

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ**  
**НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**  
**“Акад. К. Братанов”**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане на научна степен**  
**“ДОКТОР НА НАУКИТЕ”**

**Доц. Красимира Олегова Тодорова - Хайрабемян, дб**

**Генно-регулаторна мрежа между микроРНК-204,  
онкофузията TMPRSS2-ERG и транскрипционни  
фактори със значение за метастазирането**

*Област на висше образование*  
*4. Природни науки, математика и информатика*  
*Професионално направление 4.3. Биологически науки*  
*Научна специалност “Имунология”*  
*Шифър на специалността 01.06.23*

**София, 2015г.**

Дисертационният труд е написан на 325 страници, илюстриран е с 153 фигури и 7 таблици. В библиографският списък са цитирани 499 литературни източника.

### **Научно жури:**

Вътрешни членове:

**Проф. д-р Мария Иванова, д-р, д-р**  
**Проф. д-р Стефан Лолов, д-р, д-р**  
**Доц. д-р Велислава Терзиева, д-р**

Външни членове

**Проф. д-р Виктория Сарафян, д-р, д-р** (Медицински  
Университет, Пловдив)  
**Проф. Румяна Миронова, д-р** (Институт по Молекулярна  
Биология, БАН)  
**Чл. кор. проф. д-р Чавдар Славов, д-р, д-р** (Медицински  
Университет, София)  
**Проф. д-р Цветанка Маринова, д-р, д-р** (Медицински  
Факултет, Софийски Университет)

Защитата на дисертационният труд ще се състои на ..... **16.09.** 2015г.  
от...**11:00**.....часа в Институт по Биология и Имунология на  
Размножаването, БАН, с адрес гр. София, бул. Цариградско шосе, 73.  
Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБИР,  
БАН, както и на интернет страницата: <http://ibir.bas.bg>

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ**  
**НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**  
**“Акад. К. Братанов”**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане на научна степен**  
**“ДОКТОР НА НАУКИТЕ”**

**Доц. Красимира Олегова Тодорова - Хайрабемян, дб**

**Генно-регулаторна мрежа между микроРНК-204,  
онкофузията TMPRSS2-ERG и транскрипционни  
фактори със значение за метастазирането**

*Област на висше образование*  
*4. Природни науки, математика и информатика*  
*Професионално направление 4.3. Биологически науки*  
*Научна специалност “Имунология”*  
*Шифър на специалността 01.06.23*

**София, 2015г.**

## СПИСЪК СЪС СЪКРАЩЕНИЯ

PCa, prostate cancer (carcinoma) - простатен карцином  
AR, Androgen receptor - андрогенен рецептор  
TF, transcriptional factor - транскрипционен фактор  
EMT, epithelial to mesenchymal transition - епително-мезенхимна трансформация  
miR, microRNA - микроРНК  
siRNA, small interfering RNA - интерферираща РНК (некодираща)  
RT- qPCR - reverse transcriptase quantitative real time polymerase chain reaction - обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция  
FCS, flow cytometry - проточна цитометрия  
MFI, median fluorescence index - среден флуоресцентен индекс  
s.d., Standard Deviation - стандартно отклонение  
5, AzaC - 5-Azacytidine - 5-азацитидин  
PIN, prostatic intraepithelial neoplasia - простатна интраепителна неоплазия  
PIA, prostatic inflammatory atrophy - простатна инфламаторна атрофия  
BPH - benign prostatic hyperplasia - доброкачествена хиперплазия на простатата  
BCH, basal cell hyperplasia - базална клетъчна хиперплазия  
NP, normal prostate - нормална простатна тъкан  
HSC, Hematopoietic stem cell - хематопоеична стволова клетка  
c-MYB - v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog  
RUNX2, runt-related transcription factor 2  
ETS1, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1  
TMPRSS2 - Transmembrane protease, serine 2, - трансмембранна серинова протеаза  
ERG, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog;  
PGK1, phosphoglycerate kinase 1  
NOD -Nucleotide Oligomerization Domain  
ie-DAP -  $\gamma$ -D-глутамил-мезо-диаминопимелинова киселина  
LTQ, Linear Trap Quadrupole - орбитрап нано-протеомикс  
AMACR,  $\alpha$ -Methylacyl CoA racemase - алфа-метилацил-Коензим А рацемаза  
COX - Циклооксигеназа  
iNOS - индуцируема азот-окисна синтетаза  
GSTP1 - глутатион трансфераза

## УВОД

Най-често развиващият се неопластичен процес при мъжете след белодробните тумори е карциномът на простатата, който е и втората по честота причина за смъртност. Мъжкият инфертилитет напоследък се свързва с последващо развитие на различни урологични заболявания, включително простатен карцином, като това се подкрепя и от съвсем скорошни епидемиологични данни. Установена е връзка между репродуктивния здравен статус на мъжа до 40-та му година с развитието на агресивен простатен карцином през 50-та му година от живота. По тази причина изследванията на значението на мъжкия инфертилитет върху нормалното и канцерогенното развитие на простатната тъкан е от особено голямо значение.

За подобряване на диагностиката и терапевтичния мониторинг на пациентите с простатен карцином е необходимо идентифицирането и използването на нови, допълнителни маркери, които се повлияват от хормоналната терапия и/или от туморната диференциация.

Маркерите, използвани до момента не задоволяват напълно изискванията за чувствителност и надеждност, нужни за оптимален диагностичен и лечебен контрол. Прилаганите в текущата клинична практика маркери не винаги позволяват точното диференциране на някои междинни преканцерозни състояния, с простатен карцином и доброкачествена хиперплазия на простатата, особено в случаите когато нивата на маркерите не са значително повишени. Друг недостатък е невъзможността за разграничаване на клинично важните злокачествени форми от индолентните карциноми и неспособността да се предскаже метастатичният потенциал, въз основа на който да се направи съответна прогноза за състоянието на пациента. Много често използваните в клиниката маркери са или специфични относно широк набор тумори, но засягат различни органи, или са специфични за определен вид тъкан, но се откриват и при други патологични процеси освен карцином. Идентифицирането на маркери притежаващи и двата вида специфичност е особено важно за диагностиката и лечението на простатния карцином.

Известно е, че терапевтичните възможности при случаи на напреднал простатен карцином са ограничени и до момента няма налични методи за третиране, които да показват висока ефективност, поради това се изпробват множество нови терапевтични методи в тази насока.

Всичко това насочва вниманието към изследванията на нови маркери, характеризиращи хроничния инфламаторен процес в простатата, които биха позволили подобрена диагностика на градиращите състояния на преканцероза: простатна инфламаторна

атрофия, простатна интраепителна неоплазия с карцином “*in situ*” и ниско диференциран метастазирал простатен карцином, след епително-мезенхимна трансформация (в лимфни възли и кости).

С откриването на некодиращите РНК-и, в частност микроРНК-ите се променя изцяло парадигмата за механизмите на генна регулация, включвайки допълнителни нива (ДНК – РНК – микроРНК – протеин). МикроРНК-ите са с ключови регулаторни функции, свързани с клетъчния растеж, развитие и диференциация, както и са свързани с множество болести, включително карциномни заболявания. Високата тъканна и стадийна специфичност на микроРНК експресията позволява използването им за профилиране както на специфични тумори, така и за ранно откриване на клонално-мутационни събития, водещи до клинично неизявена ракова предиспозиция. Канцерогенезата може да се дължи на множество мутации в: микроРНК гените, 3' UTR мястото на свързване върху иРНК, към което се свързват микроРНК-и, както и сигнални пътища, които регулират индуцирането на микроРНК експресия. Регулаторният потенциал на микроРНК-ите едновременно върху множество главни транскрипционни регулатори, имащи туморно-супресорни или онкогенни функции, има за пряка последица високата им предиктивна способност.

Един от основните фузионни протеини TMPRSS2–ERG е уникален за простатния аденокарцином, и представлява фузия между промоторен участък на гена, кодиращ андроген-чувствителната простатно-специфична серинова протеаза 2 (TMPRSS2) към онкогенния хомолог ERG. Фузията на TMPRSS2 с ERG е най-често срещаната и съчетана с амплификация на новия ген води до влошена прогноза.

В настоящия момент, у нас почти няма проучвания на тема микроРНК-и, а такива целящи изследването на конкретни микроРНК-и и връзката им с ключови транскрипционни фактори, както и с основни фузионно-реаранжирани протеини при простатен карцином, не са правени. Установяването на подходящ биомаркер за идентификация, стадиране и мониторинг на простатния карцином е от голямо значение за клиничната практика.

Съчетаването на подходящият биомаркер с прилагането на възможният терапевтичен потенциал на микроРНК-ите, чрез стартирането на микроРНК-базирани тестове за карцином на простатата, както наскоро беше направено при аденокарцином на панкреаса, би довело до решаване на трудната задача, а именно откриването на най-успешната терапия за простатен карцином.

## ЦЕЛ

Целта на настоящият дисертационен труд беше да се изследва участието на микроРНК-204, транскрипционните фактори RUNX2, MYB, ETS1 и онкогенно реанжираният фузионен протеин TMPRSS2-ERG в патологични генно-регулаторни мрежи, имащи роля за малигнената трансформация при простатен карцином.

## ЗАДАЧИ

1. Доказване на епигенетични регулаторни взаимодействия между микроРНК-204 и главни транскрипционни фактори (MYB, RUNX2, ETS1), оказващи влияние върху епитело-мезенхимната трансформация в клетъчен модел на простатен карцином
2. Доказване на инфламаторни, генотоксични и оксидативни процеси, свързани с простатната канцерогенеза
3. Доказване на модулиращата роля на микроРНК-204 върху сигналинга на андрогенния рецептор и свързани епигенетични механизми в простатната канцерогенеза
4. Доказване на дисрегулацията на микроРНК-204 при настъпване на геномно реаранжиране и възникване на характеристичен за простатния карцином фузионен феномен TMPRSS2-ERG
5. Създаване на модел, описващ генно-регулаторна мрежа, с участието на микроРНК-204, транскрипционните фактори RUNX2, ETS, MYB, онкофузионен протеин TMPRSS2-ERG и взаимовръзката им с ключови елементи на андроген рецепторния сигналинг и епитело-мезенхимната трансформация.

## ПОДЗАДАЧИ

1. Доказване на регулаторното влияние от страна на микроРНК-204 върху главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS, MYB в модел на клетъчни линии от простатен карцином, с различна степен на злокачественост.
2. Доказване на регулаторен ефект на главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS и MYB върху микроРНК-204 в модел на клетъчни линии от простатен карцином, с различна степен на злокачественост.
3. Доказване на влиянието на генно-регулаторната мрежа (микроРНК-204 – транскрипционните фактори RUNX2, ETS и MYB) върху ключови маркери от сигналните пътища на неоангиогенеза, клетъчна адхезия и мотилитет (VEGF, SLUG, SOX9, E-CADHERIN, N-CADHERIN), които са свързани с

- епително-мезенхимната трансформация.
4. Доказване на функционална взаимовръзка между фузионен онкопротеин TMPRSS2-ERG и микроРНК-204 в модел от карциномни линии.
  5. Доказване на връзката между транскрипционните фактори RUNX2, ETS и MYB и фузионен онкопротеин TMPRSS2-ERG в модел от карциномни линии.
  6. Доказване ролята на епигенитичното метилиране върху генно-регулаторната мрежа (микроРНК-204 – транскрипционни фактори RUNX2, ETS и MYB) с оглед влиянието ѝ върху епитело-мезенхимната трансформация на генно и функционално ниво, и сигналинга на андрогенен рецептор.
  7. Доказване на регулаторното влияние на микроРНК-204 върху андрогенен рецептор и молекули, свързани с процесите на вроден имунен отговор, автофагозомни реакции и междуклетъчни контакти.
  8. Доказване на онкофузионният протеин TMPRSS2-ERG и транскрипционният фактор ERG в серуми от пациенти с простатен карцином на транскрипционно и протеомно ниво.
  9. Доказване на експресионните особености и количествено измерване на AMACR, p63, COX-2, iNOS, GST в тъканни срези от пациенти с простатната атрофия, простатна интраепителна неоплазия и простатен карцином.

\* Поради наличие на сложни взаимодействия между микроРНК-ите и техните прицелни гени, в настоящият дисертационен труд се постави за цел изследването на микроРНК върху транскрипционните фактори без да се валидира дали е директно (чрез взаимодействие с 3'UTR на иРНК) или индиректно (чрез междинни посредници). Терминът “регулация” се използва в смисъл на *индиректно взаимодействие*, освен ако не е посочен механизъм за директна регулация.

## МАТЕРИАЛИ

**Клетъчни култури.** Простатно аденокарциномни клетъчни линии бяха поръчани от American Type Culture Collection (ATCC). Клетките бяха култивирани както следва: LNCaP и H660 в RPMI среда; PC3 в F-12K среда; VCaP в DMEM среда.

**Синтетични микроРНК-и и esiRNA.** MiScript микроРНК-204 - мимик синтетичен аналог и инхибитор бяха използвани за трансфектиране на таргетните клетки, за да се отчетат ефектите на зрелите микроРНК-и. Нетаргетиращ мимик и синтетична Negative



control siRNA бяха използвани като контроли; siRNA срещу c-MYB, RUNX2, ETS1.

**Лиганд на рецептори от системата на вродения имуен отговори** - биоактивен дипептид, присъстващ в пептидогликан на всички Грам-отрицателни и някои Грам-положителни бактерии -  $\gamma$ -D-глутамил-мезо-диаминопимелинова киселина (ie-DAP) и специфичен индуктор на NOD1 (Nucleotide Oligomerization Domain) рецептор.

**Антитела срещу молекулите:** Occludin, NOD1, ATG16L, LC3, RUNX2, ETS1, cMYB, AR, AMACR, p63, iNOS, COX-2, GSTP1, TMPRSS2, ERG, Bcl-2, PUMA, NF $\kappa$ B, Act1

**Тъканни срези**, получени след радикална простатектомия от периферната зона на простатната жлеза със следните случаи: простатна инфламаторна атрофия (PIA) (n=30), простатна интраепителна неоплазия (PIN) (n=30), простатен карцином (PCa) (n=30) и простатен аденом (n=16) бяха изследвани в настоящият труд. От заобикалящата здрава тъкан бяха изготвени препарати, използвани като контролни (n=30). Тъканните срези бяха предоставени от Университетската Болница, Плевен, България и оценени с рутинна микроскопия с хематоксиин-еозин оцветяване.

**Серуми от пациенти с карцином на простатата** (n=35), предоставени от Националния център по хематология и трансфузиология, София, България. За отрицателни контроли бяха използвани серуми от здрави донори /мъже и жени/.

С разрешение на Етичните Комитети на Болниците и информирано съгласие от пациентите, съгласно Хелзинската Декларация бяха проведени изследванията.

## МЕТОДИ

1. Клетъчно култивиране
2. Трансфекция с микроРНК мимик и инхибитор и генно заглушаване “knockdown”
3. Обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-qPCR) и Метилационен специфичен RT-QPCR (MS-QPCR)
4. Проточна Цитометрия
5. Приготвяне на протеинови екстракти за електрофореза и електрофоретично разделяне (SDS-PAGE)
6. Електротрансфер и Имуно-блот (Western blot, ECL)
7. Двумерна електрофореза (2D PAGE) и сребърно оцветяване
8. Количествена нанопроотеомика
9. Имунофлуоресценция на клетки
10. Луциферазна Репортерна Система
11. Продуциране на стабилна репортерна клетъчна линия

12. Колориметрична SEAP Репортерна Система за откриване на активен NFκB
13. Ултравioletово радиационно третиране на клетки
14. Флуоресцентен метод за откриване на реактивни форми на кислорода (ROS)
15. Клетъчен пролиферативен тест (ССК-8)
16. Тест за оценка на клетъчна миграция (“scrach test”)
17. Пълно (тотално) геномно деметилиране (5-азацитидин)
18. Имунохистохимия и Количествена имунохистохимия
19. Статистическа обработка на данните от количествената имунохистохимия
20. Методи за детекция на онкофузионен протеин
21. Статистически анализ

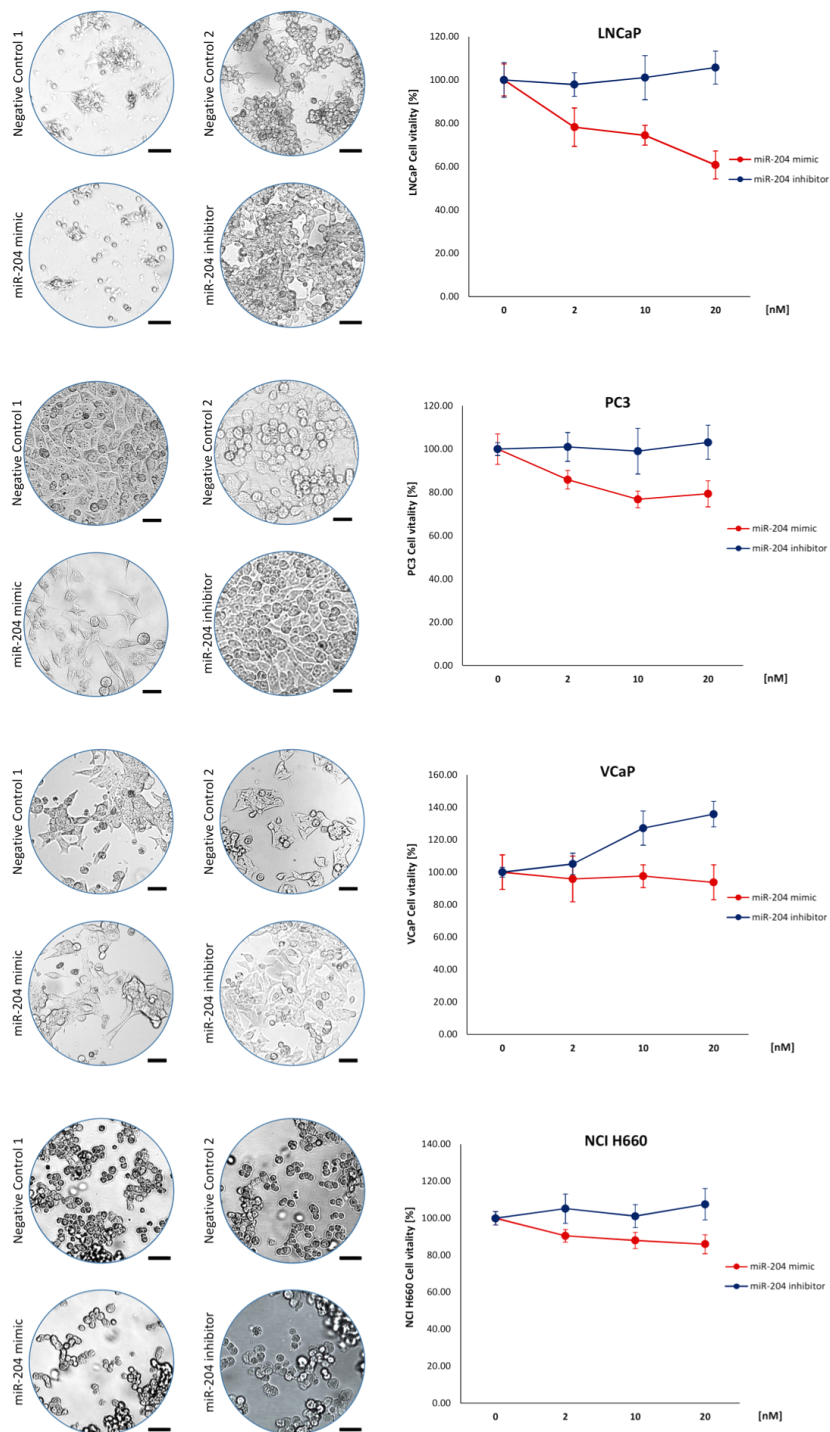
## РЕЗУЛТАТИ

**I. Епигенетични регулаторни взаимодействия между микроРНК-204 и главни транскрипционни фактори (MYB, RUNX2 и ETS1), оказващи влияние върху епитело-мезенхимната трансформация и AR сигналинг в клетъчен модел на простатен карцином**

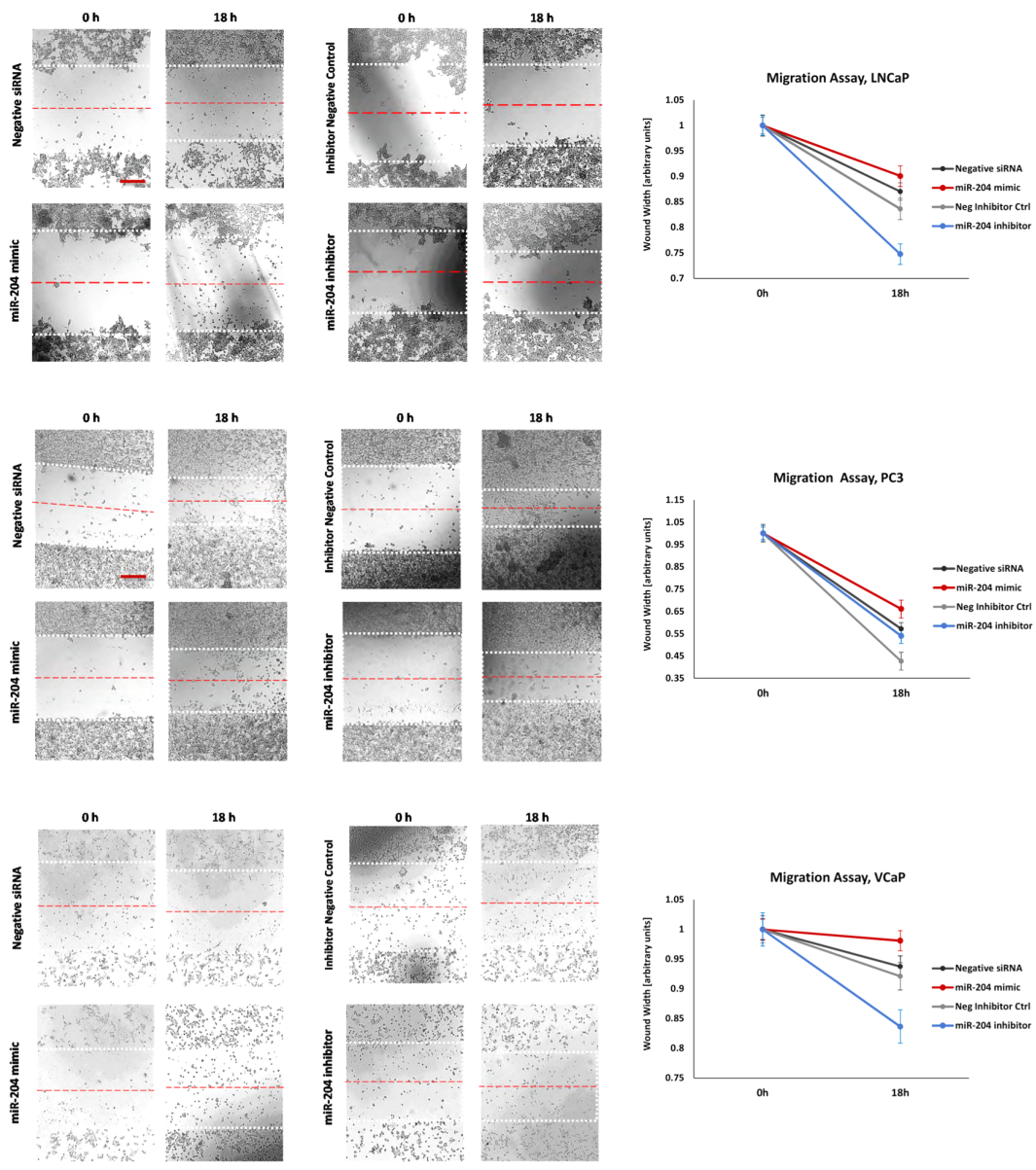
**МикроРНК-204 потиска жизнеността и миграцията на клетките само в онкофузионно-негативните LNCaP и PC3 клетъчни линии**

Използвайки МТТ кит за пролиферативен анализ, бе установено, че в следствие на специфичната трансфекция със мимик или инхибитор на микроРНК-204, ефекта на синтетичният аналог води до намаляване жизнеспособността на клетките, но само при LNCaP и PC3 клетъчните линии, докато микроРНК-204 мимик няма значителен ефект в двете VCaP и NCI-H660 клетъчни линии, които са TMPRSS2-ERG позитивни (Фиг. 1).

Подобно на горе-описаното наблюдение, миграцията на LNCaP и PC3 клетките намалява, когато са трансфектирани със синтетичен аналог на микроРНК-204, докато в VCaP клетките микроРНК-204 мимик няма значителен ефект. Когато се потискат нивата на микроРНК-204 с инхибитор, се установява увеличена клетъчна миграция и в трите простатно-карциномни линии (Фиг. 2).



**Фигура 1.** Промени в клетъчната виталност при LNCaP, PC3, VCaP и NCI-H660 клетки, трансфектирани с негативни контроли за мимик и инхибитор и със синтетичен аналог и инхибитор на микроРНК-204 в увеличаващи дози (2, 10, 20 nM) са отчетени с кит ССК-8; Колориметрична реакция, прочетена на 450 nm. Мащабиране в порядъка на 50 µm. \*\*P<0.01, \*P<0.05; s.d., n = 3.



**Фигура 2. МикроРНК-204 потиска клетъчната миграция в TMPRSS2-ERG негативни клетъчни линии. Клетъчен миграционен тест на трансфектирани с негативни контроли за мимик и инхибитор и със синтетичен аналог и инхибитор на микроРНК-204 простатно-карциномни клетъчни линии. Морфометричните измервания са проведени от 0 до 18 часа времеви интервали, представени като относителна промяна в условни единици за всяко третиране. s.d., n = 3.**

## **МикроРНК-204 има негативна регулация върху с-МУВ при простатно карциномните клетъчни линии**

За установяване експресията на с-МУВ в четирите простатно-карциномни клетъчни линии бяха амплифицирани транскрипти, кодиращи с-МУВ. Относителната експресия на МУВ в LNCaP и PC3 клетки бе с около  $10^5$  пъти по-висока в сравнение с тази в онкофузионно-позитивните VCaP и H660 клетъчни линии (Фиг. 3).

Чрез проточна цитометрия и имуноблот бе установена протеиновата относителната експресия на с-МУВ като в клетъчните линии, носители на онкофузията - VCaP и H660 бяха отчетени най-ниски нива.

В настоящата дисертация бе проследена генната и протеиновата експресия на с-МУВ след като клетките от четирите клетъчни линии бяха трансфектирани, с микроРНК-204 мимик или инхибитор, както и техните нетаргетиращи контроли съответно.

