

1. Авторска справка на доц. д-р Сорен Б. 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**

- *Връзка на про-инфламаторната сигнализация с геномната нестабилност, епигенетичните механизми на регулация и автофагията в канцерогенезата;*
- *Изследване ролята на ембрио-секретиран имуно-модулиращ пептид за евентуалната превенция на системни авто-имунни заболявания и патологии с имунна патогенеза, като диабет, болест на Алцхаймер и пр.;*
- *Изследване ролята на рецепторно-опосредстваната вродена имунна сигнализация за патогенезата на системни авто-имунни заболявания и патологии с имунна патогенеза;*

#### **Методични направления**

- *биоинформатичен анализ на големи обеми от данни получени от ОМИКс технологии като протеомика с висока резолюция и анализ на сигнални пътища;*
- *химическа информатика за анализ на лиганд-рецепторни взаимодействия – създаден е работен алгоритъм за получаване на *de novo* и *ab initio* компютърни модели на прицелни молекули за малки 9 и 15 аминокиселинни пептиди, както и за моделиране на самите пептиди. Разработеният подход включва: 1. Приложение на ориентировъчен метод за предсказване на свързване на пептид към протеинова молекула, с определяне на геометричните центрове на групите на пептида в евентуално потенциално място за свързване; 2. Приложение на моделиране на гъвкаво прикачване на пептида към кристалографски модел на протеиновата прицелна молекула (*flexible peptide docking*), 3. Използване на алгоритъм за *in silico* мутагенеза на пептида в мястото на интерфейс между него и прицелния рецептор, като всяка аминокиселина на всяка позиция се заменя с всички други възможни и се преизчислява енергията на свързване и общата енергия на молекулния комплекс пептид-протеинов рецептор; 4. Получените мутантни форми на пептида се подлагат на ново гъвкаво моделиране на свързване с рецептора и се сравняват енергиите на свързване и дистанциите между пептида и прицелния му рецептор, като така се валидира мутацията;*
- *химическа информатика за анализ на значещите аминокиселинни остатъци в пептиден лиганд за свързването му с различни таргетни молекули от семейството на калиевите волтаж-зависими канали - създаден е работен алгоритъм за анализ на значещите аминокиселини, включващ комплексен*

анализ, състоящ се от: 1. Предсказване на евентуално свързване на пептида към кристалографски модели на прицелни протеини, с определяне на това кои аминокиселинни остатъци на пептида с кои съответни остатъци от протеина се свързват; 2. Клъстеризиране на прицелните протеини по предиктивна оценка на потенциално свързване; 3. Използване на невронна мрежа тип „Само-организиращи се карти“ в режим на обучение без супервизия, върху предиктивните оценки за свързване на пептида към протеинови рецептори (различни калиеви канали от различни под-семейства), позволяваща оценка на специфичността на свързване на пептида по семейства и конкретни калиеви канали;

- *молекулярна биология* – създаден е комплексен метод за директно безшевно клониране на синтетични гени, кодиращи директно къси пептиди: използвани са нови методи за дизайн на кодон-оптимизирана ДНК, която кодира оптимизирана по 5' края иРНК, на границата на рибозомалния праг за транслация; методът е комбиниран с *de novo* структурно моделиране на фузионни пептиди с цел оптимизация на свойствата им;
- *молекулярна биология* – оптимизиране на метод за „proximity ligation assay“ за детекция на фузионен протеинов продукт, без предварително известна пълна аминокиселинна последователност: използвани са данни от дълбоко секвениране на онкофузията TMPRSS2:ERG за определяне на транслируемите N- и C- краища на фузионния протеинов продукт; получаване на *de novo* структурни молекулни модели за оценка на стеричните интерференции при свързване на фузионната молекула с поне две тип IgG антитела; определяне на потенциалните епитопи разпознавани от поликлонални IgG разпознаващи N- и C- краищата на физиологичните форми, кодирани от гените TMPRSS2 и ERG, и евентуалното им наличие във фузионните онкопротеини;

### **1. Връзка на про-инфламаторната сигнализация с геномната нестабилност, епигенетичните механизми на регулация и автофагията в канцерогенезата**

В канцерогенезата като цяло и в простатната канцерогенеза по-специално, възникването на онкогенна клетъчна трансформация се разглежда в контекста на про-инфламаторно индуцирана сигнализация водеща до геномна нестабилност, епигенетично репрограмизиране на клетъчната съдба и преход към хормонално рефрактерни състояния. Тези промени на свой ред причиняват непрекъснато прогресираща геномна увреда, дестабилизация, загуба на тумор-супресивен контрол и метастазирание. В този контекст глобалното геномно реаранжиране е относително нов феномен, който стана известен благодарение на пълното геномно секвенирането от ново поколение. Освен, че про-инфламаторната сигнализация потенцира канцерогенезата, както е известно от множество изследвания преди, нашите проучвания показват, че геномното реаранжиране на свой ред води до позитивна селекция на потенциращи клетъчната преживяемост мутации. В отделни клетъчни субпопулации се съдържат реаранжировки

водещи до епигенетични феномени, използващи вътреклетъчната вродена имунна сигнализация, с цел стабилизиране и потенциране на малигнения фенотип.

