

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ**



Даниела Миткова Митева

**„Едноклетъчните зелени водорасли като
модел за генотипна устойчивост към
окислителен стрес”**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИЯ
ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“**

**ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „ГЕНЕТИКА”
ШИФЪР 01.06.06.**

Научен ръководител:

проф., д-р Стефка Чанкова

София, 2022

Дисертационният труд е разработен в рамките на свободна докторантура в секция „Мутагенеза от околната среда”, Отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология” към Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен към защита след провеждане на заседание на разширен състав на Колегиума на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“ на 19 юли 2022 г., свикано със Заповед № 63/10.07.2022 на и.д. Директор на ИБЕИ.

Дисертацията съдържа 90 страници текст, 4 таблици и 19 фигури. Списъкът на цитираната литература включва 201 заглавия, от които 7 на кирилица и 194 на латиница. Изследванията, които са включени в дисертационния труд, са проведени в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 10.10.2022г. от 14 ч на открито заседание на Научно жури в състав:

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Румяна Мечева - ИБЕИ, БАН (пенсионер)
2. Доц. д-р Михаела Недялкова - ИБЕИ, БАН - **Председател**

Външни членове:

1. Акад. д.б.н. Атанас Атанасов - Агробιοинститут (пенсионер) - **Рецензент**
2. Проф. д.б.н. Севдалин Георгиев - БФ, СУ „Св. Кл. Охридски” (пенсионер) -

Рецензент

3. Проф. д-р Стефка Чанкова - ИБЕИ, БАН (пенсионер) Материалите по защитата са на разположение на всички интересувачи се в библиотеката на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, София, ул. „Ю. Гагарин“ № 2

Използвани съкращения:

SH-групи - сулфхидрилни групи

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

UV - ултравиолетови лъчи

UV-A - дълговълнови ултравиолетови лъчи

UV-B - средновълнови ултравиолетови лъчи

ЕВР - едноверижни разриви в молекулата на ДНК

ДВР - двойно-верижни разриви в молекулата на ДНК

АКФ - активните кислородни форми

BER - базово-ексцизионна репарация

NER - нуклеотид-ексцизионната репарация

REC - рекомбинативна репарация

NR - хомоложна рекомбинативна репарация

NHEJ - нехомоложна рекомбинативна репарация

CFGE - Constant Field Gel Electrophoresis (Електрофореза в постоянно електрично поле)

HSPs - топлинно-стресовите белтъци

LD - летална доза

ФР - фотореактивация

БФР - „без” фотореактивация

SOD - супероксид дисмутаза

RT - възстановително време

CPD - цикло-бутанови пиримидинови димери

6-4PP - 6-4-фотопродукти

PRS - Сектори на фотореактивация

I. Увод

Използването на моделни тест-системи, различаващи се по своята генотипна устойчивост и прилагането на комплекс от критерии, с различни разрешителни възможности са от съществено значение при изучаване на механизмите, участващи при изработването на стресовия отговор и формирането на генотипната устойчивост на организмите към абиотичен стрес (Badahur et al., 2011; Chankova and Yurina, 2012, 2016; Lipiec et al., 2013; Zinati et al., 2013; Chankova et al., 2014).

Според съвременното ниво на познание множество взаимосвързани и взаимозависими комплексни механизми (Costantini et al., 2013; Gong and Miller, 2019) участват при формирането на клетъчната устойчивост към окислителен стрес. В този род изследвания досега се използват основно устойчиви или чувствителни мутантни щамове, сортове, линии или ГМО организми.

Едноклетъчните зелени водорасли са утвърден модел в изследванията по мутагенеза от околната среда повече от половин век, поради редица свои характеристики - повсеместно разпространени, кратък жизнен цикъл, типичен строеж за еукариотната растителна клетка, хаплоиден геном (рецесивните мутации се проявяват още в първото поколение), средно чувствителни към йонизиращи и УВ лъчения и достатъчно чувствителни към действието на химични вещества, лесни за култивиране и особено подходящи за молекулярни изследвания (Хропова и др., 1964; Ваулина и др., 1967; Шевченко и др., 1967, 1979; Чанкова 2005; Harris 2001; Zaffagnini et al., 2012; Ganapathy et al., 2017; Sasso et al., 2018).

В последно време във фокуса на изследователите са екстремофилни видове и щамове, способни да растат в екстремни условия на средата (високи-ниски температури, засоляване, кисело или алкално рН на средата, високо замърсяване с тежки метали и др.), поради възможността да бъдат използвани като нов ценен източник на биологично активни вещества и като модел за изясняване на адаптивните механизми, осигуряващи живота им в тези екстремни условия (Pattanaik et al., 2008; Wai-Kuan et al., 2016; Barati et al., 2019; Shetty et al., 2019; Abassi et al., 2020; Lafarga et al. 2021; Abiusi et al., 2022).

До този момент, за изучаване на механизмите на генотипната и индуцираната устойчивост в секция «Мутагенеза от околната среда» са използвани щамове от оригинално създадената и охарактеризирана от нас богата колекция от мутантни и

хибридни щамове *Chlorella* и *Chlamydomonas*, различаващи се по своята радио-, хеми- и фото- резистентност (Chankova et al., 2000, 2001, 2002, 2005, 2014),

В настоящия дисертационен труд ние прилагаме нов подход - използване на два екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* и *Chlorella kessleri* мезофилерн вид, лансирайки хипотезата, че „*видове едноклетъчни зелени водорасли от род Chlorella, изолирани от местообитания с различни екстремни условия на живот имат подобни и/или по-ефективни клетъчни механизми на защита, в сравнение с мезофилния щам, поради което са подходяща моделна система за изследване на механизмите, участващи при формирането на генотипната устойчивост към окислителен стрес.*”

II. Цел и задачи

Формулираната по-горе хипотеза определи целта на настоящия дисертационен труд: Да се проучи и сравни генотипната устойчивост на два екстремофилни щама на *Chlorella vulgaris* и *Chlorella kessleri* - мезофилен вид, изолирани от местообитания с екстремни условия на живот към топлинен и UV-B индуциран стрес.

- *Chlorella vulgaris* Antarctic екстремофилен щам, изолиран от почва на остров Ливингстън, Антарктида.
- *Chlorella vulgaris* 8/1 екстремофилен щам, изолиран от минералните извори в района на Рупите, през 1968 г.
- *Chlorella kessleri* мезофилен вид от Trebon collection, Чехия.

За реализирането на целта бяха поставени следните задачи:

1. Да се определи биологичната активност на UV-B лъчи в широк диапазон от дози от 10J/m^2 до 1000J/m^2 при двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и *Chlorella kessleri* мезофилен вид на базата на:
 - Spot - test;
 - Метод на микроколониите;
 - Скорост на растеж (брой удвоени клетки; коефициент на скоростта на растеж).

2. Да се определи генотипната устойчивост на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и *Chlorella kessleri* мезофилен вид към UV-B облъчване на базата на:
- Три степени на леталност - LD₂₀, LD₅₀, LD₈₀;
 - ДНК чувствителност, на базата на индуцираните ДВР в молекулата на ДНК;
 - Репаративен капацитет на базата на:
- ✓ Сектори на фотореактивация;
- ✓ Репарация на ДВР в молекулата на ДНК.
3. Да се определи генотипна устойчивост на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и *Chlorella kessleri* мезофилен вид към температурен стрес на базата на:
- Метод на макроколониите;
 - Конститутивни и индуцирани нива на HSP70B.

