

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПОСТИЖЕНИЯ

на проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“ - БАН

ПРИНОСИ ОТ НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ

Приносите на проф. Хайрабедян са разгледани по отношение на научната и научно-приложната му продукция, както и по отношение на научно-организационната му дейност, като са систематизирани по начин отразяващ както промените в собствените парадигми, така и ролята му в промяната на някои общоприети такива. Тази промяна във визията е и двигател на научно-приложните и методични интердисциплинарни разработки направени през годините, които кумулират в развитието на нови изследователски платформи отразени в разделът за научно-организационна дейност. Тематично, научните разработки на проф. Хайрабедян са в областите репродуктивна имунология, ролята на вродения имунитет за поддръжката на геномна стабилност, тъканно ремоделиране и канцерогенеза, роля на някои епигенетични механизми за развитие на канцерогенезата и връзката с вродената имунна сигнализация. Основния подход при различните изследвания е свързан с прилагането на методи позволяващи многоразмерност и количественост на изследването, или специфика до ниво структура на молекула.

Научни направления:

А. Репродуктивна имунология

1. Роля на вродена имунна сигнализация в безплодието при човека, и в частност при мъжа.

1.1. Рецептори на вродената имунна сигнализация от семейството на NOD и TLR рецепторите, инфламазоми и свързани със сигнализацията им цитокини и каспази, дефиниращи клетъчната съдба, чрез решение за клетъчна смърт или про-инфламаторен цитокинов отговор.

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. Клетките на Сертоли са известни с мощните си свойства да индуцират имунен-толеранс. До скоро се считаше, че мулти-протеиновия комплекс открит от проф. Юрг Чоп от Университета в Лозана и наречен инфламазома е

присъщ основно на клетки от кръвната редица с имунни функции, т.к. активирането му води до формиране в клетката на един единствен огромен комплекс от NALP3 (NLRP3) молекули, които свързват чрез, адаптор като Asc2, каспаза-1 и водят до срязване на интерлевкин 1 бета.

При изследване на миши Сертоли клетки (2010-) 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 (Nature Scientific Reports, 2016).

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 кл. на Сертоли съдържаща вектор с промоторен елемент, реагиращ на активирани NF- κ B, с отделянето на секретирема алкална фосфатаза. Нивата и 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.

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 сигнализацията през рецептора NOD2 действа различно на контактите. Потискането на сигнализацията на инфламазомата NALP3 също оказва влияние на плътните контакти. По този начин е показана роля на инфламаторния сигнал като механизъм за контрол на достъпа на имунни клетки до стволовата ниша и зоната на клетъчна увреда, чрез модулиране на междуклетъчните контакти.

Чрез прилагане на методи за генно заглушаване на Nalp3, както и на RT-qPCR и флуоцитометрия 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 който и да

е от 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 компартментализацията 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.

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.

С помощта на протеомика е показана различна сигнализация през пътищата на рецепторите NOD1 и TLR4, като сравнителна транскриптомика показва не само експресия на тези елементи, но и наличие на транскрипти на други инфламазоми. Тези изследвания променят парадигмата за експресията на инфламазомите от неимунни клетки и възможността те да служат като важен сензор за клетъчна увреда, извън контекста само на имунния отговор. Някои от техните активатори са АТФ, който стига в достатъчни количества при тях след значителна клетъчна увреда, докато други са лиганди от инфекциозен произход (вирусни РНК, ДНК, елементи от кл.стена) или клетъчни нокси.

В последните няколко години в хода на 3 дисертационни труда са получени нови данни за връзката на инфламазомната активация с клетъчния метаболизъм и автофагията, както и възможността други неканонични инфламазоми да се активират в процеса на индукция на рецепторите на вродения имунен отговор. Активирането на каспаза-1 при имунни клетки като макрофаги и неутрофили може да доведе до формиране на гасдерминови пори (активация от каспаза-1), но в други случаи гасдермина не се активира. Установихме, че тогава каспаза-1 активира каспаза-3 и води до апоптотична клетъчна смърт.

