Софийски Университет „Св. Климент Охридски”

Биологически Факултет

КАТЕДРА Генетика

Антония Велчева Георгиева

“Създаване на нови антибактериални агенти, базирани на антисенс олигонуклеотиди, с използване на различни молекулни механизми на действие“

Автореферат

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” в професионално направление 4.3 Биологически науки – „Генетика-Синтетична биология“

Научен ръководител: проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски

гр. София

2025 г.

Този дисертационен труд е обсъден на апробация (разширено заседание) на катедра Генетика към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на ……..г. и е насрочен за защита пред научно жури, потвърдено със Заповед №…….на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“.

Научно жури:

1.
2.
3.
4.
5.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на…….от……часа в сградата на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд съдържа:

1. Страници: 129

2. Фигури: 30

3. Таблици: 4

4. Цитирания: 140

Дисертационният труд е базиран на 2 научни публикации с участието на докторанта, реферирани в SCOPUS с общ импакт фактор – 8:

1. **Penchovsky, R., Georgieva, A. V., Dyakova, V., Traykovska, M., & Pavlova, N. (2024). Antisense and functional nucleic acids in rational drug development. Antibiotics, 13(3), 221. https://doi.org/10.3390/antibiotics13030221**

   IF: 4,3
   Q1: 25 точки

2. **Pavlova, N., Miloshev, G. Y., Georgieva, A. V., Traykovska, M., & Penchovsky, R. (2022). Versatile tools of synthetic biology applied to drug discovery and production. *Future Medicinal Chemistry, 14*(17), 1325–1340. https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0063**

   IF: 3,7

   Q2, 20 точки

Научно-изследователската дейност е извършена в лабораторията на проф. д-р Роберт Пенчовски – Лаборатория по „Синтетична биология и Биоинформатика". Тя е подкрепена от следните научни проекти:

1. „Дизайн на функционални нуклеинови киселини за синтетична регулация на генната при прокариоти и еукариоти", КП-06-Н31/18/13.12.2019, финансиран от Фонд „Научни Изследвания", комисия по Биологически Науки, ръководител на проекта проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски
2. „Сравнителен анализ на ефективността на нови антибактериални агенти, базирани на различни видове антисенс олигонуклеотиди, използващи различни молекулярни механизми на инхибиране на РНК", грант: КР-06-Н63/1/13.12.2022, предоставен на проф. д-р Роберт Пенчовски от Националния фонд за научни изследвания (ФНИ)
3. „Създаване на антисенс олигонуклеотиди, които специфично инхибират бактериалния растеж на *Helicobacter pylori* и *Porphyromonas gingivalis*", КП-06-М33/5/18.12.2019, финансиран от Фонд „Научни Изследвания", комисия по Медицински Науки, ръководител на проекта гл. ас. д-р Мартина Трайковска
4. „Дизайн на антисенс олигонуклеотиди, свързани с проникващи в клетките олигопептиди, като нови антибактериални агенти срещу резистентни човешки патогенни бактерии", грант:4011/05.07.2023 , присъден на проф.Робърт Пенчовски, д.м

Думи на благодарност

Изразявам своята благодарност към**:**

- Научения ми ръководител проф. д-р Роберт Пенчовски за знанията и опитът, които сподели с мен.

- Членовете на Лабораторията по „Синтетична биология и Биоинформатика“ при Биологически Факултет на Софийски Университет “Св. Климент Охридски”, за възможността да работя върху темата „Създаване на нови антибактериални агенти базирани на антисенс олигонуклеотиди с използване на различни молекулни механизми на действие“ и за рекациите на дисертацията.

- Членовете на Катедра „Генетика“ при Биологически Факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски” за тяхната подкрепа по време на докторантурата ми.

Съдържание

1. Въведение

През последните години се наблюдава значителен ръст в броя на клинично установените случаи на антибиотична резистентност при бактерии, което представлява сериозно предизвикателство за съвременната медицина. Предизвикателство, което ако не бъде овладяно в кратък срок от време, ще е причина за множество проблеми, свързани със застрашаването на живота на голяма част от човешката популация. За това сигнализират данните от множество международни проучвания, които представят резултати, определящи настоящия обхват и последици от антимикробната резистентност (АМР). Здравните специалисти отчитат рекордни нива на смъртност причинени от АМР, като в световен мащаб случаите достигат до 1,27 млн. души, а броят на косвено засегнатите е 4,95 млн. смъртни случая годишно. Според данни на Европейската комисия над 35 000 смъртни случая годишно в Европейския съюз се дължат на антибиотичната резистентност (АМР). Прогнозите сочат, че в периода от 2025 г. до 2050 г. броят на починалите вследствие на АМР може да достигне 39 милиона души.

На този фон разработването на иновативни, селективни и най-вече устойчиви антибактериални агети е от ключово значение за осигуряването на ефективно лечение на инфекции причинени от резистентни към антибиотици патогенни щамове бактерии. Работи се върху пет ключови технологии – откриване на нови молекули чрез използването на високопроизводсвен скриниг и компютърно моделиране, разработване на устойчиви към резистентност фагови терапии, нанотехнологии за прецизна доставка на терапевтични средства, иРНК ваксини и антисенс технологии.

Антисенс технологиите, включват няколко основни модела за въздействие и контрол на генетичната експресия, чрез синтетични РНК-и.

Създават се дизайнерски синтетични рибозими, които имат способността да разцепват целеви РНК молекули, използвайки специфични ензимни реакции. Проектират се интерферентни РНК молекули (RNAi), които задействат РНК-индуциран комплекс за заглушаване (RISC), като по този начин потискат експресията на специфични гени. Третият вид са антисенс технологиите, които включват използването на антисес олигонуклеотиди (АСО). Тази технология е

обещаваща и предлага широк спектър от възможности за прецизно насочване на антисенс олигонуклеотидите (ACO) към конкретни молекулни мишени (Bui & Chu, 2024). По този начин се създава система, която позволява адаптиране на терапията спрямо специфичните нужди и едновременно с това минимизира риска от нежелани странични ефекти върху организма гостоприемник, както и вероятността за развитие на резистентност от страна на бактериалните патогени.

Настоящият дисертационен труд е посветен на разработването на антисенс олигонуклеотиди (ACO) с потенциал за приложение като антибактериални агенти, както и на оптимизирането и прилагането на различни химични модификации и структурни промени с цел повишаване на тяхната ефективност и стабилност.

2. Цел и задачи

Цел на изследването

Основната цел на настоящата дисертация е да се проектира и оптимизира ефективността на инхибиране от антисенс олигонуклеотиди (АСО) с потенциал за антибактериално приложение. За тази цел върху една и съща нуклеотидна последователност ще бъдат въведени седем различни химични модификации и структурни промени, като всяка от тях ще бъде оценена спрямо способността ѝ да инхибира експресията на целеви ген. В крайна сметка ще бъде определена най-ефективната модификация на АСО за инхибиране на бактериален растеж.

Основни задачи

1. Конструиране на репортерна система за контролиране на генната експресия в *Escherichia coli*, включваща репортера LacZ (Фигура 13).
2. Проектиране на антисенс олигонуклеотид за ефективно инхибиране на генната експресия при *E. coli*.
3. Извършване на химическа и структурна модификация на антисенс олигонуклеотиди (АСО).
4. Тестване и анализ на инхибиращия ефект на химически модифицираните АСО върху целевия ген.
5. Проектиране и тестване на АСО като средство за инхибиране на бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus*.

3. Материали и методи

4.1. Материали

С цел изпълнение на заложените експериментални задачи в настоящата дисертационна работа са използвани подходящи биологични материали, химични реагенти, лабораторно оборудване и биоинформатични инструменти, както е посочено по-долу:

4.1.1. Софтуер и биоинформатични инструменти

За проектирането на ACO и предвиждането на характеристиките на модификацията на всеки агент, са използвани редица биоинформатични база данни и софтуерни инструменти.

- **BLAST от NCBI** – https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
  BLASTn (Basic Local Alignment searching Tool for nucleotidesl) е софтеурна програма, част от програмата BLAST (Basic Local Alignment searching Tool) на NCBI (National Center for Biotechnology Infomation). NCBI е една от най-големите платформи със свободен достъп до биологична информация. Информацията в нея предоставя възможност за достъп до специализирани база данни, включващи разнообразни научни данни и инструменти. **BLAST** е биоинформатичен инструмент за анализ и определяне на специфичността на ACO спрямо целевата мишена и избягване на нежелано неселективно свързване. Този инструмент е използван за сравняване на нуклеотидните последователности и проверка за наличието им в човешкия геном.

- **Rfam** – https://rfam.org/
  базата данни е използвана за определяне структурата на РНК и наличието на функционални мотиви. Източник е и за всички данни, които

показват разпространението на рибопревключвателите в разлините организми.

- **RevComOligo -**
  https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=41
  Програмата е използвана за получаване на комплементарна секвенция на предварително зададена такава в посока 5‘-3‘.

- **ENA(European Nucleotide Archive)** –
  https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home
  Базата данни предоставя достъп до информация, касаеща нуклеотидната последователност на таргетни гени. Тази база данни е използвана за определяне на таргетните гени и тяхната последователност, а също и за скрининг на целевите РНК молекули в различни организми.

- **RNAfold**
  Този инструмент е част от пакета ViennaRNA Web Services (http://rna.tbi.univie.ac.at/), който включва набор от различни биоинформатични алгоритми, които служат за предсказване и анализ на вторични структури на РНК. Този инструмент е използван за предсказване на вторичната структура на целевата РНК, което беше важно при проектирането на АСО, което включва откриването на стабилни структури, които АСО може да разруши. Също така този инструмент е използван за изчисляването на енергията на хибридизация на АСО и иРНК. RNAfold може да пресъздава вторична структура, за която е установено, че е най-устойчива структура поради минималното общо разстояние между сдвоените бази.

- **Mfold**
  Mfold е биоинформатичен софтуер за предсказване на вторичната структура на НК (като РНК и ДНК) на база минимална свободна енергия. Често се използва за моделиране на сгъването на РНК молекули.

- **PyMol**

  е мощен молекулен визуализатор, който се използва за създаване на 3D изображения на биомолекули като белтъци, ДНК и малки молекули. Много популярен е за структурен анализ и презентации.

- **Notepad++**

  Notepad++ е многофункционален текстов редактор за програмисти и учени. Поддържа синтактично оцветяване за много езици (HTML, Python, etc.) и е полезен за работа с текстови файлове, скриптове и код.

- **OriginLab**

  OriginLab е програма за анализ и визуализация на данни. Използва се за статистическа обработка и създаване на графики.

4.1.2. Нуклеинови киселини

Тук са посочени всички използвани НК, тяхната структура и източникът, от който са закупени. В раздел Методи е посочена процедурата по подготовката им преди употреба. За целите на този научен труд е проектирана ACO последователност, която покри нужните изисквания при проведените експерименти и показа своята ефективност като антибактериален агент при инхибирането на растежа на целевата бактерия, съдържаща синтетичен ген.

Дизайнът на ACO изисква покриването на поредица от критерии и биоинформатични методики (Pavlova et al., 2023). Методологията включва структурен дизайн на ACO, съгласно утвърдени в литературата принципи (Pavlova et al., 2023). За да са ефективни ACO трябва да отговарят на редица структурни и функционални изисквания, като оптималната дължина на ACO трябва да е между 15 до 30 нуклеотида. Целевата секвенция трябва да бъде достъпна за хибридизация и консервативна сред патогенните бактериални щамове. Важно е да не се наблюдава хомоложност между ACO и човешки РНК секвенции. В структурата на олигонуклеотида трябва да присъстват не повече

от 10 фосфоротиоатни връзки, с което се повишава устойчивостта към нуклеази. За да се осигури проникваемоста на АСО през клетъчната стена се добавя клетъчно-проникващ пептид (Pavlova et al., 2023).

- **Последователност на АСО**
  5′ - AGCACTCTTTTCCTCTCC - 3′
- **Дължина (nt)**
  18 нб

- **Молекулна маса (Da)**
  5.797

- **Tm**
  55.9

- **Концентрация**
  21.2 nmols

За да проучим обстойно молекулните механизми на действие на АСО, е заложена химическа модификация, включваща комбинирането на различни техники и генерации АСО (Таблица 3). С това се цели да се изследва приложението и ефективността на всяка една от модификациите и да се обобщи техния механизъм на действие. Посредством резултатите от настоящия докторски труд, ще бъдат проучени и сравнени различни техники и видове химични модификации на АСО, които влияят на бактериите, към които са насочени специфично с цел антибактериално действие.

Таблица 4. Видове химични модификации.

ACO	Последователност	Дължина	TM
pVEC + ACO1	[p-VEC][SS-C6][SpC12]A[Ps]G[Ps]C[PS]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]C[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]C	17	55.7
pVEC + ACO2	[p-VEC][SS-C6][SpC12][mA][mG][mC][mA][mC][mU][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mC][mU][mC][mC][Univ]	18	55.9
pVEC + ACO3	[p-VEC][SS-C6][SpC12]AGCACTCTTTTCCTCTCC	18	55.9
pVEC + ACO4	[p-VEC][SS-C6][Sp12C]AGCACTCTTTTCCTCTCCACCA	22	61.5
pVEC + ACO 5	[p-VEC][SS-C6][Sp12C][mA][mG][mC][mA]CTCTTTTCC[mU][mC][mU][mC][mC][Univ]	18	55.9
pVEC + ACO 6	[p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-A][TMO-G][TMO-C][TMO-A]CTCTTTTCC[TMO-T][TMO-C][TMO-T][TMO-C][TMO-C][Univ]	18	55.9
pVEC + ACO 7	[p-VEC][SS-C6][Sp12C][+A][+G][+mC][+A][+mC][+T][+mC][+T][+T][+T][+T][+mC][+mC][+T][+mC][+T][+mC][+mC][Univ]	18	55.9
pVEC + ACO 8 За ФМН	[p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-C][TMO-T][TMO-T][TMO-T]AACTGTA[TMO-C][TMO-T][TMO-G][TMO-C][TMO-C][Univ]	16	54.6

Всички описани ACO са поръчани, синтезирани и доставени от фирмата-производител Integrated DNA Technologies (САЩ). ACO пристигат в лиофилизирана форма, а разтварянето и последващото им съхранение се изпълнява спрямо протокола, предоставен от производителя.

4.1.3 Микроорганизми

За целите на експеримента са използвани следните бактериални щамове:

- *Escherichia coli HB101*, съдържаща синтетично конструиран ген клониран в плазмид PR414 (като контролът върху експресията му е под влиянието на lac промотор).
- *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC 25923).

4.1.4. Използвани бактериални среди

- **Луриа-Бертани (ЛБ)**

За инокулацията на бактериланите щамове е използвана универсална хранителна среда Луриа-Бертани (ЛБ) подходяща за култивирането на *E. coli* (Bertani, 1951) и *S. aureus*. Химичният й състав включва триптон, дрожден екстракт и натриев хлорид. При заложените от нас експерименти, ЛБ средата е използвана както в течна форма за отглеждане на трансформирани клетки, така и в твърда форма (с добавен агар) за селектиране на колонии след трансформация с плазмиди, съдържащи гени за устойчивост към антибиотици.

Състав на хранителна среда ЛБ:

- Bactotryptone (HiMedia Laboratories) - 2,5g 250ml/5g 500ml.
- Дрождев екстракт (HiMedia Laboratories) - 1,25g за 250ml/2,5g за 500ml.
- NaCl (Solimex) - 2,5g за 250ml/5g за 500m

- **SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression)**

Това е богата хранителна среда, предназначена за ускорено възстановяване на бактерии след трансформация. Тя съдържа триптон, дрождев екстракт, натриев хлорид, калиев хлорид, магнезиев хлорид/сулфат и глюкоза.

- Триптон (HiMedia Laboratories) – 20 g
- Дрождев екстракт (HiMedia Laboratories) – 5 g
- Натриев хлорид (NaCl) (Solimex) – 0.5 g
- Калиев хлорид (KCl) (Solimex) – 0.186 g
- Магнезиев хлорид хексахидрат ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Solimex) – 2.033 g
- Магнезиев сулфат хептахидрат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Solimex) – 2.465 g
- Дестилирана вода – до 1000 mL общ обем

4.2. Методи

4.2.1. Биоинформатични анализи

За целите, свързани с дизайна на нови антибактериални агенти и проследяването на техните молекулни механизми на действие след приложена химическа модификация, е извършен детайлен биоинформатичен анализ. Сред приложените методи са селектирането на РНК последователности от специализирани за тази цел база данни (Genbank от NCBI, ENA и Rfam), структурен анализ, подравняване на секвенциите и проверка за сходството им с човешкия геном (BLAST от NCBI). Извършена е и оценка на комплементарността на избраната последователност и енергетичните характеристики на олигонуклеотидите. Това позволи да се направи оптимален ACO дизайн.

4.2.1.1. Биоинформатични методи за дизайн на ACO.

Приложени са методи, които обхващат откриването на прицелни РНК последователности, чрез използването на редица биоинформатични инструменти и бази данни.

