

Елина Димитрова Аврамска

**„Влияние на метилационния статус върху
гени, свързани с репродуктивния потенциал и
рецепторите на вроден имунитет“**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по
професионално направление 6.3 Животновъдство/Развъждане на
селскостопанските животни, биология и биотехника на
размножаването, ш. 04.02.01 към секция „Лаборатория по
Репродуктивни ОМИКС технологии“, ИБИР, БАН

Научен ръководител:

проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

София

2023г.

Настоящия дисертационен труд бе изработен изцяло в лабораторията по „Репродуктивни ОМИКс технологии“ към Институт по биология и имунология на размножаването „акад. Кирил Братанов“, Българска Академия на Науките, София (ИБИР-БАН).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на2024г. отчаса в заседателната зала при ИБИР-БАН, гр. София, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред **Научно жури в състав:**

Проф. Сорен Хайрабемян, дбн – вътрешен член и научен ръководител

Доц. Десислава Абаджиева, дб – вътрешен член

Чл.-кор. проф. Нина Атанасова, дбн – външен член

Доц. Милена Божилова-Сакова – външен член

Проф. Васко Герзилов – външен член

Резервни членове:

Доц. Деница Даскалова, дб

Доц. Никола Методиев, дм

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, гр. София, бул. „Цариградско шосе“ №73, както и на интернет страницата на ИБИР.

Забележка: Номерата на фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА
РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. К. БРАТАНОВ“
секция „Лаборатория по Репродуктивни ОМИКС
технологии“

Елина Димитрова Аврамска

„Влияние на метилационния статус върху
гени, свързани с репродуктивния потенциал и
рецепторите на вроден имунитет“

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по
професионално направление 6.3 Животновъдство/Развъждане на
селскостопанските животни, биология и биотехника на
размножаването, ш. 04.02.01

Научен ръководител:

проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

София

2023г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|---------|---|
| CARD | домен за възстановяване на каспаза |
| DAMP | едногенни продукти на тъканна и клетъчна увреда |
| ELISA | ензимо-свързан имуносорбентен анализ |
| ESCs | ембрионални стволови клетки |
| FBS- | фетален телешки серум |
| IL-1 | интерлевкин-1 |
| GAPDH | глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа |
| LPS | липополизахарид |
| LRRs | карбоксилна част, богата на повторения на левцин |
| MDP | мурамилдипептид |
| m-DAP | L-Ala- γ -D-Glu-m-диаминопимелинова киселина |
| MAPK1 | митоген-активирана протеин киназа 1 |
| miRNA | микро РНК |
| NF-kB | ядрен фактор капа-бета |
| NLR | „NOD“-подобните рецептори |
| NALP3 | криопирин |
| NOD | централен домен за свързване с нуклеотиди |
| PAMP | вътреклетъчни цитоплазмични сензори на молекули, свързани с наличието на патогени |
| RT-qPCR | обратно-транскриптна количествена полимеразно-верижна реакция |
| ROS | реактивни форми на кислорода |
| SEAP | секреция на ембрионална алкална фосфатаза |
| siRNA | малка интерферираща РНК |
| SNPs- | единични нуклеотидни полиморфизми |
| TET | „Ten-eleven“ транслокиращи протеини |
| TLRs | “toll“-подобни рецептори |
| TNF | туморен некротичен фактор |

ВЪВЕДЕНИЕ

Съгласно прогнозите на ООН, през следващите 35 години България ще изпита сериозни демографски предизвикателства, като се очаква населението да намалее с близо една трета. През последните години се отбелязва значително увеличение на процентите на "мъжкия фактор" при инфертилитета. Проблеми с репродукцията засягат около четвърт от мъжете и жените. В момента на глобално ниво не е установен клиничен стандарт за пълна оценка на имунния статус на пациентите и това как той влияе върху тяхната репродуктивна функция.

Сертолиевите клетки са ключови компоненти в семиниферните тубули, като създават стволовата ниша, която съхранява сперматогониите. Те регулират количеството и в значителна степен качеството на генерираните сперматозоиди. Създават тесни връзки, поддържащи кръвно-тестисната бариера, която пречи на чужди патогени да преминат от луменалното пространство на семиниферните тубули към тяхната базална част, и защитава авто-антигените на герминативната линия от имунокомпетентните клетки. В този процес, рецепторите на вродената имунна система играят важна роля. Вече има изследвания с миши, плъши и човешки клетки на Сертоли относно тяхната способност да експресират молекули от семейството на Toll-like рецепторите. За разлика от тях, семейството на рецепторите на нуклеотид-свързващия олигомеризационен домейн, или NOD-like рецептори (NLRs), представлява само интрацелуларни цитоплазмени молекулни сензори за молекули, асоциирани с наличието на патогени (PAMP), както и ендогенни продукти на тъканна и клетъчна увреда (DAMP). NLR рецепторите включват две молекули - NOD1 и NOD2, които се активират, основно чрез свързването и разпознаването на специфични муропептидни мотиви, присъстващи в бактериалните пептидогликани. NOD1 разпознава присъствието на L-Ala- γ -D-Glu-m-диаминопимелинова киселина (m-DAP), аминокиселина характерна за повечето Грам-негативни и някои Грам-позитивни бактерии. NOD2 разпознава и директно свързва muramyl dipeptide (MDP), мотив присъстващ в пептидогликаните на двете групи – Грам-позитивните и Грам-негативните бактерии. Специфичното свързване на лиганди към NOD1 и NOD2 предизвиква конформационна промяна в рецепторите, олигомеризация, и взаимодействие с адаптерни протеини, които активират специфичен клетъчен сигнален отговор.

Ефекторните молекули от NLR семейството се определят като инфламазомни платформени протеини, които функционират като сензори за стрес и улесняват формирането на инфламазомни комплекси. Например, в макрофаги извлечени от костен мозък, както и в моноцити, се експресират олигомерните NOD-like рецептори като NALP1 („NACHT богат на левцинови повтори протеин 1“) и аналогичният му NALP3. Тези професионални имунни клетки експресират и интрацелуларната протеаза IL-1 β -конвертиращ ензим, известен като каспаза-1. NALP протеините формират мултипротеинови комплекси, които активират каспаза-1, която протеолитично преработва неактивната форма на IL-1 β и води до секреция на зрял, активен инфламаторен цитокин. Скорешни данни промениха представата за изключителната роля на професионалните имунни клетки относно инфламазомите и показаха, че човешките кератиноцити секретират IL-1 β , след УВ-

индуцирана инфламазомна активация на каспаза-1. Този факт навежда, че зреенето на про-IL-1 β , предизвикано от инфламазомата, не е ограничено само до професионални антиген-представящи имунни клетки.

Клетките на Сертоли постоянно фагоцитират дегенериращи герминативни клетки и резидуални телца по време на спермация, и са демонстрирани като способни да функционират под определени условия като непрофесионални антиген-представящи клетки, обработващи и представящи антигени, процеси, които са тясно свързани с автофагоцитозата. Основните механизми на тази регулация остават недобре разбрани. Освен това, дефектни в процеса на автофагоцитоза макрофаги, лишени от молекулите LC3 („лека верига на асоцииран с микротубулите протеин 3“) или от beclin1, показват повишено освобождаване на IL-1 β или IL-18, което е опосредствано от инфламазомата NALP3.

Всичко това налага да се изследва функционалността на системата рецептори NOD/NALP инфлазома в клетките на Сертоли по отношение на нейното присъствие, дали би функционирала като дву-стъпков модел, както е установено в макрофагите, или в едно-или три-стъпков модел, подобно на други професионални имунни клетки, възможно ли е секретирането на IL-1 β , и дали активирането на каспаза-1, ако има такова, би довело до клетъчна увреда и смърт. Това би предложило възможност за разработване на механистичен модел за инициране на мъжки автоимунно-базиран инфертилитет с нарушаване на кръвно-тестисната бариера. Увреждането на сигналните пътища в сертолиевите клетки може да доведе и до нарушения в сперматогенезата, както поради нарушение на техния процес на спермация и зреене, така и чрез паракринна регулация на хормонални и метаболитни пътища.

Епигенетичните модификации като ДНК метилирането играят централна роля в регулирането на генната експресия, включително и в контекста на вродената имунна сигнализация. Те предлагат механизми за финато настройване на клетъчните сигнални пътища, които управляват отговора на имунната система към патогенни и не-патогенни стимули. Във връзка с обсъжданата възможност клетките на Сертоли да имат роля за репродуктивното здраве, е възможно епигенетичните промени да модулират експресията на ключови молекули и рецептори в сигналните пътища, свързани с вродената имунна сигнализация.

Метилирането на ДНК може да бъде директно свързано с регулирането на експресията на гените, кодиращи рецептори като NOD и NALP в клетките на Сертоли, което от своя страна влияе върху тяхната способност да улавят и реагират на патогенни молекули. По този начин, епигенетичните модификации могат да имат забележимо влияние върху функционалността и регулацията на инфламазомите и други молекулни компоненти на вродената имунна сигнализация в тези клетки.

В заключение, тъй като епигенетичното регулиране е динамичен и обратим процес, това открива възможности за терапевтични намеси в случаи на нарушения в репродуктивната функция и свързаните с тях имунни отговори, включително и потенциалното лечение на мъжкия инфертилитет, свързан с автоимунни процеси и нарушаване на кръвно-тестисната бариера.

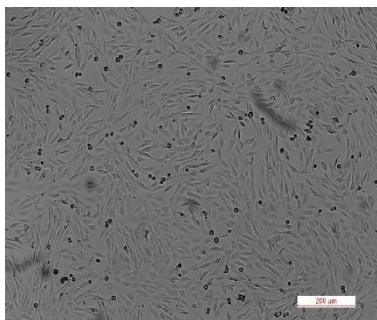
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд бе определяне епигенетичните регулаторни механизми, които оказват влияние на каноничните сигнални пътища на активация на рецепторите от семейство NOD в клетките на Сертоли, с оглед патологично засягане на функциите на кръвно-тестикуларната бариера и антиген-представящите им функции.

За постигане на тази цел бяха поставени следните **задачи**:

1. Проследяване дали блокирането на ДНК метилирането като механизъм на генна регулация (заглушаване) вероятно активира експресията на MAPK сигналните пътища.
2. Проследяване дали деметилирането на генома влияе на директните участници в инфламазомната сигнална ос – NOD1, NOD2, NLRP3.
3. Проследяване активирането на сигнални пътища от вродената клетъчна сигнализация на TLR4, както и повлияване на пътищата от MAPK семейството посредством активацията на TLR4 с помощта на LPS.
4. Установяване дали стимулирането на лигандите на TLR4 (LPS), NOD1 (iE-DAP) и допълнителното активиране на инфламазомата NALP3 (ATP) влияят на каспаза-1 и секрецията на IL-1 β .
5. Проследяване влиянието на MAPK1 върху активността на каспаза-1.
6. Проследяване дали индуцирането на TLR4 оказва влияние на клетъчната миграция и пролиферация, през MAPK1 сигналния път.
7. Проследяване дали стимулирането на TLR4 и активиране на инфламазомата NALP3 предизвикват клетъчна смърт.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

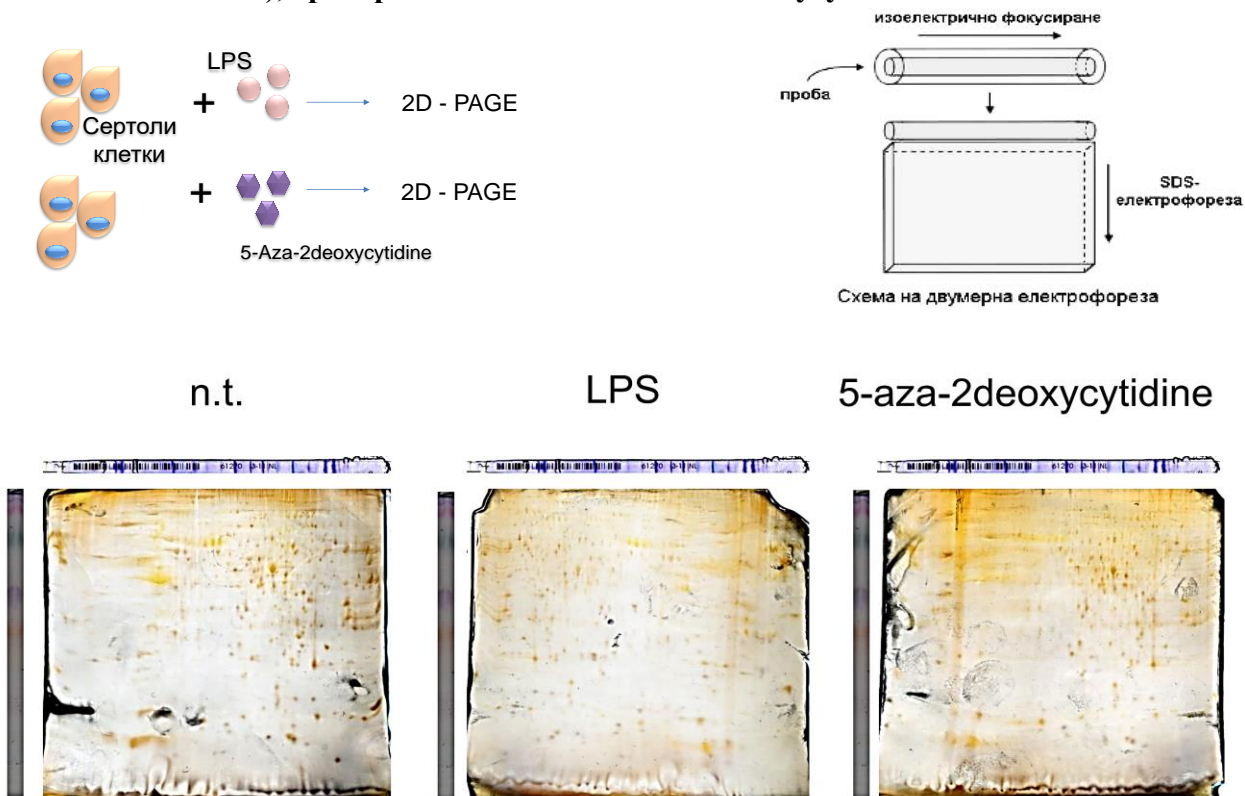


Всички представени експерименти са проведени с клетки на Сертоли от половозрепи 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™)). Използвани са множество и разнообразни реагенти, трансфектанти, китове и методи на клетъчната и молекулярната биология и имунология.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Приложение на двумерна гел електрофореза (2D PAGE), денситометричен анализ и биоинформатичен анализ за генериране на хипотези и идентифициране на прицелни сигнални молекули и пътища, свързани със сигнализацията на рецептора на вродена имунна сигнализация TLR4 и епигеномна регулация, основаваща се на механизмите на генно заглушаване, посредством ДНК метилиране