Клиничното значение на инфламазомната активация е голямо, т.к. в имуно-привилегирвания тестис про-инфламаторната активация на кл. на Сертоли се считаше за невъзможна. От друга страна за протичане на хода на нормално зачеване е нужно обучение на локални дендритни клетки в матката на жената, за да може да се създаде имуно-толерантен, а не агресивен отговор срещу сперматозоидите на мъжа (основополагащо изследване на проф. С. Робъртс за индукцията на Т-хелперен отговор в матката). Това се постига и чрез отделяния от кл. на Сертоли и присъстващ в спермата

TGF-beta, който е нужен за процеса. Сензорната роля на инфламазомата за клетъчна увреда и евентуална увреда на мъжките гамети води не само до клетъчна смърт, но и до отделянето на IL-1beta/IL-18, или IL-18, което води до сигнал променящ толеранса към сперматозоидите в женския полов тракт. По този начин инфламазомите участват в адаптивна авто-селекция на индивиди с увреден генофонд. Тази хипотеза бе представена на Училището по репродуктивна имунология на Европейската асоциация по репрод. имунология (Атина, 2019), като свръх-активация на инфламазомата NALP3 бе показана при хора и маймуни от групата на проф. Артур Майерхофер (LMU, Munich, Max Plank) независимо след нас през 2018 год., докато серия клинични изследвания от различни групи по света показва повишени нива на IL-18 (срязван от същата каспаза-1) в спермата на инфертилни мъже. Установихме и възможността активацията на каспаза-1 да доведе по Nlrp3-зависим път до активация на каспаза-3 и да насочи клетката към имунологично по-слабо индуцираща програмирана апоптотична клетъчна смърт. Идентифицирания от нас транскриптомно активиран CD300 има важна роля за модулиране на отговорите в кл. на Сертоли към стимулация с ЛПС. Тези процеси се регулират и от MAPK1/ERK2-опосредствано препрограмиране на пътищата на инфламазомна активация и автофагия, което при активация на TLR4 пътя от ЛПС може да играе протективна роля.

(Публикации: автореферат 2, публ. 6, 9, 15, 23, 29, 31, 42; форуми: 7, 9, 13, 15, 16, 19, 23, 24, 29-31, 34, 42)

1.2. Роля на други цитокини от сем. на IL-1, и растежни фактори, с интегрирана секреция, участващи в тъканното ремоделиране и нео-ангиогенезата при ендометриоза

Предидшни наши изследвания засягат изследването на промените в ангиогенния статус при пациентки с две различни форми на ендометриоза и проследяват някои туморни маркери в хистологичен материал. Ендометриозата е една от най-честите причини за инфертилитет при жените във фертилна възраст. Това е патология при която ендометриален епител се развива ектопично от матката в мускулния и слой или отдалечено, от яйчници до други органи, дори в мозъка. За пръв път в литературата са показана увеличени количествено експресионни профили на нов потенциален ангиогенен маркер - S100A13 в тъкани от здрави жени и жени с различни форми на ендометриоза, като за целта е приложен рационализиран метод за дигитална количествена имунохистохимия. и е показана сигнификантна разлика в протеиновите нива на S100A13, стратифицираща случаите на ендометриоза в полза на овариалните форми. Въз основа на данни за съчетана екскрецията на S100A13 с растежния фактор FGF-1 и IL-1 α са проследени имунохистохимичните им профили на експресия, като е доказана имунохистохимичната ко-локализация на FGF-1 и S100A13 (приложен разработен по време на дисертацията метод за двойна имунохистохимия с два хромогена върху един и същи срез, *виж автореферат 1*) в ендометриозен жлезен епител, подкрепящ хипотезата за потенциращ ефект на S100A13 в авто-кринната и пара-кринната растежна стимулация на ендометриозните жлези. За пръв път са проследени количествените различия на протеиново ниво (дигитална количествена

имунохистохимия) в експресията на FGF-1 и IL-1 α между еутопичния жлезен епител и ектопичните огнища при аденомиоза и овариална ендометриоза, показващи хетерогенна по тип и сигнификантно повишена по количество стимулация на растежа от страна на IL-1 α при случаите на аденомиоза, и реципрочен ефект на FGF-1 при случаите на овариална ендометриоза. Изказана е хипотеза за взаимните ефекти и потенциалната роля на сигналинга на FGF-1, S100A13 и IL-1 α в ендометриозната патогенеза, касаещо съдовата нео-ангиогенеза, публикувано в ревю в Journal of Reproductive Immunology, оценено в 25-те „най-горещи“ заглавия - последно тримесечие, 2005.

