

## РЕЦЕНЗИЯ

по конкурс за заемане на академичната длъжност **професор по специалност 4.3** Биологични науки (Физиология на растенията, шифър 01.06.16), обявен от Институт по физиология на растенията и генетика - Българска Академия на Науките (ИФРГ-БАН) в ДВ, брой 95/29.11.2016., за нуждите на лаборатория „Регулация на генната експресия“, към научноизследователско направление „Молекулярна биология и генетика“.

с кандидат: **доцент д-р Валя Николова Василева**, ръководител на лаборатория

„Регулация на генната експресия“ в ИФРГ-БАН

от д-р Стойно Стефанов Стойнов, доцент в секция “Структура и Функция на Хроматина”, Институт по Молекулярна Биология - БАН

Д-р **Валя Николова Василева**, доцент в лаборатория „Регулация на генната експресия“ при ИФРГ, е единствен кандидат по обявения конкурс. Представените от доц. Валя Василева документи са оформени съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на БАН.

### 1. Карриерно и тематично развитие на кандидата

Доцент Валя Василева е завършила магистратура в Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 1986 г. От постъпването ѝ в Института през 1990 г. до 2000г. работи основно в областта на симбиотичните взаимоотношения на растенията с азотфиксиращи бактерии и отговор към абиотичен стрес. През 2000 г., като докторант на самостоятелна подготовка, придобива научната степен „Доктор“ с дисертация на тема „Фактори, определящи оптималното функциониране на симбиотичната система *Galega* spp.-*Rhizobium galegae*“. През периода 2000 - 2010 г. работи като научен сътрудник I степен (главен асистент), като научно-изследователската и работа е съсредоточена върху миграция на клетъчното ядро, асиметрични клетъчни деления, ауксинова сигнализация, функционална и сравнителна геномика на бобови растения, клетъчен цитоскелет, абиотичен стрес. Научното звание „старши научен сътрудник II степен“ (доцент) ѝ е присъдено през 2010 г. по научна специалност „Физиология на растенията“ в ИФРГ. От 2011 досега ръководи лаборатория „Регулация на генната експресия“. Специализирала е в реномирани чуждестранни институти в Япония, Белгия, Англия и печели една от най-престижните европейски стипендии „Мария Кюри“ по EU-FP7. Член е на Секция „Физиология и биохимия“ към Съюз на учените в България (СУБ), Федерацията на Европейските дружества по растителна биология (FESPB), Японската асоциация по растително-микробни взаимодействия (JSPMI).

### 2. Общо описание на представените материали

Доц. д-р Василева е представила всички изискуеми документи, включително копия от научните ѝ трудове. Научната продукция на кандидатката е впечатляваща и напълно покрива профила на обявения конкурс.

Общият брой научни публикации на доц. Василева е 65, от които 56 публикации са в списания с импакт фактор. Общият импакт фактор на публикуваните статии, изчислен

според Thomson JCR е 140.8. Тази обемна по количество и висока по качество научна продукция е отлично доказателство за сериозната и последователна научна дейност на кандидатката. Много добро впечатление правят и двете таблици след списъка на публикациите, даващи класификацията им по тип издания, което значително улеснява рецензирането на научните трудове. Публикациите са цитирани общо 1050 пъти, което надхвърля многократно изискванията за конкурса и е индикатор за отличния прием на научната работа на доц. Василева. Три от статиите са цитирани над 150 пъти, което показва, че научната дейност на доц. Василева е на световно равнище.

### **3. Публикации след получаване на научната длъжност доцент**

За участие в настоящия конкурс доц. Василева представя 25 научни труда, които не са включени в нейното хабилиране и докторантура. От тях 21 са статии, публикувани в списания с импакт фактор, сред които са едни от най-реномираните международни издания в областта на растителната биология като *Nature Communications*, *Plant Cell*, *PNAS*, *USA*, *Current Biology*, *Journal of Experimental Botany* и др. Три от публикациите са в списания без импакт фактор. Общият импакт фактор на публикациите е **62.7**. Публикувана е една глава от книга в международно издание. Научната работа на Валя Василева е представена с доклади и постери на 14 международни научни форуми след 2010г.