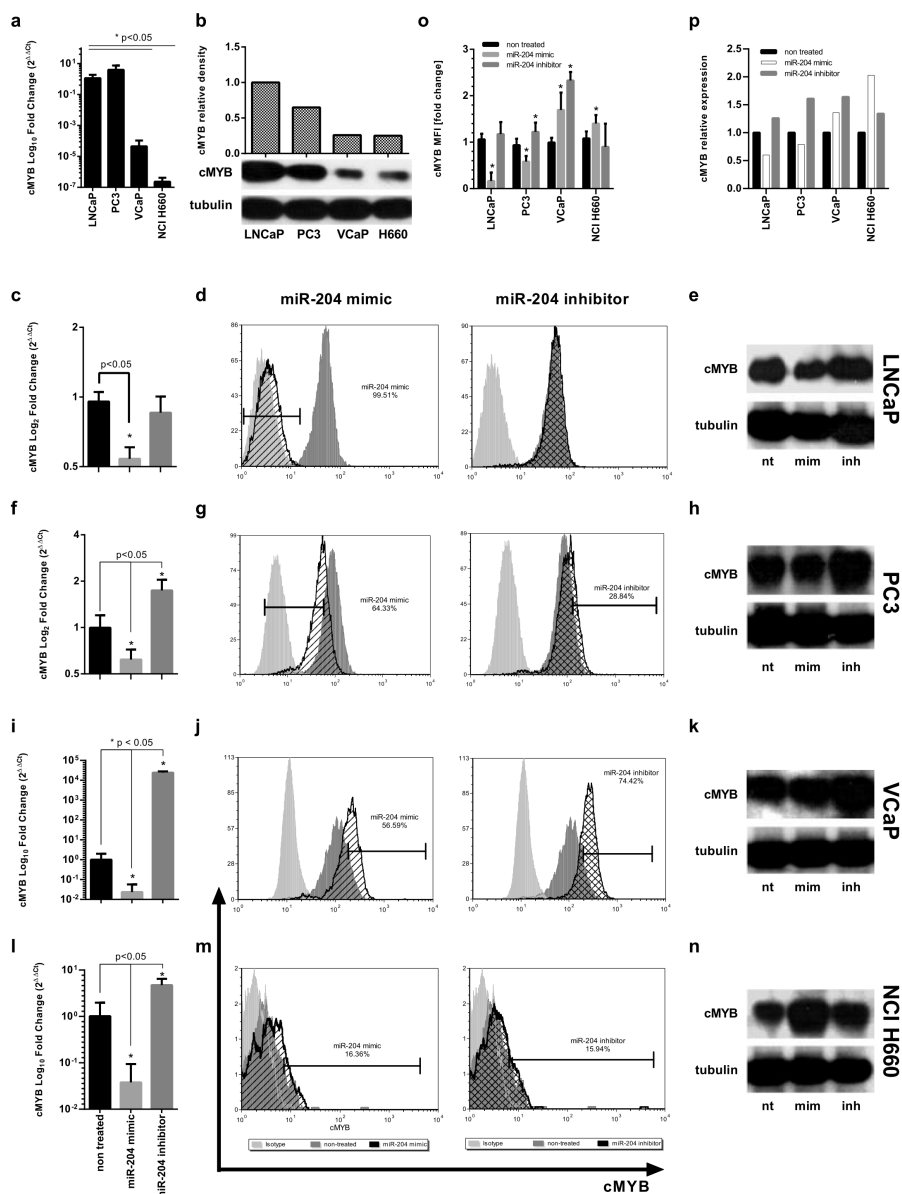
В LNCaP клетки *с-МУВ* генната експресия намалява след използването на микроРНК-204 изкуствен аналог, с който значително се повишават нивата на микроРНК в клетката (Фиг. 3).

Протеиновата експресия на с-МУВ по подобен начин беше намалена след микроРНК-204 мимик трансфекция с повече от 80% спрямо нивата му при контролните клетки, което бе установено чрез проточна флуоцитометрия и имуноблот (Фиг. 3).

В PC3 клетки *МУВ* транскрипционната и с-МУВ протеиновата експресия намаляват след изкуствена свръх-експресия на микроРНК-204, докато потискането на микроРНК-204 доведе до увеличаване на иРНК и протеинови нива на с-МУВ, в сравнение с контролните клетки.

В VCaP клетки, транскрипционната *МУВ* експресия намалява  $10^2$  пъти след изкуствена свръх-експресия на микроРНК-204, докато потискането на микроРНК-204, доведе до свръх-регулация на *МУВ* нивата с  $10^5$  пъти, в сравнение с контролните клетки. Експресията на МУВ протеина бе увеличена с два пъти след трансфекция на VCaP клетки със синтетичен аналог на микроРНК-204. Изненадващо, тя също бе увеличена с 2,5 пъти след инхибирането на микроРНК-204, в сравнение с контролните клетки.

Бе установено потискане на транскрипционните нива на *МУВ* след изкуствена свръх-експресия на микроРНК-204 в H660 клетките. В същата клетъчна линия увеличението на *МУВ* иРНК бе с около 10 пъти след инхибирането на микроРНК-204. Протеиновата експресия на МУВ бе увеличена след трансфектиране на клетките със изкуствен аналог на микроРНК-204. Данните от денситометричният анализ на имуноблота за тази клетъчна линия бяха подобни (Фиг. 3).



**Фигура 3.** Клетъчните линии LNCaP, PC3, VCaP и H660 са анализирани за с-MYB експресия, използвайки RT-qPCR, FCS и Western blot денситометричен анализ. RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на с-MYB в простатно-карциномните клетки, след трансфекция със синтетични микроРНК-204 мимик или инхибитор. Броят цикли е нормализиран към PGK1 (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ CT). RT-qPCR данни са представени като относителна промяна за микроРНК-204 мимик или микроРНК-204 инхибитор, нормализирани към нетаргетиращите контроли. Протеиновата експресия е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично трансфектираните клетки. Представителен Western blot анализ на експресията на с-MYB след трансфекция на клетките с нетаргетиращ мимик или микроРНК-204 мимик или инхибитор; \*P<0.05; s.d, n = 3.

## **МикроРНК-204 има различен ефект върху транскрипционните и протеиновите експресионни нива на RUNX2**

Установената относителна експресията на RUNX2 бе много ниска в позитивните за онкофузията VCaP и H660 клетъчни линии в сравнение с LNCaP и PC3 клетките (Фиг. 4).

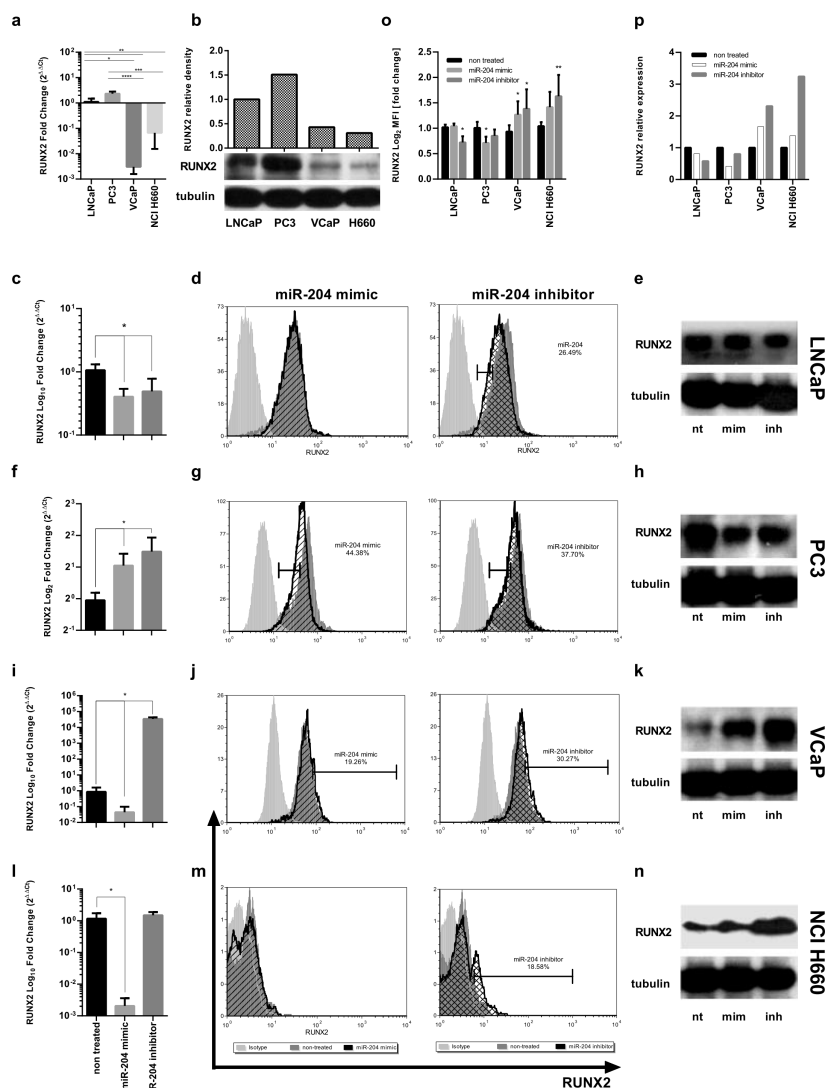
Бе проследен ефекта, който оказва микроРНК-204 върху транскрипционният фактор RUNX2 в простатно-карциномните клетъчни линии LNCaP, PC3, VCaP и H660. Нивата на RUNX2 иРНК бяха значително намалени след изкуствената свръх-експресия на микроРНК-204 в LNCaP клетки. Трансфекцията с мимик не доведе до значителна промяна в експресията на RUNX2 протеина в LNCaP клетките, което се доказва с данните, получени както от цитометричния така и от имуноблот анализите. Транскрипционните и протеиновите нива на RUNX2 бяха регулирани с намаляване след потискане на нивата на микроРНК-204 в LNCaP клетките със специфичен инхибитор (Фиг. 4).

При PC3 клетките нивата на RUNX2 иРНК бяха с повишен синтез след действието на трансфектираният синтетичен аналог на микроРНК-204. В сравнение с контролните клетки, изкуствената свръх-експресия на микроРНК-204, доведе до намаляваща RUNX2 протеинова експресия в PC3 клетките.

В клетъчната линия VCaP, изкуствената свръх-експресия на микроРНК-204 доведе до значително потискане на RUNX2 на транскрипционно ниво, докато RUNX2 бе значително възходящо регулиран след изкуствено получената супресия на микроРНК-204 вследствие използването на инхибитор. Изненадващо, бе установена значително повишена регулация на RUNX2 протеина след свръх-експресия и инхибиране на микроРНК-204 в VCaP клетките, като този феномен бе установен както с проточна цитометрия, така и с имуноблот (Фиг. 4).

Вероятно регулацията на микроРНК-204 бе променяща се в H660 клетъчна линия, тъй като микроРНК-204 мимик доведе до значително намаляване на нивата на RUNX2 иРНК. Потискането на микроРНК-204 доведе до значителна възходяща регулация на нивата на RUNX2 протеина в простатно-карциномните клетки H660. Този феномен бе установен и чрез имуноблот.

Въз основа на данните получени, чрез флоуцитометричен и денситометричен имуноблот анализи при всички простатно карциномни клетъчни линии, бе направена обобщена оценка на влиянието на микроРНК-204 модулацията върху експресионните нива на RUNX2 (Фиг. 4).



**Фигура 4.** Клетъчните линии LNCaP, PC3, VCaP и H660 са анализирани за RUNX2 експресия, използвайки RT-qPCR, FCS и Western blot денситометричен анализ. RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на RUNX2 в простатно-карциномните клетки, след трансфекция със синтетични микроРНК-204 мимик или инхибитор. Броят цикли е нормализиран към PGK1 (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ CT). RT-qPCR данни са представени като относителна промяна за микроРНК-204 мимик или микроРНК-204 инхибитор, нормализирани към нетаргетиращите контроли. Протеиновата експресия е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично трансфектираните клетки. Представителен Western blot анализ на експресията на RUNX2 след трансфекция на клетките с нетаргетиращ мимик или микроРНК-204 мимик или инхибитор; \*P<0.05; s.d, n = 3.

### Потискането на микроРНК-204 води до значителна свръх-експресия на ETS1

В настоящият дисертационен труд бе проследена относителната експресия на транскрипционният фактор ETS1,

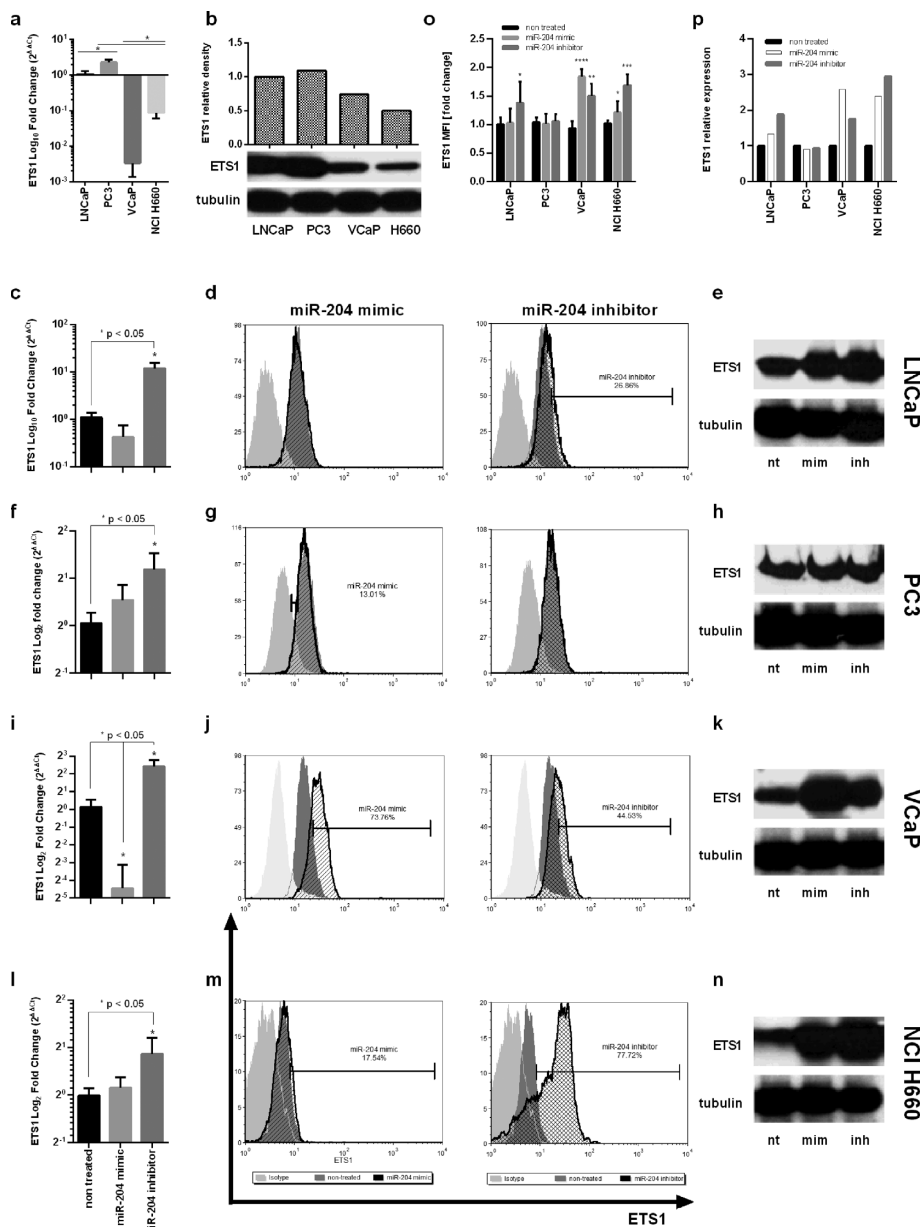


участващ в епително-мезенхимната трансформация при простатният карцином. Относителната експресия на *ETS1* бе много ниска в съдържащите онкофузията VCaP и H660 клетъчни линии, в сравнение с негативните в това отношение LNCaP и PC3 клетки (Фиг. 5). Протеиновата относителна експресия следваше подобен модел с онкофузионните носители VCaP и H660 клетки, където са отчетени най-ниските нива. Имуноблот анализите показаха, че с най-голям интензитет бяха ивиците при клетъчните линии (LNCaP, PC3), при които липсва фузията между TMPRSS2 и ERG. Бе използвано анти-тубулин антитяло, с което бе отчетена еднаквата белтъчна концентрация за четирите лизата от клетъчните линии (Фиг. 5).

Полимеразно-верижна реакция бе използвана за отчитане на експресионните нива на *ETS1* във всички клетъчни линии, преди и след трансфекцията с микроРНК-204 мимик или инхибитор. Бе установено, че супресията на микроРНК-204 при използване на синтетичен инхибитор доведе до значително възходящо регулиране на *ETS1* иРНК в четирите клетъчни линии - LNCaP, PC3, VCaP и H660.

Експресията на белтъчния продукт, проследена чрез проточна цитометрия, беше с възходяща регулация в три от изследваните клетъчни линии – LNCaP, VCaP и H660. Резултатите от тези изследвания бяха напълно съвпадащи при флоуцитометрията и имуноблот анализите. Изкуственото увеличаване на експресията на микроРНК-204 доведе до значително потискане на *ETS1* иРНК само в VCaP клетъчна линия. На протеиново ниво, само при TMPRSS2-ERG онкофузионно-положителните клетъчни линии (VCaP, H660) се наблюдаваше повишен *ETS1* след използването на синтетичен аналог на микроРНК-204. Денситометричният анализ от имуноблота, получен след електрофоретично разделяне на клетъчните лизати, контролни и трансфектирани, показва сходни резултати. Нямаше достоверна разлика при другите две клетъчни линии, които не са носители на онкофузията (LNCaP и PC3).

Въз основа на данните получени, чрез флоуцитометричен и денситометричен имуноблот анализи при всички простатно карциномни клетъчни линии, бе направена обобщена оценка на влиянието на микроРНК-204 модулацията върху експресионните нива на *ETS1* (Фиг. 5).



**Фигура 5.** Клетъчните линии LNCaP, PC3, VCaP и H660 са анализирани за ETS1 експресия, използвайки RT-qPCR, FCS и Western blot денситометричен анализ. RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на ETS1 в простатно-карциномните клетки, след трансфекция със синтетични микроРНК-204 мимик или инхибитор. Броят цикли е нормализиран към PGK1 (Pfafl, 2 $\Delta\Delta$ CT). RT-qPCR данни са представени като относителна промяна за микроРНК-204 мимик или микроРНК-204 инхибитор, нормализирани към нетаргетиращите контроли. Протеиновата експресия е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично трансфектираните клетки. Представителен Western blot анализ на експресията на ETS1 след трансфекция на клетките с нетаргетиращ мимик или микроРНК-204 мимик или инхибитор; \*P<0.05; s.d, n = 3.

## Транскрипционните фактори *c-MYB*, *RUNX2* и *ETS1* са позитивни регулатори на микроРНК-204

Бе установена относителната експресия на микроРНК-204 във всички изследвани простатно-карциномни клетъчни линии (LNCaP, PC3, VCaP и H660) с помощта на обратно-транскриптазна реакция. Клетъчната линия PC3 показва близо до 10 пъти намаляване на базалната експресия на микроРНК-204 в сравнение с LNCaP клетките, докато експресията на същата микроРНК в позитивните за онкофузията VCaP и H660 клетки се регулираше възходящо от порядъка на  $10^5$  и  $10^1$  съответно (Фиг. 6).

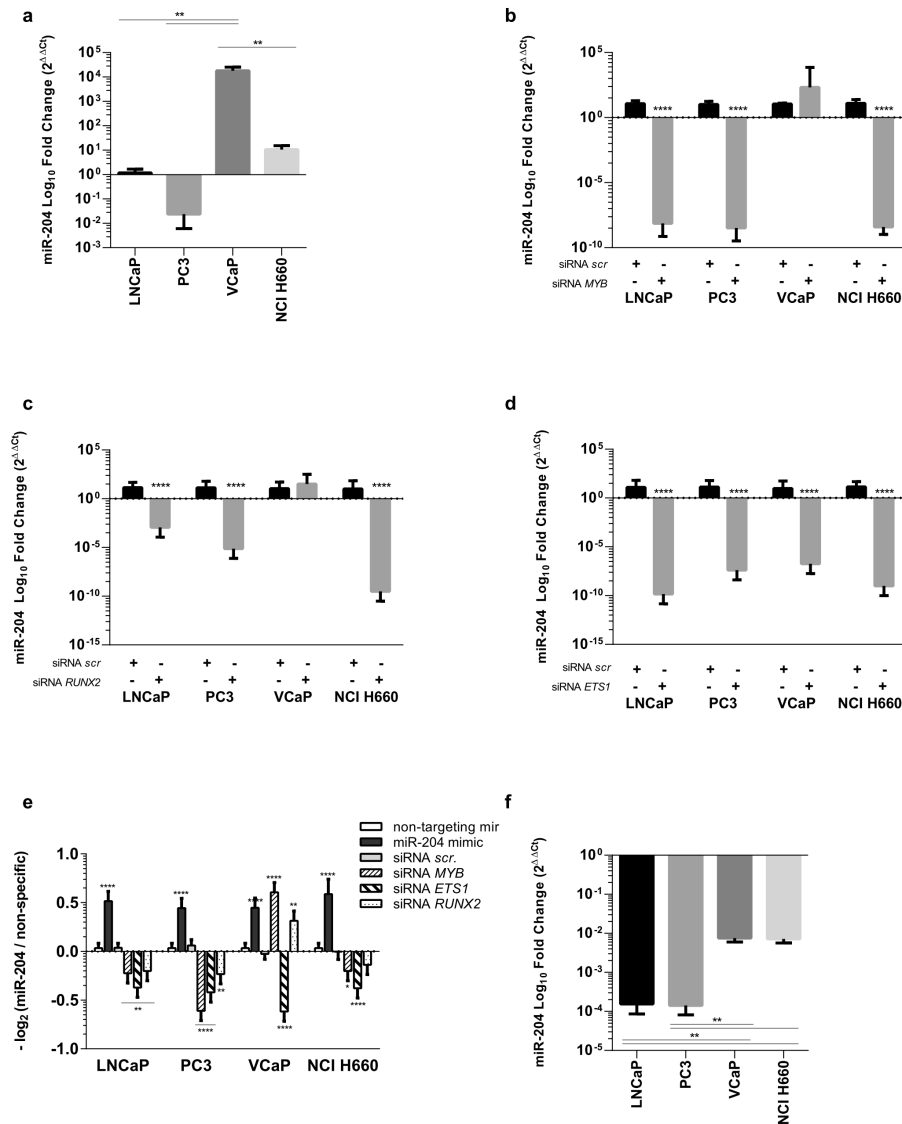
В настоящият дисертационен труд бе проследена взаимовръзката между микроРНК-204 и *MYB*, *RUNX2* и *ETS1* транскрипционни фактори, участващи в процесите на простатната канцерогенеза. Всички простатно-карциномни клетъчни линии LNCaP, PC3, VCaP и H660 бяха трансфектирани с esiRNA (генно заглушаване), специфична за всеки един от транскрипционните фактори. Клетки, трансфектирани с негативна siRNA, бяха използвани за отрицателна контрола.

Установено бе, че генното заглушаване (esiRNA) на *MYB* и *RUNX2* води до значително потискане на микроРНК-204 в LNCaP, PC3 и H660, но не и в VCaP клетки (Фиг. 6). *ETS1* генното заглушаване доведе до значително потискане на микроРНК-204 в четирите клетъчни линии (Фиг. 6).

Освен с полимеразно-верижна реакция, експресионните нива на микроРНК-204 в простатно-карциномните клетъчни линии след генното заглушаване със специфични интерфериращи РНК-и, бяха отчетени и с помощта на микроРНК-204 репортерна луциферазна система (Фиг. 6).

Бяха открити намалени нива на микроРНК-204 след генното потискане на *MYB*, *RUNX2* или *ETS1* в LNCaP, PC3 и H660 клетъчни линии. В VCaP клетките, експресионните нива на изследваната микроРНК бяха повишени след *MYB* и *RUNX2* генно заглушаване, но те бяха намаляващи след *ETS1* генно заглушаване (Фиг. 6).

Тези данни подкрепят данните получени от полимеразно-верижните реакции за ефекта на транскрипционните фактори *MYB*, *RUNX2* и *ETS1* върху нивата на експресия микроРНК-204.



**Фигура 6.** RT-qPCR анализ за относителната експресията на микроРНК-204, представена като  $\log_{10}$  промяна.  $****P < 0.001$ ; s.d.,  $n = 3$ . Тотално деметилиране. Относителна експресия на микроРНК-204 в клетъчните линии LNCaP, PC3, VCaP и H660, трансфектирани със siRNA за: MYB; RUNX2; ETS1. Данните са нормализирани към трансфектирани с негативна siRNA контролни клетки. LNCaP, PC3, VCaP и H660 клетки, трансфектирани със siRNA за с-MYB, RUNX2, ETS1, нетаргетираща мимик контрола и микроРНК-204 мимик, с последваща трансфекция със специфичен микроРНК-204 3'UTR GoClone луциферазен репортерен вектор.

## Транскрипционният фактор *c-MYB* вероятно е позитивен регулатор на *RUNX2* и *ETS1*

За проследяване на взаимовръзката в генно-регулаторната мрежа между транскрипционните фактори *MYB*, *RUNX2* и *ETS1* в моделна система за простатен карцином, бе необходимо да се извършат серии от експерименти, включващи генно заглушаване с интерфериращи РНК-и. Бяха използвани обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция за отчитане на генната експресия и проточна флоуцитометрия за отчитане на протеиновата експресия на изследваните транскрипционни фактори от предварително трансфектирани простатно-карциномни клетки (LNCaP, PC3, VCaP и H660) със специфични некодиращи РНК-и за *c-MYB* (Фиг. 7). Клетките бяха трансфектирани със siRNA *MYB* и в следствие събрани и обработени за флоуцитометричен анализ, като бяха инкубирани със специфични антитела за *RUNX2* и *ETS1*. Бе проведена проточна цитометрия и бяха отчетени протеиновите експресии на двата транскрипционни фактора.