III. Материали и методи

Характеристика на използваните видове: За изпълнение на поставените задачи в дисертационния труд са използвани едноклетъчни зелени водорасли от род *Chlorella*, изолирани от различни местообитания, които заемат различни екологични ниши:

- ✓ *Chlorella vulgaris* Antarctic екстремофилен щам, изолиран от почва на остров Ливингстън (предоставена от доц. д-р Ирина Пунева, Институт по Физиология на Растенията и Генетика - БАН);
- ✓ *Chlorella vulgaris* 8/1, екстремофилен щам, изолиран в района на Рупите през 1968 г. и поддържан в нашата колекция;
- ✓ *Chlorella kessleri*, мезофилен вид от Trebon collection (предоставен от доц. д-р Ирина Пунева),

Условия за култивиране на *Chlorella*: Колекцията от видове *Chlorella* е поддържана на хранителна среда Sager-Granick (SG) в епруветки с кос агар (Harris, 1989) в растежна камера *Phytotron* GC 400 с интензивност на осветлението 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и температура $23^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Изследваните видове *Chlorella* са култивирани в течна хранителна

среда TAP (Harris, 1989) при гореспоменатите условия. Залагани са прекултури - клетъчният материал от една епруветка с кос агар е прехвърлян в 30 ml течна TAP среда, които са култивирани 5 дни до получаване на добре развити клетъчни суспензии, които са в края на експоненциална и началото на стационарна фаза.

Индуктури на окислителен стрес:

- ✓ UV-B облъчване ($\lambda = 312\text{nm}$) - използван е апарат BLX-254 (Life Technology, UV crosslinker) в диапазон от дози - 50J, 100J, 250J, 500J и 1000J/m^2 UV-B и **различни експериментални схеми:** варианти „със“ фотореактивация (ФР) - клетките са поставени веднага след облъчването на светло и „без“ фотореактивация (БФР) - след облъчването клетките са поставени на тъмно за 24 часа, за да се предотврати ФР; индуциране и репарация на двойно-верижни разриви в ДНК - облъчените клетки са поставяни за 4 и 24 часа при 23°C на светло и на тъмно на лед.
- ✓ топлинен стрес - използвана е водна баня и следният температурен диапазон - $39^\circ\text{C}/30\text{мин}$, $42^\circ\text{C}/5\text{мин}$, $45^\circ\text{C}/5\text{мин}$ за 2 и 4 часа възстановително време след температурното въздействие;

Използвани методи:

Генотипната устойчивост на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилен вид *Chlorella kessleri* към UV-B индуциран стрес е определяна на базата на взаимно допълващи се по информативност методи:

- Spot-test (Harris E., 1989)
- Метод на микроколониите (Vlcek et al., 1987)
- Скорост на растеж:
 1. Брой удвоени клетки (Harris E., 1989)
 2. Коефициент на скоростта на растеж (Шевченко, 1979)
- Летални дози по метода на Рид и Менч (Лидански Т., 1988).
- Сектори на фотореактивация (Harm, 1968; Serafin et al., 2003; Kiefer, 2012)
- Ниво на индуцирани и репарирани двойно-верижни разриви в ДНК - чрез гелелектрофореза в постоянно електрично поле. За отчитане на количеството индуцирани и репарирани ДВР в ДНК беше модифицирана, по - рано разработената методика за *Chlamydomonas reinhardtii* (CFGE) (Chankova and Bryant, 2002; Chankova et al., 2005). Допълнителната стъпка е разрушаването на клетъчната стена

на видове *Chlorella* със соникатор BANDELIN Sonopuls HD 2070. Параметри за разграждане на клетъчната стена са:

- *Chlorella vulgaris* Antarctic екстремофилен щам - 3 минути 4 цикъла, 75% сила;
- *Chlorella vulgaris* 8/1 екстремофилен щам - 3 минути 4 цикъла, 25% сила.
- *Chlorella kessleri* мезофилен вид - 3 минути, 2 цикъла, 25% сила;

Генотипната устойчивост на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилен вид *Chlorella kessleri* към индуциран температурен стрес е определяна на базата на:

- метод на макроколониите (Шевченко, 1979)
- гел-електрофореза и Western blotting (Chankova et al., 2009; Chankova et al., 2013) за определяне на конститутивните и индуцирани нива на HSP70B.

Анализ на резултатите:

Изчислявани параметри:

- Метод на микроколониите - Клетъчно преживяване (Vlcek et al., 1987)
- Нива на леталност LD₂₀, LD₅₀, LD₈₀ (Т. Лидански, 1988)
- Фракция ДНК, напуснала стартовете (FDR) (Chankova, Bryant, 2002).
- Определяне на конститутивните и индуцираните нива на HSP70B (Chankova et al., 2013/Bioprotocol)
- Статистическа обработка: Всички данни са средни стойности от три независими експеримента. Където не се виждат стандартни грешки, те са равни или по-малки от символите на графиките. За статистическата обработка на данните е използван софтуер GraphPad Prism program, version 6.04 (San Diego, USA) и следните статистически анализи - еднофакторен дисперсионен ANOVA анализ с множество сравнение по метода на Бонферони - за сравнение на резултатите от различни третирания; двуфакторен дисперсионен ANOVA анализ с последващи тестове по метода на Бонферони - за оценяване влиянието на факторите генотип, концентрация на генотиксина и взаимовръзката между тях върху крайния резултат.

IV. Резултати и обсъждане

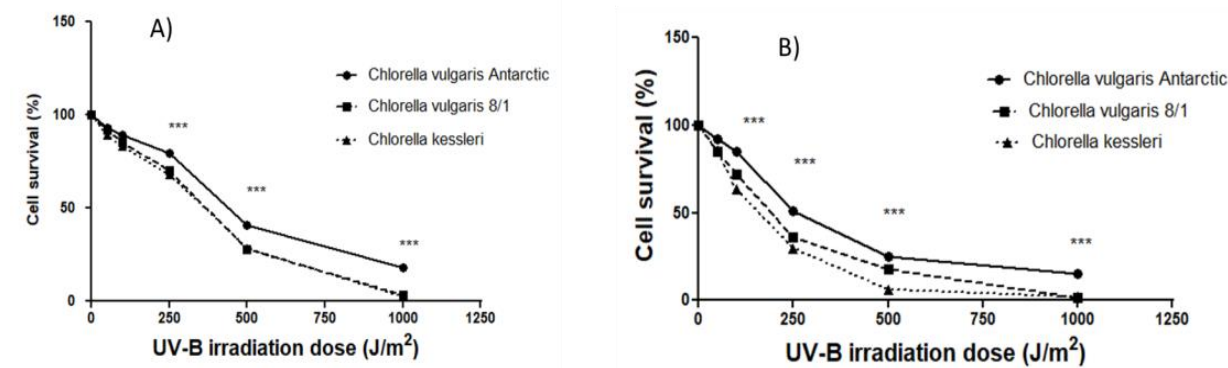
1. Изследване на генотипната устойчивост към UV-B стрес.

1.1 **Spot-test** е използван за определяне на биологично активните дози UV-B в зависимост от генотипа. По интензивността на петната се получава предварителна информация за:

- наличието или отсъствието на генотоксичен ефект;
- чувствителността на генотиповете;

Намаляване на интензитета на петната е наблюдаван при облъчване на екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилния вид *Chlorella kessleri* с дози равни или по-големи от 250J/m^2 в условия на фотореактивация. Два пъти по-висока доза - 500J/m^2 води до леко намаление на интензитета при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic. Като по-добре изразени разлики в отговора бяха наблюдавани в условия без фотореактивация.

1.2 **Клетъчно преживяване след облъчване с UV-B** - Способността на клетките да репарират циклобутановите пиримидинови димери е много важна, тъй като вследствие на това се увеличава и % на преживелите клетки след въздействие с UV-B. Анализират се кривите „доза-преживяване“ при варианти „със“ и „без“ фотореактивация е изключително информативен, за да се определи дали изследваните от нас едноклетъчни зелени водорасли от род *Chlorella* са дефектни или ефективни по отношение на фотоензимната репарация.



