



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет

Катедра “Генетика”

Мария Христова Петрова

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

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научна и образователна степен “доктор”

Професионално направление
4.3.Биологични науки
(Генетика)

София

2014 г.

Дисертационния труд съдържа 139 страници, 28 фигури, 12 таблици и 3 схеми. Цитирани са 418 литературни източника.

Докторантът е зачислен в редовна докторантура към катедра „Генетика” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”.

Изследванията по дисертацията са извършени в катедра „Генетика” на БФ, СУ „Св. Климент Охридски“, в Института по молекулярна биология при БАН и в Института по биология и имунология на размножаването при БАН.

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен съвет на катедра „Генетика” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, проведено на 17.10.2014г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2014г. от.....ч. в зала..... на на открито заседание на специализирано научно жури.

Копия от докторската дисертация се съхраняват в Национален център по информация и документация, в Национална библиотека „Св.Кирил и Методий“ и в архива на СУ “Св.Климент Охридски“.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет
Катедра “Генетика”

Мария Христова Петрова

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

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научна и образователна степен “доктор”

Професионално направление
4.3.Биологични науки
(Генетика)

Научен ръководител:
Проф.д-р Гинка Генова

София

2014 г.

УВОД

Правилното функциониране на нервната система и на мозъка почива на формиране на точно свързана невронна мрежа в развитието.

Факторите, които регулират невронната диференциация, нарастването на аксоните, тяхната навигация и намиране на пътя до съседни аксони, както и образуването на терминални синаптични учатъци, имат огромно значение за поддържането на невронните мрежи и за синаптичната пластичност.

В контекста на тези факти изучаването на факторите, регулиращи невронното развитие, е изключително важно не само за разбирането на процесите на неврогенезата и формирането на нервната система, но за медицинската наука и практика.

FMRP е РНК-свързващ белтък, чиято роля във всички тези процеси се изучава интензивно. Той е консервативен белтък, установен в редица моделни организми. Сред тях *Drosophila* заема водещо място със своята много добре изучена генетика и подходяща нервна система. Мозъкът на *Drosophila* е много по-просто устроен от човешкия. Той има около 200 000 неврона, сходни по видове с тези на човека. Важно предимство на този генетичен моделен организъм е също фундаменталното сходство между дрозофила и човека по отношение основната анатомична организация на мозъка, клетъчните елементи, основните сигнални пътища в клетките и начина на функциониране на нервната система.

Трябва да отбележим също, че около 80% от човешките хомолози, свързани с наследствени заболявания, включително и неврологични, са представени в генома на *Drosophila*.

В настоящото изследване ние използваме *Drosophila melanogaster* като модел на невродегенеративното заболяване fragile X syndrome (синдром на чупливата X хромозома). Този синдром е най-често срещаната причина за умствена изостаналост при човека. В патогенезата му е въввлечен генът *fmr1*, който е инактивиран и не кодира нормалния продукт на гена – dFMRP. Най-характерните анатомични дефекти в мозъка на пациенти или на мишки с инактивиран ген *fmr1* са дефекти в невронните разклонения.

В тази връзка за нас представляваше интерес да проведем изследване, посветено на ролята на FMRP като фактор в невронното развитие при *Drosophila melanogaster*. Като РНК-свързващ белтък, dFMRP може да регулира различни етапи от метаболизма на своите мРНК-мишени. Нарушенията в тази регулация могат да доведат до редица аномалии, в това число и аномалии в развитието и формирането на зряла централна нервна система, изградена от адекватно организирана невронна мрежа.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд бе да се изучи ролята на dFMRP (*Drosophila* Fragile X Mental Retardation Protein) в контрола на експресията на гени, участващи в невронното развитие.

За изпълнението на тази цел ние си поставихме следните **задачи**:

1. Да се проведе генетичен скрининг на енхансерни и супресорни взаимодействия на предварително избрани групи гени със специфични функции в развитието на нервната система (в нарастването на аксона) с гена *dfmr1*.

2. Да се изучат генетичните взаимодействия на избрани гени с *dfmr1* на клетъчно ниво – на ниво аксонна и синаптична морфология на мозъчните неврони.

3. Да се извърши биоинформатичен анализ на последователностите на мРНКи за наличие в тях на dFMRP-свързващ G-квартетен мотив.

4. Да се изучи участието на dFMRP в различни нива на контрол на експресия на набор от гени, контролиращи нарастването на мозъчните аксони и взаимодействащи с *dfmr1*.

5. Да се установят описани в литературата допълнителни екзонни и интронни последователности, регулиращи алтернативния сплайсинг на невронни мРНКи – потенциални мишени на dFMRP.

6. Да се извърши компютърно прогнозиране на случайни хексамерни секвенции в екзон/интронните краища на избрани гени с потенциална роля в сплайсинга..

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

А/ Материали

Всички използвани в дисертационния труд дрозофилни линии бяха закупени от Дрозофиланата база в Блумингтън, САЩ. Подробна информация за тях може да се намери в сайта на дрозофиланата база в САЩ (www.flybase.org).

Б/ Методи

1. Генетични методи

1.1. GAL4/UAS - система за насочена генна експресия

1.2. Провеждане на насочен скрининг за изучаване на генетични взаимодействия с *dfmr1*

2. GFP-флуоресценция и конфокална микроскопия

2.1. Анализ на невронната морфология

3. Молекулярно-биологични методи

3.1. qRT-PCR анализ

3.2. *Western blot* анализ

4. Статистическа обработка на резултатите

5. Биоинформатичен анализ

5.1. Биоинформатичен анализ за наличие на G-квартети

5.2. Биоинформатичен анализ за наличие на известни допълнителни регулаторни елементи на сплайсинга

5.3. Компютърно предсказани хексануклеотидни допълнителни регулаторни елементи на сплайсинга

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

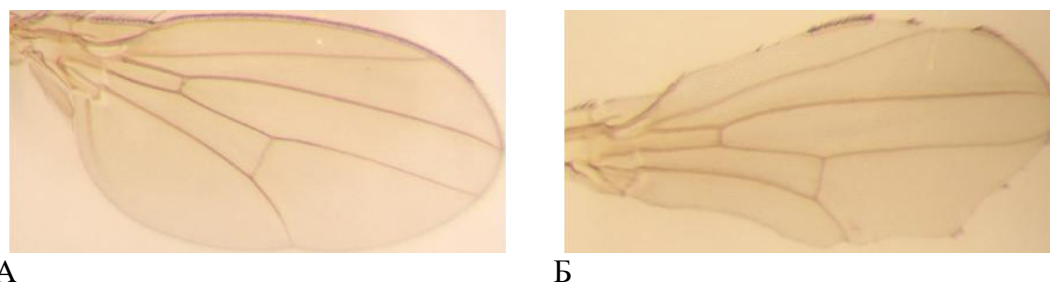
1. Насочен скрининг за взаимодействие на *dfmr1* с предварително избрана група гени, контролиращи развитието на нервната система

Една от задачите на нашето изследване беше да анализираме генетичното взаимодействие между *dfmr1* и предварително избрана група от гени с установена от други автори (Sanchez-Soriano et al., 2007) роля в развитието на нервната система. Функциите на тези гени могат да се видят в раздела Литературен обзор (табл.1). В този насочен скрининг ние искахме да намерим модификатори – енхансери и супресори на гена *dfmr1*.

За да осъществим скрининга, ние използвахме 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 melanogaster* (Brand and Perrimon, 1993). Тази система дава възможност да се получат мутантни фенотипове в лесно наблюдаеми тъкани, които не са от съществено значение за развитието на организма. На фона на ектопично експресиран/свръхекспресиран ген и неговия фенотип могат да се търсят гени, мутациите, в които водят до модификация на съответния фенотип. Подробно описание на този подход може да се намери в раздела Материали и методи.

За получаване на мутантен фонов фенотип на очите ние използвахме трансгенна линия – *Gal4-ninaE.GMR*, а за получаване на мутантен фонов фенотип на крилата използвахме трансгенната линия *Gal4-vg.M*.

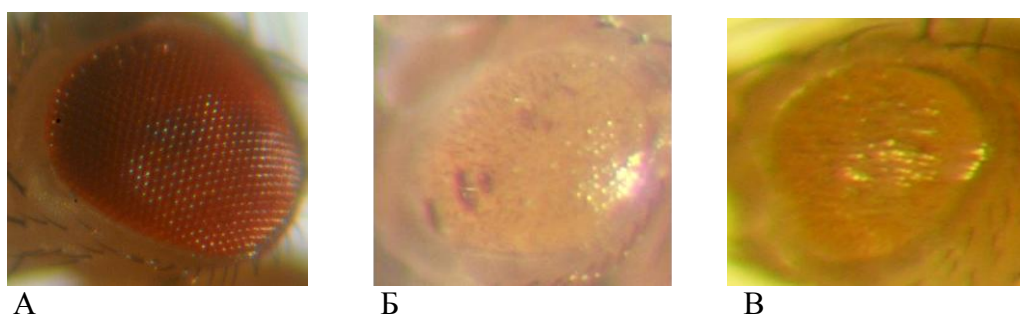
Фотографии на получените свръхекспресионни мутантни фенотипове са представени на фиг.1 и фиг. 2. По същество, мутации, дължащи се на хиперфункция на даден ген, се наричат мутации с придобиване на функция. Тъй като експресията на трансгените зависи от температурата, проверявахме фоновият фенотип при различни температури.



Фиг. 1. Свръхекспресионен мутантен фенотип в крилата на имаго: А/ при 21°C и Б/ при 27 °C.

Както се вижда от фиг.1, при температура 21°C всички женски мухи от генотип *w/w; +/Gal4-vg.M; +/UAS-Fmr1.Z* са с нормални крила, а мъжките индивиди от същия генотип са с мутантен крилов фенотип “изрязани” крила (“notched” wings) – резултат от ектопичната експресия на гена *dfmr1*. Очевидно е, че този мутантен фенотип има непълна пенетрантност и при температура 21°C той се проявява само при мъжките индивиди. При температура 27°C всички мухи – както мъжки, така и женски индивиди, имат изрезки по крилето. И при двете температури се наблюдават изрезки само по ръбовете на крилата, което силно напомня фенотипа на известната мутация *Notch* и е потвърждение на подобен фенотип, наблюдаван от Wan и др. Тези автори показват, че фенотипът “notched wings” се дължи на апоптоза на клетки по ръбовете на крилата, в които функционира промотора *vg.M* (Wan et al., 2000).

От тези данни става ясно, че температура 21°C е удобна за откриване на енхансери на мутантния крилов фенотип в женски индивиди, които при дадената температура са с изрезки по крилата. А температура 27°C пък се явява удобна за откриване на супресори на криловия фенотип, тъй като всички мухи, които имат нормални по форма крила, независимо от своя пол, ще бъдат супресори на мутантния крилов фенотип.



Фиг. 2. Свърхекспресионен мутантен фенотип в ретината на очите: А/ див тип; Б/ при 21°C и В/ при 23 °C.

При температура 21°C и при женските и при мъжките индивиди с генотип *w/w; +/Gal4-ninaE.GMR; +/UAS-Fmr1.Z* се наблюдават груби очи и депигментация на ретината с отделни некротизирани участъци – резултат от свръхекспресията на *dfmr1*. При 23°C преживелите индивиди (повече женски) имат груби и депигментирани очи (фиг.2).

От тези експерименти може да се направи извод, че по-ниската температура - 21°C, позволява намирането на енхансери на очния мутантен фенотип, наблюдавани в женски индивиди, които при тази температура са с по-груби очи. Температура 23°C е подходяща за намиране на супресори на очния мутантен фенотип, при които размерът на очите и морфологията на очните фасетки е близка до нормалната.

За да анализираме генетичните взаимодействия на *dfmr1*, ние проведохме дозочувствителни експерименти, при които получавахме мутантен крилов или очен фенотип в резултат на ектопична експресия/свърхекспресия на *dfmr1* в хетерозиготно съчетание в F₂ с мутация по всеки анализиран ген, независимо от неговата хромозомна локализация (виж Материали и методи).

Логиката на нашия подход е, че ако продуктите на два гена участват в реализирането на една и съща функция и са компоненти на един и същи биологичен път, дисбалансът в количеството на тези продукти заради мутация по всеки един от гените, които анализираме, ще доведе до промяна в крайния фенотип – крилов или очен. В такъв случай ние ще отчетем генетично взаимодействие и при това, както вече отбелязахме по-горе, ако фоновият крилов или очен фенотип е “влошен”, т.е. силно изразен, анализираният ген се счита за енхансер на гена *dfmr1*. Обратно, ако този фонов фенотип е по-слабо изразен, така че той се доближава до дивия тип, генът взаимодейства с *dfmr1* и се явява негов супресор.

В първия етап от нашия насочен скрининг ние анализирахме избраните гени за енхансерни взаимодействия с *dfmr1* в крилата на имагото. Резултатите от тези експерименти, проведени при температура 21°C, са представени на табл.1.

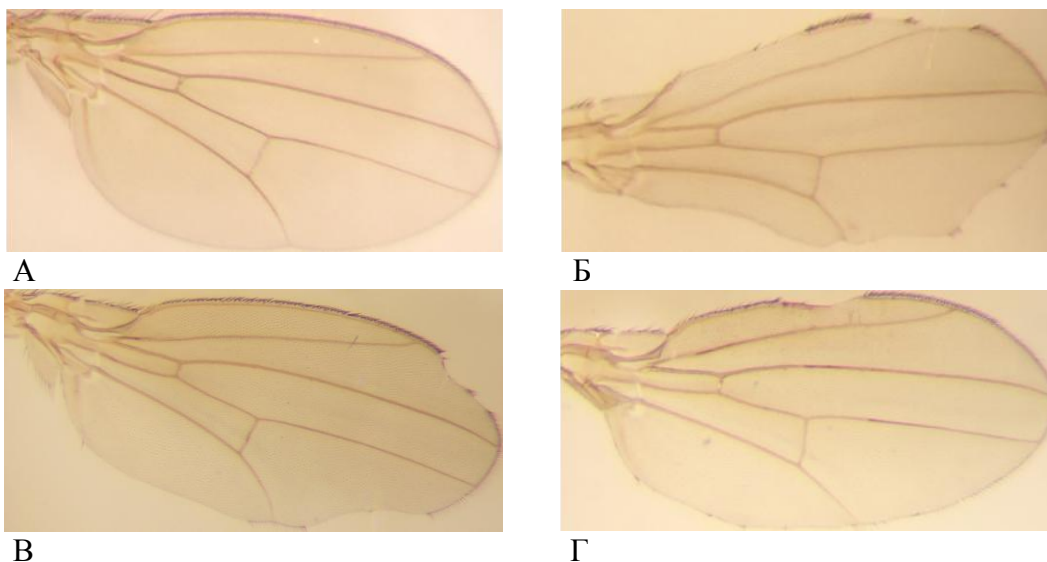
Таблица 1. Проверка за наличие на енхансерен крилов фенотип в генетични експерименти, проведени при температура 21°C.

