

Авторска справка за основните научни постижения

Транскрипцията в еукариотното ядро се извършва във „фабрики“, специализирани за едновременно презаписване на повече от един ген

- [8]¹ Osborne et al., 2004, Nature Genet
- [5] Chakalova et al., 2005, Nat Rev Genet
- [3] Osborne et al., 2007, PLoS Biol

Работата ми в лабораторията, ръководена от Питър Фрейзър (Peter Fraser), беше фокусирана върху няколко научни проблема, свързани с функционирането на клетъчното ядро на бозайници. Едни от най-важните научни постижения на екипа на д-р Фрейзър доведоха до изясняване на организацията на транскрипцията в контекста на архитектурата на ядрото и динамиката на ядрените процеси. Аз бях един от основните участници в тези изследвания. Моята роля се състоеше във въвеждане на ключови *in situ* техники и последващо провеждане на експерименти за събиране на оригинални данни.

Използвайки миши еритроидни клетки и прилагайки РНК и ДНК флуоресцентна *in situ* хибридизация, комбинирана с имунодетекция на РНК полимераза II, ние демонстрирахме, че синтезата на РНК в ядрото е компартментализирана в дискретни фокуси, наречени транскрипционни фабрики (Osborne et al., 2004, Nature Genet). Нашите резултати, наред с резултати от други лаборатории, показваха, че транскрипционно активните гени не се транскрибират непрекъснато. Вместо това всяко отделно генно копие преминава през редуващи се периоди на активна транскрипция, през които е асоциирано с транскрипционна фабрика, и фази на временно „мълчание“, през време на които е разположено извън фабрики. Освен това нашите експерименти за първи път показваха убедително, че в една транскрипционна фабрика могат да се транскрибират два гена едновременно (Osborne et al., 2004, Nature Genet). Тези резултати послужиха за пряко опровержение на общоприетия модел, според който, преди да започне транскрипция на даден ген, промоторът „привлича“ компонентите на транскрипционния комплекс. Вместо това – поне в мнозинството случаи – гените се придвижват до предварително сглобени, вече активни транскрипционни фабрики (Osborne et al., 2004, Nature Genet). След като публикувахме нашите резултати, получихме покана от престижното списание Nature Reviews Genetics да напишем научен обзор по темата (Chakalova et al., 2005, Nat Rev Genet).

Впоследствие разширихме нашите изследвания, включвайки в анализите миши В лимфоцити, преди и след стимулация към пролиферация (Osborne et al., 2007, PLoS Biol). Показахме, че нивото на транскрипция на тежката имуноглобулинова верига *IgH* е високо и не се променя при стимулация на В клетките, докато транскрипцията на *Мус*, чест транслокационен партньор на *IgH*, се индуцира в стимулираните клетки. Нарастването на *Мус* транскрипцията се осъществява чрез увеличаване на броя *Мус* копия в клетъчната популация, които се транскрибират (а не увеличаване на броя РНК полимерази, транскрибиращи едно копие). Както може да се очаква, увеличената транскрипция на *Мус* се съпровожда от повишена асоциация с транскрипционни фабрики. Нещо повече, висок процент от *Мус* копията, които се свързват с транскрипционни фабрики, се включват към фабриките, в които се транскрибира *IgH* (Osborne et al., 2007, PLoS Biol). Тези резултати подсказват възможен механизъм, чрез който *IgH* и *Мус* се оказват в непосредствена близост, което увеличава вероятността за осъществяване на рекомбинация между тях.

¹ [Число] отговаря на номера на статията в списъка на научните публикации, с които кандидатът се представя в конкурса (стр. 6)

Взети заедно, тези изследвания допринесоха съществено за нашата представа за глобалната организация и динамиката на транскрипцията в ядрото. Освен това те насочиха вниманието ни към възможните последици от честото „партньорство“ на гени в транскрипционни фабрики, а именно увеличаване на вероятността от настъпване на рекомбинационни събития и съответно хромозомни транслокации, включително хромозомни реаранжирания с патологични последствия.

β -Глобинови гени и locus control region – модел за доказване на физическото взаимодействие между гени и отдалечени регулаторни елементи

- [11] Carter et al., 2002, Nature Genet
- [10] Chakalova et al., 2004, Methods Enzymol