Фигура 1 Клетъчно преживяване след UV-B облъчване в условия на фотореактивация (A) и „без“ фотореактивация (B) при *Chlorella vulgaris* Antarctic, *Chlorella vulgaris* 8/1, *Chlorella kessleri*. Средни данни от три независими експеримента. Когато стандартните грешки не се виждат, те са равни или по-малки от символите на графиките. Разликите между двата и *Chlorella kessleri* мезофилен вид са статистически значими *** $p < 0,001$.

На фигура 1A са представени данните от клетъчното преживяване в условия на фотореактивация след UV-B облъчване. Получените резултати показват, че при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и *Chlorella kessleri* мезофилен вид се наблюдава

редуциране на клетъчното преживяване още при облъчване с 250J/m^2 UV-B и при доза 1000J/m^2 - 100% леталност, докато при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic има преживяване макар и с ниска честота.

Получените резултати показват, че всички дози, равни или по-големи от доза 250J/m^2 UV-B предизвикват значително намаляване на клетъчното преживяване, което е най-силно изразено при мезофилния вид *Chlorella kessleri* сравнение с двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1). Данните показват, че *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1 имат по-добре изразена тъмнинна репарация отколкото *Chlorella kessleri* (Фигура 1B).

Нива на леталност - определени са три степени на леталност (LD_{20} , LD_{50} и LD_{80}) за сравняване на устойчивостта на генотипите към различни мутагенни фактори, в нашия случай към UV-B облъчване.

Данните представени на таблица 1 показват, че дозите за екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic са значително по-високи от тези, причиняващи същото ниво на леталност при другия екстремофилен щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилен вид *Chlorella kessleri* в условия фотореактивация. Дозите, които предизвикат трите нива на леталност са приблизително сходни при екстремофилен щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилен вид *Chlorella kessleri*.

Получените резултати при варианти „без“ фотореактивация показват, че за екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилния вид *Chlorella kessleri* дозите, определящи LD_{20} и LD_{50} са сходни.

Може да се предположи, че екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic е по-устойчив на въздействието на UV-B в сравнение с екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилния вид *Chlorella kessleri*.

Сектори на фотореактивация (PRS) са изчислени по три метода - Harm, 1968; Serafin et al., 2003; Kiefer, 2012.

При сравняване на резултатите по Kiefer, 2012 се разкрива, че двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) се характеризират с дозово-зависимо намаляване на величината на PRS. Такава тенденция не е открита за мезофилния вид *Chlorella kessleri*, което дава основание да се предположи, че тъмнинната репарация е слабо изразена и поради тази причина се компенсира от фотореактивацията.

Таблица 1 UV-B дози, определящи нива на леталност

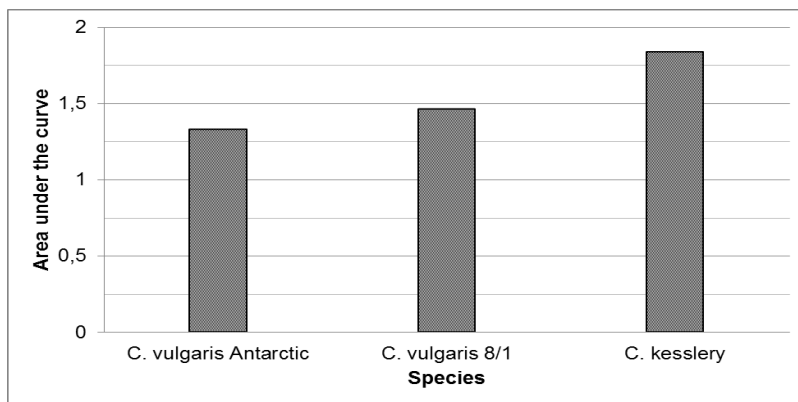
	<i>Chlorella vulgaris</i> Antarctic			<i>Chlorella vulgaris</i> 8/1			<i>Chlorella kessleri</i>		
	J/m ²	DMF	PRS	J/m ²	DMF	PRS	J/m ²	DMF	PRS
(+) PR	239	2.07	0.52	138	2.12	0.53	120	2.03	0.51
(-) PR	113			65			59		
(+) PR	425	1.65	0.40	348	1.98	0.50	343	2.38	0.58
(-) PR	257			175			144		
(+) PR	940	1.32	0.24	627	1.37	0.27	626	1.88	0.47
(-) PR	710			458			333		
Σ PRS		1.16			1.29			1.56	
Average PRS		0.39			0.43			0.52	

Данните са средни стойности от 3 независими експеримента; PHR (+) представлява проби, култивирани при светлина - "със" фотореактивация; PHR (-) - проби "без" фотореактивация; DMF - фактор, модифициращ дозата; PRS - сектор за фотореактивация.

Подобна тенденция (таблица 2) е установена при метода на Harm, 1968. Резултатите показват, че се наблюдава дозово-зависимо намаляване на фотоензимната репарация на двата екстремофилни щамма, изолирани от различни местообитания - *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и приблизително еднакви сектори за всички дози при мезофилния вид *Chlorella kessleri*.

Таблица 2 Сектори на фотореактивация по Harm, 1968

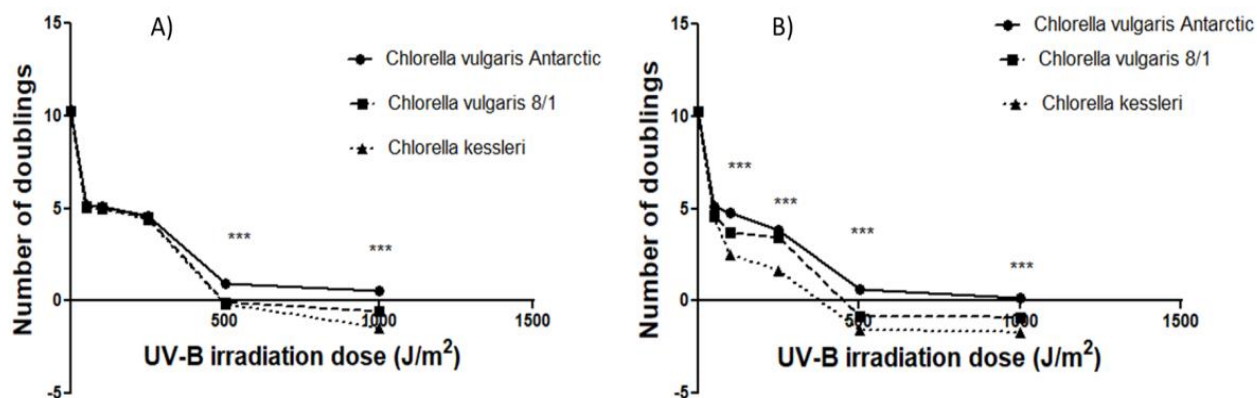
	LD ₂₀	LD ₅₀	LD ₈₀
<i>Chlorella vulgaris</i> Antarctic	0,590	0,393	0,252
<i>Chlorella vulgaris</i> 8/1	0,540	0,493	0,275
<i>Chlorella kessleri</i>	0,525	0,575	0,472



Фигура 2 Секторите на фотореактивация са представени като площ под кривата Serafin, 2003.

PRS изчислени като площ под кривата показват, че за мезофилния вид *Chlorella kessleri* е по-голям, докато за двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) са приблизително еднакви.

Скорост на растеж - резултати показват, че при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилния вид *Chlorella kessleri*, дози от 500 и 1000J/m² предизвикват необратими повреди, които водят до клетъчна смърт. Получена е статистически значима корелация между преживяването на клетките и скоростта на растеж за екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилния вид *Chlorella kessleri* - съответно 0.895 и 0.912. За екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic при условия на фотореактивация способността на удвояване на клетките при дози от 500 и 1000J/m² е силно намалена.