Ген	Символ	Крилов фенотип в женски-индивиди от F ₂ с генотип <i>a/w</i> ; <i>+Gal4-vg.M</i> ; <i>+//UAS-Fmr1.Z</i>			Наличие на енхансерно взаимодействие с <i>dfmr1</i>
		Фонов крилов фенотип (% индивиди от F ₂)	Енхансерен фенотип (% индивиди от F ₂)	Общ брой женски индивиди от F ₂	
<i>Suppressor of Profilin 2</i>	<i>Sop2</i>	92%	8%	276	-
<i>Actin-related protein 66B</i>	<i>Arp66B</i>	65%	35%	232	енхансер**
<i>enabled</i>	<i>ena</i>	98%	2%	231	-
<i>capulet</i>	<i>cap</i>	87%	13%	293	енхансер*
<i>ciboulot</i>	<i>cib</i>	78%	22%	315	енхансер*
<i>capping protein alpha</i>	<i>cpa</i>	92%	8%	220	-

<i>capping protein beta</i>	<i>cpb</i>	91%	9%	400	-
<i>twinstar</i>	<i>trs</i>	95%	5%	285	-
<i>flightless</i>	<i>fli1</i>	70%	30%	290	енхансер**
<i>quail</i>	<i>qua</i>	95%	5%	245	-
<i>alpha Actinin</i>	<i>Actn</i>	91%	9%	626	-
<i>cheerio</i>	<i>cher</i>	94%	6%	375	-
<i>zipper</i>	<i>zip</i>	91%	9%	251	-
<i>spaghetti squash</i>	<i>sqh</i>	83%	17%	404	енхансер*
<i>Cytoplasmic linker protein 190</i>	<i>CLIP-190</i>	93%	7%	442	-
<i>short stop</i>	<i>shot</i>	100%	0.3%	380	-
<i>stardust</i>	<i>std</i>	79%	21%	312	енхансер*
<i>bazooka</i>	<i>baz</i>	84%	16%	218	енхансер*
<i>discs large 1</i>	<i>dlg1</i>	97%	3%	395	-
<i>scribbled</i>	<i>scrib</i>	50%	50%	456	енхансер**
контрола		98%	2%	728	

“a” – анализиран мутантен алел на избраните от нас гени, локализирани в X, втора или трета хромозома. С ** са означени силните енхансери, а с * – умерените

От тази таблица се вижда, че значителна част от анализирани гени – 8 от всички 20 – модифицират контролния крилов фенотип, идуциран от ектопичната експресия на *dfmr1*, и показват енхансерен ефект. Намерените от нас енхансери на *dfmr1* условно могат да бъдат разделени на две групи: силни и умерени. Приехме за силни енхансери такива, при които модифициран крилов фенотип (изрезки по крилата) се наблюдава сред 30-50% от женските индивиди в F₂. Приетите за умерени енхансери показват модифициран фенотип в 10-30% от женските индивиди. Криловият фенотип на двата различни по сила енхансери е показан на фиг.3.



Фиг. 3. А/ Свръхекспресионен крилов фенотип; Б/, В/ и Г/ крилов ехансерен фенотип на женски индивиди с генотип *a/w; +/Gal4-vg.M; +//UAS-Fmr1.Z*.

Вижда се, че всички изрезки при ехансерните фенотипове са в самите ръбове на крилата, което е характерно за мутантите по гена *Notch* (de Celis et al., 1996).

От табл.1 става ясно, че най-силен ехансерен фенотип се наблюдава при гените *Actin-related protein 66B*, *flightless* и *scribbled*. Един от тези силни ехансери - *scribbled* играе роля в клетъчната полярност и клетъчните контакти (Bilder and Perrimon, 2000; Bilder et al., 2000). Два от всички анализирани гени, контролиращи аксоногенезата чрез растежния конус - *Actin-related protein 66B* и *flightless*, влошават силно свръхекспресионния крилов фенотип.

Във всички случаи на ехансерен крилов фенотип се наблюдаваше запазено жилкуване на крилата.

В този първи етап от нашата работа ние проведохме дозо-чувствителни експерименти и за ехансерен очен фенотип, при който част от мутантните гени, анализирани за модифициран крилов фенотип, проверявахме и за ефект върху контролния фенотип “груби очи”. За наличие на ехансерно взаимодействие с *dfmr1* ние съдехме по появата в F₂ на женски индивиди с още “по-груби очи”, т.е. с “влошен” очен фенотип, в сравнение с фоновия (контролния). Гените, които показваха усилване на мутантния контролен фенотип, определяхме като ехансери. Резултатите от тези експерименти са показани в табл.2.

Таблица 2. Проверка за наличие на енхансерен очен фенотип в генетични експерименти, проведени при температура 21°C.

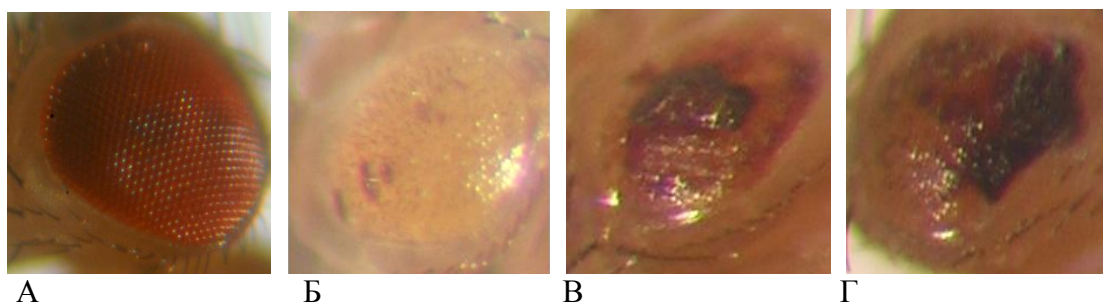
Ген	Символ	Очен фенотип в женски индивиди от F ₂ с генотип <i>a/w; +/Gal4-ninaE.GMR; +//UAS-Fmr1.Z</i>			Наличие на енхансерно взаимодействие с <i>dfmr1</i>
		Фонов очен фенотип (% индивиди от F ₂)	Енхансерен фенотип (% индивиди от F ₂)	Общ брой женски индивиди от F ₂	
<i>Suppressor of profilin 2</i>	<i>Sop2</i>	91%	9%	52	-
<i>enabled</i>	<i>ena</i>	100%	0%	48	-
<i>ciboulot</i>	<i>cib</i>	77%	23%	58	енхансер
<i>twinstar</i>	<i>trs</i>	90%	10%	67	-
<i>cheerio</i>	<i>cher</i>	89%	11%	53	-
<i>discs large 1</i>	<i>dlg1</i>	97%	3%	42	-
<i>scribbled</i>	<i>scrib</i>	6%	94%	50	енхансер
контрола		98%	2%	87	

“*a*” представлява анализиран мутантен алел на избраните от нас гени, локализиращи в X, втора или трета хромозома

За по-удобно количествено сравняване на данните от двата типа насочен скрининг отчитяхме само женското поколение от F₂.

От табл.2 се вижда, че 2 от анализиранияте 7 гена – *ciboulot* и *scribbled* показват енхансерен очен фенотип. Ние определихме тези гени като енхансери на криловия фенотип. Тъй като те са енхансери и на очния фенотип, ние имаме пълна увереност, че двата типа скрининг за генетични модификатори са взаимно заменяеми. Коментираме този факт, тъй като досега в литературата е използван само очен фенотип “груби очи” за скрининг на доминантни модификатори на *dfmr1* (Zarnescu et al., 2005) и на други гени. Този фенотип, обаче, е свързан със значително намаление на жизнеспособността на мухите, което прави неговата “разделителна способност” малко по-ниска и предопредели по-нататъшната ни работа само с крилов фенотип.

Наблюдаваният от нас енхансерен очен фенотип при температура 21°C е илюстриран на фиг.4.



Фиг. 4. А/ Див тип; Б/ Свърхекспресионен очен фенотип; В/ и Г/ очен ехансерен фенотип на женски индивиди с генотип *a//w; +/Gal4-ninaE.GMR; +//UAS-Fmr1.Z*.

Във втория етап от нашия скрининг тези от гените, които не показаха ехансерно взаимодействие с *dfmr1* на 21°C, проверихме за наличие на супресорен ефект върху свърхекспресионния крилов фенотип (фонов, контролен) при 27°C.

Резултатите от този скрининг са представени в табл.3.

Таблица 3. Проверка за наличие на супресорен крилов фенотип в генетични експерименти, проведени при температура 27°C.

Ген	Символ	Крилов фенотип в женски-индивиди от F ₂ с генотип <i>a//w; +/Gal4-vg.M; +//UAS-Fmr1.Z</i>			Наличие на супресорно взаимодействие с <i>dfmr1</i>
		Фонов крилов фенотип (% индивиди от F ₂)	Супресорен фенотип (% индивиди от F ₂)	Общ брой женски индивиди от F ₂	
<i>Suppressor of Profilin 2</i>	<i>Sop2</i>	19%	81%	161	супресор
<i>enabled</i>	<i>ena</i>	4%	96%	154	супресор
<i>capping protein alpha</i>	<i>cpa</i>	15%	85%	176	супресор
<i>capping protein beta</i>	<i>cpb</i>	20%	80%	385	супресор
<i>twinstar</i>	<i>trs</i>	37%	63%	155	супресор
<i>quail</i>	<i>qua</i>	32%	68%	165	супресор
<i>alpha Actinin</i>	<i>Actn</i>	30%	70%	358	супресор
<i>cheerio</i>	<i>cher</i>	46%	54%	131	супресор

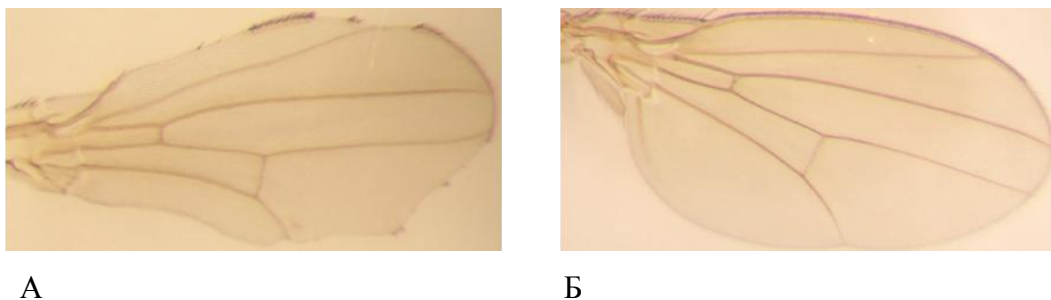
<i>zipper</i>	<i>zip</i>	22%	78%	228	супресор
<i>Cytoplasmic linker protein 190</i>	<i>CLIP-190</i>	23%	77%	411	супресор
<i>short stop</i>	<i>shot</i>	7%	93%	161	супресор
<i>discs large 1</i>	<i>dlg1</i>	22%	78%	235	супресор
контрола		100%	0%	203	

“a” - анализиран мутантен алел на избраните от нас гени, локализирани в X, втора или трета хромозома

Подобно на анализа на енхансерите, и тук също отчитяхме само женското поколение в F₂, което позволяваше да сравняваме сходен брой индивиди от двата експеримента.

Както се вижда от табл.3, всички изследвани гени показват поправка на ефекта, получен от ектопичната експресия на *dfmr1* в крилата на *Drosophila*. За това ние съдихме по честотата на поява на женски индивиди от F₂ с генотип *a//w; +/Gal4-vg.M; +//UAS-Fmr1.Z* без изрезки, в сравнение с тази на контролата с генотип *w//w; +/Gal4-vg.M; +//UAS-Fmr1.Z*, в която всички женски индивиди притежават силни изрезки по крилата.

Описаните крилови фенотипове са илюстрирани с фотографии на фиг.5.



Фиг. 5. А/ Свръхекспресионен крилов фенотип при 27°C и Б/ крилов супресорен фенотип на женски индивиди с генотип *a//w; +/Gal4-vg.M; +//UAS-Fmr1.Z*.

От данните, представени в табл.1 и 3, се вижда, че *dfmr1* взаимодейства генетично с всички от анализиранияте гени. Наблюдаването на взаимодействия, които модифицират контролния мутантен фенотип на този ген, означава, че гените-модификатори на този фенотип изпълняват една и съща функция с *dfmr1*, участват с него в едни и същи биологични процеси. Може да се спекулира, че енхансерните гени, които “влошават” контролния фенотип, могат да кодират белтъци, участващи в общи комплекси с белтъка на

гена *dfmr1* – dFMRP. В този случай се очаква продуктите на гените да взаимодействат директно в белтъчните комплекси и да осъществяват дадена функция.

Супресорите на мутантния фенотип “подобряват” контролния крилов фенотип. Като правило, супресорните взаимодействия са характерни за сигнални каскади. Възможно е, в този случай единият от двата взаимодействащи гена да контролира нивото на белтъчния продукт на другия ген и чрез него – общия биологичен процес. Свърхекспресията на *dfmr1* води до повишена експресия на белтъка dFMRP. Тъй като тази свърхекспресия предизвиква мутантен фенотип (контролен), който се “поправя” от хипоморфна или аморфна мутация в анализиран ген, то, очевидно е, че *dfmr1* трябва да се намира преди този ген (upstream) в сигналната верига.

В нашата работа анализирахме група гени, които контролират растежа и разклоняването на аксона; формирането и зреенето на синапсите. Получените резултати показват глобално участие на *dfmr1* в различни процеси в централната нервна система на *Drosophila*. За това ние съдим от факта, че откриваме генетични взаимодействия с почти всички скринирани гени. Доколкото ни е известно от литературата, нашите данни са първите, които показват генетични взаимодействия на тези гени с *dfmr1*.

За да изучим взаимодействието на *dfmr1* с гени, участващи в невронното развитие в по-подходящ физиологичен контекст, ние избрахме два гена, за които е известно, че играят роля в синаптогенезата - *discs large 1 (dlg1)* и *sribbled (scrib)*. Тези два гена имат и други клетъчни функции и образуват едно семейство – семейство Lgl. Изследвахме тяхното взаимодействие с *dfmr1* в самата нервна система, в процеса на формиране на синапси в мозъчните неврони.

