

Институт по молекулярна
биология - БАН
В.Н. 26-РА
10.02.25

РЕЦЕНЗИЯ

От чл-кор. Евдокия Пашева, д.б.н.

На дисертационния труд на проф. Стефан Димитров за присъждане на научната степен „доктор на науките“

Представеният ми за рецензия труд на тема „Хроматинът от структура към функция“ се състои от четири глави: въведение, цели, резултати и обобщение и дискусия. В глава „Въведение и предистория“ авторът представя натрупаните данни за опаковането на ДНК в еукариотното ядро и организацията на генома. Особено внимание се обръща на структурата на основната нуклеозомна частица и сгъването на хроматиновия филамент в хроматиновото влакно. Организацията на хистоновия октамер и неговите взаимодействия с нуклеозомната ДНК са анализирани в детайли и е обсъдено "поведението" на NH₂-хистоновите крайни опашки. Наличните данни за структурните свойства на линкерния хистон H1 и неговата функция са описани като откритите въпроси за взаимодействието на H1 с нуклеозомната ДНК, един от основните проблеми на структурната епигенетика, са ясно формулирани. Описани и анализирани са натрупаните в последните години данни за 3D структурата на хроматиновия филамент като са представени наложилите се в литературата модели. Втората част на Въведението е фокусирана върху това как наличието на хистонові варианти придава нови структурни свойства на нуклеозомата и как това обуславя специфични функции. Разглежда се по-специално структурата на нуклеозомата съдържаща един от основните варианти на хистони, а именно macroH2A, H2A.Z, H2A.Bbd и CENP-A. Бих искала да отбележа, че авторът е съумял да представи един много голям обем от публикувани резултати по темата много синтезирано и прегледно като е анализирал постиженията в светлината на епигенетиката.

Целите на дисертационния труд са ясни и много добре дефинирани и логично изведени от представените факти в литературния обзор. Първата основна цел е насочена към двата основни проблема в структурната епигенетика, а именно структурата на H1-свързаната нуклеозома и 3D организацията на хроматиновите влакна, проблеми, за които епигенетичната общност проявява голям интерес повече от четири десетилетия. Втората група от цели е фокусирана върху хистоновите варианти, техният начин на включване в хроматина и ролята им в хомеостазата на ядрото.

В раздел Резултати авторът е използвал неконвенционален, но до голяма степен приет от международната общност начин да представи своите експериментални данни. Резултатите са представени като съвкупност от част от публикациите на автора, които пряко третираат целите на дисертацията. Резултатите от взаимодействията и свързването на хистон H1 към нуклеозомата и хроматиновия филамент са описани в 4 статии (#1-4 от "Публикации, използвани за дисертационния труд"). Чрез използване на голям набор от структурни, биофизични и биохимични подходи, е описано подробно картографиране на линкерните хистонов H1-ДНК взаимодействия при разделителна способност на единична ДНК база. След обработка на данните е определена както кристалната, така и крио-ЕМ структурата на H1-свързаната нуклеозома. Данните показват, че H1 свързването индуцира по-компактна и твърда конформация на нуклеозомата. H1 глобуларният домен взаимодейства с ядрото на ДНК на диадата и с двата ДНК линкера, докато С-терминалният домен се асоциира предимно с единичен ДНК линкер. Като моделна система за определяне на структурата на хроматиновите влакна екипът на Димитров е използвал хексануклеозоми с много ясно позиционирани нуклеозоми. Данните от рентгеновата дифракция недвусмислено показват, че кристалната структура на хексануклеозомата може да се опише като спирала с два старта с еднакви