Фигура 3 Скорост на растеж, изчислена като брой удвоени клетки в условия "със" (А) и "без" (В) фотореактивация. Данните са средни стойности от 3 независими експеримента. Когато стандартните грешки не са видими, те са равни или по-малки от символите, *** p < 0,001.

В условия „без“ фотореактивация при доза 250J/m² се наблюдава намаляване на броя удвоените клетки при мезофилния вид *Chlorella kessleri*, при 500 и 1000J/m² се наблюдава клетъчна смърт екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и при мезофилния вид *Chlorella kessleri*. Най-добър потенциал за възстановяване на клетъчната популация след UV-B облъчване притежава екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic (фигура 3В). При условия „без“ фотореактивация по UV-B устойчивост едноклетъчните зелени водорасли от род *Chlorella* могат да бъдат подредени:

Chlorella vulgaris Antarctic > *Chlorella vulgaris* 8/1 > *Chlorella kessleri*.

Получена е статистически значима корелация между клетъчното преживяване и скоростта на растеж за *Chlorella kessleri* - 0.914.

Получените резултати за коефициент на скоростта на растеж на Шевченко, 1979. Данните, представени в таблица 3, илюстрират същата тенденция, описана по-горе.

При дози 500 и 1000J/m² има необратимо блокиране на клетъчното делене при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1 и мезофилния вид *Chlorella kessleri*, докато при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic делителната способност на клетките не е напълно блокирана.

Таблица 3 Скорост на растеж при варианти "със" (+) и "без" (-) фотореактивация.

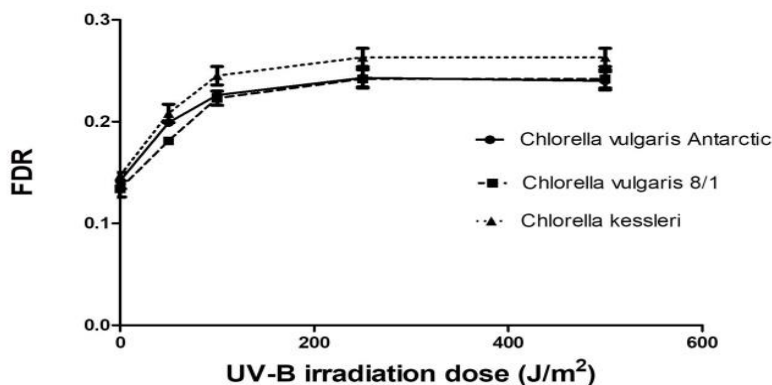
Doses	<i>Chlorella vulgaris</i> Antarctic		<i>Chlorella vulgaris</i> 8/1		<i>Chlorella kessleri</i>	
	PHR (+)	PHR (-)	PHR (+)	PHR (-)	PHR (+)	PHR (-)
control	2,38	2,37	2,30	2,29	2,28	2,20
50J/m ²	1,19	1,18	1,18	1,08	1,16	1,05
100J/m ²	1,18	1,10	1,16	0,85	1,14	0,58
250J/m ²	1,06	0,89	1,05	0,80	1,03	0,39
500J/m ²	0,22	0,15	-0,02	-0,19	-0,04	-0,36
1000J/m ²	0,13	0,03	-0,13	-0,21	-0,34	-0,39

Данните са средни стойности от 3 независими експеримента. Когато стандартните грешки не се виждат, те са равни или по-малки от символите на графиките. Разликите са статистически значими *** p < 0,001.

Ниво на индуцирани и репарирани двойно-верижни разриви в ДНК след облъчване с UV-B.

Отчитане на ДВР веднага след облъчване с UV-B. ДВР индуцирани от UV-B в дозов диапазон 50-500J/m², са представени на **фиг. 4**, двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* реагират на UV-B облъчване

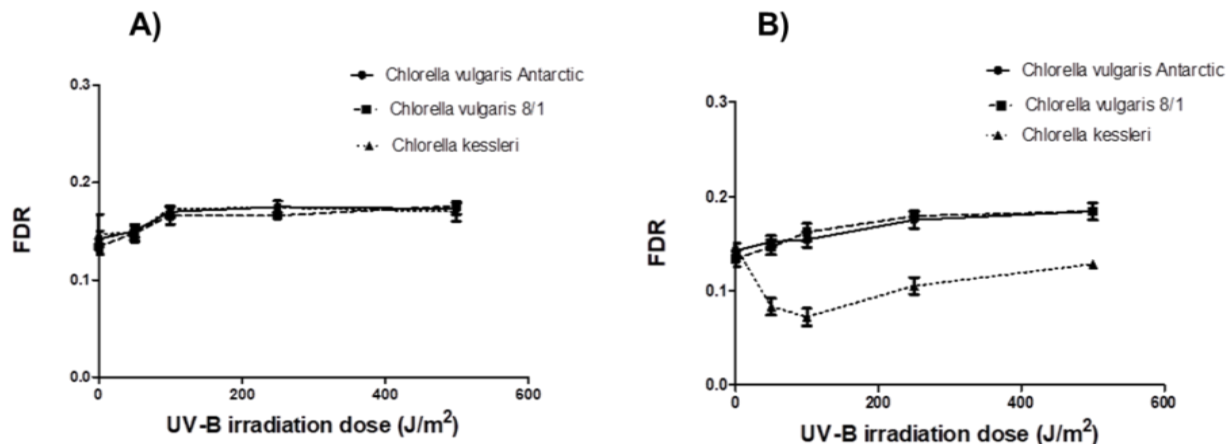
по сходен начин до доза 250J/m^2 . Докато дози, по-високи от 250J/m^2 , водят до образуването на плато. Двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1), изолирани от различни местообитания реагират на UV-B облъчване по подобен начин - приблизително същите, по-ниски нива на ДВР са измерени в мезофилния вид *Chlorella kessleri*.



Фигура 4 Индукция на ДВР след облъчване с UV-B в диапазона $50\text{-}500\text{J/m}^2$. Данните са средни стойности от три независими експеримента. Когато стандартните грешки не се виждат, те са равни или по-малки от символите на графиките.

Отчитане на ДВР след 24 часа възстановително време. Резултатите показват, че 23°C на светло (фигура 5А), двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* възстановяват част индуцираните ДВР от UV-B.

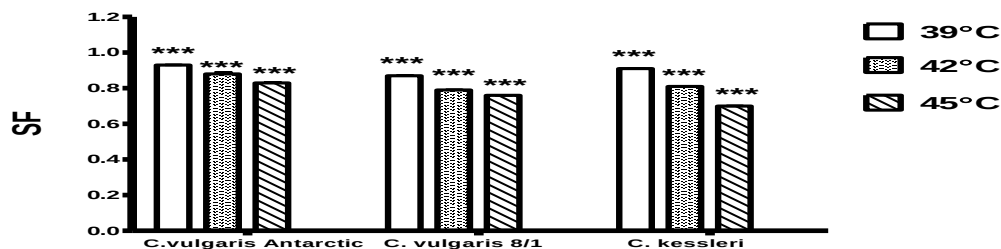
В условия на тъмно и на лед (фигура 5В), двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) по сходен начин репарират ДВР, докато мезофилния вид *Chlorella kessleri* показва много ниски нива на репарация на ДВР. На база корелационен анализ може да се предположи, че ниските нива на ДВР, измерени след 24 часа възстановително време В условия на тъмно и на лед, са резултат от огромна фрагментация на ДНК, а не от по-висок капацитет за възстановяване.



Фигура 5 Репаративен капацитет на ДВР след 24 часа възстановително време при: (А) оптимални условия (светлина, стайна температура); (Б) неблагоприятни условия (тъмно, върху лед). Данните са средни стойности от три независими експеримента. Когато стандартните грешки не се виждат, те са равни или по-малки от символите на графиките.

Изследване на генотипната устойчивост към температурен стрес.

