

РЕЦЕНЗИЯ

от Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн
Институт по молекулярна биология, БАН

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. Биологични науки, Докторантска програма:
„Физиология на растенията“

Автор: Катерина Христова Такова

Тема: *„Растителна експресионна система, продуцираща рекомбинантни белтъци за диагностика на Хепатит Е и проследяване на разпространението на вируса в България“*

Научен ръководител: проф. д-р Валентина Тонева и гл. ас. д-р Гергана Захманова, Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“, Биологически факултет, ПУ „П. Хилендарски“.

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-21-873 от 16.05.2022 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема *„Растителна експресионна система, продуцираща рекомбинантни белтъци за диагностика на Хепатит Е и проследяване на разпространението на вируса в България“* за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологични науки, Докторантска програма „Физиология на растенията“.

Автор на дисертационния труд е Катерина Христова Такова – редовен докторант към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ с научни ръководители проф. д-р Валентина Тонева и гл. ас. д-р Гергана Захманова от ПУ „П. Хилендарски“.

Представеният от докторанта комплект материали е в пълно съответствие с Чл.36, ал. 1 от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

- Молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедура за защита
- Автобиография в европейски формат
- Копия от дипломи за висше образование (ОКС „магистър“)
- Заповед за зачисляване в докторантура
- Заповед за провеждане на изпит по специалността и протокол от изпита
- Протоколи от катедрени съвети свързани с откриване на процедура за защита
- Дисертационен труд, съдържащ 143 страници, 33 фигури, 14 таблици и 406 литературни източници
- Автореферат на дисертационния труд обхващащ 39 страници
- Списък и копия от научните публикации свързани с дисертацията
- Декларация за оригиналност на получените резултати

Прегледът на документите показва, че процедурата по зачисляване, провеждане на обучението и отчисляване от докторантура е проведена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и вътрешния правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Катерина Христова Такова е родена на 26.05.1993 г. Тя е възпитаник на Биологическия факултет на ПУ „П. Хилендарски“, откъдето през 2016 г. придобива бакалавърска степен по „Молекулярна биология“, през 2017 г. магистърска степен по „Молекулярна биология и биотехнологии“, а от 2018 г. е редовен докторант към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“. Междувременно е работила и като учител по биология в различни софийски гимназии. По време на своята докторантура е била на специализация в John Innes Centre, Norwich, Великобритания. Тъй като е завършила езикова гимназия, тя владее писмено и говоримо немски и английски език.

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

Дисертацията на Катерина Такова е посветена на използването на високо иновативни растителни биотехнологии за получаване на рекомбинантни вирусни протеини предназначени за ваксинация или като антигени в имунологични тестове за определяне на HEV специфични антитела в кръвни серуми. Имайки предвид голямото социално значение на вирусните заболявания, особено през последните години, както и необходимостта от евтини и безопасни ваксини и тестове, актуалността на разработваната дисертационна тема е повече от очевидна.

Конкретната цел на дисертацията е да се осъществи експресия на капсидния протеин ORF2 110-610 на хепатит Е в *Nicotiana benthamiana* с помощта на векторите pEAQ-HT и pEff, да се оцени антигеността и имуногеността на получения рекомбинантен белтък и да се проведе серологична диагностика за Хепатит Е при домашна и дива свиня. Във връзка с така поставената цел са формулирани 7 конкретни задачи, които намирам за целесъобразни.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор на дисертацията обхваща около 50 страници и се позовава на повече от 400 литературни източници. Той е съставен от три раздела посветени съответно на: *растителното молекулно земеделие; биологията и епидемиологията на хепатит Е вируса и приложението на хепатит Е капсидния белтък за диагностика, превенция и създаване на ваксини.*

В първия раздел на обзора са разгледани детайлно най-често използваните в растителното молекулно земеделие експресионни системи и методи за клетъчни трансформации, куртивиране на трансформирани клетки в суспензионни култури, като особено внимание е отделено на транзиторната генна експресия. Разгледано е и индустриалното култивиране на растителна биомаса при молекулното земеделие, както и растенията като биореактори за производство на белтъци за ваксини и диагностика. Вторият раздел е посветен на вируса на хепатит Е (HEV). Тук е представена класификацията на HEV вирусите и техните гостоприемници, разпространението им в природата и в частност в България, жизнения цикъл на HEV, структурата и организацията на HEV вириона, генома и капсидния белтък и др. В третия раздел е разгледан въпроса за използването на HEV капсидния белтък за диагностика, превенция и създаване на

ваксини, експресията на ORF2 в растения, както и диагностичния потенциал на съответния рекомбинантен белтък.