С количествена имунохистохимия потвърдихме повишена експресия на маркера за активирана неоангиогенеза ендоглин (CD105) в ендотела на еутопичния ендометриум при ендометриоза (втора публикация в световната литература). Изследванията върху експресията на ендоглин с помощта на количествена имунохистохимия в нео-ендотела, образуван в ектопичните ендометриозни лезии при аденомиоза и овариална ендометриоза (публ. 1, 27, 31), помогнаха за създаване на клинично-патолгичен панел от неоангиогенни маркери (CD105, S100A13, hCG receptor) с цел оценка на степента на агресивност на ендометриозната патология или на неопластични състояния – простатен карцином, глиобластома, което е направено въз основа на статистическа обработка на количество дигитално измерен маркер, а не на полуколичествен метод или брой съдове, както това бе практикувано до момента.

Изследванията ни относно ендометриозната патология показват, че развитието на ектопичен епител може да се разглежда като вид нарушено тъканно ремоделиране, т.к. се изисква промяна на програмата за тъканна диференциация, което вероятно е свързано с епигенетични промени, роля за което имат некодиращи РНК, участващи в процеса на регулация. Нашите данни показаха, че съпътстващ феномен, вероятно участващ в този процес са цитокини и растежни фактори имащи роля и в инфламаторния процес (IL-1 α е купилиран с IL-1 β в експресията си). Връзката с вродената имунна сигнализация бе направена по-късно в наши изследвания на протеиновата продукция на перитонеална течност от жени с ендометриоза, при които с 2D DIGE се установи профил вероятно свързан с активация на TLR4 и сходни пътища.

(Публикации: 58, 66-69, 70)

2. Неканонична роля на фактори на тъканното ремоделиране за оценка на кумулс-оофорния комплекс

В колаборативно изследване с клиници за асистирана репродукция, проведено върху транскрипционните профили на кумулусни клетки изолирани от пациентки с намален овоцитен потенциал, участващи в АРТ програми, бяха установени някои уникални, неописвани при човека маркери, в това число Lysil Oxydase (LOX), като бе проведено и протеомно изследване с цел търсене на нови меркери, при което бе използван биоинфоматичен подход за *in silico* откриване на потенциални таргети въз основа характеристиката на 2D PAGE спотове и инструменти за обогатяване на генни онтологии за намиране на ангажирани сигнални пътища и статистически най-вероятно „обогатени“ молекули. Подходът позволява предварителна селекция на

потенциални таргети които могат да бъдат директно валидирани и намалява себестойността свързана със скъпата мас спектроскопия. За пръв път в литературата при хора е установена промяна в експресията на транскриптите на Lysil Oxidase (LOX), както и е потвърдено за BSG (базиджин) в кумулусни клетки при пациентки с намален овоцитен потенциал, в сравнение със здрави жени с мъжки фактор на стерилитет, като е направена позитивна сигнификантна корелация между двата маркера. Разработен бе разширен панел за определяне на овоцитния потенциал по кумулусния експресионен профил (част от общия кумулусен транскриптом. Изследванията на кумулусните клетки директно контактуващи с яйцеклетката бяха пионерски в страната и показаха възможност за добро клинично приложение на нови маркери за оценката на качеството на ооцитите при ин витро процедури.

(Публикации: 48, 51-53)

3. Роля на имуно-модулиращи пептиди отделяни от ембрионите като фактор за нормално протичане на бременност.

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 ПреИмплантационенФакторTM (PreImplantationFactorTM, PIF). Ендогенният ПреИмплантационенФактор (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), като в момента е обект на няколко клинични проучвания в САЩ.

