БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

Анна Димитрова Димитрова

Регулация на транскрипцията на рибозомните РНК гени в реконструирани кариотипове ечемик

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен "доктор"

Научна специалност:

01.06.06 – Генетика

София, 2011 г.

Дисертацията е написана на 134 страници и включва 25 фигури и 3 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 283 литературни източника, от които 5 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения Научен съвет на секция "Молекулярна генетика" към Института по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 17. 09. 2010 г.

Докторантката към момента е главен асистент в секция "Молекулярна генетика" към Института по физиология на растенията и генетика" – БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание на жури, избрано от Научния съвет на Института по физиология на растенията и генетика – БАН с Протокол № 6/05. 05. 2011 г. и утвърдено със Заповед 381/05. 05. 2011 г. на Директора на Института по физиология на растенията и генетика – БАН.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика -БАН, бл. 21, ет. 2, ст. 225. и на Web-страницата на Института по физиология на растенията и генетика – БАН

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

Анна Димитрова Димитрова

Регулация на транскрипцията на рибозомните РНК гени в реконструирани кариотипове ечемик

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен "доктор"

<u>Научен консултант:</u> доц. д-р Евгени Ананиев

Рецензенти:

доц. д-р Елена Георгиева доц. д-р Лъчезар Карагьозов

> <u>Научна специалност:</u> 01.06.06 – Генетика

> > София, 2011 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- НОР нуклеолусен (ядърцев) организатор
- рРНК рибозомна РНК
- рДНК рибозомна ДНК
- МГС междугенен спейсер
- **UPE** Upstream Promoter Element
- **UBF** Upstream Binding Factor
- TIS Transcription Initiation Site

I. <u>УВОД</u>

Структурните хромозомни мутации (възникващи спонтанно или индуцирани изкуствено) са от голямо значение както за изясняването на някои теоретични генетични проблеми, така и за селекционната практика. Една от найсъществените последици от структурните мутации е промяната на положението на гените, което понякога може да доведе и до промяна в тяхната експресия. Този ефект, нар. позиционен, е установен при Drosophila и някои животински видове, докато данните за наличието му при растенията са оскъдни. Изясняването на механизмите, обуславящи хромозомния позиционен ефект в генната експресия представлява интерес, поради възможността, чрез промяна на позицията на гена целенасочено да се регулира неговата експресия. Удобен обект за подобен род изследвания са умерено или високо повторени генни фамилии, каквито са 18S-5.8S-25S рибозомните РНК гени. Значителен брой структурни мутанти ечемик, създадени от проф. Гечев, притежават изменения, засягащи структурата или позицията на рибозомните локуси. Наличието на генетично стабилни линии, съдържащи подобен род структурни мутации е добра предпоставка за провеждане на настоящето изследване.

Литературните данни показват, че специфична супресия на активността на рибозомните локуси може да се постигне при транспозицията им върху хромозома, носеща рибозомен локус. Това явление е нар. вътревидова нуклеоларна доминантност (вътревидово ядърцево доминиране) и се счита за позиционно обусловена проява на активността на рибозомните гени. Изясняването на механизмите, които обуславят както специфичната супресия на активни гени и подържането на неактивното им състояние, така и механизмите, обуславящи активирането на транскрипционно неактивни гени може да предостави указания за поведението и на други гени (напр. трансгени). По този начин, това явление представлява удобна моделна система за изясняване механизмите, регулиращи подтискането на генната експресия в определени локуси, в зависимост от положението им в генома, а също така за изследване на дозовите компенсационни ефекти.

II. <u>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</u>

Целта на настоящата дисертационна работа е да се проведе функционален анализ на транскрипцията на рибозомните РНК гени в реконструирани линии ечемик с различна локализация или с променена позиция или структура на ядърцевите организатори (НОРи).

За реализиране на тази цел бяха поставени следните конкретни експериментални задачи:

 Да се анализира функционалното състояние на рРНК гените посредством изследване активността на РНК полимераза I в ядра, изолирани от различни хромозомни мутанти ечемик, показващи промяна в позицията или структурата на ядърцевите организатори. Сравнителен анализ на активностите на РНК полимераза I и РНК полимераза II.

- 2. Да се определи скоростта на елонгация на насцентрните пре-рРНК вериги в система *in vitro* с изолирани ядра.
- 3. Да се изследва чувствителността на рДНК към смилане с екзогенна ДНК-аза I като мярка за активността на гените за рРНК.
- 4. Да се изследва профилът на метилиране на рРНК гените в реконструирани линии ечемик посредством метил чувствителните рестриктази Msp I, Hpa II и Hha I.

III. <u>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</u>

IV. 1. Експериментален материал

IV. 1.1. Растителен материал:

В изследването са използвани оригинални линии ечемик, получени в резултат на облъчване с γ-лъчи (дози между 100 и 200 Gy) на сухи семена от стандартния кариотип двуреден пролетен ечемик сорт Freya и транслокационната линия T-1586 (Gecheff, 1996).

Контролната линия T-1586 произлиза от сорт Freya и съдържа реципрочна транслокация, включваща късото рамо на хромозома 3H и дългото рамо на хромозома 4H (Гечев, 1978).

Нашият интерес беше насочен към линии ечемик, съдържащи хромозомни реконструкции, които засягат позицията, структурата или целостта на рибозомните локуси в хромозоми 6Н и 5Н. В зависимост от характера на хромозомната реконструкция, тези линии могат да бъдат разделени в няколко групи: транслокационни линии (T-30 и T-21) (Gecheff, 1996; Gecheff, 1989), дупликационна линия (D-2946) (Gecheff et al., 2003) и делеционна линия (T-35) (Gecheff et al., 1994).

Кариотип Т-30 произлиза от стандартния сорт Freya. В резултат на реципрочна транслокация между хромозома 5H и хромозома 6H, HOP5H е прехвърлен на хромозома 6H (Gecheff, 1996). Транслоцираният HOP е локализиран в района между дисталния хетерохроматинов сегмент и терминалния участък на дългото несателитно рамо на хромозома 6H.

Транслокационната линия T-21 произхожда от кариотип T-1586 и съдържа реципрочна транслокация между хромозоми 6H и 5H (Gecheff, 1989). Транслокационният разрив в 6H хромозома разцепва НОРа на две почти еднакви части, терминалната от които е прехвърлена в късото рамо на хромозома 5H (Gecheff et al., 2008).

Дупликационната линия D-2946 е получена след хибридизация на две транслокационни линии ечемик (T-29 и T-46), съдържащи хромозомен обмен между несателитна (4H) и сателитна (6H) хромозоми. Двата кариотипа произхождат от стандартния сорт Freya. Разположението на обменните локуси в тези линии води до дуплицирането на разположения между тях сегмент в сателитното рамо на хромозома 6H (Gecheff et al., 2003).

Линия T-35 е получена чрез интеркаларна делеция на НОР 6Н в кариотип T-1586 (Gecheff et al., 1994). В резултат на делецията този кариотип притежава един ядърцев организатор разположен на хромозома 5Н.

В експериментите са използвани 5-дневни прорастъци от анализираните линии ечемик. Семената се накисват за един час във чешмяна вода и се отглеждат върху влажна филтърна хартия, на тъмно в термостат, при 24°С.

IV. 1. 2. ДНК клонове използвани в хибридизационните

анализи:

В експериментите бяха използвани ДНК клонове, предоставени от доц. д-р Цв. Хвърлева, АгроБиоИнститут. Структурата на рибозомните РНК повтори при ечемика и използваните ДНК-сонди са представени на Фиг. 1.



Фиг. 1 Структура на рибозомните ДНК повторени единици при ечемика. Рестриктазна карта на клон Hv 014 (R10) и на късата рДНК повторена единица при ечемика. Със стрелки са означени позициите на местата на разпознаване от Есо RI и Bam HI (Hvarleva et al. 1987), както и едно от местата на Таq I. Между структурните гени за 18S и 26S рРНК с малък необозначен правоъгълник е представен структурният ген за 5.8S рРНК. Плътните червени линии над дългата рДНК повторена единица представляват ДНК-сондите използвани като специфични хибридизационни проби.

Клон Hv 014 съдържа Есо RI фрагмент с дължина 9.8 кб (R10) клониран в pBR 325 и съответства на дългата повторена единица за 18S – 26S pPHK гените, локализирани на хромозома 6H при ечемика (Ananiev et al. 1986).

Клон R1.8 представлява Ват HI – Ват HI фрагмент на клон Hv 014, субклониран в pBR 322, с дължина 1.8 кб, съдържащ част от междугенния спейсър и част от 18S pPHK гена (Hvarleva et al. 1987).

Клон R3.2 е Есо RI – Ват НІ фрагмент на клон Hv 014, субклониран в pBR 322, с дължина 3.2 кб, съдържащ 3[/]-края на 26S pPHK гена и вариабилната част на междугенния спейсър (Hvarleva et al. 1987).

В експериментите беше използван също така Есо RI - Таq I фрагмент с дължина 0.7 кб (R 0.7), получен след непълна рестрикция на клон R 3.2 с рестриктазната ендонуклеаза Таq I.

Пробите бяха подготвени за белязане чрез изолиране на вставките след рестрикция с рестриктазните ензими, по които са вмъкнати в съответните конструкти. При рестрикцията на клон Hv 014 е използвана рестриктазната ендонуклеаза Есо RI. Смилането на клон R1.8 беше извършено с Bam HI, а за рестрицирането на клон R3.2 бяха използвани рестриктазните ендонуклеази Есо RI и Bam HI. Сонда (R 0.7) беше използвана в хибридизационните анализи след елюиране от агарозния гел.

IV. 2. Методи

IV. 2. 1. Изолиране на ядра

За изолиране на ядра от 5 дневни етиолирани прорастъци ечемик бяха използвани две методики.

