

## РЕЦЕНЗИЯ

**върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3 “Биологически науки”, научна специалност 01.06.06 „Генетика”**

**Автор на дисертационния труд:** Ралица Георгиева Георгиева, ИФРГ, БАН

**Тема на дисертационния труд:** „Ефективност и генетичен контрол на репарацията на ДНК повреди, индуцирани от ултравиолетовата радиация в генома на ечемика (*Hordeum vulgare* L.)”

**Рецензент:** проф. д-р Катя Маринова Георгиева, ИФРГ, БАН

### **Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура**

Дисертационният труд е написан на 189 страници, структуриран е според изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор” и включва разделите: въведение (2 стр.), литературен обзор (45 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (29 стр.), резултати (40 стр.), дискусия (22 стр.), заключение (1 стр.), изводи (2 стр.), приноси (1 стр.) и цитирана литература (38 стр.). Списъкът на цитираната литература включва 390 източника. В дисертационния труд са включени 41 фигури и 12 таблици, от които 12 фигури в Литературния обзор, 2 фигури и 11 таблици в Материали и методи, 25 фигури и 1 таблица в Резултати и 2 фигури в Дискусията.

### **Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем**

Разработеният в дисертационния труд проблем е изключително актуален и е от важно значение за изясняването на механизмите на репарация на ДНК повредите, индуцирани от ултравиолетовата радиация (УВР). През последните десетилетия в резултат на изтъняването на озоновия слой в атмосферата се повишава количеството на ултравиолетовите лъчи, достигащи земната повърхност, а това води до засилване вредното им влияние върху растенията. Прониквайки в растителната клетка УВР може да предизвика морфологични, метаболитни и генетични промени, както и намаляване на продуктивността на растенията. Основните УВ-индуцирани ДНК повреди са циклобутановите пиримидинови димери, чието присъствие в ДНК може да доведе до блокиране на важни клетъчни процеси като репликация и транскрипция. За да се справят с тези увреждания растенията са развили специфични репаративни механизми, но те са много по-слабо проучени при растенията, в сравнение с тези при прокариотите, дрождите, животните и човека. Независимо от значителния прогрес в изследванията

на увреждането и репарацията на ДНК, главно при *Arabidopsis* и ориз, е необходимо да се използват и други моделни и културни растения за да се получи по-цялостна характеристика за способността на растителния геном да преодолява стресовото въздействие на факторите на околната среда. Като обект на изследване на репарацията на ДНК повредите, индуцирани от УВР, в дисертационния труд е използван ечемик, който е не само икономически важна култура, но и интересна моделна система за генетични изследвания, тъй като притежава висока степен на сходство с други житни растения като пшеница, ориз, царевица и овес. Освен това молекулярните механизми, отговорни за възстановяването на ДНК от увреждащото действие на УВР при ечемик са все още слабо проучени.

### **Анализ на дисертационния труд**

**Литературният обзор** е много подробен и информативен. Прави изключително добро впечатление структурирането на тематичните раздели, които са представени в много добра логическа последователност. Подробно са описани ендегенните ДНК повреди, предизвикани от спонтанна хидролиза, деаминиране, реактивни кислородни форми, ДНК алкилиране, грешки при репликацията, както и екзогенните ДНК повреди, индуцирани от различни химични и физични агенти от околната среда - химични мутагени, йонизиращата радиация, ултравиолетовата радиация. Разгледани са ДНК повредите, индуцирани от ултравиолетова радиация, както и честота на формиране и факторите, влияещи върху разпределението на индуцираните от УВР повреди в ДНК. Направеният обстоен преглед на механизмите за директно и индиректно поправяне на повредите в ДНК, както и на механизмите за временно толериране на ДНК повредите показва отличната осведоменост на докторантката. Особено внимание е отделено на репаративните механизми за отстраняване на УВ-индуцирани ДНК повреди в растителния геном. Представена е информация за отговора на ечемик към УВ радиация на физиологично, биохимично и генетично ниво. Прави много добро впечатление цитирането и на предходните изследвания на колеги от ИФРГ. Изложението на този раздел е илюстрирано с 12 фигури, което улеснява възприемането на представената информация.

Доброто познаване на литературата по изследвания проблем е позволило на дисертантката да формулира точно **целта и задачите** на своята дисертация.

