

СТАНОВИЩЕ

от **Д-р Вера Максимова, проф.** Институт по молекулярна биология на БАН
(н.ст., име, презиме, фамилия – акад. дл. в научна организация)

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен '**доктор**'
в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3. Биологически науки,
докторска програма Молекулярна биология.

Автор: Милена Мазаловска

Тема: “Разработване на мултифункционални ваксини – транзитна експресия на имуногенни белтъци в тютюн”

Научен ръководител: гл. ас. д-р Гургана Захманова и проф. д.б.н. Иван Никифоров Минков, Пловдивски Университет „П. Хилендарски“.
(акад. дл., н. ст., име, презиме, фамилия – научна организация)

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № Р33-1358 от 07.04. 2017 на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема **“Разработване на мултифункционални ваксини – транзитна експресия на имуногенни белтъци в тютюн”** за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Молекулярна биология.

Автор на дисертационния труд е **Милена Мазаловска** – докторантка в редовна форма на обучение към катедра „Физиология на растения и молекулярна биология”, Биологически факултет на Пловдивски Университет ”Паисий Хилендарски”.

Научни ръководители са гл. ас. д-р Гургана Захманова и проф. д.б.н. Иван Никифоров Минков, Пловдивски Университет „П. Хилендарски“.

Докторантката Милена Мазаловска представи по електронен път, комплект материали, които са в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ. Включени са следните документи:

молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;

автобиография в европейски формат;

нотариално заверено копие от диплома за висше образование („бакалавър” и „магистър”)

заповеди за записване в докторантура (Зачисляване в редовна докторантура със заповед Р33-214, 23.01.2012), прекъсване на обучението (4 заповеди поради командировки и специализации в чужбина) и за продължаване на обучението (съответно 4 заповеди след завръщане от чужбина);

заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план (3 заповеди за провеждане на изпит по Епигенетика на човека, Молекулярна таксономия и Сравнителна геномика) и 3 протокола за издържания изпит с успех 6.00, 5.50 и 6.00 - съответно;

протоколи от катедрени съвети (N2/16.02.2017), свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд (протокол N3/17.03.2017);

дисертационен труд;

автореферат;

списък на научните публикации по темата на дисертацията;

копия на научните публикации (3 публикации);

списък на забелязани цитирания (отсъства);

декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;

Кратки биографични данни за докторанта

Милена Мазаловска завършва бакалавърска и магистърска степен на обучение с отличен успех, в катедра „Физиология на растения и молекулярна биология“. В същата катедра продължава да работи и по докторската си тема. По време на докторантурата си, макар и за кратко, Милена специализира в чуждестранни лаборатории в Англия, Щатите и Италия. Не на последно място са и личните ѝ качества, които допринасят за изграждането ѝ като отличен молекулярен биолог, изработил и оформил един съвременен дисертационен труд.

2. Актуалност на тематиката

През последните години, усилията на много учени, занимаващи се с генно инженерство, са насочени към създаване на нови технологии за манипулиране на растения. За да се избегнат негативите при генномодифицираните растения, усилията са насочени към получаване на рекомбинантни белтъци с помощта на транзитна експресия. Растенията, като еукариоти се оказват подходяща система за получаване на рекомбинантни белтъци, претърпяващи постранслационни модификации, каквито не се наблюдават при получаването им в бактерии. Това предимство на растенията ги превръща в „молекулни ферми“ за продукция на евтини, лесно достъпни фармацевтични белтъчни продукти за медицинската практика (профилактика, диагностика и лечение). При използване на подходящи конструктори и векториекспресирани белтъци в растенията могат да се самоорганизируют като вирусоподобни частици (VLPs), изградени само от капсидни вирусни белтъци, без да е включена в тях нуклеинова киселина. Такива VLPs са особено ценни за получаване на субединични ваксини и на химерни вирусоподобни частици носещи чужди антигени.

Актуалността на темата на дисертационния труд на Милена Мазаловска идва от поставената цел – Транзитна експресия на хепатит Е капсидни химерни белтъци в *N. benthamiana*, използването им за серологична диагностика и възможна разработка на ваксина срещу хепатит Е. След подробна литературна справка, докторантката отбелязва, че до момента гените на капсидният белтък на хепатит Е вируса (HEV) и негови химерни гени не са транзитно експресирани в растения. Не са провеждани изследвания за способността им да формират VLPs, и те не са пробвани за серологична диагностика на хепатит Е инфекция при хора и прасета. Ето защо решаването на поставените задачи в дисертационния труд представляват научен интерес и биха намерили приложение в медицинската практика.

