

## 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 Лъчезар Костов Карагъзов

В еукариотните клетки 18S, 5.8S и 25-28S рибозомните РНК (рРНК) се образуват чрез зреене на общ транскрипт – предшественик на рРНК (35-45S пре-рРНК). В генома гените за пре-рРНК са представени от множество копия, групирани тандемно в един или няколко локуса (NOR – nucleolus organizing regions). Както при растенията, така и при животните се наблюдава явлението „междувидово ядърцево доминиране”, което се състои в следното. Когато след генетична хибридизация в една клетка попаднат NOR от два организма, тогава, по правило, само единият NOR е напълно активен. При видовете *Hordeum* има ясно изразено междувидово ядърцево доминиране. При *Hordeum vulgare* обаче допълнително се наблюдава и явлението „вътревидово ядърцево доминиране”. В генома на *H. vulgare* има два NOR, на хромозоми H5 и H6. С цитологични методи, главно 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 H6 образува ядърце. Въпреки определени различия това наподобява ядърцевото доминиране и по механизъм възможно е свързано с него.

Дисертационният труд на Анна Димитрова е посветен на изучаване с молекулярно-биологични методи на състоянието и активността на NOR при линии *H. vulgare* с различен кариотип. При едни линии има промяна на мястото на NOR, разцепване на NOR, дупликация, делеция на NOR H6. При някои може да се наблюдава вътревидово ядърцево доминиране, а при линията с делеция (Т35) - компенсаторно увеличаване на активността на останалия NOR H5.

Представеният за рецензия дисертационен труд е написан на 134 стандартни страници. Списъкът на цитираната литература обхваща 28 страници (281 заглавия). Материалът е изложен по стандартната схема: литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи и приноси.

Литературният обзор на дисертацията (33 стр.) е обширен, с желание да обхване голям брой процеси, структури и организми. В обзора Анна Димитрова разглежда основните епигенетични изменения, съпровождащи промяната на активността на пре-рРНК гените. В обзора важно място заема описанието на междувидовото и вътревидовото ядърцево доминиране.

Към раздела имам следните забележки. Поради старание да се обхване огромен по обем материал са допуснати някои неточности и непълноти, които можеше да бъдат избегнати. В описанието на транскрибируемия участък на пре-рРНК гените при растенията (раздел II. 4. 1.) не е отбелязано съществуването на външен транскрибируем спейсер (5' ETS). Това са последователностите между 5'-края на пре-рРНК и 18S рРНК. Тези последователности при зрееенето се изрязват. Преди години ETS се обозначаваеше като част от междугенния спейсер (МГС), но сега тези участъци най-често се отделят (пресен пример - обзора *Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing*. Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010 Jun; 22(3): 351-6). Това обаче е въпрос само на терминология. По-важен недостатък на обзора е, че при обсъждане на механизмите за подтискане на активността на рРНК гените съвсем бегло е спомената възможната роля на (иначе така нашумелите) малки интерфериращи РНК и на специфичните за растенията РНК полимераза IV и РНК полимераза V.

След прегледа на литературата в дисертацията се дават конкретно и ясно експерименталните задачи на работата. Задачите пред Димитрова са теоретично важни, а получените резултати могат да допринесат за разбиране на механизмите на вътревидовото ядърцево доминиране и дозовата компенсация.

Разделът „Материали и Методи” (18 стр) обхваща описанието на използваните линии *H.vulgare* и клонове от рДНК, както и подробно изложение на молекулярно-биологичните методи. Следва да се отбележи, че използваните от Анна Димитрова методи отговарят на поставените пред нея задачи и са напълно съвременни и общоприети. Недостатък на раздела е, че при описание на линиите отсъства известната цитологична характеристика на активността на съответния NOR. Освен това в този раздел никъде не е посочена сондата R3.8, въпреки че тя се използва при работата.

Разделът „Резултати и обсъждане” обхваща 46 стр. Експерименталните резултати са илюстрирани с 19 фигури. В този раздел прави впечатление подробното описание и доброто документиране на резултатите.