Ние имаме активна роля и голям принос за показването на модела на действие на PIF спрямо неговите прицелни молекули, като с помощта на комбинация от ин силико молекулно моделиране, биофизични методи показващи протеиново навиване и силата на свързване с лиганда, както и функционални методи за оценка на йонен поток и пр. бе установена конкретната аминокиселинна последователност участваща в свързването на PIF с прицелните му молекули и промените във функционалните състояния на клетките. Наши мутанти за „загуба на функция“, получени по рационален ин силико дизайн бяха тествани в редица лаборатории (Университета в Йейл и др. в САЩ, изследователски центрове в Австралия, Великобритания, Германия, Израел, Швейцария) за валидиране на механизма на свързване и действие на PIF.

Изследвана е ролята на PIF в развитието на ембрионите и е показано за първи път, че PIF предпазва ембрионите, като противодейства на оксидативният стрес и неправилното нагъване на протеините, като този ефект механистично е зависим от „основната“ аминокиселинна секвенция на PIF – R4I5K6P7. 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. Показано е, че PIF се интернализира активно от ембрионите, като между експериментално показаните (PIF-имуно-афинитетно изолирани протеини доказани с LC/MS² 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). **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 биоинформатичния 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 - R4I5K6P7. (Arg3, Ile4, Lys5, Pro6) към двете прицелни молекули, PDI и HSP.

Приложен е метод за *in silico* предсказване на свързването на PIF към над 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. 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 (Pro6 – специфична за редуцирана форма на PDI, и Val2 – специфична за оксидирана форма на PDI) и едната е конформационно независима (мутагенеза на позиция Ile4), показващо ролята на Pro6 за функцията на PIF. Последната е показана в няколко други изследвания и при други прицелни молекули, и показва механизмите на действие на PIF спрямо PDI в ембриони от бозайници.

ПреИмплантационенФакторTM се секретира в две форми, 9 и 15 аминокиселинна - PIF9, PIF15, 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 е показано, че PIF 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. **Личен принос:** Структурно молекулно моделиране и молекулен докинг показват, че формата PIF15 има подобрена специфичност към прицелните молекули, каквато е PDI, в сравнение с формата PIF9. Установените като значещи аминокиселинни остатъци с позиции 3–6 (RIKP, Arg3-Pro6) са общи за двете форми PIF15 и PIF9, 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 *de novo*

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.

ПреИмплантационенФакторTM 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 (ζ/δ , $\epsilon 1$, $\beta/\alpha 1$, η) семейството, виментин, калретикулин и калмодулин, докато при CD4⁺ и CD8⁺ клетките той взаимодейства с цитоскелетни протеини и 14-3-3 ζ/δ . Публикацията показва механизмите на действие на PIF водещи до координирана системна имунорегулация. **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 τ , и то само ако е в комплекс друг пептид. В CD4⁺ и CD8⁺ клетките са установени само 14-3-3 ζ/δ интерактори на PIF, поради което е изследвана вероятността за свързването му с техни хетеро-комплекси с β , ζ , τ . Установено бе, че само 14-3-3 τ хомо-димери и хетеро-димери τ/ζ 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 конформацията на 14-3-3 променят ъгъла между двете субединици, особено при 14-3-3 ζ , η и θ субединиците и взаимодействието им с външни пептиди.

ПреИмплантационенФакторTM 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- γ . 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 (KCNA3) и от инсулин деградиращият ензим. **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 R₄I₅K₆P₇ (Arg3, Ile4, Lys5, Pro6) 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.

ПреИмплантационенФактор™ освен чрез fmos синтеза може да се експресира и от еукариотни клетки, както е показано в модел на трансфектирани НЕК293 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. Обикновено рибозомите имат праг под който не транслират много къси последователности иРНК. 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 НЕК293 клетки и Jurkat клетки, и е показан функционалния му ефект да потиска калиевия флуks. Дефинирани са и свързващите интерфейси в различните прицелни за PIF молекули и е създаден консенсусен модел за предпочитани места за свързване - **Патент No 2**.

PIF™ бе изследван в два транслационни модела, показващи потенциалния му ефект за приложение при мултиплена склероза и при Болест на Алцхаймер, и диабет. При мултиплена склероза досегашните терапии намаляват честотата на инфламаторни атаки, но не намаляват невродегенерацията. PIF, е не само отделящ се от ембриона имуно-модулятор, но има възможност естествено да преминава кръвно-ликворната бариера и да блокира невро-възпалителния процес, намалявайки парализата и демиелинизацията в мозъка при модел на експериментален автоимунен енцефаломиелит. С фосфо-протеомика показваща не само протеомните промени на ниво експресия, но и на ниво пост-транслационни модификации бе установено реверсивно модулиране на функциите на редица протеин кинази, водещо до положителните ефекти.