2. Генетични взаимодействия на *dfmr1* с членове на семейството белтъци Lgl в невронната морфология на избрана група мозъчни неврони

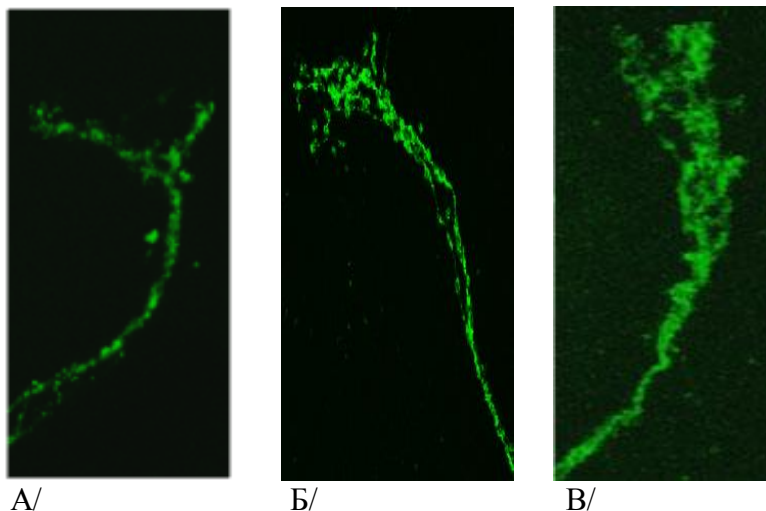
Lgl е семейство “scaffolding” белтъци, кодирани от няколко гена. Генът *discs large 1 (dlg1)* играе роля в клетъчната полярност, в развитието на мозъчните неврони и във функционирането на синапсите (Tejedor et al., 1997; Thomas et al., 1997; Bilder and Perrimon, 2000; Bilder et al., 2000). Друг член на това семейство е *sribbled (scrib)*, който също участва в поддържането на клетъчната полярност и в контрола на клетъчната пролиферация (Bilder and Perrimon, 2000; Bilder et al., 2000). Той е важен и за синаптичната структура и физиология (Roche et al., 2002; Moreau et al., 2010). Третият член на това семейство е *lethal(2)giant larvae (lgl)*, за който неотдавна беше показано, че взаимодейства с FMRP/dFMRP при мишки и дрозофили, образувайки общ макромолекулен комплекс, който включва специфични РНК и се регулира от белтъчния комплекс Par (Zarnescu et al., 2005).

За да изучим взаимодействията на *dfmr1* с тези гени в мозъка на *Drosophila*, ние наблюдавахме невронната морфология на група добре изучени и лесно наблюдаеми мозъчни неврони – малки вентро-латерални неврони (sLNv).

За да визуализираме крайните аксонални разклонения на тези неврони, ние свръхекспресирахме в тях подходящ GFP-трансген - *mCD8::GFP*, като използвахме системата *GAL4/UAS*. Последната е много удобна за изучаване на невронни разклонения, тъй като експресира в клетъчните мембрани флуоресциращия в зелено GFP (green fluorescent protein) (Clyne et al., 2003).

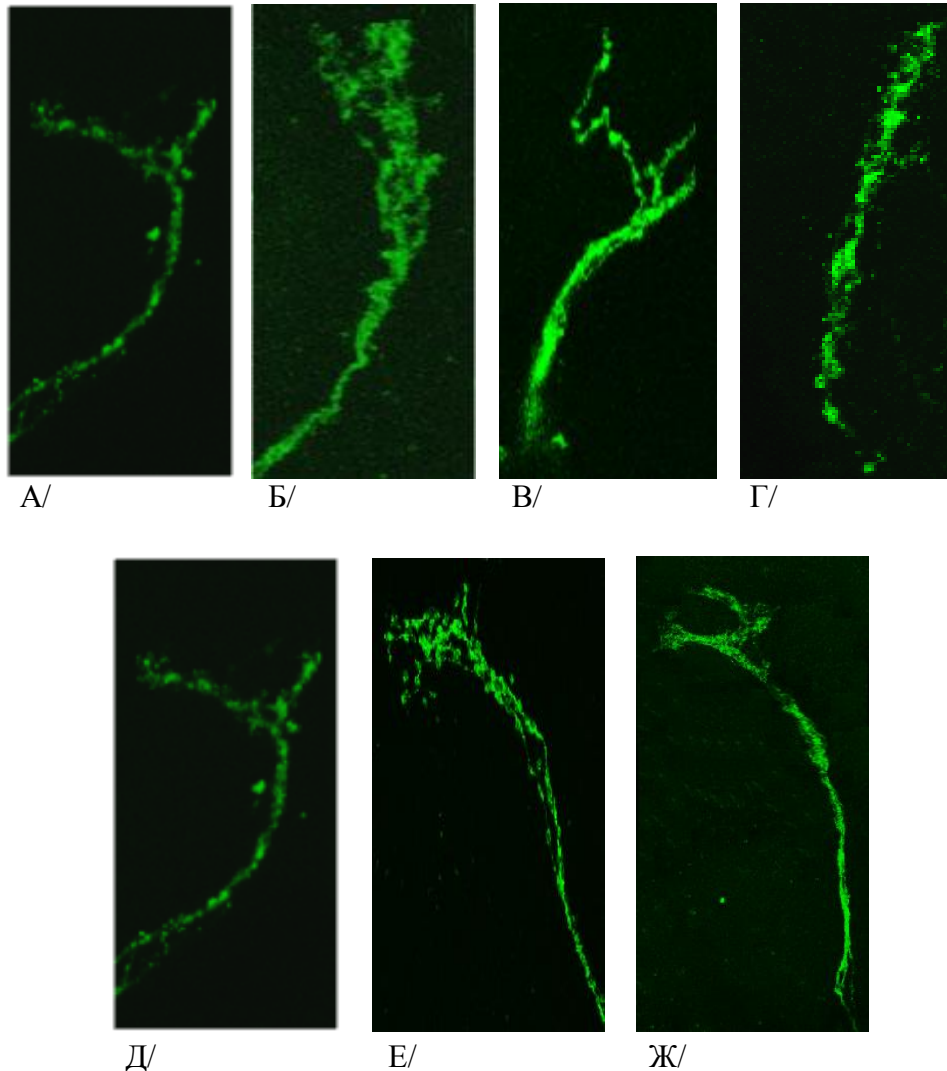
Чрез конфокална микроскопия ние сравнихме аксонната морфология и синапсите на sLNv- неврони от контролни мозъци, получени от възрастни индивиди с генотип - *+/+*; *pdf-Gal4//UAS- mCD8::GFP*, с такива, в които липсва продукт на гена *dfmr1* (генотип: *+/+*; *pdf-Gal4//UAS- mCD8::GFP*; *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*) или, в които *dfmr1* е свръхекспресиран в избраната група неврони (генотип: *+/+*; *pdf-Gal4//UAS- mCD8::GFP*; *UAS-dfmr1/+*).

Нашите резултати показват, че загубата на dFMRP води до свръхразклонени дорзални разклонения на sLNv-невроните и увеличена синаптична площ (фиг.6, Б), докато при свръхекспресия на *dfmr1* в нервната система се намалява броят на крайните разклонения и синаптичната площ (фиг.6, В). Получените от нас резултати са в съгласие с предишни данни на други автори (Morales et al., 2002; Reeve et al., 2005; Gatto and Broadie, 2009).



Фиг. 6. Синаптична морфология на sLNv невроните в различни генотипове: А/ Контрола – *+/+*; *pdf-Gal4//UAS- mCD8::GFP*; Б/ Липса на експресия на *dfmr1* – *+/+*; *pdf-Gal4//UAS- mCD8::GFP*; *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*; В/ Свръхекспресия на *dfmr1* – *+/+*; *pdf-Gal4//UAS- mCD8::GFP*; *UAS-dfmr1/+*.

Ние също изследвахме ефекта от липсата на продукт на *dfmr1* или от неговата свръхекспресия на фона на хетерозиготност по мутантни алели на гените *dlg1* или *scrib*. Резултатите са представени на фиг.7 В, Г и Ж.



Фиг. 7. Синаптична морфология на sLNv невроните: А/ Контрола – +/+; *pdf-Gal4//UAS-mCD8::GFP*; Б/ Свръхекспресия на *dfmr1* в генотип – +/+; *pdf-Gal4//UAS-mCD8::GFP; UAS-dfmr1/+*; В/ *dlg1/+* и свръхекспресия на *dfmr1* в генотип – *dlg1/+*; *pdf-Gal4//UAS-GFP;+//UAS-dfmr1*; Г/ *scrib/+* и свръхекспресия на *dfmr1* в генотип – +/+; *pdf-Gal4//UAS-GFP;scrib//UAS-dfmr1*; Д/ Контрола – +/+; *pdf-Gal4//UAS-mCD8::GFP*; Е/ Липса на експресия на *dfmr1* в генотип – +/+; *pdf-Gal4//UAS-mCD8::GFP; Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*; Ж/ *dlg1/+* и липса на експресия на *dfmr1* в генотип – *dlg1/+*; *pdf-Gal4//UAS-GFP; Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*.

От фиг.7 Г се вижда, че на фона на едно мутантно копие на гена *scrib*, дефектите в крайните разклонения на аксона, дължащи се на свръхекспресията на *dfmr1* в нервната система на *Drosophila*, се усилват. Получените резултати потвърждават енхансерния ефект

на *scrib* не само в криловите имагинални дискове, но и в пресинаптичната аксонна морфология на неврони в мозъци от възрастни индивиди.

На фона на едно мутантно копие на гена *dlg1*, синаптичните дефекти, получени в резултат от липсата на продукт на *dfmr1* (фиг.7 Ж), са значително намалени и е намален броя на крайните разклонения на sLNv-невроните. Същият ефект се наблюдава и при свръхекспресия на *dfmr1* и липса на едно копие на *dlg1* (фиг.7 В). Тези резултати подвърждават супресорния ефект на *dlg1*, както в криловите имагинални дискове, така и в крайните разклонения на sLNv-невроните.

В нашите експерименти ние наблюдавахме генетични взаимодействия на *dfmr1* с голям брой гени, особено с такива от тях, които участват в растежа на аксоните и формирането на синапсите. Тези резултати трудно могат да се обяснят, ако допуснем образуване на общи комплекси с толкова много белтъци, които да осъществяват един и същи процес. По-вероятно е този значителен брой гени да са мишени на dFMRP и да се подчиняват на координиран контрол на тяхната транскрипционна или посттранскрипционна експресия.

3. Биоинформатичен анализ за наличие на G-квартети в последователностите на мРНК, кодирани от анализираните гени

За да получим допълнителни данни в подкрепа на нашата хипотеза, ние проведохме биоинформатичен анализ на транскриптите на тези гени за наличие на мотиви – потенциални места за свързване с dFMRP.

С помощта на този анализ ние очаквахме да идентифицираме в някои от тези транскрипти описаната от други автори G-квартетна последователност, с която dFMRP се свързва чрез своя RGG-бокс и осъществява контрол на транслацията (Darnell et al., 2001; Schaeffer et al., 2001).

За нашия анализ използвахме софтуерна програма (виж Материали и методи), модифицирана за нашите изследвания от доц. Е. Молле, която търси мотива [DWGGN₍₀₋₂₎]₄ в анализираните секвенции на мРНКи. В този мотив D е всеки нуклеотид с изключение на C; W е T или A; N е всеки нуклеотид.

Ние намерихме G-квартетна последователност в мРНКи на четири от анализираните гени. Те са: *flightless (fliI)*, *capulet (capt* – и в трите мРНКи), *stardust (std* – в 2 от 14-те мРНКи), *discs large 1 (dlg1* - в 14 от 21 мРНКи). Установихме G-квартетна последователност в 5 (екзони 12, 38, 39, 40 и 41) от всички 41 екзона на *dlg1*, в един (екзон 3) от 8-те екзона на *capt*, в един (екзон 24) от 32 екзона на *std* и в един (екзон 2) от 4-те екзона на *fliI*. Не намерихме G-квартетна последователност в интроните на нито един от тези гени.

4.Изучаване нивата на мРНК, кодирани от гени, взаимодействащи с *dfmr1* чрез количествен *real-time* PCR- анализ. Роля на *dFMRP* в контрола на тези нива

За да изучим един от възможните механизми, чрез който би могла да се осъществява ролята на *dFMRP* в невронното развитие на мозъка при *Drosophila*, ние изследвахме участието на този белтък в контрола на експресията на набор от гени, за които установихме генетични взаимодействия с *dfmr1*. Основание за провеждането на експерименти с подобна цел беше фактът, че *dFMRP* е РНК-свързващ белтък с ключова роля в различни етапи на генната експресия, някои от които са слабо проучени.

Известно е, че *FMRP* се свързва с набор от невронни мРНК, и формира заедно с тях и други белтъци рибонуклеобелтъчни комплекси (RNP), където той участва в метаболизма на тези мРНК: в регулацията на транспорта им (Antar et al., 2004; Kanai et al., 2004; Ling et al., 2004; Davidovic et al., 2007; Dichtenberg et al., 2008; Kao et al., 2010), на стабилността им (Zhang et al., 2007; Zalfa et al., 2007; De Rubeis and Bagni, 2011) и транслацията им (Eberhart et al., 1996; Tamanini et al., 1996; Feng et al., 1997; Lagerbauer et al., 2001; Li et al., 2001; Zalfa et al., 2003; Hou et al., 2006; Muddashetty et al., 2007; Napoli et al., 2008; Park et al., 2008). Регулираните мРНК са важни за синаптичните функции и невронното развитие.

Напоследък бяха получени данни, показващи, че е възможно *FMRP* да участва и в контрола на транскрипцията на някои невронни мРНК. Беше намерено, че той се свързва със *Simiate* – нов белтък, експресиран в човешкия мозък, за който се предполага участие в процесите на транскрипция и сплайсинг (Derlig et al., 2013).

Ние предположихме, че експресията на част от гените, взаимодействащи с *dfmr1* и кодиращи важни за развитието на нервната система белтъци, може да бъде под директен контрол на *dFMRP*. За нас представляваше интерес да установим дали този контрол може да се осъществява на ниво транскрипти. Изследвахме относителното ниво на мРНК на избрана група от гените-интерактори на *dfmr1* чрез количествен *real-time* PCR (qRT-PCR).

За нашите експерименти ние избрахме 7 гена от различни функционални групи – *enabled (ena)*, *capulet (capt)*, *ciboulot (cib)*, *capping protein alpha (cpa)*, *flightless (fliI)*, *zipper (zip)*, *spaghetti squash (sqh)*, участващи в нарастването на растежния конус (Sanchez-Soriano et al., 2007), както и 3 гена – *stardust (std)*, *bazooka (baz)* и *discs large 1 (dlg1)*, чиято невронна функция е свързана с формирането на синапси. Сред избраните гени са тези, в чийто транскрипти установихме наличие на секвенции, образуващи G-квартетни структури – *flightless (fliI)*, *capulet (capt)*, *stardust (std)*, *discs large 1 (dlg1)*. Освен тях, ние избрахме още няколко други гени, в чийто транскрипти, по биоинформатични данни, не присъстват G-квартети: *enabled (ena)*, *ciboulot (cib)*, *zipper (zip)*, *spaghetti squash (sqh)*, *bazooka (baz)*.

