



РЕЦЕНЗИЯ

от

Проф. д-р Ива Угринова

Институт по Молекулярна биология, БАН

Относно

Дисертационен труд на доктор Стефан Димитров за присъждане на научна степен „Доктор на науките“

Тема: „Хроматинът от структура към функция“

Рецензията е изготвена в съответствие с Протокол №1 /16.12.2024 г от първото заседание на научното жури назначено със Заповед № 209 ОБ/06.12.2024 год. на Директора на ИМБ-БАН, определяща неговия състав.

Документи и допустимост на процедурата:

Дисертационният труд и автореферата на български език както и наборът от документи заложили в ППЗРАСРБ на ИМБ с приложени към тях публикации и протокол от заседанието на ПНЗ са в съответствие с актуалната нормативна уредба, регулираща провеждането на тази процедура.

Тематичен обхват и научна област:

Тематичният обхват на изследването в представения дисертационен труд е фокусиран върху структурната епигенетика, по-специално върху разбирането на структурата и функционалната роля на хистоните и хроматиновите влакна. Изследването разглежда основни въпроси като свързването на хистон H1 с нуклеозомата, 3D организацията на хроматиновите влакна, както и влиянието на различни хистонові варианти върху структурата и функциите на хроматина. Научната област на изследването е биология на хроматина и епигенетика, с особен акцент върху молекулярната биология, биохимията и структурната биология. Работата включва и мултидисциплинарен подход, използвайки методи като криоелектронна микроскопия, хидроксилен радикален отпечатък и биофизични анализи.

Структура, раздели, цели, оригинални резултати и изводи

Дисертационният труд е написан на 309 стандартни машинописни страници, и представлява сборник от научни публикации съпроводен от изчерпателен литературен обзор и свързваща дискусия. Литературният обзор покрива тематичния обхват на труда и включва раздели, посветени на хроматина и хистоновите варианти в този раздел са обхванати 178 библиографски източника.

Литературният обзор показва изключително познаване на тематиката на труда, чете се лесно и дава подробна информация за състоянието на изследванията в момента в световен мащаб.

В дисертацията са поставени две ясно и логично формулирани цели и двете свързани с организацията на хроматина в ядрото. Първата е да се намерят кристалните и крио-ЕМ структурите на нуклеозомите свързани с H1 за да хвърли светлина върху тяхната организация в разтвор. Втората се фокусира върху въпроса как основните хистонові варианти *macroH2A*, *H2A.Bbd*, *H2A.Z* и *CENP-A*, чрез модулиране на организацията на нуклеозомите, позволяват правилното функциониране на ядрото. Така формулираните цели всъщност решават два основни научни въпроса: Как линкерният хистон H1 се свързва с нуклеозомата и как хроматиновото влакно се увива в по-плътна хроматинова структура? Тези въпроси са оставали нерешени повече от четиридесет години, след като беше определена структурата на ДНК и нуклеозомната частица.

Настоящата дисертация представя оригинален и интердисциплинарен подход, който успешно адресира и решава тези два основни епигенетични проблема.