### **4. Обща характеристика на научната дейност и основни научни и научно-приложни приноси**

Проведените изследвания от доц. Василева ясно показват, че тя се е утвърдила като безспорен международно признат молекулярен биолог в изучаването на физиологията и развитието на растенията, регулация на генната експресия, метилиране на ДНК, фитохормонална сигнализация, функционална и сравнителна геномика на растенията, които се покриват изцяло с областта на обявения конкурс. Научната дейност на доц. Василева се вписва напълно в приоритетните направления на Европейските програми за изучаване на механизмите, които определят устойчивостта на растенията към абиотичен стрес. В методично отношение, доц. Василева използва изключително богат набор от авангардни молекулярно биологични, генетични, биохимични и микроскопски техники, които и позволяват да провежда пионерни изследвания на световно равнище. Научната дейност на доц. Василева може да бъде обобщена в няколко допълващи се направления:

I. Клетъчни и молекулярни механизми на инициране и формиране на кореновата система в *Arabidopsis thaliana* (Публикации No 2, 3, 7, 16, 17).

В многоклетъчните организми растежът, развитието и органогенезата, са стриктно регулирани. В растенията, фитохормонът ауксин играе важна роля при контролирането на почти всяка стъпка от растежа и развитието им. Как една сигнална молекула като ауксина, може да предизвика толкова много различни отговори по време на развитието на растението е въпросът, който си поставя за разрешаване доц. Василева. Резултатите и показват, че контролът, упражняван от ауксина на постембрионалното образуване на латерални коренови разклонения при *A. thaliana*, е поне бимодален и се състои от ранен SLR/IAA14-ARF7-ARF19 зависим модул, активиран от ауксин, последван от втори BDL/IAA12-

MP/ARF5 зависим модул. Експресирайки репортерните белтъци GFP и  $\beta$ -глюкоронидаза под контрола на промоторите на BDL и MP, доц. Василева показва за пръв път, че белтъците BDL и MP се натрупват в местата, където започва образуването на страничните коренови разклонения. Чрез серия от елегантни генетични експерименти с мутанти с повишена функция на BDL или с мутанти със загуба на функцията на белтъка MP, доц. Василева установява, че освен активираща функция при образуване на латерални коренови разклонения, модулът BDL/IAA12-MP/ARF5 може да има и инхибиращ ефект върху началните формативни събития на този процес (Публикация No 2). Анализирайки транскрипционните профили от различни клетъчни типове на *A. thaliana*, доц. Василева идентифицира за пръв път транскрипционния фактор GATA23 като потенциален регулатор на инициацията и формирането на латералните коренови зачатъци. Експресирайки репортера  $\beta$ -глюкоронидаза под контрола на GATA23 промотор доц. Василева показва, че GATA23 се експресира в клетките на перицикълъ, локализиран срещу ксилема като експресията му съвпада с максимумите на ауксиновата сигнализация в базалната меристема на кореновия връх. Изследвайки фенотипните разлики при заглушаване на експресията на GATA23 чрез РНК интерференция, както и при овърекспресия на GATA23, доц. Василева установява, че GATA23 контролира специфичната идентичност на инициращите клетки на латералните корени. Използвайки тройна репортерна линия, която маркира плазмената мембрана, ядрото и ауксиновия максимум, доц. Василева успява да наблюдава *in vivo* и в реално време началните клетъчни деления при формирането на латералните коренови зачатъци, за да изследва в детайли ролята на GATA23. Доц. Василева показва че, след ауксин-зависима миграция на клетъчните ядра, която осигурява поляризация на клетките, две съседни клетки на перицикълъ се делят асиметрично. Доц. Василева установява че транскрипционният фактор GATA23 се експресира преди първото асиметрично делене на инициращите клетки и действа след репресора IAA28, за да предаде ауксиновия отговор надолу по транскрипционната верига (Публикация No 3). Доц. Василева открива директна връзка между ауксиновия сигнален път и активацията на компоненти на клетъчния цикъл при образуването на латерални коренови разклонения в *Arabidopsis thaliana*. Нейните експерименти показват, че E2Fa транскрипционен фактор е основен елемент, който регулира асиметричното клетъчно делене при инициацията на латералните коренови разклонения. Освен това, доц. Василева демонстрира, че експресията на E2Fa се регулира от димера LBD18/LBD33, който, от своя страна, се регулира чрез ауксиновия сигнален път. Доц. Василева показва, че експресията на E2Fa под контрол на LBD18 промотор напълно замества LBD18, което доказва, че LBD18/LBD33 опосредства кореновата органогенеза чрез транскрипционна активация на E2Fa. Мутантите на E2Fa се характеризират не само с нарушено инициране на латерални корени, но и с дефекти при образуване на проводящата система. Този фенотип е сходен с наблюдаваните в LBD мутанти и мутанти с нарушена ауксинова сигнализация. Тези резултати показват, че индукцията на транскрипцията на E2Fa чрез LBDs представлява общ механизъм за ауксиново зависимо активиране на клетъчния цикъл. Данните също показват как консервативен механизъм за активиране на клетъчния цикъл е адаптиран еволюционно за свързване на ауксиновата сигнализация с контролиране на процесите, определящи растителната архитектура. Доц. Василева изследва и ролята на GLV6 пептида в образуване на латерални корени. Сигнални пептиди от семейството на GLV/RGF/CLEL са

