

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за присъждане на
образователната и научна степен „Доктор”
Професионално направление 4.3 „Биологични науки“ (Генетика)

Автор на дисертационния труд: Димитрина Георгиева Георгиева

Тема на дисертационния труд: „Скрининг за гени-интерактори на гена *fragile X mental retardation 1 (dfmr1)* при *Drosophila melanogaster*”

Рецензент: проф. д-р Елена Иванова Георгиева

През последните няколко десетилетия благодарение на изключителния, експоненциален напредък на геномните технологии беше постигнат огромен прогрес в проучване етиологията, както на наследствените, така и на спорадичните невродегенеративни заболявания, включително деменции, паркинсон, атаксия (разстройство в координацията) и нервно двигателни разстройства. Тези заболявания са прогресивно разпространяващи се и засягат около 2% от съвременното ни общество. В голяма част от случаите гените имат отношение в етиологията на заболяването. Изучаването на генетичните механизми участващи в регулацията на заболяването, определянето на патогенните локуси, както и типа и честотата на възникване на мутации са важна предпоставка за по-задълбочено разбиране патогенезата на тези процеси и дава възможности за насочена терапия.

Дисертационният труд на Димитрина Георгиева е фокусиран върху изключително актуален и важен медицински проблем, а именно върху изучаване на някои генетични пътища в молекулната патология на невродегенеративните болести. Изследването ѝ включва идентифициране на ген или гени, участващи в патогенезата на заболяването на експерименталния моделен обект *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* е използвана като модел за изучаване синдрома на чупливата X-хромозома (fragile X syndrome), който е причина за най-разпространената форма на наследствена и умствена изостаналост при човека. Знае се, че в патогенезата на това заболяване е въввлечен генът *fmr1* (*fragile X mental retardation 1*), който е инактивиран и не кодира нормалния продукт – РНК-свързващия белтък FMRP. *Drosophila* е задълбочено изучен генетичен вид. Доказано е наличието в генома ѝ на около 80% от човешките хомолози, свързани с наследствени заболявания. В голяма степен получените резултати от този обект могат да бъдат използвани за развитието и приложението на идеи изясняващи патогенезата, диагнозата и подпомагащи терапията при заболели индивиди. Предимствата на тази моделна система са много добре описани в края на литературния обзор. Публикуваните данни в тази област са многобройни, но на

този етап недостатъчни и противоречиви, за пълното изясняване и лечение на тези увреждания. В контекста на казаното, резултатите от дисертацията на Димитрина Георгиева са важни, навременни и биха спомогнали за установяване на някои от нарушенията при невродегенеративните болести.

Дисертационният труд е структуриран в съответствие с приетите у нас стандарти за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” и обхваща 135 страници, от които: „Увод” – 3 стр., „Литературен обзор” - 39 стр., „Цел, задачи и хипотеза” - 1 стр., „Материали и методи” - 15 стр., „Резултати” - 49 стр., богато илюстрирани с 13 фигури, 13 таблици и 9 схеми, „Изводи” - 1 стр., „Приноси” – 1 стр. и 19 страници „Литература”, съдържаща 343 източника, всички на латиница. Голяма част от цитираните трудове са от последните 5 години, включително и 2013 г.

Представен е списък на публикации, отразяващи съществени части от получените резултати от дисертационния труд, който съдържа три статии на латиница – една в реферирано международно списание с ИФ, една е отпечатана в реферирано международно списание без ИФ и една в реферирано българско списание без ИФ. И в трите публикации Д. Георгиева е водещ автор. Даден е също и списък на 14 участия в научни форуми по темата на дисертационния труд. Всички посочени трудове (3 стр.) са в престижни наши и международни научни форуми.

Отделните раздели на дисертационния труд са добре балансирани и представени достатъчно изчерпателно.