IV. 2.1.1. Изолиране на ядра съгласно Ananiev and Karagyozov (1984)

IV. 2.1.1. Изолиране на ядра съгласно Muller et al. (1980) и Steinmuller and Apel (1986) с малки модификации.

IV. 2. 2. Определяне на количеството на ДНК в препарати от изолирани ядра (по Burton, 1956)

- IV. 2. 3. Run-on транскрипция в изолирани ядра на ечемик
- IV. 2. 3. 1. Синтез на РНК в изолирани ядра
- IV. 2. 3. 2. Определяне на активността на РНК-полимераза I и РНК-полимераза II
- IV. 2. 4. Изолиране на геномна ДНК
- IV. 2. 5. Определяне концентрацията на ДНК
- IV. 2. 6. Разграждане на ДНК с екзогенна ДНаза I

IV. 2. 7. Хидролитично разграждане на ДНК със специфични ендонуклеази (рестриктази)

- IV. 2. 8. Фракциониране на ДНК в агарозен гел (по Manniatis et al. 1982)
- IV. 2. 9. Приготвяне на 10% полиакриламиден денатуриращ гел
- IV. 2. 10. Електрофореза на ДНК фрагменти при денатуриращи условия
- IV. 2. 11. Пренос на ДНК върху найлонови мембрани
- IV. 2. 12. Приготвяне на компетентни клетки (DH5a, HB 101) (по Manniatis et al. 1982)
- IV. 2. 13. Трансформация на компетентни клетки (по Manniatis et al. 1982)

IV. 2. 14. Изолиране на плазмидна ДНК – мини препаративно количество (по Manniatis et al. 1982)

- IV. 2. 15. Рестрикция на плазмидна ДНК
- IV. 2. 16. Извличане на ДНК фрагменти от агарозен гел

- IV. 2. 17. Хибридизация с нерадиоактивно белязана проба
- IV. 2. 18. Хибридизация с радиоактивно белязана проба
- IV. 2. 19. Авторадиография
- IV. 2. 20. Денситометриране
- IV. 2. 21. Статистическа обработка на резултатите

IV. <u>РЕЗУЛТАТИ</u>

Ечемикът има два ко-доминантни класа рибозомни РНК гени с дължина 9.8 кб и 8.8 кб, локализирани в ядърцевите организатори съответно на хромозома 6Н и хромозома 5Н (Appels et al., 1980; Saghai-Maroof et al., 1984). Тъй като всяка рДНК повторена единица при ечемика има само едно място за Есо RI, което се намира в гена за 25S pPHK (Gerlah and Bedbrook, 1979), то тази рестриктазна ендонуклеаза определя дължината на рДНК повторената единица, включваща структурните гени за 18S, 25S, 5.8S pPHK, вътрешните транскрибируеми спейсъри 1 и 2, и междугенния спейсър. Разликата между двете рДНК повторени единици се обуславя от хетерогенност по дължините на техните МГС (Saghai-Maroof et al., 1984; Hvarleva et al., 1987).

Спонтанно появилите се или експериментално индуцираните структурни хромозомни мутации биха могли да окажат влияние върху експресията на определени гени. За изследване на позиционно зависимата генна активност бяха подбрани структурни мутанти ечемик с променена позиция или структура на рибозомните РНК гени.

Като контролна линия в нашите изследвания беше използван кариотип T-1586 (Gecheff, 1996). Тази линия притежава транслокация, която не засяга позицията на ядърцевите организатори, така че може да служи като образец за сравнение на експресията на рибозомните РНК гени. Още повече, че проведените предварителни експерименти показаха, че експресията на рРНК гените в T-1586 не се различава от тази на нейната родителска форма Freya.

При транслокационната линия T-30, HOP5H е прехвърлен в дългото, несателитно рамо на хромозома 6H. Транспозицията на HOP5H води до специфично подтискане на неговата експресия (Gecheff, 1996).

Транслокационна линия T-21 е идендична с T-1586 по отношение на транслокацията 3H - 4H и включва допълнителна реципрочна транслокация между хромозоми 5H и 6H (Gecheff et al., 2008). Транслоцираната част на HOP6H не формира вторично прищъпване.

Дупликационната линия D-2946 представлява сегментен тетраплоид по медиалните участъци на хромозома 6Н. Микроскопските наблюдения показват, че в този кариотип е повишена експресията на HOP5H (Gecheff et al., 2003).

Делеционната линия T-35 представлява особен интерес за нашите изследвания по две причини. Първо, при нея е установена делеция на сегмент, съдържащ целия НОР6Н, което е свързано с ясно изразен компенсаторен ефект при експресията на останалия НОР5Н (Gecheff et al., 1994). От друга страна,

поради делецията на НОР6Н, рестриктазният профил на Т-35 позволява идентифицирането на фрагментите, произлизащи от МГС на НОР5Н.



Фиг. 2 Копийност на рРНК гените при различни реконструирани кариотипове ечемик. А/ Авторадиография на геномна ДНК изолирана от кариотипове Т-1586, Т-30, Т-21, D-2946 и Т-35 след рестрикция с Есо RI и хибридизация с ³²Р-белязан ДНК фрагмент, представляващ 10 кб рДНК повторена единица (R10). На рентгеновия филм е представена и вставката R10, отделена от плазмида след рестрикция с Есо RI. Б/ Денситограма на сканираната рентгенова плака от А. На всеки старт е нанесено едно и също спектрофотометрично определено количество геномна ДНК.

В литературата съществуват данни, че при някои транслокационни и дупликационни линии, диференциалната експресия на ядърцевите организатори е свързана с промяна в броя на рРНК гените (Subrahmanyam et al., 1994). За да проверим дали при изследваните кариотипове е настъпила амплификация или деамплификация на рРНК гените, беше проведен анализ на тяхната копийност в двата рибозомни локуса на хромозома 5Н и хромозома 6Н, които съдържат съответно 2800 копия рРНК гени с дължина 8.8 кб и 1600 копия рРНК гени с дължина 9.8 кб (Subrahmaniam and Azad, 1978). След спектрофотометрично определяне на концентрацията, геномна ДНК от контролната (Т-1586) и опитните (T-30, T-21, D-2946 и T-35) линии беше рестрицирана с Есо RI. Вставката R10, която представлява дългата рДНК повторена единица при ечемика (Ananiev et al., 1986) беше изолирана от клон Hv 014 след рестрикция с Есо RI. Получените фрагменти бяха разделени в 0.8% агарозен гел и пренесени на мембрана Hybond. Хибридизацията беше проведена с дългага рДНК повторена единица (R10) белязания с ³²Р. На авторадиографиите след хибридизацията, при линии Т-1586, Т-30, T-21 и D-2946 се откриват и двата фрагмента с дължина 9.8 кб и 8.8 кб, а при

линия Т-35 се визуализира само фрагментът с дължина 8.8 кб (Фиг. 2А). Интензив ността на сигнала на всяка една ивица беше оценена количествено. Рентгенови филми с къса експонация бяха сканирани и измерени денситометрично (Фиг. 2Б). За да се избегне грешката, която може да възникне от евентуалното нанасяне на различни количества ДНК на старта, ние сравнявахме съотношението между интензивностите на късия и на дългия рДНК повтори при Т-30, Т-21 и D-2946, с този на Т-1586. Средната стойност на това съотношение при контролната линия (Т-1586) е 1.1. При транслокационните линия (Т-30 и Т-21) това съотношение е същото, което показва, че достоверни различия в копийността на рРНК гените в трите линии не съществуват. Полученият резултат е в съгласие с данните на Papazova et al. (2001), които показват, че при кариотип T-1586 И транслокационните линии T-13, T-17 и T-30 промени в броя на рРНК гените не са настъпили в сравнение с изходната форма Freya. Обаче, при дупликационната линия D-2946 измереното съотношение между 8.8 кб и 9.8 кб рДНК повторени единици беше 1.25, което е индикация за наличие на амплификация на рРНК гените в НОР5Н. Изследванията на Subrahmanyam et al. (1994) показват критичната роля на сегмент 12-16 от сателитното рамо на хромозома 6Н за амплификацията на рРНК гените от НОР6Н и НОР5Н. Кариотип D-2946 съдържа дуплициран същия сегмент от сателитното рамо на хромозома 6Н и това корелира с повишения брой рРНК гени в тази линия.

Броят на рРНК гените в двата НОРа на изследваните линии беше изчислен по конверсионната формула на Zhang et al. (1990) с малки модификации.

 $CP = (C \times D_T \times Q_I)/D_I \times Q_T \times S_I^2,$

Където СР е броят на рРНК гените, С е размера на хаплоидния геном на ечемика (5.5 x 10⁹ pg), D_T и D_I са денситометричната стойност, съответно на растителната рДНК и на инсерта, Q_T и Q_I са нанесеното количество, съответно растителна ДНК (2 µg) и инсерт (0.2 µg), S_I² е дължината на инсерта в нд (10 кб).

Определеният по тази формула брой рРНК гени в НОР6Н за линии Т-1586, Т-30 и Т-21 беше 924, а за Д-2946 – 990 на хаплоиден геном. Броят на рРНК гените в НОР5Н за Т-1586, Т-30, Т-21 и Т-35 беше 1034, а за Д-2946 – 1232 на хаплоиден геном.

Броят на рРНК гените в двата НОРа на анализираните линии се различава от цитираните по-горе резултати на Subrahmaniam and Azad (1978). Обаче, Zhang et al. (1990) при анализиране на диворастящи растения ечемик, събрани от различни екологични райони показват съществено вътревидово вариране в количеството на рДНК и в броя на копията в двата рибозомни локуса, в зависимост от екологичните условия. Авторите установяват, че средният брой рРНК гени за локуси Rrnl и Rrn2 е съответно 962 and 917, което е в съгласие със стойностите получени при контролата и опитните варианти.

V. 2. Определяне на ендогенната ядрена РНК полимеразна активност в изолирани ядра от ечемик

Известно е, че като мярка за интензивността на процеса транскрипция може да служи определянето на ендогенната РНК полимеразна активност в система от изолирани ядра. Тя включва активностите на трите типа РНК полимерази, характерни за еукариотните организми. Изолираните ядра могат да синтезират РНК при подходящи условия, което се дължи главно на процеса елонгация (удължаване) на предварително инициираните *in vivo* пре-РНК вериги. Интензивността на транскрипцията в такава систама in vitro се определя по белег съответния РНК радиоактивния от предшестваник, включен в новосинтезирания РНК-продукт.



Фиг. 3 Активност на РНК полимераза I и РНК полимераза II в ядра изолирани от прорастъци на ечемик с модулирана експресия на НОР. Ядрата са изолирани от 5 дневни прорастъци на ечемик от съответните транслокационни линии и синтезата на РНК in vitro е осъществена съгласно Методи и Материали. Активността на ендогенната ядрена РНК полимераза I е определена в присъствието на 150 µg ml⁻¹ α-аманитин. Активността на ендогенната ядрена РНК полимераза II е определена в присъствието на а сиределена по разликата между общата РНК полимераза активност и активността на α-аманитин-нечувствителната РНК полимераза I.