въвлечени в цялостното развитие на *A. thaliana*, включително и за разклоняването на кореновата система. Чрез анализ на транскрипционния профил на 11 гена от семейството на GLV, доц. Василева показва, че единствено GLV6 се експресира в началния етап на образуване на латерални корени. Транскрипцията на GLV6 започва с миграцията на клетъчното ядро в инициращите клетки преди първото асиметрично делене, присъства по време на развитието на кореновия зачатък, и достига до съседните ендодермални клетки. Блокирането на GLV6 чрез РНК интерференция води до скъсяване на основния корен и намаляване размера на връхната коренова меристема. Обратно, свръхекспресията на GLV6, води до удължаване на първичния корен и увеличена връхна меристема. Gain-of-function мутация на GLV6 води до по-голям брой деления в перицикъла, което не позволява успешното формиране на странични корени. GLV6-свързаният фенотип може да бъде възпроизведен чрез екотопична експресия на гена само в клетките на перицикъла при ксилема. По такъв начин се установява, че GLV6 контролира първите формативни деления на перицикъла при иницирането на латералните корени (Публикация No 16). Особен интерес предизвиква откритието на доц. Василева, че ауксин-отговарящият транскрипционен фактор ARF7 и регулираните от ARF7 транскрипционни фактори FOUR LIPS(FLP)/MYB124 образуват feed-forward motif, който опосредства ауксин-отговарящата транскрипция на PIN3, модулирайки ранните етапи на формиране на латерални корени. Доц. Василева доказва че FLP директно се свързва към промотора на PIN3, което определя чувствителността на транскрипцията на PIN3 към ауксин, а количеството на ауксин от своя страна зависи от неговия експорт чрез PIN3. Чрез математическо моделиране е показано, че такъв транскрипционен цикъл може да генерира временна "памет" за ауксинови стимули, което потенциално повишава стабилността на профила на ауксиновия поток при развитие на странични корени. По такъв начин се установява, че съвместното действие на каноничната ауксинова сигнализация осигурява общ механизъм, чрез който транскрипционната чувствителност към ауксин се регулира на тъканно ниво (Публикация No 17).

