

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



SOFIA UNIVERSITY  
ST. KLIMENT OHRIDSKI

FACULTY OF BIOLOGY



**Софийски Университет „Св. Климент Охридски“**

**Биологически Факултет, Катедра Генетика**

**Катя Бисерова Попова**

**ДИЗАЙН И ПРИЛОЖЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛНИ НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ  
ЗА КОНТРОЛ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ И СЪЗДАВАНЕ НА НОВИ  
ТЕРАПЕВТИЧНИ АГЕНТИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен  
„Доктор“ в професионално направление 4.3 Биологически науки –  
„Генетика- Биоинформатика“**

**Научен ръководител: проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски**

**гр. София, 2021**



**Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедра Генетика към Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, проведено на 10.12.2020г., въз основа на ректорска заповед .....**

**Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури, потвърдено със Заповед No ..... на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ проф. дфн Анастас Герджиков.**

**Научно жури:**

**Вътрешни членове на научно жури:**

- 1. проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски**
- 2. доц. д-р Илияна Атанасова Иванова**

**Външни членове на научно жури:**

- 3. акад. проф. дбн Атанас Иванов Атанасов**
- 4. проф. дбн Иван Илиев Атанасов**
- 5. проф. д-р Радостина Ивайлова Александрова**

**Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... Г.  
от ..... часа.**

Дисертационният труд, написан от Катя Бисерова Попова, съдържа:156 страници, 50 фигури, 5 таблици и 189 цитирания. Той е базиран на 3 научни публикации с участието на докторанта с общ импакт фактор от 8.22, както следва:

1. **Katya B Popova** and Robert Penchovsky. “*Why Some Functional RNAs Such as Bacterial Riboswitches are Versatile Targets for Antibacterial Drug Discovery?*”, EC Microbiology 16.11 (2020): 54-55, **IF: 1.75**
2. **Katya B Popova**, A.Valsamatzi-Panagiotou, R. Penchovsky “*New drug discovery strategies for targeting drug-resistant bacteria: a review*”, Environmental Chemistry Letters, *in press*, **IF: 5.92.**
3. **Katya B Popova** and Robert Penchovsky “*Current Activators of the glmS Riboswitch*”, Biomed J Sci & Tech Res, (2021), **IF: 0.55.**

#### **УЧАСТИЕ В КОНФЕРЕНЦИИ:**

1. Участие в 14-ти Конгрес на Микробиолозите в България с международно участие, 10-13.10.2018г., гр. Хисаря, България. В рамките на конференцията представих два постера:

1.1. “**Probing general toxicity of antisense oligonucleotides to bacterial and mammalian cells**”, **Katya B. Popova**, Lozena A. Otcheva, Martina Traykovska and Robert Penchovsky

1.2. “**Control of gene expression by bacterial riboswitches and their application as drug targets**”, Lozena A. Otcheva, **Katya B. Popova**, Nikolett Pavlova, Martina Traykovska and Robert Penchovsky – награден за **най-добър постер– втора награда**

Изследванията по настоящия дисертационен труд са извършени в катедра „Генетика“ при Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Геномен център при Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ и в секция „Патология“ при Институт по експериментална морфология, патология и анатомия с музей БАН.

Изработването на настоящия дисертационен труд е финансирано по проекти на Национален фонд „Научни изследвания“ към МОН с номера **DN13/14/20.12.2017** и **КР-06-Н31/18/13.12.2019.**

**Използвани съкращения и  
означения на български език**

**АСО** - антисенс олигонуклеотиди

англ. - английски

**АР** – антибиотична резистентност

**дб** – базови двойки

**ДНК** – дезоксирибонуклеинова  
киселина

**ИПП** - инфекция на пикочните пътища

**ИСМО** - инфекция, свързана с  
медицинско обслужване

**иРНК** – информационна  
рибонуклеинова киселина

**кДНК** – копи ДНК

**МИК** – минимална инхибираща  
концентрация

**миРНК** – микро РНК

**МФС** - моонуклеарна фагоцитна  
система

**ПФМО** - фосфороамидатен  
морфолинов олигомер, свързан с  
пептид

**РНК** – рибонуклеинова киселина

**СЗО** - Световна Здравна  
Организация

**тРНК** – транспортна РНК

**Използвани съкращения и  
означения на английски език**

**CDC** - Център за Контрол и  
Превенция на Заболяванията  
(Centers for Disease Control and  
Prevention)

**CMV** - човешки цитомегаловирус

**CPP** - проникващ в клетката пептид  
(cell penetrating peptide)

**Da** – *мер.ед.* Далтон

**DDBJ** - ДНК базата данни на Япония  
(DNA Data Bank of Japan)

**EBI** – Европейски нуклеотиден архив  
(European Nucleotide Archive)

**GlcN6P** - глюкозамин-6-фосфат

**glmS** – глюкозамин-6-фосфат  
активираща рибозима

**KEGG** - Киото енциклопедия на  
гените и геномите (Kyoto Encyclopedia  
of Genes and Genomes)

**MRSA** - метицилин-резистентни  
*S. aureus*

**NCBI** – Национален център за  
биотехнологична информация  
(National Center for Biotechnology  
Information)

**OD** – оптическа плътност

**PCR** – полимеразна верижна реакция

**PS** - фосфоротиоатна модификация

**syn.** - синоним

# Съдържание

1. Въведение.....	8
2. Цели и задачи .....	11
2.1. Цели.....	11
2.2. Задачи.....	11
3. Материали и методи .....	13
3.1. Материали.....	13
3.1.1. Използвани бази данни и търсачки .....	13
3.1.2. Антисенс олигонуклеотиди и праймери.....	14
3.1.3. Бактериални видове и човешки клетъчни култури .....	15
3.1.4. Използвани програми.....	15
3.2. Методи.....	16
3.2.1. Работа с бактериални клетки.....	16
3.2.1.1. Култивиране на бактериални клетки.....	16
3.2.1.2. Определяне на бактериална преживяемост.....	16
3.2.2. Работа с човешки клетъчни култури .....	17
3.2.2.1. Клетъчно култивиране на човешки клетъчни линии .....	17
3.2.2.2. Определяне на клетъчна жизненост и преживяемост .....	17
3.2.2.3. Тест за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо.....	17
3.2.2.4. Определяне влиянието на вещества върху клетъчната преживяемост.....	17
4. Резултати .....	18
4.1. ГлмС рибопревключвател /ACO1/.....	18
4.1.1. Биоинформатичен анализ на човешки патогенни бактерии, съдържащи глмС рибопревключвател.....	18
4.1.2. Дизайн на антисенс олигонуклеотида ACO1, хибридизиращ с глмС рибопревключвател.....	25
4.1.3. Експериментално тестване на инхибиторното действие на ACO1 върху бактериалния растеж и развитие .....	28
4.2. N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза /ACO2/ .....	31
4.2.1. Биоинформатичен анализ.....	31
4.2.2. Дизайн на антисенс олигонуклеотида ACO2.....	37
4.2.3. Експериментално тестване.....	38
4.3. Гуанилат киназа /ACO3 и ACO4/ .....	40

4.3.1. Биоинформатичен анализ.....	40
5.3.2. Дизайн на АСО3 и АСО4, хибридиращи с gmk иРНК.....	45
5.3.3. Експериментално тестване на инхибиторното действие на АСО3 и АСО4 върху бактериалния растеж и развитие .....	48
4.4. Неспецифично хибридиране /АСО5/.....	51
4.4.1. Биоинформатичен анализ и дизайн .....	51
5.4.2. Експериментално тестване на цитотоксичното действие на АСО5 върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки клетъчни линии .....	52
4.5. Неспецифично хибридиране /АСО6/.....	53
4.5.1. Биоинформатичен анализ и дизайн .....	53
4.5.2. Експериментално тестване на цитотоксичното действие на АСО6 върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки клетъчни линии .....	54
4.6. Нехибридиращ /АСО7/.....	56
4.6.1. Биоинформатичен анализ и дизайн .....	56
4.6.2. Експериментално тестване на цитотоксично действие на АСО7 върху преживяемостта и пролиферативната активност на бактериални и ракови клетки .....	57
4.7. Допълнителни биоинформатични и експериментални резултати.....	60
5. Дискусия .....	65
6. Изводи.....	72
7. Приноси.....	74

# 1. Въведение

Разискваната тема в настоящата докторска дисертация е интердисциплинарна и обхваща няколко области в биологията като биоинформатика, синтетична биология, молекулярна биология, генетика, геномика и биохимия. Тя е базирана на 1 научна публикация в списание с импакт фактор и 1 глава от книга в реферирано издание на Springer. Тук детайлно са описани биоинформатичните анализи за структурата и синтезата на 7 антисенс олигонуклеотида и потенциалът им като бъдещи терапевтични агенти. В допълнение са описани и извършените експерименти, чрез които тествам този им потенциал. Те демонстрират различни степени на инхибиране на бактериален растеж на условната патогенна за човека бактерия *Staphylococcus aureus* или на цитотоксичност в човешки клетъчни линии.

В настоящата докторска дисертация се използват постиженията на възникналата през 1968г. биоинформатика, която от тогава постоянно се развива и днес е станала неизменна част от научната работа. Чрез непрестанно обновяващите се софтуерни програми и бази данни, тя предоставя удобен начин за анализиране и интерпретиране на биологични данни от цял свят. Примери за това са сравнителния анализ на геномите на различни организми, търсенето на консервативни области (мотиви) в тях, както и откриването на гени, отговорни за кодирането и/или контролирането на определени белтъци в конкретни организми. Посредством тези биоинформатични методи тук се възползвам от възможността да определя подходящи мишени в иРНК на човешката патогенна бактерия *Staphylococcus aureus*. С помощта на огромен арсенал от средства и методики в синтетичната биология, тези мишени могат да бъдат прицелени от специализирани синтетични молекули и по този начин се дава възможност да се регулира и/или изцяло препрограмира клетъчната съдба. В настоящата докторска дисертация е използвана антисенс олигонуклеотидната технология, представляваща клон от синтетичната биология, чрез който може да се инхибират точно и специфично определените мишени с цел създаване на нови терапевтични агенти. При нея се използват антисенс олигонуклеотиди (АСО-и), чиито последователности и дизайн



са внимателно подбрани, така че да могат да проникнат в клетката и да хибридизират с иРНК мишена. Тук от значение е мишената да е има ключова роля в биохимичния метаболитен път за синтезата на незаменим за таргетния организъм белтък. В резултат на хибридизацията на АСО с мишената иРНК, АСО активира ензима РНаза H и мишената бива разградена. По този начин се предоставя алтернатива за създаването на изцяло нова категория лекарства, която да се занимава с широко разпространени проблеми в съвременното здравеопазване. Типичен пример за това са инфекциозните заболявания, предизвикани от антибиотична резистентност, които водят до смъртта на 700 000 души всяка година.

При предишни проучвания и изследвания на научния колектив бе анализирана структурата и функцията на широко разпространени рибопревключватели и бе доказан силен инхибиращ ефект на бактериалния растеж при 3 патогенни за човека бактерии, съдържащи определени мишенни рибопревключватели. Водена от желанието да продължа изследванията в тази област, при подготвянето на настоящата докторска дисертация си поставих за цел да създам антисенс олигонуклеотид, който да се прицелва в един от най-разпространените рибопревключватели – *glmS*. Биоинформатичният анализ посочи, че той се открива единствено при бактерии, сред които 26 са патогенни за човека. Неговата структура го прави отлична аlostерична мишена за АСО технологията и съответно за разработването на антибактериална таргетна терапия. По тази причина бе проектиран АСО1, който се прицелва в *glmS* рибопревключвателя на условно патогенната за човека бактерия *S. aureus* и демонстрира силно инхибиране в нея, но не и в условния патоген *E. coli* и непатогенната бактерия *B. subtilis*, които не притежават същата мишенна последователност. Вторият създаден антисенс олигонуклеотид (АСО2) е проектиран да се прицелва в *pagA* последователността на иРНК, която е част от алтернативен път за получаване на жизнено важния глюкозамин-6-фосфат в условния човешки патоген *S. aureus*. При комбинирана терапия от АСО1 и АСО2 се демонстрира пълно инхибиране на *S. aureus*, благодарение на специфичността на свързване на двата АСО-и. Други 2 антисенс олигонуклеотиди (АСО3 и АСО4) се насочват към проблема с антибиотичната резистентност, посредством прицелване

в гуаниновия биосинтетичен път, осигуряващ необходимите за ДНК репликация, транскрипция и трансляция нуклеотиди. За целта те са проектирани да хибридизират напълно в 2 различни района от иРНК, отговорна за трансляцията на есенциалния ензим гуанилат киназа и приложени заедно те инхибират 65% от бактериалния растеж на *S. aureus*. Допълнителни 2 антисенс олигонуклеотида (АСО5 и АСО6) са проектирани да не хибридизират с определена последователност. Те са тествани за предизвикване на неспецифична цитотоксичност в лабораторно култивирани клетъчни линии от рак на гърдата и в нетуморна клетъчна линия. Финална стъпка в настоящата докторска дисертация е проектирането на антисенс олигонуклеотид (АСО7), чиято последователност е уникална и експериментално демонстрира липсата на цитотоксичен ефект при пълна липса на комплементарност в геномите на тестваните бактериални клетки и човешки клетъчни линии.

## 2. Цели и задачи

### 2.1. Цели

Целта на настоящата докторска дисертация е създаването на нови химерни антисенс олигонуклеотиди с антибактериална активност при патогенни бактерии, които се свързват специфично с *glmS* рибопревключвателя или с бактериалните иРНК-и, кодиращи ензимите N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза и гуанилат киназа, както и тестване за цитотоксичност в човешки клетъчни линии.

### 2.2. Задачи

За постигане на посочената цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се направи биоинформатичен анализ на разпространението на *glmS* бактериалния рибопревключвател в геномите на човешки патогени бактерии и на контролирани от него биохимични пътища в патогенната бактерия *S. aureus*. Оценка на най-подходящата мишенна последователност в *glmS* бактериалния рибопревключвател и дизайн на антисенс олигонуклеотид, който специфично да се свързва с него в патогенната бактерия *S. aureus*.
2. Да се направи биоинформатичен анализ на разпространението на *pagA* гена в геномите на човешки патогени бактерии и на контролирани от него биохимични пътища в патогенната бактерия *S. aureus*. Да се оцени най-подходящата мишенна последователност в *pagA* иРНК и дизайн на антисенс олигонуклеотид, който специфично да се свързва с нея в патогенната бактерия *S. aureus*.
3. Да се направи биоинформатичен анализ на разпространението на *gmk* гена в геномите на човешки патогени бактерии и на контролирани от него биохимични пътища в патогенната бактерия *S. aureus*. Да се оцени най-подходящата мишенна последователност в *gmk* иРНК и дизайн на антисенс олигонуклеотид, който специфично да се свързва с нея в патогенната бактерия *S. aureus*.

4. Да се създадат химерни антисенс олигонуклеотиди, които са базирани на проведените биоинформатични анализи от задачи 1,2 и 3 и са специфични за патогенната бактерия *S. aureus*.
5. Да се създадат химерни антисенс олигонуклеотиди, които не са специфични за определена мишена.
6. Да се тества експериментално антибактериална активност на получените специфични химерни антисенс олигонуклеотиди в патогенната бактерии *S. aureus*.
7. Да се тества експериментално неспецифична цитотоксична активност на получените неспецифични химерни антисенс олигонуклеотиди в човешки здрави клетъчни линии (Lep3) и туморни клетъчни линии от рак на гърдата (MDA-MB-231).

## 3. Материали и методи

### 3.1. Материали

#### 3.1.1. Използвани бази данни и търсачки

- **NCBI - National Center for Biotechnology Information** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) – Това е една от най-големите база данни, съдържащи геномна и биомедицинска информация [1].
- **Rfam 13.0 и 14.1** (<http://rfam.xfam.org/>) – Това е база данни, съдържаща множество подравнявания на РНК последователности, техните вторични структури и ковариационни модели на некодиращи РНК семейства.
- **Ensembl Bacteria** (<https://bacteria.ensembl.org/index.html>) – портал, даващ достъп до напълно секвенираните геноми на надцарство Бактерия и Архея.
- **CARD** (<https://card.mcmaster.ca/home>) - **Comprehensive Antibiotic Resistance Database** - База данни за резистентни гени, техните продукти и свързаните с това фенотипове [2].
- **UniProt - The Universal Protein Resource** (<https://www.uniprot.org/>) – Това е база данни, съдържаща белтъчни секвенции и информация за техните функции. Тя бе използвана за допълнителна информация и крос-референции, свързани с глюкозамин-6-фосфат синтетазния (glmS) и гуанилат киназния белтък (GMK) в патогенни бактерии.
- **KEGG- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes** (<http://www.genome.jp/kegg/>) – Това е енциклопедия на гени и геноми в Киото, чиято роля е да прави връзка между групи гени в геномите и взаимодействащите помежду си молекули в клетките на различни организми.
- **PATRIC – Pathosystems Resource Integration Center** (<https://www.patricbrc.org/>)- Биоинформатична база данни за патогенни бактерии, позволяваща различни анализи на базата на проведени биомедицински изследвания при бактериални инфекциозни заболявания.

### 3.1.2. Антисенс олигонуклеотиди и праймери

Изследвана бе терапевтичната активност на 7 новосинтезирани функционални нуклеинови киселини (антисенс олигонуклеотиди), които са резултат на поставените в точка 3 Цели и Задачи (Табл. 1). Те бяха синтезирани по моя дизайн от GeneLink (Хауторн, САЩ) като фирмата гарантира за тяхната чистота чрез извършена PAGE електрофореза (*англ.* denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis).

В настоящата докторска дисертация са използвани 2 праймера:

- прав праймер glmS (5'-GGCAGTACAGTTAAAGCGCC-3')

- обратен праймер glmS (5'-TGCTCACACTGTACTTTCCA-3')

**Таблица 1. Антисенс химерни олигонуклеотидни-олигопептидни молекули.** Пептидът pVEC започва със своя N-край и завършва със своя COOH- край, който се свързва ковалентно за специфичната олигонуклеотидна последователност. Всяка нуклеотидна последователност започва с нейния 5'-край. Означението "1" е за "2'-O-CH<sub>3</sub>" модификация на ДНК олигомерите, а означението "2" - за PS модификация на ДНК олигомерите. Означението "aar" е за аминокиселинни остатъци, а "nt" – нуклеотиди.

АСО	Последователност	aar nt	Мишена (иРНК)
1	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys- C <sub>1</sub> T <sub>1</sub> T <sub>1</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	18 16	glmS ( <i>S. aureus</i> )
2	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys-T <sub>1</sub> G <sub>1</sub> C <sub>1</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> G <sub>2</sub> T <sub>1</sub> A <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	18 13	nagA ( <i>S. aureus</i> )
3	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys- G <sub>1</sub> C <sub>1</sub> U <sub>1</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> G <sub>2</sub> C <sub>2</sub> G <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> G <sub>1</sub>	18 24	gmk ( <i>S. aureus</i> )
4	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys- C <sub>1</sub> A <sub>1</sub> U <sub>1</sub> A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> G <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> U <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	18 25	gmk ( <i>S. aureus</i> )
5	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys- G <sub>1</sub> A <sub>1</sub> U <sub>1</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> U <sub>1</sub> U <sub>1</sub>	18 22	неспецифична хибридизация
6	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys- C <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> U <sub>1</sub> U <sub>1</sub>	18 22	неспецифична хибридизация
7	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys- U <sub>1</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> G <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	18 11	няма

Те са синтезирани и пречистени от белгийския клон на фирмата-производител Integrated DNA Technologies (САЩ) чрез високоефективна течна хроматография (BETX, HPLC).

### 3.1.3. Бактериални видове и човешки клетъчни култури

За целите на експеримента използвах три вида бактерии:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923)- патогенна за човека
- *Escherichia coli* K12
- *Bacillus subtilis* 168

Всички бактериални видове, които бяха използвани по време на изследването, са човешки клинични изолати, получени от болниците под шапката на Катедра медицинска микробиология на Медицински Университет в град София.

Експерименти са проведени с две постоянни човешки клетъчни линии:

- Нетуморна клетъчна линия от 3-месечен човешки ембрион – Ler3
- Тройнонегативен рак на гърдата - MDA-MB-231

Всички човешки клетъчни линии са придобити от колекцията от клетъчни култури на Института по експериментална морфология, патология и антропология (ИЕМПАМ) към Българска академия на науките (БАН).

### 3.1.4. Използвани програми

- **BLAST** алгоритъм за търсене на подобност– **Basic Local Alignment Search Tool** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ). Чрез този алгоритъм на NCBI базата данни се откриват локални региони на подобност между различни секвенции.
- **Notepad++** - Стандарт при копирането или извличането на нуклеотидни и белтъчни последователности от различни организми е в текстови FASTA формат, който се разчита от програмата на Notepad++.
- **Clustal W/Clustal X/Clustal Omega** (<http://www.clustal.org/> ) – Те са популярни биоинформатични програми за множествоно подравняване на нуклеотидни последователности и са налични както за употреба в операционната система на Windows, така и за онлайн търсене.
- **Vienna RNAfold web server**, (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi> ). Уеб сървърът RNAfold предсказва вторичните структури на едноверижни РНК или ДНК последователности като текущата граница за изчисляване на статистическа (partition) функция е 7500nt, а за предсказване на минимална свободна енергия е 10 000 nt [3].

- **OriginPro 8** – Програма за анализиране на получените експериментални данни и изготвяне на фигури.

## **3.2. Методи**

### **3.2.1. Работа с бактериални клетки**

#### **3.2.1.1. Култивиране на бактериални клетки**

Хранителна среда Luria-Bertani (LB) е приготвена в съответствие с протокол на *Sambrook et al* [4], като 1L от нея съдържа 10g триптон, 5g дрожден екстракт и 10g NaCl. Хранителната среда за приготвяне на блюдо „Петри“ (*син.* петриева паничка) за бактериални посевки съдържа LB и агар като 1L от нея съдържа 10g триптон, 5g дрожден екстракт, 10g NaCl и 15g агар. Хранителните среди се автоклавира в продължение на 2,5ч на 120°C и се оставят да изстинат преди да се приберат за съхранение в хладилник на 4°C. При необходимост от посевка в петриева паничка се използва стерилно „Петри“, в което внимателно се разпределя хранителна среда, разтопена на микровълнова, до оказаната маркировка (25ml). Петриевите панички се оставят да изстинат за половин час и след това се прибират на съхранение в хладилник на 4°C с капака надолу [5].

#### **3.2.1.2. Определяне на бактериална преживяемост**

При достигане на log фаза на бактериален растеж, след *overnight* инкубиране (12-18ч), със стойности на оптична плътност (OD) между 0,7- 0,8 се извършва 1:1000 разреждане на инокулата чрез добавяне на LB хранителна среда. В стерилни кювети се отпипетират бактерии от разреждения инокулат и се третират с различни концентрации на АСО-те до достигане на краен обем от 100µl във всяка кювета. Контролните кювети съдържат 100µl от разредените бактерии. За експериментите с АСО1 и АСО2 се добавят и по 5µl MgCl<sub>2</sub> във всяка кювета, включително контролните, отново при краен обем от 100 µl/кювета. Всяка контрола и приложена концентрация на АСО притежава по 3 повтора. За определяне на бактериалната преживяемост се извършваше измерване на оптичната плътност на кюветите чрез фотоспектрометър на всеки 30мин при 600nm дължина на вълната. Кюветите с пробите се култивираха между всяко измерване на оптимални условия (37°C) в инкубатор с клатачка.



### **3.2.2. Работа с човешки клетъчни култури**

#### **3.2.2.1. Клетъчно култивиране на човешки клетъчни линии**

Всички човешки клетъчни линии са култивирани като монослойни култури в хранителна среда D-MEM. В нея са добавени 100 U/ml пеницилин, 100 µg/ml стрептомицин и 10% фетален телешки серум. Клетъчните линии се поддържат в инкубатор Forma Series II при температура 37.5°C, 5% CO<sub>2</sub> и наличие на необходимата влажност във въздуха. За “пасиране” на клетките се използва разтвор, съдържащ 0.025% етилендиаминтетраоцетна киселина и 0.05% трипсин. Всички експерименти бяха проведени при експоненциалната фаза на растежа на клетките [6].

#### **3.2.2.2. Определяне на клетъчна жизненост и преживяемост**

#### **3.2.2.3. Тест за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо**

Клетъчна суспензия и разтвор на трипаново синьо (0.2% разтвор във фосфатно-солеви буфер, PBS) в съотношение 1:1 (10µl:10µl) се добавят и ресуспендират в епруветка тип Епендорф непосредствено преди отчитането на резултата. Преброяването на клетките (живи и мъртви) и определянето на тяхната жизненост се осъществява чрез поставянето им в С-слайд (C-Slide, cell counting chamber slide) и отчитане с електронен брояч Invitrogen<sup>tm</sup> Countess<sup>tm</sup>, съгласно инструкциите на фирмата-производител.