За функционалния анализ на транскрипцията на pPHK гените в контролата и в опитните линии ечемик беше проведена "run-on" – транскрипция с изолирани ядра. Транскрипцията на pPHK гените беше определена посредством измерване на активността на PHK полимераза I. За диференциалната активност на ензима съдехме по включването на ³²P[УТФ] в състава на новосинтезираната PHK в присъствие на високи дози α-аманитин (150 мкг/мл). Установено е, че при такива

дози на токсина се потиска напълно не само активността на чувствителната към αаманитин РНК полимераза II, но и на РНК полимераза III (Gaudino, Pikaard, 1997). Активността на РНК полимераза II беше определена по разликата между общата ядрена РНК полимеразна активност и тази на нечувствителната към α-аманитин РНК полимераза І. В нашите опити беше установено, че делът на РНК полимераза III от общата полимеразна активност е 3-5%. Резултатите показаха, че при всички линии ечемик с изключение на Т-35 не се наблюдават съществени промени в активността на двете основни ядрени РНК полимерази (Фиг. 3). Делът на РНК полимераза I и на РНК полимераза II в *in vitro* системата за биосинтез на РНК с изолирани ядра при транслокационните (Т-30 и Т-21) и дупликационната (D-2946) линии е сравним с този на контролната (Т-1586) линия. Съотношението между активностите на РНК полимераза I и РНК полимераза II в T-1586, T-30, T-21 и D-2946 е 60% към 40%. Тези съотношения са в съгласие с резултатите получени при други растителни обекти (Ananiev et al., 1987; Gaudino, Pikaard, 1997). При линия T-35, обаче, активността на РНК полимераза I нараства с 44% в сравнение с контролния вариант, докато тази на РНК полимераза II практически не се променя. От този резултат следва, че само при делеция на единия НОР (НОР6Н) се наблюдава компенсаторен стимулаторен ефект върху транскрипциата на рРНК гените в единствения останал НОР5Н. При мутантните линии T-30 и T-21 не се наблюдават съществени различия в активността на РНК полимераза I (Фиг. 3). Този резултат е в съгласие с предишни данни относно РНК полимеразната активност при транслокационната линия Т-506, при която е осъществено прехвърляне на НОРа от хромозома 5Н на противоположното рамо на хромозома 6Н (Karagyozov et al., 1986). Промяна в активностите на двете полимерази не се забелязва и при линия D-2946, при която се наблюдава амплификация на рРНК гените

V. 3. Изследване на транскрипцията на рРНК гените *in vitro* за кратки периоди от време.

Стимулацията при транскрипцията на единствения НОР5Н в делеционната линия T-35 може да се дължи на следните обстоятелства: 1) увеличена скорост на елонгация на транскрипцията при запазен постоянен брой на активните pPHK гени и брой на транскрибиращите молекули PHK полимераза I; 2) увеличена скорост на инициация на транскрипцията *in vivo*, в резултат на което се увеличава и броя на активните молекули PHK полимераза I върху рибозомния цистрон (packing density); 3) увеличаване "дозата" на активните гени от единствения запазен HOP5H, които участват в транскрипцията.

По принцип при "run-on"-транскрипцията с изолирани ядра биосинтезата на РНК се осъществява само за сметка на елонгацията на преформираните *in vivo* активни транскрипционни комплекси (насцентни РНК вериги). В условия *in vitro* не се осъществява ре-инициация на транскрипцията (Ananiev et al., 1987). С цел по-детайлно изследване на компенсаторния ефект върху транскрипцията на рРНК гените от елиминирането на НОР6Н при линията Т-35, ние проведохме опит с изолирани ядра от този вариант и контролата за максимално кратко време (секун-



Фиг. 4 Кинетика на транскрипцията на рРНК гените в изолирани ядра от стандартния кариотип Т-1586 и от делеционната линия Т-35. Активността на ендогенната ядрена РНК полимераза е определена в присъствие на 150 µg/ml α-аманитин.

ди). Намаляването на времето за биосинтеза на РНК цели максималното намаляване на дела на скоростта на елонгация в транскрипцията in vitro, така че включването на белязания предшественик на РНК да се определя главно от броя на молекулите РНК полимераза I, които участват в активна транскрипция. Биосинтезата на РНК беше оценена по включването на ³²Р[УМФ] в насцентните пре-рРНК вериги за 30, 60 и 120 сек. Получените резултати показаха (Фиг. 4), че за максимално кратко време от 30 сек, както при контролния вариант, така и при мутантната линия Т-35 се наблюдава една и съща синтеза на белязан пре-рРНК продукт. При следващите точки (60 и 120 сек) силно нараства включването на 32 P[VM Φ] в новосинтезираната PHK (съответно 53 и 55 %). Може да се допусне, че еднаквото включване на белязания РНК предшественик за период от 30 сек както в контролната линия, така и при линията с делетиран НОР6Н, може да се дължи на еднакъв брой активни молекули РНК полимераза I от състава на преформираните в условия *in vivo* транскрипционни комплекси. Бързата стимулация транскрипцията в Т-35 за следващия период от време (60 и 120 сек) се дължи на увеличената скорост на елонгация, която съвпада с отчетената по-рано стимулация в активността на РНК полимераза I при други условия на опита (вж. Фиг. 3). Трябва да се отбележи, че стимулацията на транскрипцията на рРНК гените в Т-35 е специфична и се различава от хормоналната стимулацията на експресията на рРНК гените под влияние на цитокинините в изолираните семедели на тиквичка (*Cucurbita pepo* L. zucchini) (Абдулова, 2006). В този случай, за максимално кратко време се натрупва 2 пъти повече белязан РНК продукт в опитния вариант, т.е. кривата на цитокининовия вариант стартира от два пъти по-висока точка на ординатата (Абдулова, 2006). За разлика от случая при Т-35, повлияната от цитокинини стимулация на транскрипцията на рРНК гените при изолираните семедели на тиквичка предполага и възможно увеличение на броя на активните молекули РНК полимераза І.

Трябва да се уточни, че използвания от нас метод не е еднозначен, защото той не може да елиминира процеса на елонгация макар и за такъв кратък период от време. Необходимо е използването на други по-чувствителни методи за анализ.

V. 4. Картиране на рРНК гените при ечемика по рестриктазната ендонуклеаза Есо RV

Промените в транскрипцията на pPHK гените може да се определят не само от активността на ензима PHK полимераза I, но и да се дължат на променена конформация на pДHK и/или модификации на генно ниво. Добре известно е, че pPHK гените се състоят както от високо консервативни райони, кодиращи биосинтезата на двете големи рибозомни PHK (18S pPHK и 25S pPHK), така също и от силно вариабилни междугенни спейсъри (МГС) и от вътрешни транскрибируеми участъци (ITS1 и ITS2). Ето защо следващ етап от експерименталната работа беше да се подберат съответните ресткриктазни ендонуклеази, с помощта на които да се разграничат отделните участъци по протежение на рДНК повторените единици. С този анализ се целеше да се улесни работата при изследване на евентуалните промени в ДНК секвенциите на рибозомните PHK гени в избраните от нас транслокационни линии при ечемика.

Основен метод при анализа на рРНК гените е методът на молекулната хибридизация със специфични ДНК проби (хибридизационни проби), които покриват различни участъци от повторената рДНК единица. С цел изготвяне на по-детайлна рестриктазна карта на рРНК гените при ечемика беше проведен Southern блот анализ с помощта на два рестриктазни ензима (Есо RI и Есо RV) и няколко рДНК проби (R10, R1.8, R3.2 и R3.8).

Както беше споменато по-рано, при ечемика, рестрикционната ендонуклеаза Есо RI диференцира две основни рДНК повторени единици с дължина 8.8 кб и 9.8 кб. От друга страна, изследванията на Saghai-Maroof et al. (1984) и Kumar and Subrahmanyam (1999) показват, че рестриктазата Eco RV генерира три фрагмента в рДНК повторените единици на ечемика, с дължина 7.0 кб, 6.1 кб и 2.9 кб. Клон Hv 014 съдържа целия повтор от дългата рДНК повторена единица (означен като R10), включена по Есо RI в плазмид pBR325 (Ananiev et al. 1986). При пълна рестрикция на R10 с Ват НІ се генерират четири фрагмента с дължина съответно 1.8 кб, 3.2 кб, 3.8 кб и 1.0 кб. Тези фрагменти са субклонирани във вектор pBR322 от Hvarleva et al. (1987). Авторите показват, че субклоновете R1.8 и R3.2 съдържат основно участъци от МГС, а субклоновете R3.8 и R1.0 съдържат кодиращата част на рРНК гените.

Вставката (R10), която включва цялата повторена рДНК единица в клона Hv014 беше отделена от плазмида pBR325 чрез смилане с Есо RI. Изолираният ДНК фрагмент с дължина 9.8 kб беше допълнително фрагментиран с рестриктазната ендонуклеаза Есо RV. Геномна ДНК от кариотип T-1586 беше рестрицирана с Есо RI/Есо RV и с Есо RV. Получените фрагменти след рестрикцията на вставката и на геномната ДНК бяха разделени в 0.8% агарозен гел и пренесени на мембрана Hybond. Хибридизацията беше проведена с белязани с дигоксигенин (DIG-UTP) ДНК проби, изброени по-горе. След хибридизация с R10 се визуализират фрагменти с дължина 3.7 кб, 3.2 кб, 2.9 кб и 2.7 кб (Фиг. 5А). Хибридизацията със субклоновете R3.2, R1.8 и R3.8 показва, че фрагментите с дължина 3.7 кб и 2.7 кб включват основно последователности от МГС на рДНК



Профил Фиг. 5 след Southern хибридизация на ДНК от ечемик. Геномна ДНК от Т-1586 беше рестрицирана с Есо RI/Есо RV и с Есо RV. Вставката R10 беше отделена от плазмида с Есо RI и Eco беше рестрицирана с RV. Хибридизацията беше осъществена с белязани с DIG сонди: R10 дългата повторена рДНК единица на ечемика (А), R3.2 - субклон на R10, съдържащ 3/-края на 25S рРНК гена и вариабилната част на МГС (Б), R1.8 - субклон на R10, съдържащ част от МГС и част от 18S рРНК гена (В) и R3.8 – субклон на R10, съдържащ част от 18S, целия 5.8S и част от 25S рРНК гените (Г). М - молекулен (ДНК маркер фаг, от λ фрагментирана с Есо RI и Hind III).

повторените единици, съответно от НОР6Н и НОР5Н, а фрагментите с дължина 3.2 кб и 2.9 кб съдържат последователности от структурните гени за 18S и 25S рРНК (Фиг. 5Б, В, Г). Тези данни бяха използвани, за да се картират относителните позиции на Есо RV местата в рРНК гените при ечемика, показани на Фиг. 6. Позициите на кодиращите участъци ca определени по аналогия със съществуващите рестриктазни карти на рРНК повторените единици при ечемика (Appels et al., 1980; Hvarleva et al., 1987). Единичната рестрикция на геномна ДНК от линия T-1586 с Есо RV и хибридизация с R10 води до появата на три фрагмента с дължина 6.9 кб, 5.9 кб и 2.9 кб (Фиг. 5А). Хибридизацията със субклоновете показва, че първите два фрагмента съдържат целия структурен ген за 25S рРНК,

както и по-голямата част от МГС съответно при дългата и при късата рДНК повторена единица (Фиг. 5Б, В и Г).