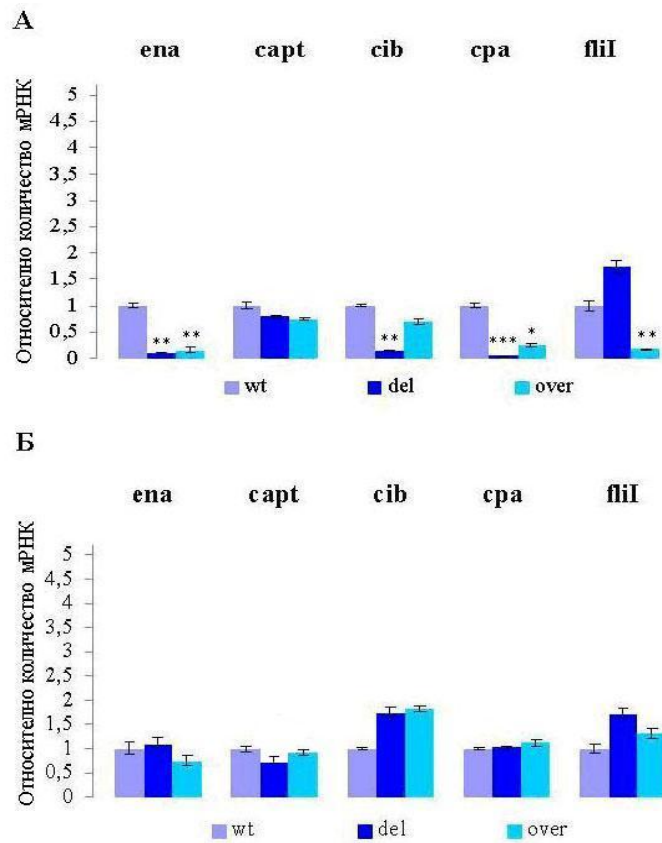
Сравняването на относителните нива на транскриптите на един и същи ген: с G-квартети и без такива в мозъчна тъкан от нулеви мутанти по гена *dfmr1* и в мутанти със свръхекспресия на dFMRP би изяснило ролята на G-квартетните структури като предполагаем определящ фактор в свързването на dFMRP с неговите потенциални РНК-мишени и в експресията на тези РНКи. Подходящ ген в това отношение е *dlg1*. Той кодира 21 различни транскрипта, получени в резултат на алтернативен сплайсинг. В екзоните на 14 от тях установихме наличие на G-квартетна последователност (виж Резултати и обсъждане, т.3). В екзоните на останалите 7 изоформи не установихме G-квартетни секвенции. Това ни даде основание да разделим изоформите на този ген на две групи – с G-квартетна последователност, а втората - без такава последователност. Така ние можехме да отчитаме относителните нива на мРНКи на *dlg1* с G-квартет, отделно от тези без G-квартетна последователност.

Ние открихме и в трите изоформи гена *capt* G-квартетна последователност, поради което анализирахме относителните нива и на трите мРНКи на този ген. Изучавахме и нивата на единствената изоформа на *fli1*, в чиято последователност е налице G-квартетна последователност. При гена *std* изучавахме относителното ниво на всички 14 мРНКи, въпреки че установихме G-квартетна последователност в две от тях.

За всички избрани гени анализирахме нивата на мРНКи в мозъци от нулеви мутанти по гена *dfmr1* (генотип: *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*) и в такива със свръхекспресия на този ген (генотип: *GAL4-elav.L//UAS-Fmr.Z*), в различни стадии от индивидуалното развитие на *Drosophila*. Като ендогенна контрола използвахме гена глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (*glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, gapdh*), спрямо който нормализирахме експресията на изследваните гени. Всички реакции бяха извършени в две биологични повторения, като всяко повторение съдържаше по две еднакви реплики (виж Материали и методи).

Двете отделни групи изоформи на *dlg1* (с и без G-квартет) амплифицирахме с две отделни двойки праймери. Транскрипционните нива на изоформите на останалите анализирани гени бяха изследвани с отделна двойка праймери за всеки от тях.

Резултатите, получени от тези експерименти, са представени на фиг.8 и фиг.9.

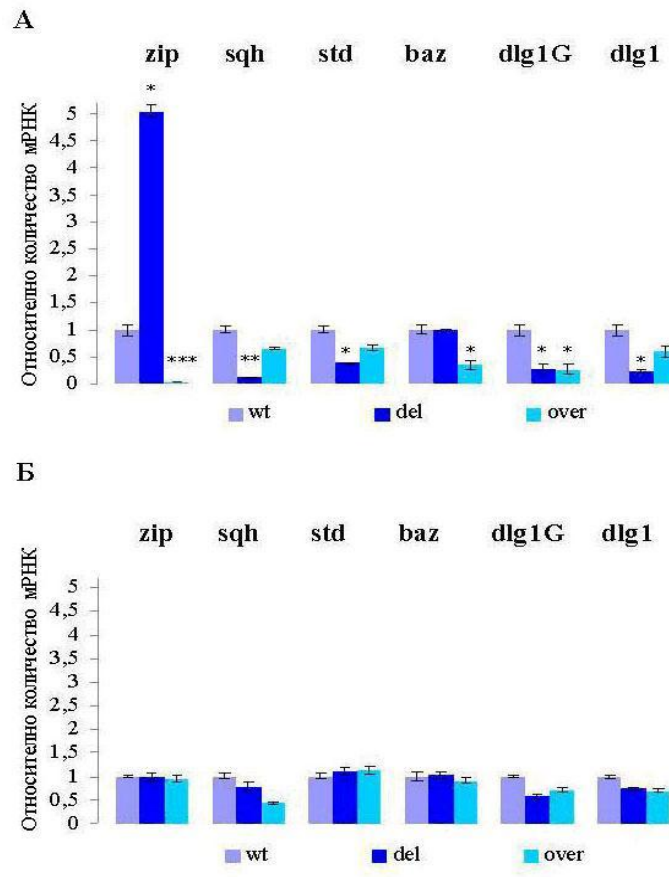


Фиг. 8. Относителни нива на експресия на гените *ena*, *capt*, *cib*, *cpa* и *flil* в див тип (wt), в нулеви мутанти по гена *dfmr1* (del) и в мутанти със свръхекспресия на *dfmr1* (over) в различни стадии на развитието: А/ в мозъци от ларви; Б/ в мозъци от какавиди.

wt-*w[1118]*; **del-***Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*; **over-***GAL4-elav.L//UAS-Fmr.Z*

Стойностите за относително количество на мРНК са средно аритметичното ± SEM, **p*<0,05;

** *p*<0,01; ****p*<0,0001; *n*=4



Фиг. 9. Относителни нива на експресия на гените *zip*, *sqh*, *std*, *baz* и *dlg1* в див тип (wt), в нулеви мутанти по гена *dfmr1* (del) и в мутанти със свръхекспресия на *dfmr1* (over) в различни стадии на развитието: А/ в мозъци от ларви; Б/ в мозъци от какавиди.

wt-*w[1118]*; **del-***Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*; **over-***GAL4-elav.L//UAS-Fmr.Z*

Стойностите за относително количество на мРНК са средно аритметичното ± SEM, **p*<0,05;

p*<0,01; *p*<0,0001; *n*=4

Както се вижда от фиг.9, А, в изоформите на *dlg1*, които притежават G-квартетна последователност, както и в тези без такава последователност, се наблюдава силно намаление в относителните нива на мРНКи в мозъка на ларви при липса на dFMRP (генотип: *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*). Този резултат може да свидетелства за позитивен контрол на dFMRP на експресията на *dlg1* на транскрипционно ниво, за който най-вероятно присъствието на G-квартет не е задължително. Силно намаление в относителните количества на мРНКи на *dlg1*, обаче, наблюдавахме и при свръхекспресия на dFMRP при изоформи с наличие на G-квартетна последователност. Въз основа на тези данни може да се предположи, че за експресията на гена *dlg1* на транскрипционно ниво е необходимо нормално количество на белтъка dFMRP и всяка промяна в това количество, очевидно, е критична и води до намаляване нивото на *dlg1*- транскриптите.

В нашите експерименти върху мозъци от стадий ларва ние установихме позитивен контрол на dFMRP върху експресията на гените *ena*, *cib*, *cra*, *sqh*, които не притежават в своите транскрипти G-квартетна последователност, и за гена *std* с наличие на такава последователност (фиг.8, А и фиг.9, А).

Гените *ena* и *cra* показват намаление в относителното количество на техните мРНКи и при свръхекспресия на dFMRP в ларвните мозъци. Тяхната експресия, изглежда, че се контролира от dFMRP по начин, сходен с този, който предположихме за гена *dlg1*.

При гена *zip*, обратно, наблюдавахме негативен контрол на dFMRP върху относителното ниво на неговите транскрипти. В ларвни мозъци, в които dFMRP липсва, нивото на тези транскрипти е петкратно повишено, а при свръхекспресията му относителното ниво на *zip*-транскриптите е силно понижено (фиг.9, А). Тъй като този ген участва в динамиката на актиновите елементи, които са важна част в аксонното нарастване (Sanchez-Soriano et al., 2007), а dFMRP е необходим за неврогенезата, очевидно е, че експресията на *zip* е под строг контрол (негативен). Промените в белтъчното ниво на dFMRP оказват драматичен ефект върху нивото на транскриптите на този ген.

Интересно е, че при *fli1* и *baz* се наблюдава особен контрол на нивото на мРНКи от dFMRP – в ларвни мозъци, в които липсва dFMRP, нивото на техните транскрипти не се различава от това в мозъците от див тип. При повишена експресия на dFMRP, обаче, тези гени показват силно намаление на нивата на техните транскрипти (Фиг.8, А; фиг.9, А).

Единствено при гена *capt* не установихме промяна в транскрипционното ниво, както при отсъствие на dFMRP, така и при неговата свръхекспресия в ларвния мозък на *Drosophila* (фиг. 8, А).

Нашите резултати от експериментите по количествен RT-PCR на стадий каквида са коренно различни от тези за стадий ларва. Нито един от анализираниите гени не показва промяна в относителните нива на транскриптите си при липса или при свръхекспресия на dFMRP в мозъчната тъкан (фиг.8, Б и фиг.9, Б).

Въз основа на двете групи данни може да се предположи, 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 какавидния стадий това количество не е съществено за развитието на нервните клетки в мозъка.

Доколкото ни е известно от литературата, това са първите данни, които показват, че цяла група невронни гени се контролират от dFMRP чрез техните транскрипти.

5. Изучаване нивата на изоформи на гените *capulet* и *discs large 1*, получени в резултат на алтернативен сплайсинг. Роля на dFMRP в техния контрол

Функционирането на FMRP в посттранскрипционната експресия на мРНКи все още не е изяснена. Не много отдавна Didiot и сътрудници откриха, че FMRP се свързва със собствената си мРНК чрез G-квартетна последователност (Didiot et al., 2008). Тази последователност действа като екзонен ехансер, т.е. оказва влияние върху алтернативния му сплайсинг по механизма на обратната връзка (Didiot et al., 2008). Сходна роля на G-квартета също беше показана и при белтъка FXRP2 (Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2), който се кодира от автосомния ген – *FXR2*. Този белтък е тясно свързан с FMRP и участва в регулацията на транскрипцията и алтернативния сплайсинг (Melko and Bardoni, 2010).

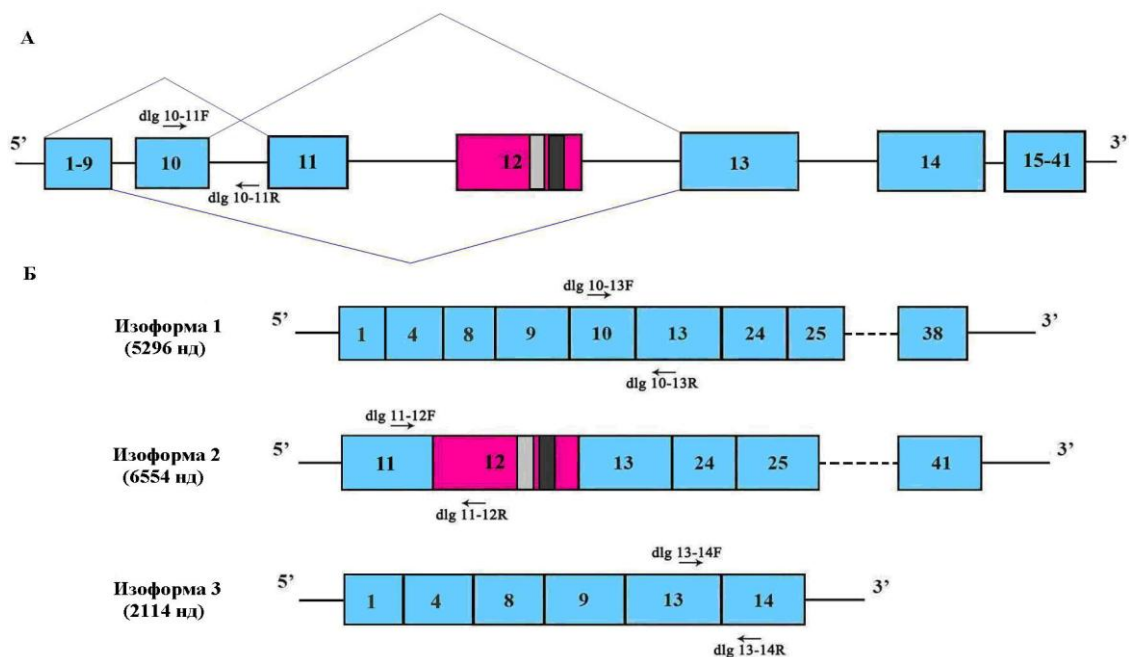
В нашето изследване ние се интересувахме от това дали dFMRP също контролира алтернативния сплайсинг на други невронни мРНК, които имат G-квартетна секвенция като потенциално свързващо място с dFMRP, и допълнителни екзонни или интронни секвенции, регулиращи сплайсинга. Тези допълнителните регулаторни секвенции биват: ехансерни секвенции - ESE (exonic splicing enhancer, екзонен ехансер на сплайсинга) и ISE (intronic splicing enhancer, интронен ехансер на сплайсинга) и супресорни секвенции - ESS (exonic splicing suppressor, екзонен супресор на сплайсинга) и ISS (intronic splicing suppressor, интронен супресор на сплайсинга). Тези секвенции са критични за правилното определяне на местата за сплайсинг в пре-мРНК (Wang et al., 2006).

За да изследваме вероятната роля на dFMRP в алтернативния сплайсинг на невронни мРНКи с G-квартетни последователности и допълнителни екзонни или интронни секвенции, регулиращи сплайсинга, ние извършихме изследване на относителното количество на мРНК-изоформи, получени в резултат на алтернативен сплайсинг, на различни стадии от развитието на *Drosophila*. Избрахме два гена – *capulet (capt)* и *discs large 1 (dlg1)*, в които установихме G-квартетна последователност.

Преди да преминем към тези изследвания ние търсихме в близост до намерената G-квартетна последователност наличие на ESE с потенциална роля в алтернативния сплайсинг на съответния екзон.

Чрез бионформатичен анализ ние намерихме в екзон 12 на *dlg1* (с G-квартетна последователност) известна от литературата ESE-секвенция – GGAAAC (Brooks et al., 2011), разположена в близост до 3' края на този екзон. В екзон 3 на *capt* (с G-квартетна последователност) установихме две публикувани преди това ESE-секвенции - GGAA и TGTGGA (Brooks et al., 2011), разположени в средата на ексона.

