

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. д-р Сорен Бохос Хайрабемян, дб

Роля на инфламазомната вродена имунна сигнализация за нарушаване на кръвно-тестисната бариера, като адаптивен механизъм, водещ до развитие на инфертилитет

Област на висше образование
4. Природни науки математика, информатика
Професионално направление 4.3. Биологични науки
Научна специалност Имунология"
Шифър на специалността 01.06.23

София, 2016г.

Дисертационният труд е написан на 283 страници, илюстриран е с 116 фигури и 4 таблици. В библиографският списък са цитирани 475 литературни източника.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 2016г. от.....часа в Института 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. д-р Сорен Бохос Хайрабемян, дб

Роля на инфламазомната вродена имунна сигнализация за нарушаване на кръвно-тестисната бариера, като адаптивен механизъм, водещ до развитие на инфертилитет

Област на висше образование
4. Природни науки математика, информатика
Професионално направление 4.3. Биологични науки
Научна специалност Имунология"
Шифър на специалността 01.06.23

София, 2016г.

Списък със съкращения

autophagy related 16-like 1, Atg16L1;
bone marrow derived dendritic cells, BMDC;
immortalized bone marrow-derived macrophage, iBMM;
D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid, iE-DAP;
Dicer-substrate RNA, DsiRNA;
differential interference contrast, DIC;
muramyl dipeptide, MDP;
median fluorescence intensity, MFI;
microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha, LC3;
NLR family, pyrin domain containing 3, NALP3;
NOD-like receptors, NLRs;
nucleotide-binding oligomerization domain containing 1, NOD1;
nucleotide-binding oligomerization domain containing 2, NOD2;
principal components, PC;
Principle Component Analysis, PCA;
three-dimensional, 3D;

УВОД

Според прогноза на ООН, през следващите 35 години най-тежък ще бъде демографският срив в България, с намаление на населението с почти 1/3. През този период се очаква компенсаторно увеличение на делът на децата до 14 години и редукия на делът на населението в трудоспособната възраст. На този фон, репродуктивното здраве е от особено значение, като при над 80% от случаите на репродуктивна патология се касае за проблеми в овулацията, фалопиевите тръби или от страна на сперматозоидите. Силно е нараснал процентът на мъжкия фактор на инфертилитет през последните години.

Проблеми в репродукцията имат около ¼ от мъжете и също толкова от жените. Епидемиологични данни показват, че мъжкия инфертилитет се свързва с последващо развитие на различни урологични патологии, включително и неоплазии. В настоящия момент не е въведен в световен мащаб клиничен стандарт за пълна оценка на имунния статус на пациента и свързани с това проблеми в репродуктивната му функция.

Имунологични фактори могат да въздействат върху всеки един от етапите на репродуктивния процес, като и при двата пола може да се наблюдава кръстосана имунизация на партньора, както и автоимунизация против компоненти на собствената полова система.

Автоимунизацията на мъжете по отношение на антигените на собствените тестиси и сперма също е една от възможните причини за стерилитет. При нормални условия в семенните каналчета кръвно-тестисна бариера създава имунологично толерантен компартмент, изолирайки зреещите сперматозоиди. Травматичното или инфламаторното увреждане на тестиса, както и пропагацията на инфламаторен отговор от простатата и семенните мехурчета или от половите пътища може да доведе до нарушаване на целостта на кръвно-тестисна бариера и развитието на автоимунен отговор с продукцията на хуморален и цитопатичен отговор.

Клетките на Сертоли изграждат част от семиниферните тубули и формират стволната ниша съхраняваща сперматогониите. Клетките на Сертоли управляват количеството и до голяма степен качеството на произвежданите сперматозоиди. Те образуват плътни контакти, които създават и поддържат кръвно-тестисната бариера, която на свой ред възпрепятства преминаването на чужди патогени от луменалното пространство на семиниферните тубули към базалната им част, защитавайки авто-антигените на клетките от герминативната линия от подлежащите имунокомпетентни клетки. Имунологичното разпознаване от страна на рецептори на вродената имунна система има основна роля в този случай. Вече съществуват изследвания при миши, плъши и човешки клетки на Сертоли за тяхната способност да експресират молекули – членове на семейството на Toll-like рецепторите. За разлика от тях, семейството на рецепторите на нуклеотид-свързващия олигомеризационен домейн, известно още като NOD-like рецептори (NLRs) е представено само от интрацелуларни цитоплазмни молекулни сензори на молекули свързани с наличието на патогени (PAMP), както и на ендогенни продукти на тъканна и клетъчна увреда (DAMP). NLR рецепторите са представени от две молекули - NOD1 и NOD2. Те се активират основно, чрез свързването и разпознаването на специфични муропептидни мотиви, които са представени в бактериалните пептидогликани. NOD1 разпознава присъствието на L-Ala- γ -D-Glu-m-диаминопимелинова киселина (m-DAP), аминокиселина характерна за повечето Грам-негативни и някои Грам-позитивни бактерии. NOD2 разпознава и директно свързва muramyl dipeptide (MDP), мотив представен в пептидогликаните и на двата вида – Грам-позитивните и Грам-негативните бактерии. При специфично свързване с лиганди на NOD1 и NOD2, съответните рецептори претърпяват конформационна промяна, олигомеризират, и взаимодействат с адаптерни протеини, които отключват специфичен клетъчен сигнален отговор.

Ефекторните молекули от NLR семейството са означени най-общо като инфламазомни платформени протеини, които действат като сензори на стрес и промотират асемблирането на инфламазомните комплекси. Така например, в макрофаги изолирани от костен мозък, както и в моноцити, се експресират олигомерните NOD-like рецептори, като NALP1 („*NACHT богат на левцинови повтори протеин 1*“), и подобния му NALP3. Тези професионални имунни клетки експресират и интрацелуларната протеаза $\text{IL-1}\beta$ -конвертиращ ензим, означена като каспаза-1. NALP протеините образуват мултипротеинови комплекси, които активират каспаза-1, която на свой ред срязва протеолитично неактивната про-форма на $\text{IL-1}\beta$ и води до секреция на зрял, активен инфламаторен цитокин. Наскоро парадигмата за изключителност на професионалните имунни клетки по отношение на инфламазомите бе променена, като бе демонстрирано, че човешки кератиноцити секретират $\text{IL-1}\beta$, след UV-индуцирана инфламазомна активация на каспаза-1. Този феномен подсказва, че зреещото на про- $\text{IL-1}\beta$ предизвикан от инфламазомата не е рестриктиран само до професионални антиген-представящи имунни клетки.

До момента само експресията на NOD1 рецептора е била потвърдена в плъши клетки на Сертоли. В настоящия момент в световната литература няма данни дали инфламазомни платформени протеини като NALP1 или NLRP3 са експресирани в миши клетки на Сертоли, и дали има функционални последици от това по отношение на активацията на каспаза-1 и про-инфламаторна цитокинова продукция. Поради

възможността повечето уропатогенни бактерии да експресират липополизахариди, както и iE-DAP или евентуално MDP, е необходимо да се провери хипотезата, относно възможността за формирането на инфламазома и нейното активиране в клетките на Сертоли. Това би могло да доведе до патогенен механизъм на обратна връзка, при който тези клетки, при имунно стимулиране биха могли да секретират инфламаторни цитокини - IL-1 β или IL-18, потенцирайки развитието на аутоимунно-базиран мъжки инфертилитет. Активацията на каспаза-1 би могла директно да допринесе за NOD-рецептор опосредствана клетъчна смърт, следвайки свързана с про-инфламаторен сигналинг форма на програмирана клетъчна смърт означена като пироптоза, придружена от цитокинова продукция, клетъчно подуване и клетъчно пръскане.

Клетките на Сертоли непрестанно фагоцитират дегенериращи герминативни клетки и резидуални телца по време на процеса на спермиация, и са показани като способни да функционират при определени условия като непрофесионални антиген-представящи клетки, обработващи и представящи антигени, процеси тясно обвързани с автофагоцитозата. Механизмите в основата на тази регулация са все още недобре изяснени. В допълнение към това, дефектни по отношение на процеса на автофагоцитоза макрофаги, лишени от молекулите LC3 („лека верига на асоцииран с микротубулите протеин 3“) или от beclin1, показват повишено освобождаване на IL-1 β или IL-18, което е опосредствано от инфламазома NALP3.

По тази причина е необходимо да се изследва функционалността на системата рецептори NOD/NALP инфламазома в клетките на Сертоли по отношение на нейното наличие, дали би функционирала като дву-стъпков модел, какъвто е установен в макрофагите или в едно- или три-стъпков модел, подобно на други клетъчни типове, възможно ли е секретирането на IL-1 β , и дали активирането на каспаза-1 ако има такова би довело до клетъчна увреда и смърт. Това би дало възможност за изграждане на механистичен модел за инициирането на мъжки аутоимунно-базиран инфертилитет с нарушаване на кръвно-тестисната бариера. Увреждането на сигналните пътища в клетките на Сертоли би могло да доведе и до нарушения в сперматогенезата, както поради нарушение на процеса им на спермиация и зреене, така и по паракринен хормонално-регулаторен и метаболитен път.

ЦЕЛ:

Целта на настоящия дисертационен труд бе да се изследва възможността за нарушаване на парадигмата за имунотолерантността на кръвно-тестисната бариера при засягане на сигналните пътища на вродения имунен отговор, инфламазомите и автофагоцитозата, като предпоставка за развитие на аутоимунно-базиран инфертилитет.

ЗАДАЧИ

1. Изследване на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2, и инфламазомният протеин NALP3 по отношение на функционалната им роля за активиране на про-инфламаторни и регулаторни цитокини в клетки на Сертоли
2. Изследване на взаимодействия на вродената имунна сигнализация с автофагоцитозната динамика в клетки на Сертоли
3. Характеризиране на молекулите на вродената имунна сигнализация с помощта на транскриптомни данни и молекулно моделиране, и изследване на протеомната динамика при индуциране на сигналните пътища на рецепторите TLR4 и NOD1 в клетките на Сертоли
4. Изследване на молекули, участващи в клетъчните контакти, формирането на екстрацелуларният матрикс, както и неklasическо антиген представяне с роля за патологията на репродуктивните стволови ниши и значение за имуно-медиирания инфертилитет
5. Генериране на хипотеза за ролята на вродената имунна сигнализация в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Антитела

- *Anti-Mouse IL-1 beta Pro-form FITC; NJTEN3; eBioscience Inc*
- *Anti-Mouse IL-6 PE; MP5-20F3; eBioscience Inc*
- *Anti-Mouse IL-10 APC JES5-16E3 eBioscience Inc*
- *Anti-Mouse IL-23 p19 eFluor® 660; fc23cpg eBioscience Inc*
- *Anti-Mouse ATG16L C-20; SCBT*
- *Anti-Mouse LC3b N-20; SCBT*
- *Anti-Mouse NOD1 H-176; SCBT*
- *Anti-Mouse NOD2 P-18; SCBT*
- *Anti-Mouse NALP3 H-66; SCBT*
- *Anti-Goat Occludin, clone Y-12; Santa Cruz*
- *MHC Class I (H-2Dk); eBioscience Inc*
- *MHC Class I (H-2Kd/H-2Dd); eBioscience Inc*
- *MHC Class Ib (H2-M3); eBioscience Inc*
- *isotype mouse IgG; sc-3877 SCBT*
- *isotype rabbit IgG; sc-3888 SCBT*
- *isotype goat IgG; sc-3887 SCBT*
- *mouse anti-goat IgG-FITC; sc-53800; SCBT*
- *mouse anti-rabbit IgG-PE; sc-3753; SCBT*
- *donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488; A-21206 Life Technologies*
donkey anti-goat IgG (H+L) Alexa Fluor® 555; A-21432 Life Technologies

1. Клетъчно култивиране
2. Клетъчни култури от първични Сертоли клетки
3. Стимулиране на рецепторите TLR4, NOD1 и NOD2 със специфичните им лиганди
4. Генно заглушаване (“siRNA knockdown”)
5. Обратно-транскриптна полимеразно-верижна реакция (RT-PCR) за Сертолиеви и кумулусни клетки
6. Проточна Цитометрия
7. Приготвяне на протеиновите екстракти от Сертоли и кумулусни клетки за електрофореза
8. Електрофоретично разделяне
9. Двумерна електрофореза (2D PAGE)
10. Orbitrap Velos нанопроотеомика
11. Биоинформатичен анализ на транскриптомни данни, получени от дълбоко секвениране от ново поколение
12. Имунофлуоресценция на пре-пубертетни и зрели Сертолиеви клетки
13. Имунофлуоресцентна детекция
14. Сканираща лазерна конфокална микроскопия
15. Три-дименционално (3D) сегментиране и компартиментализационен анализ на конфокални изображения с висока резолюция, и Принципен компонентен анализ на получените обекти (PCA)
16. Оценка на постоянната промяна (поток) на автофагията (Autophagic flux)
17. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA)
18. Тест за определяне на специфичната активност на каспаза 1 (Caspase-1)
19. Продуциране на стабилна репортерна клетъчна линия
20. Статистически анализ

РЕЗУЛТАТИ

1. Изследване на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2, и инфлазомният протеин NALP3 по отношение на функционалната им роля за активиране на про-инфламаторни и регулаторни цитокини в клетки на Сертоли

NALP3 зависимо кръстосано сигнализиране на NOD1 и NOD2 в Сертолиевите клетки вследствие действието на специфичните лиганди iE-DAP и MDP

Първично изолирани Сертоли клетки от 18 дневни мишки (пре-пубертетни Сертоли клетки) и клетки от клетъчна линия 15P-1 (6 месечна възрастна мишка) бяха използвани в опитните постановки.

Клетки от двата вида клетъчни линии бяха третирани със специфичните лиганди iE-DAP и MDP за активиране на рецепторите NOD1 и NOD2 от системата NLR.

От клетките от двете клетъчни линии (първична и комерсиална) беше изолирана РНК с помощта на специален кит, като бяха спазени всички изисквания на производителите. С помощта на обратно-транскриптазна реакция, бе направена копи-ДНК и последваща полимеразно-верижна реакция със специфични праймери за *Nod1*, *Nod2* и *Nlrp3*. Въз основа на автоматичен праг, определен от софтуера на Stratagene бе изчислен Ct за съответната амплификация и бяха изчислени относителните нива на експресия спрямо контролните клетки, по метода $\Delta\Delta Ct$ на Pfaffl.

При проследяване на експресията на *Nod1* в двете клетъчни линии преди и след третирането с лигандите, бе установено значително увеличаване на генната експресия на *Nod1* в сравнение с нетретираните клетки (Фигура 1 **Error! Reference source not found.**). Това увеличаване на експресията бе установено не само след действието на специфичният за *Nod1* лиганд - iE-DAP, но и след действието на MDP (специфичен лиганд за рецептора NOD2), както и при комбинирана стимулация с двата лиганда (**Error! Reference source not found.**).

Клетки на Сертоли от полово зрели мишки (линия 15P-1) бяха третирани със специфичните лиганди за рецепторите от системата NOD във времеви интервали от 1 до 24 часа (през 1, 2, 4, 8, 24 час). В последствие клетките бяха събрани живи и инкубирани със специфично антитяло срещу NOD1, NOD2 и NALP3 и антитела, белязани с флуоресцентно багрило. Чрез проточна флоуцитометрия бе проследена експресията на протеините NOD1, NOD2 в изследваните клетъчни линии.

Бе установена увеличена протеинова експресия на NOD1 вследствие действието на специфичният лиганд iE-DAP. Резултатите от проточната цитометрия показаха увеличаване на експресията на протеина NOD1 и след действието на специфичният лиганд за NOD2 рецептора - MDP (Фигура 1).

Третираните клетки показаха значително увеличена експресия на транскриптите на *Nod2* за двете линии (първичните клетки и в комерсиалната клетъчна линия 15P-1) в сравнение с нетретираните клетки. Увеличаването на генната експресия на *Nod2* бе установено не само след действието на специфичният за NOD2 лиганд MDP, но и след действието на специфичният за NOD1 лиганд iE-DAP (Фигура 1).

Протеиновата експресия на NOD2 следва подобен модел както при транскрипта, а именно по-висока степен на експресия при третираните клетки в сравнение с контролните нетретираните клетки и отново запазване на наблюдаваният феномен на кръстосан сигналинг (Фигура 1).

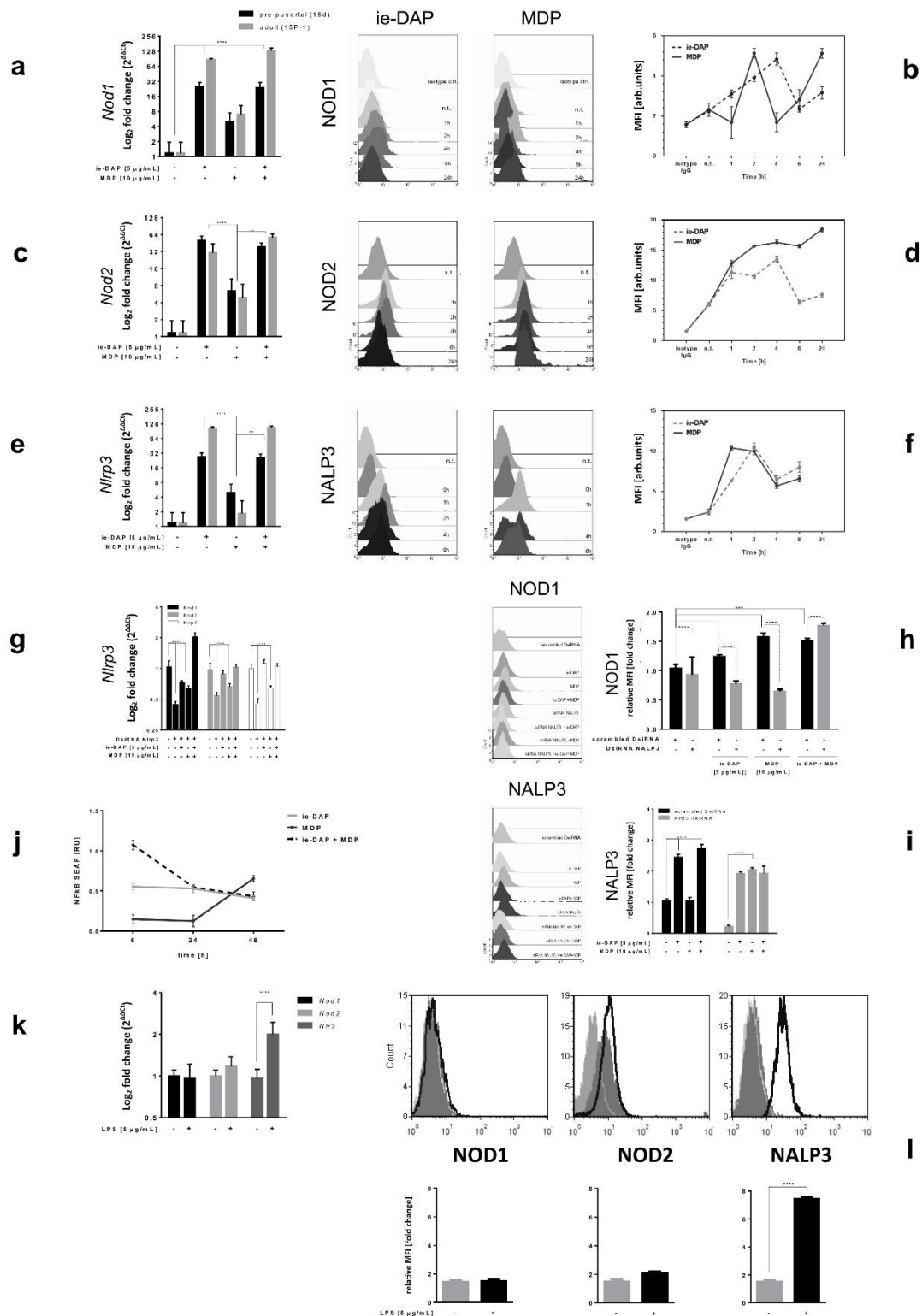
Получените резултати показаха кръстосан сигналинг, изразяващ се в това, че NOD1 специфичният iE-DAP лиганд, предизвиква не само *Nod1*/NOD1 (иРНК/протеин), но също така и *Nod2*/NOD2 експресия в двете клетъчни линии (пре-пубертетните и възрастни Сертоли клетки) и обратно, NOD2 специфичният MDP лиганд индуцира *Nod1*/NOD1 експресия.

Резултатите от обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция показаха значително увеличаване на експресионният профил на *Nlrp3* в двете изследвани клетъчни линии след действието на двата лиганда (самостоятелно и в комбинация) в сравнение с контролните нетретираните клетки (**Error! Reference source not found.**).

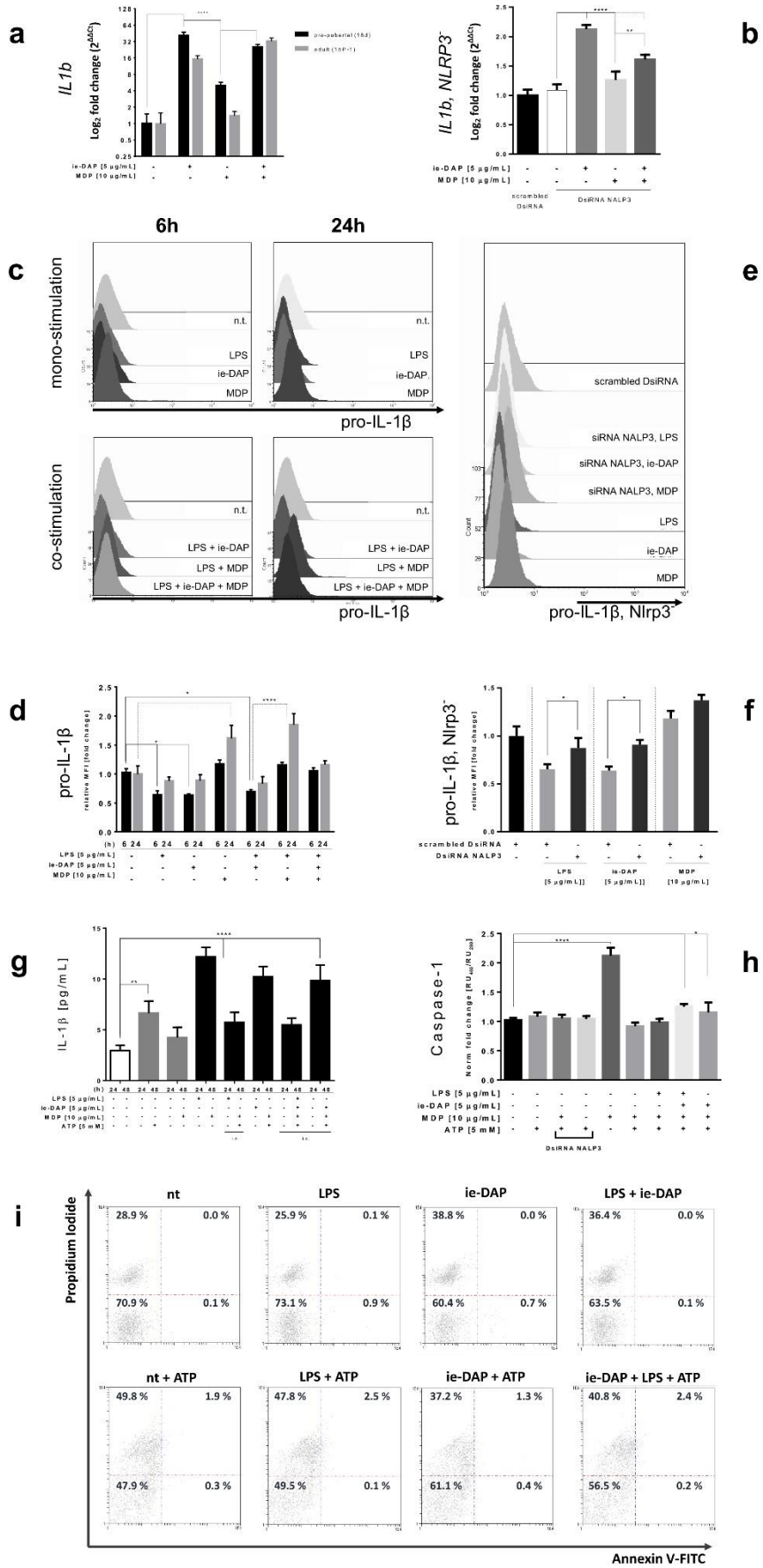
Получените данни показаха значително увеличаване на експресията на протеина NALP3 след действието на iE-DAP и MDP (Фигура 1).

Бе установена възрастово зависима генна регулация на NLR транскриптите, тъй като iE-DAP предизвиква по-силна експресия на транскриптите на *Nod1* и *Nlrp3*, а MDP индуцира по-слаба експресия на *Nod2* и *Nlrp3* във възрастни клетки, в сравнение с пре-пубертетните клетки.

Клетки от линията 15P-1, бяха трансфектирани съгласно инструкциите на производителите с *Nlrp3* малка интерферираща РНК, както и със съответната негативна контрола. Клетките бяха третирани с двата лиганда iE-DAP и MDP. От тях бе изолирана РНК, използвана за образуването на копи-ДНК, която служеше за матрица на полимеразно-верижната реакция с използването на специфични праймери за *Nod1*, *Nod2* и *Nlrp3*.



Фигура 1 RT-qPCR анализ на генната експресия на *Nod1*, *Nod2* и *Nlrp3*, представена като log промяна (Pfaffl, 2^{ΔΔCT}). Анализ на *Nod1*, *Nod2* и *Nlrp3* експресията в клетъчните линии, получени от изолиране на клетки от пре-пубертетни мишки и 15P-1 Сертоли клетъчна линия, чрез обратно-транскриптна полимеразно-верижна реакция след специфично третиране на клетките с лигандите iE-DAP, MDP и LPS; и в условия на генно заглушаване на NALP3; Флоуцитометричен анализ на NOD1, NOD2, NALP3 в 15P-1 клетки, третирани с лигандите iE-DAP, MDP и LPS; и в условия на генно заглушаване на NALP3; определяне на активността на NFκB в стабилна репортерна система; ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05; s.d. (Standard Deviation), n = 3.



Фигура 2 RT-qPCR анализ на генната експресия на IL-1 β , представена като log промяна (Pfaffl, 2 $\Delta\Delta$ CT). Анализ IL-1 β експресията в клетъчните линии, получени от изолиране на клетки от пре-пубертетни мишки и 15P-1 Сертоли клетъчна линия, чрез обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция след специфично третиране на клетките с лигандите iE-DAP, MDP и LPS; и в условия на генно заглушаване на NALP3.; Флоуцитометричен анализ на IL-1 β в 15P-1 клетки, третирани с лигандите iE-DAP, MDP и LPS; и в условия на генно заглушаване на NALP3.; Експресия на IL-1 β чрез ELISA; определяне на активността на caspase3; ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05; s.d., n = 3.

Клетки от клетъчната линия 15P-1 бяха подготвени за проточна цитометрия след генно заглушаване на *Nlrp3* и третиране със специфичните лиганди.

Бе установено, че индукцията на NOD1 и NOD2 вследствие на нативната лигандна стимулация или кръстосаният сигналинг бе NALP3 зависима (Фигура 1). Генното заглушаване на *Nlrp3* доведе до значително намаляване на експресията на *Nod1*, *Nod2* и *Nlrp3*. Подобни резултати бяха получени и за експресията на протеините - NOD1, NOD2 и NALP3 (Фигура 1).

Вследствие действието на лигандите iE-DAP и MDP за 6 часа след предварителното генно заглушаване на *Nlrp3*, експресията на *Nod1*/NOD1, *Nod2* и *Nlrp3*/NALP3 бе възстановена почти до тази на трансфектираните с негативна малка интерферираща РНК (контролните клетки), но никога толкова силно както е при нетрансфектираните условия (Фигура 1).

Ко-стимулирането на двете молекули NOD1 и NOD2 доведе до индуциране на *Nod1*, но не и на *Nod2* на ниво иРНК. Нивата на *Nod1* транскрипт бяха увеличени само 2 пъти след генното заглушаване на *Nlrp3* в сравнение с повече от 128 пъти увеличаване при контролни условия. Тези данни бяха потвърдени и на протеиново ниво (Фигура 1).

В настоящото изследване бе създадена стабилна клетъчна линия с pNiftySEAP2 репортерен вектор, амплифициран в *E. coli*. Клетъчната линия бе създадена на базата на комерсиалната Сертоли клетъчна линия 15P-1. Репортерният вектор реагира само на активната форма на транскрипционния фактор NF κ B, със секретирателна алкална фосфатаза (SEAP), което бе тествано с колориметричен SEAP анализ. Клетките, които носят pNiftySEAP2 вектора бяха селектирани със специфичен антибиотик (Zeocin). В продължение на два месеца бяха суб-селектирани по способността им да реагират специфично към активиран транскрипционен фактор NF κ B и да транскрибират секреторна алкална фосфатаза. Бе изследвано, дали NLR лигандите iE-DAP и MDP работят през NF κ B сигналният път в Сертолиевите клетки. За тази цел стабилната клетъчна линия, носеща pNifty2-SEAP вектора, бе третирана с iE-DAP, MDP, или комбинация от двата лиганда за 6, 24 или 48 часа. За позитивни контроли бяха използвани йономицин и форбол мириститат ацетат (PMA), които се считат за две от най-мощните изкуствени индуктори на NF κ B. Нетретирани клетки служеха за отрицателна контрола. По време на развитието на колориметричния анализ за всяко третиране, бяха прочетени три точки от времето (30 сек, 20 мин, 40 мин), като всяко третиране, бе нормализирано до вектор, носещ от нетретирани 15P-1 клетки.

Когато се достигна до стабилно състояние на колориметричната реакция, данните показаха, че MDP активира NF κ B само след 24 часа на инкубацията, докато iE-DAP имаше бърз отговор, с времетраене над 48 часа. Комбинираното действие на двата лиганда бе кратко, намаляващо на половината на сигнала между 6 и 24 часа на инкубацията (**Error! Reference source not found.**).

В настоящата дисертация бе проследена генната и протеиновата експресия на *Nod1*/NOD1, *Nod2*/NOD2 и *Nlrp3*/NALP3 след като клетки от 15P-1 клетъчната линия бяха третирани за 24 часа с LPS, който е специфичен лиганд за TLR4.

Бе извършена полимеразно-верижна реакция и проточна флоуцитометрия по вече описаните методи.

Данните от получените резултати показаха увеличаване на експресионният профил на *Nlrp3*/NALP3 както на транскрипционно така и на протеиново ниво (Фигура 1).

