

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Валентина Тонева- ръководител кат. Физиология на растенията и молекулярна биология, ПУ "П. Хилендарски"

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”

Научни ръководители

проф. дбн Иван Никифоров Минков

гл.ас. д-р Гергана Захманова, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски”

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-1358 от 07.04.2017 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски" (ПУ) съм определена за член на научното жури за провеждане на процедура за защита на дисертационен труд на Милена Мазаловска 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, научна специалност „Молекулярна биология”**.

Милена Мазаловска е докторант редовна форма на обучение към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология”, с научни ръководители проф. дбн Иван Минков и гл.ас. Гергана Захманова.

Представеният от Милена Мазаловска комплект материали на хартиен носител е в съответствие с чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за откриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография по европейски формат;
- нотариално заверено копие на диплома за ОКС ‘бакалавър’ и ‘магистър’
- протоколи от катедрени съвети, докладващи готовност за откриване на процедурата и предварително обсъждане на дисертационния труд;

- автореферат;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- дисертационен труд;
- копия на научните публикации;
- заповеди за зачисляване, прекъсване и отчисляване от докторантура
- заповеди за комисии и за провеждане на изпити от индивидуалния план на докторанта и протоколи за издържани изпити

Докторантът е приложил 2 броя публикации, от които едната публикация е в специализирано издание с импакт фактор и докторантът е водещ автор.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Милена Мазаловска придобива образователна степен „бакалавър” по специалност „Молекулярна Биология” към ПУ „Паисий Хилендарски” през 2009 г със среден успех от следването Отличен 5.88. През 2011 г. защитава образователна степен „магистър” по специалност „Молекулярна биология и биотехнология” към същия университет с успех Отличен 5.93. От 01.03.2012г. е зачислена в редовна докторантура към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология” на Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски”. В периода 2013 – 2016 докторантката специализира в Института по растителна вирусология, Торино, Институт John Innes, Норич и Arizona State University, Biodesign Tempe, Аризона. Последните две специализациите са осъществени за сметка на индивидуални стипендии, получени от: The British Scholarship Trust, The GEN Foundation, FEBS и стипендия Fulbright осигурена от правителството на САЩ.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Развитието на вирусологията на молекулярно ниво осигурява знание относно молекулните взаимодействия, опериращи в организацията и експресията на вирусния геном и неговите взаимоотношения с гостоприемника. Постигнатият прогрес в изследванията на вирус-индуцираните патологични процеси позволява ефективна профилактика и терапия на вирусните инфекции, особено на тези пряко засягащи здравето и живота на човека. Контрола на животинските вирусни болести чрез създаването на безопасни и ефективни ваксини, е жизнено важен аспект в превенцията, особено в слабо развитите страни. Във връзка с разработката на мултивалентни ваксини особен интерес представлява експресията на

имуногенни белтъци и генерирането на вирусоподобни частици в растения. В тази връзка изследването е изключително актуално, тъй като проучва възможността за експресия на хепатит Е капсидни и химерни белтъци в *N.benthamiana* с цел серологична диагностика и създаване на HEV ваксина. Получените резултати представляват сериозна основа за бъдеща разработката на мултивалентни ваксини.

4. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд на Милена Мазаловска е представен на 145 страници и илюстриран на в 7 таблици и 45 фигури. Цитирани са 245 литературни източника, като преобладават заглавия, публикувани през последното десетилетие.

4.1 Литературен обзор

Литературният обзор е структуриран в 8 раздела. Прави впечатление, че докторантът много добре познава теоретичните основи на провежданото от него изследване. Описани са основните видове ваксини с техните предимства и недостатъци. Особено внимание е отделено на използването на растенията за експресия на имуногенни белтъци. Детайлно е разгледана организацията на генома и жизнения цикъл на вируса на хепатит Е (HEV). На базата на разпространението на хепатит Е вирусната инфекция и неговото диагностициране сред животинските видове и човека е обосновава необходимостта от създаването на ваксини срещу HEV. Докторантът показва отлични познания относно съществуващите до момента кандидат-ваксини за HEV, базирани на експресия на част от капсидния белтък на генотип I в клетки от насекоми и бактериални клетки.

4.2 Цел и задачи

Целта на научно-изследователската работа е съобразена с проведените до момента изследвания в областта и е правилно формулирана. Поставените задачи са ясни и удовлетворяват изпълнението на заложена цел.