Изследвана е комплексната взаимовръзка между една почти неизследвана некодиращата микро-РНК, микроРНК-204, като част от епигенетичен механизъм на регулация на мрежа от транскрипционни фактори, подпомагащи развитието и метастазирането на простатния карцином. Проследена е нейната роля за епитело-мезенхимната трансформация, водеща до прехода на по-силно диференцирани епитело-подобни клетки в простатната жлеза до дедиференциран и метастатичен фенотип. В този процес е интегрирана промяната и в следствие загубата на андроген-рецепторната сигнализация. В същият процес играят важна роля и основни онкофузионни феномени, като TMPRSS2:ERG.

1.1. Установена е, и е съобщена за пръв път *дуалистичната роля на микроРНК-204* в резултат на сложно дерегулиране на гените, участващи в позитивната обратна връзка между транскрипционните фактори с-MYB-RUNX2-ETS1 и рестрикционния контрол, осъществяван от микроРНК-204, в резултат на което се потенцира силно метастатичен фенотип в позитивните за TMPRSS2:ERG фузията клетки. МикроРНК-204 постепенно загубва тумор-супресорната си активност и започва да дерегулира напредналите позитивни за фузията клетъчни линии от простатен карцином, подпомагайки епитело-мезенхимната трансформация по андроген-рецептор зависим и TMPRSS2:ERG фузия-зависим характер. В тези линии, микроРНК-204 потенцира транскрипционните фактори сMYB и RUNX2 да активират туморната пролиферация и костно-мозъчното метастазиране. Различните модели на метастазиращ простатен карцином – метастатичен тип в лимфните възли и метастатичен тип в костния мозък, имат различен тип на експресия на различни епитело-мезенхимни маркери и транскрипционни фактори. Това предоставя първична информация за персонализиране на терапевтичните подходи и средствата за селективно потискане на некодиращи РНК-и и транскрипционни фактори. **публикации №5, № 8, №11 и научни съобщения № 11, №12.**

1.1.1. **Лични приноси:** Флоуцитометрична оценка на вътреклетъчната експресия на важни за метастазирането транскрипционни фактори под действието на микро-РНК-204. Денситометрична оценка на протеинова експресия в имуноблот. Биоинформатичен анализ на протеомни данни с висока резолюция, показващ промени в убиквитинирането и промяна в полуживота на изследваните транскрипционни фактори при наличие на промени в андрогенната сигнализация.

1.2. МикроРНК-ите са директни медиатори на андрогенната рецептивност. Ролята на изследваната микроРНК е проследена в контекста *взаимовръзката микроРНК - андрогенен рецептор - онкофузионен феномен*. Установено бе,

че микроРНК-204 е способна да модулира ефекта на някои важни регулатори на ДНК метилирането и сигнализация на андрогенният рецептор, както и да регулира експресията и промоторното метилиране при андрогенният рецептор и фузионния ген TMPRSS2:ERG. На молекулно ниво, репресията на AR от TMPRSS2:ERG може да предостави злокачествен селекционен натиск, който да допринесе за рекурентия на туморите, чрез амплифициране на AR. TMPRSS2:ERG играе много важна роля в развитието на простатният карцином, чрез разрушаване на програмата за диференциация на AR-специфични клетъчни редове в простатата и благоприятства EZH2-медираното клетъчно дедиференциране. В допълнение, чрез инхибиране на AR сигнализация, TMPRSS2:ERG може селективно да оказва натиск за развитието на простатният карцином, който е резистентен към хормон-депривационна терапия. От друга страна, преди достигане до андрогенна рефрактерност, именно AR активира промотора на TMPRSS2:ERG, потенцирайки неговите про-онкогенни действия. Установен е феномен на “препрограмиране” на андрогенният рецептор, който е опосредстван от загуба на традиционни прицелни молекули, промяна в регулацията на убиквитинирането, транскрипционната и протеиновата стабилност, промяна в регулацията на ДНК метилирането и регулацията на някои хистони, модулиране регулацията на прицелни на андрогенният рецептор молекули. Участието на оста андрогенен рецептор - онкофузия изглежда има фундаментално значение за прогресията на простатния карцином. В този аспект, микроРНК-204 модулира и двете, вероятно потенцирайки метастазирането по комплексен механизъм - както чрез активиране на епитело-мезенхимната трансформация, така и чрез модулиране на онкофузионната експресия, и чрез индукция на транскрипционни фактори, потенциращи метастазирането. **публикации № 1, №7, научни съобщения №2, №3, №7, №8**

1.2.1. *Лични приноси:* Изследвани са данни от протеомика на няколко клетъчни линии от простатен карцином с и без андрогенна рефрактерност, като са сравнени генните сигнатури MSigDB за гени активирани от андрогенна сигнализация, микроРНК-204, модулатори на андрогенният рецептор и други и са конструирани автоматично генно-регулаторни сигнални мрежи показващи взаимодействията на активация и супресия на андрогенната и други сигнализации под действието на микроРНК-204. Установени са промени в няколко нива на епигенетична регулация, съвпадащи и обясняващи наблюдавани експериментално феномени в същите публикации под действието на екзогенна свръх-експресия на микро-РНК-204, съвпадаща с напредналите стадии притежаващи геномната реаранжировка TMPRSS2:ERG.