Лигандите NRL водят до свръхрегулиране на pro-IL-1 β , но само специфични условия на активиране индуцират секреция на IL1 β в Сертоли клетки

В настоящият дисертационен труд бе проследен инфламазомният сигналинг във фагоцитиращи, непрофесионални антиген представящи епителни клетки, каквито са клетките на Сертоли. За тази цел пре-пубертетните и полово зрели (15P-1) клетки бяха третирани или с iE-DAP или с MDP. Част от клетките бяха трансфектирани с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*. Бе изолирана РНК от клетъчните линии, включени в изследването. Изолираната РНК бе използвана за образуването на копи-ДНК, служеща за матрица на полимеразно-верижната реакция с използването на специфични праймери за IL1 β . За установяване на експресията на IL1 β в мишите клетъчни линии бяха амплифицирани транскрипти (иРНК),

кодиращи *IL1β*. Бе изчислен Ct за съответната амплификация, както и относителните нива на експресия спрямо контролните клетки, по вече описаният метод ΔΔCt.

Стимулирането на полово незрели Сертоли клетки с iE-DAP или с MDP доведе до значително повишена регулация (над 40-пъти) на *Il1b* иРНК. iE-DAP стимулирането на възрастни Сертоли клетки доведе до 15-кратно увеличение на *Il1b* иРНК, като в същото време, MDP третирането предизвика само слаба индукция. Комбинираното iE-DAP и MDP стимулиране доведе до подобна значителна *Il1b* иРНК възходяща регулация в двете клетъчни линии - полово незрели и зрели Сертоли клетки (Фигура 2).

Миши Сертоли клетки бяха третирани с iE-DAP, MDP или LPS. Част от клетките бяха трансфектирани с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*.

Живи Сертоли клетки от полово зрели мишки (линия 15P-1) бяха събрани и инкубирани със специфично антитяло срещу проформата на *Il1b* (pro-IL-1β) и второ антитяло, белязано с флуоресцентно багрило. В изследваната миша клетъчна линия, чрез проточна флуоцитометрия бе проследена експресията на протеина *Il1b*, след блокиране на цитокиновата секреция.

Експресията на pro-IL-1β бе установена, че намалява почти наполовина след 6 часова- клетъчна стимулация с LPS и iE-DAP, самостоятелно или в комбинация. Това редуциране изчезва след 24-часово третиране. От друга страна, MDP стимулирането за 6 часа доведе до повишена pro-IL-1β експресия, която бе почти удвоена след 24 часова третиране. Едновременното LPS и MDP стимулиране доведе до подобен модел на регулация за pro-IL-1β. Изненадващо, когато LPS-медираната TLR4 стимулация бе комбинирана със стимулиране на NOD1 и NOD2, повишената регулация от действието на MDP върху pro-IL-1β антагонистично прекъсна, най-вероятно заради ефекта на MDP, което не доведе до промяна в регулацията (Фигура 2).

Индукцията на *Il1b* иРНК вследствие на стимулацията на NOD1 и NOD2 бе установено, че е NALP3 зависима. Този ефект бе наблюдаван след iE-DAP или комбинирано третиране с iE-DAP и MDP, но не и след генното заглушаване на *Nlrp3* само по себе си (Фигура 2).

Генното заглушаване на *Nlrp3* частично отменя намаляването на експресията на pro-IL-1β, постигнато след 6 часова LPS или iE-DAP стимулация. По същия начин, експресията на pro-IL-1β се увеличаваше още повече след третирането с MDP (Фигура 2).

Въз основа на данните, получени чрез флуоцитометричните анализи бе направена обобщена оценка на влиянието на лигандите iE-DAP, MDP, LPS в и без условия на генно заглушаване на *Nlrp3* върху експресионните нива на pro-IL-1β (Фигура 2).

Секрецията на IL-1β в Сертоли клетките (15P-1) изискваше специфични условия на активиране. Клетките от клетъчната линия 15P-1 бяха третирани в продължение на 24 /48 часа с LPS, iE-DAP, ATP или MDP. Бе използван метода „сандвич“ ELISA.

Две конфигурации доведоха до IL-1β секреция: TLR4, последвано от активиране на NOD2 / NALP3, медирано само чрез MDP, или NOD1, последвано от комбинирано MDP ATP и активиране на NALP3 (Фигура 2). Обратно, 48-часовото комбинирано третиране на двата NOD рецептора, с или без TLR4, въпреки че индуцира високо количество на вътреклетъчния pro-IL-1β в присъствието на ATP, не доведе до неговото освобождаване. Комбинираните третиранения в рамките на 24-часов период не доведоха до индуцирането на секреция на IL-1β (Фигура 2).

Миши Сертолиевни клетки от клетъчната линия 15P-1 бяха третирани с лигандите за активиране на NOD и TLR4 рецепторите за 24 часа. Клетките бяха използвани в специфичен тест за определяне на активността на caspase-1 (ензим, чиито активен център участва в рязането на pro-IL-1β).

Директната стимулация на NALP3 от MDP доведе до активиране на caspase-1. Комбинираното третиране, използвайки LPS, iE-DAP и MDP, или iE-DAP и MDP, последвано от ATP също доведе до активиране на caspase-1 (Фигура 2).

Миши Сертолиевни клетки от линията 15P-1 бяха третирани с лигандите iE-DAP (NOD1) и LPS (TLR4) самостоятелно или в комбинация. Клетките бяха подготвени по описана методика за флуоцитометрия, като в изследването бяха използвани Annexin V/Propidium iodide (PI).

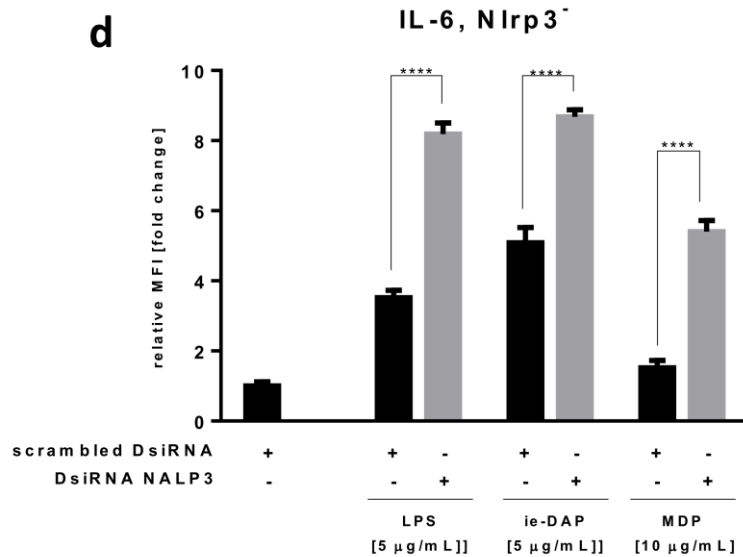
Резултатите от проточната цитометрия показаха, че третирането на клетките с нарастващи дози (1, 2, 10, 20 mM) ATP доведе до повишаване на нивата на клетъчна смърт (Фигура 2), като при максималната концентрация на ATP 20 mM, процента на мъртви клетки достигна 78% от събраните клетки в гейта, като общия брой клетки беше намален значително за сметка на клетъчен детрит.

При стимулиране на клетките на Сертоли с лигандите на NOD1 и TLR4 бе установено, че iE-DAP, но не и LPS води до повишена клетъчна смърт. Използването на комбинацията LPS с iE-DAP доведе до увеличаване на клетъчната смърт, резултат съвместим с този, получен от третирането само с iE-DAP. Добавянето на ATP към LPS/iE-DAP комбинацията допълнително увеличава процента на клетъчна смърт (Фигура 2).

В настоящата дисертация бе проследен ефекта, който оказват лигандите за рецепторите NOD1/NOD2/TLR4 върху други цитокини, включително IL-6, IL-10 и IL-23 в Сертоли клетъчната линия 15P-1. Бяха извършени третирания с лигандите iE-DAP, LPS и MDP (самостоятелно и в комбинация) през различни времеви интервали (6 час и 24 час). Допълнително бяха направени трансфекции с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*, както и с контролни нетаргетиращи РНК-и. Чрез проточна цитометрия бяха установени протеиновите нива на IL-6, IL-10 и IL-23 в Сертолиевите клетки.

Бяха установени експресионни нива на изследваните цитокини, които са различно засегнати от NLR сигналинга.

TLR4/NOD1 индуцира регулацията на IL-6, докато NOD2/NALP3 ограничава регулацията на IL-6 (Фигура 3).

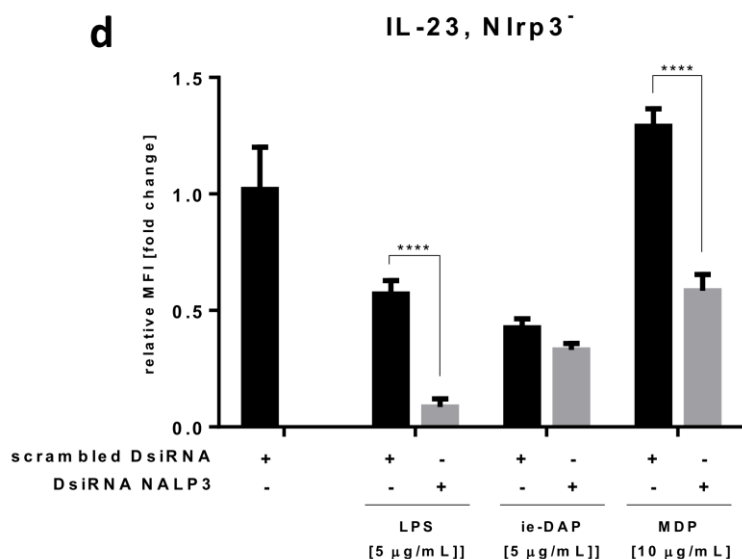


Фигура 3. Обобщена количествена оценка на модулацията на експресията на IL6 в 15P-1 клетъчна линия, след третиране с специфични лиганди (iE-DAP, MDP, LPS) и трансфекция с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*, направена с помощта на флоуцитометричен анализ. Експресията е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично третирани клетки. Графиката е представена с Медианен индекс на флуоресценция (MFI) за всяка FCS хистограма, нормализиран към MFI на нетаргетиращите трансфектирани клетки. *P<0.05; s.d., n = 3.

Обратно, TLR4 ограничава регулацията на IL-23, докато NOD1/NOD2 индуцира регулацията на IL-23 (**Error! Reference source not found.** Фигура 4).

Не бе установена индукция на IL-10 след стимулация с лигандите, както и промени в интактно и стимулирано състояние след генно заглушаване на NALP3.

Въз основа на данните получени чрез флоуцитометричните анализи бе направена обобщена оценка за влиянието на NOD/TLR4 сигналинга върху експресионните нива на изследваните интерлевкини (Фигура 4).



Фигура 4. Обобщена количествена оценка на модулацията на експресията на IL23 в 15P-1 клетъчна линия, след третиране с специфични лиганди (ie-DAP, MDP, LPS) и трансфекция с малки интерфериращи РНК-и срещу Nlrp3, направена с помощта на флуцитометричен анализ. Експресията е представена като FCS насложени хистограми на изотипните контроли, нетаргетиращи контроли и специфично третирани клетки. Графиката е представена с Медианен индекс на флуоресценция (MFI) за всяка FCS хистограма, нормализиран към MFI на нетаргетиращите трансфектирани клетки. *P<0.05; s.d., n = 3.

2. Автофагоцитозният сигналинг е модулиран по различен начин в зависимост от индукцията на вродения имунен отговор

Експресия на NOD1, NALP3, ATG16L, LC3 в клетки на Сертоли изолирани първично от пре-пубертетни мишки и в клетъчна линия получена от полово зрели мишки

Клетки от Сертоли първична клетъчна линия бяха третирани с ie-DAP (индуктор на NOD1) и MDP (индуктор на NOD2). Индиректна имунофлуоресценция и лазерна сканираща конфокална микроскопия бяха използвани за детектиране на позитивна реакция. За контрола бяха използвани нетренирани клетки. Клетките бяха инкубирани с антитела срещу NOD1, NOD2, ATG16L и LC3, и бе проведен имунофлуоресцентен анализ, описан вече.

Стимулирането на първични Сертоли клетки от пре-пубертетни мишки с ie-DAP и MDP доведе до умерено и респективно слабо повишение на експресията на NOD1, докато същото стимулиране доведе до относително слабо повишение на NALP3 и при двата лиганда (Фигура 5), при много ниски базални нива на експресия на NOD1 и NALP3.

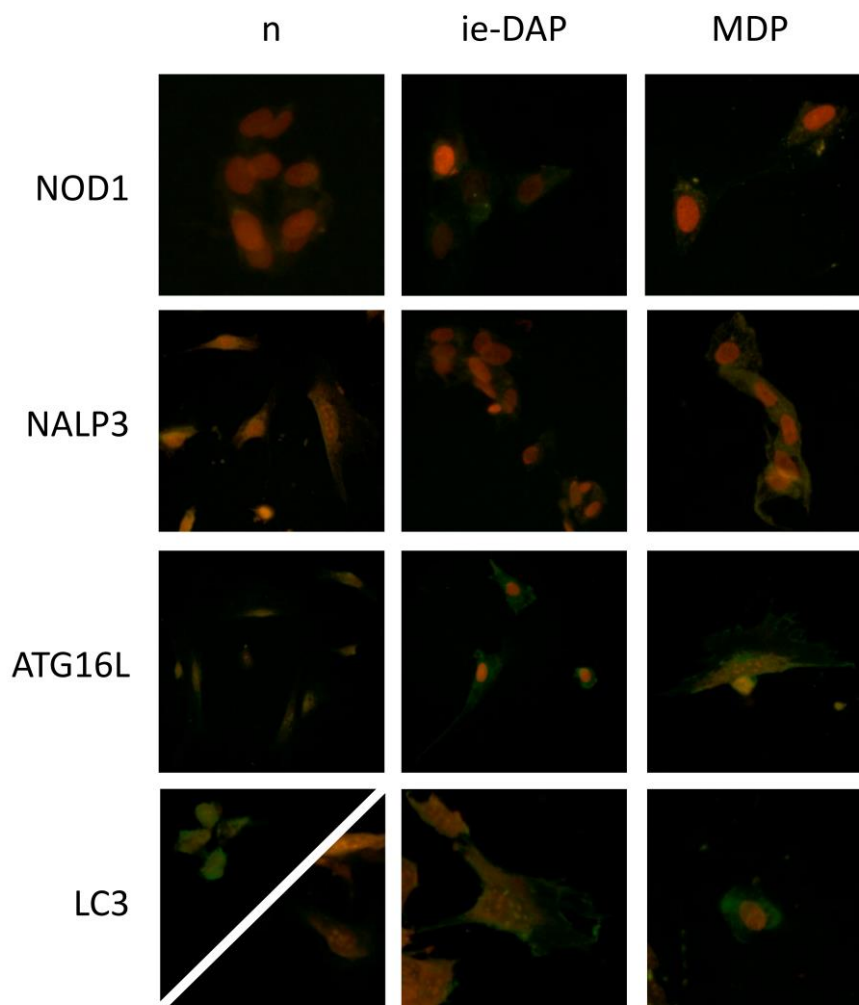
За разлика от NLR молекулното семейство, експресията на маркерите за ранна и късна фаза на автофагоцитозата – ATG16L и LC3, и в базални условия бе на относително умерено ниво, като и двата маркера реагираха с повишение след стимулация с лигандите ie-DAP и MDP. ATG16L бе най-силно повишен от ie-DAP, докато LC3 бе най-силно повишен от MDP (Фигура 5).

Клетки от Сертоли клетъчна линия 15P-1 получена от полово зрели животни бяха третирани с ie-DAP (лиганд на NOD1), MDP (лиганд на NOD2) или LPS (лиганд на TLR4). Индиректна имунофлуоресценция и лазерна сканираща конфокална микроскопия бяха използвани за детектиране на позитивна реакция. За контрола бяха използвани нетретиращи клетки. Клетките бяха инкубирани с антитела срещу NOD1, NOD2, ATG16L и LC3, и бе проведен имунофлуоресцентен анализ, описан вече.

Бе установено, че клетките на Сертоли могат да експресират и NOD2, като в базални условия клетъчната линия 15P-1 демонстрира тенденция за максимална експресия перинуклеарно и дребна зърнистост по хода на цитоскелета. При стимулация с MDP (индуктор на NOD2) бе установено значително повишаване на нивото на флуоресценция, и обособяване на различни по размери гранули по хода на цитоскелета и засилване на перинуклеарните струпвания.

Експресията на рецептора NOD1, инфлазозомния платформен протеин NALP3 и маркерите за автофагоцитоза ATG16L и LC3 бе проследена в условия на единични клетки и плътен клетъчен монослой, като NOD1 и NALP3 бяха ко-локализиращи с ATG16L и LC3 във всички експерименти.

NOD1 експресията в монослой на интактни Сертоли клетки от полово зрели мишки (линия 15P-1) се характеризираше с дистрибуция и концентрация на рецепторите в зоните на клетъчните контакти.



Фигура 5. Индиректна имунофлуоресценция за доказване експресията на NOD1, NALP3, ATG16L, LC3 в първични пре-пубертетни Сертоли клетки; нетретирани или третирани с ie-DAP или с MDP лиганди в следствие инкубирани със специфичните антитела срещу молекулите; Вторите антитела са конюгирани с FITC, ядрата са оцветени с пропидиев йодид. Нетретираните клетки, инкубирани с антитяло срещу LC3 са представени в две микрофотографии; x 400.

За оценка на степента на реална колокализация се използват различни цифрови обективни методи, основаващи се на статистическа оценка на степента на припокриване на пиксели от различни цветови канали. Един от най-разпространените е методът на Костес, с изчисляване на коефициенти на Мандерс. Този подход бе използван за оценка на степента на „фалшива“ колокализация (интерференция) между цветните сигнали, получени само от вторите детектиращи антитела (имуноглобулини, конюгирани с флуоресцентни багрила и насочени срещу първичните специфични антитела). Поради същността на реакцията антиген-антитяло, е възможно друговидови имуноглобулини – изработени в магаре, да реагират с епитопи от тъкан или клетки от миши произход. Клетки на Сертоли линия 15P-1 бяха имуно-оцветени само с втори конюгирани антитела. Използвани са антитела магарешки анти-заешки ИгГ конюгиран с Alexa Fluor 488 (емитиращ в зеления спектър) и магарешки анти-кози ИгГ конюгиран с Alexa Fluor 555 (емитиращ в червения спектър). Изображенията са получени от конфокален микроскоп с много висока степен на резолюция Nikon 1R и софтуер Nikon NIS Elements AR software и обработени с модулът за оценка на колокализация на софтуера Fiji (версия на ImageJ).

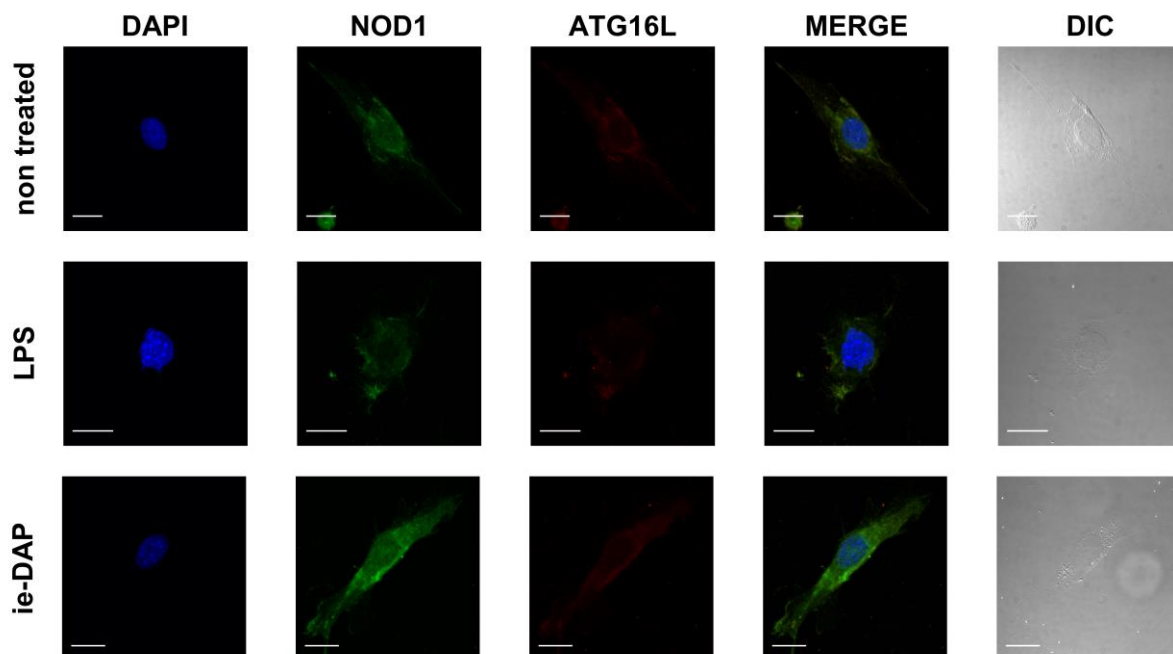
Индексът за оценка на тоталната колокализация R_{total} от 0.188 показва липса на колокализация между вторите антитела. Въз основа на тези резултати бе направен изводът, че негативните контроли от Сертоли клетки третирани само с втори антитела не показва статистически значима степен на колокализация (метод на Костес) поради протокола за блокиране на неспецифични протеин-протеин взаимодействия, избора на специфичност, и емисионните им спектри.

На тази основа бе създаден протокол за колокализация от ново поколение, с използване на три-дименсионални сегментирани обекти, вместо с използването само на дву-дименсионални пиксели, с цел избягване на интерференцията получавана от информационния цифров шум наличен във всяко едно флуоресцентно изображение.

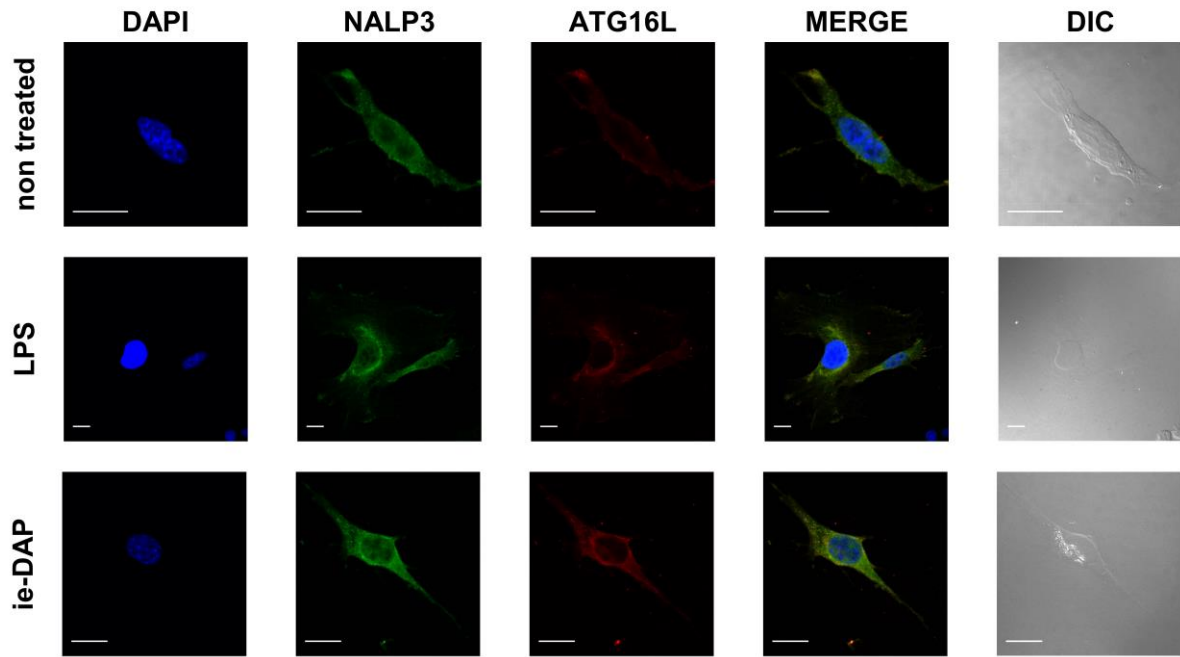
Бяха селектирани три-дименсионални конфокални изображения, сканирани при латерална резолюция от 80 nm и вертикална резолюция от 100-150 μm , като бяха избрани единични клетки и бяха съхранени z-stack изображения в оригиналния цифров формат на Nikon.

Следвайки различно препрограмиране на клетъчния отговор, NOD1 насочва към модулиране на процеса на автофагоцитоза, докато TLR4 насочва към асемблиране на инфламазомния комплекс

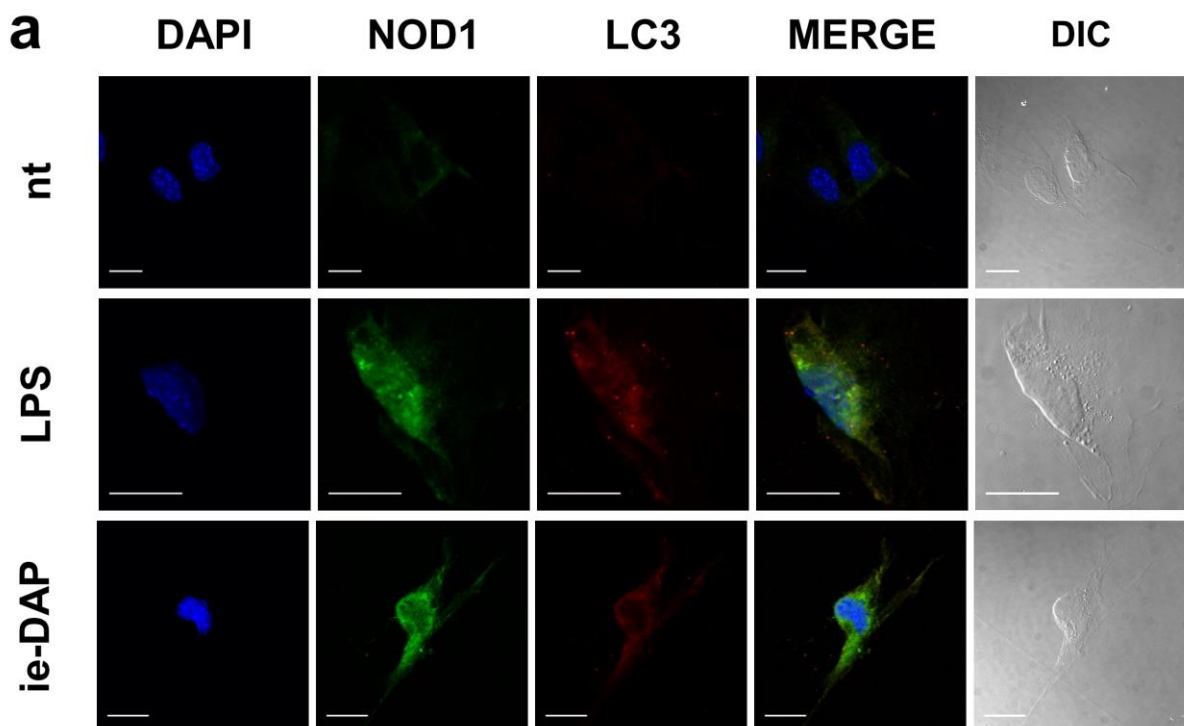
По-нататък бе проследено, как стимулацията с LPS или iE-DAP се отразява на пространствено-времето разпределение на NOD1 рецепторите и на инфламазомния платформен протеин NALP3 по отношение на маркерите за начални и зрели автофагозоми – ATG16L (Фигура 6, Фигура 7) и LC3 (Фигура 8, Фигура 9) съответно.



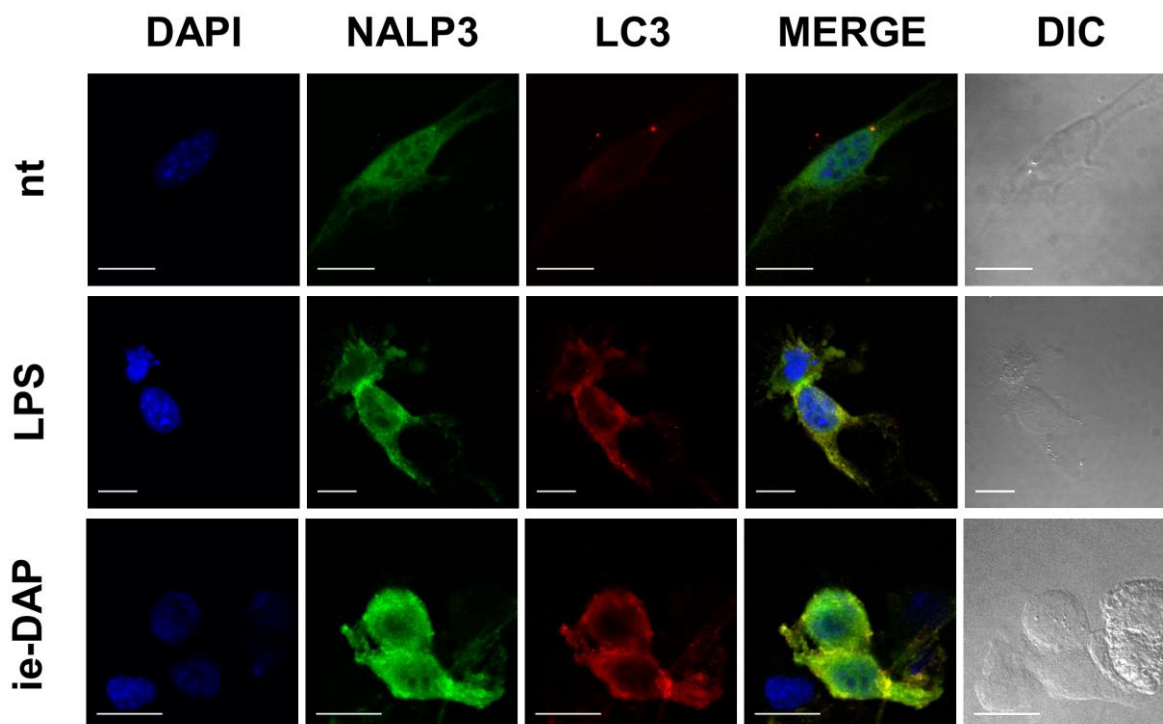
Фигура 6. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на индиректна имунофлуоресценция за оценка на колокализацията на NOD1 с ATG16L в 15P-1 Сертоли клетки; нетретирани или третирани с iE-DAP или LPS лиганди; Имунодетекцията е направена с помощта на специфични антитела: заешки анти-NOD1 IgG, детектиран с магарешки анти-заешки IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 488; кози анти-ATG16L IgG, детектиран с магарешки анти-кози IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 555; ядрения хроматин е оцветен с DAPI. x 400.



Фигура 7. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на индиректна имунофлуоресценция за оценка на колокализацията на NALP3 с ATG16L в 15P-1 Сертоли клетки; нетретиран или третиран с iE-DAP или LPS лиганди; Имунодетекцията е направена с помощта на специфични антитела: заешки анти-NALP3 IgG, детектиран с магарешки анти-заешки IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 488; кози анти-LC3 IgG, детектиран с магарешки анти-кози IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 555; ядрения хроматин е оцветен с DAPI. x 400.



