

Становище

ОТ

проф. д-р Гинка Колева Генова – катедра Генетика, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”, София

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”, изготвен в Катедра Генетика на Биологическия факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

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

Автор: Мария Христова Петрова

Дисертационният труд на Мария Петрова разглежда различни аспекти от ролята на дрозофилния ортолог на белтъка Fragile X Mental Retardation (FMRP) в невронното развитие на „мозъка” на този моделен организъм. Липсата на FMRP в мутанти, в които кодиращият ген *FMR1* е транскрипционно инактивиран, предизвиква умствено изоставане, отклонения в поведението, съня и други аномалии, описани като синдром на чупливата X-хромозома

В първата част от своя труд докторантката си поставя задача да намери нови гени в *Drosophila*, които взаимодействат с *dfmr1* (хомолог на човешкия ген *FMR1*) и които са важни за развитието на мозъчните неврони. Тя избира група гени с добре известни функции в аксонното нарастване и синаптогенезата и провежда с тях насочен скрининг за енансерни или супресорни взаимодействия с *dfmr1*. Чрез използване на UAS/Gal4-система за ектопична експресия на *dfmr1* в криловия имагинален диск, Мария Петрова намира, че почти всички анализирани гени взаимодействат с *dfmr1*. Мутантите по тези гени модифицират свръхекспресионния крилов фенотип на *dfmr1*. 12 от тях го супресират и се явяват супресори в тези взаимодействия, а 8 други го усилват и се явяват енансери..

В резултат на своите изследвания Мария Петрова установява набор от нови гени – интерактори на *dfmr1*, които участват в развитието на мозъчните неврони.

Тя установява генетични взаимодействия на *dfmr1* и с гените за хистоновите деацетилази HDAC4 и HDAC6, които показват енхансерен ефект върху контролния свръхекспресионен крилов фенотип. Въз основа на получените данни тя изказва предположение, че енхансерният ефект на хистоновите деацетилази може да бъде резултат от съвместното им функциониране с dFMRP в общи белтъчни комплекси и участие в промените на хроматиновата кондензация и на генната експресия.

Чрез биоинформатичен анализ Петрова намира в част от гените-интерактори G-квартетни последователности, които се считат потенциално място за свързване с RGG-бокса на FMRP, контролиращ тяхната транслация.

Особено важно е, че докторантката установява генетични взаимодействия на част от гените, участващи в синаптогенезата – членове от семейството белтъци Lgl, с *dfmr* непосредствено в процеса на развитие на мозъчния нервен ганглий на *Drosophila*. Така, подобно на взаимодействията в криловата тъкан, генът *scrib* се явява енхансер, а генът *dlg*, съответно – супресор на *dfmr1* в пресинаптичните разклонения на мозъчните аксони, наблюдавани благодарение на индуцираната ектопична експресия на GFP с конфокален микроскоп.

В следващата част от дисертационния труд Мария Петрова изучава някои от механизмите, чрез които dFMRP регулира експресията на намерените от нея гени-интерактори на *dfmr1*, участващи в неврогенезата при *Drosophila*. Чрез метода real-time RT-PCR тя изучава експресията на голям брой от тези гени в мозъчната тъкан на ларви и какавиди от генотипове с различно количество на белтъка dFMRP. Част от тези гени притежават G-квартетни последователности *flightless*, *capulet*, *stardust* и *discs large 1*, а в останалите те не са намерени (*enabled*, *ciboulot*, *zipper*, *spaghetti squash*, *bazooka*). мРНК-изоформите на гена *discs large 1(dlg1)* са разделени на две групи в зависимост от наличието/липсата на потенциални G-квартети в тях и тяхното относително ниво е изследвано поотделно. За преобладаващата част от гените докторантката установява позитивен контрол от dFMRP на нивото на транскриптите в ларвни мозъци на мутанти, в които dFMRP отсъства, а за един от тях – *zipper* контролът е негативен. При това мРНК-изоформите на *dlg1* с и без G-квартетни последователности не показват разлики в относителните нива на съответните

транскрипти, от което Петрова прави логичния извод, че тези последователности не са необходими за експресията на *dlg1* на транскрипционно ниво. Тя подчертава, че различията в нивата на транскриптите на анализирани гени в зависимост от клетъчното ниво на dFMRP на генотипа се контролират и от онтогенетичния стадий на развитие на нервната система. В какавидни мозъци не се наблюдават различия, което предполага, че адекватно количество от РНК-свързващия белтък dFMRP е критично главно в невроните на ларвния мозък за осигуряване на необходимото количество на транскриптите на анализирани гени. За да покаже, че главното ниво на експресионен контрол поне за гена *dlg1* е нивото на транскриптите, Мария Петрова проследява белтъчния профил на същите изоформи чрез Western- блот анализ. В резултат на всички тези експерименти докторантката получава нови за науката данни, които показват, че цяла група невронни гени чрез неясен засега молекулен механизъм се контролират от dFMRP на нивото на техните транскрипти.