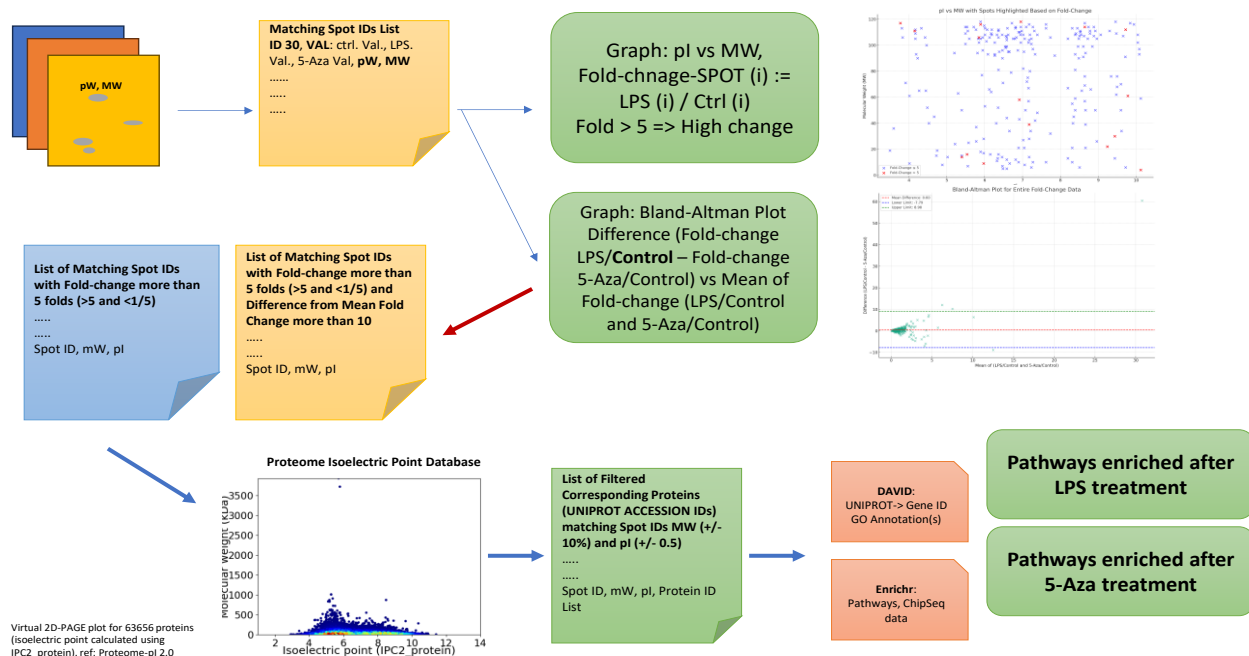
1.1. Комплексен анализ на двумерна гел електрофореза (2D PAGE) на клетки на Сертоли от половозрепи 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирани с LPS или 5-Aza-2'-deoxycytidine



Фиг. 4-1. Експериментална схема за третиране на клетки на Сертоли (15P-1) и провеждане на двумерна полиакриламидна гел електрофореза. Използват се няколко аотирани от потребителя точки в образите на гелове, които са с идентични констелации от петна и имат висока вероятност да съответстват на едни и същи феномени на електрофоретично разделяне. Тези петна се означават като “landmarks” в аналитичния софтуер, за да може изображенията да се модифицират и да представляват идентични по изоелектрично фокусиране и SDS разделяне феномени (съответните идентични протеини трябва да са изминали еднакъв път по двете оси на разделяне).

Във връзка с протеомния анализ се осъществява сравнителна характеристика на протеиновите профили на нетретирана, третирана с LPS (Invivogen, USA) и 5-Aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich, USA) клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™), чрез прилагане на двумерна полиакриламидна гел електрофореза (2D-PAGE) и

последващ биоинформатичен анализ (фиг.4-1). Въз основа на образен анализ на изображения от 2D гел електрофореза и биоинформатичен анализ се генерират хипотези въз основа на предсказани протеинови съответствия (фиг.4-2).



Фигура 4-2. Образен анализ на 2D гел електрофорезни изображения и биоинформатичен анализ за генериране на хипотези въз основа на предсказани протеинови съответствия

За идентифициране на специфични протеини е използвана комбинирана методология, позволяваща използване на 2D гел електрофоретични изображения, тяхното физическо картиране за протеинови петна, получени след сребърно оцветяване, физическо модифициране на размерите с цел „съпоставяне“ на идентичните групи петна, идентифициране на съответните параметри за молекулно тегло в kDa/Da и pI, посредством съпоставянето на изоелектрично фокусиран маркер в първо направление и маркер за молекулно тегло във второ направление, както и последващ анализ на петната, включващ:

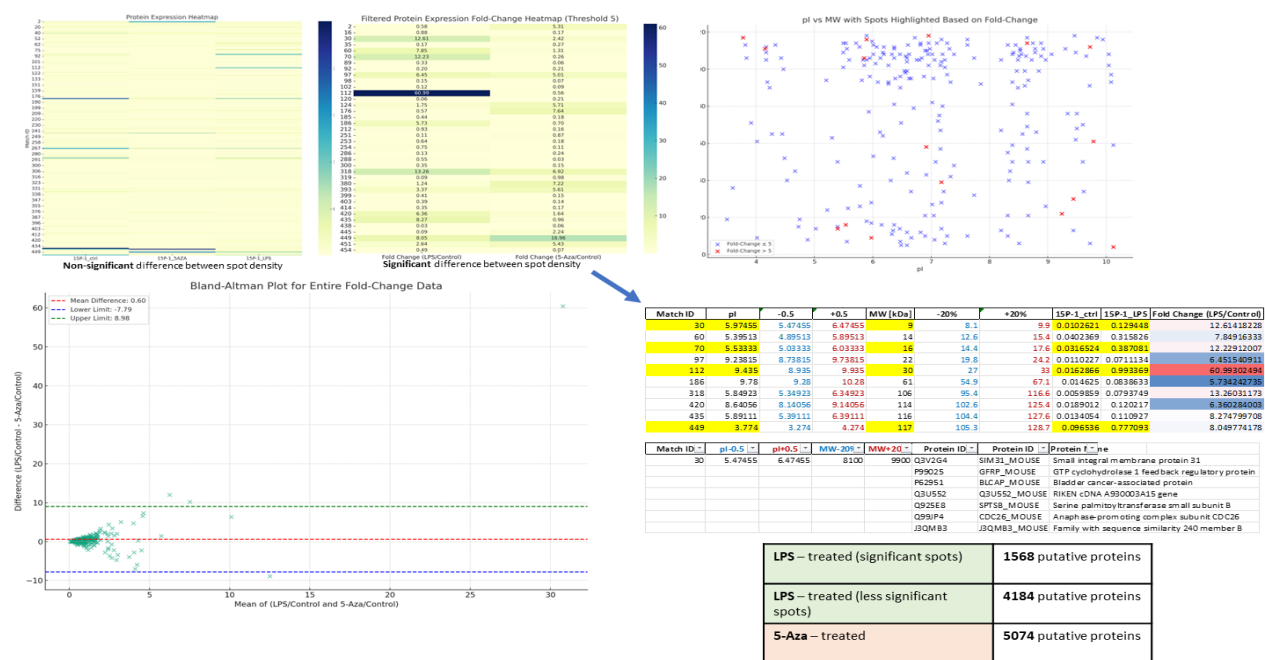
(1) Петната се идентифицират по съвпадащи групи, като на всяка идентифицирана група се задава номерация (Match ID). Групата съдържа 3 петна, съответстващи на протеините, разделени от лизатите, получени от контролните клетки (ctrl, control), клетки третирани с LPS (LPS), и такива третирани с 5-Azacytidine (5-Aza). Всяка група петна формира вектора: Match ID, control, LPS, 5-Aza, pI, MW. Параметрите control, LPS, 5-Aza показват нормирана относителна експресия, основаваща се на денситометрия, измерваща оптичната плътност на петната. За идентификация и сравнение на протеиновите профили между различните групи клетки е използван софтуерът ImageMaster 2D Platinum 7.0 DIGE.

(2) Идентифициране на групите с промяна в експресията над 5 пъти (fold change >5) (фиг.4-3), както и кои от тези групи са със сигнификантна разлика в експресията, посредством построяване на графика на Bland-Altman. Тя показва по y-оста Разликата в експресията (Difference), а по x-оста Средните стойности на промените в експресията (Mean

of Fold-change), където $\text{Difference} = (\text{Fold-change LPS/Control} - \text{Fold-change 5-Aza/Control})$, $\text{Mean of Fold-change} = (\text{LPS/Control} + \text{5-Aza/Control}) / 2$ (фиг.4-3). Всички петна със стойности извън праговете от -8 и +9 Difference се считат за сигнификантно променени (фиг.4-3). Този подход се използва за допълнителна оценка на оптичната плътност на петната, когато статистическите тестове с корекция за брой сравнения не могат да дадат добри резултати.

(3) Идентифициране на сигнификантни петна на база средна разлика

От списъците с групи сравнени петна (Match ID), които са променени над 5 пъти и/или сигнификантно различни се идентифицират потенциалните протеини, които биха съответствали при мас-спектрометрична идентификация (фиг.4-3).



Фигура 4-3. Идентифициране на групите с промяна в експресията над 5 пъти (fold change >5). Съпоставяне на групите с петна от гелетите. Определяне на сигнификантни разлики с One Way ANOVA. Съпоставяне на всички групи и идентифициране на тези с промени над 5 пъти. Идентифициране на сигнификантни петна на база средна разлика

Това се осъществява посредством извличане и филтриране на данни от базата данни Proteome-pI 2.0 (<https://isoelectricpointdb2.mimuw.edu.pl/>) [263]. В тази база от данни са записани над 60 000 миши протеина със стойности за всеки от тях по MW [Da] и pI. Последният може да се калкулира по много начини, като за изследването е използван алгоритъма IPC2_protein, който се основа на подход, използващ машинно обучение за оценка на pI на база на виртуални 2D-PAGE изображения от 63656 миши протеина). Филтрират се всички протеини от групата (Match ID) за анализ, които са в обхвата MW +/- 20%, както и pI +/- 0.5. Получените UNIPROT ACCESSION идентификатори се използват за анализ и статистическо обогатяване на онтологични номенклатури и сигнални пътища. Използван бе онлайн инструментът Enrichr, който идентифицира статистически обогатени сигнални пътища. Той поддържа няколко Gene Ontology класификации, няколко дефиниции

на сигнални пътища, епигенетични модификатори и пр. за разпознаване и картиране на протеините със статистическо обогатяване.

1.1.2. Биоинформатичен анализ на потенциалните протеини и свързани с тях сигнални пътища, хистонови модификации, микро-РНКи след третиране с LPS

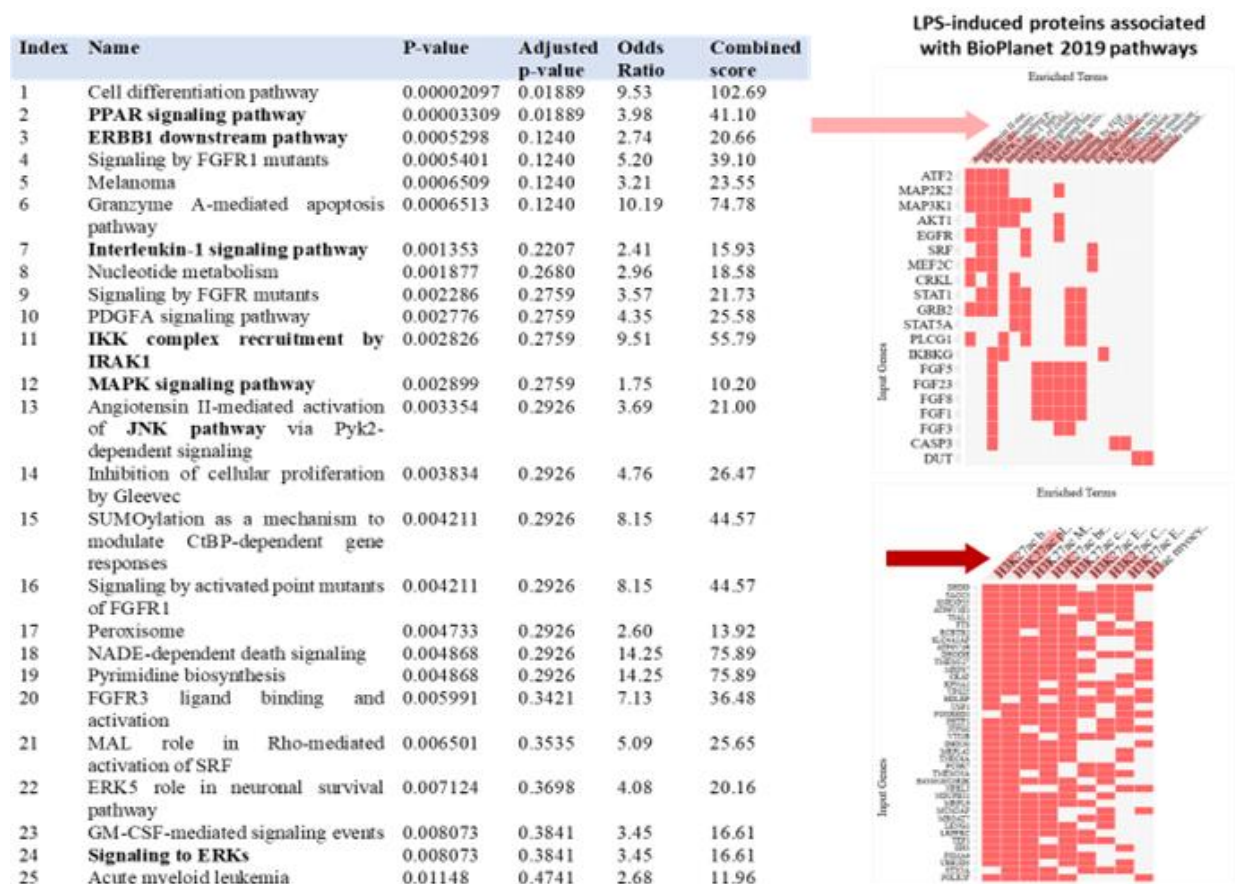
В проведеното изследване беше установено, че разнообразие от сигнални пътища е обогатено, изобразявайки сложно взаимодействие на молекулярни механизми, лежащи в основата на изследваните биологични явления. Тези пътища обхващат широк набор от клетъчни процеси, включително клетъчна диференциация, апоптоза, метаболизъм и клетъчна сигнализация. Пътят на клетъчна диференциация е решаващ механизъм, който ръководи съзряването на клетките в отделни фенотипове, процес, управляван от множество протеини, чиито роли са точно координирани. По подобен начин сигналният път на PPAR, известен със своята ключова роля в липидния метаболизъм и про-инфламаторните (възпалителните) реакции, се очертава като друг обогатен път в нашите данни. Редица обогатени пътища са свързани със сигнализирането на рецепторната тирозин киназа (RTK), което е показателно за неговата централна роля в клетъчната комуникация и реакцията на сигнали от околната среда. Те включват пътя ERBB1 надолу по веригата, сигнализиране от FGFR1 мутанти, сигнализиране от FGFR мутанти, FGFR3 лиганд свързване и активиране, и PDGFA сигналния път. По-специално, пътищата на рецептора на фибробластния растежен фактор (FGFR) и неговите мутанти подчертават потенциалните възможности за нюансите в динамиката на сигнализирането, които могат да възникнат в резултат на генетични аберации.

Нашите данни от статистическото обогатяване също така подчертават значението на апоптозата и възпалителната сигнализация с обогатяването на пътя на апоптозата, медиран от Granzyme A, и сигналния път на интерлевкин-1. Тези пътища са фундаментални за машината за клетъчна смърт и съответно за имунните отговори. Освен това, връзката между метаболизма и сигналните пътища се разкрива с обогатяването на нуклеотидния метаболизъм, пиримидиновата биосинтеза и пероксизомните пътища. Тези пътища са основни за клетъчната енергийна хомеостаза и синтеза на нуклеотиди, които са от съществено значение за механизмите за репликация и възстановяване на ДНК.