По отношение на методиките авторът използва хидроксил-радикално отпечатване (*hydroxyl radical footprinting*), комбинирано с EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) и криоелектронна микроскопия, за да картографира контактите между линкерния хистон H1 и ДНК в моно-, ди- и три-нуклеозомни комплекси с еднбазова резолюция (публикация №1: Syed et al. 2010, PNAS). Използвайки тези данни за моделиране на ДНК, той разработва молекулен модел, който показва как различните домени на H1 взаимодействат с нуклеозомата и предвижда специфична H1-медирана „стеблова“ структура в линкерната ДНК (публикация №2: Mayer et al. 2011, Nucleic Acids Res.). Следва разрешаване на кристалната и крио-ЕМ структура на нуклеозома с H1 с молекулярна резолюция (публикация №3: Bednar et al. 2017, Mol. Cell). В изследването е използван 197-базов нуклеозомен комплекс, съдържащ симетрични 25-базови линкерни ДНК рамена в комплекс с линкерен хистон H1. Анализите показват, че H1 променя конформацията на нуклеозомата, приближавайки двата линкерни сегмента и намалявайки тяхната гъвкавост. Основните изводи, които авторът прави са, че С-терминалният домейн на H1 се локализира главно върху единия линкер, а глобуларният домейн на H1 контактува нуклеозомния диад и двете линкерни ДНК, с което H1 създават асиметрия в нуклеозомата, която вероятно влияе върху структурата на по-високите хроматинови нива. Тези структури са допълнително валидирани чрез ковалентно свързване на протеини и хидроксил-радикално отпечатване. За да анализира по-висшите нива на организация на хроматина, д-р Димитров използва хексануклеозомна система, свързана с линкерен хистон H1. В тези експерименти чрез кристалография с резолюция 9,7 Å е разкрита структурата на тази частица (публикация №4: Garcia-Saez et al. 2018, Mol. Cell). Получената двуспирална хеликална структура показва еднородно наслявяване на нуклеозомите, но с по-малка плътност в сравнение с усукания 30-нанометрова хроматинова фибриля. Данните от крио-ЕМ и последвалите биофизични анализи потвърждават, че малки промени в йонната сила могат да доведат до компактна, усукана форма. Тези изследвания на д-р Димитров са пробив в структурната епигенетика. Нещо повече определената 3D организация на H1-свързаната нуклеозома и двуспиралната структура на хроматиновото влакно наскоро бяха потвърдени и *in vivo*. Известно е, че хроматинът е силно кондензиран в клетъчното ядро, като най-висока степен на

компактизация се достига на ниво митотични хромозоми. Чрез измервания на еластичността на митотичните хромозоми, д-р Димитров предлага модел за тяхната структура (публикация №5: Houchmandzadeh & Dimitrov, 1999, J. Cell Biol.).

За да може клетката да извлече необходимата генетична информация, тя разчита на епигенетични механизми, като ремоделиране на хроматина, пост-транслационни модификации на хистони и ДНК, както и включване на хистонови варианти. Вторият аспект на дисертацията е свързан с хистоновите варианти и тяхната роля и обхваща 11 ръкописа (от №6 до №16), публикувани в най-добрите списания като Nature, Molecular Cell, Nature Structural and Molecular Biology, The EMBO Journal и Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. Тези статии имат пионерски характер и изследват взаимодействието между различните конформации на нуклеозоми съдържащи хистонови вариантни и техните функционални ефекти.

Първата статия, публикувана през 2003 г. (Angelov et al., Mol. Cell) показва, че хистонът macroH2A пречи на свързването на транскрипционни фактори и на ремоделирането на нуклеозомите от комплекса SWI/SNF. macroH2A е най-странния хистонов вариант, състоящ се от хистонов H2A-подобен домен и голяма нехистонова област (NHR), като специфичните свойства на macroH2A нуклеозомите се дължат главно на NHR частта на протеина. Вzeti заедно, данните предполагат, че macroH2A участва в транскрипционната репресия. Интересното е, че H2A.Bbd нуклеозомата, нуклеозома с друг вариант на хистон, показва "противоположни" свойства (статии № 7-9). Включването на H2A.Bbd предоставя по-ниска стабилност на нуклеозомата както *in vitro*, така и *in vivo*. Освен това транскрипцията, активирана от p300- и Gal4-VP16-активираната транскрипция изглежда по-ефективна за H2ABbd нуклеозомни масиви, отколкото за конвенционалните H2A масиви.

От особен интерес са приносите на д-р Димитров в изясняването на структурно-функционалните връзки на CENP-A нуклеозомата (публикации №10 и 11). CENP-A принадлежи към семейството на H3 хистоните и замества H3 в центромерния хроматин. Той се депозира в хроматина благодарение на специфичното взаимодействие между домейна на CENP-A и неговия шаперон HJURP (публикация №11). Чрез криоелектронна микроскопия Димитров и неговите сътрудници определят динамичните свойства на CENP-A нуклеозомата в разтвор. Основни биохимични, протеомни и генетични анализи разкриват, че повишената гъвкавост на краищата на ДНК намалява свързването на хистон H1 към CENP-A нуклеозомата. *In vivo* замяната на CENP-A с хибридни H3-CENP-A нуклеозоми води до рекрутиране на H1, делокализация на кинетохорните протеини и значителни митотични и цитокинетични дефекти. Данните показват, че еволюционно запазената гъвкавост на краищата на CENP-A нуклеозомата е от съществено значение за осигуряване на коректното протичане на митотичния процес. Тези научни публикации са **ключови за разбирането на ролята на центромерите в асемблирането на активни кинетохори както в нормални, така и в патологични условия.**