**Материали и методи.** Като основен експериментален материал в настоящия дисертационен труд е използван двуреден пролетен ечемик (*Hordeum vulgare* L.) от линия Freya. Проведени са и изследвания с реконструирания кариотип T-1586, получен от родителската линия Freya чрез гама-облъчване. Шест-дневни ечемични прорастъци са облъчвани с различни дози УВ-С радиация, вариращи от 0.5 до 50 кJ/m<sup>2</sup>. В експериментите са използвани

етиолирани и зелени ечемични прорастъци, а възстановяването им след облъчването е проведено на тъмно или при различни светлинни режими (с висок и нисък интензитет) и проследено от 0.5 до 120 час. Поради използването на различен растителен материал и третирания би било добре ако беше представена експериментална схема.

В методично отношение дисертационният труд впечатлява с използването на много генетични и молекулярно-биологични методи като изолиране на ДНК и РНК, електрофоретично разделяне на ДНК, Southern blot и хибридизация, конвенционален и RT-PCR, секвенционен анализ, TILLING и EcoTILLING и други, което говори за добрата методична подготовка на докторантката. Всички методи са описани подробно и по начин, който позволява тяхното възпроизвеждане от други учени. Разделът съдържа 11 таблици и 2 фигури.

### ***Представяне и обсъждане на получените резултати.***

Прави много добро впечатление разделянето на раздел ***Резултати*** от ***Дискусия***. Раздел ***Резултати*** е добре структуриран в няколко подраздели в съответствие с поставените в дисертацията задачи. Извършена е голяма по обем експериментална работа и са получени съществени резултати, които са представени с 25 фигури и 1 таблица. Изложението е стегнато и ясно. В раздел ***Дискусия*** е направен задълбочен анализ на получените експериментални резултати чрез съпоставянето им с наличните литературни данни, като е избегнато повторение с раздел ***Резултати***. В ***заключението*** само на една страница докторантката е обобщила основните експериментални резултати, което показва способността ѝ да систематизира информацията от получените данни.

Получени са следните по-важни резултати:

Установено е, че броят на циклобутановите пиримидинови димери (ЦПД) нараства линейно с увеличаването на дозата на УВ-С лъчението от 0.5 до 10 kJ/m<sup>2</sup>. Резултатите показват сравними стойности на честотата на димерите в листата на зелените и етиолираните ечемични прорастъци.

Направена е сравнителна характеристика на ефективността и относителният принос на светлинно-зависимите и опериращите на тъмно ДНК репаративни пътища за премахването на ЦПД в ечемични прорастъци. За да се изследва връзката между нивата на експресия на ЦПД-фотолиазния ген и способността на растенията да поправят УВ-индуцираните ЦПД са използвани етиолирани и зелени ечемични прорастъци от линиите Freya и T-1586. След облъчването растенията са подложени на репаративна инкубация при условия на осветяване със слънчева светлина с висок интензитет или при липса на светлина. Получените резултати ясно показват, че в ечемични прорастъци, подложени на УВ-С стрес, оперират предимно свет-

линно-зависими механизми за отстраняване на ДНК повредите. Фоторепарацията на ЦПД в етиолирани прорастъци протича много по-бавно, отколкото в зелените, като разликата е ясно забележима дори само след 30 мин. репаративна инкубация. Установено е, че етиолираните прорастъци съдържат няколко пъти по-ниски нива на ЦПД-фотолиазни иРНК в сравнение със зелените и се предполага, че излагането на светлина преди облъчването е предпоставка за по-високия капацитет на зелените ечемични прорастъци да поправят УВ-индуцирани ЦПД. Предполага се наличието и на други репаративни механизми в процеса на възстановяване на геномния интегритет в ечемичните листа отглеждани на тъмно, но тяхното активиране изисква по-дълъг инкубационен период. Освен това, ефикасността на отстраняването на ЦПД чрез светлинно-зависимите репаративни пътища корелира с интензитета и качеството на светлината, използвана при възстановяването им - фотореактивацията е по-ефективна под въздействие на слънчева светлина с висок интензитет, докато използването на флуоресцентна светлина с нисък интензитет значително забавя фотореактивацията.

Установено е, че честотата, с която се формират ЦПД в рДНК на ечемика в резултат на облъчването с УВ-С е по-ниска в сравнение с тоталната гДНК, но те се отстраняват ефективно чрез светлинно-зависим репаративен механизъм, чиято кинетика е сходна с установената в генома като цяло.

