



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Биологически Факултет

Катедра Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**на Дисертационния труд за придобиване на
образователна и научна степен „Доктор“ в професионално
направление 4.3 Биологически науки – „Генетика“ на тема:**

**Биоинформатичен и геномен анализ на
рибопревключватели и свързани с тях биохимични пътища
при човешки патогенни бактерии и използването им като
мишени за създаване на нови антибактериални агенти**

Изготвил: Николет Илиева Павлова

Научен ръководител: доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски

гр. София

2019

Дисертационният труд е обсъден на Аprobация (разширено заседание) на катедра Генетика към Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, проведено на 25.06.2019г., въз основа на ректорска заповед РД 38-284/19.06.2019.

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:

1. доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски, катедра „Генетика“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

2. доц. д-р Светослав Георгиев Димов, катедра „Генетика“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ – Председател на журито

Външни членове:

3. чл. кор. проф. дбн. Драга Иванова Тончева-Митева, катедра Медицинска Генетика, Факултет по Медицина при Медицински Университет – гр. София

4. чл. кор. проф. дбн. Иван Гергов Митов, катедра Медицинска Микробиология, Факултет по Медицина при Медицински Университет – гр. София

5. доц. Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм, катедра “Медицинска Микробиология”, Факултет по Медицина при Медицински Университет – гр. София

Защитата на дисертационния труд ще се състои на..... от..... часа в сградата на Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд, написан от Николет Илиева Павлова съдържа: 151 страници, 43 фигури, 5 таблици и 168 цитирания. Той е базиран на 2 научни публикации с участието на докторанта с общ импакт фактор 7,096 и Scimago Journal and Country Rank (SJR) 50 точки.

1. Genome-wide bioinformatics analysis of FMN, SAM-I, glmS, TPP, Lysine, Purine, Cobalamin, and SAH riboswitches for their applications as allosteric antibacterial drug targets in human pathogenic bacteria, **Nikolet Pavlova**, Robert Penchovsky, 2019, Expert Opinion on Therapeutic targets, **IF:4,598**, <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1618274>. Q1, 25 точки.

2. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria, **Nikolet Pavlova**, Dimitrios Kaloudas, Robert Penchovsky, 2019, Gene. **IF: 2,498**, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.036>, Q1, 25 точки.

УЧАСТИЕ В КОНФЕРЕНЦИИ:

1. Участие в международната биоинформатична конференция „German Conference on Bioinformatics”, която се проведе от 25-28.09.2018г. в гр. Виена, Австрия и представяне на постер: „EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses, **Nikolet Pavlova**, Dimitrios Kaloudas and Robert Penchovsky”

2. 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:

2.1 Bioinformatics Web-based Server for bacterial genome analyses, **Nikolet Pavlova** and Robert Penchovsky – **Най-добър постер – Втора награда**

2.2 Control of gene expression by bacterial riboswitches and their application as drug targets, Lozena A. Otcheva, Katya B. Popova, **Nikolet Pavlova**, Martina Traykovska and Robert Penchovsky – **Най-добър постер – Втора награда**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АМФ – аденозин монофосфат

АДФ – аденозин дифосфат

АСО – антисенс олигонуклеотид

АСОи – антисенс олигонуклеотиди

АР – антибиотична резистентност

АБ – антибиотик

АТФ – аденинтрифосфат

бд – базови двойки

ГИТ – гастроинтестинален тракт

ГМФ – гуанозин монофосфат

ГДФ – гуанозин дифосфат

ГТФ – гуанозин трифосфат

dГМФ – деоксигуанозин монофосфат

dГТФ – деоксигуанозин трифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеинова
киселина

ЕС – Европейски съюз

ИМФ – инозин монофосфат

иРНК – информационна
рибонуклеинова киселина

ИФ – Импакт фактор, Impact factor, IF

кДНК – копиДНК

КМФ – ксантин монофосфат

Kd – константа на дисоциация

мезо-ДАР – мезо-ДАП, мезо-
диаминопимелинова киселина

мМ – микромола

МОН – Министерство на
Образованието и Науката на Република
България

мРНКи – малки рибонуклеинови
киселини, sRNAs

НК – нуклеинова киселина

нМ – наномола

НТР – нетранслиран район

нкРНК – нуклеинова РНК

ПНК – пептид нуклеинова киселина,

PNASs – пептид нуклеинови киселини

РНК – рибонуклеинова киселина

РСМ – рибозим свързващо място

САМ – S-аденозил метионин

САЩ – Съединени Американски Щати

САХ – S-аденозил хомоцистеин

СУ – Софийски Университет „Св.
Климент Охридски“

ТПФ – тиамин пирофосфат, TRP

тРНК – транспортна рибонуклеинова
киселина

ФМН – флавин мононуклеотид

ФМН Н₂ – хидроскилна форма на ФМН,
възстановена форма

ФАД – флавин аденин динуклеотид

ФАД Н₂– хидрохинонова форма на флавин аденин динуклеотид

яРНК – ядрени рибонуклеинови киселини, sRNA

A – аденин

Adk - аденилат киназа

Apt - аденин фосфорибозилтрансфераза

C – цитозин

CGlcN - карба- α -D-глюкозамин, carba- α -D-glucosamine

CPP – cell penetrating protein (клетъчно проникващ белтък)

Downstream - надолу по веригата

Ие - изолевцин

Fru-6-P – фруктозо-6-фасфат

G – гуанин

Gly – Glycine, глицин

Glc-6-P - глюко-6-фосфат

GlcN-1-P - глюкозамин-1-фосфат

GlcN6P - глюкозамин-6-фосфат

GlmS – глюкозамин-6-фосфат активираща рибозима

Gmk - гуанилат киназа

HTS – методи за скрининг с висока чувствителност

HprT- хипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза, HGPRtase

IMP - инозин монофосфат

Leu – Leucine, левцин

MDR – мултирезистентни

MDRB - много-резистентните бактерии

PT – пиритиамин

PRPP – фосфорибозил пирофосфат

PTPP – пиритиамин пирофосфат

PRPT фосфорибозил пирофосфат

PurB - аденилосукцинат лиаза, ASL

SD – Шайн-Делгарно последователности

Ser – Serine, серин

SAMP - сучиниладенозин монофосфат

Thr – Threonine, треонин

U – урацил

UDP-GlcNAc – Uridine diphosphate N-acetylglucosamine, Уридин-дифосфат N-азетилглюкозамин

Val – Valine, валин

XMP - ксантозин монофосфат

3D – 3-дименсионално пространство, 3-странно пространство

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	10
2.1 ЦЕЛИ.....	10
2.2 ЗАДАЧИ	10
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	12
3.1 МАТЕРИАЛИ	12
3.2 МЕТОДИ.....	13
3.2.1 Чужди софтуерни програми	13
3.2.2 Софтуерни програми, разработени от нас с доц. д-р. Роберт Пенчовски	14
4. РЕЗУЛТАТИ	15
4.1 Разпространение на бактериалните рибопревключватели.....	15
4.2 Структурна организация на рибопревключвателите и различни видове лиганди	27
4.3 Използване на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени	39
4.3.1 Препимущества на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени.	39
4.3.2 Пригодност на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени	40
5. ОБСЪЖДАНЕ.....	77
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
7. ИЗВОДИ	87
8. ПРИНОСИ	89
АВТОБИОГРАФИЯ	91
БИБЛИОГРАФИЯ	96

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Антибиотичната резистентност (АР) е една от най-големите заплахи за общественото здраве в днешно време. АР възниква по естествен начин, но злоупотребата с антибиотици при хора и животни ускорява процеса. Световната Здравна Организация (СЗО, World Health Organization, WHO) предупреждава през 2016 година, че глобално се появяват и разпространяват нови механизми за резистентност, които застрашават способността ни да лекуваме инфекциозни заболявания, водещи до продължително боледуване и смърт. Това води до по-дълъг болничен престой, по-високи медицински разходи и повишена смъртност сред пациентите.

В Европейския съюз (ЕС) от 5% до 12% от болничните пациенти развиват инфекция по време на престоя си. Всяка година около 400 000 пациенти се заразяват с резистентен щам по време на лечение в болница, от които средно 25 000 души умират. Много-резистентните бактерии (MDRB) в ЕС причиняват икономически загуби от над 1,5 милиарда евро годишно. В резултат на това съществува огромна нужда да се открият лекарства, които преодоляват АР (1).

Една от стратегиите за разработване на антибактериални лекарства е използването на нови молекулярни цели. Обширните проучвания върху бактериални иРНК са довели до откриването на нов тип генетични регулаторни елементи, наречени рибопревключватели, които директно свързват специфични метаболити и променят генната експресия (2). Те са контролни елементи, базирани на РНК, които регулират генната експресия без участието на белтъчни фактори (3), (4), (5), (6). Те контролират генната експресия в различни видове, които принадлежат към трите домена на живота, включващи бактерии, археи и еукариоти. Рибопревключвателите са най-широко разпространени в бактерии и археи. (7), (8), (1). Към настоящия момент не са открити в човек. (9)

Рибопревключвателите са цис-действащи регулаторни елементи, разположени обикновено в 5'-нетранслирания регион (5'-НТР, 5'-UTR) на информационната РНК (иРНК, mRNA) (4)(5). Те се нагъват в сложни триизмерни структури, които представляват прецизни рецептори за техните прицелни молекули (10)(11). От откриването на първите рибозими до сега са направени много открития, които значително разширяват нашето разбиране за различните роли, които Рибонуклеиновата киселина (РНК) може да изпълнява в клетката освен като посредник между Дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК) и белтъците (12), (13), (14). Всички тези

фундаментални открития осезаемо променят познанието за голямото разнообразие от функции на РНК и доказват, че РНК изпълнява най-различни функции в клетката в сравнение с белтъците и ДНК. РНК може да проявява каталитични и биосензорни свойства, подобни на тези на белтъците (15).

Най-често рибопревключвателите са изградени от две части - аптамерен домен и експресионна платформа (16), (17). Аптамерният домен е метаболит-чувствителна структура, която често се разполага в 5'-нетранслирания район (5'-НТР) на иРНК (mRNA). Аптамерът представлява високо консервативна секвенция, която формира 3-измерна (3D) структура, свързваща специфично конкретен клетъчен метаболит. Този метаболит се нарича лиганд (18), (19), (20) Благодарение на консервативността на аптамерния домен, рибопревключвателите могат да се класифицират в отделни групи. Размерите на известните аптамери обикновено варират от 35 до 200 нуклеотида по дължина. Втората част от структурата на рибопревключвателя е експресионната платформа (21). Експресионната платформа и аптамерният домен често предизвикват конформационни промени след свързване на лиганда (22). Експресионните платформи могат да се различават по размер, нуклеотидна последователност и структурна конфигурация (23).

Един рибопревключвател може да бъде открит в много различни бактерии и може да бъде повторен многократно в конкретен геном. Рибопревключвателите контролират биосинтеза на някои витаминни прекурсори като рибофлавин, тиамин и кобаламин. Те контролират синтеза на есенциални аминокиселини, като метионин и лизин и синтеза на нуклеотиди, като аденин и гуанин.

Бактериалните рибопревключватели регулират генната експресия чрез четири различни механизма на регулация. Три от тях са цис-действащи регулаторни механизми - превенция на транслацията, терминация на транскрипцията и дестабилизиране на иРНК. Четвъртият механизъм за генна регулация посредством рибопревключватели е транс-действащ (24-26), (27), (28). Рибопревключвателите регулират експресията на ограничен брой гени. Повечето от тези гени са отговорни за синтеза на важни метаболити, без които клетката не може да функционира. Следователно, разпространението на рибопревключвателите е важно за откриването на нови антибактериални лекарствени препарати.

Понастоящем са открити 36 различни класа рибопревключватели. Всички рибопревключватели са класифицирани според техните аптамерни домени в отделни класове (1, 29). Всеки клас рибопревключватели регулира отделен метаболитен

биохимичен път чрез специфично усещане и свързване на различен тип метаболит (30). Откритите до днес рибопревключватели могат да усещат, разпознават и свързват специфично нуклеотиди (аденин, гуанин и 2'-дезоксигуанозин и т.н.), йони (Mg^{2+} , Mn^{2+} и F^{-}), коензими (акокобаламин, ФМН, САМ, ТПФ и др.), сигнални молекули (цикличен-ди-АМР, цикличен-ДИ-ГМП и др.), аминокиселини (глицин, глутамин и лизин) и други производни.

В настоящата Докторска дисертация представяме анализ на разпространението на 28 различни рибопревключватели и структурата, и функцията на 8 различни класа рибопревключвателя, открити в човешки патогенни бактерии и специфичните лиганди, с които си взаимодействат. Извършихме биоинформатичен и геномен анализ на избрани рибопревключватели, които се срещат при най-много бактериални човешки патогени. В действителност, осемте рибопревключвателя, чиито резултати избрахме да представим в настоящата Докторска дисертация са открити в 49 вида човешки патогенни бактерии от общо 59 вида известни бактериални човешки патогени. Бактериите, в които се откриват рибопревключвателите заразяват хората и водят до развитие на сериозни бактериални инфекциозни заболявания, в някои случаи дори завършващи с летален край. Причинителят на Антракс, *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) има 12 различни класа рибопревключвателя в генома си (1). Третият най-често срещан патоген, отговорен за хранителните натравяния във Великобритания и САЩ, *Clostridium. perfringens*, също се открива при 12 класа рибопревключватели.

Бактериалните рибопревключватели притежават редица преимущества, които им позволяват да бъдат използвани като алостерични молекулярни мишени за разработването на нови антибактериални агенти (31)(32, 33). Не всички класове рибопревключватели са обещаващи лекарствени цели. До този момент липсваше всеобхватен анализ на пригодността на различните класове рибопревключватели като антибактериални мишени за разработване на антибактериални лекарства.

Основавайки се на извършените от нас *in silico* анализи класифицирахме осем от най-разпространените рибопревключватели в четири отделни групи въз основа на тяхната пригодност да се използват като антибактериални мишени. Установихме, че рибопревключвателите ФМН, САМ-I (S-аденозилметионин), glmS, ТПФ и Лизин са обещаващи мишени за откриване на антибактериални лекарства. Всички извършени биохимични и геномни анализи, които по своя смисъл са структурно биологични анализи, дадоха възможност да се отделят само пригодните рибопревключватели, чието инхибиране довежда до потискане на растежа на патогенни бактерии, в които

рибоправключвателите се откриват. С част от пригодните рибопревключватели бяха извършени лабораторни анализи, които изпитват на практика предложените от нас стратегии за инхибирането им и потвърждават тяхната пригодност на практика. Резултатите от лабораторните анализи не са обект на настоящия труд.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

2.1 ЦЕЛИ

Основната цел на настоящата докторска теза е да се извършат биоинформатичен и геномен анализ на рибопревключватели и свързани с тях биохомични пътища при човешки патогенни бактерии за използването им като мишени за създаване на нови антибактериални агенти. Да се направи оценка за възможността конкретни рибопревключватели да бъдат използвани и класифицирани по пригодност като мишени за откриване и създаване на нови антибиотици.

2.2 ЗАДАЧИ

Задача №1. Биоинформатичен анализ за разпространението на рибопревключвателите.

1.1 Да се извърши биоинформатичен анализ даващ информация за това, в колко биологични вида се среща всеки един от изследваните 28 рибопревключвателя.

1.2 Да се извърши биоинформатичен анализ даващ информация за това, в колко бактериални вида се среща всеки един от изследваните 28 рибопревключвателя. От тях да се отделят само човешките патогенни бактерии и да се изчисли процента на човешките патогенни бактерии, в които са открити конкретните рибопревключватели спрямо всички известни човешки бактериални патогени.

1.3 Да се извърши биоинформатичен анализ даващ информация за това, в колко общо видови секвенции се среща всеки един от изследваните 28 вида рибопревключвателя.

1.4 Да се съберат статистически данни носещи информация за това, в колко бактериални секвенции се среща всеки един от изследваните 28 рибопревключвателя.

1.5 Да се анализират събраните данни за разпространението на рибопревключвателите.

Задача № 2. Организация на структурата на рибопревключвателите и видове лиганди, които биват разпознавани от рибопревключватели.

2.1 Да се изберат някои от най-разпространените рибопревключватели според анализа направен вследствие изпълнението на Задача №1 и да се проучи структурата им.

2.2 Да се проучат всички известни лиганди, които се разпознават от различните 28 рибопревключвателя.

Задача №3. Биоинформатичен и геномен анализ на осем от най-разпространените рибопревключватели.

3.1 Да се изберат критерии, на чиято база да се определи дали конкретните избрани рибопревключватели са подходящи мишени за откриване на нови антибактериални лекарства.

3.2 Да се провери, за всеки един от избраните най-разпространени рибопревключватели, в кои биохимични пътища участва.

3.3 Да се провери дали рибопревключвателят участва в синтезирането на ключови метаболити от метаболитните пътища на човешки патогенни бактерии.

3.4 Да се проучи, в биоинформатични бази данни и научна литература, дали съществуват активни транспортни белтъци, чиято експресия да се контролира от рибопревключвателите или съществуват такива, чиято експресия не се регулира от рибопревключватели.

3.5 Да се проучи дали има алтернативни пътища за синтез на ключовия метаболит за бактерията, които да не са под контрола на рибопревключвателя.

3.6 Рибопревключвателите да се категоризират по пригодност за използването им като мишени за нови антибактериални лекарства.

3.7 Въз основа на данните от Задача №1, Задача №2 и Задача №3, да се даде отговор на въпроса дали деактивирането на функцията на конкретните рибопревключватели би довело до леталност на патогенните бактерии или до спиране на растежа им.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 МАТЕРИАЛИ

3.1.1 Бази данни

За събирането на необходимата информация за извършването на биоинформатичните и геномни анализи на рибопревключвателите, използвахме различни бази данни с отворен достъп.

3.1.1.1 GeneBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), NCBI data base, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Базата данни NCBI представлява Национален център за биотехнологична информация, подкрепяща науката и здравето, позволяваща достъп до биомедицински и геномни публикации. Част от тези публикации послужиха за написването на „Литературния обзор” и вникването в дълбочина в проблема (34), (35).

3.1.1.2 Rfam 14.1 (<http://rfam.xfam.org/>) представлява база данни – колекция от РНК семейства, всяко от които е представено чрез множество секвенционно подравняване, консенсусни вторични структури и модели. От нея бяха използвани нуклеинови последователности на рибопревключвателите при отделните човешки патогенни бактерии, както и данни за броя на всички видове, в които се откриват рибопревключвателите, обект на настоящата Докторска теза. От нея са взети и броя на бактериалните видове, общия брой на всички секвенции, както и броя на бактериалните секвенции, в които се откриват споменатите рибопревключватели (36-38).

3.1.1.3 Protein Data Bank (PDB) (<http://www.wwpdb.org/>) е кристалографска база данни за 3D структурите на биологични молекули, като белтъци и нуклеинови киселини. Тя е свободно достъпна за всички Internet потребители (39),(40).

3.1.1.4 KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, (<http://www.genome.jp/kegg/>) – KEGG – енциклопедия с гени и геноми. Тя е създадена като източник за разбиране на сложните биохимични процеси протичащи в биологичните системи, т.е клетките, организмите и екосистемите. От раздела **KEGG PATHWAY** почерпихме информация за основните ензими и метаболити, които участват в биохимичните реакции на бактериите (41-43).

3.1.1.5 BioCyc data base – база данни BioCyc, (<http://biocyc.org/>). Тя представлява колекция от 14727 пътя и/или геномни бази данни (PGDBs – pathway genome databases) и софтуер, за анализиране на данните в тях. Преди 3 години, в нея имаше малко над 6000 биохимични пътя (44-47).

3.1.1.6 ExPASy Bioinformatic Resource Portal, (<http://www.expasy.org/>), позволява достъп до научни бази данни и софтуерни продукти в различните области на науката, включващи протеомика, геномика, биологични системи, популационна генетика, транскриптомика и други. Използвахме я за откриване на поредния номер на ензимите (48).