В отделно проучване бе показан потенциален ефект на PIF да модулира функциите на инсулин деградиращия ензим IDE, който участва в контрола на нивата на инсулина, имащи значение при диабета, както и при разграждането на амилоидните прекурсори. С молекулно моделиране, молекулна динамика и лиганд-рецепторни изследвания бе показано кои аминокиселини (Iso4, Pro6) участват в свързването на PIF в молекулния комплекс на IDE, както и с ин силико функционална мутагенеза и докинг бе показана ролята на PIF в регулацията на процеса, намалявайки натрупването на бета-амилоидни пептиди (Aβ).

Тези наши изследвания, дадоха основа за навлизане на изследванията за PIF™ във фаза на клинични проучвания при хора за заболявания свързани с автоимунен отговор. Нашите изследвания показаха ролята на PIF като функционален бенигнен аналог на стероидите (сходно място за свързване в Шейкър каналите), което се изследва за клинично приложение в момента от BioIncept LLC.

(Публикации: 14, 16, 21, 22, 25, 27, 36; Патент 2)

Б. Разработка и приложение на мултидисциплинарни подходи за изследване на нарушенията в тъканното моделиране и клетъчната диференциация при редица патологични процеси

1. Изследване на тъканно ремоделиране, вкл. ангиогенеза при простатен карцином

Изследванията провеждани в областта на биомаркерите през последните 17 год. претърпяха еволюция от характеристика на маркери като предиктивни за нозология към изследване на фундаменталните процеси стоящи в основата на канцерогенезата и определяне на нови терапевтични молекули на тази основа. С помощта на **внедрен и рационализиран** от проф. Хайрабедян **метод за дигитална количествена цветна имунохистохимия**, за пръв път бе оценена количествената експресия на нов маркер за простатна патология - PSMA на протеиново ниво в хистохимични срези (статии 1, 10), за разлика от предишни публикации, представящи традиционно преброяване на специфично оцветени клетки и полуколичествено определено от няколко хистопатолога измерение на интензивността на хромогенната реакция. При приложения подход количествено и без внасяне на субективност от изследователя се определя цветен RGB вектор съответстващ на специфичната хромогенова реакция и се сравнява с получената хромогенова реакция от нетретиран със специфично антитяло сериен срез, в резултат на което се получава безразмерна величина, пряко определяща и производна на количеството специфично свързан от антитяло изследван протеин. Предимство на метода пред имуноблота е допълнителната информация за локализация на антигена, което дава самата хистохимия, както и възможността за сравняване на количествената експресия на един и същи антиген в различни морфологично–различими клетъчни типове или в съседни хистологични структури (напр. интактна и неопластично променена простатна жлеза).

С помощта на дигитална имунохистохимия бе създаден панел за оценка на неоангиогенеза при простатна патология основаващ се на експресията на човешки хорион гонадотропин (hCG), ендоглин (CD105), и S100A13 (5), показващи процеси на тъканно ремоделиране, свързано с хроничен възпалителен процес.

(Публикации: 55, 58-62, 64, 70)

2. Изследване на тъканно ремоделиране, вкл. придобиване на стволони характеристики при ракови клетки

2.1. Приложение на дигитална количествена имунохистохимия и предиктивни методи

Използването на количествена имунохистохимия и математически методи за определяне на предиктивност използвани при микрочипове, позволи определянето на предиктивните способности на нов панел от маркери приложени при патоанатомичната диагноза на простатния карцином и неговите преканцерози. Изследваните маркери AMACR, p63,

