

РЕЦЕНЗИЯ

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

Автор на дисертационния труд: Мария Христова Петрова

Тема: „Изучаване на някои механизми, чрез които Fragile X Mental Retardation Protein 1 контролира невронното развитие при *Drosophila melanogaster*”

Рецензент: проф. д-р Елена Иванова Георгиева

Невродегенеративните болести са разнородна група заболявания на централната нервна система. Характеризират се с постепенен ход, обикновено започват в по-късна възраст и засягат определени функционални системи. Обикновено се разделят според клиничната изява, но най-често срещани са болестта на Алцхаймер и на Паркинсон. Причините за тези заболявания не са изяснени, въпреки натрупаните резултати от редица науки, като биология, медицина, социология, геронтология, психология и др., но както за спорадичните форми така и за фамилните информацията е ограничена. В генезата на тези заболявания се предполага участието на множество фактори или мутации в гени контролиращи тези процеси. За някои от тях е доказана наследственост или повишен риск от развитие при наличие на болни роднини. За други се подозират различни външни фактори и/или токсични агенти.

Дисертационният труд на Мария Петрова е фокусиран върху изключително важен за медицинската наука и практика проблем, а именно върху разбирането на процесите на неврогенезата и ключовата роля на FMRP (Fragile X mental retardation 1 protein) като фактор, участващ в регулацията и контрола на механизмите на невронното развитие и молекулната патология на невродегенеративните болести при *Drosophila melanogaster*. Изследванията й засягат изучаване синдрома на чупливата X-хромозома (fragile X syndrome), който е причина за най-разпространената форма на наследствена и умствена изостаналост при човека. 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. Анализите са извършени върху експерименталния моделен обект *Drosophila melanogaster*, един много добре изучен генетичен обект, с висока степен на фундаментално сходство с човека по отношение основната анатомична организация на мозъка, клетъчните елементи и свързаните наследствени заболявания.

Дисертационният труд е структуриран в съответствие с приетите стандарти за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” и е написан на 139 страници, от които: „Увод” – 2стр., „Литературен обзор” - 36 стр., „Цел, задачи и хипотеза” - 1 стр., „Материали и методи” - 18 стр., „Резултати и обсъждане” - 49 стр.,

онагледени с 28 фигури, 12 таблици и 3 схеми, „Изводи” - 1 стр., „Приноси” – 1стр. и 24 страници „Литература”, съдържаща 418 източника, всички на латиница. Голяма част от цитираните трудове са от последните 10 години, включително и от 2013г.

На 2 страници е даден списък от публикациите на докторантката, както и участията ѝ в научни форуми. Тя има публикувани три статии на латиница – една в реферирано международно списание с ИФ и две са отпечатани в реферирани международни списания без ИФ. В две от публикациите Петрова е водещ автор. Представен е и доклад в пълен текст, изнесен на международна конференция, а също и списък на 13 участия в престижни национални и международни научни форуми, всички по темата на дисертационния труд.

Литературният обзор е написан подробно, професионално и е илюстриран с информативни фигури и таблици, на база от 418 представителни литературни източници. От него е видно, че докторантката познава състоянието на проблема в дълбочина и отлично го анализира, което дава възможност на читателя лесно да възприеме и осмисли огромния литературен материал. Компетентно са изложени съвременните данни за причините на наследствената умствена изостаналост при човека, дължащи се на симптомите на синдрома на чупливата X-хромозома. Важно е да бъде отбелязано, че М. Петрова проявява аналитично отношение към обсъждания материал, осмисля го творчески и в резултат на това логично стига до целите и задачите, които си поставя за разрешаване.