3.2 МЕТОДИ

3.2.1 Чужди софтуерни програми

За обработването на събраните данни и нуклеотидни последователности и извършването на биоинформатичните и геномни анализи на рибопревключвателите, използвахме различни софтуерни продукта, част от които са разработени от нас с доц. д-р Роберт Пенчовски.

3.2.1.1 Notepad++, (<https://notepad-plus-plus.org/>).

Notepad++ е безплатен редактор на програмни кодове.

Той се използва за съхранение на нуклеотидни секвенции под формата на fasta-format файлове. Fasta файл може да съдържа безброй много секвенции. За да бъдат прочетени и разбрани правилно от обработващата програма, въведените секвенции във файла, е необходимо да спазват няколко правила. В един файл може да има безброй много редове. На всеки ред могат да се изписват до 80 символа. Въвеждането на нова секвенция започва с „>” последван от името на секвенцията, след което, отдолу се написва ръчно или поставя копираната последователност. След това, създадените fasta файлове се използват за секвенционно подравняване (multiple alignment).

3.2.1.2 Basic Local Alignment Search Tool - BLAST алгоритъм за търсене, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Basic Local Alignment Search Tool открива локални региони на подобност между нуклеотидни последователности. Програмата сравнява нуклеотидни или белтъчни секвенции със секвенции от бази данни и изчислява статистическите прилики. Програмата се използва и за откриване на еволюционни връзки между секвенции и по този начин помага за идентифицирането на членовете от генни семейства.

3.2.1.3 Clustal W/Clustal X, (<http://www.clustal.org/>)

Clustal X е интерфейс за Windows на Clustal W multiple sequence alignment program (програма за множествоно секвенционно подравняване). Той работи с последователности. Последователностите могат да бъдат предварително написани в Notepad++ и записани във fasta-format файл и непосредствено след това да се използват от програмата ClustalX (2.0). Ако във файла има написани повече от една последователности, то с тях може да се направи множествоно секвенционно подравняване. По този начин, чрез оцветяване на еднаквите нуклеотиди в един цвят се вижда подравняването между анализирани последователности и се създават мотиви.

3.2.1.4 Vienna RNAfold web server,

(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>),

представява интернет сървър, който дава предположение за вторичните структури на едноверижни РНК и ДНК последователности. Дължината на последователностите не трябва да надвишава 7500 нуклеотида за статистическа функция (partition function) и 10 000 нуклеотида за минимална свободна енергия. С помощта на сървъра са създадени вторичните структури на 7 от проучватите рибопревключвателя.

3.2.2 Софтуерни програми, разработени от нас с доц. д-р. Роберт Пенчовски

За реализиране на поставените задачи, използвахме две от разработените от нас с доц. д-р. Роберт Пенчовски биоинформатични приложения - Essential Bioinformatics Web Services (EBWS) (49) и Extended Essential Bioinformatics Web Services (ExEBWS) (50). Те са изключително лесни за работа и са доброволно предоставени за достъп на официалната веб-страница на доц. др. Пенчовски в раздел „Приложения” <http://penchovsky.atwebpages.com/applications.php> Благодарение на тях определихме консервативните варианти (мотиви) в последователностите на рибопревключвателите.

3.2.2.1 Motif Searcher

(<http://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=43>)

Програмата търси зададени от потребителя мотиви – ДНК, РНК или белтъчни последователности. Мотивите могат да варират от прости до сложни.

3.2.2.2 Prokaryotic ORF (Openreading frame)

(<http://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=45>).

Приложението търси отворени рамки за четене и промоторни елементи (Pribnow box и -35 последователности) в прокариотни ДНК последователности.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Разпространение на бактериалните рибопревключватели

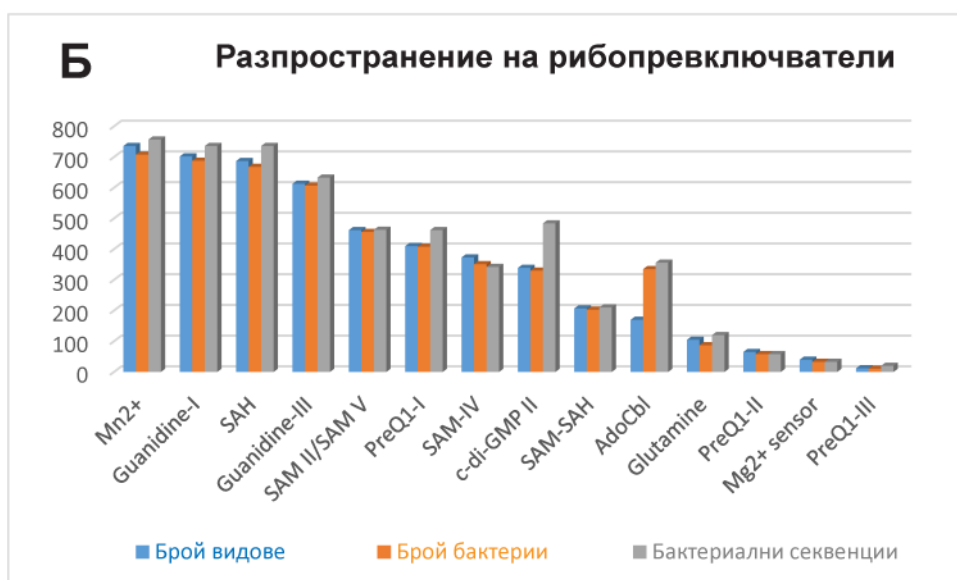
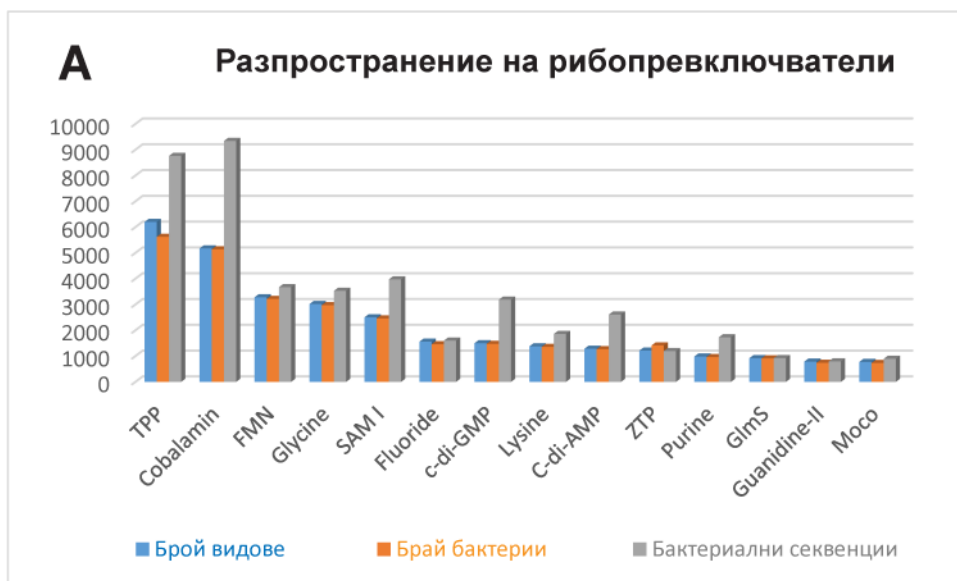
Рибопревключвателите се откриват във всичките три Домена на живота, които включват бактерии, археи и еукариоти. Те са най-често разпространени в бактерии и археи и рядко се срещат в еукариоти. Тиамин пирофосфатният рибопревключвател (ТПФ, TRP) е установен в гъби (51), (52) в някои водорасли като в *Neurospora crassa* (53) и в някои растения като *Arabidopsis thaliana* (54), (51), (55), (56). Бактериалните рибопревключватели се откриват в Грам-отрицателни и преимуществено в Грам-положителни бактериални видове (57).

След извършване на биоинформатичен анализ на големи бази данни са представени в Таблица 1 общото разпространение на 28 от откритите класове бактериални рибопревключватели. Представен е и броят на бактериите, в които се открива всеки един от конкретните рибопревключватели, както и броя на човешките бактериални патогени носещи рибопревключвателя. Изчислихме и нанесохме в таблицата процентното съдържание на бактериалните патогени при човека, в които е установен конкретен рибопревключвател спрямо всички известни видове човешки бактериални патогени (общо 59 според Списък 1, които представихме в частта “Литературен обзор” на Докторската дисертация). Представихме още и количеството на последователностите – бактериалните последователности и последователностите на всички видове, при които се открива всеки един от рибопревключвателите. Таблицата е подредена по брой на видовете за всеки от класовете рибопревключватели.

Според установеното от нас, най-разпространеният клас рибопревключвател е ТПФ. Той е следван от Кобаламинов рибопревключвател, ФМН, Глицинов рибопревключвател, САМ-I рибопревключвател, Флуориден и Цикличен-ди-ГМФ рибопревключватели. С данните от първите две колони на таблицата – брой видове и брой бактерии, както и с данните от колоната с брой бактериални секвенции създадохме диаграма, която представя разпределението на рибопревключвателите на Фигура 1.

Таблица 1. Разпространение на рибопревключватели. В таблицата са посочени броя на всички видове и на бактериите, за всеки от рибопревключвателите. Представен е броя на човешките бактериални патогени и процентното им отношение спрямо човешки патогенни бактерии общо, броя на всички секвенциите и броя на бактериалните секвенции, в които се откриват рибопревключватели.

Вид рибопревключвател		Брой видове	Брой бактерии	Човешки бактериални патогени , %		Всички секвенции	Бактериални секвенции
1	ТПФ	6201	5624	48	81.35%	12593	8762
2	Кобаламин	5174	5140	36	61.02%	14211	9343
3	ФМН	3281	3216	41	69.49%	4153	3672
4	Глицин	3019	2974	21	35.60%	4617	3532
5	САМ-I	2503	2461	20	33.90%	6026	3976
6	Флуорид	1561	1460	11	18.64%	2138	1601
7	цик-ди-ГМФ	1499	1474	16	27.12%	4748	3188
8	Лизин	1379	1356	24	44.68%	2261	1859
9	цик-ди-АМФ	1285	1268	2	3.39%	3917	2611
10	ЗТФ	1214	1414	3	5.08%	1673	1196
11	Пурин	985	962	17	28.81%	2703	1730
12	GlmS	920	912	26	40.68%	943	922
13	Гуанидин-II	788	740	5	8.47%	1001	797
14	Моко	775	733	9	15.25%	1270	896
15	Mn ²⁺	736	708	13	22.03%	832	757
16	Гуанидин-I	702	688	5	8.48%	901	736
17	САХ	687	668	3	13.56%	861	736
18	Гуанидин-III	613	607	5	8.48%	665	633
19	САМ-II/САМ-V	462	456	2	3.39%	593	463
20	PreQ1-I	410	408	15	25.42%	532	462
21	САМ-IV	373	351	5	8.47%	792	342
22	цик-ди-ГМФ-II	339	330	6	10.17%	660	484
23	САМ-САХ	207	203	-	-	251	210
24	Аденозин-кобаламин	170	335	2	3.39%	181	356
25	Глутамин	105	87	-	-	1125	120
26	PreQ1-II	65	58	4	6.78%	69	58
27	Mg ²⁺ сензор	40	33	9	15.25%	42	33
28	PreQ1-III	12	11	-	-	37	20



Фигура 1. Разпространение на рибопревключвателите

На графиката са показани броят на всички видове, броят на бактериите и броят на бактериалните последователности, в които се откриват всички посочени 28 класа рибопревключватели. Графиката е подредена по брой на видовете за всеки от рибопревключвателите. **А.** Включва следните рибопревключватели: ТПФ, Кобаламин, ФМН, Глицин, САМ-I, Флуорид, Цикличен-ди-ГМФ, Пурини, GlmS, Гуанидин-II, Моко. **Б.** Включва следните рибопревключватели: Mn²⁺, Гуанидин-I, САХ, Гуанидин-III, САМ-II/САМ-V, PreQ1-I, САМ-IV, Цикличен-ди-ГМФ-II, САМ-САХ, Аденозинкобаламин, Глутамин, PreQ1-II, Mg²⁺сензор, PreQ1-III. Фигурата е създадена и публикувана в Gene 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).

Тиаминовият рибопревключвател – тиаминпирофосфатен рибопревключвател (ТПФ, TRP) е най-разпространеният не само при бактерии, но въобще сред всички организми рибопревключвател. Той се открива при 6201 различни вида, от които 5624 са бактериални видове (Таблица 1). ТПФ е рибопревключвателят, който е най-разнообразен от гледна точка на различни механизми за контрол на генната експресия, които упражнява - включително терминация на транскрипцията и превенция на трансляцията в бактериите, както и регулиране на алтернативния сплайсинг при еукариотите. Рибопревключвателят за ТПФ се открива в геномите на 48 вида патогенни бактерии. Той е най-често срещаният рибопревключвател при бактериални видове човешки патогени. Сред тези 48 човешки бактериални патогена са: *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi/ Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Yersinia pestis*. Повечето от споменатите бактериални видове са включени в списъка на Световната Здравна Организация като приоритетни антибиотик-резистентни бактериални патогени, срещу които трябва да бъдат проучвани, открити и създавани нови антибиотични агенти (59). ТПФ рибопревключвателя се открива при над 12 000 секвенции на организми, от които почти 9000 са бактериални последователности (Фигура 8).

Кобаламиновият рибопревключвател, познат още като Витамин В12 рибопревключвател (Cobalamin riboswitch, Vitamin B12 riboswitch) се открива при повече от 14 000 секвенции на организми, от които повече от 9000 са бактериални секвенции. Той се открива в геномите на повече от 5000 вида, повечето от които са бактерии (Таблица 1, Фигура 8). Кобаламиновият рибопревключвател се открива в 36 вида човешки бактериални патогена, сред които са: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi/ Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* и *Yersinia pestis* (Таблица 2) (59).

Флавиновият рибопревключвател (ФМН, FMN riboswitch, Flavin mononucleotide riboswitch) се открива при 41 вида човешки бактериални патогена, сред които са *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*,

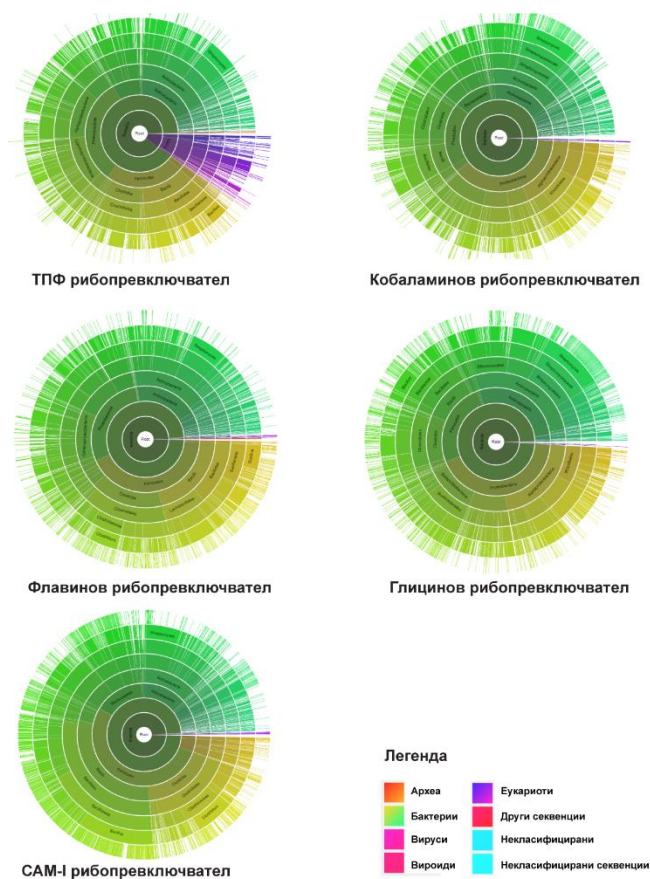
Listeria monocytogenes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*/ *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Yersinia pestis* (59). По този критерий, той е вторият най-разпространен рибопревключвател, иначе е на трето място по разпространение сред класовете рибопревключватели (Таблица 1, Фигура 7, Фигура 8). Открива се при повече от 3280 различни организма, като преобладаващата част от тях са бактериални видове - 3216 вида. Осем вида от тези бактерии са вписани в списъка с приоритетни патогени на СЗО за разработване на нови антибиотични препарати.

Глициновият рибопревключвател (Glycine riboswitch) се открива в малко над 3000 вида, като повечето от тях са бактериални представители - 2074 вида. Сред бактериалните видове се откриват 21 човешки патогена. По този критерий той заема четвърто място. Рибопревключвателя се открива в над 4600 секвенции, от които над 3500 последователности са бактериални (Фигура 8).

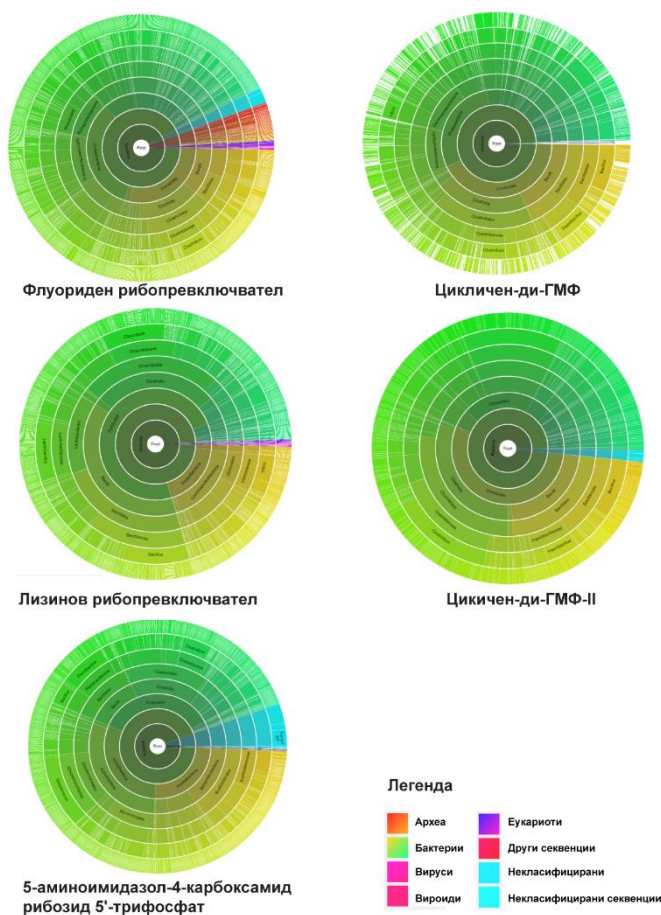
S-аденозил-метиониновият-I рибопревключвател (SAM-I, SAM-I riboswitch, S-adenosyl methionine-I riboswitch) се открива при повече от 2500 вида организми. От тях, 2460 са бактерии, от които 20 са човешки патогени. Той се открива в 6026 организмови последователности, от които почти 4000 са бактериални. Той е петият най-често разпространен рибопревключвател във видовете изобщо и трети най-разпространен в достъпните организмови секвенции (Фигура 8).

Флуоридният рибопревключвател (F^- riboswitch, Fluoride riboswitch) е шестият най-разпространен рибопревключвател сред организмите. Той се открива при над 1500 вида. От тях, 1460 вида са бактериални. Рибопревключвателя се открива при 11 човешки патогенни бактерии. Той се открива при 2138 организмови секвенции, от които 1601 са бактериални последователности (Фигура 3).

Цикличен-ди-ГМФ (Cyclic-di-GMP riboswitch, c-di-GMP riboswitch) се среща в почти 1500 вида, повечето от които са бактерии - 1474. Той е седмият най-често разпространен рибопревключвател във видовете. Той е открит в 16 вида човешки бактериални патогени. Среща се в над 4700 секвенции, почти 3200 от които са на бактерии (Фигура 3).



Фигура 2. Графично представяне на разпространението на рибопревключватели по видове. Представено е разпространението на ТПФ, Кобаламин, ФМН, Глицин и САМ-I рибопревключвателите.