За да проверим вероятното участие на dFMRP в контрола на относителното количество на мРНК-изоформите на гените *cap1* и *dlg1*, получени в резултат на алтернативен сплайсинг, ние проведохме qRT-PCR. Изследваните изоформи на двата гена са представени на фиг.10 и фиг.11.



Фиг. 10. Изоформи на гена *dlg1*, получени в резултат от алтернативен сплайсинг. А/ пре-мРНК на гена *dlg1*; Б/ изоформи на гена *dlg1*.

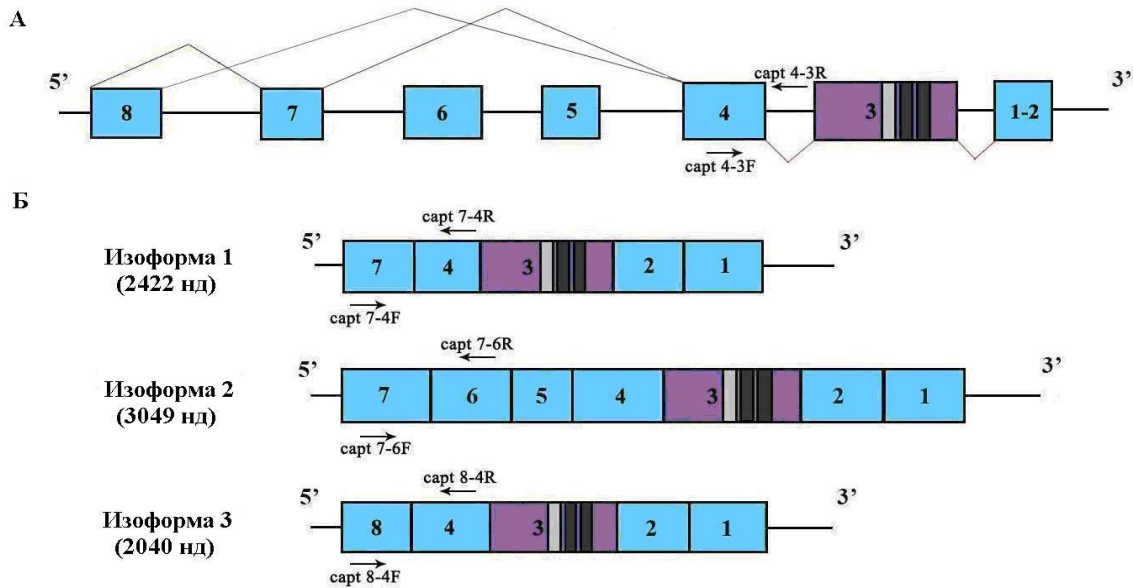
5' и 3' означават 5'- и 3'- UTR (untranslated region, нетранслируем край) на / пре-мРНК на гена *dlg1* на изоформите на гена *dlg1*. Сините триъгълници изобразяват сплайсинга на обозначената екзонна касета. G-квартетът в екзон 12 е представен със сив правоъгълник, а ESE-секвенцията - с черен. Със стрелки са показани позициите на двойките праймери, използвани за амплификация на съответния зрял транскрипт или на пре-мРНК.

При гена *dlg1* G-квартетната секвенция и близко разположената ESE-секвенция са локализираны в 3'-края на екзон 12, близо до мястото за сплайсинг. Както е показано на фиг.10, при изрязването на екзони 11 и 12 се получава изоформа, означена на фигурата като изоформа 1 или *dlg 10-13*. Изоформа 2 (*dlg 11-12*) се получава в резултат на изрязването на екзонната касета 1-10, а изоформа 3 (или *dlg 13-14*) – при изрязването на екзони 10, 11 и 12. На тази фигура е показана и незрялата мРНК на *dlg1*.

Най-често срещаният вид алтернативен сплайсинг (АС) в гените на еукариотните организми е множественото изрязване на екзони (exon skipping), при което един или повече

екзони, наречени екзонна касета, се изрязват от транскриптите заедно със заобикалящите ги интрони (Keren et al., 2010). Такива екзони са описани като алтернативни.

Съседни екзони от незрелите мРНК, които се запазват в две или повече мРНК-изоформи, са описани като конститутивни и сплайсингът на заобикалящите ги интрони се означава като конститутивен (КС).

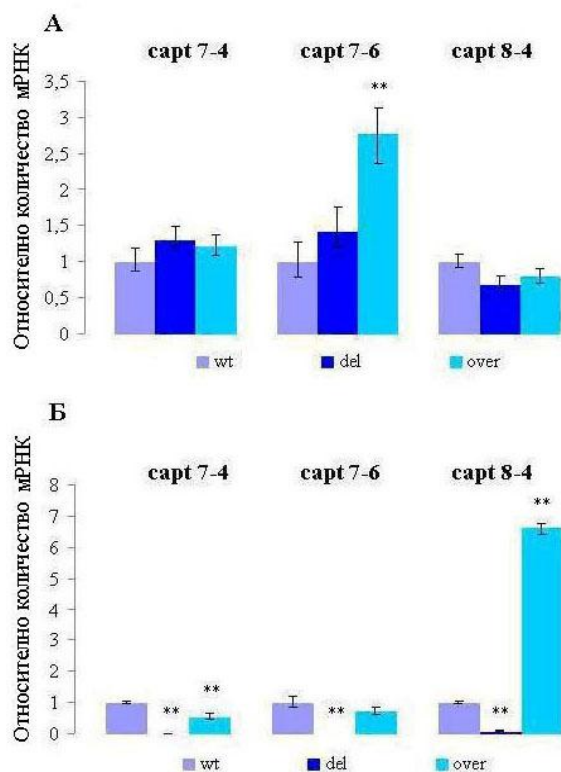


Фиг. 11. Изоформи на гена *capt*, получени в резултат от алтернативен сплайсинг. А/ пре-мРНК на *capt*; Б/ изоформи на *capt*.

5' и 3' означават 5'- и 3'- UTR (*untranslated region, нетранслируем район*) на пре-мРНК на *capt* и на неговите изоформи. Сините триъгълници изобразяват алтернативния сплайсинг на обозначената екзонна касета, а червените триъгълници – конститутивния сплайсинг на интроните между екзони 4-3; 3-2. G-квартетът в екзон 3 е представен като сив правоъгълник, а ESE-секвенциите - с черни правоъгълници. Със стрелки са показани позициите на двойките праймери, използвани за амплификация на съответния зрял транскрипт или пре-мРНК.

Трите изоформи на гена *capt* съдържат екзон 3 с G-квартетна последователност и две ESE-секвенции, които обаче са далеч от екзон/интронните граници. В ляво от екзон 4 има район, в който се извършва алтернативен сплайсинг на една екзонна касета, така че в зрялата мРНК или се изключват два екзона – 6 и 5 (изоформа 1) или три екзона – 7, 6 и 5 (изоформа 3). Когато се изрежат само интроните между екзоните 7-6; 6-5 и 5-4, се получава най-дългата изоформа 2, съдържаща всички екзони от 7 до 1 (фиг.11).

Резултатите от нашите експерименти с qRT-PCR за изоформите на гена *capt* в мозъци от ларви и какавиди от линии с различна експресия на dFMRP са представени на фиг.12.



Фиг. 12. Относителни нива на експресия на изоформите на *capt* в див тип (wt), в нулеви мутанти по гена *dfmr1* (del) и в мутанти със свръхекспресия на *dfmr1* (over) в различни стадии на развитието: А/ в мозъци от ларви; Б/ в мозъци от какавиди.

wt-w[1118]; del-*Fmr1*^{A113M}//*Fmr1*^{A113M}; over-*GAL4-elav.L*//*UAS-Fmr.Z*

Стойностите за относително количество на мРНК са средно аритметичното \pm SEM, * $p < 0,05$;

** $p < 0,01$; $n=4$

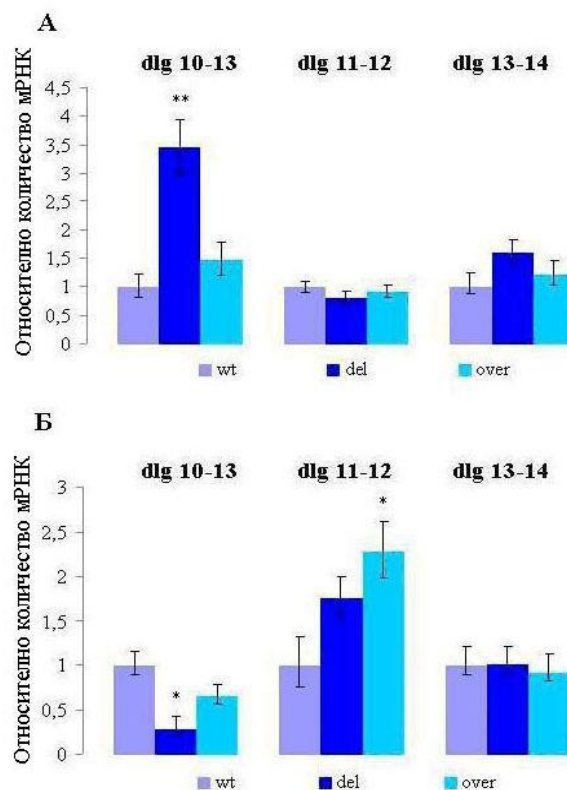
Получените резултати в ларвни мозъци не показват връзка между количеството на белтъка dFMRP и алтернативния сплайсинг в изследвания район на гена *capt*.

В какавиди ние установихме драстично намаление на относителното ниво и на трите изоформи на *capt* в мозъци от нулеви мутанти по *dfmr1*. В мозъци на какавиди, свръхекспресиращи dFMRP, едната изоформа – *capt* 8-4 показва седемкратно увеличение на относително количество (** $p < 0,01$, $n=4$), другата – *capt* 7-4 показва двукратно намаление (** $p < 0,01$, $n=4$), а изоформата *capt* 7-6, която се получава при изрязването на интроните между екзоните 7, 6, 5, 4 и 3 (всички са вляво от екзон 3, в който е намерена G-квартетна секвенция), не показва промяна.

Въз основа на тези резултати може да се направи извод, че в мозъка на каквиди dFMRP регулира позитивно експресионните нива на мРНК на *capt*, но най-вероятно, не участва в контрола на алтернативния сплайсинг.

Функционалното значение на различията в ефекта на dFMRP върху относителното ниво на специфични мРНК-изоформи на гена *capt*, получени при алтернативен сплайсинг в зависимост от стадия на индивидуалното развитие на *Drosophila*, засега е неясно. И трите му изоформи, кодират белтъци, съдържащи едни и същи домени, и следователно, изпълняват сходна функция (по: www.flybase.org). Генът *capulet* кодира актин-свързващ белтък, който регулира полимеризацията на актина и като такъв, той е от съществено значение за правилното развитие на невронния цитоскелет и за намирането на пътя на аксона (Wills et al., 2002; Medina et al., 2008).

За да изучим предполагаемата роля на dFMRP в алтернативния сплайсинг на гена *dlg1*, ние проведохме сходни експерименти с метода qRT-PCR. Резултатите от тях са представени на фиг.13.



Фиг. 13. Относителни нива на експресия на изоформите на *dlg1* в див тип (wt), в нулеви мутанти по гена *dfmr1* (del) и в мутанти със свръхекспресия на *dfmr1* (over) в различни стадии на развитието: А/ в мозъци на ларви; Б/ в мозъци на какавиди.

wt-*w[1118]*; del-*Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*; over-*GAL4-elav.L//UAS-Fmr.Z*.

Стойностите за относително количество на мРНК са средно аритметичното ± SEM, **p*<0,05;

** *p*<0,01; *n*=4

Както се вижда от фиг.13, в мозъка на ларва при липса на белтъка dFMRP наблюдаваме значително (трикратно) увеличение на относителното количество на изоформа 1, съдържаща екзони 10 и 13, докато количеството на изоформа 2, притежаваща екзони 11 и 12, остава непроменено. В мозъка на какавида наблюдаваме обратния ефект – количеството на изоформа 1 с екзони 10 и 13 е значително намалено в нулеви мутанти по *dfmr1*. Нивата на изоформа 2 с екзони 11 и 12 и тези на изоформа 3 с екзони 9, 13 и 14 остават непроменени. Когато свръхекспресираме *dfmr1* в мозъчната тъкан от какавиди, относителното количество на втората изоформа значително нараства, докато това на третата изоформа остава непроменено.

Въз основа на тези резултати, които показват увеличено ниво на изоформа 10-13 в нулеви мутанти по *dfmr1* в ларвни мозъци може да се предположи, че честотата на сплайсинга, при който се изрязват екзони 11 и 12 е по-висока, отколкото в дивия тип. Обратно – честотата на изрязването на тази екзонна касета при какавиди от същия генотип е по-ниска, отколкото в дивия тип.

Следователно при гена *dlg1*, алтернативният сплайсинг в районите с G-квартетна секвенция и ESE-секвенция в граничния 3'-екзон/интронен район, усилваща алтернативния сплайсинг, очевидно зависи от нивото на белтъка dFMRP.

Функционалното значение на превключването на генната експресия от една към друга изоформа на *dlg1* при прехода от ларва към какавида засега остава неизяснено. Dlg1 е белтък с няколко различни по функция домени от семейството на гуанилат-киназите. Той изпълнява важна роля в организацията и функционирането на синапсите на мозъчните неврони и на невро-мускулните синапси (Lahey et al., 1994; Budnik et al., 1996).

Изучената от нас изоформа 1 съдържа всички 5 известни домена (L27, PDZ, SH3-DLG-like, GMPK, GUK) на Dlg1, докато изоформа 2 има 4 домена и в нея липсва домен L27 с подчертани синаптични функции (Mendoza et al., 2003). Увеличаването на изоформа 1 в мозъците на ларви – нулеви мутанти по *dfmr1* би могло да обясни техния мутантен синаптичен фенотип, свързан с абнормално увеличение на броя на синаптичните разклонения.

Сравнявайки ефекта на dFMRP върху алтернативния сплайсинг в специфични райони на *dlg1* с този при гена *capt*, ние установихме, че екзонен G-квартет и съседна ESE-секвенция в специфични мРНК-изоформи контролират алтернативния сплайсинг в зависимост от нивото на белтъка dFMRP, само, ако те са локализирани в 5'- или 3'-края на съответния екзон. Ние установихме конкретна ESE секвенция – GGAAAC, разположена

близо до 3'-края на екзон 12 на *dlg1*, която в бъдещи експерименти може да се изследва за директно участие в сплайсинга.

Така ние показваме, че РНК-свързващия белтък dFMRP може да контролира експресията на своите потенциални мишени и на посттранскрипционно ниво, чрез контрол на алтернативния сплайсинг. Тези данни разширяват обхвата на неговия потенциал като белтък, участващ в сплайсинга на собствените си мРНК (Didiot et al., 2008).