Димитрова отначало изследва активността на РНК полимераза I в изолирани ядра. В тази експериментална система отсъства инициация на нови РНК вериги, активността се дължи само на елонгация на коледното дръвче. При сравнение се оказва, че в ядра от линията T35 (само с NOR H5), скоростта на елонгация на рРНК веригите е повишена. Този резултат е в полза на модел, съгласно който компенсацията на намаления брой рРНК гени се извършва като се увеличи експресията на фиксиран брой транскрипционни единици.

Анна Димитрова изследва също състоянието на рДНК хроматина в интерфазни ядра. Резултатите показват еднаква чувствителност към разграждане с ДНазаI на NOR H6 и NOR H5, която не зависи от взаимното разположение на NOR върху хромозомите или от отсъствието на другия NOR. Тези резултати смятам за много важни. Те говорят, от една страна, че вътревидовото и междувидовото ядръцево доминиране не са аналогични, защото при едното видимо не става пълна хетерохроматинизация на подтиснатия NOR. От друга страна, увеличаването на транскрипционната активност на компенсиращия NOR H5 (при делеционна линия T35) не е съпроводено с големи промени в хроматиновата структура (и отваряне на нови гени за транскрипция).

В дисертацията са показани резултатите от метилирането на рДНК при различните линии ечемик. За определяне на общата картина на метилирането се използва разграждане на ДНК с метил-чувствителни рестриктази и хибридиране със сонди, които обхващат големи участъци от повторената единица. Вижда се, че степента на метилиране на рДНК е висока (така е например и при пшеницата). Определени места обаче са хипометилирани, без да се забелязват особени разлики между изследваните линии ечемик.

За да се картират хипометилираните участъци Димитрова използва метода на индиректното крайно белязване. Такива участъци се оказва, че присъстват в повторите, които изграждат междугенния спейсер. За тези повтори при пшеницата се смята, че играят роля на енхансери и са определящи при междувидовото ядърцево доминиране. Присъствието на хипометилирани последователности и при междугенния спейсер на ечемика подсказва възможна функционална роля.

При картиране на хипометилираните сайтове се забелязва една интересна особеност (фигура 21-Б). Съотношението между интензивността на ивиците MspI и ивиците HpaII при делеционната линия T-35 е различно от това на останалите линии. Това показва, че в случая дозовата компенсация води до промяна на степента и типа на метилиране на последователността CCGG в междугенния спейсер и 5' ETS (външния транскрибируем спейсер).

Към този раздел нямам особени забележки. Трябва да отбележа неудачните подписи под Фиг. 10 и Фиг. 11, които не позволяват веднага да се разбере разликата между тях.

Този раздел завършва със заключение (5 стр.), в което е направено общо обсъждане на резултатите и научните приноси на дисертацията. Като цяло резултатите са обсъдени задълбочено и са подложени на внимателен анализ.

Изводите в дисертацията са подкрепени напълно достатъчно с оригинален експериментален материал. Те са написани ясно и показват добре приносите на дисертацията.

Смятам, че получените от Димитрова резултати и факти са нови и интересни. Те могат да послужат за изказване на предположения, които подлежат на експериментална проверка. Съпоставени с други данни, те ще позволят да се получи по-пълна картина за механизмите и начините на промяна на активността на NOR при растенията.

Резултатите във връзка с дисертацията са представени в две статии излезли от печат – в *Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci.* и в *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. В тези статии Димитрова е водещ автор. Това според мен правилно отразява нейната роля при получаване на резултатите и в подготвянето на публикациите. Резултатите от дисертацията освен това са представени и на две национални конференции.

Представеният ми за разглеждане автореферат (34 стр.) отразява правилно съдържанието на дисертационния труд. Като цяло смятам дисертацията за добро и обещаващо начало за бъдещи изследвания в това направление.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Смятам, че дисертационният труд на Анна Димитрова представлява значителен и оригинален принос в областта на физиология на растенията и генетиката. Убедено препоръчвам на научното жури да присъди на Анна Димитрова Димитрова образователната и научна степен „Доктор”.

Рецензент

16 юни 2011

(доц. д-р Л. Карагъзов)