Първата стъпка за определяне на ефекта на топлинния стрес е: анализиране на клетъчното преживяване (SF) на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* след третирането при 39°C/30 минути и 42°C/5 минути. Получените данни показват, че температури 39°C/30 минути и 42°C/5 минути не предизвикат силен температурен стрес, докато 45°C/5 минути предизвиква температурен стрес, който е най-добре изразен при мезофилния вид *Chlorella kessleri*.



Фигура 6 Клетъчно преживяване след температурен стрес. Данните са от три независими експеримента. Когато стандартните грешки не се виждат, те са равни или по-малки от символите на графиките. Разликите между *Chlorella vulgaris* Antarctic и другите два вида са статистически значими *** $p < 0.001$.

Няма статистически значима разлика между конститутивните нива на HSP70B при мезофилния вид *Chlorella kessleri* и екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* 8/1, най-високото съдържание е измерено при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic, което е около 30% по-високо. За да се изясни дали високото съдържание конститутивните нива на HSP70B в екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic се дължи на генотипа или температурните условия на култивиране (23°C), двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* се култивират и при 8°C в продължение на 12 часа. При тези експериментални условия съдържанието на конститутивните нива на HSP70B е много подобно на това, измерено, при 23°C. Установено е, че екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic има добре изразена продукция на HSP70B както при 23°C, така и 8°C (127% -135%).

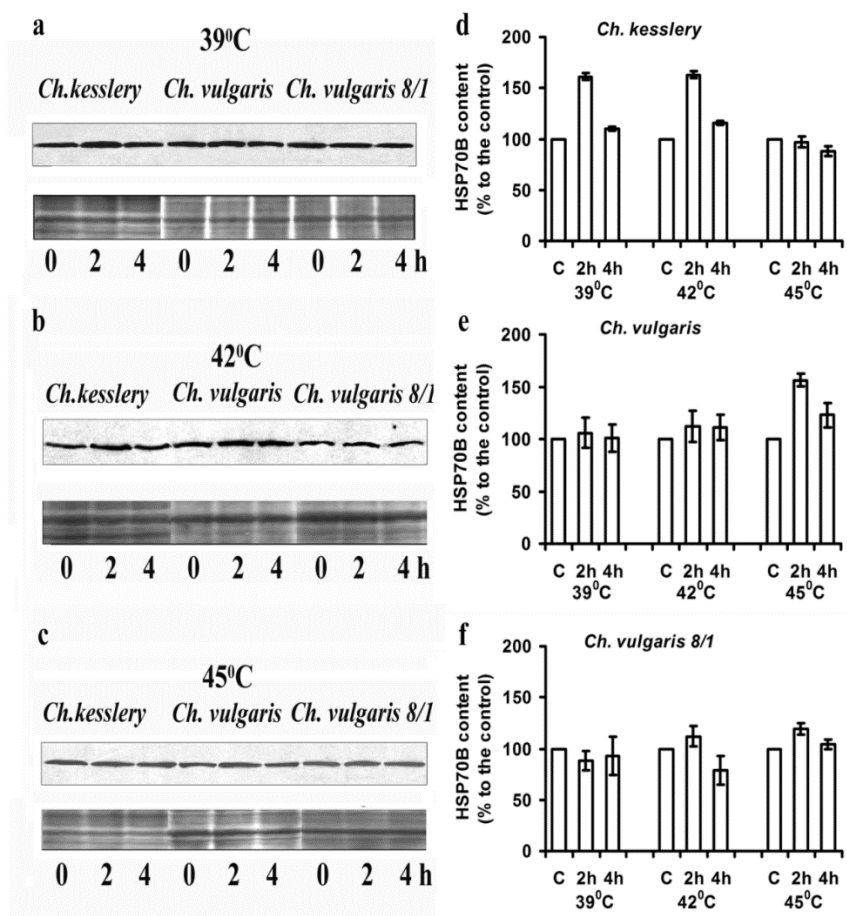
Таблица 4 Топлинно-стресови белтъци. Конститутивни нива. Относително съдържание (относителни единици) на HSP70B.

	HSP70B при 23°C	%	HSP70Bпри 8°C	%
<i>Chlorella kessleri</i>	399,8±9.86	101	420±2	107
<i>Chlorella vulgaris</i>	499,3±7	127	529±6	135
<i>Chlorella vulgaris</i> 8/1	392±19.45	100	391±4	100

Данните са от 3 независими експеримента (P < 0.05).

Получените резултати от Western blotting показат, че 39°C не предизвиква промени в нивото на HSP70B в двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) в сравнение с нивата на HSP70B в контролните варианти, в които не са били подложени на температурен стрес (култивиране при 23°C). Единствено мезофилния вид *Chlorella kessleri* реагира на тази температура с приблизително 60% увеличение на нивото HSP70B. Подобен ефект се наблюдава след третиране с 42°C/5 минути. Съдържанието на HSP70B при мезофилния вид *Chlorella kessleri* при третиране с 45°C/5 минути не се променя, докато при двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (Antarctic и 8/1) се променя (съответно 55% и 20%). По отношение на кинетиката на натрупването на HSP70B,

максималното наблюдавано количество е на 2 час. На 4 час съдържанието на HSP70B е като в контролните варианти или по-ниско.



Фигура 7 Сравнение нивото на HSP70B при видове *Chlorella* след топлинен стрес: 39°C/30 минути; 42°C/5 минути; 45°C за 5 минути.

Обобщено резюме на получените резултати

Според съвременното схващане, по време на еволюцията живите организми са развили редица защитни клетъчни механизми (по-ефективни системи на репарация на ДНК индуцирани повреди, по-висока ефективност на ензимната и не-ензимната антиоксидантна и шаперонна система, стабилност на клетъчната мембрана, по-добра осморегулация, индуциране на определени кинази и др (Chankova et al., 1994; Al-Whaibi, 2011; Dimova et al., 2008, 2009; Wahid et al., 2007; Fulda et al., 2010; Guan et al., 2017; Matarredona et al., 2020), които позволяват на клетките/организмите да се справят с абиотичия стрес,

предизвикан от присъстващи в околната среда химични и/или физични фактори с естествен или антропогенен произход (Iqbal Z et al., 2021).

В настоящата дисертационна разработка беше получена нова информация относно приноса на две защитни системи - ДНК репаративната и шаперонната при формирането на генотипната устойчивост.

По-ранни изследвания в нашата лаборатория, разкриха приноса на редица критични събития в клетката за формирането на генотипната устойчивост на едноклетъчните зелени водорасли към окислителен стрес - по-ефективна репарация на едноверижни и двойноверижни разриви в молекулата на ДНК (Chankova et al., 1994, 2000; Dimova et al., 2008, 2009), по-високи конститутивни нива на SOD, SH-групи, каротеноиди и хлорофил "a" (Chankova et al., 1990, 2000), стабилност на ултраструктурните компоненти и/или наличие на клетъчна стена (Chankova et al., 2000). Не може да бъде изключена ролята и на други важни фактори - хроматиновата структура, мутациите, клетъчния цикъл, дефектната апоптоза, увеличените нива на HSPs (Bao et al., 2006; Chalmers, 2007; Stasser et al., 2007; Fulda et al., 2010; Matarredona et al., 2020) и др.

Като модел в изследванията на генотипната устойчивост най-често се използват мутантни щамове *Chlorella* и *Chlamydomonas*, различаващи се по своята радио- и/или хеми-чувствителност или ГМО щамове/организми (Chankova et al., 2000; Ahanger MA et al., 2017).

