

I. Авторска справка на доц. Красимира Тодорова-Хайрабедян, дбн, за приносния характер на научните трудове, които не са прилагани в други конкурси

В представените по конкурса научни трудове се очертават следните *научни* и *методични* направления:

Научни направления

1. Роля на некодиращите микро-РНКи, като един от механизмите на епигенетична регулация на генно-регулаторни мрежи от транскрипционни фактори, взаимовръзката им с андрогената сигнализация и ново образувани в процеса на простатната канцерогенеза фузионни гени със значение за метастазирането
2. Изследване ролята на вродената имунна сигнализация за патогенезата на имунологично базирания мъжки инфертилитет и ендометриозата при жените.
3. Изследване ролята на ембрионален имуно-модулиращ пептид като имуномодулатор с терапевтичен потенциал.

Методични направления

- *молекулярна биология и имунология – разработен е метод за детекция на фузионен протеинов продукт, без предварително известна пълна аминокиселинна последователност с помощта на „proximity ligation assay“.* Към специфично подбрани дълги нуклеотиди са конюгирани поликлонални антитела, разпознаващи транслируемите N- и C- краища на протеиновите продукти на дивите (нормалните) форми на фузионните партньори на онкофузията TMPRSS2:ERG; оптимизиран е протокол за инкубация на съдържащ натурално получен от карциномна линия притежаваща фузията онкофузионен протеин, както и на серуми от пациенти с простатен карцином в напреднала 3-4 фаза; оптимизирани са условията за размножаване с RT-qPCR на нуклеотидна последователност, имаща частична комплементарност и към двата нуклеотида, конюгирани с антитела; получен е работен протокол за определяне на съдържанието на протеинови продукти на онкофузията TMPRSS2:ERG с помощта на нормализация по фузионната форма,

съдържаща се в линията VCaP (получена от простатно-карциномна костна метастаза).

1. Роля на некодиращите микро-РНКи hsa-miR-204 и hsa-miR-15a в епигенетична регулация на генно-регулаторни мрежи с участието на андрогенната сигнализация и ново образувани в процеса на простатната канцерогенеза фузионни гени като TMPRSS2:ERG

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

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

1.1. Установен е феномен на загуба на функциите на микро-РНК-204 като тумор-супресорна и е установена трансформацията и в онкогенна микро-РНК, като са установени модулиращите ѝ ефекти по отношение на андрогенната сигнализация и експресията и регулацията на фузионните протеинови продукти на TMPRSS2:ERG. По този начин става ясна ролята ѝ за прехода към андроген-резистентно състояние. За целта е създаден уникален метод за разпознаването на протеинови продукти на

TMPRSS2:ERG. Изследвана е и роля на тумор-супресорната микро-РНК-15а за простатната канцерогенеза, като е показана връзката ѝ с регулацията на транскрипционния фактор MYB и андрогенния рецептор като прицелни молекули на нейната тумор-супресорна активност. Установена е важна роля на микро-РНК-204 за модулиране на сигнализацията на TMPRSS2/ERG и андрогенния рецептор (AR) и фина настройка на TMPRSS2/ERG, която пречи на свръх-експресията му във фазата преди андрогенната депривация.

Лични приноси:

1.1.1. С помощта на нов метод е установена експресията на протеиновите продукти на фузията TMPRSS2/ERG. Показано е, че микро-РНК-204 е неин негативен регулатор, като това се опосредства от ДНК метилиране на промотора на онкофузията. Транскрипционните фактори runt-свързан транскрипционен фактор 2 (RUNX2) и ETS прото-онкоген 1 (ETS1) са позитивни регулатори на експресията на TMPRSS2:ERG, като тази регулация е също медирана, чрез промоторна хипометилация. Геномната фузия TMPRSS2:ERG е характеризирана в серуми на пациенти с напреднал простатен карцином, фази 3 и 4, като последните са клъстеризирани въз основа на данните от нивата на протеиновите продукти на фузията, амплификацията на транскрипти на различни варианти на фузията, нивата на нативната форма на изоформите на ERG, като се установява, че не всички пациенти с налични транскрипти на фузията имат наличен фузионен протеин и само някои позитивни за фузията пациенти имат и увеличени нива на нативните ERG транскрипти. С приложението на метод, използващ разпознаването на нативно-навити части от протеиновите продукти на гените участващи във фузията, в **публикация № 1** се показва, че онкофузията дори и да присъства в туморните клетки не винаги е активна като протеин, както и, че изследването на фузията само с антитела срещу ERG не позволява точна оценка на патогенното състояние.