#### **3.2.2.4. Определяне влиянието на вещества върху клетъчната преживяемост**

Човешките клетки бяха посяти в 96 ямкови плоскодънни плаки и при експоненциална фаза на растеж на клетките (24<sup>ия</sup> час от култивирането им), културалната среда беше отнемана. Към образувания клетъчен монослой (непълен, 50-70% покритие) се добавя поддържаща среда (с 5% фетален телешки серум), която съдържа и различни концентрации от изследваните антисенс олигонуклеотиди. От всяко разреждане на олигонуклеотидите се третира по 3 ямки. Клетъчната преживяемост беше определяна за 24-часов интервал от време след началото на третирането чрез тест с тиазол блу тетразолиум бромид (МТТ) [7].

## 4. Резултати

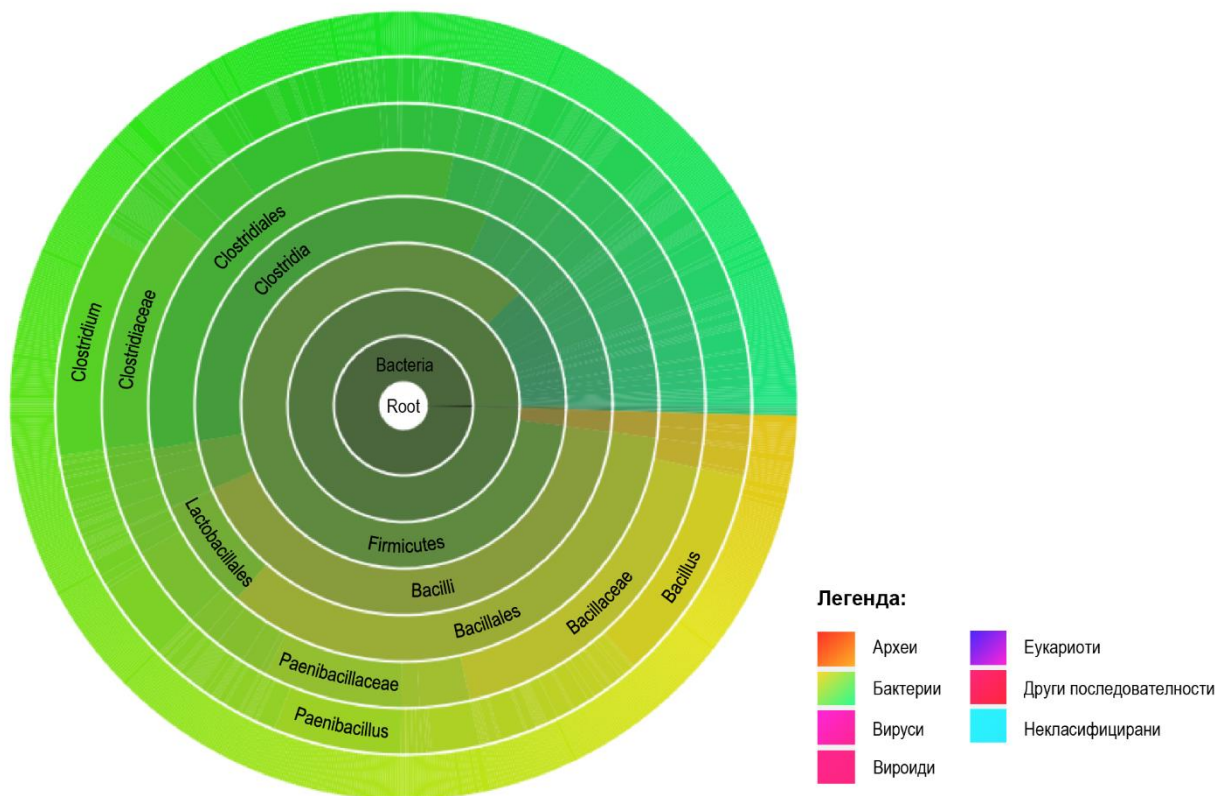
### 4.1. ГлмС рибопревключвател /АСО1/

Сред всички открити до момента рибопревключватели, само един притежава двойствена функция. Това е глмС рибопревключвателят (glmS riboswitch). Неговото пълно наименование е глюкозамин-6- фосфат активирана рибозима и както името му подсказва, той функционира и като рибозима. Ролята му като рибопревключвател е да отговаря за кодирането на ензима глутамин:фруктозо-6-фосфат аминотрансфераза (GFAT). Глутамин:фруктозо-6-фосфат аминотрансферазата е известна още в научната литература с името глюкозамин-6-фосфат синтетаза (GlcN6P synthetase), тъй като участва в образуването на глюкозамин-6-фосфат (GlcN-6-P) в бактериалните клетки (Фиг.2). От друга страна, глмС като рибозима има свойството да действа като избирателен метаболитен сензор, който открива специфично наличието на глюкозамин-6-фосфат. По този начин всеки път при наличието на достатъчно количество глюкозамин-6-фосфат в бактериалната клетка, той действа като кофактор. Той деактивира каталитичната функция на рибозимата като предизвиква нейното саморазцепване. Така иРНК се дестабилизира, което води до липса на синтеза на глюкозамин-6-фосфат. При недостиг или пълна липса на глюкозамин-6-фосфат в бактериалната клетка, глмС рибозимата остава неактивна. По този начин иРНК остава цяла и информацията от нея успешно се транслира в глюкозамин-6-фосфат синтетаза. В резултат на това, глюкозамин-6- фосфат синтетазата катализира необходимото за бактерията количество глюкозамин-6- фосфат, докато нивото му не се повиши достатъчно и повече не е необходимо.

#### 4.1.1. Биоинформатичен анализ на човешки патогенни бактерии, съдържащи глмС рибопревключвател

Направен бе биоинформатичен анализ на разпределението на глмС рибопревключвателя сред организмите (Фиг.1). За целта е използвана базата данни на Rfam 14.1 и е открито, че с изключение на няколко неклассифицирани последователности (маркирани в синьо), глмС рибопревключвателят се открива

единствено сред бактериите. Техният брой според данните от Rfam е 920 вида, сред които 26 са патогенни за човека. От тези 26 бактерии, 13 са Грам-положителни и 13 са Грам-отрицателни бактерии.



**Фиг. 1. Разпространение на глмс рибопревключвателя.** Представената графика е генерирана чрез базата данни на Rfam 14.1 и показва разпространението на glmS рибопревключвателя сред организмите.

За да се добие по-ясна представа за значимостта на рибопревключвателя бе изготвен списък с всички патогенни за човека бактерии, съдържащи глмс рибопревключвател (Таблица 4). Сред тези бактерии е открито, че 8 бактерии са част от списък на Световната Здравна Организация (СЗО), съдържащ приоритетни патогени, нуждаещи се от спешно създаване и разработване на нови антибиотици- *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* и *Yersinia pestis*.

**Таблица 2. Списък на задължителни и условни патогени в човека, притежаващи glmS рибопревключвател.**

Бактериите, маркирани в синьо са част от списък за разботка и създаване на антибиотици срещу приоритетни патогени на Световната Здравна Организация (СЗО). С “-“ са означени Грам-отрицателните бактерии, а с „+“ са означени Грам-положителните бактерии.

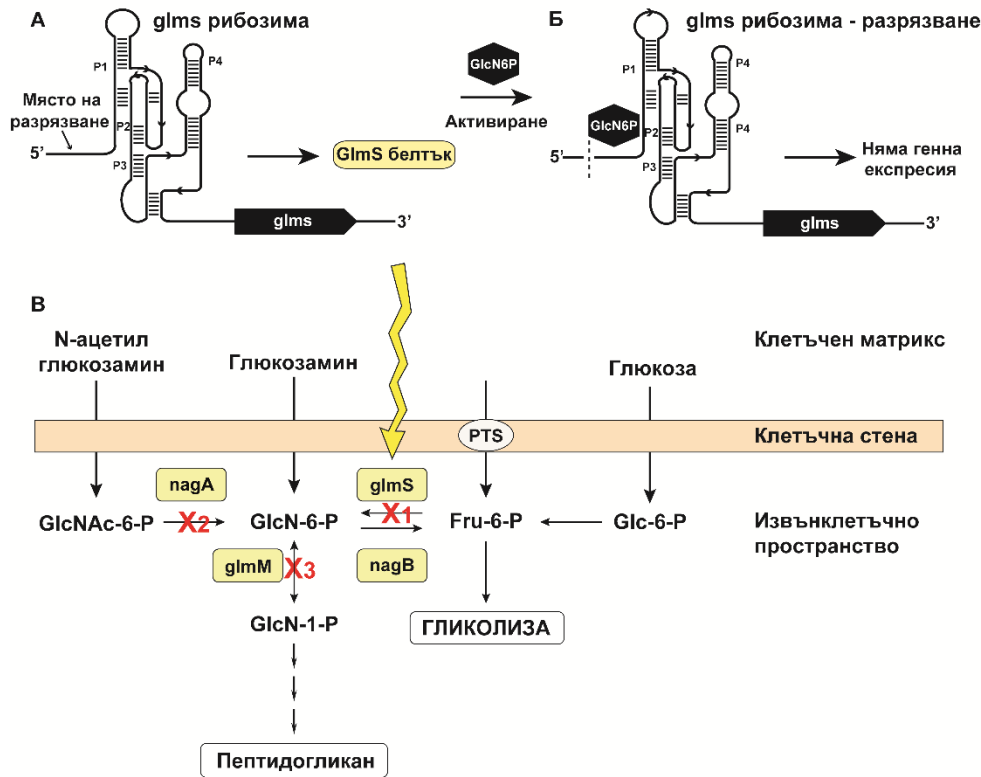
№	Патогенна бактерия	Грам	Заболявания
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Вътреболнична пневмония, инфекции на ЦНС, кожата и меките тъкани, и костите; кръвни инфекции, инфекция на пикочните пътища (ИПП), вторичен менингит, ендокардит
2	<i>Bacillus anthracis</i>	+	Антракс
3	<i>Bacillus cereus</i>	+	Хранително отравяне (синдром на еметично заболяване и диария), негастроинтестинална инфекция, очни инфекции (ендофталмит, кератит, панофталмит)
4	<i>Bordetella pertussis</i>	-	Коклюш
5	<i>Brucella abortus</i>	-	Бруцелоза
6	<i>Brucella canis</i>	-	Бруцелоза
7	<i>Brucella melitensis</i>	-	Бруцелоза
8	<i>Brucella suis</i>	-	Бруцелоза
9	<i>Clostridium botulinum</i>	+	Ботулизъм
10	<i>Clostridium difficile</i> ( <i>Clostridioides difficile</i> )	+	Свързана с антибиотика диария, възпаление и некроза на тъканите
11	<i>Clostridium perfringens</i>	+	Газова гангрена (кlostридиална мионекроза), хранително отравяне
12	<i>Clostridium tetani</i>	+	Тетанус
13	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	+	Дифтерит

14	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Бактериемия, ентерококов менингит, ендокардит, урологични инфекции (пиелонефрит), инфектирани рани
15	<i>Enterococcus faecium</i>	+	Бактериемия, ентерококов менингит, ендокардит, пиелонефрит
16	<i>Escherichia coli</i>	-	ИПП, ушна инфекция, инфекция на рани
17	<i>Francisella tularensis</i>	-	Туларемия
18	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Бактериемия, менингит, отит на средното ухо, епиглотит, синусит, остри обостряния на хроничен бронхит, пневмония
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Вътреболнични инфекции, неонатален сепсис, пневмония, инфекция на пикочните пътища, менингит, абсцеси на черния дроб, ендофталмит, интраабдоминална инфекция, инфекция на кожата и меките тъкани
20	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Листериоза, много рядко ендокардит и менингит
21	<i>Salmonella enterica</i>	-	Ентериална треска (кореман тиф)
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Инфекции на кожата и кръвта (бактериемия), пневмония, инфекциозен ендокардит, остеомиелит, естествен септичен артрит на ставите, инфекции, свързани с медицински устройства
23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	Вътреболнични и съдови катетърни инфекции на кръвния поток
24	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	Урологични инфекции като цистит и др.
25	<i>Vibrio cholerae</i>	-	Холера
26	<i>Yersinia pestis</i>	-	Чума

Сред гореспоменатите бактерии, притежаващи glmS рибопревключвател, е избраната мишена - условно патогенната бактерия *S. aureus*. Тя е сред водещите причинителни на инфекции, придобити в болница или сред обществото и със статут на високо приоритетен патоген в списъка с приоритетни патогени на СЗО. Тя е и на първо място по брой на докладвани случаи за поява на AP в базата данни на Medline-PubMed за 2017г. - 28 023 души [8]. Направен е биоинформатичен сравнителен анализ на glmS последователности от 6 бактерии – *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. epidermitis*, *S. saprophyticus* и мишената *S. aureus* (Фиг.11, представена в дисертационния труд). Последователностите бяха взети от базата данни на Rfam и след това бяха обработени чрез множествоно подравняване в програмата ClustalX. За дизайна на антисенс олигонуклеотид, който да хибридува с glmS рибопревключвателя, бе необходимо да се избере мишенна последователност, която да има пълно съвпадение с нуклеотидна област единствено в мишенния организъм.

Извършен бе биоинформатичен анализ на биохимичните пътища за синтез на глюкозамин-6-фосфат в патогена *S. aureus*. Глюкозамин-6-фосфатът е ключов метаболит, необходим за образуването на пептидогликан в бактериалната клетъчна стена. Това се дължи на факта, че той е част от аминокиселинния и нуклеотиднозахарния метаболитизъм при бактериите (фиг.2B). Демонстрираните на фиг.2B пътища са построени в съгласие с доказаните до момента биохимични пътища в базата данни на KEGG pathway при *S. aureus*. От там става ясно, че има 3 възможни биохимични пътя за контрол на синтезата на глюкозамин-6-фосфат (X1, X2 и X3, фиг.2B). Първият, означен като X1, се осъществява чрез конвертиране на фруктозо-6-фосфат (Fru-6-P) в глюкозамин-6-фосфат с помощта на вече споменатата глюкозамин-6-фосфат синтетаза (т.е. превръщане от кетоза в алдоза). Вторият път, означен в червено с X2 на фиг.2B, се осъществява посредством деацетиране на N-ацетилглюкозамин-6-фосфат с помощта на ензима N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза (*pagA*). Третият път, означен като X3, е обратен и включва получаването на глюкозамин-6-фосфат от глюкозамин-1-фосфат и обратно. Важно да се отбележи е, че при анализа на биохимичните пътища не се откри друг път за получаване на глюкозамин-1-фосфат и се очаква,

че снабдяването на клетката с необходимия глюкозамин-6-фосфат по този път би било недостатъчно за клетъчната преживяемост при успешно инхибирани X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub>.



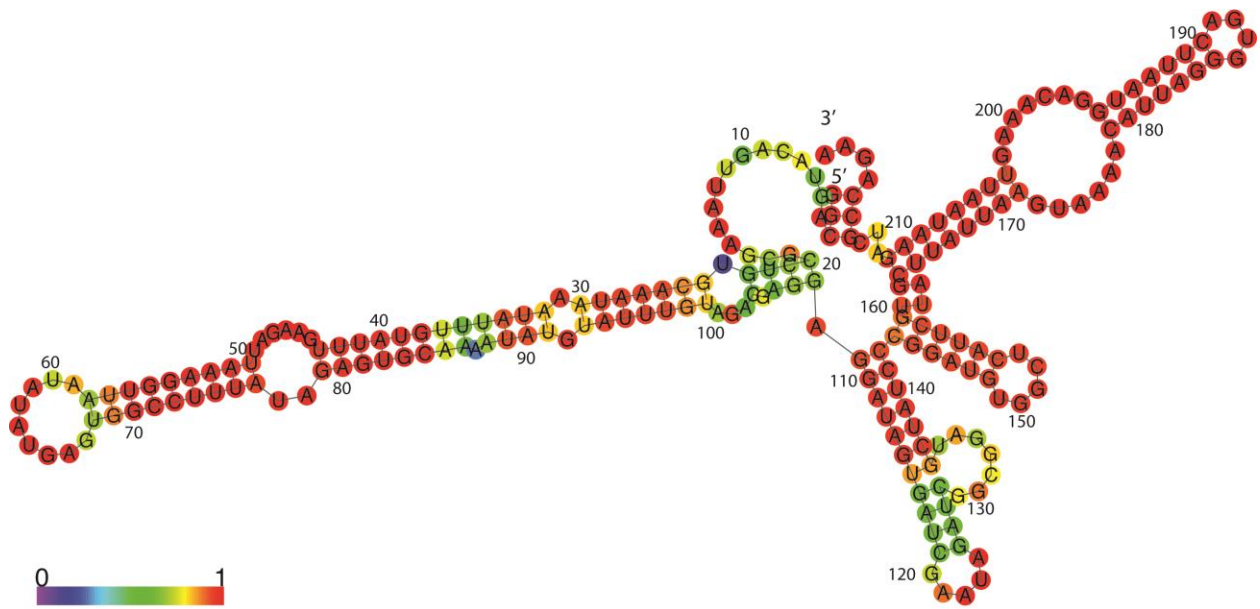
**Фиг. 2.** Схематично представяне на регулацията на глмС рибопревключвателя/рибозима чрез дестабилизиране на иРНК и неговото място в биохимичния път за получаване на пептидогликан при *S. aureus*. (А) В неактивно състояние на глмС рибопревключвателя при липсата на глюкозамин-6-фосфат, глмС белтъкът (глюкозамин-6-фосфат синтетаза) се експресира; (Б) Активиране на глмС рибопревключвателя в присъствието на глюкозамин-6-фосфат води до саморазцепването му, дестабилизиране на иРНК и липса на генна експресия на глмС белтъка; (В) Налични са 3 биохимични пътя за получаване на GlcN-6-P, означени с X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> и X<sub>3</sub>.

Преди да се пристъпи до дизайна на АСО1 бе необходимо да се извърши и друг анализ по две причини. Първо, присъствието на *glmS* рибопревключвателя е доказано експериментално в други щамове на *S. aureus* (като *S. aureus* clone sabac-11), но не и в избрания в настоящата докторска дисертация. В следствие от това, втората причина бе, че разположението на *glmS* рибопревключвателя бе неизвестно в генома на мишенния патоген. По дефиниция рибопревключватели се откриват предимно в 5'-нетранслирания район на иРНК, но има случаи и в 3'-нетранслирания район. В мишенния щам генът за *glmS* се открива в хромозомата в района от

2185124nt до 2186929nt. Именно затова извърших blast- търсене в базата данни на GenBank в 5'- и 3'-нетранслираните райони около гена, благодарение на които намерих района от хромозомата на *S. aureus*, в който се намира glmS рибозимата (посочено във Фиг.13А в дисертационния труд). Последователността, която бе въведена за blast- анализ бе открита чрез сравняване и цялостно подравняване спрямо последователността на вече доказания glmS рибопревключвател в *S. aureus* clone sabac-11 от базата данни на Rfam. Сравняването е извършено чрез EMBOSS Needle, ползващ Нийдълман- Вунш (Needleman-Wunsch) алгоритъма за подредба на нуклеотидни и пептидни последователности и даващ % информация за наличието на сходност между тях (посочено във фиг.13Б в дисертационния труд). Резултатът показва силно запазена мотивна област в 5'-UTR на негативната верига между двата щама с 98,2% идентичност и 98,2% сходност. Разликата се изразява единствено в 1 нуклеотидна база аденин на 87 позиция спрямо 1 база урацил на същата позиция в последователността на *S. aureus* clone sabac-11. Чрез този биоинформатичен начин бе потвърдено присъствието на glmS рибопревключвателя в изчисления за мишена щам *S. aureus* subsp. *aureus* Rosenbach.

Използвана е програмата на Vienna RNAfold, за да се изчисли предполагаемата вторична структура на glmS рибопревключвателя (Фиг.3). Това става на базата на пресмятане на минималната свободна енергия (MFE) и нагъване по дяловата функция (*англ.*partition function folding), като при това е възможно получаването и на не-Уотсън-Крик двойки. Това е възможно, защото редки тавтомерни двойки бази са с предимство ако формирането им води до намаляване на общата свободна енергия на РНК молекулата.





**Фиг.3.** Предполагаема вторична структура на нагъването на **glmS** рибопревключвател при *S. aureus*. Структурата е направена чрез софтуерът на Rfam (версия 13.0) като вероятността за образуване на определената вторична структура е означена от 0 (лилаво) към 1 (червено).

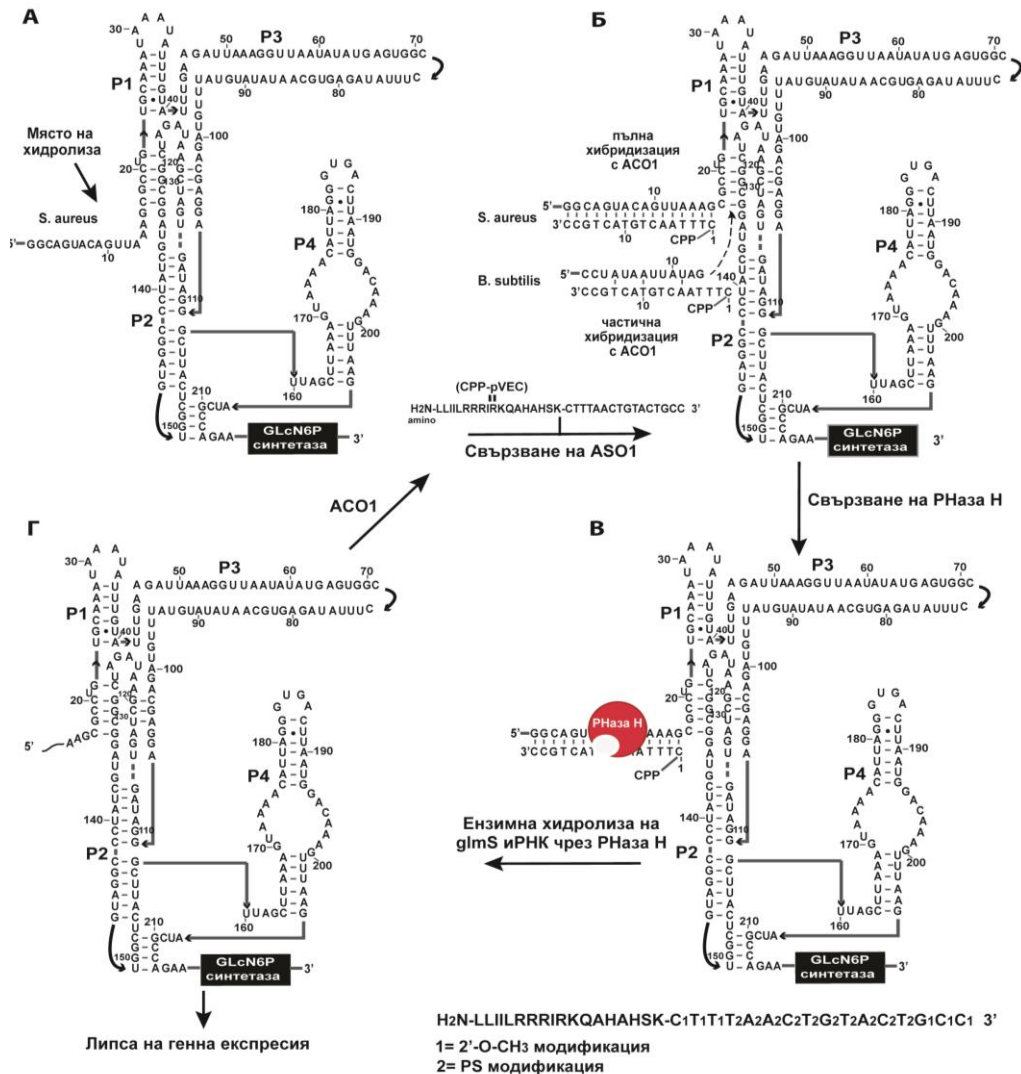
#### 4.1.2. Дизайн на антисенс олигонуклеотида АСО1, хибридиращ с глмС рибопревключвател

За дизайна на АСО1 е избрано да се работи с щам на патогенната бактерия *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), който е често използван в лабораторни условия за тестване на устойчивост към антибиотици и други терапевтични агенти. С цел хибридизация на АСО1 с глмС рибопревключвателя при този щам е подбрана част от неговия аптамерен домен със следната секвенция: 5'- GGCAGUACAGUUAAG- 3'. Избраната мишена е специфична само за този щам и при потенциално прилагане в човешкия организъм АСО1 не би предизвикал инхибиране на полезните бактерии с глмС рибопревключвател.