Друг аспект на контрола на dFMRP върху невронното развитие, който е предмет на изучаване в дисертационния труд, е регулацията на алтернативния сплайсинг на неговите гени-интерактори. Мария Петрова разширява изследванията на други автори, които показаха контрол на вътреклетъчното ниво на мишия FMRP върху алтернативния сплайсинг на изоформи на собствената му мРНК, като установява, че и при *Drosophila* dFMRP контролира сплайсинга на някои изоформи на мРНК на гена *dlg1*, които притежават в даден екзон G-квартетна последователност и едновременно с това – последователност, усилваща сплайсинга (ESE- exon splicing enhancer) и разположена в 3'-края на този екзон. В м-РНК-изоформи на гена *capulet (capt)*, независимо от наличието на G-квартетна последователност в определен екзон, dFMRP не упражнява такъв контрол – вероятно, поради отсъствие на подходящо ESE с подходяща локализация в границите на дадения екзон.

Последната част от дисертационния труд е посветена на компютърен анализ за наличие на описани в литературата допълнителни екзонни и интронни последователности, регулиращи алтернативния сплайсинг, в 5'- и 3'-екзонните/интронните граници на геномните секвенции на *dlg1* и *capt*, както и на компютърно прогнозиране на допълнителни случайни хексамерни секвенции в същите райони с потенциална роля в сплайсинга. Намерени са 12 от проверените 37 известни от литературата допълнителни регулаторни секвенции, контролиращи сплайсинга - 7

ESE секвенции, 3 ESS секвенции (exon splicing suppressor) и 2 ISE секвенции (intron splicing enhancer). ESE секвенциите са най-често срещаните регулаторни елементи, установени в близост до местата за сплайсинг на *dlg1* и *capt*, някои от които са ген-специфични, а други – характерни и за двата гена – или само за алтернативния сплайсинг, или за алтернативния и конститутивния сплайсинг. ESS и ISE секвенциите са специфични само за алтернативния сплайсинг на двата гена.

5'- и 3'- екзонните и интронните граници на *dlg1* и *capt* са обогатени с 30 нови за науката допълнителни елементи, контролиращи сплайсинга, чрез компютърен анализ за наличие на хексануклеотидни секвенции (хексамери) със статистически достоверно по-висока честота на срещане в екзонните/интронните граници на изследваните гени. Функционалното значение и експерименталното валидиране на тези секвенции предстои да бъде осъществено.

Във връзка с дисертациония труд са публикувани: 1 статия в международно списание с импакт-фактор, 2 статии в реферирани международни списания без импакт-фактор. Част от резултатите по дисертацията са представени с: 1 доклад от конференция в пълен текст, 3 участия в международни конференции в чужбина, 10 участия в национални конференции (включително и с международно участие).

Заклучение:

Докторантката Мария Петрова е разработила достатъчен по обем дисертационен труд, посветен на актуален проблем на неврогенетиката. Тя е усвоила значителен набор от съвременни методи на „правата“ генетика, изискващи не само експериментални умения, но и способност конструиране на експеримента, за анализ на резултатите, формулиране на хипотеза. Усвоила е също модерни микроскопски и молекулярно-биологични методи, които се прилагат рутинно в добрите в съответното направление лаборатории. Тя е получила също така умения в използването на биоинформатични методи за решаване на биологични проблеми.

Мария Петрова е получила нови и интересни за науката резултати, придобила е необходимия опит в натрупването на данни, в тяхната статистическа обработка и интерпретация. Особено ценно е, че тя е получила сериозна теоретична подготовка в областта не само на неврогенетиката, но и на молекулярната генетика

(генна експресия). Нейната публикационна активност е в съответствие с изискванията на закона за развитие на академичния състав в България и вътрешния правилник на БФ при СУ „Св. Климент Охридски” за ОНС. Във връзка с всичко това най-убедено предлагам на Уважаемите членове на научното жури да присъдят на Мария Христова Петрова образователната и научна степен „Доктор” в професионално направление 4.3. Биологични науки (специалност „Генетика”).

01.12.2014 год.

Подпис:

/ Проф. д-р Г. Генова/