

## РЕЦЕНЗИЯ

на

дисертационния труд на **Меглена Левчова Китанова**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”, научна специалност 01.06.06 – Генетика на тема: „Проучване експресията на рибозомните гени в структурни мутантни форми на *H. vulgare* L.»

Развитието на геномиката показва, че познаването на пълната нуклеотидна последователност на организмите не е достатъчно, за да се разбере как функционират гените в живите клетки. Стана ясно, че кодът на записване, запазване и предаване на генетичната информация в молекулата на ДНК не е достатъчен, за да осигури динамиката на генната експресия, която се наблюдава при клетъчната диференциация и развитието на организмите. Унаследяването на специфична генна експресия без промяна на самите гени на ниво последователност на ДНК представлява друг начин, друг код за предаване на наследствената информация. Този код наричат епигенетичен и той се осигурява чрез промени в статуса на самия хроматин, от който зависи транскрипционната активност на гените. Според правилата на епигенетиката, кондензираният хетерохроматин със своята висока степен на опаковка на ДНК инактивира локализираните в него гени, а еухроматинът, тъй като има разхлабена конформация, обратно – позволява тяхната транскрипционна активност.

Еукариотните рибозомни гени, със своята тандемна повтореност по генома, със своята значителна изученост са прекрасен модел за изучаване на взаимовръзката между транскрипцията на гените и структурата на хроматина и за изучаване на епигенетичните механизми, контролиращи генната експресия.

Всеки рибозомен ген кодира голям 45S-първичен транскрипт, от който впоследствие се получават 18S; 5,8S и 26-28S рибозомна рРНК – всички те участващи в изграждането на рибозомите. Множествените рДНК-гени са разположени тандемно в специфични хромозомни локуси, наречени ядърцеви организатори(NOR). Тези локуси са местата, където в интерфазата транскрипцията на рибозомните гени образува ядърца и в метафазните хромозоми се наблюдават вторични прищъпвания.

Описаната организация на рибозомните гени позволява те да бъдат изучавани не само на молекулно ниво, но и на хромозомно ниво – с цитогенетични методи.

Именно с тази комбинация от методи докторантката Меглена Китанова си е поставила за цел да изучи експресията на рибозомните гени в различни транслокационни линии ечемик и позиционния ефект на всяка съответна хромозомна аберация върху активността на ядърцевите организатори в дадената линия.

В еукариотите гените, кодиращи рДНК, могат да бъдат в две епигенетични състояния, различни въз основа на тяхната хроматинова структура, която стабилно се унаследява в клетъчните поколения. Освен това, тяхната активност е в силна зависимост от хромозмния им контекст. Така, още през 1927 год. Навашин описва явление на обратимо подтискане на активността на ядърцевите организатори на единия от видовете при междувидови хибриди на *Crepis* – ядърцево доминиране (nucleolar dominance). Този феномен бе обяснен като междугеномно взаимодействие, свързано с промяна в хроматиновата структура на единия NOR и превръщането му в кондензиран хетерохроматин.

Дисертационният труд е написан на 172 стр. и включва разделите: увод (3 стр.); въведение (41 стр.); цел и задачи (1 стр.); материал и методи (22 стр.); резултати и обсъждане (53 стр.); обобщение (12 стр.); заключение (2 стр.); изводи (1 стр.); приноси (1 стр.); литература (30 стр.).

Въведението (литературният обзор) се състои от 3 раздела, посветени, съответно на: организацията на рРНК-гените; регулация на тяхната транскрипционна активност и на ядърцевото доминиране.

В тази част от дисертационния труд ясно се вижда отличната теоретична подготовка на докторантката. Тя разглежда много задълбочено, с много вещина проблема за организацията на рибозомните гени в еукариотите и в частност, в растенията, както и механизмите, чрез които се контролира тяхната експресия. Специално внимание е отделено на ядърцевото доминиране. Разглеждат се подробно предполагаемите механизми на това явление при междувидовите хибриди: хипотезата за видовоспецифични транскрипционни фактори, съгласно която при междувидовото ядърцево доминиране транскрипционните фактори на единия вид не разпознават рибозомния генен промотор на другия; хипотезата за небалансираните ехансери на рибозомните гени, които са в различен брой при двата вида и имат различен афинитет за свързване с транскрипционните фактори. Докторантката разглежда ядърцевото доминиране и в контекста на редица други по-обща събития, които водят до изключване на рРНК-гените чрез модификации на ДНК, на хистоните и с участието на хроматин-ремоделеращи комплекси.

Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани точно и ясно. Намирам само, че има известно припокриване във формулирането на задачи 1.2 и 1.3.

Използваните методи са напълно адекватни на поставените задачи.

Първата част от резултатите в дисертационния труд представлява много подробен цитогенетичен анализ на рДНК-локусите в осем транслокационни линии на ечемика *Hordeum vulgare L.*, както и на активните ядръцеви организатори (NOR), транскрибиращи рибозомните гени. Той е проведен чрез сребърно оцветяване и флуоресцентна *in situ* хибридизация в митотични и мейотични тъкани (пахитен и диакинез).

В тези тъкани докторантката Меглена Китанова извършва количествен анализ на клетките, които показват различен брой и размери на ядръцата. В стандартния кариотип на ечемика има две NOR- носещи хромозомни двойки, което означава образуване на четири първични ядръца. Варирането на този брой между клетките се дължи на сливане на ядръцата в интерфазата или на получаване на нови рДНК-локуси, пренесени от оригиналното си място в процеса на транслокация и образуващи малки ядръца(микроядръца).

Във всички изследвани линии Китанова показва тясна връзка между размера на ядръцата като продукт на активността на даден NOR и размера на вторичното прищъпване на този NOR. От размера на ядръцата тя определя степента на експресия на даден рДНК-локус и установява, че в транслокационни линии *T505* и *T506*, в които се наблюдават две нормални ядръца и две микроядръца, транскрипцията на рибозомните гени в транслоцираните NOR-ове от хромозома 5Н, е частично потисната. В тези линии заради транслокация NOR-ове от хромозоми 5Н и 6Н се намират в двете рамене на една и съща хромозома, поради което показват вътрехромозомен позиционен ефект на частична супресия(вътрехромозомно ядръцево доминиране).

В линиите с реципрочна транслокация между NOR-носещи и NOR-не носещи хромозоми Китанова установява наличие на три двойки рДНК-локуси, формиращи ядръца, една от които има слаба транскрипционна активност (или висока степен на компактизация в метафаза на разположения в съседство хетерохроматин, поради което не може да се открие дори с високо-чувствителния метод на флуоресцентната хибридизация *in situ*). Сходен резултат е получен и за линия *ab*, при която се установяват с FISH-метода шест рДНК-локуса, подредени тандемно след транслокацията в една двойка хомоложни хромозоми.

Този раздел от резултатите е описан много подробно, с прекрасен илюстративен материал.

Във втория раздел на дисертационния труд са представени резултатите от молекулярно-генетичния анализ на транслокационните линии ечемик. Докторантката провежда полуколичествен RT-PCR-анализ на относителните нива на транскрипция на рДНК при изследваните осем транслокационни линии. Целта на тези експерименти е да се направи връзка между количеството транскрипти на рибозомните гени и наблюденията вътрехромозомен позиционен ефект на супресия на ядрцевия организатор при транслокация.

Проведени са експерименти с използване на различни двойки праймери, амплифициращи различна част от транскрипционната единица на рибозомните гени.

Когато използва праймери за 5,8 рРНК, докторантката не наблюдава различия в количеството на PCR-продуктите във всички анализирани линии. Тъй като тоталната РНК, с която се работи в първата стъпка на провежданите експерименти, съдържа 18S; 5,8S; 28S рРНК; мРНК; тРНК, докторантката прави закономерен извод, че в нивата на зрелите рРНК във всички транслокационни линии и в контролата няма съществени различия.