COX-2, GSTP1 и iNOS, в клиничен патоанатомичен материал от пациенти с простатен карцином или преканцерози на простатния карцином (PCa) – простатна интраепителиална неоплазия (PIN), простатен карцином започващ в PIN, и простатна атрофия (PIA), целящо определяне на предиктивна констелация с диагностично значение, показаха диференциален модел на експресия между неопластичните и пре-неопластичните форми, като загубата на p63 в базалната клетъчна популация с паралелна свръх-експресия на AMACR са показани като особено предиктивни за простатен карцином сравнен с пре-неопластичните състояния. След сравнение на секреторните експресионни профили на жлезния епител на простатата, направени в изследването, с тези на подлежащия базалния клетъчен слой е изказана хипотеза за простатната „секреторна колона“, която обяснява локализацията и количествените промени между отделните състояния и се различава от приетите до момента на публикацията схващания в литературата. Експресионните профили на базалния слой на жлезната тъкан в преканцерозното състояние определени в изследването подсказаха възможност евентуални карциномни стволови клетки като прогенитори на неопластичен растеж да бъдат свързани с процеса, като бяха установени 2 типа базални клетки въз основа на количествения им експресионен фенотип – клетки, експресиращи високи AMACR нива и ниски p63, GSTP1, и клетки с ниски AMACR нива и високи p63, GSTP1. Установена е сигнификантна корелация между количествата на p63 само в първия тип базални клетки и съответните им нива на AMACR и GSTP1, като този тип е определен като евентуални транзиторно-амплифициращи p63-позитивни клетки. Тези и други резултати са обобщени и в глава от книга посветена на Простатната канцерогенеза. Изказаната тогава хипотеза противоречеше на общоприетата по това време концепция за увреда идваща от лумена на жлезите, като 10-на години по-късно животински трансгенни модели доказаха p63-позитивните клетки като стволовите клетки поддържащи епителната ниша, както и ролята на карциномните стволови клетки за отключване и пропагиране на процеса.

(Публикации: 55, 58-62, 64, 70)

2.2. Приложение на директно РНК секвениране за детекция на некодиращи РНК, свързани със стволовия фенотип

През 2019 год. за пръв път е приложено нанопорово директно РНК секвениране за определяне на промени в стволово обогатени клетки от простатен карцином за идентификация на дълги некодиращи РНКи с роля за избягване на тумора от имунния надзор. Този подход позволява идентифициране не само на нови фузионни феномени, но и идентификация на промени в базите на РНК (епитранскриптомни модификации) които да дават превес на туморите. Друг положителен ефект е детекцията на цели транскрипти и идентификацията на дефекти в алтернативното снаждане, чест феномен при туморите.

(Форум: 2, 8, 16, 22)

3. Връзка на про-инфламаторната сигнализация с геномната нестабилност, епигенетичните механизми на регулация и автофагията в канцерогенезата. Роля

на некодиращите микро-РНКи, като един от механизмите на епигенетична регулация на генно-регулаторни мрежи от транскрипционни фактори, взаимовръзката им с андрогенната сигнализация и ново образуване в процеса на простатната канцерогенеза фузионния гени със значение за метастазирането и преживяемостта на пациентите

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. 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 и ефекти по отношение на андрогенната сигнализация и експресията и регулацията на фузионните протеинови продукти на TMPRSS2:ERG, като по този начин става ясна ролята и за прехода към андроген-резистентно състояние. За целта е създаден е и **уникален метод за разпознаването на протеинови продукти на TMPRSS2:ERG**. Изследвана е и роля на тумор-супресорната микро-РНК-15a за простатната канцерогенеза, като е показана връзката и 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. 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, 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.

Установено е, че микро-РНК-204 умерен регулатор на фикцията на AP по време на прехода от запазена AP сензитивност, т.к. последната е нужна за транслокацията на ERG и образуването на епигенеично-активната онкофузия TMPRSS2:ERG. Микро-РНК-204 свърх-регулира AP, 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. Протеомни изследвания показаха, че miR-204 има дуалистична роля в препрограмирането на AP при простатната канцерогенеза, водещо до промотиран на AP прицелни гени свързани с простатната канцерогенеза и AP ко-регулаторни молекули. По този начин тумор-супресорната микро-РНК-204, въпреки че усилюва експресията на поддържащия в норма епителната простатна диференциация AP, при фузия-позитивните карциномни клетки води до увеличение на AP с цел препрограмиране на прицелните за AP 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**

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. Поради възможността да възникнат и множество некодиращи мутанти с минимално значение за канцерогенезата, бе разработен *метод за откриване на протеиновите продукт 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 мъже с простатен карцином в напреднал III-IV стадии, като са определени и транскриптите на онкофузионния феномен и получаваните с RT-qPCR. Разработеният диагностичен метод би позволил пациенти положителните 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.).

