

От проф. ДБН Севдалин Георгиев Ангелов,
Катедра Генетика на БФ при Софийски университет
„Св. Кл. Охридски“, пенсионер

На
дисертационен труд на тема:

**„Едноклетъчните зелени водорасли като модел за
Генотипна устойчивост към окислителен стрес“**

Докторант: Даниела Миткова Митева

Научен ръководител

Проф. д-р Стефка Чанкова

1. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Генетичното разнообразие има съществено важно значение за еволюцията, но за оцеляването на индивидите се изисква генетична стабилност. За поддържане на тази стабилност е необходимо не само наличието на точен механизъм за репликация, но съществуването на репарация на пораженията които непрекъснато възникват в ДНК. В този процес участват гликозилазни ензими които разпознават и отстраняват увредените или погрешно сдвоени бази.

За изучаването на генотипната и индуцираната устойчивост на организмите спрямо действието на различни мутагенни фактори от околната среда – йонизиращи, УВ лъчения и различни химически съединения, са използвани оригинално създадени и охарактеризирани в секция „Мутагенеза от околната среда“, колекция от мутантни щамове *Chlorella* и *Chlamydomonas*, различаващи се по своята радио-, хеми, фото резистентност.

Видовете от *Chlorella* са космополити, които се срещат сред широк кръг от хабитати – в почвата, в пресни водоеми, снежни както и горещи извори. *Chlorella* е един от видовете най-добре проучени сред автотрофните еукариоти. *Chlorella* се явява един от идеалните експериментални организми, които се използват за проучване на различни биотехнологични въпроси.

В дисертационния труд на Даниела Митева, се предлага един нов подход чрез проучване на два екстремофилни щамове от *Chlorella vulgaris* и един мезофилен вид

Chlorella kessleri за проучване на механизмите при формирането на генотипната устойчивост към окислителен стрес.

Докторантката лансира хипотезата, че видовете от едноклетъчни зелени водорасли от род *Chlorella*, изолирани от местообитания с различни екстремни условия на живот питежават ефективни клетъчни механизми за защита, поради което са подходяща моделна система за изследване на механизмите, участващи при формирането на генотипната устойчивост към окислителен стрес.

На базата на тази хипотеза докторантката определя и целите на тази на дисертация. Проучват се в детайли генотипната устойчивост на два екстремофилни щамове от *Chlorella vulgaris (8/1 u Antarctic)*, от местообитания с екстремни условия и *Chlorella kessleri мезофилен вид към температурен и UV-B индуциран стрес*.

Дисертационният труд е структуриран съгласно приетият от Научния съвет на БАН план за представяне и включва 8 глави, както следва:

-Heat shock protein HSP70B as a marker for genotype resistance to environmental stress in *Chlorella* species from contrasting habitats, (IF=2,196):

-DNA damaging effect of UV-B in different *Chlorella* genotypes. Seminar of Ecology -2015 with international participation, ФАРАГО, 2016, ISBN: 979-853-476-132-4,158-160л

-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)

Заклучение /6 стр./, включващо общо резюме на резултатите: декларация за оригиналност, изводи и приноси /4 стр./. Научните доказателства, са добре илюстрирани с подходящи фигури -14бр., и таблици – 4бр. Представени са 6 извода и 5 приноси, определени от докторанта като оригинални и с потвърдителен характер.

Литературна осведоменост и теоритична подготовка на докторантката

Представеният литературен преглед обхваща 201 източника от които 194 на латиница и 7 на кирилица, което показва една отлична осведоменост на докторантката по проучвания проблем. Проучването на генотипната устойчивост при 3 различни местообитания от *Chlorella* – *Chlorella vulgaris Antarctic*, *Chlorella vulgaris 8/1* и *Chlorella kessleri*, има съществено важно значение за предсказване на евентуалните промени в глобалните климатични изменения както и за проучване на механизмите включени при формирането на клетъчната устойчивост на стрес.

Избирането на тези 3 представителя на *Chlorella*, представлява прекрасен генетичен модел много удачно подбран, тъй като те притежават хаплоиден геном,

поради това рецесивните мутации ще се проявят още в първото поколение и освен това имат по-кратък жизнен цикъл, което улеснява и не оскъпява съответния анализ. **През цялото време се прокрадва много важна замисъл на докторантката а именно, че животът и биоразнообразието зависят от баланса между мутациите и репарациите.** Този период с малък лаг-период във времето обхваща сериозен етап от развитието на научната проблематика в световен мащаб и отразява задълбочено познаване на постиженията по този проблем през последните години.

