

Становище

Върху дисертационния труд на тема: „Регулация на транскрипцията на рибозомните РНК гени в реконструирани кариотипове ечемик” за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност „Генетика”, шифър 01. 06. 06

Автор на дисертационния труд: гл. асистент Анна Димитрова, докторант на самостоятелна подготовка в секция „Молекулярна генетика, Институт по физиология на растенията и генетика, БАН

Член на научното жури: проф. д-р Спаска Димитрова Петкова

Дисертационният труд на Анна Димитрова е посветен на проблема за регулация на транскрипцията на рибозомните РНК гени в реконструирани кариотипове ечемик. На настоящия етап са налице достатъчно литературни данни за специфична супресия на рибозомните локуси чрез транспозицията им върху хромозома носеща рибозомен локус. В този аспект откритият при растенията феномен – вътревидов нуклеоларен доминанс (вътревидово ядърцево доминиране), описан от български изследователи в транслокационни линии ечемик, съдържащи два НОРа (Anastassova-Kristeva et al., 1977; 1979a; 1979b; Nicoloff et al., 1979a; 1979b), разположени върху срещуположните рамена на една и съща хромозома и изразяващ се във вариране на активността на НОРа от нормална експресия до пълна супресия (Гечев, 1995) представлява определено голям интерес.

За проучването на позиционния ефект върху генната експресия чрез промяна в позицията на гена особено подходящи са умерено и високо повторените генни фамилии каквито са 18S-5.8S-25S рибозомните РНК гени. Освен това процесите на метилиране и деметилиране на ДНК и специфичните модификации на хистоните заемат важно място в епигенетичния контрол на регулацията на транскрипцията на рРНК гените.

В литературата са известни единични изследвания върху механизмите, свързани с контрола на вътревидовото ядърцево доминиране. Разнопосочни са резултатите по отношение на ролята на ДНК метилирането в проявите на този феномен. Някои изследвания потвърждават ограничената роля на този процес. Профилът на метилиране на рДНК в транслокационни линии на ечемика, при които транслоцирания НОР е разположен в различни позиции спрямо центромерата на дългото рамо на хромозома 6Н не показва еднозначни отклонения спрямо контролата (Parazova et al., 2001). Остават открити и въпросите за механизмите, които са отговорни при растителните и животинските хибриди рибозомните РНК гени само от единия родител да се транскрибират и участват във формирането на ядърцето (междувидово ядърцево доминиране).

Посочените по-горе аргументи извеждат на преден план актуалността и подчертаната целенасоченост на дисертационния труд.

В литературния обзор компетентно са разгледани въпросите непосредствено свързани с темата на дисертационния труд. Направен е професионален анализ на локализацията на рибозомните РНК гени, брой на РНК гените, епигенетичния контрол на регулацията на рРНК гените, моделирането на хроматина и чувствителността към ДНаза I. Специално място е отделено на междувидовото и вътревидовото ядърцево доминиране.

Като цяло литературният обзор разкрива солидна професионална култура и способност за компетентна интерпретация на получените експериментални резултати от различни изследователи. Той би спечелил още повече ако бяха представени и интригуващите нови данни за ролята на малките интерфериращи РНКи в регулиране

активността на рРНК гените, както и на ролята на специфичните за растенията РНК полимераза IV и РНК полимераза V.

Раздел „Материали и методи“ впечатлява с богатството на включения в експерименталната работа материал. Използвани са оригинални линии ечемик, получени в резултат на облъчване с γ -лъчи (150 и 200 Gy) на сухи семена от стандартния кариотип двуреден пролетен ечемик сорт Freya и транслокационната линия T-1586 (Гечев, 1996).

Тези линии съдържат хромозомни реконструкции, които засягат позицията, структурата и целостта на рибозомните локуси (транслокационни линии T-30 и T-21; дупликационна линия D-2946; делеционна линия T-35). Без тази методическа постановка би било невъзможно провеждането на планираното в рамките на дисертационния труд сериозно и всеобхватно изследване на регулацията на транскрипцията на рибозомните РНК гени. Прецизно представеният широк набор от генетични и молекулярно биологични методи е напълно адекватно използван за целите на експерименталната работа.

В резултат на голямата по обем експериментална работа, богатата методическа постановка и изискващия висока прецизност методически арсенал са получени интересни резултати.

Тъй като в литературата са налице данни, че при някои транслокационни и дупликационни линии диференциалната експресия на ядрцевите организатори е свързана с промяна в броя на рРНК гените (Subrahmanyam et al., 1994), в дисертационния труд е проведено изследване на включените реконструирани кариотипове за наличие на амплификация или деамплификация на рРНК гените чрез анализ на броя на копията в двата рибозомни локуса върху хромозоми 5Н и 6Н. Безупречните хибридизационни профили при линии T-1586, T-30, T-21 и D-2946 показват наличие и на двата фрагмента с дължина 9.8 и 8.8 кб, докато при делеционната линия T-35 съвсем логично – само един фрагмент с дължина 8.8 кб (липса на НОР 6Н). Съотношението между интензивностите на късия и на дългия рДНК повтори при T-30, T-21 не показва достоверни различия с това при контролата T-1586 (1.1), което корелира с данните на Parazova et al. (2001), и при T-1586 и транслокационните линии T-13, T-17 и T-30 промени в броя на рРНК гените не са настъпили в сравнение с изходния сорт Freya, докато при дупликационната линия D-2946 е налице индикация за наличие на амплификация на рРНК гените в НОР 5Н. Изчисленото съотношение между двете рДНК повторени единици (8.8 и 9.8 кб) е от порядъка на 1.25.