Както вече бе споменато, антисенс олигонуклеотидите се разделят на 3 поколения според модификациите, които им се прилагат. Взимайки предвид преимуществата и недостатъците на всяко едно поколение (обсъдено в т.2.1.2), направеният дизайн на АСО1 включва комбинация от модификации от първо и

второ поколение. Приложената модификация от първо поколение се изразява в това, че и в двата края на АСО1 стандартната фосфодиестерна връзка е заменена с фосфотиоатна връзка, при която един кислороден атом е заменен от серен атом). Другата приложена модификация (второ поколение) е на пентозния пръстен на 2' позиция. Там единият водороден атом е заменен от О-СН<sub>3</sub> група, т.е. приложено е метилиране. Това важи за всички централно разположени нуклеотиди. Последователността на АСО1, която се получава след тези модификации, придобива следния вид: 5'- С<sub>1</sub>Т<sub>1</sub>Т<sub>1</sub>Т<sub>2</sub>А<sub>2</sub>А<sub>2</sub>С<sub>2</sub>Т<sub>2</sub>Г<sub>2</sub>Т<sub>2</sub>А<sub>2</sub>С<sub>2</sub>Т<sub>2</sub>Г<sub>1</sub>С<sub>1</sub>С<sub>1</sub>- 3', където с „1“ се обозначават 2'-О-СН<sub>3</sub> модификациите, а с „2“ - фосфотиоатните модификации. По този начин се получава гаптамерна структура. Тя позволява да се активира РНаза Н- индуцирана хидролиза на мишенната иРНК (заради PS-модификациите), като едновременно с това 2'-О-СН<sub>3</sub> модификациите предпазват АСО1 секвенцията от разграждане от ендонуклеази и екзонуклеази *in vivo*. В допълнение, метилирането спомага и за по-високата специфичност на свързването с мишенната секвенция, а прикрепения в 5' края на нуклеотидната част белтък рVEC със последователност: LLILRRRIRKQАНАНСК (ОН) спомага за по-лесния пренос и прием на АСО1 в организма.

Въз основа на направения дизайн е представен схематично механизма на действие на АСО1 (фиг.4). На фиг.4А е представена структурата на glmS рибопревключвателя на *S. aureus* (ATCC 25923) като със стрелка е посочено мястото на хидролиза. При навлизане на АСО1 в бактериалната клетка с помощта на рVEC, АСО1 хибридизира напълно с мишенната си в аптамерния домен на glmS рибопревключвателя съгласно правилото на Уотсън- Крик за комплементарност (фиг.4Б). Поради различието в последователността на glmS рибопревключвателя при *B. subtilis* (демонстрирано и в фиг.11, АСО1 хибридизира само частично с тази бактерия. В резултат се образува двойноверижен участък само при *S. aureus*, който бива разпознат от ендонуклеазния ензим РНаза Н и се предизвиква ензимна хидролиза на този участък (фиг.4В). По този начин липсва генна експресия на глюкозамин-6-фосфат синтетаза, докато АСО1 остава незасегнат от ендонуклеазата и продължава да се свързва по същия начин с други мишенни иРНК (фиг.4Г).



**Фиг. 4. Схематично представяне на механизма на действие на ASO1, прицелващ се в аптамерния домен на глмС рибопревключвателя. (А)** Структура на глмС иРНК при *S. aureus* преди третиране с ASO1; **(Б)** Пълна хибридизация на ASO1 с комплементарната мишенна последователност на глмС аптамера при *S. aureus*, докато при *B. subtilis* хибридизацията е само частична; **(В)** Образувания двойноверижан ДНК-РНК участък е разпознат от РНаз Н, благодарение на PS-модификациите, при което се активира ензимна хидролиза на глмС иРНК; **(Г)** Ензимната хидролиза води до липса на генна експресия на глюкозамин-6-фосфат синтетазата.

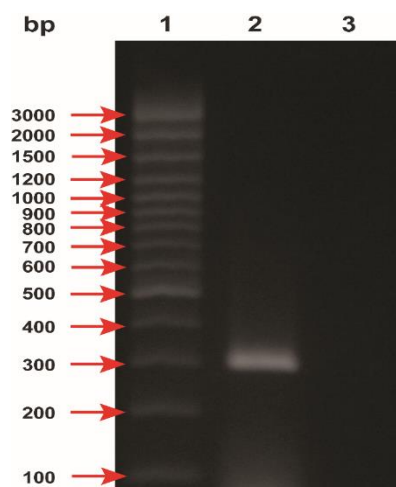
След като дизайнът и мишената на ASO1 бяха определени, извърших допълнителен биоинформатичен анализ в базата данни на NCBI. За целта е използвана RNA Reference Sequence (RefSeq), в която сравнявам мишенната последователност на ASO1 с всички експресиращи се РНК молекули в човешкия организъм. Резултатите показаха липса на пълно съвпадение с цялата

последователност на АСО1 с наличие на несъответстващи (*англ.* mismatch) бази или пропуски (*англ.* gaps) между отделни нуклеотидни двойки. На фиг.16 в дисертационния труд са посочени трите най-близки попадения с базата данни, които се характеризират със 100% идентичност на 14 от 16-те бази, но само 87% покритие с тях. Два от резултатите се намират в 2 различни транскриптни варианта на paired box 6 (PAX6) иРНК, която се кодира от PAX6 гена в 11p13 хромозома. Първият е транскриптен вариант 16, а вторият е транскриптен вариант 45 като общия брой на срещаните вариации на транскрипта към момента е 1088 ([http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select\\_db=PAX6](http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select_db=PAX6)). Третият най-близък резултат е в FAM171B иРНК, чийто кодиращ ген се намира в 2q32.1 хромозомата (по данни на Entrez Gene). Липсата на пълно съвпадение и с трите иРНК означава, че АСО може да бъде използван за третиране в човешкия организъм без да образува нежелани хибридизации с PAX6 иРНК и FAM171B иРНК.

#### **4.1.3. Експериментално тестване на инхибиторното действие на АСО1 върху бактериалния растеж и развитие**

За тестване на ефективността на създадения АСО1 са извършени 2 типа експерименти. Първият тип експерименти изискваше изолиране на тотална РНК от мишенната бактерия *S. aureus* и провеждане на PCR, а вторият тип бе тестване на бактериалния растеж чрез фотоспектрометър. Съгласно описания в т.4.2.3 протокол са изолирани 2 проби – една от тотална РНК в отсъствието на АСО1 и една проба от третирана с 2000nM АСО1 бактерия. Изолираните проби се третират с ДНаза, пречистена от РНазна активност като по този начин се премахват останалите следи от геномна ДНК, а чрез ензима обратна транскриптаза получените тотални РНК-и са обратно транскрибирани в копиДНК (кДНК). След това е извършен PCR с кДНК пробите като за целта използвах праймери, чиято последователност е посочена в раздел 4.1.3 на Материали и методи. Правият праймер започва от 2 187 331 нуклеотидна позиция от обратната ДНК верига на *S. aureus* ATCC 25923 и завършва на 2 187 350 нуклеотидна позиция. Обратният праймер започва от 2 187 088 нуклеотидна позиция на правата верига и завършва

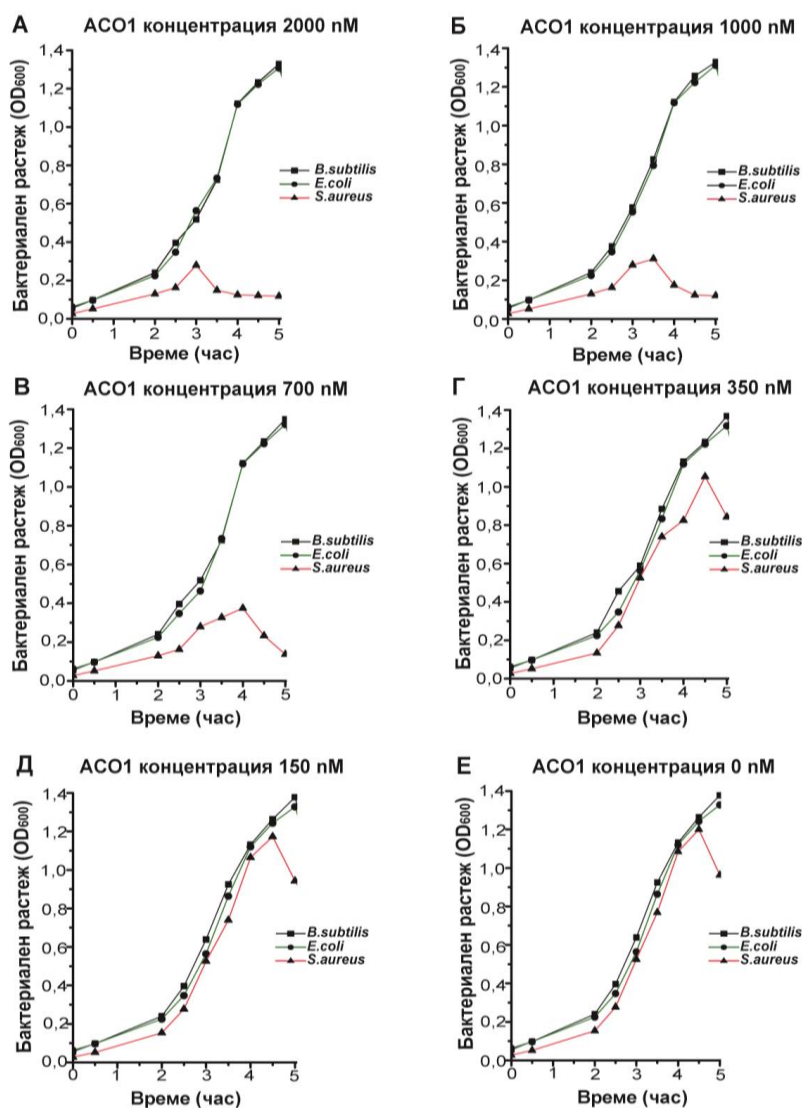
на 2 187 107 нуклеотидна позиция. Получените ДНК амплифицирани проби са преципитирани (съгласно т.4.2.3 в дисертационния труд) и нанесени на агарозен гел за гелова електрофореза. Резултатите от електрофорезата са показани на фиг.5. Наличие на амплификация се наблюдава в пробата, съдържаща кДНК на нетретирани с АСО1 бактерии *S. aureus* (проба №2). Липса на амплификация, поради успешно разгаждане на иРНК от АСО1, се наблюдава при проба №3. Размерът на двете проби е определен чрез ДНК стълба от 100бд до 3000бд (проба №1).



**Фиг. 5. Гел електрофореза на глмС рибопревключвателя в *S. aureus*.** Проба №1 съдържа контролната ДНК стълба от 100бд-3000бд, която служи за определяне на размера на останалите ДНК проби. Проба №2 съдържа PCR-амплифицирана *glmS* кДНК (сDNA) в отсъствието на АСО1. В проба №3 липсва банд, поради липсата на амплификация на глмС иРНК в присъствието на АСО1.

Тествана е ефективността на АСО1 да се свързва с глмС рибопревключвателя в човешките условни патогени *S. aureus* и *E. coli*, както и в непатогенната за човека бактерия *B. subtilis*. Последователността на АСО1 е създадена да хибридизира напълно само и единствено с *S.aureus*, докато при *E. coli* и *B. subtilis* АСО1 не хибридизира поради слабата степен на комплементарност с техните бази, съгласно правилото на Уотсън-Крик. Затова е извършена поредица от експерименти при различни концентрации на АСО1 в мишената *S. aureus*, , които бяха сравнени с контролни проби на *E. coli* и *B. subtilis*, третирани с АСО1. В пробите, третирани с най-висока концентрация от 2000nM АСО1, се наблюдава максимално инхибиране на бактериалния растеж от приблизително 92% ( $OD_{600} = 0.143 \pm 0.003$ ) на *S. aureus*, докато при *E. coli* и *B. subtilis* липсва инхибиране (Фиг.6А). Максимален растеж на *S. aureus* се достига 3 часа след инкубацията с 2000nM АСО1 със стойност  $OD_{600} = 0.307 (\pm 0.012)$ . При същата приложена концентрация, бактериите *E. coli* и *B. subtilis* достигат максимален

растеж 5 часа след третирането им с АСО1 с приблизителна стойност  $OD_{600} = 1.341(\pm 0.011)$ . С прилагането на по-ниски концентрации на АСО1 се наблюдава постепенно намаляване на инхибиращото действие в *S. aureus* като при 150nM АСО1 кривата на растеж е почти еднаква с тази на бактерията, култивирана в отсъствие на АСО1 (Фиг.6Д). Кривите на бактериалния растеж на *E. coli* и *B. subtilis* остават непроменени с намаляването на прилаганите концентрации на АСО1. На базата на получените резултати бе изчислена минимална инхибиторна концентрация  $MIC_{80} = 700nM$  (5  $\mu g/ml$ ), при която 80% от бактериалния растеж е инхибиран.



**Фиг.6.** Проследяване на криви на бактериален растеж след третиране на три вида бактерии с различни концентрации на АСО1.

**(А)** Бактериите *B. subtilis* (черна линия), *E. coli* (зелена линия) и *S. aureus* (червена линия) са третирани с 2000nM АСО1; **(Б)** Бактериите *B. subtilis* (черна линия), *E. coli* (зелена линия) и *S. aureus* (червена линия) са третирани с 1000nM АСО1; **(В)** Бактериите *B. subtilis* (черна линия), *E. coli* (зелена линия) и *S. aureus* (червена линия) са третирани с 700nM АСО1; **(Г)** Бактериите *B. subtilis* (черна линия), *E. coli* (зелена линия) и *S. aureus* (червена линия) са третирани с 350nM АСО1; **(Д)** Бактериите *B. subtilis* (черна линия), *E. coli* (зелена линия) и *S. aureus* (червена линия) са третирани с 150nM АСО1; **(Е)** Контролни проби на бактериите *B. subtilis* (черна линия), *E. coli* (зелена линия) и *S. aureus* (червена линия), които не са третирани с АСО1.

## 4.2. N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза /ACO2/

N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилазата е позната още със съкратените наименования GlcNAc-6-фосфат деацетилаза или NagA. Тя представлява ензим, който се кодира от nagA гена и катализира деацетилирането на въглехидрата N-ацетилглюкозамин-6-фосфат (GlcNAc-6-P) в глюкозамин-6-фосфат (GlcN-6-P) (фиг.2). Тя представлява обект на интерес в настоящата дисертация поради ролята, която заема в алтернативния (втори) път на биосинтез на GlcN-6-P в бактерията *S. aureus*.

### 4.2.1. Биоинформатичен анализ

Направен бе биоинформатичен анализ на разпределението на nagA гена сред бактериите. За тази цел е използвана базата с данни на Ensembl Bacteria (release 45 - September 2019), където е открито, че генът nagA е идентифициран в 41 662 гена на различни щамове бактерии. Сред тях открих 106 условни и задължителни патогени, сред които 48 са Грам- положителни и 57 са Грам-отрицателни (Таб.3). Въз основа на получените данни изготвих списък с патогенните бактерии под формата на таблица, като разделих Грам-положителните и Грам-отрицателните бактерии в отделни колони и ги подредих под азбучен ред. След това съпоставих тези бактерии с патогените, съдържащи glmS рибопревключвател и открих, че 20 от тях са общи с получените резултати: *Bacillus anthracis* (Г+), *Bacillus cereus* (Г+), *Brucella abortus* (Г-), *Brucella canis* (Г-), *Brucella melitensis* (Г-), *Brucella suis* (Г-), *Clostridium difficile* (Г+), *Enterococcus faecalis* (Г+), *Enterococcus faecium* (Г+), *Escherichia coli* (Г-), *Francisella tularensis* (Г-), *Haemophilus influenzae* (Г-), *Klebsiella pneumoniae*(Г-), *Listeria monocytogenes* (Г+), *Salmonella enterica* (Г-), *Staphylococcus aureus* (Г+), *Staphylococcus epidermidis* (Г+), *Staphylococcus saprophyticus* (Г+), *Vibrio cholera* (Г-) и *Yersinia pestis* (Г-).

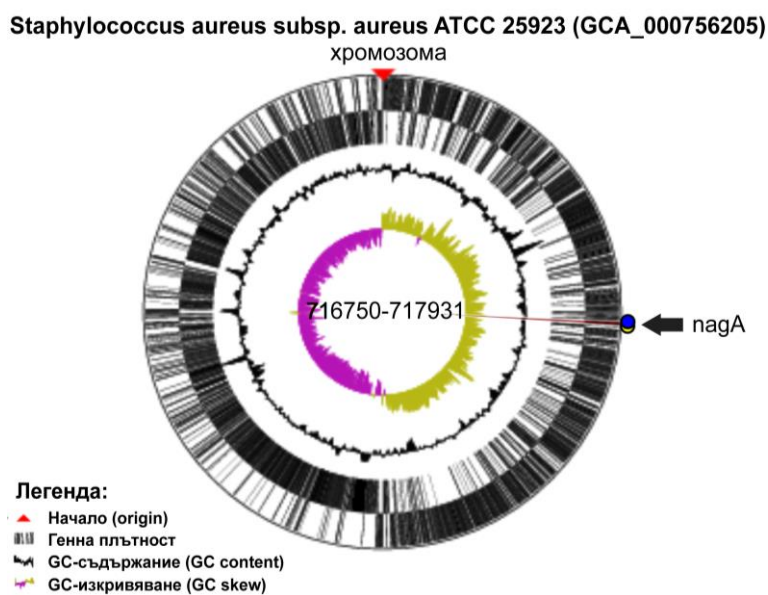
**Таблица 3. Списък на задължителни и условни патогени в човека, притежаващи nagA ген.** Списъкът е изготвен чрез информация, свалена от базата с данни на Ensembl Bacteria (release 45). Грам- положителните и Грам-отрицателните бактерии са подредени в отделни колони по азбучен ред. Със зелена маркировка са означени патогенни човешки бактерии, които притежават и glmS рибопревключвател.

№	Бактерия	Грам	№	Бактерия	Грам
1	<i>Aerococcus urinae</i>	+	1	<i>Actinobacillus ureae</i>	-
2	<i>Aerococcus viridans</i>	+	2	<i>Aeromonas caviae</i>	-
3	<i>Bacillus anthracis</i>	+	3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
4	<i>Bacillus cereus</i>	+	4	<i>Aeromonas schubertii</i>	-
5	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	5	<i>Aeromonas veronii</i>	-
6	<i>Bacillus pumilus</i>	+	6	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-
7	<i>Bacillus subtilis</i>	+	7	<i>Asaia bogorensis</i>	-
8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	8	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
9	<i>Clostridioides difficile</i> (syn. <i>Clostridium difficile</i> )	+	9	<i>Bifidobacterium dentium</i>	-
10	<i>Clostridium sporogenes</i>	+	10	<i>Borrelia garinii</i>	-
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	11	<i>Brucella abortus</i>	-
12	<i>Enterococcus faecium</i>	+	12	<i>Brucella canis</i>	-
13	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+	13	<i>Brucella melitensis</i>	-
14	<i>Gardnerella vaginalis</i>	+	14	<i>Brucella suis</i>	-
15	<i>Gemella haemolysans</i>	+	15	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	-
16	<i>Gordonia effusa</i>	+	16	<i>Burkholderia gladioli</i>	-
17	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	+	17	<i>Burkholderia glumae</i>	-
18	<i>Lactococcus lactis</i>	+	18	<i>Burkholderia pseudomall</i>	-
19	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	19	<i>Burkholderia thailandensis</i>	-
20	<i>Mycobacterium abscessus</i>	+	20	<i>Citrobacter freundii</i>	-
21	<i>Mycobacterium africanum</i>	+	21	<i>Citrobacter koseri</i>	-
22	<i>Mycobacterium avium</i>	+	22	<i>Cupriavidus necator</i>	-
23	<i>Mycobacterium bovis</i>	+	23	<i>Edwardsiella tarda</i>	-
24	<i>Mycobacterium marinum</i>	+	24	<i>Escherichia albertii</i>	-
25	<i>Mycobacterium microti</i>	+	25	<i>Escherichia coli</i>	-
26	<i>Mycobacterium sinense</i>	+	26	<i>Escherichia vulneris</i>	-
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	27	<i>Francisella tularensis</i>	-
28	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	+	28	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-
29	<i>Nocardia nova</i>	+	29	<i>Haemophilus ducreyi</i>	-
30	<i>Olsenella uli</i>	+	30	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
31	<i>Paenibacillus alvei</i>	+	31	<i>Klebsiella michiganensis</i>	-
32	<i>Paenibacillus larvae</i>	+	32	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
33	<i>Paeniclostridium sordellii</i> (syn. <i>Clostridium sordellii</i> )	+	33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
34	<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	34	<i>Klebsiella variicola</i>	-
35	<i>Rhodococcus equi</i>	+	35	<i>Mannheimia haemolytica</i>	-
36	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	36	<i>Mycoplasma mycoides</i>	-
37	<i>Staphylococcus capitis</i>	+	37	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-
38	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	38	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	-
39	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	39	<i>Pantoea agglomerans</i>	-
40	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	+	40	<i>Pantoea ananatis</i>	-
41	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	41	<i>Pasteurella multocida</i>	-
42	<i>Staphylococcus warneri</i>	+	42	<i>Proteus vulgaris</i>	-
43	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	43	<i>Providencia stuartii</i>	-
44	<i>Streptococcus equi</i>	+	44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-



45	<i>Streptococcus intermedius</i>	+	45	<i>Rahnella aquatilis</i>	-
46	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	+	46	<i>Raoultella planticola</i>	-
47	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	47	<i>Salmonella bongori</i>	-
48	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	48	<i>Salmonella enterica</i>	-
			49	<i>Serratia fonticola</i>	-
			50	<i>Serratia marcescens</i>	-
			51	<i>Shigella flexneri</i>	-
			52	<i>Shigella sonnei</i>	-
			53	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
			54	<i>Vibrio cholerae</i>	-
			55	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
			56	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
			57	<i>Yersinia pestis</i>	-

Предвид поставената цел в т.2.1 избраният мишенен организъм за инхибиране отново е *S. aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), за да се направи дизайн на нов антисенс олигонуклеотид (ACO2) и експериментално да се тества ефекта върху бактериалните клетки при комбинирано потискане на първия и втория път за снабдяване на клетката с глюкозамин-6-фосфат (Фиг.2). Разположението на *nagA* генът в хромозомата на *S. aureus* е между 716 750nt и 717 931nt от водещата верига (Фиг.7).