Целта на дисертационния труд е да се изучи ролята на dFMRP (*Drosophila* Fragile X Mental Retardation Protein) в контрола на експресията на гени, участващи в невронното развитие. Тази цел е изцяло изпълнена с поставянето на шест основни задачи за решаването на които Петрова отлично е подбрала материалите и методите. В тази връзка, тя е представила подробна информация на големия брой използвани дрозофилни линии, като например: линии за индуциране на експресия, линии за конструиране на нови линии, мутантни линии с мутации в гени които участват в хроматинови модификации и различни процеси контролиращи клетъчната полярност, пролиферацията и др. Впечатлението ми за отличната професионална подготовка на Мария Петрова се потвърждава и от широкия спектър от усвоени и компетентно описани класически генетични, молекулярни, имунологични, микроскопски, клетъчно-биологични и статистически методи. Висока оценка заслужава и прилагането на биоинформатичен анализ за доказване наличие на допълнителни регулаторни елементи в интроните и екзоните на изследваните гени. Като пример за адекватно използвани техники бих посочила: а) GAL4/UAS - система за насочена генна експресия за индуциране на свръхекспресия на гена *dfmr1* в ретината на очите и в криловия имагинален диск на *Drosophila*; б) конфокален микроскопски анализ; в) Western blot хибридизация; г) количествен real time PCR (qRT-PCR) и др. Методичният

раздел е представен с вещина и описан много подробно, което дава възможност тези протоколи да бъдат използвани и при бъдещи обучения на специалисти.

Резултатите и обсъждането на дисертационния труд са представени в една глава с 9 раздела съответстващи на поставените задачи. Една от първите задачи е чрез насочен скрининг да се анализира генетичното взаимодействие между *dfmr1* и предварително избрана група от гени с установена роля в развитието на нервната система. Целта на този скрининг е да се намерят модификатори – енхансери и супресори на гена *dfmr1*. За да неговото осъществяване, Петрова използва GAL4/UAS-системата за индукция на ектопична експресия или свръхекспресия на гена *dfmr1* (*Drosophila fragile X mental retardation 1*) в ретината на развиващите се очи, както и в криловия имагинален диск на *Drosophila*. В тази връзка тя много удачно е провела дозо-чувствителни (температурно зависими) експерименти, при които се получава мутантен крилов или очен фенотип в резултат на ектопична експресия/свръхекспресия на *dfmr1* в хетерозиготно съчетание в F2 с мутация по всеки анализиран ген. Резултатите от това оригинално изследване са показали, че 8 от всички 20 анализирани гени модифицират контролния крилов фенотип, идуциран от ектопичната експресия на *dfmr1* и показват енхансерен ефект. Най-силен крилов енхансерен фенотип е установен при гените *Actin-related protein 66B*, *flightless* и *scribbled*, докато само 2 от анализираните 7 гена за енхансерен очен фенотип – *ciboulot* и *scribbled* са определени като енхансери. Тъй като тези два гена са намерени и като енхансери на криловия фенотип, то това позволява на докторантката да направи важния извод, че двата типа скрининг за генетични модификатори са взаимно заменяеми. Във втория етап от скрининга тези от гените, които не са показали енхансерно взаимодействие с *dfmr1* при 21°C, са проверени за наличие на супресорен ефект върху свръхекспресионния крилов фенотип при 27°C. Всички изследвани гени са показали поправяне на ефекта, получен от ектопичната експресия на *dfmr1* в крилата на *Drosophila*, свидетелство за което е честотата на поява на женски индивиди от F2 без изрезки, в сравнение с тази на контролата, в която всички женски индивиди притежават силни изрезки по крилата. Трябва да отбележа, че в подкрепа на тези данни са показани прекрасни илюстративни фигури и таблици, от които ясно се вижда, че *dfmr1* взаимодейства генетично с всички от анализираните гени, контролиращи растежа и разклоняването на аксона; формирането и зреенето на синапсите. Получените данни показват глобалното участие на *dfmr1* в различни процеси в централната нервна система на *Drosophila*. В литературата това са първи съобщения, доказващи генетични взаимодействия на тези гени с *dfmr1*.

Следващата задача на докторантката е била да проследи взаимодействието на *dfmr1* с гени, участващи в процеса на формиране на синапси в мозъчните неврони. За изпълнението на тази задача тя много удачно е подбрала два гена - *discs large 1* (*dlg1*)