Активността на РНК полимераза I е изследвана в система от изолирани ядра от ечемик. Този показател е мярка за активността на процеса транскрипция. Експерименталните резултати показват, че при всички линии с изключение на T-35 не се наблюдават съществени промени в активността на двете ядрени РНК полимеразы. При линия T-35, обаче, тя нараства с 44% в сравнение с контролния вариант, докато активността на РНК полимераза II практически не се променя. В случая при делеция на единия НОР (НОР6Н) се наблюдава компенсаторен стимулационен ефект върху транскрипцията на рРНК гените в единствения останал НОР5Н. Тъй като в експерименталната система отсъства индикация за нови РНК вериги, то очевидно активността се дължи само на елонгация на РНК веригите.

Известно е, че участъците от хроматина, които са ангажирани в процес на активна транскрипция притежават повишена чувствителност към действието на нуклеази и затова подобен род изследвания намират широко приложение при изучаване на връзката между генната експресия и структурата на хроматина. Такъв подход е използван и от докторантката. Като критерии за активността на рРНК гените в мутантните линии (T-30, T-35 и D-2946) е изследвана чувствителността на рДНК към

смилане с екзогенна ДНаза I. Хиперчувствителни места към ДНаза I в рДНК повторените единици се откриват в състава на междугенния спейсър (МГС) и не зависят от нуклеотидните последователности и/или специфични нагъвания на ДНК, а се обуславят от хроматиновата структурата на рДНК. Промяната в позицията на единия от НОРи както и амплификацията на рРНК гените в единия от тях не са съпроводени с големи промени в хроматиновата структура както и с промяна в броя на активните рРНК гени (отваряне на нови гени за транскрипция).

Проведените изследвания с метил-чувствителни рестрикционни ензими не показват различия в профила на метилиране на рДНК от контролата и изследваните с променена позиция или структура на НОР линии. Това показва, че не винаги е налице корелация между диференциалната експресия и метилирането на рДНК.

За картиране на хипометилираните участъци е приложен методът на „индиректно крайно белязане”, тъй като чрез него прецизно се локализира скъсванията предизвикани от метил-чувствителните рестриктази. Само малка част от Нра II и Нна I местата в повторените рДНК единици са хипометилирани, докато много от тях са резистентни, което показва, че те са метилирани във всичките си -CCGG- и -CGCG- места, локализирани както в МГС така и в структурните гени за 18S и 25S рРНК.

Заклучение:

Дисертационният труд на Ана Димитрова е едно сериозно и заслужаващо внимание изследване в областта на молекулярната генетика и биология. Работната хипотеза върху която е изградена експерименталната работа за предполагаема връзка между организацията на хроматина и диференциалната експресия на рРНК гените в генома на ечемика се е оказала изключително ползотворна. Надеждна и необходима основа за проведените изследвания са и създадените от проф. Гечев в Института по генетика генетично стабилни транслокационни линии ечемик с реконструкции, засягащи позицията, структурата или целостта на рибозомните локуси в 5Н и 6Н хромозоми.

Богатият методически арсенал на докторантката, адекватно използваните методи и прецизно изпълнените експерименти са довели до получаването на интересни резултати с потвърдителен и оригинален характер.

Те обогатяват познанията ни относно механизмите обуславящи позиционния ефект при експресията на рибозомните РНК гени; ролята на РНК полимераза I и факторите контролиращи нейната активност; структурата на хроматина, отговорна за голям брой генетични процеси в това число и ядръцевото доминиране; връзката между диференциалната експресия на гените и процесите на метилиране на цитозиновите бази в ДНК; наличието на райони от МГС с повишена чувствителност към ДНаза I и предполагаемата им връзка с важни регулаторни функции.

Съществен резултат в дисертационния труд е установеният компенсаторен стимулационен ефект в експресията на рРНК гените от единствения НОР5Н в делеционната линия Т-35, дължащ се на увеличена скорост на транскрипция. Тя се съпровожда 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 ДНаза I.

Докторантката демонстрира солидна професионална култура и обективен подход при интерпретацията на собствените и чужди експериментални резултати. Атестат за прецизно проведените експерименти са и безупречните хибридационни профили, които заслужават адмирация.

На основание на горепосоченото убедено препоръчвам на Научното жури да присъди на гл. асистент Анна Димитрова Димитрова образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност „Генетика” шифър 01. 06. 06.

30. 06. 2011

подпис:

/проф. д-р Спаска Петкова/