б. Изучаване на относителните нива на незрялите мРНКи на гените *capulet (capt)* и *discs large 1 (dlg1)*. Роля на dFMRP в тяхната стабилност

Ние проведохме допълнителни qRT-PCR-експерименти, с които да потвърдим, че промените в транскрипционните нива на изоформи на *dlg1*, получени при алтернативен сплайсинг в генотипове с различна експресия на белтъка dFMRP се дължат на включване/изключване на екзони, а не на различия в тяхната стабилност. От друга страна, тъй като за гена *capt* наблюдавахме намалени нива на всички транскрипти в какавидни мозъци на нулеви мутанти по гена *dfmr1*, ние искахме да проверим евентуална промяна в тяхната стабилност във връзка с намалената експресия на dFMRP.

Преди да преминем към qRT-PCR-експерименти, ние проведохме биоинформатичен анализ за наличие на AU-богата ARE-секвенция в транскриптите на гените, чиито относителни нива бяха изучени. Такава секвенция бе установена в мРНК на мишия ген *psd-95*, участващ в синптичната сигнализация. Беше показано, че именно тя осигурява свързването на FMRP с тази мРНК за осъществяване на диференциален контрол върху нейната стабилност, варираща в различните райони на мишия мозък (Zalfa et al., 2007).

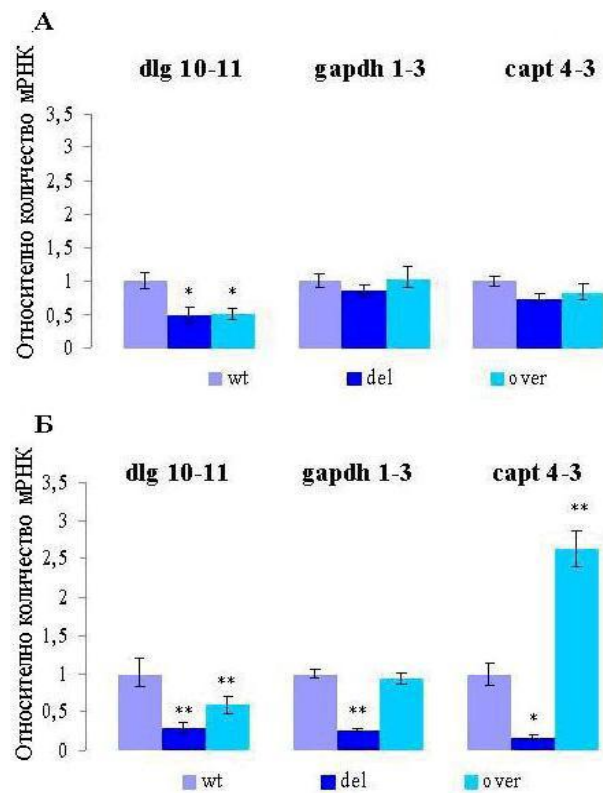
В транскриптите на нито един от анализирания гени, включително и в тези на *dlg1*, не бе открита последователност, хомоложна на специфичната ARE-секвенция, от която зависи скоростта на разграждане на мРНК (Zalfa et al., 2007).

За да извършим експериментите с qRT-PCR ние съставихме следните двойки праймери: *dlg 10-11F* и *dlg 10-11R* (прав и обратен, виж Материали и методи), заграждащи район между екзон 10 и следващия след него интрон. Тази двойка праймери амплифицира участък от незрялата мРНК в избрания район на гена *dlg1*. Тази незряла мРНК е означена като *dlg 10-11* (виж т.5 от Резултати и обсъждане, фиг.10).

Съставихме и двойка праймери *capt 4-3 F* и *capt 4-3 R*, която загражда участък между екзон 4 и следващия след него интрон, който е включен в конститутивен сплайсинг. Тази двойка праймери амплифицира участък от незрялата мРНК на *capt*, означена като *capt 4-3* (фиг.11). Двойката праймери *gapdh 1-3 F* и *gapdh 1-3 R* амплифицира незрялата мРНК на

house-keeping гена – глицералдехид 3 фосфат дехидрогеназа (*gapdh*) (виж Материали и методи), който избрахме като контролен ген.

Резултатите от нашите експерименти са представени на фиг.14.



Фиг. 14. Относително количество на незрелите мРНК на *dlg1*, *capt* и *gapdh* при различно количество на dFMRP: А/ в мозъци от ларви; Б/ в мозъци от какавиди.

wt-*w[1118]*; **del**-*Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*; **over**-*GAL4-elav.L//UAS – Fmr.Z*

Стойностите за относително количество на мРНК са средно аритметичното \pm SEM, * $p < 0,05$;

** $p < 0,01$; $n=4$

В тях ние наблюдавахме намаление в относителното количество на незрялата мРНК на *dlg1* в нервната система на ларва при липса на dFMRP (генотип: *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*). Същият резултат наблюдавахме и при увеличено количество на този белтък (генотип: *GAL4-elav.L//UAS-Fmr.Z*) – фиг.14, А. При това относителното количество на незрялата мРНК на *gapdh* остава непроменено във всички анализирани ларвни генотипове. Непроменено остава също и относителното количество на незрялата мРНК на *capt* във всички ларвни генотипове – без dFMRP или при увеличено количество на този белтък (фиг.14, А).

При липса на dFMRP в нервната система на какавиди, ние установихме значително намаление в количеството на незрелите мРНКи на двата гена *dlg1* и *capt*, но, изненадващо, също и на контролния ген (фиг.14, Б). При свръхекспресия на dFMRP в този стадий на

развитие наблюдавахме намаление в нивото на незрялата мРНК на гена *dlg1* и увеличение на незрялата мРНК на гена *capr*, сравнено с това в дивия тип (фиг.14, Б).

Въз основа на тези и на предишните ни експерименти за относителните нива на зрелите (фиг.12, Б) и незрелите форми (фиг.14, Б.) на *capr* в мозъка на какавиди може да се направи извод, че dFMRP оказва влияние на ниво транскрипти на една от изоформите на този ген (*capr* 8-4). За това свидетелства намаленото количество на незрялата мРНК на *capr* и на зрялата *capr* 8-4 в мозъка на какавиди при липса на dFMRP (генотип: *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*). В същото време, при свръхекспресия на dFMRP (фиг.14, Б) се наблюдава значително увеличение на незрялата мРНК на *capr*, което наблюдавахме и при изоформа *capr* 8-4. Въз основа на тези резултати може да се допусне, че в мозъка на какавиди dFMRP регулира не само транскрипционното ниво на експресия, но, вероятно, и нивото на стабилност на останалите мРНК-изоформи на този ген.

Относно гена *dlg1* ние установихме намаление в относителното количество на незрелите изоформи на *dlg1* в ларвни мозъци от нулеви мутанти по dFMRP (фиг.14, А) и увеличение само в една от зрелите изоформи на *dlg1* (съдържаща екзони 10 и 13, *dlg* 10-13) (фиг.13, А). Въз основа на тези данни може да се направи извод, че dFMRP влияе на относителното ниво на транскриптите на изоформа *dlg* 10-13 (вероятно, и на други неизследвани изоформи), контролирайки нейната стабилност/сплайсинг.

В заключение можем да обобщим, 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 алтернативен сплайсинг, локализиран в близост до екзонен G-квартет и ESE-секвенции.

7. Роля на dFMRP в транслационния контрол на изоформи на *dlg1*

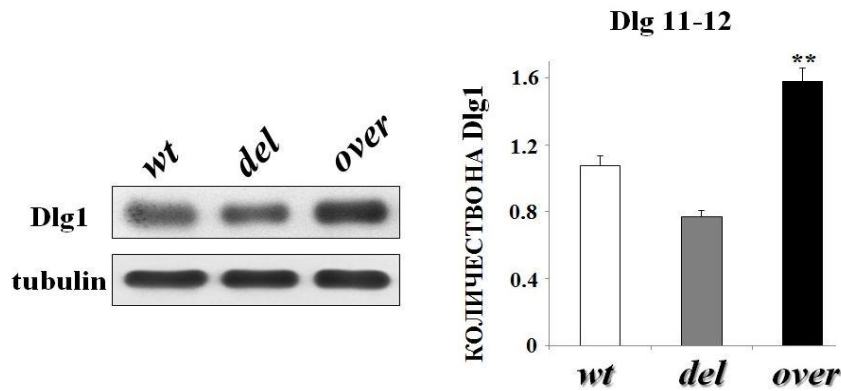
За да проверим вероятния ефект на dFMRP върху транслационния етап от експресията на някои гени, за които намерихме взаимодействия с *dfmr1*, проведохме експерименти по Western blot-анализ.

Анализирахме белтъчните нива на някои от изоформите на гена *dlg1*, за които разполагахме със специфично моноклонално антитяло анти-Discs large 4F3 (Developmental Studies Hybridoma Bank, USA). Антитялото е изработено срещу PDZ-домена на дрозофилния белтък, който присъства във всички негови изоформи с изключение на нискомолекулните (с молекулно тегло около 24 кДа).

Белтъчният лизат, използван в тези експерименти, е получен от мозъци на какавиди с различен генотип – див тип, нулеви мутанти по гена *dfmr1* (генотип: *Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}*) и

мутанти, в които *dfmr1* е свръхекспресиран (генотип: *GAL4-elav.L/UAS-Fmr.Z*) (виж Материали и методи, т.3.2).

Резултатите от проведения Western blot-анализ са представени на фигурите по-долу (фиг.15, фиг.16).

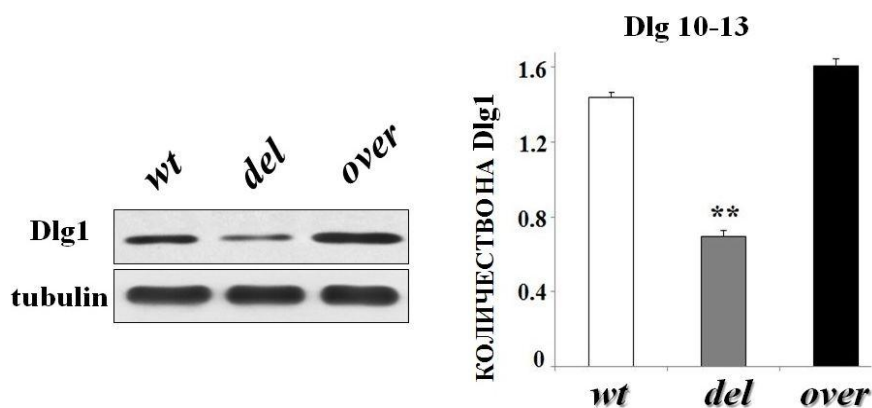


Фиг. 15. Western blot анализ на изоформа на Dlg1 с молекулна маса 100.5кДа *wt-w[1118]*; *del-Fmr1^{Δ113M}/Fmr1^{Δ113M}*; *over-GAL4-elav.L/UAS – Fmr.Z*.

Стойностите за количеството на Dlg1 са средно аритметичното \pm SEM, ** $p < 0,01$; $n=4$

Както се вижда от фиг.15, количеството на изоформата на Dlg1 с молекулна маса 100.5 кДа в генотипове със свръхекспресия на *dfmr1* е повишено в сравнение с това при дивия тип (** $p < 0,01$, $n = 4$). В нулеви мутанти по *dfmr1* нейното ниво не се различава значително от това при дивия тип. Изчисленията на молекулната маса на тази белтъчна изоформа показват, че тя трябва да се кодира от изоформа *dlg 11-12* с дължина 6654 нд (виж Резултати и обсъждане, т.5).

Изоформата на Dlg1, чиято молекулна маса е около 106 kDa, показва различен резултат (фиг.16). В мозъци от какавиди - нулеви мутанти по *dfmr1* нивото на белтъка е намалено – около 2 пъти, в сравнение с това при дивия тип (** $p < 0,01$, $n = 4$). При свръхекспресия на *dfmr1* в мозъчните неврони на какавиди не се наблюдава промяна в експресията на тази белтъчна изоформа в сравнение с дивия тип. Въз основа на изчисленията, описани по-горе, определихме, че тя се кодира от изоформата на *dlg1*, означена като *dlg 10-13* (виж Резултати и обсъждане, т.5).



Фиг. 16. Western blot анализ на изоформа на Dlg1 с молекулна маса 106,7 kDa **wt-w[1118]; del-Fmr1^{Δ113M}//Fmr1^{Δ113M}; over-GAL4-elav.L//UAS – Fmr.Z.** Стойностите за количеството на Dlg1 са средно аритметичното ± SEM, ** $p < 0,01$; $n=4$

Сравнявайки резултатите от Western blot анализа (фиг.15 и фиг.16) и тези, получени в експериментите qRT-PCR (фиг.13, Б), можем да видим, че белтъчните нива на изоформи dlG 11-12 и dlG 10-13 в мозъци какавиди от различни генотипове корелират с тези на кодиращите ги мРНКи. От представените данни следва, че транслационният етап на генна експресия не променя изходните съотношения в транскрипционните им нива, т.е., че критичното ниво на контрол на експресия за тези изоформи е преди транслацията.

Останалите белтъчни изоформи на Dlg1, които можеха да се разделят чрез полиакрил-амидната гелна електрофореза, не показаха различия в тяхното експресионно ниво и не са представени с електрофореграма.

Анализ на белтъците, кодирани от останалите гени, чиито транскрипционни нива бяха изследвани чрез qRT-PCR, не беше извършен, тъй като не разполагахме с подходящи специфични антитела. Поради това не е изучена ролята на dFMRP в транслационното ниво на контрол на тяхната експресия.

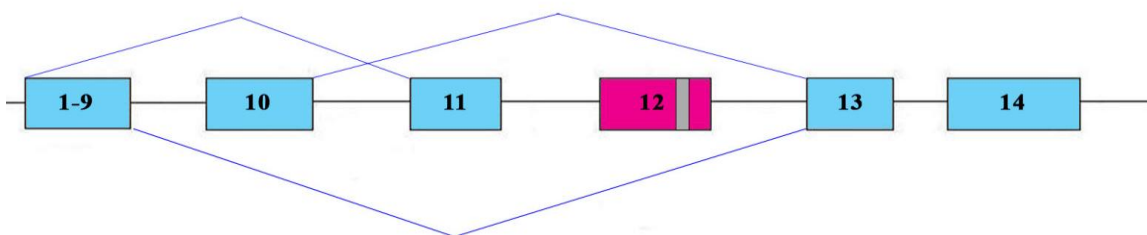
8.Търсене на известни допълнителни регулаторни елементи на сплайсинга

Сплайсингът на незрелите мРНКи заема важно място в регулацията на генната експресия. Точното изрязване на интроните и заобикалящите ги екзони е съществено за правилната белтъчна синтеза. Поради това сплайсингът изисква консервативни сигнали, разположени в 5'- и 3'- краищата на екзоните и интроните. Те са AG и GU съответно в 5'- и 3'- краищата на екзона; GUA/GAGU в 5' края на интрона, CUA/GACU (секвенция за мястото на раклоняване), следвана от полипиримидинов тракт с различна дължина и AG в 3'- края на интрона (виж също Литературен обзор). Класифицират местата за сплайсинг като “силни” и “слаби”, в зависимост от степента им на сходство с консервативните

секвенции. Освен тях, в сплайсинга участват и допълнителни екзонни (ESE, ESS) и интронни (ISE, ISS) елементи.