(Публикации: 17,18,30,32,33,34,35,39,40,43,50)

4. Изследване ролята на рецепторно-опосредстваната вродена имунна сигнализация 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 медиат 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 Т-клетки и отделянето на патогенните цитокини IFN- γ 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. Риа се свързва с изследователската група под ръководството на доц. д-р Сорен Хайрабедян, 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).

(Публикации: 22)

5. Роля на инфламазомната свръх-активация за еднотелна увреда при КОВИД-19

Разработени са молекулни модели на генните продукти на мутантите на ORF3a, ORF8 и инфламазомата Nlrp3 с изкуствен интелект (Google DeepMind Alpha Fold 2). Доказана е тяхната свързаност и токсичност чрез *ин силико* скрийнинг и молекулен докинг, и експериментално с микрофизиологични системи. Установихме, че тези гени увреждат микросъдовия ендотел, водят до пироптоза и метаболитен стрес в клетките. Създадохме заглушаващи олигонуклеотиди за терапевтична защита на ендотела. Разработени са молекулни модели с помощта на изкуствен интелект на продукти на гените ORF3a, ORF8, както и на инфламазомата Nlrp3. Показано е чрез няколко метода за *ин силико* скрийнинг и молекулен докинг, че продуктите на тези гени могат директно да свържат инфламазомата, както и че ***мутагенезата на тези гени не е в посока на силно намаляване на токсичния им ефект за клетката. Установява се, че по-скоро имунният отговор има протективен ефект, докато тези гени отговарят не само за преживяването на вируса, но и нанасят увреди на микросъдовия ендотел, не само в белия дроб.*** Мутантните модели са валидирани експериментално с клониране в плазмиди и имат по-силен ефект на пироптотична активация от дивия тип ORF3a от Ухан. Установява се и че мутации в гена кодиращ инфламазомата могат да доведат до по-силно свързване на тези генни продукти на вируса и до по-силна клетъчна смърт, каквито са мутантни варианти на NLRP3 установени при неврологични и вродени съдови аномалии. С изградена от нас система за перфузия на сложни клетъчни модели използваща микрочипове, както и наблюдението им в реално време с 3-дименсионална клетъчна холотография, сме установили, че продуктите на мутациите в пациентите на гените ORF3a, ORF8 на SARS-CoV-2 водят до два вида клетъчна смърт, от които пироптозата е силно застъпена, за сметка на апоптозата. Това води до почти пълен разпад на клетъчното ядро, с изсипване на клетъчното съдържимо и това на цитоплазмата. Тези продукти водят и до метаболитен стрес на клетката, с увреждане на митохондриите и липидните гранули в ендотелните клетки, което е предпоставка за допълнителна съдова увреда, и намалена устойчивост на съдовете към стрес. Това обяснява донякъде и по-лесната съдова увреда при пациенти с метаболитни нарушения както и предварително увреден ендотел. Разработихме в колаборация заглушаващи олигонуклеотиди за блокиране на пироптотичния път чрез инхалация, без трансфекция, с които разработваме терапевтичен орган-в-чип модел на протекция на ендотела при пациенти с повишен риск.

(Публикации: 1, 7, 8)

ПРИНОСИ ОТ НАУЧНО-ПРИЛОЖНАТА ДЕЙНОСТ

Научно-приложните приноси под форма на внедрявания или методични разработки са описани подробно в предходната точка, във връзка с проследяване на приложението им в хода на научното изследване и само са изброени накратко по-долу.