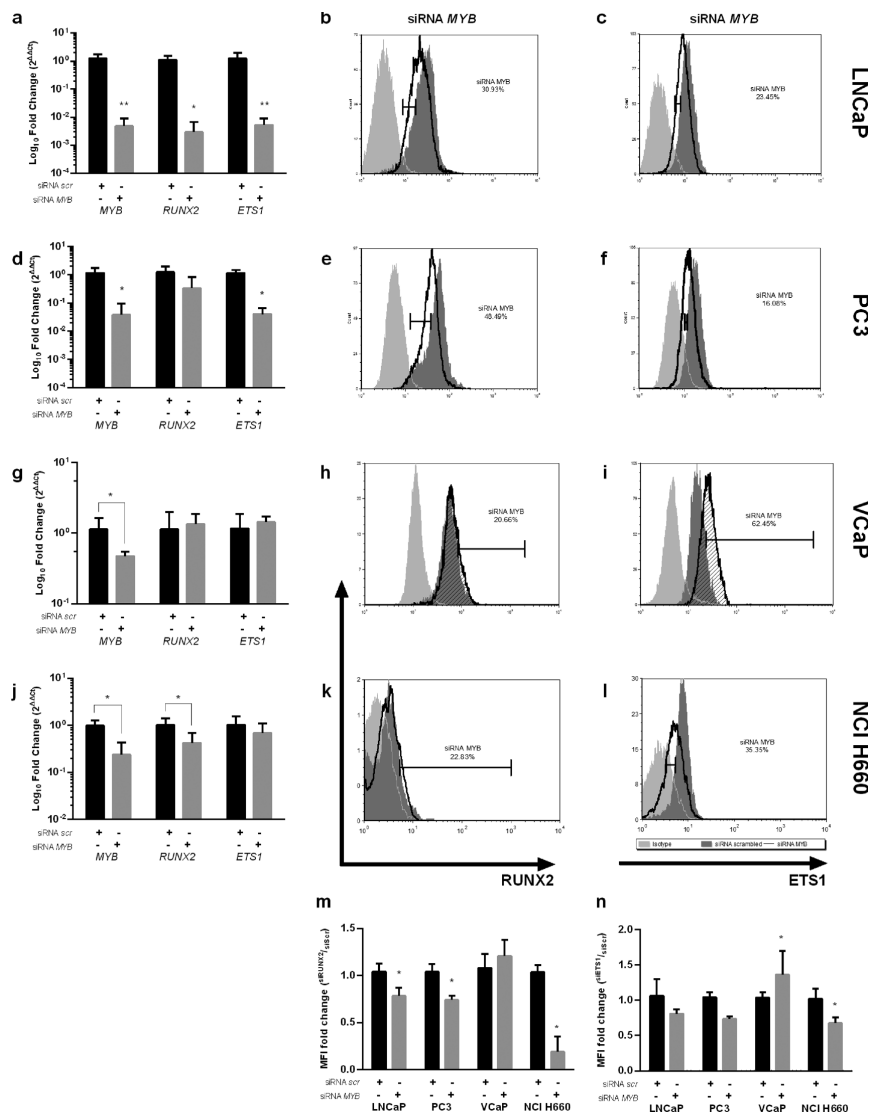
Получените резултати показаха, че генното потискане на *MYB* в клетъчна линия LNCaP доведе до  $10^2$ - $10^3$  пъти намаляване на регулацията на *RUNX2* и *ETS1* транскриптите съответно. Бе установено около 0,8 пъти намаление на тяхната протеинова експресия в LNCaP клетъчната линия (Фиг. 7).

Наблюдавано бе подобно низходящо *RUNX2* и *ETS1* регулиране и намаляване на експресията на протеините в близост до 0,7 пъти за PC3 клетъчната линия след *MYB* генното заглушаване.

В клетъчната линия VCaP, генното заглушаването на *MYB* доведе до незначително изменение на транскрипционните нива на *RUNX2* и *ETS1*, което се свързва с незначителни вариации в протеиновата експресия на *RUNX2*. Протеиновите нива на *ETS1* бяха значително увеличени след *MYB* заглушаването в VCaP клетки (Фиг. 7).

Трансфекцията със siRNA *MYB* и произтичащото от това генно заглушаване доведе до значително намаляване на *RUNX2* транскрипционната и протеиновата експресия в H660 клетки. Същата трансфекцията не доведе до значителни промени в *ETS1* транскрипта, но доведе до значително намаляване на експресията на *ETS1* протеина в H660 клетки (Фиг. 7).

Въз основа на данните получени, чрез флоуцитометричен анализ при всички простатно карциномни клетъчни линии, бе направена обобщена оценка на влиянието на генното заглушаване на *MYB* върху експресионните нива на *ETS1* и *RUNX2* (Фиг. 7).



**Фигура 7.** с-MYB вероятно е позитивен регулатор на RUNX2 и ETS1. LNCaP, PC3, VCaP и H660 клетъчни линии са трансфектирани с siRNA MYB (сиви колони) или негативна siRNA (черни колони) с цел MYB генно заглушаване, като е проследена експресията на RUNX2 и ETS1, установена чрез RT-qPCR и FCS. FCS - насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично трансфектираните клетки. \*\*P<0.01, \*P<0.05, s.d., n = 3.

## Тотално геномно деметилиране

Използваните за моделна система на простатен карцином клетъчни линии (LNCaP, PC3, VCaP и H660) бяха третирани с химиотерапевтика 5-азациитидин, инхибитор на ДНК – метил-трансферазата, с цел тотално деметилиране. Чрез полимеразно-верижна реакция бе установено, че тоталното геномно деметилиране доведе до значителна низходяща регулация на микроРНК-204 и в

четирите клетъчни линии, с намаление от повече от  $10^4$  пъти в LNCaP и PC3 и  $10^2$  пъти в VCaP и H660 клетки (Фиг. 6f).

Клетъчните линии LNCaP, PC3, VCaP и H660, използвани за моделна система на простатен карцином, бяха разделени в 3 групи: третирани с 5-азациитидин с цел тотално деметилиране; клетки, трансфектирани с негативна некодираща РНК (използвани за отрицателна контрола); клетки, подложени на тотално деметилиране с последваща трансфекция със синтетичният аналог на микроРНК-204.

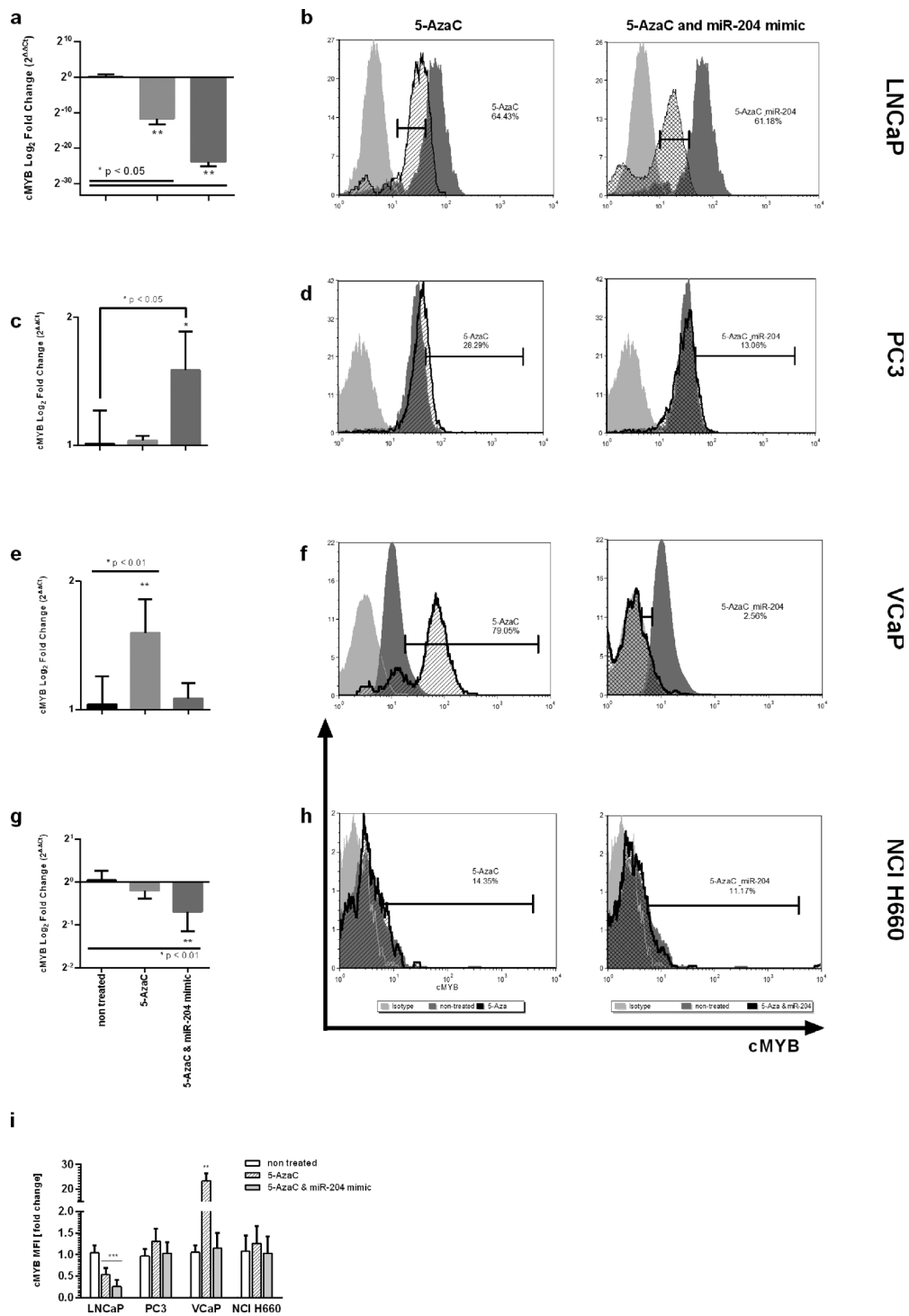
Чрез полимеразно-верижна реакция и флуоцитометрия бе установено потискане на *c-MYB* в LNCaP клетки (Фиг. 8). Потискането бе още по-силно, когато допълнително бе прибавен синтетичният аналог на микроРНК-204. Добавъчният ефект на микроРНК-204 мимик, корелира с резултатите, които са получени в следствие на самостоятелното действие на мимика (Фиг. 8).

За разлика от лимфно-възловият метастазен модел, в PC3 клетъчната линия (с произход от костно-мозъчни метастази), тоталното геномно деметилиране, доведе до незначителна *MYB* възходяща регулация, която бе още по-силна и значителна, след допълнителна свръх-експресия на микроРНК-204 (Фиг. 8).

Тоталното геномно деметилиране на VCaP клетки, доведе до повишаване на *c-MYB* транскриптите и корелираше с около 20 пъти увеличаване на *MYB* протеиновата експресия, което най-вероятно се дължи на понижена протеинова деградация (Фиг. 8).

Геномното деметилиране, последвано от допълнителна свръх-експресия на микроРНК-204 доведе до значимо потискане на *MYB* и РНК в клетъчната линия H660. Изненадващо бе, че намаляването на транскрипционните нива не бе свързано с подобно намаляване на *MYB* протеина, по-скоро нивата на протеина остават непроменени, което предполага за евентуално намаляване на протеиновата деградация (Фиг. 8).

Въз основа на данните получени, чрез флуоцитометричен анализ при всички простатно карциномни клетъчни линии, бе направена обобщена оценка на влиянието на тоталното деметилиране с 5-азациитидин върху експресията на *MYB* (Фиг. 8).



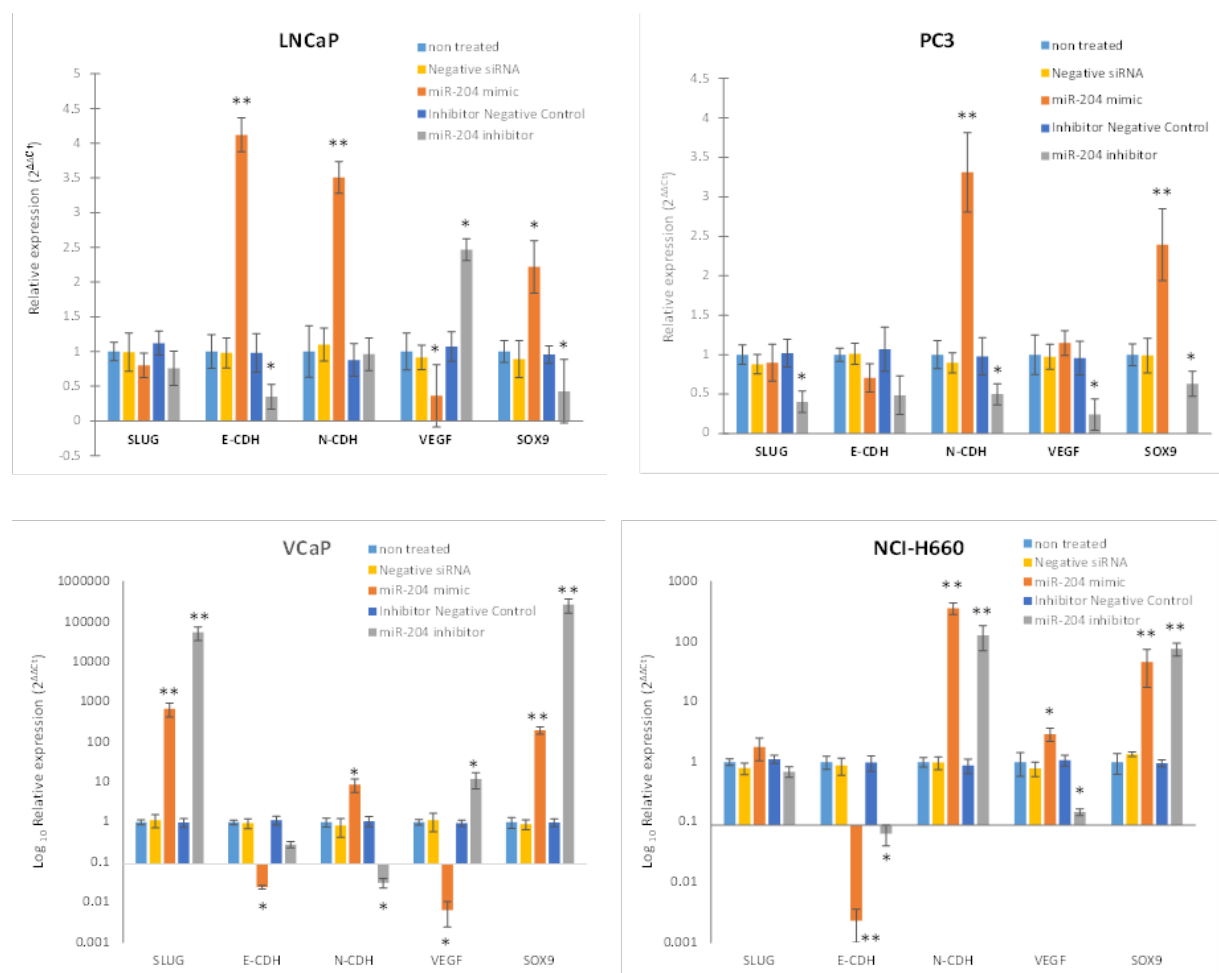
**Фигура 8.** с-MYB експресия след 5-азациитидин третиране или 5-азациитидин третиране последвано от трансфекция с микроРНК-204 мимик, установена чрез RT-qPCR и FCS анализи в простатно-карциномни клетки. RT-qPCR данните са представени като относителна експресия след третиране с 5-азациитидин, или 5-азациитидин третиране последвано от трансфекция с микроРНК-204 мимик, нормализирани към не-таргетиращи контролни клетки. FCS експресията е представена като насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично трансфектираните клетки. \*\*P<0.01, s.d., n = 3.



## Влияние на микроРНК-204 върху молекули, участващи в епитело-мезенхимната трансформация

Бе проследен модулаторният ефект на микроРНК-204 върху молекулите *E-cadherin*, *N-cadherin*, *SOX9* и *VEGFA* чрез използването на синтетичен аналог и инхибитор на микроРНК-204 в LNCaP, PC3, VCaP и H660 клетки.

Установена бе свръх-регулация на *E-cadherin* в LNCaP клетките и низходяща регулация във всички останали клетъчни линии. Бе установена свръх-регулация на *N-cadherin* във всички изследвани клетъчни линии след трансфекцията със синтетичен аналог на използваната микроРНК (Фиг. 9). Получените резултати показаха, че *SOX9* беше възходящо регулиран от микроРНК-204 във всички клетъчни линии. Потискане на експресията на *VEGFA* бе установено при клетки, които са с AR-чувствителност (LNCaP, VCaP) (Фиг. 9).

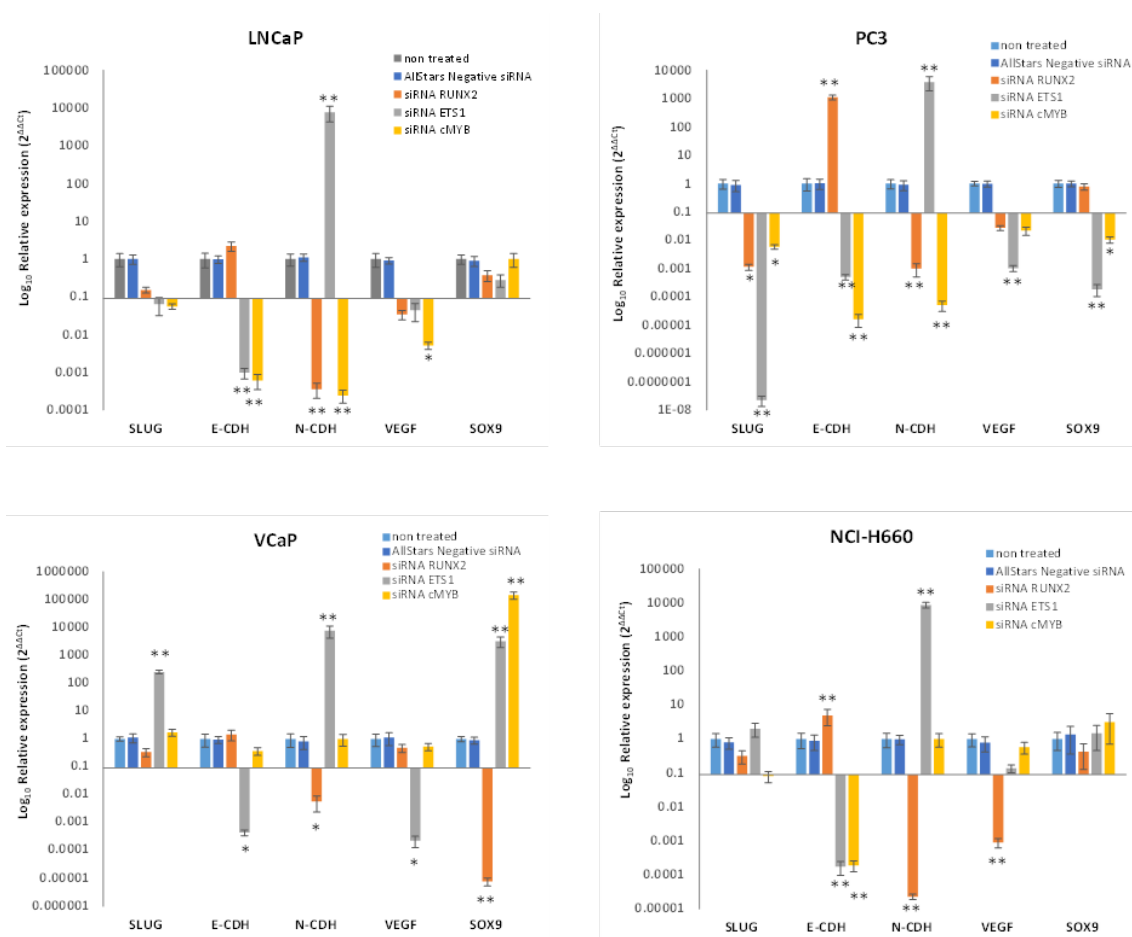


Фигура 9. Ефект на микроРНК-204 върху ЕМТ. Негативни контроли или синтетичен аналог и инхибитор на микроРНК-204 са трансфектирани в LNCaP, PC3, VCaP и H660. Проведена е обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция със специфични праймери за SLUG, ECDH, NCDH, VEGFA, SOX9 с отчетена относителна генна експресия (Pfaffl, 2<sup>ΔΔCt</sup>). \*\*P<0.01, \*P<0.05; s.d.; n = 3.

## Влияние на RUNX2, ETS1 и c-MYB върху експресията на молекули, участващи в епитело-мезенхимната трансформация

За проследяване на влиянието на MYB, RUNX2 и ETS1 в генно-регулаторната мрежа бе необходимо да се извърши генно заглушаване с интерфериращи РНК-и.

Генното заглушаване на *c-MYB* доведе до потискане на *E-cadherin* и *N-cadherin* в LNCaP и PC3 клетки, които не са носители на онкофузията (Фиг. 10). След генното заглушаване на *RUNX2* нивата на *N-cadherin* бяха низходящи при всички изследвани клетъчни линии (Фиг. 10). Генното заглушаване на *ETS1* доведе до намаляване на експресионните нива на *SLUG* в негативните за онкофузията LNCaP и PC3 клетки и на *E-cadherin* във всички изследвани клетъчни линии (Фиг. 10). Обратно, генното заглушаване на *ETS1* доведе до възходяща регулация на експресионните нива на *N-cadherin* във всички изследвани клетъчни линии.



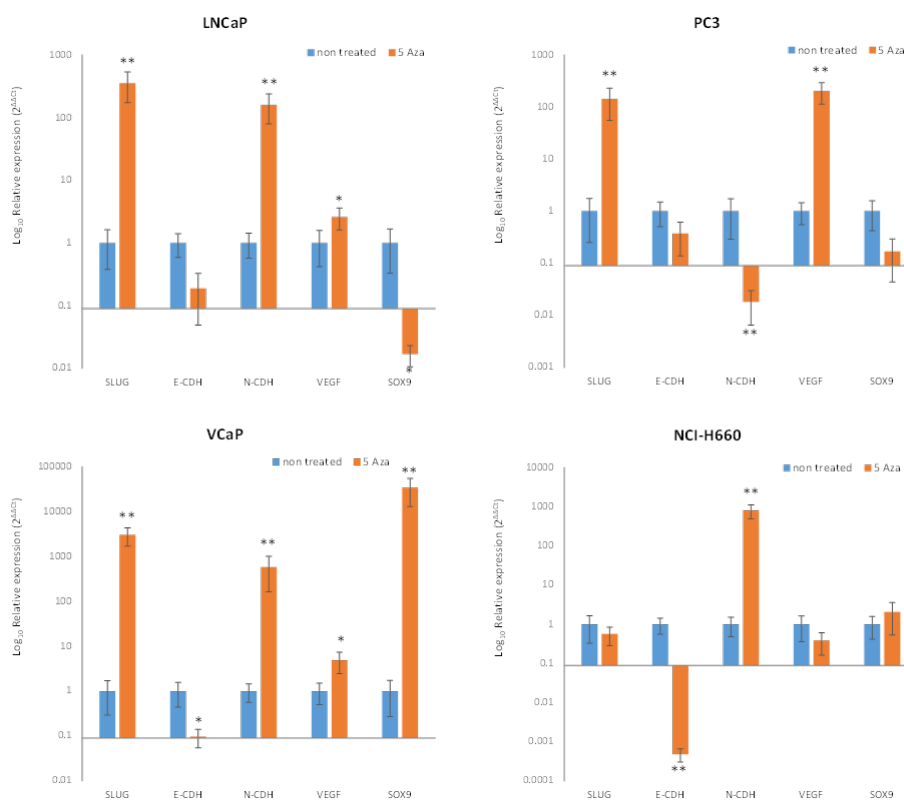
Фигура 10. MYB, RUNX2 и ETS1 са EMT регулатори. LNCaP, PC3, VCaP и H660 клетки, трансфектирани с Negative siRNA или специфични siRNA, бяха използвани за RT-qPCR с праймери за SLUG, ECDH, NCDH, VEGFA, SOX9. Относителната генна експресия е представена като log<sub>10</sub>, \*\*P<0.01, \*P<0.05. s.d., n = 3.

## Глобалното деметилиране разкри, че експресията на SLUG и N-Cadherin е метилационно зависима

Използвайки 5-азациитидин, инхибитор на ДНК-метилтрансферазата, бе проследена експресията на вече изследваните гени, свързани с епително-мезенхимната трансформация.

Двата изследвани фактора *SLUG* и *VEGFA* бяха с повишена регулация в LNCaP, PC3 и VCaP клетки. *E-Cadherin* беше с низходяща регулация, докато *N-cadherin* беше свръх-експресиран в LNCaP, VCaP и H660 клетките.

Потискането на експресията на *SOX9* бе установено в клетъчните линии без онкофузионният феномен (LNCaP, PC3) в следствие на тоталното деметилиране с 5-азациитидин (Фиг. 11).

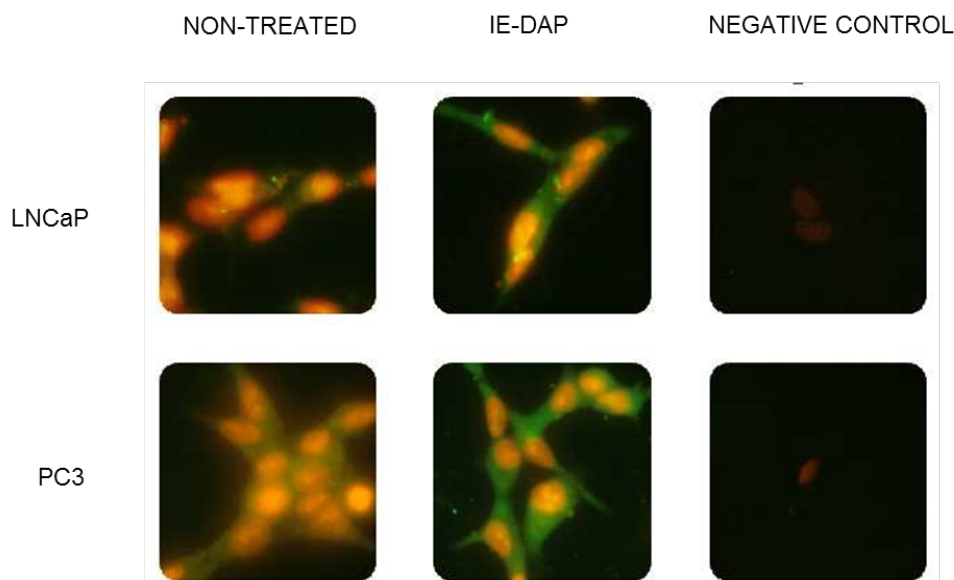


Фигура 11. Тоталното деметилиране потиска *E-Cadherin* и свръх-регулира *N-Cadherin* и *SLUG*. 5-азациитидин третиран и не-третиран LNCaP, PC3, VCaP и NCI-H660 клетки бяха използвани за отчитане на генната експресия (RT-qPCR) на *SLUG*, *E-CDH*, *N-CDH*, *VEGFA*, *SOX9*. Относителната генна експресия е представена като  $\log_{10}(\text{Pfaffl}, 2^{-\Delta\Delta C_t})$ , нормализирана към *PGK1*. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ . s.d.,  $n = 3$ .

## II. Изследвания върху инфламаторни, генотоксични и оксидативни процеси, свързани с простатната канцерогенеза

### Роля на микроРНК-204 и NOD1 рецептора в инфламаторния сигналинг при простатен карцином

В настоящият дисертационен труд бе проследен ефекта на микроРНК-204 самостоятелно и в контекста на индуцирано възпаление върху NOD1 в простатно-карциномните клетъчни линии (LNCaP и PC3) като модел за метастази със лимфен или костно-мозъчен произход. Клетките бяха третирани с ie-DAP (индуктор на NOD1). За негативна контрола бяха използвани нетретирани клетки. Клетките бяха инкубирани с антитяло срещу NOD1 и в следствие с второ специфично антитяло, белязано с флуоресцентно багрило. Бе проведен имунофлуоресцентен анализ (Фиг. 12).