Фигура 3. Графично представяне на разпространението на рибопревключвателите по видове. Представено е разпространението на Флуориден, Лизинов, ЗТХ, цикличен-ди-ГМФ I и цикличен-ди-ГМФ II рибопревключвателите.

Петият най-разпространен рибопревключвател сред видовете човешките бактериални патогени е лизиновият рибопревключвател (Lysine riboswitch). Той се открива в 24 човешки бактериални патогена. Лизиновия рибопревключвател се открива при повече от 1300 вида, от които едва 24 вида не са бактерии. Той е осмият най-разпространен рибопревключвател сред организмите (Фигура 3).

Цикличен-ди-АМФ (Cyclic-di-AMP riboswitch, c-di-AMP riboswitch) се среща в 1285 вида, от които едва 17 вида не са бактерии. Той е деветият най-често разпространен рибопревключвател сред видовете. Цикличен-ди-АМФ е открит в два вида човешки бактериални патогена. Среща се в почти 4000 секвенции, от които 2611 са бактериални секвенции.

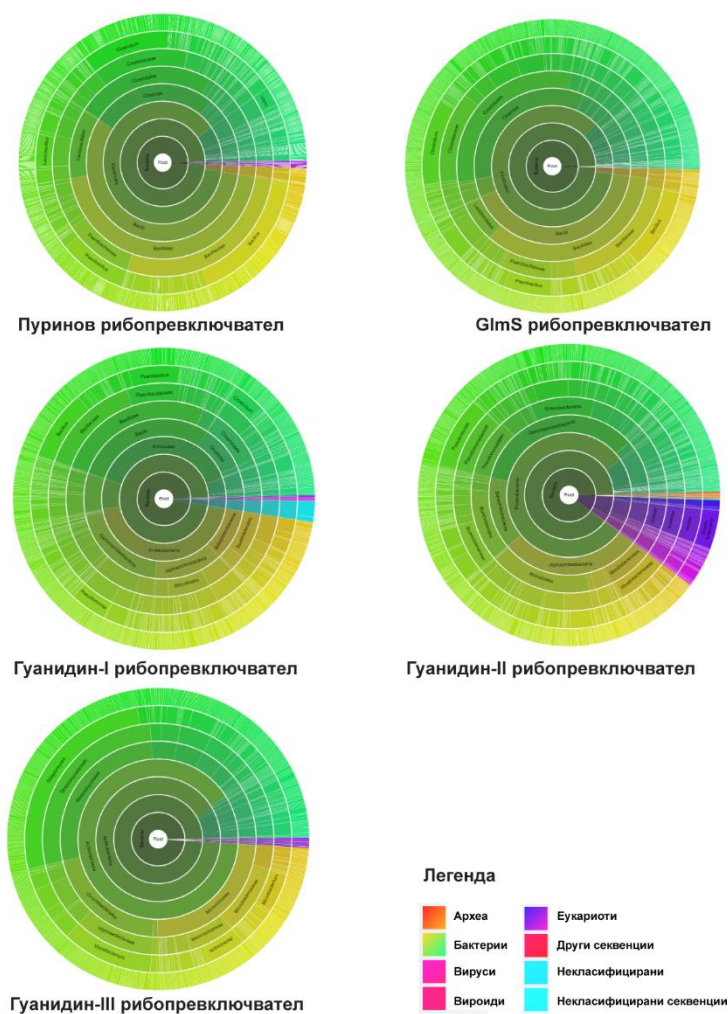
5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибозид-5'-трифосфатния рибопревключвател (ЗТФ, ZTP riboswitch, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside 5'-triphosphate riboswitch) се среща в повече от 1400 вида, от които 1200 вида са бактерии. Едва три от всички бактерии, при които той се открива са видове човешки патогени. Той е десетият най-разпространен рибопревключвател сред видовете (Фигура 3).

Пуриновият рибопревключвател (Purine riboswitch) е единадесетият най-често срещан рибопревключвател сред видовете. Той се срещат в 985 вида, от които 962 вида са бактериални (Фигура 4).

Моко рибопревключвателят (Moco riboswitch, MocoRNA riboswitch) се среща в 775 вида и е четиринадесетият най-разпространен рибопревключвател сред организмите (Фигура 5). Той се открива в 9 вида бактериални човешки патогена.

Глюкозамин-6-фосфатният рибопревключвател (GlmS riboswitch) е двадесетият най-разпространен рибопревключвател сред организмите. Среща се в 920 вида, повечето от които са бактериални (Фигура 4). Общо 26 от бактериите са човешки бактериални патогени. Той е четвъртия най-разпространен рибопревключвател в човешките бактериални патогени.

Следва Гуанидин-II рибопревключвателят, който се открива в над 780 вида. Познати са още два класа гуанидинови рибопревключватели - гуанидин-I и гуанидин-III, откриващи се съответно в повече от 700 и 600 вида. Всеки един от тях се открива в пет вида човешки бактериални патогена (Фигура 4).

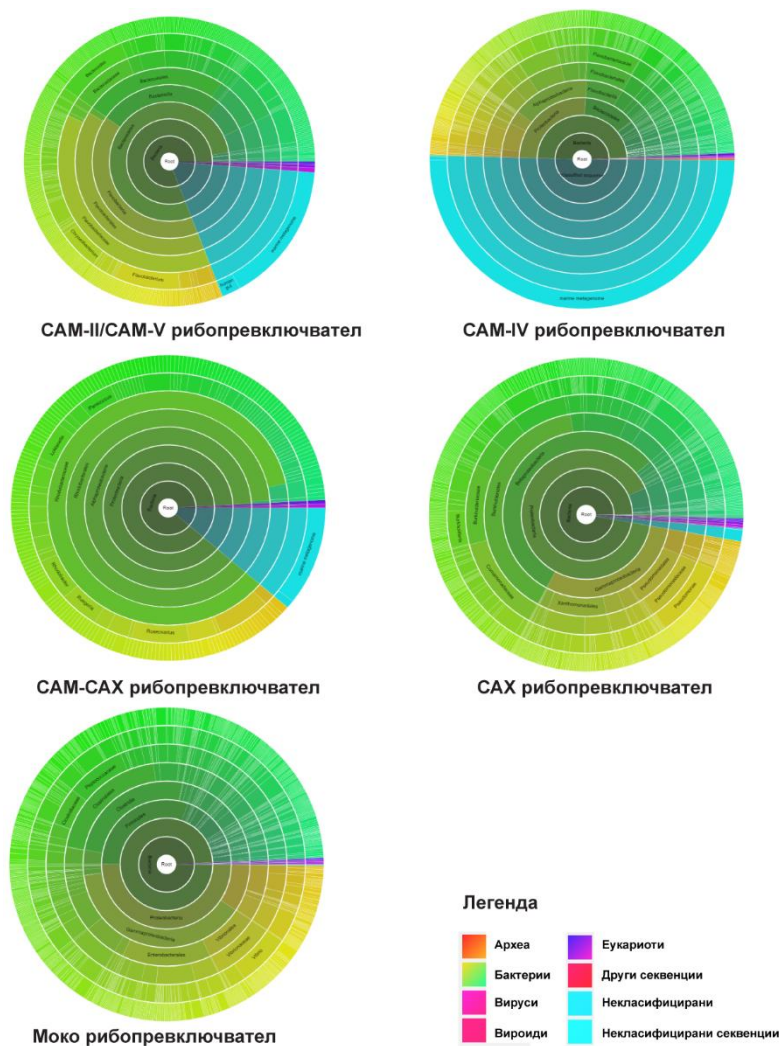


Фигура 4. Графично представяне на разпространението на рибопревключватели по видове. Представено е разпространението на Пуринов рибопревключвател, Глюкозаминов рибопревключвател, Гуанидин-I, Гуанидин-II и Гуанидин-III.

Пре-гуанозин-I рибопревключвателят (PreQ1-I riboswitch, Prequanosine-I riboswitch) е двадесетият най-разпространен рибопревключвател сред бактериите. Той се среща в повече от 410 вида бактерии, от които 17 вида са човешки бактериални патогени (Фигура 6).

SAM-II/SAM-V рибопревключвателят се открива при 462 представителя на организмовия свят, от които 456 вида са бактерии. Той се среща изключително при бактериални видове. От тези бактерии две са патогенни за човека (Фигура 5).

SAM-IV се открива при 373 вида, от които 351 вида са бактерии. Пет от бактериалните видове са човешки патогенни бактерии. Този рибопревключвател също се открива предимно в бактериални видове (Фигура 5). SAM-SAX се открива при 207 вида, от които 203 вида са бактерии. Към настоящия момент не се открива в човешки патогенни бактерии (Фигура 5).



Фигура 5. Графично представяне на разпространението на рибопревключватели по видове. Представено е разпространението на SAM-II/CAM-V, SAM-IV, SAM-CAX, CAX и Моко рибопревключвателите.

Рибопревключвателят Mn^{2+} се среща в повече от 700 бактериални вида, от които 13 вида са бактериални патогени (Фигура 6).

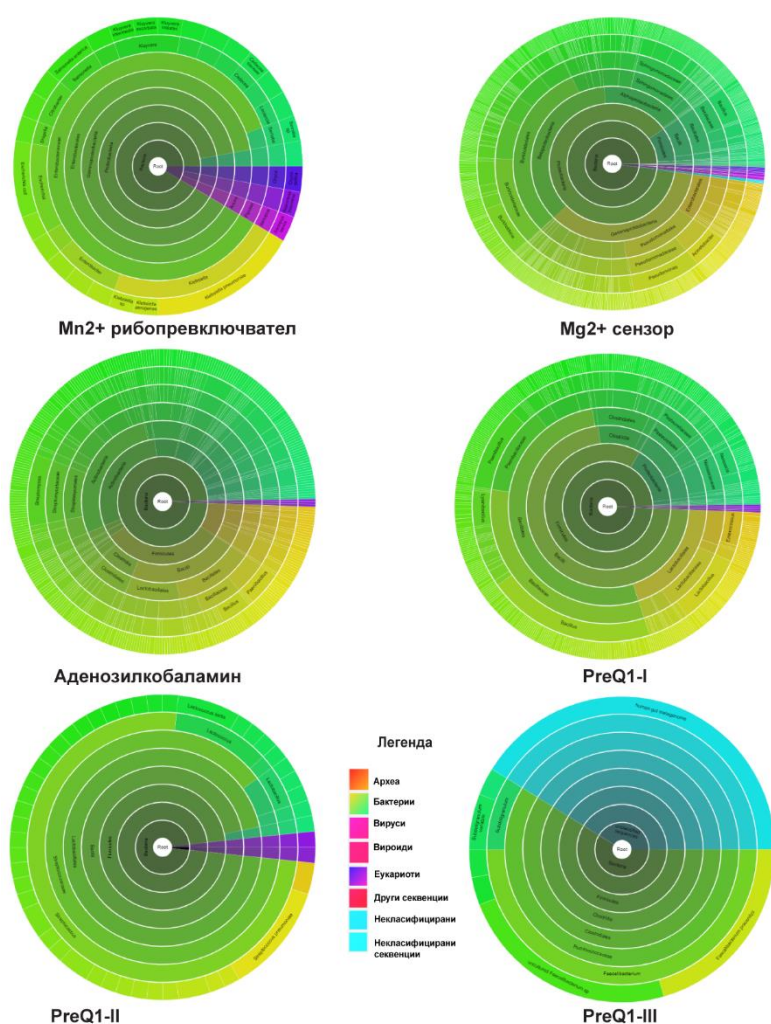
Аденозилкобаламиновият (AdoCbl riboswitch) рибопревключвател се открива при 192 организма, от които само 3 не са бактерии (Фигура 6). Два вида от бактериите, в чиито геноми се открива Адокобаламина, са човешки патогенни бактерии.

Откриват се три класа рибопревключватели, които се срещат при редица бактерии, но не се откриват в бактериални човешки патогени. Това са SAM-CAX рибопревключвателят, Глутаминовият рибопревключвател, и рибопревключвателят PreQ1-III (Фигура 5), (Фигура 6).

Рибопревключвателите, открити при по-малко от 500 вида, са SAM-II / CAM-V, PreQ1-I, SAM-IV, цикличен-ди-ГМФ-II, SAM-CAX и аденозилкобаламин (AdoCbl riboswitch) рибопревключватели (Фигура 3), (Фигура 5) и (Фигура 6).

Рибопревключвателите, които се откриват при по-малко от 100 вида организми, са Глутамин, PreQ1-II, Mg2 + сензор и PreQ1-III (Фигура 5) и (Фигура 6).

Общо 12 класа рибопревключватели се откриват в повече от 10 вида човешки бактериални патогена. Десет класа рибопревключватели се откриват в повече от 15 вида човешки бактериални патогена, а седем класа рибопревключватели са открити в повече от 20 вида бактериални патогени. Анализиранията информация до тук е съществена, тъй като рибопревключвателите биха могли да се използват като потенциална антибактериална мишена с широкоспектърно действащ или тясноспектърно действащ агент.



Фигура 6. Графично представяне на разпространението на рибопревключватели по видове. Представено е разпространението на Mn²⁺, Mg²⁺ сензор, аденозилкобаламин, и PreQ1-I, PreQ1-II и PreQ1-III рибопревключвателите.

Таблица 2. Рибопревключватели, открити в човешки бактериални патогени. В 49 вида патогенни бактерии за човека са открити 8 отделни класа рибопревключватели. Тези патогени са сред основните причинители на инфекциозни заболявания при хората. Най-широко разпространените рибопревключватели във видове човешки патогенни бактерии са тези за ТПФ и ФМН, открити съответно в 48 и 41 вида патогенни бактерии. След тях са рибопревключвателите Кобаламин, открит в 36 човешки патогенни бактерии, GlnS открит в 26 вида човешки патогенни бактерии, Лизин открит в 24 вида човешки патогенни бактерии, SAM-I открит в 20 вида човешки патогенни бактерии, Пурин открит в 17 вида човешки патогенни бактерии и SAH открит в 8 вида човешки патогенни бактерии. Таблицата е подредена по брой рибопревключватели в бактерия. Бактериите, отбелязани в розово, са класифицирани от СЗО като приоритетни патогени за изследване и разработване на нови антибиотици. Във всеки един от геномите на приоритетните бактерии са намерени от 1 до 7 от общо 8-те класа рибопревключвателя.

Човешки бактериални патогени		ТПФ	ФМН	Кобаламин	Лизин	Glms	Пирун	САМ	САХ	Брой
1	<i>Bordetella pertussis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	8
2	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
3	<i>Bacillus anthracis</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
4	<i>Clostridium botulinum</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
5	<i>Clostridium difficile</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
6	<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
7	<i>Clostridium tetani</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
9	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
10	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+		7
11	<i>Brucella abortus</i>	+	+	+	+	+		+		6
12	<i>Brucella canis</i>	+	+	+	+	+		+		6
13	<i>Brucella melitensis</i>	+	+	+	+	+		+		6
14	<i>Brucella suis</i>	+	+	+	+	+		+		6
15	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	+			6
16	<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	+	+	+	+			6
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+		+		6
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+			+	+	6
19	<i>Salmonella enterica</i>	+	+	+	+	+			+	6
20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+		+	+	+	+		6
21	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+			+	6
22	<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	+	+				5
23	<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+		+			+	5
24	<i>Acinetobacter baumannii</i>		+	+	+	+				4
25	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	+	+	+		+				4
26	<i>Francisella tularensis</i>	+	+	+		+				4
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+				+		4
28	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	+	+	+				+		4
29	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+				+		+	4
30	<i>Streptococcus mutans</i>	+	+				+		+	4
31	<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+		+	+				4
32	<i>Yersinia pestis</i>	+	+	+		+				4
33	<i>Mycobacterium leprae</i>	+	+	+						3
34	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	+		+					3
35	<i>Neisseria meningitidis</i>	+						+	+	3
36	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+				+			3
37	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+				+			3
38	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	+						3

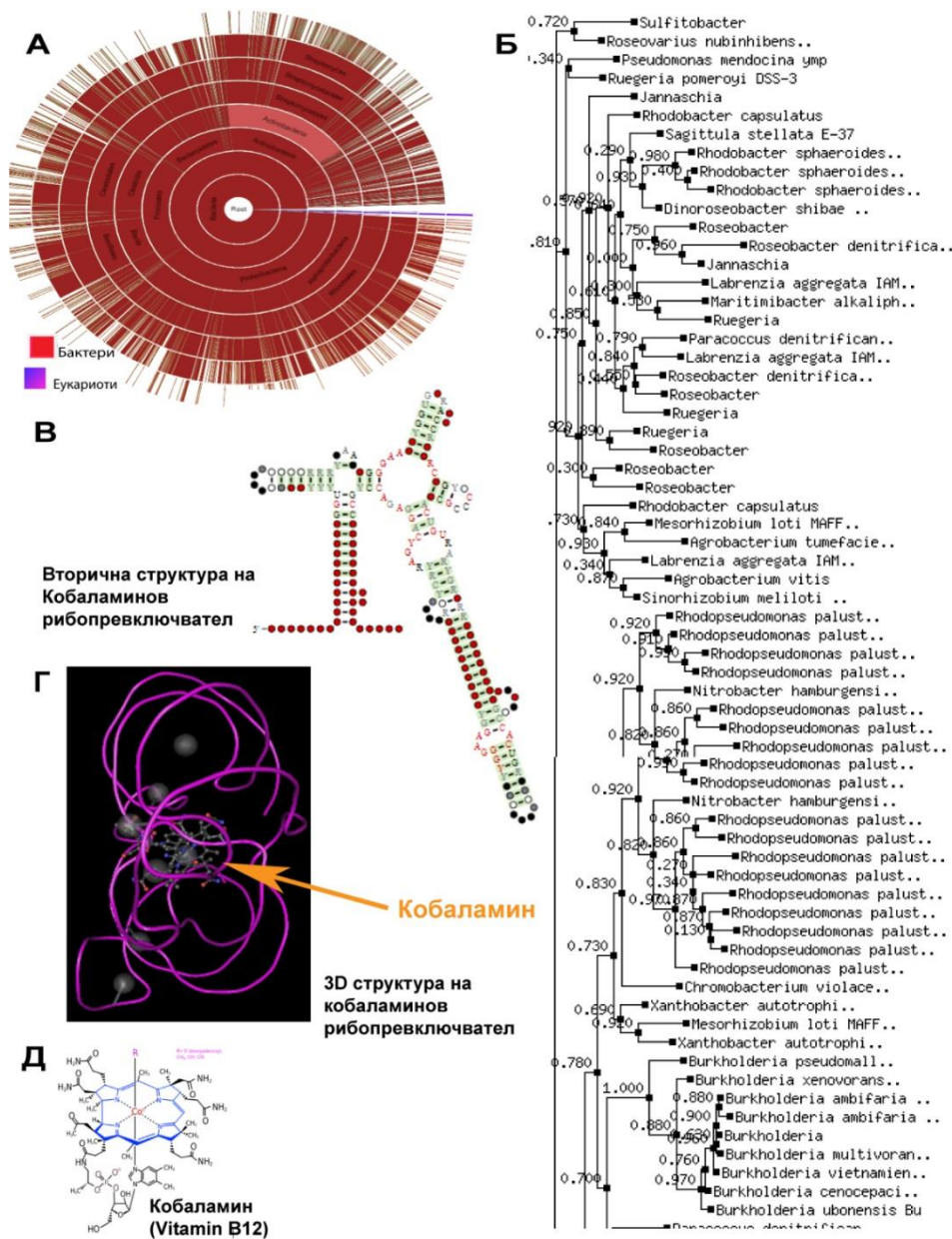
39	<i>Leptospira interrogans</i>	+	+	+						3
40	<i>Leptospira noguchii</i>	+	+	+						3
41	<i>Leptospira santarosai</i>	+	+	+						3
42	<i>Leptospira weilii</i>	+	+	+						3
43	<i>Shigella sonnei</i>	+		+						2
44	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	+		+						2
45	<i>Campylobacter jejuni</i>	+								1
46	<i>Chlamydia psittaci</i>	+								1
47	<i>Chlamydia trachomatis</i>	+								1
48	<i>Helicobacter pylori</i>	+								1
49	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+								1
	Общ брой:	48	41	36	25	26	17	20	8	

