

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. Спаска Ангелова Станилова, дбн

**Катедра Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика,
Медицински факултет, Тракийски Университет, Стара Загора**

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'
в област на висше образование – Природни науки, математика и информатика
професионално направление - Биологични науки
докторска програма – Молекулярна биология

Автор: Милена Мазаловска

Катедра: „Физиология на растенията и молекулярна биология“, ПУ „Паисий Хилендарски“

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

Форма на докторантурата: редовна

Научен ръководител: Проф. д.б.н. Иван Никифоров Минков, Гл. ас. д-р Гергана Захманова

Общо представяне на процедурата и докторанта

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 осигуряване на процедура за защита на дисертационият труд. Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, и включва всички необходими документи, така както са изброени в Инструкциите. Нямам забележки по представените документи. Докторантът е приложил 2 публикации в пълен текст, 1 резюме в списание, 7 участия в международни научни форуми.

Кратки биографични данни за докторанта

Милена Мазаловска е завършила Пловдивския университет „Паисий Хилендарски" през 2011г с придобита професионална квалификация: биолог – магистър по молекулярна биотехнология, което е много добра основа за бъдеща изследователска дейност в тези бързо развиващи се и актуални за биомедицинските изследвания области, свързани с биотехнологичното производство на ваксини.

От 2012 е редовен докторант към Катедрата по „Физиология на растенията и молекулярна биология“, ПУ „Паисий Хилендарски“

Проведеното допълнително обучение в Института по растителна вирусология, Торино, Италия; Института John Innes, Норвич, Англия и Arizona State University – Биодизайн Институт, Темпе, Аризона относно получаване на биофармацевтични продукти чрез трансгенна експресия на вирусни белтъци в растения е допринесло за израстването и като експериментатор и за изработването на представената дисертация.

Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Изследването е свързано основно с проучване на транзитна експресия на имуногенни белтъци в тютюн с оглед възможността за създаването на химерни вирусоподобни частици, които да се използват за разработване на орални и мултивалентни ваксини. Въпреки че най-често за трансгенна експресия се използват бактерии, те често са неподходящ модел поради отсъствието на вътреклетъчна мембранна система в която се модифицират еукариотните синтезирани протеини, особено когато се касае за получаване на функционално активни вирусни протеини. Като една подходяща алтернатива, растенията са перспективна система за експресия и производство на широка гама от функционално активни белтъци, които са от изключителна важност за фармацевтичната индустрия, включително имуногенни белтъци за разработване на ваксини. При това генен трансфер в растителните клетки, чрез почвена агробактерия (*Agrobacterium tumefaciens*) е добре разработен експериментален подход за експресия на хетероложни белтъци, чрез стабилна трансформация на генома на растението или транзитна експресия в листна тъкан без трансгенна трансформация на растението. Избраното от докторанта растение *N. benthamiana* е подходящо за транзитна експресия, тъй като е особено податливо на агроинфилтрация и е доказан модел при този вид хетероложна експресия на протеини от хепатитни човешки вируси.

В предвид научните данни по темата и представеният литературен обзор проведените изследвания от Милена Мазаловска са актуални, както в теоретично направление, така и за конкретно експериментално приложение.

Целта на дисертационния труд: Транзитна експресия на хепатит Е капсидни и химерни белтъци в *N. benthamiana*, използването им за серологична диагностика и възможна разработка на ваксина срещу хепатит Е е точно и ясно формулирана и научно обоснована, като включва основна и две допълнителни цели.

Поставените задачи, 6 на брой произтичат от основната и допълнителна цели на дисертацията. Задачите са представени в ясно свързана последователност и тяхното изпълнение предопределя получаването на съществени експериментални резултати относно транзитната експресия на хепатит Е капсидни и химерни белтъци в тютюн, както и използването им за серологична диагностика.

Познаване на проблема

Литературният обзор е добре структуриран и систематизиран в съответствие с темата, което показва че дисертанта е отлично запознат с постиженията на световната и наша наука по изследвания проблем, както и свързаните с изследването на проблема молекулно-биологични и електронно-микроскопски методи. Така представеният литературен обзор е с приносен характер, особено в частта за транзитна експресия на вирусни белтъци и оценка на имуногенността на HEV белтъци, като основа за кандидат ваксини, което е солидна база за планиране и провеждане на собствените проучвания на докторанта в очертаната тематика.

