

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен
“Доктор”

Тема на дисертационния труд: “Проучване експресията на рибозомните гени в структурни мутантни форми на *H. vulgare* L.”

Автор на дисертационния труд: Меглена Левчова Китанова, редовен докторант в катедра „Генетика” на Биологическия факултет при СУ «Кл. Охридски».

Рецензент: проф., д. б. н. Костадин Иванов Гечев.

В представения ми за рецензиране дисертационен труд предмет на проучване са проявите и механизмите на явлението ”вътревидов нуклеоларен доминанс” при ечемика, където комбинирането чрез реципрочна транслокация на двата основни клъстера от рибозомните РНК (rРНК) гени в една и съща хромозома води до частично или пълно подтискане на транскрипционната активност на един от тези клъстери.

По общо признание, рибозомните гени са едни от най-добре проучените генетични локуси на еукариотните организми и това несъмнено е следствие от изключителните предимства, които те предоставят при изследванията на хромозомно и молекулярно ниво. Това е и причината за тяхното широко използване при изясняване на регулаторните механизми на експресията на генома на висшите растения. Както локализацията, така и експресията на тези гени може да бъде визуализирана чрез използване на сравнително прости цитологични методи. Като правило, те са организирани в множествени генни фамилии, обхващащи от стотици до хиляди тандемно разположени повтори, локализирани в специфични хромозомни райони, наречени нуклеолусни (ядърцеви) организатори и видими цитологично като вторични ахроматинови констрикции в хромозомната структура. Цитологично лесно идентифицируема е и експресията на рибозомните гени, която е свързана с формирането на комплексна ядрена структура, ядърцето,

където протича транскрипцията на тези гени и комплектоването на рибозомите – клетъчните „фабрики” на белтъчния синтез.

Докторантката е използвала безупречно посочените предимства на рРНК гените и е получила внушителен масив от данни с безспорна достоверност. Не може да се подлагат на никакво съмнение актуалността и научната значимост на дисертационната разработка, която е насочена към изучаване на генетични явления с фундаментално значение, а именно, процесите на позиционно зависимата експресия и инактивирането на гените при висшите еукариоти.

Дисертационният труд е написан на 177 близки до стандарта печатни страници и структурно е построен по традиционно възприетата схема: увод (2 стр.), литературен обзор, не съвсем удачно озаглавен като „въведение” (42 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (14 стр.), резултати и обсъждане (54 стр.), заключителна част (15 стр.), изводи (1 стр.), приноси (1 стр.) и списък на използваната литература (30 стр.). В края на дисертацията е приложена справка за участието на докторантката в национални и международни научни форуми, декларация за оригиналност и кратка професионална автобиография.

Литературният преглед включва 498 заглавия, значителен брой, от които са излезли от печат през последните няколко години и почти всичките публикувани в реферирани и реномирани чуждестранни издания, на латиница. Като цяло, тази част от дисертацията заслужава много висока оценка. С впечатляваща компетентност и на достъпен за читателя език са отразени съвременните познания за структурната организация и функционалните механизми на транскрипция на гените, обуславящи синтеза на рибонуклеиновите киселини (РНКи) а също така и проявите и механизмите на инактивация на рРНК гените в междувидовите хибриди и в транслокационни линии при висшите растения и ечемика, в частност. Не мога да не отбележа, че в дългогодишната ми практика на рецензент, тази дисертация е рядък пример за направен всеобхватен и задълбочен анализ на съществуващите в научната литература данни по изследваната тематика. Към

положителните характеристики на обзора трябва да отнесем и умело очертаните приноси на българските учени в обогатяване на познанията ни за структурната и функционалната организация на рРНК гените и откритието и изучаване проявите на явлението вътревидово нуклеоларно доминиране.

Към този раздел на дисертационния труд обаче, могат да бъдат отправени и някои забележки, най-съществената, от които според мен е липсата на акценти в критичния анализ на данните от литературата. Този недостатък изпъква много ясно при паралелното обсъждане на фактологичния материал и интерпретацията на нуклеоларното доминиране при междувидови хибриди, от една страна, и структурните мутанти, от друга, дефинирани съответно като междувидов и вътревидов нуклеоларен доминанс. Не става ясно в каква степен докторантката е склонна да приеме изказаното в по-ранните публикации схващане, че двете явления, които имат някои сходни прояви са резултат от идентични процеси, в чиято основа лежат сходни причини и механизми.

Два взаимно свързани факта показват убедително, че супресията в активността на рРНК гените при междувидовите хибриди, от една страна, и при мутантните форми със специфична транспозиция на основните клъстери на тези гени при ечемика, от друга, са феномени от различен порядък, породени и контролирани от различни биологични механизми. Първо, при междувидовото нуклеоларно доминиране настъпват обратими драстични промени в компактизацията на транскрипционно активните рРНК гени, локализирани в НОри с подтисната експресия и второ, тази компактизация на хроматина се съпровожда с възникване на хиперметирирани места в регулаторните участъци (междугенните спейсери) на инактивираните НОри. Такива процеси не се наблюдават в случаите на вътревидовидов нуклеоларен доминанс и едно по-ясно съпоставяне в дискусията на биологичните механизми, съпътстващи двата феномена би спомогнало за по-убедителната интерпретация на получените от докторантката експериментални данни.

