

РЕЦЕНЗИЯ

по конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент” по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Биохимия”, обявен в ДВ бр. 17/26.02.2021 г. за нуждите на лаборатория „Регулация на генната експресия” на Институт по физиология на растенията и генетика - Българска академия на науките (ИФРГ-БАН)

Кандидат: д-р Кирил Михайлов Мишев, главен асистент в лаборатория „Регулация на генната експресия” на ИФРГ-БАН

Рецензент: д-р Лиляна Георгиева Гилова, професор в ИФРГ-БАН, лаборатория „Експериментална алгология”, понастоящем пенсионер

Единственият кандидат в обявения конкурс, гл. ас. д-р Кирил Мишев, е представил всички необходими за целта документи.

Кариерно и тематично развитие на кандидата

Кирил Мишев завършва Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски” през 2004 г. с придобита квалификация „Магистър по физиология на растенията”. В периода 2005-2009 г. е докторант в Института по физиология на растенията „Акад. М. Попов”, (понастоящем ИФРГ) и в началото на 2010 г. придобива ОНС „доктор“ по научна специалност „Физиология на растенията” въз основа на защитена дисертация на тема: „Функционално състояние на фотосинтетичния апарат и генна експресия в хлоропластите при тъмнинно-индуцирано и естествено стареене”. От април 2008 г. е главен асистент по специалност „Биохимия“ в ИФРГ. Научно-изследователската дейност на д-р Кирил Мишев е в областта на растителната физиология, клетъчна биология и биохимия и е фокусирана върху функционалната организация на фотосинтетичния апарат, регулация на хлоропластната генна експресия, листно стареене, фитохормонални сигнални пътища, вътреклетъчен мембранен трафик. В периода 2007-2019 г. е специализирал във водещи научни институции в Германия, Белгия и Чехия, което е допринесло за обогатяване на знанията и разширяване на уменията и компетенциите му за прилагане на различни техники и методи за научни изследвания.

Наукометрични данни

Общият брой на научни публикации на д-р Мишев е **24** (**Q1 – 16** публикации; Q2 – 2; Q4 – 2, публикации в рецензирани списания, неиндексирани в Web of Science и Scopus – 4; общ JCR IF: **104.409**); общият брой на цитирания е **338**, като забелязаните в WoS/Scopus са **285**; h-индексът му е **8** (Scopus и WoS). За участие в настоящия конкурс са представени **16** научни публикации, извън хабилитационния труд (**14** с **Q1** и **2** с **Q4**; общ JCR IF: **98.964**), на 4 от които К. Мишев е първи автор (**3** с **Q1** и **1** с **Q4**). Впечатляващо е, че представените за конкурса публикации са предимно в авторитетни международни списания от много висок

ранг като Nature Chemical Biology (IF 12.587); Nature Communications (IF 12.124); Proc Natl Acad Sci USA (IF 9.580); The Plant Cell (IF 8.631); Current Opinion in Plant Biology (IF 7.848); Chemistry & Biology (IF 6.586); Plant Physiology (IF 6.456). Високите наукометрични показатели на научната продукция на гл. ас. Мишев потвърждават значимостта на тематичната насоченост на научните изследвания и получените резултати, предизвикали интерес и широко признание от научната общност.

Принос на кандидата при колективни публикации

Представените за конкурса публикации са в съавторство с български и/или чуждестранни учени (основно от Белгия, САЩ, Чехия и Германия). Приносът на д-р Мишев за формиране на идеята (първи автор е на 4 от публикациите), при провеждане на експериментите, онагледяване, анализ и обсъждане на резултатите е значителен, което е видно от детайлно представеното му лично участие във всяка публикация.

Участие в научни форуми и научни проекти

Представен е списък с 23 участия на Кирил Мишев в научни форуми у нас и в чужбина с 15 постерни и 8 устни съобщения. В 7 от устните съобщения Мишев е първи автор. Общият брой на участията му в научни проекти е 18 (9 национални и 9 международни), като на 4 от тях е ръководител/координатор от страна на ИФРГ.