Методичен подход

Докторантката използва широк набор от съвременни методи, които кореспондират с изискванията на експерименталните задачи. Те включват метод на микро- и макроколониите, Spot test, скорост на растеж, три степени на леталност –LD₂₀, LD₅₀, LD₈₀, Western blotting, гел електрофореза. Този комплексен подход дава възможност на докторантата за задълбочено проучване и решаване на научните задачи.

Значимост на получените резултати

Драматичните промени в условията на обкръжаващата среда води и до промяната в експресията на съответните гени. При висока температура протеините или се денатурират или агрегират или и двете. Индуцираните протеини включват тези които разпознават и деградират аберантните протеини или така наречените „Шаперонни протеини“, което помага за разгъването на протеините и по този начин предотвратяват тяхната агрегация. Много организми в това число и растенията индуцират подобни протеини –Шаперони в отговор на висока температура. Резултатите дават допълнителни доказателства в полза на възприетата от докторантката хипотеза относно функционалните качества на HSP70B, като механизъм за термотолеранс при растителните видове. HSP са особено важни за еу- и прокариотни организми, способстващи за поддържането на клетъчния хомеостаз при оптимални обкръжаващи стресови условия и като резултат от формиране на топлинен толеранс. Сред различните семейства HSP специална роля протектираща от действието на различните стресови фактори, докторантката установява, че това принадлежи на HSP70, които се срещат при широк кръг организми от микроорганизми до човек. Интересно е и становището на докторантката, че HSP протеините могат да послужат като индикатор за ранно предупреждение „Early-warning indicators“ към температурните промени на средата. Има достатъчни основания от страна на докторантката, че HSP70, са сред най-важните кандидати за чувствителни биомаркери към различни замърсители от околната среда. Интересен е установения от докторантката факт, че температура от 39^oC и 42 ^oC не се явява стрес фактор за проучваните 3 вида водорасли, макар че някои автори смятат(Knight 2010), че 42^oC се явява критичен праг за растенията.

Интересен е установеният от докторантката факт, че високото съдържание и свръх експресията на HSP70B, е сред факторите които позволяват на *Chlorella vulgaris* да преживява при екстремните условия на Антарктика. На базата на чувствителността към повишена температура, докторантката подрежда видовете както следва: **C. vulgaris – Antarctic > C. vulgaris 8/1 > C. kessleri**. Оказва се, че при мезофилния вид *C. kessleri*, е супресирана синтеза на HSP70B, за разлика от термофилния *C. vulgaris 8/1* и екстремофилния *C. vulgaris –Antartic*. Високото съдържание и свръх продуцирането на HSP70B е сред факторите които позволяват на *C. vulgaris* да преживее сред екстремните условия на Антарктика. Това още веднъж се явява като доказателство в полза на хепотезата изказана от докторантката относно функционалните качества на HSP70B, като механизъм за термотолеранс при растителните видове.

Би било интересно да се съпоставят данните с тези при прокариотите (*E. coli*), където този проблем е много по-добре проучен. Когато *E. coli* е в условията на хит-шок един фактор G^{32} неговото количество нараства в клетката и той измества G^{70} от РНК полимеразата и това насочва транскрипцията на гни /groN/ чиито продукти протектират клетките от хит-шока.

Много добре е мотивирано от докторантката използването на UV-B /280-315J/m² /, поради нарастващата роля на екологичния фактор, настъпилите климатични промени и засилената антропогенеза, която води до изтъняване на „озоновия екран“.

Известно е, че UV-B облъчването, пряко или чрез генериране на АКФ може да предизвиква различни видове увреждания в ДНК като – цикло-бутанови димери, ДНК/ДНК и ДНК – белтък съшивания, ЕВР и ДВР, които нарушават структурата на ДНК. След облъчване с поредица от UV-B дози /от 50-1000J/m² /, в условия на фотореактивация без, анализирайки трите степени на леталност, докторантката установява, че двата екстремофилни вида на *Chloralla vulgaris* и мезофилния вид се подреждат по следния ред:

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

Интересен е факта, които докторантката установява а именно, че при облъчване с UV-B, мезофилния вид *Chlorella kessleri* предотвратява в пълен обем възстановяването на ДВР, макар че проучваните видове се различават по клетъчна преживяемост, темп на растеж, фотореактивация и способност за репарация на ДВР.

Критични бележки към дисертационния труд

Като цяло дисертацията е написана на добър стилизиран език, макар че на места се срещат и чужди думи като напр., “foldosome”, генетиране на свободни радикали /стр. 15, 20 „ексцинуклеаза“, “biota” и др.