4.2 Структурна организация на рибопревключвателите и различни видове лиганди

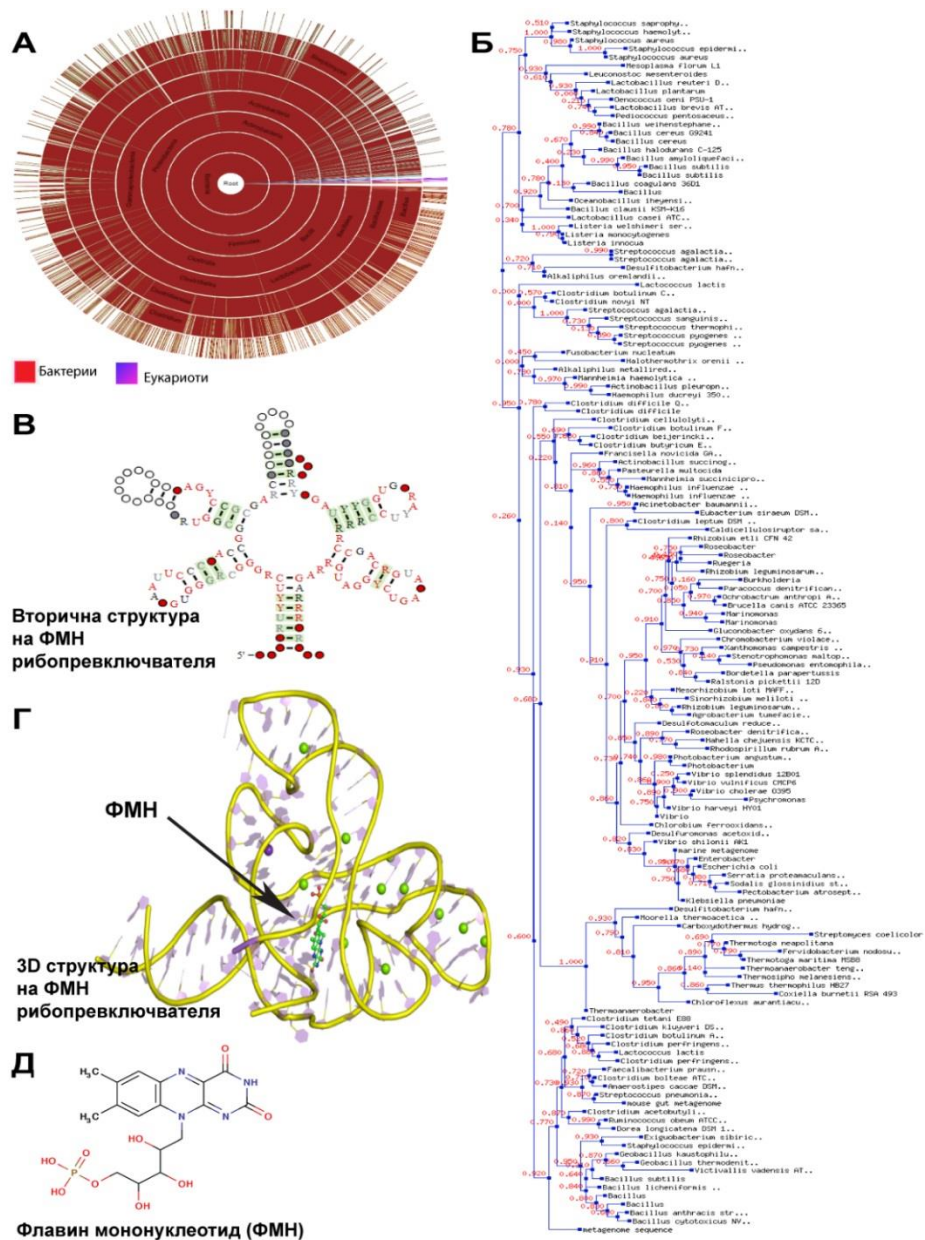
След откриването на първите рибопревключватели и установяването на тяхната структура (аптамерна част и експресионна платформа), учените се опитват да отговорят на въпроса как един рибопревключвател усеща, разпознава и свързва точно определен лиганд сред разнообразието от клетъчни метаболити (60). В настоящия труд са представени 26 различни лиганда, които класифицирахме в шест отделни групи. Групите включват коензими, нуклеотидни-производни, сигнални молекули, йони, аминокиселини и други метаболити. Всички 26 метаболита са представени в Таблица 3.

4.2.1 Коензими

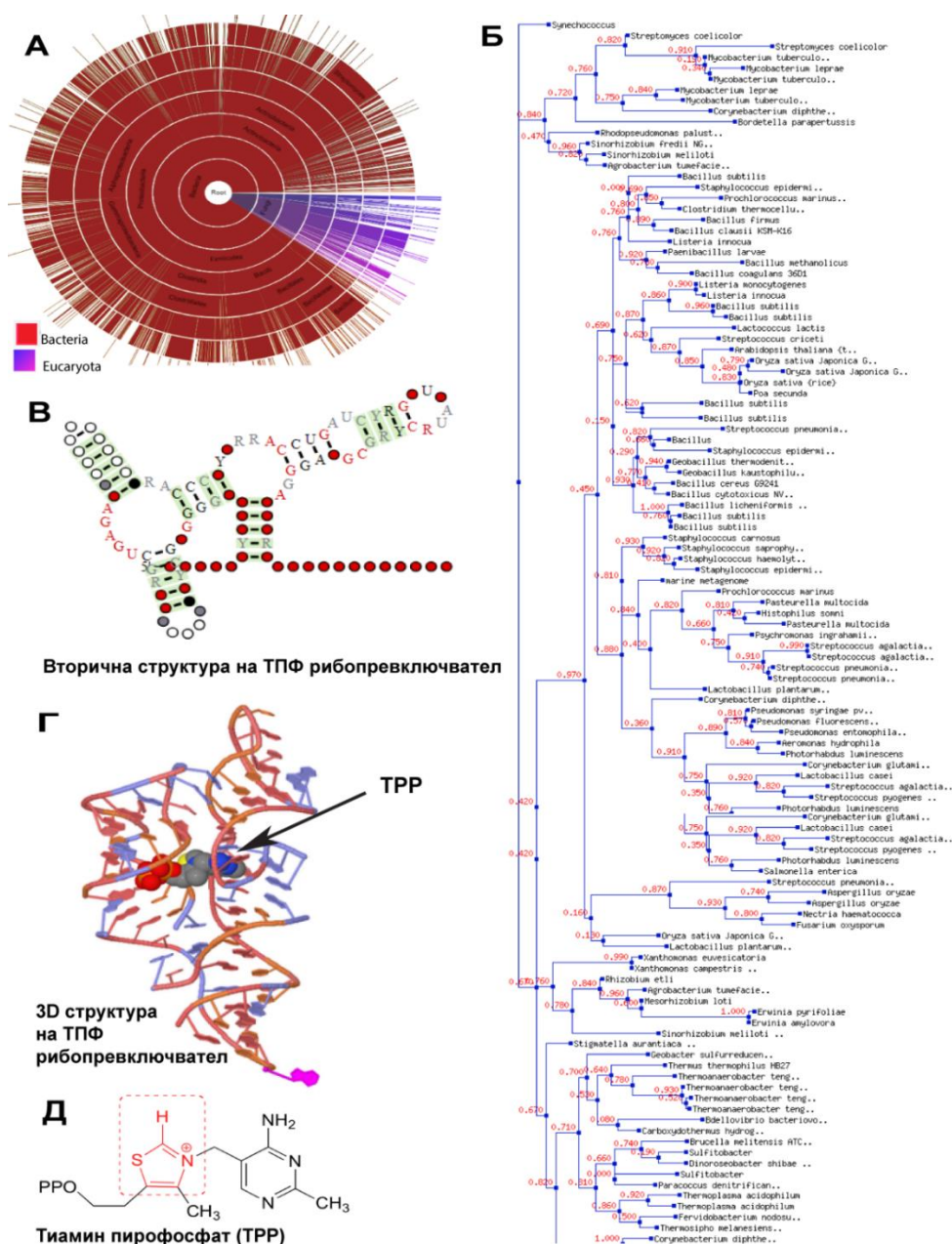
Групата от коензими е най-голямата група лиганди. Тя включва девет лиганда. Към коензимите се причисляват аденозилкобаламин и аквакобаламин, които са форми на Витамин Б12 (61) и флавин (ФМН, FMN) – производно на рибофлавина (Витамин Б2) посредством ензима рибофлавин киназа. В групата на коензимите е и молибденовият кофактор за ензими като ксантин оксидаза, сулфит оксидацз, нитрит редуктаза, тиамин пирофосфат (ТПФ, TPP), S-аденозилметионин за САМ-I, САМ-II, САМ-III, САМ-IV, САМ-V, САМ-САХ рибопревключвателите и S-аденозилхомоцистеин за САХ рибопревключвателя. Общо 15 класа рибопревключватели разпознават и свързват специфично 9 коензима от тази група (Таблица 3). В групата на коензимите са включени лиганди, които биват разпознавани и специфично свързвани от най-широко разпространените класове рибопревключватели: ТПФ (Фигура 9), Кобаламин (Фигура 7), ФМН (Фигура 8) (62), (63), и САМ-I (Фигура 10), (Таблица 3) (64), (65).



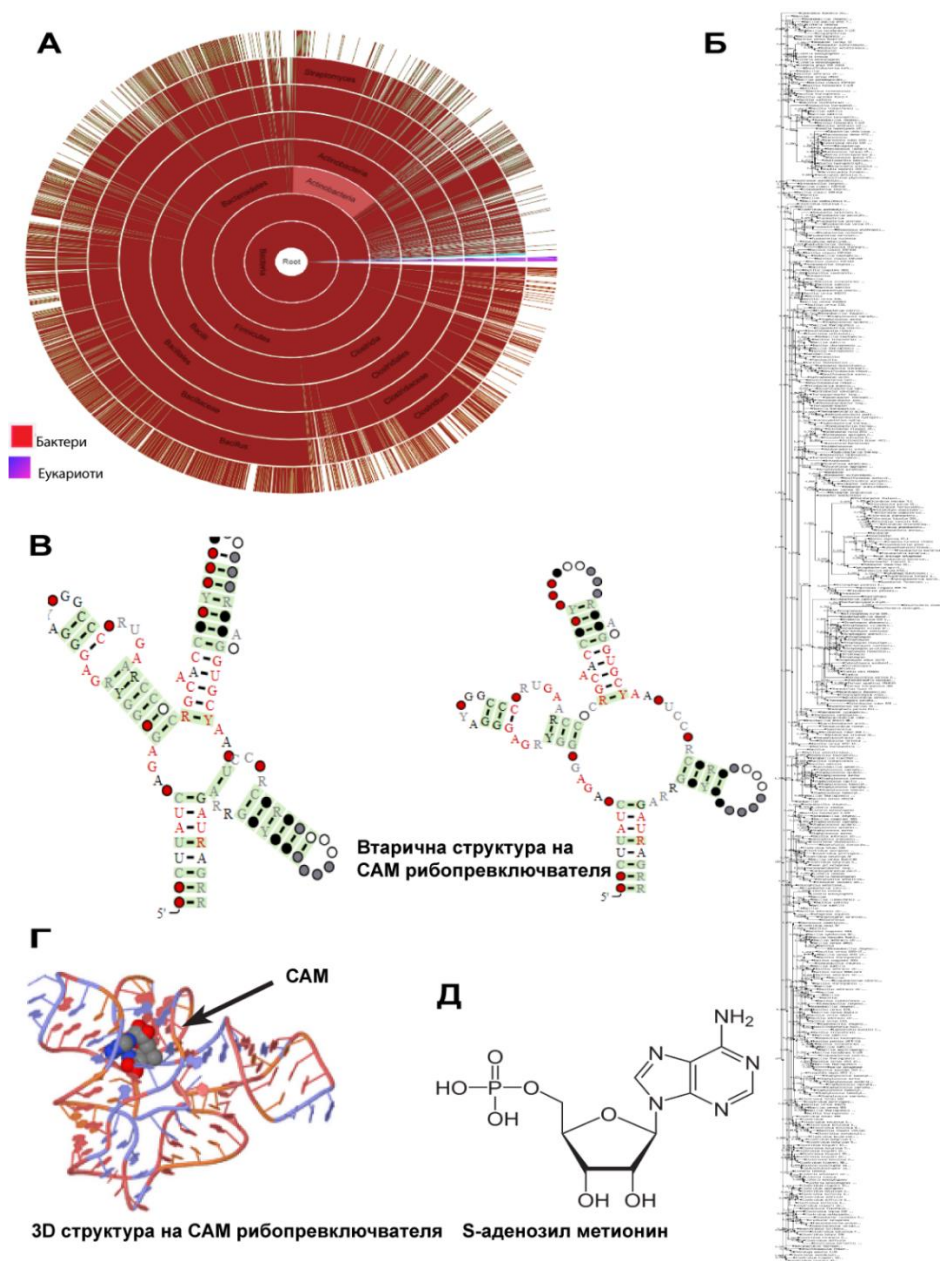
Фигура 7. Кобаламинов рибопревключвател. **А.** Графично представяне на разпределението на рибопревключвателя по видове. В червено са отбелязани бактериалните видове. **Б.** Филогенетично дърво за кобаламиновия клас рибопревключвател. **В.** Вторичната структура на рибопревключвателя. С символа R са отбелязани A или G, с Y са C или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. **Г.** 3D структура на рибопревключвателя. **Д.** Химичното съединение кобаламин, което се разпознава специфично от кобаламиновия рибопревключвател. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).



Фигура 8. Флавинов рибопревключател. А. Графично представяне на разпределението на рибопревключателя по видове. В червено са отбелязани бактериалните видове. В Еукариоти са отбелязани в сиво. Б. Филогенетично дърво на флавиновия клас рибопревключател. В. Вторичната структура на рибопревключателя. С символа R са отбелязани A или G, с Y са C или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. Г. 3D структура на рибопревключателя. Д. Химичното съединение флавин мононуклеотид, разпознавано специфично от флавиновия рибопревключател. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).



Фигура 9. ТПФ рибопревключател. А. Графично представяне на разпределението на рибопревключателя по видове. В червено са отбелязани бактериалните видове. Б. Филогенетично дърво на Тиамин пирофосфатния клас рибопревключател. В. Вторичната структура на рибопревключателя. С символа R са отбелязани А или G, с Y са С или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. Г. 3D структура на рибопревключателя. Д. Химичното съединение тиамин пирофосфат, разпознавано специфично от ТПФ рибопревключателя. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).



Фигура 10. SAM-I рибопревключател. **А.** Графично представяне на разпределението на рибопревключателя по видове. В червено са отбелязани бактериалните видове. **Б.** Филогенетично дърво за SAM-I клас рибопревключател. **В.** Вторичната структура на рибопревключателя. С символа R са отбелязани A или G, с Y са C или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. **Г.** 3D структура на рибопревключателя. **Д.** Химичното съединение S-аденозил метионин, разпознавано специфично от SAM-I рибопревключателя. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).

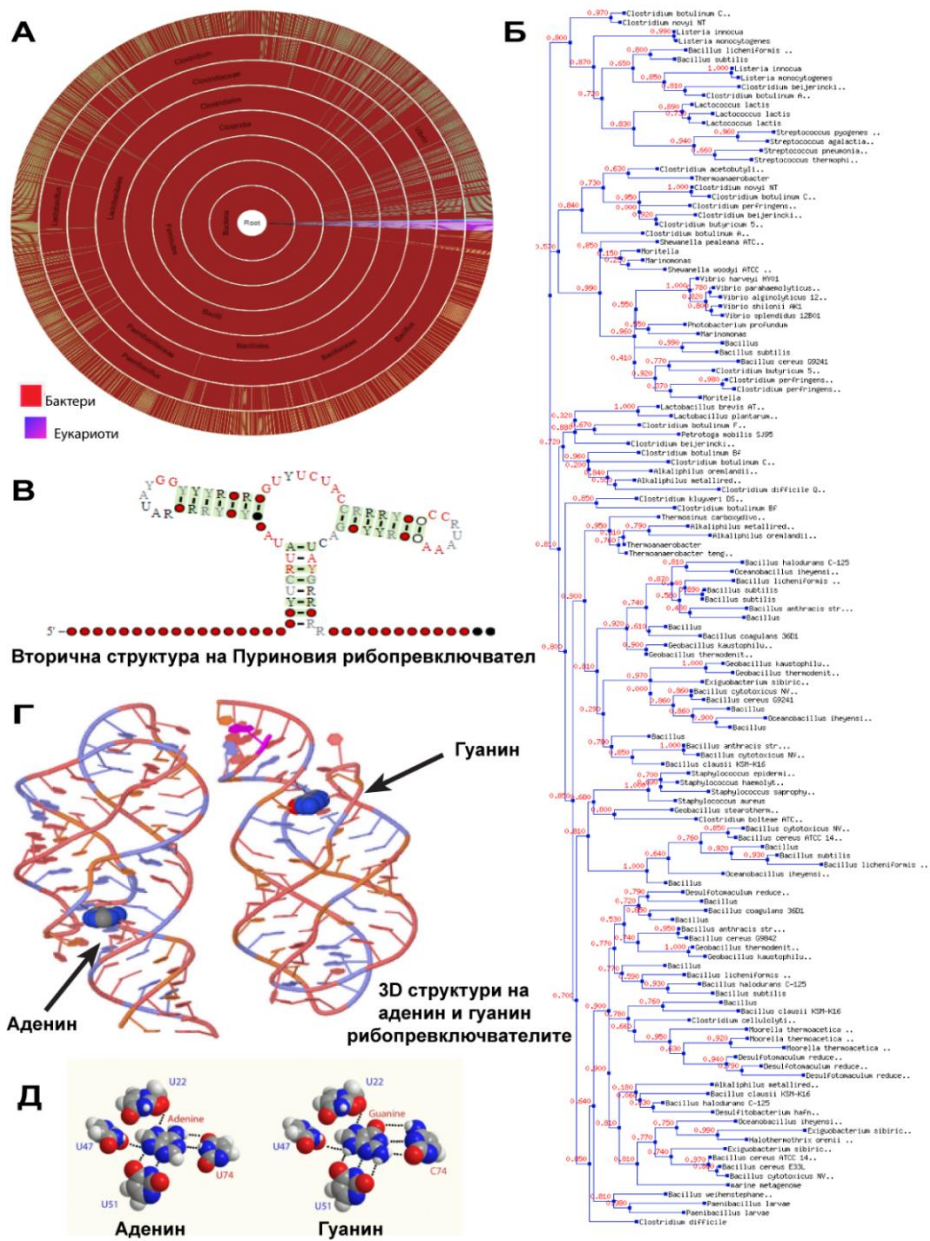
4.2.2 Нуклеотидни производни

Групата от нуклеотидни производни, които биват разпознавани и свързвани специфично от рибопревключватели съдържа четири лиганда. Това са лигандите аденин, гуанин, prequeusine-1 и 2'-деоксигуанозин (Таблица 3). Те се разпознават от рибопревключватели, както следва: аденин и гуанин от аденинов и гуанинов рибопревключвател (т.е клас Пуринов рибопревключвател), prequeusine-1 от PreQ1-I, PreQ1-II и PreQ1-III рибопревключватели и 2'-деоксигуанозин от деоксигуанозинов рибопревключвател (dG-riboswitch).