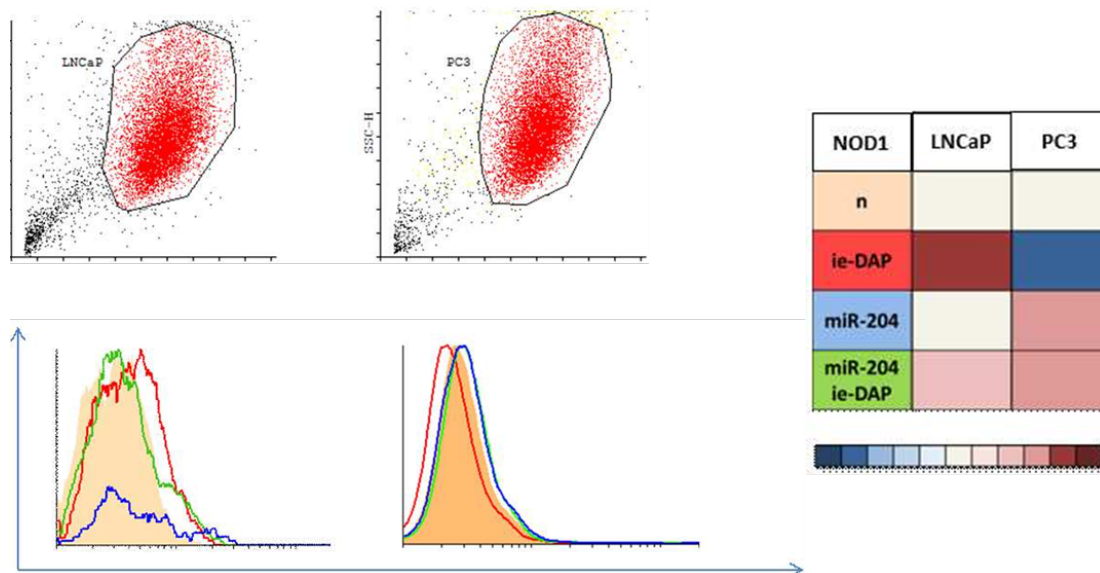


**Фигура 12.** Индиректна имунофлуоресценция за доказване експресията на NOD1 в простатно-карциномни клетки; нетретирани (ляв панел) и третирани с ie-DAP лиганд (среден панел) LNCaP и PC3 клетки, в следствие инкубирани с антитяло срещу NOD1; отрицателни контролни клетки (десен панел) без първо антитяло. x 400.

Третирането на клетките с NOD1 специфичен лиганд доведе до възходяща регулация на NOD1 в двете клетъчни линии LNCaP и PC3 (Фиг. 12).

Клетки от линиите LNCaP и PC3, трансфектирани с изкуствен аналог на микроРНК-204, или третирани със ie-DAP или трансфектирани със синтетичен аналог на микроРНК-204 и в следствие третирани с ie-DAP бяха инкубирани с антитяло срещу

NOD1 и второ антитяло, белязано със флуоресцентно багрило. Клетките бяха анализирани чрез проточна цитометрия (Фиг. 13).

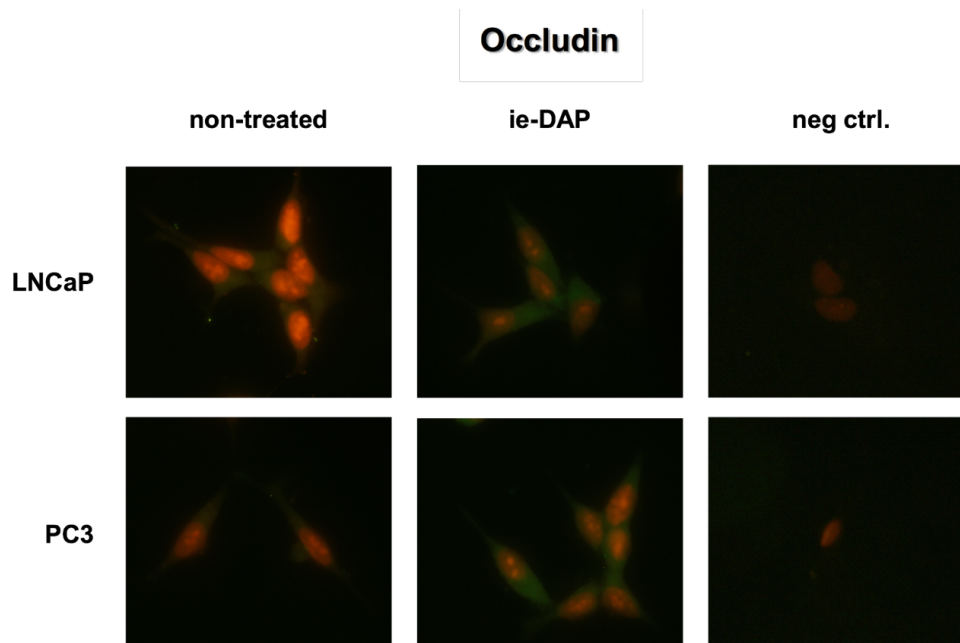


**Фигура 13.** Проточна цитометрия за доказване на експресията на NOD1 в LNCaP и PC3 клетки; нетретирани и третирани с: ie-DAP лиганд; микроРНК-204 мимик; комбинация от ie-DAP лиганд и микроРНК-204 мимик. Клетките са инкубирани с антитяло срещу NOD1; контролни клетки без първо антитяло. Експресията е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, Negative siRNA и специфично трансфектираните клетки. Графиката е представена с Медианен индекс на флуоресценция (MFI) за всяка FCS хистограма, нормализиран към MFI на Negative siRNA трансфектирани клетки.

Трансфектирането на клетките със синтетичен аналог на микроРНК-204 индуцира стратифициране на клетките в два фенотипа, и доведе до намалена експресия на NOD1 в PC3 клетките. В LNCaP единичното действие на ie-DAP доведе до слабо увеличаване на NOD1, докато микроРНК-204 не показва ефект върху NOD1. В костно-метастазиращите PC3 клетки бе открито намаляване на NOD1 нивата, докато при LNCaP имаше индуциране на NOD1 (Фиг. 13).

### **Регулация на Occludin от микроРНК-204 в модел на възпаление при простатно-карциномни клетъчни линии**

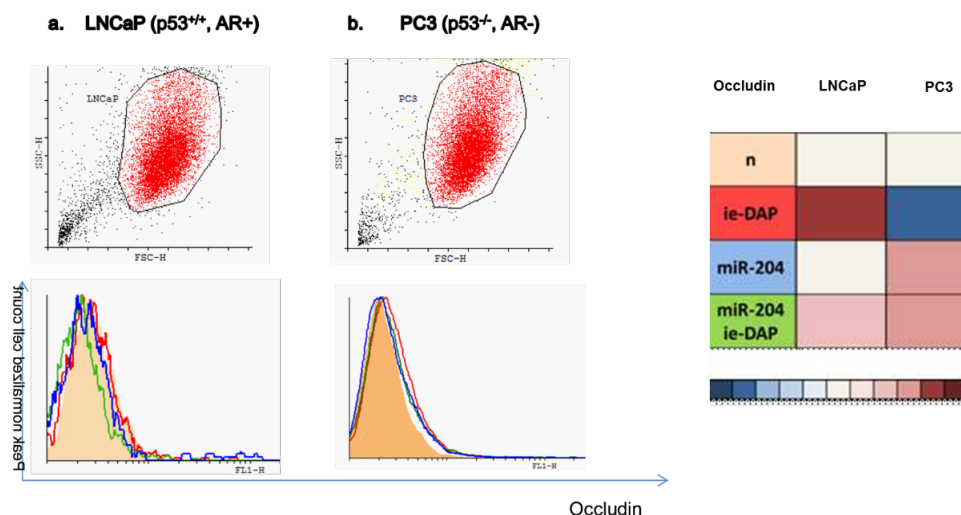
В настоящият дисертационен труд бе проследен ефекта на микроРНК-204 самостоятелно и в контекста на индуцирано възпаление върху Occludin в простатно-карциномните клетъчни линии (LNCaP и PC3). Клетките бяха третирани с ie-DAP (индуктор на NOD1) и бе използвана имунофлуоресцентна реакция. За негативна контрола бяха използвани нетретирани клетки. Клетките бяха инкубирани с антитяло срещу Occludin и бе проведен имунофлуоресцентен анализ.



**Фигура 14.** Индиректна имунофлуоресценция за доказване експресията на Occludin в простатно-карциномни клетки; нетретиран (ляв панел) и третиран с ie-DAP лиганд (среден панел) LNCaP и PC3 клетки, в последствие инкубирани с анти тяло срещу Occludin; отрицателни контролни клетки (десен панел) без първо анти тяло. x 400.

Беше установена позитивна експресия на Occludin в простатно-карциномните клетки от лимфен възел - LNCaP и костно-мозъчните метастатични PC3 клетки (Фиг. 14).

Клетки, трансфектирани с изкуствен аналог на микроРНК-204, или третиран със ie-DAP или трансфектирани със синтетичен аналог на микроРНК-204 и в последствие третиран с ie-DAP, бяха инкубирани със анти тяло срещу Occludin и с второ анти тяло, белязано със флуоресцентно багрило. Като негативна контрола бяха използвани клетки, трансфектирани с негативна некодираща РНК. Клетките бяха анализирани чрез проточна цитометрия. Получените резултати показаха, че единичното третиране на клетките само с ie-DAP индуцира експресия на Occludin в двете клетъчни линии. Трансфектирането на клетките само със синтетичен аналог на микроРНК-204 продуцира втори пик в хистограмата за LNCaP клетъчната линия, предполагащ низходяща регулация. Трансфектирането с микроРНК-204 мимик и в последствие с ie-DAP доведе до различна регулация на Occludin на протеиново ниво, като Occludin бе потиснат в LNCaP клетките и свръх-регулиран в PC3 клетките (Фиг. 15).

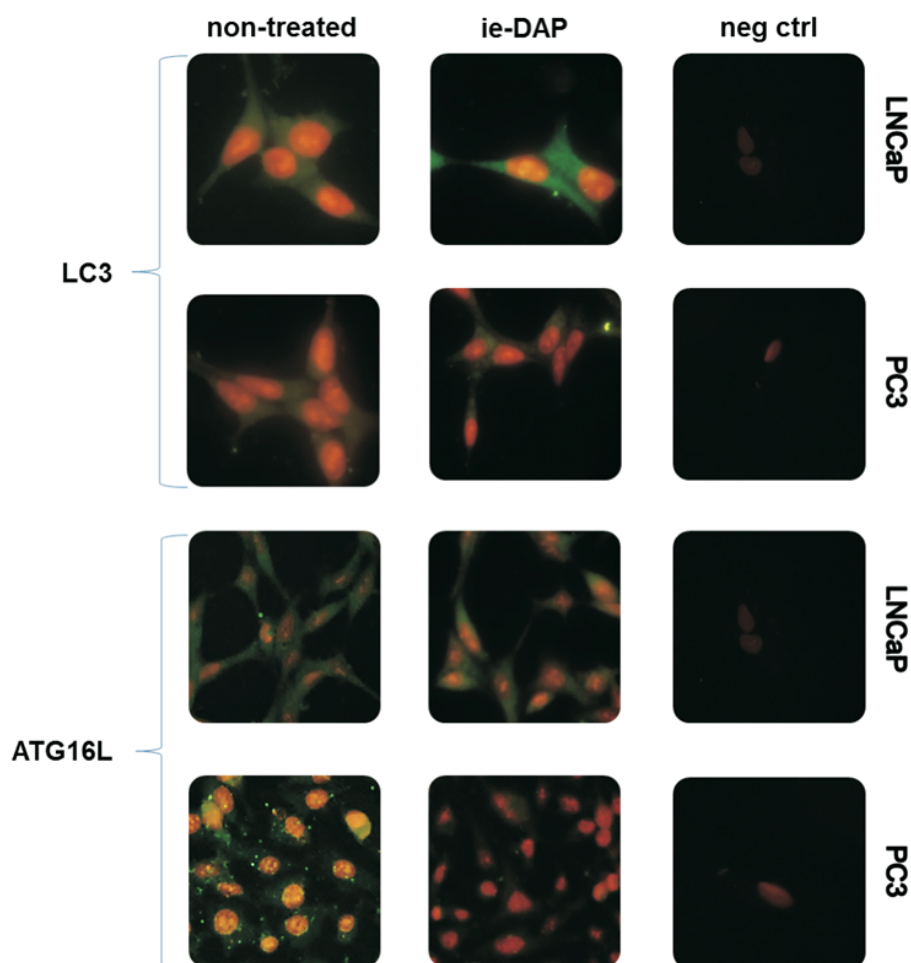


**Фигура 15.** Проточна цитометрия за доказване на експресията на Occludin в LNCaP и PC3 клетки; нетретирани и третирани с: ie-DAP лиганд; микроРНК-204 мимик; комбинация от ie-DAP лиганд и микроРНК-204 мимик. Клетките са инкубирани с антияло срещу Occludin; отрицателни контролни клетки без първо антияло. Експресията е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, Negative siRNA и специфично трансфектираните клетки. Графиката е представена с MFI за всяка FCS хистограма, нормализиран към MFI на Negative siRNA трансфектирани клетки.

### **Автофагоцитозният сигналинг е различно модулиран от микроРНК-204 в зависимост от индукцията на вродения имунен отговор**

В настоящото проучване бе проследено въздействието на микроРНК-204 върху молекулите, свързани с автофагоцитозата в клетъчен модел на простатен карцином. Простатно-карциномните клетъчни линии (LNCaP и PC3) бяха третирани с ie-DAP. За негативна контрола бяха използвани нетретирани клетки. Клетките бяха инкубирани с антигено срещу ATG16L и LC3, и бе проведен имунофлуоресцентен анализ. Беше установена увеличена експресия при флуоресценция на ATG16L и особено на LC3 в LNCaP клетките след третиране на клетките с ie-DAP. Обратно, в PC3 клетките флуоресцентното оцветяване на тези молекули бе намалено (Фиг. 16).

Клетки от простатно-карциномните линии LNCaP и PC3, трансфектирани с изкуствен аналог на микроРНК-204, или третирани със ie-DAP или трансфектирани със синтетичен аналог на микроРНК-204 и в последствие третирани с ie-DAP, бяха инкубирани с антигено срещу ATG16L и LC3 и втори антигено, белязани със флуоресцентно багрило. Като негативна контрола бяха използвани клетки, трансфектирани с негативна некодираща РНК. Клетките бяха анализирани чрез проточна цитометрия.

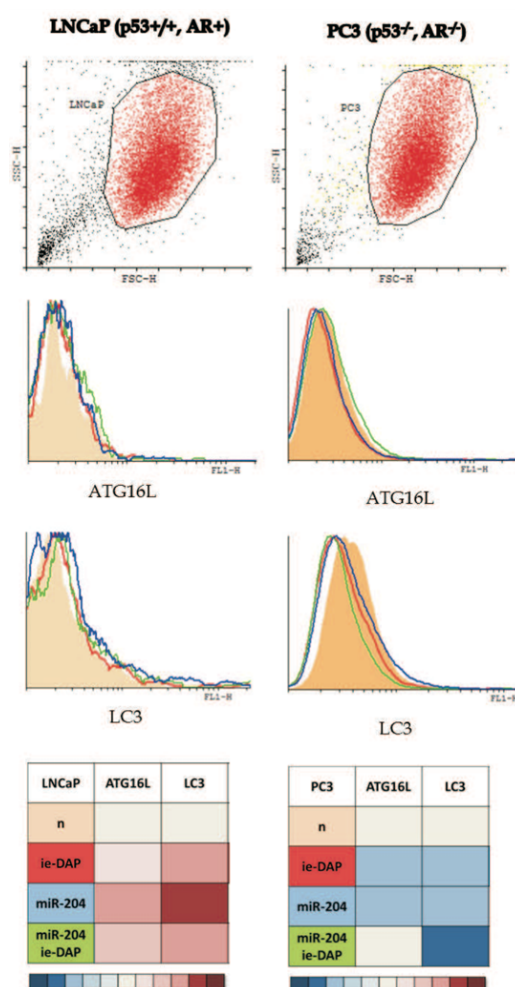


**Фигура 16.** Индиректна имунофлуоресценция за доказване експресията на ATG16L и LC3 в простатно-карциномни клетки; нетретирани (ляв панел) и третирани с ie-DAP лиганд (среден панел) LNCaP и PC3 клетки, в последствие инкубирани с антитела срещу ATG16L и LC3; отрицателни контролни клетки (десен панел) без първи антитела; x 400.

Клетките, които бяха трансфектирани само със синтетичен аналог на микроРНК-204 имаха увеличение на Медианен Флуоресцентен Индекс (MFI) на хистограмата за LC3 в сравнение с контролните клетки. Наблюдаваната разлика бе по-скоро значима и демонстративна за ефекта на микроРНК-204 върху LC3 зряла автофагозомна популация в LNCaP клетъчната линия. По-малко демонстративен бе ефекта от ie-DAP самостоятелно или в комбинация с предварителна трансфекция със синтетичният аналог на микроРНК-204 (Фиг. 17). Данните за PC3 клетките бяха потвърдителни на тези от имунофлуоресцентният анализ, където бе отчетено намаляване на експресията на LC3, като в този случай въздействието на микроРНК-204 самостоятелно или в комбинация с изкуствено



предизвиканото възпаление доведе до понижаване на протеиновата експресия на LC3 (Фиг. 17). Подобни бяха резултатите и за другата изследвана молекула ATG16L. При LNCaP клетки микроРНК-204 предизвика слабо увеличаване на експресията на ATG16L, докато при PC3 клетките бе отчетено значимо намаляване на протеиновата експресия на автофагозомната молекула. Комбинацията от въздействието на микроРНК-204 и изкуствено предизвиканото възпаление и в двете клетъчни линии доведе до увеличаване на експресията на ATG16L, отчетена с проточна цитометрия (Фиг. 17).

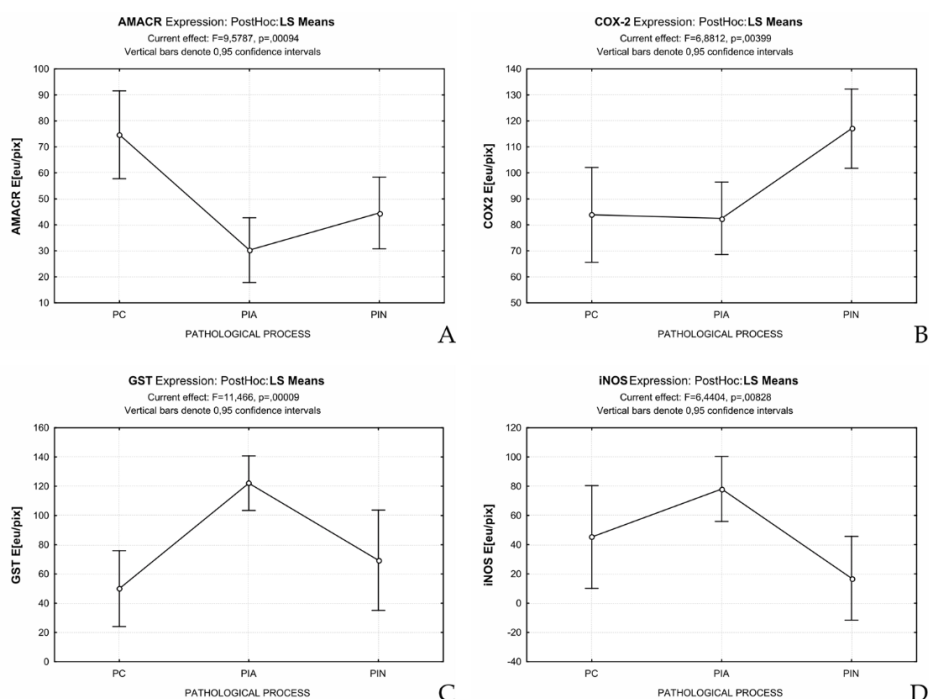


**Фигура 17.** Проточна цитометрия за доказване на експресията на ATG16L и LC3 в LNCaP и PC3 клетки; третиран с: ie-DAP лиганд; микроРНК-204 мимик; комбинация от двете. Антитела срещу ATG16L и LC3; Експресията е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, Negative siRNA и специфично трансфектираните клетки. Графиката е представена с MFI за всяка FCS хистограма, нормализиран към MFI на Negative siRNA трансфектирани клетки.

## Сравнителен анализ на имунохистохимичната експресия на AMACR, p63, COX-2, GST, iNOS при PIA, PIN и PCa

Тъканни срези от простатна инфламаторна атрофия (PIA) простатна интраепителна неоплазия (PIN) и карцином на простатата (PCa) (n=30), бяха обработени по протокол за имунохистохимия с използване на специфични антитела срещу AMACR, p63, COX-2, GST, iNOS и детектирани със система на DACO EnVision.

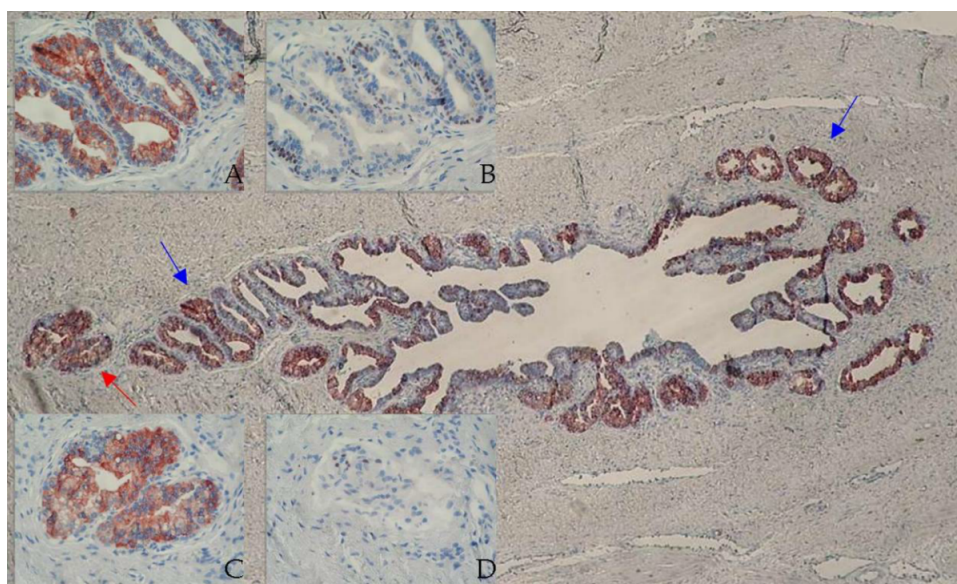
При анализа на експресията на AMACR бе установена статистическа разлика между нивата в PCa и тези в PIA, както и между тези в PCa сравнени с PIN, но не и между PIA и PIN. Нивата на експресия на COX-2 и на GST сигнификантно се различават между измерените в PIN от тези в PCa и PIA. iNOS няма статистически значима разлика в експресията си при PCa и PIA (Фиг. 18).



Фигура 18. Еднофакторен дисперсионен анализ на средните експресионни нива на AMACR (A), COX-2 (B), GST (C) и iNOS (D), придобити чрез количествена имунохистохимия и измерени eu/rix. Статистически сигнификантно повишени нива са демонстрирани от AMACR в PCa, COX-2 в PIN и GST в PIA, докато iNOS е статистически съществено намален само в PIN.

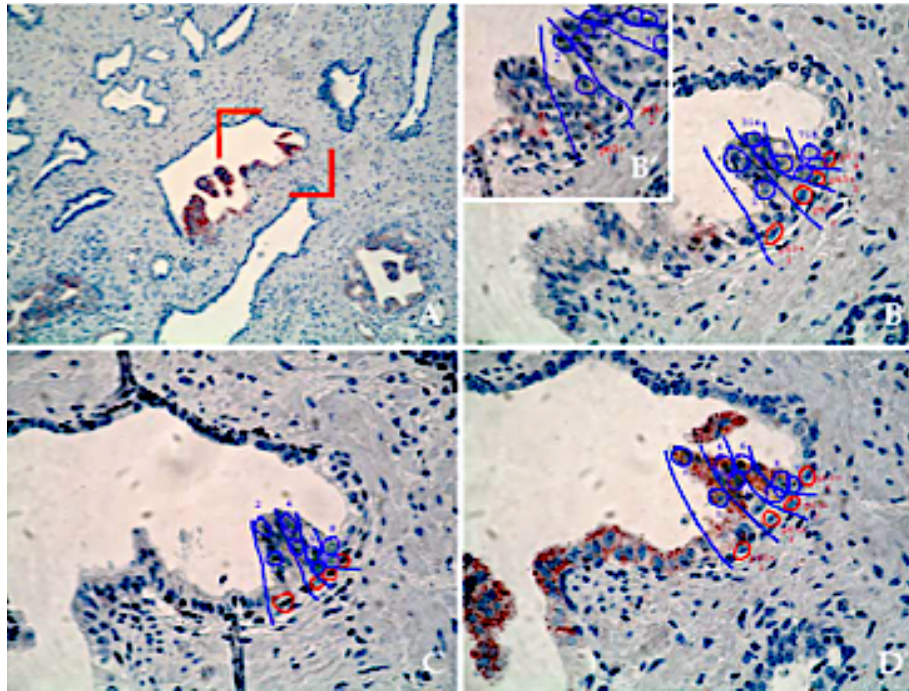
В настоящото изследване бе установено наличието на множество жлези (Фиг. 19) с морфологично класифицируема PIA, където нивата на COX-2 са повишени при едновременна експресия на GST с ниски до средни нива. В някои случаи, интензивността на AMACR бе средно степенна до отсъстваща. В повечето от случаите, при които има и прилежащите лезии с PIN в близост до атрофичните

жлези, бяха наблюдавани популации от АМАСР позитивни клетки, с намален интензитет на GST. Преобладаващото разпространение на СОХ-2 експресиращи клетки предполага за инфламаторен отговор, който е придружен с намаляване на GST, загуба на р63 имунооцветяването в някои от базалните клетки, и леко имунооцветяване за АМАСР. В жлезите с PIN, р63 протеиновата експресия бе намаляваща, а за GST бе негативна, докато за АМАСР бе установена повишена интензивност на оцветяване и експресия съответно. В някои случаи (Фиг. 19), имунооцветяването на АМАСР не се наблюдава в PIN лезията и това на р63 изчезва в базалните клетки. Това непостоянство на маркерния профил доведе до изследването на АМАСР, СОХ-2, GST и р63 експресията не на ниво жлеза, а в рамките на морфофункционална единица - "секреторна колона". За целта са изследвани серийни срези на PIN, възникнала в рамките на PIA жлези, в които е сравнен профилът на експресия на маркерите в една секреторна колона с този в други колони.