1.2. Установено е, че микро-РНК-204 е умерен регулатор на функцията на AR по време на прехода от запазена AR сензитивност, т.к. последната е нужна за транслокацията на ERG и образуването на епигенеично-активната онкофузия TMPRSS2:ERG.

Лични приноси:

1.2.1. Микро-РНК-204 свръх-регулира АР, чрез директно хипометилиране на промотора му, като този феномен е по-силно застъпен в простатно карциномните линии с налична онкофузия или под въздействие на транскрипционните фактори RUNX2 и ETS1. Протеомните изследвания показваха, че miR-204 има дуалистична роля в препрограмирането на АР при простатната канцерогенеза, водещо до промотиран на АР прицелни гени, свързани с простатната канцерогенеза и АР ко-регулаторни молекули. По този начин тумор-супресорната микро-РНК-204, въпреки че усилва експресията на поддържащия в норма епителната простатна диференциация АР, при фузия-позитивните карциномни клетки води до увеличение на АР с цел препрограмиране на прицелните за АР гени и развитие на метастатичен фенотип. Микро-РНК-204 води до активиране на молекули, отговарящи за хроматиновото ремоделиране, ДНК метилирането и регулацията му - **патент №1, публикации № 1, №2, №3, научни съобщения № 8, № 9, №11.**

1.3. В патологичната практика се изследва ERG, но не съществуваше метод за детекцията на протеиновите продукти на генно реаранжиране в хромозома 21, при които се получават TMPRSS2:ERG фузии. Получените аминокиселинни последователности при фузията на гените TMPRSS2 и ERG могат да бъдат функционално навити “*in frame*” мутанти или неправилно навити и да нямат биологичен ефект, т.к. ERG доменът е този който има транскрипционна активност.

Лични приноси:

1.3.1. Поради възможността да възникнат и множество некодирани мутанти с минимално значение за канцерогенезата, бе разработен *метод за откриване на протеиновите продукти на тази генна фузия, патологично формирана само в клетки от карцином на простатата.* Този метод може да бъде използван за оценка на нивата на функционален протеин на генната фузия TMPRSS2:ERG при експериментална работа с клетъчни линии, носители на фузията, както и в материал, получен от биологични течности (серум, урина) и/или тъкани (простатна биопсия). Изследвани са над 30 пациента с простатен карцином в напреднал III-IV стадии, като са определени и транскриптите на онкофузионния феномен. Разработеният диагностичен метод би позволил пациенти, положителни за TMPRSS2–ERG протеин да бъдат лекувани с

химиотерапия, насочена към най-агресивните форми на простатен карцином, докато пациенти, позитивни за онко-фузията на RT-qPCR, но негативни за протеинов продукт да бъдат лекувани по конвенционалните схеми (андроген депривационна терапия и др.) - патент №1, публикации № 1, №3.

2. Изследване на участието на про-инфламаторни фактори и имунни рецептори в патогенезата на ендометриозата

Ендометриозата е заболяване при жените, при което се развива ендометриална тъкан състояща се от жлези и строма на ектопични места, вкл. в мозъка. Първоначалната теория за ретроградната менструация не може да обясни далечните ектопични лезии. Нови теории обясняват възникването ѝ от костно-мозъчни стволови клетки, или от инфламаторно-индуцирана цъоломна метаплазия, промени в автоимунитета и др. Въпреки, че дълги години заболяването е считано за доброкачествено, напоследък се приема, че асоциираният с него про-инфламаторен и нео-ангиогенен отговор, водещи до ендотелна дисфункция, могат да доведат дори и до канцерогенеза. Установени са повишени нива на IL-1, IL-6, TNF- α , вкл. в перитонеалната течност, както и промени в Т-клетъчните субпопулации, активирани от дендритни клетки в лезиите и отделянето от тях на хемокина RANTES, monocyte chemotactic protein-1, macrophage inflammatory protein-1-alpha. Т-клетъчните популации търпят промяна към Th2 отговор, с увеличаване на процента на Т-рег. кл. в перитонеалните течности. В проучванията посочени в публикации № 13, № 14 са изследвани перитонеални течности от жени с ендометриоза и контролна група жени, претърпели лапароскопски интервенции по други причини. Установява се потискане на процеса на децидуализация в клетъчни култури от човешки стромални ендометриални клетки от перитонеалните течности, поради което последните са изследвани с двумерна електрофореза, денситометрия и биоинформатичен анализ на получените петна чрез сребърно оцветяване, с цел определяне на сигналните пътища променени в клетки – източник на перитонеалната течност.