Преподавателска и обучителна дейност

Гл. ас. Мишев е провел практическо обучение на 8 студента от Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ по 2 проекта „Студентски практики“ в рамките на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ с хорариум от общо 1860 часа през 2013, 2020 и 2021 г. През академична 2014-2015 година е съръководител на дипломна работа на студентка от HoGent, Белгия на тема „Plant growth modulation through chemical genetics“.

Научен профил и основни научни приноси

Научноизследователската дейност на гл. ас. Кирил Мишев, отразена в представените за конкурса публикации, обхваща 4 взаимосвързани и допълващи се тематични направления, по всяко от които са постигнати **оригинални научни приноси с главно фундаментален характер**.

Първото тематично направление включва изследвания върху молекулните механизми на регулация на вътреклетъчния мембранен трафик с подходите на химичната геномика и протеомика (публикации В4_1, В4_2, Г7_3, В4_4 и Г7_7). Изследванията са насочени към идентифициране и последващо характеризиране на механизма на действие на нови

нискомолекулни химични съединения, които специфично повлияват активността на белтъчни регулатори на трафика, и които са алтернатива на класическите и генетични инструменти за изясняване на биологичната роля на тези регулаторни белтъци в еукариотните клетки и развитието на растенията. Идентифициран е растежен инхибитор (наречен Secdin), който предизвиква аберантно натрупване на маркерни белтъци от плазмената мембрана в късни ендозомални компартменти (Г7_3). Насочването на транспортираните белтъци към пътя за деградация в литичната вакуола не е свързано с директен ефект на инхибитора върху системата за убиквитиниране, а със забавяне на процесите на екзо- и ендоцитоза. Установено е, че за разлика от класическия ARF-GEF инхибитор Брефелдин А (BFA), Secdin може да взаимодейства със всички ARF-GEF белтъци (guanine nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factor GTPases) от протеома на *Arabidopsis*, като взаимодействието е извън каталитичния Sec7 домен на ARF-GEFs. Резултатите показват, че Secdin и BFA влияят на техните прицелни белтъци чрез различни механизми, което прави Secdin приложим и полезен в проучвания, при които ARF-GEF-зависимият ендомембранен транспорт не може да бъде манипулиран с BFA (BFA-нечувствителни ARF-GEFs). Идентифициран е и друг инхибитор на вътреклетъчния мембранен трафик, Endosidin 4 (ES4), който се различава по химична структура от Secdin и BFA (B4_2). Третирането с ES4 води до нарушения във всички ARF-GEF-зависими пътища на вътреклетъчен везикуларен трафик, но, за разлика от Secdin, взаимодейства селективно само с някои ARF-GEFs в *Arabidopsis*. Ефектът от действието на ES4 върху ARF-GEFs е промяна в съотношението между мембранносвързаната и цитозолната фракция на ARF1 ГТФазата - субстрат на ARF-GEFs, като цитозолната, неактивна фракция се увеличава. Открит е нов инхибитор на клатрин-зависимата ендоцитоза в растителни клетки - Endosidin9 (ES9), за който е доказана активност и в други еукариотни системи (B4_4). Третирането с ES9 има и неспецифични ефекти като драстичен спад в нивата на АТФ в клетката в резултат от разсейване на мембранный потенциал в митохондриите, както и понижаване на рН на цитоплазмата. Установено е, че инхибиторният ефект на ES9 е свързан с неговата протонофорна активност, която води до понижаване на рН на цитоплазмата. Подобни неспецифични ефекти авторите за първи път установяват и при tyrphostinA23 (TyrA23) – най-широко използваният ендоцитозен инхибитор. Чрез химична модификация е получен ES9 аналог - ES9-17, който не предизвиква понижаване на рН на цитоплазмата, но е със запазена способност да блокира ендоцитозата (B4_1). Убедително е доказано, че механизмът на специфично действие на ES9 и ES9-17 е свързан с директно взаимодействие с

тежката верига на белтъка клатрин. Резултатите от тези изследвания утвърждават ES9-17 като единствения към момента специфичен инхибитор на клатрин-зависимата ендоцитоза с приложение в растителната клетъчна биология. В обзорна статия (Г7_7) е направен ценен сравнителен анализ на пътищата за вътреклетъчен везикуларен трафик в различни еукариотни системи. Обобщени са публикуваните към 2013 г. скринингови изследвания, довели до идентифициране на нови нискомолекулни ефектори на трафика. Анализирани са потенциалът на нови съединения за биологична активност в повече от една еукариотна система в зависимост от степента на консервативност на таргетните белтъци.