Rfam е база данни, която е използвана за идентифициране на некодиращи РНК-и и по-конкретно за идентифицирането на рибопревключватели. Платформата **GenBank** е използвана за получаването на информация относно целевите РНК последователности и определянето на консервативните региони. **ENA** е използвана за анализ на еволюционните връзки при хомоложни последователности при различните организми. След определянето на

секвенцията, нейната последователност е изтеглена във **FASTA** формат и подготвена за по-нататъшна обработка. Извършен е анализ на АСО последователността с човешкия геном, за да отхвърля възможността за неспецифични взаимодействия. За тази цел е използвана базата данни **NCBI BLASTn**. За да се избегне и възможността на проектирания АСО да хибридизира със себе си, което включва образуването на димерни структури или хетеродуплекси е избрана **RevSeq,** като надежден биоинформатичен инструмент, който генерира комплементарната последователност на АСО. След като бяха отхвърлени всички възможности за неспецифични взаимодействия на АСО с РНК-и извън целевите от мен мишена се престъпи към последващата стъпка по оптимизирането на АСО. Извършена е оценка на вторичната структура и стабилността на АСО чрез **ViennaRNA RNAfold**. Този инструмент предсказва вторичната структура на РНК въз основа на минималната свободна енергия, което показва нейната стабилност. Характерно за АСО е, че могат да образува стабилни вторични структури, което може да попречи на свързването им с таргетната иРНК. Също така е използвана и **RNAalifold**, чрез което успешно е предсказана стабилността на таргетната структура в АСО и иРНА.

4.2.2 Използвани протоколи

- **<u>Изолиране на плазмидна ДНК</u>**

За изолирането на плазмидна ДНК е използван кита - **Sigma-Aldrich - GenElute™Plasmid Miniprep Kit .** ДНК е изолирана както е описано в упътванията от производителя.

- **<u>Протокол за провеждане на рестриктазна реакция</u>**

За провеждане на рестриктазна реакция с ензима **BamHI** се подготвя реакционна смес с общ обем 20 µL:

В епендорф епруветка се добавят:

- 8 µL плазмида pRS414

- 1 µL рестриктазен ензим BamHI (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µL BSA (Sigma-Aldrich)
- 2 µL подходящ реакционен буфер (Thermo Fisher Scientific)
- 8 µL дестилирана вода

Реакцията се инкубира при 37°C за 1 час и 30 минути . След инкубацията ензимът се деактивира чрез нагряване при 70°C за 10–15 минути След завършване на рестрикцията, пробите се нанасят в **2% агарозен гел**, като електрофорезата се провежда за **45 минути**.

Източник: **Protocol: Restriction Enzyme Digest — Single Enzyme**

- **Протокол за химическа трансформация на компетентни клетки на *E.coli* с плазмид pRS414**

В епруветка се смесват 100 µL компетентни клетки *E.coli* с 3 µL плазмидна ДНК (pRS414).

- Сместа се инкубира на лед за 30 минути.
- Провежда се термичен шок при 42°C за 45 секунди.
- Клетките се охлаждат на лед за 5 минути.
- Добавят се 800 µL SOC среда
- Инкубира се при 37°C с разклащане за 45 минути до 1 час.
- Клетките се посяват върху селективни агарови плочи с подходящ антибиотик и се инкубират при 37°C за 12–16 часа.

Източник: Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- **Полимеразна верижна реакция (PCR) - LifeECO Thermal Cycler**

PCR се използва за амплификация на целеви ДНК фрагменти, които впоследствие се включват в плазмидния вектор.
Състав на реакционната смес:

- 10 х так буфер – 2,5 µl
- 10 mM смес от dNTPs – 0,5 µl
- 10 mM прав праймер – 0,5 µl
- 10 mM обратен праймер – 0,5 µl
- Матрична ДНК – 1 µl
- Так полимераза – 0,5 µl
- dH2O 19,5 µl

Източник: **Mullis, K., & Faloona, F. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.

- **<u>Бета-галактозидазен анализ</u>**

За да определим нивото на експресията на LacZ гена, е проведен бета-галактозидазен анализ. Това е лабораторен метод, чрез който се измерва активността на ензима бетагалактозидаза. За коректното му изпълнение, следвахме стандартен протокол, включващ няколко етапа на подготовка на пробите. Първо се измерва оптичната плътност на клетъчната култура при 600 nm. В епендорфови епруветки се добавят 80 микролитра от буфера за пермеабилитация. След това към всяка проба се добавят 50 микролитра ONPG (Sigma-Aldrich) и се разбърква с вортекс (Fisherbrand™ Analog Vortex Mixer). Добавят се 3 до 4 капки хлороформ, отново се вортексира и пробите се инкубират за 10 минути при 37°C. След това се добавят 600 микролитра от субстрата и се оставят за 30 минути при 37°C, за да протече реакцията. Реакцията се спира с добавянето на 700 микролитра от стоп буфера и се оставя за 15 минути на стайна температура. Накрая пробите се центрофугират за 10 минути при 12 000 оборота в минута, след което се измерва оптичната плътност на супернатанта при 420 nm. За да се установи крайният резултат, описващ бета-галактозидазната активност, всички получени стойности при измерванията на A600 и A420 бяха изчислени чрез следната формула:

$$\text{Miller units} = \frac{1000 * \text{A420}}{t * V * A600}$$

Където:

A420 - Абсорбция при 420 nm

t - Време на реакцията

V - Количество на бактериалната култура

A600 - Абсорбция при 600 nm

Пермеабилизиран разтвор

Обем: 250 мл

- Na_2HPO_4 – 8,9 г (Solimex)
- KCl – 0,37 г (Solimex)
- $MgSO_4$ – 0,06 г (Solimex)
- SDS (1%) – 25 мл (Sigma-Aldrich)
- STAB – 0,2 г (производител не е посочен)
- β-меркаптоетанол – 5,4 мл (Sigma-Aldrich)

Субстратен разтвор

Обем: 250 мл

- Na_2HPO_4 – 5,37 г (Solimex)
- NaH_2PO_4 – 1,56 г (Solimex)
- ONPG – 1 mg/ml (Sigma-Aldrich)
- β-меркаптоетанол – 2,7 µл/мл (Sigma-Aldrich)

Стоп буфер

1 М натриев карбонат (Na2CO3)

Източник: Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- **Измерване на оптическата плътност (OD) на бактериалната култура в присъствие на ACO**

Бактериалните клетки са култивирани в LB хранителна среда, която е приготвена съгласно стандартния протокол, и след това инкубирани за една нощ при 37 градуса, докато се достигне оптична плътност при 600 nm от 0,8 единици. Културите са разредени в съотношение 1:5 (ON:LB), а вече разредената бактериална среда се третира с всеки от модифицираните ACO в концентрации 20, 40, 80 и 120 микрограма на милилитър. Проба, съдържаща само бактериални среда (1:5) без третиране с ACO, заменена с 30 % DMSO (Sigma-Aldrich) , е използвана като контрола. Готовите проби са поставени в термостат при 37°C за 3 часа.

Експериментални тестове на бета-галактозидазната активност на ACO

- **Подготовка на пробите**

За целите на всяко едно от изследванията с ACO е подготвен бактериална култура във флакон от 20 ml LB среда, в който са добавени 20 µl (100 mg/L) ампицилин и 50 µl от глицеролна култура съдържаща *E. coli.* Култивирането е извършено в комбиниран шейкър-инкубатор (Argolab Shaker Incubator SKI 4), при постоянна температура от 37 °C и 150 оборота в минута за интервал от 7-8 часа. След което ON културата се разрежда 1:5. Залагат се три епруветки (епендорф (2 ml), всяка от които с обем от 100 µl от разредената бактериална култура и количество DMSO (Sigma-Aldrich) равно на количеството ACO определено за конкретния експеримент, и по две епруветки съдържащи ACO в различни концентрации (20, 40, 80 и 120 µg/ml). Заложените култури са поставени на клатачка при температура от 37°C и 150 оборота за три часа или достигането на оптична плътност на контролните при 600 nm от 0,8 единици. Веднага след отчитането на оптичната плътност на пробите е извършен бета-галактозиден анализ съгласно вече описания протокол. Експериментът е повторен за всяка една от използваните концентрации

5. Резултати

С увеличаващите се на брой изследвания в областта на олигонуклеотидите и тяхната функционалност, и приложение при разработването на нови терапевтични средства, като най-значими и с най-голям потенциал на приложение при лечението на широк диапазон от заболявания се открояват АСО. Те са къси едноверижни ДНК или РНК олигонуклеотиди, които имат способността да хибридизират с целиви региони от естествено срещащи се РНК молекули, такива като иРНК, вирусни РНК-и, инхибирайки биологичната функция на рибонуклеиновите киселини. Изследвайки приложимостта на тази технология при разработването на терапевтични средства са установени множество ограничения, свързани с ниската стабилност на АСОи и разходите, свързани с техния синтез. Като основен метод за преодоляването на ограниченията свързани с фармакокенетичните свойства на АСОи се прилагат различни по вид химични модификации. Понастоящем липсва достатъчно научна информация свързана с различните механизми на молекулно взаимодействие между АСО:РНК хибрида. Това е така поради високата специфика на този тип научно-експериментална работа, както и високият финансов ресурс за осъществяването на подобен род експерименти. В този научен труд, ние за пръв път извършихме широкоспектърен анализ на молекулярните механизми на действие при различните генерации АСО, както и приложената от нас стратегия за химична модификация. С тези поставени задачи, ние не просто целим да анализираме в детайлно молекулярните взаимодействия, които възникват между хибрида АСО:РНК, а и да предоставим пред научната аудитория, нова техника за химична модификация, която ограничава токсичността на АСО, и редуцира цената за синтеза и приложението им.

Настоящата глава описва подробно извършените структурни и химични модификации върху АСО, както и резултатите от тяхното въздействие върху хибридизацията, устойчивостта към нуклеази и инхибираща активност върху генната експресия на целевата генетична последователност. За постигане целите на дисертационния труд, бяха приложени различни *in silico* и лабораторни методи. Процесът се състоя от няколко последователни етапа на научно-изследователска и експериментална работа проведени, както следва:

- Конструиране на плазмид за контрол на генната експресия при *E. coli*, съдържащ LacZ репортена система (Фигура 13).
- Проектиране на антисенс олигонуклеотид за инхибиране на генната експресия при *E. coli.*
- Химическа и структурна модификация на ACO.
- Тестване и анализ на инхибиращия ефект на химическите модифицираните ACO върху целевия ген.
- Проектиране и тестване на ACO, като средство за инхииране бактериалния растеж на *S. aureus.*

5.1.2. Конструиране на плазмид за контрол на генната експресия при *E. coli*, съдържащ LacZ репортена система

С провеждането на настоящето изследване се цели да бъде извършен сравнителен анализ върху свойствата на инхибиране и молекулните механизми на действие, които притежават седем типа химически модификации, приложени върху една таргетна ACO секвенция. За тази цел е създадена репортена система за количествено определяне на генната експресия, включваща целева последователност. Дизайнът е извършен с висока прецизност и включва многократна обработка и анализ чрез биоинформатични инструменти.

За да бъде определена количествено ефективността на различните химични модификации на ACO, е проектирана система, базирана на гена-репортер LacZ (Miloshev et al. 2022). Тази система позволява индиректното измерване на нивата на експресия на целевия ген, чрез отчитането на ензимната активност на бета галактозидазата. Анализът на бета галактозидаза е един от най-акуратните методи, чрез който е възможно проследяването на инхибиращите свойства на ACO върху генната експресия (Aviv & Gal-Mor, 2018). Началото на експерименталната дейност е отбелязана със създаването на плазмидна конструкция, позволяваща наблюдение и определяне на ефективността, на създадения ACO и приложените върху него седем вида химични модификации. Целият процес на проектиране и конструиране на плазмида включва следните процеси по проектиране на:

- **Промотор**

5‘ TAATACGACTCACTATAGGG 3‘

Началото на експерименталната дейност започна с проектирането на ДНК конструкт. Основна задача е избирането на подходящ промотор, с който да си създадат условия за иницииране на транскрипцията на целевия ген. Важни характеристики, които се съблюдават при избирането на правилния за експеримента промотор са: съвместимост с клетката гостоприемник, типа на промотора и силата му, която определя ефективността на транскрипцията.

Избран е T7 *lacZ* (β-галактозидазен промотор), тъй като отговаря на зададените изисквания за висока транскрипционна активност, минимално образуване двойноверижна РНК и поддържане на добра ефективност на транскрипцията (Sari et al. (2024). Този промотор позволява лесно определянето на активността чрез измерване на β-галактозидазната активност.

- **Шайн-Делгарно**

5‘ AGGAGG 3‘

Последователността Шайн-Делгарно представлява основният елемент на рибозомно-свързващ сайт, разположен преди старт кодона (Omotajo et al., 2015). Функцията й е свързана с индикирането началото на процеса транслация, разпознаван от рибозомата. Важен аспект при избора на последователността е изчисляването на силата на свързване, която притежава. Основна закономерност при този тип свързване е, че колкото по-ниска е свободната енергия, която се генерира, толкова по-силна е инициацията на транслацията (Wen et al., 2021).

- **Таргетната област на ACO**

5‘ TCGTGAGAAAAGGAGAGG 3‘

За целите на анализа относно ефективността на модифицираните от мен ACO, в конструкцията на плазмида е въведена целева област от РНК молекулата, спрямо която се насочват ACO. Въведената област е уникална за целевия ген,

като АСО са създадени да хибридизират с тази последователност, инхибирайки или блокирайки процеса на транслация

- **Старт кодон**

За стартов кодон е избран ATG. Този кодон се среща при повечето про- и еукариоти. Той е първият в отворената рамка за четене.

- **Репортен ген LacZ**

5‘ ACCATGATTACGCTTGGCGTTG…. 3‘

В конструкцията на плазмида, е въведен репортеният ген LacZ (кодиращ β-галактозидаза), който е използван като индикатор за отчитане на генната експресия. Неговото приложение като репортена система се наблюдава в случаите, когато генът е активен и се експресира. В този случай клетките произвеждат β-галактозидаза, която хидролизира субстрата ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), образувайки жълт цвят. Това позволява качествено и количествено измерване на нивото на експресия на конструкцията и дава възможност за оценка на ефекта на АСО върху експресията на целевия ген.

- **Стоп кодон**

За сигнализирането за края на транслационния процес е избран стоп кодона – 5‘ TAA 3‘ (UAA). За разлика от старт кодона, стоп кодонът не кодира аминокиселина, а при срещата си с рибозома се активира фактор, който освобождава полипептидната верига. (Li et al., 2012)

- **Терминатор**

5‘ GCTAGTTA 3‘Терминаторът е ДНК последователност, която определя прекратяването на транскрипцията, като сигнализира на РНК-полимеразата за края на този процес.

5.1.4. Трансформация на *E. coli* с рекомбинантния плазмид

След създаването на плазмидния конструкт, последва трансформацията му в клетки на *E. coli*. Процесът включва няколко стъпки и използването на подходящ вектор. Трансформацията бе осъществена чрез техника, наречена химическа трансформация, за която се използват компетентни клетки на *E. coli*. Химическата трансформация е техника, която се основава на използването на химически агенти и определени условия, чрез които се въвежда рекомбинантна ДНК в клетките на бактерия, в нашия случай *E. coli*. След приключване на химичната трансформация трансформираните бактерии са инокулирани върху твърда хранителна среда (агар), съдържаща ампицилин, който селектира бактериите, успешно приели плазмидната конструкция. Трансформираните бактериални колонии са прехвърлени на течна хранителна среда. Резултатите показват, че клетките, съдържащи целевия конструкт, експресират β-галактозидаза. При инкубиране на клетките с ONPG, в резултат на което се образува специфичният жълт цвят, характерен за този вид анализ.

5.2. Резултати от извършения *in silico* дизайн и биоинформатични анализи относно структурните особености и функционалността на АСО

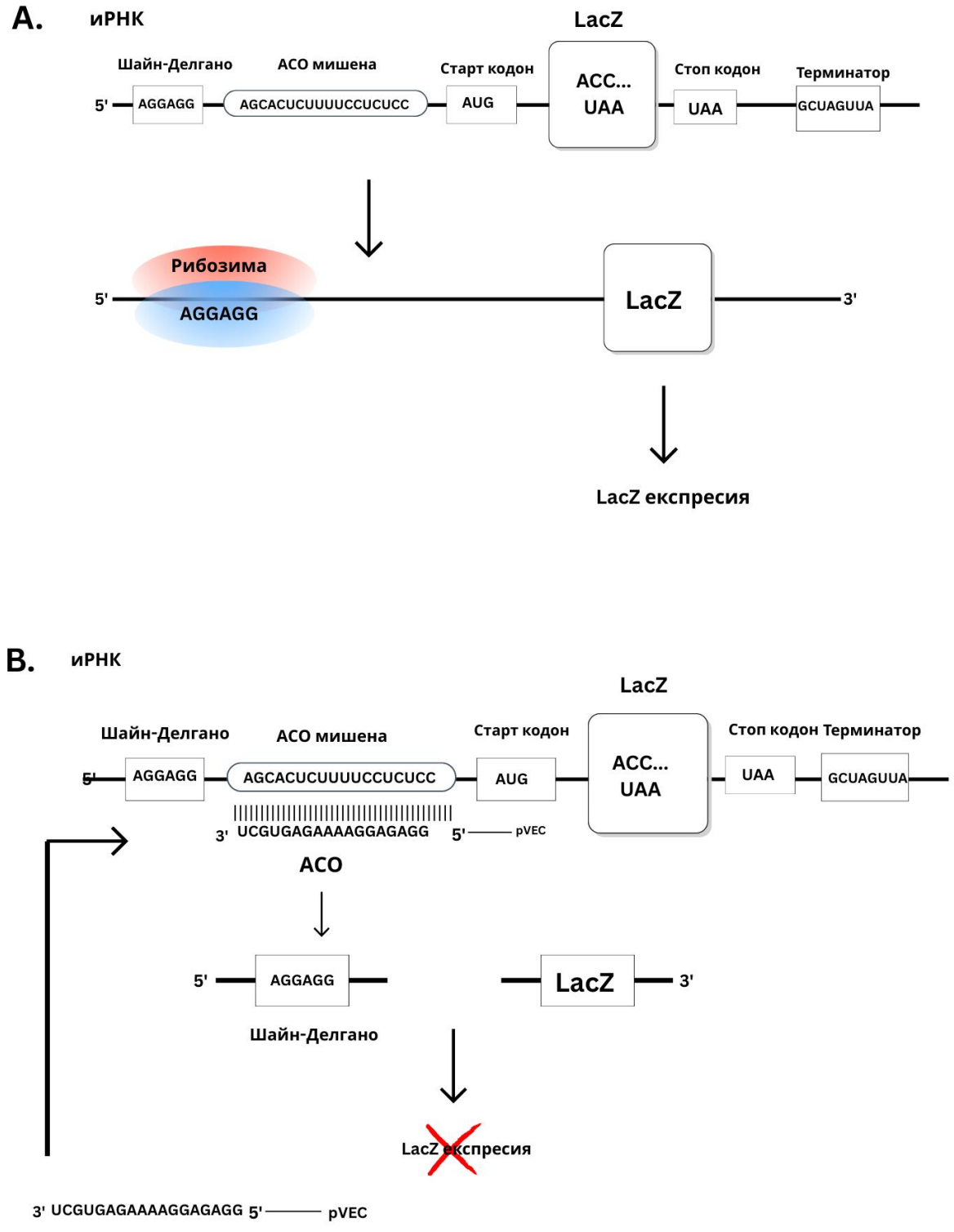
За целите на настоящото изследване, е проектиран АСО, чийто дизайн представлява последователност, която хибридизира с таргетна секвенция от иРНК. Целта на създадената от нас секвенция е да инхибира експресията на LacZ гена. Работният процес включва анализ на голям обем от бази с данни, които предоставиха информация за последователностите на антисенс олигонуклеотидите и тяхната характеристика. Извлечените данни са анализирани чрез различни биоинформатични инструменти и специализирани софтуери, чрез които е оптимизиран целевия конструкт. Разгледани са детайлно вторичните структури и е предвидена и оптимизирана стабилността на хибридите, формирани с целевата иРНК.