3. Познаване на проблема

Докторантката познава отлично състоянието на проблема, по който работи. Много подробно и систематично тя го разглежда, като цитира 243 източника. Литературният обзор е написан много компетентно и аналитично. Обзорът включва фигури и таблици, които онагледяват и разясняват конкретните текстове. Специално внимание е отделено на ваксините - историята на създаване и технологиите при получаването им. Акцент пада върху VLPs като субединични и мултифункционални ваксини, базирани на химерни частици. Аналитично заключение се прави, че има нужда от системи за експресия на белтъци, които да бъдат гликозирани и от системи, които предоставят възможност за самосборка на белтъци във VLPs. Такава система представляват растенията. В обзора се дава и пълна литературна

справка за растенията като транзитна експресионна система за имуногенни белтъци. Обстойно е разгледан въпроса на хепатит Е вируса (заболяване, диагностика, профилактика) и експресията на HEV ORF2 капсидните белтъци в различни системи (клетъчни култури от бактерии, насекоми и растения). Литературният обзор завършва с конкретизиране на неизследвани аспекти, които са от интерес за докторантката и тя ги поставя, като свои задачи за решаване. Всичко това свидетелства, че Милена познава проблема в детайли и има способността аналитично и творчески да го представи.

4. Методика на изследването

Методиките, които докторантката е подбрала, усвоила и прилага в изследванията са много, разнообразни и съвременни. Включени са молекулярно-биологично методи за манипулиране на гени и контрол, за клониране, получаване на транзитна експресия в растения и пречистване на рекомбинантни белтъци. Впечатление правят и методите за доказване на тези белтъци – чрез Western blot и маспектрален анализ. Усвоени и приложени са вирусологични техники за пречистване и визуализиране, както и набор имунологични методи. Цялата палитра от методики позволява на Милена да дава адекватен, достоверен отговор на задачите, които решава.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

В първата част от резултатите (глава 3 на дисертационния труд) се обсъжда получаването и пречистването на вариращи по дължина гени на капсидния белтък на хепатитния Е вирус (HEV ORF2). Създадени са 6 конструкта, от които 2 са синтезирани от фирма, по зададен дизайн - с нормална дължина (HEV 1-660aa) и скъсен в С-края (HEV 1-610aa). С използване на генспецифични праймери, докторантката създава още 4 конструкта: два без сигнални секвенции (HEV 33-660 и HEV 33-610), един (HEV 110-660) скъсен в N-края и един (HEV 110-610) скъсен откъм N- и С-края. Синтетичните гени са успешно клонирани във вектор за транзитна експресия (pEAQ-HT) и намножени в бактериални клетки (*E.coli* и *A. Tumefaciens*). Още на този етап достоверността на резултатите е подсигурана с проверка с *coloni* PCR и секвениране. Чрез инфилтриране на конструктите ДНК в листа на растението *N. benthamiana* е осъществена транзитна експресия. Успешно експресирания белтък е доказан чрез Western blot и сравнен с теоретично определеното му молекулно тегло с биоинформатичната програма ExPasy. Размерите са уточнени чрез денатурираща полиакриламидна гелелектрофореза. Цитирам всички тези стъпки, за да покажа, че докладваните резултати за категорично достоверни. Дисертантката показва, че чрез създадените конструкти се получава успешна транзитна експресия на рекомбинантни белтъци и че те са в молекулно тегло близко до очакваното.

Получените в растението белтъци се подлагат на изолиране и различни стъпки на пречистване (ултрацентрофугиране и градиентно центрофугиране в захарозен градиент). Анализ на получените фракции се прави отново с SDS-PAGE и Western blot (с моноклонални антители срещу HEV). За наличие на вирусоподобни частици (VLPs) са проведени електронномикроскопски и имуноелектронномикроскопски изследвания на различните варианти на белтъка получен във фракции от 30-40% захароза.

Мазаловска установява, че всички конструкти се експресират в подобна степен в листата на тютюневото растение, и тяхното реално молекулно тегло, определено чрез денатурираща полиакриламидна електрофореза е близко до очакваното (биоинформатично определено).

Дискусията която се прави в заключение на този раздел е много задълбочена, с много сравнителен материал. Докторантката доказва, че генът на капсидния белтък на хепатитния Е вирус, в различните си модификации (скъсяване в N-, С- или и в N- и С- края) успешно се експресира в растения. Тя обаче заключава, че растенията не са оптимална система за формиране на VLPs на капсидния белтък на HEV. С помощта на маспектрален анализ показва, че белтъка се нарязва в С-края и е свързан с чиперони. Направените изводи са научно значими и особено ценни са разсъжденията на докторантката върху възможните

причини, обясняващи получените резултати. Прави впечатление големият обем извършена работа и съчетание на разнообразни, съвременни методи на изследване. Изводите са адекватни и критични.

Втората голяма серия опити, описани в 4. Глава се отнасят до: Създаване на гени за получаване на химерни VLPs за продукцията на мултифункционални ваксини.

Докторантката създава две групи химерни гени. Първата е с гена на капсидния белтък на HEV, като носител на този на M2e пептида на инфлуенца А вируса, а при втората група се използва хепатит В, като носител на неутрализиращия епитоп на хепатит Е.