1.3. В патологичната практика от едва няколко години се изследва ERG, но не съществуваше метод за детекцията на формите на генно реаранжиране в

хромозома 21, при които се получават функционално навити “*in frame*” TMPRSS2:ERG мутанти. Поради възможността да възникнат и множество некодиращи мутанти с минимално значение за канцерогенезата, бе разработен *метод за откриване на протеиновият продукт на тази патологично формирана само в клетки от карцином на простатата генна фузия*. Методът за детекция на протеиновата експресия на TMPRSS2:ERG може да бъде използван за оценка на нивата на функционален протеин на генната фузия TMPRSS2:ERG при експериментална работа с клетъчни линии, носители на фузията, както и в материал, получен от биологични течности (серум, урина) и/или тъкани (простатна биопсия). Разработеният диагностичен метод би позволил положителните за TMPRSS2:ERG функционален протеин пациенти да бъдат лекувани с терапия насочена към най-агресивните форми на простатен карцином (химиотерапия), докато пациенти, позитивни за онко-фузията на RT-qPCR, но негативни по предлаганият метод да бъдат лекувани по конвенционалните схеми (андроген депривационна терапия и др.). **патент №1, публикация №1**

**1.3.1. Лични приноси:** Анализ на данни от второ ново поколение дълбоко секвениране на клинични варианти на фузията TMPRSS2:ERG и на вариантите намиращи се в клетъчни линии като VCaP с цел определяне на транслируемите краища N- и C- на фузионния онкопротеин. Генериране на три-дименсионални *de novo* структурни модели позволяващи оценка на молекулни размери и стерични интерференции при свързване на една фузионна молекула с поне две тип IgG антитела. Предикция на линейни и стерични епитопи по няколко различни алгоритъма основаващи се на тип секвенции, хидрофобност и др. с цел определяне на консенсусни секвенции и възможност за детекция от комерсиални поликлонални антитела – сравнени са потенциалните епитопи в нативните немутатни молекули с епитопите които биха били генерирани от пула от секвенции наличен във фузионните форми.

1.4. За развитието на геномните увреди и препрограмирането на сигналните пътища, съпътстващи канцерогенезата важно участие има инфламаторната и генотоксичната сигнализация. Участието на микроРНК-204 в регулацията на NF-κB обединява нейните ефекти относно метастазирането с инфламаторната сигнализация, което повдига въпроса дали има и механистична връзка с андрогенната сигнализация. Настоящите данни предполагат, че вродената имунна сигнализация и в частичност рецепторът NOD1 от семейството рецептори на вродения имунен отговор NOD, са ефективни модулатори на съдбата на метастатичните карциномни клетки в простатата, в посока оцеляване и трансформация към по-високо метастатичен фенотип. Още един аспект на връзката оксидативен и геномен стрес с инфламаторната сигнализация се открива при проследяване на свойствата на “възкръсващия” растителен вид *Haberlea rhodopensis*. Клетките с неопластична промяна

демонстрират повишена устойчивост към апоптоза при стрес, независимо от наличието на запазена p53 сигнализация. Апоптоза свързаните ефекти в UV опосредстваната ДНК увреда бяха установени да зависят от сигнализацията на апоптоза свързаният протеин PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA)*) и са вероятно медиирани от p73, както става ясно от резултатите, получени при клетъчната линия PC3 с липсващ p53. Установени бяха различни модуляции върху сигнализацията на вроденият имуен отговор при клетки без неопластични промени и неопластично променени такива, в експерименти с използване на изкуствени патогенни лиганди на NOD1. Сигналинга бе установен да действа чрез Act1-зависима NF-κB модулация в клетъчната линия, представляваща модел на метастаза на простатен карцином в лимфен възел (LNCaP). Обратно, в клетъчната линия представляваща модел на метастаза на простатен карцином в костен мозък (PC3), не се наблюдава модулация на NF-κB. **публикации №10, № 13, №15, №16, научно съобщение №1** (свързано е в методично отношение)

1.4.1. **Лични приноси:** Комплексна флоуцитометрична оценка на експресия на протеини свързани с вродената имунна сигнализация, нива на оксидативен стрес и апоптоза/клетъчна смърт. Оптимизирани са постановки за UV индуциран генотоксичен и оксидативен стрес. Оптимизиране на експериментална постановка със стабилна клетъчна линия експресираща вектор реагиращ на активиран NF-κB.

1.5. Друг свързан и с инфламаторната сигнализация и с канцерогенезата феномен, какъвто е автофагоцитозата (автофагията), също е модулиран от микроРНК-204. Активираният от микроРНК-204 или от индуцирането на пътища на вродения имунитет (чрез NOD1), автофагоцитозен път в LNCaP подсказва, че тези метастази в лимфните възли ще бъдат по-възприемчиви към лечението с инхибитори на mTOR (сигнална молекула от пътя за активиране на автофагоцитоза) в сравнение с PC3 клетки (костни метастази), в които процеса на автофагоцитоза е "изключен". **публикации №1, № 14, научни съобщения № 1** (свързано е в методично отношение), **№ 2**

1.5.1. **Лични приноси:** Флоуцитометрично определяне нивата на експресия на протеини свързани с вродената имунна сигнализация. Изследвани са данни от протеомика на няколко клетъчни линии от простатен карцином с и без андрогенна рефрактерност, като са сравнени генните сигнатури MSigDB за гени активирани от андрогенна сигнализация, микроРНК-204, модулатори на андрогенният рецептор и други и са конструирани автоматично генно-регулаторни сигнални мрежи показващи взаимодействията на активация и супресия на андрогенната и други сигнализации под действието на микроРНК-204 и асоциацията им с елементи на сигналните пътища на автофагоцитозата.

