

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Геновева Атанасова Начева
на дисертационния труд на Димитрина Георгиева Георгиева
на тема „Скрининг за гени-интерактори на гена *fragile X mental retardation 1 (dfmr1)*
при *Drosophila melanogaster*”,

представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по
Професионално направление 4.3. Биологични науки (Генетика)

1. Обща част

Със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски” № РД38-191/08.05.2014 г. съм определена за член на научното жури за провеждане на процедура за защита на дисертационния труд на Димитрина Георгиева Георгиева на тема „Скрининг за гени-интерактори на гена *fragile X mental retardation 1 (dfmr1)* при *Drosophila melanogaster*”, представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по Професионално направление 4.3. Биологични науки (Генетика).

Представеният от Димитрина Георгиева комплект материали включва следните документи:

- Заявление до ръководителя на катедра Генетика за разкриване на процедурата за защита
 - Автобиография
 - Копие от диплома за завършено висше образование (ОКС „магистър”)
 - Заповед за зачисляване в докторантура
 - Удостоверение за положени изпити/кандидатски минимуми по специалността
 - Заповед за отчисляване с право на защита
- Заповед за разширен състав на Съвета на катедра Генетика за провеждане на апробация на дисертационния труд
 - Дисертационен труд
 - Автореферат
 - Копия на научните публикации свързани с дисертационния труд
 - Сертификат от редакцията на списание *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, че публикацията „New X-chromosomal interactors of dFMRP regulate axonal and synaptic morphology of brain neurons in *Drosophila melanogaster*” с автори Dimitrina Georgieva, Roumen Dimitrov, Meglena Kitanova and Ginka Genova, е приета за печат.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Димитрина Георгиева е възпитаник на Биологически Факултет на СУ „Св. Климент Охридски”. През 2007 год. получава магистърска степен по специалност Генетика, а от 2009 до 2012 е редовен докторант в Катедра Генетика с научен ръководител проф. д-р Гинка Генова. Отчислена е с право на защита и от тогава е на длъжност асистент в същата катедра.

3. Актуалност на тематиката

Синдромът на чупливата X-хромозома причинява редица проблеми в развитието на индивида, включително и когнитивни увреждания. Честотата на поява е 1 на 4 000 мъже и 1 на 8 000 жени. Дължи се на мутации в гена *fmr1*, които водят до инактивирането

му и до липса на синтеза на неговия продукт - РНК-свързващия белтък FMRP (Fragile X mental retardation protein). FMRP участва в сложна каскада от клетъчни събития, свързани с регулацията на продукцията на редица други белтъци, както и в развитието на синапсите. Независимо от интензивните изследвания и все по-богатата научна информация, детайлните биологичните функции на FMRP и физиологичните последици от неговата липса в организма остават неизяснени. Дисертационният труд на Димитрина Георгиева е посветен на идентифицирането на нови гени, чиито продукти си взаимодействат с FMRP в процесите на осъществяване на неговите биологични функции. За целта дисертантката избира подходящ експериментален моделен обект - *Drosophila melanogaster*, в който чрез генетични методи да се определят молекулните пътища, които лежат в основата на патогенезата на заболяването Синдром на чупливата X-хромозома. Моделният организъм е подходящ за такъв тип изследвания поради напълно секвенирания геном, наличието на огромна банка с мутантни линии, близо 80% хомология с човешките хомолози, свързани с наследствени заболявания, както и функционираща система за рекомбинантна експресия на човешки гени.

3. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 135 страници, илюстриран е с 13 фигури и 13 таблици и включва 343 литературни източника, 2/3 от които са от последните 10 години.