В настоящия дисертационен труд ние приложихме принципно нов подход - използвахме едноклетъчни зелени водорасли, изолирани от хабитати с контрастни условия, лансирайки хипотезата, че ***едноклетъчни зелени водорасли от род Chlorella, изолирани от местообитания с различни екстремни условия на живот имат подобни и/или по-ефективни клетъчни механизми за защита и биха могли да се използват като подходяща моделна система в изследванията на механизмите, участващи във формирането на генотипната устойчивост към окислителен стрес.***

Формулираната по-горе хипотеза определи **целта** на настоящия дисертационен труд: **Да се проучи и сравни генотипната устойчивост на два екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic), изолирани от местообитания с екстремни условия на живот и *Chlorella kessleri* мезофилен вид към температурен и UV-B индуциран стрес.**

За изпълнение на така формулираната цел беше използван широк методичен инструментариум от микробиологични и молекулярни подходи: фракция на преживелите клетки, темп на нарастване на популацията, ефективност на три системи на репарация - фотореактивация, тъмнинна репарация, репарация на двойно-верижните разриви и кинетиката на индуцираните HSP70B.

Индукцията на топлинно-стресовите белтъци в резултат на абиотичен стрес е неспецифичен феномен, който има отношение към клетъчната хомеостаза в оптимални и стресови условия (Wang et al., 2004) и допринася за формирането на термотолерантността и устойчивостта към други стресови фактори (Shen and Lee, 1997; Xu и Huang, 2010; Bavita Asthir, 2015). През последните десетилетия HSPs се считат за много стабилни кандидати като „маркери за ранно предупреждение“ на предизвикан от околната среда и различни замърсители стрес, защото те могат да се активират бързо в резултат на токсично излагане при концентрации под летална доза (Monari et al., 2011).

Поради презумпцията, че екстремофилните щамове, вероятно се различават от мезофилните видове по механизмите си на защита (Pattanaik et al., 2008; Wai-Kuan et al., 2016; Barati et al., 2019; Shetty et al., 2019; Abassi et al., 2020; Lafarga et al., 2021; Abiusi et al., 2022;) и може би се характеризират с различни свойства на HSPs, отколкото космополитите (Wiencke, 1991; Brennecke et al., 1998; Tomanek, 2002; Shatilina et al., 2011), ние изследвахме два екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* и *Chlorella kessleri* мезофилен вид, които се различават по техните местообитания и температурни предпочитания - *Chlorella vulgaris* 8/1 - термофилен, *Chlorella kessleri* - мезофилен и *Chlorella vulgaris* Antarctic - екстремофилен.

Нашето изследване показва, че температурният стрес, в диапазона 39°-45°C води до известно намаляване на клетъчното преживяване и промени в количествата на HSP70B при двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и *Chlorella kessleri* мезофилен вид, които реагираха по различен начин: за *Chlorella kessleri* синтезата на HSP70B беше инхибирана, за *Chlorella vulgaris* 8/1 имаше леко повишена HSP70B индукция, а при екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic производството на HSP70B беше силно завишено. Измерените приблизително с 30% по-високи конститутивни нива на HSP70B в *Chlorella vulgaris* Antarctic в сравнение с тези, измерени при *Chlorella vulgaris* 8/1 и *Chlorella kessleri* са в подкрепа на хипотезата за функционалните свойства на HSP70B и

ключовата им роля като еволюционно фиксиран фактор, участващ във формирането на устойчивостта на растенията към термален стрес (Huang and Xu, 2008; Timperio et al., 2008). Според Malanga et al., 2008; Nedeva and Puneva, 2009 екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic се характеризира и с повишената активност на ензимната антиоксидантна система - супероксиддисмутаза и каталазата при високи температури в сравнение с други щамове.

Резултатите от проведените изследвания позволяват да се направят няколко важни обобщения: свръхпродукцията на HSP70B може да се охарактеризира като краткотрайна реакция на стрес, тъй като е най-силно изразена 2 часа след температурния стрес. Вероятно, по-високото конститутивно съдържание и добре изразеното свръхпроизводство на HSP70B са един от вероятните механизми, позволяващи на екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic, да оцелява в екстремните условия на Антарктида.

С оглед проверка на нашата хипотеза, че водораслите изолирани от местообитания с екстремни условия на живот биха имали подобни и/или дори по-ефективни клетъчни защитни механизми ние сравнихме капацитета на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и мезофилен вид *Chlorella kessleri* да репарират повредите в ДНК, индуцирани от UV-B облъчване.

Основният аргумент за използването на UV-B в настоящето изследване беше нарастващата му роля като екологичен фактор, в резултат на настъпилите климатични промени и засилената антропогенеза, която води на изтъняване на „озоновия екран” и пропускането на все по-мощни потоци UV-B и UV-A.

Предимствата на едноклетъчни зелени водорасли като моделен обект бяха дискутирани в литературния обзор. От друга страна трябва да се посочи, че микроводораслите са особено важни в два аспекта - екологичен и икономически, като основни източници на хранителни добавки и пигменти (Lai et al., 2019).

До момента, много надеждно е предоставена информация относно увреждащите ефекти на UV/UV-B върху растежа, развитието и фотосинтетичния апарат на микроводораслите и растенията (Pessoa, 2012; обсъждано в Apostolova et al., 2014; Ganapathy et al., 2017). Има данни за разлики в реакцията на микроводораслите в зависимост от интензивността на UV-облъчването (Pessoa, 2012) и спецификата на местообитанията (обсъдени в Apostolova et al., 2014).

Известно е, че UV-B облъчването, пряко или чрез генерираните АКФ може да предизвика различни видове ДНК повреди - цикло-бутанови пиримидинови димери (CPD) и 6-4-фотопродукти (6-4PP), ДНК/ДНК и ДНК - белтък съшивания (crosslinks), еднOVERижни разриви (EBP) и двойнOVERижни (ДВР), които водят до нарушаване на структурата на ДНК и на процесите на транскрипция и репликация (Lesser, 2008; Rastogi et al., 2010; Rastogi et al, 2020). Смята се, че типът на индуцираните повреди зависи от химичната природа на базите и тяхната последователност в молекулата на ДНК (съдържанието на G:C), конформацията на ДНК, дължината на вълната, кондензацията на хроматина и др (Kciuk et al., 2020).

Все още въпросът за възникане на еднOVERижните и двойнOVERижните разриви в молекулата е ДНК не е напълно изяснен. Според Wakasugi et al. 2014, EBP и ДВР се образуват по-скоро като следствие от опита за възстановяване на увредена база, по зависим от ДНК - NER начин (Wakasugi et al. 2014), а според други автори двойнOVERижните разриви се реализират по време на репликацията в резултат от нерепарирани от BER еднOVERижни разриви или нерепарирани по време на фотореактивацията и тъмнинната репарация пиримидинови димери и други фотопродукти, възпрепятстващи репликацията поради „колапс на репликационната вилка“ (Rastogi et al., 2010; Marabini et al., 2020).

Фотоповреди, причинени от UV-B облъчване, могат да бъдат възстановени с помощта на редица механизми за репарация на ДНК, включително фотореактивация, нуклеотид-ексцизионна репарация (NER), базова-ексцизионна репарация (BER), хомоложна (Homologous Recombination Repair - HR) и нехомоложна рекомбинативна репарация (Non-Homologous End Joining (NHEJ) и др (Mpoloka, 2008; Gill et al, 2015; Jones and Baxter, 2017; Yin et al, 2017; Kciuk et al., 2020).

Първа стъпка за оценка на генотипната устойчивост на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* да се определи фракцията на преживелите клетки и скоростта на растеж след облъчване с поредица от UV-B дози в условията на фотореактивация („светлинна репарация“) и „без“ фотореактивация, имайки предвид, че фотореактивацията е много стар, еволюционно разработен механизъм на възстановяване на UV-индуцирани повреди - CPD или (6-4)PP (Jones and Baxter, 2017). Анализирайки дозите, предизвикващи три степени на леталност

беше установена междувидова разлика в чувствителността на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* - *Chlorella vulgaris* Antarctic беше значително по-устойчива към UV-B облъчване в сравнение с *Chlorella kessleri*. Нашите резултати потвърждават тези на Pessoa (2012), където изолатите на морското микроводорасло *Chattonella marina* (Raphidophyte) от Австралия проявяват по-висока толерантност към висока интензивност на видимата светлина в сравнение с тази на *C. marina*, от водите около Япония.