Аденин рибопревключвателят и гуанин рибопревключвателят са силно консервативни генни-контролни елементи, имащи много сходна първична и вторична структура (Фигура 11). Те се различават само по един нуклеотид, който определя комплементарността на рибопревключвателя с лиганда във всеки от двата случая. При гуаниновия рибопревключвател, различният нуклеотид е цитозин, докато при адениновия рибопревключвател, нуклеотидът е урацил (66), (67), (68), (69). Те са организирани около тристранен възел, свързващ трите спирали P1, P2 и P3. Участъкът P1 е спираловидната област, която показва известна степен на консервативност (70), (67). Въпреки че адениновите и гуаниновите аптамери са структурно много сходни, те селективно усещат различните лиганди – аденин и гуанин. Това определя различията в регулацията на генната експресия на гуаниновия и адениновия рибопревключвател. Адениновият рибопревключвател регулира генната експресия посредством свързване на лиганда аденин, а гуаниновият рибопревключвател причинява терминация на транскрипцията на низходящия ген в присъствието на неговия ефектор гуанин (71).

4.2.3 Сигнални молекули

Третата група лиганди е групата на сигналните молекули. Това са цикличен-ди-АМФ, цикличен-АМФ-ГПФ, цикличен-ГМФ и 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибозид 5'-трифосфат. Четирите сигнални молекули се разпознават от пет различни класа рибопревключватели - Цикличен-ди-АМФ, Цикличен-АМФ-ГПФ, Цикличен-ГМФ-I (Фигура 12) и Цикличен-ГМФ-II и ЗТФ рибопревключвателя (ZTP riboswitch) (72), (73) (74), (29).



Фигура 11. Пуринов рибопревключател. А. Графично представяне на разпределението на рибопревключателя по видове. В червено са отбелязани бактериалните видове. Б. Филогенетично дърво на Пуриновия клас рибопревключател. В. Вторичната структура на рибопревключателя. С символа R са отбелязани А или G, с У са С или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. Г. 3D структура на рибопревключателите аденин и гуанин. Д. Химичните съединения аденин и гуанин, разпознавани специфично от адениновия и гуаниновия рибопревключател. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).

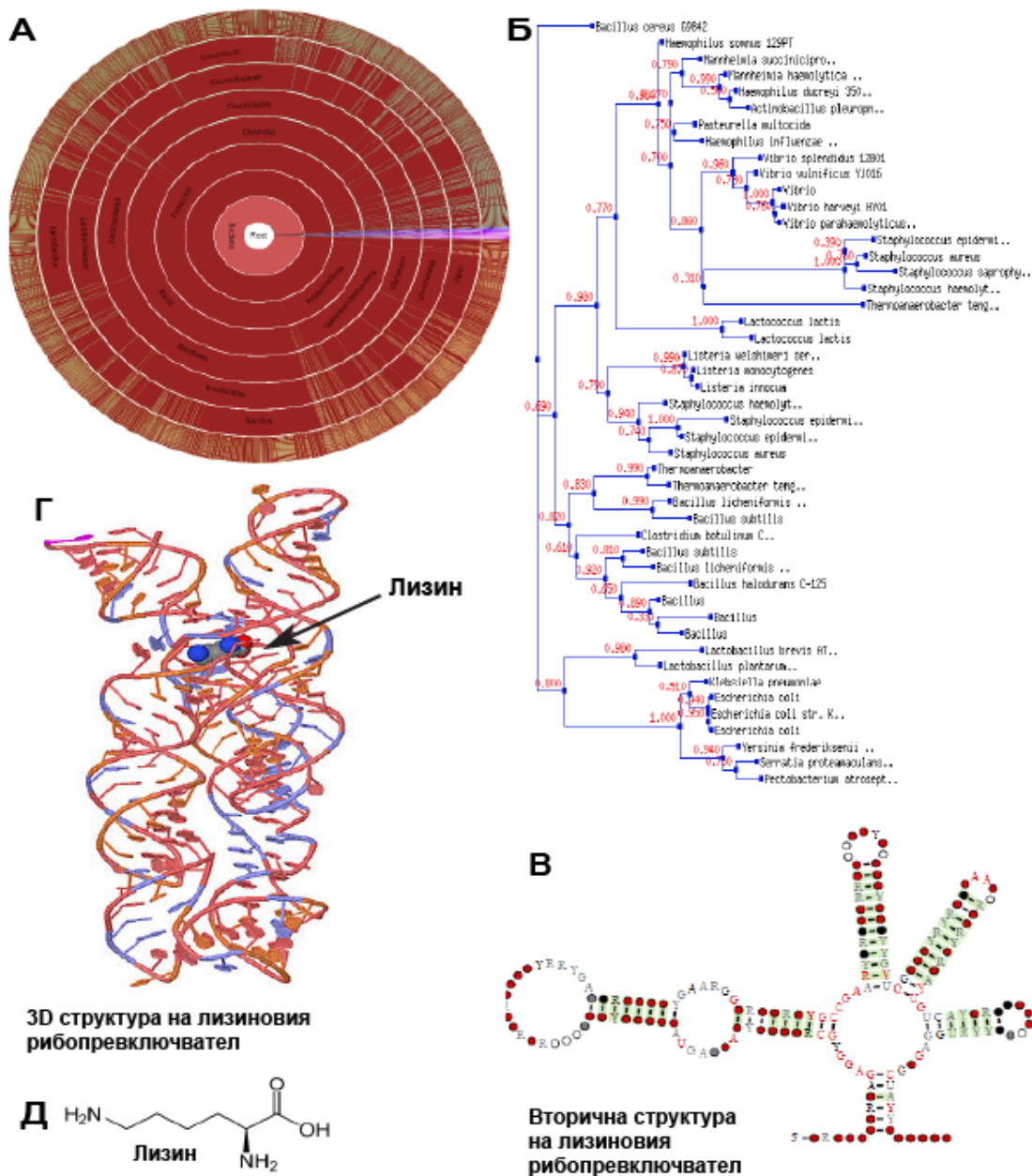
4.2.4. Йони

Групата от йонни молекули, съдържа четири двувалентни катиона (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}/Co^{2+}) и един моновалентен анион (F^-), които се разпознават от пет класа рибопревключватели. Анионът F^- се разпознава от Флуоридния рибопревключвател. Той разпознава аниона на флуора и действа като флуорид-зависим генен контролен елемент. Флуоридният рибопревключвател е открит при редица видове археи и бактерии (75). Той образува свързващ джоб, който е силно селективен за отрицателно заредени йони, носейки отрицателна фосфатна група във всеки нуклеотид от последователността си. Катиона на магнезия - Mg^{2+} се разпознава от два класа рибопревключватели. Това са Mg^{2+} -I сензор и Mg^{2+} -II сензор. Mg^{2+} -I сензор е по-разпространен в организмовия свят и използва по-голям аптамерен домен (76). The Mg^{2+} -II сензорен рибопревключвател е сходен по структура с Mg^{2+} -I сензорния рибопревключвател, но има по-малко консервативни нуклеотиди (29). Мангановите катиони Mn^{2+} са едни от най-разпространените йони в природата. Рибопревключвателят уubP-укоY разпознава Mn^{2+} йони. Той е един от най-новите кандидати за рибопревключватели, които са потвърдени по генетични и структурни данни (77), (78), (79). Бактериите имат развити механизми за реагиране на генната си експресия при по-високи нива на концентрация на манганови двувалентни катиони и Mn^{2+} токсичност.

Последните два двувалентни катиона, които са част от йонната група лиганди са Ni^{2+} и Co^{2+} . Те се разпознават от НикелКабалтовия рибопревключвател (NiCo riboswitch). Той формира високо специфичен кооперативен аптамер. Предполага се, че много от асоциираните с рибопревключватели гени са отговорни за метални йонни канали. Кооперативното свързване на един от споменатите двувалентни катиони може да бъде свързано с клетъчното откриване и реакция към повишаване на йонната концентрация, която може да бъде токсична за бактериите.

4.2.5 Аминокиселини

Днес има само три аминокиселини, които не се получават директно от РНК и се разпознават от рибопревключватели. Това са аминокиселините глицин (67), глутамин и лизин (Фигура 12), (Таблица 3) (80), (81).

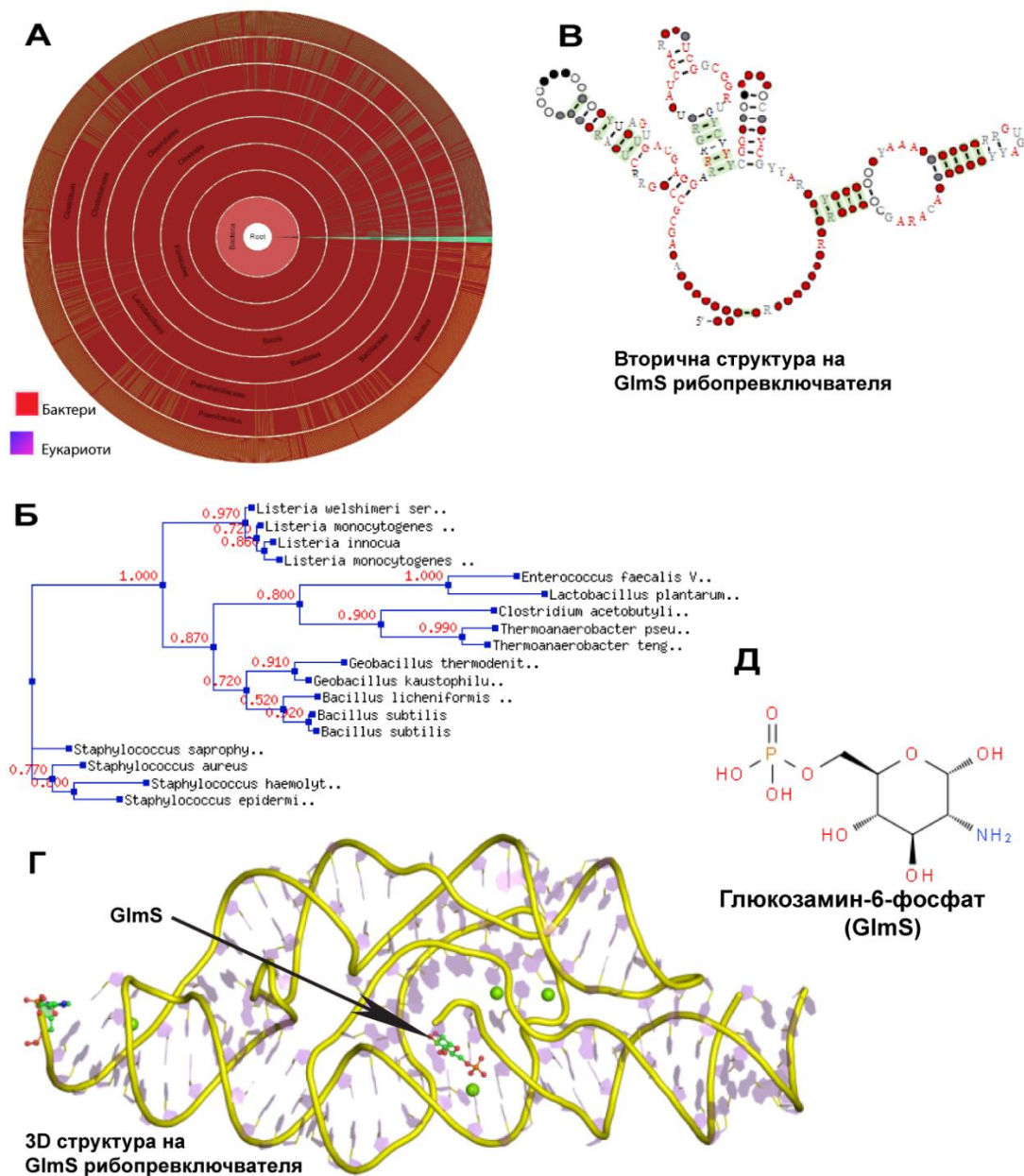


Фигура 12. Лизинов рибопревключвател. А. Графично представяне на разпределението на рибопревключвателя по видове. В червено са отбелязани бактериалните видове. Б. Филогенетично дърво на Лизиновия клас рибопревключвател. В. Вторичната структура на рибопревключвателя. С символа R са отбелязани А или G, с У са С или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. Г. 3D структура на рибопревключвателя. Д. Лизин, който се разпознава специфично от рибопревключвателя. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).

4.2.6 Други метаболити

В последната група са лигандите обозначени като “други метаболити”. Те не могат да се включат в нито една от предходните групи. Тук присъстват метаболитите глюказамин-6-фосфат (GlcN6P) (Фигура 13)(Таблица 3) и гуанидин. Модифицираното въглехидратно съединение GlcN6P се разпознава от GlnS активируемата рибозима (57), (82), (29, 83), (84), (85), (86). След свързването на лиганда с аптамера на рибопревключвателя, настъпва GlcN6P-задействаното РНК-верижно разцепване причиняващо бързо самоскъсване на иРНК (87). GlnS рибозимата е единствената открита рибозима, която е метаболит-кофактор-зависима (88).

Гуанидинът се разпознава от три класа рибопревключватели – Гуанидин-I, Гуанидин-II и Гуанидин-III. Те контролират генната експресия на три различни оперона – респективно: *ykkC*, *mini-ykkC*, and *ykkC-III*. Опероните избирателно свързват гуанидин и регулират генната експресия на белтъци, като преуодяват гуанидиновата токсичност (73), (89), (29). Гуанидин-I рибопревключвателят формира гуанидин-свързващ джоб за всички възможни водородни контакти и взаимодействия с лиганда. В допълнение, аптамерните домени за фосфорибозилпирофосфат (PRPP) съществуват в синглетни форми и/или в тандем с гуанинови аптамери. Тандемните аптамери на гуанин и PRPP могат да свързват разпознатите лиганди в комбинация или независимо един от друг и да регулират транскрипцията на иРНК за *de novo* пуринова биосинтеза в бактерии (90). Гуанидинът, който е специфичният лиганд за Гуанидин-I рибопревключвателя е изключително различен от PRPP. Той формира само част от ppGpp's пуриновия пръстен (90). Гуанидин-II рибопревключвателят носи най-малкия природен лиганд-свързващ домен.



Фигура 13. Глюкозамин-6-фосфатен рибопревключател. **А.** Графично представяне на разпределението на рибопревключателя по видове. **В** червено са отбелязани бактериалните видове. **Б.** Филогенетично дърво за глюкозамин-6-фосфатния клас рибопревключател. **В.** Вторичната структура на рибопревключателя. С символа R са отбелязани A или G, с Y са C или U. В червено са 97% от консервативните нуклеотиди. В черно са 90% консервативни нуклеотиди. В сиво са 75% консервативни нуклеотиди. В бяло са 50% консервативни нуклеотиди. **Г.** 3D структура на рибопревключателя. **Д.** глюкозамин-6-фосфат, разпознаван специфично от GlmS рибопревключателя. Фигурата е създадена от нас и публикувана в Gene през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (58).

Таблица 3. Видове лиганди, разпознавани от рибопревключвателите. В таблицата са представени всички известни видове лиганди (общо 26), разпознавани от рибопревключватели (общо 36 класа). Най-голямата група деривати са коензимите (9), следвани от нуклеиновите деривати (4), сигналните молекули (4), йоните (4), аминокиселините (2) и други метаболити (2). Рибопревключвателите и лигандите отбелязани със “*” не са дискутирани в настоящата Докторска дисертация (58).

Лиганди		Клас рибопревключвател	Вид лиганд	
1	Аденозилкобаламин	Кобаламин	Коензими 9	
		Адокобаламин		
2	Аквакобаламин*	AqCbl*		
3	Флавин моноклеотид	ФМН		
4	Молибденов кофактор	Моко		
5	Тунгстен кофактор*	Wco*		
6	Тетрахидрофолат*	ТНФ*		
7	Тиамин пирофосфат	ТПФ		
8	S-Аденозил метионин	SAM-I		
		SAM -II		
		SAM -III*		
		SAM		
		SAM -V		
		SAM -SAX		
9	S-Аденозилхомоцистеин	SAX		
10	Аденин	Пурин (аденин)		Нуклеотидни производни 4
11	Гуанин	Пурин (гуанин)		
12	Prequeusine-1	PreQ1-I		
		PreQ1-II		
		PreQ1-III		
13	2`-Деоксигуанин	2`-dG-riboswitch (2`-Deoxyguanosine)		
14	Цикличен-ди-АМФ	Цикличен-ди-АМФ		Сигнални молекули 4
15	Цикличен-АМФ-ГМФ*	Цикличен-АМФ-ГМФ *		
16	Цикличен-ди-ГМФ	Цикличен-ди-ГМФ		
		Цикличен-ди-ГМФ -II		
17	ZTP	ЗТП, ZTP		
18	F ⁻	Фруорид	Йони 4	
19	Mg ²⁺	Mg ²⁺ -I		
		Mg ²⁺ -II*		
20	Mn ²⁺	Mn ²⁺ (yubP-ykoY)		
21	Ni ²⁺ /Co ²⁺ *	NiCo*		
22	Глицин	Глицин	Аминокиселини 3	
23	Глутамин	Глутамин		
24	Лизин	Лизин		
25	Глюкозамин-6-фосфат	GlmS	Други метаболити 2	
26	Гуанидин	Гуанидин-I		
		Гуанидин-II		
		Гуанидин-III		

4.3 Използване на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени

Една от най-неотложните теми, върху които учените концентрират усилията си, е създаването на нови антибактериални лекарства. То е необходимо поради огромния брой на резистентни щамове на човешки патогенни бактерии към антибиотици, които водят до продължителни заболявания и увеличаване на смъртността в Световен мащаб (59) В нашата лаборатория - Лабораторията на доц. д-р Роберт Пенчовски, ние фокусираме вниманието си върху приложението на бактериални рибопревключватели като потенциална цел за разработване на нови антибактериални лекарства на базата на нови молекули и нови механизми на действие (1).

4.3.1 Препимущества на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени.

Съществуват много препимущества и ползи от използването на рибопревключвателите като лекарствени мишени. От резултатите представени в “5.1 Разпространение на рибопревключвателите” се потвърждава, че рибопревключвателите са широко разпространени в бактериите и не са открити в човешкия геном все още. Това намалява потенциалния риск от нежелани странични ефекти при евентуалното им приложение (91).

Второ препимущество за използването на рибопревключвателите като мишени за разработване на антибактериални препарати е това, че някои от рибопревключвателите са представени в повече от една бактерия. Например, Тиамин пирофосфатният рибопревключвател се открива в 5624 вида бактерии, от които 48 вида са човешки бактериални патогени. Флавиновият рибопревключвател се открива в повече от 3000 вида бактерии и 41 вида човешки бактериални патогени. Кобаламиновият рибопревключвател се открива в повече от 8000 вида бактериални и 36 вида човешки бактериални патогена.

Трето препимущество на рибопревключвателите е това, че тяхната структура, техният механизъм на регулиране на генната експресия и свързания с тях метаболитен процес са добре проучени. Изключително съществен е фактът, че те имат много консервативни части на аптамерите си и един рибопревключвател може да се използва като мишена за разработването на антибиотици с широк спектър на действие. Класовете

рибопревключватели, които се намират в ограничен брой бактерии, ще бъдат използвани за разработване на антибиотици с тесен спектър на действие.

Четвърто преимущество на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени е това, че човешките бактериални патогени все още не са били изложени на синтетични рибопревключвател-свързващи агенти.

Доц. д-р. Роберт Пенчовски вече притежава международна патентна заявка, озаглавена "Методи за създаване на нови антибактериални агенти, използващи химерни антисенс олигонуклеотиди" за изобретение в потенциалното използване на антисенс олигонуклеотиди, които са насочени към бактериалните рибопревключватели (92).

4.3.2 Пригодност на рибопревключвателите като потенциални антибактериални мишени

Рибопревключвателите са широко разпространени в човешките бактериални патогени. След извършеното от нас биоинформатично търсене, използвайки консенсусни последователности от аптамерната част на рибопревключвателите, открихме различни класове рибопревключватели в геномите на 49 вида човешки бактериални патогени. Част от откритите патогени видове са *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* и много други устойчиви на антибиотици мулти-резистентни бактерии.