Създадени са два конструкта с HEV капсиден белтък, като в големия имунодоминантен домен на HEV 1-610 и HEV 110-610 е въведен M2e, универсалния за грипните вируси домен. С двата химерни конструкта е получена успешна транзитна експресия на рекомбинантен белтък в растенията (доказана чрез Western blot), като експресията на по-късият вариант е в по-висока степен. Показано е, че анти M2e антитяло реагира с тотален белтъчен изолат от трансфектираните растения (с двата химерни конструкта HEV1-610M2e и HEV110-610M2e) и в него с помощта на имуноелектронна микроскопия се наблюдават VLPs.

Трудности се явяват при пречистване на белтъците (HEV1-610 и HEV1-610M2e). Изолира се капсиден белтък, прецизно доказан с Western blot и масспектрален анализ, но налице е и деградация, която според докторантката се дължи на протеиназно нарязване на скъсения в С-край протеин и то в участък преди инсерта. Процедурните стъпки по пречистване с утаяване и градиентно центрофугиране не дават положителен резултат за наличие на VLPs при електронномикроскопско изследване. Милена изпробва и други протоколи за чистене на белтъците (градиентно ултрацентрофугиране без утаяване), но и в този случай не се откриват VLPs. Заключение е, че в тютюневите растения при транзитна експресия от химерните конструкти HEV1-610 и HEV1-610M2e не се стига до самоорганизиращо се формиране на VLPs, които да бъдат изолирани в чист вид. Едва след процедура на допълнително утаяване на най-скъсените варианти HEV110-610M2e се откриват VLPs.

При втората серия опити, разглеждани в тази глава, дисертантката се позовава на факта, че от преди 10 години, капсидният белтък на хепатит В успешно е експресиран в растения. Тя ползва предоставени гени (от Lomonosoff, John Innes Center) и клонира успешно в мономерен и тандемен HBV капсиден белтък неутрализиращ регион на HEV. Транзитната експресия на двата химерни конструкта в тютюневите растения също е успешна. Много подходящ е и изборът на схемата за чистене на рекомбинантните белтъци. При частично пречистване (със захарозна възглавница) и при четирите конструкта m-/t-HBcAg с/без HEV се наблюдават формирани VLPs. При следващи стъпки, целящи по-високо пречистване се получава ниска имунологична разпознаваемост с ELISA на химерните белтъци със серуми от болни от хепатит Е. Дисертантката обяснява това с настъпили конформационни промени.

Отново се прави задълбочена дискусия на резултатите. Желанието ѝ да предложи универсална противогрипна ваксина на базата на M2e клониран върху скъсен вариант (HEV 110-610) на капсидния белтък дава обещаващи резултати, базирани на установените VLPs. Втората, разработвана възможна ваксина срещу хепатит Е, когато се използва капсидния белтък на HBV като носител, също се отчита като перспективна за практиката след провеждане на опити със животни, за изпитване на имуногенност.

Експериментите, докладвани в Глава 5, са с подчертана практическа насоченост. Рекомбинантният белтък, получен от транзитна експресия в тютюневи растения на най-скъсения вариант на HEV 110-610 да се използва, при откриване на антитела срещу HEV в човешки и свински серуми. За целта, Мазовска създава конструкти с полихистидинова опашка в N- и в С-края на гена. Двата конструкта успешно са експресирани и е изпробван пречистен рекомбинантен белтък (HEV110-610C-His tag), като диагностичен антиген. Установен е висок процент на положителни резултати, сравнени с търговски китове, при диагностика на хепатит Е, както при хора, така и при свине. Експериментите, описани в тази глава имат определен научен и практически принос. За първи е постигната транзитна

експресия на HEV110-610 His tag (в N-/ С-края) в *N. benthamiana* и е показана HEV инфекция у свине в България.

В Заключението на дисертационния труд много ясно са отбелязани приносите за науката и за практиката. За първи път е постигнатата транзитна експресия на гени на капсидния белтък на HEV. Създадените конструкции, скъсени откъм N- или С-края са с цел изпитване на влиянието им върху разтворимостта на белтъка и формирането на VLPs. За първи път се съобщава за химерни гени между HEV и грипния M2e, които формират VLPs в растения. Докато получаването на универсална грипна ваксина изисква още дълги изследвания, то мащабното получаване от растения на антиген, рекомбинантен белтък от HEV110-610 His tag, за имунологично доказване на HEV инфекция е факт.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Дисертационния материал е изложен в рефериращи се списания Ann Lab Med, където Милена е първи автор и в J. BioSci. Biotech. - трети автор. Докторантката е втори автор в Abstracts / Journal of Biotechnology. Публикациите са върху дисертационния материал, което показва личния принос на докторантката.

7. Автореферат

Авторефератът изцяло отразява материала от дисертационния труд.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Докторантката много ясно на всеки етап от изследванията си посочва необходимите допълнителни изследвания с цел достигане до практиката.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Давам много висока оценка на прецизно извършената експериментална работа, както и на компетентния, критичен и задълбочен анализ на резултатите. Дисертационният труд съдържа резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Факултета приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Милена Мазаловска притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна биология, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, написания дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да **присъди образователната и научна степен ‘доктор’ на Милена Мазаловска** в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Молекулярна биология.

23.05. 2017

Изготвил становището:

Проф. Вера Максимова