Сложните сигнални мрежи, медиращи клетъчната пролиферация и оцеляване, са представени от няколко обогатени пътища, като ангажиране на ИКК комплекс от IRAK1, MAPK сигнален път, ангиотензин II-медирано активиране на JNK път чрез Puk2-зависимо сигнализиране, роля на ERK5 в пътя на оцеляване на невроните и инхибиране на клетъчна пролиферация от Gleevec. Тези пътища очертават многостранните сигнални каскади, които управляват клетъчния растеж и реакцията на външни стимули. Освен това, ролята на пост-транслационните модификации се подчертава от обогатяването на сумоилирането (SUMOylation) като механизъм за модулиране на CtBP-зависимите генни отговори. Това подчертава сложността на генната регулация и безбройните начини, по които клетъчните процеси се настройват фино.

Поради силното ангажиране на MAPKK киназния път в процесите на възпаление, реакция на клетъчен стрес, клетъчна диференциация, клетъчно делене, клетъчна пролиферация, метаболизъм, мотилитет и апоптоза, ние картирахме потенциалните протеини обогатени след третиране на клетките с LPS в този път. Използвахме KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ([KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes](#)) базата с данни за сигнални пътища и картирахме потенциални протеини в MAPKK киназния път, както и свързания с него и автофагията PI3K-AKT сигнален път.

Откриваме епигенетични промени индуцирани при третиране с LPS, т.к. се променя експресията на серия протеини от семейството на NOD (свързващи двойно-верижна ДНК), както и такива, свързващи РНК, и модулиращи протеиновата деградация (убиквитиниране) (фиг. 4-3).



Фигура 4-3. Анализ на данните от 2D-PAGE, след третиране на клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) с LPS и последващо проследяване на обогатените сигнални пътища в REACTOME 2022 и BIOPLANET.

Установява се и асоциация на множество потенциално обогатени протеини след третиране с LPS със значително количество хистоновы модификатори (H3K27ac placenta mm9, H3K27ac CH12.LX mm9, H3K27ac ES-E14 mm9, H3K27ac bone marrow macrophage mm9, H3K27ac brown adipose tissue mm9, H3K27ac ES-Bruce4 mm9, H3K27ac cerebellum

mm9, H3K27ac MEL cell line mm9, H3ac myocyte mm9, H3K27ac liver mm9), което би означавало потенциално епигенетично препрограмиране на клетъчната сигнализация, както и с редица микро-РНКи. Наличието на обогатяване на разнообразни тъкани и специфични за клетъчни линии модификации на H3K27ac и др. модификатори, вариращи от плацентарни до чернодробни тъкани, предполагат широк спектър от геномни региони, които могат да бъдат насочени към транскрипционна модулация в клетки на Сертоли при експозиция на LPS. Това показва, че при статистическото обогатяване на потенциални протеини и сигнални пътища се идентифицира феномен, свързан с възможността LPS-индуцираните сигнални пътища да отразяват специфични за клетъчния тип епигенетични профили, което пък корелира с ролята на епигенетичното препрограмиране за предизвикване на специфичния за клетъчния тип отговор.

Микро-РНК играят роля в развитието на различни тъкани и органи. Те могат да регулират експресията на гените, участващи в клетъчната диференциация, клетъчния растеж и клетъчната смърт.

1.1.3. Биоинформатичен анализ на потенциалните протеини и свързани с тях сигнални пътища, хистонови модификации, микро-РНКи след третиране с 5-Azacytidine

За да установим кои протеини и пътища са засегнати до голяма степен от епигенетична регулация, посредством генно заглушаване, използвахме тотално деметилиране, посредством ДНК метилтрансферазен инхибитор 5-Azacytidine, който води до глобално деметилиране.

Установяват се промени в ДНК метаболизма, фосфилирането на протеини (регулация на кинази и сигнални пътища), както и потенциална промяна в регулацията на хистон-деацетилазите. ДНК деметилирането евентуално би довело до препрограмиране на хистоновата регулация (фиг.4-4).

Обобщено, ДНК деметилирането води до промени, свързани със сигнализацията, използваща тирозин-кинази, промени в регулацията на имунните клетки, използващи тирозин кинази, промени в РНК-свързващите протеини, както и промени в моно-атомните йонни канали, каквито могат да бъдат калиевите, натриевите и хлорните канали.

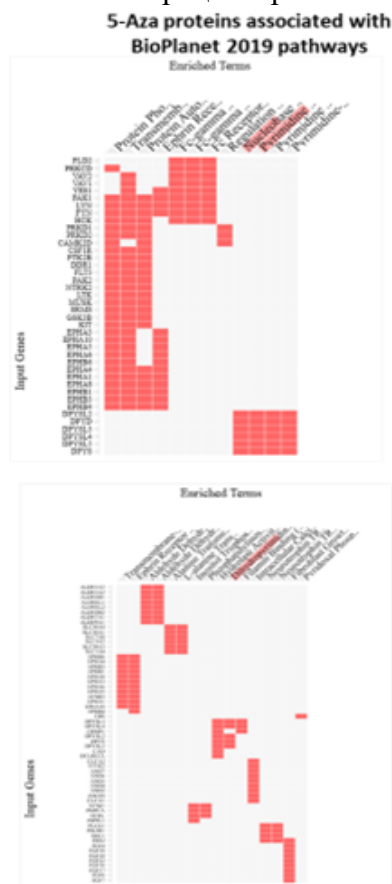
Проследихме обогатените сигнални пътища в Reactome 2022 (Home - Reactome Pathway Database) и MSigDB 2020 (GSEA | MSigDB | Human MSigDB Collections (gsea-msigdb.org)).

Промените в сигналните пътища показват силна зависимост от епигенетична регулация посредством ДНК метилиране на MAPK сигнализацията, йонните канали, зависещи от стимули (лиганди), сигнализацията на FGFR, промени в сигнализацията през PI3K път, който е свързан с предаване на сигнали тип вторичен посредник и автофагията, както и сигнализация с дефектна пироптоза, т.е. нарушения в сигнализацията на инфламазомите.

От направените анализи може да се предположи, че активацията на TLR4 с помощта на LPS води до активиране на известни пътища от вродената клетъчна сигнализация на

TLR4, посредством ИКК/IRAK, както и до значително повлияване на пътищата от MAPK семейството, включително ЕКР (MAPK), JNK, както и тези на EGF/FGF рецепторите.

| Index | Name | P-value | Adjusted p-value | Odds Ratio | Combined score |
|-------|---|-----------|------------------|------------|----------------|
| 42 | FCER1 Mediated MAPK Activation R-HSA-2871796 | 0.0009939 | 0.03778 | 3.71 | 25.65 |
| 84 | RAF/MAP Kinase Cascade R-HSA-5673001 | 0.004860 | 0.09362 | 1.50 | 7.99 |
| 94 | MAPK1/MAPK3 Signaling R-HSA-5684996 | 0.007900 | 0.1350 | 1.46 | 7.06 |
| 143 | MAPK Family Signaling Cascades R-HSA-5683057 | 0.02071 | 0.2344 | 1.35 | 5.25 |
| 247 | Semaphorin Interactions R-HSA-373755 | 0.07829 | 0.5128 | 1.61 | 4.10 |
| 389 | Activated TAK1 Mediates P38 MAPK Activation R-HSA-450302 | 0.1768 | 0.7352 | 1.87 | 3.25 |
| 496 | TRAF6 Mediated Induction Of Nfkb And MAP Kinases Upon TLR7/8 Or 9 Activation R-HSA-975138 | 0.2581 | 0.8420 | 1.22 | 1.65 |
| 514 | MAP Kinase Activation R-HSA-450294 | 0.2841 | 0.8685 | 1.26 | 1.58 |
| 601 | Negative Regulation Of MAPK Pathway R-HSA-5675221 | 0.3310 | 0.8910 | 1.27 | 1.41 |
| 636 | Oncogenic MAPK Signaling R-HSA-6802957 | 0.3662 | 0.9222 | 1.15 | 1.15 |
| 9 | MAP3K8 (TPL2)-dependent MAPK1/3 Activation R-HSA-5684264 | 0.4847 | 1.000 | 1.21 | 0.88 |
| 1048 | GRB2:SOS Provides Linkage To MAPK Signaling For Integrins R-HSA-354194 | 0.7187 | 1.000 | 0.81 | 0.27 |
| 1057 | p130Cas Linkage To MAPK Signaling For Integrins R-HSA-372708 | 0.7187 | 1.000 | 0.81 | 0.27 |
| 1060 | MAPK Targets/ Nuclear Events Mediated By MAP Kinases R-HSA-450282 | 0.7307 | 1.000 | 0.81 | 0.25 |
| 1120 | Gastrin-CREB Signaling Pathway Via PKC And MAPK R-HSA-881907 | 0.7820 | 1.000 | 0.70 | 0.17 |
| 1257 | MAP2K And MAPK Activation R-HSA-5674135 | 0.8653 | 1.000 | 0.63 | 0.09 |
| 1289 | p38MAPK Events R-HSA-171007 | 0.8770 | 1.000 | 0.48 | 0.06 |
| 1300 | ERK/MAPK Targets R-HSA-198753 | 0.8885 | 1.000 | 0.52 | 0.06 |
| 1318 | PTK6 Regulates RHO GTPases, RAS GTPase And MAP Kinases R-HSA-8849471 | 0.8967 | 1.000 | 0.44 | 0.05 |
| 1325 | RAF-independent MAPK1/3 Activation R-HSA-112409 | 0.9030 | 1.000 | 0.50 | 0.05 |
| 1346 | Sema4D In Semaphorin Signaling R-HSA-400685 | 0.9157 | 1.000 | 0.48 | 0.04 |
| 1429 | Other Semaphorin Interactions R-HSA-416700 | 0.9638 | 1.000 | 0.29 | 0.01 |
| 20 | MAPK6/MAPK4 Signaling R-HSA-5687128 | 0.9933 | 1.000 | 0.44 | 0.00 |



Фигура 4-4. Анализ на данните от 2D-PAGE, след третиране на клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) с 5-Aza и последващо проследяване на обогатените сигнални пътища в REACTOME 2022 и BIOPLANET.

Втори основен механизъм е свързан със значително потенциално повлияване на клетъчната епигенетичната регулация, в това число редица хистон-модифициращи протеини, ДНК и РНК регулиращи протеини, йонни канали, и модулиране на пътищата на убиквитиниране и регулация от микро-РНК-и. Блокирането на ДНК метилирането като механизъм на генна регулация (заглушаване) потенциално (вероятно) активира експресията на MAPK сигналните пътища още по-активно, особено на MAPK1/ERK2, MAPK3, p38 MAPK, както и на MAPK инхибитори и MAPK прицелни молекули. Активират се и пътища свързани с про-инфламаторния и пролиферативен транскрипционен фактор NF-κB през TRAF6, както и промени в йонните транспортни системи, особено свързаните с лиганд-активиране. Особено интересно е свързаното с ДНК-деметирането обогатяване на сигналния път, описващ нарушения в пироптозата и активирането на инфлазомата. Този път описва в Reactome хиперметиране в промотора на Gasdermin E, феномен наблюдаван

при редица тумори, но може да се очакват и други промени или епигенетични регулаторни механизми, които директно да влияят на самите инфламазоми.

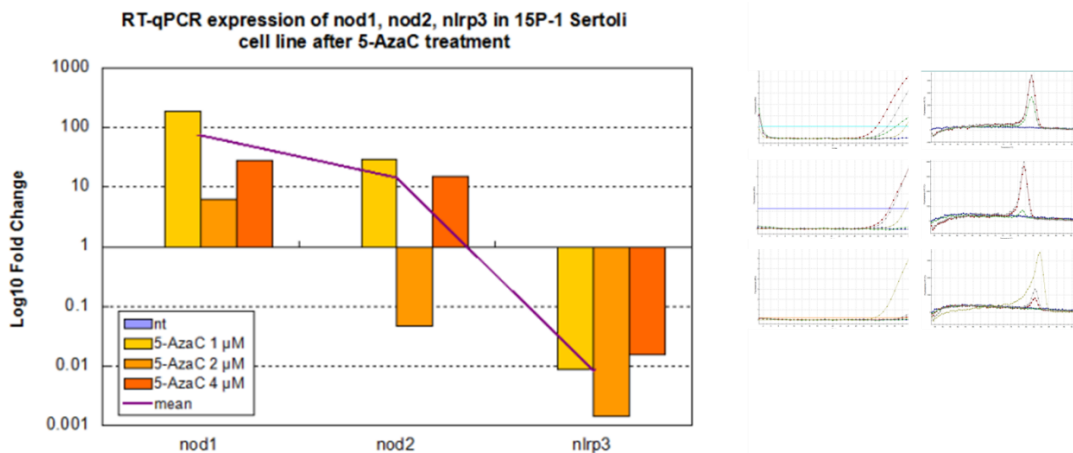
Като кратко обобщение, може да се коментира, че както третирането на клетките с LPS води до епигенетични модификации в хистоновите протеини, основно H3 ацетилиране, което потенциира LPS индуцираните транскрипционни отговори, така самото активиране на TLR4 също потенциира сигналните пътища, свързани с модулиране ефектите на NF- κ B, MAPKK (MAPK/ERK, p38 MAPK), някои йонни канали, редица про-инфламаторни цитокини, като IL-1beta, TNF-alpha, IL-6, хемокини, както и модулиране експресията на NLRP3 инфламазомния комплекс. ДНК деметилирането показва допълнителна регулация посредством ДНК заглушаване по отношение на MAPK/ERK, p38 MAPK, като индиректно регулирани в обогатените сигнални пътища VEGFA-VEGFR2 и пътищата на сигнализиране чрез VEGF, както и директно в базите данни Reactome 2022 и MSigDB 2020.

Това доведе до серия от експерименти, с които да проверим дали действително ДНК метилирането влияе директно на гени, кодиращи основни сигнални пътища, кодиращи рецептори и ефектори на инфламазомната сигнализация, както и връзката на TLR4 сигнализацията с регулацията на йонни потоци, имащи връзка с вродената имунна сигнализация, автофагията и пътищата на MAPKK, основно с участието на MAPK1/ERK2.

2. Проследяване дали деметилирането на генома влияе на директните участници в инфламазомната сигнална ос – NOD1, NOD2, NLRP3.

2.1. Влияние на глобалното деметилиране върху клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) чрез обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-qPCR)

Посредством количествен RT-qPCR (Agilent Technologies, MX3005P, Stratagene, USA) беше проследено как глобалното деметилиране влияе на транскрипционните нива на NOD1, NOD2, NLRP3. За целта клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) бе предварително третирана с 5-Aza-2'-deoxycytidine (C₆H₁₂N₄O₄), (Sigma-Aldrich, USA) в концентрации 1 μ M, 2 μ M и 4 μ M.