5.2.1. Проектиране на АСО за инхибиране на генната експресия при *E. coli*

В процеса на проектиране на АСО, изключително внимание е насочено върху анализа на корелацията структура - активност, като е приложена структурна оптимизация на параметрите, оказващи силно влияние върху биологичната активност на олигонуклеотидите. Проектираната антисенс система за генетичен контрол при *E. coli* цели инхибиране на експресията на LacZ гена като АСО хибридизира с таргетната секвенция. Тази методика ще ни позволи да проследим различните механизми на молекулно взаимодействие при извършените 7 типа химични модификации.

Проектираният АСО **има следната нуклеотидна последователност:**

5' AGCACTCTTTTCCTCTCC 3'



Фигура 13. Схематично представяне на проектираната репортерна система при E. coli

A. *Основни структурни елементи на експресионен фрагмент, проектиран като репортерна система за количествено определяне на експресията на lacZ.* ***B.*** *Хибридизация между антисенс олигонуклеотид (АСО) и иРНК. АСО се свързва чрез комплементарно базово сдвояване с целевата последователност на иРНК, което води до инхибиране на експресията на lacZ гена.*

5.3. Резултати от извършените химични модификиции.

АСО се открояват като много обещаващ инстурмент за регулиране на генната експресия, благодарение на способността си да хибридизират с целеви РНК-а молекули по принципа на комплементарното базово сдвояване. Този тип молекулярно свързване осигурява голяма гъвкавост при дизайна на лекарствени форми, базирани на РНК, и ускорява разработването им като медикаменти насочени към редки и генетични заболявания. Въпреки своята специфичност на свързване, немодифицираните олигонуклеотиди се характеризират с ниска устойчивост към нуклеази и силно изразена нестабилност в биологичните серуми. За да подобрим тяхната природа и увеличим устойчивостта им се прилагат различни по характер химични и/или структурни модификация. Възможностите в това научно поле позволяват прилагането на голям набор от стратегии, основаващи се на комбинирането на различни класове модификации, за подобряването на активността им в конкретни случаи. Научните постижения в областта са довели до подобрения, свързани с подобряването на клетъчното проникване до намаляване на извънтаргетните ефекти и имуногенност.

В този научен труд, са представени нови стратегии при избора и прилагането на модификации и са проследени и анализирани молекулните механизми на взаимодействие при различните АСО с целевата РНК. Анализът представя пред научната аудитория методологичен преглед и констатация за най-добрата стратегия.

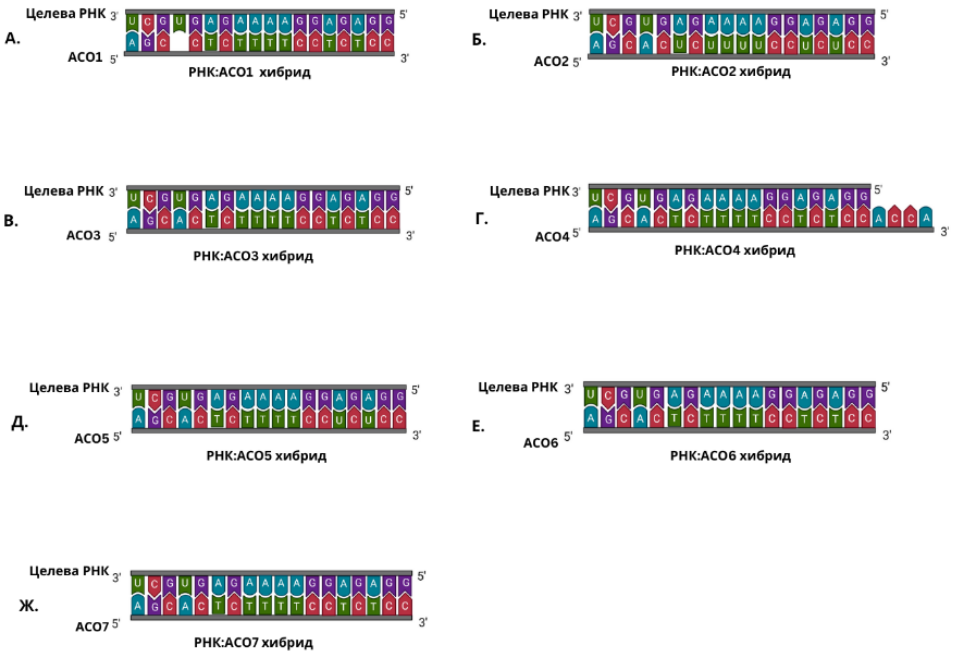
За да проследим молекулните механизми на взаимодействие между различните генерации АСО, са извършени химически и структурни модификации върху вече създадения АСО - **5’** AGCACTCTTTTCCTCTCC 3‘.

Използвани са седем различни стратегии, включващи комбинацията на няколко поколения АСОи и структурни модификации

Всяка модификация и резултатите от нейната активност са разгледани индивидуално, като основния акцент е заложен върху :

- Механизъм на действие
- Биологични ефекти

Фигура 14. АСО с различни химични модификации. *Схематично представяне на видовете химични модификации върху АСО с последователност - 5' AGCACTCTTTTCCTCTCC 3'. Показани са седем типа химични промени както следва: А. Фосфоротиоатна модификация (Ps) –*



ACO1 - [p-VEC][SS-C6][SpC12]A[Ps]G[Ps]C[PS]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]C[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]C; Б. 2' – O- метил модификация ACO2 - [p-VEC][SS-C6][SpC12][mA][mG][mC][mA][mC][mU][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mC][mU][mC][mC][Univ]; В. Немодифициран АСО – АСО3 - [p-VEC][SS-C6][SpC12]AGCACTCTTTTCCTCTCC; Г. АСОи с добавен АССА мотив. АСО 4 - [p-VEC][SS-C6][Sp12C]AGCACTCTTTTCCTCTCCACCA; Д. Гампер с 2'-O-Methyl

модификация ACO5 - [p-VEC][SS C6][Sp12C][mA][mG][mC][mA]CTCTTTTCC[mU][mC][mU][mC][mC][Univ]; Е. Гампер с тиоморфолино (TMO) модификация - [p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-A][TMO-G][TMO-C][TMO-A]CTCTTTTCC[TMO-T][TMO-C][TMO-T][TMO-C][TMO-C][Univ]; Ж. Вид модификация ACO7 LNA - [p-VEC][SS-C6][Sp12C][+A][+G][+mC][+A][+mC][+T][+mC][+T][+T][+T][+T][+mC][+mC][+T][+mC][+T][+mC][+mC][Univ]

5.3.1. ACO1. Фосфоротиоатна модификация (Ps)

Първата химична модификация, която е приложена върху ACO е фосфоротиоатна, комбинирана с делеция на един от нуклеотидите (фигура 14A). За да се постигне висока ефективност е важно да бъдат изпълнени следните стратегии валидни за модификацията на ACO1.

- За да се повиши устойчивостта на ACO към екзонуклеази, олигонуклеотидът трябва да има заложени фосфоротиоатни връзки както в 5', така и в 3' край.
- За да се повиши устойчивостта към ендонуклеази, олигонуклеотидът трябва да има фосфоротиоатни връзки в цялата последователност
- За да се ограничи възможността за свързване с нецелева структура, извърших делеция на една от нуклеотидните бази.

След извършените промени , ACO1 придоби следният модифициран вид:

- [p-VEC][SS-C6][SpC12]A[Ps]G[Ps]C[PS]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]C[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]C[Ps][Univ]

Като към 5‘ края беше прикрепен белтъкът pVEC със последователност – LLIILRRRIRKQAHAHSK. Общата дължина на ACO1: 17 нуклеотида

Експериментално тестване на инхибиращото действие на ACO1 върху експресията на LacZ

Експериментът се състоя от няколко етапа, включващи:

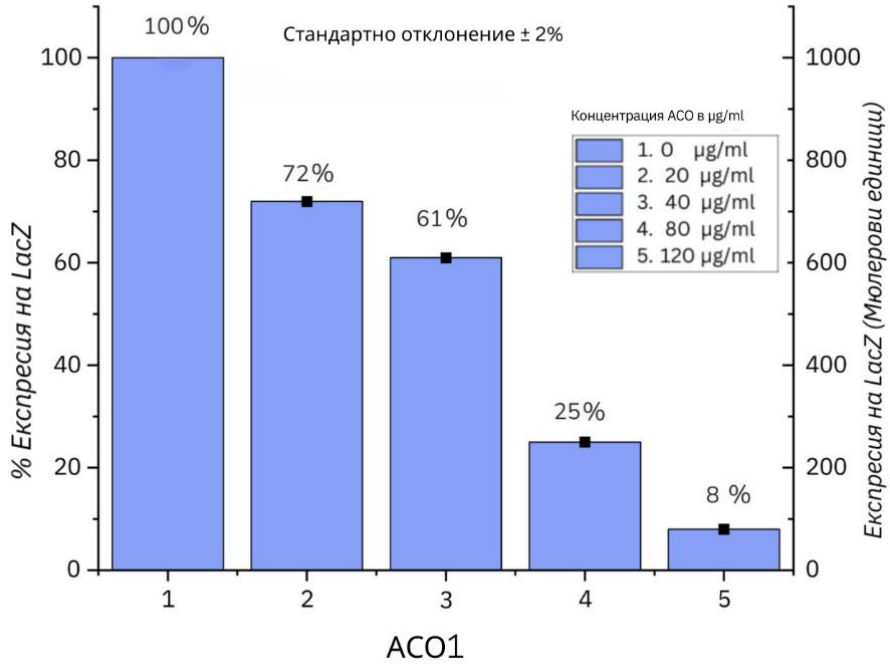
- Инокулацията на бактериални клетки в ЛБ среда.
- Пробоподготовка за анализ на ACO1 спрямо заложената за деня експериментална програма.
- Провеждане на LacZ анализ.
- Статистическа обработка на данните.

Проведените експерименти за оценка на инхибиращите свойства на ACO1 върху експресията на LacZ гена, показаха значително потискане на експресията на целевия ген. При концентрация на ACO1 от 120 µg/ml е достигнат резултат от едва 8% експресия на LacZ гена. Спрямо данните получи от проведения експеримент се наблюдава намаляване на експресията на LacZ гена. С повишаване на концентрацията на ACO1 експресията на LacZ е силно инхибирана както следва.

- Контролна проба (0 µg/ml ACO1) - наблюдава се 100% експресия.
- 20 µg/ml ACO1 – Експресията намалява до 72%.
- 40 µg/ml ACO1 – Експресията намалява до 62%
- 80 µg/ml ACO1 – Експресията спада значително до 25%.
- 120 µg/ml ACO1 - Експресията е силно повлияна и достига ниво от 8% спрямо данните получени при замерването на контролата.

Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO1 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици. Мюлеровите единици е общоприет стандартен метод за количествено определяне на бета галактозидната активност, която се използва като основен индикатор за експресията на LacZ гена.

АСО с PS модификация, приложена върху цялата секвенция, демонстрира стабилно свързване към иРНК (Фигура 15). С повишаването на концентрацията на АСО в единица обем се наблюдава значителен инхибиращ ефект спрямо експресията на LacZ гена. Измерената активност на бета галактозидазата в присъствието на АСО в различни концентрации показва дозозависимо потискане. Химически модифицираната форма на АСО1 показва завиден инхибиращ ефект. Получените резултати индикират, че модификацията приложена върху АСО1 засилва ефективността и стабилност.



Фигура 15. Данните от експеримента с АСО1. *Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на АСО1 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.*

5.3.2. ACO2. 2‘ – O- метил модификация

Втората химическа модификация, която приложена върху ACO е *2‘ – O- метил*.

За да се постигне висока ефективност са приложени следните стратегии:

- За постигането на по-висока устойчивост към нуклеази са модифицирани на всички нуклеотиди
- Избор на оптимална дължина, за да се избегне нежелана хибридизация

Като към 5‘ края се прикрепен белтъкът pVEC със последователност – LLIILRRRIRKQAHAHSK.

Общата дължина на ACO5: 18 нуклеотида.

- [p-VEC][SS-C6][SpC12][mA][mG][mC][mA][mC][mU][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mC][mU][mC][mC][Univ]

Вид модификация

Модификацията е извършена върху рибозата в нуклеотидите, като хидроксилната група (- OH) на 2’- въглеродния атом се заменя с метилова група (-OCH3). Извършените промени повлияват няколко основни свойства на ACO, като основните аспети, които се подобряват са неговата конформация и устойчивостта му. Това включва следните характеристики:

- Висок афинитет на свързване
- Ензимна стабилност
- Намаляване имуногенноста

Много важна характеристика на 2‘ -O- метил модификация е намалената имуногенност в сравнение с PS модификациите, но с по-ниска активност сравнение (Khvorova & Watts, 2017). Модификацията 2‘ – O- метил , увеличава стабилността, но не улеснява клетъчното проникване.

Механизъм на действие

Този тип модификация подобрява механизмите на моделиране на сплайсинга и стерично блокиране. Моделирането на сплайсинга на пре-иРНК е важен процес, чрез който се оказва влияние върху експресията на целивия ген, като се предотвратява създаването на зряла РНК. Друг важен процес е стеричното блокиране. Този механизъм се основава на това, че АСО се свързва с определена последователност в иРНК без да активира ензима РНКаза Н. Тази модификация всъщност възпрепятства достъпа на клетъчни белтъци или комплекси до целевата РНК. Резултат от това са например блокирането на процеса на транслация или ограничаването на стабилизацията на иРНК

Експериментална дейност

За провеждането на експеримента с ACO2 бяха заложени следните етапи:

- Инокулацията на бактериални клетки в ЛБ среда.
- Пробоподготовка за анализ на ACO2 спрямо заложената за деня експериментална програма.
- Провеждане на LacZ анализ.
- Статистическа обработка на данните.

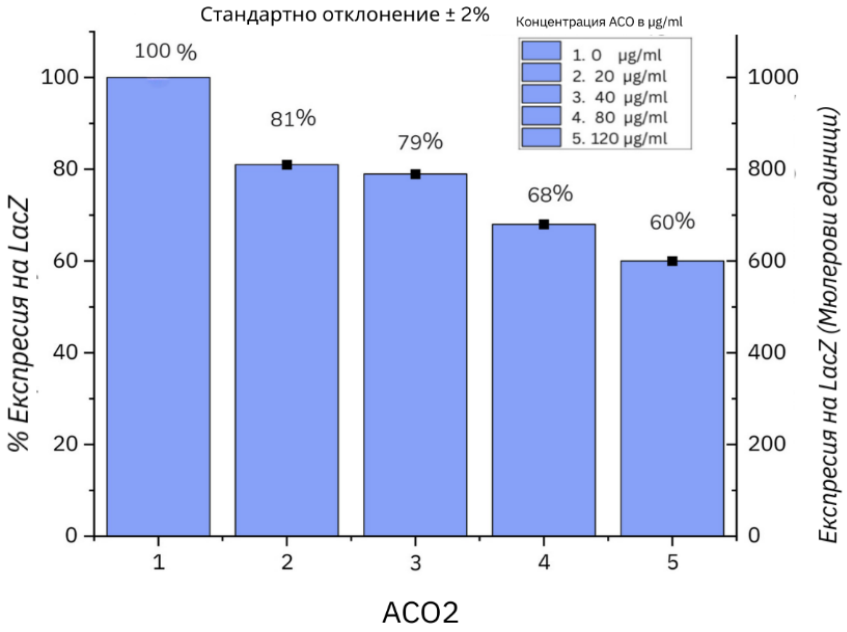
За експеримента бяха подготвени нови буфери спрямо описаните в раздел Материали и Методи протоколи. .

Отчетените резултати констатираха сравнително слаб инхибиращ ефект на ACO2 върху експресията на LacZ гена. При концентрация на ACO2 от 120 µg/ml е достигнат резултат от 60% ескпресия.