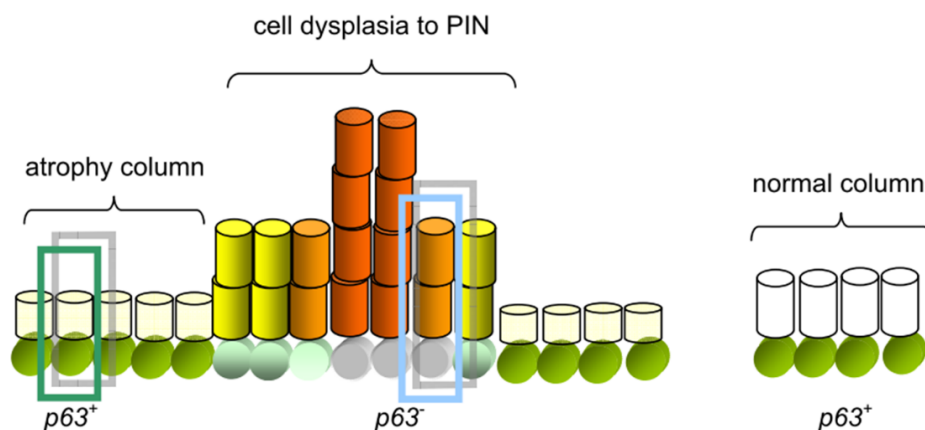


**Фигура 19.** Случай на PIA (простатна инфламаторна атрофия), състояща се от един канал и малки жлези, разположени в непосредствена близост до него. Като вложки са представени жлезите с PIA трансформираща се към PIN (A, B) и жлези с пълна трансформация в PIN (C, D). Имунодетекция на СОХ-2, А, С и на р63, В, D. Увеличение: x200, x400.

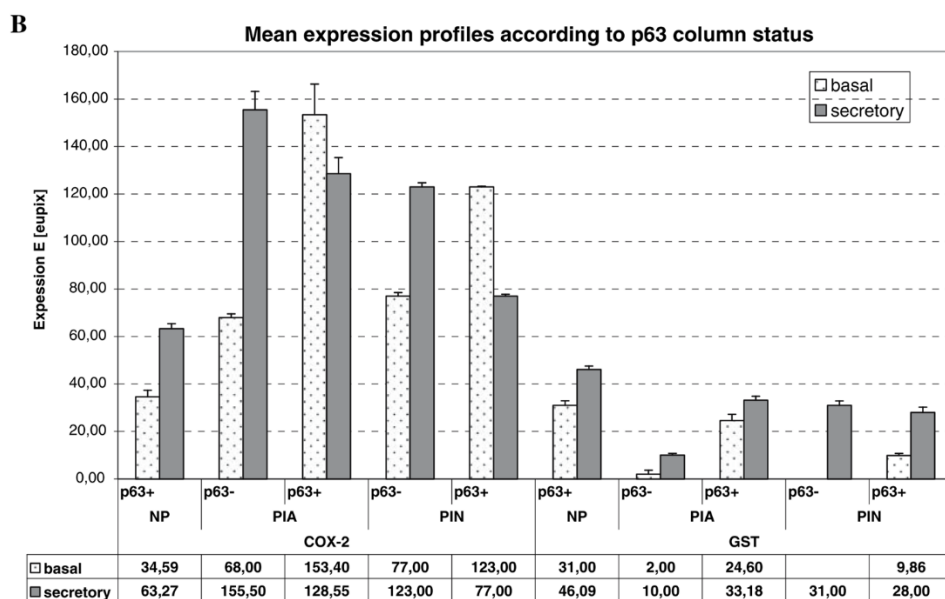
В настоящото изследване бяха анализирани жлези в PIA огнища, както и такива в PIN, възникнали в рамките на PIA огнища (Фиг. 20), като са сравнени средните нива на експресия на АМАСР, СОХ-2 и GST маркерите в клетките на техните секреторни колони и съпоставени с нивата им в техните съответни базални клетки (концепция за "секреторна колона", Фиг. 21).



Фигура 20. Случай на PIN, произтичащ от жлеза, засегната от PIA лезия. Експресията на колона спрямо колона е анализирана с помощта на серийни тъканни срези, третирани с антитела срещу AMACR, GST, COX-2 и p63. Съответните секреторните колони са избрани и изображенията, съответстващи на избраните клетки във всяка секреторна колона са екстрахирани и анализирани количествено. Освен това, съответните базалните клетки са екстрахирани както и анализирани за p63 оцветяване и евентуално GST оцветяване; x400.



Фигура 21. Концепция за "секреторна колона" - колоната се разглежда като базална клетка и нейните съответни насложени в апикално направление към жлезния лумен секреторни клетки. Нормалния фенотип е представен от високи, прозрачни клетки. При PIA, клетките стават базофилни и кубични. Определена област е дефиниран като PIN, когато клетките започват да се трансформират отново от кубични във високи, показват диспластични промени, имат видни ядра и се наблюдава процес на псевдо-стратификация.



**Фигура 22. Средни експресионни профили, генерирани с помощта на пълната информация от секреторните колони (средна стойност  $\pm$  стандартна грешка). (B) Подобно разпределение, включващо трите основни патологични подгрупи - нормална простата (представявана от нормална тъкан и базоцелуларна хиперплазия), PIA (представена от простатна атрофия или други форми на PIA) и PIN в рамките на PIA лезия. Легенда: NP - нормална простатна тъкан (или базоцелуларна хиперплазия), PIA - простатна инфламаторна атрофия, PIN-простатна интраепителна неоплазия в рамките на PIA.**

Определяйки експресията тип колона-с-колона, бяха сравнени средните нива на експресия на секреторните колони в идентични серийни срези на простатни жлези. Представените данни са средни стойности и са представителни за всички случаи.

В случаите на PIN, възникнала в рамките на PIA, бе наблюдавана намалена експресия на AMACR и COX-2 в p63+ колони, отколкото в p63- колони. Докато средните нива на GST не показаха сигнификантна разлика. В съответните базални клетки, експресията на GST бе съществено намалена.

Средната експресия на COX-2 в базалните клетки на p63+ колони бе по-висока ( $\sim 123$  eu/rix) в PIN, възникнала в рамките на PIA, отколкото в самостоятелна PIA ( $\sim 58$  eu/rix), когато се вземат в предвид p63+ колони. Колоните, които са p63- имаха подобен на предишният профил ( $\sim 77$  eu/rix в PIN, за сравнение  $\sim 68$  eu/rix в PIA). Нивата на COX-2 в базалните клетки на p63+ колоните бяха значително по-високи -  $123$  eu/rix (около 2 пъти) в областта на PIN, в сравнение с нивата в PIA, както и в сравнение със секреторните клетки в p63- колони. В същото време, тази разлика бе намаляваща в базалните клетки на p63- колони. Фиг. 22 представя средните стойности за VSN и

NP (базална клетъчна хиперплазия и нормална простатна тъкан, съответно), за PIN и за всички видове PIA.

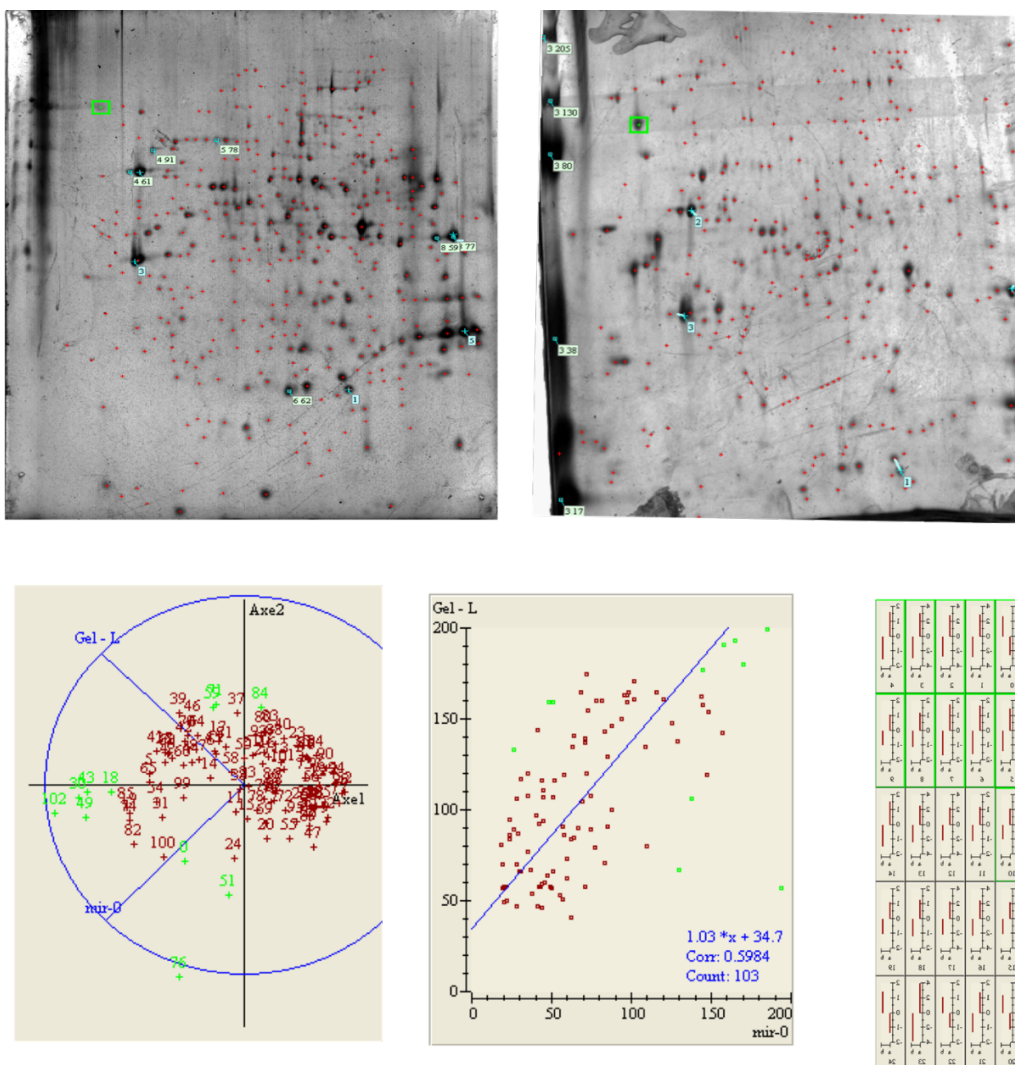
Нивата на GST от същия тип p63+ базални клетки бяха сходни между подгрупите на PIN и PIA, докато при p63- секреторни колони имаха само слаба (PIA) до липсваща експресия (PIN възникнал в PIA). Случаите на PIA без PIN се отличават от PIN възникнала в PIA по липсата им на AMACR експресия и ниските нива на COX-2. В единични секреторни колони, дефицитни на базално-клетъчно оцветяване за p63, бяха открити неочаквано увеличени нива на експресия на COX-2, докато GST бе съществено намален в базалните клетки (Фиг. 22). Експресия на iNOS бе наблюдавана само в някои от изследваните случаи.

### **III. Модулираща роля на микроРНК-204 върху сигналинга на андрогенния рецептор и свързани епигенетични механизми в простатната канцерогенеза**

#### **Сравнителна характеристика на протеиновите профили на простатно-карциномните LNCaP и PC3 клетки в следствие изкуствено повишаване на микроРНК-204**

За идентифициране на специфични протеинови фактори в LNCaP и PC3 клетки, трансфектирани с микроРНК-204 мимик и с негативна интерферираща РНК, беше приложено изоелектрично фокусиране, като първа дименсия, с последваща конвенционална полиакрилна гел електрофореза, след като бяха сравнени протеиновите профили на двете анализирани групи клетки. Бяха разделени протеини от двете групи клетки с изоелектрична точка в границите от 3-10 и молекулна маса от 20-195 kDa. Оцветените гелове, бяха дигитално сканирани (Image Scanner III, GE, Healthcare, BioSciences), при резолюция 300 dpi, използвайки софтуерна програма за сканиране и обработка на гелове Lab Scan (GE, Healthcare, BioSciences) (Фиг. 23).

От получените изображения при сравняване на двата гела в рамките на една клетъчна линия, се установи наличие на специфични протеини вследствие действието на микроРНК-204 мимик. Това се осъществи чрез анализ на геловите, използвайки специфичният софтуер Image Master 2D Platinum 7.0 DIGE. Бяха генерирани множество от идентифицирани автоматично петна, всяко със свой уникален идентификатор (ID) с количествени и качествени параметри. Средно в гел бяха отдиференцирани около 350 петна  $\pm$  30. Отдиференцираните петна от двете групи на дигиталните изображения бяха наложени едни върху други, като по този начин визуално се придоби представа за разликата в протеиновите профили помежду им.



**Фигура 23.** Двудименционална гел електрофореза на LNCaP клетки, трансфектирани с микроРНК-204 мимик и контролни клетки, трансфектирани с негативна нетаргетираща РНК; Гелове са оцветени със сребърен нитрат. С кръстчета са зададени петната, разпознати от софтуера - отправни точки за молекулно тегло и изоелектрична точка. Факторен анализ на протеиновите петна - определени са петна които имат най-голям ефект върху вариацията на данните и са определящи за разделянето на гелове според типа на клетъчната линия. Корелационна права и корелационно уравнение, получени при сравнителния анализ на двата гела.

За LNCaP клетките бяха постоянно представени общо 137 протеинови петна, като бе установено и наличие на петна, които са уникално представени. За PC3 клетките бяха постоянно представени 14 протеина (Фиг. 23). Бяха използвани т. нар. „*Scatter plots*“, които дават представа за връзката между стойностите на протеиновите петна при сравнението на двете групи гелове. От получените данни се построи корелационна крива, която описва връзката между групите гелове. От графиката и от стойностите на корелационният коефициент може да се каже, че между двете групи гелове съществува средно по степен

различие в протеиновия състав за LNCaP и голямо по степен различие за PC3 клетките.

Изследването бе разширено с нано-протеомика, проведена в колаборация с Department of Biological Sciences, Essex University, Colchester, UK.

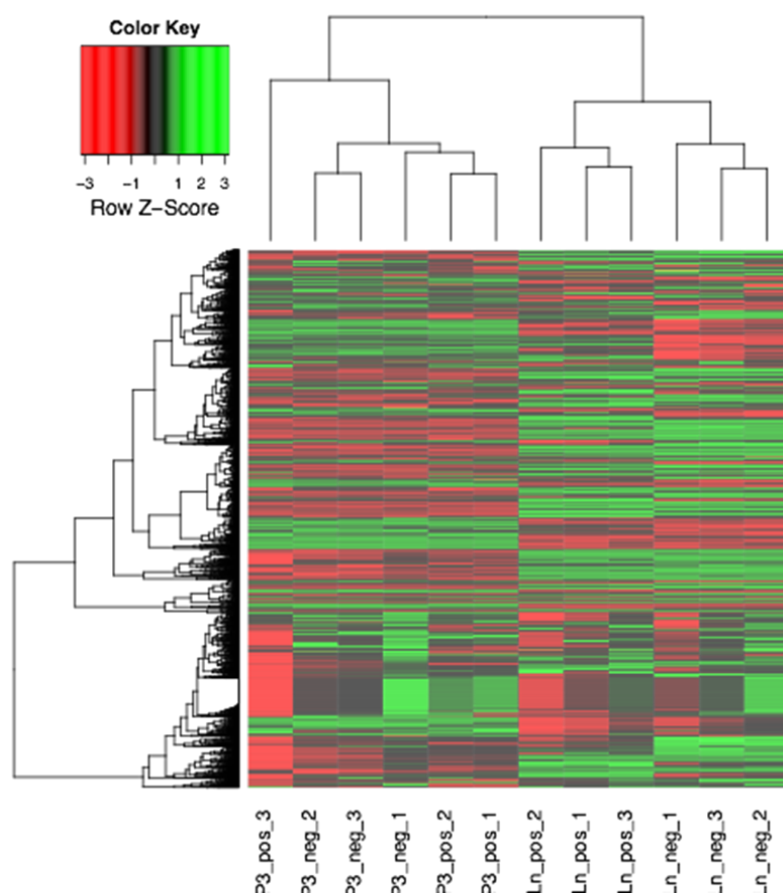
Пригответни пулове от клетки, които са трансфектирани със синтетичен аналог на микроРНК-204 и контролни клетки от двете простатно-карциномни клетъчни линии, бяха анализирани с високо чувствителна и информативна нано-протеомна система - LTQ Orbitrap мас-спектрометрия. Бяха идентифицирани около 2000 протеини за двете клетъчни линии, които надвишават максималният праг за идентификация, чрез сравняване с помощта на параметрите LFQ (*Label Free Quantification*) и MS/MS Counts. Големият набор от данни, получени от двете анализирани групи са сравнени статистически с помощта на t-test на Student и “*post hoc*” корекция на Bonferroni, като след това са избрани само тези протеини, които имат най-висока вероятност да се експресират различно (използван е параметърът LFQ Intensity), при достоверност  $p < 0.05$ .

### **Протеомната регулация на микроРНК-204 е намалена в клетъчна линия с костно-мозъчен произход в сравнение с клетъчна линия с произход от лимфен възел**

Йерархична клъстеризация на значително диференцирано изразени протеини, индуцирани от микроРНК-204 мимик показва по-голям брой засегнати протеини в LNCaP клетъчната линия в сравнение с PC3 клетките (Фиг. 24).

За по-нататъшно изясняване на това явление, беше отделен набор от протеини със значително различна експресия, индуцирана от микроРНК-204 и фокусирани върху GO и Uniprot бази данни. А именно: протеини, свързани с *иРНК алтернативно свързване, поли(А) свързване, убиквитинация и де-убиквитинация*. Бе установено, че микроРНК-204 индуцира повечето от протеините, свързани с *иРНК сплайсинг и поли(А) свързване* в двете клетъчни линии. Убиквитинация и свързани със стабилността протеини бяха диференцирано засегнати от микроРНК-204. Като цяло, промените, които настъпват в експресионно съотношение, предизвикани от микроРНК-204, показваха различен ефект на тази микроРНК в двете клетъчни линии, предизвикваща индукция на някои или потискане на други, свързани с деградацията ензими. Този ефект има специфичен модел за всяка клетъчна линия, особено когато двете клетъчни линии бяха сравнени. От идентифицираните протеини около 300 са сигнификантно различни между трансфектираните със синтетичен аналог на микроРНК-204 и контролните клетки за LNCaP клетъчната линия и 110 за PC3.





**Фигура 24.** Йерархичен клъстерен анализ на отделните експресионни нива представен съответно като хоризонтална дендрограма и цветна карта, комбиниран с втори клъстерен анализ на експерименталните условия, представен като вертикална дендрограма.

**МикроРНК-204 кумулативно усилва експресията на AR при състояние на тотално деметиране в клетъчен модел на простатен карцином**

В настоящото изследване двете простатно-карциномни клетъчни линии LNCaP (от лимфно-метастазен произход, без онкофузия) и VCaP (от костно-метастазен произход, носители на онкофузионният феномен), които експресират AR бяха трансфектирани със синтетичен аналог или инхибитор на микроРНК-204, както и със съответните негативни контроли. Отделно, клетки от същите клетъчни линии бяха третирани с 5-азациитидин самостоятелно или в комбинация с трансфекция на микроРНК-204 мимик или инхибитор и съответните негативни контроли. Чрез полимеразно-верижна реакция със специфични праймери бе проследен ефекта на изследваната микроРНК върху генната експресия на AR.

По подобен модел на третиране и трансфектиране, клетки от двете клетъчни линии бяха подготвени за цитометричен анализ, като бе използвано специфично антитяло срещу AR с цел проследяване на ефекта на микроРНК-204 върху протеиновата му експресия.

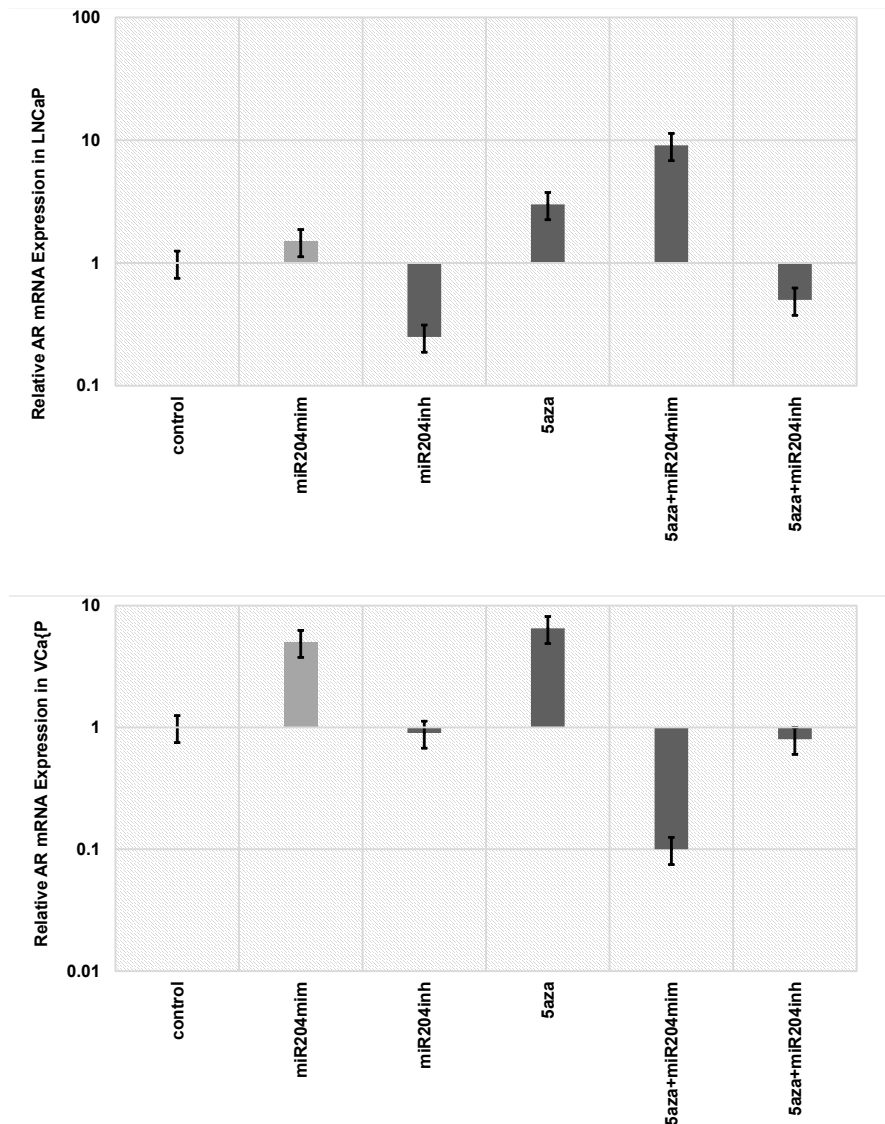
Генната експресия на *AR* в простатно-карциномната клетъчна линия от лимфни метастази - LNCaP, бе незначително увеличена (>2 пъти) след изкуствената свръх-експресия на микроРНК-204, използвайки синтетичен мимик, докато синтетичното комплементарно инхибиране доведе до значимо намаляване на иРНК нивата на *AR* около 10 пъти, в сравнение с контролните клетки (Фиг. 25).

Подобно, трансфекцията с микроРНК-204 мимик доведе до увеличаване на протеиновата експресия на *AR* с повече от 19% в сравнение с негативните контролни клетки, докато потискането на микроРНК-204 доведе до намаляване на протеиновата експресия на *AR* в LNCaP клетките (Фиг. 26).

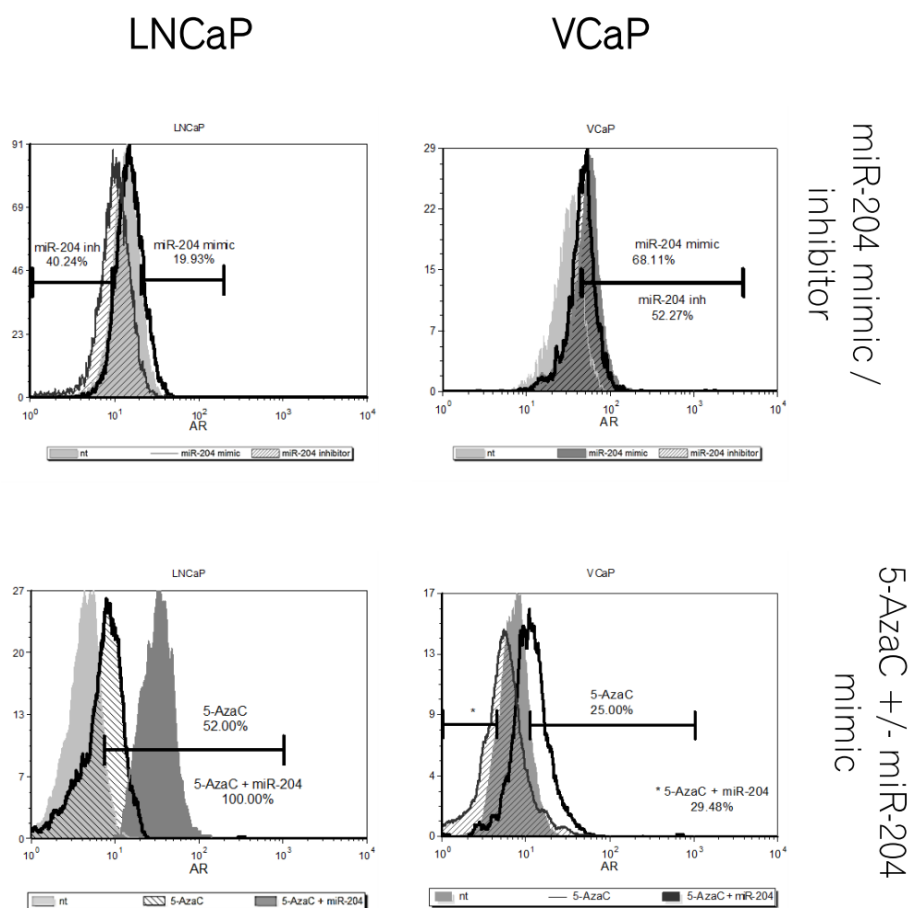
Генната експресия на *AR* в простатно-карциномната клетъчна линия от костни метастази VCaP бе увеличена 5 пъти след изкуствената свръх-експресия на микроРНК-204 (Фиг. 25).

В същата клетъчна линия VCaP, трансфектирането с микроРНК-204 мимик или инхибитор доведе до увеличена протеинова експресия на *AR* (Фиг. 26).

Глобалното деметиране с 5-азацитидин доведе до статистически значимо увеличаване на транскриптите и протеина на *AR* в двете изследвани клетъчни линии. Кумулативен ефект на това увеличаване, в LNCaP клетките бе установен с по-силна експресия (около 10 пъти), когато допълнително бе добавен микроРНК-204 мимик, в сравнение с клетките, които бяха само деметилрани. Комбинираното третиране на клетките с 5-азацитидин и трансфектирането с инхибитор на микроРНК-204, показва още по-силно изразено потискане на генната експресията на *AR* в LNCaP клетъчната линия. В контекста на деметирането, самостоятелно или едновременно с участието на микроРНК-204 мимик, протеиновата експресия на *AR* следваше същият механизъм както при транскрипта в LNCaP клетките със значимо увеличаване. Обратно, 5-азацитидин деметирането и екзогенното увеличаване на микроРНК-204 в VCaP клетките доведе до статистически значимо намаляване на иРНК нивата на *AR* (10 пъти). Тези резултати намериха потвърждение и на протеиново ниво, където екзогенната свръх-експресия на микроРНК-204 и деметирането в комбинация доведоха до намаляване на *AR* протеин (Фиг. 25, 26).