Един от водещите проекти, по които се работеше в лабораторията на Питър Фрейзър, целеше да се хвърли светлина върху механизма на действие на един регулаторен елемент, наречен контролен регион на локуса (locus control region, LCR). LCR-ът се състои от поредица къси елементи (няколкостотин bp всеки), разпределени в около 15 kb в 5' края на β -глобиновия локус (Фигура 1). Поне един от елементите (HS2) показва свойства на класически енансер, но той не функционира в изолация от останалите елементи, доколкото целият LCR е необходим за нормалната експресия на гените в β -глобиновия локус. И до днес не е напълно изяснено по какъв начин различни регулаторни елементи изпълняват своите функции. Контактните модели за действие на отдалечени регулаторни елементи от типа на енансерите предполагат, че комуникацията с регулираните гени се осъществява посредством физически контакт между енансера и гена. Използвайки модела на мишия β -глобинов локус, който също се контролира от LCR, ние предоставихме първото пряко доказателство, че елементи от LCR-a, включително енансерът HS2, действително се намират в непосредствена близост с активно транскрибирания β -глобинов ген, докато междинните последователности образуват бримка (Carter et al., 2002). За да постигнем този резултат, ние разработихме нова технология, основаваща се на РНК *in situ* хибридизация, наречена RNA TRAP (Chakalova et al., 2004). RNA TRAP е метод за ковалентно маркиране на хроматиновите участъци, разположени около активен РНК полимеразен комплекс, свързан със специфичен ген. Аз имах водеща роля при разработването на новата технология. Нашите резултати, потвърждаващи контактния модел за действие на регулаторни елементи, са от фундаментално значение.



Фигура 1. Карта на човешкия β -глобинов локус на хромозома 11. β -Глобиновите гени са черни правоъгълници. Отделните елементи на LCR-a са отбелязани с вертикални стрелки. Позицията на Корфу делецията е означена с правоъгълник, разположен под нивото на картата.

Експресията на β -глобиновите гени се контролира от транскрипционни и посттранскрипционни механизми

- [7] Chakalova et al., 2005, Blood
- [4] Goren et al., 2006, PLoS ONE

Добре известно е, че феталните *HBG* глобинови гени претърпяват практически пълно заглушаване в хода на индивидуалното развитие на човека и се експресират много слабо само в малък процент от еритроидните предшественици на възрастни индивиди. При някои наследствени състояния обаче *HBG* гените показват повишени нива на експресия при възрастни хора. Тази аномалия е не само безобидна, но дори се оказва полезна в случаите, когато е съчетана с дефекти на „възрастния“ *HBB* ген, тъй като наличието на фетален хемоглобин в кръвта смекчава симптомите на наследствените анемии. Затова механизмите на регулация на експресията на *HBG* и *HBB* гените в процеса на развитие са обект на широк интерес. Ние искахме да изследваме тази регулация в човешки клетки. По тази причина се свързахме с Христос Катамис от Атинския университет и получихме от него биологичен материал (периферна кръв) от пациенти, носещи различни мутации в β -глобиновия геномен район. Така успяхме да изследваме експресията на β -глобиновите гени в първични човешки еритроидни клетки, култивирани *in vitro*. Аз поех водеща роля в тези изследвания. Нашите данни показаха, че β -глобинов локус, който носи делецията Корфу (Corfu; Фигура 1), транскрибира феталните *HBG* гени в клетки от възрастни индивиди (Chakalova et al., 2005). Тези резултати демонстрират наличието на регулаторни елементи в рамките на Корфу делецията, участващи в регулацията на експресията на феталните гени (Chakalova et al., 2005). Независимо от това, че *HBG* гените се транскрибират в хетерозиготни носители на делецията, техните клетки показват нормални, т. е. ниски нива на *HBG* мРНК. В същото време хемоглобинът на Корфу хомозиготите е почти изцяло фетален. Ние успяхме да разрешим този парадокс, прилагайки real-time PCR, с помощта на който направихме точна оценка на нивата както на първичните транскрипти, така и на зрелите *HBG* и *HBB* мРНК при пациенти и контролни индивиди (Chakalova et al., 2005). По този начин разкрихме наличието на посттранскрипционен механизъм на регулация на нивото на *HBG* мРНК, а именно: *HBG* мРНК е нестабилна в присъствието на високи нива на *HBB* мРНК. По тази причина транскрипцията на *HBG* гените не е достатъчно условие за експресия на големи количества от кодираните от тях фетални γ белтъчни вериги; експресията на γ веригите зависи още от нивото на експресия на *HBB*. Тези резултати имат клинично значение, тъй като терапевтичното повишаване на експресията на феталните *HBG* гени е ключова цел на учени и лекари, работещи в областта.

Метилирането на ДНК в областта на *HBG* промоторите представлява още едно ниво на регулация на експресията на *HBG* гените. Използвайки *in vitro* култивирани човешки клетки, както и трансгенни мишки, носещи човешкия β -глобинов локус, ние установихме, че ефективната транскрипция на *HBG* гените корелира с хипометилация на CpG местата в промоторите на двата гена (Goren et al., 2006). Познаването на всички страни на контрола, който клетките упражняват върху експресията на *HBG* и *HBB* гените, е важно не само от фундаментална, но и от практическа гледна точка.