**Фиг. 7.** Разположение на *nagA* гена в генома на бактерията *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach

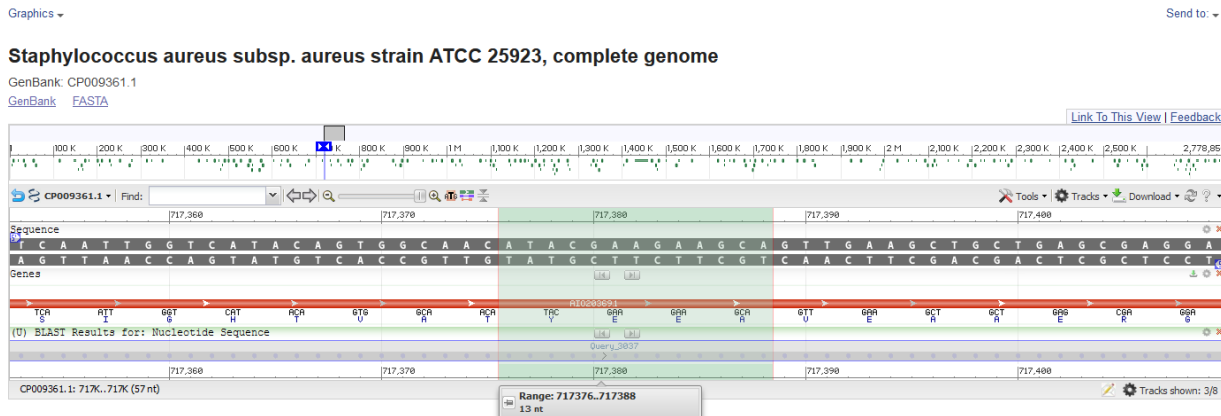
Чрез базата данни на GenBank се сдобих с пълната нуклеотидна последователност на pagA гена (5'-3'):

GTGTCAGAATTAATTATATATAACGGCAAAGTTTATACTGAAGATGACAAAATCGATAATGG  
TTACATTCATGTGAAAGATGGACAGATTGTTGCAATTGGAGAAGTGGATGATAAAGCAGCG  
ATTGATAATGATACGACAAAATAAAATTCAAGTGATTGATGCAAAAGGTCATCATGTATTACC  
AGGTTTTATCGATATACATATTCATGGTGGTTATGGACAGGATGCAATGGATGGGGTCATAC  
GATGGCTTAAAATATCTATCCGAAAATTTGTTGTCTGAAGGGACGACATCGTACTTGGCCA  
CTACAATGACGCAATCGACTGATAAAATAGATAAAGCACTTATAAATATTGCTAAATATGAA  
GTGGAGCAAGATGTTTACAATGCAGCGGAAATTGTAGGTATACATTTGGAAGGGCCATTTA  
TATCTGAAAATAAAGTTGGTGCTCAACATCCGCAATACGTTGTACGCCATTTATCGATAAA  
ATTAACATTTTTCAAGAGACTGCTAACGGACTAATAAAGATTATGACGTTTGCACCTGAAGT  
TGAAGGTGCAAAAGAAGCGCTTGAACGTATAAAGATGACATTATTTTTTCAATTGGTCATA  
CAGTGGCAAC**ATACGAAGAAGCAG**TTGAAGCTGCTGAGCGAGGAGCTAACATGTCACG  
CATTTATATAATGCAGCGACGTCATTCCAACATAGAGAACCAGGTGTTTTTGGAGCAGCAT  
GGTTGAATGATGCTTTACATACCGAAATGATTGTTGATGGCACACATTCTCATCCGGCATC  
GGTTGCAATTGCTTACCGTATGAAAGGTAATGAACGTTTTTATTTAATTACCGATGCAATGC  
GTGCAAAAGGTATGCCTGAAGGAGAATATGATTTGGGTGGTCAAAAAGTAACTGTTCAATC  
GCAACAAGCACGTCTTACAATGGTGCACCTTGTGGTAGTATTTTAAAAATGAATCATGGGT  
TACGTAACCTTAATATCATTTACAGGTGATACATTAGATCATTTATGGCGTGAACAAGTTTAA  
ATCAAGCCATTGCATTAGGTATCGATGATAGAAAAGGTAGTATTTAAAGTAAATAAGGATGCA  
GATCTTGTTATTCTAGATGATGACATGAATGTAAAATCTACAATAAAACAAGGTAAGGTTCA  
CACATTTAGCTAA

Тя бе транскрибирана в РНК последователност с помощта на <http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/trans.htm>

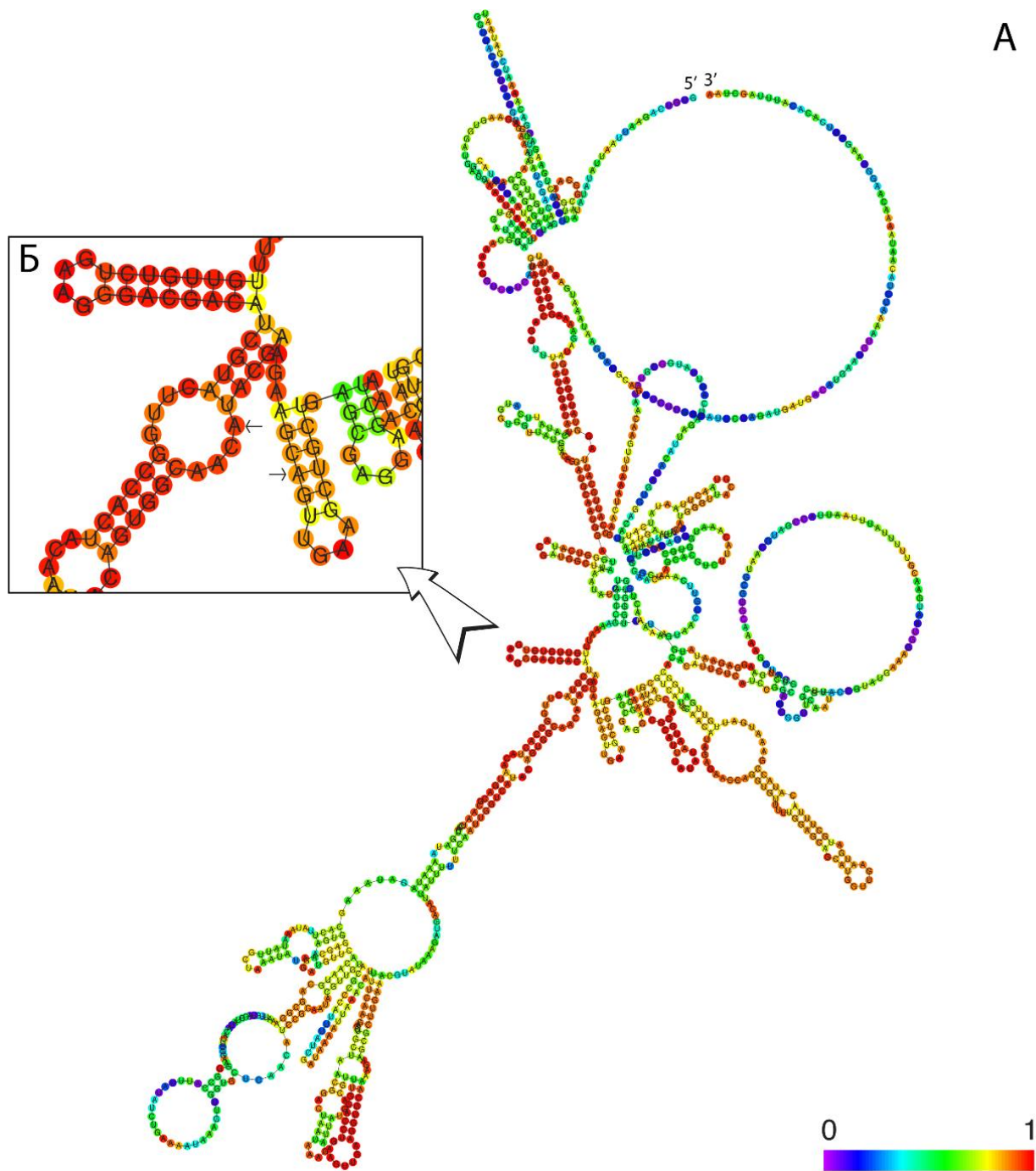
GUGUCAGAAUUAUUUAUUAUUAACGGCAAAGUUUAUACUGAAGAUGACAAAUCGAUAAU  
GGUUACAUCUUGUGAAAGAUGGACAGAUUGUUGCAAUUGGAGAAGUGGAUGAUAAAGC  
AGCGAUUGAUAAUGAUACGACAAAUAUUUAUUAAGUGAUUGAUGCAAAAGGUCAUCAUG  
UAUUACCAGGUUUUAUCGAUUAUCAUUAUUGGUGGUUAUGGACAGGAUGCAAUGGAU  
GGGUCAUACGAUGGCUUAAAAUAUCUAUCCGAAAUUUGUUGUCUGAAGGGACGACAUC  
GUACUUGGCCACUACAUGACGCAAUCGACUGAUAAAAUAGAUAAAGCACUUAUUAAUUAU  
UGCUAUUUAUGAAGUGGAGCAAGAUGUUCACAAUGCAGCGGAAAUUUGUAGGUUAUCAUU  
UGGAAGGGCCAUUUUAUUCUGAAAAUAAAGUUGGUGCUCACAUCGCAAUACGUUGUA  
CGCCCAUUUAUCGAUAAAAUUAACAUUUUCAAGAGACUGCUAACGGACUAAUUAAGAUU  
AUGACGUUUGCACCUGAAGUUGAAGGUGCAAAGAAGCGCUUGAACGUUAUAAAGAUGA  
CAUUUUUUUUCAAUUGGUCAUACAGUGGCAAC**AUACGAAGAAGCAG**UUGAAGCUGCU  
GAGCGAGGAGCUAAACAUGUCACGCAUUUAUUAUUAUGCAGCGACGCUAUUCCAACAUAJ  
AGAACCAGGUGUUUUUGGAGCAGCAUGGUUGAAUGAUGCUUUACAUAACCGAAAUGAUU  
GUUGAUGGCACACAUUCUCAUCCGGCAUCGGUUGCAAUUGCUUACCGUAUGAAAGGUA  
AUGAACGUUUUUUAUUUAUUACCGAUGCAAUGCGUGCAAAGGUAUGCCUGAAGGAGAA  
UAUGAUUUUGGUGGUCAAAAGUAACUGUUCAAUUCGCAACAAGCACGUCUUAACAAUUGG  
UGCACUUGCUGGUAGUAUUUUUAAAAUGAAUCAUGGGUUACGUAACUUAUUUAUCAUUUA  
CAGGUGAUACAUAUGAUCUUUAUGGCGUGUAACAAGUUUUAAUUAAGCCAUUGCAUUA  
GGUAUCGAUGAUAGAAAAGGUAGUAUUAAAGUAAAUAAGGAUGCAGAUUCUUGUUAUUCU  
AGAUGAUGACAUGAAUGUAAAUCUACAUAUAAACAAGGUAAGGUUCACACAUUUAGCUA  
A

В удебен шрифт и сива маркировка е отбелязана мишенната последователност, която бе избрана след допълнителни blast-анализи. Тя е разположена между 717 376нт и 717 388нт от водещата верига на бактериалната хромозома (Фиг.8). При анализите потенциалната мишенна последователност беше сравнявана с тези на всички секвенирани организми в базата данни на NCBI, сред които се включват човешкия организъм и полезните за неговата микрофлора микроорганизми. Това бе постигнато чрез RefSeq анализ, който е част от blast възможностите за анализ (демонстрирано във Фиг.21 в дисертациония труд). В резултат той успешно показва не само липсата на идентични мишенни последователности в други бактериални геноми или в човешкия геном, но и сред всички останали секвенирани организми от всички домени. По този начин се гарантира уникалността на избрания от мен участък в pagA гена и неговия потенциал като строго специфична мишена за насочена терапия.



**Фиг. 8. Разположение на ACO2 мишенната последователност в pagA гена на *S. aureus*.**

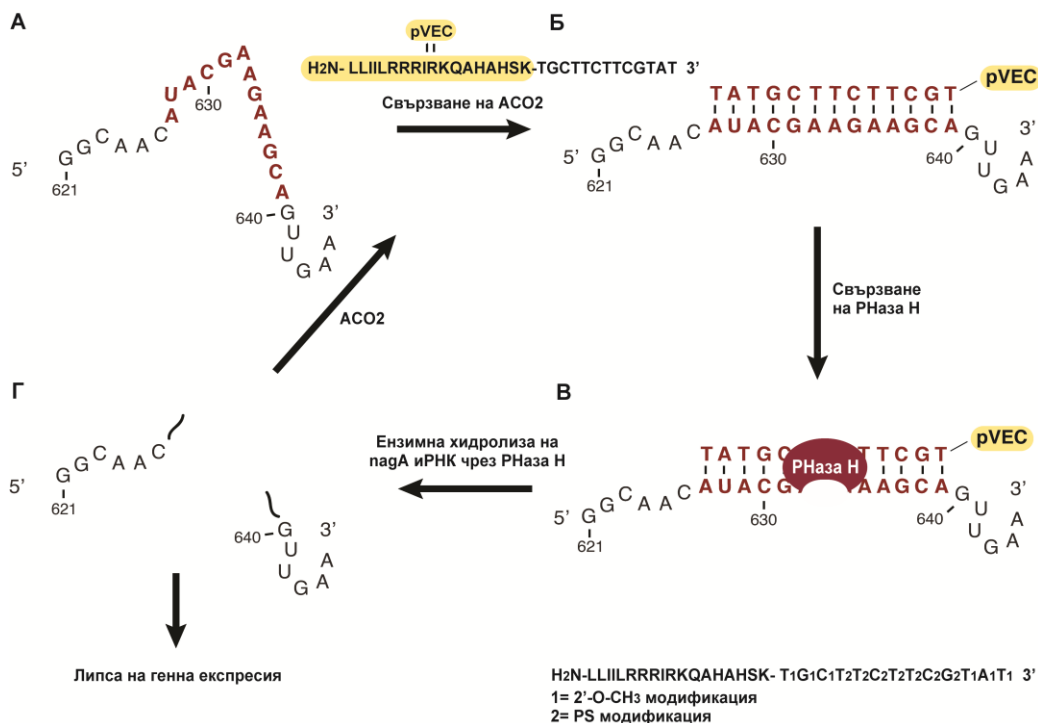
В допълнение последователността на pagA иРНК е подложена на моделиране на предполагаема вторична структура и полученият модел може да се види на Фиг.9.



**Фиг. 9.** Предполагаема вторична структура на нагъването на N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилазна (*pagA*) иРНК при *S. aureus*. (A) Представяне на цялостната вторична структура на *pagA* иРНК при *S. aureus*. (Б) Увеличено изображение на мишенната област от *pagA* молекулата. Вторичната структура е получена чрез софтуера на Rfam (версия 14.1) като вероятността за образуване на определената вторична структура е означена от 0 (лилаво) към 1 (червено).

#### 4.2.2. Дизайн на антисенс олигонуклеотида АСО2

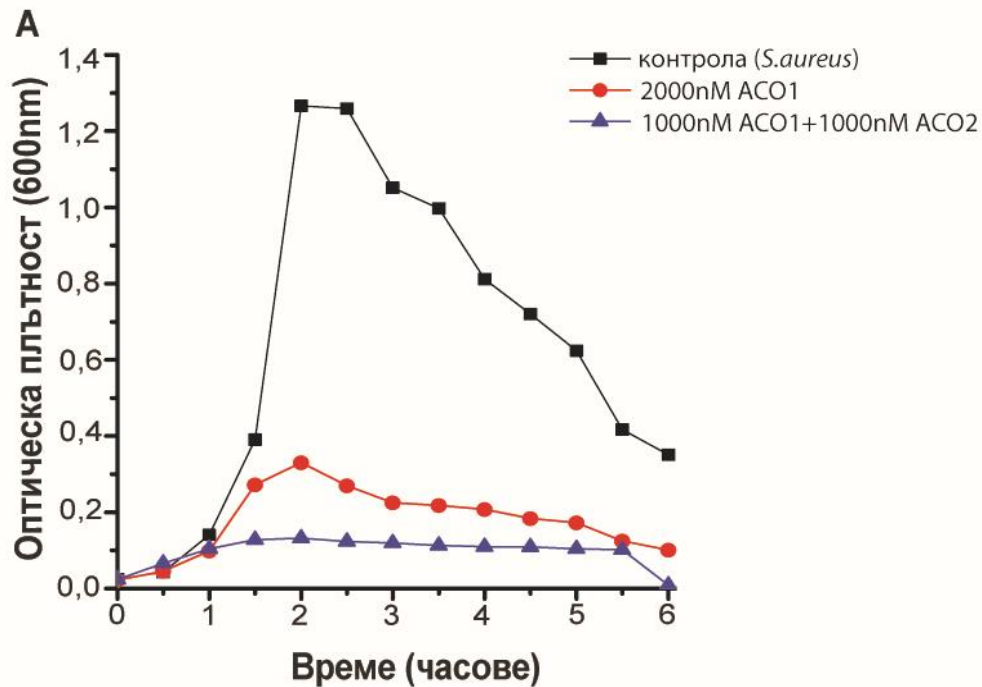
Ролята на АСО2 е да блокира втория биохимичен път за получаване на глюкозамин-6-фосфат (Фиг.2) в избраната условно патогенна бактерия *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923). За негова мишена бе избрана (пояснено в т.4.2.1) следната последователност: 5'- AUACGAAGAAGCA - 3', която се намира в областта от 627nt до 639nt в N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилазната иРНК. С цел пълна хибридизация на АСО2 с pagA иРНК при този щам съгласно правилото на Уотсън и Крик, АСО2 притежава следната нуклеотидна секвенция: 5'- TGCTTCTTCGTAT - 3'. Химичният дизайн на АСО2 бе направен на същия принцип като АСО1 (т.4.1.2), за да притежава същите характерни свойства. За тази цел той отново включва модификации от първо поколение (PS модификации), за да предизвика РН аза Н- индуцирано разграждане на мишената, както и второ поколение модификации (2'-О- метилиране) за повишаване на нуклеазната устойчивост на АСО2 при употреба *in vivo* и *in vitro*. По този начин АСО2 придобива следния модифициран вид: T<sub>1</sub>G<sub>1</sub>C<sub>1</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>T<sub>1</sub>A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>, където с „1“ са означени 2-О-СН<sub>3</sub> модификациите, а с „2“ са означени фосфотиоатните модификации. В допълнение, 5' краят на нуклеотидната част е прикрепен към СООН края на белтъка рVEC със последователност: LLILRRRIRKQАНАНСК (ОН). По този начин крайната последователност, която се получава за АСО2 е LLILRRRIRKQАНАНСК- T<sub>1</sub>G<sub>1</sub>C<sub>1</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>T<sub>1</sub>A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>. Механизмът на хибридизация на полученият АСО2 с мишенната pagA иРНК е изобразен схематично на Фиг.10.



**Фиг. 10. Схематично представяне на механизма на действие на ACO2, прицелващ се в pagA иРНК. (А)** Структура на pagA иРНК при *S. aureus* преди третиране с ACO2. **(Б)** Пълна хибридизация на ACO2 с комплементарната мишенна последователност на pagA иРНК при *S. aureus*. **(Б')** Образования двойноверижан ДНК-РНК участък е разпознат от РНаза Н, благодарение на PS-модификациите, при което се активира ензимна хидролиза на pagA иРНК. **(Г)** Ензимната хидролиза води до липса на генна експресия на ензима N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза. За по-лесно онагледяване на фигурата е представена само мишенната област от pagA молекулата.

#### 4.2.3. Експериментално тестване

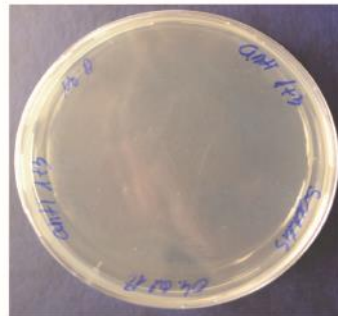
За тестване на ефективността на създадения ACO2 са проведени 2 типа експерименти – в твърда и в течна хранителна среда, съгласно описаните методи в т.3.2.1. От проведените експерименти се установи, че при комбинирано третиране на патогена *S. aureus* с 1000nM ACO1 и 1000nM ACO2 се постига неговото пълно инхибиране едва 6 часа след третиране (Фиг.11).



**Б**



контрола



1000nM ACO1+1000nM ACO2

**Фиг. 11. Инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus* чрез комбинирано третиране с ACO1 и ACO2. (А)** Пълно инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus* при комбинирано третиране с 1000nM ACO1 и 1000nM ACO2(синя линия), в сравнение с *S. aureus* третиран с 2000nM ACO1 (червена линия) или нетретиран контрол *S. aureus* в течна хранителна среда LB (черна линия); **(Б)** Пълно инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus* при комбинирано третиране с 1000nM ACO1 и 1000nM ACO2 (дясно), в сравнение с нетретирана контрола *S. aureus* (ляво) в твърда хранителна среда (LB и агар).

### 4.3. Гуанилат киназа /ACO3 и ACO4/

Гуанилат киназата, позната още с наименованието гуанозинмонофосфат киназа (GMP киназа), представлява ензим, катализиращ фосфорилирането на (d)GMP в (d)GDP. Тя се кодира от *gmk* гена и представлява потенциална мишена за антибактериални лекарства, поради жизнено важната и роля в снабдяването на бактериални клетки с РНК и РНК прекурсори.

#### 4.3.1. Биоинформатичен анализ

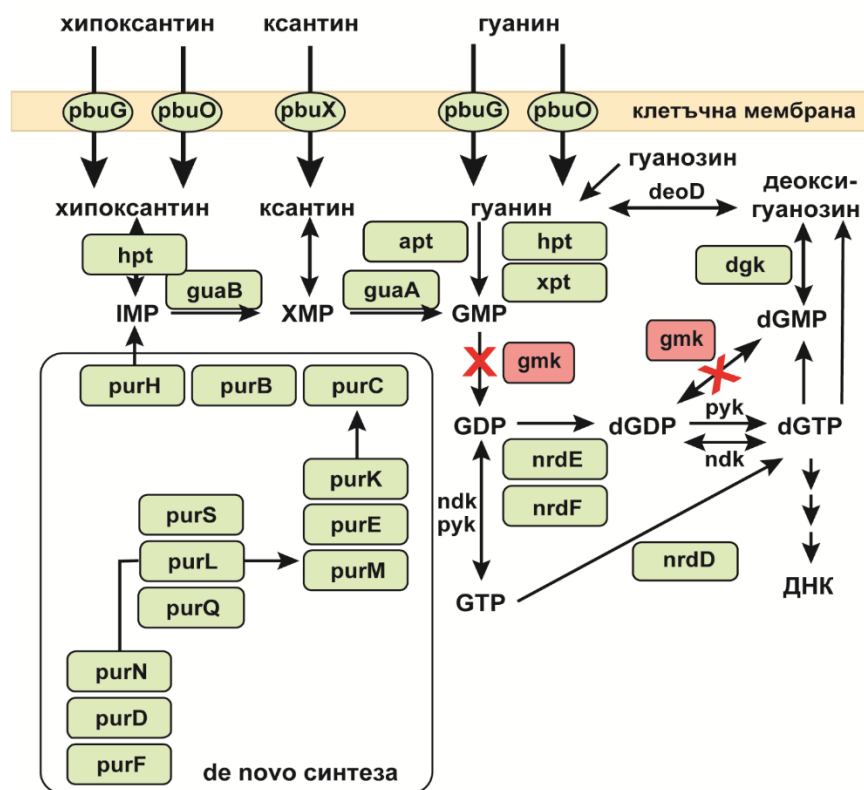
При разработването на дизайн на ACO3 и ACO4 отново е избрано да се работи с щам на патогенната бактерия *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), поради високите нива на резистентност сред представителите на този вид условни патогени и честите вътреболнични и извънболнични инфекции, които причинява. За оценка на терапевтичната мишена и до колко подходяща е тя за прилагане на ACO стратегията в *S. aureus*, е извършен биоинформатичен анализ на гуаниновия биосинтетичен път, който е част от пуриновия метаболитен път във мишенната бактерия. За целта е използвана базата данни на KEGG PATHWAY и е направена схема, фокусираща се върху мястото на *gmk* гена в гуаниновия биохимичен път (Фиг. 12). На схемата с червени хиксове са означени местата, които гуанилат киназата контролира, а именно образуването на ГДФ от ГМФ, както и обратимото образуване на дГДФ от дГМФ. При блокиране на транслацията на *gmk* продукта (гуанилат киназа), очакваният резултат е неспособността на бактерията да синтезира ключови нуклеинови киселина и инхибиране на нейните растеж и преживяемост.

Поради есенциалната си роля, гуанилат киназният ген е широко разпространен в бактериалните организми. Извършеният биоинформатичен анализ в базата данни на Uni-prot посочи наличието му сред 33 957 различни видове и/или щамове бактерии. Поради обема на получените резултати в базата им данни, те са съпоставени със съставените в т. 4.1.1. и 4.2.1. списъци на патогенни бактерии, притежаващи *glmS* рибопревключвател и *pagA* ген, както и със списъка на СЗО с приоритетни патогенни бактерии. Резултатите, които липсваха в



Uniprot, са сравнени в алтернативна и специализирана база данни PATRIC. По този начин се установи, че gmk гена се среща във:

- всички патогенни бактериални представители, притежаващи glmS рибопревключвател (Табл. 2);
- всички патогенни бактериални представители, притежаващи pagA ген (Табл. 3) с изключение на 2 Грам-положителни бактерии (*Mycobacterium microti* и *Mycobacterium sinense*) и 1 Грам-отрицателен представител (*Borrelia garinii*);
- всички приоритетни патогенни бактерии от списъка на СЗО - *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonellae*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*.



**Фиг.12. Гуанинов биохимичен път на синтез в *S. aureus*.** С червени овални правоъгълници е маркиран метаболита на gmk гена (гуанилат киназа), който фосфорилира реакциите в отбелязаните с червен хикс пътища. Тяхното потискане е мишена за разработените АСО-и (АСО3 и АСО4). Пътищата са построени въз основа на базата данни KEGG PATHWAY.

