

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за присъждане на
образователната и научна степен „Доктор”
Научна специалност: 01.06.06 – Генетика

Автор на дисертационния труд: Анна Димитрова Димитрова

Тема на дисертационния труд: „Регулация на транскрипцията на рибозомните РНК гени в реконструирани кариотипове ечемик”

Рецензент: доц. д-р Елена Иванова Георгиева

За да се осигури едно оптимално ниво на белтъчна синтеза, растящите клетки изискват непрекъснат запас от рибозоми, осъществяван чрез синтеза на рибозомални белтъци и рРНК. Скоростта на транскрипция на рРНК гените, чрез РНК-полимераза I, тясно корелира със скоростта на нарастване на клетките. В еукариотните клетки, гените за пре-рРНК са намерени в множествени, тандемно добре подредени копия в нуклеолусите, познати още като Nucleolar Organizer Region – NOR. Тандемно повторените рРНК гени съществуват в два различно структурирани функционални типа хроматин – един който е разгънат, отворен и позволява осъществяване на транскрипцията и кондензиран, който е намерен в транскрипционно неактивно състояние. Няколко епигенетични характеристики, включващи характерно ДНК метилиране и специфично модифициране на хистоните, също се различават в потенциално активни и неактивни рРНК гени, така че механизмите за епигенетичен контрол са важни за транскрипционната регулация на рРНК гените.

Най-ярка форма на регулиране на транскрипцията на рРНК гените е явлението „междувидово ядърцево (нуклеоларно) доминиране”. Ядърцевият доминанс е епигенетичен феномен наблюдаван в междувидови хибриди, в които НОРове произхождащи от единия родител са доминантни над другия. Молекулярните основи на ядърцевото доминиране е транскрипцията, посредством РНК-полимераза I, на рибозомалните РНК гени само от единия родител. Ядърцевото доминиране се проявява при селективно заглъхване на един набор от рРНК гени посредством химични модификации на хроматина. Механизмите обаче, отговорни за първоначалното дискриминиране между родителските рРНК гени и установяване на междувидовото ядърцево доминиране са все още неизяснени. Тези механизми могат да повлияват всеки рРНК ген, или NORs, или даже големи хромозомни домени.

Ядърцевото доминиране е установено при растителни и животински хибриди. При видовете *Hordeum* има ясно изразено междувидово ядърцево доминиране, но се наблюдава и явлението „вътревидово ядърцево доминиране”. В генома на *H. vulgare* има два NORa, на хромозоми 5Н и 6Н. От български автори, е показано, че при *H. vulgare* активността на NOR зависи от разположението им: ако двата NOR са на една хромозома, само NOR Н6 образува ядърце.

Дисертационният труд на Анна Димитрова е посветен на изучаване състоянието и активността на NOR при линии *H. vulgare* с различен кариотип. Линиите са добре описани и характеризирани в частта „Материали и методи”. Тези линии са получени в Института по генетика и са обект от дългогодишен труд на учени от института, главно

от проф Гечев. Интересите на докторантката са насочени към изследване на линии ечеми, 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 са разделени в няколко групи: транслокационни линии (Т-30 и Т-21), дупликационна линия (D-2946) и делеционна линия (Т-35). При някои може да се наблюдава вътревидово ядрцево доминиране, а при линията с делеция (Т35) - компенсаторно увеличаване на активността на останалия NOR H5.

Този вид научни изследвания изискват задълбочени познания и уелото владеене на съвременни молекулярно-биологични, генетични и биохимични методи.

Дисертационният труд е организиран по стандартния начин и обхваща 134 страници – „Увод” – 3стр., „Литературен обзор” - 33 стр., „Цел и задачи” - 1 стр., „Материали и методи” 18 стр., „Резултати” - 41 стр., илюстрирани с 19 фигури, „Заклучение” – 5стр., „Изводи” - 2 стр., „Приноси” – 1стр. и 28 страници „Литература”, съдържаща 281 източника, от които 5 на кирилица и останалите на латиница.

Литературният обзор заема приблизително една четвърт от цялостната работа, обхваща напълно основната литература по изброените въпроси и е добре фокусиран върху разработваната тематика. Литературните данни са обсъдени задълбочено и критично. Направен е обширен анализ на локализацията на гените за рРНК, морфологията на ядрцата, броя на гените за рРНК, епигенетичните механизми на регулация на експресията на рибозомните РНК гени, моделиране на хроматина и чувствителност към ДНКаза I. В специален раздел е разгледано междувидовото и вътревидово ядрцево доминиране. Подробно и компетентно са изложени публикуваните досега данни, което, от една страна, улеснява цялостното възприемане на работата, а от друга показва, че докторантката е много добре запозната със съвременното състояние на проблема. Обсъдени са онези данни от световната литература, които имат пряко отношение към нейните изследвания. Представеното голямо количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с подходящи схеми и таблици. Важно е да бъде отбелязано, че докторантката проявява аналитично отношение към обсъждания материал, осмисля го творчески и в резултат на това логично стига до целите и задачите, които си поставя за разрешаване.