Фигура 8. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на индиректна имунофлуоресценция за оценка на колокализацията на NOD1 с LC3 в 15P-1 Сертоли клетки; нетретиран или третиран с iE-DAP или LPS лиганди; Имунодетекцията е направена с помощта на специфични антитела: заешки анти-NOD1 IgG, детектиран с магарешки анти-заешки IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 488; кози анти-LC3 IgG, детектиран с магарешки анти-кози IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 555; ядрения хроматин е оцветен с DAPI. x 400.



Фигура 9. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на индиректна имунофлуоресценция за оценка на колокализацията на NALP3 с LC3 в 15P-1 Сертоли клетки; нетретирирани или третирирани с iE-DAP или LPS лиганди; Имунодетекцията е направена с помощта на специфични антитела: заешки анти-NALP3 IgG, детектиран с магарешки анти-заешки IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 488; кози анти-LC3 IgG, детектиран с магарешки анти-кози IgG (H+L), конюгиран с Alexa Fluor® 555; ядрения хроматин е оцветен с DAPI. x 400.

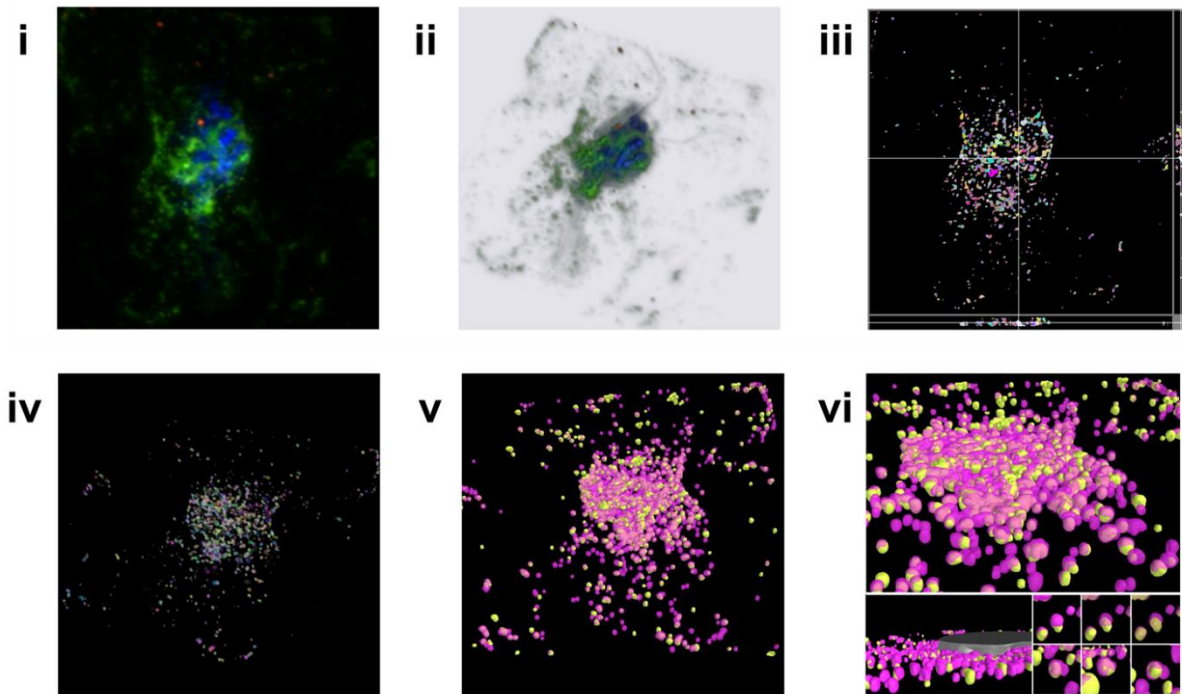
Въз основа на сигнификантното ниво на колокализация на тези молекули с LC3 и по-слабото с ATG16L, бе разработен три-дименсионален (3D) обектен волуметричен компартиментализационен анализ, като бе използвана технология за 3D сегментация на z-стеково конфокално изображение с много-висока степен на резолюция, и специално създаден и оптимизиран автоматизиран протокол за обработката и анализа на изображението. Използваната сканираща лазерна конфокална микроскопска система на Nikon A1R позволи хоризонтална вълнова резолюция между 40 – 80 nm и вертикална резолюция 0.025-0.05 μm , при резолюция на захванатото изображение (всеки кадър) 4096x4096 пиксела и увеличение до 1000 пъти (цифрово увеличение в рамките на първично регистрираното изображение от сензора). Скоростите на сканиране са от 2 кадъра/сек (512x512 пиксела, бидирекционно) до 24 кадъра/сек (512x32 пиксела, бидирекционно). За сравнение, сканираното изображение при стандартен Leica конфокален микроскоп е с резолюция 1024 пиксела максимум, като оптичестката вълнова латерална резолюция е от порядъка на стотици микрометри. В експериментите бе използвано унидирекционно сканиране с цел максимална резолюция на регистрираното изображение. Приложеният подход за анализ на изображения позволява изследването на пространствената динамика на индивидуалните молекулни комплекси и на тяхната ко-компартментализация.

Получените три-дименсионални стекове с изображения (един стек отговаря на една цяла клетка) бяха деконволюирани.

DIC и флуоресцентните изображения бяха използвани за създаване на допълнителни канали (във файла с мулти-дименсионалното изображение) съдържащи три-дименсионални бинарни маски, чрез трасирането на клетъчните очертания. Бе създадена автоматизирана поточна линия за обработка и анализ на изображенията, дефинирана софтуерно в софтуера BioImage XD. Бе извършено 3D сегментиране на обектите, изразяващо се в сегментиране от z-стек изображение, слой по слой, с цел получаване на три-дименсионален обект, отразяващ формата, плътността и обема на първичния феномен, захванат и пресъздаден в дигиталното мулти-дименсионално изображение.

За всеки 3D сегментиран обект (пример за сегментирано изображение на Фигура 10, i-iv) бе генерирана три-дименсионална мрежа (3D mesh) (Фигура 10, v), която по-късно бе използвана за количествена оценка на обектната ко-компартментализация на този обект с други три-дименсионални обекти (Фигура 10, vi). Концепцията за ко-компартментализация е представена на Фигура 10, vi и на

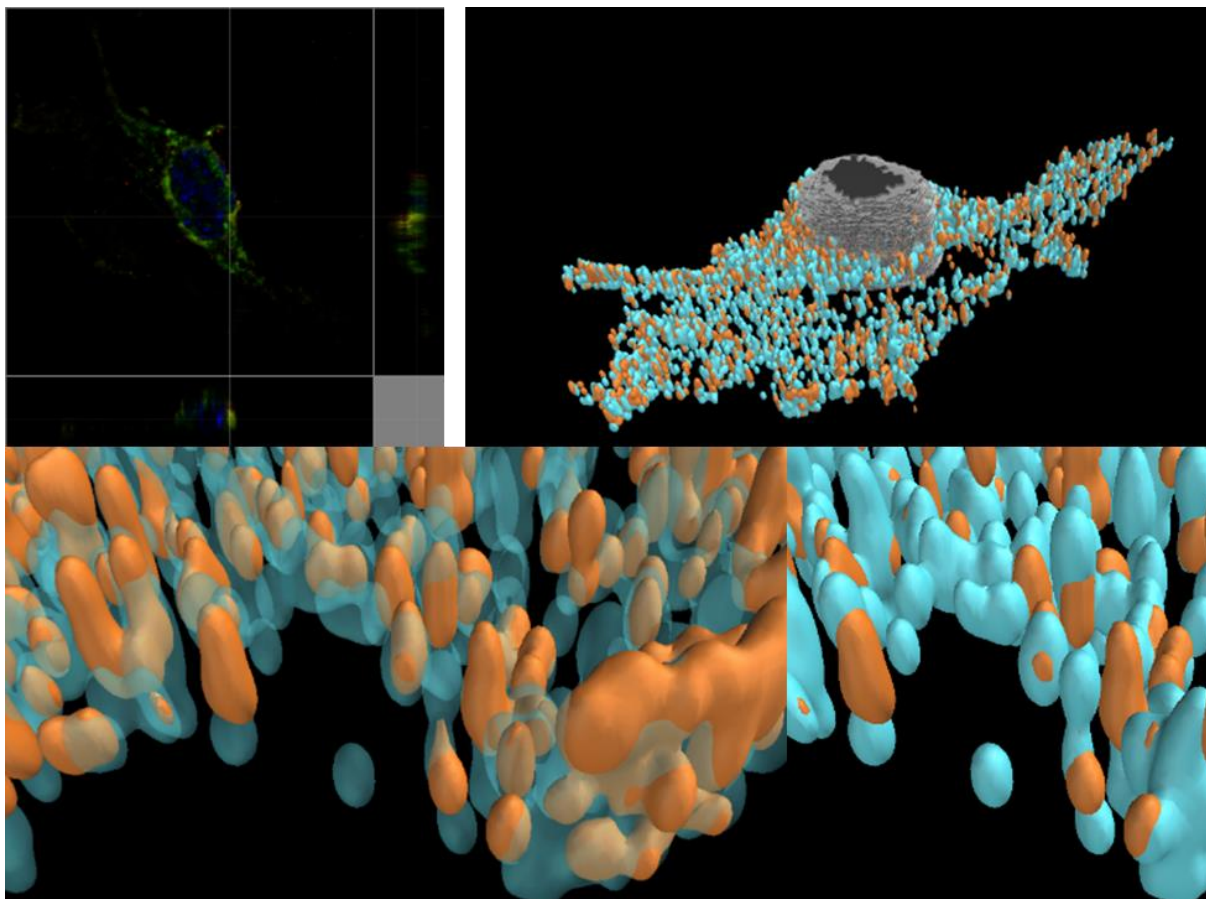
Фигура 11. 3D обектна колокализация бе оценена с 2 параметъра: процент на вокселите (три-дименсионални пиксели, 3D pixels) ко-локализиращи с 3D мрежите на други обекти, и брой на отделните, различни ко-локализиращи обекти, които се „припокриват“ в три-дименсионалното пространство с този обект.



Фигура 10. Примерни изображения показващи последователността от стъпки за получаване на 3D сегментирани изображения и концепцията за ко-компарментализация (три-измерна колокализация): Деконволюирано z-стек 3D изображение (i.), показано и като изоволуметричен 3D образ (ii.), е подложено на 3D обектна сегментация (iii, ортогонална 2D проекция; iv-v, 3D волуметричен и повърхностен образи), и последваща обектна ко-компарментализация (три-измерна колокализация)(vi). Повърхността на клетъчната мембрана и на ядрото бяха моделирани въз основа на плътността на изображението в различните канали като 3D мрежи, обемите на клетката и на ядрото бяха изчислени и бяха използвани като нормализационни параметри в изчисленията на дистанциите. Изображение на концепцията за ко-компарментализация (●) между обекти, съответстващи на платформения протеин NALP3 (●) и маркера за автофагоцитоза LC3 (●) (vi).

Каналите съдържащи три-дименсионални бинарни маски, съответстващи на флуоресцентното визуализиране на ядрото с DAPI и на визуализирането на клетъчната повърхност, бяха използвани за генериране на 3D полиедрични мрежови обекти отразяващи ядрената и клетъчната повърхности в клетката. Тези полиедрични обекти бяха използвани за количествена оценка на дистанцията между рецепторните обекти и ядрената повърхност и тази на клетъчната мембрана (Фигура 10, vi).

За всеки детектиран като отделен рецепторен обект бяха количествено определени следните атрибути ($attr_{1-16}$): процент на ко-локализирани воксели, брой на отделните обекти ко-локализиращи се с конкретен обект, осреднена дистанция на обекта, обем на обекта, осреднена интензивност на флуоресценцията на обекта, сума на интензитетите (интегрирана флуоресцентна интензивност на обекта), елонгация, дължина на късата ос, дължина на дългата ос, ъгли между късата или дългата ос на обекта и всяка от осите на Картезианската координатна система (x, y, z) (общо 6 ъгла), разстояния от центъра на масата на обекта до ядрената и до клетъчната мембрана респективно. С помощта на този автоматизиран процес на сегментация като отделни бяха определени над 8000 рецепторни обекта на цветен канал, всеки описан от 16 атрибута, генерирайки 18-размерно (цифрово) пространство ($attr_{1-16}$, лиганд за стимулиран на клетките – параметър „treatment“ [n.t., LPS, iE-DAP], вид изследвана молекула – параметър „class“ [NALP3, NOD1, LC3]).



Фигура 11. Пример за ко-компарментализация на NALP3 и ATG16L. Представено е изображение на ортогонални проекции (x,y; y,z) и на интегрална вертикална проекция (x,y) на 3D z-stack изображение (горе ляво). Реконструиран е модел на ядрото и на рецепторните комплекси (горе дясно). С промяна на прозрачността на обектите е демонстрирана концепцията за ко-компарментализация и изчисленията за обем на припокриване (изчислен като общ обем воксели между два различни обекта) (долу).

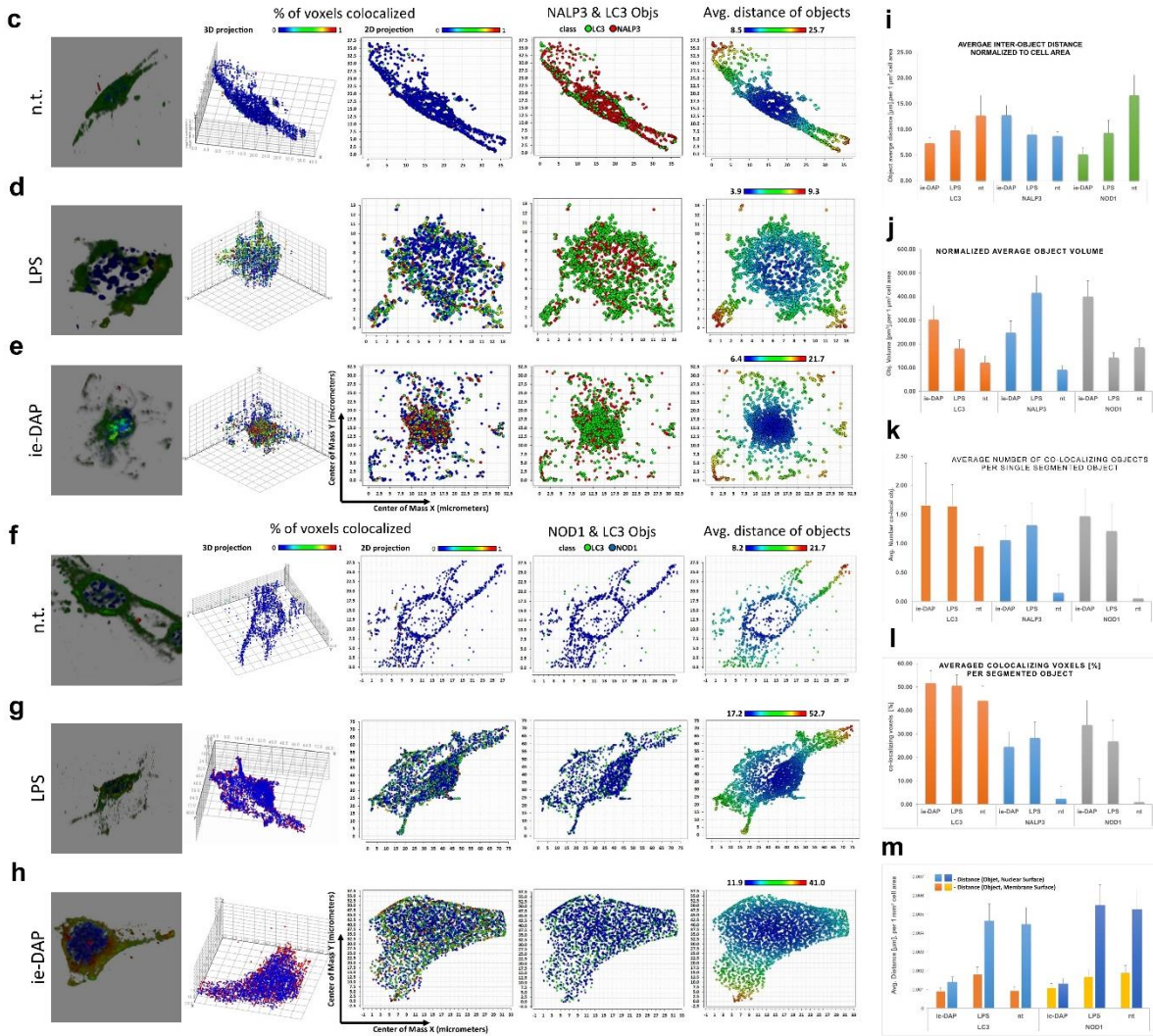
Анализа на изображения с три-дименсионално сегментиране показва, че след 24 часово стимулиране с LPS или iE-DAP, инфламазомния платформен протеин NALP3 и рецепторът NOD1 имат различно пространствено преразпределение и модел на колокализация по отношение на LC3.

Въз основа на моделите на разпределение на детектираните обекти по параметрите за разстояние, индивидуален обем и интензитет (Фигура 13) и на средното разстояние между обектите, обема и процента на вокселна колокализация (Фигура 12), се установяват два типа на взаимодействие:

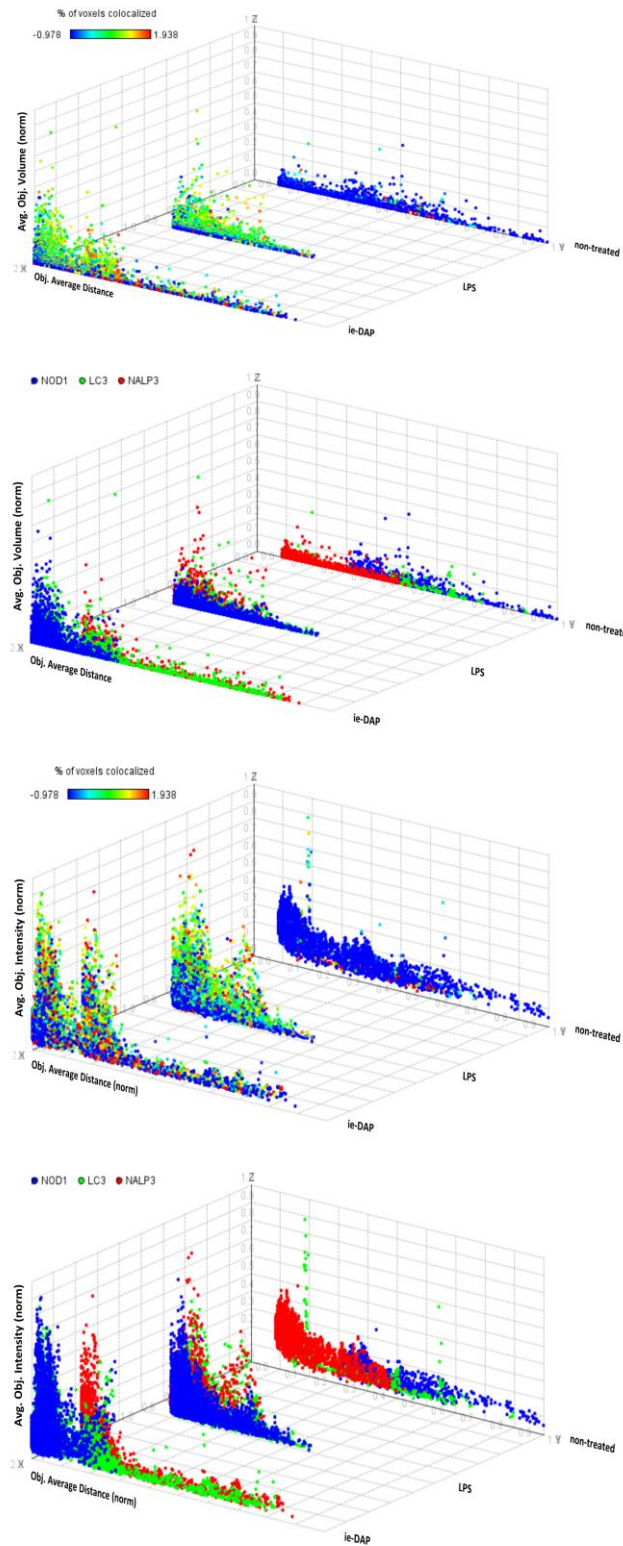
(i) TLR4 сигнализацията индуцира преразпределението на NOD1 и NALP3, докато комплексите на NALP3 акумулират и агрегират, като вероятно тяхната колокализация с LC3 води до модулация на процеса на автофагоцитиране в клетките на Сертоли. В същото време това не е съпътствано с директна активация на рецепторите на NOD1, т.к. по размера на частиците на NOD1 може да се съди, че няма NOD1 агрегация;

(ii) свързването на лиганда iE-DAP към рецептора му NOD1 води до димеризация на последния изразена от микро-кълстериране (с удвояване на обема на NOD1 обектите) и преместването им в близост до ядрото (разстояние на частиците до ядрото), като NOD1 колокализират с образуваните кълстери от LC3 комплекси (обем на частиците). Този процес на преразпределение вероятно модулира също автофагоцитозата.

Стимулирането също води до увеличение на размера на платформения протеин NALP3 изграждащ инфламазомния комплекс и до модел на разпределение от „разпръснат“ тип. Този феномен вероятно отразява началната фаза на асемблиране на инфламазомата.



Фигура 12. Нормализирана обобщена статистика за средна дистанция между обектите, нормализирана на единица клетъчна площ, за сегментираните и детектирани NALP3, NOD1 и LC3. Данните са представени като средни стойности \pm SD



Фигура 13. 3D хистограми показващи дистрибуцията на обектите представляващи отделните сегментирани рецепторни обекти по средна дистанция на обектите - Obj. Avg. Distance, средна интензивност на флуоресценцията на обект - Obj. Avg. Intensity (x), срещу средния обем на обектите - Obj. Avg. Volume, групирани по типа на стимулиране. Точките са оцветени въз основа на процента на вокселна колокализация, картирани към линейна цветна скала (0-1) или въз основа на типа на детектирания обект (NOD1, ●; LC3, ●; NALP3, ●).

Принципен компонентен анализ (PCA) на детектираните молекулярни частици показва чувствителност към лиганда iE-DAP по оста на автофагоцитозния сигналния път с резолюция индивидуален молекулен комплекс, различна от предизвиканата от лиганда LPS

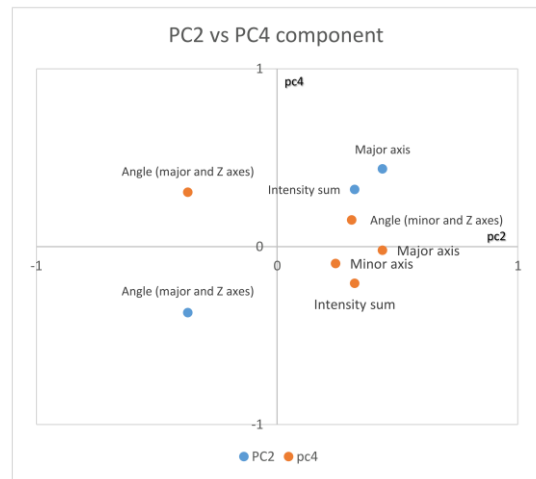
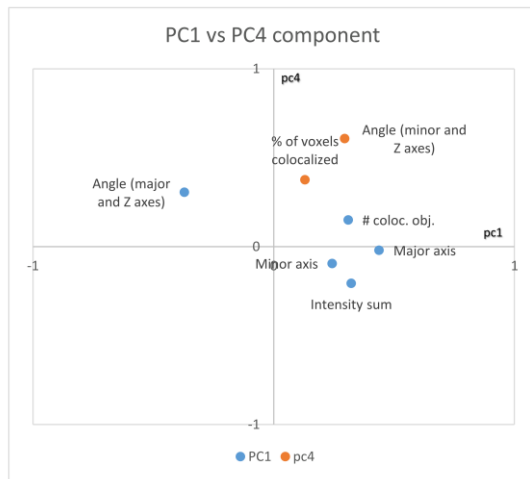
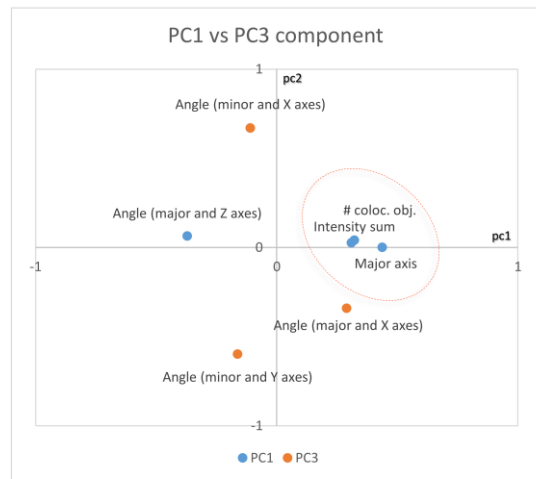
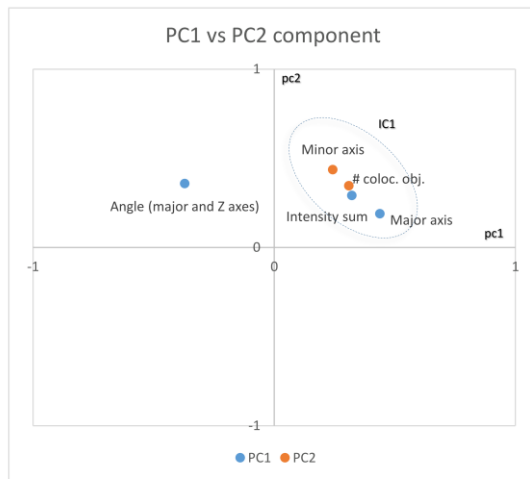
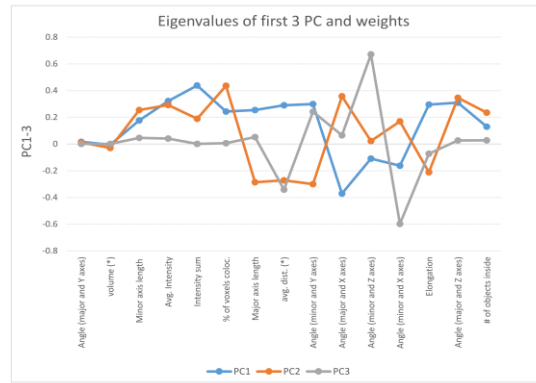
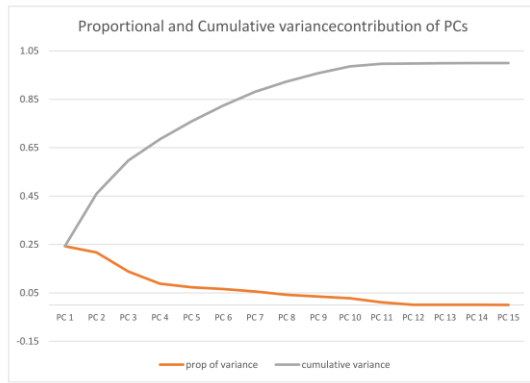
За придобиването на допълнителна яснота по отношение на асоцирането на молекулярно ниво на NOD1, NALP3 и LC3, бе използван методът Принципен компонентен анализ или Анализ на основните компоненти (PCA). Този метод редуцира размерността на данните и тяхното евентуално вътрешно корелиране, и позволи откриването на тези параметри, които имат най-голямо значение за вариабилността на данните, създавайки нови, синтетични променливи с които да се клъстеризират данните. PCA бе осъществен върху данните получени за три-дименсионалните сегментирани обекти, извлечени от конфокалните z-стекови изображения. Процедурата на PCA продуцира множество от линейно некорелиращи си „основни компоненти“ (‘principal components’, PC), редуцирайки размерността на информационното пространство описващо частиците от такова съдържащо променливи които могат да корелират една с друга, до такива които не корелират помежду си.

Трансформиранията данни бяха анализирани за клъстеризиране, като бяха използвани водещите двойки от „основни компоненти“ – PC, които бяха представени като PC изражение на проекциите на обектите съответстващи на флуоресцентно детектираните молекули и разделени в зависимост от лиганда, с който са били стимулирани (Фигура 14, Фигура 15). Така на всяка точка в три-дименсионалната диаграма съответства обект, чиито координати са стойности по двете най-значими „основни компоненти“ – PC1 и PC2, и трета стойност съответстваща на вида третиране (интактни клетки, LPS или iE-DAP третирани клетки). Всяка стойност по осите на „основните компоненти“ съответства на линейна трансформация на вектор, който описва няколко стойности от реалните параметри (напр. ниво на колокализация, обем, интензивност, голям диаметър на частицата и пр.) на изследвания рецептор.

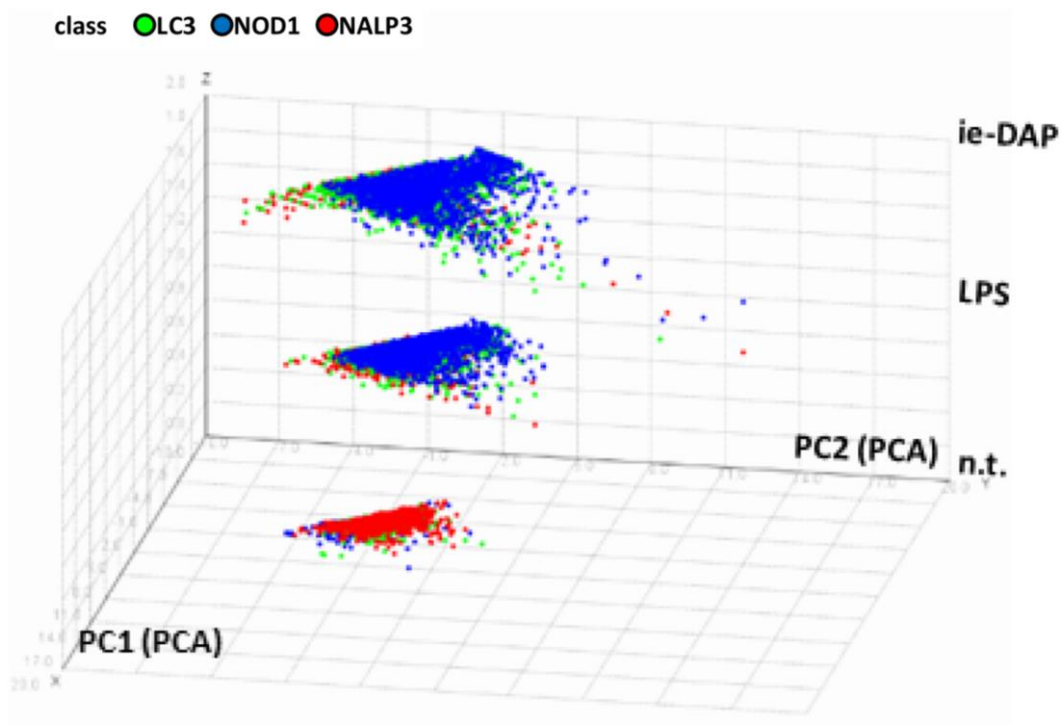
Установено бе, че LPS индуцира преразпределени на платформените молекули NALP3 (проекция по оста PC2) и промени в степента на колокализация на NOD1 и LC3 (проекция по оста PC1) (Фигура 16, плътностни диаграми). Обектите показаха „чувствителност“ при третиране с лиганда iE-DAP.