**Фигура 25.** RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на *AR* в LNCaP клетки, след трансфекция със синтетични микроРНК-204 мимик или инхибитор. Броят цикли е нормализиран към *PGK1* (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ Ct). RT-qPCR данни са представени като относителна промяна за микроРНК-204 мимик или микроРНК-204 инхибитор нормализирани към нетаргетиращите контроли. RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на *AR* в LNCaP клетки след тотално деметиране с 5-азациитидин самостоятелно или в комбинация с микроРНК-204 мимик и инхибитор трансфекция. \*P<0.05. s.d., n = 3.



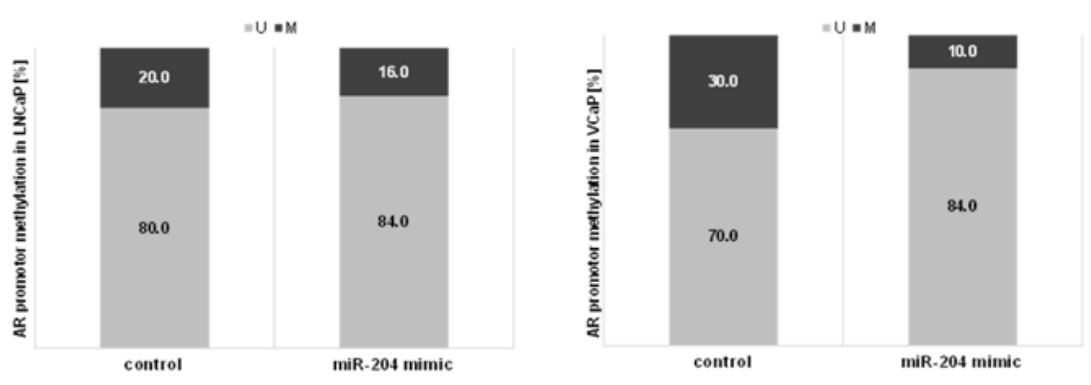
**Фигура 26.** Проследяване на експресията на AR с помощта на проточна цитометрия в клетки от линиите LNCaP и VCaP, трансфектирани с нетаргетираща РНК или с микроРНК-204 мимик или инхибитор (горен ред), или третираните с 5-азацитидин и третираните комбинирани с 5-азацитидин и последващо трансфектирани с микроРНК-204 мимик (долен ред). Данните са отчетени като разлики в медианния флуоресцентен индекс на контролните и на третираните клетки, както и чрез процента от клетъчната популация, който се променя при всяко третиране.

### МикроРНК-204 индуцира намаление на степента на метилиране на промотора на AR

За установяване на промените в съотношението на метилирана към неметирана фракция на ДНК матрицата при трансфектиране на клетъчните линии (LNCaP и VCaP) с негативна нетаргетираща контрола и микроРНК-204, имитираща РНК последователност, бе проведена полимеразно-верижна реакция с две двойки праймери, и матрица, съответстваща на регион, включващ промоторната, и част от Екзон 1 области.

И при двете клетъчни линии бе установено, че микроРНК-204 индуцира намаление на степента на метилиране на изследваната област, обхващаща част от промотора и началото на Екзон 1 на гена,

кодиращ *AR*. При клетъчната линия LNCaP това намаление бе с 4 %, а при линията VCaP с 20 % съответно. По този начин микро-РНК 204 упражнява “отключваща” активност по отношение на експресията на гена на андрогенния рецептор. Тези данни корелират с данните, получени относно експресията на иРНК, кодираща *AR*, установена чрез полимеразно-верижна реакция. По подобен начин, още по-силното намаление на степента на метилиране в областта *AR* промотор-Екзон 1 при клетъчна линия VCaP, също се съпътства от увеличение на експресията на иРНК, кодираща *AR* (Фиг. 27).



**Фигура 27.** RT-qPCR с метилационно специфични праймери и бисулфидно конвертиране на промотора на *AR*. Клетките са трансфектирани с микроРНК-204 мимик или нетаргетираща РНК (контрола). Нивата на експресия са представени като проценти съотношение на метилирана и неметилирана версия на промотора.

### **Участие на главните транскрипционни фактори RUNX2 и ETS1 в сигналинга на *AR* в клетъчен модел на простатен карцином**

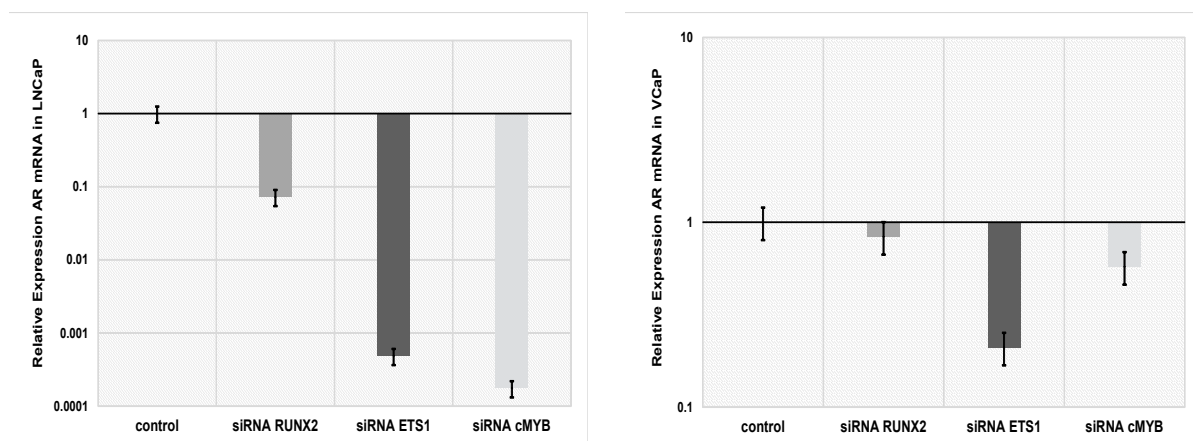
В LNCaP и VCaP клетки, трансфектирани с интерфериращи РНК-и за *RUNX2*, *c-MYB* и *ETS1*, бе проследена експресията на *AR* чрез полимеразно-верижна реакция.

Получените резултати показаха статистически значимо намаляване на експресионните нива на *AR* в двете клетъчни линии след потискането на главните транскрипционни фактори - *RUNX2*, *c-MYB* и *ETS1* (Фиг. 28).

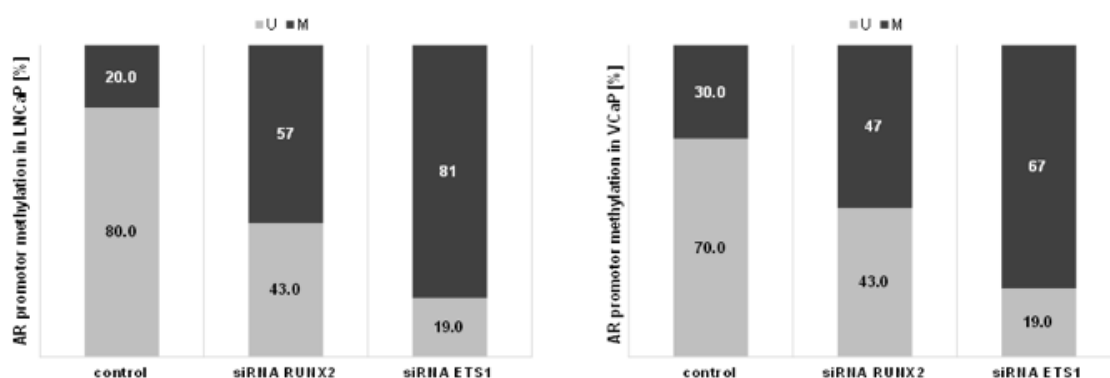
### **Участие на главните транскрипционни фактори RUNX2 и ETS1 в метилирането на промотора на *AR* в клетъчен модел на простатен карцином**

В настоящият дисертационен труд бе изследвано дали главните транскрипционни фактори *RUNX2* и *ETS1* упражняват модулаторен ефект на промотора на *AR*.

Данните от метилационният анализ показаха, че потискането на *RUNX2* доведе до 57% хиперметиране на промотора на *AR* при LNCaP клетките и 47% при VCaP клетките, при 20% и 30% съответно в клетки, които са контролни. Генното заглушаване на *ETS1* доведе до 81% хиперметиране на промотора при LNCaP клетките и 67% при VCaP клетките (Фиг. 29).



**Фигура 28.** RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на AR в LNCaP клетки, след трансфекция със siRNA специфично заглушаваща RUNX2, ETS1 или MYB. Броят цикли е нормализиран към PGK1 (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ Ct). RT-qPCR данните са представени като относителна промяна, нормализирани към нетаргетиращите контроли в log10 скала.



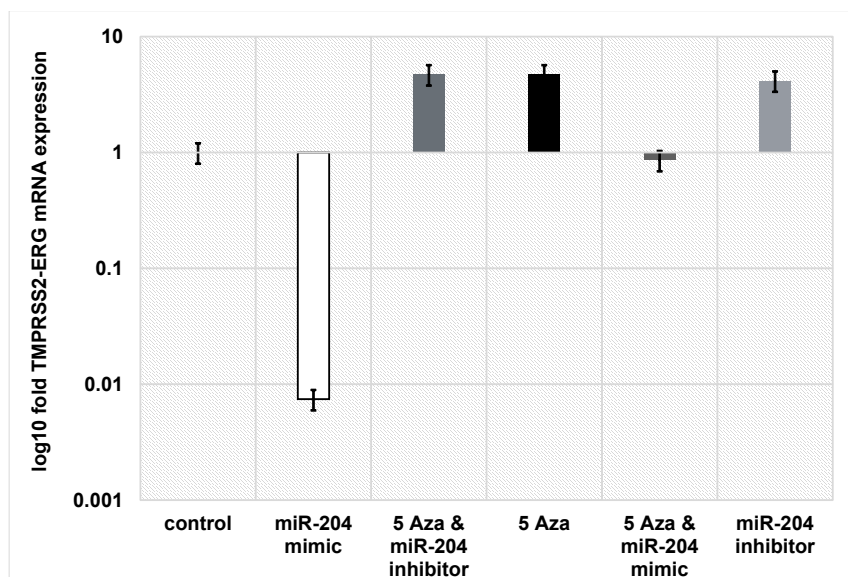
**Фигура 29.** RT-qPCR с метилационно специфични праймери и бисулфидно конвертиране на промотора на AR. Клетките са трансфектирани с siRNA срещу RUNX2, ETS1 или негативна siRNA. Нивата на експресия са представени като проценти съотношение на метилирана и неметирана версия на промотора.

#### IV. Дисрегулация на микроРНК-204 при настъпване на геномно реаранжиране и възникване на характеристичен за простатният карцином фузионен феномен TMPRSS2-ERG

##### Регулация на транскрипционните и протеинови продукти на онкологичната фузия TMPRSS2-ERG и на транскрипционният фактор ERG от микроРНК-204 в клетъчен модел на простатен карцином (VCaP)

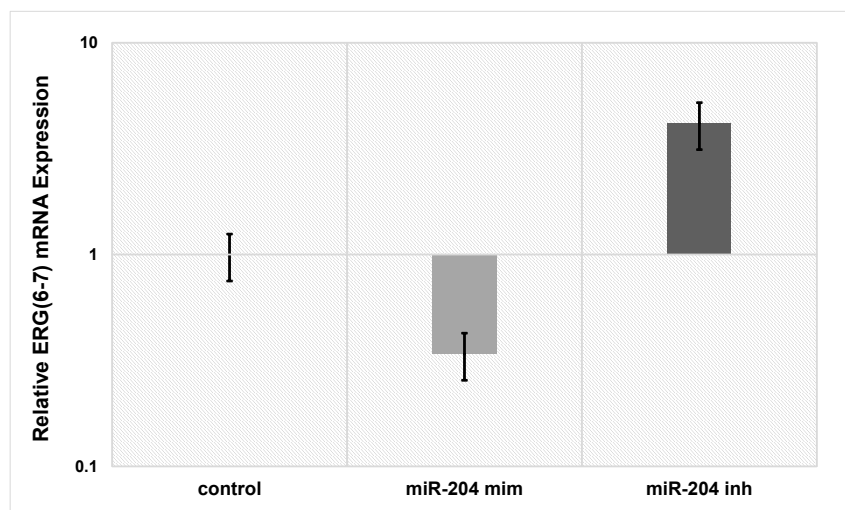
В клетъчната линия VCaP е установен наличен онкофузионен феномен, получен от интра-хромозомно пренареждане и сливане на част от гена за TMPRSS2 и по-голяма част от гена за ERG. В настоящият дисертационен труд бе проследено влиянието на микроРНК-204 върху експресията на транскрипти на TMPRSS2-ERG в тази простатно-карциномна клетъчна линия. Клетки от VCaP клетъчната линия бяха трансфектирани с изкуствен аналог и инхибитор на микроРНК-204 и бе изолирана РНК с последваща копиДНК изградена верига.

Данните от полимеразно-верижната реакция показаха, че повишаването на микроРНК-204 води до значително потискане на транскрипта на TMPRSS2-ERG и обратно, инхибирането на микроРНК-204 води до значително увеличаване на експресията на иРНК TMPRSS2-ERG (Фиг. 30).



Фигура 30. RT-qPCR Анализ на експресията на транскриптите на TMPRSS2-ERG в линия VCaP. Клетките са предварително трансфектирани с нетаргетиращ мимик, с мимик, имитиращ микроРНК-204 или с инхибитор; тотално деметилиране с 5-азациитидин самостоятелно или в комбинация с микроРНК-204 мимик и инхибитор трансфекция. Нивата на експресия са представени като log<sub>10</sub> от относителната промяна в експресията спрямо контролните клетки; n=3, p < 0.05.

Резултатите, получени от полимеразно-верижната реакция за ERG (Фиг. 31) показаха статистически значимо понижаване на транскрипта на изследваният фактор след трансфектиране с микроРНК-204 мимик и статистически значимо повишаване на нивата на иРНК след трансфектиране с инхибитор на микроРНК-204.



**Фигура 31.** RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на ERG в VCaP клетки, след трансфекция с микроРНК-204 мимик или инхибитор. RT-qPCR данни са представени като относителна промяна за микроРНК-204 мимик или микроРНК-204 инхибитор, нормализирани към нетаргетиращите контроли. \*P<0.05. s.d., n = 3.

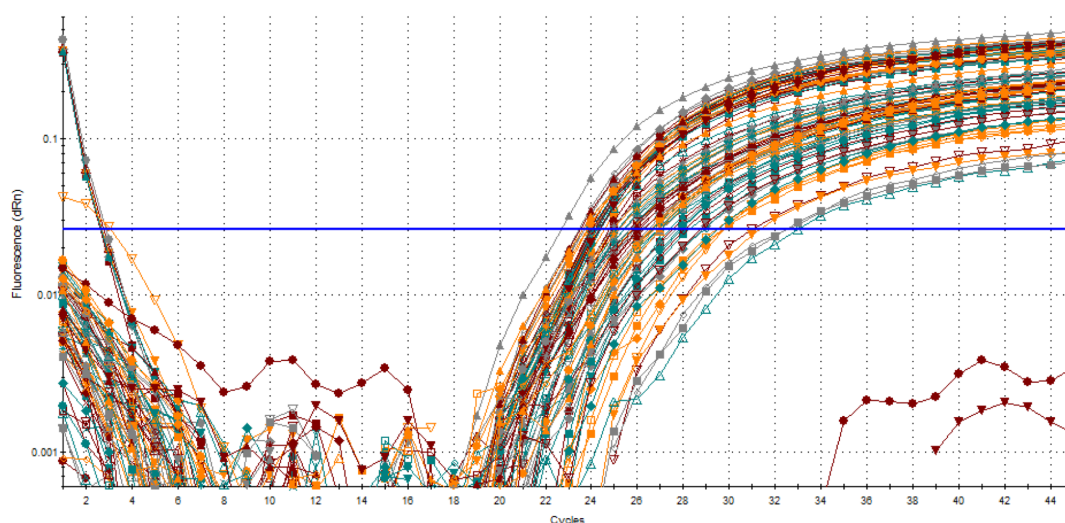
За изследване на реалния физиологичен ефект на протеиновия продукт на фузията, бе разработен метод, детектиращ фузионни протеинови продукти с близки до нативните конформации на продуктите на гените предшественици - TMPRSS2 и ERG. За референтна контрола е използвана линията VCaP, която съдържа в клетъчната си популация няколко варианта на геномно аранжиране, един от които с добре запазени части от TMPRSS2 и от ERG в *cis*-направление. Методично, детекцията на евентуален TMPRSS2-ERG протеинов продукт се осъществява, чрез детекция на домени от TMPRSS2 и ERG съответно с помощта на поливалентни антитела. При разпознаване, конюгирани към антителата олигонуклеотиди създават молекулен хибридизационен мост, който се амплифицира с помощта на полимеразно верижна реакция. Разпознават се само феномени, при които TMPRSS2 и ERG са на молекулно разстояние помежду си. Отделните нативни молекули не създават мост, както е в случая с карциномната линия LNCaP, в която този фузионен феномен не присъства. Данните са нормализирани въз основа на експресията на варианта на TMPRSS2-ERG в линията VCaP (Фиг. 32). С помощта на новият разработен метод бе проследена протеиновата експресия на онкофузионната форма TMPRSS2-ERG в клетъчен модел на простатен



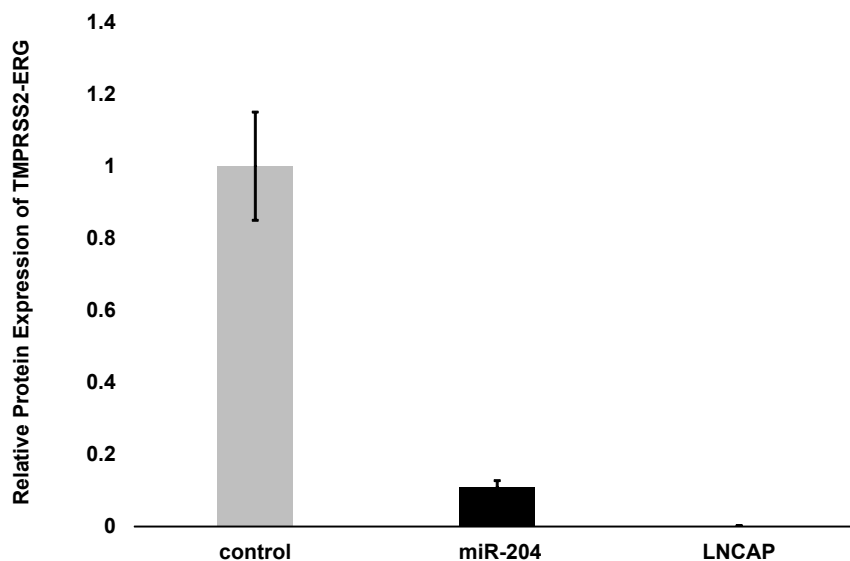
карцином след увеличаване на експресията на микроРНК-204.

Клетъчната линия VCaP бе трансфектирана със синтетичен аналог на микроРНК-204 и клетките бяха обработени по вече описаната методика, като бяха използвани и двукратни падащи разреждания. За отрицателна контрола бяха използвани трансфектирани с нетаргетиращи некодиращи РНК-и VCaP клетки, както и несъдържащи фузията LNCaP клетки. Бяха използвани специфични срещу TMPRSS2 и срещу ERG антитела (Фиг. 32).

Получените резултати показват, че свръх-експресията на микроРНК-204 води до понижение на нивата на TMPRSS2-ERG с 80 %. В клетъчната линия LNCaP не бе установена експресия на TMPRSS2-ERG протеинов продукт. Данните са представени като относителна експресия на TMPRSS2-ERG в експерименталните условия, спрямо средната им експресия в трансфектирани с нетаргетираща РНК простатно-карциномни съдържащи онкофузията VCaP клетки, където тази експресия е 100 % (Фиг. 33).



**Фигура 32.** Амплификационна крива, получена при стъпка 2 от метода за детекция на TMPRSS2-ERG протеин. Различни експериментални условия на третиране на клетки VCaP, чийто лизати са разреждени серийно. За всяко условие на третиране (трансфектиране с нонсенс секвенция, микроРНК-204 мимик секвенция, siRNA срещу RUNX2, siRNA срещу cMYB, siRNA срещу ETS1) лизатите на VCaP са разреждени от 1 до 1:10<sup>-11</sup>.



**Фигура 33.** Резултати, получени с помощта на новия метод за детекция на протеиновия продукт на реаранжирания фузионен продукт TMPRSS2-ERG в клетки от VCaP линията, трансфектирани с нетаргетираща РНК, или с микроРНК-204 мимик. LNCaP клетки са използвани като негативна техническа контрола. Данните са представени като относителна експресия на TMPRSS2-ERG в експерименталните условия, спрямо средната им експресия в трансфектирани с нетаргетиращ мимик VCaP клетки, където тази експресия е 100 %.

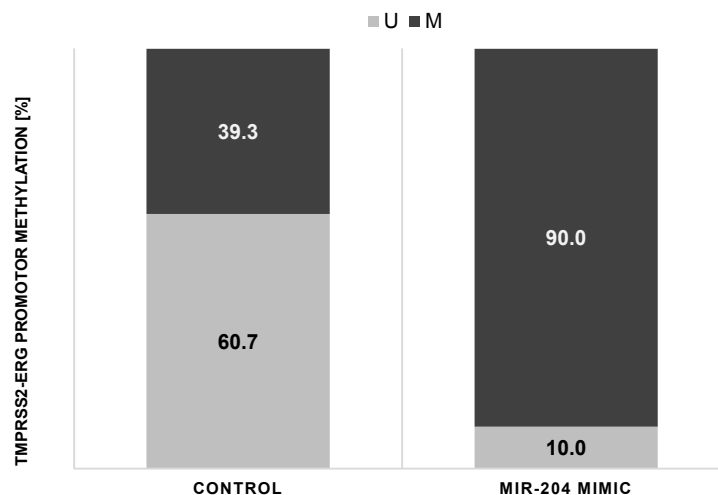
### **Глобалното деметиране подсказва, че експресията на TMPRSS2-ERG се регулира и от нивата на ДНК метилиране**

Използвайки 5-азациитидин бе проследена експресията на транскриптите на онкофузионният феномен TMPRSS2-ERG в простатно-карциномната клетъчна линия VCaP, чрез полимеразно-верижна реакция. Получените резултати показаха увеличена генна експресия на TMPRSS2-ERG след тотално деметиране, което бе статистически достоверно. Бяха установени сигнификантно увеличени нива на транскрипта след комбинирано третиране на клетките с 5-азациитидин и трансфектиране с инхибитор на микроРНК-204. Съответно, бе наблюдавано значително намаляване на експресионните нива на TMPRSS2-ERG след трансфектиране на клетките с микроРНК-204 мимик, но не и в случая на комбинирана трансфекция с микроРНК-204 мимик след третиране с 5-азациитидин (Фиг. 30).

### **МикроРНК-204 повишава нивото на ДНК метилация на TMPRSS2-ERG промотора**

При изследване на метилационният статус на промотора на TMPRSS2-ERG при интактно състояние или след трансфекция със

негативни контролни некодиращи РНК-и в VCaP клетки, нивото на метилиране на промотора е 39.3%. При трансфекция със синтетичен аналог на микроРНК-204 това ниво се увеличава от 39.3% до 90% и показва сигнификантно хиперметиране на изследваният промотор (Фиг. 34).



**Фигура 34.** RT-qPCR с метилационно специфични праймери и бисулфидно конвертиране на промотора на TMPRSS2-ERG. Клетките са трансфектирани с микроРНК-204 мимик или нетаргетираща РНК (контрола). Нивата на експресия са представени като проценти съотношение на метилирана и неметирана версия на промотора.

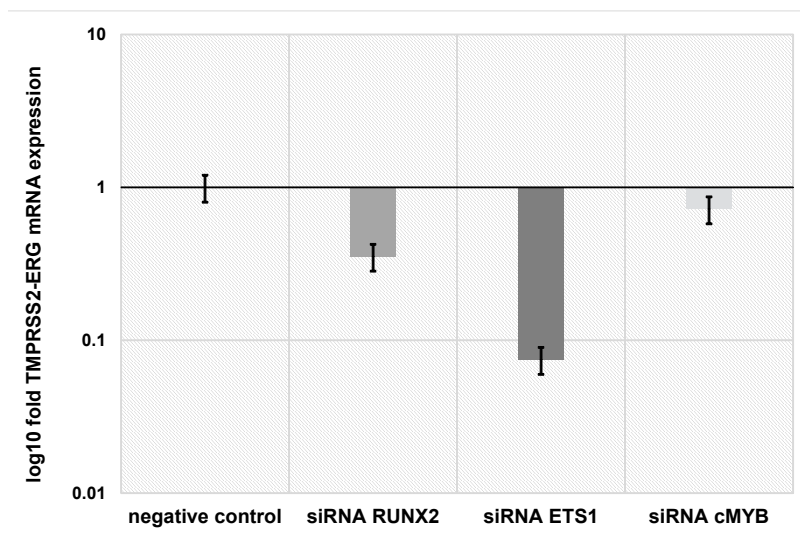
### Регулация на транскрипционните и протеинови продукти на онкологичната фузия TMPRSS2-ERG и на самостоятелните транскрипти на ERG от RUNX2, ETS1, c-MYB в клетъчен модел на простатен карцином (VCaP)

В настоящото изследване бе анализирана експресията на транскриптите на TMPRSS2-ERG и на ERG, в следствие генното заглушаване на *RUNX2*, *ETS1* и *MYB* в VCaP клетки, чрез провеждането на обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция.

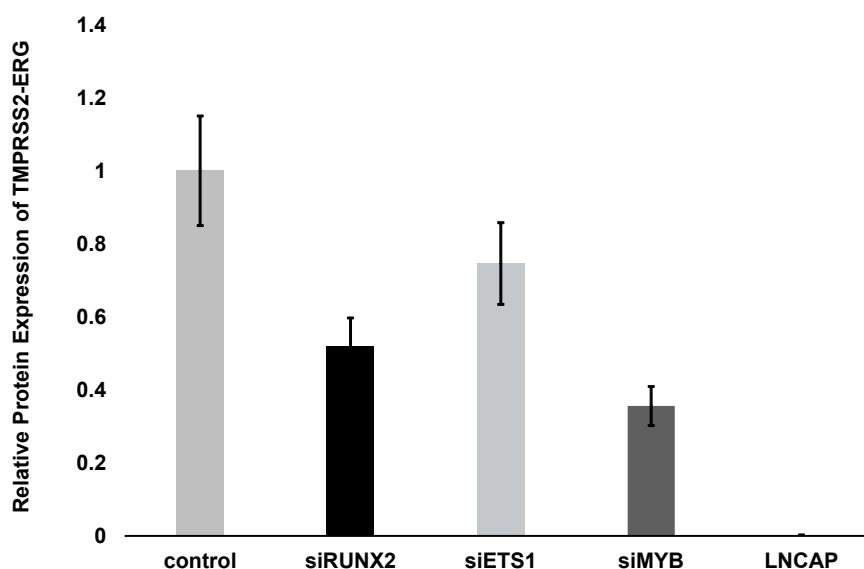
Получените резултати показаха, че заглушаването на *RUNX2*, *ETS1* и *MYB* води до потискане на транскрипцията на онкофузионният феномен TMPRSS2-ERG, като бе установена промяна със значително намаляване на неговите иРНК нива (Фиг. 35).