Проведеният анализ показва, че рестриктазната ендонуклеаза Eco RV е много удобна за нашите изследвания тъй като генерира сравнително малко на брой фрагменти, които съдържат важни структурни участъци от състава на повторената рДНК единица при ечемика.



Фиг. 6 Рестриктазна карта на 18S-5.8S-25S рРНК повторената единица при ечемика. Със стрелки са означени позициите на местата разпознавани от Есо RI и Ват HI. С червени стрелки са означени местата разпознавани от Есо RV. С малки необозначени представени правоъгълници са структурните гени за 5.8S рРНК. МГС – междугенен спейсър.

След като бяха картирани относителните позиции на Eco RV местата в рРНК гените при контролната линия (Т-1586) ечемик, в базата данни бяха публикувани секвинциите на МГС на дългата (GenBank HQ825319, Georgiev et al,



Фиг. 7 Рестриктазна карта на 18S-5.8S-25S рРНК повторената единица при ечемика. Със стрелки са означени позициите на местата на разпознаване от Есо RI, Ват HI и Есо RV. С малки необозначени правоъгълници са представени структурните гени за 5.8S рРНК. МГС – междугенен спейсър. Павите повтори с дължина 79 нд са означени със зелени правоъгълници. Правите повтори с дължина 116 нд са означени със сини правоъгълници. Промоторът е означен с пурпурен квадрат.

дължина на МГС – 4000 нд) и на късата (GenBank AF1475501, Klarholz and Hildebrandt, 1999, дължина на МГС – 2500 нд) рДНК повторени единици, както и на вътрешните транскрибируеми спейсъри 1 и 2 и първичната структура на 5.8S рРНК гена (GenBank FJ593180, Daniel and Knoess, 2009). Тези данни бяха използвани за създаването на рестриктазна карта, която да показва по-ясно структурата на рибозомната ДНК при ечемика (Фиг. 7). Според нуклеотидните последователности, 5' края на МГС и на двата повтора съдържат 7 копия пълни или частични прави повтори с дължина 79 нд. Непосредствено след тях се откриват пълни или частични прави повтори с дължина 116 нд, чийто брой в МГС на дългата повторена рДНК единица е 20, а в МГС на късата повторена рДНК единица е 6 (Фиг. 7). Позицията на промотора беше определена по аналогия с публикуваната нуклеотидна последователност при пшеницата (GenBank X07841, Barker et al., 1988). Участьците от рРНК гените кодиращи зрелите 18S, и 25S рРНК са силно консервативни и много близки по нуклеотидна последователност дори при отдавна дивергирали видове (Хаджиолов, 1981). Затова при определянето на позициите на кодиращите участъци бяха използвани данните получени след секвиниране на 18S pPHK (Gen Bank AY049040, Alkemar et al., 2001) и за 25S pPHK (Gen Bank AY049041, Alkemar et al., 2001) при пшеницата.

V. 5. Рестрикция на субклон R3.2 по рестрикназната ендонуклеаза TaqI

Широко използван метод за изследване профила на метилиране и за идентифициране на местата на скъсване от ДНаза I е методът на "индиректното крайно белязане" (Wu, 1980; Nedospasov and Georgiev, 1980). При този метод белязаната ДНК-проба хибридизира с единия край на дефиниран от дадена рестриктазна ендонуклеаза фрагмент от геномната ДНК. Дължината на така формирания радиоактивен /белязан/ ДНК-ДНК дуплекс съответства на разстоянието определено от едната страна от съответния рестриктазен сайт, а от другата страна от деметилираното или чувствителното към ДНаза I място.

С цел създаване на специфична рДНК проба за анализиране на профила на метилиране и за картиране на чувствителните към ДНаза I места в състава на МГС в анализираните линии беше проведена рестрикция на субклон R3.2 с рестриктазната ендонуклеаза TaqI. Субклон R3.2 съдържа 3[/]-края на гена за 25S рРНК и по-голямата част от МГС на повторената рДНК единица (Фиг. 8Б), включени по EcoRI и Bam HI в плазмид pBR322 (Hvarleva et al., 1987).

С цел да се определят условията за пълна и непълна рестрикция с рестрикционната ендонуклеаза TaqI, вставката R3.2, след отделяне от плазмида, беше фрагментирана с посочения ензим, при условия препоръчани от фирмата производител (Fermentas, Lathuania), за различни периоди от време (15 мин, 30 мин, 45 мин и 1 ч).

Пълната рестрикция на вставката R3.2 с рестриктазата TaqI води до появата на три фрагмента с относителна дължина 2.5, 0.4 и 0.3 кб. При непълна рестрикция на същата вставка с рестриктазата TaqI се получават четири фрагмента

с относителна дължина 2.5, 07, 0.4 и 0.3 кб (Фиг. 8А). Фрагментът с дължина 0.7 кб съдържа 3'-края на гена за 25S рРНК (около 400 нд) и малка част от 5' края на МГС



Фиг. 8. Рестрикция на субклон R3.2 по TaqI. А/ Рестриктазен профил на рибозомен клон R3.2. Старт 1) ДНК маркер, 2) рестрикция на pR3.2 с EcoRI и BamHI; 3) елюираната вставка, с дължина 3.2 кб (R3.2); 4) и 5) пълна и непълна рестрикция на R3.2 с TaqI; 6) елюираният фрагмент с дължина 0.7 кб, след непълна рестрикция с TaqI. Б/ Рестриктазна карта на клон Hv 014. Със стрелки са обозначени позициите на местата разпознавани от EcoRI и Bam HI. С червени стрелки са обозначени местата разпознавани от Taq I във вставката pR3.2. Линията над рибозомния повтор представлява вставката R3.2. С TaqI е обозначен 0.7 кб фрагмент, използван при хибридизацията. МГС – междутенен спейсър.

(около 300 нд) (Фиг. 8Б). Именно EcoRI–TaqI фрагментът с дължина 0.7 кб (R0.7) след елюиране от агарозния гел беше използван в хибридизационните анализи.

V. 6. Анализ на чувствителността на рДНК към смилане с екзогенна

ДНаза I в кариотипове ечемик с модулирана активност на нуклеолусните

организатори.

Известно е, че участъците от хроматина, които са ангажирани в процес на активна транскрипция притежават повишена чувствителност към действието на нуклеази и поради това тези изследвания намират широко приложение при изучаване на връзката между структурата на хроматина и генната експресия (Weintraub and Groudine, 1976).

Като критерий за активността на гените за рРНК в мутантните линии (Т-30, Т-35 и D-2946) изследвахме чувствителността на рДНК към смилане с екзогенна ДНаза I. Изолираните ядра от контролната линия и опитните варианти бяха обработени с нарастващи концентрации ДНазаI.

Състоянието на хроматина в изолираните ядра има голямо значение при изследване на неговата чувствителност към действието на екзогенните нуклеази. Евентуалните физически скъсвания на ДНК, получени по време на изолирането на ядрата, биха интерферирали и изменили картината на предизвиканите от екзогенната ДНаза I съсвания на рДНК. Ето защо първоначално беше анализирана чувствителността на тоталния хроматин на ечемика към действието на този ензим. За целта аликвоти от третираните ядра и от изолираната след това ДНК бяха фракционирани електрофоретично. Продуктите, получени след третирането на ядрата с ДНаза I, бяха разделени в полиакриламиден гел при денатуриращи условия а ДНК – в агарозен гел. Резултатите показаха, че мекото смилане с ДНКаза I води до появата на ясно изразена "нуклеозомна" стълбица, наблюдавана и при други растителни обекти (Spiker et al., 1983; Georgieva and Karapchanska, 1990; Conconi and Ryan, 1993).

За да се анализира чувствителността на рДНК към смилане с екзогенна ДНаза I в контролния и опитните варианти, изолираната след нуклеазно третиране ДНК беше фрагментирана с рестриктазната ендонуклеаза Есо RV. Получените фрагменти бяха разделени в 0.8% агарозен гел и пренесени на мембрана Hybond. Хибридизацията на мембраните беше осъществена със сондата R10, която включва целия повтор от дългата рДНК повторена единица.Резултатите показаха, че обработването на ядрата с нарастващи концентрации ДНаза I води до постепенното разграждане на ДНК.

Степента на разграждане на рДНК в изследваните линии беше оценена количествено, като площта на всяка ивица беше определена денситометрично. Не бяха наблюдавани статистически достоверни различия при разграждането на рДНК в линии Т-1586, Т-30 и Т-35. При дупликационната линия (D-2946) се наблюдава относително по-висока резистентност на рДНК към смилане с ДНаза I. Може да се предположи, че допълнителните копия рРНК гени са неактивни, а броят на активните гени остава непроменен в сравнение с контролната линия (T-1586). Аналогичен резултат е получен с анеуплоидни пилешки клетки, при които повишената доза рРНК гени не води до промяна в броя на активните рРНК гени (Muscarella et al., 1987).

Известно е, че основна мишена за екзогенните нуклеази при рРНК гените са ДНК последователностите от МГС (Reeder, 1984; Thompson and Flavell, 1988). В експериментите бяха използвани две ³²Р-белязани ДНК проби (R1.8 и R3.2), които покриват целите МГС на рДНК повторените единици от двата НОРа. За картирането на хиперчувствителните места са използвани рентгенови филми от два независими експеримента, както и авторадиографии на една и съща мембрана с различно време на експонация.

При използването на сонда R1.8, на авторадиографиите се откриват и трите фрагмента генерирани от Есо RV с дължина съответно 6.9 кб, 5.9 кб и 2.9 кб (Фиг. 9). Обработването на ядрата с ниски концентрации ДНаза I (0.2 ед/мл) води

до появата на фрагмент с дължина 1.2 кб. При по-високи концентрации на ДНаза I (1.0 ед/мл и 2.0 ед/мл) се откриват фрагменти с по-голяма дължина (2.5 кб, 1.5 кб и 2.7 кб). Фрагментът с дължина 2.5 кб присъства в контролната (T-1586), в транслокационната (T-30) и в дупликационната (D-2946) линии, и липсва в делеционната (T-35) линия, което е указание, че той се генерира от наличието на хиперчувствително място в рРНК гените от НОР6Н. Поради това, че фрагментът с дължина 1.5 кб присъства и в четирите линии, вероятно се генерира от хиперчувствително място в рРНК гените от НОР5Н.