Литературният обзор е написан с вещина на лек за четене научен език, достъпен дори за неспециалисти в областта на генно-инженерните биотехнологии.

5. Методика на изследването

Методичният раздел включва широка гама от експериментални методи като: синтез и клониране на гени, изолиране и секвениране на ДНК, PCR (включително Colony PCR), агарозна и полиакриламидна гел електрофорези, приготвяне на компетентни клетки и трансформация на *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens*, транзиторна генна експресия и пречистване на целеви рекомбинантни протеини чрез His-tag афинитетна хроматография, Western blot анализ, електронна микроскопия, атомно-силова микроскопия, крио-ЕМ, ELISA, статистически методи и др. Тъй като методите са описани подробно, дисертацията би могла да служи и като учебно пособие (практикум) при обучението на други докторанти и дипломанти специализиращи в областта на рекомбинантните биотехнологии.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Резултатите от изследванията свързани с дисертационния труд са представени на около 20 страници в раздел „Резултати“, който е богато илюстриран с фигури и таблици. Хронологията и логиката на проведените експерименти са в съответствие с поставените цели и задачи, а многобройните резултати са представени в три тематични раздели, посветени съответно на получаването на HEV капсидния белтък чрез експресия в *Nicotiana benthamiana*, анализ на разпространението на HEV при прасета в България и разработване на ELISA тест базиран на рекомбинантния HEV ORF2 белтък за доказване на анти- HEV серумни антитела.

Обект на изследване на К. Такова е капсидния протеин от вируса на HEV кодиран от втората отворена рамка на четене във вирусния геном, обозначена като ORF2. Той е сравнително голям белтък (72 kDa) и в него не всички аминокиселини са съществени за имуногенността и способността му да образува капсидни частици. Въз основа на резултати от предишни изследвания, докторантката решава да използва двустранно скъсен вариант на капсидния белтък с молекулна маса 53 kDa, включващ аминокиселинната област N110-C610. Този протеин има добра разтворимост във вода, съхранена имуногенност, правилно процесирание в растителните клетки и може да образува вирусоподобни частици. В дисертацията на К. Такова той е експресиран в два варианта – самостоятелно (като белтък HEV ORF2 110-610) и под формата на слят белтък с протеина M2 от генома на инфлуенца вирусите тип А (като M2 HEV ORF2 110-610). Тъй като M2 е също повърхностен протеин, полученият рекомбинантен белтък хипотетично би могъл да се използва като ваксинационен или за диагностика. За улеснение на пречистването към С-края на двата протеина е закачена хексахистидинова опашка, която позволява да бъдат задържани специфично на никелова хроматографска колона. Гените и на двата протеина са клонирани в два вектора (pEff и pEAQ-HT) предназначени за транзиторна експресия в клетки на *N. benthamiana*. След оптимизация на експресията, докторантката постига високи добиви достигащи до 10% от общия разтворим белтък. Тя наблюдава, че свръхекспресията и на двата протеина води до появата на некрози в инфилтрираните листа, което означава, че добивът е желателно да бъде оптимален, а не максимален. Пречистени чрез афинитетна хроматография, добивът на двата целеви протеина достига