Към този раздел имам следните забележки: **1** - на страница 9 е поместена Таблица 1, показваща броя и дължината на рибозомните РНК повтори и дължини на междугенните спейсери при някои растителни видове, но никъде в текста не се обясняват данните посочени в тази таблица; **2** – независимо, че в едно изречение е казано за възможната функция на Полимераза IV и V (стр.28) считам, че обзорът щеше да бъде по-пълен, а от тук и да се види, че докторантката е запозната с последни данни касаещи механизмите на заглушаване на активността на рРНК гените от малки интерфериращи РНКи и на специфичните за растенията РНК полимераза IV и РНК полимераза V.

В раздела „Цел и Задачи” ясно и конкретно е формулиран основният проблем на дисертацията: 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).

Разрешаването на тази цел е постигната с правилното поставяне на няколко добре осмислени и логично следващи задачи. Искам да отбележа, че така поставените задачи покриват и дори надхвърлят обема на една докторска работа.

В следващия раздел „Материали и Методи” са описани използваните в дисертацията методи. Както казах по-горе, растителният материал е много точно описан. Приложените методи са многобройни и обхващат широк спектър от модерни молекулярно биологични/генетични техники, като изолиране на геномна ДНК и РНК, изолиране и пречистване на плазмидна ДНК, клониране, лигиране на ДНК, пренос и хибридизация, трансформация на *E. coli*, получаване на компетентни клетки, електрофоретичен анализ на нуклеинови киселини, полиакриламидна електрофореза на белтъци, определяне активностите на РНК полимеризи I и II, синтез на РНК в изолирани ядра, ДНК електрофореза и елуация от гел, радиоактивно бележене на нуклеинови киселини, статистическа обработка на резултатите, използване на компютърни програми и др. Така изброените методи са описани с необходимата за тяхното възпроизвеждане точност. Това създава възможност дисертацията да бъде използвана и като подходящ източник на специализирани методики.

Разнообразието на използваните методи, както и компетентното им описание потвърждава впечатлението за много добрата професионална подготовка на Анна Димитрова. Адекватността на използваните методи е добра гаранция да се получат отговори на поставената цел и задачи.

Към този раздел имам няколко малки забележки, които са по-скоро от технически характер и които при една внимателна проверка можеше да бъдат избегнати, а това определено би повишило нивото на работата. На Фиг.5 е показана рестриктазна карта на клон Нv014 (R10) и на късата рДНК повторена единица при ечемика. По мое мнение в описанието под фигурата би трябвало да се обозначат малки и големи рДНКи, за да стане ясно какви са разликите между тях. Описани са и два метода за изолиране на ядра, като за този на Muller et al. (1980) и Steinmuller and Apel (1986) се казва, че са направени модификации, но от текста не се разбира кои са модификациите, последните не са прецизирани и се оставя на читателя да сравнява методите. На страница 48 е описан метод за приготвяне на 10% полиакриламиден денатуриращ гел, но не се разбира в денатуриращи условия колко моларна трябва да е уреята, а е написано само колко урея се претегля, като се оставя отново на читателя да изчислява концентрацията на уреята по претеглените грамове и обем. В следващата точка, обаче, отнасяща се за електрофореза на ДНК в денатуриращи условия, вече е отразена моларността на уреята. Докторантката можеше да обедини тези две точки, като прецизира условията за електрофорезата на ДНК и отчасти да опише приготвянето на гела, т.е. да отдели важните от маловажните неща.

В раздела „Резултати и обсъждане” са дадени добре оформени доказателствени данни на поставените за разрешаване задачи. Първоначално докторанката изследва броя на рРНК гените при реконструирани кариотипове ечемик. За да провери дали при изследваните кариотипове е настъпила амплификация или деамплификация на рРНК гените, тя е анализирала тяхната копийност в двата рибозомни локуса на

хромозома 5Н и хромозома 6Н. Хибридизационните профили, при линии Т-1586, Т-30, Т-21 и D-2946 показват наличие и на двата фрагмента с дължина 9.8 кб и 8.8 кб, а при линия Т-35 се вижда само един фрагмент с дължина 8.8 кб (Фиг. 6А). Получените резултати показват, че при кариотип Т-1586 и транслокационните линии Т-13, Т-17 и Т-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 е 1.25, което е индикация за наличие на амплификация на рРНК гените в NOR5Н.