Фиг. 9 Чувствителност към смилане с екзогенна ДНаза I на рДНК от ечемик. Изолираните ядра бяха обработени с ДНазаІ. Екстрахираната след нуклеазното третиране ДНК беше рестрицирана с Есо RV. Хибридизацията беше проведена с белязана с ³²Р сонда R1.8, съдържаща част от МГС и част от 18S рРНК гена. Старт 1, 5, 9, 13 -"имитирано" смилане, в отсъствие на ДНаза I; старт 2, 6, 10, 14 - 0.2 ед/мл; старт 3, 7, 11, 15 -1.0 ед/мл; старт 4, 8, 12, 16 - 2.0 ед/мл. От ляво дадена дължината на фигурата e на генерираните фрагменти в кб.

При използването на сонда R3.2 на авторадиографиите се откриват генерираните от Есо RV фрагменти с дължина съответно 6.9 кб и 5.9 кб. Обработ-



Фиг. 10 Чувствителност към смилане с екзогенна ДНаза I на рДНК от ечемик. Изолираните ядра бяха обработени с ДНазаІ. Екстрахираната след нуклеазното третиране рестрицирана с ДНК беше Eco RV. Хибридизацията беше проведена с белязана с ³²Р сонда R3.2, съдържаща 3/-края на 25S рРНК гена и вариабилната част на МГС. Старт 1, 5, 9, 13 - "имитирано" смилане, в отсъствие на ДНаза I; старт 2, 6, 10, 14 - 0.2 ед/мл; старт 3, 7, 11, 15 - 1.0 ед/мл; старт 4, 8, 12, 16 - 2.0 ед/мл. От ляво на фигурата е дадена лължината на генерираните фрагменти в кб.

ването на ядрата с ниски концентрации на ДНаза I (0.2 ед/мл) води до появата на фрагменти с дължина 5.5 и 4.5 кб (Фиг. 10). Поради това, че фрагментът с дължина 5.5 кб присъства в контролната (T-1586), в транслокационната (T-30) и в

дупликационната (D-2946) линии и липсва в делеционната (T-35) линия, вероятно се генерира от свръхчувствително място в рРНК гените от НОР6Н. Фрагментът с дължина 4.5 кб присъства в четирите линии, което подсказва, че се генерира от свръхчувствително място в рРНК гените от НОР5Н. При инкубация на ядрата с повисоки концентрации на ДНаза I (1.0 и 2.0 ед/мл) се наблюдават и други ДНК фрагменти с дължина 4.0, 2.5 и 1.5 кб.

Картирането на получените с двете сонди фрагменти показва, че две от хиперчувствителните места се локализират в групата от повторени елементи с дължина 116 нд на рРНК гените, съответно на хромозома 6H и хромозома 5H. Други две хиперчувствителни места са разположени в групата от повторени елементи с дължина 79 нд на рРНК гените на НОР6H и НОР5H. Фрагментът с дължина 2.9 кб, който се визуализира само със сонда R1.8, вероятно се формира от свръхчувствителни места локализирани между предполагаемия промотор и 5⁷ края на структурния ген за 18S рРНК в двете повторени единици (Фиг. 11).



Фиг. 11 Рестриктазна карта на повторените рДНК единици при ечемика. На рестриктазната карта са обозначени: позициите на местата в МГС с хиперчувствителност към ДНаза I (червени триъгълници), структурните гени за 18S – 25S рРНК, групата от повторени елементи с дължина 79 нд, групата от повторени елементи с дължина 79 нд, групата от повторени елементи с дължина 116 нд, предполагаемият промотор (TIS) и двете сонди, използвани в хибридизационните анализи (R1.8 и R3.2). МГС – междугенен спейсър.

Аналогични резултати са получени при пшеницата. Единадесет места с повишена чувствителност към ДНаза I са установени в А субповторите (с дължина 135 нд) на МГС. Три допълнителни места са картирани в В субповторите (с дължина 150 нд) на МГС, които са разположени в посока 5' от А субповторите. Две места са локализирани между групата от повторени елементи и 5' края на структурния ген за 18S рРНК, близо до мястото за начало на транскрипцията (Thompson and Flavell, 1988).

За да потвърдим или отхвърлим предположението, че наблюдаваната диференциална чувствителност на рРНК гените към смилане с екзогенна ДНаза I отразява специфични свойства на рДНК в изследваните линии, а не се дължи на особености в първичната структура на рДНК, бяха проведени контролни експерименти за фрагментиране на пречистена геномна ДНК с ДНаза I при стандартната линия Т-1586. Разграждането на "гола" геномна ДНК беше осъществено при същите условия, използвани за смилане на хроматина, с изключение на това, че ДНаза I беше добавена в 2-3 порядъка по-ниски концентрации (0.002 ед.мл⁻¹, 0.01 ед.мл⁻¹ и 0.02 ед.мл⁻¹ ДНаза I). След третирането, ДНК беше рестрицирана с Есо RV, разделена в 0.8% агарозен гел, пренесена на мембрана Hybond. Хибридизацията беше осъществена с ³²Р-белязана ДНК сонда (R10). Резултатите показаха, че геномната ДНК се смила много по-бързо от ДНК в състава на тоталния хроматин. Освен това не се появяват допълнителни фрагменти подобни на тези, наблюдавани в рДНК. Получените данни ни дават основание да приемем, че наблюдаваните свръхчувствителни места в МГС се обуславят от структурата на рДНК и не зависят от нуклеотидната последователност и/или специфични нагъвания на ДНК.

Съвпадение между местата с повишена чувствителност към ДНаза I и последователности от МГС (генни и спейсърни промотори, енхансерни последователности) с важна регулаторна функция е установено при изследване на други растения и животни (Kaufman et al., 1987; Abdulova and Ananiev, 2003; Reeder, 1984). Например при пшеницата и царевицата с повишена чувствителност към ДНаза I са места в близост до промотора, места, които се намират в къси повтори, изпълняващи енхансерна функция, както и места локализирани в повтори, за които се предполага, че функционират като спейсърни промотори (Thompson and Flavell, 1988; Jupe and Zimmer, 1993). Освен това при пшеницата е установена пряка корелация между генната активност и чувствителността към ДНаза I като местата с повишена нуклеазна чувствителност са локализирани в МГС на гените от активните (доминантни) локуси (Thompson and Flavell, 1988).

При изолирани семедели от тиквичка (*Cucurbita pepo* L. zucchini) хиперчувствителните към ДНаза I места също са локализирани в близост до генния и спейсърния промотори, както и в околността на терминатора на транскрипциата (Abdulova and Ananiev, 2003).

Нашите резултати показаха, че структурните мутации свързани с промяна в позицията, в целостта на единия от НОР-и, както и при амплификация на рРНК гените в единия от ядърцевите организатори не водят до забележими промени в компактността на рДНК. Тези резултати са индикация, че позиционно-зависимата експресия на рРНК гените при ечемика, най-вероятно не е свързана с промени в броя на активните рРНК гени.

V. 7. Анализ на профила на метилиране на МГС на рРНК гените при ечемика

Метилирането на цитозиновите остатъци в ДНК е широко разпространена ковалентна модификация, посредством която се регулира генната експресия. Приема се, че по-ниската степен на метилиране на ДНК корелира с по-високата активност на гените и обратното. С цел да се изясни има ли връзка между променената позиция или структура на НОРи и метилирането на цитозина в рРНК гените, беше изследван профилът на метилиране на рДНК при опитните варианти в сравнение с контролната линия.

Метилирането в CG динуклеотидите успешно се изследва с помощта на метил-чувствителните рестриктазни ензими – изошизомерната двойка рестриктазни ензими Msp I/Hpa II и рестриктазна ендонуклеаза Hha I.

Рестриктазната ендонуклеаза Msp I е активна при метилиран вътрешен цитозин и се инхибира в случай на метилиран външен цитозинов остатък в последователността -CCGG-, както и при метилиране и на двата цитозинови остатъка. Рестриктазната ендонуклеаза Нра II е активна само ако и двата остатъка в същата секвенцията ca неметилирани. **ПИТОЗИНОВИ** рестриктаза Hha Ι разпознава тетрануклеотидната Метилчувствителната последователност -GCGC-, като не предизвиква скъсвания, когато и двата цитозинови остатъка (поотделно или заедно) са метилирани.

Пречистена геномна ДНК от контролната и опитните линии беше фрагментирана с Есо RV, а след това поотделно атакувана с рестриктазите Msp I, Нра II или Hha I. Дължината на получените фрагменти беше определена след пренос (Southern-blotting) върху Hybond мембрана и последваща хибридизация със субклоновете R1.8 и R3.2 на клон Hv 014 белязани с [α^{32} P]СТР.

Проведените от нас анализи с метилчувствителните рестриктазни ензими не показаха разлика в профила на метилиране на рДНК, изолирана от контролната линия и от опитните варианти. Резултатите потвърждават установения от Рараzova et al. (2001) факт, че при едносемеделните растения, както и при животните (Grozdanov and Karagyozov, 2002) основно е метилирана последователността -CpG-, за разлика от тиквичката при двусемеделните, където съществува метилиране и на последователността –CpNpG- (Ananiev et al., 2003).

Отсъствието на разлики между профила на метилиране на рДНК при контролата и транслокационната и дупликационната линии показва, че диференциалната експресия на НОРи не винаги корелира с метилирането на рДНК. Например анеуплоидни пилешки клетки с повишена доза рДНК имат диплоидни нива на синтезирана рРНК и не показват промяна в профила на метилиране на рРНК гените (Muscarella et al., 1987). Subrahmanyam et al. (1994) показват, че амплификацията на рРНК гените в дупликационни линии ечемик е съпроводена от повишена резистентност на рДНК към Ват НІ и ТаqІ, без съществена промяна в профила на метилиране в сравнение с контролата и транслокационните линии ечемик. При тиквичка 2 - 4 кратно стимулиране на транскрипцията на рРНК гените след *in vivo* третиране с фитохормона цитокинин (6-БАП) не води до промени в профила на метилиране на рДНК (Ananiev et al., 2003).

Трябва да се отбележи, че използваните в анализите рестрикционна ендонуклеаза (Есо RV) и рДНК проби (R1.8 и R3.2) се оказаха неудачно съчетани за картиране на деметилираните места в състава на МГС, поради трудността да

бъдат дефинирани от кои по-точно рестриктазни места се генерират ДНК фрагментите с определена дължина. Изследванията на други автори показват, че много по-подходящ за тази цел е методът на "индиректното крайно белязане".