За успешната реализация на поставените в дисертацията изследователски задачи и постигането на набелязаните цели изключително

важна роля изиграва правилният подбор на използваните като експериментален материал структурни мутанти ечемик. Това са хомозиготни транслокационни линии получени от две богати чуждестранни колекции, които засягат по специфичен начин структурата и позицията в генома на основните рибозомални клъстери, локализирани в двете сателитни хромозоми 5Н и 6Н. Не по-малко значение в това отношение има и използването на един широк набор от съвременни техники на класическата и молекулярната цитогенетика. Всъщност, в основата на високата ефективност на проведения цитогенетичен анализ стои една уникална особеност на експресията на рРНК гените у висшите еукариоти, а именно, че тяхната транскрипция не може да протича извън ядрцата. По такъв начин, формирането на тези ядрени структури, което се визуализира чрез оцветяване със сребърен нитрат е прост, но изключително точен цитологичен тест за експресията на тези гени; липсата на ядрце означава отсъствие на транскрипционна активност, а относителният размер на ядрцата в рамките на клетъчното ядро позволява измерване на диференциалната активност на един нуклеолусен организатор спрямо друг.

Към методичните достойнства на дисертационната разработка трябва да посочим умелото прилагане на флуоресцентната *in situ* хибридизация със специфични фрагменти рДНК - молекулярно-цитогенетичен подход, който е позволил на докторантката да прецизира хромозомната локализация на транслокационните обмени в изследваните мутантни форми, стъпка, без която не би било възможно да се интерпретират достоверно вероятните механизми на позиционно зависимата експресия на рРНК гените. От друга страна, прилагането на RT-PCR анализът, макар и да не позволява отчитане на диференциалната транскрипционна активност на рРНК гените от двата клъстера, е спомогнал за изследване на относителните нива на транскрипция на тези гени при различните структурни мутанти и получаването на данни, които хвърлят допълнителна светлина върху молекулярните механизми на модулираната експресия на рибозомните гени.

Насоките на дисертационните изследвания са определяни от характера на хромозомната реконструкция на използваните мутантни форми. Транслокационните линии Т-505 и Т-506, които са били обект на аналогични изследвания преди това и от други автори имат сходна хромозомна конституция; двата рибозомни клъстера са локализиращи в срещуположните рамена на една единствена хромозома, само, че при Т-505 транслоцираният НОР принадлежи по произход на стандартната хромозома 6Н, а при Т-506 – на хромозома 5Н. Тази разлика в хромозомната конституция на двете линии е в основата на един от значимите резултати на дисертацията; получени са доказателства в подкрепа на концепцията, че при вътревидовия нуклеоларен доминанс у ечемика неизменно доминира експресията на НОР на хромозома 6Н, независимо дали обитава оригиналното си място в кариотипа или е транслоциран в другата сателитна хромозома 5Н.

В кариотиповете **s** и **q** и двата транслокационни разрива са локализиращи в рамките на ядрцевите организиращи райони. Цитологичният анализ и при двете линии показва сходни резултати с контролните варианти. Във връзка с анализа на тези линии обаче изниква въпросът: Има ли достоверни доказателства за твърдението на стр. 59, че транслокационните обмени са локализиращи проксимално на НОР-овете? И ако е установена разлика в хромозомната конституция на двете линии защо Фиг. 3.1 (стр. 60) са представени с идентична идиограма?

Значителен интерес представляват изследванията с мутантната линия **ab**, при която единият от транслокационните локуси се намира в НОР на хромозома 5Н, а другият – в централния участък на хромозома 6Н. В резултат на този обмен соматичният хромозомен набор на тази линия съдържа шест района с потенциал за нуклеоларна активност: двата хомолога на реконструираната хромозома 5Н^{6Н} носят по един изцяло транслоциран НОР 6Н и по един частично останал клъстер от рРНК гени на НОР 5Н, а хомолозите на реконструираната хромозома 6Н^{5Н} носят по един частично транслоциран клъстер от рРНК гените на хромозома 5Н. Напълно според очакванията, при цитологичния анализ на този кариотип са наблюдавани

шест първично формирани ядърца с различен размер (Фиг. 4.15a); една двойка ядърца с нормална големина, най-вероятно резултат от транскрипцията на рРНК гените на структурно непроменения НОР 6Н, а другите две двойки ядърца с драстично различаващ се размер, по всяка вероятност са формирани от двата генни клъстера на асиметрично разделения от транслокацията НОР 5Н. Последните очевидно съдържат различен брой генни повтори и следователно формират ядърца с различна големина. Що се отнася до твърдението на докторантката за наличие на несъответствие между броя на Ag-НОР-овете и броя на първично формираните ядърца, обяснението може да се търси в недостатъчната разрешителна способност на техниката «сребърно оцветяване» при идентификация на транскрипцията на къси рДНК последователности.