След като установихме разпространението на рибопревключвателите сред бактериите, избрахме осем от най-разпространените класове рибопревключватели, върху които насочихме последващите си действия. Анализирахме детайлно рибопревключвателите ТПФ, ФМН, Кобаламин, Лизин, Пурин, САХ, САМ-I и Глюкозамин-6-Фосфат. За всеки един от тях проверихме три основни критерия описани по-долу. Комбинацията от трите критерия ни позволи да класифицираме най-точно рибопревключвателите по пригодност за прицелна мишена на антибактериални агенти. Освен това, анализът извършен от нас дава информация колко антибактериални агента е необходимо да бъдат насочени към всеки един от класовете рибопревключватели за да бъде инхибиран синтеза на ключов бактериален метаболит.

1. Първият критерии за пригодност на рибопревключвател е това дали рибопревключвателят е включен в синтеза на жизненоважни есенциални метаболити за конкретните видове човешки патогенни бактерии, в които се открива той. Важно е да регулира синтеза на ключов метаболит, инхибирането на който да доведе до критични дефицити в бактерията.

2. Вторият критерии за пригодност на рибопревключвателя е наличието на активен транспортен белтък внасящ ключовия метаболит отвън-вътре в клетката. Ако в бактерията има такъв транспорт, то дали активният транспортен белтък се контролира от рибопревключвателя или не. При наличие на транспорт на екстрацелуларния ключов метаболит е необходимо да се провери дали количеството на внесения отвън метаболит е достатъчно за да компенсира инхибирането на основния път за биосинтез на метаболита, контролиран от рибопревключвателя.

3. Третият критерии за пригодност е свързан с наличието или отсъствието на алтернативни биосинтетични пътища за синтез на ключовия бактериален метаболит. Ако бактерията използва такъв алтернативен път, то той под контрол на рибопревключвателя ли е или не е. Ако не е под контрола на рибопревключвателя следва да се проучи дали количеството на алтернативно-синтезирания метаболит е достатъчен за да компенсира инхибирането на основния път за биосинтез на метаболита, контролиран от рибопревключвателя. На базата на тези анализи, класифицирахме рибопревключвателите в четири категории въз основа на тяхната пригодност да служат като цел на антибактериални агенти. Четирите категории класове рибопревключватели са:

- най-подходящи рибопревключватели (+++)
- много подходящи рибопревключватели (++)
- частично подходящи рибопревключватели (+)
- неподходящи рибопревключватели (-)

Получените резултати представихме в Таблица 5. Най-подходящите класове рибопревключватели се откриват във видове човешки патогенни бактерии и контролират уникален, съществен и жизнено важен биосинтетичен път на метаболит за този вид патоген. Най-подходящите рибопревключватели контролират и активния транспорт на метаболита в клетката ако има установен такъв. В този случай е необходимо да се инхибира само рибопревключвателя и това ще доведе до инхибирането на клетъчния растеж.

Много подходящите класове рибопревключватели контролират синтеза на важни за бактерията метаболити, но не контролират активния транспорт на същите метаболити посредством белтъци отвън-вътре в бактерията. В този случай, при наличието на активен транспорт на метаболита в бактерията, е необходимо да се инхибира функцията на рибопревключвателя и в някои случаи експресията на транспортния белтък.

В третата категория са частично подходящите рибопревключвателите, които имат алтернативен или няколко алтернативни биосинтетични пътя на ключовия метаболит за бактерията, които не са под контрола на рибопревключвателя. В този случай, трябва да се инхибира не само функцията на рибопревключвателя, но и алтернативните биосинтетични пътища в бактерията.

Неподходящи за прицелни мишени са тези рибопревключватели, които контролират пътища за разграждане на метаболити. Те не могат да бъдат използвани като мишени за лекарствените агенти.

Таблица 4. Пригодност на рибопревключвателите като мишена за антибактериални лекарства. Рибопревключвателите са групирани в четири групи. Най-подходящите (+++) рибопревключватели контролират синтеза на съществен метаболит и неговия транспорт вътре в бактерията. При тях, не се открива алтернативен биосинтетичен път на метаболита. Много подходящи рибопревключватели (++) са тези, които контролират биосинтеза на ключов метаболит за бактерията, но не контролират неговия клетъчен внос отвън. Частично подходящи рибопревключватели (+) са тези, които имат алтернативни биосинтетични пътища, които не са под контрола на рибопревключвателя и не контролират неговия транспорт. Неподходящи рибопревключватели (-) са тези, които не контролират биосинтетични пътища на жизненоважни метаболити за бактерията. Те контролират пътищата на разграждане на основните метаболити. При някои бактерии, рибопревключвателят ТПФ контролира вноса на основни белтъци в клетката. Това е отбелязано в таблицата с „- / ✓“. Рибопревключвателят Кобаламин има два паралелни биосинтетични пътя - аеробен и анаеробен биосинтетичен път. Те са отразени в таблицата със звезда „*“.

Рибо-превключватели (РПи)	Биосинтетични пътища, контролирани от РП	Транспортни белтъци, контролирани от РП	Алтернативни биосинтетични пътища, които не са под контрола на РП	Подходящ или не РП
ФМН	✓	✓	-	+++
САМ-I	✓	✓	-	+++
Лизин	✓	✓	-	+++
ТПФ	✓	-/✓	-	++/+++
GlmS	✓	-	-	++
Пурин	✓	-	✓	+
Кобаламин	✓*	-	✓	+
САХ	-	-	✓	-

4.3.2.1 Най-подходящи рибопревключватели за използване като антибактериални лекарствени мишени: ФМН, САМ-I и Лизин

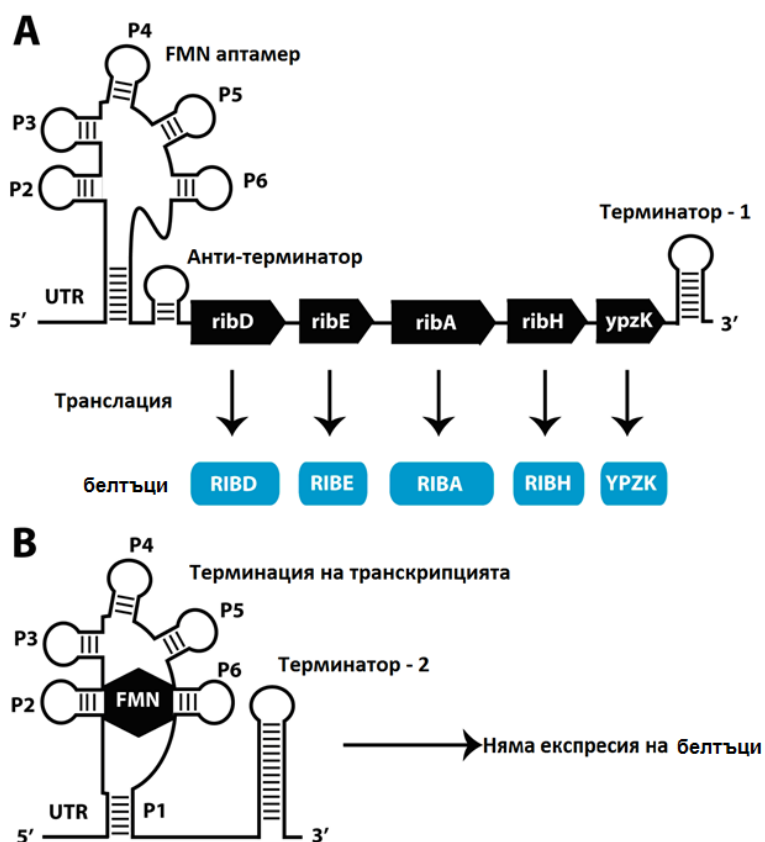
4.3.2.1.1 ФМН рибопревключвател

Пълното наименование на рибопревключвателя ФМН (FMN) е флавин мононуклеотиден рибопревключвател (flavin mononucleotide riboswitch). В научната литература той се среща още като флавинов рибопревключвател и РФН елемент (RFN element). ФМН рибопревключвателят представлява високо консервативен РНК елемент, който най-често се открива в 5'-НТР на прокариотни иРНКи, кодиращи биосинтеза на флавиномононуклеотид (FMN, ФМН), флавин-аденин динуклеотид (ФАД, FAD) и транспортни белтъци (93). Повечето микроорганизми, растения и гъби са способни да го синтезират сами, но при гръбначните животни това не е възможно (93).

ФМН Рибопревключвателят е един от най-разпространените рибопревключватели в бактериите. Според информация, публикувана в базата данни Rfam, той се среща в 3281 различни вида. Откриваме го при 41 вида човешки бактериални патогени (Таблица 2). Осем от тези 41 вида човешки бактериални патогени присъстват в списъка с приоритетите на СЗО за разработване и проучване на нови антибактериални лекарства.

Рибопревключвателят ФМН съдържа шест стема, които формират пеперудо-подобна структура, прикрепена заедно чрез срещуположно насочени и идентично нагънати периферни области. Лигандът ФМН е разположен асиметрично в аптамерния сайт и се свързва специфично с РНК чрез взаимодействия с хромофорът на изоалоксазинов пръстен и Mg^{2+} - спомогнати контакти с фосфатен остатък (94) (Фигура 8). ФМН рибопревключвателят регулира генната експресия чрез два различни механизма - чрез терминиране на транскрипция (Фигура 14) и чрез превенция на трансляцията, както е описано на с. 29 от Литературния обзор (Фигура 21). Флавиновият рибопревключвател, който използва терминацията на транскрипцията, се намира в 5'-НТР на много гени, включително *ribDEANT* (*ribD*) оперона, с *uruE*, *ribD* (*ribG*), *ribE* (*ribB*), *ribA*, *ribH* и *ribT* гени. Оперонът кодира пиримидин деаминаза, пиримидин редуктаза, рибофлавин синтаза алфа субединица, GTF циклохидролаза/3,4-дихидрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза и бета-субединицата на рибофлавин синтазните ензими, необходими за синтеза на рибофлавин. Вторият тип генетичен контрол, който ФМН рибопревключвателят упражнява е регулацията на генната експресия чрез транслационно инициране в

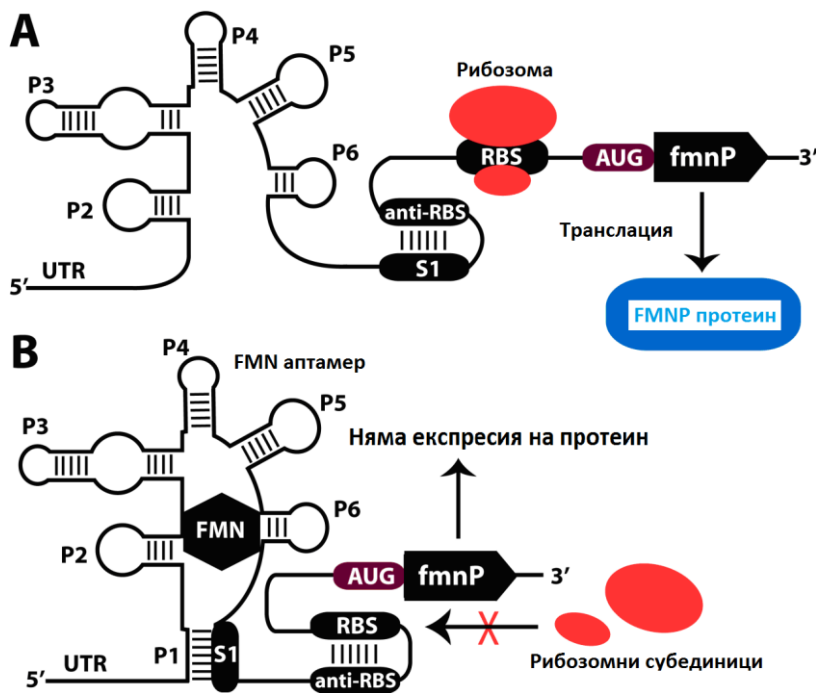
ugaA (ribU), или fmnP гена. Той кодира предполагаемия белтък-транспортър на рибофлавина (63).



Фигура 14. Регулация на генната експресия чрез терминация на транскрипцията от рибопревключвателя ФМН.

ФМН рибопревключвателят се намира в 5'-НТР на полицистронната иРНК, която кодира пет белтъка, отговорни за биосинтеза на ФМН, при много бактерии. **А.** При липса на ФМН, аптамерът се нагъва в структура, която позволява формирането на анти-

терминатор и не позволява образуването на терминатор близо до 5'-НТР. В резултат на това цялата полицистронна иРНК се транскрибира и транслира в 5 белтъка, които участват в синтеза на ФМН. **В.** Когато ФМН присъства в бактерията, аптамерът се нагъва в структура, която улеснява образуването на терминатор-2 в 5'-НТР. Впоследствие, транскрипцията на полицистронната иРНК е преждевременно терминирана. В резултат на това, не се произвеждат ензими за биосинтеза на ФМН в клетката. Тази Фигура е използвана в Дипломна работа на Николет Павлова за придобиване на Магистърска степен.



Фигура 15.

Регулация на генната експресия чрез превенция на транслацията. А. В отсъствието на ФМН, мястото за свързване на рибозомата (RBS, РСМ) е достъпно за малката рибозомна субединица и тя се свързва с иРНК, за да започне транслацията на белтъка. В. Когато ФМН присъства в клетката, той

се свързва с аптамера, това води до конформационна промяна, която прави възможна хибридизацията на РСМ с антисенс-РСМ-секвенцията. Това прави РСМ недостъпно, за свързване с малката рибозомна субединица. В резултат на това иРНК не може да бъде транслирана. Тази Фигура е използвана в Дипломната работа на Николет Павлова за придобиване на Магистърска степен.

Синтезирането на ФМН е част от Пуриновия метаболизъм и Пентозофосфатния път (ПФП) (Фигура 16). То започва от първата реакция, която представлява превръщане на ГТФ в присъствието на три молекули вода до 2,5-диамино-6-(5-фосфо-D-рибозиламино)-пиримидин-4(3Н)-он, под контрола на ензима ГТФ циклохидролаза (*ribA*, ЕС 3.5.4.25).

Втората реакция се осъществява под контрола на диаминохидроксифосфорибозиламинопиримидин деаминазата (*ribD*, ЕС 3.5.5.26). Тя представлява превръщане на 2,5-диамино-6-(5-фосфо-D-рибозиламино)-пиримидин-4(3Н)-он в 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибозиламино)урацил, при което се отделя амоняк.

Третата реакция също е под контрола на гена *ribD*. При нея ключовият ензим е 5-амино-6-(5-фосфорибозиламино)урацил редуктаза (*ribD*, ЕС 1.1.1.193). Съединението, което се получава е 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибитиламино)урацил.

Четвъртата реакция от биохимичния синтез на ФМН е реакцията, при която от 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибитиламино)урацил се получава 5-амино-6-рибитул-

аминоурацил. Тя се осъществява с помощта на ензими от класа на фосфатазите и по-точно: 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибителиамино)урацил фосфатаза – *yjgV* и *ybjI*. Полученият при четвъртата реакция метаболит служи за субстрат за получаване на 6,7-диметил-8(1-D-рибитил)лумазин в петата реакция от синтеза на ФМН.

Петата реакция се осъществява благодарение на кодирания от *ribE* ензим – 6,7-диметил-8-рибитиллумазин синтаза (*ribE*, EC 2.5.1.78). 6,7-диметил-8(1-D-рибитил)лумазин се получава още от 1-деокси-L-глицеро-тетрулозо-4-фосфат, част от ПФП. До 1-деокси-L-глицеро-тетрулозо-4-фосфат се достига от D-рибулозо-5-фосфат и ензима 3,4-дихидрокси-2-бутанон 4-фосфат синтаза (*ribB*, EC 4.1.99.12).

Шестата реакция от биохимичния път за синтезиране на ФМН е под контрола на *ribC* гена и се осъществява с помощта на ензимът рибофлавин синтаза (*ribC*, EC 2.5.1.9). В резултат на неговото действие от 6,7-диметил-8(1-D-рибитил)лумазин се получава рибофлавин. От рибофлавин лесно може да се получи рибитол, който след това влиза в цикъла на пентозо- и глюкозоуронат превръщанията.

Флавин редуктазата (EC 1.5.1.30) е ензим, който катализира следната химична реакция: **рибофлавин + НАДФН + Н⁺ ⇌ редуциран рибофлавин + НАДФ + Н⁺**

Ензимът се открива при много организми - животни и бактерии (95). Бактериите окисляват редуцирания флавин мононуклеотид до окислен ФМН и го пренасят чрез свободна фузия и генериране на светлина (96). При хора, флавиновата редуктаза често катализира НАДФН-зависимата редукция на флавин мононуклеотид, който участва в метхемоглобина при еукариоти.

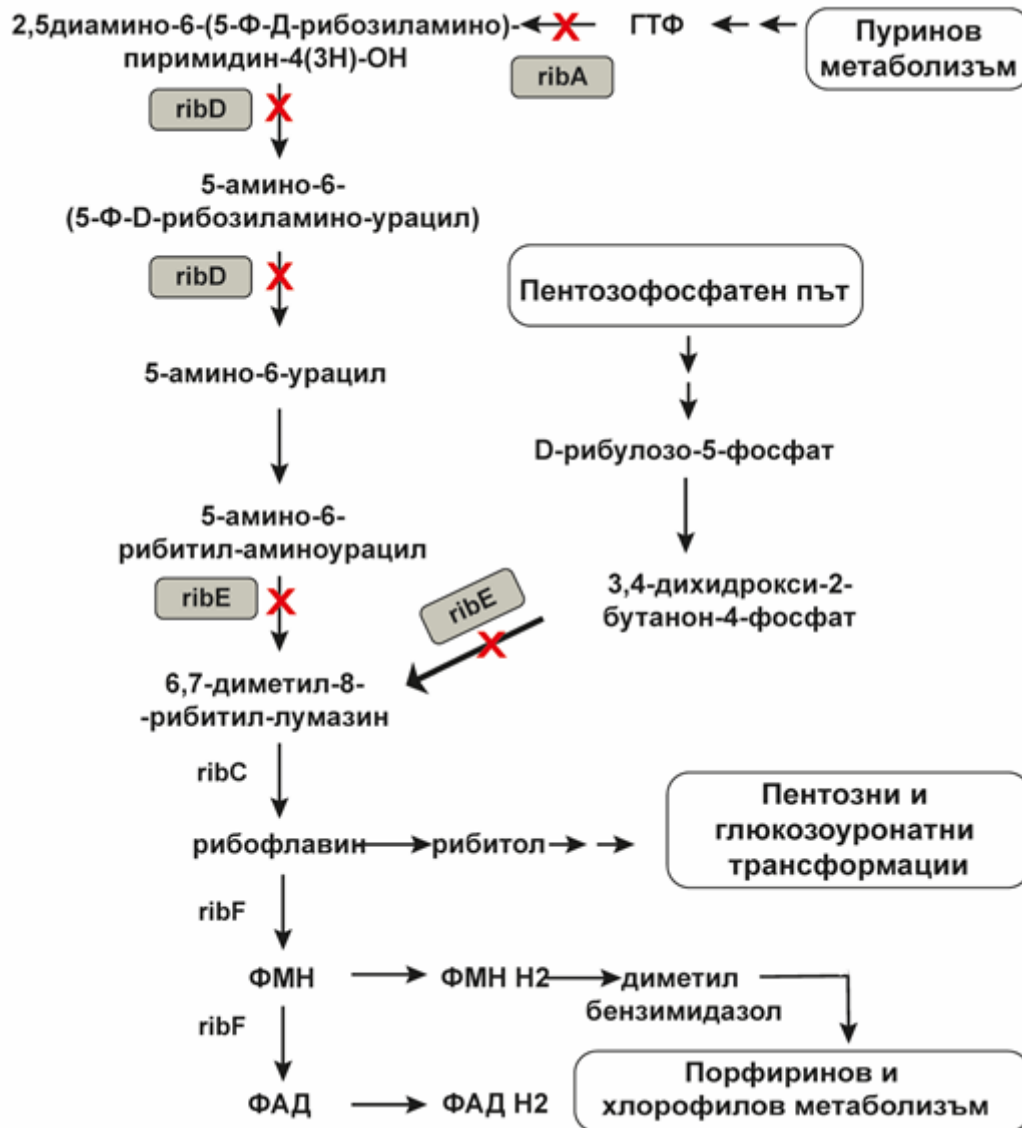
От рибофлавин, обаче, под въздействието на ензима рибофлавин киназа (*ribF*, EC 2.7.1.26) се синтезира ФМН. Полученият ФМН може да се превърне лесно и бързо в ФМНН₂, а от него да се получи диметил бензимидазол. Тези два метаболита са част от Порфириновия метаболизъм и метаболизма на хлорофила.