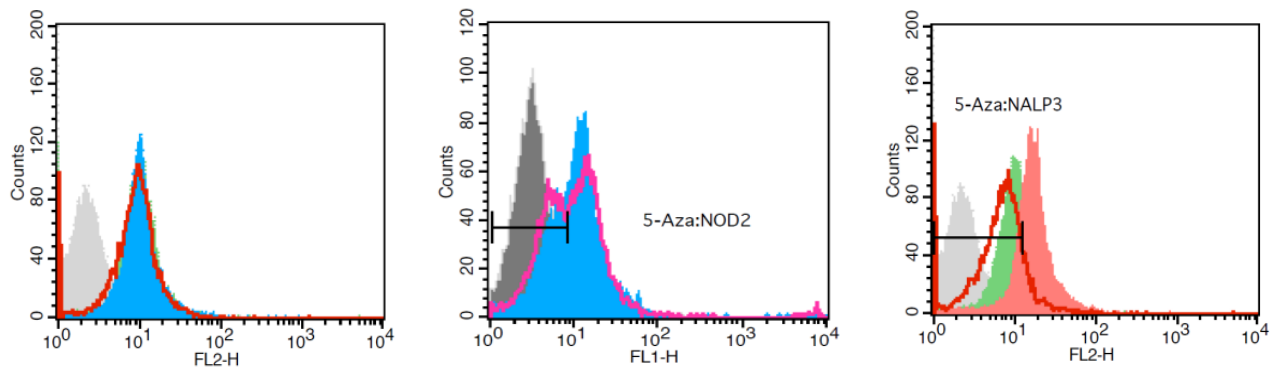
Фигура 4-5. Количествено изразяване на експресията на *nod1*, *nod2* и *nlrp3* в Сертולי клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) след третиране с 5-Aza-2'-deoxycytidine

От получените резултати би могло да се каже, че глобалното деметилиране потиска NALP3 и индуцира NOD1 (фиг.4-5).

2.2. Влияние на глобалното деметилиране върху клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) чрез проточна флоуцитометрия

Клетки от комерсиалната линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) бяха посяти в 6-ямкови плаки за клетъчно култивиране (TPP, Switzerland) в концентрация 0,1x10⁶клетки/ямка с културелна среда 10% FBS-DMEM, BI®. След 24 часа клетъчната линия бе третирана с 5-Aza-2'-deoxycytidine (C₆H₁₂N₄O₄), (Sigma-Aldrich, USA).

Протеиновата експресия на съответните рецептори бе анализирана с флоуцитометрия BD FACSCalibur (Becton Dickenson). Флуоресценция от 10⁴ клетки на проба беше отчетена в логаритмична скала и средна флуоресцентна интензивност (означена като MFI) бе отчетена в хистограма посредством софтуер Flowing Software 2, Turku Bioscience. Получените данни бяха сравнени с контрола (нетретирани клетки) (фиг.4-6).



Фигура 4-6. Протеинова експресия на NOD2 и NALP3 в Сертоли клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) след третиране с 5-Aza-2'-deoxycytidine

От получените данни се вижда, че глобалното деметилиране потиска NOD2 и NALP3 (плътна единична линия).

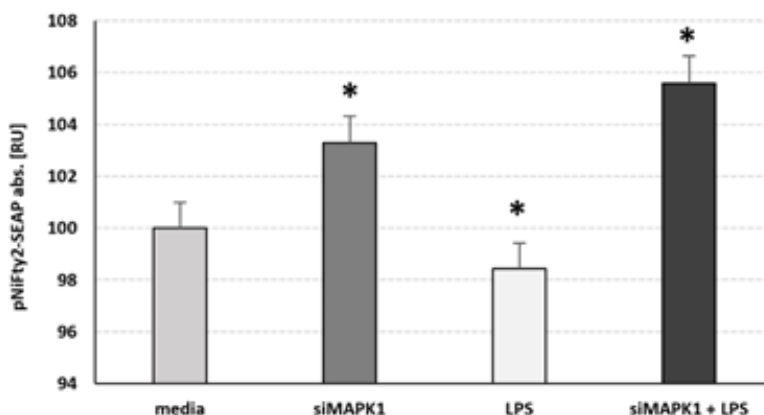
3. Изследване ролята на MAPK1/ERK2 за активирането на клетъчни сигнални пътища от вродената имунна сигнализация с участието на рецептора TLR4 през оста NF-κB

3.1. Определяне трансактивирането на транскрипционния фактор NF-κB в клетки на Сертоли от половозрепи 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), посредством съдържащия се в плазмид pNiFty2-SEAP ген, кодиращ секреторна алкална фосфатаза

В “Лабораторията по репродуктивни ОМИКС технологии” е създадена модифицирана стабилна клетъчна линия 15P-1 (ATCC® CRL-2618™), съдържаща плазмид pNiFty2-SEAP. Този плазмид носи репортерен ген, кодиращ секреторна алкална фосфатаза (SEAP), чиято експресия се контролира от NF-κB – индуциращ промотор. Транслокацията на транскрипционен фактор NF-κB е резултат от индукцията на рецептори от семейство TRLs.

Клетки от линията 15P-1 (ATCC® CRL-2618™), съдържаща плазмид pNiFty2, бяха трансфектирани по едностъпков метод, съгласно инструкциите на производителите, с *mapk1* малка интерферираща РНК (siRNA MAPK1), както и със съответната негативна контрола. Клетките бяха третирани с LPS (лиганд на TLR4) в продължение на 24 часа.

От така получените резултати би могло да се каже, че при нормални условия MAPK1/ERK2 води до потискане на NF-κB (фиг. 4-7).



Фигура 4-7. Нива на активен NF-κB, установени с колориметричен SEAP репортерен анализ след LPS стимулация за 24 часа в 15P-1 стабилна клетъчна линия, съдържаща плазмид pNiFty2-SEAP (средна стойност ± стандартно отклонение). Данните са получени чрез три технически повторения на експериментите. Звездичките над лентите означават статистическа значимост, определена чрез ANOVA (* $p < 0,05$).

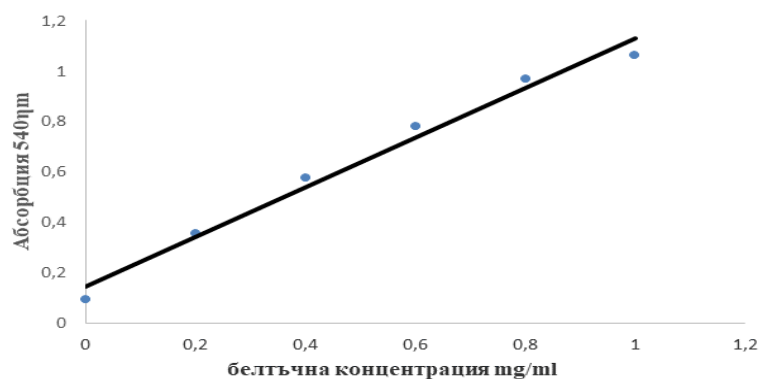
4. Изследване ролята на MAPK1/ERK2 за активирането на клетъчни сигнални пътища от вродената имунна сигнализация с участието на инфламазомната ос, чрез проследяване на активирането на каспаза-1

4.1. Определяне активността на каспаза-1 (ензим, чиито активен център участва в срязването на pгo-II-1β) в клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1) със заглушаване на гена *mapk1*.

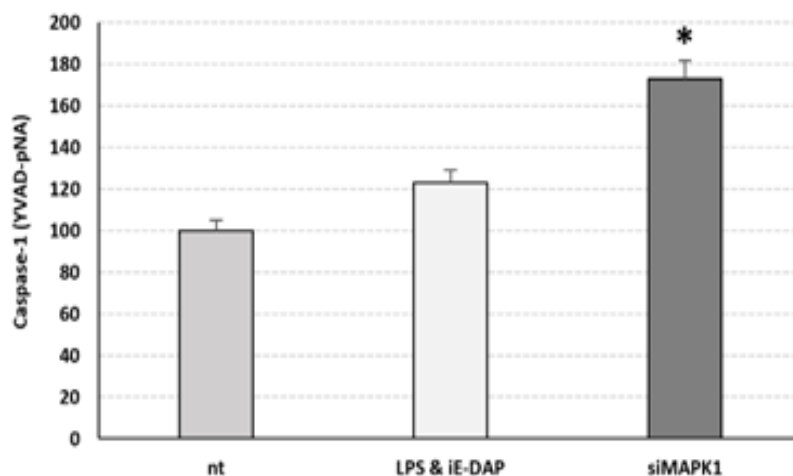
Клетки от линията 15P-1 (ATCC® CRL-2618™) бяха трансфектирани по двустъпков метод, съгласно инструкциите на производителите, с *mapk1* малка интерферираща РНК. За контрола се използват нетретирани клетки. Активността на каспаза-1 беше определена колориметрично, посредством хромофорна детекция на пара-нитроанаилид (pNA), срян от специфичната секвенция на Tyr-Val-Ala-Asp-pNA (YVAD).

По време на изследването се определя белтъчната концентрация чрез изготвяне на стандартна права на базата на белтъчен стандарт с известна концентрация (фиг. 4-8).

Получените резултати показаха, че при заглушаване на ген *mapk1* настъпва спонтанно увеличаване на активността на каспаза-1, т.е. MAPK1 контролира негативно каспаза-1 (фиг.4-9).



Фигура 4-8. Измерване на тoтaлнoтo кoличeствo прoтeин (mg) в нeизвeстнa прoтeинoвa прoбa чрeз Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA)



Фигура 4-9. Колориметрично измерване активността на каспаза-1 в клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) с трансфектиран ген *mapk1*, посредством Caspase-1/ICE Colorimetric Kit (BioVision, CA, USA) (средна стойност ± стандартно отклонение). Данните са получени чрез три технически повторения на експериментите. Звездичките над лентите означават статистическа значимост, определена чрез ANOVA (* $p < 0,05$)

Клетките на Сертоли играят ключова роля в процеса на сперматогенеза, като ранното им развитие и съзряване се влияят от комбинираните действия на FSH и про-инфламаторни цитокини като $IL-1\alpha$, които действат чрез отделни членове на семейството MAPK, включително ERK2 и p38 MAPK/ JNK. Те от своя страна взаимодействат със зависимия от автофагията NF- κ B. Развитието на клетките на Сертоли се регулира допълнително от различни потоци на йонни канали, които модулират потенциала на тяхната клетъчна мембрана.

В този дисертационен труд се задълбочихме в по-малко проучените аспекти на поведението на зрелите Сертолиевы клетки, като се фокусирахме по-специално върху

въздействието на сигналните пътища DAMP/PAMP, свързани с NOD1/NOD2 и TLR4 сигнализацията. Предлагаме хипотеза за взаимодействията MAPK1/ERK2 – TLR4 – NF-κB въз основа на данните, които сме получили досега, както и на литературата, публикувана за клетките на Сертоли и други клетки. Клетките на Сертоли са отговорни за поддържането на сперматогонната ниша, освобождавайки трансформиращ растежен фактор бета (TGF-β) и FSH-зависим-GDNF [234]. FSH и TGF-β низходящо регулират няколко пътя, свързани с клетъчната пролиферация, включително неканоничните p38 MAPK, ERK, JNK [235]. FSH е паракринен активатор на MAPK1/ERK2 пътя, докато TGF-β се контролира от NF-κB. При освобождаване на про-инфламаторни или стресови фактори, сигнализиращи опасност, като TLR4 лиганди и АТР, се включват най-малко три сигнални пътя: TLR4 активира както MyD88/TRAF6/NF-κB, така и p38 MAPK пътя, докато АТР в комбинация с TLR4 пътят низходящо може също така да регулира експресията на NLRP3 инфлазомата и последващото активиране на каспаза-1 с разцепване и освобождаване на IL-1β. Докато е в интактни условия, NF-κB насърчава пролиферацията и анти-апоптотичния фенотип [236], както и митофагията (чрез FSH-p62), за да поддържа инфлазомата активирана [237]. При повишен цитокинов стрес (индуциран от TNF-α), NF-κB има отрицателен ефект върху сигнализацията на GDNF [238] и митофагията [239].

5. Проследяване дали индуцирането на TLR4 оказва влияние на клетъчната миграция и пролиферация през MAPK1/ERK2 сигналния път

5.1. *In vitro* тест за заздравяване на рани („Wound healing assay“) за определяне степента на пролиферация на клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1) със заглушаване на гена *mapk1*

Клетки от линията 15P-1 (ATCC® CRL-2618™) бяха трансфектирани по двустъпков метод, съгласно инструкциите на производителите, с *mapk1* малка интерферираща РНК. Част от клетките бяха третирани с LPS. За контрола са използвани нетретирани клетки.

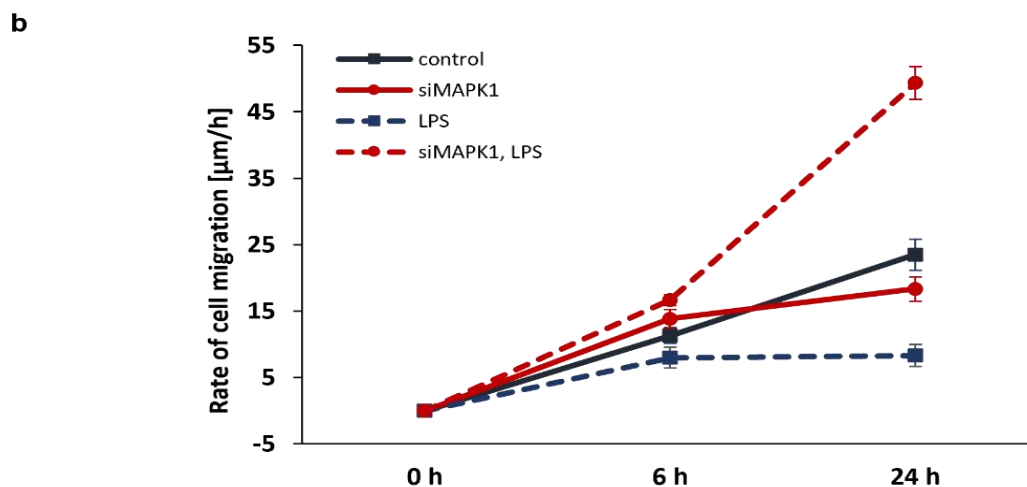
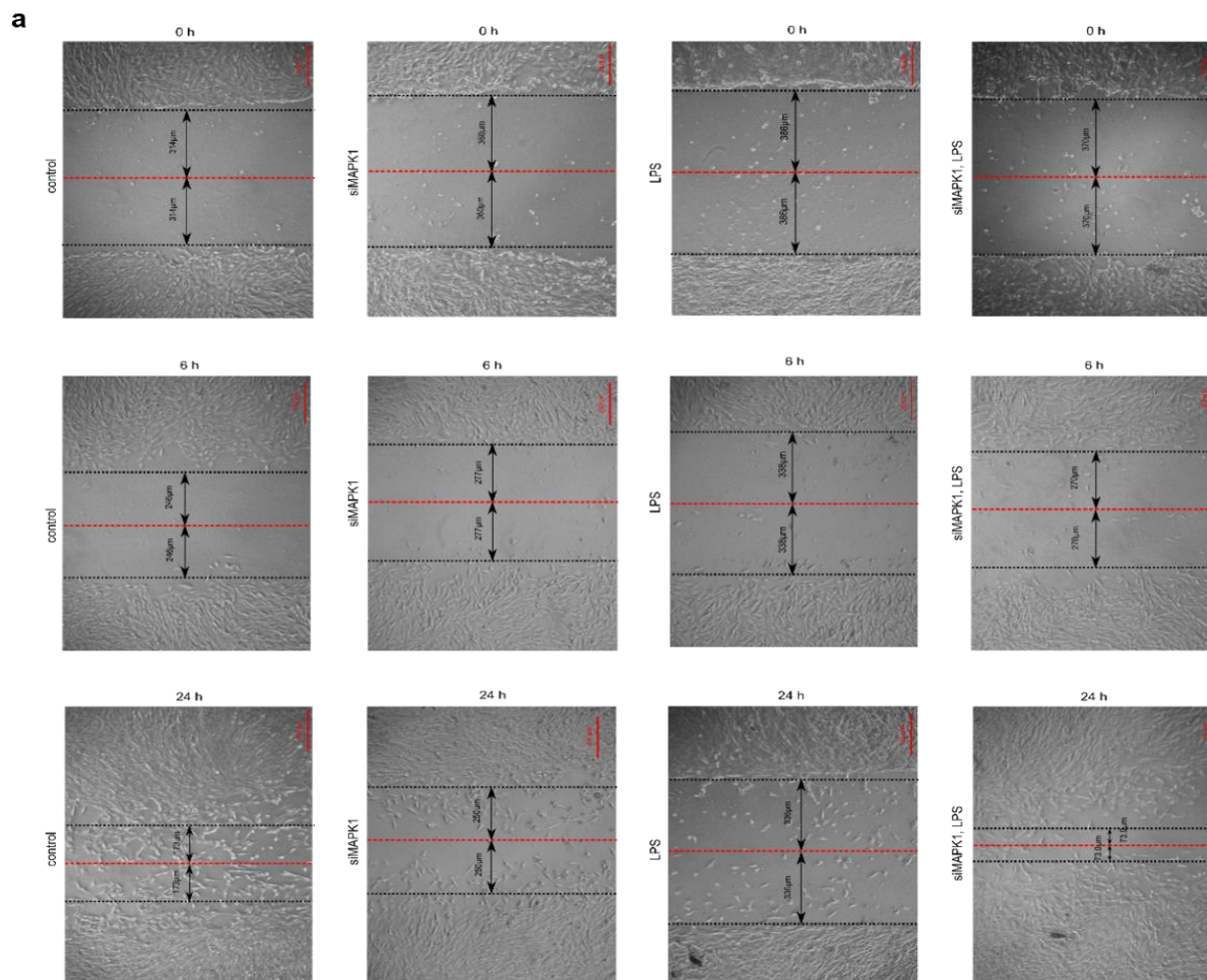
Открихме, че самостоятелната индукция на TLR4 води до намаляване на клетъчната миграция/пролиферация на 24-ия час, в сравнение с контролните нетретирани Сертолиевите клетки (Фигура 4-9, 4-9b – синя, прекъснатата линия).

