

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Нина Ивановска, дбн, назначена със заповед на Директора на Институт по микробиология №.I-97.2 10 2019

**Относно:** дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”, по Професионално направление: ”Биологични науки”с шифър 4.3., по научна специалност: ”Имунология” - 01.06.23

**Тема на дисертационния труд:** „ Насочване на моделен антиген от грипен вирус към антиген-представящи клетки чрез генетично-конструирани химерни молекули ”

**Автор на дисертационния труд:** Ива Иванова Иванова

**Научен ръководител:** доц. Андрей Чорбанов, дб

**Представената за рецензиране дисертация** е написана на 166 страници в съответствие с изискванията на Закона за развитие на Академичния състав в РБ и правилника за неговото приложение, на вътрешните правилници на БАН и на Института по микробиология при БАН. Трудът съдържа добре структурирани и балансирани по обем всички необходими раздели: увод (2 стр), литературен обзор (52 стр), цел и задачи (1 стр), материали и методи (42 стр), резултати (30 стр), дискусия (11 стр), изводи и приноси (3 стр), библиографска справка от 405 литературни източника на латиница, като по-голямата част са от последните 10 години. Трудът е илюстриран с 40 комбинирани фигури и 5 таблици.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния семинар по "Патогенни микроорганизми и инфекциозна имунология" на Институт по микробиология "Стефан Ангелов", БАН.

**Значимост и актуалност на дисертационния труд:** Безспорната значимост и актуалност на разработвания проблем се определят от няколко факта, а именно.

Грипът е остро инфекциозно респираторно заболяване, причинявано от грипните вируси, които предизвикват, както ендемични инфекции, така и периодични пандемии. Патогенът се характеризира с високата степен на вариабилност, което затруднява разработването на профилактични и терапевтични средства срещу епидемични и пандемични огнища, които да осигуряват трайна защита срещу циркулиращите грипни щамове. Ефективността на използваните противогрипни ваксини е недостатъчна, тъй като защитният имунитет се създава на базата на антигенно сходство между избраните ваксинални щамове и циркулиращите грипни изолати. Хемаглутиназинът и невраминидазата са двата повърхностни белтъка, които са най-изменчивите и имуногенни антигени на грипните вируси. Масово използваната ваксина срещу човешки грип е тривалентната инактивирана грипна ваксина (TIV), базирана на циркулиращи вирусни щамове при хора. В момента усилено се търсят нови подходи за разработване на ваксини, които притежават по-широка реактивност или в идеалния случай, близки до универсалната грипна ваксина.

Големи надежди се възлагат на ДНК ваксините, които са на ново технологично ниво, но все още са в експериментален стадий. Предимството им е, че те не съдържат цял

вирус или отделни негови компоненти, а ДНК вектор, кодиращ имуногенните компоненти на патогена. При тях няма риск от вторична инфекция, тъй като ваксиналните ДНК плаزمиди, не са в състояние да се реплицират или да се разпространят в заобикалящите ги клетки. Един алтернативен подход за индуциране на протективен имунитет, е насочването на консервативни вирусни епитопи, чрез използване на антиядлови фрагменти, специфични за определени повърхностни клетъчни ко-рецепторни молекули върху антиген-представящите клетки.

**В литературния обзор**, системно и комплексно в добре обособени тематични раздели, докторантката представя съвременните данни по темата на дисертацията. Професионално и задълбочено са анализирани знанията за патогенезата и клиничната картина на грипа. Разгледани са етиологията и биологичните свойства на грипните вируси, като са описани и отлично илюстрирани структурата и организацията на вириона и структурата на генома. Логично следват данни за видовете ваксини срещу грипа и се дискутира ролята на рецепторите за системата на комплемента и Fc рецепторите за IgG. Животинските модели са важни за изследване механизмите на заболяването и освен това са незаменими при разработването на ваксини и терапевтични средства срещу различните видове на вируса. Разгледани са моделите за изпитване на ДНК ваксини, включително използваните в дисертацията, трансгенни, knock-out и хуманизирани. Прави впечатление зрялото и критично обсъждане на литературните данни от докторантката, както и ясното и стегнато изразяване. В обзора са включени 10 фигури, подходящи и изключително информативни, както и 5 таблици.

От обзора може да се заключи, че докторантката познава в дълбочина проблема и дефинира 2 основни цели: (1) изследване на имунния отговор, предизвикан след имунизация на интактни Balb/C и CR1/2 имуно-дефицитни мишки с ДНК ваксина, кодираща scFv верига от CR1/2-специфично антияло, конюгирано генетично с В/Т НА-вирусен епитоп и (2) постигане на висок антиядлов отговор и силен грип-специфичен цитотоксичен Т-клетъчен отговор в хуманизирани NSG мишки, чрез прилагане на химерни ДНК молекули, които кодират scFv от моноклонално антияло срещу активация FcγRI, свързано с имуногенни пептиди от грипен вирус. За изпълнението им са набелязани общо 7 задчи, които са конкретни и добре дефинирани.