Друго важно направление в научната работа на гл. ас. Кирил Мишев с постигнати оригинални фундаментални приноси е изследване на механизмите на хормонална регулация в растенията и взаимодействие между фитохормоналните сигнални пътища (5 публикации). Установени са нови аспекти от регулацията на биосинтезата на ауксин и на полярния ауксинов транспорт под действие на етиленови сигнали в условия на солеви стрес (Г7_1). В това изследване са използвани две моделни системи – етилен-нечувствителна мутантна линия *Arabidopsis* и конститутивен мутант с постоянно активен етиленов сигнален път, както и съответстващи разнообразни подходи и методи. Негативният ефект от солевия стрес е по-слабо изразен при конститутивния мутант. В тази линия са установени етилен-индуцирани постоянно високи нива на ауксин, свързани със засилена експресия на ензими от биосинтетичния път на индолилacetната киселина, както и стабилна експресия на ауксинови транспортери. Идентифицирани са различия в ефекта на солевия стрес върху ауксиновия транспорт в епидермалния слой и в проводящите елементи в сърцевината на корена в двете изучавани генетични системи. Резултатите показват, че при засоляване етиленовата сигнализация има клетъчно-специфичен ефект върху ауксиновата концентрация и транспорт, изразен главно в епидермиса на кореновия връх. В друго изследване (Г7_8) е изяснено значението на рецептор-зависимата ендоцитоза за сигналната активност на брасиностероидния рецептор BRI1. Създаден е биологично активен флуоресцентно-белязан брасиностероид (AFCS), чрез който за първи път е визуализиран процесът ендоцитоза при рецептор-лигандния BRI1-AFCS комплекс в живи клетки от *Arabidopsis*. Установено е, че интернализацията на BRI1-AFCS комплекса се осъществява чрез клатрин-зависима ендоцитоза с участието на ARF-GEFs. Блокирането на ендоцитозата води до усилване на сигналната трансдукция чрез задържане на рецептор-лигандните комплекси на плазмената мембрана, докато акумулирането на комплексите в транс-Голджи мрежата не повлиява брасиностероидната сигнализация. Като

цяло резултатите показват, че BRI1 фракцията от плазмената мембрана има основна роля за възприемане на хормоналния стимул, докато ендоцитозата отслабва клетъчния отговор към брасиностероиден сигнал. Установена е ролята на U-box E3 убиквитин лигазите PUB12 и PUB13 в брасиностероидния сигнален път (B4_3). Показано е, че двата ензима директно убиквитинират рецепторната киназа BRI1. Взаимодействието между убиквитин лигазите и BRI1 се стимулира при наличие на хормонален сигнал (брасинолид) на клетъчната повърхност. Активираният BRI1 се свързва с PUB13 по разкрит от авторите уникален механизъм, регулиран чрез фосфорилиране, което от своя страна засилва активността на PUB13 за убиквитиниране на BRI1. При нарушена експресия на *PUB12* и *PUB13* (в двойни *pub12pub13* мутанти), количеството и времето на престой на BRI1 белтъка на плазмената мембрана се увеличават, а ендозомната му фракция намалява, което доказва ключовата роля на PUB12/PUB13-опосредстваното убиквитиниране за ендоцитозата и вътреклетъчното разграждане на BRI1. За първи път във функционалната растителна биология е приложен подходът на индуцирана белтъчна агрегация и е демонстрирано, че специфичността на последователността на склонни към агрегация пептидни области (APRs) може да се използва за селективно заглушаване на функцията на белтъци с различна локализация и функция (Г7_5). В качеството на моделен белтък е изследвана BIN2 киназата, негативен регулатор от брасиностероидния сигнален път. Създадени са генетични конструкти, съдържащи нуклеотидни последователности кодиращи идентифицирани и оптимизирани APRs в BIN2, в обща рамка на четене с ген за репортерен белтък (GFP). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) анализите, след кратковременна експресия на тези конструкти в листа от тютюн, доказват специфични взаимодействия на APRs с таргетните им белтъци - BIN2 и други белтъци от семейството на SHAGGY-like киназите. При трансгенни линии *Arabidopsis thaliana* е установен конститутивен отговор към брасиностероиден стимул. Този фенотип е свързан с агрегация и заглушаване на киназната активност на BIN2. В ценна обзорна статия (Г7_6) е обобщена информацията към 2014 г. за наличните нискомолекулни биологично активни вещества, които могат да се използват за изучаване на брасиностероидното (BR) действие. Анализирани са стратегиите за създаване на нови инхибитори на ензими от биосинтетичния път на BRs, както и на специфични химични модулатори на функциите на компоненти от веригата за сигнална трансдукция на BRs. Коментирани са и подходите за създаване на нови биологично активни синтетични аналози на BRs в светлината на публикуваната кристална структура на екстрацелуларен домен на BRI1-лиганд комплекса.