Следваща стъпка в анализа бе да се открие точното разположение и пълната секвенция на гуанилат киназния ген в мишенния бактериален щам. За тази цел отново са използвани базите с данни на Ensembl Bacteria и GenBank. Установено е, че разположението на *gmk* генът в хромозомата на *S. aureus subsp. aureus Rosenbach* е между 1 173 914nt и 1 174 785nt от водещата верига (Фиг. 26 от дисертационния труд) и има следната ДНК секвенция (5'-3'):

```
ATGGATAATGAAAAAGGATTGTTAATCGTTTTATCAGGACCATCTGGAGTAGGTAAA
GGTACTGTTAGAAAACGAATATTTGAAGATCCAAGTACATCATATAAGTATTCTATTT
CAATGACAACACGTCAAATGCGTGAAGGTGAAGTTGATGGCGTAGATTACTTTTTT
AAAAGTAGGGATGCGTTTTGAAGCTTTAATTAAGATGACCAATTTATAGAATATGCT
GAATATGTAGGCAACTATTATGGTACACCAGTTCAATATGTTAAAGATACAATGGA
CGAAGGTCATGATGTATTTTTAGAAATTGAAGTAGAAGGTGCAAAGCAAGTTAGAA
AGAAATTTCCAGATGCGTTATTTATTTTCTTAGCACCTCCAAGTTTAGATCACTTGA
GAGAGCGATTAGTAGGTAGAGGAACAGAATCTGATGAGAAAATACAAAGTCGTATT
AACGAAGCACGTAAAGAAGTCGAAATGATGAATTTATACGATTACGTTGTAGTTAAT
GATGAAGTAGAACTTGCGAAGAATAGAATTCATGTATTGTAGAAGCTGAGCACTT
AAAAAGAGAGCGCGTAGAAGCTAAGTATAGAAAATGATTTTGGAGGCTAAAAAA
TAA
```

Гореспоменатата ДНК секвенция е преобразувана в РНК секвенция с помощта на <http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/trans.htm>, която е подложена на допълнителен анализ за избора на подходящи мишенни участъци за антисенс олигонуклеотиди (5'-3'):

```
AUGGAUAAUGAAAAAGGAUUGUUAAUCGUUUUAUCAGGACCAUCUGGAGUAGGU
AAAGGUACUGUUAGAAAACGAAUUAUUUGAAGAUCCAAGUACAUCAUUAAGUAUU
CUAUUUCAAUGACAACACGUCAAAUGCGUGAAGGUGAAGUUUGAUGGCGUAGAUU
ACUUUUUUAAAACUAGGGAUGCGUUUGAAGCUUUAAUUAAAGAUGACCAAUUUA
UAGAAUAUGCUGAAUAUGUAGGCAACUAUUUAUGGUACACCAGUUCAAUAUGUUA
AAGAUACAAUGGACGAAGGUCAUGAUGUAUUUUUAGAAAUUGAAGUAGAAGGUG
CAAAGCAAGUUAGAAAGAAAUUCCAGAUGCGUUUUUUUUUUUCUUAGCACCCUC
CAAGUUUAGAUACAUUGAGAGAGCGAUUAGUAGGUAGAGGAACAGAAUCUGAUG
AGAAAUAACAAGUCGUAUUAACGAAGCACGUAAGAAGUCGAAAUGAUGAAUUU
AUACGAUUACGUUGUAGUUAAUGAUGAAGUAGAACUUGCGAAGAAUAGAAUUC
AUGUAUUGUAGAAGCUGAGCACUUAAAAGAGAGCGCGUAGAAGCUAAGUAUA
GAAAAUUGAUUUUGGAGGCUAAAAAUAA
```

След поредица от допълнителни blast-анализи бяха избрани 2 мишени за антисенс олигонуклеотиди. В удебен шрифт и сива маркировка е отбелязана мишенната последователност на ACO3, а в удебен подчертан шрифт и сива

маркировка е отбелязана мишенната последователност на АСО4. Мишенната последователност на АСО3 е разположена между 1 174 601нт и 1 174 624нт от водещата верига на бактериалната хромозома, докато мишенната последователност на АСО4 е разположена между 1 174 281нт и 1 174 305нт от водещата верига на бактериалната хромозома (Фиг.13).

**Staphylococcus aureus subsp. aureus strain ATCC 25923, complete genome**

**А**

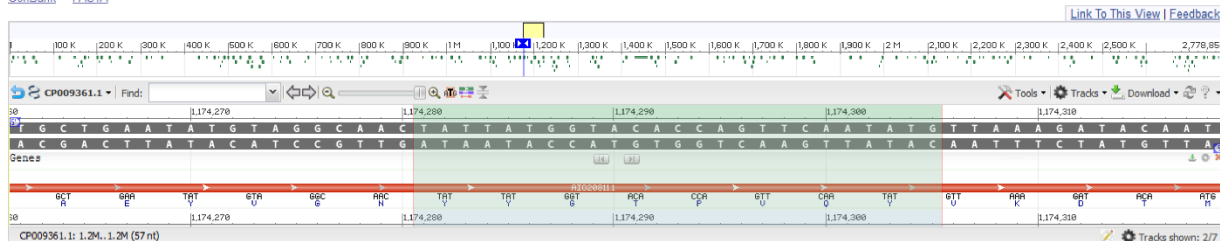
GenBank: CP009361.1  
[GenBank](#) [FASTA](#)



**Staphylococcus aureus subsp. aureus strain ATCC 25923, complete genome**

**Б**

GenBank: CP009361.1  
[GenBank](#) [FASTA](#)



**Фиг. 13. Разположение на АСО3 и АСО4 мишенни последователности в gmk гена на *S. aureus*. (А) Разположение на АСО3 мишенната последователност в gmk гена на *S. aureus*, маркирано в зелено; (Б) Разположение на АСО4 мишенната последователност в gmk гена на *S. aureus*, маркирано в зелено.**

При сравнение на мишенната последователност на АСО3 с всички експресирани се РНК молекули в човешкия организъм (RefSeq) е открито, че най-близките съвпадения са от едва 58% при:

- четири транскриптни варианта на супресора на IKBKE 1 - SIKE1 (транскриптни варианти 1,2,3 и 4);
- един в убиквитин домен съдържащ 2 (UBTD2) иРНК и още две предполагаеми в него (транскриптни варианти 1 и 2);

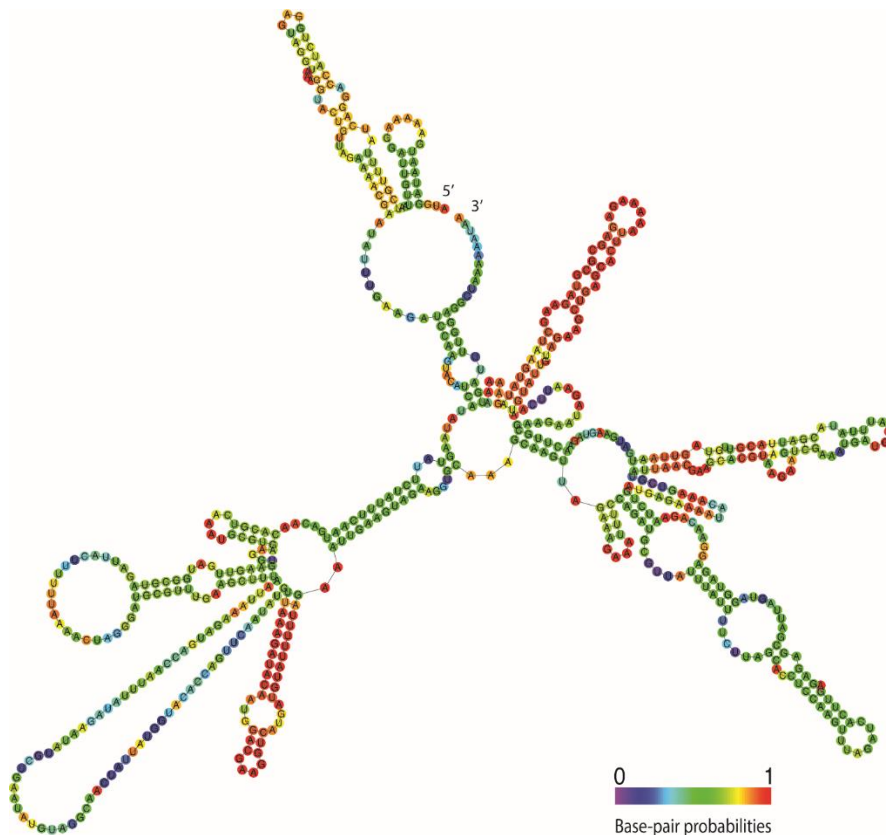
- два в предполагаеми транскриптни варианти на некодиращата РНК на LOC102723708, която към момента е нехарактеризирана в базата данни.

След това е проведено сходно сравнение на мишенната последователност на ACO3 с всички експресиращи се РНК молекули сред всички бактерии и е открито, че най-близките съвпадения са от 62% при Грам-отрицателната бактерия *Selenomonas sputigena* (част от нормалната микрофлора на горни дихателни пътища у човека) и Грам-положителната бактерия *Bacillus selenitireducens* щам MLS10 (обитаващ дънните утайки на водни басейни)(посочено във Фиг.27 от дисертационния труд). Липсата на 100% съвпадение с РНК последователности в човешкия и бактериални транскриптоми гарантира за уникалността на мишенната последователност и нейният потенциал като строго специфична мишена за таргетна терапия.

Биоинформатични анализи чрез RefSeq са извършени и за ACO4 мишенната последователност като тя е сравнена с човешкия транскриптом и транскриптомите на всички останали бактерии (посочено във Фиг.28 от дисертационния труд). В резултат от сравнението на ACO4 мишенната последователност с човешкия транскриптом е открито, че най-близкото съвпадение е 76% с предполагаем транскрипт 8 на SLC13A1 иРНК (кодиращ експресията на белтък, участващ в сулфатната хомеостаза в бъбреците), следвано от 68% с SOWANS иРНК. При сравнението на ACO4 мишенната последователност с транскриптомите на бактериални организми е открито, че най-близкото съвпадение е 68% в Грам-отрицателната бактерия *Actinobacillus pleuropneumoniae* (патогенен организъм при прасета), следвано от 52% при Грам-положителната бактерия *Mycobacterium liflandii* (патогенен организъм при жаби). Липсата на 100% съвпадение с РНК последователности в човешкия организъм, както и в бактериални транскриптоми демонстрира, че избраните мишени са подходящи за прицелване с АСО-и поради тази им уникалност на последователностите.

Получената секвенция за гуанилат киназната иРНК е обработена чрез уеб сървъра на RNAfold (версия 2.4.8), за да се получи формата на вторичната структура чрез алгоритъма на МакКаскил (*англ.* McCaskill)(Фиг.14). Този алгоритъм

изчислява функцията на равновесното разпределение и вероятностите за свързване на нуклеотидни двойки (*англ.* equilibrium partition function and base pair binding probabilities).



**Фиг. 14.** Предполагаема вторична структура на нагъването на гуанилат киназната иРНК при *S. aureus* (щам ATCC 25923). Тази структура е моделирана с помощта на RNAfold уеб сървър версия 2.4.8.

### 5.3.2. Дизайн на АСО3 и АСО4, хибридиращи с *gmk* иРНК

Химичният дизайн на АСО3 и АСО4 също е химерен, подобно на предишните два антисенс олигонуклеотида. Той отново включва модификации от първо и второ поколение за повишаване на нуклеазната устойчивост и активиране на РНаза Н. За пълна хибридизация на АСО3 и АСО4 с есенциалната гуанилат киназна иРНК са избрани две различни области от мишенната иРНК. АСО3 се прицелва в областта между 564nt и 587nt на гуанилат киназната иРНК със следната последователност: 5'- CUUAAAAGAGAGCGCGUAGAAGC -3'. За да хибридира с нея, АСО3 има следната нуклеотидна последователност: 5'- GCUTCTACGCGCTCTCTTTTAAAG -

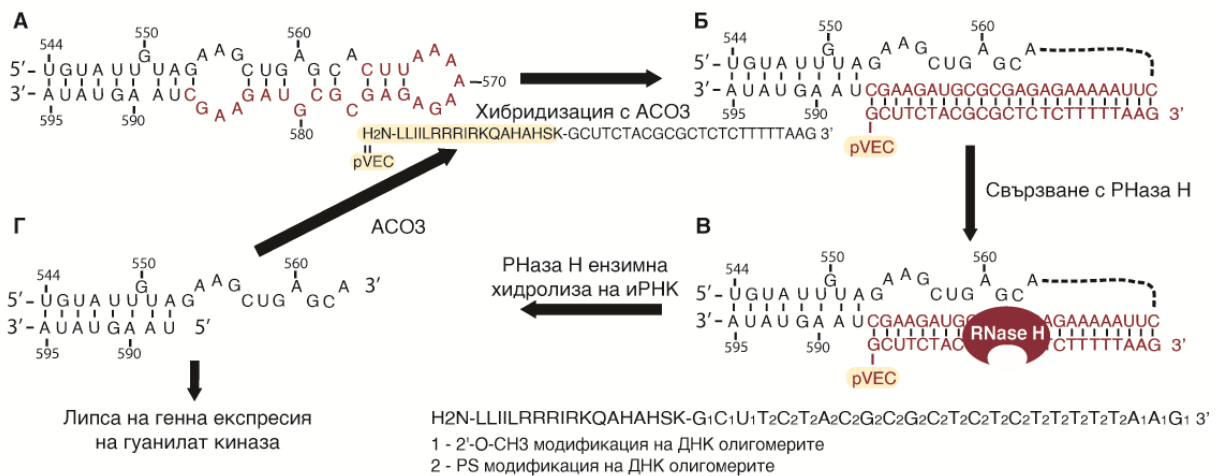
3', като с добавените модификации придобива следния вид: G<sub>1</sub>C<sub>1</sub>U<sub>1</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>G<sub>1</sub>. С „1“ са означени 2-O-CH<sub>3</sub> модификациите, които са разположени в двата края на олигомера, а с „2“ са означени фосфотиоатните модификации, които заемат централната част от олигомера. В 5' края на олигомерната част (подобно на ACO1 и ACO2) е прикрепен белтъкът рVEC със последователност: LLILRRRIRKQAHANSK. Той е свързан в COOH края си с 5' нуклеотидната част чрез ковалентна връзка и по този начин пълната секвенция на ACO3 е LLILRRRIRKQAHANSK-G<sub>1</sub>C<sub>1</sub>U<sub>1</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>G<sub>1</sub>.

По сходен начин е структуриран и ACO4. Той се прицелва в областта между 244nt и 268nt на гуанилат киназната иРНК със следната последователност: 5'--3'. За да хибридира с нея, ACO4 е дълъг 25nt и има следната нуклеотидна последователност: 5'- CAUATTGAACTGGTGTACCATAAUA -3', като с добавените модификации придобива следния вид: C<sub>1</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>A<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>A<sub>1</sub>. С „1“ отново са означени 2-O-CH<sub>3</sub> модификациите, приложени на последните 3 нуклеотида в 5' края и 3' края на олигомера, а с „2“ са означени фосфотиоатните модификации, които са приложени на нуклеотидите в централната му част. ACO4 също е свързан чрез ковалентна връзка с рVEC белтък, при което пълната последователност на ACO4 придобива следния вид: LLILRRRIRKQAHANSK-C<sub>1</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>A<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>A<sub>1</sub>.

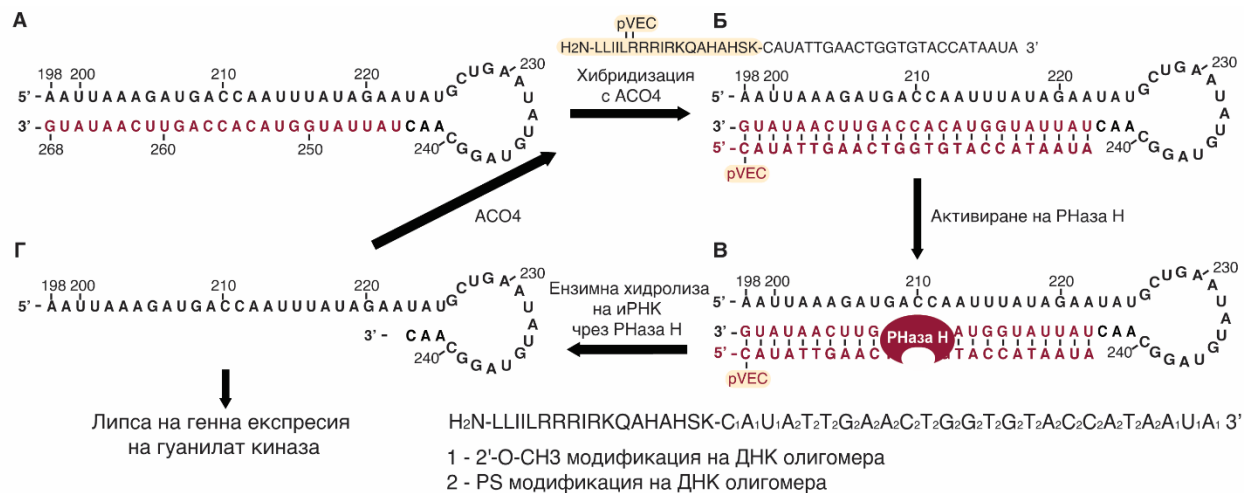
Както бе демонстрирано в т.4.3.1., избраните мишенни секвенция в гуанилат киназната иРНК са специфични само за този щам. По тази причина при потенциално прилагане в човешкия организъм ACO3 и ACO4 не предизвикват инхибиране на полезните бактерии, съдържащи гуанилат киназния ген в човешкия микробиом. При необходимост от прилагане на ACO3 или ACO4 върху друг щам на същата бактерия би следвало да се направи нов биоинформатичен анализ за проверка на несъответствия в нуклеотидните бази. При наличие на разлики базите биха се заменили с други, в съответствие с правилото на Уотсън и Крик и антисенс олигонуклеотидът би хибридирирал по същия механизъм с новата мишенна бактерия.

На Фиг.15 е показана схема на принципа на действие на АСО3. Областта, в която целя хибридизация с АСО3, се намира между 564nt и 587nt на gmk иРНК (Фиг.30А). АСО3 прониква в клетката на *S. aureus*, благодарение на прикрепения белтък рVEC и в резултат на това АСО3 хибридизира с мишената (Фиг.15Б). По този начин се формира двойно-верижан участък (дуплекс), който бива разпознат от ензима РНаза Н (Фиг.15В). Ензимът се активира и хидролизира gmk иРНК в областта на формирания АСО3-РНК дуплекс. Ензимната хидролиза на иРНК води до липса на генна експресия на есенциалната гуанилат киназа в *S. aureus*.

На същия принцип действа и АСО4, който се цели в друга област на гуанилат киназната иРНК, а именно от 244nt до 268nt (маркирано в червено, Фиг.16А). АСО4 прониква в бактериалната клетка с помощта на рVEC и в резултат на това АСО3 хибридизира с мишената (Фиг.16Б). По този начин се формира двойноверижан РНК-ДНК дуплекс, който бива разпознат от ензима РНаза Н (Фиг.16В). Ензимът се активира и подлага gmk иРНК на ензимна хидролиза в участъка от формирания дуплекс. Ензимната хидролиза на иРНК води до липса на генна експресия на есенциалната гуанилат киназа в *S. aureus* и растежът на бактерията е потиснат (Фиг.16Г).



**Фиг. 15. Специфично прицелване на АСО3 в гуанилат киназната иРНК на *S. aureus* (щам ATCC 25923).** (А) Област от гуанилат киназната иРНК в *S. aureus*, където в червено е отбелязана мишенната секвенция. (Б) АСО3 навлиза в бактериалната клетка, с помощта на прикрепен клетъчно-пенетриращ пептид (рVEC) и хибридизира с мишенната иРНК. (В) РНаза Н разпознава РНК-АСО3 дуплекса и PS-модификацията и хидролизира специфично фосфодиестерните връзки в дуплекса. (Г) Липса на генна експресия на гуанилат киназа в *S. aureus*.



**Фиг. 16. Специфично прицелване на ACO4 в гуанилат киназната иРНК на *S. aureus* (щам ATCC 25923).** (А) Област от гуанилат киназната иРНК в *S. aureus*, където в червено е отбелязана мишенната секвенция. (Б) ACO4 навлиза в бактериалната клетка, с помощта на прикрепен клетъчно-пенетриращ пептид (pVEC) и хибридизира с мишенната иРНК. (В) РНaza H разпознава РНК-ACO4 дуплекса и PS-модификацията и хидролизира специфично фосфодиестерните връзки в дуплекса. (Г) Липса на генна експресия на гуанилат киназа в *S. aureus*.

### 5.3.3. Експериментално тестване на инхибиторното действие на ACO3 и ACO4 върху бактериалния растеж и развитие

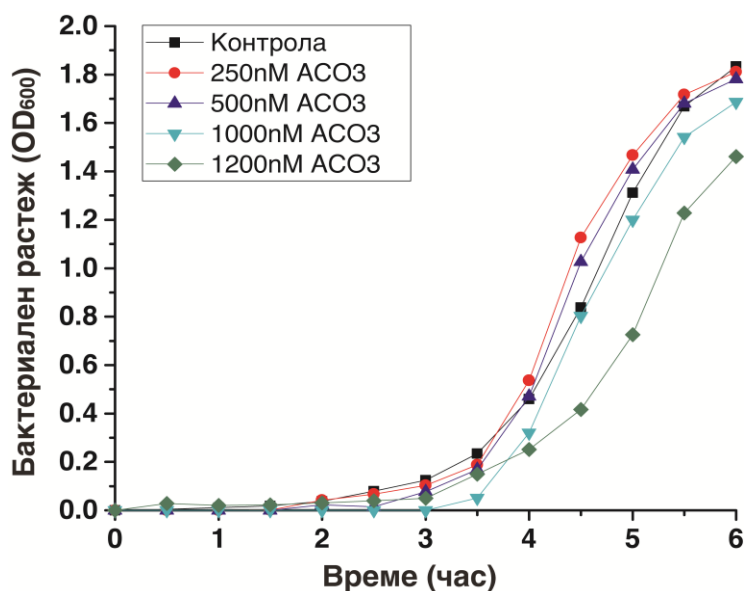
Изследване на инхибиторното действие на ACO3 и ACO4 в *S. aureus* е проведено чрез фотоспектрометър, както е описано в т.3.2.1.2. Приложените концентрации на ACO3 са 250nM, 500nM, 1000nM и 1200nM (Фиг.17). Сред получените резултати не се наблюдава значително отклонение спрямо контролната растежна крива на *S. aureus* при прилагане на 250nM, 500nM и 1000nM от ACO3 по време на цялото измерване. При прилагане на по-силна концентрация от 1200nM ACO3 се наблюдава поява на инхибиторен ефект от приблизително 20% ( $OD_{600} = 1.4607 \pm 0.0010$ ) 6 часа след третирането.

Приложените концентрации на ACO4 са 500nM, 1000nM и 2000nM. Сред получените резултати при 500nM и 1000nM се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж с приблизително 16% и при двете концентрации ( $OD_{600} = 1.4131 \pm 0.0267$  и респективно  $OD_{600} = 1.4290 \pm 0.0070$ ) 6 часа след третиране на клетките (Фиг.18). След третиране с най-високата концентрация от 2000nM

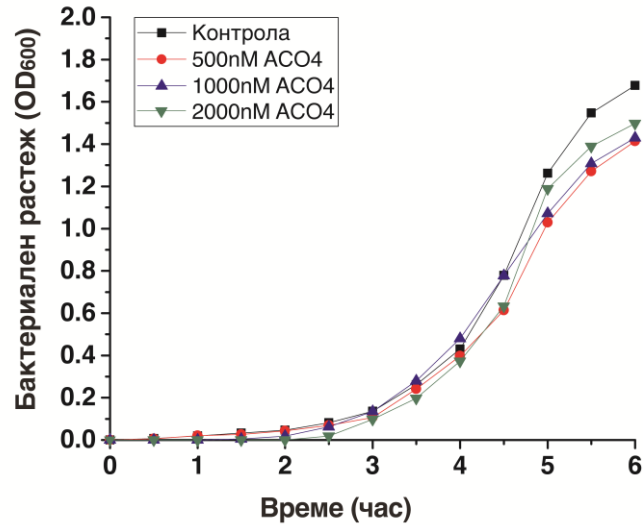


АСО4 се установи близък до предишните резултати – приблизително 11% ( $OD_{600} = 1.4970 \pm 0.0135$ ) 6 часа след третиране на клетките.