Литературният обзор обхваща 39 страници и включва 7 раздела. Първите два са посветени на Синдрома на чупливата X-хромозома и структурата, биохимични свойства и клетъчна локализация на FMRP. В следващите раздели се анализира дрозофилния ортолог на FMRP и се разглеждат подробно структурата и клетъчната му локализация, както и молекулните механизми на неговото действие свързани с транспорта, стабилността и транслацията на иРНКи, и участието му в пътя на микроРНКи(miRNA) и интерфериращите РНКи(RNAi). Особено внимание е отделено на ролята на FMRP/dFMRP в развитието на нервната система, и по-специално в диференциацията на стволовите клетки в невробластите, в процесите на нарастването на аксона, насочването и разклоняването на аксона, както и в процеса на формиране на синапсите. Разгледани са и не-невронните функции на FMRP/dFMRP, а именно ролята му в клетъчната пролиферация и диференциация, участието му в ембриогенезата, в регулацията на клетъчния цикъл и в програмираната клетъчна смърт. Разгледани са подробно РНК-мишените на FMRP и белтъците които си взаимодействат с него. Литературният обзор завършва с анализ на предимствата на избрания експериментален модел *Drosophila melanogaster*.

От литературния обзор се вижда, че FMRP участва в огромен спектър от каскадни събития свързани с генната регулация, клетъчната пролиферация и диференциация, което обяснява комплексната картина от симптоми, свързани със Синдрома на чупливата X-хромозома. Ясна е необходимостта от нови задълбочени изследвания за идентифициране на белтъците, с които той си взаимодейства при осъществяването и регулацията на неговите функции.

Направената подробна литературна справка и критичният анализ на цитираната литература е позволило на докторанта да намери своята изследователска ниша и да формулира точно и ясно *целите и задачите* на своята дисертация. Целта на дисертацията е *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)*. В светлината на представените литературни данни, намирам така формулираната цел за целесъобразна. Адекватни на нея са и поставените 6 задачи, отнасящи се до методичните изследвания необходими за постигането на целта.

По отношение на формулировката имам една забележка – намирам използването на думата „изолират“ за неподходящо в контекста на поставената цел.

Разделът *Материали и методи* обхваща 15 страници от дисертацията и включва пълно описание на използваните материали и методи, което позволява възпроизвеждане на експериментите без необходимост от допълнителна методична литература. Тук са описани всички използвани дрозофилни линии и направените кръстоски, методът за химична мутагенеза и скрининг за доминантни модификатори, определяне на типа унаследяване и групата на скачване на намерените мутации, генетично картиране чрез рекомбинационен и делеционен анализ, тест за комплементарност, имунохистохимия и конфокална микроскопия, Western blot анализ и методите за статистическа обработка на резултатите. От този раздел се вижда, че докторантката прилага с лекота широка гама от генетични, биохимични, аналитични и микроскопски методи, както и модерна и сложна научна апаратура, което е една от основните цели на докторантурата в съответното професионално направление.

Към този раздел имам една забележка – в описанието на Western blot анализа не е описан методът на пренос и буферите, които са използвани за целта.

Резултатите от проведените изследвания и тяхната дискусия са представени в раздел *Резултати и дискусия*, който обхваща 52 страници. Те са илюстрирани с 13 таблици и 9 фигури.

Както вече беше отбелязано, асистент Георгиева си поставя за цел да идентифицира гени в X-хромозомата на *Drosophila melanogaster*, чиито продукти взаимодействат с този на гена *dfmr1*. За фонен фенотип, на който да се провежда скрининга за химически индуцирани с етил-метан-сулфонат мутации тя използва фенотип, получен при свръхекспресия на *dfmr1* в криловия имагинален диск, постигната чрез *GAL4/UAS*-системата. Този фенотип се описва като “изрязани крила” и показва абнормална крилова морфология. Намирам за много удачен изборът на криловия имагинален диск като орган за насочена генна експресия, тъй като тя понижава в по-малка степен жизнеспособността и плодовитостта на мухите, в сравнение с подобна свръхекспресия в ретината на очите.

Тъй като експресията на *GAL4* зависи от температурата, експериментално установената различна пенетрантност осигурява на дисертантката удобна система за скрининг. Така всеки дефектен крилов фенотип в поколението F_1 , получено от мутагенизирани мъжки родители при 21°C , тя разглежда като енхансерен фенотип, възникнал в резултат на енхансерна мутация, а всеки поправен крилов фенотип в F_1 при 27°C като супресорен фенотип, възникнал като резултат от супресорна мутация. След преглед на повече от 39 000 женски индивиди Георгиева идентифицира 126 енхансерни и 128 супресорни мутации.