Литературният обзор е написан професионално, на разбираем български език и е илюстриран с изключително информативни фигури и таблици, на база от 343 представителни литературни източници. Той заема приблизително една четвърт от цялостната работа, обхваща напълно основната литература по изброените въпроси и е добре фокусиран върху разработваната тематика. От него е видно, че докторантката познава състоянието на проблема във всичките му основни аспекти и оценява творчески литературния материал. Задълбочено са обосновани причините на наследствената и спорадична умствена изостаналост при човека, дължащи се на симптомите на синдрома на чупливата X-хромозома. В детайли са анализирани мутационните промени в промоторния участък на гена *FMRI*, водещи до неговото инактивиране, което е основна причина за проява на умствена изостаналост. Добре е онагледен процесът на инактивиране на този ген, дължащ се на многократна амплификация на CGG-мотива, при което настъпва хиперметиране на CpG-островите в промоторния район на гена, превръща нормалния локус в мутантен и води до неговото инактивиране, а на цитогенетично ниво това се

проявява с хромозомна чупливост на локуса *FRAXA*. Разгледани са задълбочено биохимичните и молекулярни функции, както и структурните особености на продукта на *FMR1* гена, кодиращ РНК - свързващ белтък, означен като FMRP1 (или FMRP). Направен е детайлен анализ на структурата, локализацията и функциите на дрозофилния ортолог на FMRP – dFMRP, както и на ролята му в в подържането и/или елиминирането на синапсите. Задълбочено са описани и анализирани многобройните литературни данни показващи, че FMRP се свързва с активно транскрибиращите се полирибозоми, взема участие в пътя на микроРНК (miRNA) и интерфериращите РНКи (RNAi), негативно регулира разклоняването на невритите, участва в развитието на синапсите и в поведението на организмите. За разлика от всички гръбначни животни, *Drosophila melanogaster* има само един ортолог на FMRP – dFMRP, кодиран от един единствен ген *dfmr1* (*Drosophila fragile X mental retardation 1*), който е силно хомоложен на бозайниковия по отношение на структура, РНК-свързване, тъканна и субклетъчна локализация.

Към този раздел имам следната забележка. Считам, че обзора би трябвало да завърши с кратко обобщение на литературните данни, за да се съпоставят синтезирано публикуваните резултати при всички гръбначни с тези при дрозофила. Така ще се придобие по-добра представа за дълбочината и мащабността на този проблем, както и на извършената в последствие експериментална работа.

В раздела „Цел и Задачи” ясно и конкретно е формулиран основният проблем на дисертацията: да се изолират и идентифицират гени в X хромозомата на *Drosophila melanogaster*, чиито продукти взаимодействат с този на гена *fragile X mental retardation 1* (*dfmr1*).

Разрешаването на тази цел е постигната с правилното поставяне на няколко добре осмислени, конкретно формулирани и логично следващи задачи. Те са адекватни и гарантират успешното изпълнение на поставената цел. Искам да отбележа, че така поставените задачи покриват обема на една докторска работа.

В частта „Материали“, от раздела „Материали и методи“, са изброени и частично описани използваните голям брой мутантни линии дрозофила. Забележката ми към тази част е, че дадената информация за използваните линии е доста ограничена. Докторантката е отбелязала, че подробна информация за всички изброени линии може да се намери в сайта на дрозофилната база в САЩ (www.flybase.org). Информацията в този сайт е огромна и за читателя ще е нужно доста време, за да открие търсените по-подробни данни. Също така, би било от полза за читателя, всички използвани линии *Drosophila* да бъдат дадени в

табличен вид. Това ще улесни сравняването на разликите между тях, както и по-ясно ще се онагледи коя линия за каква цел на изследване е използвана.

Разнообразието на използваните методи, както и компетентното им описание потвърждава впечатлението за много добрата професионална подготовка на Димитрина Георгиева. Приложените методи са многобройни и обхващат широк спектър от класически генетични, молекулярни, имунологични, микроскопски, клетъчно-биологични и статистически методи, които могат да дадат отговор на конкретно поставената цел и задачи. Като пример за адекватно подбрани и акуратно използвани генетични техники бих посочила: а) GAL4/UAS - система за насочена генна експресия за индуциране на свръхекспресионен мутантен фенотип на гена *dfmr1* в криловия имагинален диск на имаго *Drosophila*; б) химична мутагенеза с етил-метансулфонат (EMS), за да се индуцират мутации в отделни гени, чийто ефект може да се наблюдава в хетерозиготно състояние (доминантни мутации) и скрининг за доминантни модификатори на мутантния крилов фенотип; в) генетично картиране на получените модификатори на *dfmr1* чрез рекомбинационен анализ; г) конфокален микроскопски анализ; д) Western blot хибридизация. Не само посочените, но и всички останали методи са описани професионално и достатъчно подробно във всички етапи. Това е една от гаранциите за достоверност на резултатите и дава възможност за възпроизвеждането им в други лаборатории.