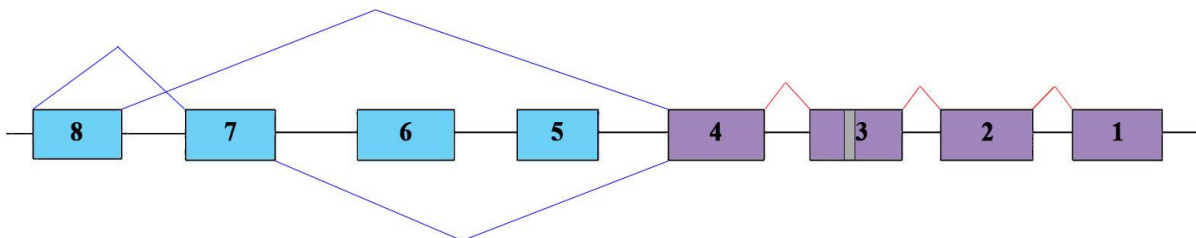
Ние анализирахме геномните секвенции на *dlg1* и *capt* за присъствие на известни от литературата допълнителни елементи за регулиране на алтернативния сплайсинг в *Drosophila* (Labourier et al. 1999; Wang et al., 2006; Qi et al., 2007; Brooks et al., 2011).

Търсехме елементи, разположени в близост до 5'- и 3'-екзонните и интронните граници (50 нд вляво/вдясно от 3'-/5'-екзонното място за сплайсинг, 50 нд вляво от мястото за разклоняване и 50 нд вдясно от 5'-интронното място за сплайсинг, Churbanov et al., 2009). За нас бяха важни районите, в които се осъществява алтернативен сплайсинг и които са разположени близо до намерения G-квартет като потенциално свързващо място на dFMRP в мРНКи на *dlg1* и *capt*. Същите елементи търсехме и в районите, в които се извършва конститутивен сплайсинг (ако той съществува, напр., в гена *capt*). Така избраните райони за двата гена са представени на фиг.17 и фиг.18.



Фиг. 17. Райони на геномната секвенция на *dlg1* с алтернативен сплайсинг и G-квартетна секвенция.

Сините триъгълници представят алтернативния сплайсинг на изобразените екзонни касети. Сивият правоъгълник в екзон 12 представя G-квартетната секвенция. Алтернативно изрязваните екзони в избрания район са: 11 и 12 (оставащи екзони 10 и 13); 1-10 (оставащи екзони 11, 12 и 13); 10,11 и 12 (оставащи екзони 13 и 14).



Фиг. 18. Райони на геномната секвенция на *capt* с алтернативен сплайсинг и G-квартетна секвенция и райони с конститутивен сплайсинг.

Сините триъгълници представят алтернативния сплайсинг на изображените екзонни касети. Сивият правоъгълник в екзон 3 представя G-квартетната секвенция. Алтернативно изрязваните екзони в избрания район са: 7, 6 и 5 (оставащ екзон 8); 8, 6 и 5 (оставащ екзон 7); 8 (оставащи екзони 7, 6 и 5). Червените триъгълници представят конститутивния сплайсинг. Конститутивните екзони са: 4, 3, 2 и 1.

Секвенциите на всички изоформи на гените *dlg1* и *capt* проверихме за наличие на 37 известни допълнителни регулиращи сплайсинга елементи. Техният пълен списък е представен в табл.2 от Материали и методи. 12 от тях присъстват и в анализирания район на двата гена: 7 ESE секвенции, 3 ESS секвенции и 2 ISE секвенции. Разпределението на трите типа секвенции в районите на алтернативен (АС) и конститутивен сплайсинг (КС) за тези гени е представено в таблица 4. Не намерихме ISS-елемент в 5'- и 3'-границите на гените *dlg1* и *capt*.

Таблица 4. Разпределение на допълнителни регулаторни елементи на сплайсинга в райони с АС и КС в незрелите мРНКи на *dlg1* и *capt* и с установена G-квартетна секвенция.

Регулаторни елементи на сплайсинга	Честота в екзоните на <i>dlg1</i> в райони с АС	Честота в алтернативно изрязани интрони на <i>dlg1</i> (АС)	Честота в екзоните на <i>capt</i> в райони с КС	Честота в конститутивно изрязани интрони на <i>capt</i> (КС)	Честота в екзоните на <i>capt</i> в райони с АС	Честота в конститутивно изрязани интрони на <i>capt</i> (АС)
ESE (A[AGC]CA[AGC]C)	3	0	0	0	4	0
ESE (GGAA)	3	0	1	0	2	0
ESE (CGCA)	6	0	2	0	1	0
ESE (AATGGA)	1	0	0	0	0	0
ESE (CTGGAG)	0	0	0	0	1	0
ESE (ATGCGG)	0	0	1	0	1	0
ESE (TGTGGA)	0	0	0	0	1	0
ESS (TAGT)	1	0	0	0	0	0
ESS (TGGG)	1	0	0	0	1	0
ESS (GGTT)	1	0	0	0	3	0
ISE (TAAT)	0	3	0	0	0	1
ISE (T[TC]TC)	0	1	0	0	0	4

Както се вижда от таблица 7, ESE секвенциите са най-често срещаните регулаторни елементи, установени в близост до местата за сплайсинг на *dlg1* и *capt*. Те са намерени 23

пъти в анализирания екзон. Повечето от тях са характерни и за двата гена, но 3 ESE – CTGGAG, ATGCCG и TGTGGA са специфични само за екзоните на *capt*. Друга ESE секвенция – AATGGA е специфична само за *dlg1* и е намерена в един екзон, включен в AC.

ESE секвенцията A[AGC]CA[AGC]C показва висока специфичност за екзони, участващи в AC и при двата гена. За други ESE – CTGGAG и TGTGGA установихме също участие само в AC, но в екзоните само на *dlg1* или на *capt*. Въз основа на това разпределение, може да се предположи, че тези регулаторни елементи са специфични за райони на алтернативен сплайсинг. Други ESE (GGAA, CGCA) са установени в различни екзони, участващи както в AC, така и в KC.

ESS елементите, които установихме в нашето изследване, са по-рядко срещани и са представени 7 пъти в близост до местата за сплайсинг на *dlg1* и *capt*. Едно от тях е характерно за екзон на *dlg1*, участващ в AC. Останалите две ESS секвенции са намерени в екзони, включени в AC и при двата гена. Такива регулаторни елементи не бяха установени в конститутивни екзони, общи за трите изоформи на *capt* (екзони 4, 3, 2 и 1). От тези данни може да се предположи, че намерените от нас ESS елементи TAGT, TGGG и GGTT са специфични в потискането на AC в гените *dlg1* и *capt*.

От всички 7 изследвани от други автори ISE ние намерихме само две такива секвенции - TAAT и T[TC]TC. Установихме ги в интрони и на двата гена *dlg1* и *capt*, изрязвани заедно с разположените до тях екзони. Освен това, тези ISE не са установени в интрони на *capt*, които участват в KC. Това показва, че те са специфични за интрони, участващи в алтернативен сплайсинг.

9. Компютърно предсказани допълнителни регулаторни елементи на сплайсинга

За да обогатим 5'- и 3'- екзонните и интронните граници на *dlg1* и *capt* с допълнителни елементи, контролиращи сплайсинга, ние проведохме компютърен анализ за наличие на хексануклеотидни секвенции (хексамери), чиято честота на срещане е статистически достоверно по-висока в екзонните/интронните граници на изследваните гени *dlg1* и *capt* (виж Материали и методи, т.5.3).

Ние предсказахме 30 такива корови консенсусни, макар и дегенерирани хексануклеотидни секвенции, локализиращи в екзонните/интронните краища на двата гена. Ние сравнихме тези потенциални регулаторни елементи с известните от литературата допълнителни регулаторни елементи на сплайсинга, описани в предишната точка и установихме, че те са нови и не са съобщавани досега в литературата. Тъй като не сме изследвали експериментално тяхната функция в сплайсинга, те не могат да бъдат

определени като енхансери/супресори на сплайсинга. Честотата и разпределението на всички получени от нас хексануклеотидни секвенции са представени в следващата таблица (табл. 5).

Таблица 5. Разпределение на компютърно предсказани дрозифилни регулаторни елементи на сплайсинга в райони с АС и КС в незрелите мРНКи на гените *dlg1* и *capt* и с установена G-квартетна секвенция.

Компютърно предсказани регулаторни елементи, участващи в сплайсинга	Честота в екзоните на <i>dlg1</i> в райони с АС	Честота в алтернативно изрязани интрони на <i>dlg1</i> (АС)	Честота в екзоните на <i>capt</i> в райони с КС	Честота в конститутивно изрязани интрони на <i>capt</i> (КС)	Честота в екзоните на <i>capt</i> в райони с АС	Честота в конститутивно изрязани интрони на <i>capt</i> (АС)
e-ACATAC	2	0	0	0	0	0
e-ACGCAC	2	0	0	0	0	0
e-CTGCTG	1	0	0	0	0	0
e-AAGTGA	1	0	0	0	0	0
e-GAGTGA	1	0	0	0	0	0
e-AATTGA	1	0	0	0	0	0
и-AACGAT	0	2	0	0	0	0
и-ATCGAA	0	1	0	0	0	0
и-CCAAAC	0	1	0	0	0	0
и-CGCACA	0	1	0	0	0	0
и-GCCACC	0	1	0	0	0	0
e-GCGGCG	0	0	2	0	0	0
e-AAGCCA	0	0	1	0	0	0
e-CTTGAA	0	0	2	0	0	0
e-ATAAAA	0	0	2	0	0	0
e-ATAAGA	0	0	1	0	0	0
и-GAGTCA	0	0	0	2	0	0
и-CCGCAG	0	0	0	1	0	0
и-CCGCAA	0	0	0	1	0	0
e-GGATTA	0	0	0	0	2	0
e-AGCAAA	0	0	0	0	2	0
e-AACCAA	0	0	0	0	1	0
e-CAAAGA	0	0	0	0	1	0
e-CTTGAC	0	0	0	0	2	0
e-CAAATT	0	0	0	0	2	0
и-GTGAAG	0	0	0	0	0	2
и-CTAGCG	0	0	0	0	0	1
и-CCCACC	0	0	0	0	0	1
и-CCCATC	0	0	0	0	0	1

e – означава екзонна секвенция; *и* – означава интронна секвенция

Табл. 5 показва, че екзонните елементи са представени по-често – общо 26 пъти, докато интронните са с по-ниска честота – 15 пъти. Можем да разделим всички елементи в 6 различни специфични групи: I-екзони на *dlg1*, участващи в АС; II-интрони на *dlg1*, изрязвани заедно със съседните до тях екзони; III- конститутивни екзони на *cap1*; IV-интрони на *cap1*, изрязвани конститутивно; V-екзони на *cap1*, участващи в АС; VI-интрони на *cap1*, изрязвани заедно със съседните до тях екзони.

За установяване на функционалното значение на откритите от нас допълнителни секвенции, контролиращи сплайсинга *in vivo*, са необходими допълнителни експерименти.

Установените екзонни и интронни секвенции са не само ген-специфични, но и специфични за различния вид сплайсинг. Те са различни за АС и за КС (отнася се за гена *cap1*).

Нашите данни за участието на белтъка dFMRP показват, че този РНК-свързващ белтък е важен регулатор и превключвател на пост-транскрипционната експресия на ключови мРНК-изоформи в невронното развитие в различни стадии на онтогенезата, осъществявана на ниво алтернативен сплайсинг. Те са важни не само от теоретична гледна точка, но и в контекста на клиничната практика. Установено е, че редица наследствени болести при човека са свързани с мутации, които водят до абнормален сплайсинг и от там – до цяла съвкупност от аномалии. Възможно е някои от симптомите на синдрома FraX да се дължат именно на подобен ефект на нарушен сплайсинг на ключови гени в мозъка заради липса на белтъка FMRP.

Резултатите от нашите изследвания отварят врати за допълнителни експерименти, които да потвърдят хипотезите ни за молекулярните механизми, чрез които dFMRP контролира невронното развитие: едновременен контрол на набора от негови гени-интерактори, участващи в развитието на мозъчни неврони на ниво транскрипция; участие в контрола на сплайсинга на тези гени.

Валидирането на функционалното значение на компютърно предсказаните случайни хексамерни последователности с потенциална роля с сплайсинга на анализирания гени също е предстояща експериментална задача.

ИЗВОДИ

В резултат от нашите изследвания могат да се направят следните **изводи**:

1. Установени са генетични взаимодействия на *dfmr1* с голям брой гени (20 на брой), участващи в развитието на нервната система при *Drosophila melanogaster*.
2. Намерени са dFMRP-специфични G-квартетни последователности в част от транскриптите на анализирания гени.
3. Чрез qRT-PCR анализ е установено, че dFMRP оказва позитивен контрол върху относителното ниво на транскриптите на гените *ena*, *cib*, *cpa*, *sqh*, *std*, *dlg1* и негативен контрол – на гена *zip*.
4. Установено е, че нивата на белтъчна експресия на изоформи *dlg 11-12* и *dlg 10-13* корелират с тези на кодиращите ги мРНК.
5. Установено е, че dFMRP контролира посттранскрипционното ниво на експресия (сплайсинг/стабилност) на изоформи на гена *dlg1* при наличие едновременно на G-квартетна и ESE секвенции в район с протичащ алтернативен сплайсинг.
6. В гените *dlg1* и *capt* са намерени 12 известни от литературата допълнителни елементи, регулиращи алтернативния сплайсинг.
7. Чрез изчислителни методи са намерени нови случайни хексамерни секвенции със статистически достоверно увеличена честота в екзон/интронните краища на гените *dlg1* и *capt* с предполагаема роля в сплайсинга.