Методика на изследването

В раздела „**Материали и методи**” са включени описанията на методите, чрез които са реализирани поставените задачи.

Избраният методичен подход е целесъобразен. Докторантката е използвала комбинация от молекулярно-биологични методи за създаване на вариращи по дължина ORF2 конструкции и получаване на компетентни клетки на *Agrobacterium tumefaciens* в експериментите включващи трансформация позволяваща транзитна експресия на рекомбинантни протеини. За доказване на тази експресия е екстрахирана фракцията тотален белтък от агроинфилтрираните листа, полученият белтък се пречиства чрез ултрацентрифугиране (вирусоподобни частици) или афинитетна хроматография, като рекомбинантните протеини са идентифицирани чрез SDS-PAGE, мас спектрометрия и Western blotting. Имуноелектронната микроскопия е използвана за потвърждаване на формирането на вирусоподобни частици в растителната тъкан.

Разработен е вариант на home-made ELISA за доказване способността на пречистените HEV ORF2 нуклеокапсидни рекомбинантни белтъци да се разпознават от серумни антитела – анти-HEV IgG.

Методологично работата е много богата и от описанието и материалите илюстриращи резултатите е видно, че докторанта владее описаните методики.

В тази насока избраният методичен подход на изследване позволява да се постигне поставената цел и да се получат научнообусловани отговори на задачите, поставени в дисертационния труд. Исклучение прави частта „**възможна разработка на ваксина срещу хепатит Е**“, за изпълнението на която би трябвало да се проведе опит за имунизация на опитни животни и оценка на имуногенността поне чрез количеството синтезирани антитела в имунизираните животни.

Характеристика и оценка на дисертационния труд. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката. Критични забележки и препоръки

Представеният дисертационен труд е написан на общо 145 страници и е онагледен с 45 фигури и схеми, както и 7 таблици. Той включва следните раздели: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и Обсъждане, Изводи, Заключение. В литературата са цитирани 243 научни източника на латиница.

Общият Раздел „Резултати и обсъждане“ е представен в три отделни глави, в зависимост от експерименталния подход: 1. Получаване и пречистване на вариращи по дължината HEV ORF2 гени; 2. Създаване на гени за получаване на химерни VLPs за продукция на мултифункционални ваксини и 3. Използване на рекомбинантния HEV ORF2 за серологична диагностика .

По литературни данни от всички белтъци на хепатит Е вируса, капсидният е с най-добре изразени имуногенни свойства, като епитопите на неутрализиращи антитела са картирани в С-терминалния край на капсидния белтък, което определя и избора на ORF2 за създаването на различните конструктори от докторанта. В съответствие с основната цел на дисертацията са създадени шест кодон оптимизирани конструктора от целия HEV ORF2 (1-660 АК) капсиден белтък генотип 3, синтезиран от фирмата Life technologies. Получените конструктори варират по нуклеотидна секвенция, респективно по брой на кодираните АК в кодирания белтък, като е запазен основния домена и домена съдържащ неутрализиращите епитопи, а отстраняването касае сигналната секвенция и следващият я РНК-свързващ регион в N-терминалния край и/или част от С-терминалния край на капсидния белтък. Тези конструктори са клонирани във вектора pEAQ-HT, който осигурява висока и ефективна експресия на рекомбинантни белтъци в растения от вида *Nicotiana benthamina*. При това изследване, вирусният капсиден белтък 1-660 АК на HEV с молекулно тегло от 72 kDa както и различните му модификации са успешно експресирани в растения, но синтезираният

HEV ORF2 1-660 AK в растения не формира вирусopodobни частици. Няма данни за механизмите водещи до този резултат. Последващите експерименти за проследяване на транзитната експресия на б-те конструктора в тютюневи растения, показват наличие на HEV белтъците с размери съответстващи на предварително теоретично определеното им молекулно тегло, потвърдено чрез Western Blott. Въпреки успешната експресия на всички изследвани конструктори, двата конструктора с най-малка дължина (110-660 и 110-610) показват най-висока експресия в сравнение с останалите, като вирусopodobни частици формира само продукта на **HEV 110-610** конструктора, както се вижда от електронната микрофотография (TEM и IGS). Логичното продължение на тези експерименти според мене би трябвало да отговорят на въпроса дали така експресиранияте протеини проявяват имуногенни свойства, което е и в съответствие със заглавието и част от целта на темата на докторанта.