По същия начин, заглушаването на MAPK1/ERK2 доведе до увеличаване на клетъчната миграция/пролиферация на 6-ия и особено на 24-ия час (фиг. 4-9b, червена линия), което предполага, че MAPK1 насърчава клетъчната пролиферация в интактни Сертолиевите клетки.

Интересното е, че когато TLR4 е индуциран в MAPK1/ERK2 заглушени клетки, се наблюдаваше значително увеличение на клетъчната миграция/пролиферация (Фигура 4-9b, червена, прекъснатата линия), много подобно на експеримента за динамика на NF-κB активиране, описан по-горе.

Пролиферацията на Сертолиевите клетки зависи най-вече от два различни сигнални пътя. FSH е основен регулатор на клетките на Сертоли и неговият митогенен ефект се медира чрез ERK [240], докато някои цитокини, като тези от семейството на интерлевкин

1, които се секретират непрестанно от Сертолиевите клетки, предимно тяхната $IL-1\alpha$ форма, упражняват своя митогенен ефект чрез активиране на p38 MAPK и JNK/SAPK пътища [241].



Фигура 4-9. Тестът за заздравяване на рани *in vitro* предполага сложни взаимодействия между пътищата MAPK1 и TLR4, където TLR4 играе защитна роля при отсъствие на MAPK1. (a)

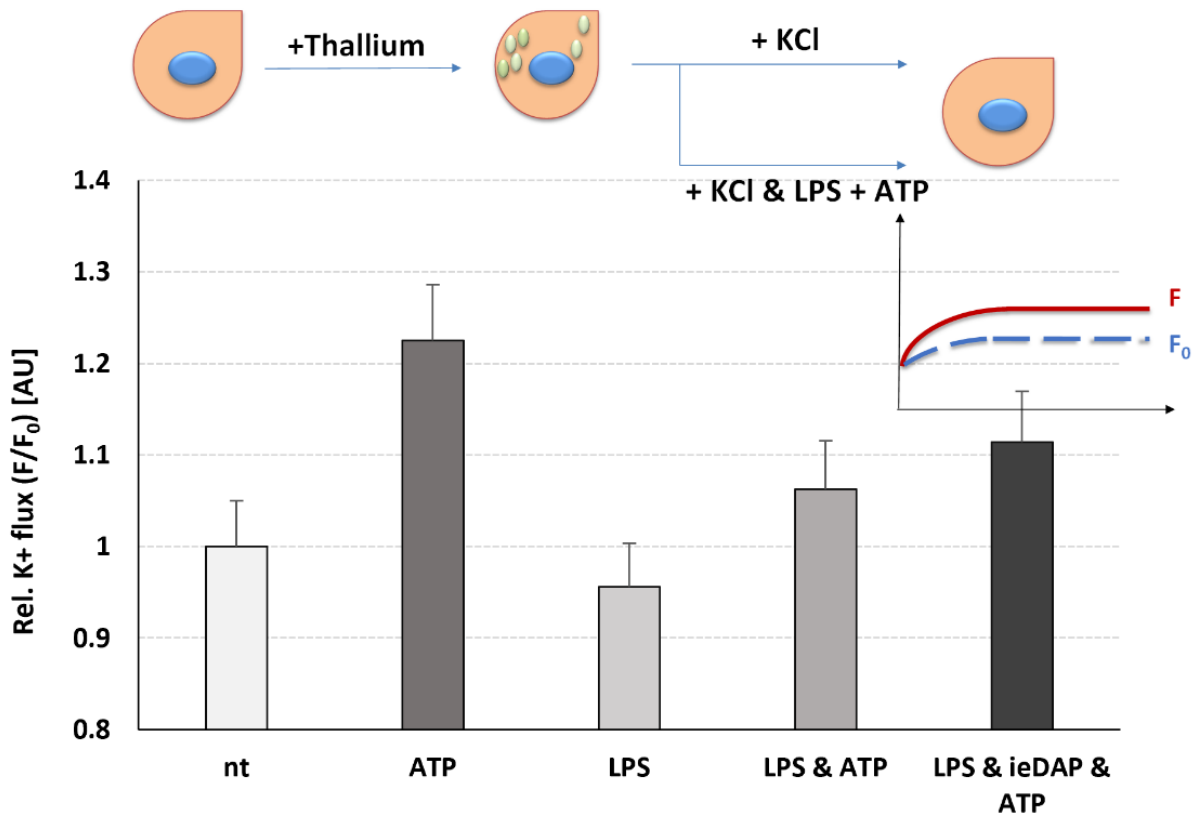
Представени са изображения от канала за светло поле на Сертоли клетъчна линия 15P-1, след образуване на конфлуентен монослой. След това внимателно е направена драскотина през сливащия се монослой с помощта на стерилен връх на пипета. Фронтът на миграция е оценен на 0, 6 и 24 час. (b) Скоростта на клетъчна миграция (R_M) [$\mu\text{m}/\text{h}$] се изразява като $R_M = (W_i - W_f)/t$, където W_i е първоначалната ширина на раната [μm], W_f е крайната ширина на раната [μm] и t е продължителността на миграцията [часове]. R_M е изразена спрямо времето на нетретиране (контрола) (черна линия), трансфектирани със siMAPK1 (48 часа) (червена линия), TLR4 заразен с LPS (24 часа) (синя, прекъсната линия) и трансфектирани със siMAPK1 и след това третирани с LPS 15P-1 клетки (червена, прекъсната линия). Отчетената грешка включва средна стойност \pm стандартно отклонение. Данните са представителни за независими експерименти с три технически повторения, използващи клетъчна линия 15P-1

6. Проследяване на промените в калиевия (K^+) йонен поток (флукс), нужен за активирането на каспаза-1 в клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирани с ATP и и/или лиганди на TLR4/NOD1.

Посредством FluxORTM анализ бяха проследени промените в калиевия (K^+) поток (флукс), въз основа на пропускливостта на калиевите канали към талий (Tl^+). Под влиянието на различни стимули, калиевите канали от мембраната на Сертолиевите клетки, необходими за активирането на каспаза-1 се отварят и притокът на талий от външната среда се открива с високочувствително индикаторно багрило. Флуорогенният сигнал отразява количествено активността на йонните канали и транспортери, които са проницаеми за талия. Така флуоресценцията, се превръща в индикатор за активност за всеки йонен канал или транспортер, който е пропусклив за талий.

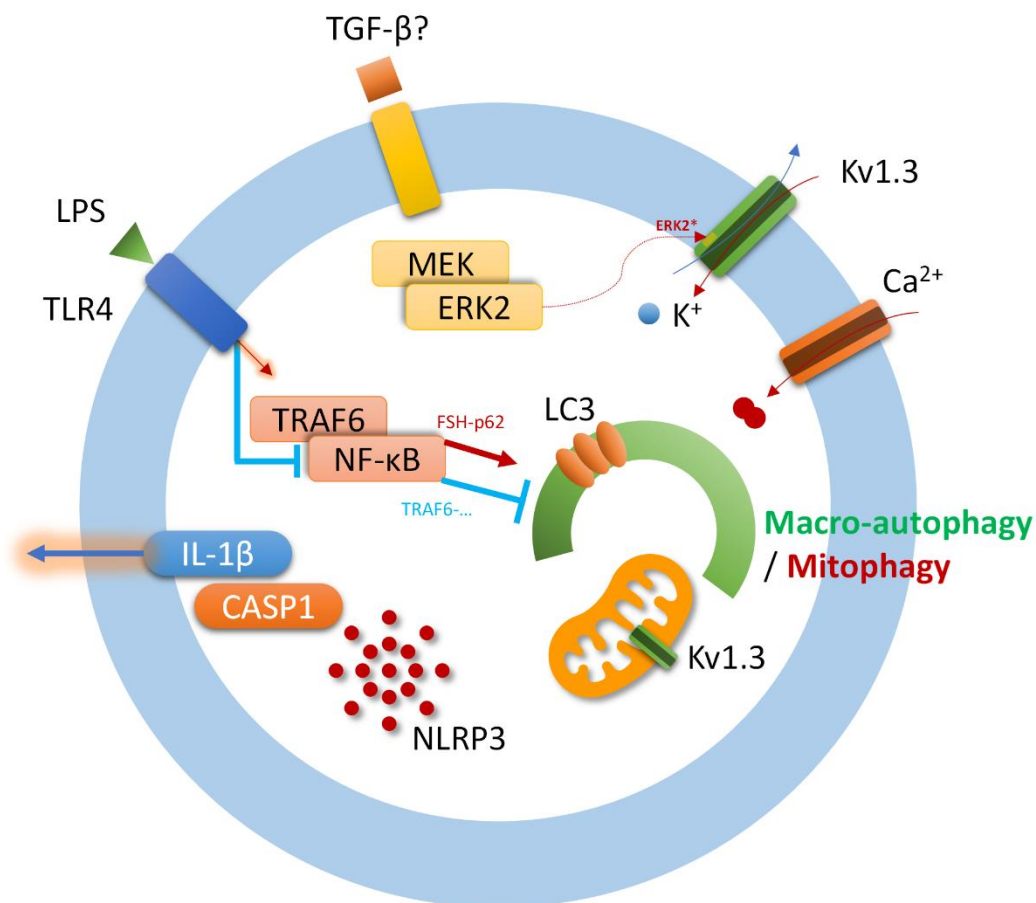
В случая бе наблюдавано активирането на волтаж-зависими канали като Kv1.3 в зрели клетки на Сертоли, използвайки K^+ -съдържащ буфер за активиране. Установихме, че активирането на TLR4 за 24 часа чрез LPS, последвано от третиране с ATP в продължение на 1 час, както и съвместното активиране на TLR4 и NOD1, използвайки съответните им лиганди LPS и iE-DAP за 24 часа, последвано от третиране с ATP за 1 час, водят до активиране на волтаж-зависимия калиев поток (фиг. 4-10). Още по-силно активиране се наблюдава, когато третирането с ATP се прилага самостоятелно, докато индукцията на TLR4 само с LPS, без допълнително добавяне на ATP води до намаляване на потока (фиг.4-28).

Калиевите волтаж-зависими канали и особено Kv1.3., са много важни за регулирането на про-възпалителните пътища и пътищата на клетъчна смърт, като пътя на NLRP3. Тяхната активност или състояние на покой може съответно или да активира, или да потисне активирането на инфламазомата [196-197]. Наскоро са публикувани данни за предполагаеми места за фосфорилиране на Kv1.3. от MAPK1/ERK2, участвайки в тяхното потенциално активиране, ние се опитахме да проучим дали MAPK1/ERK2 може също да повлияе на пътя на активиране на NLRP3 инфламазомата. Опростен модел на взаимодействията между TLR4-TRAF6-NF- κB , (FSH)-МЕК/MAPK1(ERK2), йонните потоци, NLRP3 инфламазомната активация – Caspase-1-IL-1 β и автофагията е представен на Фигура 4-11, с предполагаемо участие на волтаж-зависими калиеви Kv1.3 канали.



Фигура 4-10. Изследване влиянието върху волтаж-зависими калиеви канали (като Kv1.3) в клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), посредством FluxOR™, след индукция на TLR4 и NOD1 самостоятелно или в комбинация с добавяне на ATP. Относителния поток от калиеви йони (K⁺), е оценен като съотношение F₀/F в 120 s при следните условия: нетретираните клетки; третиране с ATP (1 час); индукция на TLR4 за 24 часа (LPS); индукция на TLR4 за 24 часа (LPS) и третиране с ATP за 1 час; съвместна индукция на TLR4 и NOD1 за 24 часа (LPS, iE-DAP) и ATP третиране за 1 час. Отчетената грешка включва средна стойност ± стандартно отклонение. Представените данни са от независими експерименти с три технически повторения. K₂SO₄ се добавя към стимулиращия буфер, за да се стимулира отварянето на волтаж-зависимите K⁺ канали. Базовите F₀ стойности и F стойностите са записани за 120 s и съотношението F/F₀ е изчислено, като по този начин се осреднява и нормализира потокът към третирането.