4.3 Материали и методи

Докторантът успешно е използвал класически генно-инженерни техники за изготвяне на вариращи по дължина HEV ORF2 конструкти, химерни HEV Me2 конструкти и химерни HBV-HEV конструкти. В по-нататъшният анализ на тези конструкти са използвани много и разнообразни методи за пречистване и анализ на рекомбинантни белтъци (градиентно центрофугиране, His-tag афинитетна хроматография, Масспектрален анализ, SDS-PAGE,

Western blot анализ, ELISA) и за анализ на вирусоподобни частици (ТЕМ, имуноелектронна микроскопия). Провеждането на повече от един анализ за доказване на работната хипотеза е показател за прецизност и достоверност на проведената експериментална работа и аз го намирам за едно от най- големите достойнства на дисертационния труд.

4.4 Резултати и дискусия

Създадени са различни по дължина генни конструкции на капсидния белтък на хепатит Е вируса и е изследвана тяхната експресия в растения с цел: 1) идентифициране на АК последователност, кодирана от HEV ORF2, отговорна за самосъбиране и формиране на VLP; 2) оценка на ролята на N' и C' крайщата в този процес. Най-силно модифицирана форма на HEV ORF2, скъсена и откъм двата края е използвана за добавяне на His tag от шест хистидилови остатъци на N' и C' края съответно. Транзитната експресия и пречистването на His tag белязаните белтъци показва наличие на всеки от рекомбинантните белтъци в трансформираните растения, което позволява индивидуалното им използване като диагностичен антиген за серологично диагностициране на HEV.

Изследвана е и възможността за включване на допълнителни антигенни детерминанти в капсидния белтък на хепатит Е и в капсидния белтък на хепатит Б. Конструирани са химерни гени между различни по дължина фрагменти от HEV ORF2 и нуклеотидна последователност, кодираща М2е белтъка от инфлуенца вируса по птиците. Последваща експресия на тези конструкции в растения показва формиране на VLPs при някои от тях, което предполага че оптимизацията на условията за формиране на VLP може да позволи бъдещото изследване на тяхната имуногенност.

Създадени са и конструкции между капсидния белтък на хепатит Б и неутрализиращия регион на хепатит Е, които са експресирани в растения и е наблюдавано формиране на VLPs. За проследяване на имунния отговор е предложено инжектиране на химерните частици в мишки в бъдещи експерименти.

Резултатите са илюстрирани с 16 фигури и 1 таблица. Проведените изследвания и произтичащите от тях резултати са компетентно интерпретирани в дискусията. Направените изводи са ясни и съответстват на целта и задачите на дисертацията.

5. Приноси

За първи път е постигната успешна транзитна експресия на различни генни конструкти на хепатит Е капсидния белтък генотип 3 в *N. benthamiana*.

За пръв път е детектирано формиране на вирусоподобни частици от химерните гени HEV M2e и HbcAg-HEV в растения.

За пръв път е използван растително продуцирания HEV ORF2 като антиген за серологична диагностика на хепатит Е инфекцията и 75.5% от изследваните свински серуми от български свинеферми са идентифицирани като позитивни за анти HEV IgG посредством in-house ELISA.

6. Публикации свързани с дисертацията

Представени са две публикации, които са свързани със задачите поставени в дисертацията. Една от статиите е в списание с импакт фактор и докторантката е водещ автор, с което са покрити изискванията на Биологическия факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ. Приложен е и абстракт, представен на Европейския конгрес по Биотехнология и включен в сборник на форума.

7. Автореферат

Авторефератът е изготвен в съответствие с изискванията и отразява съдържанието на дисертацията.

8. Критични забележки и препоръки

Нямам забележки и препоръки към дисертационния труд.

9. Заключение

Дисертационният труд на Милена Мазаловска е систематизирано и задълбочено научно изследване в областта на молекулярната биология на вирусите с цел по-добрата профилактика и диагностика на тези патогени. Получените резултати са с оригинален характер и имат съществено практическо приложение.

Дисертационният труд на Милена Мазаловска отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“, както и на специфичните изисквания на Биологическия Факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ. Въз основа на това, убедително давам своята **положителна оценка** и препоръчам на Уважаемото Научно жури да присъди на докторантката Милена

Мазаловска образователната и научна степен „Доктор” по докторска програма „Молекулярна биология”, област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки.

30.05.2017 г.

Подпис:

Проф. Д-р Валентина Тонева