Тази показана „чувствителност“ може да се „разложи“ на три модалности, които са в съответствие с представяните оригинални параметри от „основните компоненти“: *активация* (сума на флуоресцентния интензитет, „intensity sum“) и *редистрибуция* (средно разстояние на обектите, „average object distance“) на част от NOD1 рецепторите, и LC3 преразпределение и ко-латерална активация (средна дистанция на обектите, процент на вокселна колокализация, „average object distance“, „percentage of voxel co-localization“), като маркер на активирана автофагоцитоза. Успоредно с това, някои платформени NALP3 протеини претърпяват агрегация и ко-локализират с LC3 молекули.

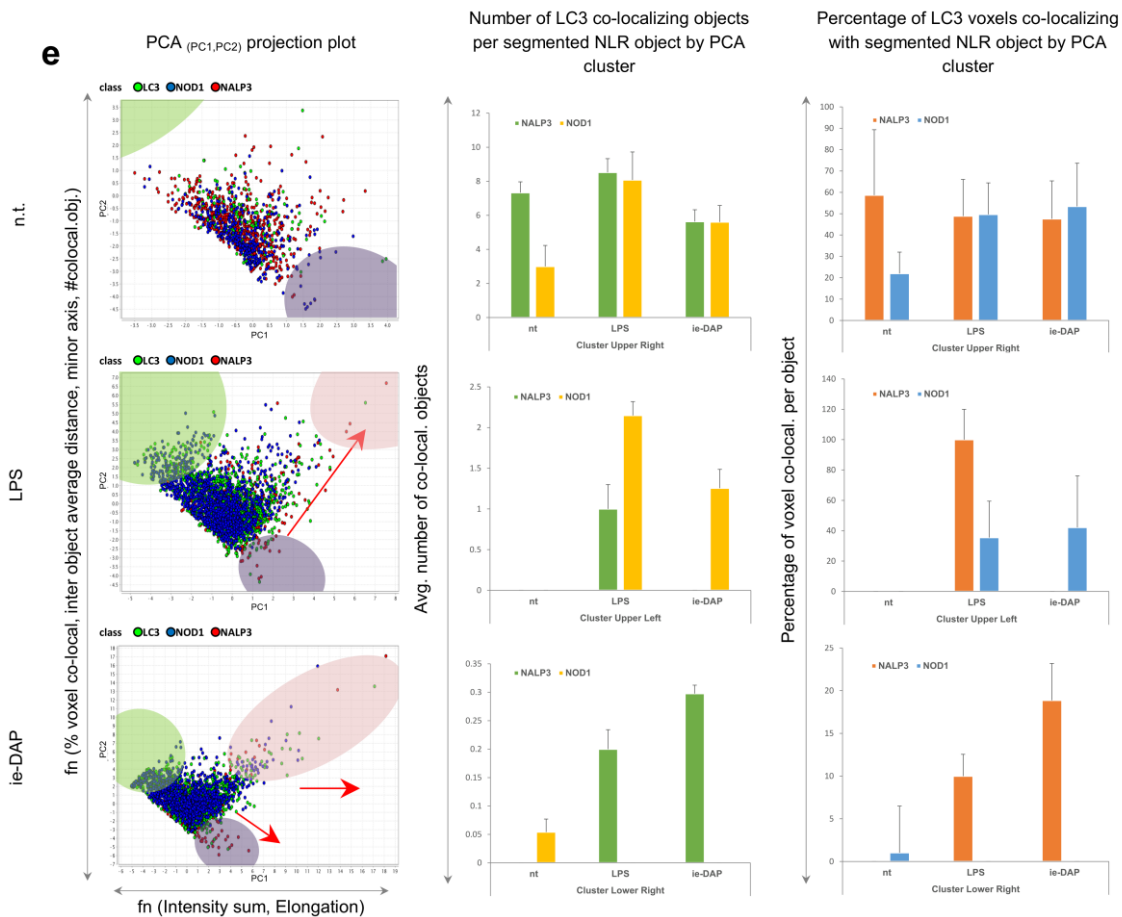
PCA анализът на данните от 3D сегментираните обекти разкри една индиректна чувствителност към лиганда iE-DAP по отношение на сигналния път на автофагоцитозата. Освен това, бе установено, че малък брой NOD1 или NALP3 комплекси във всяка клетка константно ко-локализират с LC3 (Фигура 16, хистограми).



Фигура 14. Линейна графика показваща зависимостта на степента на кумулативна вариация на 12 оригинални атрибута на сегментираните обекти, която се представя от основните компоненти (PC) получени от след анализа PCA, показващо 6-7 основни компоненти да отразяват 80% от нея. Компоненти PC1-4 са най-важни. Айген-стойностите с най-висока вариация, отразяващи основни компоненти 1-3 (PC1-PC3) са изобразени срещу реалните атрибута на обектите, показвайки тези атрибута, които имат най-голямо влияние върху всеки основен компонент. На графиките с 2D координатни системи са представени комбинации на основните компоненти PC1 срещу PC2, PC1 срещу PC3, PC1 срещу PC4, PC2 срещу PC4. На всяка графика са изобразени оригиналните атрибута на обектите с координати (x, y) айген-стойностите им в отделните основни компоненти.



Фигура 15. 3D графика на отделните обекти, представени с координати – основните им компоненти, изчислени въз основа на стойностите на атрибутите им от сегментирането им: PC1 (x), PC2 (y), тип на стимулацията (z). Обектите са кодирани в цвят, в зависимост от вида на молекулата (● NOD1; ● LC3; ● NALP3).

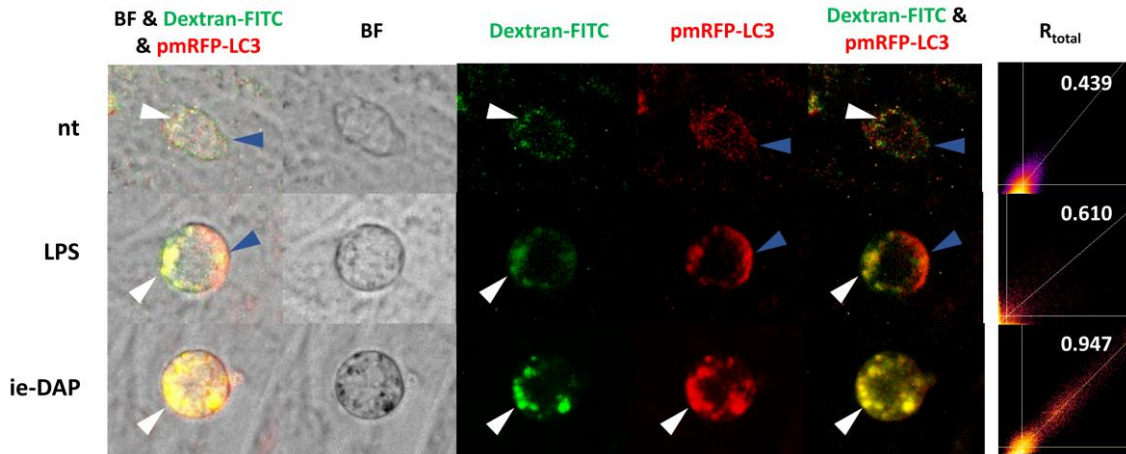


Фигура 16. Селекция на клъстери от обекти, получени след разделянето на обектите сегментирани в клетки стимулирани с iE-DAP. Клъстерите са провизорно оцветени: ● - горен ляв, ● - горен десен ● - долен ляв. Обектите от цялото множество от данни са визуализирани въз основа на според зависещи от вида на стимулирането двуизмерни графики проекции на графиките на триизмерните основни компоненти. Плътноста на колокализация на вокселите и на тази на обектите за сегментирана NLR рецептор и LC3 маркерната молекула са представени по клъстери като хистограми. Данните са представени като средни стойности \pm SD.

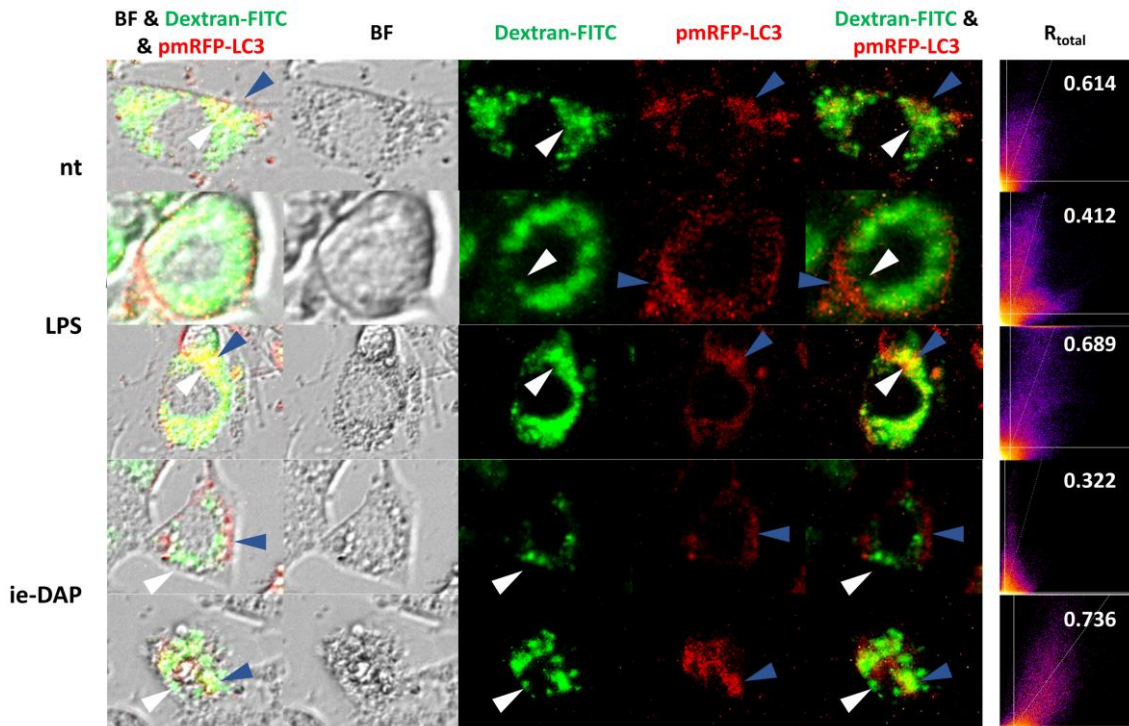
Специфичната стимулация на TLR4 и NOD1 предизвиква асемблиране на автофагозомите и сливане с автолизозомите

Изследвана бе постоянната промяна (поток) на автофагията (Autophagic flux), с проследяване на акумулирането на лизозоми и автофагозоми, и образуванияте след това чрез сливането им автолизозоми. Акумулирането на автофагозоми и лизозоми се увеличи след стимулация с LPS и особено след стимулация с iE-DAP на Сертоли клетки предварително „натоварени“ с FITC Dextran в условия без гладуване (Фигура 17). Това бе манифестирано от феномена на ко-локализиране на емитиращите в червения спектър RFP-белязани зряла форма на LC3 (кодирана от вектора mRFP-LC3), вградили се в образуващите се автофагозоми с маркираните с Dextran лизозоми, след стимулиране с лигандите LPS или iE-DAP.

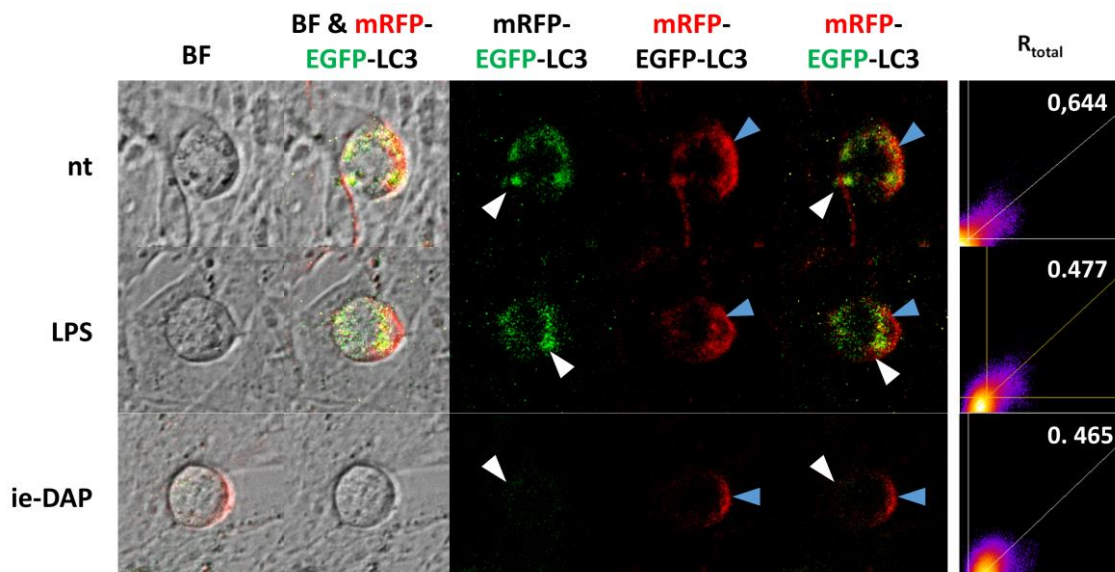
В условия на гладуване (културелна среда без серум и с ниско ниво на глюкоза) се активира пътят на автофагоцитоза. В тези условия, стимулацията с лигандите LPS или iE-DAP води до образуване на две популации, една подобна на тази наблюдавана при условия без гладуване, и една с ниско ново на колокализация между mRFP-LC3 и FITC Dextran, при която лизозомите образуват перинуклеарен ринг, заобиколен от частично припокриващи ги периферно дистрибутирани маркирани с LC3 автофагозоми. Тази разлика във втората популация бе особено изразена след стимулация с лиганда iE-DAP (Фигура 18).



Фигура 17. Клетки на Сертоли (15P-1) предварително натоварени с 1 mg/ml FITC-Dextran за цяла нощ (37°C, 5% CO₂) са трансфектирани с вектора pmRFP-LC3 (24h) и култивирани в стандартна DMEM среда с физиологични нива на глюкоза. След това клетките бяха стимулирани с лигандите LPS или iE-DAP. Бе добавен Chlorgoquine в продължение на 3 часа и клетките бяха анализирани със системата за инвертна флуоресцентна микроскопия на живи клетки ZOE Fluorescent Cell Imager. На флуоресцентните изображения и на тези със светло поле (BF) е показана колокализацията на лизозомите (▲) и автофагозомите (▲). Индексът на колокализация R_{total} е изчислен с помощта на колокализационния модул на софтуера ImageJ (корелационен коефициент на Pearson след автоматично определяне на праговете на флуоресцентните канали по Costes).



Фигура 18. Клетки на Сертоли (15P-1) предварително натоварени с 1 mg/mL FITC-Dextran за цяла нощ (37°C, 5% CO₂) са трансфектирани с вектора pmRFP-LC3 (24h) и култивирани в условия на гладуване в продължение на 4 часа, в безсерумна DMEM среда с намалени нива на глюкоза. След това клетките бяха стимулирани с лигандите LPS или iE-DAP. Бе добавен Chlorgoquine в продължение на 3 часа и клетките бяха анализирани със системата за инвертна флуоресцентна микроскопия на живи клетки ZOE Fluorescent Cell Imager. На флуоресцентните изображения и на тези със светло поле (BF) е показана колокализацията на лизозомите (▲) и автофагозомите (▲). Индексът на колокализация R_{total} е изчислен с помощта на колокализационния модул на софтуера ImageJ (корелационен коефициент на Pearson след автоматично определяне на праговете на флуоресцентните канали по Costes).



Фигура 19. Клетки на Сертоли (15P-1) култивирани в условия без гладуване са трансфектирани с вектора *tfLC3*, кодиращ тандемния протеин *mRFP-EGFP-LC3* (24 часа) и са последващо стимулирани с лигандите LPS или *iE-DAP*, след което са анализирани със система за флуоресцентна микроскопия на живи клетки (ZOE Fluorescent Cell Imager). На флуоресцентните и на светло поле (BF) изображения е показана колокализацията на сигналите от зеления протеин EGFP при инкорпорирането му в автофагозомите (Δ) със сигналите получавани от червения протеин mRFP при сливането на автофагозомите с лизозомите до автолизозоми (\blacktriangle). Индексът на колокализация R_{total} е изчислен с помощта на колокализационния модул на софтуера ImageJ (корелационен коефициент на Pearson след автоматично определяне на праговете на флуоресцентните канали по Costes).

В последствие бе проследена автофагозомната динамика резултат от формирането на автолизозомите под въздействието на стимулиране с лиганди на рецепторите TLR4 и NOD1. В условия без гладуване, клетките на Сертоли са стимулирани за 24 часа или с лиганда LPS или с лиганда *iE-DAP*, като клетките са трансфектирани с вектора *mRFP-GFP-LC3*, кодиращ тандемен флуоресцентен протеин (*tfLC3*) и динамиката на автофагозомите е визуализирана с инвертната система за флуоресцентно образно наблюдение на живи клетки – BioRad ZOE (Фигура 19).

Тандемният протеин *tfLC3* позволява да се разграничат образуващите се автофагозоми от образуващите се автолизозоми въз основа на различната чувствителност на GFP (респективно EGFP) и mRFP към лизозомната среда²⁰. Емитираните флуоресцентни сигнали от mRFP и GFP показват различен модел на вътреклетъчно разпределение. Въпреки, че сигналите получени от GFP ко-локализираха с плътни точки от mRFP в цитоплазмата, една значителна популация от mRFP плътни точки се наблюдава самостоятелно, особено с отдалечаване от перинуклеарната област. Този феномен е особено изявен след стимулиране с *iE-DAP*, показвайки високата степен на фагозомно активиране при формиращите се автофаголизозоми.

3. Изследване на промените във вродения имунен сигналинг индуциран при стимулация на рецепторите TLR4 и NOD1 в клетките на Сертоли

Протеомните данни показаха, че TLR4 и NOD1 активират по различен начин автофагозомните сигнални пътища и пътищата на вродената имунна сигнализация

С помощта на LTQ Orbitrap LS/MS/MS протеомика бяха анализирани промените в протеома на клетките на Сертоли настъпващи в резултат на стимулирането им със специфичните на рецепторите TLR4 и NOD1. За целта клетки на Сертоли, линия 15P-1 приготвени, бяха култивирани от автора и стимулирани с лиганди LPS и *iE-DAP* в продължение на 24 часа, в концентрации - 5 mg/mL. По установена и вече описана методика, пулове от третирани и контролни клетки, бяха използвани за приготвяне на клетъчни лизати, които бяха анализирани в колаборация с група по протеомика с помощта на тандемна течна хроматография и мас-спектрометрия на Thermo LTQ Orbitrap LS/MS/MS, Essex University, Department of Biological Sciences, UK.

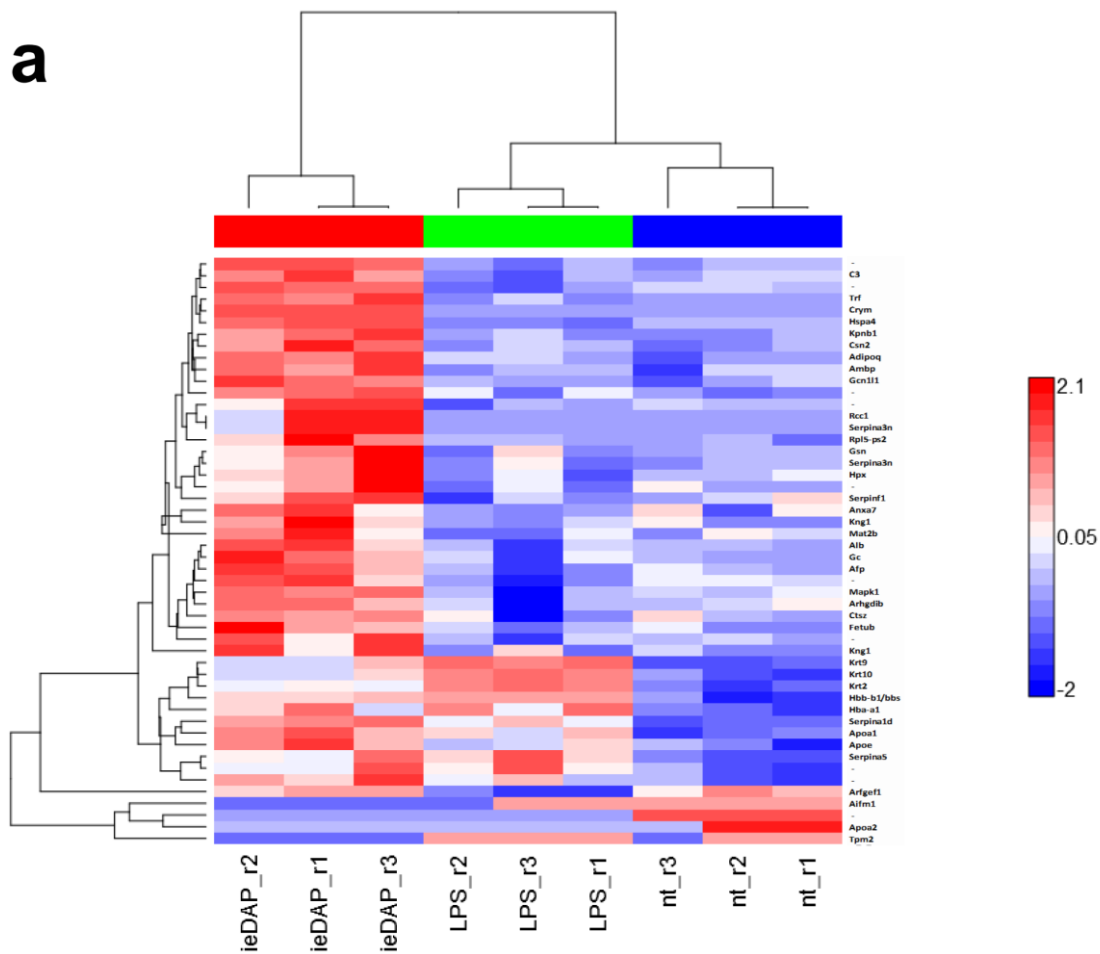
Въз основа на MS/MS спектрите и биоинформатична поточна линия базирана на LabKey инсталирана на сървър в Есекс с помощта на PepProphet, ProteinProphet и софтуера за анализ на спектри и детекция на пептиди и протеини от тандемна мас-спектрометрия X!TANDEM Spectrum Modeler, бяха

идентифицирани около 2295 протеини, които надвишават максималният праг за идентификация (използвани са алгоритми разпознаващи истински от случайни попадения при детекцията на пептиди, FDR има $q < 0.001$). Бяха експортирани IPI, UNIPROT и други картирани идентификатори, вероятност за детекция и вероятности, и количествено параметри като MS/MS Counts и LFQ (Label Free Quantification). С тяхна помощ данните бяха нормализирани по експресия, като бяха използвани изчисления за експресията на всеки протеин въз основа на тези параметри и средните стойности за цялата извадка от протеини. След импутация на липсващи стойности, \log_2 -трансформация и LOESS нормализация данните имаха вид подходящ за сравнение, с балансиране на средната стойност на всяка от глобалните протеинови извадки, за всеки от двата вида стимулиране с лиганди и не-третираната група контролни клетки. Целта бе да се премахне системната грешка и вариация, дължащи се на технически артефакти.

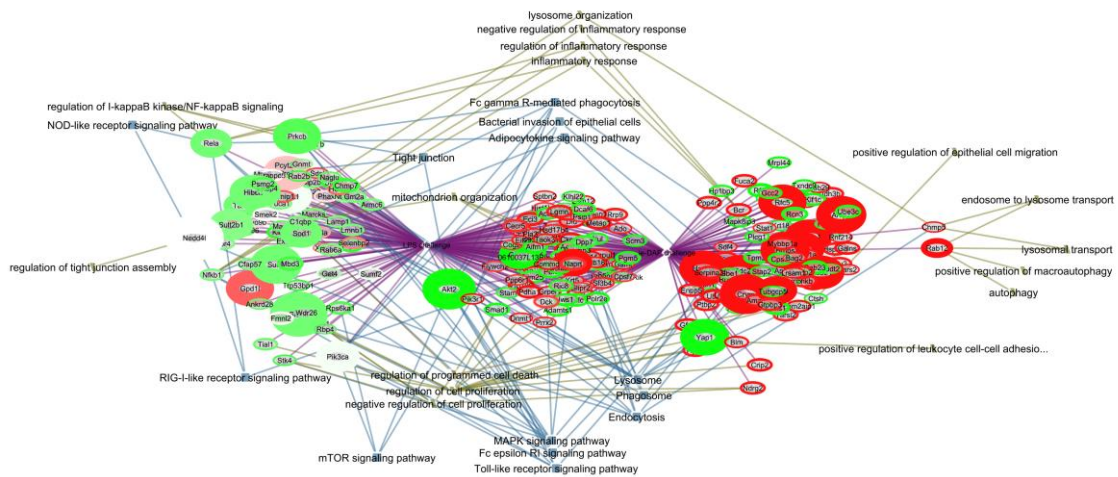
Преработените данни бяха проверени с помощта на основен компонентен анализ (PCA), като PCA групира детектираните протеини по техните експресионни профили (MS/MS Counts и LFQ) в трите групи използвани за стимулиране. Това показва, че трансформацията не е променила данните и те правилно представят изходните оригинали, без загуба на носената специфична информация.

Данните бяха подложени на допълнителен анализ с R-базиран пакет и диференциалните им разлики групирани по протеинов идентификатор и групи на стимулиране бяха оценени с ANOVA с множество сравнение ($p < 0.001$). Идентификаторите на детектираните протеини бяха подложени на двумерен клъстерен анализ (Фигура 20), според промените в експресията им и видът на стимулиращия лиганд. Установено бе, че iE-DAP предимно води до повишаване на експресията на отделни протеини, докато LPS предимно потиска експресията на други. Въз основа на 2295 сигнификантно експресирани протеини (надвишаващи използвания праг на детекция според положително установените MS/MS спектрални характеристики), 135 имаха значими разлики при стимулиране с iE-DAP лиганд, въз основа на сигнификантен FDR (*“false discovery rate”*, очакван дял на фалшивите отклонения). Съответно на тях, лизатите от клетки на Сертоли третирани с LPS лиганд имаха 129 значими разлики при сигнификантна вероятност ($p < 0.001$). Сигнификантно различните групи протеини бяха експортирани в Excel, съотношенията на експресията на стимулирани с лиганд към контролни клетки изчислени за всеки протеин и съхранени във файл, заедно с вероятността получена от ANOVA за сигнификантност на тази разлика.

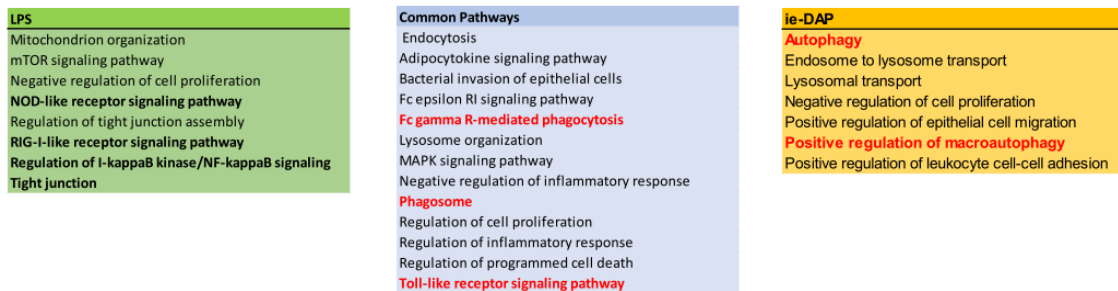
Данните бяха обработени със софтуер за анализ на генно-асоциирани мрежи (EGAN: Exploratory Gene Association Networks). От идентификаторите на протеините от тези две групи (нетретирани сравнени с iE-DAP третирани, и нетретирани сравнени с LPS третирани), бе конструиран с помощта на софтуера EGAN (и заложените в него аналитични алгоритми за анализ на мрежи) хиперграф (Фигура 21) отразяващ статистически генно-обогатени и мрежово-свързани диференциално експресирани протеини („gene enrichment and network linkage analysis hypergraph of differentially expressed proteins“), аотиран с 1) метаданни за участие в сигнални пътища дефинирани в базата данни KEGG чрез анализ на ко-инцидентна генна експресия и 2) Генно-онтологични термини за Биологични процеси (Фигура 22). Протеиновите идентификатори, които бяха статистически „обогатени“ в конкретни сигнални пътища, бяха подразделени на 1) такива регулирани общо, и такива – 2) специфично регулирани от LPS или 3) специфично регулирани от iE-DAP. Сигнификантно „обогатените“ сигнални пътища (от EGAN), бяха групирани в 1) Общи сигнални пътища (за двете лигандни стимулирания – LPS и iE-DAP) и 2) LPS или 3) iE-DAP специфични сигнални пътища. Общи сигнални пътища дефинирани в KEGG, които заслужават да се споменат са „Регулиране на програмираната клетъчна смърт“, „Лизозомно организиране“, „Fc-гама рецептор медирана фагоцитоза“ и „Фагозомен сигнален път“, докато LPS стимулирането обогати специфично „mTOR сигналния път“, „Сигнален път NF- κ B“ и „Сигнален път на плътните контакти“. iE-DAP от друга страна обогати „Сигнален път на Автофагоцитозата (Автофагията)“, „Лизозомен транспорт“, и „Позитивна регулация на макро-автофагоцитозата“ (Фигура 22). Стимулирането на който и да е от двата рецептора също обогати „Сигнален път на Toll-подобните рецептори“, докато LPS стимулирането специфично обогати „Сигнален път на NOD-подобните рецептори“ и „Сигнален път на RIG-I-подобните рецептори“, в подкрепа на експериментално установената по-рано кръстосана сигнализация. Повечето протеини, чиято експресия бе сигнификантно променена от стимулация с LPS/iE-DAP бяха част от сигналните пътища на „Клетъчна пролиферация, Лизозомен и Ендокитозен път“ (Фигура 23).