Разделът **Материали и методи** е изключително силен от една страна с генетичната работа, включваща методики за изолиране на плазмидна ДНК, конструиране на протеинови химерни молекули, амплификация на генетичните конструкти и създаване на крайните ДНК химерни молекули, сполучливо онгледени и с 5 фигури. И от друга, с демонстрираните практически умения на докторантката при подбора и изпълнението на широк набор от съвременни и класически методи: молекулярно-биологични, клетъчно-културални, имунологични, флоуцитометрични, ELISpot и ELISA анализи и статистически методи. Обемът на използвания експериментален материал е напълно достатъчен. Опитите са поставени правилно и са изведени при наличието на съответните контроли. Подробното описание на методите и процедурите дава основание да се приеме, че изследванията са лично дело на докторантката и дава възможност за възпроизвеждане на експериментите и в други научни лаборатории.

**Оценка на получените резултати:** Всички получени резултати са представени задълбочено, аналитично и компактно, разделени в 2 части, съответстващи на поставените 2 цели и следваща поставените за решаване в дисертацията задачи. Много

удачно, всяка част започва със схематични фигури на работната хипотеза (Фиг. 16 и Фиг. 28), което улеснява проследяването на представените резултати.

Получени са конструктори носещи вирусния пептид 7G6scFv-Fos/Jun и са въведени в еукариотен експресионен вектор pNut. Разпознаването на IP пептида от IP-специфичното моноклонално антитяло IP2-11-1 при Western blot анализа потвърждава, че пептидите, свързани с плъше-IgG, запазват своя B-клетъчен епитоп и той е достъпен за взаимодействие с IP-специфични B-лимфоцити. 7G6–IP химерата запазва способността си да се свързва към CR1/2 върху миша B лимфомна клетъчна линия. Установява се, че едновременното свързване на BCR и CR1/2 върху IP-специфичните B лимфоцити стимулира продукцията на антитела. Конструираниите 7G6–IP химерни молекули иницират сигнална трансдукция през CR1/2 и индуцират хуморален имунен отговор в Balb/C мишки. IFN- $\gamma$  е важен за ефективния клетъчен имунен отговор при ваксинация, като високите му нива в серума, корелират с генерирането на антиген-специфични IFN- $\gamma$  – продуциращи CD8<sup>+</sup> клетки. Резултатите показват, че ДНК имунизацията с pNut-IP-7G6scFv индуцира продукция на IFN- $\gamma$  в третираните по описаните схеми мишки.

Представен е анализ на на рекомбинантни ДНК молекули и секвенционни резултати за pTriEx-L-IP, pTriEx-L-sc22, pTriEx-L-sc22-IP3-FOS и pTriEx-L-sc22-IP-JUN. Установено е, че фюжън протеините запазват B-клетъчния епитоп на IP пептида след експресия и фюжън протеини sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos запазват способността си да свързват Fc $\gamma$ RI и да се конкурират с анти- Fc $\gamma$ RI антитяло. От своя страна свързването на Fc $\gamma$ RI на APC от фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos индуцира активацията на B-клетката.

Не може да не се отбележи създаването на хуманизиран NSG миши модел за изследване на новите химерни молекули. Имунизацията с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos и реимунизацията с експресиран фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos индуцира хуморален имунен отговор в хуманизирани NSG мишки. Съответно, имунизацията с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos и реимунизацията с експресиран фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, индуцира CTL активност в хуманизирани NSG мишки.

Получените резултати са убедителни, допринасят за изясняване на действието на антигрипни ДНК ваксини в *in vitro* и *in vivo* експериментални моделни системи, и имат потенциално значение за медицинската практиката, което позволява да се даде положителна и много висока оценка на проведените изследвания и получените резултати.

**Обсъждането на резултатите** е представено в отделен раздел „Дискусия“ с начално обобщение, последвано от дискусия към 2<sup>та</sup> подраздела. Две обстоятелства правят впечатление: аргументираното обсъждане на конкретните резултати в полза на коректно формулирани хипотези и обективното сравняване на получените експериментални данни с известните такива в научната литература. И тук трябва да подчертая високата информираност и обективност на докторантката и научният ѝ ръководител. Ваксинирането с ДНК е новаторски подход за генериране на имунен отговор срещу патогенни бактерии и вируси. Създаването на анти-грипни ДНК ваксини е актуално направление, което основно се състои в прилагането на експресионни вектори, кодиращи антигенни последователности в клетките на гостоприемника. Педимствата на ДНК ваксините са, че те са много стабилни, евтини за производство и неинфекциозни. Правилно изведени и точно формулирани са **12 основни извода**, които отразяват коректно получените значими научни и практически резултати и ги приемам изцяло. Основните

моменти са, че генът кодиран от плазмидата, след това се експресира, чрез задвижване на механизмите за транскрипция/транслация на клетките-гостоприемници, като се наподобява естествената вирусна инфекция. Също така, антигените кодирани в ДНК ваксините се обработват и представят, чрез МНС молекулите от клас I и II и предизвикват ефективен цитотоксичен и хуморален отговор.