Разработени или доразвити са следните методи:

1. Доразвит и внедрен *метод за количествена дигитална имунохистохимия*, приложен при оценка на клинична патология в области репродукция - ендометриоза, онкология – простатен карцином, глиобластома; оценка на ангиогенеза;

2. Разработен *метод и кит за детекция на протеинови продукти на онкофузионния ген TMPRSS2:ERG* формиращ се при напреднала простатна канцерогенеза; *издаден патент 1*

3. Разработен е *комплексен молекулярно биологичен метод за еукариотна експресия на къси пептиди* – 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 РНК, на границата на рибозомалния праг за трансляция; методът е комбиниран с де ново структурно моделиране на фузионни пептиди с цел оптимизация на свойствата им; *издадени патенти за САЩ, ЕС, Световен; патент 2*

4. Внедрено е *секвениране от 3-то нанопорово новогенерационно поколение*, като Лаб по репродуктивни ОМИКс технологии е може би единствената в страната засега прилагаща активно метода от 2017 год. Модифицирани са редица протоколи за транскриптомика, вкл. за секвениране на некодирани РНКи без поли-А, както и протича разработка на няколко подхода за транскриптомика на единични клетки;

В. Трансфер на технологии в полза на биотехнологии на асистирана репродукция в животновъдството

В партньорство с други изследователски групи на Института бе въведен метод за оценка на гаметния виталитет и качество с помощта на флоуцитометрично изследване на маркери за митохондриален потенциал и апоптотични промени при сперма на различни животински видове - първо проучване в страната.

В сътрудничество с колеги, търсещи маркери за определяне на фактори, влияещи върху съхранението на мъжките гамети бе установено с помощта на 2D PAGE (двумерна полиакриламидна гел електрофореза), денситометричен анализ със специализиран софтуер за определяне на сигнификантно различни петна и последваща екстракция на потенциални протеинови таргети и софтуер за статистическо обогатяване на генно-онтологични мрежи, бяха установени потенциални нови маркери за качество, както и евентуални корелации със съществуващи ензимни методи (26).

(Публикации: 46, 47)

ПРИНОСИ ОТ НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННАТА ДЕЙНОСТ

- Разработка на нови платформи по НПКНИ – разработка на интегриран подход за дизрупция на тъкани до единични клетки, геномна редакция за въвеждане на репортери, биопринтиране на 3D модели или генериране на тъканни функционални аналози с микрофлуидни орган-в-чип подходи и функционален анализ с помощта на транскриптомика/геномика на единични клетки;

- Популяризация дейността на ИБИР-БАН – Марка Братанов, нова технология за секвениране; Транслационни изследвания на модел на активирана инфлазама при КОВИД –

предложен през мес. април 2020 на МОН в групата на организации имащи готовност да се вкл. в изследванията и финансиране като проект на ФНИ през извънредна сесия 2020, финансов транш 2021 поради административни проблеми; Приложение на орган-в-чип на модел на бял дроб, с индукция на експресия на ORF3/8 в бд епител и бд ендотел за проследяване на активността на каспаза-1 и експресията на цитокини IL-1 β , IL-6 от съответните кл., както и определяне на механизма на клетъчна смърт. Модела цели терапевтична транслация с далечно заглушаване с транслационна технология (без трансфекция) на гени свързани с активацията на инфламазомата в тези кл. и превенция на пироптоза.

Международни научни мрежи/колаборации:

- Международна мрежа за изследване на ПреимплантиционенФактор™ (PreImplantationFactor™) – около 80 научни институции от цял свят; колаборация с Doctor Eytan Barnea - публикации в PloS ONE, Immunobiology, Thrombosis and Haemostasis, Oncotarget;
- Съвместни научни изследвания с биотехнологичната компания BioIncept Llc (NJ, US) (<http://www.bioincept.com/global-network>);
- Колаборация с Prof. Karlheinz Peter Baker от IDI Heart & Diabetes Institute, Australia; – публикация в Thrombosis and Haemostasis;
- Колаборация с Prof. Nelson Fernandez (Reader) от Essex University, UK; – публикации в Am J Reprod Immunol, Reprod Biol, Immunobiology;
- Колаборация с Metodi Metodiev (Senior Lecturer) от Essex University, UK; – публикации в Molecular Carcinogenesis, Scientific Reports;
- Колаборация с Prof. Robert O. Gilbert, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, USA; – публикация в Oncotarget;
- Колаборация с prof. Chaya Brodie, Israel; Michigan Medical School;
- Колаборация с Martin Mueller, University of Basel; Yale School of Medicine;