В глава 5, са представени данни от семинара по Екология ФАРГО /2015/. Считам, че излишно са представени стр. 43, 44 и 47, тъй като касае докладите на други колеги. Библиографията в литературната справка е направена обстойно и акуратно макар и с известни малки пропуски, пропуснати са повече от 10 автори- Bao S et all, 2006, които си позволих да отбележа направо в текста. Пропуснато е да се цитират страниците в тудове с номера -77, 142 и 176.

Въпроси :

1. При фотореактивацията да допуснем, че не последва светлинна фаза, това би ли попречило за протичане на други репарационни процеси в клетките на *Chlorella*?
2. В хлоропластите на *Chlorella* съдържат ли се интрони?
3. Какво е вашето обяснение, че при *Chlorella kessleri*, има по-добра изразена фотореактивация в сравнение с тъмнината репарация?
4. При *Xeroderoderma pigmentosum* от колко гена се обуславя това заболяване при човека?
5. Какво според вас представлява Rubisco?

Характер на научните приноси

Представени са приноси оригинален, потвърдителен и методичен характер.

Докторантката Д. Митева разглежда оригиналните приноси основаващи се на получените резултати. Представени са убедителни експериментални доказателства, които подпомагат за изясняване на механизмите участващи при формирането на генотипната устойчивост. В дисертационната работа бе получена нова информация относно приноса на две защитни системи – ДНК репаративната и шаперонната при формирането на генотипната устойчивост на едноклетъчните зелени водорасли от род *Chlorella* (*Chlorella vulgaris* Antarctic u *Chlorella vulgaris* 8/1). Получената информация представлява определен принос относно хипотезата за функционалните свойства на HSP70B като механизъм за формиране на термотолерантността при растителните видове и използването им като бърз био маркер “early-warning”.

Приносите с методичен характер са свързани с утвърждаването и оптимизирането на протокол за измерването на нивата на двойноверижните разриви в ДНК чрез CFGE /Електрофореза в постоянно електрично поле/.

Приносите с потвърдителен характер също имат своето значение, тъй като те в известна степен допълват и разширяват научното познание изясняването на действието на UV-B индуциране на ДВР.

Оценка на качеството на научните трудове свързани с дисертацията

Докторантка е публикувала 3 научни труда свързани с дисертацията, като по-съществено е публикацията в Gene с общ IF=2,196.

Отделно от това е участвала с доклад в международен семинар по Екология 2015, и международен семинар по случай 10 години на IBER-BAS (2020). Отбелязани са и 11 цитирания, което е също добър атестат от страна на научната общност.

Доколко изследванията са лично дело на докторанта

В две от статиите Даниела Митева е първо място. С това се определя и нейния съществен дял в разработването на дисертационния труд. Значимостта и оригиналността на получените от докторанта резултати от научните изследвания са декларирани в приложената Декларация за оригиналност.

Авторефератът е с обем от 30 страници във формат А4. Заглавната страница е идентична с тази на дисертацията и отразява в съкратена и обобщена форма всички глави от дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор“

Докторантката Даниела Митова е усвоила необходимите знания в съответната научна област – проучване на генотипната устойчивост на видове от **Clorella vulgaris** към температурен и UV-B окислителен стрес. На базата на образователната си програма докторантката е покрила учебен материал от 3 специализирани курса и два с общообразователен характер, които са сертифицирани с 130 кредита на базата успешно положени изпити. Докторантката отговаря на определените от Центъра за обучение при БАН за апробация на изпълнението на научната програма и публикации на научни резултати по темата на дисертацията в резултат на което е събрала **354 кредити, при изискващ се минимум от 120.**

Редом с това много умело, докторантката гради своя работна хипотеза и прилагане на необходимия методичен подход за решаване и прецизно формулиране на конкретните изследователски задачи. Тя е приложила и усвоила съвременни методи в областта на съвременната генетика. Анализа и обсъждането на експериментални резултати показват прецизно усвоени умения от докторантката, необходими за решаване на поставените в дисертационния труд задачи. При тези изследвания се съзира едно задълбочено проучване на добро професионално ниво с ерудиция и интелект, което характеризират Даниела Митова като учен способна да за работа в екип.

Въз основа на гореописаните аргументи на цялостната оценка за научно изследователската дейност на Даниела Митова, актуалността на дисертационната тема, нейното практическо приложение като евентуален биосензор относно

непрестанно променящите се условия на околната среда, си позволявам да оценя предоставения ми труд като дисертабилен и да препоръчам на почитаемото Научно Жури да присъди на **Даниела Миткова Митева** образователната и научна **степен „Доктор“** по научната специаност **Генетика –01.06.06.**

Гр. София

04.09.2022г.

Рецензент:

/проф. дбн С. Георгиев/