## 2. Изследване ролята на ембрио-секретирани имуно-модулиращи пептиди за евентуалната превенция на системни авто-имунни заболявания и патологии с имунна патогенеза, като диабет, болест на Алцхаймер и пр.

Ембрионите на всички бозайници отделят пептид с дължина от 15 аминокиселини, открит от д-р Итън Барнеа и патентован от BioIncept LLC, NJ, US, под търговското наименование ПреИмплантиционенФактор™ (PreImplantationFactor™, PIF). Ендогенният ПреИмплантиционенФактор (PIF) от който зависи развитието на ембриона се секретира само от витални ембриони и липсва при ембрионите без жизнен потенциал. Освен, че пептидът PIF е доказан като изключително важен за виталитета на ембрионите и нормалната имплантация и трофобластна инвазия, PIF има и имуномодулиращи свойства, позволявайки да бъде разглеждан като прицелна молекула за терапия. PIF бе одобрен през 2014 год. като "Fast track drug target" от Американската Администрация по храните и лекарствата (U.S. Food and Drug Administration, FDA).

2.1. Изследвана е ролята на PIF в развитието на ембрионите и е показано за първи път, че PIF предпазва ембрионите, като противодейства на оксидативния стрес и неправилното нагъване на протеините, като този ефект механистично е зависим от „основната“ аминокиселинна секвенция на PIF – R<sub>4</sub>I<sub>5</sub>K<sub>6</sub>P<sub>7</sub>. Синтетично *fmoc* синтезиран екзогенен PIF, подобно на ендогенния пептид, от който зависи развитието на ембриона (при бозайниците) и се секретира само от витални ембриони, е установен да може да промотира развитието на самостоятелно култивирани ембриони и ги предпазва от преждевременна смърт в среда с ембрио-токсичен серум. В изследването описано в **публикация №12** и **научно съобщение № 9**, са описани резултати показващи, че PIF се интернализира активно от ембрионите, като между експериментално показаните (PIF-имуно-афинитетно изолирани протеини доказани с LC/MS<sup>2</sup> протеомика) прицелни протеинови интерактори в ембриона, PIF взаимодейства с молекулите *протеин дисулфид изомераза* (protein disulfide isomerases, PDI), притежаваща един анти-оксидантен тиоредоксинов домейн, както и с протектиращите топлинно-шокови протеини 70 и 90 (heat shock proteins, 70&90; HSP70, HSP90).

2.1.1. **Личен принос:** 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. В изследването е показано, че PIF се свързва с помощта на обща секвенция - R<sub>4</sub>I<sub>5</sub>K<sub>6</sub>P<sub>7</sub> (Arg<sub>3</sub>, Ile<sub>4</sub>, Lys<sub>5</sub>, Pro<sub>6</sub>) към двете прицелни молекули, PDI и HSP.

Приложен е метод за *in silico* предсказване на свързването на PIF към 60 кристалографски модела на PDI, и моделиране на свързването на PIF с PDI ("*peptide flexible docking*"), като е показано, чрез *in silico* мутагенеза на всяка аминокиселина от интерфейса на свързване на PIF с PDI, кои са значещите аминокиселини, които могат да причинят нарушаване на връзката лиганд-рецептор. **публикация №12** - Table 5, Table S5 in File S1, Table 6, Table S6 in File S1, Table S7 in File S1, Figure 3c,d. Като се използва моделиране на свързването на PIF към различни кристалографски модели на PDI – оксидиран и редуциран PDI, бе установено, че 2 от възможните мутации в интерфейса са конформационно зависими (Pro<sub>6</sub> – специфична за редуцирана форма на PDI, и Val<sub>2</sub> – специфична за оксидирана форма на PDI) и едната е конформационно независима (мутагенеза на позиция Ile4), показващо ролята на Pro<sub>6</sub> за функцията на PIF. Последната е показана в няколко други изследвания и при други прицелни молекули, от които едното е в статус на "*major revision*" и показва механизмите на действие на PIF спрямо PDI в ембриони от бозайници.

2.2. ПреИмплантационенФактор™ се секретира в две форми, 9 и 15 аминокиселинна - PIF<sub>9</sub>, PIF<sub>15</sub>, като и двете оказват ефект върху макрофагите в модел различен от бременност, и регулират CD3/CD28-индуцирания Т-клетъчен отговор, като промотират Th2 цитокинов профил. В изследване (**публикация №6**) е показано, че PIF директно регулира CD2 - ко-стимулаторната молекула на Т-кл. рецептор, който свързва и се активира от митогена фитохемаглутинин (PНА), но не засяга ранната Ca<sup>2+</sup> 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 PНА.

