

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационния труд ЕФЕКТИВНОСТ И ГЕНЕТИЧЕН КОНТРОЛ НА РЕПАРАЦИЯТА НА ДНК ПОВРЕДИ, ИНДУЦИРАНИ ОТ УЛТРАВИОЛЕТОВА РАДИАЦИЯ В ГЕНОМА НА ЕЧЕМИКА (*Hordeum vulgare*L)
Представен за придобиване на научната и образователна степен ДОКТОР
От РАЛИЦА ГЕОРГИЕВА ГЕОРГИЕВА

Рецензент: чл. кор. проф. ГЕОРГИ ХРИСТОВ РУСЕВ, дбн

Представеният ми за рецензия дисертационен труд озаглавен „ЕФЕКТИВНОСТ И ГЕНЕТИЧЕН КОНТРОЛ НА РЕПАРАЦИЯТА НА ДНК ПОВРЕДИ, ИНДУЦИРАНИ ОТ УЛТРАВИОЛЕТОВА РАДИАЦИЯ В ГЕНОМА НА ЕЧЕМИКА (*Hordeum vulgare*L)“ от докторантката Ралица Георгиева е изработен под ръководството на професор д-р Любомир Стоилов в лабораторията “Геномна динамика и стабилност” към Института по физиология на растенията и генетика (ИФРГ). Ралица Георгиева е завършила висшето си образование в БФ на СУ Кл. Охридски, като през 2005 г. се е дипломирала като магистър по генно и клетъчно инженерство. От 2011 г. е зачислена като редовен докторант в ИФРГ и след изтичане на срока на докторантурата, през 2014 г. е отчислена с право на защита. От тогава до 2016 г. работи отначало като биолог, а в последствие като асистент в ИФРГ.

Дисертационният труд на Ралица Георгиева е посветен на изясняването на един важен фундаментален научен проблем от областта на молекулярната генетика, а именно въпроса за репарацията на уврежданията причинени от УВ светлина в ДНК на растения. УВ светлината е най-универсалния мутагенен фактор, който предизвиква образуването на циклопиримидинови димери (ЦПД) и други връзки между съседните пиримидинови нуклеотиди. В хода на еволюцията живите организми са разработили ефективни механизми за поправка на уврежданията предизвикани от УВ светлина. Те включват директна поправка чрез фотореактивация, поправка чрез изрязване на нуклеотиди, транслезийна синтеза на ДНК и др. От тях най-подробно е изучен т.н. поправка чрез изрязване на нуклеотиди,

тъй като той е основния път за поправка в животинските клетки и има голямо значение в медицината, както при възникването, така и при третирането на злокачествени заболявания. Този път, макар и ефективен, е сложен поради участието на много фактори и изразходва значителен енергиен ресурс за синтеза на ДНК. Директната поправка на уврежданията предизвикани от УВ светлина е значително по-прост и енергоспестяващ път, но той е непостижим за животинските клетки, тъй като за разрушаване на връзките създадени от УВ светлината между съседни пиримидинови бази е нужна висока енергия, с която животинските клетки не разполагат. От друга страна зелените растения, които могат директно да абсорбират и използват неограничения енергиен ресурс на пряката слънчева светлина нямат това ограничение и изглежда логично, че те ще използват предимно директния път за поправка. Този подход има и допълнителното предимство, че не води до мутации, тъй като при него се възстановява точно изходната структура на ДНК. Този процес се извършва от специален клас ензими наречени фотолиази, които съдържат флавинови нуклеотиди и могат да абсорбират енергията на видимата светлина, която след това да използват за осъществяване на химични реакции. Трябва да се отбележи, че ензими от това семейство съществуват и във висшите животни, но там те са част от механизмите регулиращи циркадния ритъм и не се използват за поправка на ДНК. За съжаление процесите на поправка на уврежданията в ДНК при висшите растения са слабо изследвани и много страни от този важен както в теоретично така и в практическо отношение въпрос все още не са проучени. По-тази причина аз смятам, че настоящата дисертация е посветена на един важен в световен мащаб научен проблем, от първостепенно фундаментално и практическо значение.

Дисертационният труд на Ралица Георгиева е написан на 189 страници и съдържа 39 фигури, повечето от тях композитни, както и 11 таблици. Цитирани са 390 литературни източника. Дисертационният труд се състои от следните части ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР, ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ, РЕЗУЛТАТИ, ДИСКУСИЯ, ИЗВОДИ И ПРИНОСИ.

В литературния обзор е направен преглед на повредите, които могат да възникнат в генома, както и на молекулните механизми за тяхното отстраняване. Подробно са описани видовете химични модификации, които настъпват под

въздействие на УВ светлина, йонизираща радиация и реактивни органични съединения в молекулите на ДНК, честотата на тези събития и тяхното въздействие върху генома. Описани са различните репаративни пътища, като особено внимание е отделено на директната фотореактивация и на поправката чрез изрязване на нуклеотиди, които са основните механизми за поправка на тимидиновите димери и 6-4 фотопродуктите образувани от УВ светлина. Литературният обзор е написан изчерпателно и компетентно и показва, че докторантката добре познава и свободно борави с литературата по въпроса на дисертацията.

Целта на настоящето изследване е формулирана в раздела ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ и се състои в изследване на молекулните механизми, осигуряващи репарацията на ДНК в генома на ечемика след облъчване с УВ светлина. Предвидено е да се изследва ефективността и начина на отстраняване на циклобутановите пиримидинови димери (ЦПД), образувани след облъчване с УВ светлина при осветяване с видима светлина и на тъмно. Предвидено е да се определи ефективността на поправката в различни участъци на ядрения геном, които се различават по своята организация и транскрипционна активност, както и на поправката на ДНК в хлоропласти и митохондрии. Предвидено е също така да се изследва транскрипцията на гена за циклопиримидиновата фотолиаза и да се потърсят, чрез т.н. "TILLING" анализ, мутации в различни популации ечемик. Още тук искам да отбележа, че в хода на докторантурата всички поставени задачи са изцяло изпълнени.