7. **Обобщен модел (хипотеза) за взаимодействието между MAPK1/ERK2, TLR4, NF-κB, Kv1.3 канали, активацията на автофагия и сигналната ос за инфламазна активация NLRP3-CASP1-IL1β**



Фигура 4-11. Схематично представяне на взаимодействието между MAPK1/ERK2, TLR4, NF-κB, Kv1.3 канали, автофагия и NLRP3-CASP1-IL1β

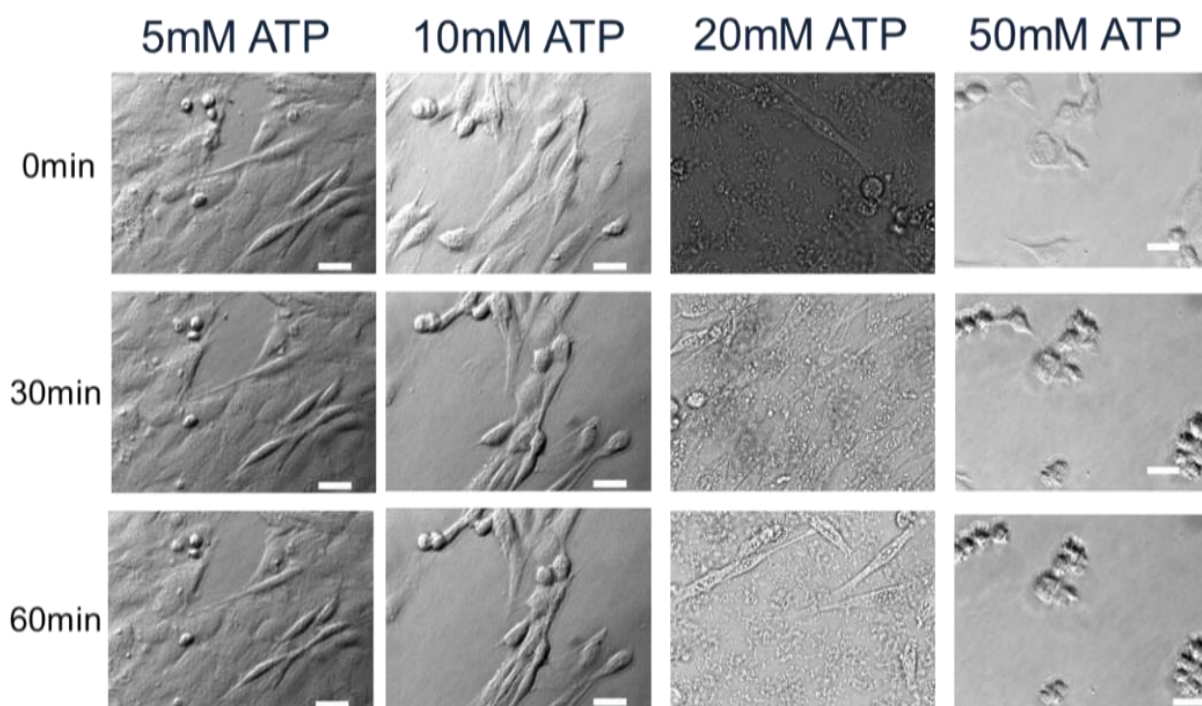
Кое ще вземе превес, клетъчната пролиферация или възпалителната клетъчна смърт се контролира още и от Kv1.3 калиевите канали. В това изследване, използвайки стимулиращ буфер , съдържащ K⁺, ние селективно измерваме потока K⁺ чрез волтаж-зависими канали. Открихме, че индуцирането на TLR4 в MAPK1 заглушени условия води до увеличаване на клетъчната миграция и клетъчната пролиферация. Това може да е свързано и с активността на каналите Kv.1.3, като според едно скорошно проучване и предложеният от него „*модел за отчитане на напрежението*“, Kv.1.3 каналите могат да „усетят“ промените в напрежението на мембраната при клетъчна стимулация [257]. Деполаризацията на клетъчната мембрана отваря каналите, като по този начин насърчава фосфорилирането на вътреклетъчни С-терминални тирозинови и серинови остатъци от протеин кинази на MEK-ERK сигналния път, включително MAPK1/ERK2. Това фосфорилиране също е необходимо за активиране на MEK-ERK сигналния път, но механизмът на взаимодействия между фосфорилирания канал и сигналния път все още

остава неясен [258]. Kv1.5 каналите за разлика от Kv1.3 каналите не стимулират клетъчна пролиферация [257]. Kv1.3 са MAPK1/ERK2, регулирани както върху клетъчните мембрани, така и в митохондриите, където индуцират окислително фосфорилиране и производство на реактивни кислородни форми (ROS), което стимулира пролиферацията. В случай на допълнителна индукция на TLR4 в присъствието на АТР (едногенни продукти на тъканна и клетъчна увреда, DAMP), е възможно Kv1.3. и други волтаж-зависими канали да предизвикат увеличаване на калиев поток, като по този начин подпомагат активирането на инфламазомата. Докато NF-κB използва митофагия, за да контролира този процес, при продължителни ко-стимулирани условия, където MAPK1 е заглушен, NF-κB вероятно връща оркестрираната клетъчна сигнализация към възпаление и клетъчна смърт. Докато индуцираният от ROS NF-κB активира автофагия със защитен резултат, индуцираният от TLR4 NF-κB първоначално активира автофагия чрез Beclin1, но по-късно я потиска чрез индуциране на А20 [259]. Освен това е установено, че FSH защитава кози Сертолиевы клетки от оксидативен стрес чрез инхибиране на р62-Nrf2 макро-автофагия [260], което би могло да обясни нашите данни, показващи повишена макроавтофагия и потисната микроавтофагия (митофагия) в културелна среда без FSH. Тъй като FSH е необходим за експресията на MAPK1/ERK2, това би довело до намален MAPK1 при интактни условия с висока глюкоза и потисната митофагия, тъй като MAPK1/ERK2 и MAPK14/p38 са от съществено значение за нейното активиране. Това проучване обяснява защо частичното активиране на митофагията се случва при условия на глад, придружено от индуцирана от метаболитен стрес обща автофагия, но не и при условия на индуциран TLR4, тъй като в следствие TLR4 пътят модулира различните MAPK пътища.

8. Разширено характеризиране на ролята на инфламазомната сигнализация за клетъчния виталитет на клетките на Сертоли

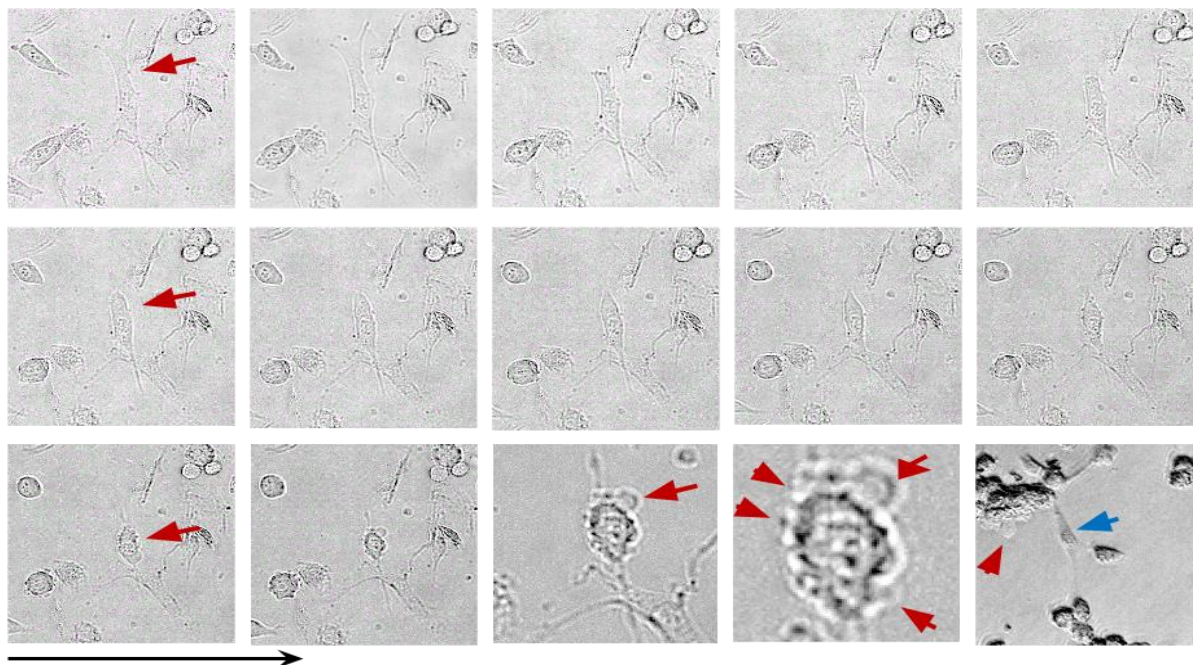
8.1. Изследване на клетъчния виталитет на клетки на Сертоли от половозреели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирани с различни концентрации АТР, като външен сигнал за увреждане (DAMP)

В настоящата дисертация бе проследен ефекта, който оказват различните концентрации АТР върху клетъчния виталитет във времето (фиг. 4-12).



Фигура 4-12. Клетки на Сертоли от половозреели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирани с различни концентрации 5 mM, 10mM, 20 mM и 50 mM АТР.

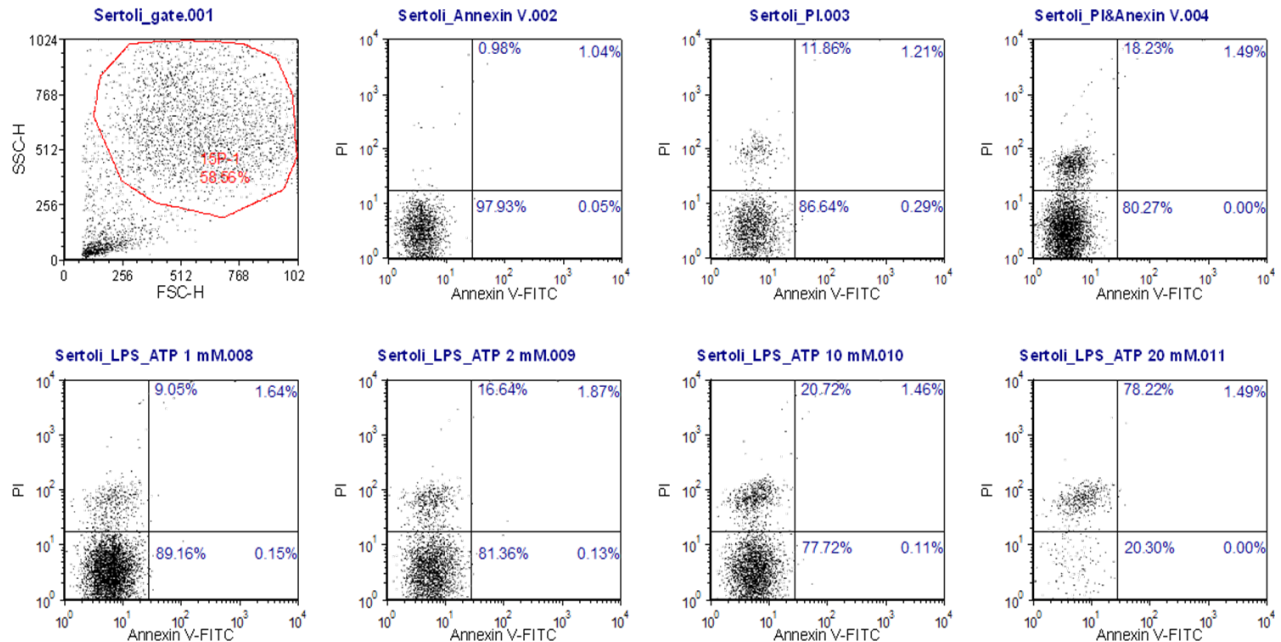
При третиране на клетки на Сертоли с 10mM АТР бе наблюдавано значително свиване на клетките, като предполагаме се наблюдават изменения в клетъчната мембрана и едновременно с това имаше абсолютно незасегнати клетки, което е характерно за клетъчна смърт по каспаза-1 механизъм, т.е. би могло да е пироптоза (фиг 4-13).



Фигура 4-13. Клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирана с 10mM АТР.

Клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1) бяха третираны с LPS (лиганд на TLR4) в комбинация с различни концентрации АТР. Клетките бяха подготвени по описана методика за флоуцитометрия, като в изследването бяха използвани Annexin V/Propidium iodide (PI).

Резултатите от проточната цитометрия показаха, че третирането на клетките с нарастващи дози (1, 2, 10, 20 mM) АТР води до повишаване на нивата на клетъчна смърт (фиг. 4-14), като при максималната концентрация на АТР 20 mM, процента на мъртви клетки достига 78% от събраните клетки в гейта, като общия брой клетки беше намален значително за сметка на клетъчен детрит т.е. отново се вижда, че АТР влияе на клетъчната смърт по дозо-зависим начин.



Фигура 4-14. Проточна флоуцитометрия (FCS) на клетъчната линия 15P-1, третирана с LPS за 24 часа и за 1 час с различни дози ATP и оцветени с Annexin V-FITC (x-axis) и Propidium Iodide (y-axis). *P<0.05. s.d., n = 3.

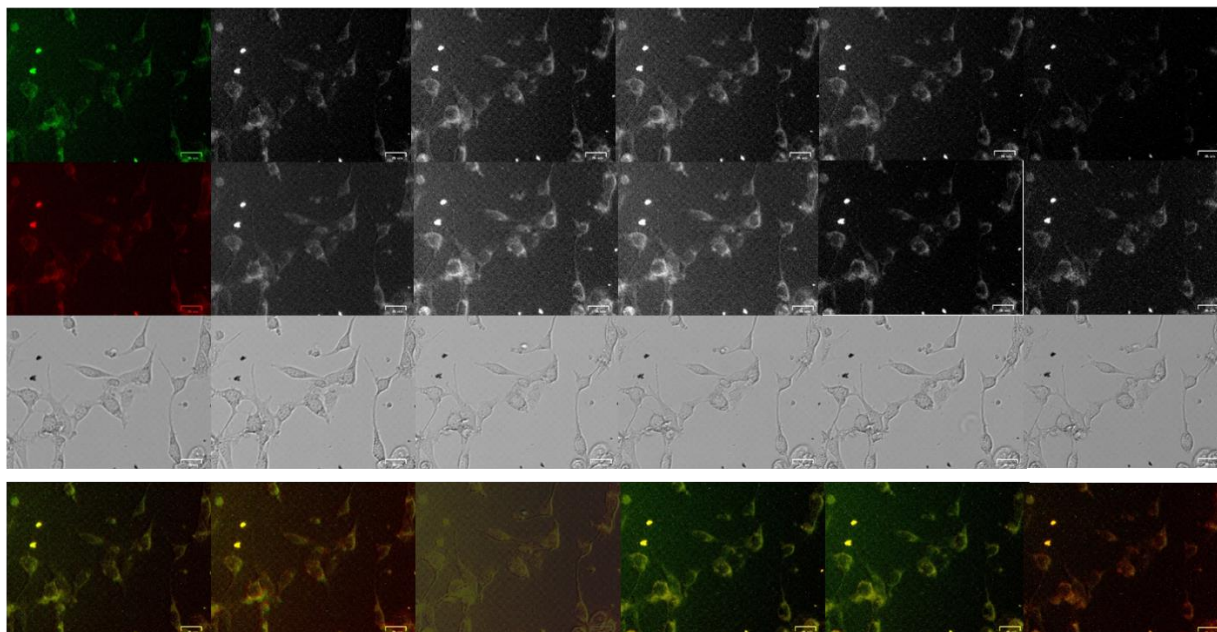
8.2. Изследване на мембрания интегритет при възникване на клетъчна смърт в клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирана с LPS и ATP, посредством детектор на автофагоцитозния флукс.