Фигура 20. Стимулацията със специфични лиганди на рецепторите TLR4 и NOD1 активира по различен начин сигналните пътища на автофагоцитозата и вродения имунитет. Картиране тип „Heat map“ представящо \log_2 -трансформирани, LOESS нормализирани данни за експресията на сравнените по двойки клетки на Сертоли стимулирани с LPS или iE-DAP с нестимулирани контролни клетки. Вертикалната дендрограма (разположена отгоре) представлява непредубедена (без надзор) йерархична клъстеризация („unsupervised hierarchical clustering“), изчислена с помощта на функция за пълна свързваща корелация („Complete Linkage Correlation“). Горизонталната дендрограма (разположена в ляво) клъстеризира индивидуалните протеини, които се били избрани като сигнификантно различни по експресия при различни условия на стимулиране с помощта на ANOVA статистически анализ. Клъстеризирането е направено с помощта на функция за медианна свързваща корелация („Median linkage Correlation“). Общия брой протеини детектирани от всички условия на стимулиране и контролите бе 2295, от които 135 бяха iE-DAP, а 129 бяха сигнификантно различни между стимулираните с LPS, определено със статистическия метод ANOVA (критерии $p < 0.001$). Протеините без имена имат само IPI идентификатор, но не и наименование в UNIPROT.



Фигура 21. Анализ със статистическо „обогатяване“ на гени и моделиране на мрежова свързаност („gene enrichment and network linkage analysis“) генериран със софтуера EGAN („Exploratory Gene Association Networks“). Бе генериран хиперграф на диференциално експресирани протеини детектирани с помощта на LTQ Orbitrap LS/MS/MS протеомика на лизати на клетки на Сертоли стимулирани с лигандите LPS или iE-DAP (24ч) и контролни клетки, изчисление на ко-инцидененс на мета-данни сигнални пътища, и на термини за биологични процеси аотирани в Генната онтология. Показани са „обогатените“ протеини с EGAN, като статистическата вероятност е изразена с дебелината на кръгчетата ограждащи генните наименования, а посоката на промяна на експресията е показана с цвят – свръх-регулиране на генна експресия спрямо нетретирани Сертоли клетки – червен цвят, потискане на генна регулация – зелен цвят.



Фигура 22. Сигнификантни променени сигнални пътища (EGAN), въз основа на „обогатените“ протеини които са част от тях. Сигналните пътища са групирани като Общи сигнални пътища („Common Pathways“) и специфично засегнати от стимулиране с LPS и с iE-DAP лиганд Специфични сигнални пътища.

Транскриптомни данни, получени от дълбоко секвениране от ново поколение показват различен набор инфламазомни молекули в клетките на Сертоли, в сравнение с макрофагите, и наличие на необходимите адапторни молекули за активирането им

Експерименталните данни получени в този научен труд относно инфламазомата NALP3 показват по-слаба и нетипична активация при сравнение с двустъпковия модел на активирането и в макрофаги и неутрофили. По тази причина, публично налични „сурови“ данни (първични файлове получени от платформата за секвениране, без биоинформатична и статистическа преработка, съдържащи само детектираните нуклеотидни последователности), получени от дълбоко секвениране на транскриптома на миши клетки на Сертоли и миши макрофаги (Фигура 24) бяха преработени чрез биоинформатичен поток, като данните бяха филтрирани за грешки, подравнени към референтен миши транскриптом (версия mm9) и анализирани с пакета “Tuxedo” на института Broad към Института по технологии на Масачузетс (Фигура 24).

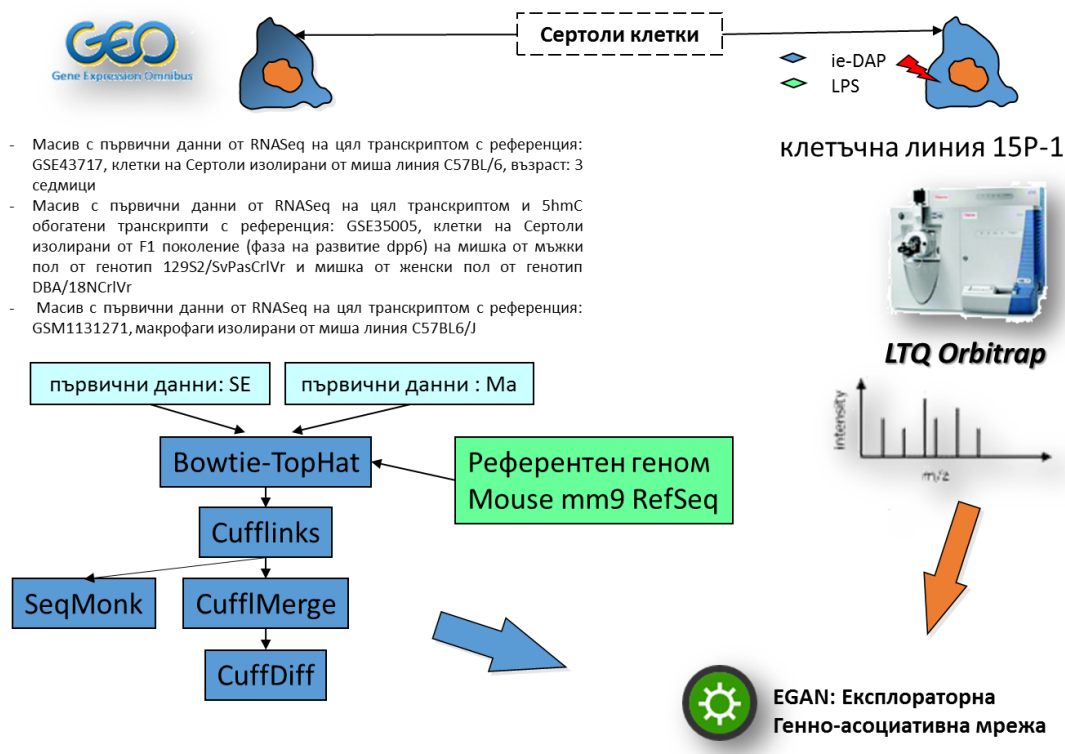
Бяха изследвани следните първични масиви с данни от дълбоко секвениране (секвениране от ново поколение): (1) Масив с първични данни от RNASeq на цял транскриптом (секвениране от ново поколение на цял транскриптом) публикувани под референция GSE43717, представляващи секвениране на целия пул РНК от изходен материал от клетки на Сертоли изолирани от миша линия C57BL/6 на възраст 3 седмици. Използвана е технология на секвениране: Illumina Genome Analyzer II (*Mus musculus*). Първичните данни са публикувани в „Gan H, Wen L, Liao S, Lin X et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine during mouse spermatogenesis. Nat Commun (2013);4:1995. PMID: 23759713“;

(2) Масив с първични данни от RNASeq на цял транскриптом и 5hmC обогатени транскрипти (метилационно профилиране) публикувани под референция GSE35005, представляващи секвениране на целия пул РНК от изходен материал от клетки на Сертоли изолирани от F1 поколение (фаза на развитие dpp6) на мишка от мъжки пол от генотип 129S2/SvPasCrIVr и мишка от женски пол от генотип DBA/18NCrIVr. Използвана е технология на секвениране: Illumina Genome Analyzer II (*Mus musculus*). Първичните данни са публикувани в „Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. Cell Rep (2013) Jun 27;3(6):2179-90. PMID: 23791531“;

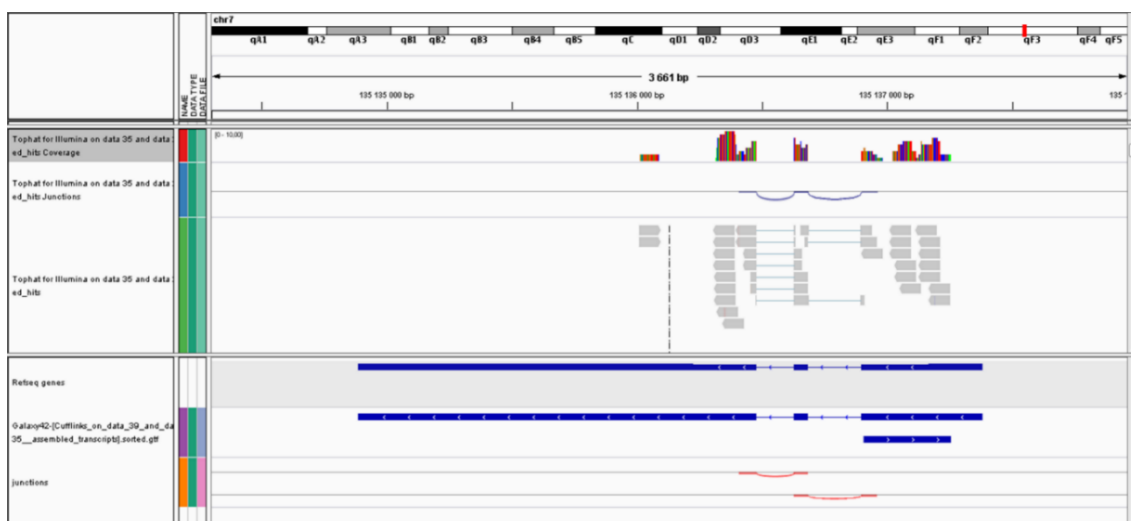
(3) Масив с първични данни от RNASeq на цял транскриптом (секвениране от ново поколение на цял транскриптом) публикувани под референция GSM1131271, представляващи секвениране на целия пул РНК от изходен материал от макрофаги изолирани от миша линия C57BL6/J. Използвана е технология на секвениране: Illumina HiSeq 2000 (*Mus musculus*). Първичните данни са публикувани в „Heinz S, Romanoski CE, Benner C, Allison KA et al. Effect of natural genetic variation on enhancer selection and function. Nature (2013) Nov 28;503(7477):487-92. PMID: 24121437“.

Биоинформатичната поточната линия за РНК-секвениране (RNA-Seq) “Tuxedo” (Broad, MIT, MA, USA) се състои от програмата TopHat картираща снадени прочети (от секвениране), която съдържа имплементиран алгоритъм Bowtie или Bowtie 2 за подравняване на прочетите към референтна секвенция (цял транскриптом или цял геном), като следваща стъпка е софтуерния инструмент Cufflinks, който позволява асемблирането (сглобяването) на транскрипти, оценка на тяхното количество, тестване на диференциална експресия и регулация на RNA-Seq секвенциите.

Потоъкът прочита огромно множество от кратки прочети получени от секвенирането, TopHat използва Bowtie да ги подравни към референтен геном/транскриптом (Фигура 25). В случая е използван глобален миши транскриптом (версия mm9), към който TopHat подравнява RNA-Seq секвенциите. Получените подравнени данни се сглобяват с Cufflinks. TopHat също детектира и места на снаждане, сравнявайки секвенциите които са прочетени и референтния транскриптом. Откритите места на снаждане са изобразени и в отделни изображения (Фигура 25, канал “junctions”).



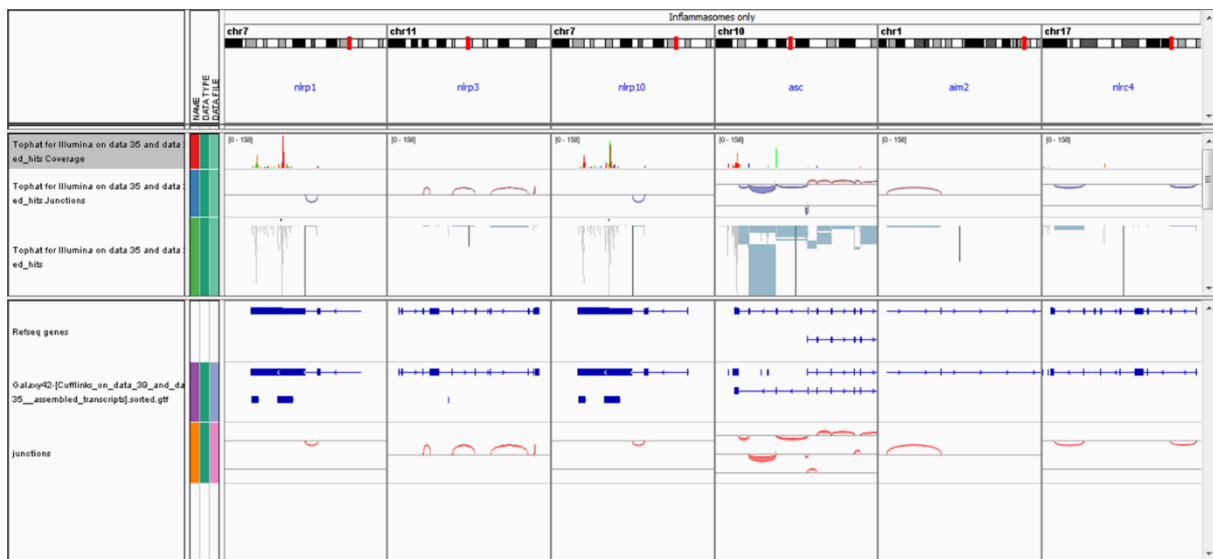
Фигура 24. Алгоритъм за комбиниран анализ на транскриптомни данни (налични в първичен, необработен вид в публична база данни) и протеомни данни (получени експериментално от автора и колеги в Университета на Есекс, Великобритания). Първични данни за секвенирани транскрипти с технология на Illumina NGS от клетки на Сертоли и макрофаги са обработени за грешки, подравнени към референтния глобален миши транскриптом (версия mm9), сравнени за разлика в експресията на база количество обогатени транскрипти подравнени към отделен ген. Данните са експортирани към Integrative Genomics Viewer (IGV) и към софтуера SeqMonk, за друг вид оценка на диференциалната експресия. Данните от гените, чиито транскрипти имат диференциална разлика между клетки на Сертоли и макрофаги са сравнени в построен с помощта на EGAN хиперграф, с данните за съотношения на експресията при третирани и нетретирани клетки на Сертоли с лиганди на рецепторите TLR4 и NOD1.



Фигура 25. Визуализирани са зоните покрити от секвенираните транскрипти подравнени към генът Nlrp3 в миши референтен транскриптом (RefSeq, mm9) с помощта на Bowtie и Tophat алгоритми. Показан е анализ на експресираниите екзони и предсказаните връзки между екзони и сравнение с различните възможни изоформи кодирани в генома. Генът Nlrp3 кодира инфлазомата NALP3. Фигурата е създадена със софтуера Integrative Genomics Viewer (IGV) на института Broad (Бостън, САЩ).

Отделните подравнявания с Cufflinks се събират заедно с Cuffmerge, а разликите в интерпретираните експресии се определя с Cuffdiff. В анализираният множество от RNA-Seq данни бяха открити секвенции подравняващи се към референтните гени на инфламазома Nlr4. Тази инфлазама бе експресирана като снадена иРНК, която според Cufflinks съответства напълно на пълния набор екзони, кодирани от референтния ген.

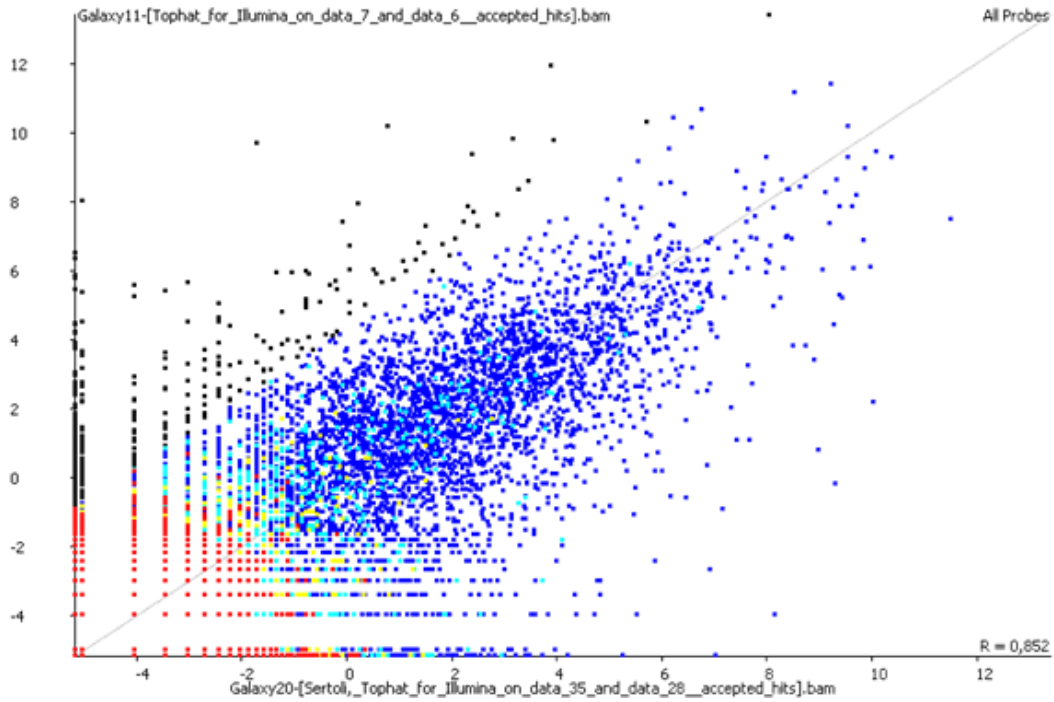
По подобен начин бяха претърсени всички гени кодиращи инфлазами и адапторните им протеини в асемблирания транскриптом на клетките на Сертоли. Със софтуера за визуализиране на тези данни Integrative Genomics Viewer (IGV) на института Broad (Бостън, САЩ) бе установено наличие на прочити в мишите клетки на Сертоли подравняващи се само към инфлазамите Nlrp1, Nlrp3, Nlrp10, Nlr4 и гените на адапторните протеини Asc и Aim2. Установени бяха няколко експресионни варианта с различно снаждане на гена за Asc. С два варианта на снаждане са представени и гените кодиращи Nlrp1 и Nlrp10, докато Nlrp3 е представен само с варианта кодиран в референтния геном (Фигура 26).



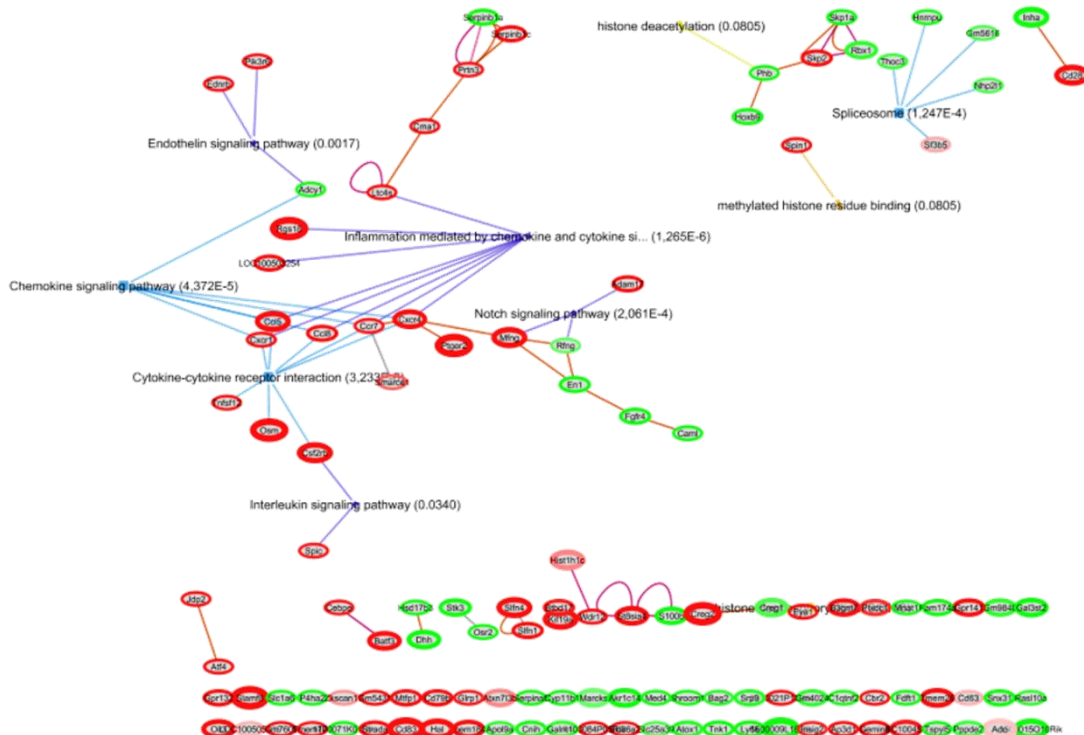
Фигура 26. Визуализирани са зоните покрити от секвенираните транскрипти подравнени към гените Nlrp1, Nlrp3, Nlrp10, Asc, Aim2, Nlr4 в миши референтен транскриптом (RefSeq, mm9) с помощта на Bowtie и Tophat алгоритми. Показан е анализ на експресираните екзони и предсказаните връзки между екзони и сравнение с различните възможни изоформи кодирани в генома. Гените Nlrp1, Nlrp3, Nlrp10, Asc, Aim2, Nlr4 кодират различни инфлазами и акцесорните протеини Asc и Aim2. Гените кодиращи останалите възможни инфлазами не са показани, т.к. нямат подравнени секвенирани последователности, т.е. не са експресираны. Инфлазамите Caspase-1 и Nlrp1 имат CARD домейн. Фигурата е създадена със софтуера Integrative Genomics Viewer (IGV) на института Broad (Бостън, САЩ).

В този дисертационен труд бе използвано сравнение на експресионните нива определени с помощта на Tophat (Cufflinks, CuffDiff) между миши клетки на Сертоли и макрофаги (Фигура 27), с цел определяне на разликите в регулацията между професионалните антиген-представящи клетки каквито са макрофагите и непрофесионални, но също антиген-представящи клетки, каквито са клетките на Сертоли.

Използвайки технологията за обогатяване на статистически значими разлики в гена или протеинова експресия EGAN, бе построен хиперграф, който да свърже гените различно експресираны в клетките на Сертоли и макрофагите и да свърже тези гени с анотирани сигнални пътища (Фигура 28). Основни разлики бяха в сигнални пътища и молекули свързани с цитокинов и хемокинов сигналинг, особено такива свързани с възпаление, както и интерлевкинови рецептори и транскрипционни фактори детерминиращи макрофажната диференциация и функция. Други основни разлики бяха открити в молекули участващи в хистоновата регулация (ацетиране, метилиране).



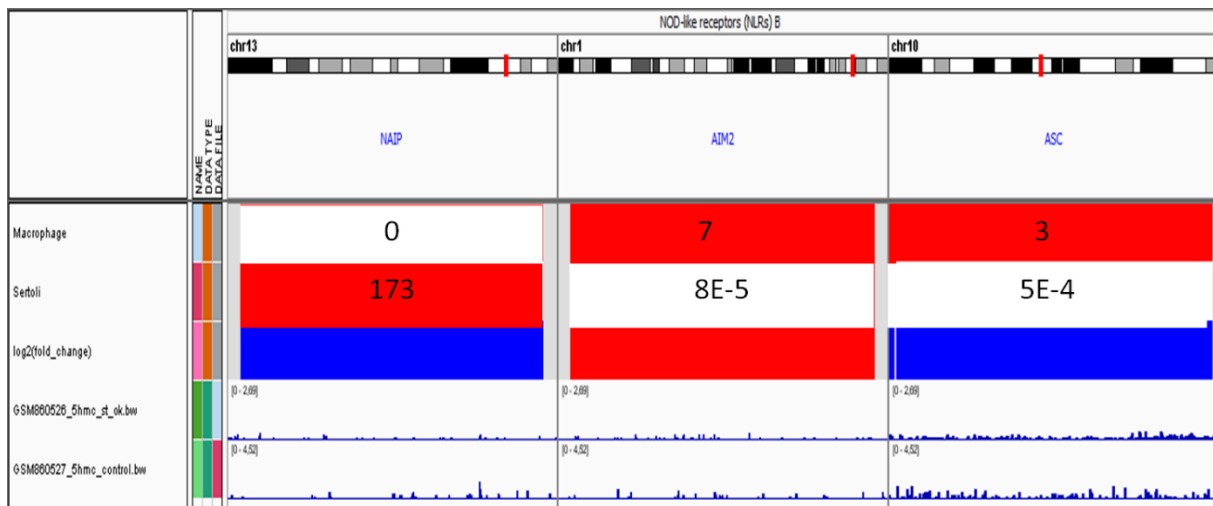
Фигура 27. Сравнение на експресионните нива определени с помощта на Tophat (Cufflinks, CuffDiff) между миши клетки на Сертולי и макрофаги. На корелационния анализ всеки ген е представен с една точка, която показва логаритмичното съотношението на експресиата и при двата вида клетки. Маркираните в черно гени са свръх-експресирани само в макрофаги.



Фигура 28. Построен с EGAN хипергеометричен граф на статистически обогатени гени, чиито транскрипти са били установени да са сигнификантно различно експресирани между клетките на Сертולי и макрофагите. Показани са „обогатените“ протеини с EGAN, като статистическата вероятност е изразена с дебелината на кръгчетата ограждащи генните наименования, а посоката на промяна на експресиата е показана с цвят – свръх-регулиране на гена експресия спрямо нетретираните Сертולי клетки – червен цвят, потискане на гена регулация – зелен цвят.

Разликите в транскрипционните профили бяха използвани допълнително за характеризиране на репертоара на вродения имунен отговор в клетките на Сертоли. За тази цел бе използван алгоритъмът в софтуера SeqMonk за определяне на т.нар. „сонди“, като в случая това бяха дефинициите на гените от вродения имунен сигналинг и инфламазомите. След претърсване на данните от TopHat/Cufflinks и определяне на позициите на картиране на тези транскрипти в цялото секвенирано множество, бе използван алгоритъм, който да направи разлика (относителна) в експресията на транскриптите (всички експресионни варианти бяха отчетени като един ген) между макрофагите и Сертоли клетките. Бе установено, че клетките на Сертоли експресират Tlr2 и Tlr4 слабо (спрямо експресията им в макрофагите), докато Tlr13 имаше висока експресия. Най-интересен бе резултатът с Tlr3, при който клетките на Сертоли експресираха транскрипти на този ген по-силно от макрофагите.

При сравняването на адапторните протеини на инфламазомите и инфламазомата NLRC4, бе установено, че Aim2, и Asc са в порядъци по-слабо експресирани в клетките на Сертоли, отколкото в макрофагите, което би довело до силно намаляване на скоростта на образуване на активни инфламазоми и продукцията на големи количества цитокини (Фигура 29). От друга страна, инхибиторната инфламазома NAIP показва много по-високо ниво на транскрипти в клетките на Сертоли, в сравнение с макрофагите.

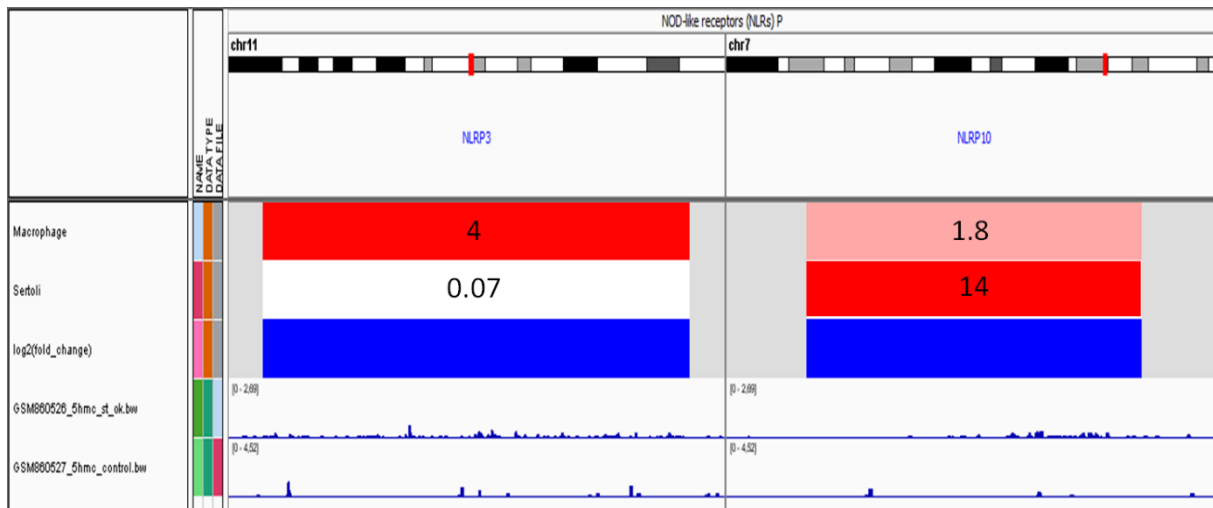


Фигура 29. Диференциална експресия на гени кодиращи NAIP инфламазомата и адапторните протеини AIM2 и ASC от системата на вроден имунен отговор, определени с NGS транскриптомен анализ, Tophat и алгоритъм за диференциална експресия на софтуера SeqMonk.

Изследването на рецепторите от семейството на NOD, показва, че NOD1 е експресиран и в двата клетъчни вида, докато NOD2 е слабо експресиран в нестимулирани клетки, особено в клетките на Сертоли. Инфламазомата NLRC4 разгледана по-горе бе експресирана по-силно в макрофагите.

Интересно бе да се установи и по-силната експресия на инфламазомата NALP10 в клетките на Сертоли, докато изследваната най-подробно в този дисертационен труд инфламазома NALP3 бе относително силно експресирана в макрофаги и доста слабо в нестимулирани клетки на Сертоли (Фигура 30). Подобно на NALP3 и двете форми на NALP1 бяха по-силно застъпени в макрофагите. Трябва да се отбележи, че много малките стойности за експресия на показани от анализа на данни от дълбоко секвениране не съответстват пряко на данните от експериментално проследената експресия на протеиново ниво. Причината е в това, че посочените данни за експресия са определени като log₂ RPM („reads per feature per million reads of library“) – трансформирани като двоичен логаритъм прочети на „ген“ нормализирани за един милион прочета от библиотеката. Важно е да се обърне внимание, и че всички екзони са събрани заедно за да се получи по един ген, без разбиване по изоформи. По този начин на стойност 0.07 съответства 1.049 прочета на милион прочети в библиотеката.