Следващите резултати са посветени на определяне на ендегенната ядрена РНК полимеразна активност в изолирани ядра от ечемик. Транскрипцията на рРНК гените е определена посредством измерване на активността на РНК полимераза I. Резултатите показват, че при всички линии ечемик с изключение на Т-35 не се наблюдават съществени промени в активността на двете основни ядрени РНК полимеразы (Фиг. 7). При линия Т-35 (NOR H5), скоростта на елонгация на рРНК веригите е повишена, активността на РНК полимераза I нараства с 44% в сравнение с контролния вариант, докато тази на РНК полимераза II практически не се променя.

Като критерий за активността на гените за рРНК в мутантните линии (Т-30, Т-35 и D-2946) Димитрова изследва чувствителността на рДНК към смилане с ДНаза I. Получените данни са интересни и важни и дават основание на докторантката да приеме, че наблюдаваните свръхчувствителни места в МГС се обуславят от структурата на рДНК и не зависят от нуклеотидната последователност и/или специфични нагъвания на ДНК. Тези резултати показват също, че структурните мутации свързани с промяна в позицията на единия от NOR-и, както и при амплификация на рРНК гените в единия от ядърцевите организатори не водят до забележими промени в компактността на рДНК. Те са също и индикация, че позиционно-зависимата експресия на рРНК гените при ечемика, най-вероятно не е свързана с промени в броя на активните рРНК гени.

С цел да се изясни има ли връзка между променената позиция или структура на NORи и метилирането на цитозина в рРНК гените в дисертационния труд важно място е отделено на резултатите получени от анализа на профила на метилиране на МГС на рРНК гените при изследваните линии ечемик. Анализите са проведени с метилчувствителни рестриктазни ензими, които не са показали различия в профила на метилиране на рДНК, изолирана от контролната линия и от опитните варианти. Отсъствието на разлики между профила на метилиране на рДНК при контролата и транслокационната и дупликационната линии показва, че диференциалната експресия на NORи не винаги корелира с метилирането на рДНК.

За картиране на хипометилираните участъци като по-подходящ за тази цел, докторантката прилага методът на „индиректното крайно белязане”, тъй като чрез него прецизно се локализируют скъсванията предизвикани от метил-чувствителните рестриктазни ензими.

Профилът на метилиране на рДНК при ечемика е сложен. Много от повторените рДНК единици са резистентни към Hpa II и/или Hha I, което показва, че те са метилирани във всичките си -CCGG- и -GCGC- места, локализиращи както в МГС, така и в структурните гени за 18S и 25S рРНК. Получените резултати дават основание на

докторантката да приеме, че малка част от съществуващите Нра II и Нна I места в повторените рДНК единици са хипометилирани.

От резултатите се вижда, че диференциалната експресия на ядърцевите организатори при транслокационните и дупликационните линии ечемик не корелира с промени в статуса на метилиране на рРНК гените. Един от интересните резултати в това изследване е, че хипометилирането на специфични цитозинови остатъци в регулаторната област на рибозомните РНК повтори води до активирането на нормално неактивни рРНК гени в делеционната линия Т-35.

Към този раздел нямам особени забележки освен, че някои от надписите под фигурите не са достатъчно информативни и не дават възможност бързо да се видят разликите, например фиг.10 и фиг.11. Като контрола за молекулна маса е използвана ДНК, но никъде не се казва как е получена тази контрола.

Много добре е написана заключителната част, където от направените обобщения личат професионалната подготовка и задълбочените познания на докторантката.

Въз основа на получените данни, изводите са правилно формулирани. Считам обаче, че те са много и някои от тях можеха да се обединят и/или съкратят.

По материалите на дисертацията са публикувани две статии излезли от печат – в *Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci.* и в *Biotechnology and Biotechnological Equipment* е, в които Анна Димитрова е водещ автор. Има и две участия в национални конференции.

Запознах се с проекта за автореферат и считам, че той правилно отразява по-важните експериментални резултати и теоретични обобщения описани в дисертацията.

Заключение: Познавам Анна Димитрова от дългогодишната ни съвместна работа в секция „Молекулярна генетика“, като изключително трудолюбив, съвестен и мотивиран научен работник. Убедено мога да кажа, че тя е извършила с висока прецизност голяма по обем експериментална работа. Познавайки естеството на работата ни, искам също да отбележа, че е изключително трудно да се получат толкова чисти и съвършени хибридизационни профили, но докторантката се е справила блестящо. Тези автордиографии могат да бъдат показвани като еталон за това как трябва да се работи. Докторантката е получила важни резултати и е направила опити за тяхната оценка и интерпретация в рамките на съществуващите хипотези. От всичко изложено до тук определено считам, че Анна Димитрова е със задълбочени познания в молекулярната биология и генетика, владее широк спектър от съвременни методи и показва способности за поставяне на самостоятелни идеи и тяхното осъществяване.

Имайки предвид професионалните качества и научните постижения на докторантката, убедено препоръчвам на научното жури да присъди на Анна Димитрова Димитрова образователната и научна степен **“Доктор”**.

Рецензент:

26.06.2011

/доц. доктор Елена Георгиева/