За картирането на Msp I/Hpa II и Hha I местата бяха използвани публикуваните в базата данни нуклеотидни последователности на МГС на дългата и на късата рДНК повторени единици. Според наличните нуклеотидни последователности в МГС на дългата рДНК повторена единица на ечемика има 8 места разпознавани от метил-чувствителните рестриктазни ензими Msp I/Hpa II. Две от тези места са в позиции 830 нд и 1000 нд, разположени в групата от повторени елементи с дължина 79 нд. Други четири места са локализирани в субповторите с дължина 116 нд. Две Msp I/Hpa II места се намират между предполагаемия промотор и 5'-края на структурния ген за 18S рРНК (вж. Фиг. 13). В МГС на късата рДНК повторена единица на ечемика има 9 места разпознавани от Msp I/Hpa II. Три от тези места са в позиции 611 нд, 830 нд и 1000 нд, разположени в групата от повторени елементи с дължина 79 нд. Три Msp I/Hpa II местата се намират в групата от повторени елементи с дължина 116 нд. Между предполагаемия промотор и 5'-края на структурния ген за 18S рРНК (вж. Фиг. 13).

Разпознаваните от Hha I места в МГС на дългата рДНК повторена единица на ечемика са 42. Две от тези места са разположени в групата от повторени елементи с дължина 79 нд. В субповторите с дължина 116 нд се локализират 35 Нha I места, а 1 място се намира между предполагаемия промотор и 5⁷ края на структурния ген за 18S рРНК. Освен това три Нha I места са разположени между групата от повторени елементи с дължина 79 нд и групата от повторени елементи с дължина 116 нд. Едно място се локализира между структурния ген за 25S рРНК и групата от повторени елементи с дължина 79 нд (вж. Фиг. 15). В МГС на късата рДНК повторена единица има 15 места разпознавани от метил-чувствителния рестриктазен ензим Hha I. Две от местата са локализирани в групата от повторени елементи с дължина 79 нд. В групата от повторени елементи с дължина 116 нд са разположени 6 Hha I места. Три места се откриват между предполагаемия промотор и 5[/] края на структурния ген за 18S рРНК. Както и при дългата повторена рДНК единица, 3 Hha I места се откриват между групата от повторени елементи с дължина 79 нд и групата от повторени елементи с дължина 116 нд, а едно място се локализира между структурния ген за 25S pPHK и групата от повторени елементи с дължина 79 нд (Фиг.15).

За картирането на деметилираните места в състава на МГС беше анализиран профилът на метилиране на контролната (T-1586), делеционната (T-35) и една от транслокационните (T-21) линии. Пречистена геномна ДНК от T-1586, T-35 и T-21 беше фрагментирана с Есо RI, а след това поотделно атакувана с рестриктазите Msp I/Hpa II или Hha I. Дължината на получените фрагменти беше определена чрез метода на "индиректното крайно белязане" със сонда R0.7 белязана с [α ³²P]СТР. Фрагментирането на ДНК от T-1586 и T-35 с Есо RI доведе до появата на очакваните ивици с дължина 9.8 кб и 8.8 кб при контролата и 8.8 кб при

делеционната линия (Фиг. 12Б, старт 2 и 9). За по-точното определяне на дължината на получените Msp I фрагменти бяха използвани рентгенови филми с по-къса експонация, а за да се визуализират по-слабите Hpa II ивици, бяха използвани рентгенови филми с по-дълга експонация.



Фиг. 12 Профил на метилиране на рДНК от ечемик. Геномна ДНК от анализираните линии беше рестрицирана с Есо RI и след това поотделно с Мяр I или Нра II. Хибридизацията беше проведена с Есо RI-Taq I фрагмент, с дължина 0.7 кб, включващ З' края на структурния ген за 25S рРНК и 5' края на МГС. А/ Авторадиография след рестрикция с Есо RI и Мяр I и хибридизация с R0.7. От дясната страна на авторадиографията е отбелязана дължината на генерираните фрагменти в кб. Б/ Авторадиография след рестрикция с Есо RI и Мяр I и мяр I/Нра II и хибридизация с R0.7 Със стрелка е отбелязан новогенерирания фрагмент. М – ДНК маркер.

След рестрикция с Есо RI/Msp I и хибридизация с R0.7, се визуализират фрагменти с относителна дължина от 4.5 кб до 0.3 кб при T-1586 и от 3.4 кб до 0.3 кб при T-35 (Фиг. 12А). Картирането на тези фрагменти показва, че ивиците с дължина 0.3 кб и 0.4 кб се формират от Msp I/Hpa II места в структурния ген за25S рPHK на двете повторени рДНК единици (Фиг. 13). Фрагментите с дължина 1.9 кб, 2.1 кб, 2.8 кб, 3.1 кб и 3.9 кб в T-1586 се генерират от Msp I места в междугенния спейсър на дългата повторена единица на pPHK гените от HOP6H, тъй като липсват в T-35. Профилът на метилиране на T-21 (Фиг. 12А, Б) не се различава от този на контролата по големина, брой или интензитет на ивиците.

Фрагментите генерирани след рестрикция с Есо RI/Hpa II и хибридизация с R0.7 са с относителна дължина от 0.8 кб до 7.3 кб в T-1586, и от 0.8 кб до 6.2 кб в T-35. Профилът на метилиране на T-21 не се различава от този на контролата (Фиг. 12Б).



Фиг. 13 Рестриктазна карта на рДНК повторените единици при ечемика. На рестриктазната карта са обозначени: дължините на фрагментите, които се получават след пълно фрагментиране с Есо RI, позициите на Msp I/Hpa II местата в МГС и в структурните гени за 18S и 25S рРНК. Между структурните гени за 18S и 25S рРНК с малък, необозначен правоъгълник е представен структурният ген за 5.8S рРНК. С Таq I е обозначена ДНК-сондата, използвана при "индиректното крайно белязане". Правите повтори с дължина 79 нд са означени със зелени правоъгълници. Правите повтори с дължина 116 нд са означени със сини правоъгълници. Промоторът е означен с оранжев квадрат. Деметилираните Нра II места са означени с червени триъгълници. МГС – междугенен спейсър.

Фрагментът с дължина 0.8 кб е общ за двата рДНК повтора, а фрагментите с дължина 1.8 кб и 2.4 кб се формират от деметилирани Нра II места в МГС на късата рДНК повторена единица (Фиг. 13). Тъй като интензитетът на трите ивици е много по-силен в Т-35, най-вероятно в по- голям брой рДНК повтори на НОР5Н в делеционната линия тези места са хипометилирани. В профила на T-35 се открива фрагмент с дължина 2.6 кб, който липсва в T-1586 (Фиг. 12Б). Сравняването между Есо RI/Msp I и Есо RI/Hpa II профилите на контролата и делеционната линия показва, че голяма част от рДНК повторите съдържат Msp I място, генериращо този фрагмент. Според публикуваната нуклеотидната последователност, това Msp I/Hpa II място се локализира между предполагаемия промотор и 5' края на структурния ген за 18S pPHK (Фиг. 13). Картирането на получените фрагменти показва, че деметилираните Hpa II места се локализират в групата от повторени елементи с дължина 79 нд, в субповторите с дължина 116 нд и между предполагаемия промотор и 5' края на структурния ген за 18S pPHK (Фиг. 13).

13). Фрагментите с дължина от 4.5 до 7.3 кб се формират от деметилирани Нра II места в структурните гени за 188 - 5.88 - 258 рРНК.

Съгласно изследванията на Flavell et al. (1988) в МГС на пшеницата има 19 –ССGG– места, като деметилиране на цитозиновите остатъци се наблюдава в областта на А субповторите (с дължина 135 нд). Подробният анализ направен от горе споменатите автори показва, че активните рРНК гени съдържат едно предпочитателно деметилирано място, локализирано в позиция 164 нд "upstream" от промотора.



Фиг. 14 Профил на метилиране на рДНК от ечемик. Геномна ДНК от анализираните линии беше рестрицирана с Есо RI и след това с Hhal. Хибридизацията беше проведена с Есо RI-TaqI фрагмент, с дължина 0.7 кб, включващ 3' края на структурния ген за 25S рРНК и 5' края на МГС. От дясната страна на авторадиографията са показани дължините на генерираните фрагменти в кб. М – молекулен маркер. Със стрелка е отбелязан новогенерирания фрагмент.

След двойна рестрикция с Есо RI/Hha I и хибридизация с R0.7 на авторадиографията се детектират фрагменти с относителна дължина от 0.2 кб до 7.2 кб при Т-1586 и от 0.2 до 6.3 кб при Т-35. Профилът на метилиране на Т-21 не се различава от този на контролата (Фиг. 14). Фрагментите с дължина 0.2 кб, 0.3 кб и 0.4 кб се локализират в 3⁷-края на структурния ген за 25S рРНК на двата повтора. Фрагментите с дължина 0.5 кб, 0.6 кб и 0.7 кб са общи за двата повтора и се картират в групата от повторени елементи с дължина 79 нд (Фиг. 15). Хибридизационният сигнал на ивиците с дължина 0.4 кб, 0.5 кб и 0.6 кб е по-силен в Т-35 в сравнение с Т-1586, което е указание, че в по-голям брой рДНК повтори от НОР5Н в делеционната линия последователността -GCGC- е хипометилирана. Фрагментите с дължина 1.1 кб, 1.3 кб, 1.9 кб, 2,2 кб и 3.9 кб произхождат от МГС на НОР6Н, тъй като липсват в Т-35. Фрагментите с дължина 2.4 кб 2.6 кб и 2.9 кб се наблюдават и в трите линии, което е указание, че най-вероятно се генерират от Нha I разпознавателни мяста в МГС на късата повторена рДНК единица. Понеже интензитетът на ивиците с дължина 2.6 кб и 2.9 кб е по-силен в делеционната линия, най-вероятно в по-голям брой рДНК повтори тези места са деметилирани. Фрагментите с дължина от 4.4 кб до 7.3 кб се генерират от Hha I разпознавателни места в структурните гени за 18S-5.8S-25S рРНК. В хибридизационния профил на T-35 се открива фрагмент с дължина 3.4 кб, който липсва в T-1586 и T-21. Този фрагмент се локализира в структурния ген за 18S рРНК.



Фиг. 15 Рестриктазна карта на рДНК повторените единици при ечемика. На рестриктазната карта са обозначени: дължините на фрагментите, които се получават след пълно фрагментиране с рестриктазата Есо RI, позициите на Hha I местата в МГС и в структурните гени за 18S и 25S рРНК. Между структурните гени за 18S и 25S рРНК с малък, необозначен правоъгълник е представен структурният ген за 5.8S рРНК. С Таq I е обозначена ДНК-сондата, използвана при "индиректното крайно белязане". Правите повтори с дължина 79 нд са означени със зелени правоъгълници. Правите повтори с дължина 116 нд са означени със сини правоъгълници. Промоторът е означен с оранжев квадрат. Деметилираните Hha I места са означени с червени линии. МГС – междугенен спейсър.