и *sribbled (scrib)*, за които се знае, че играят роля в синаптогенезата и образуват едно семейство Lgl. Lgl е семейство белтъци, кодирани от три гена - *discs large1 (dlg1)*, *sribbled (scrib)* и *lethal(2)giant larvae (lgl)*, важни за синаптичната структура и физиология и участващи в поддържането на клетъчната полярност и в контрола на клетъчната пролиферация. За да изучи взаимодействията на *dfmr1* с тези гени в мозъка на *Drosophila*, докторантката е наблюдавала невронната морфология на малки вентролатерални неврони (sLNV). За ясното визуализиране на крайните аксонални разклонения на тези неврони, тя прилага отново системата GAL4/UAS и успява да свръхекспресира в тях подходящ GFP-трансген - mCD8::GFP, след което чрез конфокална микроскопия сравнява аксонната морфология и синапсите на sLNV-неврони от контролни мозъци, получени от възрастни индивиди с такива, в които липсва продукт на гена *dfmr1* или в които *dfmr1* е свръхекспресиран в избраната група неврони. Получените от Петрова резултати потвърждават генетичните взаимодействия на тези гени с *dfmr1* в криловата тъкан. Тя е установила, че загубата на dFMRP води до свръхразклонени дорзални разклонения на sLNV-невроните и увеличена синаптична площ, докато при свръхекспресия на *dfmr1* в нервната система се намалява броят на крайните разклонения и синаптичната площ. При всички проведени анализи докторантката е намерила генетични взаимодействия на *dfmr1* с голям брой гени, участващи в растежа на аксоните и формирането на синапсите. Тук отново прави много добро впечатление изказаното от Петрова обяснение на тези резултати. Тя изказва хипотезата, че този значителен брой гени са мишени на dFMRP и се подчиняват на координиран контрол на тяхната транскрипционна или пост-транскрипционна експресия. В подкрепа на тази хипотеза, тя е провела биоинформатичен анализ на транскриптите на тези гени, за да установи наличие на мотиви – потенциални места за свързване с dFMRP, като очакването и е в някои от тези транскрипти да успее да идентифицира описаната от други автори G-квартетна последователност, с която dFMRP се свързва чрез своя RGG-бокс и осъществява контрол на трансляцията. Такава последователност тя е намерила в мРНКите на четири от анализиранияте гени: *flightless (fliI)*, *capulet (capt)*, *stardust (std)*, *discs large 1 (dlg1)*. Петрова е показала наличие на тази последователност в 5 екзона на *dlg1*, в един на *capt*, на *std* и на *fliI*. В интроните, обаче, на тези гени тази последователност липсва.

Фактът, че dFMRP е РНК-свързващ белтък, с определена роля в експресията на гени, кодиращи важни за развитието на нервната система белтъци, е предпоставка за изследване на участието му в контрола на експресията на гени, за които вече са установени генетични взаимодействия с *dfmr1*. За да отговори на въпроса, дали този контрол се осъществява на ниво транскрипти, докторантката си поставя за задача да анализира относителните нива на мРНКи, на избрана група от гени интерактори на *dfmr1*, чрез количествен real-time PCR (qRT-PCR). За изпълнението на тези

експерименти, благодарение на задълбочените си познания, тя правилно е избрала 7 гена участващи в нарастването на растежния конус – *enabled (ena)*, *capulet (capt)*, *ciboulot (cib)*, *capping protein alpha (cpa)*, *flightless (fliI)*, *zipper (zip)*, *spaghetti squash (sqh)*, както и други 3 гена – *stardust (std)*, *bazooka (baz)* и *discs large 1 (dlg1)*, чиято невронна функция е свързана с формирането на синапси. Транскриптите на някои от избраните гени са с G-квартетни последователности – *flightless (fliI)*, *capulet (capt)*, *stardust (std)*, *discs large 1 (dlg1)*, а други гени са без G-квартети: *enabled (ena)*, *ciboulot (cib)*, *zipper (zip)*, *spaghetti squash (sqh)*, *bazooka (baz)*.

Чрез множество експерименти, в зависимост от стадия на индивидуалното развитие на *Drosophila*, докторантката е установила, че наличието на адекватно количество от РНК-свързващия белтък dFMRP в невроните на ларвния мозък е критично за осигуряване на необходимото ниво на транскриптите на почти всички анализирани гени, участващи в аксоногенезата, докато за стадий какавида това количество не е съществено за развитието на нервните клетки в мозъка. Въз основа на тези резултати тя прави и важния извод, че dFMRP оказва позитивен контрол върху относителното ниво на транскриптите на гените *ena*, *cib*, *cpa*, *sqh*, *std*, *dlg1* и негативен контрол – на гена *zip*.

