

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, професионално направление 4.3. Биологични науки (Генетика), научна специалност: шифър 01.06.06. „Генетика“, изготвен в Институт по физиология на растенията и генетика към Българска академия на науките, секция „Молекулярна генетика“

Автор: асистент Марияна Стамова Георгиева

Тема на дисертационния труд: «Молекулярно-цитогенетична характеристика на геномния интегритет при ечемика»

Рецензент: доц. д-р Габриеле Йовчев, Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ), Българска академия на науките, отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“, избрана за рецензент с протокол от 19.11.2013г. на заседание на Научно жури

1. Обща характеристика: Дисертацията е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за прилагането му. Представеният труд е в общ обем 157 страници и съдържа 60 фигури (19 схеми, 20 микроскопски образи и 21 графики), 5 таблици и едно приложение. Литературната справка обхваща 322 заглавия, всички на латиница.

2. Актуалност: В последните 30 години бяха създадени повече от 1000 реконструирани кариотипа ечемик, почти всички получени чрез йонизираща радиация. С помощта на подходящи сонди флуоресцентната *in situ* хибридизация открива нови възможности за характеристика на такива транслокационни линии. Така че в течение на годините тематиката не е загубила актуалността си, напротив, откриват се нови перспективи за получаване на детайлизирана информация за тези кариотипи.

Разработката обхваща проучване на молекулярно-цитогенетичните характеристики на геномния интегритет в моделна система ечемик - *Hordeum vulgare*. Използваните структурни мутантни линии са умело подбрани и дават възможност за реализиране на поставаните цели, а именно характеризиране на физическата организация и индивидуални особености на хромозомите на стандартен кариотип на ечемик Freya, съпоставени с тези на реконструираните кариотипи. Като следваща стъпка се прави оценка на ДНК разриви, индуцирани от висок и нисък линеен пренос

на енергия, и от радиомиметика блеомицин в генома на ечемик. Анализирани са фенотипните особености на съответните кариотипи ечемик, а за молекулярния анализ е приложен „Comet assay“. С кометния анализ са детектирани първоначалните повреди и репарационната кинетика. Направена е и комплексна оценка на статистическото разпределение на резултатите от кометия анализ, чрез обобщените линейни модели.

3. Осведоменост на дисертантката: Теоретичната подготовка на докторанката е сериозна и задълбочена. В последните 10 години тя е участвала в редица международни и национални теоретично-практически курсове. Чрез тях тя е повишила професионалната си квалификация в редица области (молекулярна биология, биохимия, изследователски техники, статистика, бази данни, image-обработка и др.).

Марияна Георгиева е участвала в две специализации в Унгария и два лекционни курса, пряко свързани с дисертацията ѝ. Има и отлична езикова подготовка (английски и руски език). Всичко това допринася за доброто оформление на дисертационния труд.

Литературният обзор показва задълбочени знания по изследваната тематика. Авторката умело представя литературните данни от многобройни международни източници, използвани за основа и мотивировка на настоящата разработка. От цитираните 190 статии в глава „Литературен обзор“ 16% са от последните пет години, 39% от последните десет, а 67% от последните петнадесет години.

Съпоставката и дискусията на получените резултати в глава „Резултати и обсъждане“ е задълбочена. Марияна Георгиева показва умения да анализира собствените си резултати и да ги обсъжда и интерпретира много добре в контекста на литературните данни. От използваните в тази глава източници 8% са от последните пет, 22% - от последните десет, а 51% - от последните петнадесет години.

4. Методичен подход: Целта на предложения дисертационен труд е формулирана ясно и правилно. Поставените задачи произтичат логично от нея. Методичният подход за детайлно картиране на хромозомните изменения, настъпили след насочената реконструкция на кариотипа на ечемика чрез облъчване с йонизираща радиация е правилен и съвременен. За изпълнение на първата задача „Локализиране на местата на радиационно индуцираните транслокационни разриви при реконструирани кариотипи на ечемик“ основно е използвана флуоресцентна *in situ* хибридизация. Изследваните реконструирани кариотипи са създадени в бившия Институт по генетика, БАН. Между тях са три различни групи – две транслокационни линии, една дупликационна линия,

както и два мултиреконструирани кариотипа. За проведените FISH анализи са използвани четири ДНК-сонди: pTa71 (съдържащ EcoRI фрагмент на 18 – 5,8 – 26 рДНК транскрипционна единица, изолирана от пшеница); pAs1 (субфамилен клон на тандемно повторена последователност, изолирано от *Aegilops squarrosa*); GAA (микросателитна ДНК последователност, амплифицирана от геномна ДНК на ечемик); HvT01 (субтеломерна тандемно повторена последователност, изолирана от ечемик).