Изследвана бе постоянната промяна (поток) на автофагията (Autophagic flux) чрез детектор, с проследяване на акумулирането на лизозоми и автофагозоми, и образуваните след това чрез сливането им автолизозоми, като по този начин искахме да проверим дали възниква пълно разпадане на клетъчната мембрана и изтичане на клетъчно съдържим

В условия без гладуване, клетките на Сертоли бяха стимулирани за 24 часа с лиганда LPS и за 1 час с ATP, като клетките бяха трансфектирани с вектора mRFP-GFP-LC3, кодиращ тандемен флуоресцентен протеин (tfLC3) и бе проследена флуоресценцията на детектора на автофагоцитозния флукс – клетките бяха визуализирани с инвертната система за флуоресцентно образно наблюдение на живи клетки – BioRad ZOE. Не бе наблюдавано изтичане на клетъчно съдържимо, характерно за газдермин D опосредствана пироптоична клетъчна смърт (фиг. 4-15).

mRFP-EGFP-LC3 plasmid

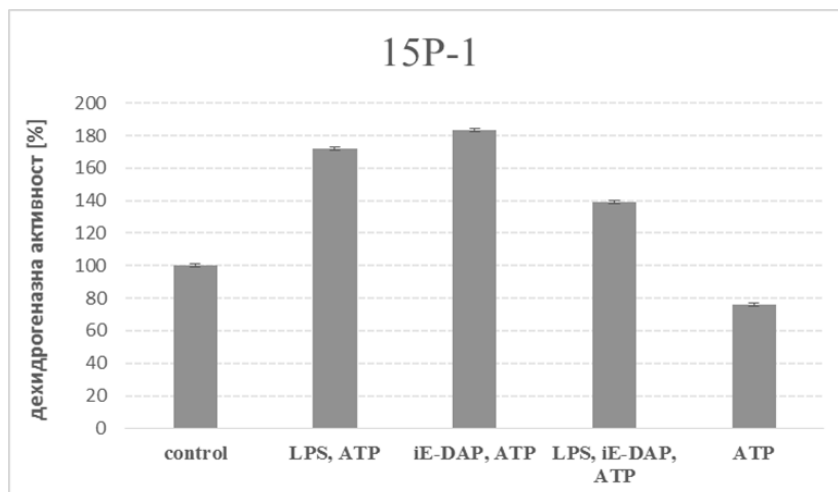
Norm GLU, 24h LPS + 10 mM ATP



Фигура 4-15. Клетки на Сертоли (15P-1) предварително натоварени с 1 mg/mL FITC-Dextran за цяла нощ (37°C, 5% CO₂) са трансфектирани с вектора pmRFP-LC3 (24h) и култивирани в условия без гладуване. След това клетките са стимулирани с лигандите LPS и ATP. Бе добавен Chloroquine в продължение на 3 часа и клетките са анализирани със системата за инвертна флуоресцентна микроскопия на живи клетки ZOE Fluorescent Cell Imager.

8.3. Изследване на клетъчния виталитет/активността на клетъчните дехидрогенази в клетки на Сертоли от половозрепи 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третираны с ATP и и/или лиганди на TLR4/NOD1

Изследвана бе клетъчната жизнеспособност посредством водноразтворима тетразолиева сол WST-8, разработена от Djoindo (Япония), която се редуцира от клетъчните дехидрогенази до оранжев формазанов продукт, който е разтворим в среда за тъканна култура. Двойката WST-8/1-Methoxy PMS обменя електрони и това води до оранжев цветен продукт. WST-1 не влиза в клетките, докато 1-Methoxy PMS влиза вътреклетъчно и обменя електрони с NADH и NADPH. Количеството произведен формазан е право пропорционално на активността на дехидрогеназите в клетките и може да се ползва като индиректен индикатор за клетъчен виталитет. Аналогично, тази активност може да отрази и активирането на инфламазомната сигнална ос Nlrp3/Casp1. Клетките на Сертоли от клетъчната линия 15P-1 бяха третирани отново със специфичните лиганди LPS и iE-DAP в продължение на 24 часа и ATP в продължение на 1 час. Към супернатанта от третираните клетки директно бе добавен разтвор ССК8. За контрола бяха използвани нетретирани клетки (фиг. 4-16).



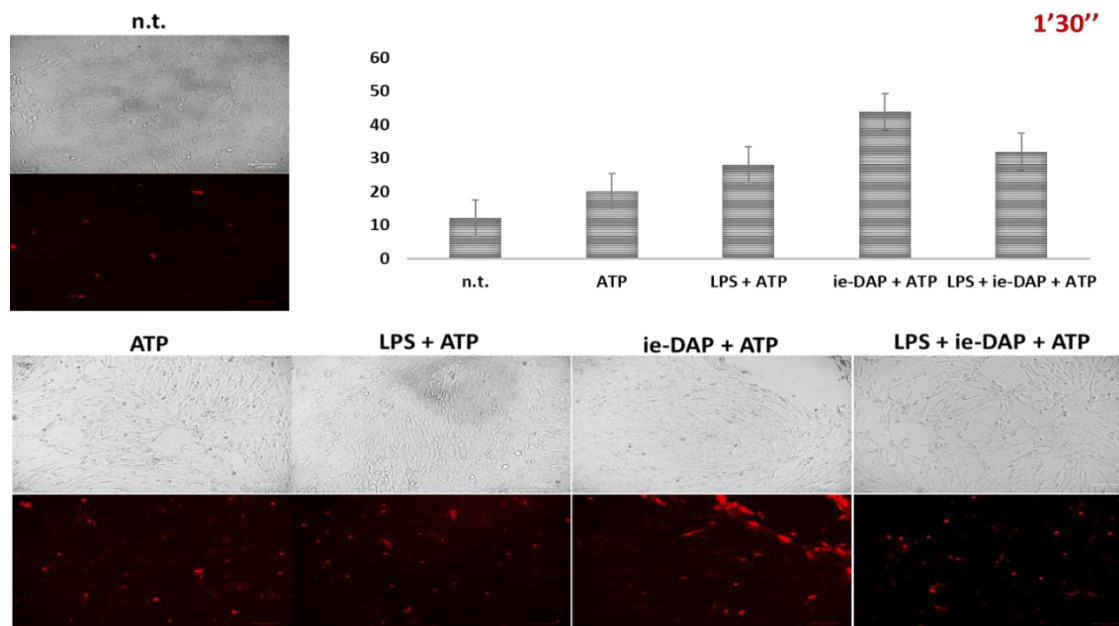
Фигура 4-16. Определяне на клетъчната виталност на Сертолиеви клетки (клетъчната линия 15P-1), третирани с LPS и iE-DAP за 24 часа и за ATP 1 час, посредством Cell Counting Kit 8.

От получените резултати стана отново ясно, че ATP директно води до намален виталитет или до намалена дехидрогеназна активност, или намалено количество NADH, NADPH, вероятно при повишена клетъчна смърт (фиг. 4-16). Още по-интересни са резултатите получени при третиране на клетките с LPS и/или iE-DAP, съвместно с ATP. Активността на клетъчните дехидрогенази бе значително повишена. Поначало NADPH е важен за подържане на глутатионовия пул и блокирането на реактивните форми на кислорода (ROS) при оксидативен стрес, но самият NADPH може да участва в генерирането им (на ROS), под действието на NADPH оксидази (NOX ензими). От друга страна, при простатни метастатични тумори, подобно на нашите данни, са показани повишени нива на активност с кита ССК8, отразяващи повишен клетъчен виталитет, който нараства особено след третиране на клетките с LPS, но не и само с ATP. Блокирането на инфламазомата NLRP3 е довело до значително намаляване на клетъчния виталитет [47]. Такъв механизъм на NLRP3 индуцирана продукция на ROS с цел промотиране на клетъчен растеж и метастазиране е описан и при карцинома на млечната жлеза. Ние считаме, че до голяма степен данните от ССК8 отразяват именно този феномен на активация на Nlrp3, (посредством дехидрогеназите, които съпътстват активирането и, както и променения баланс в ROS, т.к. и двата процеса повишават нивата на NADH, NADPH, съответно и количеството WST8 продукт.

8.4. Изследване на клетъчна смърт в клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), третирани с LPS и/или iE-DAP и/или ATP

Клетките на Сертоли от клетъчната линия 15P-1 бяха третирани отново със специфичните лиганди LPS и/или iE-DAP в продължение на 24 часа и/или ATP в продължение на 1 час, след това клетките бяха оцветени с Propidium Iodide и анализирани със системата за инвертна флуоресцентна микроскопия на живи клетки ZOE Fluorescent Cell

Imager. В случая се изброяват клетки на сходни зрителни полета с подобна гъстота на клетъчната популация.



Фигура 4-17. Клетки на Сертоли (15P-1), стимулирани с лигандите LPS и/или iE-DAP и/или ATP. Клетките са оцветени с Propidium Iodide и са анализирани със системата за инвертна флуоресцентна микроскопия на живи клетки ZOE Fluorescent Cell Imager

От получените микро-фотографии бе наблюдавано значително увеличение в броя на умрелите клетки, при индукция на рецепторите от вродената имунна система и отново се вижда, че LPS и ATP индуцират клетъчна смърт (Фиг. 4-17).

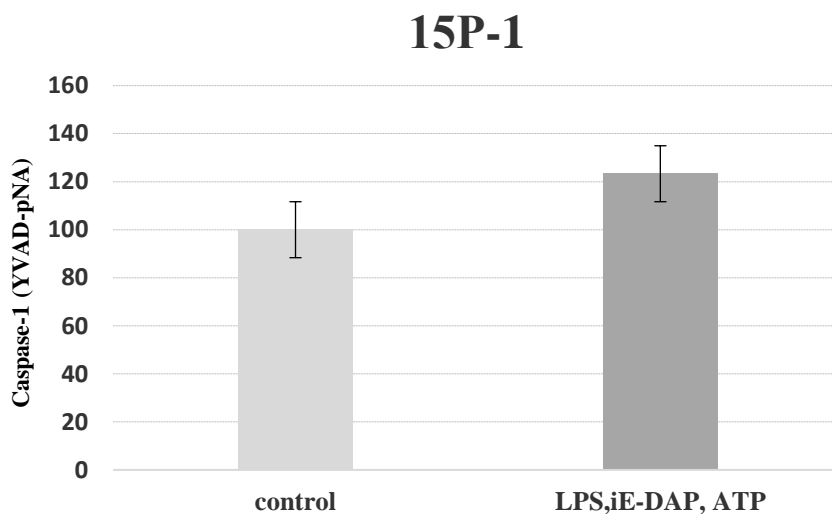
Тъй като TLR4 и NF-κB участват в инфлазомната сигнализация и решаващ механизъм за нейното низходящо регулиране се приписва на автофагията, ние допълнително проучихме как активирането на TLR4 засяга макроавтофагията и митофагията, както и как волтаж-зависимите канали повлияват процеса. Въпреки, че NF-κB, ключов активатор на възпалението, подготвя NLRP3-инфлазомата за активиране чрез индуциране експресията на p62-IL-1β и NLRP3, NF-κB в същото време е в състояние да предотврати прекомерното възпаление чрез ограничаване на NLRP3-инфлазомната активация като повишава автофагоцитарния клирънс на увредени митохондрии (митофагия). Тъй като NLRP3 агонистите увреждат митохондриите и освобождават сигнали, активиращи инфлазомата, в макрофагите NF-κB медира LPS-индуцираната експресия на p62/SQSTM1, позволявайки на убиквитинираните увредени митохондрии да бъдат елиминирани от p62-зависима митофагия [256]. В нашето проучване, TLR4, индуциран с LPS за 24 часа доведе до очаквано увеличение на макроавтофагията, но не и до увеличаване на митофагията; по-скоро обратното, митофагията беше намалена. Други проучвания показват, че p62 отслабва стерилното възпаление и фулминантния хепатит, но за този ефект са необходими както p62, така и експресията на Parkin [256]. Автофагията, протеазомният трафик и трансактивацията на NF-κB се регулират от p62, наричан още

Секвестозома 1. Тя функционира като структурен протеин, който се състои от PB1-, TRAF6 свързващи-, LC3 взаимодействащи- и убиквитин-асоциирани домени. p62 организира TRAF6-регулирано NF-κB сигнализиране и сортиране на полиубиквиниран протеин до секвестозоми и протеазоми чрез свързване на TRAF-6 и MEKK3. IL-1β регулира MEKK3-p62-TRAF6. MEKK3 регулира ERK1/2 и p38 MAPK независимо от NF-κB [254]. ERK2 и NFκB потискат апоптозата и клетъчната диференциация, докато ERK1/2 насърчават клетъчната пролиферация [253], докато p38 MAPK насърчава клетъчната апоптоза, но също и клетъчната миграция [255]. Така NF -κB контролира както пътищата за индуциране, така и пътищата за потискане на възпалението и клетъчната смърт, в зависимост от типа и състоянието на клетката. Нашите данни предполагат, че индуцирането на TLR4 е про-инфламаторно и активира инфламазомата в условия на продължителни 24-часови третирания.

9. Изследване на ролята от ко-стимулирането на TLR4 (LPS) и NOD1 (iE-DAP) върху инфламазомната сигнална ос, показали най-силен ефект върху виталитета на Сертолиевите клетки

9.1. Определяне активността на каспаза-1 (ензим, чиито активен център участва в рязането на pro-IL-1β) в клетки на Сертоли от половозрепи 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), след ко-стимулация с LPS и iE-DAP

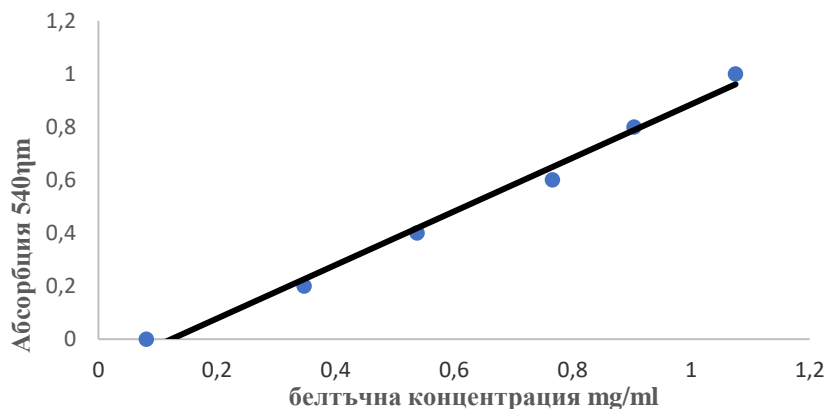
Клетки от комерсиалната клетъчна линия бяха третирани със специфичните лиганди LPS и iE-DAP за активиране на рецепторите TLR4 и NOD1 от системата съответно на Toll-like и NOD-like рецепторите в продължение на 24 часа. Един час преди определяне активността на каспаза-1 към вече третирани клетки бе добавен ATP. Активността на каспаза-1 бе определена колориметрично, посредством хромофорна детекция на паранитроанаилд (pNA), срян от специфичната секвенция на Tyr-Val-Ala-Asp-pNA (YVAD) (фиг.4-18).



Фигура 4-18.

Колориметрично измерване активността на каспаза-1 в клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) посредством Caspase-1/ICE Colorimetric Kit (BioVision, CA, USA), след специфично третиране на клетъчната линия с лигандите LPS, iE-DAP и ATP.

По време на изследването се определя белтъчната концентрация чрез изготвяне на стандартна права на базата на белтъчен стандарт с известна концентрация (фиг. 4-19).

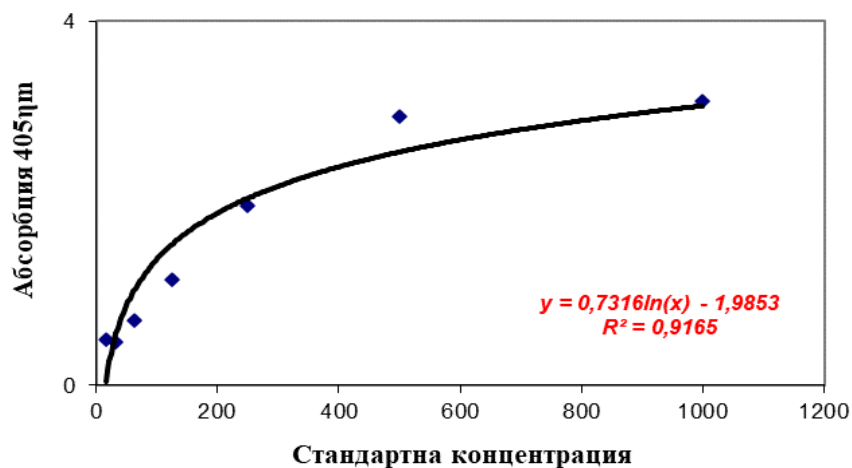


Фигура 4-19. Измерване на тоталното количество протеин (mg) в неизвестна протеинова проба чрез Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA)

При третиране на клетъчна линия 15P-1 с LPS и iE-DAP в продължение на 24 часа, и ATP в продължение на 1 час бе наблюдавано увеличаване в активността на каспаза-1 в сравнение с нетретираните клетки (фиг. 4-18).