2.2.1. **Личен принос:** Структурно молекулно моделиране и молекулен докинг показват, че формата PIF<sub>15</sub> има подобрена специфичност към прицелните молекули, каквато е PDI, в сравнение с формата PIF<sub>9</sub>. Установените като значещи аминокиселинни остатъци с позиции 3–6 (RIKP, Arg<sub>3</sub>-Pro<sub>6</sub>) са общи за двете форми PIF<sub>15</sub> и PIF<sub>9</sub>, но т.к. двете форми имат различни енергии на свързване, бе изследвано дали разлики в третичната им структура допринасят за тяхната молекулна динамика. С помощта на де ново моделиране на двете форми на пептида и структурно съпоставяне, както и с методи на молекулна динамика са изследвани свойствата им. Установено е, че по-дългата структура има различна способност да образува слаби връзки, като тя има по-малка флексибилност от късата форма, което позволява по-висока специфичност на свързване с прицелни молекули, докато късата форма има по-висока активност при по-ниска специфичност. **публикация №6** (Fig. 7C–H).



2.3. ПреИмплантиционенФактор™ е установен да има системен ефект, като действа на сходни прицелни протеини в CD14+, CD4+ и CD8+ клетки, осъществявайки интегрирана имунна регулация. Сравнителна протеомика, селективна за PIF интерактори между трите имунни фенотипа показва, че PIF действа в липополизахарид индуцирани макрофаги след CD14/TLR4/MD2 комплекса, чрез взаимодействие с множество протеини от 14-3-3 ( $\zeta/\delta$ ,  $\epsilon$ 1,  $\beta/\alpha$ 1,  $\eta$ ) семейството, виментин, калретикулин и калмодулин, докато при CD4+ и CD8+ клетките той взаимодейства с цитоскелетни протеини и 14-3-3  $\zeta/\delta$ . Публикацията показва механизмите на действие на PIF водещи до координирана системна имунорегулация.

2.3.1. **Личен принос:** С помощта на *in silico* алгоритъм, предсказващ вероятността за свързване на пептид към прицелен протеин, е изследвана възможността PIF да се свързва с различни членове на 14-3-3 семейството, т.к. данните от протеомиката в макрофаги показва, че семейството 14-3-3, е представено от най-многобройни интерактори. Най-висока вероятност е установена за хомо-димера на 14-3-3 $\tau$ , и то само ако е в комплекс друг пептид. В CD4+ и CD8+ клетките са установени само 14-3-3  $\zeta/\delta$  интерактори на PIF, поради което е изследвана вероятността за свързването му с техни хетеро-комплекси с  $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$ . Установено бе, че само 14-3-3  $\tau$  хомо-димери и хетеро-димери  $\tau/\zeta$  имат висока вероятност да се свържат с PIF. Структурните модели на PIF с тези варианти позволиха да се изгради хипотеза, обясняваща свързването му, 14-3-3 протеините улесняват свързването на PIF с различни прицелни молекули, чрез конформационна хетерогенност. Промените в конфигурацията на 14-3-3 променят ъгъла между двете субединици, особено при 14-3-3  $\zeta$ ,  $\eta$  и  $\theta$  субединиците и взаимодействието им с външни пептиди. - **публикация №4, Фигура 3.**

2.4. ПреИмплантиционенФактор™ потиска развитието на атеросклероза в експериментален ApoE дефицитен миши модел, като не променя липидния профил, но действа анти-инфламаторно, намалявайки макрофажната инфилтрация (интравитална мултифотонна микроскопия), експресията на про-инфламаторни клетъчно-адхезивни молекули, хемокини и цитокини в плаката и намаление на циркулиращият IFN- $\gamma$ . Пептидът поне отчасти осъществява ефектите си, чрез действие върху моноцитните функции, намалявайки тяхната миграция *in vitro* и в перитонитен *in vivo* модел, както и екстравазацията им, като тези ефекти са зависими от функционирането на Шейкърните волт-зависими калиеви канали 3 (KCNAВ3) и от инсулин деградиращият ензим.

2.4.1. **Личен принос:** Скринирани са 111 кристалографски модела на различни семейства калиеви канали с алгоритъм, предсказващ кои са аминокиселинните остатъци от PIF с най-висока вероятност да се

свържат с тях, вероятността за това, и кои остатъци от протеините биха участвали в интерфейса. Установени са сходни свързващи аминокиселини от PIF свързващи Kv1.3 и IDE, като отново последователността R<sub>4</sub>I<sub>5</sub>K<sub>6</sub>P<sub>7</sub> (Arg<sub>3</sub>, Ile<sub>4</sub>, Lys<sub>5</sub>, Pro<sub>6</sub>) е основна. Шаблоните на свързване на PIF към различните семейства на калиеви канали са сравнение с различни алгоритми за клъстеризиране, като е използвана и невронна мрежа тип „Само-организиращи се карти“ в режим на обучение без супервизия, показващи че PIF има специфичност предимно към семейството на Шейкър каналите. **публикация № 3 (Фиг. 5B-E), научни съобщения № 6, № 9.**