В раздела МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ са описани подробно използваните растителни модели и експериментални методи. Като основен експериментален материал е използван ечемик от линията Freya, който е добре проучен в генетично отношение. Изборът на този модел не е случаен, тъй като колективът на ИФРГ, както и научния ръководител на докторантката имат дългогодишен опит с тази култура и са създали много линии с реконституирани кариотипове, които са изключително подходящи за генетични изследвания. Експерименталните методи включват широк спектър от генетични и молекулярно биологични техники като изолиране на ДНК и РНК, различни електрофорези, Верижна полимеразна реакция, TILLING и др.

Използваните методи са адекватни за решаване на поставените задачи и показват високата квалификация на докторантката.

В раздела РЕЗУЛТАТИ са описани и анализирани проведените изследвания. Те могат да се обединят в следните групи. Поправка на ЦПД при осветяване с видима светлина и на тъмно, поправка на ЦПД в различни участъци на генома и в извънядрените геноми и изследване на ЦПД-фотолиазния ген. Получените резултати показват, че за разлика от висшите животни, в растенията и по-специално в ечемика основният път за поправка на ЦПД е фотореактивацията. Чрез фотореактивация директно се поправят над 90% от образуваните ЦПД и то в първите минути след увреждането. В отсъствие на видима светлина поправката се извършва чрез изрязване на нуклеотиди, но е значително по-бавна и по-малко ефективна отколкото директната поправка чрез фотореактивация. Това е важна разлика в начина на поправка на този тип увреждания в растителното и животинското царства и трябва да се има пред вид при оценяване на мутагенния ефект на УВ светлината по отношение на растения и животни. Не е намерена разлика в ефективността на поправката в рибозомните гени в сравнение с генома като цяло. По-нататък докторантката е изследвала механизма на поправката в геномите на някои клетъчни органели и по-специално поправката на ДНК в митохондрии и хлоропласти. И в двата случая е намерено, че образуваните от УВ светлина ЦПД се поправят ефективно чрез фотореактивация, докато поправката чрез изрязване на нуклеотиди въобще не взема участие. Тук искам да отбележа, че тези изследвания са пионерни, тъй като поправката на ДНК в растителни органели почти не е изследвана. Основният ензим, който осъществява поправката на ЦПД в ечемика се явява ЦПД-фотолиазата, която се кодира от ЦПД-фотолиазния ген. В хода на дисертацията гена на ечемичената фотолиаза е клониран и секвениран и е намерено, че той притежава висок процент хомология с оризовия ЦПД-фотолиазен ген, което показва неговата висока степен на консервативност. Това се потвърждава и от факта, че след прилагане на TILLING анализ, не са открити промени в нуклеотидната последователност на гена при анализа на голям брой индивиди изолирани от мутагенизирани популации. Експресионният профил на ечемичния ЦПД-фотолиазен ген в норма и след облъчване с видима светлина показва, че в присъствие на светлина

неговата експресия многократно се увеличава. Този резултат представлява оригинален научен принос и обяснява ефективната поправка на ЦПД на светло.

В раздела ДИСКУСИЯ критично са обсъдени получените резултати. Направена е детайлна характеристика на типа и ефективността на ДНК репаративните механизми в ечемика и е оценена степента на хомология на ечемичената фотолиза с фотолиази от други видове.

Накрая на дисертационния труд са обособени два кратки раздела озаглавени ИЗВОДИ и ПРИНОСИ, в които са изброени съответно основните изводи и приноси на дисертационния труд. Те правилно отразяват резултатите от експерименталните разработки и аз ги приемам напълно.

Резултатите получени по време на изработването на настоящата дисертация са публикувани в 2 статии в специализирани списания, от които едното е списанието на ИФРГ, а другото – международното списание *Physiologia plantarum*, с импакт фактор 3.52, и са представени на 6 международни симпозиуми и конгреси. Работата по дисертацията е финансирана от 2 гранта, единият от които национален, а другия – от Международната атомна агенция, което показва, че тези институции са преценили, че научния проект, който представлява предмет на дисертационния труд е важен, оригинален и актуален.

Запознах се с Автореферата и считам, че той правилно отразява по-важните теоретични и практически достижения на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният ми за рецензия дисертационен труд представлява едно оригинално фундаментално научно изследване, което заслужава най-висока оценка. Докторантката е усвоила и успешно е използвала най-модерните методи на съвременната молекулярна биология и генетика за да проведе детайлно проучване на механизма на един от най-важните процеси в живата природа, а именно репарацията на ДНК. Въпреки, че този процес е подробно изследван при прокариотите и висшите животни, за което откривателите му получиха Нобелова награда за химия за 2015 г., въпросът за репарацията на ДНК в растенията и то по-специално за репарацията на геномите на растителните органи, все още не е добре проучен. В тази област

Ралица Георгиева е получила важни и оригинални научни резултати, които хвърлят светлина върху въпросите свързани с поправката на увреждания в ДНК на растенията, който процес стои в директна връзка с тяхната изменчивост и с изключително актуалния въпрос за създаване на нови сортове с подобрени качества. Всичко това характеризира докторантката като един напълно подготвен в областта на молекулярната генетика изследовател със специфичен интерес към модерните фундаменталните изследвания. Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на ЗРАС и на правилника на ИФРГ и аз убедено препоръчвам на уважаемото жури да присъди на Ралица Георгиева Георгиева научната и образователна степен ДОКТОР.

02.06.2017

Рецензент:

/Г. Русев/