ФМН може да се превърне и във ФАД под въздействието на ензима ФМН аденилилтрансфераза (*ribF*, EC 2.7.7.2). Той се кодира от гена *ribF*. ФАД бързо се превръща във ФАДН₂. Той също участва в Порфириновия метаболизъм.

В биохимичния път за синтезиране на ФМН основна част от ензимите се контролират от рибопревключватели. Флавиновият рибопревключвател включва под своя контрол гените: *ribA*, *ribE* и *ribD*. Техните продукти, а именно ензимите, които кодират, участват в първата, втората, третата и петата реакции от процеса.

Ако бактериалният синтез на ФМН се блокира, това би довело до неефективно окисление на мастните киселини, дихателен арест, невъзможност за метаболизиране на порфирина, пентозурон и глюкуроonium и прекъсване на разграждането им. Тъй като голяма част от биохимичните реакции, включени в синтеза на флавин, се контролират от флавиновия рибопревключвател, те могат да се използват като мишени, за да се блокира синтеза на ФМН. Точно тези рибопревключвател-регулирани места са отбелязани в овални сиви форми върху Фигура 16. Синтезът на ФМН е линеен биохимичен процес, при който липсват много допълнителни разклонени реакции. Това е изключително голямо преимущество, тъй като може да се блокира биосинтезът на всички ензими (Фигура 16), като се дестабилизира полицистронната иРНК на RibD или/и функцията на рибопревключвателя, който е част от него. Това позволява растежът на бактериите да се преустанови. Този ефект прави флавиновия рибопревключвател една от най-подходящите цели в разработването на нови лекарства в борбата срещу човешките патогенни бактерии. За да се блокира биохимичният път за синтез на флавин, е необходимо да се инхибира само една реакция. Инхибирането на ФМН рибопревключвателя ще спре бактериалния растеж. Това го прави една от най-подходящите лекарствени мишени. Към настоящия момент е установено, че аналогът на рибофлавин, розофлавин, е насочен към рибопревключвателя и блокира клетъчния растеж на *Listeria monocytogenes*, но повишава вирулентността на бактериите (97). Публикувана е информация за откриването на силно селективно химично съединение, което модулира ФМН рибопревключвателя, наречено рибоцил. То действа като синтетичен двойник на флавин мононуклеотид. Неговото свързване с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя потиска експресията на гена RibV и инхибира растежа на бактериалната клетка (98). През 2017 година са изследвани ефектите на рибоцил-С и розофлавин във видове Грам-положителни бактериални патогени (99). Резултатите показват, че при резистентния към метицилин *Staphylococcus aureus*, рибоцил-С и розофлавин едновременно прицелват два различни рибопревключвателя водещо до инхибиране на *de novo* синтеза и разпознаването на рибофлавина (100).

От друга страна, ФМН рибопревключвателят е един от най-широко разпространените класове рибопревключватели сред бактериите. Последователността му е изключително консервативна при различните видове бактерии, в които се открива той (Фигура 17 и Фигура 18). Това е изключително голямо преимущество, защото може да се създаде един единствен антибактериален агент, който да бъде ефективен върху много опасни бактериални видове едновременно.



Фигура 16. Инхибиране на синтеза на ФМН от ФМН рибопревключвателя и гените под негов контрол. Когато се блокира генът *ribE* (контролиран от ФМН рибопревключвателя) чрез антисенс олигонуклеотидно съединение, 6,7-диметил-8-ибицикламилсилиловото съединение не се синтезира. ФМН не се транспортира в клетката и инхибирането на неговия синтез предопределя инхибирането на синтеза на рибофлавин, флавин и ФАД. Това води до блокиране на растежа и размножаването на патогенните бактерии и/или тяхната смърт. Със сива овална форма са оградени ензимите, които са под контрола на ФМН рибопревключвателя. Фигурата е направена от нас в Adobe Illustrator и е публикувана в Expert Opinion on Therapeutic Targets през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (59).

4.3.2.1.2 САМ-I рибопревключвател

Рибопревключвателят S-аденозил метионин (САМ-I, S-box лидер или SAM-I) се открива преди гени, които кодират белтъци, участващи в биосинтеза на метионин и цистеин в Грам-положителни бактерии. САМ-I рибопревключвателят се открива в геномите на 20 вида човешки патогенни бактерии (Таблица 1 и 2). Два вида от човешките патогенни бактерии, в които рибопревключвателят се открива са посочени в приоритетния списък на СЗО, за които спешно са необходими нови антибиотици.

S-аденозил метионинът е основен коензим във всички организми и се синтезира директно от метионин чрез синтез на S-аденозил метионин. Основните синтетични пътища на метионин и цистеин са запазени в еволюцията, което предполага, че аналогични рибопревключватели могат да контролират Серния метаболизъм в много бактериални видове и други организми (101).

Структурата на рибопревключвателят е определена чрез рентгенова кристалография (Фигура 10) (102). Тя е организирана около четиристранно свързване, с две коаксиално подредени спирали, разположени една до друга. Терминиращият продукт от метил-лидерните конструкции се увеличава от 12% до почти 75% при включването на САМ (103). Структурата на рибопревключвателя регулира транскрипцията на *metE*, *yitJ*, *ukrW* и няколко други гена в *B. subtilis* и *cysH* в *B. subtilis* и *B. anthracis*, след свързване на S-аденозил метионин (150). Един от гените, контролирани от САМ-I рибопревключвателят в *B. subtilis* е *yitJ*. Той участва в S-аденозил-L-метиониновия цикъл. В отсъствието на S-аденозил метионин по време на синтеза в частта на 5'-НТР се формира анти-терминаторен участък (Фигура 18).

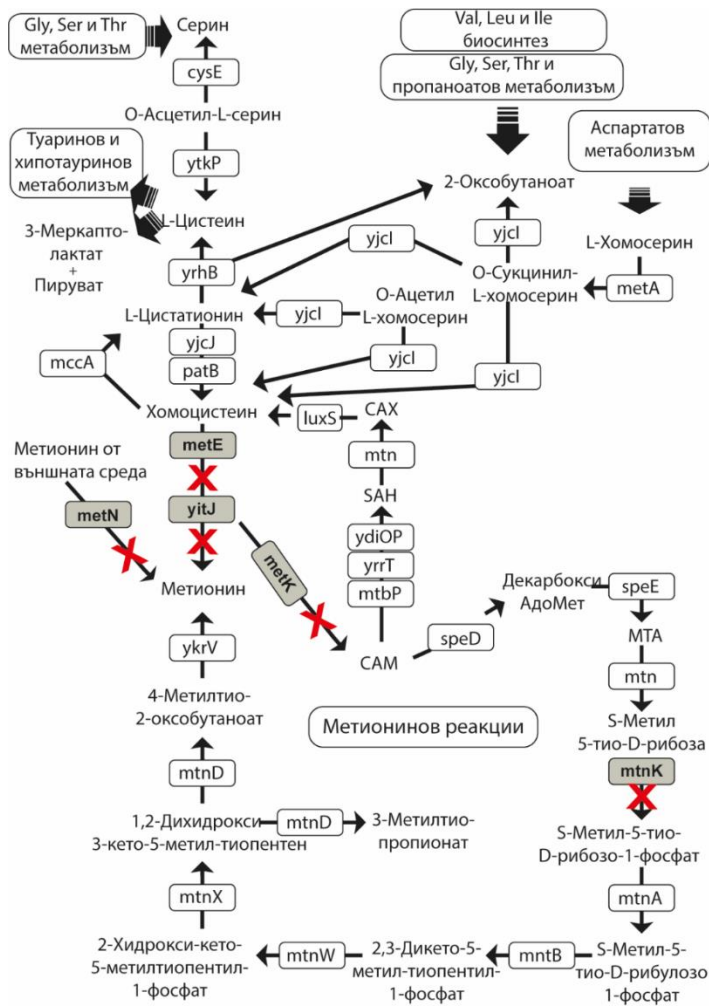
Цистеинът и метионинът са аминокиселини, съдържащи сяра. При бактериите метионин се синтезира от L-аспартат, който е част от пътя на Аспартатния метаболизъм. Пътят за биосинтез на метионин от L-аспартат преминава през L-хомосерин → O-сукцинил-L-хомосерин → L-цистатионин → Хомоцистеин → реакции с участието на метионин (Фигура 17). Кобаламин-независимата метионин синтаза MetE и хомоцистеин-S-метилтрансфераза (YitJ) участват в синтеза на метионин от хомоцистеин и се контролират от САМ-I рибопревключвателя и свързването му с лиганда чрез терминация на транскрипция. Този биосинтетичен път е открит при всички видове организми (104). Метионинът може да се внесе в клетката чрез ABC транспортер MetN (кодиран от *metNPQ* оперон). В пътят за спасяване на метионин се рециклират метаболитите,

съдържащи сяра до в метионин (97). След това, 7 допълнителни ензимни етапа образуват 4-метилтио-2-оксобутаноат. MtnK е част от mtnKA оперона (104).

SAM е едновъглероден донор, синтезиран от АТФ и метионин чрез SAM синтетаза, кодирана от основния metK ген, който е под контрола на SAM-I рибопревключвателя. SAM е донор на метилова група в много важни преносни реакции, включително ДНК метилиране за регулиране на генната експресия. SAM се използва за регенериране на метионин в пътя на възстановяване на метионина.

SAM-I рибопревключвателят регулира няколко ензимни етапа на Суперпътя за S-аденозил-L-метионинов биосинтез посредством терминиране на транскрипцията (Фигура 18). Гените metE, metK и yitJ от оперона yitJI са включени в този Супер път. Метионинът може да бъде внесен от екстрацелуларната среда чрез metN, полипептид метионин ABC транспортер, субстрат свързващ липопротеин (metNPQ оперон), където metN се контролира от SAM-I рибопревключвателя (105).

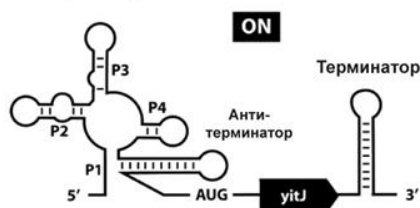
Последните изследвания за естествената вариабилност на рибопревключвателите от класа SAM-I показват, че има разлика в чувствителността на SAM-I *in vivo* и *in vitro* (106). Гените, които пряко участват в биосинтеза на метионин (metE, yjcIJ, metIC и yitJ), показват най-силна регулация *in vivo*. Наблюдава се най-голямо увеличение на експресията по време на „гладуване“ и най-ниска експресия по време на растеж в присъствието на метионин. Най-голямото забавяне преди индукцията се наблюдава при metE и yitJ. В присъствието на метионин metNPQ оперонът показва по-високи нива на експресия по време на растежа. Той показва не толкова бърза индукция в отсъствието на SAM. MetNPQ оперонът кодира метаболитен транспортер от ABC тип. За бактериите е по-ефективно да поемат и използват екзогенния метионин, отколкото да осъществят биосинтез на метионин вътре в тях. Теоретично, растежът на *Bacillus subtilis* може да бъде потиснат по един начин чрез потискане на metK гена. MetK, SAM синтетазата, е ензим, който води до получаването на SAM чрез взаимодействие на метионин и АТФ. SAM е лиганд, който се свързва с SAM-I рибопревключвателя специфично (Фигура 10). Инхибирането на SAM-I рибопревключвателя води до спиране на бактериалния растеж. По тази причина SAM-I рибопревключвателят е една от най-подходящите бактериални лекарствени мишени.



Фигура 17. Метаболитни пътища на цистеин и метионин в *Bacillus subtilis* 168. Съкращенията SAM, SAH и SRH обозначават метаболитите както следва: S-аденозилметионин, S-аденозил-(L)-хомоцистеин, S-рибозил-L-хомоцистеин. Със сива овална форма са отбелязани ензимите, които са под контрола на SAM рибопревключвателя. Реакциите, които ще бъдат блокирани от регулирането на рибопревключвателя SAM, са показани със зачеркнати с червени X-ове. Фигурата е направена от нас в Adobe Illustrator и е публикувана в Expert Opinion on Therapeutic Targets през 2019, след което е

преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (59).

А SAM-I рибопревключвател



Б Терминация на транскрипцията



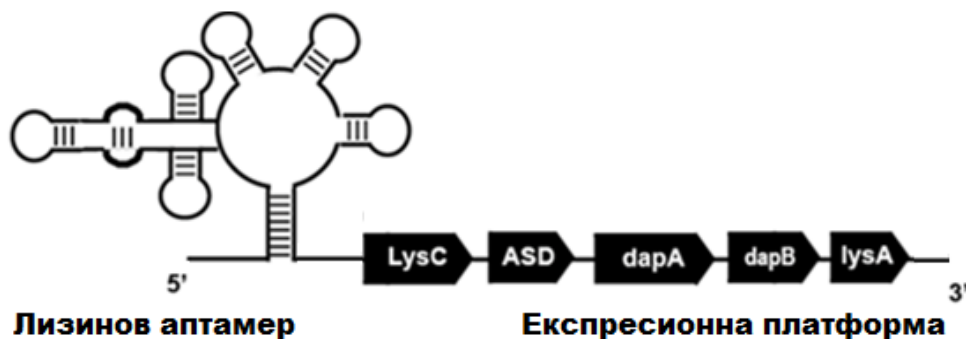
структура. Червената част показва разгънатата анти-терминаторна позиция в експресионната платформа.

Фигура 18. Терминация на транскрипция в *Bacillus subtilis* от SAM-I рибопревключвател. А. В отсъствие на SAM по време на синтеза на 5'-НТР (GENE ON), анти-терминаторни структури не пречат на генната експресия на yitJ ген. Б. В присъствие на SAM (GENE OFF), той се свързва с рецептора и стабилизира спиралата (P1) и позволява образуването на терминаторна структура.

4.3.2.1.2 Лизинов рибопревключвател

Лизиновият рибопревключвател (Lisine riboswitch, L-box) е цис-регулаторен металорит-свързващ РНК елемент, който разпознава аминокиселината лизин (Фигура 19)(107). Много бактерии транспортират лизин и го синтезират сами. Лизинът участва в образуването на мезо-ДАП конструкта и пептидогликана. Пептидогликанът е един от основните компоненти на бактериалната клетъчна стена (51)(108). Клетъчната стена е важен структурен елемент на прокариотната клетка. Тя заема от 5 до 50% от сухото вещество на клетките и формира бариера между околната среда и протопласта (частта от клетката, ограничена от цитоплазмената мембрана), като придава формата на бактериите. Тя представлява силна и еластична структура.

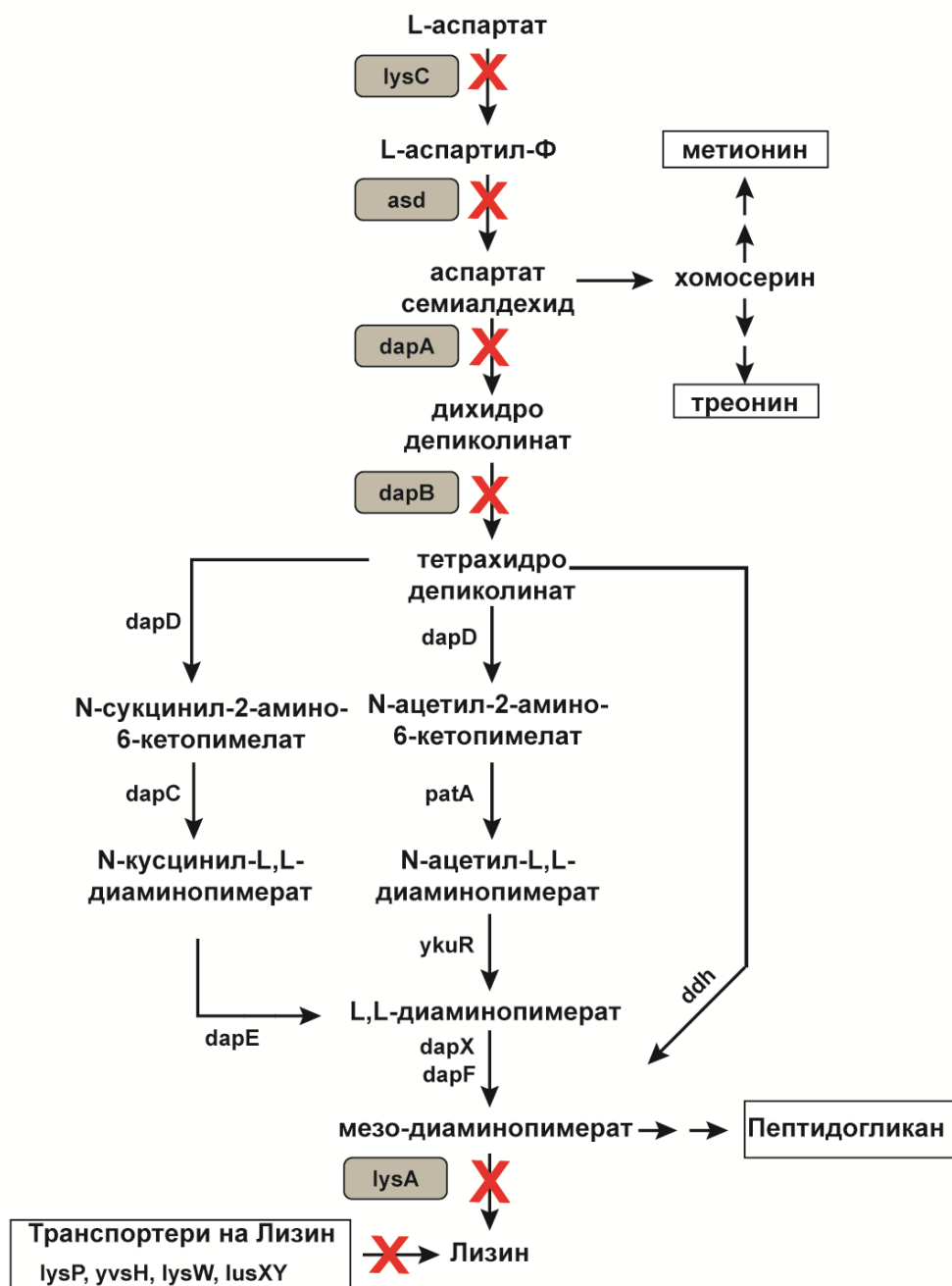
В клетката, осмотичното налягане е високо и съответства на 5 до 20% разтвор, дължащо се на концентрацията на сол в резултат на активен транспорт през мембраната. В повечето случаи това би довело до спукване на клетките. Клетъчната стена предпазва клетката от разкъсване. Поради тази причина, лизинът, заедно с мезо-ДАП, са изключително подходящи мишени за разрушаване на клетъчната стена и оттам за загиването на бактериалната клетка.



Фигура 19. Структура на рибопревключвателя лизин. На фигурата са показани аптамерната част и експресионната платформа, съставена от гените *lysC*, *asd*, *dapA*, *dapB* и *lysA*, образуващи лизиновия рибопревключвател. Настоящата фигура е създадена от Николет Павлова и използвана в нейната Дипломна работа за придобиване на Магистърска степен.