Получените нови и ценни познания по тези две направления могат да намерят практическо приложение в бъдеще, при разработване на иновативни биотехнологични и агрохимични подходи за подобряване на растежните показатели на растенията, чрез модулиране на вътреклетъчния трафик на хормонални рецептори и транспортери.

С голям научен и приложен потенциал са и резултатите от изследванията на Мишев върху структурни и функционални аспекти от реакцията на фотосинтетичния апарат при стресови условия на средата като затъмняване или химически индуцирани изменения в свойствата на тилакоидни мембрани (4 публикации). Особено внимание е обърнато на различията в способността на семеделите и същински листа да се възстановяват от приложени стрес. Установени са различия в механизмите на фотопротекция в семеделите и същински листа на *Arabidopsis* по отношение на нефотохимично гасене и нерегулирана дисипация на енергия, в зависимост от начина на прилагане на тъмнинен стрес – локално или на цяло растение (Г7_11). Нивата на транскриптите на хлоропластните гени *psaB* (кодира А2-белтъка от реакционния център на ФС I) и *rbcL* (кодира голямата субединица на Рубиско) се понижават в приблизително еднаква степен в индивидуално затъмнени и в семеделите на цели затъмнени растения. При същинските листа обаче, спадът в мРНК нивата на двата гена при индивидуално затъмняване е по-силен от този при затъмняване на цели растения, което показва, че за разлика от семеделите, реакцията на фотосинтетичния апарат при затъмнените розетъчни листа зависи от осветяването на останалата част от растението. Експресионните анализи в затъмнени семеделите и листа разкриват драстично намаляване на мРНК за FtsH5 и Deg1 протеазите, които участват в репарацията на увредени ФС II комплекси, което авторите свързват с липсата на фотоокисление на белтъците от ФС II в условия на тъмно. Сравнителните анализи на хлорофилната флуоресценция и на мРНК нивата на изследваните хлоропластни гени и маркерния *SAG12* ген (ядрен ген, кодиращ асоциираната с листното стареене цистеинова протеаза SAG12) в етапа на възстановяване от тъмнинен стрес предоставят оригинални данни, показващи способността на фотосинтетичния апарат на семеделите да преодолява негативните ефекти от затъмняване. При повторно осветяване, индивидуално затъмнените същински листа показват типични симптоми на стареене на хлоропласта, докато същинските листа на затъмнени цели растения поддържат висок фотосинтетичен капацитет. Открита е разлика в чувствителността на пластидните РНК полимеризи PEP и NEP към тъмнинен стрес в семеделите на тиквичка (Г7_10). Скоростта на общата транскрипция в хлоропластите намалява, поради значителен спад в активността на