2.5. Преимплантационен Фактор™ освен чрез *in vitro* синтеза може да се експресира и от еукариотни клетки, както е показано в модел на трансфектирани HEK293 клетки и Jurkat клетки. Създаден е комплексен подход за директно клониране на къси пептиди, без нужда от клониране на протеинови носители с линкери или фагови библиотеки. PIF е маркиран с къси пептиди използвани за изолиране, или с къс секреторен пептид, при което секвенцията му е кодирана с реверсивно инженерство и кодонна оптимизация. Структурата на фузионния пептид е проектирана с линкерни секвенции и е оптимизирана с *in silico* методи показващи кои варианти имат максимална флексибилност и достъпност до солвенти. Информационната РНК кодираща фузионния PIF е допълнително оптимизирана откъм 5' края за експресия в рибозомите. PIF фузионния пептид е експресиран в HEK293 клетки и Jurkat клетки, и е показан функционалния му ефект да потиска калиевия флукс. **Патент № 2, научни съобщения № 6, № 9, № 10.** Дефинирани са и свързващите интерфейси в различните прицелни за PIF молекули и е създаден консенсусен модел за предпочитани места за свързване - **Патент № 2.**

### **3. Ролята на рецепторно-опосредстваната вродена имунна сигнализация (рецептор TLR2) за патогенезата на системни авто-имунни заболявания и патологии с имунна патогенеза**

В клиничната практика по света е установено, че бактериални инфекции, както и приложението на ваксината БЦЖ (прилагана за превенция на туберкулоза) повлияват положително клиничното протичане и тежестта на социално значими автоимунни заболявания като мултиплена склероза и диабет тип 1, както и различни алергични състояния. Продуктите от ваксината БЦЖ, както и пълния адювант на Фроинд, съдържащи лиганди на рецепторите на вродения имунен отговор имат двулична роля, като могат както да подпомагат, така и да потискат имунни отговори активиращи процесите на възпаление. Изследователската група на проф. Франческо Риа от Университета в Милано бе установила, че тези ефекти се медиират от рецептора Tlr2 от вродения имунен отговор, използвайки мутация на аминокиселината Метионин в Изолевцин на 82 позиция в полипептидната верига на рецептора в специална миша

линия. Мутантната форма на рецептора Tlr2 82ile промотира авто-специфичен възпалителен отговор с активиране на патогенни антиген-специфични FoxP3+ T-регулаторни клетки, докато естествената Tlr2 82met форма на рецептора намалява продукцията на тези T-клетки и отделянето на патогенните цитокини IFN- $\gamma$  и IL-17, потенциращи автоимунните реакции. Димеризацията на този рецептор с други рецептори от семейството му - Tlr1 или Tlr6 не може да обясни ефекта. Групата на проф. Рия се свързва с изследователската група под ръководството на доц. д-р Сорен Хайрабемян, която изследва рецепторите на вродения имунен отговор от семейството на NOD, като NOD2 е специфичен рецептор именно на съставки на БЦЖ. Използвайки *in silico* методи, вкл. молекулна динамика, ние установихме, че мутацията предизвиква „втвърдява“ рецептора, намалява обемът на молекулния „джоб“ свързващ естествените му пептидогликанови лиганди, и в крайна сметка променя енергията им на свързване, пречейки на провеждане на естествените му сигнали. Като отделен феномен, тази мутация създава нови места за неспецифично свързване на нови малки молекули, като захари и кадхерини, имащи отношение към сигнализацията му. Крайният ефект е промяна на сигнализацията в имунните клетки в посока автоимунен отговор, феномен имащ значение в обяснението на състояния на автоимунитет, откриващ нови възможности за терапевтичното им повлияване. Съвместните резултати на двете групи са публикувани в статия в най-голямото и най-цитирано списание с „отворен достъп“ в област Имунология и 7-то по цитируемост от всички списания по Имунология – *Frontiers in Immunology* (IF 5.695), **публикация №2**, резюмета от **научни форуми №: 4, № 5**.

В представените публикации, доц. Хайрабемян е първи автор в 2 публикации, втори автор в една публикация и старши последен автор в 8 статии, от общо 16 публикации участващи в конкурса.

От представените 16 публикации, 2 са в първите 10% от ранга на списанията в съответната научна област – **спусануемо *Frontiers in Immunology* (IF 5.695)**, според SJR топик Immunology and Microbiology, ранг 50 от 525 списания (първите 9.52%), като списанието е №1 в списанията с “open access” в област „имунология“ и №7 от всички списания с област „имунология“; според ISI Web of Science Global Journal Rank, списанието е на 512 позиция от 11997 (в първите 10%); **спусануемо *Thrombosis and Haemostasis* (IF 5.255)**, според SJR топик Medicine, ранг 412 от 6537 списания (първите 6.30%), в топик Haemathology, ранг 412 от 6537 списания има ранг 14 от 123 списания; според ISI Web of Science Global Journal Rank, списанието е на 619 позиция от 11997 (в първите 10%).

Списанията Hormones and Cancer, Immunobiology, PloS ONE са съответно според SJR с ранг в първите 22.6%, 26.6%, 27.1% съответно в областите Oncology, Immunology and Microbiology, Agricultural and Biological Sciences.