II. Разработване на платформа по функционална и сравнителна геномика на моделни бобови растения в България (Публикации No 1, 6, 12, 13, 15, 18-22, 25)

Важна насока и принос в научната работа на доц. Василева е разработването на платформа за интегриране както на секвенционна, така и на функционална информация за моделни в растителната биология бобови растения (Публикации No 1, 6, 12, 13, 15, 18-22, 25). Основни моделни организми са *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus*, като проведените изследвания допринасят за изясняването на функционалната организация и еволюцията на бобовите растения, както и на приликите и разликите им на молекулно ниво с други растителни видове. Важен подход във функционалния анализ на редица характеристики на тези растения е създаването на колекции от инсерционни мутанти, при които мобилният генетичен елемент Tnt1, изолиран от *Nicotiana tabacum*, е вграден в различни гени, елиминирайки тяхната функция. В резултат на инсерционната мутагенеза са установени и характеризирани редица гени, свързани с размножаването на растенията, образуването на кореновата система, формирането на коренови грудки със симбионтни бактерии, както и гени, кодиращи белтъци, вземащи участие в сигнални пътища, отключени от фитохормони. Избрани са линии от колекция от Tnt1-инсерционни мутанти на *M. truncatula*, създадена от

колаборатори от АБИ, които са отгледани в лабораторни условия и фенотипирани. След провеждането на секвениране за установяване на местата на вмъкване на Tnt1, са били подбрани за клониране съответните гени с цел изясняване на тяхната функция. Успоредно с това е създадена колекция от инсерционни мутанти на втория вид *L. japonicus*. Заедно двете колекции от специфични мутанти представляват важен ресурс и основа за провеждането на разнообразни геномни изследвания при бобовите растения, като получените резултати могат да бъдат транспонирани по отношение на редица други значими селскостопански растителни видове (Публикации No 1 и 6). Разработен е протокол за трансформация на *M. truncatula* cv. *Jemalong 2NA* чрез суспензионни клетъчни култури, при който се трансформират единични клетки или клетъчни кълъстери, гарантиращи относително хомогенна клетъчна популация и даващи стабилни трансгенни растения за около 4 месеца. С помощта на този протокол са създадени трансгенни растения експресиращи репортерните гени GUS и GFP под контрол на ендогенните промотори на гените LAX3 (LIKE AUX1 3), GRAS и SCR както и растения, свръхекспресиращи cyclin-like F-box слат с GFP (Публикация No 12). Тествана е възможността за използване на ретро-транспозон Tnt1 за инсерционен мутагенез в *L. japonicus*. При този протокол Tnt1 се въвежда в *L. japonicus* чрез трансформация с *A. tumefaciens*, за да се конструират първични трансгенни линии. При *in vitro* регенерация чрез индиректна соматична ембриогенеза на първичните трансгенни линии са наблюдавани нови транспозиции на Tnt1, които не ревертират по време на растежа и развитието на растенията. Тези резултати доказват, че Tnt1 е подходящ за инсерционен мутагенез в *L. japonicus* (Публикация No 19). Един от подбраните за проучване Tnt1 инсерционни мутанти на *M. truncatula*, след секвениране показва включване на ретро-транспозона в екзони на ген, кодиращ хистон ацетилтрансферазата HAC1 (MtOG02960). За проучване на функциите на HAC1 в изследваните моделни видове са конструирани стабилни трансгенни растения с модифицирана експресия на MtHAC1. Линиите с намалена експресия и със свръхекспресия на MtHAC1 показват морфологични отклонения, което илюстрира участието на HAC1 в основни процеси, свързани с развитието на растенията и прогресирането на клетъчния цикъл. Експресионните профили на репортери под контрола на HAC1 промотор, показват че HAC1 се локализира предимно в млади тъкани с активно делящи се клетки. Редуцираната експресия на HAC1 в *A. thaliana* показва включването на този ген в ацетилирането на хистоните по време на S фазата на клетъчния цикъл (Публикация No 21). Доц. Василева също демонстрира че циклин-подобен F-box (CycF-box) белтък в *M. truncatula*, *L. japonicus* и *A. thaliana* се локализира във всички растителни органи и тъкани, където има активно делящи се клетки. Намалената експресия на MtCycF-box води до натрупване на G2/M специфичен маркер CYCB1;1, показвайки евентуалната роля на MtCycF-box в регулацията на клетъчния цикъл. Проучваният ген показва сходни резултати в трите моделни организма, което доказва функционалната му консервативност (Публикация No 18). Особено обещаващо е изследването на доц. Василюва на експресията на гена, кодиращ ауксиновия преносител MtLAX3, като са създадени трансгенни растения *M. truncatula*, *L. japonicus* и *A. thaliana*, които свръхекспресират или експресират с понижено ниво MtLAX3, както и растения, които експресират транскрипционни репортери под MtLAX3 промотор. Резултатите ясно показват, че MtLAX3 се експресира на различни етапи от соматичната ембриогенеза и развитието на растенията, както и при формирането на симбиотични грудки. Променената