хлоропластно кодираната РЕР полимераза, докато ядрено кодираната NEP не се повлиява съществено от стреса. В сравнение с хлоропластите, синтезата на тотална РНК в клетъчното ядро се засяга значително по-слабо, което се дължи на почти непроменена активност на РНК полимераза I. Активността на РНК полимераза II намалява, което е по-силно изразено в индивидуално затъмнени семедели в сравнение със семедели от цели затъмнени растения. В периода след прекратяване на стреса, скоростта на пластидна транскрипция в семеделите от цели затъмнени растения е трикратно по-висока от тази в естествено стареещи контроли, което е категорично указание за забавено стареене. Установен е индуциран от затъмняването спад в нивата на *psaB* и *rbcL* транскрипти, който се дължи поне отчасти на намалена скорост на синтеза, докато транскрипцията на *psbA* гена не се повлиява. В друго изследване е установено, че локалното затъмняване на семедели или същински листа на тиквичка повлиява процесите на стареене на съседните нормално осветени листни органи (Г7_9). Компенсаторният отговор на незатъмняваните органи е анализиран с комбинация от биофизични, биохимични и микроскопски подходи. Резултатите показват, че затъмняването на семеделите предизвиква специфични промени във физиологичния статус, включително спад в нивата на общите цитокинини, повишена активност на цитокинин оксидаза/дехидрогеназата, повишаване на съдържанието на АБК в осветения първи същински лист, които се разглеждат като признаци на стрес. Затъмняването на съседния на семеделите първи същински лист има противоположен ефект върху тези показатели в осветяваните семедели. Липсата на въздействие върху фотосинтетичната активност и експресията на маркерни хлоропластни гени показва, че процесът на фотосинтеза не е първична мишена в механизмите на комуникация между двата типа листни органи. Разкрити са нови аспекти от механизма на биологично действие на амфифилния пептид мелитин от пчелна отрова, като за моделна система са използвани тилакоидни мембрани от хлоропласти (Г7_12). Установени са съществени различия в ефекта на мелитин върху електрофоретичната подвижност и светоразсейващите свойства на тилакоидите в зависимост от концентрацията на пептида и солевия състав на средата. Тези различия са интерпретирани във връзка с екраниране на отрицателните заряди от мембранната повърхност, увеличаване на пропускливостта на липидния бислой и промени в геометрията на мембранните структури. Мелитин намалява първичната фотохимична ефективност на ФС II само когато хлоропластите се инкубират с по-високи концентрации на пептида и този негативен ефект е по-добре изразен при ниска йонна сила (висока степен на стиковане на мембраните), отколкото при висока йонна сила.

Четвъртото тематично направление е свързано с изясняване на структурната и функционална организация на рибозомната ДНК в *Hordeum* (публикации Г7_2 и Г7_4, съответно). Локализираните са неметилирани CCGG участъци в малка фракция от рДНК повторите на обикновения ечемик (*Hordeum vulgare*) в близост до стартовото място на транскрипция, във външния транскрибируем спейсер и в кодиращите рРНК последователности. Като моделна система е използван делеционен мутант, който притежава вместо два, само един ядръцев организатор, но с повишена транскрипционна активност. Компенсаторното нарастване на активността авторите свързват с едновременно повишената степен на хипометилиране на рРНК, тъй като в делеционната линия не са установени промени в броя на рРНК гените или в структурата на междугенния спейсер. Определена е нуклеотидната последователност и структурните елементи в 25S-18S рДНК участъка от геномна ДНК на *Hordeum bulbosum*, който има един ядръцев организатор. Установено е, че междугенният спейсер съдържа два участъка със субповтори – R143 (2 повтор) и R128 (5 или 6 повтор), в нуклеотидната последователност на които е открито сходство с R79 и R135, съответно от *H. vulgare*. Последователност от 31 bp в R128/R135 повторите е консервативна при всички изследвани житни видове, което предполага нейната регулаторна роля в транскрипцията. Определено е и стартовото място на транскрипция, което се разпознава от РНК полимеразата I.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обстойният преглед на представените за конкурса материали показва, че кандидатът отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и на специфичните условия в ИФРГ–БАН за заемане на академичната длъжност „доцент”. Високостойностните научни трудове, значимостта на съдържащите се в тях научни приноси, високата цитируемост и активната преподавателска и проектна дейност характеризират д-р Кирил Мишев като изявен, признат от международната научна общност изследовател в областта на растителната физиология, клетъчна биология и биохимия, с отлична теоретична и методична компетентност и умения за работа в колектив. Всичко това ми дава основание безусловно да подкрепя кандидатурата му и убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури и на Научния съвет на ИФРГ-БАН да изберат гл. ас. д-р Кирил Мишев за заемане на академичната длъжност „доцент” по специалност „Биохимия” в лаборатория „Регулация на генната експресия”.

Дата 18.06.2021 г.

Рецензент:

/проф. Лиляна Гилова/