Светлинно-зависимите механизми за отстраняване на ДНК повредите са ефективни и в хлоропластния и митохондриалния геноми на ечемика. За разлика от резултатите, получени за тоталната гДНК, където е отчетена активност на тъмнинните репаративни механизми след 120 часа инкубация на тъмно на ечемичните прорастъците облъчени с УВР, тези механизми не участват в поправянето на ДНК фотопродуктите в хлоропластния и митохондриалния геноми.

Идентифицирана и секвенирана е геномната ДНК последователност с дължина 4525 бд., представляваща ЦПД-фотолиазния ген при ечемика. Секвенцията на идентифицирания ЦПД-фотолиазен ген е включена в генната банка на NCBI.

За първи път е изследвана регулацията на експресията на ЦПД-фотолиазния ген в отговор на излагането на ечемични прорастъци на слънчева светлина с висок интензитет и УВ-С радиация. Установено е, че слънчевата светлината повишава транскрипционните нива на гена в етиолираните растения, докато УВ-С радиацията намалява до известна степен количеството на новосинтезираните транскрипти в рамките на изследваните времеви периоди.

## **Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Дисертационният труд на Ралица Георгиева е едно комплексно и задълбочено изследване върху индукцията и репарацията на повредите в тоталната геномна ДНК, ядрения и извънядрения геноми на ечемика, индуцирани от УВ-С радиация. Получени са значими научни резултати с подчертан приносен характер за изясняване на ролята на ДНК репаративните механизми и техния генетичен контрол във връзка с толерантността на ечемика към ултравиолетова радиация. Получените данни в огромната си част са нови и оригинални, тъй като механизмите, отговорни за възстановяването на ДНК на ечемичните растения от увреждащото въздействие на УВР са все още слабо проучени. Освен това, в литературата няма изследвания върху репаративните механизми, опериращи в пластидния и митохондриалния геноми на ечемика. Като съществен научен принос може да се отбележи секвенирането на ЦПД-фотолиазния ген при ечемика и анализирането на транскрипционния му профил след излагането на растенията на силна светлина или облъчване с УВ-С радиация. Изказани са интересни хипотези, които са предпоставка за бъдещи разработки.

На този етап изследванията на Р. Георгиева имат фундаментален характер, но разбирането на ДНК репаративните механизми за защитата на растенията срещу УВ радиация е от съществено значение за изясняването на способността на растенията да се адаптират към неблагоприятните фактори на околната среда.

*Изводите* от дисертационния труд са в пълно съответствие с получените резултати. Приемам посочените *научни приноси*, които имат оригинален характер.

## **Личен принос на докторантката**

Проведените изследвания в дисертационния труд са дело на докторантката под компетентното ръководство на нейния научен ръководител проф. д-р Любомир Стоилов и научния ѝ консултант гл. ас. д-р Василиса Манова. Изследванията са проведени основно в лаборатория „Геномна динамика и стабилност“. Трудовете на Ралица Георгиева не са самостоятелни, което е нормално за съвременните трудове в областта на природните науки. Доброто ѝ представяне на проведената предзащита и компетентните отговори на зададените въпроси също доказва отличната ѝ осведоменост и личния ѝ принос в представената разработка.

## **Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Резултатите от изследванията са публикувани в 2 научни статии, едната в *Genetics and Plant Physiology*, а другата в *Physiologia Plantarum* с ИФ 3.52 – безспорно доказателство за актуалността на проблематиката и изследванията на докторантката. Представените публи-

кации напълно отговарят на дисертацията и покриват изискванията на ИФРГ-БАН за допускане до защита на дисертационен труд. Част от резултатите са представени на 4 научни форума.

### **Оценка на автореферата**

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и отразява основните раздели и резултати от дисертационния труд.

### **Заклучение**

Дисертацията на Ралица Георгиева е едно сериозно изследване в областта на молекулярната биология. Докторантката познава литературата по изследвания проблем и отлично я използва. Изследванията са проведени със съвременни молекулярно-биологични подходи, извършена е внушителна по обем експериментална работа и са получени научни резултати с оригинален принос.

Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника за специфичните условия и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИФРГ-БАН.

Ралица Георгиева притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения в областта на Молекулярната биология.

Като член на Научното жури убедено гласувам положително и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен „доктор” на Ралица Георгиева Георгиева по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност 01.06.06 „Генетика”.

05.06.2017 г.

Рецензент:

проф. д-р Катя Георгиева