2. Справка за административни научно-образователни дейности на доц. д-р Сорен Б. Хайрабемян, дбн

#### **Научни интереси**

1. Геномна стабилност в репродуктивната биология и имунология, и канцерогенезата
2. Вроден имунен отговор. Инфламазомна сигнализация. Рецептори от семейството на NOD. Автофагоцитозна сигнализация
3. Фузионни гени и некодиращи РНКи в простатната канцерогенеза
4. Имуномодулиращи пептиди - PreImplantationFactor™
5. Геномно редактиране и секвениране от трето поколение

#### **Образователни и научни степени:**

1. Магистър - Медицина, МУ Плевен, 1996
2. Магистър - Информационни системи, ВТУ „Кирил и Методий“, 2007
3. ОНС „Доктор“, ш. Имунология, ИБИР-БАН, 2006
4. Научна степен „Доктор на биологическите науки“, ш. Имунология, 2016

#### **Заемани длъжности (последни 5 години):**

1. Научен секретар, ИБИР-БАН, 2015-
2. Председател на Общото събрание, ИБИР-БАН, 2014-2015
3. Хабилизация, Доцент по имунология, ИБИР, 2013-
4. Старши изследовател, реинтеграционна програма по проект на 7РП, ReProForce, 2010-2013

#### **Специализации в чужбина и международно сътрудничество:**

1. Постдокторантура – Harvard Cutaneous Biology Research Center at Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA, 2008
2. Гост-изследовател - Гост-Изследовател, Essex University, School of Biological Sciences, Colchester, UK, 2012

#### **Членство в научни организации:**

1. Избран за Президент на Международния Координационен Комитет по Имунология на Репродукцията (International Coordination Committee for Immunology of Reproduction), основан от акад. Кирил Братанов през 1967 г. в Женева, с първи председател Нобеловият лауреат проф. Робърт („Боб“) Едуардс.

(Изборът е посочен в последният Бюлетин на Комитета на <http://iccir1967.com/newsletter2015.php>);

2. Национален представител в Управителният съвет на COST Акция „TRANSAUTOPHAGY (CA15138)“ (2016-2020)
3. Участник в COST Акция „EpiConcept“ (2013-2016)
4. Член на International Coordination Committee for Immunology of Reproduction (ICCIR)
5. Член на European Society of Reproduction Immunology (ESRI)
6. Член на International Society of Reproductive Immunology (ISIR)

#### **Международни научни мрежи/колаборации:**

- Международна мрежа за изследване на ПреимплантационенФактор™ (PreImplantationFactor™) – около 80 научни институции от цял свят; колаборация с Eytan Barnea;
- Директна колаборация – биотехнологична компания BioIncept Llc (NJ, US) (<http://www.bioincept.com/global-network>); - публикации в PloS ONE, Immunobiology, T&H; колаборация с Eytan Barnea;
- Колаборация с Baker IDI Heart & Diabetes Institute, Australia; – публикация в Thrombosis and Haemostasis, IF = 5.2; колаборация с Prof. Karlheinz Peter;
- Колаборация с Catholic University of the Sacred Heart – Milano, IT; – публикация във Frontiers of Immunology (<http://home.frontiersin.org/>), IF = 5.69; колаборация с Prof. Francesco Ria;
- Колаборация с Essex University, UK; – публикации в Am J Reprod Immunol, Reprod Biol, Immunobiology; колаборация с Prof. Nelson Fernandez; колаборация с Doctor Metodi Metodiev;

#### **Нови колаборации:**

- Колаборация с prof. Chaya Brodie, Israel; Michigan Medical School;
- Колаборация с Martin Mueller, University of Basel; Yale School of Medicine;
- Колаборация с Prof. Tassula Proikas, University of Tübingen;

#### **Преподавателска активност:**

1. Ръководство на докторанти – 2 редовни докторанти:
  - a. д-р Елина Аврамска, „Влияние на метилационния статус върху гени, свързани с репродуктивния потенциал и рецепторите на вроден имунитет“ (2014-2017);
  - b. Лейля Аскова, „Модулиране на инфламазомния отговор от фагоцитозата при клетки на Сертоли“ (2017-2020);
2. Консултант на защитили докторанти – 1 редовен докторант:
  - a. (Нели Манолова, тема: „Биохимична характеристика на ендометриозна перитонеална течност“)

3. Ръководство на дипломанти – 1 (тема: „Оценка на ооцитен статус по експресия на кумулусни маркери“)
4. Поканен външен екзаминатор на докторанти по процедура за защита на докторантура (PhD). Процедурата включва кратка рецензия на дисертационен труд и устен изпит върху дисертационния труд и теоретичните и методичните резултати, както и общ научно-образователен изпит на докторанта (в рамките на 3-4 часа) – 2 докторанта в Essex University, School of Biological Sciences, Colchester.
  - a. 2015 год., тема: „Study of the interaction of the cytoskeleton with histocompatibility molecules expressed on human trophoblast cells: relevance for fetomaternal tolerance and pregnancy“, докторант Палави Джаин;
  - b. 2016 год., тема: „The role of immunological receptors CD74 and CD44 in association with the macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) on human breast cancer derived cells“, докторант Хюсеин Ал‘Садх
5. Ръководство на теоретичен и практичен курс по флоуцитометрия за оценка на гамети в репродукцията – проект ReProForce
6. Лектор, Флоуцитометричен анализ на гамети по проект BG051PO001-3.3.06-0059
7. Ментор, ОП “Развитие на човешките ресурси” и Европейски Социален Фонд, тема на практиката „Сигналинг на вродения имунен отговор на семейство рецептори NOD“, 12 брой студенти бакалаври и магистри от БФ на СУ
8. Асистент по Физиология на човека, Медицински Университет – Плевен, 1998. Провеждане на практически упражнения по Физиология на студенти по медицина на английски език.