150-200 µg/g от инфилтрираната листна маса. Такова установява, че както HEV ORF2 110-610, така и M2 HEV ORF2 110-610 имат свойството да се самоорганизируют във вирусоподобните частици, които са значително по-имуногенни в сравнение с разтворените индивидуални белтъци. Изследвайки тяхната имуногенност, тя намира, че докато HEV ORF2 110-610 индуцира силен имунен отговор в опитни мишки, водещ до появата на специфични анти-ХЕВ антитела, то химерният белтък M2 HEV ORF2 110-610 няма такъв ефект, поради което е изоставен при по-нататъшните изследвания. Рекомбинантният протеин HEV ORF2 110-610 обаче е използван рационално за изследване на носителство и разпространение на HEV при свинете в България. За целта докторантката разработва оригинален ELISA тест за откриване на анти-HEV антитела в кръвен серум, който показва 97.8% съответствие с комерсиалния PrioCHECK™ Porcine HEV Ab Kit. С помощта на разработения метод тя провежда мащабно проучване за разпространението на HEV сред домашната и дивата свиня в България. Нейните резултати показват, че 60% от домашните прасета (в 19 ферми) са серопозитивни, а при дивата свиня позитивните са 12.5%.

Резултатите са отлично документирани и са добре интерпретирани в светлината на литературните данни, което показва уменията на докторантката да борави аналитично с литературните източници и да оценява обективно собствените си приноси в разработваната от нея научна област.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Дисертационният труд на Катерина Такова има подчертан приносен характер за науката и практиката. Тя разработва високоефективна технология за производство на рекомбинантен капсиден протеин на хепатитния вирус Е (HEV ORF2 110-610) чрез експресия в растителни клетки. Полученият рекомбинантен белтък проявява висока имуногенност и склонност към образуване на вирусоподобни частици и може да бъде използван за аналитични и диагностични цели, а вероятно и за имунизация срещу HEV. Тя създава и оригинален iEIA тест за серологични изследвания, съизмерим по специфичност и чувствителност с комерсиалните тестове за детекция на HEV и с негова помощ провежда мащабно проучване за разпространението на HEV сред домашната и дивата свиня в България.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд на К. Такова са отразени в **3 научни статии** в реферирани международни списания, от които **2 са с Q1** и **1 е с Q2**. В две от статиите докторантката е водещ автор.

9. Лично участие на докторанта

От уверението на научните ръководители на докторанта и водещото й място в две от приложените статии съдя, че разработката на дисертационния труд е лично дело на докторанта.

10. Автореферат

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

11. Критични бележки и препоръки

Към дисертационния труд на К. Такова нямам съществени забележки. Той е написан на точен професионален език и е оформен съгласно традиционния за българските докторанти формат. Въпреки че в него се откриват отделни стилови и граматични грешки, не считам че те намаляват висока научна стойност на дисертацията като цяло.

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръката ми към К. Такова е да продължи изследванията си върху HEV със същия ентузиазъм и жар, да реализира своята разработка във ветеринарно-медицинската практика и да тества своята експресионна система за производство на ваксинални протеини предназначени за човека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Катерина Такова е посветен на използването на иновативни растителни биотехнологии за получаване на рекомбинантни вирусни протеини предназначени за ваксинация или като антигени в имунологични тестове за определяне на антитела срещу хепатитен Е вирус. Тя разработва високоефективна технология за производство на рекомбинантен капсиден протеин на HEV (HEV ORF2 110-610) чрез експресия в растения, който проявява висока имуногенност и склонност към образуване на вирусоподобни частици. Тя създава и iEIA тест базиран на този протеин за серологични изследвания, съизмерим по специфичност и чувствителност с комерсиалните тестове за детекция на HEV и провежда първото мащабно проучване за разпространението на HEV сред домашната и дивата свиня в България. Резултатите от проведените изследвания са публикувани в 3 реферирани международни списания (Animals, Biotechnology Letters и Vaccines), от които две са с Q1 и една с Q2. Така докторантката се представя пред научната общност като зрял и перспективен изследовател в областта на молекулярната биология и растителните биотехнологии. Със своите научни постижения и изследователски опит тя напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и вътрешния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“ за придобиване на ОНС „Доктор“. Всичко това ми дава основание **убедено да препоръчам** на уважаемото научно жури **да присъди на Катерина Христова Такова образователната и научна степен „Доктор“** по научната специалност **„Физиология на растенията“**.

25.05.2022 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/