Лични приноси:

2.1. Приложен е метод с дву-дименционално разделяне на протеиновото съдържание на перитонеални течности от пациенти. Приложено е изоелектрично фокусиране и последващо разделяне на протеините по молекулно тегло. С помощта на маркери в пробите е нормализирано и изчислено молекулното тегло на протеиновите петна и изоелектричната точка, като са приложени и методи на сребърно оцветяване на

геловите и денситометричен образен анализ. Приложен бе Факторен статистически анализ при изолиране на петна от двуизмерни гелове от ендометриозни перитонеални течности и такива без или с друга патология, показващ петната с параметри внасящи най-голяма вариабилност в данните. Селектираните петна са използвани за „вероятностно идентифициране“ на сигналните пътища, в които биха могли да участват, чрез следния алгоритъм: с помощта на биоинформатичен инструмент са получени списъци с потенциални протеини, съответстващи на оцветените в геловите, като са използвани реално детектирани с помощта на мас-спектрометрия протеини от същия биологичен вид в двуизмерни гелове; проведен е биоинформатичен анализ със статистическо обогатяване на генно-онтологичните анотации на провизорните протеини, позволяващ да се определят с известна вероятност сигналните пътища, съдържащи провизорните протеини. С помощта на подхода са предсказани сигнални пътища, активирани в перитонеалните ендометриозни лезии (от клетките, отделящи перитонеалната течност или от имунни клетки в нея), свързани с евентуалната патогенеза, показваща активиране на сигнализация в имунната система, сигнализация на повърхности рецептори на имунната система, сигнален път на Toll-подобните рецептори, активация на каскадата I-kappa B kinase / NF-кВ. Чрез функционално статистическо обогатяване на генно-онтологичните анотации е установено, че най-репрезентиран е пътят на Адхерентните контакти, представен от провизорно детектираните протеинови еквиваленти на гените: EGFR (Epidermal growth factor receptor), FGFR1 (Fibroblast growth factor receptor 1), MAPKKK7 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7), и PTPNR 6 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 3), представляващи рецептора на епидермалния растежен фактор, свързан с клетъчната пролиферация и онкогенната трансформация при някои онкогенни заболявания, рецептор 1 на фибробластния растежен фактор, свързан с потенцирането на нео-ангиогенезата и малигнена трансформация, митоген-активирана киназа киназа киназа 7, свързана с клетъчна пролиферация, трансформация и мотилитет и нерецепторна тирозин-протеин фосфатаза тип 3, свързана с клетъчен растеж, диференциация, митотичен цикъл и онкогенна трансформация. Множество от предсказаните сигнални пътища и протеини са валидирани експериментално в публикации на други изследователски групи - публикации № 13, № 14.

3. Изследване ролята на вродената имунна сигнализация в клетките на Сертоли за патогенезата на имунологично базирания мъжки инфертилитет

Клетките на Сертоли изграждат част от семиниферните тубули и формират стволовата 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, и защитават 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.

3.1. При изследване на миши Сертоли клетки от пред-пубертетни и полово зрели индивиди се установява на транскриптно и на протеиново ниво експресия на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2, както и на инфламазомния протеин NALP3. С помощта на функционални изследвания за активиране на рецепторите и проследяване на интрацелуларната експресия на тези протеини и на някои про-инфламаторни цитокини е показана активация на инфламазомата и отделяне на активно срян IL-1beta, както и отделянето на про-инфламаторни цитокини насочващи към Th17 патологичен имунен отговор и загуба на целостта на кръвно-тестисната бариера. Установена е и директна активация на Caspase-1, основен ензим, активиращ се от NALP3 и конвертиращ IL-1beta от проформа в активна такава. Отделно е установено, че тази активация на инфламазомата е свързана и с активация на автофагоцитозния флукс – **публикация № 4. Лични приноси:**

Лични приноси:

3.1.1. С помощта на RT-qPCR и флуоцитометрични изследвания са проследени експресиите на рецепторите на вроден имунен отговор и инфламаторни цитокини. Установено е, че пролонгираната експозиция на клетки на Сертоли в среда с лиганди на NOD1 и NOD2, с или без активация на TLR4, особено в присъствието на сигнала за „опасност“ АТФ, води до активация на Caspase-1, експресия на IL-1 β , IL-6, IL-23 и до клетъчна смърт. Активира се и *de novo* експресията на NALP3, което е доказано с едновременна стимулация на сигналните пътища на NOD1 и/или TLR4 и генно заглушаване на Nalp3