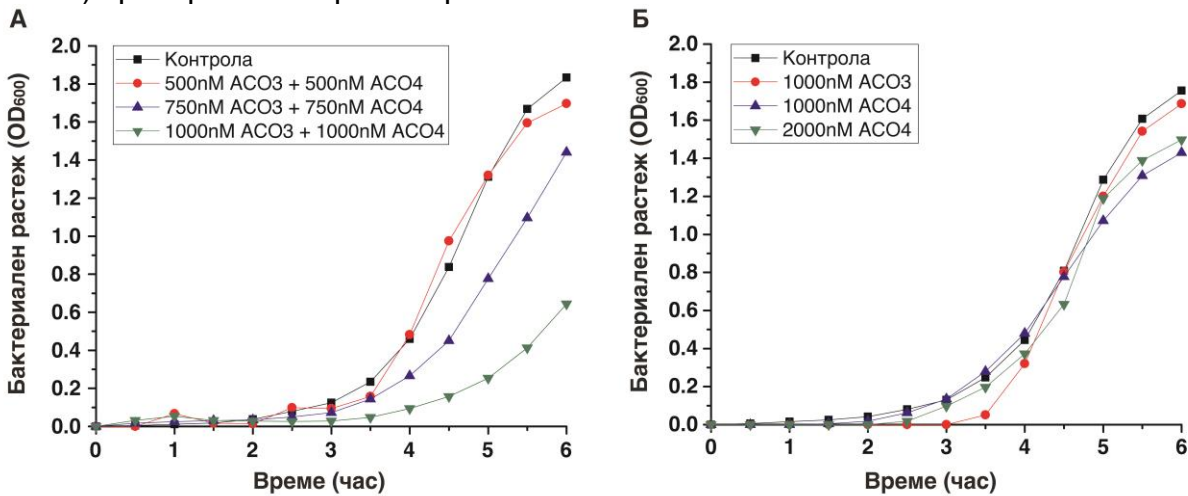
От проведените експерименти се установи, че изследваните АСО3 и АСО4 проявяват синергичен ефект и значително потискат растежа на *S. aureus* (Фиг.19). Прилагането на комбинирано третиране с АСО3 и АСО4 инхибира растежа на патогенната бактерия с около 80% ( $OD_{600} = 0.4598 \pm 0.0414$ ) 4 часа след третиране в най-високата си концентрация. Този ефект обаче спада до 65% ( $OD_{600} = 0.6436 \pm 0.0583$ ) 6 часа след третиране на бактериите (Фиг.19А), като тези резултати са сравнени с индивидуални третираня на АСО3 или АСО4 (Фиг.19Б). Прилагането на по-ниска концентрация от 750nM АСО3 и 750nM АСО4 потиска бактериалния растеж в по-ниска степен и 6 часа след третиране се наблюдава приблизително 21% инхибиране ( $OD_{600} = 1.4410 \pm 0.0261$ ) в сравнение с нетретираната контрола. В най-ниската тествана концентрация от 500nM АСО3 и 500nM АСО4 почти не се наблюдава потискане на растежа (~3%) на *S. aureus* в сравнение с нетретираната контрола.



**Фиг. 17. Инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus*, третиран с различни концентрации на АСО3.** Бактерията *S. aureus* е култивирана в LB течна среда и е третирана с 4 различни концентрации на АСО4: 250nM АСО3 (червена линия), 500nM АСО3 (тъмно синя линия), 1000nM АСО3 (светло синя линия), 1200nM (зелена линия). Растежът е сравнен с контрола на *S. aureus*, която не е третирана с АСО3 (черна линия). Всички измервания са проведени чрез определяне на оптическа плътност при 600nm дължина на вълната ( $OD_{600}$ ) чрез фотоспектрометър.



**Фиг. 18. Инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus*, третиран с различни концентрации на ACO4.** Бактерията *S. aureus* е култивирана в LB течна среда и е третирана с 3 различни концентрации на ACO4: 500nM ACO4 (червена линия), 1000nM (синя линия) и 2000nM (зелена). Растежът е сравнен с контрола на *S. aureus*, която не е третирана с ACO4 (черна линия). Всички измервания са проведени чрез определяне на оптическа плътност при 600nm дължина на вълната ( $OD_{600}$ ) чрез фотоспектрометър.



**Фиг. 19. Определяне на синергично инхибиращо действие на бактериален растеж на *S. aureus* при третиране с ACO3 и ACO4 и сравнение с предходните експериментални резултати.** (А) Бактерията *S. aureus* е култивирана в LB течна среда и е третирана с 3 различни концентрации на ACO3 и ACO4: 500nM ACO3 и 500nM ACO4 (червена линия), 750nM ACO3 и 750nM ACO4 (синя линия) и 1000nM ACO3 и 1000nM ACO4 (зелена линия); (Б) Сравнителни резултати за растежа на бактерията *S. aureus* при приложени 3 различни концентрации: 1000nM ACO3 (червена линия), 1000nM ACO4 (синя линия) и 2000nM ACO4 (зелена линия). Всички измервания са проведени чрез определяне на оптическа плътност при 600nm дължина на вълната ( $OD_{600}$ ) чрез фотоспектрометър.

#### 4.4. Неспецифично хибридиране /ACO5/

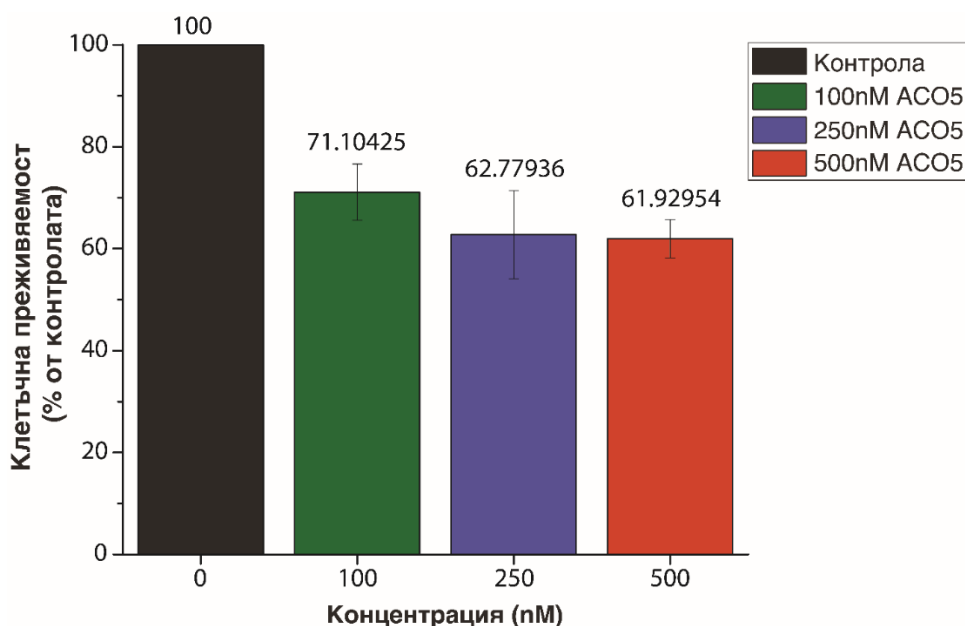
##### 4.4.1. Биоинформатичен анализ и дизайн

На базата на проведените биоинформатични анализи е създаден антисенс олигонуклеотида ACO5, който не притежава специфична мишенна последователност. Той има дължина 22нт и е със следната последователност: 5'-GAUTTTGCTTCTTTACCTAAUU- 3'. При добавяне на характерни за първо и второ поколение модификации, подобно на предходните ACO-и в настоящата докторска дисертация, той придобива следния модифициран вид: 5' - G<sub>1</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>U<sub>1</sub>- 3", където с „1“ са означени 2-О-СН<sub>3</sub> модификациите в двата края на олигомера, а с „2“ са означени фосфотиоатните модификации, които заемат централната част от олигомера. В 5' края на олигомерната част отново е прикрепен белтъкът pVEC със последователност: LLILRRRIRKQAHANSK. Той е свързан в COOH края си с 5' нуклеотидната част чрез ковалентна връзка и окончателния вид на ACO5 придобива следния вид:

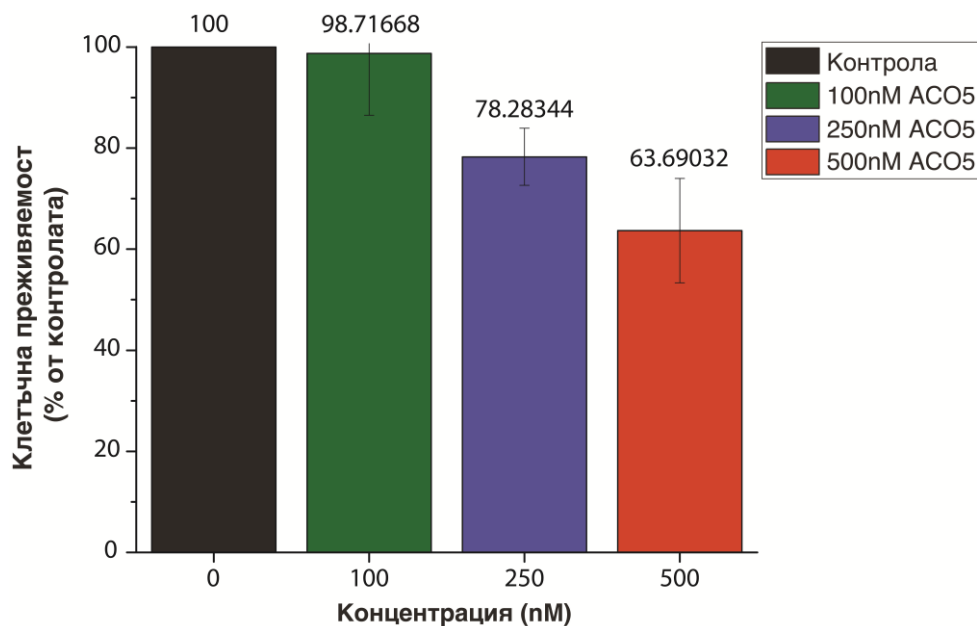
LLILRRRIRKQAHANSK- G<sub>1</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>U<sub>1</sub>. Негова пълна (и хипотетична) комплементарна мишенна последователност е последователността: 5'- AAUUAGGUAAAGAAGCAAAAUC- 3'. Тъй като поставената цел е да се изследва влиянието на ACO5 при неспецифична хибридизация, проведех биоинформатични анализи за проверка за наличие на пълни съвпадения с цялата комплементарна на ACO5 последователност (посочено във Фиг.35 от дисертационния труд). В резултат е открито, че най-близките съвпадения в бактериалните транскриптоми (посочено във Фиг.36А от дисертационния труд) в базата данни на NCBI са 68% при Грам-отрицателните бактерии *Prolinoborus fasciculus* (сун. *Aquaspirillum fasciculus*; обитаваща сладководни водоеми) и *Legionella lansingensis* (условен патоген). По същия начин е проведен биоинформатичен анализ (RefSeq) и в човешкия геном (демонстрирано във Фиг.36Б от дисертационния труд). Резултатите там демонстрираха най-близки съвпадения в предсказани РНК, които не кодират белтъци (ncРНК) като първото съвпадение е от 95% в РНК 2778 (LINC02778), следвано от 94% в транскрипт 3 от LOC105372520 иРНК.

#### 5.4.2. Експериментално тестване на цитотоксичното действие на АСО5 върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки клетъчни линии

Проведени са експерименти за оценка на влиянието на неспецифично хибридиране на АСО5. За целта е изследвано цитотоксичното действие на АСО5 в човешка ракова линия MDA-MB-231 и здрава ембрионална линия Lер3. Приложените концентрации са 100nM, 250nM и 500nM. При третиране на клетъчна линия MDA-MB-231 с най-ниската приложена концентрация се наблюдава приблизително 29% инхибиране (Фиг.20). Повишаване на концентрацията на 250nM води до цитотоксичност на приблизително 37% от клетките, които се различават само с 1% по-слаба активност от максималната приложена концентрация в същите клетки. При третиране на Lер3 с 100nM АСО5 не се наблюдава цитотоксичност (Фиг.21). С повишаване на концентрацията на 250nM се установява 22% цитотоксичност, която нараства на 36% цитотоксичност при прилагане на максимална концентрация от 500nM.



**Фиг.20.** Влияние на АСО5 върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от туморна линия MDA-MB-231. АСО5 е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез МТТ тест.



**Фиг.21. Влияние на ACO5 върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от нетуморна линия Lep3. ACO5 е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.**

#### **4.5. Неспецифично хибридиране /ACO6/**

##### **4.5.1. Биоинформатичен анализ и дизайн**

На базата на проведените биоинформатичните анализи е създаден антисенс олигонуклеотида ACO6, който не притежава специфична мишенна последователност. Подобно на ACO5 той също има дължина от 22нт и е със следната последователност: 5'- СААСТТСТТТСТТГСТТСАUU- 3'. При добавяне на характерни за първо и второ поколение модификации, подобно на предходните ACO-и в настоящата докторска дисертация, той придобива следния модифициран вид: 5' - C<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>U<sub>1</sub>- 3', където с „1“ са означени 2-O-CH<sub>3</sub> модификациите в двата края на олигомера, а с „2“ са означени фосфотиоатните модификации, които заемат централната част от олигомера. В 5' края на нуклеотидната последователност отново е прикрепен белтъкът pVEC със последователност: NH<sub>2</sub>- LLILRRRIRKQAHANHSK- COOH. Той е свързан в COOH края си с 5' нуклеотидната част чрез ковалентна връзка и окончателния вид на ACO5 придобива следния вид: LLILRRRIRKQAHANHSK-C<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>1</sub>U<sub>1</sub>U<sub>1</sub>. Негова пълна (и хипотетична)

комплементарна мишенна последователност е последователността: 5'-AATGAAGCAAGAAAAGAAGTTG - 3'.

Тъй като поставената цел е да се изследва влиянието на АСО6 при неспецифична хибридизация, биоинформатични анализи са проведени за проверка за наличие на пълни съвпадения с цялата хипотетична комплементарна на АСО6 последователност (посочено във Фиг.39 от дисертационния труд). В резултат е открито, че най-близките съвпадения в бактериалните транскриптоми (посочено във Фиг.39А от дисертационния труд) в базата данни на NCBI са с Грам-отрицателните бактерии *Candidatus blochmannia* (ендосинбионт по мравките, 86% съвпадение) и *Cyanobacterium aponinum* (воден обитател, 72% съвпадение). По същия начин е проведен биоинформатичен анализ (RefSeq) и в човешкия геном (посочено във Фиг.39Б от дисертационния труд). Резултатите там демонстрираха най-близки съвпадения от 72% в:

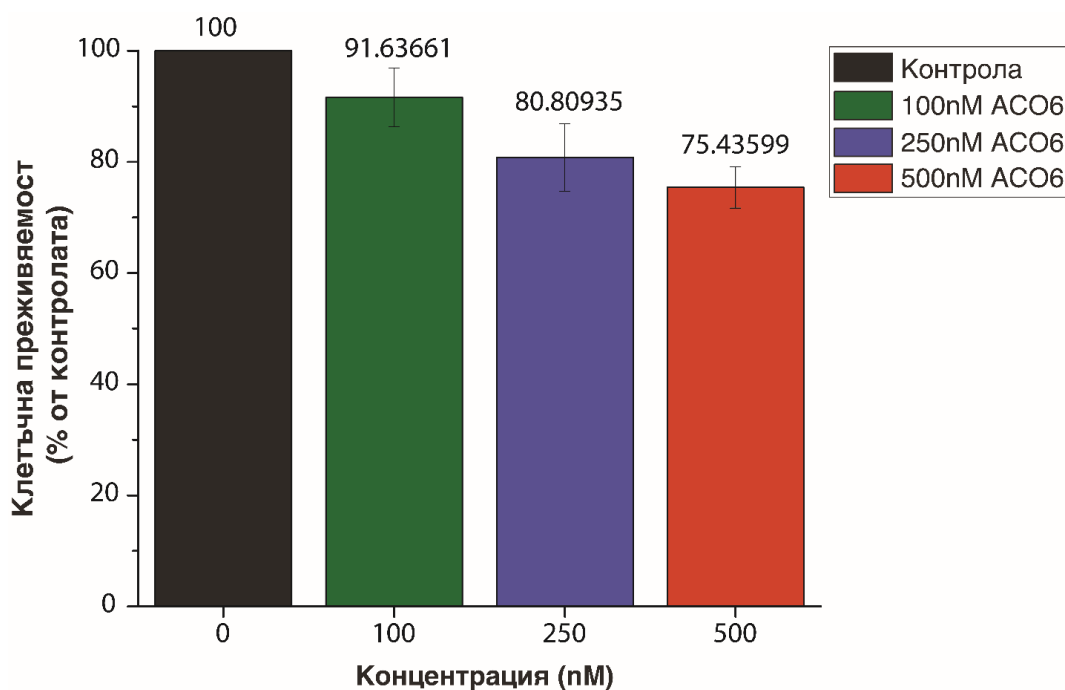
- 3 доказани транскриптни варианта на ARHGAP30 иРНК (варианти 1, 3 и 4), кодираща Rho ГТФ- активиращ белтък 30 и още 4 предсказани такива в същата молекула;
- 2 предсказани транскриптни варианта на нехарактеризираната LOC105377508 ncРНК (варианти 1 и 2).

Друг интересен резултат при този анализ бе, че ако се позволи в настройките на базата данни подравняването да допуска и пропуски (gaps), т.е. % идентичност да не е 100% както до сега, то са налични още 2 съвпадения – 95% съвпадение с транскрипционен вариант на протоонкогена BRAF и 90% с транскрипционни варианти на CNTLN иРНК, кодиращи белтъка центлеин, необходим за центрозома кохезия и набиране на CEP68 центрозоми в човешките клетки, които смятам, че имат роля в получените експериментални резултати.

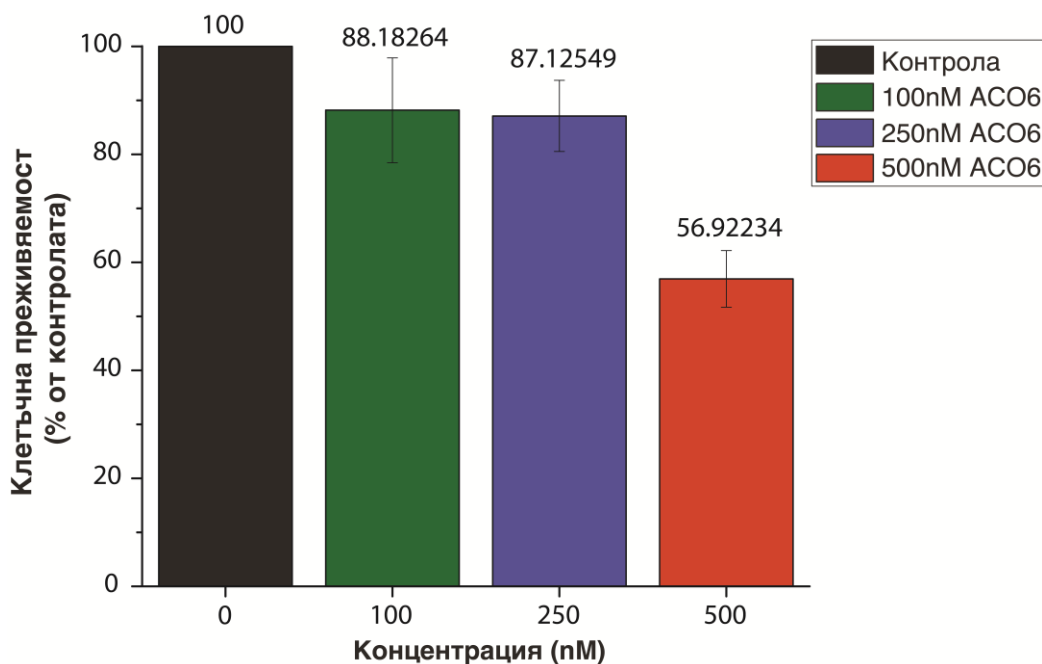
#### **4.5.2. Експериментално тестване на цитотоксичното действие на АСО6 върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки клетъчни линии**

Проведени са експерименти за оценка на влиянието на неспецифично хибридизиране на АСО6. За целта е изследвано цитотоксичното действие на АСО6 в човешка ракова линия MDA-MB-231 и здрава ембрионална линия Lер3.

Приложените концентрации са 100nM, 250nM и 500nM. При третиране на клетъчна линия MDA-MB-231 с най-ниската приложена концентрация се наблюдава съвсем слаба цитотоксичност от 8% (Фиг.22). Повишаване на концентрацията на 250nM води до цитотоксичност на приблизително 19% от клетките, които се различават само с 6% по-слаба активност от максималната приложена концентрация в същите клетки. При третиране на Lep3 с 100nM ACO6 се наблюдават 11% цитотоксичност (Фиг.23). С повишаване на концентрацията на 250nM се установява 13% цитотоксичност, която нараства на 43% цитотоксичност при прилагане на максимална концентрация от 500nM.



**Фиг.2.** Влияние на ACO6 върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от туморна линия MDA-MB-231. ACO6 е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез МТТ тест.



**Фиг.23. Влияние на ACO6 върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от нетуморна линия Lер3. ACO6 е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.**

#### **4.6. Нехибридиращ /ACO7/**

##### **4.6.1. Биоинформатичен анализ и дизайн**

При дизайна на ACO7 може да се открие една коренна разлика, в сравнение с останалите ACO (ACO1-ACO7) и тя е, че ACO7 не притежава мишена. Нуклеотидната последователност на ACO7 е 5'- UACGCTCGGAC- 3'. Подобно на останалите разработени ACO-и в настоящата докторска дисертация, за да има по-стабилна структура на ACO7 е приложено метилиране на последния нуклеотид и в двата края на последователността (2'-O-CH<sub>3</sub> модификация). Останалите нуклеотиди от последователността са с приложена PS-модификация за активиране на РНаза Н. В резултат, ACO7 придобива следния модифициран вид: 5'- U<sub>1</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>G<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>1</sub>- 3', където с „1“ е означена 2'-O-CH<sub>3</sub> модификацията и с „2“ е означена PS-модификацията. Неговата последователност бе създадена да не хибридира с нито една последователност, публикувана в базите данни на NCBI GeneBank. Това е демонстрирано на Фиг. 24 като за целта бе извършен blast-анализ за намиране на сходство между обратната комплементарна последователност на



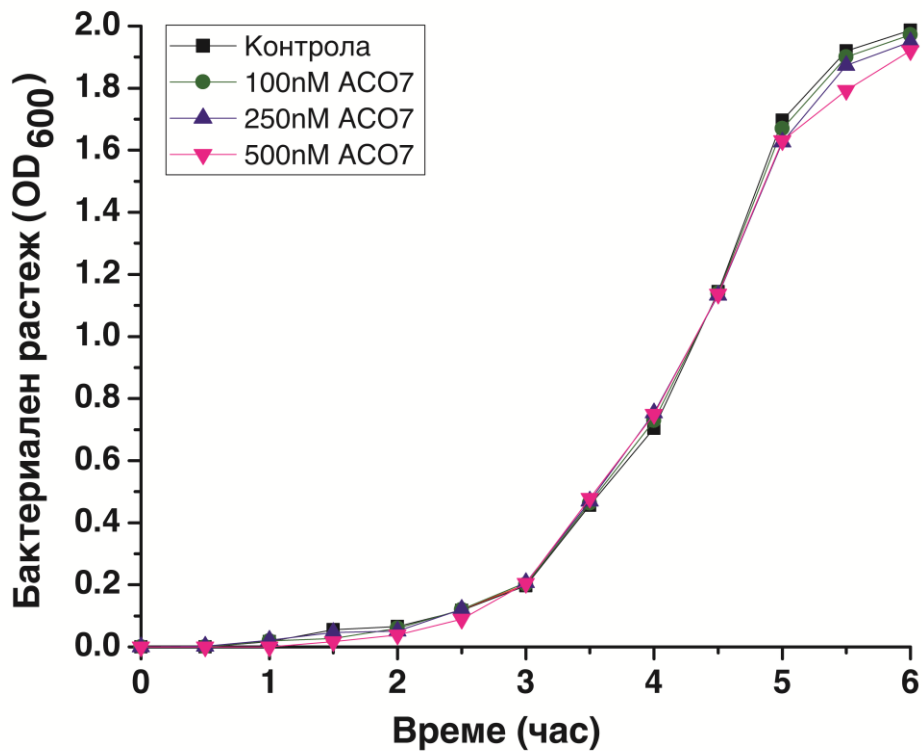
ACO7 (5'- GTCCGAGCGTA- 3') и наличните в базата данни секвенирани геноми на всички организми.

The screenshot shows the BLAST search results interface. At the top, it reads 'BLAST » blastn suite » results for RID-CRZDJWKW016'. There are navigation links for 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'. Below this, there are buttons for '< Edit Search', 'Save Search', and 'Search Summary'. A message states: 'Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.' The search details include: Job Title: ASO7; RID: CRZDJWKW016; Program: Citation; Database: nt; Query ID: lcl|Query\_41977; Description: None; Molecule type: nucleic acid; Query Length: 11. The 'Filter Results' panel is visible, with fields for 'Organism', 'Percent Identity', 'E value', and 'Query Coverage'. At the bottom of the page, a yellow warning box states: 'No significant similarity found. For reasons why, click here'.