Анализирайки размерите на секторите на фотореактивация, определени като „площ под кривите“ във вариантите „със“ и „без“ фотореактивация може да се направи обобщението, че двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* (8/1 и Antarctic) и мезофилния вид *Chlorella kessleri* имат ефективни фото- и тъмнинна репарация, като при мезофилния вид *Chlorella kessleri* фотореактивацията е по-добре изразена в сравнение с тъмнинна репарация. Сравнявайки устойчивостта към UV-B, определена на база три степени на леталност при условия „със“ и „без“ фотореактивация двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* и мезофилен вид *Chlorella kessleri* се подреждат по следния начин:

Chlorella vulgaris Antarctic > *Chlorella vulgaris* 8/1 ~ *Chlorella kessleri*

В настоящата работа бяха отчетени сходни нива на спонтанно възникналите ДБР, в *Chlorella vulgaris* 8/1 и *Chlorella vulgaris* Antarctic), и мезофилния вид *Chlorella kessleri*. При нивата на ДБР, индуцирани от различни дози UV-B, не се откриват разлики, което означава, че се наблюдава сходна ДНК чувствителност, от което може да се предположи, че генотипната устойчивост е по-скоро свързана с репаративния капацитет, отколкото с нивото на първично индуцираните повреди.

Нашето проучване предостави нова информация относно ДНК увреждащия потенциал на UV-B. Облъчването с UV-B в използвания от нас диапазон от дози води до индукция на ДБР в двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* и мезофилния вид *Chlorella kessleri*. Установено е ускоряване на репарацията на ДБР, когато времето за възстановяване е 4 или 24 часа (RT/светлина). Не е получена статистически значима разлика между репаративния капацитет и продължителността на времето за възстановяване.

Когато клетките бяха 4 или 24 часа (RT/тъмно върху лед) репарацията на индуцираните ДВР беше частична за двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1. Установено беше, че и двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1 изразяват подобен репаративен капацитет. Интригуващо е, че същите експериментални условия предотвратяват в пълен обем възстановяването на ДВР, индуцирани от UV-B в мезофилния вид *Chlorella kessleri*.

За съжаление, проведените от нас изследвания, не предоставят информация за механизмите, участващи в репарацията на реализираните двойно-верижни разриви. Допълнителни изследвания, с включването на специални инхибитори, биха допринесли за изясняването на този въпрос, но той не беше предмет на настоящето изследване.

В резултат от настоящето изследване са получени нови експериментални доказателства, че UV-B облъчването може да предизвика ДВР в ДНК.

Нашата констатация, че двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1 притежават добре изразен репаративен капацитет за отстраняване на UV-B индуцирани ДВР в молекулата на ДНК и активна фотореактивация, както и високи конститутивни нива на топлинно-стресви белтъци (HSP70B) би могла да допринесе за по-доброто разбиране на механизмите на формиране на генотипната устойчивост към абиотичен стрес при този едноклетъчен моделен обект.

Изводи

1. На базата на „spot test” е установен диапазонът на биологично активните дози UV-B за двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* и мезофилния вид *Chlorella kessleri*: за *Chlorella vulgaris* 8/1 и *Chlorella kessleri* интензитетът на петната започва да намалява след облъчване с доза от 250J/m^2 , докато два пъти по-висока доза - 500J/m^2 води до леко намаляване на интензитета на петната на *Chlorella vulgaris* Antarctic.
2. На базата на три степени на леталност е установена разлика в устойчивостта на двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* и мезофилния вид *Chlorella kessleri* към UV-B индуциран и температурен стрес:

Chlorella vulgaris Antarctic > *Chlorella vulgaris* 8/1 >~ *Chlorella kessleri*.

3. Двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1 имат ефективни фотоензимна и тъмнинна репарации, докато мезофилният вид *Chlorella kessleri* се характеризира с по-ефективна фотореактивация в сравнение с тъмнинната репарация.
4. По отношение на UV-B индуцираните ДБР отново двата екстремофилни щама *Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1 показват сходен репаративен капацитет, като нивата на UV-B индуцираните ДБР в молекулата на ДНК нарастват с увеличаване на използваната доза.
5. На базата на комплекс от микробиологични и молекулни методи за устойчивост (преживяване, скорост на растеж, нива на индуцирани и репарирани ДНК повреди, индукция на HSP70B) е установено, че екстремофилният щам *Chlorella vulgaris* Antarctic, изолирана от почва на о-в Ливингстон има най-висок капацитет да преодолява UV-B индуциран и температурен стрес.
6. Установено е, че температурният преход от 42°C до 45°C е стресиращ фактор за трите изследвани таксона, но води до различна реакция при всеки от тях: при мезофилния *C. kessleri* синтезата на HSP70B е подтисната, а при сравнение с контролата двата щама на *C. vulgaris* показват различни нива на HSP70B (при термофилния *Chlorella vulgaris* 8/1 нивата на HSP70B са леко завишени, докато при екстремофилния *Chlorella vulgaris* Antarctic производството на HSP70B е по-силно повишено).

Приноси

Получените данни помагат за изясняване на механизмите, участващи при формирането на:

- генотипната устойчивост;
- специфичната роля на HSP70B;
- използването на HSP70B като „early-warning“ маркер

Според приносния си характер представените резултати оформят следните групи:

А. Приноси с оригинален характер:

1. Едноклетъчни зелени водорасли от род *Chlorella* (*Chlorella vulgaris* Antarctic и *Chlorella vulgaris* 8/1), изолирани от местообитания с екстремни условия на живот, са развили подобни стратегии за преодоляване на температурен и UV-B индуциран стрес и се характеризират с по-ефективни шаперонна и ДНК репаративни системи. Получената информация е принос към теорията за механизмите, участващи в изработването на генотипната устойчивост.
2. По-високото конститутивно съдържание и добре изразеното свръхпроизводство на HSP70B са едни от най-вероятните фактори, които позволяват на екстремофилния щам *Chlorella vulgaris* Antarctic да оцелее в екстремните антарктически условия. Получената информация е принос към хипотезата за функционални свойства на HSP70B като механизъм за формиране на термотолерантността при растителни видове.

Б. Приноси с потвърдителен характер

1. Получените данни, че UV-B лъчите могат да индуцират ДВР са принос при изясняване на механизмите на действие на UV-B.

В. Оригинални приноси с методичен характер:

1. Оптимизиран е протокол за измерване нивата на двойноверижни разриви в ДНК чрез CFGE при род *Chlorella*, който включва допълнително разграждане на клетъчната стена със сонификатор BANDELIN Sonopuls HD 2070. За всеки от изследваните екстремофилни щамове *Chlorella vulgaris* и мезофилен вид *Chlorella kessleri* са определени параметрите за разграждане на клетъчната стена:
 - *Chlorella vulgaris* Antarctic - 3 минути, 4 цикъла, 75% сила;
 - *Chlorella vulgaris* 8/1 - 3 минути, 4 цикъла, 25% сила;
 - *Chlorella kessleri* - 3 минути, 2 цикъла, 25% сила.
2. Свръх производството на HSP70B може да се използва като бърз маркер за оценка на температурния стрес, индуциран при еноклетъчните зелени водорасли от род *Chlorella*.