транслацията. Получена е стабилна линия от клетки на Сертоли, съдържаща вектор с промоторен елемент, реагиращ на активиран NF- κ B, с отделянето на секретирuема алкална фосфатаза. Нивата ѝ бяха измервани в хранителните среди на живи, третирани с различни лиганди на вродения имунен отговор клетки на Сертоли. Активацията на Caspase-1 е показана със специфично преобразуване на хромогенен ензимен субстрат, а каузалността на тази активация от NALP3 е доказана с генно заглушаване на Nalp3 транслацията. Срязването на IL-1beta е доказано с помощта на ELISA метод – **публикация № 4, научно съобщение № 7, № 10.**

3.1.2. Приложен е нов метод за детекция на глобалния ДНК метилационен статус на ниво единична клетка, с помощта на 3D реконструкция на ядро и метилирана ДНК и анализ на обекти. Методът показва промени в ДНК метилирането в резултат на третиране на клетки на Сертоли с лиганди на рецептори на вродения имунен отговор от семейство TLR4 – **научно съобщение № 1, № 2, № 5.**

3.2. Установено е, че сигнализацията през рецепторите от семейството на вродения имунен отговор NOD1 в клетките на Сертоли има протективен характер към плътните контакти, формиращи кръвно-тестисната бариера, докато активирането на сигнализация през рецептора NOD2 действа различно на контактите. Потискането на сигнализацията на инфламазомата NALP3 също оказва влияние на плътните контакти. По този начин е показана ролята на инфламаторния сигнал като механизъм за контрол на достъпа на имунни клетки до стволната ниша и зоната на клетъчна увреда, чрез модулиране на междуклетъчните контакти - **публикации № 9, № 10, №11.**

Лични приноси:

3.2.1. Чрез прилагане на методи за генно заглушаване на Nalp3, както и на RT-qPCR и флоуцитометрия е установено, че основният за функцията на плътните контакти трансмембранен протеин оклудин, който осъществява с екстрацелуларния си домейн връзка между две Сертоли клетки, е свръх-регулиран при стимулиране на рецепторите NOD1 или NOD2, или и на двата. Заглушаването на инфламазомата NALP3 демонстрира рестриктивен ефект по отношение на тази свръх-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 компарментализацията на сперматогенезата, подържана от същата тази бариера. Други два основни протеина – клаудин-5 и клаудин-11 са различно регулирани при стимулиране на рецепторите на вродения имунен отговор NOD1 и NOD2. Стимулирането на рецептора NOD1 е 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 свръх-регулиране на клаудините. Активирането на рецептора NOD2 води до различно поведение на клаудин-5 и клаудин-11, подсказвайки разлика в сигнализацията, която се индуцира по пътя на NOD2 - публикации № 9, № 10, №11.

4. Изследване ролята на ембрионален имуно-модулиращ пептид като имуномодулятор с терапевтичен потенциал

ПреИмплантационенФактор™ (PreImplantationFactor™, PIF) е 15 аминокиселинен пептид, отделен от ембрионите на всички бозайници, открит от д-р Итън Барнеа и патентован от BioIncept LLC, NJ, US. Освен, ролята му за виталитета на ембрионите и нормалната им имплантация, PIF има и имуномодулиращи свойства. PIF е одобрен през 2014 год. като “Fast track drug target” от Американската Администрация по храните и лекарствата (U.S. Food and Drug Administration, FDA).

4.1. Установено е, че PIF подпомага развитието на ембрионите, като противодейства на оксидативният стрес и неправилното нагъване на протеините в тях и ги предпазва от преждевременна смърт в среда с ембрио-токсичен серум, като този ефект е опосредстван от аминокиселинна му секвенция R₄I₅K₆P₇. Чрез скрийнинг с протеинов чип за потенциални протеинови интерактори (участващи в протеин-протеинови взаимодействия), PIF бе изследван за взаимодействие с над 1500 прицелни молекули. Първичните данни са публикувани в друго изследване, но биоинформатичният анализ за механизмите на свързване и характеристиките на рецепторната част в прицелните молекули е извършена в нашата лаборатория.