На фона на представената в дисертационния труд интерпретация на резултатите от молекулярно-цитогенетичния анализ на линия *ab* изникват и някои въпроси:

1. Има ли достатъчно убедителни експериментални данни за твърдението (стр. 101), че силно понижената транскрипционна активност (мълчанието) на рРНК гените в нетранслоцираната част на НОР 5Н се дължи именно на нуклеоларно доминиране на НОР 6Н, а не на драстично ниския в този участък брой генни повтори?

2. Как да се обясни фактът, че дистално локализираният НОР в хромозома 5Н^{6Н}, който съответства на структурно незасегнатия от транслокацията НОР 6Н, при FISH анализа показва по-слабо интензивен хибридизационен сигнал от проксимално локализирания частичен клъстер от рРНК гени на НОР 5Н (Фиг. 4.16).

При анализа на транслокационната линия Т-21, в която части от НОР 5Н са пренесени в дългото рамо на хромозома 1Н и линия Т-627, при която аналогично е осъществен транслокационен пренос на част от рРНК гените на НОР 6Н в дългото рамо на хромозома 3Н, се наблюдава несъответствие между броя на идентифицираните с FISH НОР-участъци и броя на първично формираните ядърца, което е особено силно изразено при Т-627. Получените

резултати повдигат много интересни въпроси, които не са получили отговор в дисертацията и разкриват перспективи за по-нататъшни проучвания на проблема за вътревидовия нуклеоларен доминанс.

Много ценна информация е получена и при провеждане на молекулярните анализи на транскрипционната активност на рРНК гените в структурните мутанти чрез метода RT-PCR. Забележителен е фактът, че повишена транскрипционна активност са показали само транслокационните линии, при които е наблюдавано нуклеоларно доминиране в експресията на рРНК гените, който докторантката свързва с наличие на дозова компенсация в транскрипционната активност на тези гени.

Нямам възражения относно достоверността на направените в дисертацията изводи и посочените научни приноси, в които докторантката е включила и значими резултати с потвърдителен характер.

Смятам, че научните достойнства на дисертационния труд могат да бъдат резюмирани в два основни приноса с оригинален характер. Чрез комплексно прилагане на съвременни методи на цитогенетичния и молекулярно-генетичния анализ е установено, че:

- Вътревидовият нуклеоларен доминанс при ечемика се обуславя от доминиращата супресия на рРНК гените, локализирани в НОР на хромозома 6Н и този ефект се проявява независимо дали рибозомалният клъстер заема нормалната си позиция или е транслоциран в другата НОР носеща хромозома 5Н на кариотипа.
- При нуклеоларното доминиране в генома на ечемика винаги се наблюдава остатъчна нуклеоларна активност в инактивирания НОР, т. е., супресията никога не е пълна и понижената активност на даден рибозомален клъстер се компенсира с повишена експресия на доминиращия НОР – механизъм, който осигурява нужното ниво от рРНКи за нормалното функциониране на клетката.

Най-съществените резултати от дисертационните изследвания са обобщени в две научни статии, в които докторантката е водещ автор. Едната

е излязла от печат в списание *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, а втората е подадена за публикуване в реномираното международно списание *Chromosome Research*.

Редакционното и техническото оформление на дисертационния труд е извършено старателно и на добро ниво, но са допуснати и някои пропуски. Навлизането на чуждици в българския език особено, когато се отнася за думи от специалната научна терминология приемам като нормален процес, но ми се струва, че задължение на учените е да се опази езикът ни от излишни увлечения в тази посока. Думи като „субкомпармент” (стр. 24), „преципит”, (стр. 65), транспозиран” (стр. 130) или словосъчетания от типа „нуклеолус организиращ район” (стр. 18) са неудачни чуждоезични заимствания, които лесно са могли да бъдат избегнати. Няма да се спирам на не големия брой печатни грешки, които неизбежно съпътстват всяко печатно произведение.

Приложеният към документацията проект за автореферат е подготвен съгласно изискванията и отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

Заклучение: Въз основа на представения в рецензията анализ и оценките на дисертационния труд по отношение на актуалността на тематиката, съвременната методична подготовка на изследванията, научната значимост на получените резултати и перспективата за тяхното използване считам, че той отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България. Към тези аргументи трябва да изтъкнем и факта, че в процеса на обучението и изследователската работа докторантката **Меглена Левчова Китанова** се изгражда като подготвен специалист, способен да решава самостоятелно, на съвременно научно равнище проблеми на генетиката и сродните области на биологията. Ето защо, с голяма убеденост ще гласувам да и бъде присъдена образователната и научна степен **«Доктор»**.

30.05.2011 г.

Рецензент:

/Проф. К. Гечев/