Спрямо данните получени от проведения експеримент се наблюдава намаляване на експресията на LacZ гена. С повишаването на концентрацията на ACO2 експресията на LacZ е силно инхибирана както следва:

- Контролна проба (0 µg/ml ACO2) - наблюдава се 100% експресия.
- 20 µg/ml ACO2 – Експресията намалява до 81%.
- 40 µg/ml ACO2 – Експресията намалява до 79%
- 80 µg/ml ACO2 – Експресията спада значително до 68%.
- 120 µg/ml ACO2 - Експресията е силно повлияна и достига ниво от 60% спрямо данните получени при замерването на контролата.

С повишаването на концентрацията на ACO2 в единица обем не се наблюдава значителен инхибиращ ефект върху експресията на LacZ гена (Фигура 16). Измерената активност на бета-галактозидазата в присъствието на ACO в различни концентрации показва дозозависимо потискане. Химически модифицираната форма на ACO2 показва ниска ефективност върху експресията на целевия ген. Получените резултати показват, че модификацията приложена върху ACO2 подобрява общата стабилност на молекулата в клетъчна среда, но ефективността е силно ограничена, което изключва ACO2 като подходящ кандидат за антибактериален агент



Фигура 16. Данни от експеримента с ACO2.

Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO2 (0, 20, 40, 80 и 120 μg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.

5.3.3. ACO3. Немодифициран ACO

При третия тип модификация е запазена първоначалната химическа структура на ACO. За да се повиши ефективното навлизане на ACO в клетката е добавен проникващ пептид, който улеснява трансмембранния транспорт на ACO3. Пептидът е получен е от миши съдов ендотелен белтък - кадерин (Elmquist et al., 2006). Проведени опити относно неговата функционалност и специфика на структурата, показват, че N-крайната хидрофобна част е от решаващо значение за ефективното клетъчно транспортиране (Elmquist et al., 2006). Друг важен аспект при дизайна на ACO е въвеждането на линкер [SS-C6], който позволява специфичното отделяне на активната последователност вътре в клетката. За да повиша структурната гъвкавост и разграничаването на ACO от транспортните домейни, е добавен хидрофобния спейсър [SpC12]. Добавянето му допринася не само за ограничаването на нежеланите взаимодействия между ACO и други молекули, но и стимулира повишаването на афинитета за свързване с целевата иРНК. Чрез тази химична конюгация е проследена ефективността на ACO при отсъствието на химични модификации върху основната му структура.

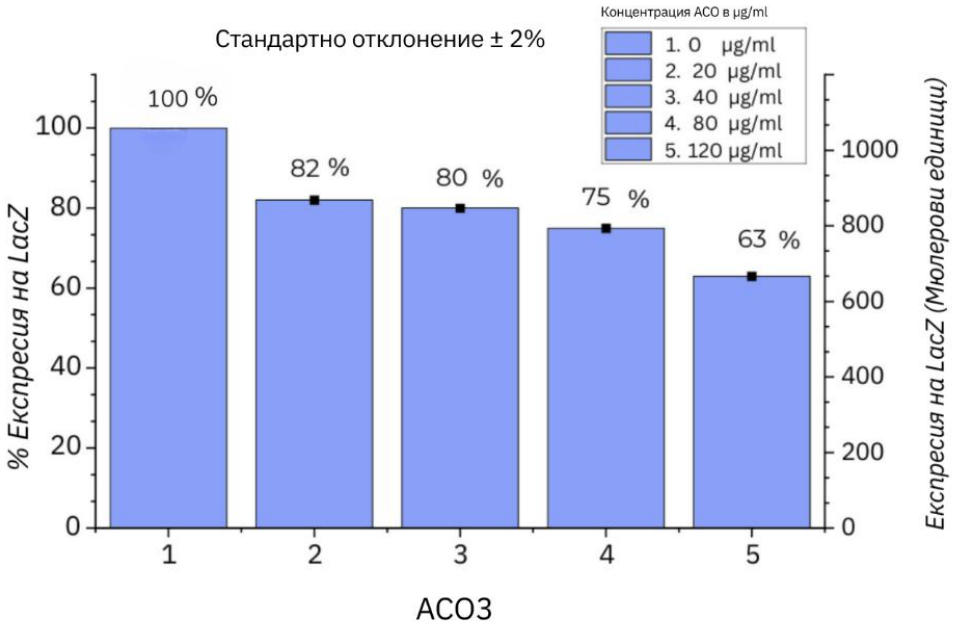
Тук е представена структурата на ACO с въведените допълнителни елементи - [p-VEC][SS-C6][SpC12]AGCACTCTTTTCCTCTCC.

Общата дължина на ACO3: 18 нуклеотида (Виж (фиг.14B).

следва:

6. Контролна проба (0 µg/ml ACO2) - наблюдава се 100% експресия.
7. 20 µg/ml ACO2 – Експресията намалява до 82%.
8. 40 µg/ml ACO2 – Експресията намалява до 80%
9. 80 µg/ml ACO2 – Експресията спада значително до 75%.
10. 120 µg/ml ACO2 - Експресията е силно повлияна и достига ниво от 63% спрямо данните получени при замерването на контролата.

Извършените промени, не доведоха до силно инхибиране на целевия ген (Фигура 17). Това ясно показва, че добавянето на тези химични елементи не повлиява общата стабилност на АСО и ефективното му свързване с целевата РНК. Отчита се дозозависимо потискане, свързано с повишаването на концентрацията на АСО в единица обем. Но и тук, както и при АСО2, отчетените стойности индикират за нисък потенциал за приложение на АСО3 като терапевтично средство.



***Фигура 17. Данни от експеримента с АСО3**.*

Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на АСО3 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици. При наличие на 20 µg/ml АСО3 се наблюдава видимо понижение на генната експресия, достигащо до 82%, спрямо контролната проба. При проба с концентрация на АСО от 40 µg/ml се отчита ефект, достигащ до 80%. С увеличаването на концентрацията на АСО3 до 80 µg/ml, ефектът се засилва и се наблюдава експресия равна на 75%. В пробите с заложен АСО3 от 120 µg/ml се наблюдава максимален ефект, като редукцията е сведена до 63% спрямо контролата. . Данните показват, че липсата на модификаия върху АСО3 не подобрява устойчивостта на молекулата и тя бива разградена от ензими. АСО3

все пак достига до по-добри резултати в сравнение с някои от останалите модификации.

** Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO2 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.*

** Мюлеровите единици са общоприет стандартен метод за количествено определяне на бета галактозидната активност, която се използва като основен индикатор за експресията на LacZ гена.*

5.3.4. ACO4. ACCA мотив

При този тип модификация е добавен ACCA мотив към 3‘ – края на ACO. ACCA мотивите представляват кратки последователности, които могат да бъдат включени в дизайна на терапевтични олигонуклеотиди с цел да се подобри тяхната клетъчна интернализация или устойчивост на разграждане. С това се цели да се подобри хибридизацията на ACO с неговата РНК мишена и да се активира ензима РНКаза Р. Началото на хибридизацията към иРНК често се инициира чрез взаимодействие с ACCA последователността, където се образуват преходни комплекси (Serikov et al., 2011).

ACO4 се състои от следната последователност-[p-VEC][SS-C6][Sp12C]AGCACTCTTTTCCTCTCC**ACCA**. Общата дължина на ACO5: **22 нуклеотида**.

Механизъм на действие

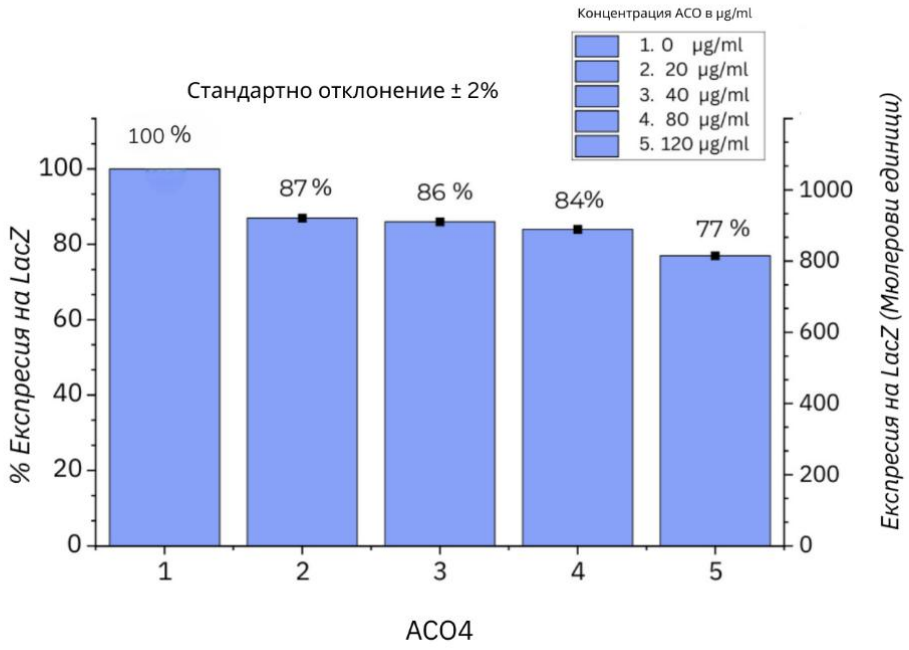
ACO често използват РНКаза Р-медиирана деградация като основен механизъм на действие, като РНКаза Р деградира РНК веригата от ДНК-РНК хибрида. С въвеждането на ACCA мотива се очаква подобряването на хибридизацията, с което се цели да се повиши ефективността на разцепване чрез РНКаза Р.

Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO4 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици. Спрямо данните получени от

проведения експеримент се наблюдава незначителен инхибиращ ефект върху експресията на LacZ гена. Получените резултатите са следните:

11. 20 µg/ml ACO2 – Експресията е 87%.
12. 40 µg/ml ACO2 – Експресията намалява до 86%
13. 80 µg/ml ACO2 – Експресията спада до 84%.
14. 120 µg/ml ACO2 - Експресията достига ниво от 77% спрямо данните получени при замерването на контролата.

При четвъртата по ред модификация (Фигура 18), която е заложена в дизайна на ACO, се наблюдава незначителен инхибиращ ефект върху целевия ген и неговата експресия. Резултатите отчетоха по-ниска ефективност спрямо ACO2 и ACO3, което предполага за слаба хибридизацията между ACO:РНК дуплекса.



Фигура 18. Данни от експеримента с ACO4. *Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO4 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици. При наличие на 20 µg/ml ACO1 се наблщдава видимо понижение на генната експресия, достигащо до 87%, спрямо контролната проба. При проба с концентрация на ACO от 40 µg/ml се отчита ефект, достигащ до 86%. С*

увеличаването на концентрацията на ACO4 до 80 μg/ml, ефектът се засилва и се наблюдава експресия равна на 84%. В пробите с заложен ACO1 от 120 μg/ml се наблюдава максимален ефект, като редукцията е сведена до 77% спрямо контролата. Данните показват, че ACO4 не е успешен кандидат за антибактериален агент, поради показаните ниски нива на инхибиране на LacZ гена.

5.3.5. ACO5. Гаптамер с 2'-O-Methyl модификация

Дизайнът на ACO5 включва следната структура:

- **5' и 3' краища:** общо 9 нуклеотида с 2'-O-methyl (2'-OMe) модификации. **Централна част:** 9 нуклеотида от немодифицирана ДНК, позволяващи активиране на РНКаза Н.
- **Общата дължина на ACO5:** 18 нуклеотида.
- **ACO5 притежава следната структура**: [p-VEC][SS-C6][Sp12C][mA][mG][mC][mA]CTCTTTTCC[mU][mC][mU][mC][mC][Univ]

Гаптамерите са антисенс олигонуклеотиди, които включват основен ДНК сегмент, който е фланкиран от РНК участъци с модифицирани нуклеотиди. (Lim & Yokota, 2020) Концепцията за тях е разработена през 80-те години на миналия век. Гаптамерите са антисенс олигонуклеотиди, чиито състав е съставен от централен сегмент на ДНК, фланкиран от нуклеотиди, най-често върху които са приложени различни по характер хинически модификации. При хибридизацията им със целвата РНК молекула се предивиква деградацията на хибридът ACO:РНК. Както вече беше отбелязано по-рано, гаптамерите са открити за пръв път през 80-те години на 19 век, като за този кратък период от време разработките в областта и тяхното приложеное при разработването на на нови лекарствени форми бележи изключителен ръст. Към този момент се провеждат успешни клинични изпитания за терапевтичните средства базирани на гаптамери.

Механизъм на действие

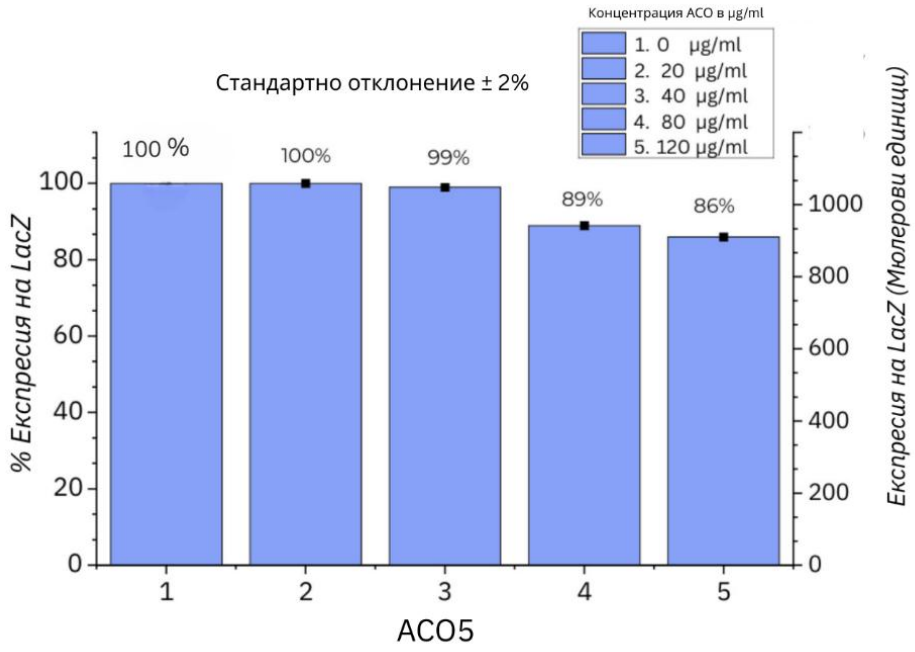
Гамптамерът е проектиран да заглушава генната експресия чрез предизвикване на по-висока РНКаза Н активност. Структурата, комбинираща

ДНК основа с РНК-ови модифицирани краища, увеличава устойчивостта им към различните видове нуклеази, което повишава стабилността при провеждането на *in vivo* експерименти. Много често в практиката се прилагат различни модификации, които не засягат фланкиращите региони. В случая е избрана OMe модификация, която е приложена, за да се повиши стабилността и да намали неспецифичната токсичност. Този тип модификация изключва възможността за нежелани разрези върху краищата на ACO:РНК хибрида.

Резултати

При наличие на 20 µg/ml ACO5 се наблюдава видимо понижение на генната експресия, достигащо до 100%, спрямо контролната проба. При проба с концентрация на ACO от 40 µg/ml се отчита ефект, достигащ до 99%. С увеличаването на концентрацията на ACO5 до 80 µg/ml, ефектът се засилва и се наблюдава експресия равна на 89%. В пробите със заложен ACO5 от 120 µg/ml се наблюдава максимален ефект, като редукцията е сведена до 86% спрямо контролата. Данните показват, че при типът модификация приложена при ACO5, се отчита най-ниския резултат на инхибиране на генната експреся.

*** Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO5 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.



Фигура19. Данни от експеримента с ACO5*. Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO5 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици*

5.3.6 ACO6. Гаптамер с тиоморфолино (TMO) модификация

Тиоморфолино модификацията (TMO) се определя като един от най-иновативните методи за подобряване на алелната селективност и устойчивостта на олигонуклеотидите към нуклеазна деградация, като отново е приложена модификацията върху фланкиращите региони на ACO. Специфична особеност при тиомофолино модификации е, че се прилага структурна промяна на рибозата, при която кислородният атом в позиция 4‘ се заменя със сяра, при което се образува тиоморфолинов пръстен. Важна специфика е, че TMO модификациите позволяват многократна хибридизация, наречена още мулти-цикличност.