Лични приноси:

4.1.1. В изследването е показано, че PIF се свързва с помощта на обща секвенция - R₄I₅K₆P₇ (Arg₃, Ile₄, Lys₅, Pro₆) към двете прицелни молекули, *протеин дисулфид изомераза* (protein disulfide isomerases, PDI) и топлинно-шоков протеин 70 (heat shock proteins, 70; HSP70). Приложен е метод за *in silico* предсказване на свързването на PIF към кристалографски модели на HSP70 (Protein Data Bank модели 3FZH, 3A8Y), и моделиране на свързването на PIF с HSP70 (“*peptide flexible docking*”), като е показано, чрез *in silico* мутагенеза на всяка аминокиселина от интерфейса на свързване на PIF с HSP70, кои са значещите аминокиселини, които могат да причинят нарушаване на връзката лиганд-рецептор - **публикация № 8 - Figure 4f, Figure S6 и научно съобщение № 3, № 4**. Моделирането показва, че PIF има по-висока вероятност да свърже HSP70, когато последният е предварително свързан с молекули от анти-апоптотичните пътища на сигнализация, като интеракторите на BCL-2 - Bag1 и Bag5.

4.2. Установено бе, че ПреИмплантационенФактор директно регулира CD2 - ко-стимулаторната молекула на Т-кл. рецептор, който свързва и се активира от митогена фитохемаглутинин (РНА), но не засяга ранната Ca²⁺ мобилизация. Като промотира CD2 рецептора в активирани Т-кл. и инхибира експресията на ко-лиганда CD58, PIF регулира взаимодействието антиген-представяща клетка–Т-клетка, нужно за действието на РНА.

Лични приноси:

4.2.1. Проведени са структурно молекулно моделиране и молекулен докинг, които показват, че формата PIF₁₅ има подобрена специфичност към прицелните молекули, каквато е оксидираната форма на PDI, в сравнение с формата PIF₉. Въпреки, че формите PIF₁₅ и PIF₉ имат подобна ефективност при РНА-индуцираната пролиферация и цитокинова секреция, формата PIF₁₅ е по-често срещана при секретиранияте от ембриона варианти. При докинг моделиране на свързването на двете форми на PIF към PDI в оксидиран и в редуциран вид, бе показано, че енергиите на свързване на PIF₁₅ е по-висока от тази на PIF₉, показвайки че допълнителните аминокиселини в PIF₁₅ формата подобряват селективното му свързване - **публикация № 7 (Table 1, Fig. 7A, B)**.

4.3. Установено е, че ПреИмпантационнияФактор води до интегрирана системна имунна регулация, като действа на сходни прицелни протеини в CD14+, CD4+ и CD8+ клетките. Анализа на PIF интеракторите показва, че PIF действа след CD14/TLR4/MD2 комплекса в липополизахарид индуцирани макрофаги, като взаимодейства с множество протеини от 14-3-3 (ζ/δ , ϵ 1, β/α 1, η) семейството, виментин, калретикулин и калмодулин. Докато при CD4+ и CD8+ клетките, пептидът взаимодейства с цитоскелетни протеини и 14-3-3 ζ/δ . Показано е, че ефекта на PIF вероятно зависи от интерактори на рецептора TLR4, въпреки че пептидът не се свързва с него директно.

Лични приноси:

4.3.1. Изследвано бе, как PIF взаимодейства с различни прицелни молекули за липополизахарид (ЛПС) индуцираната сигнализация (ЛПС е специфичен лиганд на TLR4). Идентифицирани с протеомика протеини – интерактори на PIF като YWHAH (14-3-3 η), PTMA (prothymosin- α 1) и MYH9 (myosin-9) са анализирани с алгоритъм, изграждащ сигнални пътища от свързани с тях молекули, които са или протеиновы интерактори, или са експресирани както тези молекули в тъканите или са част от известни сигнални пътища. Установява се, че PIF вероятно взаимодейства и с NF κ B, естрогенови рецептори 1 и 2, андрогенен рецептор, и ABL1. PIF протеиновите интерактори бяха клъстеризирани с дендрограма и нивата на експресия сравнени с „топлинно картиране“, показващо специфична група протеини, взаимодействащи в CD14+ клетките, и различни много по-малко на брой групи протеини в CD4+ и CD8+ клетките. Показано е, че PIF взаимодейства с молекули, свързани с TLR4 сигнализацията, като директния му интерактор Myosin-9. PIF взаимодейства и с антагонистичните на TLR4 протеини 14-3-3 ϵ и 14-3-3 σ , както и с калмодулин, друг интерактор на PIF, който активира кинази свързващи TLR4 и BCL2 експресията - **публикация № 6, Фигури № 5, № 7.**