Списък на публикациите по дисертационния труд

1. Stephka Chankova, Zhana Mitrovska, **Daniela Miteva**, Yulia P. Oleskina, Nadezhda P. Yurina (2013). Heat shock protein HSP70B as a marker for genotype resistance to environmental stress in *Chlorella* species from contrasting habitats. *Gene* 516, 184-189, IF 2,196; Q1 (Scopus)
2. **Miteva, D**, Mitrovska Z., Chankova, S. DNA damaging effect of UV-B in different *Chlorella* genotypes. Seminar of Ecology -2015 with international participation, ФАРАГО, 2016, ISBN:979-853-476-132-4, 158-160
3. **Miteva, D**, Todorova, T, Chankova, S. How *Chlorella* species isolated from contrasting habitats respond to UV-B induced stress? *Ecologia Balkanica*, Special edition 3, 19 - 30, 2020, SJR (Scopus):0.13, Q4 (Scopus)

Списък на цитиранията

Chankova, S, Mitrovska, Z, **Miteva, D**, Oleskina, Y, Yurina, N. Heat shock protein HSP70B as a marker for genotype resistance to environmental stress in *Chlorella* species from contrasting habitats. *Gene*, 516, 1, Elsevier, 2013, 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.052>, IF: 2.196.

Цитира се в:

1. An, L. H., Lei, K., & Zheng, B. H. (2014). Use of heat shock protein mRNA expressions as biomarkers in wild crucian carp for monitoring water quality. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(1), 248-255.
2. Beruto, D. T., Lagazzo, A., Frumento, D., & Converti, A. (2014). Kinetic model of *Chlorella vulgaris* growth with and without extremely low frequency-electromagnetic fields (EM-ELF). *Journal of biotechnology*, 169, 9-14.
3. Майстренко, Татьяна Анатольевна, and Елена Сергеевна Белых. "Токсическое действие урана на пресноводную водоросль *Chlorellavulgaris*." *Вестник института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН* 2 (2014): 34-38.

4. Maute, K., French, K., Legge, S., Astheimer, L., & Garnett, S., Condition index monitoring supports conservation priorities for the protection of threatened grass-finch populations. *Conservation Physiology*, 3(1), 2015, cov025. [Линк](#)
5. Lyubenova, Mariyana, and Silvena Boteva. "Biotests in ecotoxicology: current practice and problems." *Toxicology-New Aspects to This Scientific Conundrum*. IntechOpen, 2016.
6. Yong, Wai-Kuan, et al. "Response of microalgae in a changing climate and environment." *Malaysian Journal of Science* 35.2 (2016): 169-191.
7. Wai-Kuan Yong, Yong-Hao Tan, Sze-Wan Poong, and Phaik-Eem Lim. Response of microalgae in a changing climate and environment. *Malaysian Journal of Science* 35 (2): 167-187, 2017. [Линк](#)
8. Barati, B., et al. "Green algal molecular responses to temperature stress." *Acta Physiologiae Plantarum* 41.2 (2019): 26. [Линк](#)
9. Choi, Yoon Young, et al. "Autotrophic Biodiesel Production from the Thermotolerant Microalga *Chlorella sorokiniana* by Enhancing the Carbon Availability with Temperature Adjustment." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 24.1 (2019): 223-231. [Линк](#)
10. Abassi, Sofia, Hui Wang, and Jang-Seu Ki. "Molecular cloning of heat shock protein 70 and HOP from the freshwater green algae *Closterium ehrenbergii* and their responses to stress." *Cell Stress and Chaperones* (2020): 1-7.
11. Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., Khan, K.A. & Li, S. "Health and environmental effects of Heavy metals." *Journal of King Saud University-Science* (2021): 101653. [Линк](#)

Списък на участията в научни форуми, отразяващи изследванията по дисертацията

Доклад Daniela Miteva, Zhana Mitrovska, Stephka Chankova.
 DNA damaging effect of UV-B in different *Chlorella* genotypes.
 „Seminar of Ecology - 2015 with international participation Proceedings“, 23 - 25 April 2015,
 Sofia, Bulgaria

Доклад Daniela Miteva, Teodora Todorova, Stephka Chankova. How *Chlorella* species respond to UV-B induced stress. International Seminar of Ecology - 2020, Dedicated to the 10th Anniversary of IBER-BAS, On-line Seminar 23 - 24 April 2020 Sofia, Bulgaria

Unicellular green algae as a model for genotype resistance to oxidative stress



Daniela Mitkova Miteva

PhD Thesis, Sofia, 2022

Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences

2 Gagarin Street, 1113 Sofia, Bulgaria

Supervisor: Prof. Stephka Chankova, PhD

Summary

Relevance of the problem: Mechanisms involved in the formation of genotypes' resistance to abiotic stress are of great importance for better understanding the processes involved in the formation of a genetic elite of populations and radio-chemo-therapy. The common strategy is to use resistant or sensitive mutant strains, lines, or GMO organisms. Recently, scientists have focused on extremophiles species and strains growing in extreme environmental conditions (high-low temperatures, salinity, acidic or alkaline pH of the environment, high pollution with heavy metals, etc.), speculating that these organisms could be used to clarify the adaptive mechanisms giving them the chance to survive in various extreme conditions.

Based on this here, a new approach was applied: two extremophilic strains of *Chlorella vulgaris* - *C.vulgaris* Antarctic, isolated from the soil of Livingstone Island, Antarctic, and *C.vulgaris* 8/1, isolated from hot spring in the Rupite region, and *C.kessleri* as a control mesophylic strain.

For more than 50 years unicellular green algae Chlorella is a robust model for different studies in the field of physiology, genetics, environmental mutagenesis, biophysics, and biochemistry because it is widespread photoautotrophic eukaryotes with typical plant cell structure, and genome organization so that the results could be extrapolated to higher plants; single-cell organisms so that the response of a single cell is equivalent to the response of an

individual organism; with a haploid genome so that the induced recessive mutations are revealed in the first generation, short life cycle and routine inexpensive laboratory cultivation techniques, very appropriate for molecular studies.

Hypothesis: The unicellular green algae of the genus *Chlorella* isolated from habitats with different extreme environmental conditions would have similar and/or more efficient cellular defense mechanisms compared to mesophilic strain and could be used in the future as a good model for studying the mechanisms involved in the formation of genotype's resistance to oxidative stress

Main results: Results presented here illustrate that taxons investigated by us differ in their cell survival, growth rate, photoreactivation, and dark repair, as well as in their DNA double-strand breaks repair capacity and constitutive and induced levels of HSP70B. Both extremophilic strains *Chlorella vulgaris* Antarctic and *Chlorella vulgaris* 8/1, isolated from habitats with very different environments (one of them isolated from the soil in Antarctic and strain 8/1 isolated from a hot spring) have developed very similar defense mechanisms. These strains possess high constitutive and induced levels of heat shock proteins (HSP70B), as well as they are photo- and dark repair proficient, with a good capacity to repair DSBs, induced in DNA after UV-B irradiation. The mesophilic *Chlorella kessleri* is probably with impaired dark repair and with a high level of DNA susceptibility to UV-B irradiation, measured as DSBs. On the other hand, using a complex of microbiological and molecular methods (survival, growth rate, levels of induced and repaired DNA damage, induction of HSP70B) some differences were found between responses of the both extremophilic strains: the extremophilic strain *Chlorella vulgaris* Antarctic has the highest capacity to overcome UV-B induced and temperature stress. Our finding could be explained by the fact that the strain 8/1 was cultivated in laboratory conditions for more than 50 years. Despite this, *C. vulgaris* 8/1 was found to possess better developed defense systems compared to the mesophilic *C. kessleri*.

Contribution: It was shown by us, that extremophilic organisms could be used for a better understanding of the molecular mechanisms involved in the formation of the cellular resistance to environmental stress; as models for investigating how biomolecules are stabilized when subjected to extreme conditions; the overproduction of HSP70B can be used as an early warning marker for the assessment of temperature-induced stress as well as for predicting an organism's responses to global climate change.