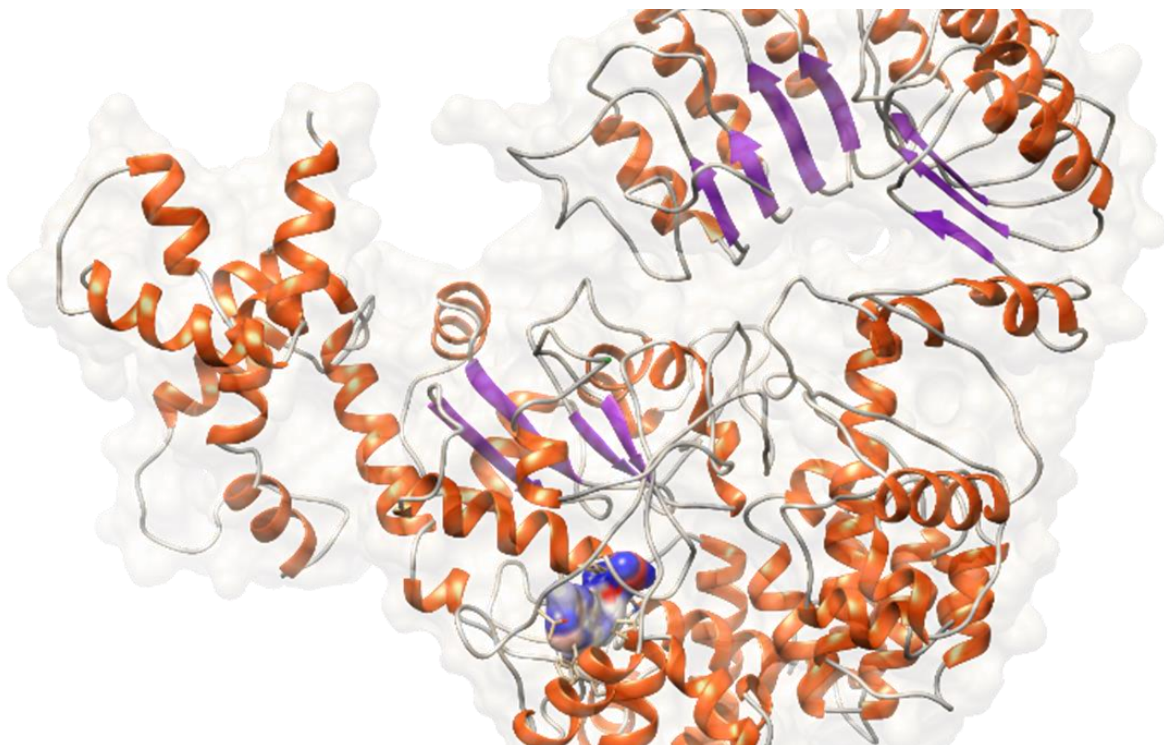
При 10-15 милиона прочета за цял транскриптом на бозайник, това би съответствало на 10-15 копия



Фигура 30. Диференциална експресия на гени кодиращи инфлазасомите NALP3 и NALP10 от системата на вроден имуен отговор, определени с NGS транскриптоманализ, Tophat и алгоритъм за диференциална експресия на софтуера SeqMonk.

Инфлазасомата NALP3 в мишиите клетки на Сертоли има аденозин ди-фосфат (АДФ) свързваща кухня, предоставяйки механистично средство за негативна само-регулация.

За да бъде установена причината за по-нетипичното поведение на инфлазасомата NALP3 в клетките на Сертоли, в този дисертационен труд бе генериран структурен модел на част от NALP3. За целта бе използвана нуклеотидната последователност, получена от пълно секвениране на миши BALB/c клетки на Сертоли, от която бе определена съответната и аминокиселинна последователност и последната моделирана с алгоритъм комбиниращ шаблон-базирано структурно моделиране с de novo моделиране на липсващите части (Фигура 31).

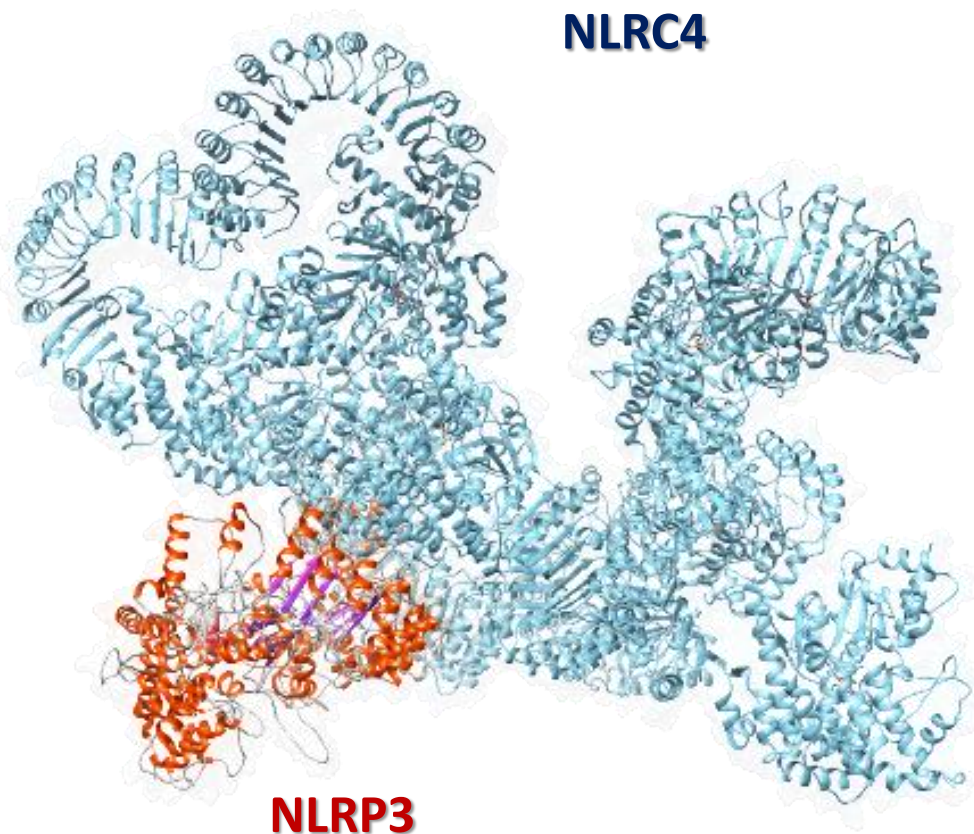


Фигура 31. Структурен модел получен от автора *in silico* на инфлазасомата NALP3, генериран с помощта на определяне на точната аминокиселинна последователност на молекулата въз основа на публични транскриптомни данни за секвенцията на гена Nlrp3 в миши Сертоли клетки, линия BALB/c. Инфлазасомата NALP3 в мишиите клетки на Сертоли има аденозин ди-фосфат (АДФ) свързваща кухня, предоставяйки механистично средство за негативна само-регулация, подобно на описани другаде инфлазасоми.

В кристалографски структурен модел на друга инфлазозмна молекула - NLRC4 (Hu и съвт. 2013), е показано, че С-терминалният домейн обозначен като „богат на левцин повтор“ (LRR) е разположен по такъв начин, че стерично (пространствено) да запушва едната част на нуклеотид-свързващия домейн (NBD) и в следствие да задържа молекулата в мономерно (неактивно) състояние. Нуклеотид свързващия домейн (NBD) и крилато-спиралния домейн (WHD) са критични при стабилизирането на затворена конформация на инфлазозмата NLRC4 (Hu и съвт. 2013). Разграждането на АДФ-медираните взаимодействия NBD-WHD и NBD-HD2/NBD-LRR водят до активация на NLRC4.

В настоящият труд, полученият *in silico* модел на NALP3 бе суперпозиран (наложен) с кристалографския модел на NLRC4 (Фигура 32) и показва голяма степен на стерично сходство с мястото на свързване на АДФ. Последното бе установено с *in silico* докинг симулация, показваща модел на свързване на АДФ към съответния моделиран домейн на NALP3 (Фигура 31, Фигура 32).

Бе установено, че това структурно сходство вероятно показва същия модел на авто-инхибиция на NALP3, подобно на притежавания и описан за NLRC4. От друга страна, разликата в други важни за регулацията домейни между NALP3 и NLRC4, подсказва друг механизъм на активация, който би обяснил и някои различни модели на активация на NALP3 от АДФ установени експериментално в този дисертационен труд.



Фигура 32. Моделирана от автора суперпозиция на молекулен модел на домейн от инфлазозмата NALP3 и цялата молекула на инфлазозмата NLRC4. Кристалографски е установено (Hu и съвт. 2013), че при подобна молекула - С-терминалният домейн обозначен като „богат на левцин повтор“ (LRR) е разположен по такъв начин, че стерично (пространствено) да запушва едната част на нуклеотид-свързващия домейн (NBD) и в следствие да задържа молекулата на в мономерно (неактивно) състояние.

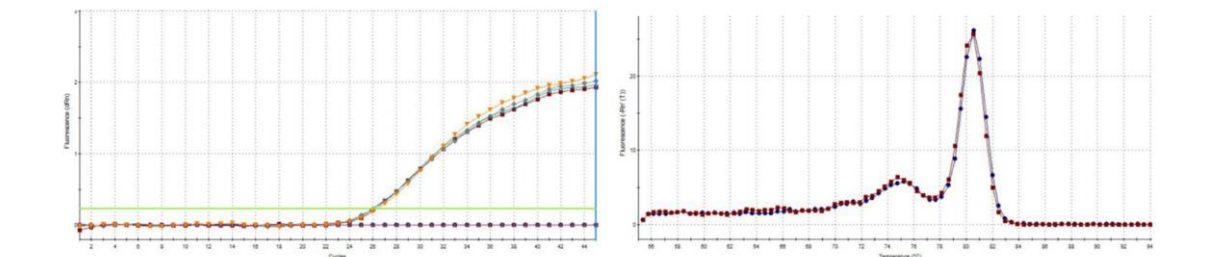
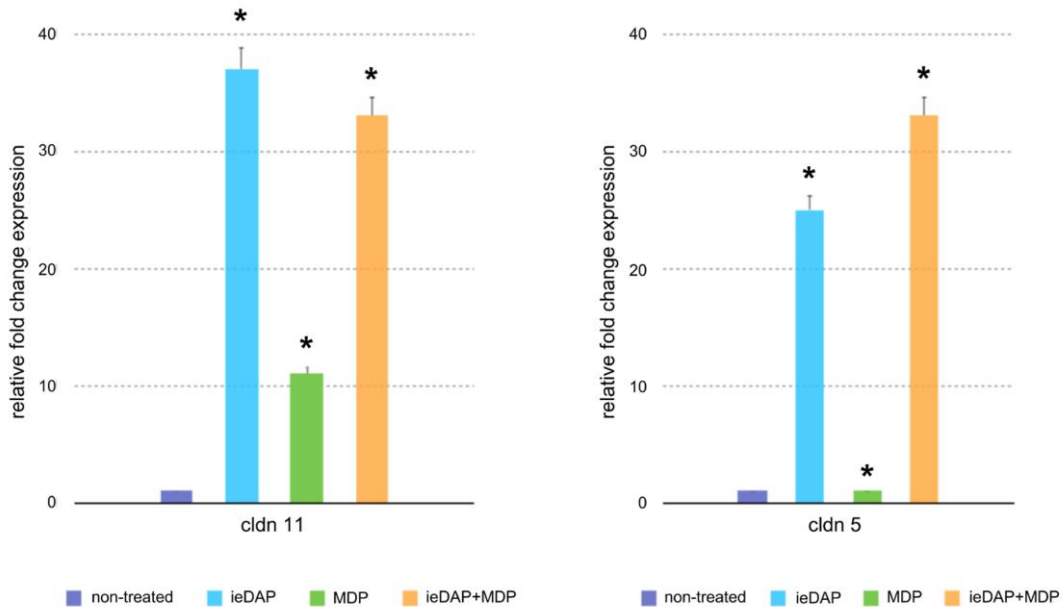
4. Молекули участващи в клетъчните контакти, с роля за патологията на репродуктивните стволони ниши и значение за имуно-медиирания инфертилитет

Промени в протеините на клетъчните контакти в следствие на активиране на рецептора NOD2 в клетките на Сертоли, формиращи мъжката репродуктивна стволова ниша

Следвайки получените данни от LTQ Orbitrap протеомиката и данните, получени от предсказаните потенциални протеини с помощта на двуизмерна гел-електрофореза, бе интересно да се проследи експресия на протеини, свързани с плътните междуклетъчни контакти, каквито са claudin и occludin.

За тази цел клетки от Сертоли клетъчната линия 15P-1 бяха третирани с лигандите iE-DAP и MDP самостоятелно и в комбинация. Отделно, част от клетките бяха предварително трансфектирани с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*. От клетките беше изолирана РНК с помощта на специален кит, като бяха спазени всички изисквания на производителите. С помощта на обратно-транскриптазна реакция, бе направена копи-ДНК и последваща полимеразно-верижна реакция със специфични праймери за claudin 5 и claudin 11. Въз основа на автоматичен праг, определен от софтуера на Stratagene бе изчислен Ct за съответната амплификация и бяха изчислени относителните нива на експресия спрямо контролните клетки, по метода $\Delta\Delta Ct$ на Pfaffl.

Получените резултати показаха увеличаване на генната експресия на двете изследвани молекули (claudin 5 и claudin 11) след действието на двата лиганда самостоятелно и в комбинация. По-силен ефект имаше активатора на NOD1 рецептора - лиганда iE-DAP (Фигура 33).



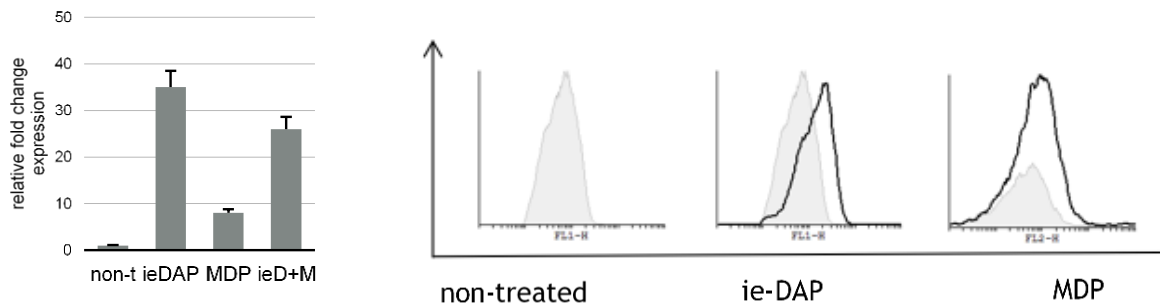
Фигура 33. RT-qPCR анализ на генната експресия на claudin5 и claudin11, представена като log промяна (Pfaffl, $2^{\Delta\Delta Ct}$). Анализ на claudin5 и claudin11 експресията в 15P-1 Сертоли клетъчна линия, чрез обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция след специфично третиране на клетките с лигандите iE-DAP и MDP. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05; s.d., n = 3.

В условия на генно заглушаване на *Nlrp3* и след третиране на клетките с лиганда MDP нивата на claudin 11 бяха увеличени значително, в сравнение с тези в контролните клетки. Експресионните нива на двете изследвани молекули (claudin 5 и claudin 11) бяха увеличени в клетките, които са трансфектирани (генно заглушаване на *Nlrp3*) и третирани с комбинация от двата използвани лиганда - iE-DAP и MDP.

Клетки от първичната клетъчна линия и от Сертоли клетъчната линия 15P-1 бяха третирани с лигандите iE-DAP и MDP самостоятелно и в комбинация. Отделно, част от клетките бяха предварително трансфектирани с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*. От клетките беше изолирана РНК с помощта

на специален кит, като бяха спазени всички изисквания на производителите. С помощта на обратно-транскриптазна реакция, бе направена копи-ДНК и последваща полимеразно-верижна реакция със специфични праймери за *occludin*. Въз основа на автоматичен праг, определен от софтуера на Stratagene бе изчислен Ct за съответната амплификация и бяха изчислени относителните нива на експресия спрямо контролните клетки, по метода $\Delta\Delta C_t$ на Pfaffl.

Живи клетки от двете изследвани клетъчни линии (първична култура и 15P-1) бяха третирани с лигандите iE-DAP и MDP. Част от клетките бяха предварително трансфектирани с малки интерфериращи РНК-и срещу *Nlrp3*. Чрез проточна флоуцитометрия със специфично антитяло срещу *occludin* бяха отчетени протеиновите нива на експресия на изследваната молекула.



Фигура 34. Анализ на експресията на *occludin* в клетки, изолирани от пре-пубертетни мишки, чрез обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция и проточна флоуцитометрия, след специфично третиране на клетките с лигандите iE-DAP и MDP. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; s.d., $n = 3$.

Резултатите от обратно-транскриптазната полимеразно-верижна реакция показаха увеличаване на генната експресия на *occludin* в първичната пре-пубертетна клетъчна линия след действието на лиганда iE-DAP (Фигура 34). Третирането на клетките с MDP също доведе до значително увеличаване на генната експресия на *occludin*, но в сравнение със специфичният лиганд за NOD1 рецептора нивата на иРНК експресия бяха по-ниски. Комбинираното третиране на клетките с двата лиганда доведе също до увеличаване на експресията на транскриптите на *occludin* в първичната клетъчна култура (Фигура 34).

Протеиновата експресия на *occludin* следваше подобен характер. След iE-DAP третирането бяха отчетени високи нива на експресия на *occludin* в сравнение с нетретираните клетки в пре-пубертетните Сертоли клетки (Фигура 34).

Изследванията проведени със Сертоли клетъчната линия 15P-1 показаха увеличена иРНК експресия на *occludin* след третирането с iE-DAP. Бе установено значително увеличаване на генната експресия на *occludin* след третирането на клетките с MDP и комбинираното третиране, но по-слабо в сравнение с това, получено от лиганда iE-DAP самостоятелно.

Интересен феномен бе установен в протеиновата експресия на *occludin* с наличие на две различни клетъчни популации след третирането на клетките с iE-DAP и MDP.

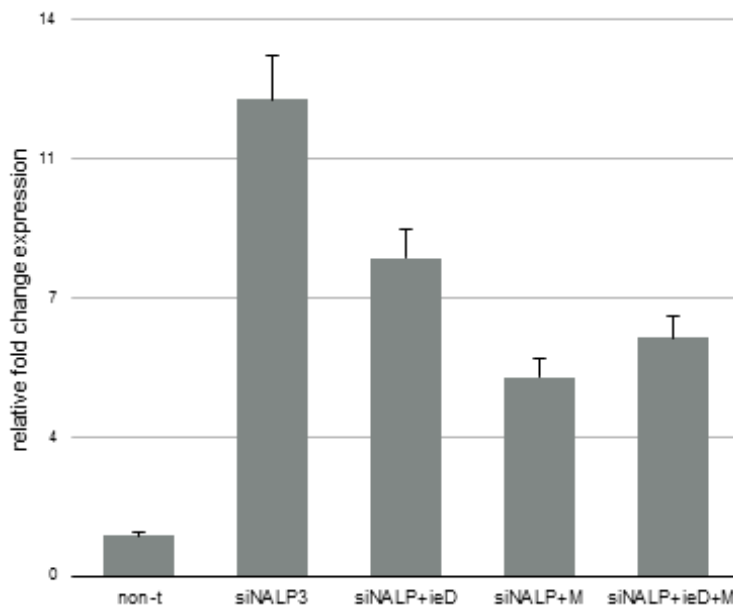
Генното заглушаване на *Nlrp3* в Сертоли клетъчната линия 15P-1 доведе до увеличаване на нивата на транскриптите на *occludin* в сравнение не само с негативната контрола, но и с комбинираното третиране с лигандите за NOD1/2 (Фигура 35).

Бе установено увеличаване на протеиновите нива на *occludin* след генното заглушаване на *Nlrp3* и в случаите на комбинирано третиране с iE-DAP и MDP.

Допълнително, за установяване на протеиновата експресия на *occludin* бяха проведени имунофлуоресцентни изследвания. Клетки от първичната култура и от мишата линия 15P-1 бяха третирани с iE-DAP и MDP. За детектиране на позитивна реакция бе използвана имунофлуоресцентна реакция. За негативна контрола бяха използвани нетретираните клетки. Клетките бяха инкубирани с антитяло срещу *occludin* и в последствие с второ специфично антитяло, белязано с флуоресцентно багрило. Бе проведен имунофлуоресцентен анализ по описана вече методика.

Бе установена позитивна експресия на *occludin* в клетките третирани с iE-DAP и MDP в първичната клетъчна култура. Не бе наблюдавана експресия в контролните нетретираните клетки.

Бе наблюдавана позитивна за *occludin* имунофлуоресцентна реакция в клетките от мишата линия 15P-1, които бяха третирани с лигандите за двата рецептора NOD1/2 за разлика от контролните клетки.



Фигура 35. RT-qPCR анализ на генната експресия на occludin, представена като log промяна (Pfaffli, 2ΔΔCT). Анализ на occludin експресията в 15P-1 Сертоли клетъчна линия, чрез обратна-транскриптазна полимеразно-верижна реакция след специфично третиране на клетките с лигандите iE-DAP и MDP и предварително проведено генно заглушаване на Nlrp3. ***P < 0.001, **P<0.01, *P<0.05; s.d., n = 3.

5. Хипотеза за ролята на вродения имуен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома

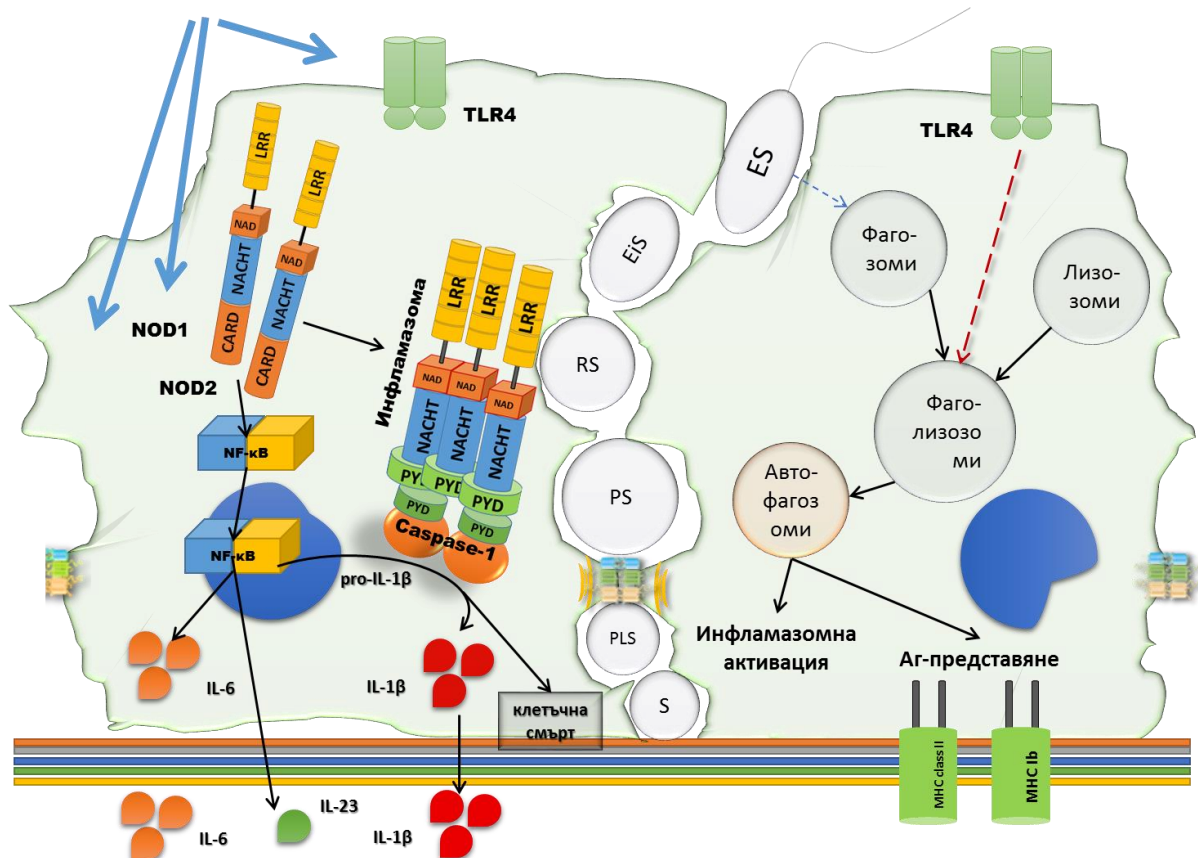
Смущения във вродения имуен сигналинг като патогенетичен механизъм за възникване на мъжки инфертилитет

Активацията на вродения имуен сигналинг е представена като част от комплексен механизъм за индукция на патогенетична верига от събития водеща до индукция на авто-имунитет (специфичен имуен отговор) по отношение на собствени антигени конституирани в протеини специфични за сперматозоидите. Показаният в този дисертационен труд механизъм се основава на доказаната експресия на рецептори на вродения имуен отговор и на доказаната функционална активност на поне една инфламазома – тази основана на платформения протеин NALP3. При стимулиране на рецепторите TLR4 и NOD1 представляващо детекция на PAMP (асоциирани с патогени молекулярни шаблони) молекули с или без помощта на АТФ представляващ тип DAMP (асоциирани с увреда молекулярни шаблони) сигнал, бе установена индукция на NALP3 и активацията на инфламазомата и. При това бе установена активация на Caspase-1, като последното събитие доведе до продукция на активен IL-1β, повишени нива на клетъчна смърт и освобождаване на IL-1β. Тази активация на рецепторите TLR4/NOD1 и на инфламазомата NALP3 променя пропускливостта на плътните контакти (TJ) на кръвно-тестисната бариера – директно, чрез MAPKK път и индиректно, чрез отделянето на IL-1β. Допълнителен фактор за увреждане на Сертоли клетките е активацията на Caspase-1. По този начин допълнително количество DAMP молекули като АТФ се отделят от загиналите клетки и активират дори и самостоятелно (без нужда от активация на вродените рецептори TLR4/NOD1/2) нови молекули NALP3/Caspase-1. Резултат от това е увеличението на концентрацията на IL-1β в извънклетъчното пространство (Фигура 36).

Успоредно с това, активирането на TLR4/NOD1 води до активиране на NF-κB и активиране на експресията на IL-6 и IL-23, но не и на IL-10.

Паралелно с това, отделянето на IL-1β води до продукция на IFN-γ от Т-клетките, които на свой ред могат да го секретират. Екстрацелуларният IFN-γ е показан да повишава нивата на MHC class II, които са антиген-представящи молекули на семейството рецептори за тъканна съвместимост. В настоящия дисертационен труд бе установена индукция от IFN-γ и на молекули от MHC class Ib (H2-M3), които имат роля в поддържане на имунния толеранс (аналог на HLA-G при хората).

LPS, ie-DAP, MDP, ATP (комбинация от PAMP и DAMP сигнали)

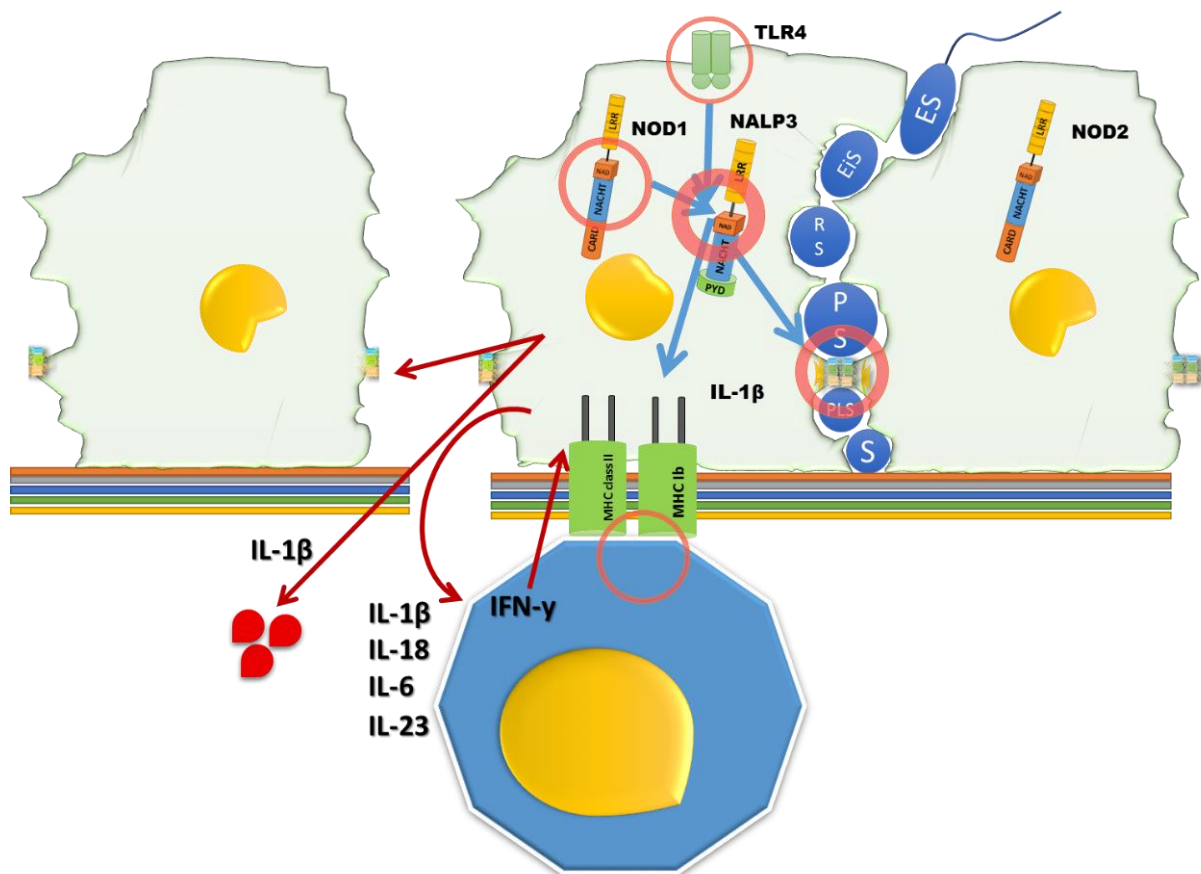


Фигура 36. Схема показваща активацията на вродения имуен сигналинг на TLR4, NOD1 и NOD2, и на автофагоцитозния път в клетки на Сертоли

Дефинираната в този дисертационен труд хипотеза, постулира, че при определени патогенни условия са възможни 3 независими събития, всяко от които би могло да бъде достатъчно условие за настъпване на състояние на нарушен имуен толеранс към собствени антигени, предпазвани до този момент от кръвно-тестисната бариера:

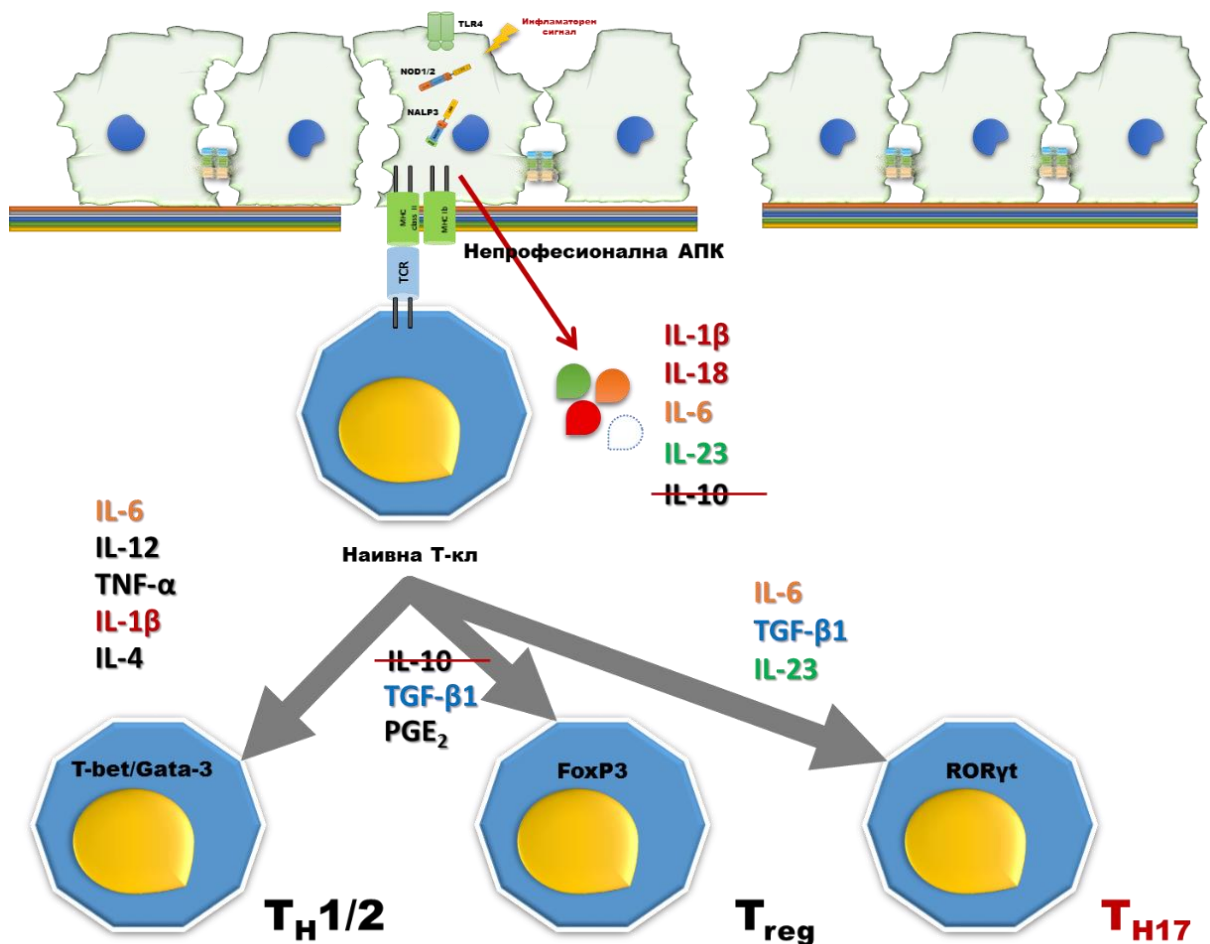
1). Модулирането на сигналния път на автофагоцитозата от сигналните пътища на вродения имуен отговор, както и от активирането на инфлазомния платформен протеин NALP3 може да доведе до промени в преработката на антигени, получени при естествената фагоцитоза на предшествениците на зрелите сперматозоиди при процеса на спермация и трансфера на тези сперматозоидни Ag към автофаголизозомите и вакуолите пакетиращи преработени Ag пептиди в молекули от тим MHC class II. При състояние с паралелно повишен екстрацелуларен IFN- γ , това би могло да промени баланса между MHC class II/MHC class Ib и да доведе до представяне на авто-антигени на наивни T-клетки. Въпреки, че това не е достатъчно условие за авто-имуен отговор към тъканите на тестиса, следващите патогенни условия биха довели до това (Фигура 36).