За да изучи вероятната роля на dFMRP в алтернативния сплайсинг (АС) на невронни мРНКи с G-квартетни и допълнителни екзонни или интронни секвенции, регулиращи сплайсинга, докторантката изследва относителното количество на мРНК-изоформи, получени в резултат на АС, на различни стадии от развитието на *Drosophila*, с помощта на гените – *capulet (capt)* и *discs large 1 (dlg1)* с G-квартетни секвенции, като е търсила и наличие на ESE (Exonic Splicing Enhancer) с потенциална роля в АС в близост до намерени G-квартети. Въз основа на тези резултати, получени чрез qRT-PCR и добре направен дизайн на праймери е и установения от докторантката важен извод, че в мозъка на какавиди, за разлика от този на ларви, dFMRP регулира позитивно експресионните нива на мРНКи на *capt*, но най-вероятно, не участва в контрола на АС. При гена *dlg1*, обаче, АС в районите с G-квартетна и ESE-секвенции в граничния 3'-екзон/интронен район, усилваща АС, очевидно зависи от нивото на белтъка dFMRP. Въз основа на тези различни за двата гена данни докторантката прави друг важен извод, че нивото на някои от изоформите на невронни гени, кодирани от генетични интерактори на *dfmr1*, се променя в зависимост от различната експресия на dFMRP. Това се отнася за райони, в които се осъществява АС, локализиран в близост до екзонен G-квартет и ESE-секвенции, локализирани в 3'/5'-краищата на съответния екзон. Това са нови, интересни и първи публикувани данни, с приносен характер показващи, че цяла група невронни гени се контролират от dFMRP чрез техните транскрипти.

За да провери вероятният ефект на dFMRP върху транслацията на някои гени, за които са намерени взаимодействия с *dfmr1* Петрова е провела и Western blot-анализ. Анализирала е белтъчните нива на някои от изоформите на гена *dlg1* с моноклонално анти тяло (анти-Discs large 4F3). Сравнявайки резултатите от този анализ с тези, получени от qRT-PCR, тя намира, че белтъчните нива на изоформи *dlg 11-12* и *dlg 10-13* в мозъци на какавиди от различни генотипове, корелират с тези на кодиращите ги мРНКи. Така докторантката доказва, че транслационният етап на генна експресия не променя изходните съотношения в транскрипционните им нива.

Петрова подлага на анализ геномните секвенции на *dlg1* и *capt*, за да докаже присъствие на известни от литературата допълнителни елементи, участващи в регулацията на АС в *Drosophila*. Тя е проверила секвенциите на всички изоформи на гените *dlg1* и *capt* за наличие на 37 известни допълнителни елементи и е намерила, че 12 от тях присъстват и в анализиранията райони на двата гена.

С цел обогатяване 5'- и 3'- екзонните и интронните граници на *dlg1* и *capt* с допълнителни елементи, контролиращи сплайсинга, докторантката е провела компютърен анализ за наличие на хексануклеотидни секвенции (хексамери), с който е успяла да предскаже 30 нови и несъобщавани досега в литературата хексамери, локализиращи в екзонните/интронните краища на двата гена.

Приемам представените и аналитично аргументирани от докторантката изводи и приноси, както и представения от нея „Автореферат“, който е изготвен съгласно изискванията, правилно и обхватно отразява изложението на дисертационния труд.

Заклучение: Дисертационният труд на Мария Христова Петрова е актуален, с ясно поставени цели и задачи, осъществени с използването на модерни съвременни методи. Получени са оригинални резултати с безспорни научни и научно-приложни приноси. Определено считам, че Мария Петрова е със задълбочени познания не само в областта на генетиката и молекулярната биология, но навлиза и добре се справя в едно ново направление – биоинформатика. Тя показва способности за поставяне на самостоятелни идеи и тяхното осъществяване. Едно много важно качество на докторантката, дължащо се на нейните отлични познания, е уменията и аналитично, задълбочено и критично да дискутира и намира приложение на собствените си резултати в светлината на огромния брой публикации. Този научен труд 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 високите професионални качества и научни постижения на Мария Петрова, убедено препоръчвам на научното жури да й присъди на образователната и научна степен “Доктор”.

01.12.2014

Рецензент:

/Проф. д-р Елена Георгиева/