Роля на некодиращи РНКи в процесите на V_HDJ_H рекомбинация и геномен импринтинг

- [9] Bolland et al., 2004, Nature Immunol
- [2] Mohammad et al., 2008, Mol Cell Biol

Участвах в няколко разработки, целта на които беше разкриване на ролята на РНК молекули, некодиращи белтъци (non-coding RNAs, ncRNAs), в различни ядрени процеси. Едва през последните десетина години започна да става ясно, че некодиращите РНКи изпълняват разнообразни функции в клетъчното ядро. Ние допринесохме за развитието на тази млада област като публикувахме резултатите от два колаборативни проекта, водени съответно от Ан Коркоран (Anne Corcoran) от Бейбрахам и Чандра Кандури (Chandra Kanduri) от Университета Упсала. Моето участие в тези разработки се състоеше във въвеждането и прилагането на фини *in situ* техники за визуализиране на изследваните ncRNA молекули в единични ядра, което ни позволи да направим изводи за техните функции. Групата на Ан Коркоран се интересува от регулацията на рекомбинацията в В лимфоцити, благодарение на която се образуват гените, кодиращи тежките вериги на антителата. Използвайки РНК флуоресцентна *in situ* хибридизация, ние внимателно анализирахме некодиращата транскрипция в мишия *IgH* локус в процеса на развитие на В лимфоцити и установихме, че в строго определени етапи от диференциацията на В клетките се произвеждат специфични транскрипти (Bolland et al., 2004). Нашите резултати ни дадоха основание да заключим, че антисенс (antisense), но не и сенс (sense), некодиращата транскрипция в областта на V_H генните сегменти участва в подготовката на V_H геномния регион за последваща V_H-to-DJ_H рекомбинация (Bolland et al., 2004).

Чандра Кандури се занимава с механизмите на геномен импринтинг в *Kcnq1* локуса. Използвайки комбинации от РНК и ДНК флуоресцентна *in situ* хибридизация и имунодетекция на ядръцевия маркер нуклеоплазмин, установихме, че определен участък от некодиращата *Kcnq1ot1* РНК е едновременно необходим за заглушаване на генната транскрипция в локуса (в *cis* положение) и за локализацията на локуса в периферията на ядръцето (Mohammad et al., 2008). Възможно е специфичната локализация на локуса в близост до ядръцето да има отношение към механизма на заглушаване, доколкото този ядрен компартимент е богат на белтъчни фактори, характерни за транскрипционно неактивен хроматин.

Вариации в нивото на поправка на ДНК в мишия β -глобинов геномен район

- [17] Chakalova and Russev, 1998, Mutat Res
- [16] Chakalova and Russev, 1998, Acta Biochim Pol
- [15] Chakalova and Russev, 1999, Eur J Biochem

Работата ми в Института по молекулярна биология, свързана с разработването на дисертационния ми труд под ръководството на Георги Русев, имаше за цел да изследва относителното ниво на поправка на ДНК по дължината на мишия β -глобинов локус след облъчване с ултравиолетова светлина. По онова време се работеше повече върху механизмите на поправка на активно транскрибирани гени; по-малко се знаеше за ефективността на глобална репарация на междугенните райони. Ние изследвахме глобалната репарация в *in vitro* култивирани клетки, които експресират β -глобинови гени и такива, в които гените са мълчащи. За целта разработихме метод за изолиране на фрагменти, претърпели поправка и последващо количествено определяне на обогатяването на репарирания фракция на конкретни последователности с количествен PCR. И в двата типа клетки поправката на ДНК беше по-ефективна в близост до LCR-a, отколкото в другите изследвани междугенни участъци. Нашите резултати показаха, че

ефективността на глобалната поправка може да варира и поставиха нови въпроси, например кои са факторите, от които зависи тази ефективност.

Създаване на тест за идентификация на мутации, водещи до β -таласемия

В Центъра по генно инженерство и биотехнология в Македонската академия на науките и изкуствата разработихме нов тест за идентификация на няколко мутации, предизвикващи β -таласемия. Идентификацията на мутациите заема централно място в процеса на диагностика на наследствените анемии, както и при определянето на носителство. Избраните генетични промени, включени в теста, се срещат с висока честота в средиземноморските страни, включително в Македония и България. Новият тест се основава на метода за удължаване на праймер с един нуклеотид (single-nucleotide primer extension). Успяхме да постигнем максимална точност на молекулната диагноза като включихме по два праймера за всяка мутация (хибридизиращи с двете ДНК вериги, съответно). В същото време съкратихме значително времето и разходите, необходими за поставяне на диагноза, обединявайки праймерите за определяне на най-честите мутации в една реакция. Оптимизираният и валидиран тест вече се прилага успешно в нашата диагностична лаборатория. В допълнение подготвяме ръкопис, описващ новия тест. Той би представлявал интерес за множество специализирани клинични лаборатории.