2). Увреждане на клетките на Сертоли по директен механизъм чрез активиране на Caspase-1 и клетъчна смърт, в резултат на ATP-NALP3-медиран механизъм. Активирането на пътищата TLR4/NOD1 и NOD2/NALP3 води до конвергентен сигнал върху инфлазома NALP3/Caspase-1 с продукция на IL-1 β , увреждане на плътните контакти и кръвно-тестисната бариера и създаване на условия за антигенно-представяне на авто-антигени и независимо от това контакт на клетките на Сертоли и на евентуални патогени с подлежащи под базалната ламина T-клетки и клетки на вродения имуен отговор (Фигура 36, Фигура 37).



Фигура 37. Схема показваща връзката на активацията на вродения имуен сигнал на TLR4, NOD1 и NOD2 с индукцията на антиген-представящи молекули в клетки на Сертоли

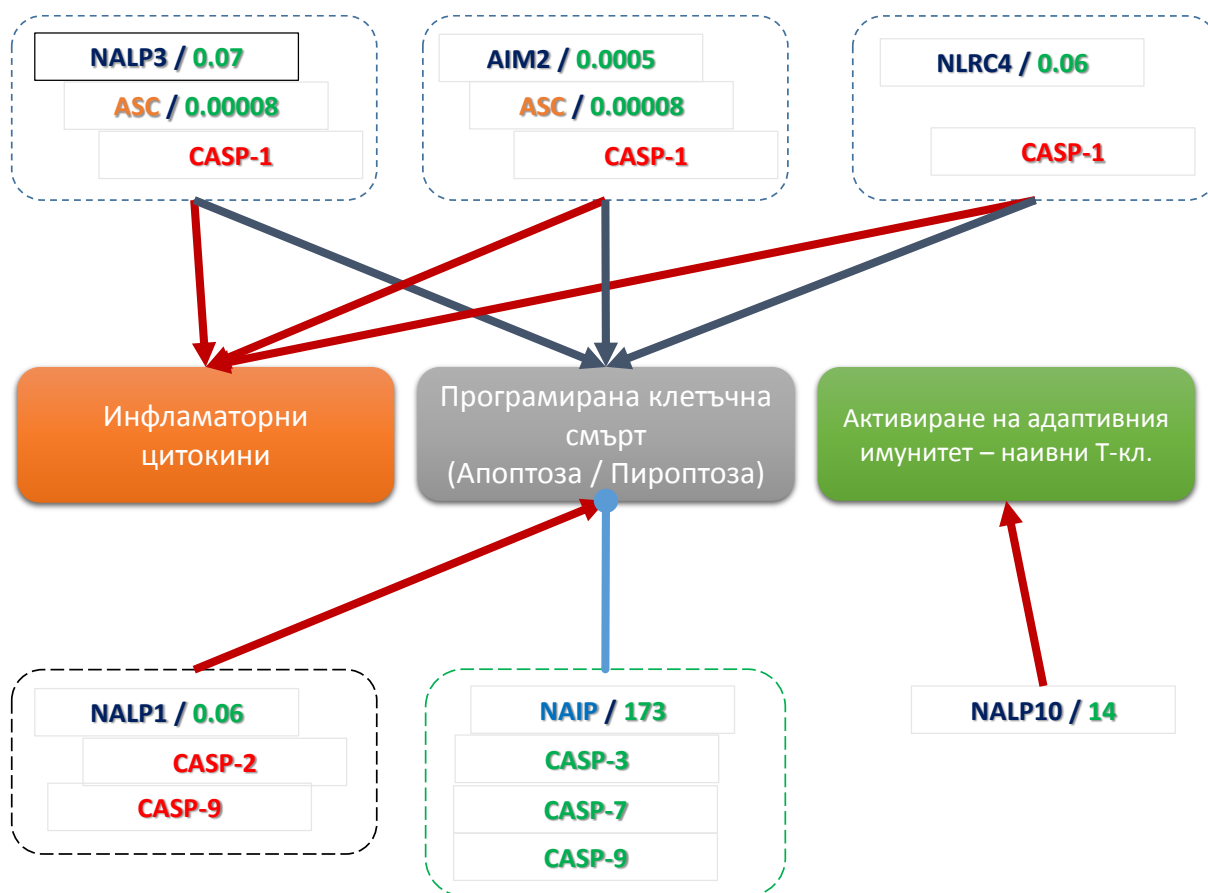
3). Участие на клетките на Сертоли като непрофесионални антиген представящи клетки (АПК), които при патологична индукция на вродения имуен сигнал, могат да насочат наивни Т-клетки към T_{H17} имуен фенотип. Основание за тази част от хипотезата е известното в литературата насочване към различни Т-клетъчни фенотипи въз основа на различни комбинации от цитокини. При индукция на TLR4/NOD1/NALP3 в клетките на Сертоли се експресират цитокините IL-1 β , IL-6, IL-23. От Avallet и сътр. (1997) е установена и експресия на TGF- β 1. За индукция на $T_{H1/2}$ са нужни IL-1 β , IL-4, IL-12 и TNF- α , но от тях само IL-1 β бе установен в този дисертационен труд да се експресира и секретира. Индукцията на наивни Т-клетки към Трег клетки, които поддържат нормалния имуен толеранс изисква среда с цитокините IL-10, TGF- β 1 и PGE2. В този труд бе установено, че IL-10 не се експресира от интактни клетки на Сертоли, както и от клетки стимулирани с лиганди на TLR4/NOD1/NOD2. Експресията на TGF- β 1 от клетките на Сертоли посочена вече в литературата, както и установена за пръв път в настоящия дисертационен труд, експресия на IL-6 и IL-23, би насочила наивни Т-клетки към патогенния T_{H17} фенотип (Фигура 38).



Фигура 38. Схема показваща връзката на активацията на вродения имуен сигналинг на TLR4, NOD1 и NOD2 с възможността за насочването от клетки на Сертоли, в ролята им на непрофесионални АПК, на наивни Т-клетки към патогенен TH17 фенотип.

Инфлазозна кръстосана сигнализация – механизъм за контрол на вродения имуен отговор и превключването към адаптивен имуен отговор

В светлината на разгледаната дотук хипотеза за участие на вродения имуен сигналинг в активирането на про-инфламаторна цитокинова секреция и евентуално антиген представяне и клетъчна смърт на увредените/стимулирани от PAMP лиганди клетки на Сертоли, бе направен анализ на различните потенциални инфлазази вероятно експресирани в тези клетки (Фигура 39). За целта бяха използвани стойности за относителната им експресия, получени със сравнителна транскриптомика на данни от дълбоко секвениране от ново поколение на миши клетки на Сертоли и миши макрофаги (Фигура 29, Фигура 30). От направения анализ става ясно, че инфлазозата NALP3, която бе доказана да се експресира експериментално на ниво иРНК и протеин, както и да активира функционално Caspase-1 (CASP-1), би могла да бъде подкрепена от активирането и на инфлазозите NALP1, AIM2, NLRC4 (Фигура 39). От друга страна клетките на Сертоли демонстрират високи нива на транскрипционна активност на инфлазозата NAIP, която е известна като мощен инхибитор на пътя на програмирана клетъчна смърт - апоптоза, активиран чрез Caspase-3, -7, -9. Тези клетки експресират във високи нива и инфлазозата NALP10, която напоследък се свързва с възможността на професионалните антиген представящи клетки за обучение на наивните Т-клетки.



Фигура 39. Схема на потенциално експресирани инфламазони в клетките на Сертоли и връзката им с про-инфламаторна цитокинова секреция и програмирана клетъчна смърт. След наименованието на молекулите от семейство NLRP са добавени стойности на относителната им експресия, получени със сравнителна транскриптомика на данни от дълбоко секвениране от ново поколение на миши клетки на Сертоли и миши макрофаги.

Вродения имуен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома

Транслационното значение на изследването на индукцията на вродения имуен сигналинг в клетките на Сертоли се измерва с възможността за механистична връзка на този сигнален път с пътищата на автофагоцитоза, антиген-преработка и представяне, както и на нарушаване на целостта на кръвно-тестисната бариера и на жизнеността на клетките на Сертоли, със създаване на позитивен патологичен цикъл на отделяне на АТФ и увреждане на нови клетки. Известни са патогенетични механизми свързани с мутации в молекулите на NOD1 и особено на NOD3, както и на платформения протеин NALP3, маркерите за активация и зрялост на автофагозомите ATG16L и LC3, и авто-имунни заболявания с тежко протичане и генериране на популации от T_H17 клетъчен фенотип, насочени към авто-антигени, каквито са хеморагичния колит и др.

Биологичния смисъл на популационно ниво, от индуцираната смърт на клетките на Сертоли с нарушаване на интегритета на кръвно-тестисната бариера и индукцията на авто-имунитет срещу авто-антигени на сперматозоидите, макар и да изглежда неприемлив от социално-медицинска гледна точка е свързан с факта, че рецепторите на вродения имуен отговор от семейството на NOD са ендеогенни, както може да бъде и част от популацията на TLR4. Съществуват и други ендеогенни рецептори водещи при детекция, особено на вирусни PAMP на активация на интерфероновите гени и отделяне на цитокини. Силната активация на NOD1 и на NOD2, както и високите концентрации на екстрацелуларен АТФ са сигнал за проникване на ендеогенен патоген в клетката и „заплаха“ за целостта на генома. TLR9, както и рецепторите от семейството RIG детектират вирусни патогени. Възможността ендеогенен патоген да се размножава в клетките поддържащи сперматогонната стволова ниша създават ситуация с повишена вероятност за увреда на геномите на тези клетки и служат като предупредителен сигнал за активиране на отговор за отхвърляне на „чужд“ геномен произход. Поради факта, че сперматозоидите са хаплоидни клетки с минимален строго контролиран метаболизъм, а зоната отвъд кръвно-тестисната бариера е имуно-

привилегирована, единствената „сентинелна“ клетка, която би могла да „алармира“ имунната система за опасност за увреда на пренасяния при размножаването геном, остава клетката на Сертоли.

От популационна гледна точка, тези клетки които подържат имунния толеранс в тестиса и изграждат кръвно-тестисната бариера, имат и механизми да превантират „лесно“ активиране на деструкция в тестиса, експресирайки FasL на мембраните си, TGF- β , MHC Ib, както и редица анти-апоптотични молекули интрацелуларно. При активиране на инфлазозомния път обаче, и Caspase-1, а вероятно и други инфлазозоми и каспази, е възможно да се получи състояние при което стимулацията на вродения имуен сигналинг в клетките на Сертоли е по-силна от имуно-толерантните им свойства и това да доведе до масова клетъчна смърт и увреда с отделяне на цитокини насочващи към патогенен T_H17, както и Ag-представяне на сперматозоидни авто-антигени. Крайният резултат от тази активация би бил „имунологичното кастриране“ на дадения индивид, с цел превенция на оплождане с генетично променени сперматозоиди и нарушаване на геномния фонд на популацията на вида.

ДИСКУСИЯ

Роля на оста NLR рецептори/инфлазозома NALP3/Caspase-1/IL-1 β в клетките на Сертоли и връзка с инфертилитета

NOD-подобните рецептори са основополагащи за вродения имуен отговор на гостоприемника и предоставят адекватен защитен механизъм, свързващ вродения с придобития имуен отговор. Докато наличието на множество TLR рецептори е установено в клетките на Сертоли, досега са открити само транскрипти на NOD1 и iPHK при плъхове (*Rattus norvegicus*). До момента обаче, нито NALP3, или NOD2 са били установени в плъши Сертоли клетки. Липсата на NALP3 и NOD2 е свързана вероятно с наблюдението, че NALP3 се открива експресиран само в клетъчни линии (клетъчни типове и прогениторите им), които са пряко свързани с имунния отговор. Тази гледна точка обаче се променя, т.к. NALP1 и NALP3 бяха открити в различни човешки епителни клетки, включително в клетки на тестиса, превръщайки този тип изследвания в такива с транслационно значение. В скорошни изследвания, стимулацията с LPS индуцира *Nlrp3* и iPHK в тестиса на мишки с фенотип C3H/HeN. Още повече, при мутантна линия мишки, LPS индуцира в *in vivo* условия IL-1 β секреция в тестиса, като по този начин подсказва възможността за потенциална активация на caspase-1 сигналния път.

В настоящото изследване се показва, че клетки на Сертоли от пре-пубертетни (първични) и от полово зрели (15P-1 cell line) BALB/c мишки експресират *Nod1*, *Nod2* и *Nlrp3* и iPHK транскрипти и имат функционални NOD1 и NOD2 рецептори, както и основният платформен протеин, нужен за асемблирането на инфлазозомния комплекс - NALP3. Регулаторното им значение се подкрепя и то други изследвания, съобщаващи за възможността гените на *Nlrp3* и *Nod2* да следват неканоничен 5'-алтернативно снаждане, като по този начин става възможно образуването на тъканно-специфични изоформи.

TLR4 индуцира NOD1 в макрофаги изолирани от костен мозък. В настоящото изследване бе установено, че при стимулиране рецептора TLR4 не индуцира експресия на рецепторите NOD1 и NOD2 в клетки на Сертоли, но индуцира експресията на платформения инфлазозомен протеин NALP3. Въз основа на установените разлики в динамиката на NF κ B при стимулиране на различните NLR рецептори и на тяхната кръстосана сигнализация бе изказана хипотезата, че NOD1 и NOD2 активират различни сигнални пътища. Данните от протеомният анализ с висока степен на резолюция (над 2000 детектирани протеина) допълнително подкрепи хипотезата за кръстосана сигнализация между TLR4/NOD1. Тези данни показват, че стимулацията на които и да е от двата рецептора води до модулиране на експресията на протеини, част от сигналния път на рецептора TLR. От друга страна специфичната стимулация на TLR4 дискретно модулира експресията на протеини от сигналните пътища на семействата на NOD-подобните рецептори и RIG-I-подобните рецептори. В настоящият дисертационен труд бе установено, че стимулирането на NLR рецепторите в клетките на Сертоли е в състояние да отключи първата фаза на цитокинов отговор, а именно свръх регулация на iPHK транскриптите на *pro-IL-1 β* .

Важно е да се отбележи, че със съзряването на индивидите, в настоящия труд бе установено, че NOD2 загубва способността си самостоятелно да стимулира експресията на гена IL1 β , като по този начин се ограничава възможността за продължителна свръх-експресия на IL-1 β . Още по-важно, в активацията на NLR рецепторите в Сертоли клетките, особено на рецептора NOD1 бе в състояние да възстанови iPHK транскрипционните нива на гена *Nalp3* в условие на предварително генно заглушаване с малки интерфериращи РНК-и. Това показва наличието на индукция на *de novo* синтеза на продуктите на този ген, което бе потвърдено и на протеиново ниво чрез флуцитометрично изследване.

Предварителната активация (прайминг) и последващата NALP3-медирана активация на caspase-1 в макрофагите също е показана, че е функционално ограничена от протеиновата синтеза *de novo*, чрез

регулация от страна на MyD88 или TRIF, чието активиране води до натрупване на *Nlrp3* иРНК транскрипти.

Наскоро, Martinon и Tschopp (2007) предлагат „дву-сигнален“ модел на инфлазомна активация. Този модел защитава тезата, че в дендритните клетки и макрофагите експресията на NALP3 е ограничена и че промотор на гена, кодиращ *Nlrp3* може само да бъде активиран след предварителен прайминг, чрез стимулация на рецепторите TLR4 или NOD1. Този прайминг предоставя необходимата NF κ B-медирана транскрипционна активация на цитокиновите прекурсори, както е pro-IL-1 β .

Във втора пост-транскрипционна стъпка инфлазомата NALP3 преминава в активирано състояние. Само тогава ако caspase-1 се активира, тя може да бъде в състояние да продуцира зрели цитокини.

В настоящият дисертационен труд бе установено, че стимулирането на рецепторите TLR4/NOD1 води до намаляването на протеиновите нива на прекурсора pro-IL-1 β за разлика от стимулацията на рецепторите NOD2/NALP3. Имайки предвид, че секрецията на IL-1 β е под формата на зряла форма, може да се предположи, че TLR4/NOD1 редукцията на нивата на проформата в първите 6 часа най-вероятно е резултат на активно срязване на проформата, а не на редукция на нейната експресия, особено като се вземе предвид протичащата паралелна свръх-регулация на иРНК транскриптите на IL1B. Редукцията на протеиновата експресия на pro-IL-1 β (проформата) бе NALP3 зависима. Това бе установено чрез заглушаване на гена *Nlrp3*, което доведе до прекъсване на редукцията на проформата при стимулация на TLR4/NOD1 в първите 6 часа. Стимулацията на NOD2/NALP3 не се повлия от генното заглушаване с малки интерфериращи РНК-и.

Обратно, стимулирането с MDP самостоятелно доведе до свръх-регулация на експресията на прекурсора на pro-IL-1 β , най-вероятно поради намаляване на срязването на цитокина, тъй като секреторната форма също бе редуцирана. Функционалното генно заглушаване показва, че NALP3 модулира по различен начин кръстосаната сигнализация на NLR рецепторите и NLR-рецептор индуцираната транскрипционна активация на *Il-1b*, като значително промотира NOD1 сигнализацията, но в същото време ограничаваша сигнализацията на NOD2. Генното заглушаване на *Nlrp3* доведе до ограничение на редукцията на pro-IL-1 β , медирана от TLR4/NOD1, но не и на NOD2 сигнализацията.

Вземайки в предвид наблюдението, че стимулацията на рецепторите на TLR4/NLR в клетките на Сертоли води до редуциране на протеиновите нива на проформата pro-IL-1 β , бе зададен въпросът дали това е наистина резултат от срязване или представлява регулаторно явление. За да бъде проверена тази хипотеза, бе изследвана активността на ензима caspase-1 и моделите на секретирание на IL-1 β , т.к. те биха могли да бъдат отражение на наблюдаваната редукция на проформата pro-IL-1 β .

За активирането на caspase-1 е необходимо активирането на инфлазомата. В макрофагите NALP3 се активира от комбинация от лиганда MDP и втора субстанция каквато е напр. АТР. Свързането на рецептора NOD2 с лиганда MDP също е необходимо за прайминга с АТР. Извънклетъчният АТР служи като сигнал тип „асоцииран с увреда молекулярен шаблон“ („damage-associated molecular pattern“, DAMP) и може да действа чрез комплекс от пуринергичен АТР-зависим P2X7 рецептор (P2X7R) и АТР-активирана пора Pannexin-1 (Panx1). И двете молекули - P2X7R и Panx1 са необходими за индуцираният от АТР калиев ефлукс, чиято експресия е била установена и в клетки на Сертоли, като последните се намират на нивото на кръвно-тестисната бариера. В настоящото проучване бяха изследвани различни комбинации от лиганди използвани за стимулиране в различни моменти от времето. Бе установено, че секрецията на IL-1 β от клетките на Сертоли изисква предварителен „прайминг“ („priming“) в продължение на 24 часа с един от двата лиганда LPS или iE-DAP. За секретирането на IL-1 β прайминга трябва да се последва от активиране на NALP3 медирано от MDP с или без добавяне на АТР. Бе изказана хипотеза, според която в наблюдаваните сценарии, в които се изисква АТР за секреция, вероятно той служи като втори сигнал който активира оста канали P2X7R/Panx1, които на свой ред активират двойката NALP3/caspase-1. За разлика от изследваните в това изследване клетки на Сертоли, дендритните клетки могат да свръх-експресират цитокинови гени при стимулиране с лиганда MDP и активация на инфлазомата директно от агенти като пикочна киселина по механизъм независещ от NALP3. В настоящото проучване, стимулация само с MDP доведе до индукция на секреция на малки количества IL-1 β от клетките на Сертоли, като този феномен не се нуждае от добавянето на АТР и няма нужда от прайминг, но бе съпроводен и медиран от паралелно активиране на caspase-1. Изненадващо, при този вид клетки (клетки на Сертоли), самостоятелното стимулиране само с АТР бе достатъчно да продуцира дори по-високи нива на IL-1 β в културелната медия, в която са отглеждани клетките на Сертоли, и то в условия на липсваща активация на caspase-1. Този феномен би могъл да се обясни и с феномен на паралелно настъпваща клетъчна смърт, т.к. добавянето на АТР увеличава процента на клетъчна смърт и по този начин секретирания IL-1 β в клетъчната среда би могъл да се дължи на детекция на проформата му (pro-IL-1 β).

В настоящия дисертационен труд бе изказана и още една хипотеза – клетките на Сертоли се нуждаят от активирането на инфлазомата NALP3 за физиологичен източник на IL-1 β , за да могат да секретират IL-1 α . Тази хипотеза се подкрепя от находката на ниски нива на секретирани IL-1 β и на

детекцията на високи нива вътреклетъчен IL-1 β след стимулация в продължение на 6 или 24 часа на NLR рецепторите, без това да се последва от секреция в клетъчната културелна среда. По тази причина нито проформа рго-IL-1 β -лимитиращите TLR4\NOD1, нито проформа рго-IL-1 β -индуциращите NOD2\NALP3 функции се отнасят директно към секрецията на зряла форма на IL-1 β . От друга страна, в случай на свръх-регулация на секретирем IL-1 β , неговата совалкова функция би довела до увеличена паракринна секреция на IL-1 α , който на свой ред би „отворил“ плътните контакти на кръвно-тестисната бариера, каквато функция бе открита наскоро за IL-1 α . Когато ефектите на цитокините се комбинират с caspase-1 индуцирана клетъчна смърт, оста NLR\NALP3 би могла да слъжи като патофизиологичен път за развитие на мъжки инфертилитет. Клетъчно пъпкуване и свиване бяха също феномени наблюдавани при стимулирането на TLR4 и активирането на caspase-1. Тези феномени имаха характерно проявление по типа „всичко-или-нищо“, като засягаха болшинството клетки при наличие на абсолютно интактни клетки, феномен описан при някои форми на активиране на caspase-1. Извънклетъчният АТР служи като DAMP сигнал и също потенцира клетъчната смърт, увеличавайки сигналния потенциал на клетъчната увреда. По този начин освобождаването на IL-1 дали като прекурсорната форма рго-IL-1 β или като зрелия активен цитокин IL-1 β би могло да служи като силен про-инфламаторен сигнал. Освободеният рго-IL-1b в резултат на тъканна увреда и клетъчна смърт може да бъде сръзан и доведен до активен цитокин и екстрацелуларно, от протеази освободени от инфилтриращи неутрофилни гранулоцити, в следствие на което се получава IL-1b-зависим инфламаторен отговор, независим от активността на caspase-1, какъвто е напр. случаят със стерилното възпаление при тъканни увреди и при някои форми на остър артрит. Проформата рго-IL-1b може също да бъде сръзана до зряла биологично-активна молекула и от някои бактериални протеази, феномен създаващ предпоставки за екстрацелуларно зреене на цитокина, което би могло да се случи в инфламаторни лезии причинени от инфекциозни агенти.

Особено вероятна е възможността автофагоцитозата да играе важна роля в лимитирането на сръзването на проформата рго-IL-1 β и последващата секреция на активната му форма, т.к. секрецията на зрелите цитокини и специфичната активация на caspase-1 бяха прекъснати в следствие на пролонгирано третиране с АТР (24 часа и повече). В макрофаги изолирани от костен мозък и в моноцити, автофагоцитозата е открита да контролира продукцията на IL-1 β , или чрез захващане и насочване на проформата рго-IL-1 β за лизозомално разграждане или чрез регулиране на активацията на инфламазомата NALP3. Инхибирането на активира инфламазомата и секрецията на IL-1 β в стимулирани с LPS макрофаги изолирани от костен мозък, както и в индуцирани костно-мозъчни макрофаги, повишавайки цитокиновата активация и секреция. Тази дейност по активиране на цитокините без изкуствено инхибиране на автофагоцитозата би била секвестрирана в LC3-позитивните (активирани) автофагозоми, и по този начин би довела до ефективно изключване на достъпа на проформите до caspase-1.

Известно е, че сигналния път на цитокинова секреция се регулира негативно от молекулите ATG16L и ATG7. В настоящото изследване бе установено, че генното заглушаване на *Nlrp3* уврежда медирането от лиганда iE-DAP „клирънс“ на проформата рго-IL-1 β . По тази причина бе изследвано дали има взаимодействие между сигналните пътища на NLR рецепторите и на пътя на автофагоцитозата. Има много малко данни до момента, как автофагоцитозата и инфламазомата NALP3 си взаимодействат. Три-дименсионална сегментация на конфокални изображения с много висока резолюция показаха, че стимулирането на рецепторите TLR4 и NOD1 модулират по различен начин агрегацията на инфламазомата NALP3 и LC3 маркираните автофагозоми. Поради факта, че рецепторът NOD1 димеризира само след сръзване с нативния му лиганд iE-DAP, но не и след TLR4-стимулация медирана релокация на NOD1 и сръзване с LC3, бе предположено, че стимулирането на рецепторът TLR4 води до инициране на първи сигнал, който да доведе до преместване на ендегенния NOD1 рецептор близо до LC3-автофагозомните везикули и преминаването му във „въоръжено състояние“. Анализът PCA на сегментираните частици разкри допълнително една скрита зависимост на сигналния път на автофагоцитозата по отношение на стимулация с лиганда iE-DAP. Резултатите получени в този дисертационен труд показват, че сръзването на лиганда iE-DAP към рецептора NOD1 променя интензитета на LC3 маркираните частици (установено чрез 3D анализ на изображението), регулира позитивно експресията на протеини от сигналния път на автофагоцитозата, потенцира също сигналните пътища на ендцитозата и лизозомите (установено чрез нано-протеомика) и увеличава автофагоцитозния флукс (поток) и образуването на автолизозоми от автофагозоми (установено, чрез образно изследване с помощта на тандемния вектор tfLC3). Тези наблюдения са в съгласие с наскорошните данни относно способността на NOD да активира автофагоцитозата, като по този начин задържа вътреклетъчни бактерии в автофагозомите. Този механизъм служи за ограничаване разпространението на инфекции. По подобен начин, в клетките на Сертоли рецептора NOD1 промотира автофагоцитозата, чрез сливане на зрелите автофагозоми с лизозоми и образуването на автолизозоми, но не и чрез директна промяна на степента на експресия на маркера LC3. Рецепторите NOD1 и NOD2 вероятно служат като молекулни платформи, физически доставяйки бактериални патогени в автофагоцитозната машина на изолираните от костен мозък макрофаги, чрез взаимодействието си с ATG16L1.

Обобщено, данните представени в настоящият дисертационен труд, насочват към преразглеждане на настоящото виждане относно клетките на Сертоли само като потенциращи имунотолерантна среда. При патологични „*про-инфламаторни*“ условия тези клетки не само не са имунотолерантни, но и продуцират освен IL-1 α и IL-1 β . Няколко нови открития поддържат тази хипотеза. Наскоро бе установено, че семейството на рецепторните тирозин-кинази Туго3 (TAM) е отговорно за инхибирането на инфламаторния отговор и за промотирането на фагоцитозата в дендритните клетки и макрофаги изолирани от костен мозък. TAM бяха установени да рестриктират свръх-регулацията и секрецията на инфламаторните цитокини IL-1 β , IL-6, TNF и type I интерферони в отговор на стимулация на рецептора TLR3 в клетките на Сертоли, както показва TAM тройно негативен мутантен миши модел. Бе установено, че TLR3 драматично усилва сигналните пътища на рецепторите NOD1/NOD2, като по този начин допълнително впримчва сигналният път на рецептора NOD2 в зреенето на IL-1 β . В този дисертационен труд също са демонстрирани данни за експресия на цитокините IL-6 и IL-23 в миши клетки на Сертоли под въздействието на „*про-инфламаторни*“ стимули, подсказвайки за по-нататъшно увреждане на кръвно-тестисната бариера и активиране на патогенната ос IL-23–IL-17.