За установяване на чувствителността съответните кариотици ечемик към мутагенната обработка е приложен кометният анализ в два различни варианта (неутрален и алкален). В практиката типичният кометен анализ е изключително чувствителен, както към факторите, наложени от протоколите на отделните варианти на теста, така и към точното изпълнение на експерименталните процедури. По тази причина резултатите, получени от различни работни групи и/или дори от различни експерименти са недостатъчно съпоставими. Високата вариабилност на резултатите налага необходимостта от вътрешни проверки и сравняване на данните. Оттам произлиза и необходимостта от прилагане на специални статистически подходи за дизайн и оценка на отчетените ефекти.

5. Достоверност на материала: Направен е задълбочен цитогенетичен анализ на използваните транслокационни линии на ечемика. Сравнени са физическата локализация на повторените последователности GAA, Afa-family, pTa71 и HvT01 в стандартния кариотип Freya с тези на реконструирания кариотип ечемик T-1586, T-21, D-29/46, РК 88-19 и РК 180-19. В стандартния кариотип профилът на разпределение на GAA пробата е съпоставен с гимза N бендинга. Установени са разлики в дългите рамена на хромозоми 2, 3, 4 и 7, както и в късите рамена на хромозоми 5 и 6, където FISH техниката отчита сигнали. Допълнителни сигнали на рибозомните РНК гени са локализиращи в дългите рамена на хромозоми 2, 5 и 6. Характеризирани са участъците, в които са възникнали транслокационните разриви в реконструирания хромозом $3H^{4H}$ и $4H^{3H}$ на транслокационна линия T-1586, както и в реконструирания хромозом $5H^{6H}$ и $6H^{5H}$ на транслокационната линия T-21. Анализирани са и дупликационната линия D-29/46. В реконструирания хромозом $4H^{6H}$ и $6H^{4H}$ са установени участъците, в които са възникнали транслокационните разриви и е определена дължината на дублицирания участък. Характеризирани са особеностите на реконструирания хромозом в мултиреконструирания кариотип ечемик - РК 88-19 и РК 180-19. Локализиращи са участъците, в които са възникнали транслокационните и инверсионните разриви.

Профилът на разпределение и локализирането на хибридизационните сигнали е съобразен с публикувания профил на нормалния кариотип на ечемик от Künzel и съавтори от 2000 г. Представените FISH сигнали са получени и обобщени за проби от най-малко три независими експеримента. Сигналите, представени на идиограмите са наблюдавани в 98% от анализираниите хромозоми, което удостоверява важния принос на получените резултати.

Чрез адаптиране на кометния анализ дисертантката успява да оцени типа и кинетиката на ДНК разрывите, индуцирани от гама-лъчи и литиеви йони, както и ефективността на репарация на индуцираните едноверижни и двойноверижни ДНК скъсвания. Анализирани е различната чувствителност на стандартния кариотип и реконструирани транслокационни линии ечемик към мутагенното въздействие. Оказва се, че реконструираният кариотип D-29/46 проявява най-висока чувствителност по отношение и на двата типа разкъсвания в ДНК. Той проявява и нисък репаративен потенциал в сравнение с другите изследвани кариотипи. Кометният анализ е проведен чрез софтуерна система за анализ на изображенията (Comet Score) на най-малко три независими експеримента и достатъчен брой отчетени препарати.

6. Научни и научно-приложни приноси: Подробното характеризирани на хромозомните изменения в изследваните реконструирани кариотипи ечемик ще позволи ефективното им използване като моделни системи в цитогенетичния анализ в областта на експерименталния мутагенез от една страна, както и от гледна точка на кариотипната еволюция, от друга. Адаптирането на кометния анализ открива нови възможности, както за фундаментални изследвания относно кинетиката на ДНК разрывите и ефективността на репарация им, така и за прилагането му в областта на екоотоксикологията. Новите статистическите подходи подпомагат правилната интерпретация на резултатите.

7. Значимостта на приносите: Формулирани са пет извода и четири приноса. Считаю, че дисертационният труд на Марияна Георгиева съдържа достатъчно значими приноси, които се отнасят до подробна характеристика на местата на радиационно-индуцираните транслокационни и инверсионни скъсвания при реконструирани кариотипи ечемик, посредством флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) с повторени ДНК последователности.