В раздела „Резултати и обсъждане” са дадени добре оформени доказателствени данни на поставените за разрешаване задачи.

В тази връзка, една от много добре първоначално поставени и изпълнени задачи е, че скринингът на получените посредством EMS индуцирани мутации в X-хромозомни гени, засилващи или потискащи абнормалния крилов фенотип, позволява да се съди за тяхното включване във функциите на dFMRP. Този труден генетичен скрининг, докторантката е провела чрез успешното прилагането на GAL4/UAS-системата за насочена индукция на свръхекспресия на гена *dfmr1* в криловия имагинален диск при имаго *Drosophila melanogaster*. Целта на този подход е била, да се получи мутантен фенотип в тъкани, които не са съществени за развитието на организма и да се намерят X-хромозомни мутации, които го модифицират - усилват (енхансери) или потискат (супресори). Индуцираната свръхекспресия на *dfmr1* в криловия имагинален диск предизвиква абнормално висока белтъчна експресия на dFMRP, което води до изрезки по ръбовете на крилата и при възрастните индивиди се проявява като фенотип “изрязани крила”. Преди провеждането на този генетичен скрининг докторантката е извършила голям брой предварителни експерименти, за да намери най-подходящите условия за откриване на индуцирани

супресорни мутации, при които да се наблюдава силен свръхекспресионен крилов фенотип при женските мухи, така че поправянето му към див тип да може лесно да се идентифицира. В скрининга за енхансерни мутации Георгиева е прегледала над 18000 женски индивиди и е намерила 126 енхансерни мутации, които според техния крилов ефект е разделила условно в 4 групи: много силни енхансери; силни енхансери; умерени енхансери и слаби енхансери, а в скрининга за супресорни мутации е прегледала над 21000 женски индивиди и е намерила 128 такива. С резултатите от тези експерименти докторантката е показала, че дрозофилното крило е подходяща и лесна за работа моделна система за изучаване на генетични взаимодействия. Освен това, тъй като редица важни сигнални пътища участват в развитието на крилата, откриването на доминантни модификатори на *dfmr1*, които изпълняват функции в тези пътища, е важно за изясняването на ролята на този ген в развитието на крилата.

За да провери дали получените мутанти с доминантен енхансерен или супресорен фенотип унаследяват стабилно този фенотип и не са “фалшиви сигнали” докторантката е кръстосвала всеки отделен мутант с индивиди от линията *w[1118]* и е анализирано поколението за унаследяване на търсения фенотип. Георгиева е анализирала също разпадането по пол в тези поколения, тъй като, когато доминантната енхансерна или супресорна мутация е възникнала в X хромозомата, може да се определи едновременно и нейния евентуален—рецесивен летален ефект. По този начин автоматично става и разделянето на X-хромозомните от автозомните мутанти.

В резултат от тези експерименти сред индуцираните модификаторни мутации тя е получила 8 X-хромозомни енхансера и 11 X-хромозомни супресора. Последните са картирани с помощта на класически рекомбинационен анализ. За картирането на всяка мутация е отчетено поколение от над 1200 мухи, сред които е определен процентът на рекомбинантните индивиди. От данните, представени в табличен вид ясно се вижда, че изолираните модифициращи мутации – енхансери и супресори се картират в отделни локуси на X-хромозомата.