Дизайнът на ACO6 включва следната структура:

- **5’ и 3’ краища**: общо **9 нуклеотида** с тиоморфолино (TMO) модификация
- **Централна част**: 9 **нуклеотида** от **немодифицирана ДНК**, позволяващи активиране на RNase H.
  Общата дължина на ACO5: **18 нуклеотида** (14E)
- **След приложената модификация ACO6 има следната структура**: [p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-A][TMO-G][TMO-C][TMO-A]CTCTTTTCC[TMO-T][TMO-C][TMO-T][TMO-C][TMO-C][Univ]

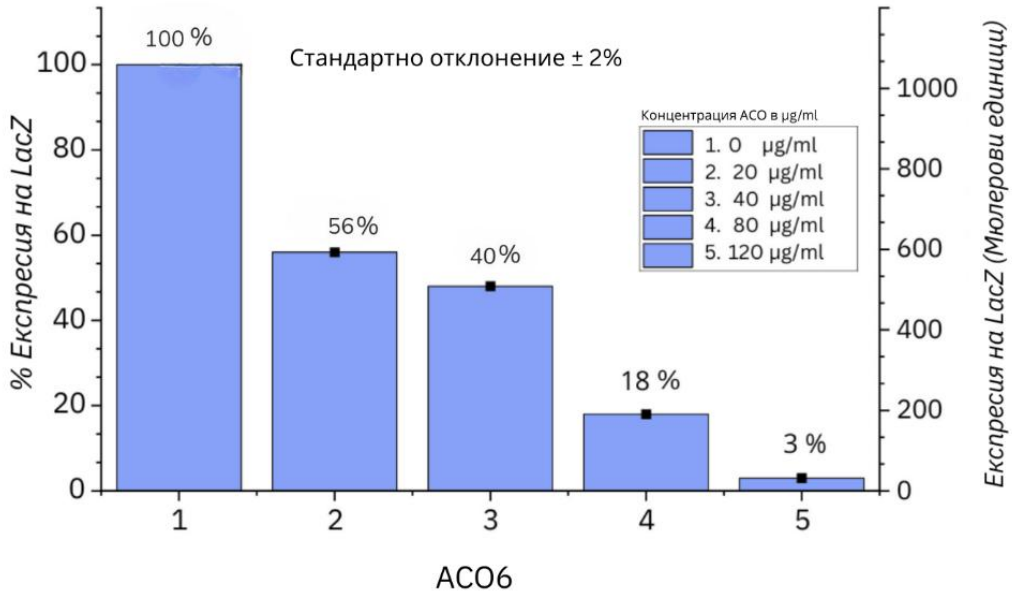
Механизъм на действие

TMO-модифицираните гаптамери показват подобрена ефективност при откриването на целеви специфични РНК молекули, което се определя от тяхната висока алелна специфичност. Модификацията на рибозата осигурява стабилизацията на олигонуклеотидите, като едновременно с това увеличава термодинамичната стабилност на хибридите с целевата РНК. Когато TMO гаптамерите са свързани с целевата РНК, те задействат РНКаза Н, което води до разпадане на РНК целта и заглушаване на генната експресия. Доставянето в клетките протича чрез използване на пептидни носители, които улесняват трансмембранния транспорт на олигонуклеотидите. Експериментите показват, че TMO гаптамерите имат увеличена стабилност и ефективност в сравнение с конвенционалните олигонуклеотиди, поради намалената нуклеолитидна деградация, подобреното задържане в клетката и удълженото действие в клетката.

След провеждане на експерименталната дейност, е установено, че при наличие на 20 µg/ml ACO6 се наблюдава видимо понижение на генната експресия, достигащо до 56%, спрямо контролната проба. При проба с концентрация на ACO от 40 µg/ml се отчита ефект, достигащ до 40%. С увеличаването на концентрацията на ACO до 80 µg/ml, ефектът се засилва и се наблюдава експресия равна на 18%. В пробите с заложен ACO6 от 120 µg/ml се наблюдава максимален ефект, като редукцията е сведена до 3% спрямо

контролата. Данните показват, че ACO1 е успешен кандидат за антибактериален агент, поради показаните високи нива на инхибиране върху LacZ гена.

От получените до сега резултати, при ACO6 отчитаме най-ниската измерена активност на бета галактозидазата в присъствието на ACO. Чрез



прилагането на този тип модификация е постигнато почти цялостно инхибиране на LacZ гена, което показва потенциала на ACO6 като терапевтично средство при лечение на бактериални инфекции (Фигура 19).

Фигура 19. Данни от експеримента с ACO6. *Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO6 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.*

5.3.7. Вид модификация ACO7 LNA

Последният вид модификация, която е заложен в дизайна на АСО и тестван в лабораторни условия е от типа заключени нуклеинови киселини (LNA). Заключените нуклеинови киселини (LNA) са ДНК/РНК последователности с метиленова група между 2′-O и 4′-C, която „заключва“ рибозния пръстен (Shen, 2019). Това дава силно предимство за повишането на афинитета на АСО към свързване с РНК и стабилността на олигонуклеотида, като по този начин повишава терапевтичната и диагностичната му употреба. Също така чрез този метод на модификация се повишава термична стабилност (Tm) на образувания хибрид (ScienceDirect Topics).

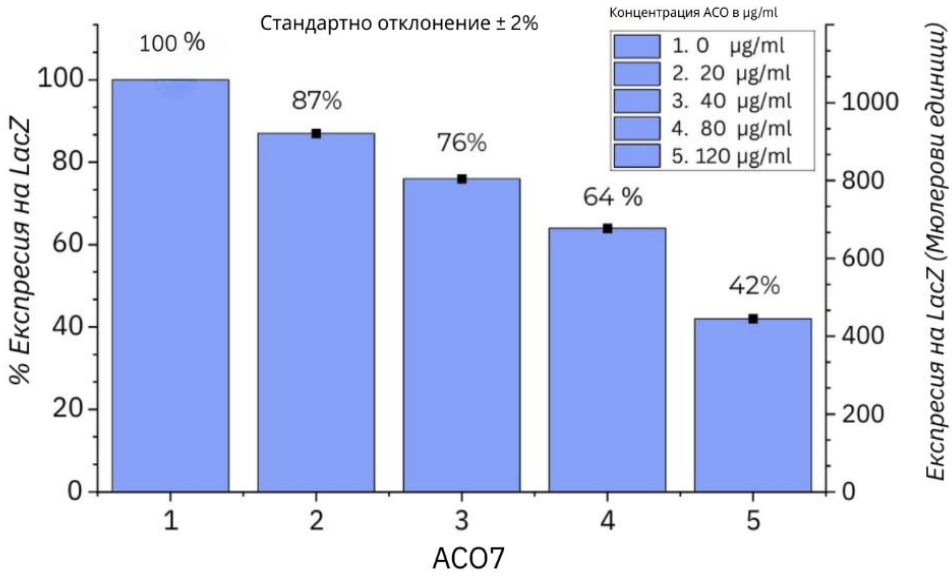
Върху цялата секвенция на ACO7 е приложена модификация, като олигонуклеотидът придоби следната структура - [p-VEC][SS-C6][Sp12C][+A][+G][+mC][+A][+mC][+T][+mC][+T][+T][+T][+T][+mC][+mC][+T][+mC][+T][+mC][+mC][Univ]. Напълно модифицираният с LNA ACO7 не активира действието на РНКаза Н, а вместо това действа чрез стерично блокиране, като ограничава достъпа на сплайсозомния механизъм, рибозомите или микроРНК (Zhu et al., 2022).

Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO2 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.

1. 0 µg/ml ACO7 – Експресията намалява до 100%.
2. 20 µg/ml ACO7 – Експресията намалява до 87%.
3. 40 µg/ml ACO7 – Експресията намалява до 76%
4. 80 µg/ml ACO7 – Експресията спада значително до 64%.
5. 120 µg/ml ACO7 - Експресията е силно повлияна и достига ниво от 42% спрямо данните получени при замерването на контролата.

При наличие на 20 µg/ml ACO7 се наблюдава видимо понижение на генната експресия, достигащо до 87%, спрямо контролната проба. При проба с концентрация на АСО от 40 µg/ml се отчита ефект, достигащ до 76%. С увеличаването на концентрацията на ACO1 до 80 µg/ml, ефектът се засилва и се наблюдава експресия равна на 64%. В пробите с заложен ACO1 от 120 µg/ml се наблюдава максимален ефект, като редукцията е сведена до 42% спрямо контролата.

Въз основа на данните от проведения експеримент се наблюдава значително инхибиращо повлияване върху експресията на LacZ гена, което при концентрация от 120 μg/ml ACO7, достигна 58%. Това, което може да отбележим от получените резултати е, че при повишаването на концентрацията на ACO в единица обем се наблюдава инхибиращ ефект спрямо експресията



на LacZ гена (Фигура 21). Данните показват, че ACO7 е успешен кандидат за антибактериален агент, поради показаните високи нива на инхибиране върху LacZ гена.

Измерената активност на бета галактозидазата в присъствието на ACO в различни концентрации показва дозозависимо потискане.

Фигура 21. ***Данни от експеримента с ACO7.*** Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO7 (0, 20, 40, 80 и 120 μg/ml). Получените стойности са изобразени в процентни стойности и в Мюлерови единици.

Сравнителен анализ на степента на инхибиране в изследваните проби

В резултат на проведените експериментални дейности е извършен сравнителен анализ на ефективността на седем различни типа химични модификации, приложени към антисенс олигонуклеотидна секвенция, с цел оценка на техния инхибиторен потенциал. С анализа на данните са определени типовете модификации с най-голям инхибиращ ефект върху експресията на LacZ гена, както и тези, при които отчетените резултати са с минимален ефект върху експресията му. Всички резултати показват дозозависимо потискане.

Резултатите от експериментите проведени с ACO-1, показват, че той успешно инхибира експресията на целевия ген. Стойноста на инхибиране, установена чрез анализ, отчитащ подтискане на генната експресия с 92% при концентрация на ACO1 от 120 µl/Ml. Фосфоротиотно модифицирания ACO1 е проектиран да въздейства чрез подтискане на генната експресия чрез ензимно разцепване от РНКаза Н1. Въведена е и структурна модификация, която отговаря на делецията на един аденин от ACO. С тази стратегия се цели да ограничa нежалните свързвания с нетаргетни молекули и да се подобри терапевтичният индекс на разработения антибактериален ген.

За разлика от ACO1, антибактериланите агенти обозначени като ACO2, ACO3, ACO4 О ACO5 показват сравнително нисък индекс на инхибиране на експресията на LacZ гена. Тук се наблюдават различни механизми на интеракция между хибрида ACO:РНК, които се базират на характеристиките на модификационната стратегия.

При ACO2 е извършена 2‘ – О- метил модификация, която включва метилиране на всички рибонуклеозиди. Тази стратегия предвижда придобиването на много висока устойчивост на ACO2 към нуклеази, но само по себе си не води до деградацията на иРНК. Тук се наблюдава механизмът на действие, който включва стерично блокиране. Резултатите отчитащи стойност при инхибирането на таргетния ген сочат едва 40% инхибиране, което определя този тип антибактериален агент, като подходящ в случаите, в който следва да ограничим растежа на даден патоген в определени стойности.

При ACO3 не са въведени модификации по дължината на основната секвениция. Добавени са сегменти, с които се цели да се подобри клетъчното навлизне на проектирания агент – pVEC; дисулфидна връзка с 6-въглероден линкер, служеща за освобождаването на ACO вътре в клетката и Sp12C. След извършен анализ, ние установихме, че при ACO3, експресията на LacZ гена достига нива от 63%, което показва, че е налице инхибиращ ефект, но поради липсата на модифицирани елементи, ACO3 е бил подложен под нуклеазна активност.

Третираните и инкубирани с ACO4 бактериални клетки достигат нива на експресия на LacZ гена от 77%. Това е един от най-незадоволителните резултати, който предполага ниски нива на взаимодействие между ACO и иРНК. При проектирането на този агент, ние запазихме основната последователност не - модифицирана, като беше добавен сегмент състоящ се от четири нуклеотидни бази – ACCA към 3‘ края. С това имахме за цел да активираме РНКаза Р.

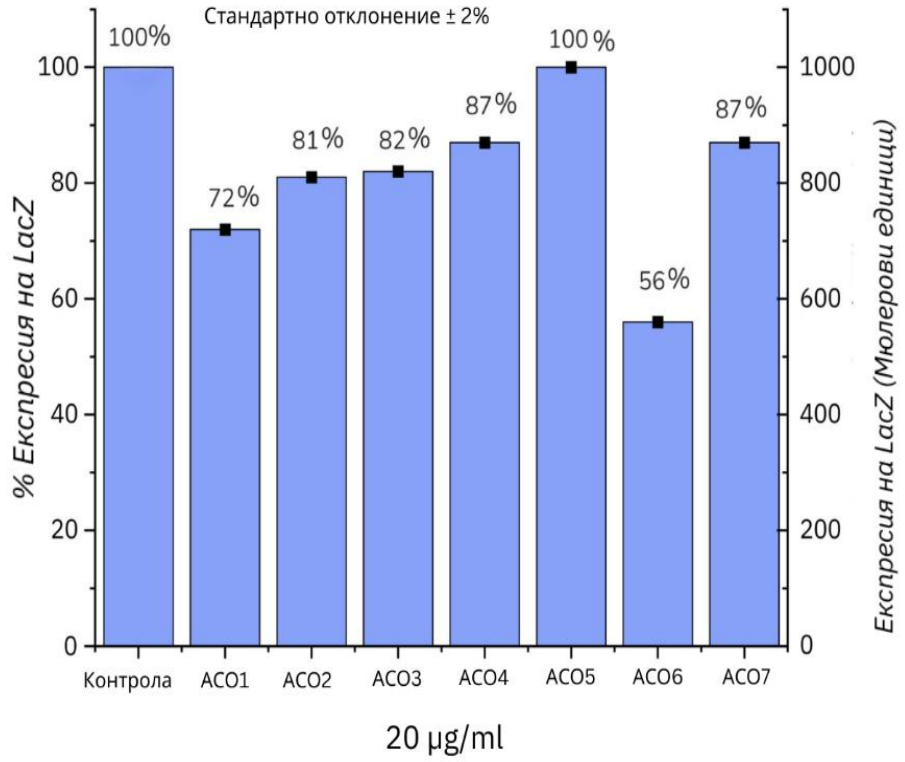
С най-нисък терапевтичен потенциал е ACO5, чиято структура е гаптамер, включващ централен немодифициран ДНК-ов сегмент и фланкиращи краища, състоящи се от О- метил модифицирани рибонуклеотиди. Тук резултатите показват наличие на 86% експресия на LacZ при концентрация на ACO от от 120 µl/mL. Това е ясно показва, че този тип модификация не е ефективна и има нужда от подобрения свързани с нейната структура. Вероятните причини за слабия резултат са свързани с ограничен достъп до мишената, поради образуването на вторични или третични структури.

ACO6 е гаптамер. Спрямо структурата си, той включва централна част, състояща се от немодифицирани дезоксирибонуклеотиди и модификации при фланкиращите краища. Тук е приложена ТМО модификация, като рибозата бе заменена с тиоморфолинов пръстен. Този тип модификация се отличи с най-силен ихибиращ ефект, като експресията на LacZ достигна едва 3%. ТМО модификациите са сравнително ново решение за подобряването на антисенс технологията, поради две основни причини – подобряване на устойчивостта/биостабилността и намаляване на токсичноста.

Освен това, приложената модификация, която включва намеса само в крайните нуклеотиди води до структурна промени, които ограничават нуклеазите да

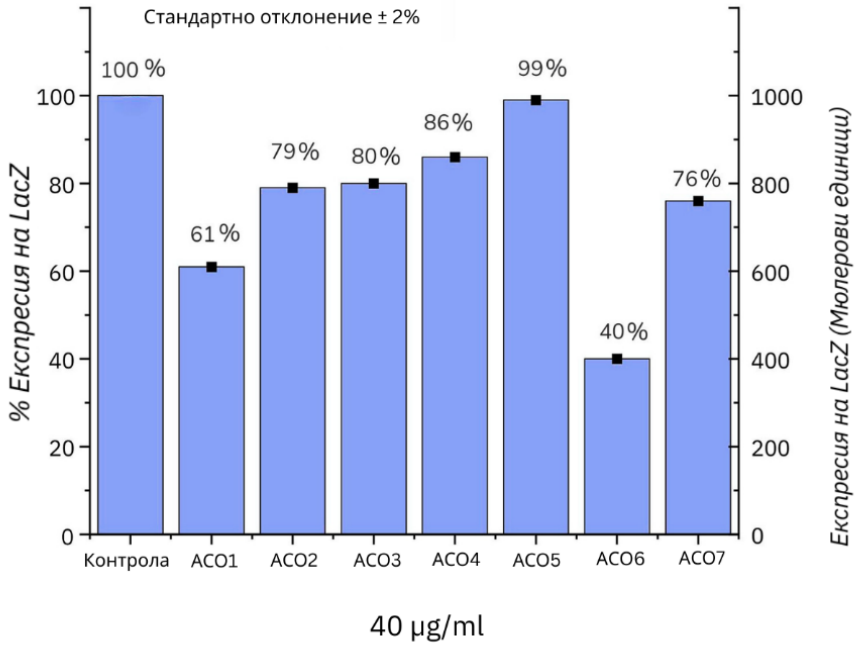
взаимодействат с ACO6. Тук също така се наблюдава multi-turnover ефект, който действа чрез РНКаза Н1-медиирана деградация. Този ефект се отнася до това, че една ACO молекула може да участва в няколко поредни цикли на хибридизация с таргетната РНК.

Последният от ACO, обозначен като ACO7, включва модификация върху цялата секвенция от типа LNA. Тук са отчетени резултати при експресията на LacZ от 42%. Това е резултатът, който има задоволителен характер. Постига се

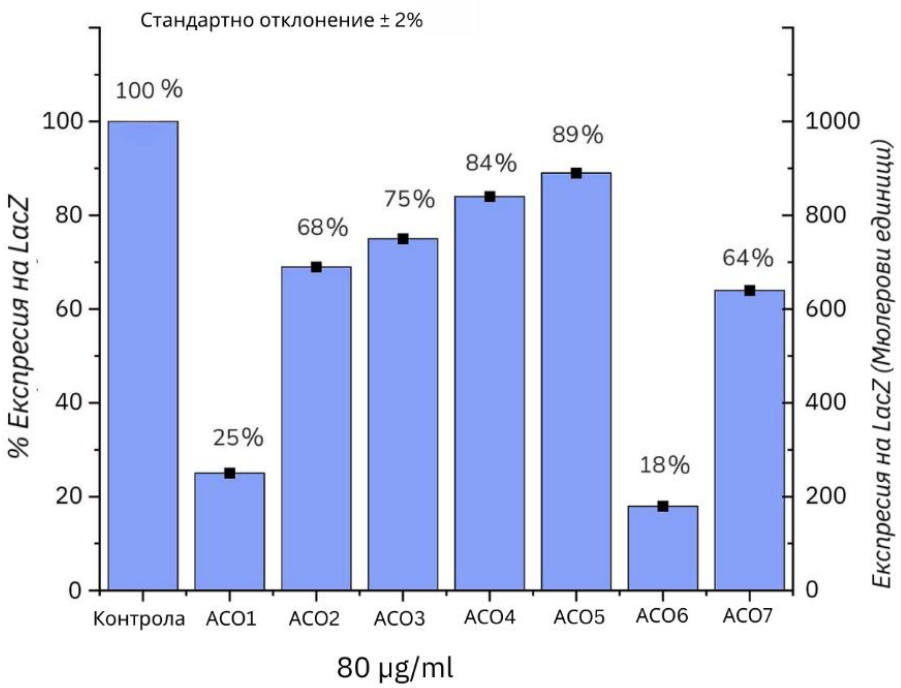


благодарение на „заключването“ на пентозния пръстен чрез химична връзка между 2‘-O и 4‘-C, което стабилизира захарната конформация. Наблюдава се повишена способност за хибридизация и висока нуклеазна устойчивост.