## Участие в проекти

### Проекти по програми на ЕК и структурни фондове

• Дати	2016-2021
• Наименование на проекта	Член на Управителния комитет (национален представител) на COST Акция Транс-автофагия (CA15138 TRANSAUTOPHAGY) за изследване на процесите на автофагия и транслирането и в практиката
• Финансиране	<b><i>COST Action CA15138, TRANSAUTOPHAGY</i></b>

• Дати	2014-2015
• Наименование на проекта	Ментор: Провеждане на теоретичен и практически приложен курс по „Сигналинг на вродения имунен отговор на семейство рецептори NOD“

• Финансиране	Проект <b>BG051PO001-3.3.07-0002</b> „Студентски практики“ по ОП „Развитие на човешките ресурси“ и Европейски Социален Фонд Проект „Студентски практики“.
---------------	---

• Дати	2015-2016
• Наименование на проекта	Лектор, „Флуцитометричен анализ на гаметите“
• Финансиране	Проект <b>BG051PO001-3.3.06-0059</b> „Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии“ по ОП „Развитие на човешките ресурси“ и Европейски Социален Фонд Проект „Студентски практики“.

• Дати	2013-2015
• Наименование на проекта	Участник в българската група по проект COST Action FA1201, EPICONCEPT (“Epigenetics and Periconception Environment”), с цел изследване на епигенетични промени свързани с репродукцията.
• Финансиране	<b>COST Action FA1201, EPICONCEPT</b>

• Дати	2010-2013
• Наименование на проекта	Старши изследовател с разработка на научно-изследователско направление: „Механизми на вроден имунитет при клетки на Сертоли и сигналинг на NOD рецептори и NALP3 инфлазама“
• Финансиране	Инфраструктурен проект на ЕК: <b>FP7-REGPOT-ReProForce 2010-2013</b>

#### Проекти финансирани от национални фондове – МОН и други

• Дати	2017-2019
• Наименование на проекта	<b>ДКОСТ 01/23, 2016:</b> Национално съфинансиране на участие по Акция TRANSAUTOPHAGY (COST Action CA15138)
• Финансиране	ФНИ, Програма за предоставяне на национално съфинансиране за участие на български колективи в утвърдени акции по Европейската програма за сътрудничество в областта на научните изследвания и технологии COST

• Дати	2010 – 2013
• Наименование на проекта	Консултант на проект финансиран от МОН-ФНИ: <b>ДМУ 03/27/2012</b> , „Микро РНКи, транскрипционни фактори и онкофузионни протеини в простатната канцерогенеза с диагностично и терапевтично значение“

• Дати	2016-2017
• Наименование на проекта	<b>Вх. №136:</b> „Епигенетичен анализ и изследване експресията на гени в процеса на диференциация на човешки мезенхимни стволови клетки“, Млад учен ръководител на проекта: гл. ас. Елена Христова, Научен ръководител: доц. д-р Сорен Хайрабемян, дбн
• Финансиране	<i>Програма за подпомагане на младите учени в БАН 2016 финансирана от Българска Академия на Науките</i>

#### Проекти финансирани от частни компании

• Дати	2014-2016
• Наименование на проекта	Проект: “PreImplantation Factor™ related peptides - in silico investigation of structural and functional properties and eventual binding partners (short: In silico PIF-related interactome)”, Ръководител на проекта: доц. д-р Сорен Б. Хайрабемян
• Финансиране	<i>Биотехнологична компания BioIncept Llc, NJ, US; Финансиране на консумативи;</i>

• Дати	2014-2016
• Наименование на проекта	Проект: “DevelopmentalPeptides™ - in silico investigation of structural and functional properties and eventual binding partners (short: In silico DP interactome)”, Ръководител на проекта: доц. д-р Сорен Б. Хайрабемян
• Финансиране	<i>Биотехнологична компания BioIncept Llc, NJ, US; Финансиране на консумативи;</i>

• Дати	2013-2014
• Наименование на проекта	Проект: “PreImplantation Factor™ transgene expression cassette design and validation. smallORF gene seek for PIF native genome-wide expression”, Ръководител на проекта: доц. д-р Сорен Б. Хайрабемян



• Финансиране	Биотехнологична компания BioIncept Llc, NJ, US; Финансиране на консумативи;
• Дати	2012-2014
• Наименование на проекта	Проект: "PreImplantation Factor™ binding partners", Ръководител на проекта: доц. д-р Сорен Б. Хайрабемян
• Финансиране	<i>Подписан МТА договор. Биотехнологична компания BioIncept Llc, NJ, US; Финансиране на консумативи;</i>