С помощта на новият разработен метод бе проследена протеиновата експресия на онкофузионната форма TMPRSS2-ERG в клетъчен модел на простатен карцином (VCaP), след генното заглушаване на *RUNX2*, *ETS1* и *MYB*. За отрицателна контрола бяха използвани трансфектирани с нетаргетиращи интерфериращи РНК-и VCaP клетки, както и несъдържащи фузията LNCaP клетки.

Бе установено понижаване на експресията на TMPRSS2-ERG след потискане на транскрипционните фактори *RUNX2* (~40%), *ETS1* (~20-25 %) и *MYB* (~60 %) (Фиг. 36).

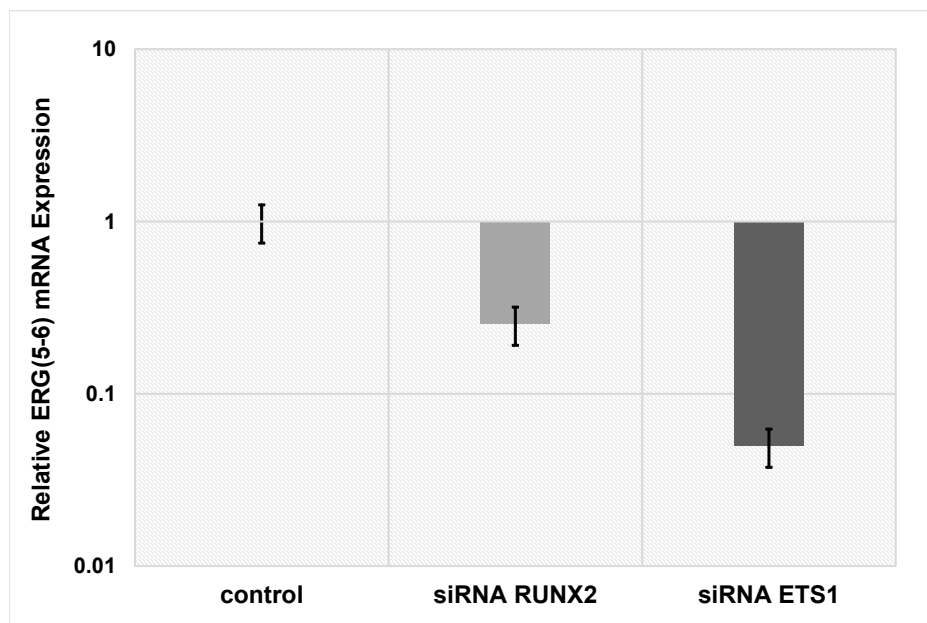


**Фигура 35.** RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на TMPRSS2-ERG в VCaP клетки, след трансфекция със siRNAs специфично заглушаващи *RUNX2*, *ETS1* или *MYB*. Броят цикли е нормализиран към PGK1 (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ Ct). qPCR данните са представени като относителна промяна, нормализирани към нетаргетиращите контроли в log<sub>10</sub> скала.



**Фигура 36.** Резултати, получени с помощта на новия метод за детекция на протеиновия продукт на реаранжирания фузионен феномен TMPRSS2-ERG, в клетки от линията VCaP, трансфектирани със siRNA срещу *RUNX2*, *ETS1*, *cMYB*. LNCaP клетки са използвани като негативна контрола. Данните са представени като относителна експресия на TMPRSS2-ERG в експерименталните условия, спрямо средната им експресия в трансфектирани с nonsens siRNA VCaP клетки, където тази експресия е 100 %.

Бе анализирана и експресията на транскрипционен фактор *ERG* в клетки *VCaP* след генно заглушаване на *RUNX2* и *ETS1*. Установеното бе сигнификантно потискане на транскриптите на *ERG* (Фиг. 37).

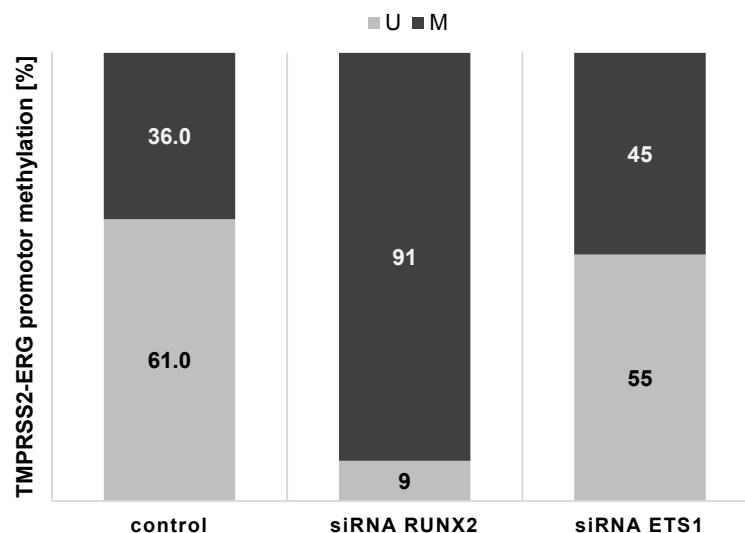


Фигура 37. RT-qPCR за отчитане на експресионните нива на *ERG* в клетки *VCaP*, след трансфекция със siRNA специфично заглушаваща *RUNX2* или *ETS1*. Броят цикли е нормализиран към *PGK1* (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ Ct). RT-qPCR данните са представени като относителна промяна, нормализирани към нетаргетиращите контроли в log<sub>10</sub> скала.

### Участие на главните транскрипционни фактори *RUNX2* и *ETS1* в метилирането на промотора на *TMPRSS2-ERG* в клетъчен модел на простатен карцином

За установяване на промените в нивата на ДНК метилиране на промотора на *TMPRSS2-ERG* в резултат от експресията на транскрипционните фактори *RUNX2* и *ETS1*, клетъчната линия *VCaP* бе трансфектирана с негативна нетаргетираща контрола и интерфериращи РНК-и за *RUNX2* и *ETS1*, и бе проведена полимеразно-верижна реакция с две двойки праймери за напълно метилиран и напълно неметилиран CpG остров в промотора на *TMPRSS2-ERG*.

При генното заглушаване на *RUNX2* чрез интерферираща РНК, нивото на ДНК метилиране на промотора от 36% нараства на 91%, т.е. бе наблюдавано хиперметилиране на промотора. При генното заглушаване на *ETS1* бе установено увеличаване на нивото на ДНК метилиране на промотора на *TMPRSS2-ERG* от 36% до 45% при *VCaP* клетъчната линия (Фиг. 38).

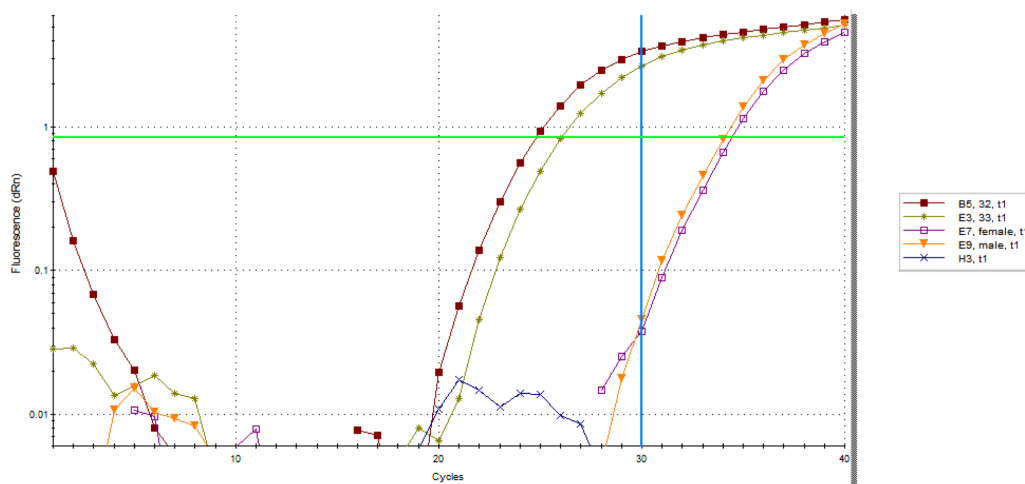


**Фигура 38.** RT-qPCR с метилационно специфични праймери и бисулфидно конвертиране на промотора на TMPRSS2-ERG. Клетките са трансфектирани със siRNA срещу RUNX2, ETS1 или негативна siRNA. Нивата на експресия са представени като проценти съотношение на метилирана и неметилирана версия на промотора.

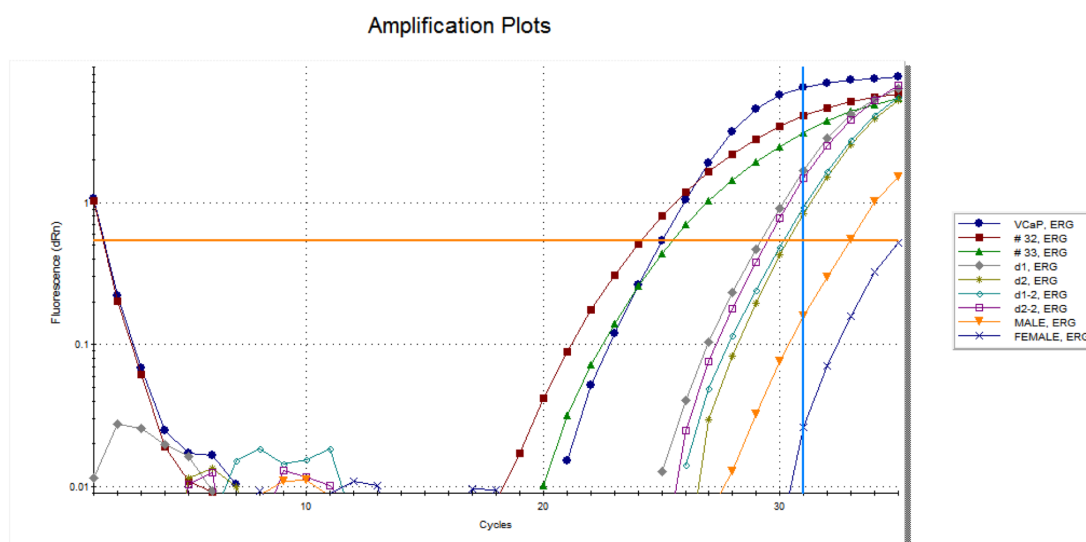
### **Откриване на транскрипти на онкофузия TMPRSS2-ERG и фактор ERG в серуми от пациенти с простатен карцином в напреднал стадий**

В настоящият дисертационен труд бе проследена генната експресия на онкофузионният феномен TMPRSS2-ERG и на транскрипционният фактор ERG в серуми от пациенти с диагностициран простатен карцином в напреднал стадий (n=35) чрез провеждане на обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция. Бяха използвани серуми от здрави мъже и жени като отрицателни контроли, както и лизати от простатно-карциномните LNCaP клетки, които не експресират онкофузионният феномен. Като положителна контрола бе използвана, съдържащата онкофузионен феномен простатно-карциномна клетъчна линия VCaP. От серумите и клетъчните лизати бе изолирана РНК, която послужи за изграждане на копиДНК. В полимеразно-верижната реакция отново бяха използвани специфичните праймерни двойки на TMPRSS2-ERG и на ERG. Представени са амплификационни и дисоциационни криви на TMPRSS2-ERG. Праймерните двойки, амплифициращи TMPRSS2-ERG дават специфичен продукт при амплификация под 30 цикъл (26-28 цикъл). Продуктите от амплификация след 30 цикъл се приемат за неспецифичен амплификационен феномен. Така например, серумите на здравите донори – мъже и жени са негативни (Фиг. 39).

Степента на амплификация на TMPRSS2-ERG, оценена по прага  $C_T$  (колкото на по-късен цикъл на амплификация се достигне до този праг толкова по-малък е броя на транскриптите в пробата) при случаите на серуми, получени от пациенти с карцином на простатата, бе по-голяма в порядъци в сравнение със степента на амплификация на серумите от здрави мъже и жени.



**Фигура 39.** Амплификационни крива на стандартен RT-qPCR за определяне нивата на транскриптите на TMPRSS2-ERG, детектирани с праймерна двойка специфична за вариант 1 (t1) на фузията в серуми от пациенти с простатен карцином. Като пример са представени пациенти с номера 32 и 33, както и негативни контроли - клинично здрави донори мъже и жени. H3 е отрицателна контрола, в която няма ДНК матрица.

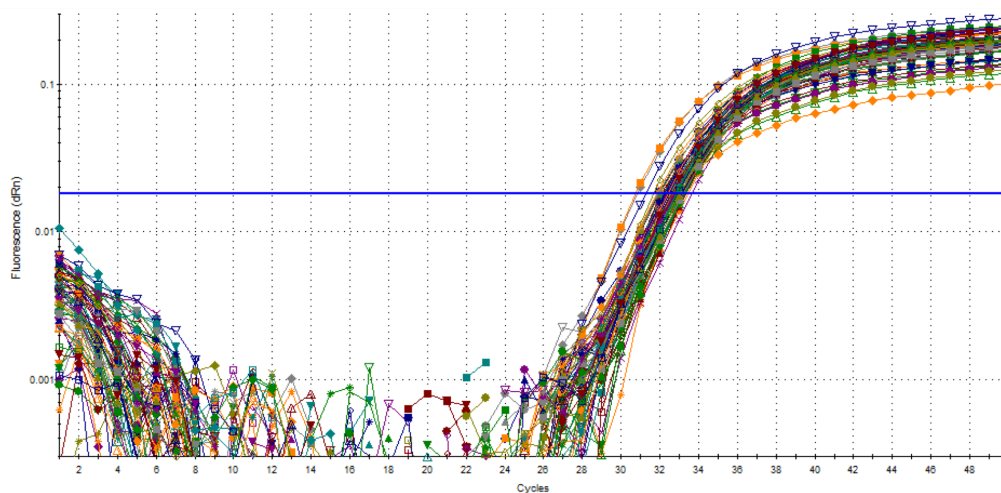


**Фигура 40.** Криви на амплификация на *ERG* при серуми от пациенти с простатен карцином и при серуми от здрави донори; позитивна контрола – VCaP клетки.

Степента на амплификация на *ERG* бе по-малка при пробите, получени от серуми от здрави мъже и жени, докато при случаите на серуми, получени от пациенти с карцином на простатата, степента на амплификация бе по-голяма в порядъци (Фиг. 40). Най-голяма степен на амплификация бе установена при позитивната контрола – VCaP клетки. Най-ниска степен на амплификация бе детектирана при серумите от здрави жени.

### Използване на метод за детекция на онкопротеин TMPRSS2-ERG за оценка на количеството протеин в серуми от пациенти с диагностициран простатен карцином в напреднал стадий

Серуми от пациенти с диагностициран простатен карцином в напреднал стадий бяха използвани за детекция на TMPRSS2-ERG чрез използване на разработеният нов метод (Фиг. 41).



Фигура 41. Амплификационни криви, получени при стъпка 2 от метода за детекция на TMPRSS2-ERG протеин. Анализирани са серуми от здрави донори - мъж, жена, серуми от мъже с поставена диагноза простатен карцином (n=35) в относително напреднал стадий. Лизатите на VCaP и LNCaP са разреждени от 1 до 1:10<sup>-11</sup>.

Протеиновият продукт на реаранжирания фузионен феномен TMPRSS2-ERG в серуми от пациенти (n=35) на възраст 60-80 години с поставена диагноза простатен карцином в напреднал стадий имаше висока вариация, като позитивни за функционален TMPRSS2-ERG протеин бяха под половината от пациентите. Клетъчните лизати от VCaP линията бяха използвани като позитивна контрола, клетъчните лизати от линията LNCaP и серуми от здрави мъже и жени бяха използвани като отрицателни контроли.

При сравняване на данните за експресия на TMPRSS2-ERG протеина, с тези за експресия на неговия транскрипт не бе установена корелация. Това показва предимството на определянето на



протеиновата експресия и хетерогенността на фузиите и дължината на техните секвенции.

Допълнително бе изготвен статистически анализ за относителната експресия на ERG транскрипти в същите серуми от пациенти и здрави донори.

Анализът на данните от пациентите показва, че 31 % от пациентите имат пълно съответствие на наличие на експресия на TMPRSS2-ERG транскрипт с транскрипти на EGR.

Всички пациенти бяха позитивни за поне едната форма на ERG.

При двама пациенти не се откри експресия на TMPRSS2-ERG транскрипт, както и на протеинов еквивалент. При същите пациенти се откри много висока експресия на ERG.

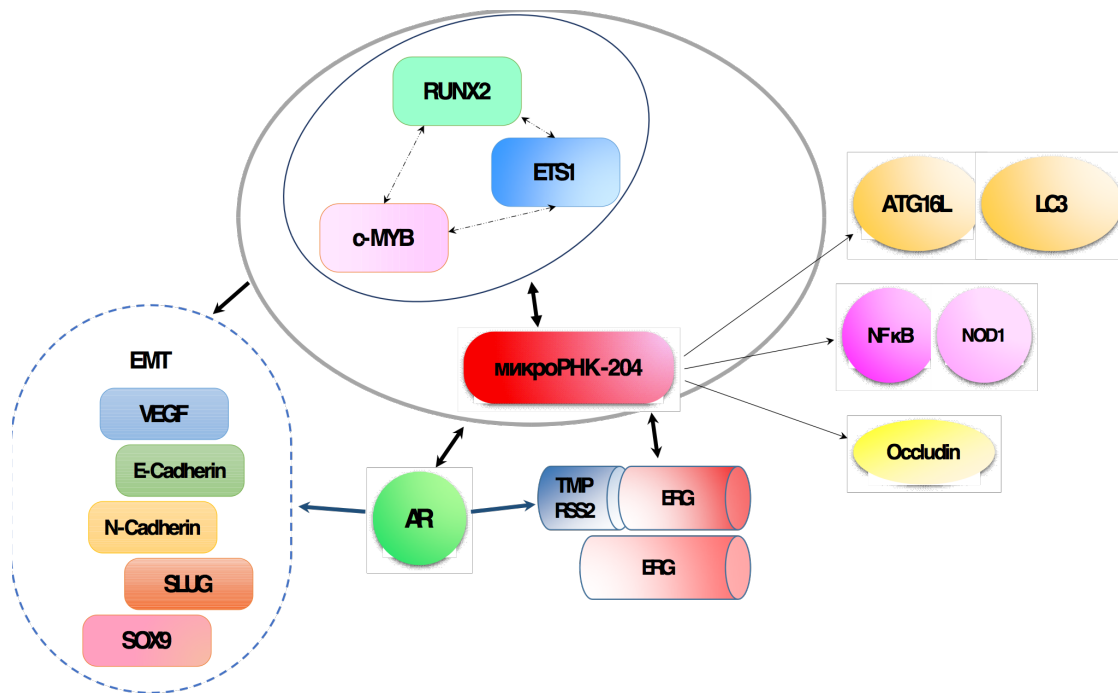
От направените изследвания става ясно, че пациентите могат да се стратифицират в две групи:

1. експресиращи TMPRSS2-ERG транскрипт и протеин;
2. експресиращи само TMPRSS2-ERG транскрипт.

## **V. Модел на генно-регулаторни взаимоотношения с участието на микроРНК-204 в карцином на простата**

Въз основа на получените резултати в настоящият дисертационен труд, бе направена схема, показваща генно-регулаторните взаимодействия между микроРНК-204, главните транскрипционни фактори (RUNX2, c-MYB, ETS1), онкофузионният феномен TMPRSS2-ERG, транскрипционният фактор и маркер ERG, андрогенният рецептор и молекули, участващи в епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином (SLUG, SOX9, VEGF, E-cadherin, N-cadherin).

В схемата е представена взаимовръзка между микроРНК-204 и молекули, включени в инфламаторните (NF $\kappa$ B, NOD1), автофагоцитозните (ATG16L, LC3) и междуклетъчните (Occludin) взаимодействия (Фиг. 42).



Фигура 42. Схема на генно-регулаторните взаимодействия между микроРНК-204, главните транскрипционни фактори (RUNX2, c-MYB, ETS1), онкофузионните протеини TMPRSS2-ERG, андрогенния рецептор и молекули, участващи в епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином; представена е взаимовръзка между микроРНК-204 и молекули, включени в инфламаторните, автофагоцитозните и междуклетъчните взаимодействия.

## VII. ДИСКУСИЯ

В настоящата дисертация бе изследвана регулаторната мрежа между микроРНК-204 и някои транскрипционни фактори, важни за развитието на злокачествените процеси и EMT в модели на комерсиално създадени метастазиращи клетъчни линии. Установена бе трансформацията в супресорен ефект на микроРНК-204 по време на прогресията към злокачествен фенотип в клетъчни линии, носещи допълнително увеличаващи малигнизацията фузионни мутации. Фокусът на изследването бе върху слабо изследваната микроРНК-204, т.к. тази микроРНК има дуалистична роля в процесите, засягащи туморогенезата. Амплифицирането на геномният регион асоцииран с микроРНК-204 е свързан с простатен карцином, предполагайки ролята на тази микроРНК в туморната прогресия.

В настоящите изследвания бе установено, че експресията на микроРНК-204 бе значително по-висока в VCaP и H660, в сравнение с LNCaP и PC3 клетъчни линии. Изключително интересен е феноментът, който се наблюдава при клетъчните линии VCaP и H660, носители на TMPRSS2-ERG, със свръх-експресията на микроРНК-204. Тъй като

ERG принадлежи към семейството на ETS молекулите, които са изключително важни за ЕМТ и метастазирането, бе поставен въпроса, дали други транскрипционни фактори, включени в туморогенезата също биха въздействали върху диференциалната експресия на микроРНК-204. В настоящият дисертационен труд бе установено, че експресията на ETS1 беше зависима от микроРНК-204. Наблюдавана бе силна негативна корелация между микроРНК-204 и транскрипционните и протеиновите базални нива на експресия на ETS1 в четирите изследвани клетъчни линии. Бе установена свръх-експресия на ETS1 транскрипт и протеин със значим характер след специфично инхибиране на микроРНК-204, предполагайки репресорната функция върху ETS1 от страна на тази микроРНК. Бе доказана формирана негативната обратна връзка. Това дава основание да се смята, че микроРНК-204 може да играе роля на онкомирна в простатната канцерогенеза, като индиректен ETS1 репресор, стимулиран от самият ETS1. Открито е, че ETS1 също свързва промотора на друг транскрипционен фактор, участващ в канцерогенезата - с-МΥВ, който първоначално е открит свръх-експресиран в някои простатно-карциномни клетъчни линии, като LNCaP, PC3, DU145, съгласно тяхната андрогенна чувствителност. В настоящото изследване бе установена, висока експресия на с-МΥВ в LNCaP и PC3, и сравнително потисната експресия в онокофузионните VCaP и H660 клетъчни линии, на транскрипционно и протеиново ниво. Използвайки транзиторно заглушаване бе установена позитивна обратна връзка между с-МΥВ и ETS1. Изключение имаше само за VCaP клетъчна линия (костно-мозъчна, онокофузионно позитивна) където туморно супресорният ETS1 протеин беше негативно регулиран от с-МΥВ. Установено беше, че реципрочната експресия бе заради взаимната регулация между с-МΥВ и микроРНК-204. Докато микроРНК-204 имаше потискащ ефект върху МΥВ иРНК във всички клетъчни линии, с-МΥВ протеина бе различно регулиран в зависимост от наличието или липсата на онокофузионен протеин. Още едно ниво на стратифициране бе разкрито като клетъчни линии, произхождащи от костно-мозъчни метастази и са позитивни за фузията, бяха напълно лишени от негативната регулация на микроРНК-204 върху с-МΥВ. Тази дисрегулация беше частично постигната вероятно чрез редуцираната деградация на с-МΥВ.

В настоящата дисертация бе изследван транскрипционният фактор RUNX2, който е патологично експресиран във високо метастатичен простатен карцином. Доказано е, че този фактор е от изключителна важност за развитието на метастазиращият простатен карцином в костната микросреда чрез *in vitro* и *in vivo* изследвания. Интересно е, че микроРНК-204 е открита да инхибира остеоблстната

диференциация в мишки, бидейки директен негативен регулатор на *Runx2* в миши костен мозък и мезенхимни прогениторни клетъчни линии. Настоящите изследвания представени в дисертационният труд показваха, че микроРНК-204 следва патогенно *RUNX2* таргетирано поведение в *TMPRSS2-ERG* онкофузионните позитивни клетки (*VCaP*), като тази микроРНК е способна да потиска *RUNX2* иРНК транскрипти, но не и протеинова експресия. Изненадващо, *RUNX2* протеина беше свръх-регулиран съгласно микроРНК-204 екзогенната модулация (мимик или инхибитор) в *VCaP* клетки. Това би обяснило променената иРНК и протеинова деградираща кинетика. Един от изводите направени е, че негативната регулация на микроРНК-204 върху *RUNX2*, която е открита при нормални клетки е заменена с дерегулация на цикъла микроРНК-204 — *RUNX2*. Свръх-експресията на *RUNX2* е най-силно изразена при *TMPRSS2-ERG* онкофузионно позитивните клетъчни линии, съгласно изкуствено индуцираната промяна при микроРНК-204.

Тъй като в настоящата дисертация бе открито, че *RUNX2* може позитивно да регулира микроРНК-204, описаното по-горе избягване от рестриктивната регулация на микроРНК-204 вероятно е механизъм, който осигурява предимство при преживяване на метастатичните клетки, дължащо се на свръх-експресията на *RUNX2*. Установеният феномен, при който за собствената експресия на *RUNX2* се изисква наличие на с-МҮВ в клетъчни линии, произхождащи от метастази на лимфен възел, допълнително подсилва хипотезата за важността на този транскрипционен фактор, т.к. позитивните за *TMPRSS2-ERG* фузия линии, произхождащи от костно-мозъчни метастази, избягват дори това изискване. Настоящите данни подсказват, че инхибирането на микроРНК-204 води до свръх-експресия на *RUNX2* в клетъчни линии от костно-мозъчен метастатичен произход. МикроРНК-204 потискането води до намалена или непроменена експресия на *RUNX2* в клетъчните линии от лимфно-възловият метастатичен произход. Изкуственото увеличаване на нивата на микроРНК-204 доведе до значимо потискане на *RUNX2* в клетките с лимфно-възлов метастатичен произход. Същият феномен бе наблюдаван в *AR* позитивните костно-метастатични клетки - *VCaP*. Единствено *AR*-негативните костно-мозъчни метастатични клетки *PC3* показаха възходяща регулация на експресията на *RUNX2* след микроРНК-204 свръх-експресиране.