Според публикуваните нуклеотидни последователности на двете повторени рДНК единици деметилираните Hha I места се локализират в субповторите с дължина 116 нд на дългата повторена рДНК единица, в групата от повторени елементи с дължина 79 нд и между предполагаемия промотор и 5⁷ края на структурния ген за 18S рРНК на рРНК гените от двата НОРа (Фиг. 15).

Представените данни за метилирането на рибозомната ДНК при ечемика са в съгласие с получените по-рано резултати от Ruffini et al. (2010). Проведеният от тези автори кариологичен анализ на разпределението на 5-метилцитозина по протежение на хромозомите показва, че делецията на НОР6Н в кариотип Т-35 води до по-ниско ниво на метилиране на сателит 5Н. Те също така, потвърждават наблюдаваните от Рараzova et al. (2001) съществени разлики в профила на метилиране на МГС на рРНК гените в линия Т-35 в сравнение с контролата и с транслокационните линии Извършеният от нас анализ представлява естествено продължение на цитогенетичните изследвания на тези автори, тъй като чрез "индиректното крайно белязане" бяха прецизно локализирани скъсванията предизвикани от метил-чувствителните рестриктази.

Профилът на метилиране на рДНК при ечемика е сложен. Много от повторените рДНК единици са резистентни към Нра II и/или Нha I, което показва, че те са метилирани във всичките си -CCGG- и -GCGC- места, локализирани както в МГС, така и в структурните гени за 18S и 25S рРНК. Получените резултати дават основание да се приеме, че малка част от съществуващите Нра II и Нha I места в повторените рДНК единици са хипометилирани.

Съгласно изследванията на Flavell et al. (1988) при пшеницата, хипометилирането засяга регулаторната област на рДНК повторените единици. При ечемика не е доказана точната локализация на промоторните и терминаторните участъци в МГС на рДНК повторените единици. При сравняване на хипометилираните и на свръхчувствителните към ДНаза I места в МГС може да се предположи, че вероятни зони с хипометилиране са промоторни и терминаторни ДНК последователности на рРНК гените от НОР6Н и НОР5Н. Деметилиране в района на промоторният участък, около терминатора и спейсърния промотор е установено при голям брой растения (Watson et al., 1987; Torrez-Ruiz and Hemleben, 1994; Ananiev et al., 2003) и животни (Stancheva et al., 1997; Santoro and Grummt, 2001). Този факт може да се приеме като индикация за активен статус на гените. Метилирането на цитозиновите остатъци в ДНК става веднага след репликацията, като новосинтезиращите се ДНК вериги приемат статуса на метилиране на старите вериги и обикновено промени в профила на метилиране настъпват при нарушаване на тези процеси на подържащо метилиране (Finnegan et al., 1998).

V. 8. Заключение

Изясняването на механизмите обуславящи позиционния ефект при експресията на рибозомните РНК гени изисква да се анализира транскрипционната им активност в широк набор от структурни мутанти. Избраните от нас линии ечемик съдържат различен тип структурни мутации, свързани с промяна в позицията или целостта на единия от ядърцевите организатори. Работната хипотеза залегнала в основата на настоящата дисертационна работа е свързана с предполагаемата връзка между организацията на хроматина и диференциалната експресия на рРНК гените в генома на ечемика. Ние използвахме някои от общоприетите методични подходи, с помощта на които бихме могли да съдим за промени, произлизащи от локализацията и функционалната активност на изследваните линии ечемик, а именно чувствителността към ДНКаза I, степента на метилиране на рДНК, както и диференциалната активност на РНК полимераза I.

Получените от нас резултати показаха, че при всички линии ечемик с изключение на T-35 не се наблюдават съществени промени в активността на двете основни ядрени РНК полимерази. Делът на РНК полимераза I и на РНК полимераза II в *in vitro* системата за биосинтез на РНК с изолирани ядра при

транслокационните (T-30 и T-21) и дупликационната (D-2946) линии е сравним с този на контролната (Т-1586) линия. Този резултат е в съгласие с предишни данни относно РНК полимеразната активност при транслокационната линия Т-506 при която е осъществено прехвърляне на НОРа от хромозома 5Н на противоположното рамо на хромозома 6H (Karagyozov et al., 1986)). При линия T-35 активността на РНК полимераза I нараства с 44% в сравнение с Т-1586, докато тази на РНК полимераза II практически не се променя. По принцип повишената транскрипция на единствения запазен НОР5Н в делеционната линия Т-35 може да се дължи на три основни причини: 1) по-бърза елонгация на синтезиращите се пре-РНК вериги; 2) увеличаване на броя на активните молекули РНК полимераза І в условия in vivo и 3) включване в активна транскрипция на по-голям брой рРНК гени. Възможността за промяна на броя на активните гени се обсъжда в литературата. Напр. при лена е установено, че намаляването на количеството на рДНК не води до съществени промени в биосинтезата на рРНК и белтък, както и върху развитието на растенията (Culis and Charlton, 1981). Някои автори допускат, че при определени екстремални условия е възможно да се експресират различни популации pPHK гени (Blundy et al., 1987; Kaufman et al., 1987; Flavell, 1989).

Подкрепа на получените от нас резултати представляват поредицата от изследвания на хормоналната регулация на гените за рРНК. Стимулиращият ефект на цитокинините при растенията е доказан убедително при различни моделни системи (Mikulovich, 1978; Kinoshita et al., 1979; Kulaeva, 1981; Ananiev et al., 1987). В последните години стимулиращия ефект на цитокинините върху транскрипцията на рРНК гените е констатирана при Arabidopsis thalina и изолирани семедели на тиквичка (Cucurbita pepo L. zucchini) (Gaudino and Pikaard, 1997; Абдулова, 2006). С помощта на метода "S1 nuclease protection" и след провеждане на "run-on" анализ в система от изолирани ядра при A. thalina, е установено, че под влияние на цитокинините се повишава нивото на насцентните пре-РНК транскрипти (Gaudino and Pikaard, 1997). Авторите предполагат, че повишеният рРНК синтез под влияние на цитокинините може да се дължи на увеличаване броя на ангажираните в транскрипцията молекули РНК полимераза І. При провеждане на "run-on" транскрипция в система от изолирани ядра на тиквичка, за максимално кратко време от 10 сек се натрупва 2 пъти повече белязан РНК продукт в опитния вариант в сравнение с контролата (Абдулова, 2006), което дава основание да се предположи, че повишеният рРНК синтез в изолирани семедели от тиквичка може да се дължи на увеличаване броя на ангажираните в транскрипцията молекули РНК-полимераза І.

За разлика от фитохормоналният ефект споменат по-горе, установената от нас стимулация на транскрипцията в Т-35, предполага увеличена скорост на елонгация на вече съществуващи и ангажирани в транскрипцията ензимни молекули. Напълно реално е, обаче, компенсаторния ефект да засяга и процеса на инициация на транскрипцията в условия *in vivo*. Полученият от нас резултат с [³²P]УТФ и синтез на РНК за 30 – 120 сек ясно показва, че стимулацията на

транскрипцията в T-35 се дължи на увеличена скорост на елонгация на насцентните рРНК транскрипти.

РНК-полимераза I е ключов компонент на сложния апарат, който осъществява синтезата на рРНК и проучването на факторите, контролиращи нейната активност разкрива част от възможните механизми за контрол. Регулацията на транскрипцията зависи, обаче, не само от присъствието на ДНК-свързващи транскрипционни фактори, в това число и РНК-полимераза I, но включва и процесите, които определят достъпността на ДНК за факторите на транскрипцията.

При еукариотните организми, структурата на хроматина е отговорна за брой генетични процеси, включително и ядърцевото доминиране. голям Изследванията на нуклеоларната доминантност при междувидови хибриди показват корелация между чувствителността към ДНаза I и активността на рибозомните РНК гени (Macleod and Bird, 1982; Thompson and Flavell, 1988). Като критерий за активността на гените за рРНК при нашите изследвания беше проследена и чувствителността на рДНК към екзогенна ДНКаза I. Резултатите показаха, че с повишена чувствителност към ДНКаза I са някои райони от МГС. Тъй като при ечемика не е известна точната локализация на промоторните и терминаторните участъци в МГС на рДНК повторените единици, по аналогия с други растения и животни може да се предположи, че това са области с важни регулаторни функции. При всички изследвани линии ечемик беше наблюдаван идентичен модел на нуклеазна чувствителност на рДНК, което показва, че структурните мутации свързани с промяна в позицията или в целостта на единия НОР, както и при амплификация на рРНК гените в ядърцевите организатори не водят до съществени промени в компактността на рДНК. Резултатите с екзогенна ДНКаза I показват, също, че позиционно-зависимата експресия на рРНК гените при ечемика, най-вероятно не е свързана с промени в броя на активните рРНК гени.

Диференциалната експресия на гените най-често ce свързва с метилирането на цитозиновите бази в ДНК. През последните години се натрупаха редица данни, изясняващи многостранното значение на тази постсинтетична модификация на ДНК за нормалното функциониране на клетките. Открити бяха различни белтъци, които се свързват към метилирани участъци на ДНК и посредством които метилирането на ДНК води до промени в генната експресия (Boys and Bird, 1991). Следователно, метилирането на ДНК не е "директна бариера" за транскрипцията. Както при гръбначните животни, така и при растенията неактивните рибозомни гени са метилирани в значителна степен в сравнение с активните. Нашите резултати показаха, че диференциалната експресия на ядърцевите организатори при транслокационните и дупликационната линии ечемик не корелира с промени в статуса на метилиране на рРНК гените. Един от интересните резултати в това изследване е, че деметилирането на специфични цитозинови остатъци в регулаторната област на рибозомните РНК повтори води до активирането на нормално неактивни рРНК гени в делеционната линия Т-35.

Получените от нас резултати при позиционно обусловената супресия на НОРи потвърждават извода направен от Karagyozov et al. (1986), че транслокацията на рРНК гените може да е свързана със забавяне на експресията им в телофаза и да не води до тяхната постоянна инактивация. От друга страна наши и на други автори (Папазова, 2001) данни показват, че механизмите обуславящи вътревидовата нуклеоларна доминантност не засягат структурата на рРНК гените. Твърде възможно е вътревидовото ядърцево доминиране да е свързано с взаимодействието на самите НОРи, като това взаимодействие да е индиректно посредством фактори разположени извън рибозомния локус.