експресия на MtLAX3 води до проблеми в развитието на листата и кореновата система. Този ген има важна роля за развитието на кореновата система и броя на образуваните грудки и семена (Публикация No 15). Извършени са методични изследвания и на ген, кодиращ ауксин-отговарящ транскрипционен фактор В3 от *M. truncatula* (MtARF-B3). Извършените фенотипни и експресионни анализи на конструираните стабилни трансформанти *M. truncatula*, *L. japonicus* и *A. thaliana* със свръхекспресия и намалена експресия на MtARF-B3, както и транскрипционни репортерни линии, доказват ролята на изследвания ген в образуването на кореновата система и формирането на семена. Хистохимични и транскрипционни анализи демонстрират експресията на гена на различни фази от соматичната ембриогенеза и развитието на тъкани и органи, включително и при симбиотичното грудкообразуване. Повишената експресия на MtARF-B3 в репродуктивните органи на *M. truncatula* подчертава значението на изследвания ген за фертилността на изследваните растения (Публикации No 20, 22 и 25).

III. Изследване на генотипно-специфичния отговор на културни растения към абиотични стресови фактори (Публикации No 5, 8, 9, 14 и 23)

Особен интерес предизвикват резултатите от изследванията на доц. Василева върху отговора на културни растения към абиотични стресови фактори (No 5, 8, 9, 14 и 23). Изследването на три сорта пшеница (*Triticum aestivum* L.) с различно ниво на сухоустойчивост демонстрира сортово-специфичен отговор на дишането на листа, след въздействие с прогресиращо засушаване и последващо възстановяване. При тези условия дихателната активност на всички сортове е понижена, но при силна дехидратация устойчивият сорт Катя показва относително стабилни дихателни стойности в сравнение с чувствителните сортове. Листата на Катя показват и по-високи нива на дишане в сравнение с чувствителните сортове и при комбиниран стрес от засушаване и краткосрочна промяна в температурата на листата, сортът Катя демонстрира и по-висок капацитет за възстановяване след прекратяване на стресовото въздействие (Публикация No 5). Сравнени са биохимичните и ултраструктурни отговори на четири сорта пшеница (*Triticum aestivum* L.) след дълговременно засушаване в полски условия. Два от сортовете демонстрират толерантност към засушаване, за разлика от останалите два, характеризиращи се с по-висока чувствителност. Засиленото разграждане на Рубиско активазата и голямата и малка субединици на Рубиско, повишената протеазна активност и намаленото ниво на дехидрините и протеините на топлинния шок (HSP70) са свързани с чувствителност към засушаване. Относително стабилното или повишено ниво на HSP70 и дехидрини, и на Рубиско активазата и голямата и малка субединици на Рубиско са показатели за толерантност към дехидратация. Важно от практическа гледна точка е наблюдението, че толерантните сортове показват по-висока продуктивност при силно засушаване (Публикация No 8). Изследванията на доц. Василева установяват, че листната ултраструктура на мезофилни клетки на листата може да бъде използвана като важна характеристика за оценка на сухоустойчивостта на различни сортове пшеница (Публикация No 9). Проведено е сравнително изследване на протеиновите профили на два генотипа бяла (*Trifolium repens* L. cv. Haifa) и червена (*Trifolium pratense* L. cv. Start) детелина с