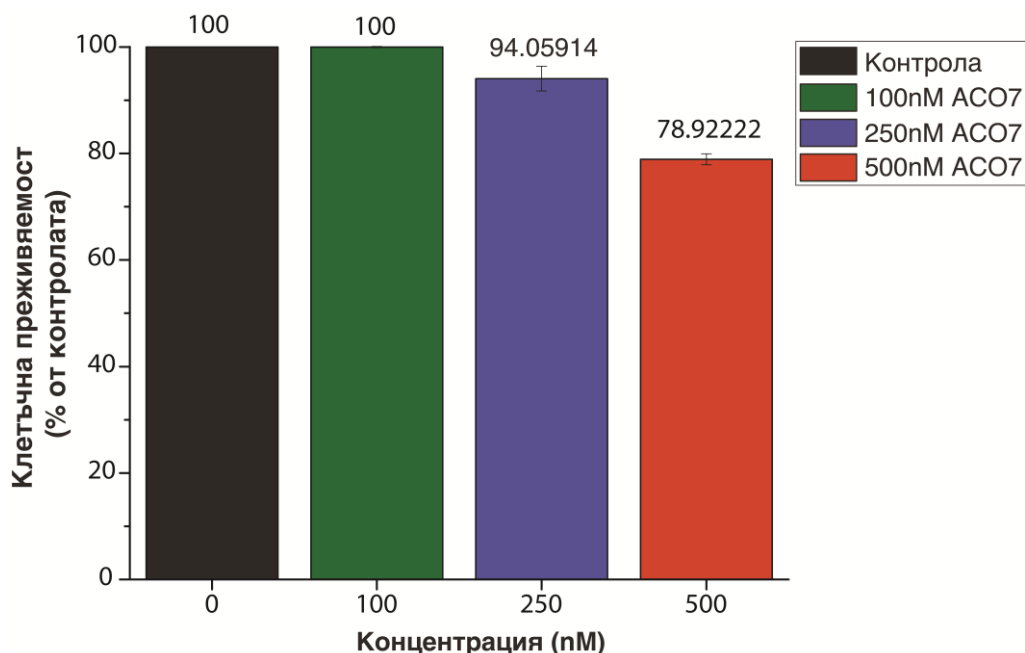
**Фиг.24. Blast анализ на ACO7 мишенната последователност сред всички секвенирани организми в NCBI базата данни.** След извършения биоинформатичен анализ за съвпадения между обратната комплементарна последователност на ACO7 и наличните геноми в базата данни на GeneBank не бе установено значимо съвпадение.

#### 4.6.2. Експериментално тестване на цитотоксично действие на ACO7 върху преживяемостта и пролиферативната активност на бактериални и ракови клетки

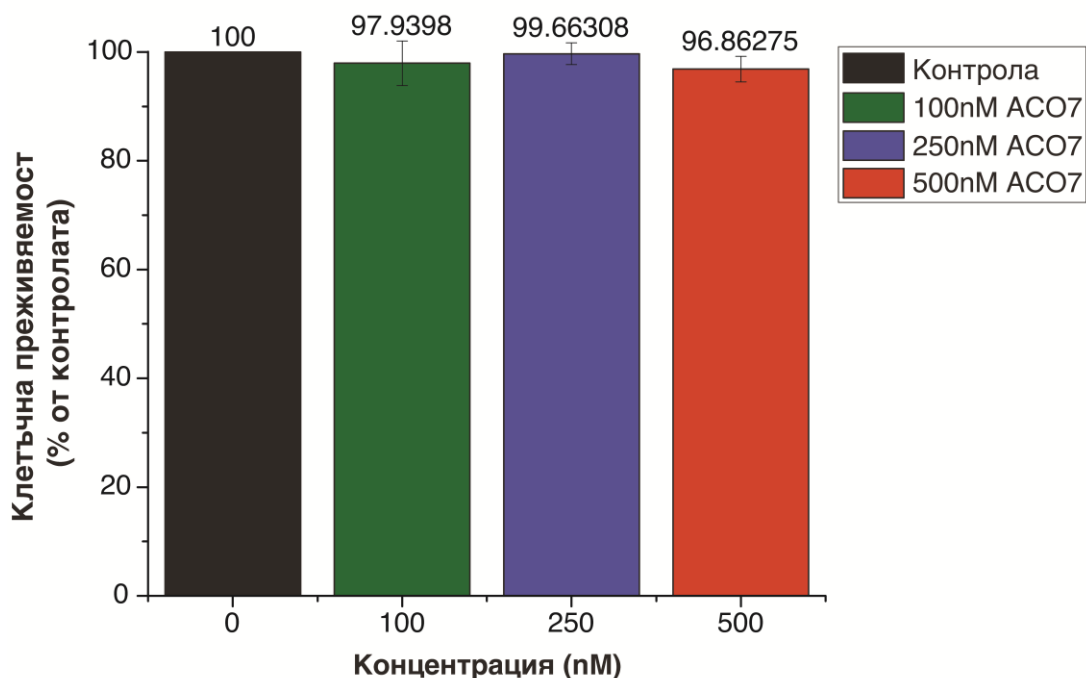
Изследване на цитотоксично действие на ACO7 е проведено чрез фотоспектрометър в бактерията *S. aureus* и чрез ELISA reader в човешки клетъчни линии, както е описано в т.4.2.1. Приложените концентрации на ACO7 във всички експерименти са 250nM, 500nM и 1000nM. Сред получените резултати в човешкия патоген *S. aureus* не се наблюдава значително отклонение спрямо контролната растежна крива на бактерията по време на цялото измерване (Фиг. 25). При извършване на MTT тест за клетъчна преживяемост и пролиферативна активност на човешка клетъчна линия MDA-MB-231 бе установено, че ACO7 предизвиква приблизително 21% цитотоксичност при прилагане в най-високата си концентрация от 500nM (Фиг.26). Същевременно при провеждане на MTT тест при същите условия в човешка клетъчна линия Hep3 предизвиканата цитотоксичност е едва 3% (Фиг.27).



**Фиг.25.** Инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus*, третиран с различни концентрации на ACO7. Бактерията *S. aureus* е култивирана в LB течна среда и е третирана с 3 различни концентрации на ACO4: 100nM ACO7 (зелена линия), 250nM ACO7 (синя линия) и 500nM ACO7 (червена линия). Растежът е сравнен с контрола на *S. aureus*, която не е третирана с ACO7 (черна линия). Всички измервания са проведени чрез определяне на оптическа плътност при 600nm дължина на вълната (OD<sub>600</sub>) чрез фотоспектрометър.



**Фиг. 26.** Влияние на ACO7 върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от туморна линия MDA-MB-231. ACO7 е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.



**Фиг. 27.** Влияние на ACO7 върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от нетуморна линия Lep3. ACO7 е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.

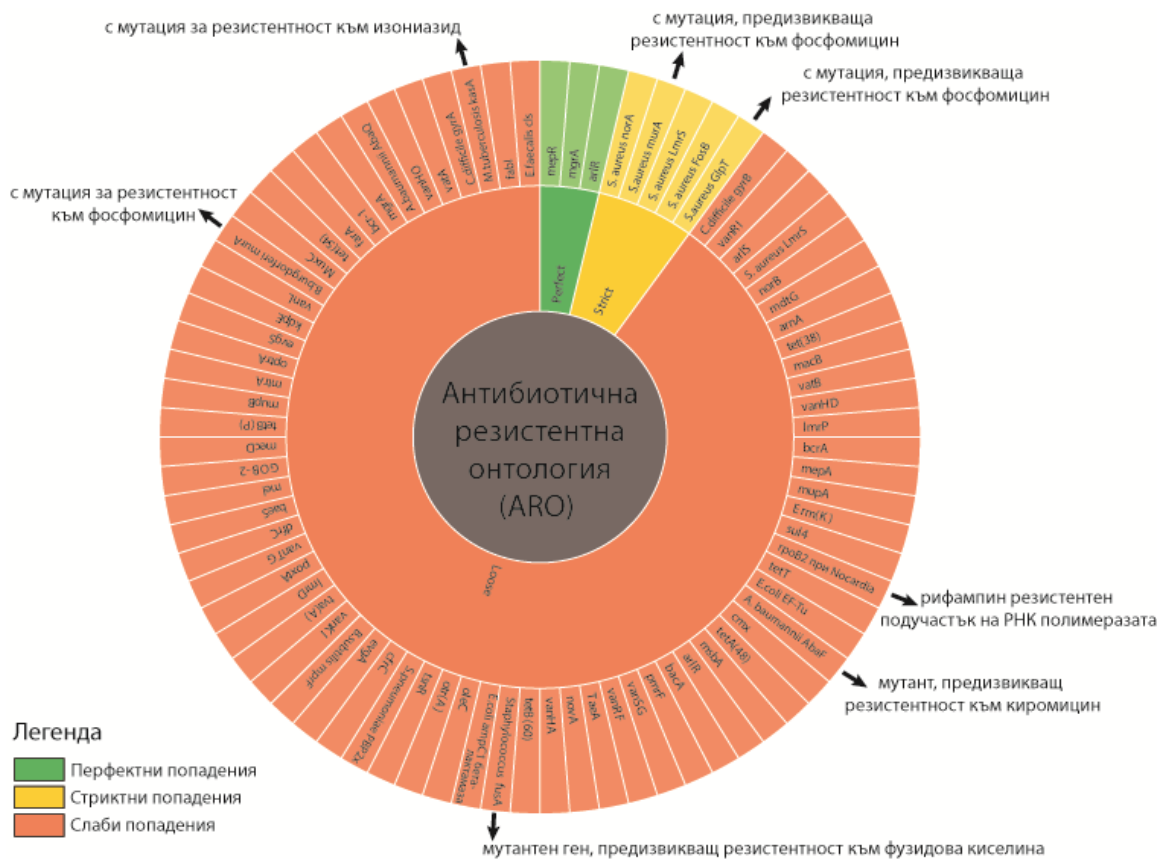
#### 4.7. Допълнителни биоинформатични и експериментални резултати

Проведен е допълнителен биоинформатичен анализ на човешката патогенна бактерия *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), използвана като основна мишена в настоящата докторска дисертация. Този анализ бе проведен в база данни CARD за проверка за наличие и предвиждане на резистентни гени и свързаните с това фенотипни прояви при използвания от мен щам. При биоинформатичния анализ е сравнен целият геном на бактериалния щам за възможно наличие на AP с наличните в базата им данни и получените RGI резултати сочат (Фиг.28):

- перфектни попадения в 3 гена – *arlR*, *mgrA* и *merR*;
- стриктни попадения в 5 гена- *Staphylococcus aureus* *GlpT* с мутация, предразполагаща резистентност към фосфомицин, *Staphylococcus aureus* *FosB*, *Staphylococcus aureus* *LmrS*, *Staphylococcus aureus* *murA* с мутация, предразполагаща към резистентност към фосфомицин и *Staphylococcus aureus* *norA*.
- слаби попадения в 148 гена- *Enterococcus faecalis* *cls* с мутация, предразполагаща към резистентност към даптомицин, антибиотик резистентния *fabI*, *Mycobacterium tuberculosis* *kasA* мутант, предразполагащ резистентност към изониазид, *Clostridioides difficile* *gyrA* предразполагащ резистентност към флуорохинолини, *vatA*, *vanHO*, *Acinetobacter baumannii* *AbaQ*, *mgrA*, *bcr-1*, *farA*, *tet(54)*, *MuxC*, *Borrelia burgdorferi* *murA* с мутация, предразполагаща резистентност към фосфомицин, *vanL*, *kdpE*, *evgS*, *optrA*, *mtrA*, *murB*, *tetB(P)*, *mecD*, *GOB-2*, *mel*, *baeS*, *dfrC*, *vanTG*, *poxtA*, *lmrD*, *tva(A)*, *vanKI*, *Bacillus subtilis* *mprF*, *evgA*, *cfrC*, *Streptococcus pneumoniae* *PBP2x* предразполагащ резистентност към амоксицилин, *tsnR*, *otr(A)*, *oleC*, *Escherichia coli* *ampC1* бета-лактам, *Staphylococcus* мутант *fusA* с мутация, предразполагаща резистентност към фузидова киселина, *tetB(60)*, *vanHA*, *novA*, *TaeA*, *vanRF*, *vanSG*, *pmrF*, *bacA*, *arlR*, *msbA*, *tetA(48)*, *cmx*, *Acinetobacter baumannii* *AbaF*, *Escherichia coli* EF-Tu мутанти предразполагащи резистентност към киромидин, *tetT*, *Nocardia* рифампин резистентен бета-подучастък на РНК полимераза (*rpoB2*), *sul4*, *Erm(K)*, *murA*, *merA*, *bcrA*, *lmrP*,

vanHD, vatB, macB, tet(38), arnA, mdtG, norB, *Staphylococcus aureus* LmrS, arlS, vanRI и *Clostridioides difficile* gyrB предразполагат резистентност към флуорохинолин.

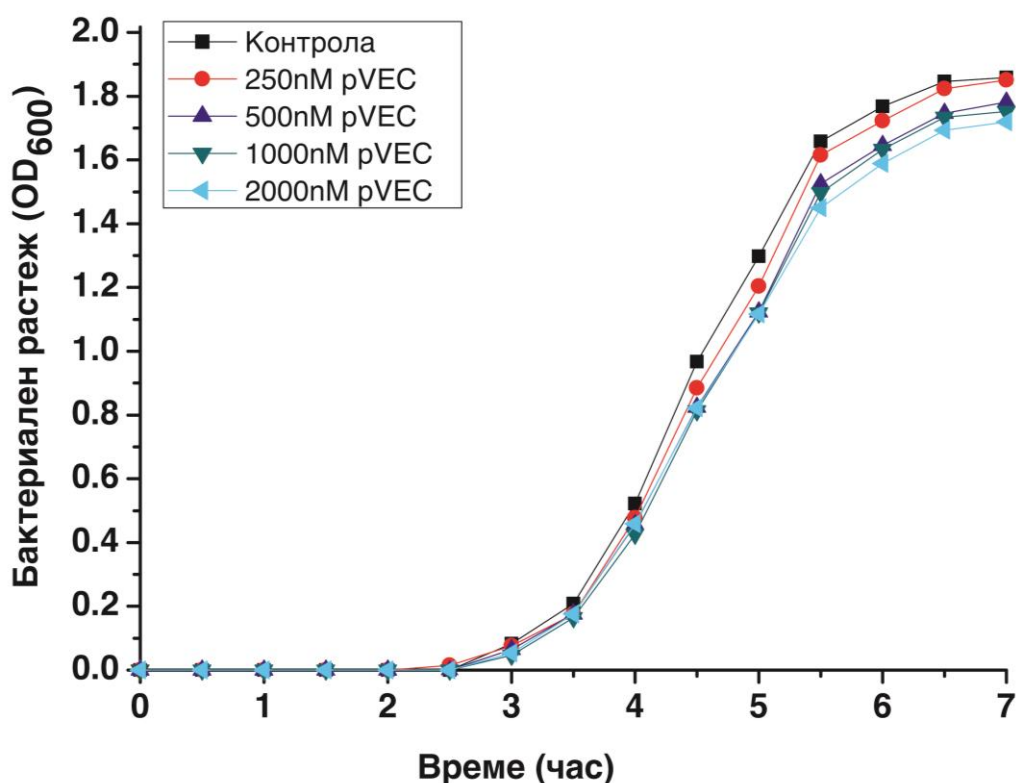
Сред получените резултати не присъстват glmS, nagA и gmk гените, което потвърждава по-ниската вероятност от възникване на мутации, водещи до AP в избраните мишени.



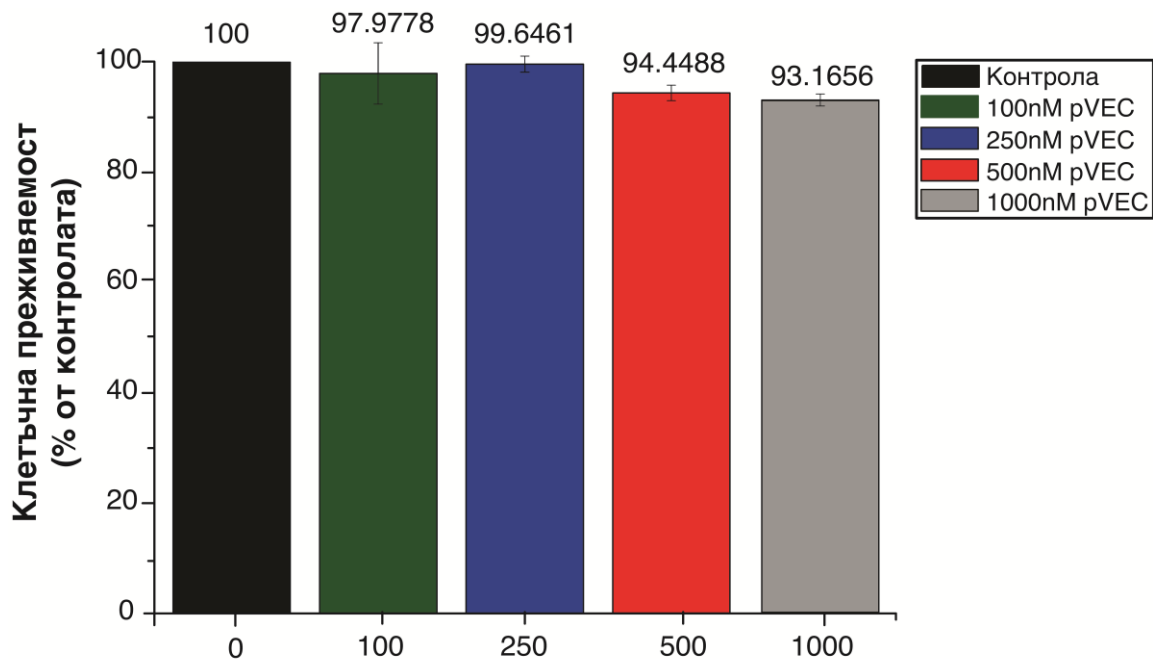
**Фиг.28.** Биоинформатичен анализ на патогенната бактерия *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach (ATCC 25923) в базата данни на CARD за възникване на AP. Представената антибиотична резистентна онтология описва съвпадения с гени и мутации, водещи до възникване на антибиотична резистентност чрез BLAST и RGI анализ в базата данни CARD.

Проведени са допълнителни експерименти в бактериални и човешки клетки, за да проследя влиянието на проникващия в клетките белтък pVEC, който е прикачен за всички проектирани ACO-и. Бактерията *S. aureus* е третирана с 4 различни концентрации pVEC - 250nM, 500nM, 1000nM и 2000nM (Фиг.29). Получените резултати демонстрират липсата на антибактериален ефект на pVEC в тестваните бактерии. При MTT тест с приложена максимална концентрация

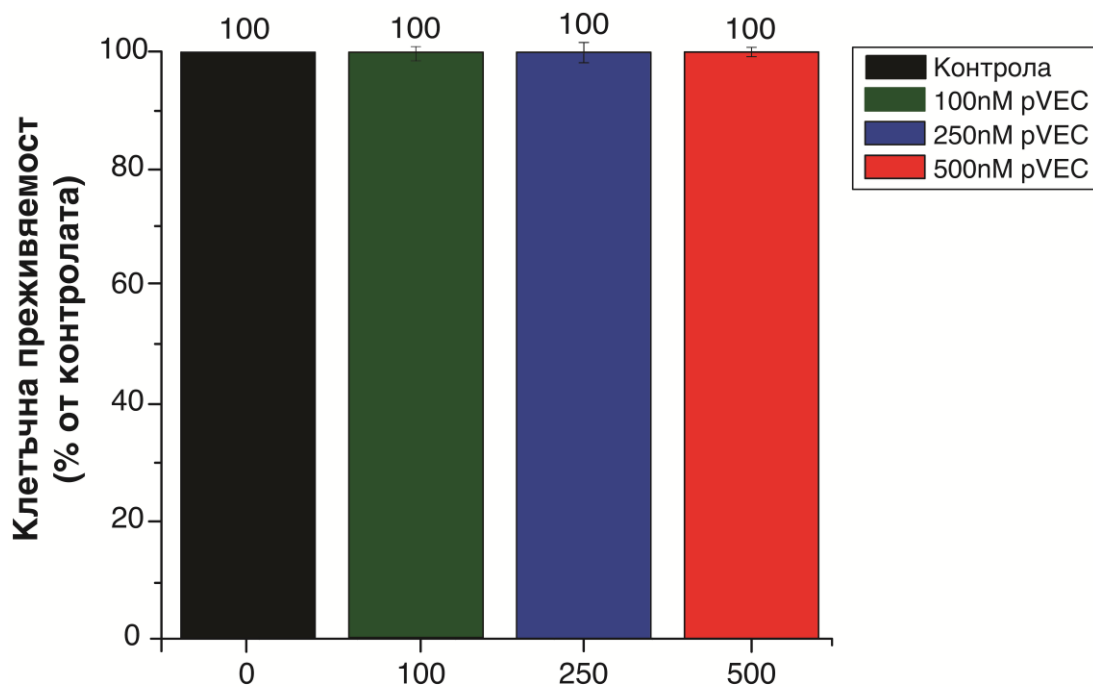
1000nM pVEC в човешка ракова линия MDA-MB-231 се наблюдава приблизително 7% потискане на растежа и пролиферативната активност (Фиг.29). Провеждането на MTT тест при същите условия и времетраене (72ч) демонстрира пълна липса на потискане на растежа и пролиферативната активност на здрави човешки клетки от линия Lер3 (Фиг.30).



**Фиг.29. Инхибиране на бактериален растеж на *S. aureus*, третиран с различни концентрации на pVEC.** Бактерията *S. aureus* е култивирана в LB течна среда и е третирана с 4 различни концентрации на pVEC: 250nM pVEC (червена линия), 500nM pVEC (тъмно синя линия), 1000nM pVEC (зелена линия), 2000nM (светло синя линия). Растежът е сравнен с контрола на *S. aureus*, която не е третирана с pVEC (черна линия). Всички измервания са проведени чрез определяне на оптическа плътност при 600nm дължина на вълната ( $OD_{600}$ ) чрез фотоспектрометър.

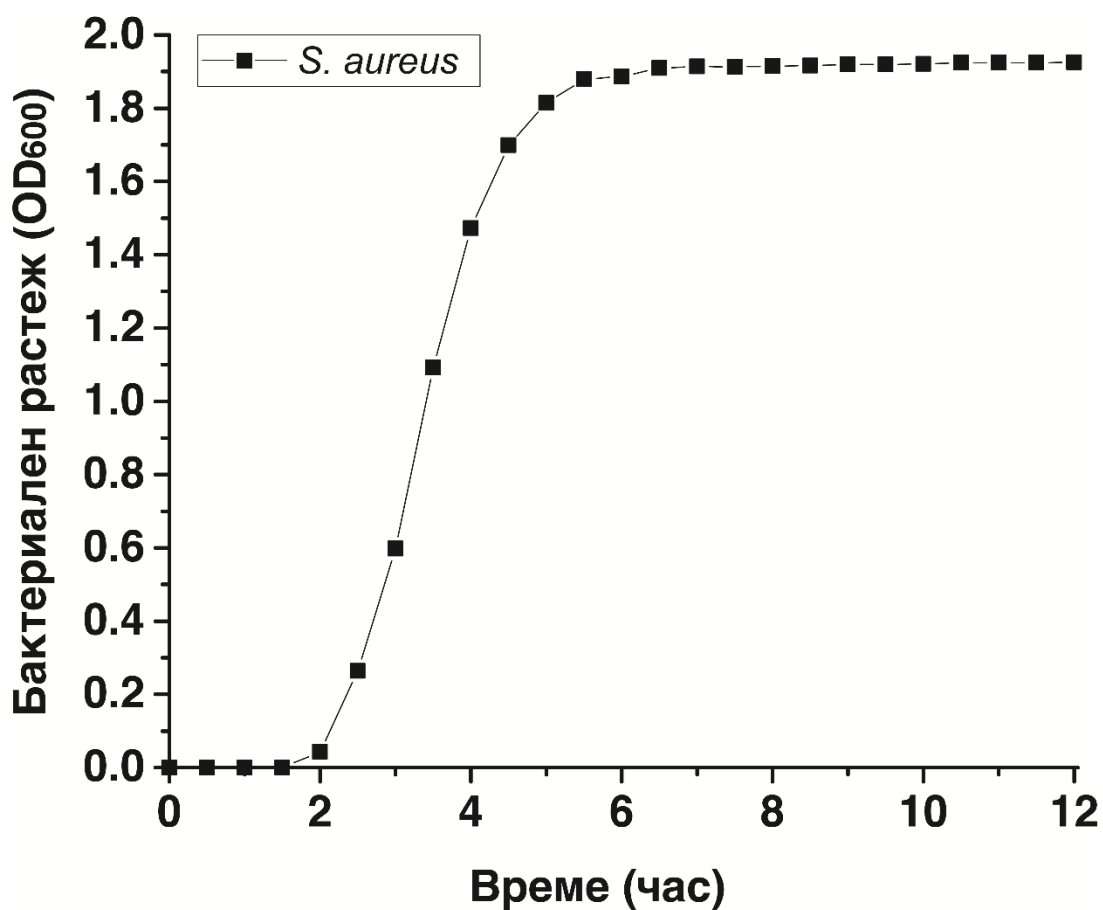


**Фиг.30.** Влияние на pVEC върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от туморна линия MDA-MB-231. pVEC е приложен в концентрации 100, 250, 500 и 1000 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.