За да провери нивото на незрелите рРНК в транслокационните линии, Меглена Китанова използва и друга двойка праймери, обхващащи областта на транскрибируемия спейсер. В този случай тя установява повишена транскрипционна активност на рРНК-гените в линиите с установено ядрцево доминиране (*T505* и *T506*), както и за линия *ab* също с ядрцево доминиране и тандемно разположени три двойки рДНК-локуси в една двойка хромозоми. Значително е повишена също транскрипционната активност в транслокационната линия *s* с реципрочна транслокация, при която точката на разкъсване е в крайната дистална част на двата NOR'a – на 5Н- и на 6Н-хромозоми.

Стандартен PCR с геномни ДНК от изследваните линии показва, че между тях няма значителни разлики в броя на рДНК-копията. Въз основа на всички тези данни Китанова изказва хипотезата, че повишената транскрипционна активност в линиите: *s*, *ab*, *T505* и *T506* се осъществява на ниво транскрипция на пре-рРНК, а по-късно, когато тези РНК зреят, се включва механизъм, който изравнява и поддържа количеството рРНК-транскрипти на постоянно ниво, оптимално за нуждите на клетката от рибозоми. Тя изказва идея, че повишената транскрипция на незрели пре-рРНК-транскрипти, вероятно, се отнася до експресията на доминантния NOR от 6Н-

хромозома, който потиска частично супресията на 5Н- NOR'a, когато двата са разположени в една хромозома – в едно и също рамо(линия *ab*) или в различни рамене(линии *T505* и *T506*) - позиционен ефект. Докторантката счита, че при тази локализация на двата NOR'a се потиска експресията на единия, а компенсаторно се увеличава транскрипцията на рибозомните гени в активния NOR.

Изказаната хипотеза подлежи на лесна и директна проверка, ако за RT-PCR се използват праймери за целия рибозомен генен повтор, който има специфична дължина, различна за двата NOR'a. В друг вариант на тази проверка би могло да се анализира съдържанието на микроядърцата в линии *T505* и *T506* за наличие в тях на рибозомен повтор само от 6Н-NOR.

Изводите от дисертационния труд са формулирани точно и ясно и в пълно съответствие с получените резултати. Докторантката М. Китанова посочва 5 приноса, 4 от които имат оригинален характер. Те се отнасят до: пълна характеристика за изследваните няколко транслокационни линии по отношение на техните рДНК-локуси и тяхната транскрипционна активност; установяване на факта, че микроядърцата принадлежат на супресирани рибозомни гени; установяване на частична супресия в транслокационна линия с тандемно разположено рДНК-локуси и установяване на повишена транскрипционна активност на пре-рРНК в линии с ядърцево доминиране(*T505* и *T506*).

Във връзка с дисертацията М.Китанова има публикувана една статия в *Biotechnol&Biotechnol.Eq.* и още една е представена за печат в *Chromosome Research*. Освен това резултатите и са докладвани в шест национални и международни научни форуми.

Тя е представила декларация, че цялата дисертация е изработена самостоятелно от нея и че публикациите имат оригинален характер. Тъй като работя в катедрата по Генетика на БФ и имам непосредствени впечатления от работата на докторантката, напълно съм убедена, че всички представени резултати са дело само на нейния труд под ръководството на научния ръководител проф. Дбн Севдалин Георгиев.

Единствените ми забележки към дисертационния труд се отнасят до използването на редица чужди термини като: „нуклеоларен доминанс”, „протеин”, „мултимегабазово явление” и др., за които има подходящ български превод, както и на някои стилови неточности и печатни грешки.

В заключение, като имам пред вид прекрасната подготвеност на докторантката в областта на рибозомните гени и контрола на тяхната експресия(тя цитира в своя труд

498 заглавия, огромната част от които са издадени в последните години), методичните умения, видни от дисертационния труд, както и оригиналните и научни приноси, убедено препоръчвам присъждане на Меглена Китанова на научната и образователна степен „доктор”.

5 юни 2011 год.

Подпис:

доц. д-р Гинка Генова  
Катедра Генетика, БФ, СУ „Св.  
Кл. Охридски”, София