4.4. Установено е, че ПреИмпантационнияФактор потиска развитието на атеросклероза в експериментален ApoE дефицитен миши модел, като действа анти-инфламаторно, намалявайки инфилтрацията на макрофагите (интравитална мултифотонна микроскопия), експресията на про-инфламаторни клетъчно-

адхезивни молекули, хемокини и цитокини в атеросклеротичната плака и циркулиращият IFN- γ . PIF осъществява ефектите си, като регулира функциите на моноцитите. PIF намалява миграция им *in vitro* и в перитонитен *in vivo* модел, както и екстравазацията им.

Лични приноси:

4.4.1. Тези ефекти са опосредствани от взаимодействие с Шейкърните волт-зависими калиеви канали 3 (KCNAВ3) и с инсулин деградиращият ензим (IDE). Ефектът на PIF е сравнен с този на неспецифичен и специфичен инхибитор на Шейкърните волт-зависими калиеви канали 3 (KCNAВ3) в клетъчен Jurkat модел, в който калиевите канали са в превес на калциевите. Tl⁺ базиран тест показва, че флуксът на калиеви йони се прекъсва по доза-зависим начин от PIF, подобно на инхибиторите, но не и от мутантни или скрамблирани форми на пептида. Показано е, че ефекта на PIF е подобен на този на кортизона, както и че в едновременно присъствие на последния ефекта се потиска, което прави PIF и кортизона взаимно-заменяеми антагонисти - публикация № 5 (Фиг. 5A), научно съобщение №3, № 4, № 6.

4.5. ПреИмпантационнияФактор предотвратява забавянето на ембрионалното развитие при ембриони, третирани с фракции от серуми от пациентки с рекурентни аборти. Това вероятно се дължи на потискане на образуването на реактивни форми на кислорода (ROS), т.к. PIF взаимодейства в ембриона с комплекса протеин дисулфид изомераза/тиоредуксин (PDI/TRX), който има функция да прихваща ROS. Инхибиторът 16F16 на PDI/TRX силно потиска развитието на ембрионите и достигането до стадии бластоцист, докато екзогенния PIF увеличава над 2 пъти броя на ембрионите, достигащи този стадии.

Лични приноси:

4.5.1. Чрез *in silico* анализ, сравняващ местата за докинг на инхибитора I PIF към оксидираната и редуцираната форма на PDI е установен механизма на действие на PIF. Механистично, PDI-инхибитора се свързва ковалентно с предпочитание към оксидираната форма на PDI и само слабо свързва редуцираната му форма. Прилагането на PIF води до свързването на последния към определено място на молекулата на PDI/TRX, като така се

ограничават про-оксидативните ефекти на инхибитора на PDI. Прилагането на фракцията над 3kDa от серум на жени с рекурентни аборти води до над 3 пъти увеличение в броя на загиналите ембриони, но потискането на PIF с антитела срещу него не води до ембрио-токсичност – **публикация № 15, Figure 3B-C, Figure 4A-D, Figure 5; Supplementary Table 3.**

В представените по конкурса публикации, доц. Тодорова е първи автор в 3 публикации, втори автор в 2 публикации и старши последен автор в 3 статии, от общо 15 публикации участващи в конкурса.

От представените 15 публикации, 2 са в първите 10% от ранга на списанията в съответната научна област – според SJR *списанието Nature Scientific Reports (IF 5.578)* има ранг 4 от 111 списания (т.е. в първите 3%) в топик Multidisciplinary, а според ISI Web of Science Global Journal Rank, списанието е на 625 позиция от 11997 (т.е. в първите 10%); според SJR *списанието Thrombosis and Haemostasis (IF 5.255)* има ранг 412 от 6537 списания в топик Medicine (първите 6.30%), а в топик Haemathology има ранг 14 от 123 списания; според ISI Web of Science Global Journal Rank, списанието е на 619 позиция от 11997 (също в първите 10%).

Списанията *Hormones and Cancer (IF 3.165)*, *Oncotarget (IF 5.008)*, *Immunobiology (IF 3)*, *PloS ONE (IF 3.5)* са съответно според SJR с ранг в първите 10.86%, 22.6%, 26.6%, 27.1% съответно в областите *Oncology*, *Oncology*, *Immunology and Microbiology*, *Agricultural and Biological Sciences*.