различна устойчивост към заблацияване. При бялата детелина, която притежава по-висок адаптационен потенциал при заблацияване, е отбелязано значимо увеличение на нефотохимичното гасене (NPQ). Двумерно електрофоретично разделяне комбинирано с мас-спектрометрия идентифицира 22 индивидуални протеина при червена и 26 при бяла детелина, като 17 от белтъците са общи за двата вида. Резултатите демонстрират, че желязо-свърнатата субединица на цитохром b6-f комплекса показва обратна тенденция при заблацияване - намаляване при червената и увеличаване при бялата детелина (Публикация No 14).

#### IV. Методически и приложни приноси – клетъчно фенотипиране

Оригинална разработка с методичен принос на доц. Василева е въвеждането на бързи техники за фенотипиране при анализиране на растителни мутанти и трансформанти, базирани на морфометричен анализ на листна тъкан чрез микроскопия с последваща морфометрична обработка на изображенията, съчетани с флоуцитометрия. Силата на този методичен подход е демонстрирана при: изследване на мутанти на *M. truncatula*, генерирани чрез Tnt1 инсерционна мутагенеза (Публикация No 4), при изследване на ефекта на експресирането на човешки лактоферин (hLf) върху епидермалната морфология на листа от люцерна (*Medicago sativa* L.) (Публикация No 11) и при фенотипиране на мутанти *A. thaliana* с глобално хипометилирана ДНК (Публикация No 24).

#### 5. Участие в научни проекти и други дейности на кандидата

Доц. Василева е участвала в 16 успешно завършени български и международни проекта, като в 6 случая тя и техен ръководител. Този факт ясно показва, че тя е изграден учен, способен да осигури финансиране на собствените си научни изследвания чрез спечелване на проекти на конкурентен принцип и което е още по-важно - да осигури чрез научната си работа тяхното успешно изпълнение. Доц. Василева е ръководител на лаборатория „Регулация на генната експресия“ към ИФРГ-БАН от 2011 година, като успява да привлече в екипа си млади хора и да обезпечи финансово, организационно и научно тяхната работа в нелеката среда, в която се развива науката в България. Доц. Василева е научен ръководител на 1 докторант - отчислен с право на защита и е научен консултант на 2-ма успешно защитили докторанти. В допълнение, д-р Василева провежда успешна учебно-педагогическа дейност. Водила е два курса лекции и упражнения в Университет в Берн по Растителна биология: симбиоза и азотфиксация, микроелементи, дисимиляция, както и практически курс за млади учени на тема: „Използване на съвременни микроскопски методи в биологията“ по проект BG051PO001-3.3.06-0025, ИФРГ-БАН. Доц. Василева участва активно в управлението на ИФРГ като член на НС на ИФРГ и представлява института в Общото събрание на БАН.

#### 6. Заключение

Оригиналните научните приноси, активната публикационна дейност (65 статии) в едни от най-реномирните научни списания (ИФ 140.8) и изключително високата цитируемост (1050 цитата) надхвърлят препоръчителните критерии на Закона за академичното развитие в РБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните Правилници на ИФРГ-БАН за заемане на академичната длъжност „Професор” и характеризират доц. Василева като безспорен международно признат експерт в областта на генетиката и физиологията на растенията. Въз основа на направения преглед на представените научни трудове, тяхната международна значимост, съдържащите се в тях оригинални научни и научно-приложни приноси, както и проектната активност на кандидатката, напълно убедено препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди на доцент д-р Валя Василева научната длъжност професор” по 4.3. Биологични науки, научна специалност Физиология на растенията, шифър 01.06.16.

01.04.2017 г.

София

Рецензент:



(доц. Стойно Стойнов)