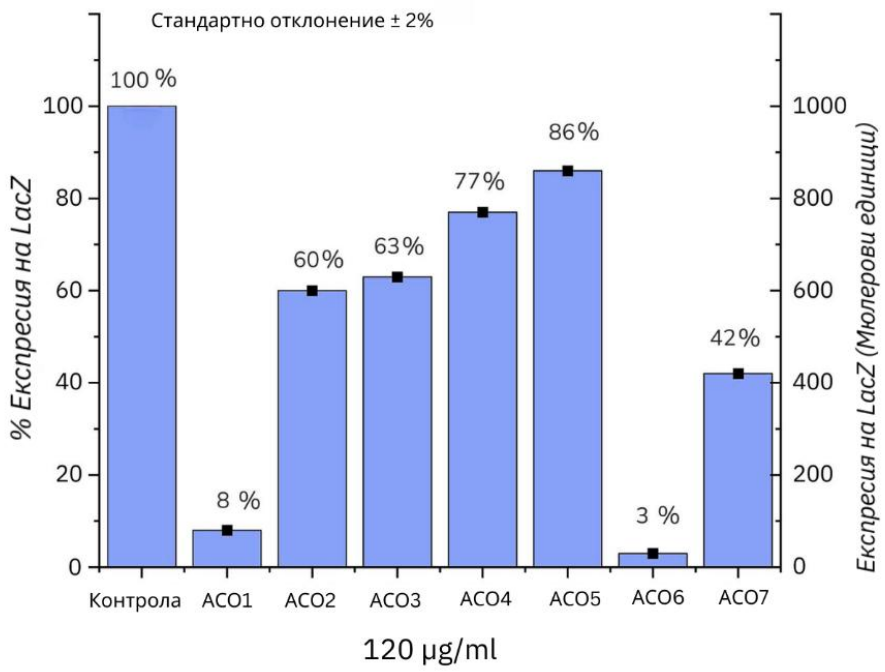
Фигура 22. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните ACO с концентрация от 20 микролитра/милилитър при инхибирането на LacZ гена. *Получените данни дават ясна оценка за ефективността на всеки един модифицираните ACO и нагледно позволяват да се определи дизайнът показващ най-висока инхибираща способност. Сравнителният анализ между седемте ACO (ACO1-ACO7) при концентрация от 20 µg/ml отчита следните резултати: ACO1 показва значителен инхибиращ ефект, равняващ се на 71%, което го определя като един от най-ефектвните антибактериални агенти. Постигнатият резултат показва, че при ACO1 се наблюдават стабилни молекулни механизми на взаимодействие между ACO1:РНК хибрида. ACO2 проявява слаб ефект с максимални нива на потискане на генната експреси с 81%. ACO3 демонстрира слабо изразен ефект близък до резултата отчетен при ACO2. Експресията на LacZ гена е 82%. ACO4 не показва значителен ефект върху потискането на генната експресия. При него резултатът е 87%. ACO5 отбелязва най-нисък ефект, като резултатът показва, че този тип модификация не променя нивата на експресия на репортерния ген. ACO6 показа най-силен ефект. Резултатът при наличието на ACO6 в пробите отчита 56% ефективност върху потискането на експресията. ACO7 проявява слаб ефект – 87%.*



Фигура 23. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните АСО с концентрация от 40 микролитра/милилитър при инхибирането на LacZ гена. *Получените данни дават ясна оценка за ефективността на всеки един модифицираните АСО и нагледно позволява да се проследи дизайнът показващ най-висока инхибираща способност. Сравнителният анализ между седемте АСО(АСО1-АСО7) при концентрация от 40 μg/ml отчита следните резултати: АСО1 показва значителен инхибиращ ефект, равняващ се на 61%, което го определя като един от най-ефективните агенти. Постигнатият резултат показва, че при АСО1 се наблюдават стабилни молекулни механизми на взаимодействие между АСО1:РНК хибрида. АСО2 проявява слаб ефект с максимални нива на потискане на генната експреси с 79%. АСО3 демонстрира слабо изразен ефект близък до резултата отчетен при АСО2. Експресията на LacZ гена е 80%. АСО4 не проявява значителен ефект върху потискането на генната експресия. Тук резултатът е 86%. АСО5 отбелязва най-нисък ефект, като резултатът показва, че този тип модификация не променя нивата на експресия на репортерния ген. Резултатът е 99%. АСО6 показа най-силен ефект. Резултатът при наличието на АСО6 в пробите отчита 40% ефективност върху потискането на експресията. АСО7 проявява слаб ефект – 64%.*



Фигура 24. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните ACO при инхибирането на LacZ гена. *Получените данни дават ясна оценка за ефективността на всеки един модифицираните ACO и нагледно позволява да се проследи дизайнът показващ най-висока инхибираща способност. Сравнителният анализ между седемте* ACO*(ACO1-ACO7) при концентрация от 20 µg/ml отчита следните резултати: ACO1 показва значителен инхибиращ ефект, равняващ се на 25%, което го определя като един от най- ефектвните агенти. Постигнатият резултат показва, че при ACO1 се наблюдават стабилни молекулни механизми на взаимодействие между ACO1:РНК хибрида. ACO2 проявява слаб ефект с максимални нива на потискане на генната експреси с 68%. ACO3 демонстрира слабо изразен ефект близък до резултата отчетен при ACO2. Експресията на LacZ гена е 75%. ACO4 не проявява значителен ефект върху потискането на генната експресия. Тук резултатът е 84%. ACO5 отбелязва най-нисък ефект, като резултатът показва, че този тип модификация не променя нивата на експресия на репортерния ген. Тук резултата достига до 89%. ACO6 показа най-силен ефект. Резултатът при наличието на ACO6 в пробите отчита 18% ефективност върху потискането на експресията. ACO7 проявява слаб ефект – 64%.*



Фигура 25. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните ACO при инхибирането на LacZ гена. *Получените данни дават ясна оценка за ефективността на всеки един модифицираните ACO и нагледно позволява да се проследи дизайнът показващ най-висока инхибираща способност. Сравнителният анализ между седемте* ACO*(ACO1-ACO7) при концентрация от 120 µg/ml отчита следните резултати: ACO1 показва значителен инхибиращ ефект, равняващ се на 8%, което го определя като един от най- ефективните агенти. Постигнатият резултат показва, че при ACO1 се наблюдават стабилни молекулни механизми на взаимодействие между ACO1:РНК хибрида. ACO2 проявява слаб ефект с максимални нива на потискане на генната експреси с 60%. ACO3 демонстрира слабо изразен ефект близък до резултата отчетен при ACO2. Експресията на LacZ гена е 63%. ACO4 показва на значителен ефект върху потискането на генната експресия. Тук резултатът е 77%. ACO5 отбелязва най-нисък ефект, като резултатът показва, че този тип модификация не променя нивата на експресия на репортерния ген. Резултатът е 86%. ACO6 показа най-силен ефект. Резултатът при наличието на ACO6 в пробите отчита 3% ефективност върху потискането на експресията. ACO7 проявява слаб ефект – 42%.*

След анализ на получените резултати от експерименталната част, изследваща молекулните механизми на действие на различните поколения антисенс олигонуклеотиди (АСО), използвани в рамките на настоящия дисертационен труд, категорично е установена високата ефективност на АСО6, която води до почти пълна инхибиция на експресията на гена LacZ.

Този резултат постави началото на последващото изследване, с което се цели да се приложи най-ефективната модификация върху АСО8, която да инхибира растежа на бактерията *S. aureus*.

Следвайки описаните в разделите Материали и Методи, както и Резултати, научни методики, беше създаден АСО, който хибридизира със строго консервативна последователност от аптамерния домейн на ФМН рибопревключвателя. Като последващо действие е приложена ТМО модификация, която включва немодифициран централен ДНК сегмент и модификация върху фланкиращите рибонуклеотиди. Към АСО, чрез ковалентни връзки беше добавен и pVEC КПП, за да бъде подобрено клетъчното му проникване проникваемост.

Общата структура на проектираният АСО8 е [p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-T][TMO-T][TMO-C][TMO-T]CCCATCC[TMO-A][TMO-G][TMO-A][TMO-][TMO-T][Univ].

Проведения експеримент с него отчете високи нива на инхибиране на бактериалния растеж, което потвърди резултатите получени от предходния експеримент.

При концентрация на АСО8 от 120 µg/ml, е постигнат инхибиращ ефект върху бактериалния растеж изразяващ се в 0,2 оптични единици. Като при отчетените резутати от контролните пробите (0 µg/ml АСО8), които са заложени при същите условия, бактериалният растеж бе достигнал 1,4 оптични единици. Този резултат доказва високата ефективност на ТМО модификациите и терапевтичният потенциал на създадения от мен антибактериален агент.

Този тип модификация показва високи нива ефективност, като същевременно разходите нужни за синтеза й бяха сравнително съкратени. Съществуват проучвания, които доказват ефективността на ТМО модификациите, особено

при съчетанието й с PS модифицирани нуклеотиди. Ефективността й е по-висока, но разходите за синтеза й също. АСОи с гампер с тиоморфолино (ТМО) модификация е златната среда, която предлага висока ефективност и приемливи разходи, свързани със синтеза на олигонуклеотида. Създаденият олигонуклеотид е добър кандидат за терапевтично средство.

5.3. Дизайн на АСО за инхибиране на бактериален растеж хибридизиращ с FMN рибопревключвател

За целите на дисертационни труд е проектиран нов АСО, върху който е приложена тиоморфолино (ТМО) модификация. Тест микроорганизъм е щам на патогенната бактерия *S. aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC 25923).

Този бактериален щам притежава уникална целева зона, чрез което минимализираме възможността от нежелани последици. АСО8 е проектиран да хибридизира с аптамерната последователност на ФМН рибопревключвателя на *S. aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC 25923), която съдържа следната последователност:

3'- AAGAGGGUAGGUCUGA - 5'

ФМН рибопревключвателят представлява рибонуклеинова киселина, която притежава регулаторна функция и има контрол върху експресията на гени, които са част от биохимичния път на флавин мононуклеотид. Позиционирана при 5'-нетранслираната област (5'-UTR) на иРНК,

В случаите, при които се наблюдава високи вътреклетъчни концентрации на ФМН, молекулата се свързва с аптамерния домеин на рибопревключвателя и предизвиква структурни промени в РНК, които възпрепятстват синтеза на гени, отговарящи за този биохимичен път. Възпрепятстването се основава на няколко основни механизма.

- Терминация на транскрипцията

Образува се стем-луп (stem-loop) терминаторн в 5′-UTR на полицистронната иРНК, кодираща ензими от оперона *ribD* (включително *ribD*, *ribE*, *ribA*, *ribH* и др.), който води до преждевременното прекратяване на транскрипцията.

- Инхибиране на транслацията

Тук се осъществява контрол върху достъпа до рибозом-свързващия сайт (RBS), при което се формира структура, която покрива региона.

Избран е ФМН рибопревключвателя за мишена на проектирания от мен АСО8. Чрез въвеждането на химична модификация ТМО, се цели да се подобрят фармакокинетичните свойства на антибактериалния агент, като паралелно с това да се намали цената на крайния продукт. АСО ще се свърже комплементарно с целевата РНК, като по този начин ще се образува двуверижен хибрид, който ще активира РНКаза Н с последваща деградация на иРНК. Липсата на ФМН в клетката нарушава множество процеси, които рефлектират върху метаболизма и се нарушава клетъчното делене.

Чрез биоинформатични анализи е установено, че избраната мишена е специфична само за конкретния щам и не съществува възможност за хибридизация с нецелеви бактерии при прилагането на технологията при лечение върху човешки организъм.

Както бе дискутирано в литературния обзор, АСО се разделят на три основни поколения в зависимост от използваните химични модификации. След проведените анализи относно структурни закономерности и хибридизацията по правилото Уотсън и Крик, е създадена последователност, която хибридизира с избраната мишена. Върху структурата от аптамера на ФМН е приложена интегрираща модификация, характерна за трето поколение АСО – тиоморфолино модификация (ТМО).

ТМО модификацията включва промяна на структурата, изразяваща се в замяната на кислородните атоми на фосфатните (P-O) групи със сяра (P-S). Тази модификация прави молекулата по-устойчива на ензимна деградация, като позволява и многократната хибридицазия между АСО с целевата РНК молекула. В предишните експерименти доказахме ефективността на този тип

модификации, като най-ефективни и приложихме технологията върху създаването на терапевтично средство целящо инхибирането на LacZ експресията при синтетично конструиран ген. Този тип модификация се отличи с най-силно инхибиращ ефект, което е и причината да продължим експеримента върху целева патогенна бактерия с цел инхибирането на важен за преживяемостта и метаболитен път. Структурата на създадения ACO представлява гампер с химични модификации върху фланкиращите участъци, с което целим да активираме РНказа Н-медиираната хидролиза на целевата иРНК, както да запзим ACO функционално непокътнат, за да може многократно да участва в нови цикли при иРНК инактивацията. За да подобрим транспортирането на ACO8 през клетъчните мембрани, прикрепихме към 5‘-краят му pVEC пептид с аминокиселинна последователност LLIILRRRIRKQAHAHSK (OH). Благодарение на специфичните си свойства този пептид подпомага навлизането на ACO8 в клетките, което играе важна роля върху ефективността на инхибирането в организма

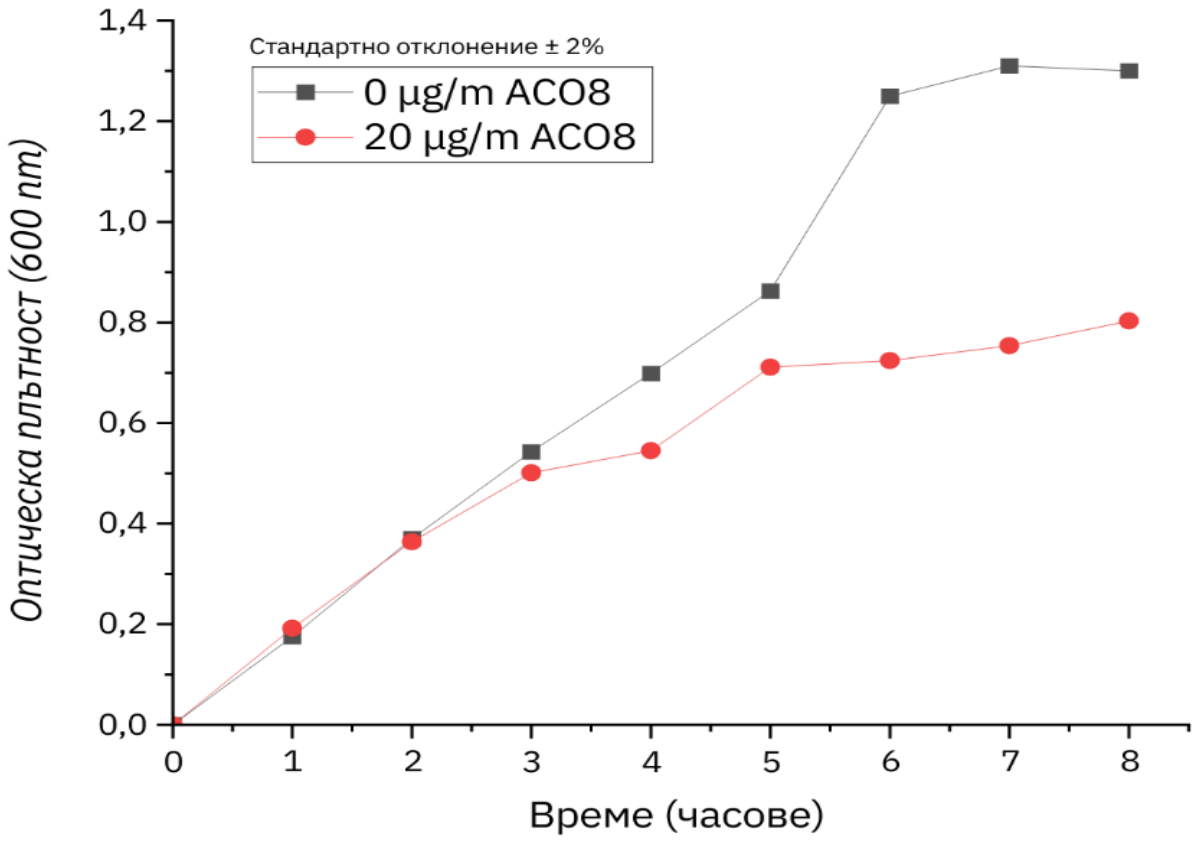
[p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-C][TMO-T][TMO-T][TMO-T]AACTGTA[TMO-C][TMO-T][TMO-G][TMO-C][TMO-C][Univ]

Експериментално тестване на инхибиращото действие на ACO8 върху бактериалния растеж и развитие на *S. aureus*

Проектираният от нас ACO8, съдържащ TMO модификация, показа високи инхибиращи свойства върху бактериалния растеж при *S. aureus*. Чрез резултата може да заключим, че се е осъществила стабилна хибридизация между ACO8 и консервативната последователност от аптамерния домейн на ФМН рибопревключвателя. Бактериалният растеж е инхибиран до стойност при концентрация от 120 микрограма/милилитър от 88%. Резултатите от всяка една концентрация на ACO са показание във фигури - 23, 24, 25, 26.