Тъй като рекомбинационното картиране е показало, че някои от получените модификаторни мутации са разположени в близки райони на хромозомите на *Drosophila*, възниква въпроса дали някои от мутации не са в един и същи ген. За да отговори на този въпрос, докторантката е провела тест за алелизъм на близко локализираните мутации. Тя е направила 35 кръстоски и във всяка от тях е отчела най-малко по 100 мухи. При всички проведени кръстоски Георгиева е установила комплементарност между изпитваните мутации. Резултатите от тези кръстоски са представени в няколко информативни таблици.

От тези данни е направен логичния извод, а именно, че тези проверени енхансерни и супресорни мутации засягат различни гени.

За определяне на точната локализация на всяка анализирана енхансерна или супресорна мутация в F₁, получено от кръстосване с избрани дупликационни линии, са изследвани по 100-150 мухи. От резултатите Георгиева е установила, че всяка модификаторна мутация се картира в отделен цитологичен район, който заема почти цялото рамо на X-хромозомата на *Drosophila*.

Информацията от рекомбинационния анализ и картирането, чрез припокриващи се дупликации, докторантката е приложила за избор на кандидат-гени, локализиращи в същия цитологичен район, в който са откритите от нея модификаторни гени. В списъка на подобни гени са включени само такива, чиято функция е известна, които имат летални алели и за които има налични линии в Дрозофилния център. Георгиева е идентифицирала няколко отделни гена със съответните им алели, в които са възникнали индуцираните с EMS модификаторни мутации. При проведените анализи, тя е установила само 4 модификаторни мутации, които взаимодействат генетично с *dfmr1* гена в криловата тъкан на *Drosophila* и е направила извода, че леталните алели *peb*^[hnt-E8], *ras*^{G0380b}, *shaggy*^{G0263} и *rock*¹ са доминантни супресори на мутантния крилов фенотип, който е резултат от свръхекспресията на този ген.

Георгиева е направила опити да определи ролята на *pebbled*, *rock*, *shaggy* и *raspberry* като доминантни супресори на фенотипа “изрязани крила“. Отново с добре изведени генетични методи и доказателствени резултати тя е установила, че наблюдаваните взаимодействия с *dfmr1* са специфични не за отделни алели на даден ген, а за самите гени - *pebbled*, *shaggy*, *raspberry* и *rock*. Въз основа на това тя приема, че тези четири гена са потенциални функционални партньори на гена *dfmr1* в процеса на развитие на крилата при *Drosophila melanogaster*. От наблюдаваното силно генетично взаимодействие между гените *sgg* и *dfmr1* и между гените *ras* и *dfmr1* тя предполага, че те най-вероятно са компоненти на общ биологичен път. В този труд, докторантката представя за пръв път данни, които показват, че Peb и dFMRP са функционални партньори в развитието на крилата при *Drosophila* и най-вероятно са компоненти на общ биологичен път.

Следваща логично поставена задача от докторантката е да изследва функциите на доминантните мутации *pebbled*, *rock*, *shaggy* и *raspberry* в аксонната и синаптичната морфология на мозъчните неврони на възрастни мухи. За да бъде оценено въздействието на намерените супресорни мутации върху аксонния растеж и морфологията на синапсите, тя е направила препарати от цели мозъци на възрастни мухи и е наблюдавала морфологията на малките латерални вентрални неврони и техните синапси с помощта на конфокална

микроскопия. Микроскопският анализ на препаратите е извършен на лазерен сканиращ конфокален микроскоп. За всеки генотип са анализирани по 8-10 мозъка при *Drosophila*. Получените от Георгиева представителни данни са показали, че всичките четири супресорни мутации засягат аксонната и синаптичната морфология доминантно, което води до значителни отклонения в тяхната морфология, нарастване и разклоняване.

Детайлно е изследван и доминантният ефект на леталните алели *peb*^[hnt-E8], *rock*¹, *sgg*^{G0263} и *ras*^{G0482} върху аксонната и синаптична морфология на мозъчните неврони. Всички получени резултати ясно са показали, че намерените от докторантката генетични модификатори на *dfmr1* участват в нарастването на аксоните, правилното намиране на пътя и разклоняването им, както и в синаптичната архитектура на мозъчните неврони.