**Фиг.30.** Влияние на pVEC върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от нетуморна линия Lp3. pVEC е приложен в концентрации 100, 250 и 500 nM за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.

Проведен е експеримент, проследяващ стандартната крива на растеж на мишенната бактерия *S. aureus* за период от 12 часа (Фиг.31). Патогенната бактерия е отглеждана и измервана в същите условия като предходните експерименти с нейно участие, с цел да се установи в какъв момент тя навлиза в стационарна фаза на бактериален растеж. Експерименталните резултати демонстрират, че след 6-тия час от нейното култивиране в кювети с LB течна хранителна среда, тя навлиза в гореспоменатата стационарна фаза на растеж. Това се наблюдава и при всички предходни експерименти с бактерията и по тази причина са онагледени техните измервания до 6-тия час от тяхното третиране с АСО-и.



**Фиг. 31. Стандартна крива на бактериален растеж на *S. aureus*.** Бактерията *S. aureus* е култивирана в LB течна среда при оптимални температурни условия от 37°C. Всички измервания са проведени чрез определяне на оптическа плътност при 600nm дължина на вълната (OD<sub>600</sub>) чрез фотоспектрометър.



## 5. Дискусия

Възникването и разпространението на антибиотична резистентност у бактериите представлява сериозен проблем в световен мащаб. То пречи на ефективното лечение и борба с инфекциите, причинени от широк спектър от патогени и излага на сериозен риск пациентите, особено тези с отслабена имунна система. Хора с тежък имунен дефицит (синдром на балоненото момче), диабет, трансплантирани органи, СПИН или претърпелите по-тежка операция или химиотерапия са по-предразположени към развитието на инфекции. Ако те са придизвикани от резистентен щам, лечението не само се усложнява, но и се увеличават болничният престой, необходимите медицински грижи и генерираните разходи. Именно затова едно от най-големите предизвикателства пред съвременната медицина и фармация е необходимостта от създаване на нови, високоефективни и добре поносими антибактериални терапевтични агенти. Антисенс олигонуклеотидната технология дава възможност за създаването на именно такива терапевтици. Тя предоставя начин за манипулиране на генетичната експресия вътре в клетките, чрез което да се изучават генетични функции и лекуват множество заболявания. Антисенс олигонуклеотидите са създадени да достигат до таргетни клетки и да хибридизират със специфични РНК мишени, инхибирайки тяхната експресия (Таблица 1). Макар че дълго време се смяташе, че РНК е обикновена междинна молекула, тя предизвика силен интерес във фармацевтичната индустрия през последните години. Предвид, че тя играе фундаментална роля за експресията на гени и често участва в развитието на много заболявания бе логично фокуса за развитие на таргетна терапия да падне именно върху нея. Тъй като АСО технологията позволява за мишенна РНК да бъде използвана на практика всяка една РНК молекула в определен организъм, това предоставя огромно поле от възможности за този тип лечение. Една малка част от тези възможности е именно инхибирането на цели метаболитни пътища чрез прицелване в ключови и есенциални метаболити в силно консервативни (мотивни) последователности като рибопревключвателите в патогенни за човека бактерии.

## Избор на дизайна

За постигане на желаната регулация на генетичната (РНК) експресия от изключително значение е химичната структура на АСО. От нея зависи дали АСО ще достигне тъканите и клетките, които се асоциират с определено заболяване, дали ще премине през клетъчната мембрана и ще предизвика РНК инхибиране на мишената. Както бе обяснено в т.4.1.3. в настоящата дисертация са представени 7 АСО-и, чиято структура е химерна, тъй като обединява 2 поколения модификации. За дизайна е избрана именно гаптамерна структура, комбинираща първо и второ поколение модификации като причините за това са както следва:

1) Първо поколение модификации се характеризира с активиране на ендонуклеазния ензим РНаза Н. Той разпознава образуваните двойноверижни участъци между АСО и РНК мишената и реже РНК молекулата без да засяга АСО. По този начин АСО е свободен да се свързва със следващи иРНК мишени и изисква по-ниски концентрации за постигане на ефект (микромоларни или наномоларни). С този тип модификации е направена централната част от дизайна на антисенс олигонуклеотидите. Те обаче не придават на АСО достатъчно стабилност и специфичност, поради което възможността от неспецифично свързване с белтъци на повърхността на клетката или вътре в нея е голям. По този начин може да се предизвика нежелана цитотоксичност и/или по-усилено филтриране от отделителната система в човешкия организъм. Затова се прибегва до подход номер 2.

2) Второ поколение модификации бе приложено на всичките 7 АСОи чрез заместване на единия водороден атом на 2'-О място от пентозния пръстен на нуклеотида с метилна група. Тази модификация е приложена на последните 3 нуклеотида в двата (5' и 3') края на АСО1 до АСО6 включително, както и на последния нуклеотид от двете страни на АСО7. По този начин се постига не само увеличена стабилност на създадените АСО спрямо ендо и екзонуклеази, а и редуциране на неспецифичното свързване с белтъци и увеличение на афинитета за свързване с комплементарната РНК. В допълнение, химерната структура увеличава плазмения полу-живот и приема в тъканите и клетките. По този начин

получената комбинация между двете поколения модификации прави цялостната структура на АСО много по-ефективна за потенциално приложение не само *in vitro*, но и *in vivo*.

3) Трето поколение модификации включват по-разнообразна група от химически промени в структурата на нуклеотидите и при тях не се предизвиква верига от последователни цикли на действие, подобно на химерните гаптамери. Напротив, те действат еднократно като хибридизират със специфичната за тях РНК мишена и след това напускат тялото чрез отделителната система. Затова е предпочетена гаптамерната структура, при която броят на циклите за инициране на ензимно разграждане на мишените е значително по-голям и необходимата концентрация за постигане на терапевтичен ефект е по-малка.

4) Предхождащата работа на научния колектив в тази област сочи, че този тип структура в действителност е високоефективна в борбата с патогенни бактерии.

Част от химерността на някои от проектираните АСО-и (АСО3-АСО7) се изразява в употребата на У вместо Т в единия или и двата края на олигомерите. Това е свързано с химическата синтеза на АСО-ите, които са метилирани в тези области и техният синтез по този начин е по-удобен и стабилен за цялостната структура. Друга важна част от структурата на изработените АСОи е, че всички са свързани с проникващия в клетките пептид рVEC. Според научната литература повечето антисенс олигонуклеотиди без допълнителни преносители преминават по-трудно през клетъчната бариера на таргетните клетки, особено ако те са бактериални. Затова е избран един от утвърдилите се преносители на АСО в прокариотни и еукариотни организми - гореспоменатия рVEC. Той е свързан ковалентно с АСО-те последователности, тъй като експерименталната практика показва, че CPP-АСО комплексите са по-стабилни при ковалентно свързване.

Тяхната дължина (Таблица 1) варира от 11нт (АСО7) до 25нт (АСО4), което попада в рамките на препоръчаните в научната литература и широко използвани в клинични тествания размери за антисенс олигонуклеотиди, с изключение на АСО7. Обикновено не се препоръчва АСО-те да бъдат под 12нт поради увеличен риск от неспецифична хибридизация в тествания организъм и над 25нт поради увеличен риск от намален клетъчен прием. АСО7 е дълъг едва 11нт. По-дълга

нуклеотидна последователност не позволяваше да се избегне пълната липсата на комплементарност с всички секвенирани организми. Затова създаденият дизайн е в по-къс размер на последователността, но въпреки това последвалите експерименталните данни не сочат за наличие на неспецифична токсичност в тестваните бактериални и човешки клетки.

### **Избор на мишените и тълкуване на получените резултати**

В основата си антисенс олигонуклеотидната технология се базира на хибридизацията между АСО и едноверижна РНК мишена по правилото за комплементарност на Уотсън и Крик. Проблем обаче представлява нагъването на иРНК във вторична и четвъртична структура, което може да блокира хибридизацията с АСО. Затова като по-подходящи и препоръчителни мишени се използват участъци от иРНК, които не са нагънати. За тази цел е използван набор от биоинформатични бази данни и софтуер, който чрез серия алгоритми изчислява приблизителната вторична структура на РНК мишените (RNAfold). По този начин по-лесно се избрат последователностите, в които да се прицелим.

GlmS рибопревключвателят бе избран като мишена по три причини. Първо, прицелването в бактериалните рибопревключватели води до потенциално по-ниска токсичност от често използваните антибиотици поради факта, че те не се откриват у хората. Втората причина е, че вероятността от развитие на резистентност на бактерията е значително по-ниска, поради силно консервативния характер на аптамерните домени, но дори при възникване на мутации в мишенната рибопревключвателна последователност- тя лесно и бързо може да бъде заменена с новата. Третата причина за избора е, че един рибопревключвател може да се среща в много патогенни бактерии и чрез биоинформатичен подбор може да се избере мишенна последователност, която или да е специфична за определен патогенен бактериален щам (както в настоящата докторска дисертация) или да е обща за повече патогенни бактериални представители. Това несъмнено дава предимство при употребата на АСО технология, тъй като позволява създаването както на тясноспектърни, така и на широкоспектърни антибиотици без да се засягат полезните бактерии, които са част от човешката микробиота. Отличен пример за това е създаденият АСО1, които се прицелва единствено в glmS

рибопревключвателя на патогена *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), където демонстрира силен антибактериален ефект. Благодарение на предварително извършените биоинформатични анализи и сравнителното му подравняване с други патогенни бактерии, притежаващи glmS рибопревключвател, то с лекота може да се промени последователността му в зависимост от терапевтичните нужди. В допълнение, АСО1 може да се използва с АСО2 като част от комбинирана терапия за постигане на бактерициден ефект в 20 установени патогени у човека.

Изборът на гуанилат киназният ген се дължи на важната роля, която има за бактериалния растеж и развитие като част от *de novo* синтеза на гуанин, демонстрирано на Фиг.12. Разбира се, бактериите могат да използват хранителни вещества от околната среда, за да допълнят *de novo* пътя на синтеза, но до каква степен това се застъпва с него и до колко е достатъчно за развитието на бактериите все още не е изяснено [10]. Въпреки това според изследване, проведено през 2008г., количеството на нуклеотидните бази в човешкия серум е недостатъчен и това често принуждава навлезлите в организма патогенни бактерии да разчитат на *de novo* нуклеотидна биосинтеза [11]. По тази причина прицелването в ензими, които са част от нуклеотидните пътища за синтез като гуанилат киназата, представлява един добър терапевтичен метод за лечение на бактеремии. Интересен резултат бе, че създадените АСО3 и АСО4 самостоятелно предизвикват много слаб инхибиторен ефект в тази мишена поотделно, но заедно предизвикват синергичен ефект, при който бактериалният растеж значително се инхибира. Възможно е това да се дължи на факта, че gmk иРНК е много голяма молекула със сложно вторично и четвъртично нагъване, поради което поотделно АСО-те не успяват да предизвикат желанния инхибиторен ефект, докато комбинирани заедно ефектът е достатъчно силен за предизвикване на стрес в иРНК и нейното ефективно инхибиране. На базата на споменатото по-рано изследване, приложението на АСО3 и АСО4 би било удобно за лечение на пациенти с бактериемия, предизвикана от *S. aureus*.

Изключително важно при дизайна на АСО-и е те да не хибридизират дори частично с други последователности освен мишенните, т.е. да не предизвикват

неспецифична хибридизация. В определени ситуации обаче е възможно възникването на подобни хибридизации дори с едва 6-7 нуклеотидни бази, при което да се активира РНаза Н-зависим механизъм на действие и да се хидролизира грешната молекула. В допълнение, рискът от свързване с неспецифични белтъци също не е напълно елиминиран, поради което експерименталното тестване е абсолютно наложително при създаването на теоретично идеалния терапевтичен АСО кандидат. По тази причина бяха създадени АСО5 и АСО6, които притежават неспецифични последователности с вариращи % на сходство в човешкия организъм. Целта бе да се изследва ефекта, който биха предизвикали в човешкия организъм и да се демонстрира колко важен е подбора на строго специфични последователности, които са предварително подложени на поредица от биоинформатични анализи. Както се и очакваше, АСО5 и АСО6 предизвикват цитотоксичност в човешки клетъчни линии. Приблизително близките цитотоксични активности на АСО5 в раковата клетъчна линия MDA-MB-231 и ембрионалната Lер3 е възможно да бъдат обяснени с наличието на близко съвпадение с предсказани некодиращи белтъци РНК-и и възникване на частична хибридизация, водеща до получените резултатите. По същият начин АСО6 демонстрира силна цитотоксичност в ракови клетки MDA-MB-231, която е още по-силно изявена в здравите ембрионални клетки Lер3. Този факт може да се обясни с възможни изменения в раковите клетки, които ги правят по-устойчиви на този АСО и близките % съвпадение в транскриптома на човека, при което отново възникват частични хибридизации в Lер3, водещи до по-силна цитотоксичност в тях.

Антисенс олигонуклеотидът АСО7 успешно демонстрира липсата на предизвикване на антибактериална или цитотоксична активност в бактерията *S. aureus* и здравите ембрионални клетки Lер3, благодарение на уникалната си последователност с липса на дори близки до неговата последователности. Интересен ефект обаче бе предизвиканият противотуморен ефект в клетъчна линия MDA-MB-231. Възможно е този ефект да се дължи на неспецифично свързване на АСО7 с вътреклетъчни белтъци, с което да пречи на важни вътреклетъчни процеси.

Експерименталното тестване на проникващия пептид pVEC, който е задължителна част от всеки от проектираните АСО-и в настоящия дисертационен труд, доказва липсата на антибактериална активност в тестваните бактериални клетки *S. aureus* и липсата на цитотоксична активност в човешките Lер3 и MDA-MB-231 клетъчни линии. Това демонстрира, че предизвиканият ефект на АСО-те в настоящата докторска дисертация се базира изцяло на успешната хибридизация на тестваните АСО-и и активирането на ензима РНаза Н.

### **Избор на експериментални модели**

Избраният мишенен организъм е *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), който е важен клиничен изолат и е сред най-честите причини за придобити в болнични заведения, както и сред обществото, инфекции. Именно този щам на патогенната бактерия е често използван в лабораторни условия за тестване на устойчивост към антибиотици и други терапевтични агенти [12]. В допълнение, мишенният организъм е част от списъка с приоритетни патогенни бактерии на СЗО, нуждаещи се спешно от развитие на нови антибактериални агенти. Другите две бактерии, използвани в настоящата дисертация (*E. coli* K12 и *B. subtilis* 168), са избрани, поради наличието на glmS рибопреключвател в тях с целта да служат за проверка за специфичността на АСО1 спрямо избраната мишенна последователност в *S. aureus*. Избраните човешки клетъчни линии от нетуморна клетъчна линия Lер3 и туморна клетъчна линия MDA-MB-231 са избрани, за да се тества цитотоксичността, която може да се предизвика от неспецифично хибридизиране (АСО5 и АСО6) или липса на такова (АСО7) в човешкия организъм.

В обобщение, с напредване на АСО технологията и подобряването на разбирането на РНК структурата и функцията, става все по-възможно откриването на нови лекарствени агенти и терапевтици. Разбира се, различните РНК молекули могат да представляват различна степен на трудност като мишени за АСО-и и е възможно да ни изправят пред стари и нови предизвикателства като селективност и специфичност. За щастие обаче при добър биоинформатичен анализ и дизайн на АСО, шансовете за успешно откриване на нови антибактериални терапевтици стават все по-големи и все по-чести с всяка изминала година.

## 6. Изводи

1. Според проведените биоинформатични анализи като подходящи мишени за широкоспектърни антибиотици са установени:
  - 1.1. *glmS* рибопревключвателят, отговарящ за кодирането на глюкозамин-6-фосфат синтетаза в геномите на 26 патогенни за човека бактерии;
  - 1.2. *pagA* генът, кодиращ ензима N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза в геномите на 106 патогенни за човека бактерии;
  - 1.3. *gmk* генът, кодиращ ензима гуанилат киназа в 109 патогенни за човека бактерии.
2. Според проведените биоинформатични анализи на биохимичните пътища за синтез на ключови метаболити в патогенната бактерия *S. aureus* е установено, че липсват функционални алтернативни пътища за синтез на пептидогликан и гуанин в бактериалните клетки, освен тези с участието на избраните мишени.
3. Създадени са общо 7 нови химерни антисенс олигонуклеотиди, сред които четири са строго специфични за патогенната бактерия *S. aureus* (ACO1-ACO4), два не са специфични за определена мишена (ACO5, ACO6) и един не притежава мишена (ACO7).
4. Доказано е силно инхибиращо действие на ACO1, който при комбинирано приложение с ACO2 *in vitro* блокира синтезата на пептидогликан и постига бактерициден ефект в патогена *S. aureus* (МИК<sub>80</sub>=800nM ACO1 и МИК<sub>80</sub>=800nM ACO2).
5. Доказан е силен синергичен инхибиращ ефект при комбинирано приложение на ACO3 и ACO4 *in vitro* в патогена *S. aureus* (МИК<sub>50</sub>=875nM ACO3 и МИК<sub>50</sub>=875nM ACO4).
6. Доказано е, че неспецифичните последователности на ACO5 и ACO6 предизвикат силен цитотоксичен ефект в здрави и ракови човешки клетъчни линии, което демонстрира важноста при проектирането на ACO от строго специфичен и предварително анализиран биоинформатично дизайн.
7. Доказано е, че ACO7 със своята уникална последователност, която не притежава нито напълно комплементарна, нито дори сходна мишена в никой



секвениран организъм, не предизвиква цитотоксичност в бактерията *S. aureus* и в човешка клетъчна линия Lep3, но проявява антитуморна активност спрямо ракова клетъчна линия MDA-MB-231.

## 7. Приноси

Научните приноси на настоящата докторска дисертация могат да се представят по следния начин:

1. Проведен е комплексен биоинформатичен анализ на човешки патогенни бактерии и техни жизнено важни биохимични пътища за оценка на потенциала им като мишени за създаването на нови антибактериални агенти.
2. За първи път в света са използвани функционално значимите бактериални мишени *glmS*, *pagA* и *gmk* за създаването на 4 новосинтезирани химерни антисенс олигонуклеотиди, които доказано водят до *in vitro* инхибиране на растежа на патогенната бактерия *S. aureus*.

## Автобиография

Катя Попова е родена през 1991г. в гр. София. Настоящем тя е отчислен докторант по „Генетика- Биоинформатика“ към катедра „Генетика и геномика“ в Биологически факултет към Софийски университет „Св.Климент Охридски“ и асистент в Института за ядрени изследвания и ядрена енергетика (ИЯИЯЕ), БАН. Катя е защитила магистърска степен по “Генетика и геномика” през 2016 г. По време на своето обучение в магистърската програма по “Генетика и геномика”, тя завършва с пълно отличие. Катя успешно полага държавни изпити и се дипломира като Бакалавър по „Биология“ през 2014г. По време на своето обучение в бакалавърската програма по „Биология“, тя е стажувала в продължение на 6 месеца в Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН по Проект BG051PO001 – 3.3.07-0002- “Студентски практики” в направление „Експериментална клетъчна морфология и патология“ при проф. д-р Радостина Александрова.

Катя Попова участва в следните научни публикации:

1. **К. В. Popova**, A.Valsamatzi-Panagiotou, R. Penchovsky “New drug discovery strategies for targeting drug-resistant bacteria: a review”, *Environmental Chemistry Letters*, *in press*.
2. **К. В. Popova** and Robert Penchovsky “Current Activators of the glmS Riboswitch”, *Biomed J Sci & Tech Res*, DOI: 10.26717/BJSTR.2021.33.005348 ISSN: 2574-1241, 2021.
3. A.Valsamatzi-Panagiotou, **К. В. Popova**, R. Penchovsky „Chapter 1 Strategies for prevention and containment of antimicrobial resistance“, *Sustainable Agriculture Reviews 49 : Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 2. Natural and Synthetic Approaches*, ISBN10 3030582582, 2020.
4. Valsamatzi-Panagiotou A., **К. В. Popova.**, R. Penchovsky Drug Discovery for Targeting Drug Resistant Bacteria. In: Panwar H., Sharma C., Lichtfouse E. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews 46. Sustainable Agriculture Reviews*, vol 46. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2_9), 2020.

5. **K. B. Popova** and Robert Penchovsky. "Why Some Functional RNAs Such as Bacterial Riboswitches are Versatile Targets for Antibacterial Drug Discovery?". *EC Microbiology* 16.11 (2020): 54-55.
6. L. A. Otcheva, N. Pavlova, **K. B. Popova**, M. Traykovska and Robert Penchovsky. "Why Some Riboswitches are Suitable Targets for Antibacterial Drug Discovery?", *EC Microbiology* 16.11 (2020): 48-51.
7. **K. B. Popova**, L. A. Otcheva, M. Traykovska, R. Penchovsky "RNA as a Potent Target for Antibacterial Drug Discovery", *Biomedical Journal of Scientific and Technological Research*, 16, 942-953, 2019.
8. **K. B. Popova**, L. A. Otcheva, M. Traykovska, R. Penchovsky "Probing general toxicity of antisense oligonucleotides to bacterial and mammalian cells", 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, 2018
9. L. A. Otcheva, **K. B. Popova**, M. Traykovska, R. Penchovsky "Control of gene expression by bacterial riboswitches and their application as drug targets", 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, 2018

Катя Попова притежава сертификати за следните успешно завършени курсове:

- Курс "Въведение в експерименталната онкология"
- Курс „Молекулни механизми на карциногенезата и нови подходи в профилактиката, диагностиката и лечението на раковите заболявания"
- Курс „Въведение в клетъчното и тъканното инженерство"
- Курс по диагностични маркери на заболяванията при човека и животните

Катя Попова участва в следните проекти:

- Проект № КП-06-Н31/18 на тема: **Дизайн на функционални нуклеинови киселини за синтетична регулация на генната при прокариоти и еукариоти, ФНИ-МОН**
- Проект №ДН/13/14/20.12.2017 на тема: **Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти, ФНИ-МОН**
- Проект №2621 на тема: **Антисенс олигонуклеотиди, които специфично се свързват с ФМН и САМ рибопревключватели при човешки патогенни бактерии, Научен фонд „Изследвания“ към СУ „Св.Кл.Охридски“**

▪ Проект №80-10-100/20.04.2017 на тема: **Нови методи за създаване на антибиотици срещу резистентни щамове на *Escherichia coli*, чрез използване на антисенс олигонуклеотиди, които инхибират биохимични пътища, контролирани от рибопревключватели**, Научен фонд „Изследвания“ към СУ „Св.Кл.Охридски“

## Използвана литература

1. Coordinators, N.R., *Database resources of the National Center for Biotechnology Information*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D8-D20.
2. Alcock, B.P., et al., *CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D517-D525.
3. Lorenz, R., et al., *ViennaRNA Package 2.0*. Algorithms Mol Biol, 2011. **6**: p. 26.
4. Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Грудева, В., et al., *Ръководство по микробиология* 2006, гр. София: УИ "Св. Климент Охридски".
6. Драганов, М., *Клетъчни култури. Теория и техники*. 2004: ИК "ВАП".
7. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
8. Asokan, G.V., et al., *WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain*. Oman Med J, 2019. **34**(3): p. 184-193.
9. Kofoed, E.M., et al., *De Novo Guanine Biosynthesis but Not the Riboswitch-Regulated Purine Salvage Pathway Is Required for Staphylococcus aureus Infection In Vivo*. J Bacteriol, 2016. **198**(14): p. 2001-2015.
10. Samant, S., et al., *Nucleotide Biosynthesis Is Critical for Growth of Bacteria in Human Blood*. J Plos Pathogens, 2008. **4**(2).
11. Treangen, T.J., et al., *Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 25923*. Genome Announc, 2014. **2**(6).