Установено е, че *AR* сигналинг е изключително важен за действието на *RUNX2*, като регулира и предпазва *RUNX2* индуцирана туморно-развиваща се гена индукция. Доказано е, че *AR* директно предпазва *RUNX2* от свързване към ДНК промоторите на неговите таргетни гени, обратно на преканцерозното действие на *RUNX2*.

Следователно, дехидротестостероновите инхибитори, потискащи андрогенният сигналинг, са били способни да увеличат нивата на RUNX2 в AR позитивните клетки като LNCaP. Базирайки се на гореспоменатите събития, в настоящият труд бе изказано предположение, че съществува регулаторна мрежа, която помага на RUNX2, с тенденция да потиска AR сигналинг. В подкрепа на тази теза в настоящият дисертационен труд бе открито, че RUNX2 нивата са значително увеличени в PC3 клетки, където AR функционален протеин е загубен. Следователно, микроРНК-204 мимик не е способен да редуцира RUNX2 в PC3 клетки, където AR протеин е липсващ, докато във VCaP клетки AR протеин съществува и микроРНК-204 мимик е в състояние да редуцира RUNX2. Интересно, докато RUNX2 иРНК може да е свръх-експресирана в PC3 клетки, RUNX2 протеиновите нива бяха всъщност под рестриктивен контрол, намалени от модулацията на микроРНК-204. Този контрол е вероятно заради микроРНК-204 упражняваната диференциална модулация от убиквитиниращите пътища в AR позитивните спрямо негативните клетъчни линии. В TMPRSS2-ERG-фузионните клетъчни линии, RUNX2 протеина е високо регулиран, съгласно модулацията на микроРНК-204. Следователно микроРНК-204 придобива индиректен модулаторен ефект върху RUNX2 чрез комплексната регулаторна мрежа, като са избегнати ефектите на промяна в експресионните нива на микроРНК-204.

Изследвайки важноста за карциново асоцираната хиперметилация на изследваните регулаторни мрежи, в настоящият труд бе установено, че хиперметилационният статус е с основно значение за нормалната експресия на микроРНК-204, т.к. тоталното химическо деметилиране на ДНК намалява експресията на микроРНК-204 до 10 хиляди пъти. Интересно, този ефект макар и по-слаб все още се запазва сигнификантен и в линиите, съдържащи TMPRSS2-ERG фузия. Настоящите данни налагат извода, че хиперметилацията допринася също и за намаляване на експресията на тумор-супресияният фактор ETS1 в простатно-карциномните линии.

Фамилията транскрипционни фактори MYB има ефект противоположен на този на тумор-супресияните протеини E2F2-RBF в епигенетичната регулация на гените, критични за преминаването във фаза G2/M на клетъчния цикъл. От данни, представени в дисертацията се вижда, че хиперметилацията е основополагащ механизъм за експресията на с-MYB. Хиперметилацията бе необходима за свръх-експресията на с-MYB в метастази от лимфен възел, докато тя служеше като рестриктивен механизъм по отношение на с-MYB експресията при костно-мозъчни метастази.

Поради ограниченото количество изследвания и дуалистичното поведение на микроРНК-204, бе в интерес на научните изследвания да се проследи модулиращият ефект микроРНК-204 върху молекули важни за ЕМТ като SLUG, E-кадхерин и N-кадхерин.

Сврѣх-експресията на микроРНК-204 засяга различно експресионните нива на E-Cadherin и N-Cadherin в зависимост от нивата на геномна увреда на клетъчните модели за простатен карцином. В настоящото изследване бе открито, че E-Cadherin бе сврѣх-регулиран в LNCaP клетки и потиснат в останалите клетъчни линии, докато N-Cadherin бе сврѣх-регулиран във всички клетъчни линии след трансфекция с микроРНК-204 мимик. E-Cadherin е низходящо регулиран, докато N-cadherin е възходящо регулиран по време на ЕМТ. Диференциалната регулация на E-Cadherin от микроРНК-204 в LNCaP клетки вероятно зависи от превключването на сплайсинг вариантите. Това алтернативно свързване може да обясни потискането на E-Cadherin по време на развитието на рака и метастазите и може да се окаже допълнителна подкрепа за разликите в потискащият ефект на микроРНК-204, оказван в простатно-карциномните клетъчни линии, обсъдени по-горе.

SOX-9 бе възходящо регулиран от микроРНК-204 във всички клетъчни линии, докато SOX9 низходящата регулация от микроРНК-204 инхибиране бе загубено в клетъчните линии, носители на фузионния онкопротеин. Значението на микроРНК-204 дава отражение върху контрола над Sox9 и е свързано с намирането на ролята на Sox9 като императив за ранното развитие на простатата и карцинома на простатата, както стана ясно от изследвания с неговото заличаване/делетиране. Нещо повече, SOX9 е намерен като критичен ефектор на ERG в TMPRSS2-ERG фюжън-положителни простатно-карциномни линии като VCaP. Тѣй като ERG е сврѣх-експресиран в тези клетки, и ERG пренасочва AR до набор от гени, включително SOX9, които не са обикновено андроген стимулирани. Това допълнително подкрепя дерегулиращата роля на микроРНК-204 в развитието на рака.

Един от основните фактори, участващи в ангиогенезата на туморите и в ЕМТ, е VEGFA. Интересно бе да се проследи ролята на микроРНК-204 в транскрипционната експресия на VEGFA, тѣй като много метастази секретират VEGFA да произвежда неоваскуларизация. Данните от настоящото изследване показаха, че микроРНК-204 модулира VEGFA в зависимост от AR-чувствителност. Тя регулираше в низходящ ред VEGFA в LNCaP и VCaP клетки и регулираше положително VEGFA в устойчиви на кастрация клетъчни линии като PC3 и H660. Инхибирането на микроРНК-204 имаше реципрочен ефект върху VEGFA транскриптите. Тази микроРНК е известна с

регулирането на васкуларизацията в роговицата чрез инхибиране на Angiopoetin-1 и също така играе съществена роля в белодробна артериална хипертония, където се регулира низходящо.

Резултатите от настоящото изследване показаха, че главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS1 и c-MYB са необходими за експресията на SLUG в клетъчните линии, които не са носители на онкофузионният протеин (LNCaP и PC3). Известно е, че SLUG *in vivo* се свързва за промоторите на Runx2 и Sox9 гените, като по този начин действа като позитивен и респективно негативен регулатор на тези гени. По настоящем бе проследено как главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS1 и c-MYB, свързани с EMT са участвали в карциногенезата на простатната жлеза. Тъй като Slug е доказан да регулира положително RUNX2, в настоящият труд бе проследен обратния път на взаимодействие, а именно, как RUNX2 повлиява нивата на SLUG. Резултатите показаха, че SLUG се регулира низходящо след RUNX2 генно-заглушителна трансфекция във всички четири клетъчни линии, което доказва, че е налице положителна обратна връзка между RUNX2 и SLUG. Всъщност, последните литературни данни показват, че RUNX2 е в състояние да се свързва с AR и да го отделя от неговите целеви гени като някои туморни супресори, но в същото време, двата фактора заедно, RUNX2 и AR, са в състояние да свържат “enhancer” региона и това да доведе до увеличена инвазивност.

За развитието на геномните увреди и препограмирането на сигналните пътища, съпътстващи канцерогенезата важно участие има инфламаторният и генотоксичен сигналинг. Резултатите от настоящият дисертационен труд показват важността на тези молекули не само като ефекторни молекули при метастазирането, но и като част от комплекс с обратни взаимодействия, които обикновено са много сложни и включването на микроРНК-и, играещи ролята на допълнителни модулатори с регулаторна мултифункционална роля. Участието на микроРНК-204 в регулацията на NFκB обединява нейните ефекти относно метастазирането с инфламаторния сигналинг, което повдига въпроса дали има и механистична връзка с андрогенния сигналинг. Настоящите данни предполагат, че вродения имунен сигналинг и в частичност NOD1, са ефективни модулатори на съдбата на метастатичните карциномни клетки в простатата, в посока оцеляване и трансформация към по-високо метастатичен фенотип. Друг свързан и с инфламаторния сигналинг и с канцерогенезата феомен, какъвто е автофагоцитозата, също бе модулиран от микроРНК-204. Активираният от микроРНК-204 или от индуцирането на пътища на вродения имунитет (чрез NOD1), автофагоцитозен път в LNCaP подсказва, че тези метастази в лимфните възли ще бъдат по-

възприемчиви към лечението с инхибитори на mTOR (сигнална молекула от пътя за активиране на автофагоцитоза) в сравнение с РС3 клетки (костни метастази), в които процеса на автофагоцитоза е "изключен".

МикроРНК-ите са директни медиатори на андрогенната рецептивност и тяхната модулиция на сигналните пътища на ДНК увреда, клетъчна смърт и оцеляване показват регулаторната комплексност на мъжката репродуктивна система. В този контекст, микроРНК дерегулацията може да има дълбок смисъл и акцентира на значимостта за маркерна селекция за диагностика, прогностика и терапия.

В настоящият дисертационен труд бе установено, че микроРНК-204 е способна да модулира ефекта на някои важни регулатори на ДНК метилирането и AR сигналинг, както и да регулира експресията и промоторното метилиране при андрогенния рецептор и фузионния ген TMPRSS2-ERG. Бяха изследвани паралелно и промените в секреторната колона и подлежащите ѝ базални клетки в простатната жлеза с маркери за онкогенеза, проследявайки промените от преканцерозно към карицнома "*in situ*" състояние. При p63 негативните базални клетки, губещи способността си да поддържат простатната диференциационна програма, бе наблюдавана трансформация към карциномни стволово-подобни клетки. На молекулно ниво, репресията на AR от TMPRSS2-ERG може да предостави злокачествен селекционен натиск, който да допринесе за рекуренция на туморите, чрез амплифициране на AR. TMPRSS2-ERG играе много важна роля в развитието на простатният карцином, чрез разрушаване на програмата за диференциация на AR-специфични клетъчни редове в простатата и благоприятства EZH2-медираното клетъчно дедиференциране. В допълнение, чрез инхибиране на AR сигнализация, TMPRSS2-ERG може селективно да оказва натиск за развитието на простатният карцином, който е резистентен към хормон-депривационна терапия. От друга страна, преди достигане до андрогенна рефрактерност, именно AR активира промотора на TMPRSS2-ERG, потенцирайки неговите про-онкогенни действия. Изхождайки от предпоставката, че всяка ефекторна клетка е възникнала от прогениторна/стволова клетка, в настоящият дисертационен труд бе показано, че секреторната колона еволюира от своя прогениторен базоцелуларен слой, т.е., че секреторната колона е продукт на пролиферация и диференциация на базалните клетки. Ето защо, в настоящото проучване се изказва хипотезата, че ако настъпи повреда в базалните стволови клетки, то тя ще продължи да пропагира към повърхностните слоеве на потомството (секреторните клетки). Бе предложена хипотезата, че именно тези базални клетки тип I са



вероятно първите клетки, които претърпяват изменения, вероятно водещи до последващите туморогенни промени. Тези промени водят до загуба на експресията на GSTP1 и p63, което е свързано с намалена защита на ДНК срещу увреда и повишена вероятност от неопластична трансформация на базалните клетки. Сходството на маркерните експресионни профили и локализация на базалните клетки тип I, прави правдоподобно очакването тези клетки да бъдат евентуално предполагаемите човешки простатно карциномни стволови клетки, от които възникват простатна интраепителна неоплазия и простатен карцином, и които при простатна интраепителна неоплазия вероятно съдържат TMPRSS2-ERG.

В патологичната практика от едва няколко години се изследва ERG, но не съществуваше метод за детекцията на формите на генно реаранжиране в хромозома 21, при които се получават функционално навити “*in frame*” TMPRSS2-ERG мутанти. Поради възможността да възникнат и множество некодиращи мутанти с минимално значение за канцерогенезата, в този труд бе разработен метод за откриване на протеиновият продукт на тази патологично формирана само в клетки от карцином на простатата генна фузия. Методът за детекция на протеиновата експресия на TMPRSS2-ERG може да бъде използван за оценка на нивата на функционален протеин на генната фузия TMPRSS2-ERG при експериментална работа с клетъчни линии, носители на фузията, както и в материал, получен от биологични течности (серум, урина) и/или тъкани (простатна биопсия). Разработеният диагностичен метод би позволил положителните за TMPRSS2-ERG функционален протеин пациенти да бъдат лекувани с терапия насочена към най-агресивните форми на простатен карцином (химиотерапия), докато пациенти, позитивни за онко-фузията на RT-qPCR, но негативни по предлаганият метод да бъдат лекувани по конвенционалните схеми (андроген депривационна терапия и др.).

В заключение, този научен труд допринася за изясняване ролята и механизмите, свързани с един от аспектите на епигенетичната регулация - некодиращите микроРНК-и в простатната канцерогенеза и транслира фундаменталните им прояви в сигналинга на транскрипционните фактори, автофагоцитозата и инфламаторния сигналинг към регулацията на андрогенния рецептор и онкофузионните генни реаранжименти към патолого-морфологичните и клинично-лабораторни манифестации на прогресията на простатния карцином с цел стратификация на пациентите и предоставяне на възможности за нови стратегии за персонализирано лечение.

## ИЗВОДИ

1. Установените функционални вътрешни зависимости в генно-регулаторната мрежа между микроРНК-204 и главните транскрипционни фактори - RUNX2, ETS, MYB са със значение за малигнената трансформация при простатен карцином.
2. Установен е ефекта на модулиране на генно-регулаторната мрежа (микроРНК-204 – RUNX2, ETS, MYB) върху процеса на епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином.
3. Доказана е взаимовръзката между възникващият в малигнизиращи простатни карциноми фузионен онкопротеин TMPRSS2–ERG и установената генно-регулаторна мрежа (микроРНК-204 — RUNX2, ETS, MYB) и ключови елементи на андроген-рецепторния сигналинг.
4. Открит в механизъм, по който микроРНК-204 свързва вродения имунен сигналинг и хроничното възпаление с модулацията на сигналинга на андрогенния рецептор.
5. Установено е, че микроРНК-204 повлиява метилази, регулиращи активността на андрогенният рецептор и повлиява онкофузионният протеин TMPRSS2–ERG, като регулира метилирането на промотора му.
6. Направен е сравнителен анализ на експресионният профил на TMPRSS2–ERG, установен в серумите от пациенти с простатен карцином на транскрипционно и протеиново ниво и взаимовръзка с експресията на ERG в същите серуми. По този начин установената TMPRSS2–ERG експресия на протеиново ниво подпомага суб-селекцията на пациенти, които са най-застрашени от развитие на андрогенна резистентност.
7. Количественото профилиране на секреторните колони по маркери за геномна протекция и геномна увреда (AMACR, COX-2, GSTP1) и подлежащите им базални клетки, с отчитане на нарушенията в линейността на базалният слой (по р63), позволява да се проследи техният клетъчен ред и показва, че началните стадии на простатната канцерогенеза започват точно от процеса на простатна атрофия чрез трансформация на базалните клетки в неопластични. Това позволява обективното разграничаване на възникващите карцинома “in situ” от състояние на преканцероза.

## ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Установено е, че микроРНК-204 губи рестриктивните си свойства по отношение на онкогенни транскрипционни фактори и участва в потискането на онкофузионният продукт TMPRSS2–ERG, както и води до препрограмиране на андроген рецепторният сигналинг с промяна на част от неговите прицелни гени.
2. Установено е, че някои от ефектите на микроРНК-204 за регулация на андроген - рецепторният сигналинг и експресията на онкофузионният ген TMPRSS2–ERG са опосредствани чрез епигенетични механизми, като промяна в нивата на ДНК промоторно метилиране, промяна на ключови ДНК метилази, хистонова регулация и препрограмиране на убиквитинирането, свързано с транскрипционната регулация на андрогенния рецептор.
3. Установена е модулаторната роля на генно-регулаторната мрежа микроРНК-204 —RUNX2, ETS1, c-MYB върху процеса на епителомезенхимната трансформация при простатен карцином.
4. Установена е модулаторната роля на главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS1, c-MYB върху онкофузионният продукт TMPRSS2–ERG и андроген рецепторният сигналинг.
5. За оценка на метастатичният потенциал е анализирана онкофузията TMPRSS2–ERG в серуми от пациенти с простатен карцином на ниво иРНК. Направен е сравнителен анализ с данните за транскрипционният фактор ERG, получени от изследвания на същите серуми.
6. Създаден е аналитичен метод за детекция и количествена оценка на протеиновите продукти, само на тези генни реаранжировки, които водят до правилно функционално навити части на TMPRSS2 и ERG и биха имали функционална активност като транскрипционен фактор, с цел стратифициране на пациентите с най-висока вероятност за преминаване към андрогенна резистентност.
7. Изказана е хипотеза относно възможността простатно-карциномната инициация да започне от базалните прогениторни клетки на преканцерозни състояния на хронично възпаление, въз основа на загубата на гени, поддържащи епителната диференциация и характерни промени в количествените експресионни профили.

## НАУЧНИ ТРУДОВЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА (IF=23.509)

### КНИГИ:

1. **Krassimira Todorova** and Soren Hayrabedian. Handbook of Prostate Cancer Cell Research – Growth, Signaling and Survival. NOVA BIOMEDICAL. The Stem Cell Paradigm and Its Application to prostate Cancer – An Old and Young Idea. Chapter 3, 127-177., 2009. ISBN: 978-1-60741-954-9. (Published by Nova Science Publishers, Inc. New York)

### НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ (IF=11.476):

2. **Krassimira Todorova**, Metodi V. Metodiev, Gergana Metodieva, Diana Zasheva, Milcho Mincheff, and Soren Hayrabedian. miR-204 is Dysregulated in Metastatic Prostate Cancer In Vitro. MOLECULAR CARCINOGENESIS, 2015; Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com); IF = 4.77
3. **Krassimira Todorova**, Diana Zasheva, Kristiyan Kanev, and Soren Hayrabedian, “miR-204 Shifts the Epithelial to Mesenchymal Transition in Concert with the Transcription Factors RUNX2, ETS1, and cMYB in Prostate Cancer Cell Line Model,” Journal of Cancer Research, vol. 2014, Article ID 840906, 14 pages, 2014. doi: 10.1155/2014/840906
4. **Krassimira Todorova**, Diana Zasheva, Soren Hayrabedian. Innate Immunity Challenge Differently Modulates Inflammatory And Apoptosis Regulation In Lymph Node And Bone Marrow Metastatic Cell Line Models, Favouring Higher Metastatic Phenotype Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences Tome 67, No 11, 2014, 1575-1582; IF = 0.198
5. **Todorova, Krassimira**, Milcho Mincheff, Soren Hayrabedian, Jana Mincheva, Diana Zasheva, Aleksandar Kuzmanov, and Nelson Fernández. "Fundamental Role of microRNAs in Androgen-Dependent Male Reproductive Biology and Prostate Cancerogenesis." American Journal of Reproductive Immunology 69, no. 2 (2013): 100-104; IF = 2.668

6. Soren Hayrabedian, Milcho Mincheff, Diana Zasheva, Nelly Manolova, **Krassimira Todorova**. Autophagy Signalling Is Differentially Modulated By Mir-204 In Context Of Innate Immunity Induction. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences. Tome 66, No 1, 2013, 127-132; IF = 0.198
7. Soren Hayrabedian, **Krassimira Todorova**, Diana Zasheva, Daniela Moyankova, Desislava Georgieva, Jordana Todorova & Dimitar Djilianov Haberlea Rhodopensis has Potential as a New Drug Source Based on its Broad Biological Modalities, Biotechnology & Biotechnological Equipment, (2013) 27:1, 3553-3560; IF= 0.379
8. **Krassimira Todorova**, Milcho Mincheff, Diana Zasheva, Soren Hayrabedian. The Role Of Mir-204 And Nod1 Receptor In Prostate Cancer Inflammation Signalling Comptes Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences, (2012) 65 (12), pp. 1739-1744; IF= 0.210
9. **K. Todorova**, N. Manolova, D. Zasheva, S. Hayrabedian. A Relationship Between Microrna-204 And Occludin In Prostate Cancer Inflammation Signaling. Acta Medica Bulgarica, Vol. XXXIX, 2012, No 2, 23-28
10. A. Kuzmanov, S. Hayrabedian, M. Karaivanov, **K. Todorova**. Basal cell subpopulation as putative human prostate carcinoma stem cells. Folia Histochem Cytobiol. 2007, Vol. 45, N 2 pp 75-80; IF = 1.081
11. Karaivanov M\*, **Todorova K\***, Kuzmanov A, Hayrabedian S. Quantitative immunohistochemical detection of the molecular expression patterns in proliferative inflammatory atrophy. J Mol Histol. 2006. (**\*equal contribution with the first author**); IF = 1.972
12. **Todorova K.**, Hayrabedian S., Kuzmanov A. Karaivanov M. Kehayov I., Kyurkchiev S. Expression patterns of PsmA, COX-2, iNOS and GST in prostate carcinoma, adenoma and normal human tissues. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2006; Tome 59, N4, pp. 459-462
13. Karaivanov M., **Todorova K.**, Kuzmanov A., Hayrabedian S., Kehayov I., Kyurkchiev S. Immunohistochemical comparative analysis of the expression of p63, AMACR, COX-2 and GSTP1 in proliferative inflammatory atrophy, prostate intraepithelial neoplasia and prostate carcinoma: differential diagnosis and predicative significance. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2006; Tome 59, N8, pp. 885-889
14. Kuzmanov A., **Todorova K.**, Hayrabedian S., Karaivanov M., Kehayov I., Kyurkchiev S. Subpopulation of basal cell as putative human prostate carcinoma stem cells. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2006, Tome 59, N 12, pp 1327-1330

## **I. ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ:**

“МЕТОД И КИТ ЗА ОТКРИВАНЕ НА ОНКОФУЗИОНЕН ПРОТЕИН”, 2014

Заявител: ИБИР-БАН, Красимира Тодорова, Сорен Хайрабемян  
Изобретатели: доц. Красимира Тодорова, доц. Сорен Хайрабемян

## **II. Проект към МОН - ФНИ: ДМУ 03/27, 12.12.2011;**

**Ръководител д-р Красимира Тодорова-Хайрабемян**

“Генно-регулаторни мрежи, включващи микро РНКи, транскрипционни фактори и фузионни онкопротеини в простатната канцерогенеза, с диагностично и терапевтично приложение”

## **III. Научно-Изследователски Проекти:**

**1) 2005-2006г.; Медицински Университет, Плевен**

**Участник: д-р Красимира Тодорова-Хайрабемян**

“Сравнителен Анализ На Химичната Експресия На PSMA, P504S, P63, COX2, NOS При Пролиферативна Инфламаторна Атрофия, Простатна Интраепителна Неоплазия и Карцином: Диференциално-Диагностично и Предиктивно Значение”

**2) 2007г.; Медицински Университет, Плевен**

**Участник: д-р Красимира Тодорова-Хайрабемян**

“Изследвания на сентинелните лимфни възли в простатен карцином, използвайки имунохистохимични маркери – CK MNF 116 и PSAP за микрометастанозна детекция”

## **IV. Научно-образователни проекти:**

**2014-2015г.; ОП “Развитие на човешките ресурси” и Европейски Социален Фонд Проект “Студентски практики”**

**Участник: д-р Красимира Тодорова-Хайрабемян**

“Регулаторни взаимоотношения между специфични микроРНКи и транскрипционни фактори”

**УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С  
ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД (IF=12.033):**

1. **Todorova K**, Hayrabedian S. Genome disarrangement cell line models reveal an epigenetically driven miR-204 regulation of androgen receptor. EPICONCEPT Workshop 2014. Las Palmas, Spain 07 - 09 May 2014
2. Soren HAYRABEDYAN, **Krasimira TODOROVA**. Micro RNA Based Therapy of Cancer: Rationale, Current State of the Art and Future Perspectives. TOGETHER IN CANCER CONTROL: IMMUNOLOGY, VIRUSES, NATURAL REMEDIES. THE 8 -Th MEETING WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION - Hasumi foundation. PLEVEN 24-25.10. 2014 plenary lecture
3. **K. Todorova**, M. Mincheff, S. Hayrabedian. miR-204 Regulatory Interaction Network affect c-Myb Transcriptional Activation in Prostate Cancer Cell Line Model. Oncoimmunology - new horison. Hasumi founation. The 6-th meeting with international participation. 26-27.10.2012 Pleven Bulgaria plenary lecture
4. **Todorova K.**, Zasheva D.1, Manolova N., Mincheva J., Mincheff M., Hayrabedian S. MiR-204 and miR-15a regulative interaction of c-Myb transcriptional activation in prostate cancer cell lines. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2012, AmJReprod Immunology IF 3.317, oral presentation
5. **Todorova K.**, Zasheva D., Mincheva J., Mincheff M., Pashova Sh., Hayrabedian S. Does miR-204 play a role in inflammation signaling in prostate cancer cell lines? 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2012, AmJReprod Immunology IF 3.317

6. Hayrabedyan S., **Todorova K.**, Zasheva D., Moyankova D., Georgieva D., Todorova J., Mladenov P., Djilianov D. Anti-oxidative, genotoxic and inflammatory signaling modulation effects of *Haberlea rhodopensis* extract in prostate cancer. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2012, AmJReprod Immunology IF 3.317
7. Karaivanov M., **Todorova K.**, Hayrabedyan S. Immunohistochemical quantitative assessment of the expression of GSTP1, iNOS and COX-2 in PIA, PIN AND carcinoma in the prostate gland. 3rd Intercontinental Congress of Pathology, May 18- 21, 2008, Barcelona, Spain; Virchows Arch, 452(Suppl 1):S1–S286 (2008). ISSN: 0945-6317. IF – 2.082 – poster session
8. **Todorova K.**, M. Karaivanov, A. Kuzmanov, S. Hayrabedyan, I. Kehayov, S. Kyurkchiev. Immunohistochemical comparative analysis of the expression of AMACR and p63 in PIA, PIN and PCA: differential diagnosis and predicative significance. 11th International Symposium of Immunology of Reproduction. Varna, Bulgaria, June 2-4, 2006
9. Karaivanov M., A. Kuzmanov, **K. Todorova**, S. Hayrabedyan, I. Kehayov, S. Kyurkchiev. Oxydative stress in PIA, PIN and PCA – immunohistochemical study on the expression of GSTP1 and COX-2. 11th International Symposium of Immunology of Reproduction. Varna, Bulgaria, June 2-4, 2006
10. Karaivanov M., **K. Todorova**, S. Hayrabedyan, V. Ivanova, A. Kuzmanov, I. Kehayov, S. Kyurkchiev. Immunohistochemical quantitative assessment of the expression of GSTP1, iNOS and COX-2 in PIA, PIN and carcinoma in the prostate gland. IX National congress of pathology with international participants. 2-4 November 2006, Sofia, Bulgaria.
11. Karaivanov M., **K. Todorova**, S. Hayrabedyan, V. Ivanova, A. Kuzmanov, I. Kehayov, S. Kyurkchiev. Differential diagnosis and predicative significance of AMACR and p63 in PIA, PIN and prostate carcinoma. IX National congress of pathology with international participants. 2-4 November 2006, Sofia, Bulgaria.