Инфламазна мрежа и нейното взаимодействие в клетките на Сертоли

В този дисертационен труд бе направен и допълнителен анализ на други инфламази експресирани в клетките на Сертоли, освен експериментално потвърдената и функционално характеризирани инфламаза NALP3, като бяха използвани данни от дълбоко секвениране на пълния Сертоли клетъчен транскриптом. Бе установен потенциален набор от няколко инфламази, които индиректно – чрез адапторния протеин ASC, или директно чрез собствен CARD домейн могат да взаимодействат с Caspase-1. Инфламазите NALP3 и AIM2 действат чрез адаптора ASC, докато инфламазата NLRC4 действа директно, като всички могат да продуцират инфламаторни цитокини като IL-1 β и IL-18, в резултат на активацията на Caspase-1. Отделно от тази функция, Caspase-1 може да иницира процес на програмирана клетъчна смърт, означен като пироптоза, т.к. за разлика от апоптозата, при него се образува един пироптозомен молекулярен комплекс от димери на ASC адапторния протеини, който води до бърза клетъчна смърт с подуване на клетката, образуване на пори и лизис. Пироптозата действа като защитен механизъм срещу инфекция, чрез индуциране на патологично възпаление. Образуването на инфламаза и активността на Caspase-1 определят баланса между премахването на патологичното възпаление и развитието на трайна автоимунна патология. При имунни клетки, които не са подложени на дълъг про-инфламаторен стимул („здравни клетки“), активирането на caspase-1 води до борба с инфекции причинени от Salmonella, Shigella и др., чрез индуциране на програмирана клетъчна смърт и ограничаване на инвазията и размножаването на патогена. При засичане на сигнал за „опасност“ (DAMP), клетките в покой се активират и претърпяват пироптоза, с успоредното продуциране и освобождаване на инфламаторните цитокини IL-1 β и IL-18. IL-18 стимулира продукцията на IFN γ и иницира развитието на Th1 тип адаптивен имунен отговор, с цел бързо отстраняване на патогена. Това до голяма степен се обуславя от цитокиновата продукция на този тип T-клетки, които усилват възпалителния отговор и допринасят за развитие на адаптивен имунен отговор.

При случаи на хроничен про-инфламаторен сигналинг и особено при възникване на мутации или наследствена предиспозиция с носителство на определени алелни варианти на гени от вродения имунен сигналинг е възможна появата на патологични възпалителни реакции и развитието на автоимунитет, основан на патологичен отговор на имунни клетки. Данните от транскриптомиката показваха сходен брой транскрипти на NALP3, NLRC4 и AIM2 в интактно състояние на Сертоли клетките. Особеност представлява възможността на NLRC4 да активира директно Caspase-1. При определени обстоятелства NLRC4 и NLRP3 могат да бъдат включени пространствено в един и същи инфламазомен комплекс. Мутации и в двете инфламази са свързани с автоимунна патология при човека:

Мутациите на NLRP3 гена са асоциирани с ред доминантно унаследени автоимунни заболявания, означени общо като криопирин-асоцииран периодичен синдром („*cryopyrin-associated periodic syndrome*“, CAPS), към който се причисляват фамилният студов автоимунен синдром („*familial cold autoinflammatory syndrome*“, FCAS), синдромът на Muckle-Wells (MWS), хроничен инфантилен неврологичен, кожен и ставен синдром („*chronic infantile neurological cutaneous and articular*“, CINCA) и неонатално възникващата мултисистемна инфламаторна болест („*multisystem inflammatory disease*“, NOMID). Дефекти свързани с този ген са свързани с фамилната Средиземноморска треска, автоимунния синдром на Schnitzler, патогенезата на диабета, невровъзпалението при заболявания, свързани с нарушение в протеиновото навиване и третична структура, каквито са болестите на Alzheimer, на Parkinson, и прионовите инфекции.

Подобни връзки с патогенезата на други заболявания има и NLRC4. При пациенти носещи активиращи мутации в молекулата на NLRC4 се развива Синдрома на активираните макрофаги

(„*Macrophage Activation Syndrome*“, MAS), протичащ с остра треска, хепатит, много висок серумен феритин, както и живото-застрашаващ ентероколит.

NLRC4 е установен да взаимодейства с молекулата от инфламазомното семейство NAIP. Взаимодействието на NAIP с NLRC4 може да определи в някои случаи специфичността към определени лиганди. В клетките на Сертоли NAIP бе установен с най-висока степен на транскриптна активация. Тази молекула е от семейството на инфламазоми, но за разлика от NALP3, NLRC4 и AIM2, NAIP инхибира апоптозата, като директно се свързва и блокира каспазите caspase-3, -7, и -9. Наскоро бе установено, че NAIP може да индуцира пироптоза в макрофаги, при инфектирането им с *Legionella pneumophila* по механизъм свързан с активация на Caspase-1. Тази двойствена роля подсказва, че при определени условия сигналинга на инфламазоми в клетките с имунни свойства е резултат от крос-сигнализация на множество активиращи и инхибиращи молекули, и дори молекули с инхибиращи свойства могат да индуцират програмирана клетъчна смърт по Caspase-1 зависим механизъм, заради съдържащия се в тях CARD домейн.

Високата транскриптна активност в клетките на Сертоли на NAIP може да стои отчасти в силната им антиапоптотична сигнална активност, доказана и от експресията на други анти-апоптотични молекули. В съзвучие с това, установената експресия на NALP1 – активатор на Caspase-2 и по-слабо на Caspase-9, промотиращ апоптозата, бе от порядъка на експресията на про-инфламаторните инфламазоми.

Обобщено 3 про-инфламаторни инфламазоми са балансирани от високо-експресирана анти-апоптотична инфламазома и слабо експресирана про-апоптотична такава. От особен интерес бе и установената експресия на NALP10, член на инфламазомното семейство за който до сега няма данни за точния механизъм на действие. До скоро е било прието, че това е една инхибираща инфламазома, но скорошно проучване показва, че няма директно действие на NALP10 върху про-инфламаторните инфламазоми, техните адапторни протеини или дори върху Caspase-1. NALP10 обаче се оказва жизнено важна за функцията на професионалните антиген представящи дендритни клетки. В NALP10^{-/-} „knockout“ миши модел, дендритните клетки не могат обучават наивните Т-клетки и се наблюдава ефективно прекъсване на индукцията на адаптивен имунен отговор. По този начин наличието на NALP10 гарантира възможност антиген представящите клетки да са в състояние да обучават наивни Т-клетки.

Обобщение на концепцията за клетъчна увреда и имунологично-медиран инфертилитет

Представените данни предоставят транслационна механистична основа за обяснение на нарастващия брой клинични съобщения за пациенти мъже с инфертилни проблеми и паралелна находка на увеличени нива на IL-18 в пробите им от семинална плазма, независимо дали имат или не урогенитално инфламаторни състояние. Доказано е, че активирането на caspase-1 е достатъчно да индуцира сръзване както на IL-1 β така и на IL-18.

Настоящият дисертационен труд подчертава важността от ревизия на настоящата парадигма, поддържаща тезата инфламазоми да присъстват само в професионални имунни клетки и да бъдат нужни само за иницирането на първичен имунен отговор. Бе демонстрирано, че клетките на Сертоли, които представяват неимунни, и дори имунотолерантни клетки, са способни да използват инфламазомата NALP3 и Caspase-1 за продуцирането на про-инфламаторен IL-1 β във физиологичен и евентуално в патологичен контекст. Клетките на Сертоли са епителни непрофесионални антиген-представящи клетки способни да автофагоцитират, което ги прави потенциални участници и в сценарии на автоимунна патогенеза.

В една друга посока, не само активирането на рецепторите от семейството на NOD, но и такива детектиращи РНК или ДНК, като TLR9 или RIG-I-подобните, също биха могли да причинят първата фаза на прайминг на клетките на Сертоли. Биологичният смисъл на наблюдаваните феномени свързани с клетъчно увреждане, особено при активация на рецептори детектиращи РНК или ДНК молекулярни шаблони, или такива присъщи на вътреклетъчни бактериални форми (NOD2, TLR4 има форма която е експресирана вътреклетъчно в клетъчни гранули) вероятно е свързан със съществуването на механизъм да предпазване на качеството на генома на популационно ниво. Това което в репродуктивната медицина е манифестирано с мъжки инфертилитет, в популационен план представлява индивиди с потенциално увреден геном, при които развитието на автоимунен орхит е вероятен механизъм за елиминиране на продукцията на сперматозоиди с потенциални увреди или такива с интегрирани вирусни геноми. Основната функция на клетките на Сертоли е да подържат тестисната стволва ниша, като протектират сперматогониите тип А, които по същество са унипотентни стволови клетки, даващи начало на сперматогенетичната линия. Интактността на тези клетки е от важно значение, т.к. увреждането на генома им би довело до сериозни дефекти и нарушения в последващата мейотична генерация на хаплоидни геноми пренасяни от бъдещите сперматозоиди. Именно по тази причина клетките на Сертоли, известни с множеството си механизми за генериране на имунотолерантно обкръжение, са най-вероятно и тези които също по механизма „*всичко-или-нищо*“ могат да активират инфламаторен имунен отговор с отделянето на цитокини като IL-1, IL-6 които да увредят кръвно-тестисната бариера и да допуснат имунни клетки които

да атакуват увредените клетки и тъкани. От друга страна клетките на Сертоли могат да отделят IL-23, но не и IL-10, при условията на стимулация симулираща екзогенна инфекция, чрез стимулиране на рецепторите TLR4/NOD1,2. IL-23 е цитокин известен със способността си да насочва имунния отговор към T_H17, което би предположило какъв би бил механистично имунният отговор, подобно на автоимунните колити.

Клетките на Сертоли изхранват развиващите се сперматозоиди и действат константно като фагоцити, консумирайки остатъчната цитоплазма на сперматозоидите при процеса на спермиация.

Клаудините и оклудина са първите идентифицирани интегрални транс-мембрани протеини формиращи плътните контакти („tight-junction“). В този дисертационен труд бе установено, че основният за функцията на плътните контакти трансмембранен протеин оклудин, който осъществява с екстрацелуларния си домейн връзка между две Сертоли клетки, бе свърх-регулиран при стимулиране на който и да е от рецепторите NOD1 или NOD2, или и на двата. Заглушаването на инфламазомата NALP3 демонстрира рестриктивен ефект по отношение на тази свърх-регулация. Преплитането на сигналните пътища на вродения имунен отговор и на тези на плътните контакти вероятно имат протективен ефект както за тестисната имунна бариера, така и за компартментализацията на сперматогенезата, подържана от същата тази бариера.

За разлика от молекулата на оклудина, който представлява протеин прехвърлящ се от една до друга Сертоли клетка в областта на междуклетъчното пространство на плътния контакт, други два основни протеина – клаудин-5 и клаудин-11 бяха различно регулирани при стимулиране на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2. Стимулирането на рецептора NOD1 с лиганда му iE-DAP бе по-ефективно по отношение на модулирането на експресията на двата клаудина. Заглушаването на гена на NALP3, особено в комбинация със стимулиране на NOD рецепторите води до свърх-регулиране на клаудините. Активирането на рецептора NOD2 чрез MDP доведе до различно поведение на клаудин-5 и клаудин-11, подсказвайки разлика в сигналинга който се индуцира по пътя на NOD2.

Въз основа на данните получени за активиране на сигналния път на MAPKK от нано-протеомното изследване на протеините експресирани в клетки на Сертоли при индукция на NOD1, както и от изследванията на оклудин и клаудините 5 и 11, може да се заключи, че стимулацията на рецепторите за вроден имунитет NOD1/2 индуцира синтез на нови протеини на плътните контакти и вероятно стабилизира контактите. Механизмът за постоянна обмяна на плътните контакти е описан от Чен. При клетките на Сертоли, плътните контакти се интернализират и евентуално деградират, а нови плътни контакти се екстернализират под клетки от сперматогонния ред, след което при затваряне на контакта въпросните клетки се „избутват нагоре“ към апикалната повърхност на клетките в междуклетъчното пространство. Като се има в предвид този модел, стимулираната от NRL рецепторното семейство експресия вероятно има за цел да стабилизира контакта и да не позволи преминаването на инфекциозни агенти през кръвно-тестисната бариера. В този аспект нуждата от експресия на инфламазомата NALP3 би могла да се хипотезира с предположението, че при слаби или средни по сила стимули оста NOD1/NOD2-NALP3 поддържа секретицията на IL-1 β . Последният би помогнал за експресията на IL-1 α , последният е паракринен фактор също регулиращ динамиката на физиологично кръвно-тестисната бариера. От друга страна IL-1 β повишава пермеабилитета на кръвно-тестисната бариера и при преминаването си през нея би активирал имунни клетки разположени в близост и би служил като атрактант.

При засилване на стимулацията на вродения имунен сигналинг, секретията на IL-1 β и IL-6, особено в по-високи концентрации би могло да доведе до нарушение на кръвно-тестисната бариерна функция. Активирането на NOD1/NOD2-NALP3 и Caspase-1 би могло да има и ефект на инициране на програмирана клетъчна смърт, при което клетките на Сертоли биха се превърнали в източник на DAMP сигнали, а бариерата би изчезнала. Може да се предположи, че това е рядко явление, т.к. клетките на Сертоли са генератор на имунотолерантна зона, чрез набор от свойства – експресия на TGF- β , FASL и др. Въпреки това, при разрушаването им е възможна активацията на съседни Сертоли клетки, фагоцитиране на DAMP сигнали и апоптотични частици в контекста на PAMP сигнали, което би довело при фагоцитоза от АПК като макрофаг например до експресия на цитокинов профил насочващ към патологично възпаление. Подобен сценарий може да се окаже възможен дори и с участието (в началото) само на клетки на Сертоли, т.к. в този труд бе установено, че пролонгираната им експозиция в среда с лиганди на NOD1 и NOD2, с или без активация на TLR4, особено в присъствието на АТР, води до активация на Caspase-1, експресия на IL-1 β , IL-6, IL-23. Конститутивната експресия на TGF- β , заедно с патогенно индуцираната експресия на IL-6 и IL-23 може да отключи патогенетичната ос IL-23/IL-17 и да индуцира в наивни T-клетки фенотип T_H17 (Roryt+).

Клинични данни показват, че феномени свързани с активацията на Caspase-1 и системата на IL-1 са наблюдавани от известно време в литературата, но до момента не е правена механистична каузална връзка за причинно-следствения характер на вродения имунен сигналинг и мъжкия инфертилитет. Така например, транскриптите на Caspase-1 са установени силно експресирани (на ниво иРНК) в интерстициалния компартмент на тестиса, както и в тестикуларни тумори, докато тези на IL-1 рецепторния

му антагонист са намалени. Нивата на транскриптите на IL1A се увеличават от нормални гонади, през сперматогенен арест до синдрома само със Сертоли клетки (без сперматогенеза).

Невъзможността за създаване на потомство при двойки в рамките на определен период от време (12 месеца или повече) се определя като безплодие. Приблизително 15% от сексуално активните двойки, който не използват контрацептиви не са в състояние да заченат. В около половината от тях, мъжкият фактор е единствената причина или допринася за проблема с безплодието. Изследване на различни възможни причини спомогна за разбирането на основният процес на сперматогенеза и мъжка плодовитост. Основните причини за безплодие при мъжете са различни – генетични, физио-патологични и анатомо-патологични аномалии, интензивно и продължително физическо натоварване, стареене, лекарствени средства и дори продължително време на сексуално въздържание.

Апоптозата играе важна роля в регулирането на сперматогенезата на различни видове бозайници, включително и на човека. Относително високи нива на апоптоза са докладвани в биопсични материали от тестиси на безплодни мъже с различна степен на тестисна недостатъчност. Съобщено е, че порции от апоптотични сперматозоиди са по-високи в еякулатни спермални проби от безплодни мъже в сравнение с мъже със запазена оплодителна способност. Това е видно и от факта, че спермалните каспази са по-активни при пациенти с безплодие, отколкото в здрави мъже. Има изграден консенсус относно влиянието на апоптозата в мъжкото безплодие, въпреки, че точният механизъм на участието и остава неясен.

Апоптозата е от съществено значение за поддържане на тестисната хомеостаза по време на сперматогенезата, но неподходящо възникваща апоптоза се свързва със суб-оптимална мъжка репродуктивна функция. Прекомерните нива на апоптоза в резултат от нарушена регулация или неправилно активиране могат да повлияят сперматогенезата и дори да доведат до безплодие. Уточняване как екологичната токсичност засяга апоптозата е важно за развитието на превантивната медицина и поведение, особено докато потенциално вредни съединения продължават да се използват в домакинствата и на работните места. Освен това, познаването на процесите в тестисите, и по-специално индукцията на апоптоза, е от съществено значение за повишаване на мъжкия фертилитет.

Транслационното значение на изследването на индукцията на вродения имунен сигналинг в клетките на Сертоли се измерва с възможността за механистична връзка на този сигнален път с пътищата на автофагоцитоза, антиген-преработка и представяне, както и на нарушаване на целостта на кръвно-тестисната бариера и на жизнеността на клетките на Сертоли, със създаване на позитивен патологичен цикъл на отделяне на АТФ и увреждане на нови клетки. Известни са патогенетични механизми свързани с мутации в молекулите на NOD1 и особено на NOD3, както и на платформения протеин NALP3, маркерите за активация и зрялост на автофагозомите ATG16L и LC3, и автоимунни заболявания с тежко протичане и генериране на популации от T_H17 клетъчен фенотип, насочени към авто-антигени, каквито са напр. хеморагичния колит, някои автоимунни дерматити, криопирин-асоцииран периодичен синдром, диабет, невровъзпаление и др.

Биологичния смисъл на популационно ниво, от индуцираната смърт на клетките на Сертоли с нарушаване на интегритета на кръвно-тестисната бариера и индукцията на авто-имунитет срещу авто-антигени на сперматозоидите, макар и да изглежда неприемлив от социално-медицинска гледна точка е свързан с факта, че рецепторите на вродения имунен отговор от семейството на NOD са ендогенни, както може да бъде и част от популацията на TLR4. Съществуват и други ендогенни рецептори, водещи при детекция, особено на вирусни PAMP на активация на интерфероновите гени и отделяне на цитокини. Силната активация на NOD1 и на NOD2, както и високите концентрации на екстрацелуларен АТР са сигнал за проникване на ендогенен патоген в клетката и „заплаха“ за целостта на генома. TLR9, както и рецепторите от семейството RIG детектират вирусни патогени. Възможността ендогенен патоген да се размножава в клетките, поддържащи сперматогонната стволова ниша създават ситуация с повишена вероятност за увреда на геномите на тези клетки и служат като предупредителен сигнал за активиране на отговор за отхвърляне на „чужд“ геномен произход. Поради факта, че сперматозоидите са хаплоидни клетки с минимален строго контролиран метаболизъм, а зоната отвъд кръвно-тестисната бариера е имуно-привилегирана, единствената „сентинелна“ клетка, която би могла да „алармира“ имунната система за опасност за увреда на пренасяния при размножаването геном, остава клетката на Сертоли.

От популационна гледна точка, тези клетки които поддържат имунния толеранс в тестиса и изграждат кръвно-тестисната бариера, имат и механизми да превантират „лесно“ активиране на деструкция в тестиса, експресирайки FasL на мембраните си, TGF- β , MHC Ib, както и редица анти-апоптотични молекули интрацелуларно. При активиране на инфламазомния път обаче, и Caspase-1, а вероятно и други инфламазоми и каспази, е възможно да се получи състояние, при което стимулацията на вродения имунен сигналинг в клетките на Сертоли е по-силна от имуно-толерантните им свойства и това да доведе до масова клетъчна смърт и увреда с отделяне на цитокини, насочващи към патогенен T_H17, както и Ag-представяне на сперматозоидни авто-антигени. Крайният резултат от тази активация би бил „имунологичното кастриране“ на дадения индивид, с цел превенция на оплождане с генетично променени сперматозоиди и нарушаване на геномния фонд на популацията на вида.

ИЗВОДИ

1. Установена е експресията на рецептори от семейството NLR на вродената имунна сигнализация в клетки на Сертоли, с кръстосано сигнализиране на рецепторите NOD1 и NOD2 вследствие стимулиране със специфичните лиганди iE-DAP и MDP, което преминава през активиране на NF- κ B, и е NALP3 зависимо.

2. Лигандите на TLR4, NOD1 и NOD2 водят до свръхрегулиране на инфламазомата NALP3 и на рго-IL-1 β , активиране на каспаза-1 и индуциране на секреция на IL1 β и евентуално на клетъчна смърт, както и до индукция на цитокини IL-6 и IL-23, но не и IL-10.

3. Автофагоцитозният сигналинг е модулиран по различен начин в зависимост от индукцията на вродения имунен отговор чрез стимулация на рецепторите TLR4 или NOD1. Следвайки различно препрограмиране на клетъчния отговор, NOD1 насочва към активиране на процеса на автофагоцитоза с ускорено формиране на автофаголизозоми, докато TLR4 насочва към асемблиране на инфламазомния комплекс.

4. Протеомните данни показват, че TLR4 и NOD1 активират по различен начин автофагозомните сигнални пътища и пътищата на вродената имунна сигнализация.

5. Анализът на транскриптомни данни показва различен набор инфламазомни молекули в клетките на Сертоли, в сравнение с макрофагите, и наличие на необходимите адапторни молекули за активирането им.

6. Установено е, че стимулирането на рецепторите NOD1 и NOD2 индуцира експресията на протеините на клетъчните контакти клаудин-5, клаудин-11 и оклудин, по NALP3 зависим механизъм, като заглушаването на последния потиска индукцията на клаудините.

7. Установена е ролята на вродения имунен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома, показващ патогенетичен механизъм за възникване на имуно-обусловен мъжки инфертилитет, с участието на активация на инфламазомната сигнализация и превключването към патогенен адаптивен имунен отговор.

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Установено е, че клетките на Сертоли, неимунни клетки от епителен произход, експресират освен NOD рецептори от семейството на вродената имунна сигнализация и една (NALP3) или повече инфламазоми, които могат да активират каспаза-1 и да продуцират проинфламаторен цитокин - IL1 β , както и да доведат до програмирана клетъчна смърт.

2. Установено е, че инфламазомния платформен протеин NALP3 има и генно-регулаторни функции, медирайки експресията на NOD1, NOD2, цитокините IL1 β , IL-6, IL-23, както и клаудините и оклудина от плътните контакти на кръвно-тестисната бариера.

3. Приложен е уникален метод за анализ, комбиниращ конфокална микроскопска триизмерна реконструкция с много висока резолюция на ко-локализиращи рецепторни и автофагозомни молекулни комплекси, с принципен компонентен анализ на всичките им морфологични параметри.

4. Установено е, че автофагоцитозния сигнален път показва индиректна чувствителност към стимулация на рецептора NOD1, чрез методите за анализ на ко-локализиращи молекулни комплекси, Орбитрап протеомика с висока резолюция и анализ на автофагоцитозната динамика.

5. Установено е, че стимулирането на рецепторите на вродената имунна сигнализация потенцира експресията на протеини на клетъчните контакти, изграждащи кръвно-тестисната бариера.

6. Въз основа на получените експериментални данни е показан патогенетичен механизъм и е изказана хипотеза за ролята на вродения имунен сигналинг в инфертилитета, като адаптивен механизъм за предпазване на генома, чрез възникване на имуно-обусловен мъжки инфертилитет, с активация на инфламазомите и превключването към патогенен придобит имунен отговор.

НАУЧНИ ТРУДОВЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ IF = 19.4:

1. **Soren Hayrabyan**, Krassimira Todorova, Asma Jabeen, Gergana, Metodieva, Stavri Toshkov, Metodi V. Metodiev, Milcho Mincheff, Nelson Fernández. Sertoli cells have a functional NALP3 inflammasome that can modulate autophagy and cytokine production. *Scientific Reports* | 5:18896 | DOI: 10.1038/srep18896; received: 15 September 2015; accepted: 27 November 2015; Published: 8 January 2016 Nature Publishing Group **IF = 5.578**
2. **Hayrabyan, S.**, Todorova, K., Pashova, S., Mollova, M., Fernández, N. Sertoli Cell Quiescence - New Insights (2012) *American Journal of Reproductive Immunology*. Epub 2012/04/24 **IF = 3.317**
3. **Soren Hayrabyan**, Krassimira Todorova. NALP signalling is required in sertoli cells for tight-junction protein interaction. *Acta Medica Bulgarica*, Vol. XLII, 2015, No 1, pp12-17.
4. **Soren. Hayrabyan**, Diana Zasheva, Krassimira Todorova. NLRs challenge impacts tight junction claudins in Sertoli cells. *Folia Medica*, 2015; 57(1): 43-48
5. **Soren Hayrabyan**, Elina Avramaska, Krassimira Todorova. Stemness applied to testis stem cell niche. *Andrologia*, vol 25, lss. 4, 2015, pp 7-14
6. Kyurkchiev, S., Gandolfi, F., **Hayrabyan, S.**, Brevini, T.A.L., Dimitrov, R., Fitzgerald, J.S., Jabeen, A., Mourdjeva, M., Photini, S.M., Spencer, P., Fernández, N., Markert, U.R. Stem Cells in the Reproductive System (2012) *American Journal of Reproductive Immunology*, 67 (6), pp. 445- 462. **IF = 3.317**
7. Spencer, P.S., Hakam, S.M., Laissue, P.P., Jabeen, A., Jain, P., **Hayrabyan, S.**, Todorova, K., Blanch, A., Mcelhinney, J.M., Muhandiram, N., Alkhatib, S., Dealtry, G.B., Miranda-Sayago, J.M., Fernández, N. Key Cellular Components and Interactive Histocompatibility Molecules Regulating Tolerance to the Fetal Allograft (2012) *American Journal of Reproductive Immunology*. Epub 2012/04/24 **IF = 3.317**
8. Asma Jabeen, Jose ´ Maria Miranda-Sayago, Boguslaw Obara, Patrick Simon Spencer, Gill Barbara Dealtry, **Soren Hayrabyan**, Valerie Shaikly, Pierre Philippe Laissue, and Nelson Ferna ´ ndez. Quantified Colocalization Reveals Heterotypic Histocompatibility Class I Antigen Associations on Trophoblast Cell Membranes: Relevance for Human Pregnancy. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2013) 89(4):94, 1–10 Published online before print 4 September 2013. DOI 10.1095/biolreprod.113.111963 **IF = 3.451**
9. Kr. Todorova, **S. Hayrabyan**, J. Dineva, I. Vangelov, D. Zasheva, V. Penchev, G. Nikolov, M. Mollova and M. Ivanova. Cumulus biomarker evaluation for human oocyte quality prediction. *Acta Medica Bulgarica*, Vol. XXXIX, 2012, No 1, 70-76
10. Todorova K., I. Vangelov, J. Dineva, V. Penchev, **S. Hayrabyan**, G. Nikolov, M. Mollova, M. Ivanova. Lysil oxidase as a potential biomarker for predicting oocyte quality. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*. 2011, Vol 64, No9, pp.1355-1362 **IF=0.210**
11. Todorova K., D. Zasheva, **S. Hayrabyan**, J. Dineva, I. Vangelov, V. Penchev, G. Nikolov, M. Mollova, M. Ivanova Gene panel in human cumulus cells as biomarker for successful in vitro procedures *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*.2011, ISSN: 1310-1331 Vol 64, No8, pp.1143-1150 **IF = 0.210**
12. K. Todorova, **S. Hayrabyan**, J. Dineva I. Vangelov, V. Penchev, D. Nikolov, M. Mollova, M. Ivanova. IVF studies on the genetic potential of cumulus cells as biomarkers for selection of oocytes. *BG Journal: Reproductive Health* 2011, N18, pp 23-32.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД (IF=14.411):

1. **Hayrabyan S.**, Todorova K., Jabeen A., Pashova Sh., Zasheva D., Manolova N., Fernández. N., Mollova M. The role of the Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 in the mouse Sertoli cell innate immunity and signaling. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2012, AmJReprod Immunology, IF 3.317, invited speaker plenary lecture
2. **S. Hayrabyan**, M Metodiev, G Metodieva, A Jabeen, N Fernandez, K Todorova. Role of TLR4 and NOD1 signaling in Sertoli cell innate immunity in regard to male infertility. Sertoli inflammasome and beyond. 14th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2015, Am J Reprod Immunology, IF 2.438, invited speaker plenary lecture
3. **Hayrabyan S**, Avramaska E, Kacheva D, Kistanova E, Todorova K. DNA methylation landscape in Sertoli cells play role in its specific inflammasome regulation with implications to male fertility. EPICONCEPT Workshop 2014. Las Palmas, Spain 07 - 09 May 2014, , poster
4. Kanev K., Avramaska E., Todorova K., **Hayrabyan S**. Application of 3D image based assessment for studying the impact of innate immunity signaling on global methylation status. 6th EFIS-ESI SEEIS. Timisoara. Romania. 26-29.09.2014, poster
5. Elina Avramaska, **Soren Hayrabyan**. Testicular Sertoli cell functions. Differences in the mode of phagocytosis of bacteria between macrophages and Sertoli cells. The Fifth Workshop on experimental models and methods in biomedical research. ISSN 1314-9091. Sofia, 2014, poster
6. Kristiyan Kanev, Elina Avramaska, Krassimira Todorova, **Soren Hayrabyan**. Application of 3D quantitative DNA methylation imaging for studying the global methylation status in Sertoli cells. Workshop of Experimental methods and models in biomedical research. May, 2015, Sofia, poster
7. Jabeen Asma*, Boguslaw Obara, **Soren Hayrabyan**, Soukaina M. Hakam, Jain Pallavi, Patrick S. Spencer, Pierre P. Laissue, Fernández Nelson. Effect of infection on heterotypic associations of immune receptors expressed on trophoblast-derived cells. Journal of Reproductive Immunology 101–102 (2014) 18–39. ESRI meeting, Budapest, Hungary, 29.03-1.04.2014, IF 2.373, poster
8. Jabeen A., Laissue P.P., Spencer P.S., Hakam S. M., Jain P., **Hayrabyan S.**, Todorova K., Blanch A.; McElhinney J. M.W.R., Paluwatta N. J. M., Alkhatib S., Dealtry G.B., Miranda-Sayago J.M., and Fernández N. Mapping histocompatibility molecules on trophoblast cells: a bioinformatics, bioimaging and proteomics systems approach; relevance for fetomaternal interaction. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, 2012, Am J Reprod Immunology, IF 3.317, plenary lecture
9. Todorova K., **Hayrabyan S.**, Dineva J., Vangelov I., Ivanova M., Mollova M. Gene panel in human cumulus cells as biomarker for successful in vitro procedures. ESHRE. Copenhagen, Denmark, 23-27 August, 2011, IF 2.966, poster

УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

2010-2013, Старши изследовател с разработка на научно-изследователска тема „Механизми на вроден имунитет при клетки на Сертоли и сигналинг на NOD рецептори и NALP3 инфламазома“ по инфраструктурен проект на ЕС: FP7-REGPOT-ReProForce 2010-2013

2013-2015, Участник в българската група по проект COST Action FA1201, EPICONCEPT (“Epigenetics and Periconception Environment”), с цел изследване на епигенетични промени свързани с репродукцията.

УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛНИ ПРОЕКТИ

2014-2015, Проект BG051PO001-3.3.07-0002 „Студентски практики“ по ОП „Развитие на човешките ресурси“ и Европейски Социален Фонд Проект „Студентски практики“. Ментор: Провеждане на теоретичен и практически приложен курс по „Сигналинг на вродения имунен отговор на семейство рецептори NOD“