9.2. Определяне количеството на IL-1 β в клетки на Сертоли от полово зрели 6 месечни мишки (комерсиална клетъчна линия 15P-1), след ко-стимулация с LPS и iE-DAP

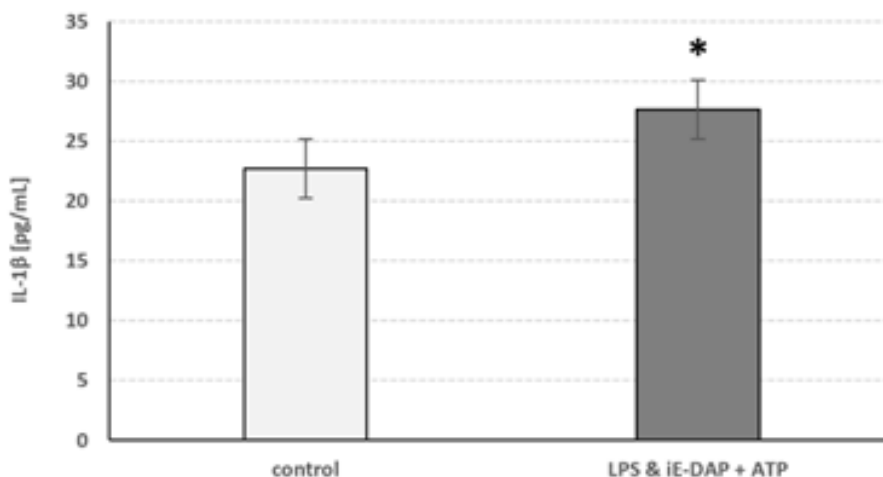
Клетките на Сертоли от клетъчната линия 15P-1 бяха третирани отново със специфичните лиганди LPS и iE-DAP в продължение на 24 часа и ATP в продължение на 1 час. За количественото измерване на IL-1 β бе използван метода „сандвич“ ELISA (Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go![®]), като бяха спазени всички изисквания на производителя.



Фигура 4-20. Стандартна крива на базата на белтъчен стандарт с известна концентрация на IL-1 β от 8 точки, получена чрез 2-кратни серийни разреждания на стандарт.

По време на изследването се изготвя стандартна крива на базата на белтъчен стандарт с известна концентрация на IL-1 β (фиг. 4-20).

При третиране на клетъчна линия 15P-1 с LPS и iE-DAP в продължение на 24 часа, и ATP в продължение на 1 час бе наблюдавано увеличаване в количеството на IL-1 β в сравнение с нетретираните клетки (фиг. 4-21).



Фигура 4-21. Количествено измерване на IL-1 β в клетъчна линия 15P-1(ATCC® CRL-2618™) посредством Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!®, след специфично третиране на клетъчната линия с лигандите LPS, iE-DAP и ATP (средна стойност \pm стандартно отклонение). Данните са получени чрез три технически повторения на експериментите. Звездичките над лентите означават статистическа значимост, определена чрез ANOVA (* $p < 0,05$)

Както открихме, MAPK1/ERK2 в интактни условия ограничава активирането на NF- κ B, докато индукцията на TLR4 за период от 24 часа има потискащ ефект върху активирането на NF- κ B, клетъчната пролиферация и миграцията, както и върху митофагията. Продължителната индукция на TLR4 също води до повишено активиране на каспаза-1 и секреция на IL-1 β , което в комбинация с потисната митофагия и повишен калиев клетъчен поток (чрез Kv1.3) може да доведе до намалено клетъчно оцеляване. Тъй като пътят на MAPK1/ERK2 се стимулира от растежни фактори като TGF- β и FSH, тяхното отсъствие би могло да е сигнал за потенциална загуба на Сертолиевы клетки чрез повишена клетъчна смърт и намалена антиапоптотична сигнализация, което се подпомага също от продължителното TLR4-NF- κ B стимулиране. Установено е, че NF- κ B се увеличава след краткотраен стимул за TLR4 през първите 4-6 часа, последван от понижение след 24-ия час, докато неговите MyD88 низходящи мишени са все още активни за 24-48 часа [242]. Това може да обясни нашите наблюдения за TLR4 моно стимулацията. Интересно е, че когато TLR4 се индуцира за 24 часа в клетки на Сертоли със заглушен MAPK1/ERK2 път, открихме значителна клетъчна пролиферация/миграция и NF- κ B активиране. Ние предполагаеме, че заглушаването на MAPK1 пътя води до превключване към по-изобилна експресия на p38 MAPK пътя, тъй като е установено, че p38 MAPK пътя е съществен за провеждане на LPS-индуцираното NF- κ B активиране, освобождаване на TNF- α и IL-1 β и клетъчна адхезия [243-

245]. Инхибирането на p38 MAPK отменя индуцираното от TLR4 NF-кВ сигнализиране [246], тъй като p38 регулира достъпността на NF-кВ транскрипционния фактор до неговите хроматинови мишени [247], а индуцираното от TLR4 NF-кВ и p38 MAPK сигнализиране също регулира стабилизирането на IL-6 mRNA [246]. Друг ключов сигнален преобразувател и интерактор, който е от решаващо значение както за сигнализацията на TLR4, така и за сигнализацията на p38, е адапторният протеин, съдържащ домейн на Toll-интерлевкин-1 рецептор (TIR) (TIRAP), който свързва трансмембранната форма на TLR4 рецептора с MyD88 [248]. TIRAP също взаимодейства с TRAF6 за провеждане на сигнала за трансактивиране и мигриране на NF-кВ към ядрото. TIRAP също така взаимодейства с p38 MAPK, осигурявайки скеле за PKC δ , така че може да активира p38 [248], провеждайки сигнала към низходящия транскрипционен фактор AP-1, който е от съществено значение за индуцирането на про-инфламаторните цитокини IL-12, IL-23, TNF- α , IL-6 и IL-1 β [249]. Активността на AP-1 се контролира както от ERK2 (чрез Elk-1, Ets-1), така и от p38 MAPK (чрез директно фосфорилиране при Thr69 и Thr71) [250]. Много е вероятно двата пътя, ERK и p38 MAPK, да взаимодействат, за да приспособят низходящата NF-кВ сигнализация.

FSH улеснява активирането на извънклетъчни сигнално-регулирани протеин кинази 1 и 2 (ERK1/2) по cAMP/PKA-зависим начин, като по този начин инициира MAPK каскадата *in vitro*, упражнявайки нейния митогенен ефект [251]. Обратно, митогенният ефект при незрели Сертолиевы клетки, упражнявано от IL-1 α , не се задейства от ERK, а от p38 MAPK и JNK пътищата [253], а индуцираната от IL-1 α клетъчна пролиферация на Сертолиевы клетки е отслабена от p38 MAPK инхибитора SB203580 [252]. Този p38 MAPK зависим ефект е синергичен към ERK-зависим FSH ефект и вероятно действа и при зрели клетки на Сертоли. Въпреки това, митогенният ефект на FSH в Сертолиевы клетки от плъх е релевантен само по време на феталния и ранния постнатален период [261]. Това наблюдение поставя на фокус въздействието на пътя на IL-1 чрез TLR4/NF-кВ върху пролиферацията на Сертолиевы клетки. Като се има предвид, че не добавяме FHS към културелната среда, заглушаването на ERK2 (MAPK1) донякъде отразява наблюдавания ефект на FSH след ден 19, когато FSH води до противоположен ефект и пътят на ERK е значително инхибиран от третирането с FSH [251]. Друг аспект за разглеждане е различното време на активиране на NF-кВ и AP1 и възходящото регулиране на Tlr4, Il1A, Il1B и други гени, свързани с LPS-индуцирани пътища, в сравнение с низходящите Tlr4 p38 MAPK и ERK сигнални пътища. Например, генът Il1B възходящо се регулира след 24 часа в пилешки [254] и миши Сертолиевы клетки [47], докато генът Tlr4 се регулира възходящо след 48 часа [254]. Освен това, активираните NF-кВ и ERK2 не са наблюдавани при новородени прасета през първите 6 часа след третиране с LPS [255], което предполага, че активирането на ERK2 като низходящ процес трябва да настъпи след 6-ия час.

ИЗВОДИ

1. Блокирането на ДНК метилирането като механизъм на генна регулация (заглушаване) потенциално активира експресията на MAPK сигналните пътища, особено на MAPK1/ERK2, MAPK3, p38 MAPK, както и на MAPK инхибитори и MAPK прицелни молекули.
2. Тоталното деметилиране, посредством ДНК метилтрансферазен инхибитор 5-Azacytidine, потиска NOD2 и NALP3, и индуцира NOD1.
3. Установено е, че въздействието на LPS води до активиране на сигнални пътища от вродената клетъчна сигнализация на TLR4 със значително повлияване на пътищата от MAPK семейството, включително EKR (MAPK), JNK, както и тези на EGF/FGF рецепторите.
4. Стимулирането на лигандите на TLR4 (LPS), NOD1 (iE-DAP) и допълнителното активиране на инфламазомата NALP3 (ATP) води до активиране на каспаза-1, до индуциране на секреция на IL-1 β и до клетъчна смърт.
5. В интактни условия MAPK1 води до потискане на NF-kB и контролира негативно каспаза-1. При заглушаване на ген *mapk1* настъпва спонтанно увеличаване в активността на каспаза-1.
6. Индуцирането на TLR4 в MAPK1 заглушени условия води до увеличаване на клетъчната миграция и клетъчната пролиферация.
7. Стимулирането на TLR4 (LPS) и последващото добавяне на ATP като външен сигнал за увреждане индуцират клетъчна смърт, като ATP причинява клетъчна смърт по доза-зависим начин.

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Установени са важни прицелни пътища за регулиране, свързани с TLR4 сигнализацията, и отключваните от нея или съществуващи отделно епигенетични механизми за контрол на елементи на вродената имунна сигнализация, като MAPK сигнализация, особено EKR2/MAPK1, както и влиянието на йонните канали в тази регулация. Тези промени могат да бъдат свързани с клетъчната смърт (апоптоза или пироптоза).
2. Лигандите на TLR4 (LPS), NOD1 (iE-DAP) и допълнителното активиране на инфламазомата NALP3 (ATP) водят до свръхрегулиране на pro-IL-1 β , активиране на каспаза-1 и индуциране на секреция на IL-1 β и евентуално на клетъчна смърт.
3. MAPK1/ERK2 в интактни условия ограничава активирането на NF- κ B, докато индукцията на TLR4 има потискащ ефект върху активирането на NF- κ B, клетъчната пролиферация и миграцията.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. *Elina Avramka, Kristiyan Kanev*, Sertoli cells, apoptosis, and male infertility, *Andrologia*, Vol. 24, Book 2, 2015
2. *Soren Hayrabyan, Elina Avramka, Krasimira Todorova*, Stemness applied to testis stem cell niche...Putative contribution for somatic stem cell lineages..., *Andrologia*, Vol.24, Book 4, 2015

СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Hayrabedian S, **Avramska E**, Kacheva D, Kistanova E, Todorova K. DNA methylation landscape in Sertoli cells play role in its specific inflammasome regulation with implications to male fertility. EPICONCEPT COST action FA1201, Workshop Epigenomic Toolbox: from Methods to Models, Las Palmas, Spain 07-09 May 2014
2. **Elina Avramska**, Soren Hayrabedian. Testicular Sertoli cell function. Differences in the mode of phagocytosis of bacteria between macrophages and Sertoli cells. Fifth Workshop on Experimental models and methods in biomedical research, April 7-9, 2014, Sofia, Bulgaria
3. Kanev K, **Avramska E**, Todorova K, Hayrabedian S. Application of 3D image based assessment for studying the impact of innate immunity signaling on global methylation status. 6th EFIS-EJL South East European Immunology School (SEEIS 2014), 26- 29 September 2014, Timisoara Romania
4. Soren Hayrabedian, **Elina Avramska**, Krassimira Todorova Single cell resolution 3D compartmentalization analysis of inflammasome and autophagy interaction in Sertoli cells challenged with TLR4 and NOD1 ligands The First Joint WGs Meeting of TRANSAUTHOPHAGY COST Action CA15138, October 6-7, 2016, Warsaw, Poland
5. Kristiyan Kanev, **Elina Avramska**, Krassimira Todorova, Soren Hayrabedian. Application of 3D quantitative DNA methylation imaging for studying the global methylation status in Sertoli cells. Sixth Workshop on Experimental models and methods in biomedical research, May 12-15, 2015, Sofia, Bulgaria
6. Sezer L., **Avramska E.**, Todorova K., Hayrabedian S. Innate immunity TLR4 receptor signaling modulates Sertoli cells metabolic profile and induced NF-kB in MAPK1-dependent manner 15th International Symposium for Immunology of Reproduction (15th ISIR), June 15-17, 2018, Varna, Bulgaria
7. Soren Hayrabedian, **Elina Avramska**, Krassimira Todorova Single cell resolution 3D compartmentalization analysis of inflammasome and autophagy interaction in Sertoli cells challenged with TLR4 and NOD1 ligands The First Joint WGs Meeting of TRANSAUTHOPHAGY COST Action CA15138, October 6-7, 2016, Warsaw, Poland
8. Kristiyan Kanev, **Elina Avramska**, Krassimira Todorova, Soren Hayrabedian. Application of 3D quantitative DNA methylation imaging for studying the global methylation status in

Sertoli cells. Sixth Workshop on Experimental models and methods in biomedical research, May 12-15, 2015, Sofia, Bulgaria

9. *Sezer L., Avramaska E., Todorova K., Hayrabedyan S. Innate immunity TLR4 receptor signaling modulates Sertoli cells metabolic profile and induced NF-kB in MAPK1-dependent manner 15th International Symposium for Immunology of Reproduction (15th ISIR), June 15-17, 2018, Varna, Bulgaria*

СПИСЪК НА ПРОЕКТИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Проект ДФНП 17/141 „Изследване на неканоничната инфламазомна вродена имунна сигнализация в епителни клетки, имащи значение за развитие на автоимунна патология, в това число и имунологично обусловен мъжки инфертилитет, с помощта на транскриптомика /RNA-seq/и епигеномика /5 mеC-seq/, чрез директно молекулно секвениране от 3-то поколение“ с ръководител Е. Аврамска и консултант проф. д-р С. Хайрабемян

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящия дисертационен труд бе изработен изцяло в лабораторията по „Репродуктивни ОМИКс технологии“ към Институт по биология и имунология на размножаването „акад. Кирил Братанов“, Българска Академия на Науките, София (ИБИР-БАН).

Изказвам най-искрена благодарност към научните ми ръководители – проф. д-р Сорен Хайрабемян, дбн и проф. Красимира Тодорова-Хайрабемян, дбн! Без тяхната неизменна помощ, подкрепа и напътствия нито един ред от настоящия труд нямаше да е факт!

Поднасям благодарности и на членовете на Научния съвет за ценните съвети и препоръки, в резултат на които научно-изследователския труд придоби завършен вид!

Изказвам и специална благодарност на доц. Диана Зашева, за помощта и ценните съвети, които получих по време на изработване на научния труд!

И не на последно място, сърдечни благодарности поднасям на семейството и близките си!

БЛАГОДАРЯ!!!