Списък на научните публикации, с които кандидатът се представя в конкурса

1. Chakalova L and Fraser P (2010) Organization of transcription. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a000729. *
2. Mohammad F, Pandey R, Nagano T, Chakalova L, Mondal T, Fraser P, and Kanuri C (2008) Kcnq1ot1/Lit1 noncoding RNA mediates transcriptional silencing by targeting to the perinucleolar region. Mol Cell Biol 28:3713-28.
3. Osborne CS, Chakalova L, Horton A, Mitchell JA, Bolland D, Wood A, Corcoran AE, and Fraser P (2007) Myc is dynamically and preferentially recruited to a transcription factory occupied by its frequent translocation partner gene, Igh. PloS Biol 5:e192.
4. Goren A, Simchen G, Fibach E, Szabo PE, Tanimoto K, Chakalova L, Pfeifer GP, Fraser P, Engel D, and Cedar H (2006) Fine tuning of globin gene expression by DNA methylation. PloS ONE 1:e46.
5. Chakalova L, Debrand E, Mitchell JA, Osborne CS, and Fraser P (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. Nat Rev Genet 6:669-77. *
6. Chakalova L, Carter D, Debrand E, Goyenechea B, Horton A, Miles J, Osborne CS, and Fraser P (2005) Developmental regulation of the human β -globin gene locus. In: Epigenetics and Chromatin, Progress in Molecular and Subcellular Biology series (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), Jeanteur P (Ed.). *
7. Chakalova L[§], Osborne CS[§], Dai Y-F, Goyenechea B, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis A, Kattamis C, and Fraser P (2005) The Corfu $\delta\beta$ -thalassemia mutation disrupts β -globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. Blood 105:2154-60.
8. Osborne CS, Chakalova L, Brown K, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, and Fraser P (2004) Active genes dynamically co-localize to shared sites of ongoing transcription. Nature Genet 36:1065-71.
9. Bolland D, Wood A, Johnston C, Bunting S, Morgan G, Chakalova L, Fraser P, and Corcoran AE (2004) Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. Nature Immunol 5:630-7.
10. Chakalova L, Carter D, and Fraser P (2004) RNA fluorescence *in situ* hybridization tagging and recovery of associated proteins to analyze in vivo chromatin interactions. Methods Enzymol 375:479-93.
11. Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai Y-F, and Fraser P (2002) Long-range chromatin regulatory interactions *in vivo*. Nature Genet 32:623-6.
12. Chakarov S, Chakalova L, Tencheva Z, Ganev V, and Angelova A (2000) Morphine treatment affects the regulation of high mobility group I-type chromosomal phosphoproteins in C6 glioma cells. Life Sci 66:1725-31.
13. Чакалова Л (1999) Репарация на ДНК в β -глобиновото генно струпване при мишка. Автореферат на дисертация за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“. [†]
14. Chakalova L and Tsvetanova B (1999) Constitutive β -globin gene expression by the murine erythroleukemia cell line F4N-S. Доклади на БАН 53:119-22. [†]
15. Chakalova L and Russev G (1999) Transcriptionally active and inactive mouse β -globin gene loci are repaired at similar rates after ultraviolet irradiation. Eur J Biochem 261:667-73. [†]
16. Chakalova L and Russev G (1998) Comparison of repair activity in different genomic regions. Acta Biochim Pol 45:173-81. [†]
17. Chakalova L and Russev G (1998) Quantitative polymerase chain reaction assay for DNA repair within defined genomic regions. Mutat Res 407:147-55. [†]
18. Chakarov S, Chakalova L, Tencheva Z and Angelova A (1995) HMGI/Y chromosomal proteins in developing rat brain cells. Доклади на БАН 48:139-41.

* Научен обзор

§ Равно участие (equal contribution)

[†] Публикация, свързана с дисертацията

Наукометрични показатели
на публикациите, с които кандидатът се представя в конкурса:
според ISI Web of Knowledge, Journal Citation Reports Science Edition, 2010

Общ брой публикации	18
В това число:	
Статии, описващи оригинални научни резултати	15
Научни обзори	3
Брой публикации с импакт фактор	17
Брой публикации на година	1
Общ импакт фактор на публикациите	182,249
Среден импакт фактор на публикация	10,125
Общ брой на цитиранията (включително автоцитати)	1213
Брой на цитиранията – изключени автоцитати	1112
Среден брой цитирания на публикация	67
Среден брой цитирания на година	67
<i>h</i>-индекс	10