Хистоновият вариант H2A.Z, мистериозен протеин с многопосочни функции, също е обект на изследване от екипа на д-р Димитров. Първоначално авторът и

неговите сътрудници идентифицират първите шаперони на H2A.Z при бозайници (публикации №12, 13). Те демонстрират, че ANP32E е хистонов шаперон, който премахва H2A.Z от хроматина. YL1, от друга страна, е отговорен за специфичното депозиране на H2A.Z и замяната му с конвенционалния H2A. Чрез геномни изследвания при мишки, комбинирани с биохимични и омни-методи, екипът показва, че H2A.Z играе роля в преждевременното стареене и стартирането на ДНК-ремонта при двуверижни скъсвания (DSB) в мускулните влакна (публикации №14, 15). Изключването на H2A.Z в стволите клетки на епидермиса разкрива тясна връзка между вродения имунитет, епигенетиката и възпалението (публикация №16). Тези последни данни потвърждават, че H2A.Z е ключов фактор за запазването както на геномната цялост, така и на хомеостазата на ядрото. Освен това, те обясняват плеотропните функции на H2A.Z в основните ядрени процеси – въпроси, които остават отворени от момента на откриването на H2A.Z като хистонов вариант.

Изводите, както са формулирани в труда както и описаните приноси могат да бъдат приети, като удачно систематизиращи основните резултати от научно-изследователската програма.

Публикационна активност и наукометрични характеристики

Оригиналните резултати са базирани на 15 публикации излезли в най-реномирани международни издания с висок импакт фактор като Nature, Molecular Cell, Nature Structural and Molecular Biology, Nucleic Acids Research, The EMBO Journal, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA и др. Общият импакт фактор на 15 публикации е 219, а трудовете са цитирани 2335 пъти. Тази стряскаща наукометрия говори сама за себе си.

Автореферат

Авторефератът удачно компилира структурата и съдържанието на дисертационния труд.

Значимост на изследването

Тази дисертация представлява значителен пробив в областта на структурната епигенетика. Определянето на структурата на H1-свързаната нуклеозома и хроматиновото влакно с висока резолюция осигурява знания, сравними по значение с откриването на двойната спирала на ДНК и нуклеозомната частица. Наред с това, функционалните изследвания върху хистоновите варианти предоставят цялостен поглед върху техните роли в регулацията на транскрипцията, ремоделирането на хроматина, стабилността на генома и ядрената хомеостаза.

Препоръки:

1. Препоръчвам дисертацията за най-висока академична оценка поради нейните революционни научни приноси.

2. Препоръчвам на автора да проучи допълнително как тези структурни и епигенетични знания могат да бъдат приложени в терапевтични интервенции и за заболявания, свързани с дисрегулация на хроматина, като рак и невродегенеративни разстройства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Дисертационният труд на д-р Стефан Димитров представлява изключителен научен труд, който съчетава структурна биология, биофизика и функционална геномика, за да даде отговор на основополагащи въпроси в биологията на хроматина. Тя се характеризира с оригиналност, методологична прецизност и интердисциплинарен подход. Получените резултати значително разширяват разбирането ни за архитектурата на хроматина и механизмите на неговата регулация.

Извън науката, познавам Бат' Стефко от над 20 години като прекрасен учител, наставник и приятел. С връщането си в България и в института той успя да убеди и останалите колеги в тези си невероятни личностни качества.

Въз основа на всичко казано до тук давам положителна оценка на дисертационния труд и препоръчвам на почитаемите членове на научното жури да присъдят научната степен „Доктор на науките“ на д-р Стефан Иванов Димитров.

29.01.2025 г. София

Автор на рецензията:

проф. д-р Ива Угринова