Най-интересният резултат в нашето изследване е, че компенсаторният стимулационен ефект в експресията на рРНК гените от останалия НОР5Н в делеционната линия ечемик води до повишен синтез на рРНК. Увеличената транскрипционна активност на рРНК гените в Т-35 най-вероятно се дължи на повишена скорост на елонгация и се съпътства от съществени промени в профила на метилиране на рДНК изразени в по-силна степен на хипометилиране на определини участъци от МГС, и в поява на нови деметилирани места.

VI. <u>ИЗВОДИ</u>

Въз основа на получените резултати могат да бъдат формулирани следните изводи:

- Доказано е, че установената на цитологично ниво промяна в нуклеоларната активност при транслокацията на НОР от хромозома 5Н върху хромозома 6Н, както и дупликацията на съседен на НОР 6Н хромозомен сегмент при ечемика, не водят до промяна в транскрипцията на рРНК гените определена чрез активността на ендогенната ядрена РНК полимераза I.
- 2. Установено е, че делецията на НОР от хромозома 6Н в линията Т-35 води до увеличаване с около 45% на активността на РНК полимераза I в рРНК гените на запазения единствен НОР 5Н. Стимулацията на експресията на рРНК гените от НОР5Н се дължи на увеличена скорост на елонгация на транскрипцията.
- **3.** Доказано е, че при всички изследвани линии ечемик, проявявящи позиционно обусловено вътревидово ядърцево доминиране, активността на ендогенната ядрена РНК полимераза II не се променя.
- 4. При всички реконструирани линии ечемик свързани с промяна в позицията на НОР, с делеция на единия НОР или с дупликация на съседен на НОР6Н хромозомен сегмент, не се наблюдават промени в чувствителността към смилане на рДНК с екзогенна ДНКаза I. Хиперчувствителни места към ДНКаза I в рДНК повторената единица се откриват в състава на МГС.
- 5. Отсъствието на предпочтително смилане на рДНК с екзогенна ДНКаза I в делеционната линия Т-35 показва, че стимулацията на транскрипцията на рРНК гените в тази линия не корелира с промени в компактността на хроматина.

- **6.** Установено е хипометилиране на цитозина съответно в последователностите ССССС- и -СССС- от *cis*-регулаторните последователности на МГС на рРНК гените на анализираните линии.
- Структурните мутации свързани с промяна в позицията на НОРи, както и при амплификация на рРНК гените в ядърцевите организатори не се съпътстват от забележими промени в профила на метилиране на рДНК.
- **8.** Установено е съществено намаление в степента на метилиране на -СССС- и -GCGC- последователностите в МГС при НОР-делеционната линия T-35.
- Установено е специфично деметилиране на цитозина в едно -ССGG- място в МГС на рНК гените от НОР5Н при линията Т-35, което води до появата на нов ДНК фрагмент с дължина 2.6 кб.

IV. <u>Приноси</u>

От получените в дисертационното изследване резултати могат да бъдат посочени следните приноси:

- За първи път е проведен функционален анализ на транскрипцията на рРНК гените в НОР-делетираната линия Т-35 на ечемик и е установено, че компенсаторния ефект по отношение на единствения запазен НОР5Н в тази линия се дължи на увеличена скорост на транскрипция.
- Повишената скорост на транскрипцията на рРНК гените в линия Т-35 се съпътства от значително намаление в степента на метилиране на специфични последователности в МГС и не е свързана с промени в чувствителността на смилане на рДНК с екзогенна ДНК-аза I.

Списък на публикациите по темата на дисертацията

1. Dimitrova A. D., Ananiev E. D., Stoilov L. S., Gecheff K. I. (2008) Ribosomal RNA gene expression in reconstructed barley karyotypes. *Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 61: 1159-1168.

2. Dimitrova A. D., Ananiev E. D., Gecheff K. I. (2009) DNaseI hypersensitive sites within the intergenic spacer of ribosomal RNA genes in reconstructed barley karyotypes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23: 1-5.

Участия в научни конференции по темата на дисертацията

1. Dimitrova A. D., Ananiev E. D., Gecheff K. I. (2008) DNase I sensitivity of ribosomal RNA genes in reconstructed barley karyotypes. Dr Tzanev Conference, October 6 – 7 2008, Sofia (постерно съобщение).

2. Димитрова А., Ананиев Е., Гечев К. (2009) Промени в профила на метилиране на рибозомните РНК гени в реконструирани кариотипове ечемик. Национална научна конференция по генетика, посветена на 60 години от смъртта на акад. Д. Костов, Октомври 28 – 30 2009, Sofia (постерно съобщение).

Цитирана литература

- 1. Абдулова Г. Г. Дисертация "Доктор", София, 2006.
- 2. Гечев К. 1978. Генетика и селекция 11: 17-22.
- 3. Abdulova G., Ananiev E. D. 2003. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 56 (8): 65-70.
- 4. Ananiev E. V., Bochkanov S. S., Rizie M. V., Chernishov A. I., Shipkova N. I., Yakovleva E. Y. 1986. Genetika (Russian) 22: 920-928.
- Ananiev E. D., Abdulova G., Grozdanov P., Karagyosov L. 2003. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 56 (6): 111-116.
- 6. Ananiev E. D., Karagyozov L. K., Karanov E. N. 1987. Planta 170 (3): 370-378.
- 7. Ananiev E., Karagyozov L. 1984. Physiol. vég. 22 (5): 555-563.
- Appels R., Gerlach W. L., Dennis E. S., Swift H., Peacock W. J. 1980. Chromosoma 78: 293-311.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 16: 6-21.
- 10. Blundy K. S., Cullis C. A.q Hepburtn A. G. (1987). Plant Mol. Biol. 8: 217-225.
- 11. Boyes J., Bird A. 1991. Cell 64: 1123-1134.
- 12. Burton K. 1956. Biochem. J. 62: 315-323.
- 13. Conconi A. and Ryan C. A. 1993. J. Biol. Chem. 268 (1): 430-435.
- 14. Cullis C. A., Charlton L. M. 1981. Plant Science Letters 20: 213-217.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. 1998. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 223-247.
- 16. Flavell R. B. 1989. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. Genome 31: 963-968.
- 17. Flavell, R. B., O'Dell M., Thompson W. F. 1988. J. Mol. Biol. 204: 500-534.
- 18. Gaudino R. J., Pikaard C. S. 1997. J. Biol. Chem. 272: 6799-6804.
- 19. Gecheff K. I. 1989. Theor. Appl. Genet. 78: 683-688.
- 20. Gecheff K. I. 1996. Theor. Appl. Genet. 92, 777-781.
- Gecheff K. I., Hvarleva Ts., Georgiev S., Wilker T., Karp A. 1994. Genome 37: 419–425.
- 22. Gecheff K. I., Papazova N., Telbizova T. 2003. Plant Sci. (Bulg.) 40: 103-106.
- Gecheff K., Manova V., Bonchev G., Kitanova M., Vlahova M., Stoilov L. 2008. Genetics and Breeding 37: 3-4.
- 24. Georgieva E. I., Karapchansca N. I. 1990. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 43 (11): 87-90.
- 25. Gerlah W. L., Bedbrook J. R. 1979. Nucl. Acids Res. 7: 1869-1885.
- 26. Grozdanov P. N., Karagyozov L. 2002. Z. Naturforsch. 57c: 897-901.

- 27. Hvarleva Ts. D., Chernishov A. I., Bochkanov S. S., Yakovleva E. Y. Ananiev E. B. 1987. Genetika 23: 717-724 (in Russian).
- 28. Jupe E. R., Zimmer E. A. 1993. DNase I-sensitive and undermethylated rDNA is preferentially expressed in a maize hybrid. Plant Mol. Biol. 21: 805-821.
- 29. Karagyozov L. K., Ananiev E. D., Mateeva Z. E., Hadjiolov A. A. 1986. Genetika (in Russian) 22: 557-565.
- Kaufman L. S., Watson J. C., Thompson W. F. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1550-1554.
- 31. Kinoshita I., Katagiri K., Tsuji H. 1979. Plant Cell Physiol. 20: 707-713
- Kulaeva O. N. 1981. In: Metabolism and molecular activities of cytokinins. pp. 218-227. Guern J., Peaud-Lenoel C. eds. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York.
- 33. Kumar P. K., Subrahmanyam N. C. 1999. Genome 42: 1127-1133.
- 34. Macleod D. and Bird A. 1982. Cell 29: 211-218.
- 35. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. 1982, Molecular cloning. A laboratory manual (Gold Spring Harbor, NY; Gold Spring Harbor Laboratory).
- Mikulovich T. P., Wolgiehn R., Khokholova W. A., Neuman D., Kulaeva O. N. 1978. Physiol. Pflanzen. 172: 101-110.
- 37. Muller A., Philipps G., Gigot C. 1980. Planta 149: 69-77.
- 38. Muscarella D. E., Vogt V. M., Bloom S. E. 1987. J. Cell Biol. 105: 1501-1513.
- 39. Nedospasov S. A., Georgiev G. P. 1980. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 532-539.
- 40. Papazova N., Hvarleva Ts., Atanassov A., Gecheff K. 2001. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 15: 35-44.
- 41. Reeder R. H. 1984. Cell 38: 349-351.
- 42. Ruffini Castiglione M., Venora G., Ravalli C., Gecheff K., Stoilov L., Cremonini R. 2010. Protoplasma 242: 13-18.
- 43. Saghai Maroof M. A., Allard R. W., Zhang Q. F. 1990. Proc Natl Acad Sci USA 87: 8486-8490.
- 44. Saghai-Maroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014-8018.
- 45. Santoro R, Grummt I. 2001. Mol Cell 8: 719-725.
- 46. Spiker S., Murray M. G., Thompson W. F. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 815-819.
- Stancheva I., Lucchini R., Koller T., Sogo J. M. 1997. Nucl. Acids Res. 25: 1727-1735.
- 48. Steinmüller K., Apel K. 1986. Plant Mol. Biol. 7: 87-94.
- 49. Subrahmaniam N. C., Azad A. A. 1978. Chromosoma 69: 255-264.
- 50. Subrahmanyam N. C., Bryngelson T., Hagberg P., Hagberg A. 1994. Hereditas 121: 157-170.
- 51. Thompson W. F., Flavell R. B. 1988. J. Mol. Biol. 204: 535-548.
- 52. Torres-Ruiz R. A., Hemleben V. 1994. Plant Mol. Biol. 26: 1167-1179.
- 53. Watson, J. C., Kaufman L. S., Thompson W. F. 1987. J. Mol. Biol. 193: 15-26.
- 54. Weintraub H., Groudine M. 1976. Science 193: 848-856.

- 55. Wu C. 1980. Nature 286: 854-860.
- Zhang Q., Saghai-Maroof M. A., Allard R. W. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8741–8745.