След проведените кръстоски за анализ на типа на онаследяване и определяне на X-хромозомните и автозомни мутанти, дисертантката идентифицира 8 енхансерни мутации и 11 супресорни мутации, които са локализирани в X-хромозомата и са рецесивни летални мутации. Именно те позволяват провеждането на генетично картиране и идентифициране на съответните гени. С помощта на класическия рекомбинационен анализ Георгиева

установява, че изолираните от нея модифициращи мутации се картират в неприпокриващи се локуси на X-хромозомата и най-вероятно са възникнали в отделни гени. За по-прецизно определяне на местоположението на гените, тя провежда картиране чрез припокриващи се дупликации и доказва, че получените енхансерни и супресорни мутации се намират в различни гени. Всяка мутация заема отделен цитологичен район, при това тези райони са разположени почти върху цялата дължина на X-хромозомата на *Drosophila*.

За определяне на кандидат-гените, които са локализиращи в същия цитологичен район, в който са и гените-модификатори, както и конкретните техни алели, докторантката провежда стандартен комплементационен анализ. В списъка на подобни гени тя логично включва само такива, чиято функция е известна, които имат летални алели и за които има налични линии в Дрозофилния център. Чрез този подход тя идентифицира 4 модификаторни мутации (от всички 19 получени), които взаимодействат генетично с *dfmr1* в криловата тъкан на *Drosophila*. 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. Проведените по-нататък кръстоски на женски мухи, носещи летален алел на съответния ген с мъжки, в които *dfmr1* е свръхекспресиран в крилата, показват, че наблюдаваните от Георгиева взаимодействия с *dfmr1* са специфични не за отделни алели, а за самите гени *pebbled*, *shaggy*, *raspberry* и *rock*. Въз основа на това тя прави заключението, че тези четири гена са потенциални функционални партньори на гена *dfmr1* в процеса на развитие на крилата при *Drosophila melanogaster*. За да анализира взаимодействията между гените дисертантката провежда експерименти по паралелна свръхекспресия на гените *rock*, *sgg* или *ras* с *dfmr1* в криловата тъкан. Свръхекспресията на двата гена едновременно довежда до появата на много по-силни крилови дефекти, отколкото тези, които се наблюдават при свръхекспресията само на *dfmr1*. Когато трите гена са свръхекспресирани на фона на половин доза *dfmr1* (хетерозиготи по нулевия алел на *dfmr1*) се наблюдава развитие на нормален крилов фенотип. Тези експерименти показват, че съществува силно генетично взаимодействие между трите изследвани гена и *dfmr1* и че техните продукти са функционални партньори в развитието на крилата при *Drosophila*. На базата на получените резултати и на анализа на литературните данни Георгиева прави предположението, че гените най-вероятно са компоненти на общ биологичен път, в който генът *dfmr1* трябва да е разположен преди (upstream) гените *rock*, *sgg* и *ras*. Подобни експерименти не са проведени за гена *peb*, тъй като в дрозофилната база липсват трансгенни линии с UAS-конструкции за този ген. Анализирайки, обаче, наличните в литературата данни за този ген и функцията на неговия продукт, дисертантката изказва хипотеза в кои сигнални пътища гените могат да си взаимодействат.

След като идентифицира гените *pebbled*, *shaggy*, *raspberry* и *rock* като супресори на *dfmr1*, Георгиева логично продължава тяхното изследване като изучава участието им в аксонната и синаптичната морфология на мозъчните неврони на възрастни мухи. С помощта на свръхекспресия на GFP в pdf-невроните и последваща конфокална микроскопия тя наблюдава и анализира статистически промените в архитектурата на LNv-невроните и техните синапси в резултат на модификаторните мутации в хетерозиготно състояние, а след това и събрани в общ генотип, в който мутантните алели *peb*^[hnt-E8], *ras*^{G0380b}, *shaggy*^{G0263} и *rock*¹ и нулевия алел на гена *dfmr1* са в хетерозигота. За по-детайлно изясняване на ролята на *Peб* в невронната морфология, дисертантката изследва допълнително и морфологията на още една група мозъчни неврони, а именно т.нар.