интерфейси на нуклеозомно подреждане. Данните от footprinting на хидроксилни радикали, биофизични, крио-ЕМ и омрежващи данни потвърждават кристалната структура и разкриват, че малка промяна в йонната среда измества конформационния модел към по-компактна, усукана форма. Как се нагъват хроматиновите влакна в митотичните хромозоми е следващият фокус на д-р Димитров, който чрез измерване на тяхната еластичност е предложил оригинален модел за структурата им (реферат №5). В обобщение, тази първа част от дисертационния труд решава двата основни открити въпроса на структурната епигенетика. Важно да се отбележи, че последните данни от крио-микроскопия потвърдиха тези резултати *in vivo*. Получените оригинални резултати на Димитров и съавт. могат да се разглеждат като значим пробив в областта на епигенетиката. Втората част на дисертацията на д-р Димитров анализира как инкорпорирането на редица варианти на хистони, основните епигенетични фактори, влияе както върху структурата, така и върху функцията на хроматина (статии 6-15). Тази част има подчертан интердисциплинарен характер и използва различни подходи: структурна биология, физикохимия, биохимия, молекулярна и клетъчна биология и епигенетични методи, комбинирани с генетика на мишки. Вzeti като цяло, данните идентифицират някои специфични структурни особености на макроH2A, H2A.Bbd, H2A.Z и CENP-A нуклеозоми и илюстрира как тези характеристики предопределят техните специфични функции. Установено е, че нуклеозомата на хистоновия макроH2A пречи на свързването на транскрипционния фактор и ремоделирането на нуклеозомите SWI/SNF (статия #6). Екипът на Димитров също така анализира структурата и функционалността на нуклеозома с хистоновия вариант H2A.Bbd като изучава ремоделирането на SWI/SNF и p300 зависимата транскрипция на H2A.Bbd нуклеозомни масиви. Установено е, че за разлика от макроH2A нуклеозомите, H2A.Bbd нуклеозоми показват по-ниска стабилност както *in*

vitro, така и *in vivo*, което подпомага транскрипцията на H2A.Bbd хроматина (статии #7-9). Нуклеозомата CENP-A е епигенетичен маркер на центромерите като нейното сформирание се осъществява с помощта на HJURP, който служи като chaperone, и има гъвкави краища. Оригиначните резултати са публикувани в статия #10. Интригуващо е, че гъвкавостта на тези краища е необходима за правилната митотичната функция, тъй като втвърдяването *in vivo* на нуклеозомните краища води до сериозни проблеми и нарушения в процеса на митоза (статия #11).

В последния раздел на втората част се анализират ефектите на хистоновия вариант H2A.Z. Проф. Димитров и сътрудници са идентифицирали първите бозайници за H2A.Z. Те доказват, че белтъкът ANP32E е в състояние да премахне H2A.Z от нуклеозомата и да я замени с конвенционалния H2A (статия #12), докато в обратния процес участва YL1, който отлага H2A.Z в хроматина (статия #13). Последните три статии хвърлят светлина върху функцията на H2A.Z *in vivo* като са използвани различни техники и нокаутирани мишки за H2A.Z (статии #14-16). Резултатите недвусмислено показват, че H2A.Z е един от основните фактори за запазването на целостта на генома и на хомеостазата на ядрото. Изчерпването на H2A.Z в стволовите клетки на базалния слой на епидермиса води до активиране на пътищата на цитозолните ДНК сензори като в следствие се развива възпалителен процес. Тези факти представят в напълно нова светлина H2A.Z-зависими взаимовръзки между епигенетични, имунни и възпалителни процеси.

Взети заедно, резултатите на д-р Димитров за хистоновите варианти са напълно оригинални и са проправили пътя за голям брой изследвания върху функцията на тези белтъци, както *in vitro*, така и *in vivo*. Те са широко многократно цитирани в литературата и са придобили широко международно признание.

Заклучение: Представената ми за рецензия дисертация представлява един изключително обемен и задълбочен труд върху ролята на хистоновите варианти. Авторът проследява не само структурните промени в нуклеозомата, но анализира клетъчните механизми в дълбочина като докладва конкретни зависимости при процесите на ремоделиране на хроматина, митоза, възпаление и т.н. Считам, че постигнатите оригинални резултати, охарактеризираните структурни модели и изказаните хипотези представляват изключително ценен принос за развитието на епигенетиката. Прилагането на новаторски подходи при изследванията могат да служат като основа за бъдещо разработване на нови тематики и направления свързани със структурата и функциите на хроматина и епигенетичния контрол.

Предлагам най-убедено да бъде присъдена на проф. Стефан Диомитров научната степен „Доктор на науките“.