Кометният анализ е адаптиран за оценка на индукцията и ранните етапи на репарация на едно- и двойноверижните ДНК-разриви в генома на ечемика.

От особено значение е извършването на комплексен анализ на статистическото разпределение на данните от кометния анализ при растенията, като са използвани обобщените линейни модели за проверка на статистическата достоверност, подход, който се прилага за първи път.

8. Личен принос на дисертантката: Докторантката има водеща роля и безспорно лично творческо участие в представената научна разработка, което се изразява от една страна в убедителна компетентност в теоретичен план, а от друга страна в прецизност и упоритост като експериментатор.

9. Преценка на публикационната дейност : Основните резултати от дисертационния труд вече са намерили мястото си в международното научно пространство. Те са оформени в три научни публикации в реферирани научни списания с импакт фактор, от които една е в списание „Environmental and Molecular Mutagenesis” (Impact factor 2.868/2009) и две са в списание „Biotechnol & Biotechnol. Eq”(Impact factor 0.706 /2011 и Impact factor 0.76 /2012). Докторантката е първи автор в тези статии.

Асистент Марияна Георгиева има и участия в четири национални и международни научни форума (3 постера и един доклад). Публикациите имат вече осем цитирания, от които три са в списания с импакт фактор и четири в книги от международни издателства („The Comet Assay in Toxicology” Royal Society of Chemistry, ISBN 978085404 1992; „Plant Genome: Biodiversity, Conservation and Manipulation”, Narosa Publications, New Delhi, ISBN 978-81-8487-113-5 и „Plant Mutation Breeding and Biotechnology”, CABI, Oxfordshire UK, Cambridge USA, ISBN 978-92-5-107022-2).

10. Препоръки за използване на приносите: Новите познания и адаптираните методи биха могли да се използват в бъдещи комплексни изследвания, при които може да се внедри методиката за комбиниране на кометния тест с флуоресцентната *in situ* хибридизация. Това ще позволи проучването на по-комплексни въпроси, като например - участието на специфични хроматинови домени при ДНК-миграцията след прилагане различни мутагени и/или различни видове индуцирано ДНК-увреждане.

11. Качествата на автореферата: Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и правилно отразява основните положения и научните приноси на дисертационния труд.

12. Въпроси и забележки:

12.1. Въпроси:

12.1.1. По отношение на условията за денатуриране, могат да бъдат разграничени три варианта на кометния анализ:

- „неутрален“ (Н/Н) кометен анализ, където отсъстват алкални условия. При този вариант на кометния анализ се наблюдава сравително голяма ДНК-миграция в негативните контроли с неизяснени причини.

- „алкален вариант“ (А/А) на кометния анализ, използва се "лека" или "високо" алкална денатурация и електрофореза в алкален разтвор. По-голямата ДНК-миграция в негативните контроли се обяснява с дългата експозиция в алкална среда.

- "полу-алкален" (Н/А) вариант на кометния анализ, комбинира алкална денатурация и електрофореза в неутрален буфер. При този вариант обикновено се получават „най-чистите“ (най-ниската ДНК миграция) негативни контроли.

Радиомиметикът блеомицин и радиацията с висок и с нисък линеен пренос на енергия пряко индуцират единични и двойноверижни разкъсвания във веригата на ДНК, които би трябвало да се установят в "полу-алкалния" вариант на кометния анализ, поради това че този вариант детектира и двата вида ДНК повреди. Какви са мотивите за използване на другите два варианта на теста?

12.1.2. Какви са мотивите за избор на кариотипите ечемик Т-1586 и D-29/46 за кометния анализ? Не се ли предполага по-голяма чувствителност на мултитранслокационните линии на ечемика?

12.2. Забележки: Има и някои технически пропуски: например Menke et al., (2001), Künzel & Nicoloff (1979) и Venter GG (2008), липсват в цитираната литература.

Направените критични забележки не засягат приносите на дисертацията, а по-скоро имат за цел отстраняването на посочените неточности в по-нататъшните разработки по темата.

13. Заключение: Дисертационният труд обхваща огромен материал в една важна област на биологичната наука. Работата има сериозни приноси в рамките на изследваната тема и открива още по-широки възможности за използването на изследваните кариотипи на ечемика. Резултатите са представени и много добре приети в научната литература, показател за което е и цитируемостта на публикациите, отпечатани в списания с импакт фактор. Това ми дава основание да сложа положителна оценка на дисертационния труд и да предложа на Уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Генетика“ на асистент Марияна Георгиева.

06.12.2013 г., София

Изготвил рецензията:.....

доц. д-р Габриеле Йовчев