гъбовидно тяло. Всички получени от нея резултати показват, че намерените генетични модификатори на *dfmr1* участват в нарастването на аксоните, правилното намиране на пътя и разклоняването им, както и в синаптичната архитектура на мозъчните неврони при *Drosophila melanogaster*. Георгиева дискутира детайлно своите наблюдения в светлината на публикуваните научни данни и изказва предположения за евентуалното участие на всеки един от четирите продукта на модификаторните гени в сигналните пътища.

За да изучи по-добре типа на взаимодействие на *Peb/Hnt*, *Rock*, *Shaggy/GSK-3 β* и *Ras* с *dFMRP*, дисертантката провежда Western blot анализ, като използва мутантни ембриони по всяка от модификаторните мутации и търси разлика в нивата на експресия на *dFMRP*. В резултат на изследването тя не открива значими разлики в нивата на експресия на *dFMRP* при никой от мутантите в сравнение с дивия тип. Въз основа на този резултат тя прави извода, че нито един от гените-модификатори, кодиращи белтъците *Peb/Hnt*, *Rock*, *Shaggy/GSK-3 β* и *Ras*, не контролира експресията на *dFMRP*. По-нататък Георгиева изследва нивата на експресия на тези белтъците в мозъци от току-що излюпени възрастни мухи в нулеви мутанти по *dfmr1* и в мутанти, при които *dfmr1* е свръхекспресиран. В резултат тя наблюдава около 2,1 пъти по-висока експресия на белтъка *Rock* в нулеви мутанти по *dfmr1* в сравнение с тази при дивия тип. В мухи със свръхекспресия на *dfmr1* в централната нервна система, нивото на белтъка не се отличава от този при дивия тип. Въз основа на тези резултати тя прави предположение, че *dFMRP* негативно контролира нивото на белтъка *Rock*. За разлика от *Rock*, при *Peb/Hnt*, *Ras* и *Shaggy/GSK-3 β* дисертантката не наблюдава разлика в нивата на експресия.

Във връзка с това изследване имам следния въпрос: На Фиг. 9, панел В “Експресионни нива на *Shaggy/GSK3 β* ”, се наблюдава повишаване на количеството на изследвания белтък при нулеви мутанти и при мутанти със свръхекспресия на *dfmr1* в сравнение с дивия тип, като това е по-силно изразено при високомолекулната изоформа *SGG39*. Георгиева тълкува този резултат като липса на „значителни различия” в експресионните нива при мутантите и при дивия тип. Може ли тя да обоснове това свое тълкувание.

Изводите следват логично резултатите от проведените изследвания, те са формулирани стегнато и ясно, като несъмнено най-съществения принос на дисертантката е откриването на 4 нови гени-интерактори на гена *dfmr1* в криловата тъкан на *Drosophila*.

Приятно впечатление прави фактът, че дисертационният труд е написан с вещина на точен и ясен научен език, като в него се срещат минимално количество печатни грешки.

4. Публикации по дисертационния труд

Във връзка с дисертацията са представени **3 публикации и 2 доклада в пълен текст**. От статиите 2 са публикувани в *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1 в *Drosophila Information Service*, а докладите са от научни конференции в страната. В трите публикации и в 1 от докладите Георгиева е първи автор, което е безспорен атестат за водещата роля при осъществяване на свързаните с дисертацията изследвания. Резултатите от дисертацията са докладвани с постери на 14 научни форума у нас и в чужбина. С тази продукция Георгиева напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и вътрешния правилник на СУ „Св. Климент Охридски” за ОНС „Доктор”.

5. Автореферат

Запозната съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на ас. Димитрина Георгиева е пример за прецизна научна разработка. При нейната реализация тя е вложила знания и значителни методични умения от различни сфери на биологията – генетика, биохимия, молекулярна биология. Изследванията са проведени със съвременна методология и модерна експериментална техника и са довели до резултати публикувани в 3 статии. Чрез своите научни постижения Георгиева се представя като зрял изследовател и преподавател, който удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на СУ „Св. Климент Охридски” за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”. Въз основа на всичко това, убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури *да присъди на Димитрина Георгиева образователната и научна степен „Доктор” в професионално направление 4.3. Биологични науки (Генетика).*

06.06.2014 г.

Рецензент:

/доц. д-р Геновева Начева/