Следващата задача на докторантката е била да проследи какви са генетичните взаимодействия между *dfmr1* и получените модификаторни мутации в нервната система при *Drosophila*. Тя е изследвала съвместния им ефект върху архитектурата на LNv-невроните и техните синапси, с помощта на двойни хетерозиготи по мутантните алели на съответните гени-модификатори – *peb*^[hnt-E8], *ras*^{G0380b}, *shaggy*^{G0263} и *rock*¹ и по нулевия алел на *dfmr1*. Нейните наблюдения са показали, че във всички разгледани случаи двойните хетерозиготи имат значителни нарушения в нарастването на аксоните и формирането на синапсите на sLNv-невроните.

За да се разбере по-добре как белтъците Peb, Rock, Shaggy и Ras взаимодействат с dFMRP, по всяка от модификаторните мутации, докторантката е провела Western blot анализ, като е използвала протеинов екстракт, както от мутантни ембриони, така и от мозъци на току-що излюпени възрастни. Тя е установила, че нивото на белтъка Rock в нулеви мутанти по *dfmr1* е значително повишено – около 2,1 пъти в сравнение с това при дивия тип. В мухи, при които *dfmr1* е свръхекспресирани в централната нервна система, нивото на белтъка не е различно от това при дивия тип. Въз основа на тези резултати Георгиева предполага, че dFMRP негативно контролира нивото на белтъка Rock. Данните й показват, че няма значими разлики в нивата на експресия на dFMRP при всички мутанти в сравнение с дивия тип. Тя доказва, че нито един от гените - модификатори, кодиращи белтъците Peb/Hnt и Ras, не контролира експресията на dFMRP. В мозъци на току-що излюпени възрастни също не е намерена разлика в нивата на експресия на трите изоформи на белтъка Shaggy при нулеви мутанти по *dfmr1* и при мухи, при които *dfmr1* е свръхекспресирани, в сравнение с дивия тип.

В заключение от този раздел мога да обобщя, че са използвани достатъчен брой от биологични материали, адекватни контроли и брой експерименти, с което се дава възможност за постигане на висока достоверност при статистическата обработка на

резултатите. Важно е да бъде отбелязано, че за статистическия анализ са приложени адекватни високо информативни статистически подходи.

Не на последно място, гаранция за надеждността и достоверност на получените резултати са надлежно документираните, високо информативни и представителни фигури и таблици от всички резултати, част от които са намерили отражение в индексирани списания и престижни научни форуми. Приемам представените и аналитично аргументирани от дисертанта 4 основни изводи и приноси. Резултатите в дисертацията на Георгиева са предпоставка за бъдещи разширени проучвания в областта.

Димитрина Георгиева е зачислена в редовна докторантура към катедра „Генетика” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”. Изследванията по дисертацията са извършени в катедрата по „Генетика” на БФ, СУ „Св. Климент Охридски“ и в Института по биология и имунология на размножаването при БАН. Цялостното представяне, описването на материалите и методите, анализът на резултатите, коректно представените експериментални данни, водещото място на дисертантката в публикациите и съобщенията ми дават основание да приема, че настоящият труд в много висока степен е личен принос на дисертантката.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията, правилно и обхватно отразява изложението на дисертационния труд и формулираните изводи и приноси от получените резултати.

Заклучение: Докторантката е получила важни резултати и е направила опити за тяхната оценка и интерпретация в рамките на съществуващите хипотези. Дисертационният труд е актуален, използва съвременна методология, с ясни цели и задачи, с надеждни и значими изводи и постижения и има безспорни научни и научно-приложни приноси. От всичко изложено до тук определено считам, че Димитрина Георгиева е със задълбочени познания в генетиката и показва способности за поставяне на самостоятелни идеи и тяхното осъществяване. Дисертационният труд на Димитрина Георгиева отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БФ на СУ „Кл. Охридски“. Имайки предвид професионалните качества и научните постижения на докторантката, убедено препоръчвам на научното жури да присъди на Димитрина Георгиева образователната и научна степен “Доктор”.

Рецензент:

/проф. д-р Елена Георгиева