Резултатите са представени като диаграма обединяваща концентрации на ACO8 (0, 20, 40, 80 и 120 µg/ml).

Резултатът от инхибирането е определен чрез измерване на оптичната плътност на бактериалната култура след инкубационен период от 8 часа. Отчетените данни сочат, че при ACO8 пробата се наблюдава значителен инхибиращ ефект върху бактериалния растеж, достигащ до 0,8 оптични единици, докато резултатът при пробата без ACO8, са отчетени 1,4 оптични единици (Фигура 8). .ACO8 в концентрация от 20 µg/ml се свързва с аптамерния домейн на ФМН рибопревключвателя и инхибира бактериалния



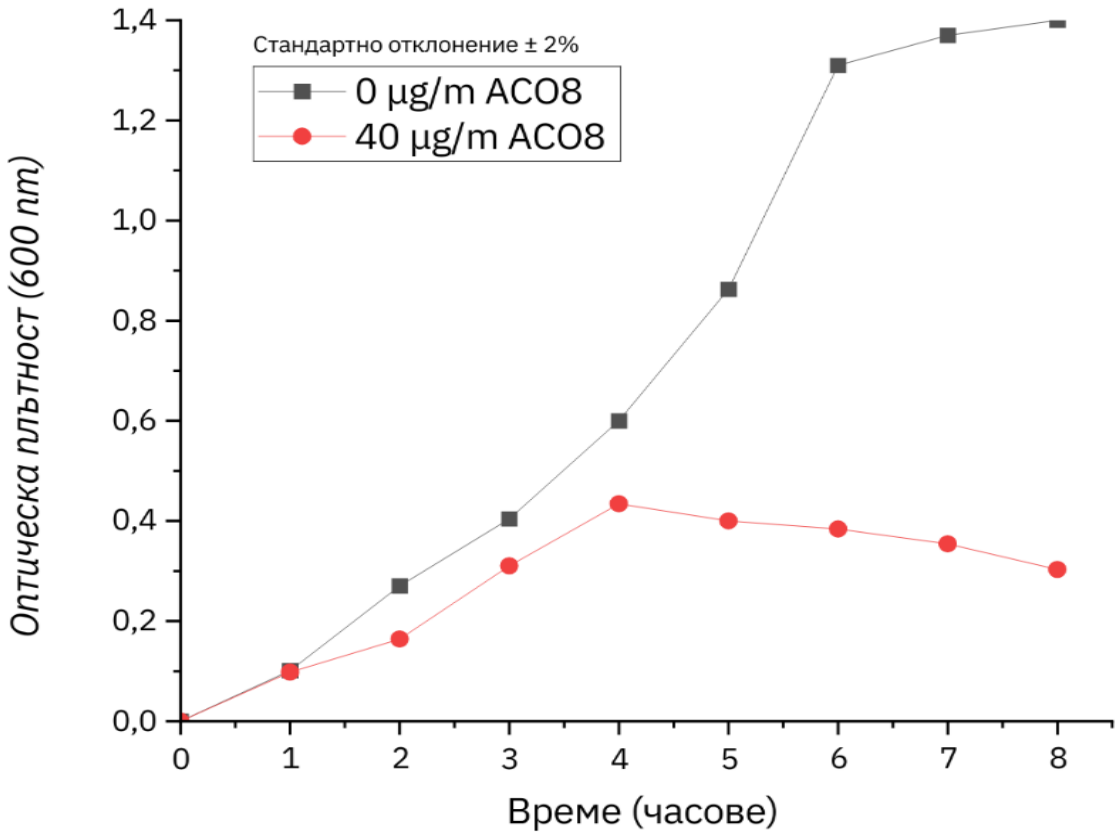
растеж на *S. aureus*.

Фигура 26. Инхибиране на бактерислния растеж на *S. aureus* при концентрация на ACO8 от 20 µg/ml. *Показан ебактериалният растеж на S. aureus, анализиран в две парелени проби както следва:*

----- 0 µg/m ACO8

----- 20 µg/m ACO8

При проведения опит с 40 µg/ml ACO8 бяха отчетените резултати, които



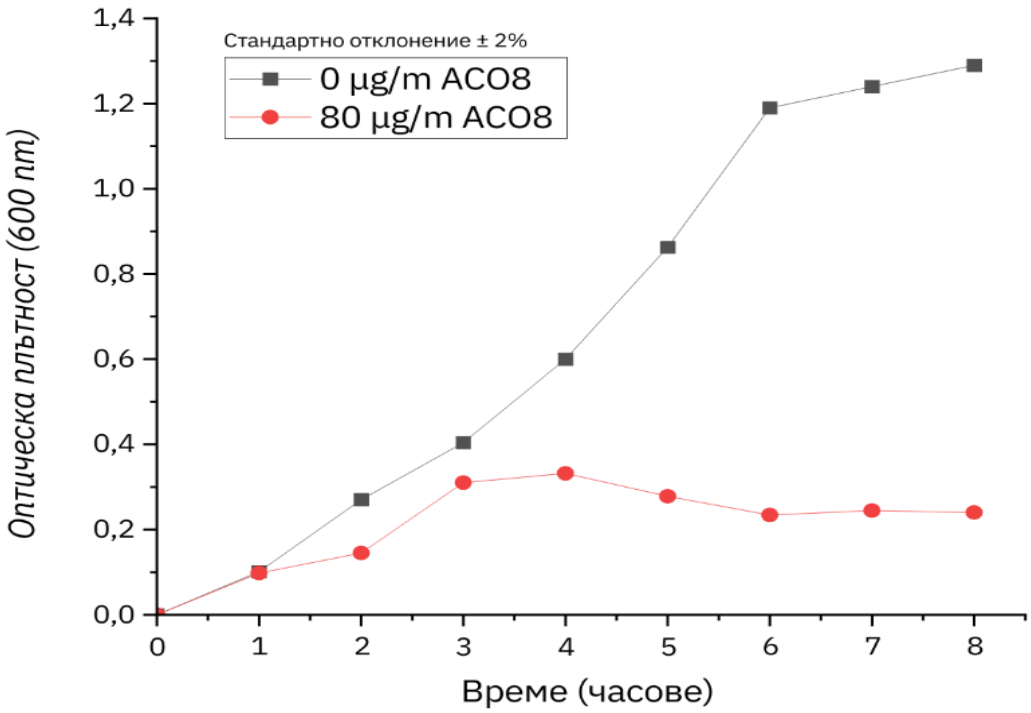
показага значителен инхибиращ ефект върху бактериалния растеж, достигащ до 0,3 оптични единици, докато резултатът при пробата без ACO8, са отчетени 1,4 оптични единици.

Фигура 27. **Инхибиране на бактерислния растеж на** S. aureus **при концентрация на ACO8 от 20 µg/ml.** *На графиката е изобразен бактериалния растеж на S. aureus, анализиран в две парелени проби както следва:*

----- *0 µg/m ACO8*

----- *40 µg/m ACO8*

Проведен е анализ при концентрация от 80 µg/ml. Отчетените данни показват, че при пробата с ACO8 се наблюдава значителен инхибиращ ефект върху бактериалния растеж, като оптичната плътност достига стойност от 0,25, в сравнение с контролната проба без ACO8, при която се отчита 1,4 оптични единици. Резултатът от инхибирането е определен чрез измерване на оптичната плътност на бактериалната култура след инкубационен период от 8 часа.



ACO8 в концентрация от 80 µg/ml се свързва с аптамерния домейн а ФМН рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на ***S. aureus*** (червената линия).

Фигура 28. ***Инхибиране на бактериалния растеж на S. aureus*** **при концентрация на ACO8 от 80 µg/ml.** *На графиката е изобразен*

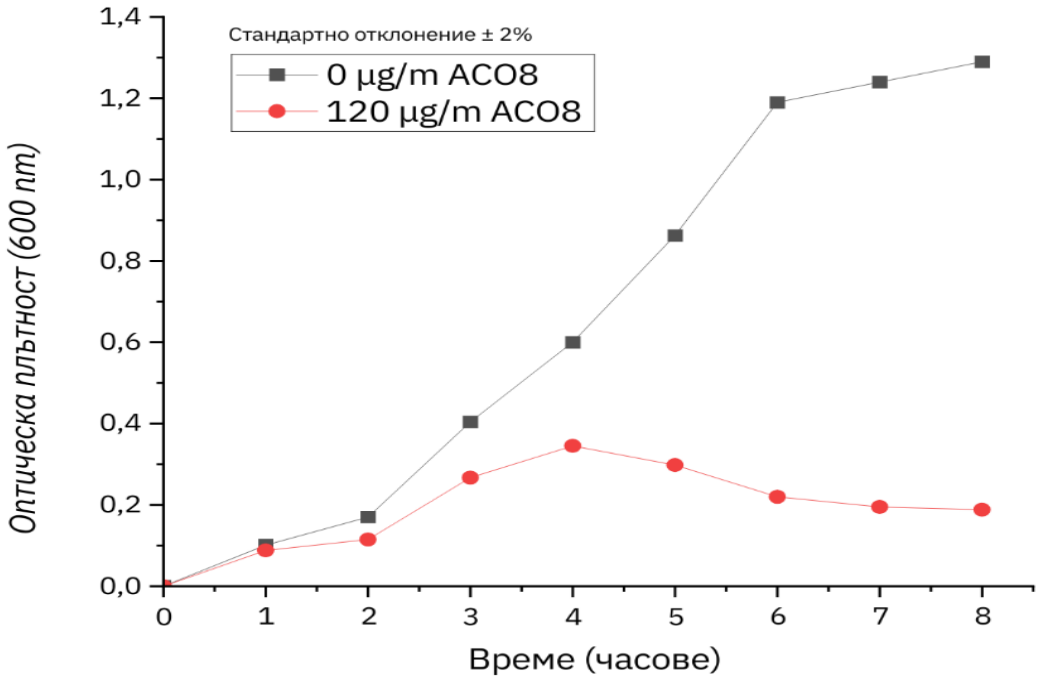
бактериалниятрастеж на S. aureus, анализиран в две парелени проби както следва:

----- *0 µg/m ACO8*

----- *80 µg/m ACO8*

Анализът е извършен и при концентрация 120 µg/ml. Получените данни показват, че пробата с ACO8 има значителен инхибиращ ефект върху бактериалния растеж — оптичната плътност е 0,20, докато в контролата без ACO8 стойността достига 1,4. Инхибирането е оценено чрез измерване на оптичната плътност на бактериалната култура след 8-часов инкубационен период. Тези резултати ясно демонстрират потенциала на ACO8 за ефективно потискане на растежа на бактериите при посочената концентрация.

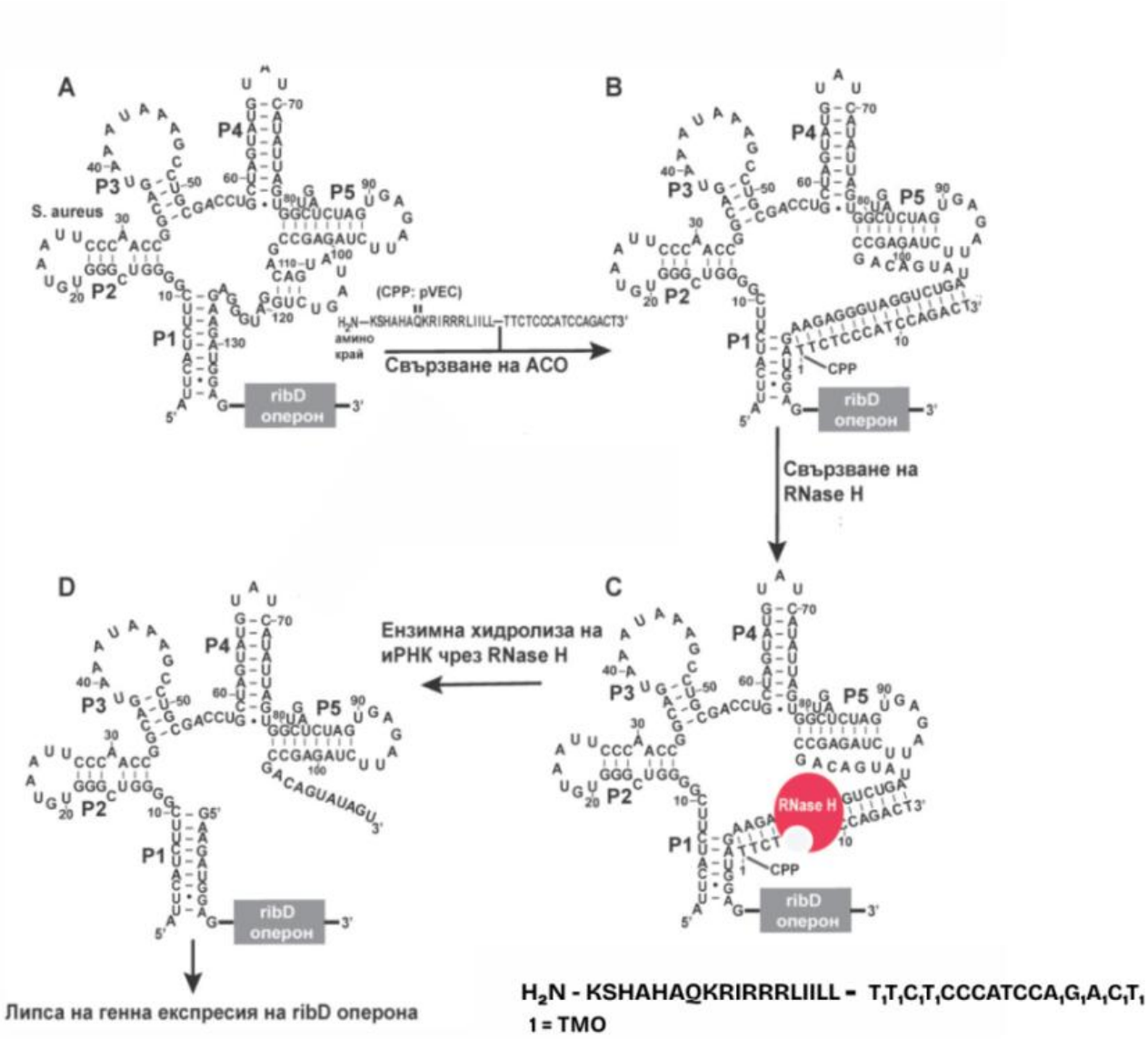
ACO8 в концентрация от 1 20 µg/ml се свързва с аптамерния домейн на ФМН



рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на ***S. aureus*** (червената линия)

Фигура 29. **Инхибиране на бактерислния растеж на *S. aureus* при концентрация на ACO8 от 120 µg/ml.** *На графиката е изобразен бактериалният растеж на S. aureus, анализиран в две паралелни проби както следва:*

----- *0 µg/m ACO8*



----- *120 µg/m ACO8*

Фигура 30. Ензимно хидролизиране на ФМН аптамера в *полицистронната ribD* ***на иРНК чрез ACO8.*** *Проектираният ACO8 се свързва* ***специфично и комплементарно*** *с последователността на FMN аптамерния домейн в*

полицистронната ribD иРНК. При свързване с аптамера се образува двойноверижна РНК молекула. ТМО-модификациите на АСО активират ензима РНказа Н, който разпознава двойноверижната РНК и разгражда целевата иРНК. Това ензимно разграждане води до спиране на генната експресия на ribD оперона и инхибира бактериалния растеж.Това ензимно разграждане води до спиране на генната експресия на ribD оперона и инхибира бактериалния растеж.

6. Дискусия

Настоящият дисертационен труд анализира и сравнява ефективността на инхибиране на седем различни химични модификации, приложени върху една и съща секвенция, насочена към целева РНК. Основната цел е да се оцени не само инхибиторната способност на секвенциите, но и да се проследи възможността за възникване на off-target ефекти, както и да се определи оптимална структура, която съчетава висока ефективност и намалена производствена цена. След прилагането на избраните стратегии за най-подходящи химични модификации и структурни промени върху изследваната секвенция, пристъпихме към същинската част на изследването, а именно – провеждането на лабораторни експерименти. Получените резултати показаха, че модификациите оказват съществено влияние върху свойствата на антисмисловите олигонуклеотиди (АСО) и тяхната активност спрямо целевата РНК. Това включва ефект върху хибридизационната способност на дуплекса АСО:РНК, ефективността на РНКаза Н, устойчивостта на АСО към нуклеази, както и подобряване на клетъчния транспорт на АСО.

Резултатите потвърдиха хипотезата, че чрез внимателен подбор на химични модификации е възможно оптимизиране на терапевтичния профил на АСО.