ПРИНОСИ

1. Установени са *нови* генетични интерактори на dFMRP в криловата имагинална тъкан и в аксонното развитие на мозъчни неврони.
2. *За пръв път* в литературата е показан позитивен контрол от dFMRP върху експресията на част от тези интерактори на ниво транскрипти.
3. Установени са *нови* хексануклеотидни секвенции в граничните екзонни/интронни райони на гените *dlg1* и *cap1* с потенциална роля в сплайсинга.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Antar L.N., Afroz R., Dichtenberg J.B., Carroll R.C., Bassell G.J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci.* 24:2648–2655.
2. Bilder D., Li M., Perrimon N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science.* 289, 113–116.
3. Bilder D., Perrimon N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature.* 403, 676–680.
4. Brand A.H., Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118 (2):401-415.
5. Brooks A.N., Aspden J.L., Podgoraia A.I., Rio D.C., Brenner S.E. (2011). Identification and experimental validation of splicing regulatory elements in *Drosophila melanogaster* reveals functionally conserved splicing enhancers in metazoans. *RNA.* 17: 1884-1894.
6. Budnik V., Koh Y. H., Guan B., Haugh C., Woods D., Gorczyca M. (1996). Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*. *Neuron.* 17:627–640.
7. Churbanov A., Vořechovský I., Hicks C. (2009). Computational prediction of splicing regulatory elements shared by *Tetrapoda* organisms. *BMC Genomics.* 10:508.
8. Clyne P.J., Brotman J.S., Sweeney S.T., Davis G. (2003). Green fluorescent protein Tagging *Drosophila* proteins at their native genomic loci with small P-elements. *Genetics.* 165(3):1433-41.
9. Darnell J.C., Jensen K.B., Jin P., Brown V., Warren S.T., and Darnell R.B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell.* 107:489-499.
10. Davidovic L., Bechara E., Gravel M., Jaglin X.H., Tremblay S., Sik A., et al. (2006). The nuclear microspherule protein 58 is a novel RNA-binding protein that interacts with fragile X mental retardation protein in polyribosomal mRNPs from neurons. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1525–1538.
11. de Celis J.F., de Celis J., Ligoxygakis P., Preiss A., Delidakis C., Bray S. (1996). Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development.* 122(9):2719-28.
12. De Rubeis S., Bagni C. (2011). Regulation of molecular pathways in the Fragile X Syndrome: insights into Autism Spectrum Disorders. *J Neurodevelop Disord.*, 3:257.
13. Derlig K., Gießl A., Brandstätter J. H., Enz R., Dahlhaus R. (2013). Identification and Characterisation of Simiate, a Novel Protein Linked to the Fragile X Syndrome. *PLoS ONE.* 8(12): e83007.
14. Dichtenberg J.B., Swanger S.A., Antar L. N., Singer R.H., and Bassell G. J. (2008). A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev. Cell* 14, 926–939.
15. Didiot M.C., Tian Z., Schaeffer C., Subramanian M., Mandel J.L., and Moine H. (2008). The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *NucleicAcidsRes.* 36, 4902–4912.
16. Eberhart D.E., Malter H.E., Feng Y., Warren S.T. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet.* (8):1083-91.
17. Feng Y., Absher D., Eberhart D.E., Brown V., Malter H.E., Warren S.T. (1997). FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol. Cell.* 1:109–118.
18. Gatto C.L., Broadie K. (2009). Temporal requirements of the fragile X mental retardation protein in modulating circadian clock circuit synaptic architecture. *Front Neural Circ.* 3:8.
19. Hou L., Antion M.D., Hu D., Spencer C.M., Paylor R., Klann E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron.* 51:441–54.
20. Kanai Y., Dohmae N. and Hirokawa N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron.* 43, 513–525.
21. Kao D.I., Aldridge G.M., Weiler I.J., Greenough W.T. (2010). Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 107, 15601–15606.
22. Labourier E., Allemand E., Brand S., Fostier M., Tazi J., Bourbon H.M. (1999). Recognition of exonic splicing enhancer sequences by the *Drosophila* splicing repressor RSF1. *Nucleic Acids Research.* Vol. 27, No. 11 2377–2386.
23. Laggerbauer B., Ostareck D., Keidel E.M., Ostareck-Lederer A., Fischer U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 10(4):329–38.
24. Lahey T., Gorczyca M., Jia X., Budnik V. (1994). The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron.* 13:823–835.

25. Li Z., Zhang Y., Ku L., Wilkinson K.D., Warren S.T., Feng Y. (2001). The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* 29(11):2276–83.
26. Ling S.C., Fahrner P.S., Greenough W.T., Gelfand V.I. (2004). Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17428–17433.
27. Melko M., Bardoni B. (2010). The role of G-quadruplex in RNA metabolism: involvement of FMRP and FMR2P. *Biochimie.* 92(8):919-26.
28. Mendoza C., Olguin P., Lafferte G., Thomas U., Ebitsch S., Gundelfinger E. D., Kukuljan M., Sierralta J. (2003). Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in Drosophila. *J Neurosci.* 23(6):2093-101.
29. Morales J., Hiesinger P.R., Schroeder A.J., Kume K., Verstreken P., Jackson F.R., Nelson D.L., Hassan B.A. (2002). Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron.* 34(6):961-72.
30. Moreau M.M., Pigué N., Papouin T., Koehl M., Durand C.M., Rubio M.E., Loll F., Richard E.M., Mazzocco C., Racca C., Olié S.H., Abrous D.N., Montcouquiol M., Sans N. (2010). The planar polarity protein Scribble1 is essential for neuronal plasticity and brain function. *The Journal of Neuroscience.* 30(29):9738–9752.
31. Muddashetty R.S., Kelic S., Gross C., Xu M., Bassell G.J. (2007). Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* 27: 5338–48.
32. Napoli I., Mercaldo V., Boyl P. P., Eleuteri B., Zalfa F., De Rubeis S. (2008). The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell* 134. 1042–1054.
33. Park S., Park J.M., Kim S., Kim J.A., Shepherd J.D., Smith-Hicks C.L., Chowdhury S., Kaufmann W., Kuhl D., Ryazanov A.G. (2008). Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron.* 59:70–83.
34. Qi J., Su Sh., Mattox W. (2007). The *doublesex* Splicing Enhancer Components Tra2 and Rbp1 Also Repress Splicing through an Intronic Silencer. *Molecular And Cellular Biology.* p. 699–708.
35. Reeve S.P., Bassetto L., Genova G.K., Kleyner Y., Leyssen M., Jackson F.R., Hassan B.A. (2005). The Drosophila fragile X mental retardation protein controls actin dynamics by directly regulating profilin in the brain. *Curr Biol.* 15(12):1156-63.
36. Roche J.P., Packard M.C., Moeckel-Cole S., Budnik V. (2002). Regulation of synaptic plasticity and synaptic vesicle dynamics by the PDZ Protein Scribble. *J.Neurosci.* 22(15):6471-9.
37. Sánchez-Soriano N., Tier G., Whittington P., Prokop P. (2007). *Drosophila* as a genetic and cellular model for studies on axonal growth. *Neural Dev.* 2:9.
38. Schaeffer C., Bardoni B., Mandel J.L., Ehresmann B., Ehresmann C., Moine H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J.* 20(17): 4803-13.
39. Tamanini F., Meijer N., Verheij C., Willems P.J., Galjaard H., Oostra B.A., Hoogeveen A.T. (1996). FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum. Mol. Genet.* 5: 809-813.
40. Tejedor F.J., Bokhari A., Rogero O., Gorczyca M., Zhang J., Kim E., Sheng M., Budnik V. (1997). Essential role for dlG in synaptic clustering of Shaker K⁺ channels in vivo. *J Neurosci.* 17(1):152-9.
41. Thomas U., E. Kim, S. Kuhlendahl, Y. H. Koh, E. D. Gundelfinger, M. Sheng, C. C. Garner, V. Budnik. (1997). Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron.* 19:787–799.
42. Wan L., Dockendorff T.C., Jongens T.A. and Dreyfuss G. (2000). Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol. Cell Biol.* 20 (22):8536-8547.
43. Wang Z., Xiao X., Van Nostrand E., Burge C.B. (2006). General and Specific Functions of Exonic Splicing Silencers in Splicing Control. *Mol Cell.* 23(1): 61–70.
44. Zalfa F., Giorgi M., Primerano B., Moro A., Di Penta A., Reis S., Oostra B., Bagni C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell.* 112(3):317–27.
45. Zalfa F., Eleuteri B., Dickson K.S., Mercaldo V., De Rubies S., di Penta A., Tabollaci E., Chiurazzi P., Neri G., Grant S.G., Bagni C. (2001). A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat. Neurosci.* 10(5):578-87.
46. Zarnescu D.C., Jin P., Betschinger J., Nakamoto M., Wang Y., Dockendorff T.C., Feng Y., Jongens T.A., Sisson J.C., Knoblich J.A., Warren S.T., Moses K. (2005). Fragile X protein functions with lgl and par complex in flies and mice. *Dev. Cell.* 8(1):43-52.
47. Zhang M., Wang Q., Huang Y. (2007). Fragile X mental retardation protein FMRP and the RNA export factor NXF2 associate with and destabilize Nxf1 mRNA in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(24):10057-62.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

I. Статии:

A/ реферирани международни списания с IF:

1. **M. Petrova**, E. Molle, M. Nedelcheva-Veleva, G. Genova, **2014**. Splicing regulatory elements and mRNA-abundance of *dlg1* and *capt*, genetically interacting with dFMRP in *Drosophila* brain. Int. J. Bioautomation. **In Press**.

Б/ В реферирани международни списания без IF:

2. **M. Petrova**, D. Georgieva, E. Molle, I. Daskalovska, G. Genova, **2012**. *Drosophila dfmr1* interacts with genes of the LGL-pathway in the brain synaptic architecture, Biotechnol. & Biotechnol. Equipment, 26(1), DOI: 10.5504/50YRTIMB.2011.0010.

3. Georgieva D., **Petrova M.**, Kitanova M., Hristozova D., Genova G., **2011**. Preliminary results of a forward genetic screen for X chromosomal dominant modifiers of *Drosophila melanogaster dfmr1*. DIS, 94, 104-111.

Г/ Доклади от конференции в пълен текст:

4. Milena Georgieva, **Maria Petrova**, Ginka Genova, George Miloshev, **2013**. Changes in the chromatin structure revealed by chromatin comet assay(CHCA) in the Fragile X chromosome syndrome model *Drosophila melanogaster*, Proc. of the fourth workshop on experimental models and methods in biomedical research, May 27-29, GO2, 142-144, Sofia, Bulgaria.

II. Участие с постери в международни конференции в чужбина:

5. **Petrova Marya**, Georgieva Dimitrina, Daskalovska Ivana, Dimitrov Rumens, Genova Ginka, **2011**. Components of *Drosophila* Lgl-pathway interact genetically with *dfmr1* and regulate synaptic morphology and brain neurons. In: **22nd European Drosophila Research Conference, Lisboa**, 21-24 September, 222- MHD 19

6. Georgieva Dimitrina, **Petrova Marya**, Kitanova Meglena, Hristozova Doroteya, Daskalovska Ivana, Genova Ginka, **2011**. X-chromosomal genetic modifiers of *dfmr1* in *Drosophila melanogaster*. In: **22nd European Drosophila Research Conference, Lisboa**, 21-24 September, 219- MHD 12.

7. Georgieva D., Kitanova M., **Petrova M.**, Genova G., **2013**. X-chromosomal interactors of dFMRP in *Drosophila melanogaster*. In: 23rd European Drosophila Research Conference, Barcelona, 16-19 October, 2013.

III. Участие с постери в национални конференции (вкл. с междунар. участие)

8. **M. Petrova**, D. Georgieva, A. Michailova, G. Genova, **2009**. *GAL4-vg.M/+;UASFmr1.Z/+* system in a screen of EMS-induced mutations in genes, interacting with *dfmr1* in *Drosophila melanogaster*. XI Anniversary Scientific Conference with International Attendance "BIOLOGY – TRADITIONS AND CHALLENGES", may 27 - 29, 2009, MB p72.

9. Georgieva D., **Petrova M.**, Genova G., **2009**. A genetic screen for EMS-induced mutations in genes, interacting with *dfmr1* of *Drosophila melanogaster*, **2009**. Bulgarian-Japanese Symposium “Genomics and Proteomics in Personalized Medicine”, March 19-20, 2009, Sofia, Bulgaria, P1.21, 43-44.
10. D. Georgieva, **M. Petrova**, A. Michailova, G. Genova, **2009**. *GAL4-ninaE.GMR/+;UAS-Fmr1.Z/+* system in a screen of EMS-induced mutations in genes, interacting with *dfmr1* in *Drosophila melanogaster*, XI Anniversary Scientific Conference with International Attendance “BIOLOGY –TRADITIONS AND CHALLENGES”, may 27 - 29, 2009, MB p73. 4.
11. Georgieva D., **Petrova M.**, Daskalovska I., Genova G., **2010**. A genetic screen for dominant suppressors of fragile X mental retardation 1 in *Drosophila melanogaster* (*dfmr1*). В сб. Резюме на Младежка Научна Конференция „Климентови дни”, 22-23 ноември, 2010, София, Р62.
12. **Petrova M.**, Georgieva D., Daskalovska I., Genova G., **2010**. Genetic interactions of the gene *dfmr1* with the Lgl-tumor suppressor pathway of *Drosophila melanogaster*. В сб. Резюме на Младежка Научна Конференция „Климентови дни”, 22-23 ноември, 2010, София, Р63.
13. Georgieva Dimitrina, **Petrova Marya**, Genova Ginka, **2011**. Genetic Mapping of EMS-induced mutations which interact with *Drosophila* fragile X mental retardation 1 (*dfmr1*). In: Anniversary molecular biology conference – 50 years Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology. Sofia, 6-7 October, p. 100 - PD 2.
14. **Petrova Marya**, Georgieva Dimitrina, Genova Ginka, **2011**. *Drosophila dfmr1* interacts with genes controlling actin filament organization in neuronal development. In: Anniversary molecular biology conference – 50 years Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology. Sofia, 6-7 October, p. 102 - PD 4.
15. **Maria H. Petrova**, Dimitrina G. Georgieva , Meglena L. Kitanova , Ginka K. Genova, **2012**. “*Drosophila dfmr1* (*Drosophila fragile X mental retardation 1*) interacts with genes involved in synaptic formation”, Младежка научна конференция “Климентови дни“, 22-23 септември 2012, p.60 – P67.
16. **Petrova M.**, Georgieva D., Kitanova M., Genova G., **2012**. ”*Drosophila dfmr1* (*Drosophila fragile X mental retardation 1*) interacts with genes encoding components of the apical polarity protein network“, Национална младежка конференция “Биологически науки за по-добро бъдеще”, 19-20 октомври 2012, Пловдив, България
17. Georgieva D., Harizanova A., Pukniiska K., **Petrova M.**, Genova G., **2013**, Mapping of genes, modifying *dfmr1*-overexpression phenotype in the wings of *Drosophila melanogaster*, International Conference “Bioscience – development and opportunities”, 50 years Faculty of Biology, Kliment’s days, 20th – 22nd November 2013.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам искрена благодарност на научния си ръководител проф. д-р Гинка Генова за нейната всеотдайност и оказаната голяма помощ при изготвянето на настоящия дисертационен труд. Благодаря на гл.ас. д-р Марина Неделчева-Велева и доц. д-р Ива Угринова от ИМБ, БАН за предоставената възможност да използвам апарата за real-time PCR в този институт, и за оказаната помощ при изработването на експериментите с qRT-PCR. Благодаря на доц. д-р Емил Молле за помоща при изготвянето на биоинформатичната част и на целия екип на катедра генетика за оказаната подкрепа и съдействие. Специални благодарности на Димитрина Георгиева, Меглена Китанова и Анета Михайлова за техническата помощ при изготвянето на настоящия дисертационен труд.

Дисертационния труд и автореферата са отпечатани изцяло благодарение на финансовата подкрепа на проект BG051PO001-3.3.06-0025 "Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми" по Оперативна програма «Развитие на човешките ресурси».