Както докторанта няколко пъти отбелязва растенията са използвани често като моделни системи за производство на редица диагностични и терапевтични рекомбинантни белтъци, поради тяхната безопасност и способност да изпълняват еукариотни пост-транслационни модификации. В тази връзка какво е обяснението и на факта, че нито един от продуктите на експесиранияте конструктори не са поне частично гликозилирани?

В следващата глава се описват експериментите по създаване на химерни HEV-M2e конструктори, чрез въвеждането на M2e пептида от Инфлуенца вируса по птиците в големия имунодоминантен регион на HEV белтъка с цел повишаване имуногенността на M2e пептида. Въвеждането на M2e пептида в капсиден белтък не повлиява значително експресията, нито формирането на вирусopodobни частици в растителната тъкан. В тази връзка въпросът ми към докторанта е каква е била идеята и целта за реализирането на тези конструктори?

Изследванията относно способността на изолираният рекомбинантен HEV ORF2 110-610 протеин за серологична диагностика на анти-HEV антитела са добре планирани и реализирани, поради което считам че те са значима част от резултатите в представената дисертация, което се потвърждава и от публикацията на тези резултати в списание с импакт фактор. Създаването на два нови конструктора с хистидинова опашка в N- или C-терминалния край, позволява бързо и едностъпално афинитетно изолиране на рекомбинантния протеин. При използването растително продуцирания HEV 110-610 C-His tag белтък за диагностичен антиген в разработената от докторанта in-house ELISA, се установяват анти-HEV IgG антитела в 29 от 36 предварително определени положителни човешки серуми, което ясно демонстрира факта че имунодоминантни не са само епитопите

от тази част на така експресирания рекомбинантен капсиден протеин. Чувствителността на разработената in-house ELISA е определена на 80,5% в сравнение с комерсиалният кит от DIA.PRO.(Италия). Сходен е и резултатът за чувствителността на метода при тестване на свински серуми, а именно 75.5% са положителни за анти-HEV IgG антитела.

Въпросът ми към тази част е как са определени стойността на cut-off (OD) линията при за човешки и свински серуми. Този въпрос е от съществено значение за определяне на чувствителността на разработената ELISA. При това в дисертацията пише че стойността на cut-off (OD) линията е определена като средна стойност от пет негативни серума, а в публикуваната статия е представена като отношение на OD стойностите на тестираната проба към контролата P/N of ≥ 2.5 . Би трябвало резултатите да се обработят статистически и да се посочи формулата за изчисляване на cut-off линията .

Като основна критична бележка към този раздел е обединяването на Резултати и Обсъждане. Считаю че подобно обединение не е подходящо за дисертация, а то не се и препоръчва в изискванията за степента доктор, представени в Приложението към правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“. В конкретният случай това обединяване е попречило за добрата интерпретация на получените резултатите. В този раздел отново са повторени цели абзаци от литературния преглед без конкретно обсъждане на самите резултати, получени от дисертанта.

Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

В заключение представената Дисертация има актуален и приносен характер, като направените критични бележки са с цел изясняване на някои неточности и повишаване нивото на критичност на докторанта в бъдещата му научна дейност. Приемам научните изводи и приноси, така както авторът ги е формулирал: 3 с оригинален характер и един с потвърдителен характер.

Авторефератът е направен според изискванията на съответният правилник, и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертационния труд са представени 2 публикации (по определението в критериите), като една от тях е в списание с IF, с което се изпълняват изискванията на ПУ „Паисий Хилендарски“ в направление 4.3. Биологични науки,

формулирани в Правилника за получаване на научно-образователната степен „Доктор”. Освен това докторанта е докладвал резултати в 6 международни научни форуми.

Заключение: Дисертационният труд, предоставен ми за рецензиране съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати и отговаря на изискванията 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 Биологически Факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Милена Мазоловска притежава теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна биология като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, представяне на резултати и тяхната интерпретация.

Поради гореизложеното, давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’ на Милена Мазоловска в докторска програма по Молекулярна биология и професионално направление „Биологични науки”.

07.06.2017 г.

/проф.Спаска Станилова, дбн/