За целите на настоящия научен труд е изготвен дизайн на АСО, като върху избраната секвенция са приложени седем типа модификации – химични и структурни промени. В резултат са създадени следните АСО:

1. **Фосфоротиоатна модификация**
   [p-VEC][SS-C6][SpC12]A[Ps]G[Ps]C[PS]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]T[Ps]C[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]T[Ps]C[Ps]C - ACO1
2. **2‘ – O- метил модификация**
   [p-VEC][SS-C6][SpC12][mA][mG][mC][mA][mC][mU][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mC][mU][mC][mC][Univ] – ACO2
3. **Липса на модификация**
   [p-VEC][SS-C6][SpC12]AGCACTCTTTTCCTCTCC – ACO3
4. **Добавяне на ACCA мотив**
   [p-VEC][SS-C6][SpC12AGCACTCTTTTCCTCTCC**ACCA** – ACO4
5. **Гаптамер с 2’-O-Methyl модификация ACO5** [p-VEC][SS-C6][Sp12C][mA][mG][mC][mA]CTCTTTTCC[mU][mC][mU][mC][mC][Univ] – ACO5
6. **Гаптамер с 2’-O-Methyl модификация** [p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-A][TMO-G][TMO-C][TMO-A]CTCTTTTCC[TMO-T][TMO-C][TMO-T][TMO-C][TMO-C][Univ] – ACO6
7. **LNA модификация**
   [p-VEC][SS-C6][Sp12C][+A][+G][+mC][+A][+mC][+T][+mC][+T][+T][+T][+T][+mC][+mC][+T][+mC][+T][+mC][+mC][Univ] - ACO7

6.1. Основни наблюдавани ефекти

ACO1 с фосфориотиоатна модификация показа изключително висока устойчивост и стабилност в in vitro, което доведе до 92% инхибиране на целевата иРНК. Тези резултати съответстват с данни от други изследвания, показващи, висока ефективност и добри фармакокинетични свойства. В едно от проведените изследвания, насочени към проследяване на ефективността срещу бактериални гени, една от секвенциите (KM726) постигна 89,7% инхибиране на своята мишена, демонстрирайки силна

активност за заглушаване на гени (Good et al., 2001). PS-ASO демонстрират мощни инхибиторни ефекти в различни биологични модели. Например, едно изследване съобщава за до 87,6% инхибиране на репликацията на коксакивирус B3 чрез използване на фосфоротиоатен олигонуклеотид, насочен към вирусния 3′-UTR (Zhou et al., 1995). В човешки клетъчни култури PS-ASO ефективно редуцира нивата на U16 snoRNA с около 80% при ниски наномоларни концентрации (Lennox и Behlke, 2010). При ACO2 е наблюдавано инхибиране на LacZ гена с 40%, което показва сравнително ниска инхибиторна активност на проектирания антисенс олигонуклеотид и въведената модификация. Както беше отбелязано по-рано, механизмът на действие на тази модификация е чрез стерично блокиране, което обикновено е по-слабо ефективно в сравнение с RNase H–медииранoто разграждане. При недостатъчно стабилно свързване, блокирането на транслацията не е ефективно (Hammond et al., 2021). При ACO4 приложихме изцяло нова стратегия, насочена към активиране на РНКаза P – ензим, който разпознава и разрязва прекурсори на тРНК с 3′-CCA край. Чрез добавяне на такъв мотив към 3′ края на ACO, целим да повишим неговата активност чрез специфичното въздействие на РНКаза P. Резултатите в този случай бяха скептични и показаха ниска инхибираща способност. По-високи нива на инхибиране чрез добавяне на ACCA мотив се наблюдават при модифициран 3′-ACCA мотив, съдържащ LNA нуклеотиди, който води до по-стабилна хибридизация с целевата РНК и повишена ефективност на РНКаза P-медииранoто разцепване на иРНК (Soler Bistué et al., 2009). При ACO6 — гапмер с TMO модификация, установихме най-високи нива на инхибиране, достигащи до 97%, което представлява резултат, непостиган до този момент при инхибиране на експресията на целевия ген. В научната литература има сравнително малко данни относно този тип антисенс олигонуклеотиди. В една от малкото налични публикации се съобщава, че след прилагане на TMO-модифицирани ACO демонстрират намалено образуване на структурирани ядрени включвания и агрегации на SFPQ — нежелани ефекти, които обикновено се наблюдават при фосфоротиоат-съдържащите ACO (Mejzini et al., 2024). Учени съобщават, че TMO-модифицираните ACO демонстрират висока ефективност дори при ниски концентрации, като при 5–

10 nM индуцират до 52% екзонно прескачане, а при 50 nM – до 74% (Le et al., 2024).

6.2. Приложение на ACO

Чрез настоящото изследване потвърдихме терапевтичния потенциал на ACO като нови антибактериални агенти. Чрез прилагането на различни видове химични модификации и структурни промени върху ACO, установихме ясна зависимост между структурата и инхибиращия ефект, което ни позволи да открием и оптимизираме най-ефективната модификация за потискане на бактериалния растеж при *S aureus*.

Получените резултати демонстрират не само изключително висок инхибиращ ефект, но и структура на ACO, която значително намалява себестойността на синтеза му. В този контекст, ACO вариантът с най-висока инхибираща активност и оптимален профил на производствени разходи се явява особено подходящ кандидат за последващи предклинични и клинични изпитвания.

Въпреки това, оптимизирането на доставката, минимизирането на off-target ефектите и намаляването на производствените разходи остават ключови предизвикателства за клиничната интеграция на ACO.

6.3. Предложения за бъдещи изследвания

Извършване на дългосрочни *in vivo* изследвания

За доказване на терапевтичните свойства на постигнатите до момента резултати е необходимо да се продължи със изследвания, насочени към потвърждаване или отхвърляне на възможна токсичност, както и към детайлно изучаване на фармакокинетиката на ACO. Тези допълнителни проучвания ще осигурят по-добро разбиране на безопасността на терапевтичния агент, което е от ключово значение за успешното им клинично приложение.

Важно е също така да бъдат разгледани и потенциалните иммуно-модулаторни ефекти и взаимодействия с други лекарства, за да се ограничат нежеланите

странични ефекти на лекарствения продукт и да се подобри терапевтичният профил. Постигнатите резултати от тези изследвания ще позволят разработването на безопасни и ефективни терапии с широко приложение в борбата с бактериалните инфекции.

6.4. Обобщение и заключителни коментари

Дисертационният труд потвърждава, че прилагането на химическите модификации и структурни промени върху АСО са критични фактори за тяхната ефективност и стабилност. Най-значимият резултат, който очертава нова посока в разработването на лекарствени средства на базата на АСО, е създаденият от нас гаптамер с тиоморфолино (ТМО) модификация. Ефективността на този гаптамер е успешно потвърдена чрез неговото приложение като антибактериален агент за инхибиране на растежа на *S. aureus*.

Това откритие не само демонстрира значителен инхибиращ ефект върху бактериалния растеж, но и показва нови възможности за прилагане на ТМО-модифицирани АСО като обещаващи терапевтични агенти срещу антибиотично-резистентни патогени. Освен високата ефективност, гаптамерът с ТМО модификация показва подобрена стабилност в клетъчната среда и понижена токсичност спрямо конвенционалните АСО, което е ключово за бъдещото му развитие и клинично приложение.

7. Изводи

1. С разработената lacZ репортерна система, е доказано, че тя е подходящ и ефективен инструмент за количествено определяне на инхибиторния ефект на АСО.

2. Проектираният АСО, с дължина 18 нуклеотида, успешно хибридизира с целевата РНК-ова последователност, което потвърждава прецизността на приложените биоинформатични и софтуерни програми.

3. Приложените седем типа химични модификации демонстрират различни нива на инхибиращ ефект, като резултатите разкриват значими разлики в стабилността и афинитета на АСО към целевата иРНК в зависимост от типа и позицията на модификацията.

4. Установяването на най-ефективната модификация (гаптамер с ТМО) доведе до създаването на АСО8 с подобрена биологична активност, който показа силно инхибиране на растежа на патогенната бактерия *S. aureus.*

5. Оптималният подбор на химични модификации в АСО е критичен за постигане на висока специфичност и ефективност при молекулното инхибиране на целевата иРНК, което има пряко приложение в разработването на антибактериални терапии.

8. Приноси

В резултат на извършените научно-експериментални изследвания са установени следните приноси:

1. За първи път е проведен сравнителен анализ на ефективността на инхибиране на АСОи с различни химически модификации, но с една и съща секвенция.

2. Индентифицирани са оптималните комбинации от химични модификации, които постигат баланс между стабилност, ефективност и клетъчна проникваемост.

3. Проследена е ефективността на различните генерации АСОи при инхибирането на иРНК. Това доведе до установяването на модификацията, притежаваща най-висока ефективност - гаптамер с тиоморфолино (TMO) модификация , притежаващ следната структурна и химична последователност:

   [p-VEC][SS-C6][Sp12C][TMO-C][TMO-T][TMO-T][TMO-T]AACTGTA[TMO-C][TMO-T][TMO-G][TMO-C][TMO-C][Univ]

   a. Тези резултати са универсално приложими и могат да се използват за по-ефектично инхибирана на всякакви видове РНКи при прокариоти и еукариоти.

4. Демонстрирано е инхибиране растежа на *S. aureus* с АСО.

9. Използвани съкращения

- **АБ** – антибиотик
- **AMP** – антимикробна резистентност
- **АР** – антибиотична резистентност
- **АСО** – антисенс олигонуклеотид
- **АСОи** – антисенс олигонуклеотиди
- **бд** – базови двойки
- **CPP** – Cell Penetrating Peptide (клетъчно проникващ пептид)
- **crRNA** – CRISPR RNA
- **ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина
- **ЕС** – Европейски съюз
- **FDA** – Food and Drug Administration (Агенция по храните и лекарствата – САЩ)
- **gRNA** – guide RNA
- **инРНК** – интерфериращи РНК
- **иРНК** – информационна рибонуклеинова киселина
- **КПП** – клетъчно проникващ пептид
- **lncRNA** – long non-coding RNA (дълга некодираща РНК)
- **МИК** – минимална инхибираща концентрация
- **MDR** – Multidrug-resistant (мултирезистентни бактерии)
- **NAT** – *натурални антисенс транскрипт*
- **ON** – Over Night култура
- **ОСД** – Олигонуклеотид-свързващ домейн
- **PCR** – полимеразна верижна реакция
- **ПНК** – пептид нуклеинова киселина
- **РНК** – рибонуклеинова киселина
- **SD** – Шайн-Далгарно последователност
- **SNP** – single-nucleotide polymorphism (единична нуклеотидна полиморфизъм)
- **TPP** – тиамин пирофосфат
- **UTR** – untranslated region (нетранслиран регион)
- **ФМН** – флавин мононуклеотид

- **(A[ps])** – Аденин с фосфороотиоатна модификация
- **(C[ps])** – Цитозин с фосфороотиоатна модификация
- **(G[ps])** – Гуанин с фосфороотиоатна модификация
- **(mA)** – 2'-O-метил аденин
- **(mC)** – 2'-O-метил цитозин
- **(mG)** – 2'-O-метил гуанин
- **(mU)** – 2'-O-метил урацил
- **(pVEC)** – NH_2-KSHAHAQKRIRRRLIILL (клетъчно проникващ пептид)
- **(T[ps])** – Тимин с фосфороотиоатна модификация**[+A]** – Заключен аналог на аденин (Locked Analog A)
- **[+G]** – Заключен аналог на гуанин (Locked Analog G)
- **[+mC]** – Заключен аналог на метилиран цитозин (Locked Analog mC)
- **[+T]** – Заключен аналог на тимин (Locked Analog T)
- **[Ps]** – Фосфороотиоат (Phosphorothioate, SOX)
- **[SpC12]** – Пространствен разделител C12 (Spacer C12)
- **[SS-C6]** – Тиолен свързващ елемент SS-C6 (Thiol SS-C6)
- **[TMO-A]** – Тио-морфолинов олигонуклеотид с аденин
- **[TMO-C]** – Тио-морфолинов олигонуклеотид с цитозин
- **[TMO-G]** – Тио-морфолинов олигонуклеотид с гуанин
- **[TMO-T]** – Тио-морфолинов олигонуклеотид с тимин

10. Фигури

концентрация от 20 μg/ml при инхибирането на LacZ гена.

Фигура 23. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните АСОи с концентрация от 40 μg/ml при инхибирането на LacZ гена.

Фигура 24. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните АСОи с концентрация от 80 μg/ml при инхибирането на LacZ гена.

Фигура 25. Сравнителен анализ на ефективността на проектираните АСОи с концентрация от 120 μg/ml при инхибирането на LacZ гена.

Фигура 26. Инхибиране на бактерислния растеж на *S. aureus* при концентрация на ACO8 от 20 μg/ml.

Фигура 27. Инхибиране на бактерислния растеж на *S. aureus* при концентрация на ACO8 от 40 μg/ml.

Фигура 28. Инхибиране на бактерислния растеж на *S. aureus* при концентрация на ACO8 от 80 μg/ml.

Фигура 29. Инхибиране на бактерислния растеж на *S. aureus* при концентрация на ACO8 от 120 μg/ml.

Фигура 30. Проектираният ACO8 се свързва **специфично и комплементарно** с последователността на FMN аптамерния домейн в полицистронната ribD иРНК. При свързване с аптамера се образува двойноверижна РНК молекула.

Фигура 31. Сравнение на ефективността на проектираните АСО при инхибирането на LacZ гена при фиксирана концентрация от 20, 40, 80 и 120 μg/ml.

11. Таблици

10. Литература

1. Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., Janson, A. A. M., Heemskerk, H., de Winter, C. L., de Kimpe, S., van Deutekom, J. C. T., 't Hoen, P. A. C., & van Ommen, G. J. B. (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Molecular Therapy*, *17*(3), 548–553. https://doi.org/10.1038/mt.2008.205
2. Agrawal, S. (2021). The evolution of antisense oligonucleotide chemistry—a personal journey. *Biomedicines*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/biomedicines9050503
3. Agrawal, S., Jiang, Z., Zhao, Q., Shaw, D., Cai, Q., Roskey, A., Channavajjala, L., Saxinger, C., & Zhang, R. (1997). Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: In vitro and in vivo studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(6). https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2620
4. Anderson, B. A., Freestone, G. C., Low, A., De-Hoyos, C. L., Iii, W. J. D., Østergaard, M. E., Migawa, M. T., Fazio, M., Wan, W. B., Berdeja, A., Scandalis, E., Burel, S. A., Vickers, T. A., Crooke, S. T., Swayze, E. E., Liang, X., & Seth, P. P. (2021). Towards next generation antisense oligonucleotides: Mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, *49*(16). https://doi.org/10.1093/nar/gkab718
5. Andersson, P. (2022). Preclinical Safety Assessment of Therapeutic Oligonucleotides. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_25
6. Angrish, N., & Khare, G. (2023). Antisense oligonucleotide based therapeutics and its applications against bacterial infections. In *Medicine in Drug Discovery* (Vol. 20). https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100166
7. Anwar, S., Mir, F., & Yokota, T. (2023). Enhancing the Effectiveness of Oligonucleotide Therapeutics Using Cell-Penetrating Peptide Conjugation, Chemical Modification, and Carrier-Based Delivery Strategies. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 4). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041130
8. Arechavala-Gomeza, V., & Garanto, A. (n.d.-b). *Antisense RNA Design, Delivery, and Analysis*. http://www.springer.com/series/7651
9. Arechavala-Gomeza, V., & Garanto, A. (2022). Antisense RNA Therapeutics: A Brief Overview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_2
10. Arnoldi, M., Zarantonello, G., Espinoza, S., Gustincich, S., di Leva, F., & Biagioli, M. (2022). Design and Delivery of SINEUP: A New Modular Tool to Increase Protein Translation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_4
11. Aviv, G., & Gal-Mor, O. (2018). Lacz reporter system as a tool to study virulence gene regulation in bacterial pathogens. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1734). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_5

12. Aydin, O., Kanarya, D., Yilmaz, U., & Tunç, C. Ü. (2022). Determination of Optimum Ratio of Cationic Polymers and Small Interfering RNA with Agarose Gel Retardation Assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_7
13. Bäckström, E., Bonetti, A., Johnsson, P., Öhlin, S., Dahlén, A., Andersson, P., Andersson, S., & Gennemark, P. (2024). Tissue pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, *35*(1). https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102133
14. Bennett, C. F. (2018). Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu. Rev. Med. 2019*, *70*, 307–321. https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217
15. Boros, B. D., Schoch, K. M., Kreple, C. J., & Miller, T. M. (2022). Antisense Oligonucleotides for the Study and Treatment of ALS. In *Neurotherapeutics* (Vol. 19, Issue 4). https://doi.org/10.1007/s13311-022-01247-2
16. Bremer, J., & van den Akker, P. C. (2022a). In Vitro Models for the Evaluation of Antisense Oligonucleotides in Skin. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_11
17. Bremer, J., & van den Akker, P. C. (2022b). In Vivo Models for the Evaluation of Antisense Oligonucleotides in Skin. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_21
18. Bui, N. le, & Chu, D. T. (2024). An introduction to RNA therapeutics and their potentials. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 203). https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.12.020
19. Butreddy, A., Kommineni, N., & Dudhipala, N. (2021). Exosomes as naturally occurring vehicles for delivery of biopharmaceuticals: Insights from drug delivery to clinical perspectives. In *Nanomaterials* (Vol. 11, Issue 6). https://doi.org/10.3390/nano11061481
20. Chiu, Y. L., Ali, A., Chu, C. Y., Cao, H., & Rana, T. M. (2004). Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chemistry and Biology*, *11*(8). https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.06.006
21. Crooke, S. T. (2017a). Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*, *27*(2), 70–77. https://doi.org/10.1089/nat.2016.0656
22. Czech, M. P., Aouadi, M., & Tesz, G. J. (2011). RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 7, Issue 8). https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.57
23. Daoutsali, E., & Buijsen, R. A. M. (2022). Establishment of In Vitro Brain Models for AON Delivery. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2434). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_17
24. Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., & Bahal, R. (2020a). Antisense oligonucleotides: An emerging area in drug discovery and development. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1–24). MDPI. https://doi.org/10.3390/JCM9062004
25. Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., & Bahal, R. (2020b). Antisense oligonucleotides: An emerging area in drug discovery and development. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1–24). MDPI. https://doi.org/10.3390/JCM906200