**Оценка на приносите в дисертационния труд:** Като следствие от прецизно и в голям обем извършени експерименти, в дисертационния труд се открояват 3 формулирани приноса, които отразяват нови до настоящия момент значими научни факти и са с потенциално клинично приложение. А именно:

- Конструиран е прототип на ДНК ваксина в миши модел, генериращ високи нива на анти-грипен имунитет, чрез насочване на моделен антиген към ко-стимулационни В-клетъчни рецептори.

- Разработен е хуманизиран NSG трансферен човешки модел, чрез прехвърляне на човешки тонзиларни клетки в имунодефицитни мишки. Моделът дава информация за всякакъв тип пред-клинични тестове.

- Успешно е конструиран и изпитан прототип на анти-грипна ДНК ваксина за хуманна употреба, генерираща балансиран хуморален и клетъчен имунитет – главно условие за неутрализиране на грипната инфекция.

**Критични бележки, препоръки, въпроси:** Нямам критични бележки по същество. Дисертационният труд като цяло е написан на много добър научен и литературен език.

**Оценка на автореферата:** Авторефератът е изготвен съгласно изискванията, отразява адекватно и в достатъчен обем получените резултати и научните приноси на дисертационния труд и е оформен много добре графично.

**Публикации във връзка с дисертационния труд:** По темата на дисертационния труд докторантката е представила 2 статии, в 1 от които докторант Ива Иванова е водещ автор. Публикациите са в международни списания с висок IF – 3.09 (Immunol. Research) и IF – 4.24 (Human Gene Therapy), което е атестат за високата значимост на резултатите. Втората статия вече е цитирана 2 пъти в реномирани списания. Резултатите са представени с постери и доклади на 21 международни и национални научни форуми. Личният принос на докторант Ива Иванова в разработването на дисертационния труд е неоспорим.

Изследванията, включени в дисертацията са проведени в Департамент по имунология, Лаборатория по инфекциозна имунология и възпаление, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, при БАН с подкрепата на проект ДТК 02/19, предоставен от Фонд Научни Изследвания, България и ACTIONS CONCERTÉES INTERPASTEURIENNES, France.

**Биографични данни:** Ива Иванова е родена на 18.11.1982 г. Бакалавърска степен получава 2007 г. по специалност-Биотехнологии и Магистърска степен, специалност-Екологична Биотехнология през 2009 г., СУ “Св.Климент Охридски”. От 2011 г. е докторант в департамент „Имунология“ на Институт по микробиология. Положила е изпити за докторантски минимум, изпълнила е образователната програма и е надвишила изискуемите количествени критерии - събрала е 786 кредита при задължителни 250.

За изпълнение на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд, докторант Ива Иванова е придобила основни теоритични знания и професионални умения, които напълно съответстват на изискванията на образователната и научна степен „Доктор”. Тя е овладяла съвременни и класически методи, които прилага творчески и успешно за разрешаване на поставените в дисертацията цел и задачи. Придобила е знания и умения самостоятелно да анализира и обобщава научни данни, обективно да дискутира резултати, да прави конкретни изводи и да оформя научни статии.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд е едно комплексно и задълбочено изследване върху изключително актуален проблем на клиничната практика – борбата с грипните инфекции, чрез създаване на нови по-ефективни и безопасни ДНК ваксини. Дисертационният труд е добре замислен, методично обоснован, прецизно изпълнен и богато илюстриран. Получените данни са изчерпателно дискутирани и допринасят за разширяване на наличните знания по темата на дисертацията. Представените резултати внасят ценен и оригинален теоритично-приложен принос за изясняване на молекулярно-биологични аспекти в създаването на противогрипни ваксини и възможностите за бъдещо клинично прилагане, като нов терапевтичен подход за лечение на грипа.

Всичко това ми дава увереност да изразя положителното си мнение за разработения дисертационен труд и в качеството ми на член на НЖ по процедурата, давам своя положителен вот за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Ива Иванова Иванова в професионално направление 4.3."Биологически науки", научна специалност "Имунология" 01.06.23

Рецензент:



(Проф. Нина Ивановска, дбн)

07.10.2019г.

Гр.София