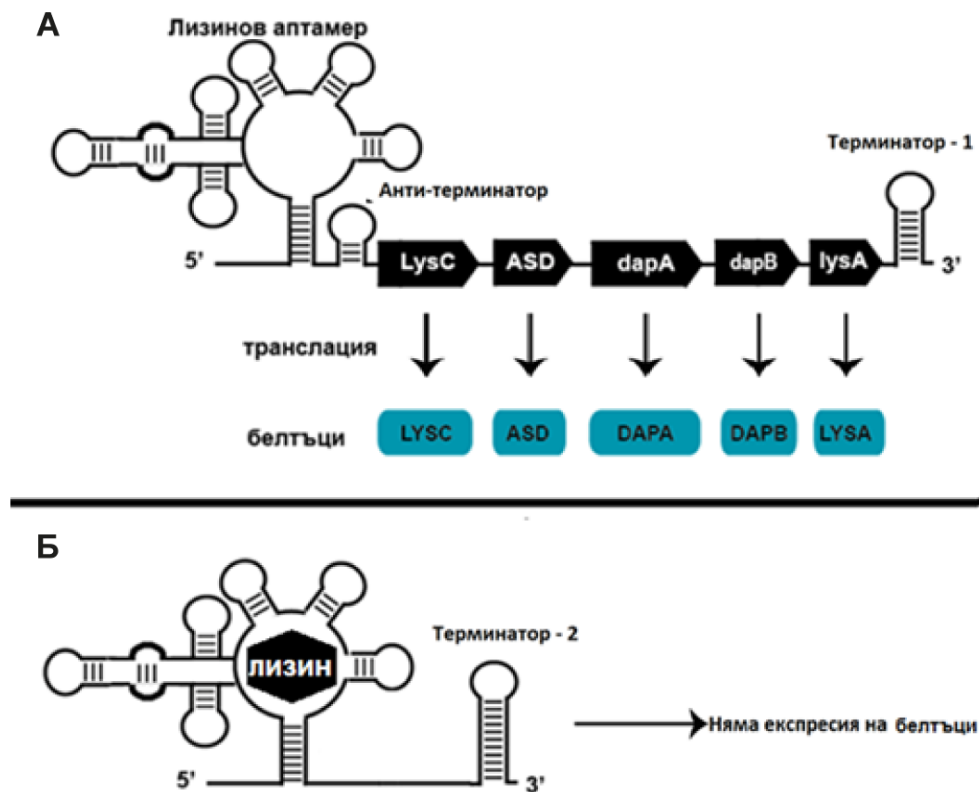
Лизиновият рибопревключвател е част от полицистронна иРНК, която кодира гените *lysC*, *asd*, *dapA*, *dapB* и *lysA*. Рибопревключвателят се открива в 2261 вида, включително в 25 вида патогенни бактерии (Таблица 1 и Таблица 2). Пет от тези 25 вида бактерии са в списъка на СЗО за незабавна нужда от откриване на нови антибиотици. В Грам-положителни бактерии, фуркетните структури на рибопревключвателя се следват от богати на тимидин области и регулират генната експресия чрез терминация на транскрипцията на *LysC* гена. В Грам-отрицателни бактерии, "фибите" се припокриват с рибозом-свързващото място на първия ген в лизин-регулацияния оперон и следователно действат като превенция на транслацията. Ако рибопревключвателят не е активиран, синтезът на ензима аспартат киназа ще бъде блокиран (Фигура 20). Чрез едновременно блокиране на *lysP* гена - лизин белтък-транспортатор лизин и *lysA*-диаминопимелат декарбоксилазен ензим, лизинът не може да бъде синтезиран в клетката, нито може да бъде внесен отвън (Фигура 20). Разглеждайки биохимични пътища при различни бактерии, забелязахме, че има някои бактериални видове, при които транспортирането на лизин не е под контрола на рибопревключвателя.

Ако рибопревключвателят Лизин се възприеме като мишена, която се атакува с антисенс олигонуклеотид, то рибопревключвателят няма да бъде активен и ще се блокира синтеза на ензима аспартат киназа. Аспартат киназа участва в първата реакция от ДАП биохимичния път. Този метод на регулация би бил успешен ако лизин не се внася с помощта на транспортен белтък в клетката или ако количеството на внесения лизин е недостатъчно за да се осъществи образуването на бактериалната стена. При едновременно супресия на гена, синтезиращ белтък-транспортатор за внасяне на лизин в клетката - *lysP* и гена за ензима диаминопимелатдекарбоксилаза – *lysA*, бактерията няма да може да синтезира лизин, нито пък ще може да го внесе отвън. Това ще доведе до неспособността на бактерията да синтезира голяма част от белтъците си и едновременно с това пептидогликана, изграждащ клетъчната ѝ стена.



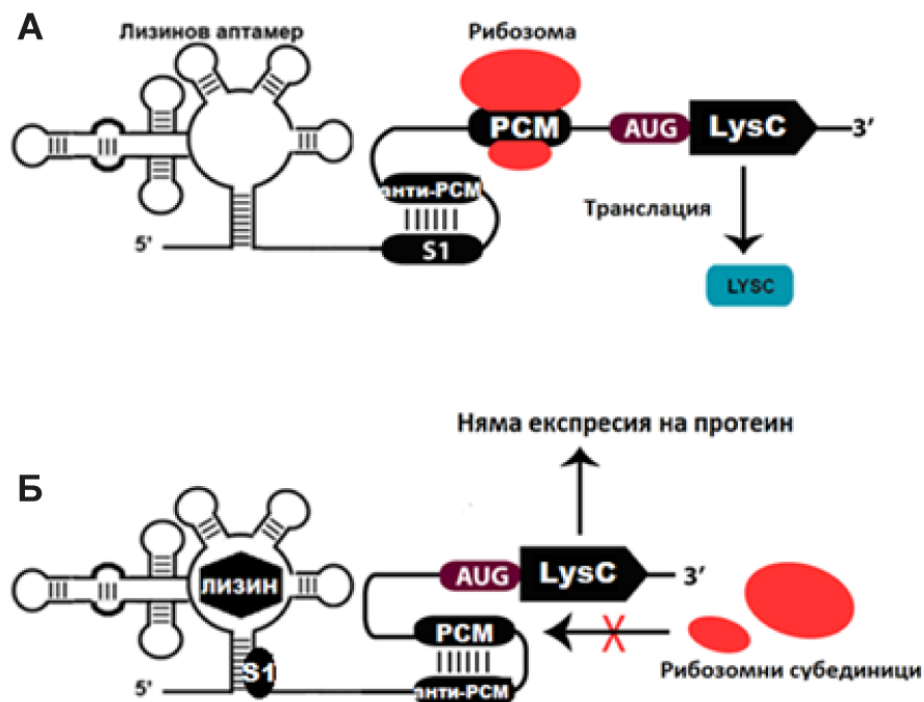
Фигура 20. Основни стратегии за блокиране на биохимичния път на ДАП за синтез на лизин. Ензимите под контрола на рибопревключвателя Лизин са отбелязани в сиви овални форми. Червените кръстове показват всички стъпки, които ще бъдат блокирани, ако бъде блокиран лизиновият рибопревключвател. Фигурата е направена от нас в Adobe Illustrator и е публикувана в Expert Opinion on Therapeutic Targets през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (59).

Регулирането на биосинтетичните и транспортните гени се осъществява на транслационно ниво в една група бактерии и транскрипционно в друга група бактерии. Пример за бактерия, при която лизиновият рибопревключвател регулира генната експресия посредством превенция на транслацията е Грам-положителна бактерия *Bacillus subtilis*. Лизиновият рибопревключвател регулира експресията на *LysC* гена чрез терминация на транскрипция. В отсъствието на лизин в средата, аптамерът се нагъва в структура, която позволява образуването на анти-терминатор и в същото време предотвратява образуването на терминатор близо до 5'-НТР. В резултат на това, всички полицистронни иРНК се транскрибират и транслират в ензими, осъществявайки синтеза на лизин. Когато присъства лизин в средата, аптамерът се нагъва в структура, която улеснява образуването на терминатор в 5'-НТР. Следователно, транскрипцията на полицистронната иРНК е преждевременно прекратена. В резултат на това не се произвеждат ензими за биосинтеза на лизин в бактериите (Фигура 21).



Фигура 21. Терминация на транскрипцията при *Bacillus subtilis*. **А.** В отсъствие на лизин, рибопревключвателя осъществява своя генетичен контрол. **Б.** В присъствие на лизин, рибопревключвателя го свързва и се образува терминаторен участък. Фигурата е създадена от Николет Павлова и е използвана в нейната Магистърска теза.

В Грам-отрицателни бактерии, в отсъствие на лизин, рибозом-свързващото място (PCM, RBS) е достъпно за малката рибозомна субединица. Тя се свързва с иРНК, за да започне транслацията на ензима. Когато лизинът присъства в клетката, той се свързва с аптамера на лизиновия рибопревключвател. Това свързване води до конформационна промяна, която прави възможна хибридизацията на PCM с антисенс PCM-последователност. По този начин, PCM става недостъпно място за свързване на малката рибозомна субединица. В резултат на това, иРНК не може да се транслира. Наблюдава се транслационен контрол, т.е терминация на транскрипцията (Фигура 22).



Фигура 22. Регулация на генната експресия от Лизинов рибопревключвател чрез превенция на транслацията. (А) В отсъствието на лизин, мястото за свързване на рибозомата (PCM, RBS) е достъпно за малката рибозомна субединица. Тя се свързва с иРНК, за да започне транслацията на ензима. (В) Когато лизин присъства в клетката, той се свързва с аптамера на лизиновия рибопревключвател. Това свързване води до конформационна промяна, която прави възможна хибридизацията на PCM с антисенс-PCM-секвенция. По този начин PCM се превръща в недостъпно място, за свързване на малката рибозомна субединица. В резултат на това, иРНК не може да бъде транслирана. Наблюдава се транслационен контрол, т.е превенция на транслацията.

4.3.2.2 Много подходящи рибопревключватели за използване като антибактериални лекарствени мишени: ТПФ и Глюкозамин-6-фосфат

Много подходящи рибопревключватели като мишени за антибактериални лекарствени препарати са тези рибопревключватели, които са широко разпространени в човешките бактериални видове патогени. Това са рибопревключватели, които синтезират ключови метаболити, с важно значение за бактерията, в която се откриват. При тези рибопревключватели се наблюдава внасяне на метаболита от външната среда в бактерията, посредством белтък-преносител, който не е под техния генен регулаторен контрол. Това е основната разлика с рибопревключвателите от групата на най-подходящите рибопревключватели за антибактериални мишени, които нямат внос на метаболита отвън-вътре в бактерията или контролират експресията на гените, кодиращи активните белтъчни преносители. В категорията за много подходящи рибопревключватели, причислихме рибопревключвателите ТПФ и Глюкозамин-6-фосфат. Те отговарят на всички описани по-горе характеристики.

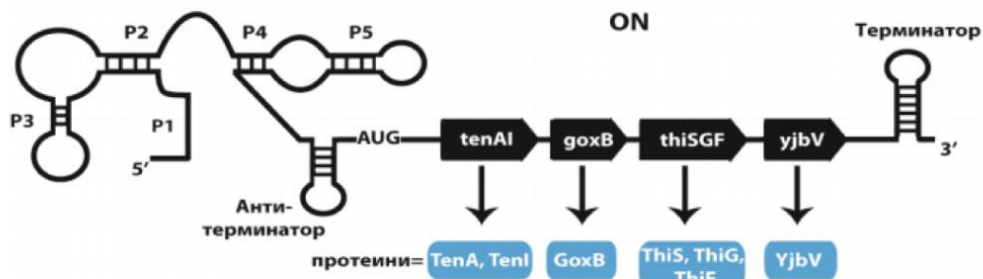
4.3.2.2.1 ТПФ рибопревключвател

Тиамин пирофосфатният рибопревключвател (ТПФ рибопревключвателя, TRP riboswitch) е известен още като thi-елемент и thi-box riboswitch. Тиаминовият пирофосфат е активна форма на тиамин (витамин B1) (109). Според база данни Rfam, ТПФ рибопревключвателят присъства в 5624 бактериални вида. ТПФ е широко разпространен в човешки видове бактериални патогени и е най-разпространеният рибопревключвател сред патогенните бактерии. Той се открива в 48 вида човешки патогенни бактерии (Таблица 1 и Таблица 2). 11 от тези 48 вида бактерии са споменати в списъка на СЗО за необходимост от незабавно откриване на нови антибиотици. ТПФ рибопревключвателят контролира генната експресия чрез индуциране на терминация на транскрипция в Грам-положителни бактерии или инхибиране на трансляцията при Грам-отрицателни бактерии (110).

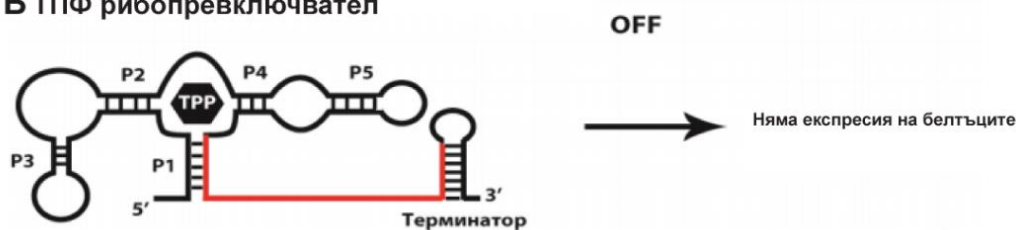
Рибопревключвателят е изграден от аптамерна част и експресионна платформа. Аптамерната му част има много силно консервативна последователност в различни организми. Експресионната му платформа варира в последователност, структура и дори в механизма на генната експресия (10). Описани са два различни механизма на генно регулиране, от ТПФ рибопревключвателя, които включват термиране на транскрипция (Фигура 23) и предотвратяване на трансляцията (Фигура 24), (111). Терминация на транскрипцията се причинява от свързването на ТПФ с

рибопревключвателя ТПФ в *tenA* иРНК оперона и след това индуциране на прекъсване на транскрипцията чрез формиране на терминаторна структура. Когато ТПФ не присъства по време на синтеза в средата, в 5'-НТР анти-терминаторни структури не пречат на генната експресия. Този механизъм на регулация на генната експресия се наблюдава при *B. subtilis*, където лидерът *tenA* контролира полицистронния локус *tenA* – *goxB*-*thiSGF*-*yjbV*. Превенцията на транслацията се наблюдава в *Escherichia coli* (*E. coli*).

А ТПФ рибопревключвател



Б ТПФ рибопревключвател

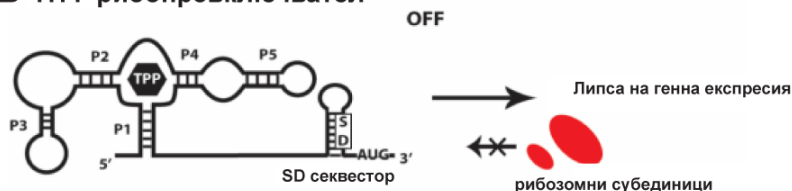


Фигура 23. Регулация на генна експресия чрез терминация на транскрипцията от ТПФ рибопревключвател. **А.** В отсъствие на ТПФ по време на синтез на 5'-НТР (ON), се образува анти-терминатор, който не пречи на генната експресия (*tenAI*-*goxB*-*thiSGF*-*yjbV* полицистронен локус). **Б.** В присъствие на ТПФ (OFF), свързането му с аптамерния домен води до терминация на транскрипцията.

А ТПФ рибопревключвател



Б ТПФ рибопревключвател



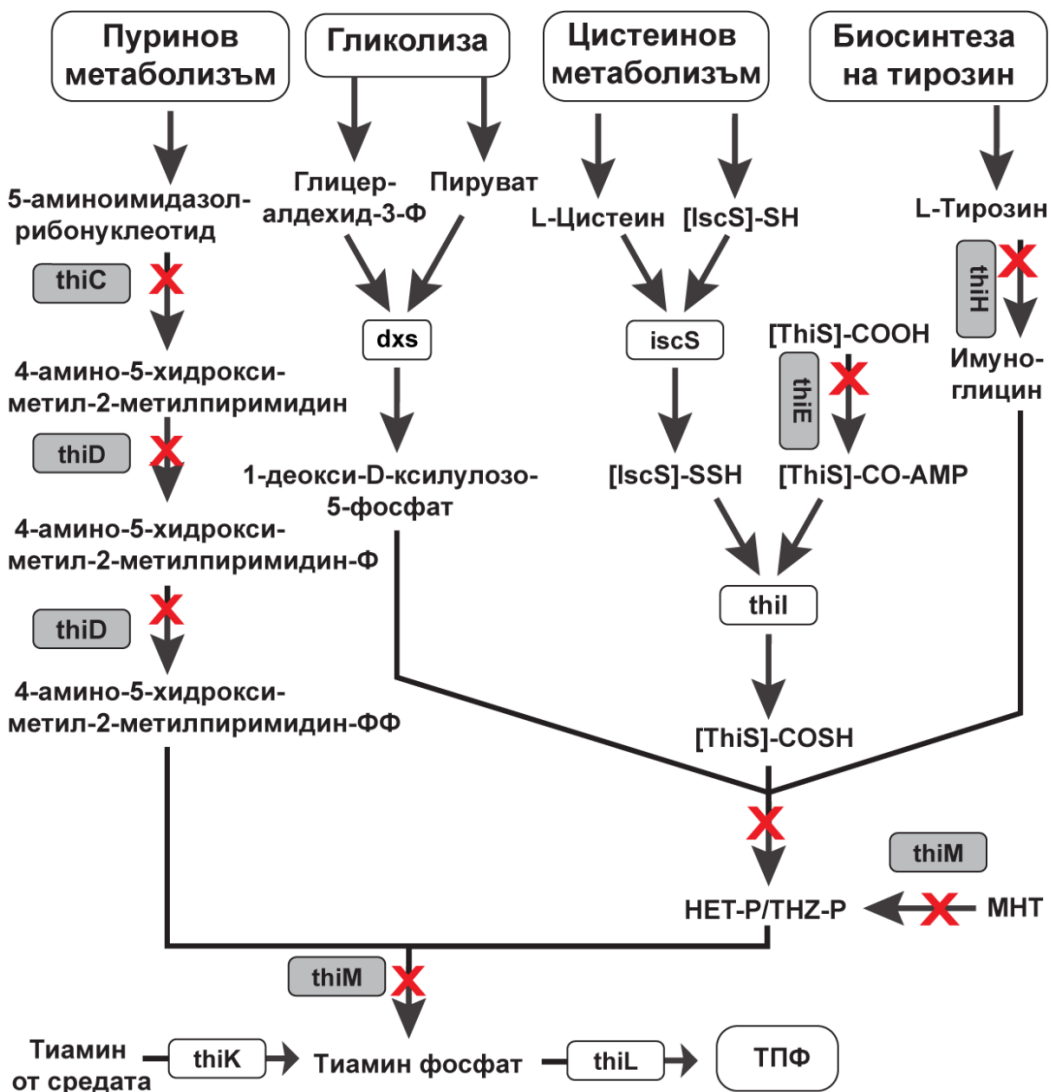
Фигура 24. Регулация на генната експресия чрез превенция на транслацията от ТПФ рибопревключвател. А. В отсъствие на ТПФ (ON), се образува структура анти-секвестор, която не повлиява генната експресия и рибозимата може да се свърже с Шайн-Далгарно (SD) последователността и да иницира транслацията на белтъците от thiCEFSGH-thiMD-thiBPQ полицистронния локус. **Б.** В присъствието на ТПФ (OFF), той се свързва с рецептора в аптамера и стабилизира P1 ствола. Това стабилизиране позволява образуването на структура (SD секвестор), която блокира свързването на рибозимата с Шайн-Далгарно (SD) последователността.

Витамин В1 е основен коензим, който се синтезира чрез свързване на пиримидинови (хидроксиметилпиримидинови, НМР) и тиазолови (хидроксиетилтиазолови) части в бактерии. Разнообразие от синтетични ТПФ аналози са използвани за изучаване и анализиране на всички взаимодействия между лигандата и рибопревключвателя. Пиримидин-чувствителната спирала на thiM разпознава и свързва ТПФ чрез разпознаване на Н-свързващия донор и приема аминоксипиримидиновия пръстен. Рибопревключвателя също така усеща специфично ТПФ въз основа на формирането на π -взаимодействията. Тиазолиевият пръстен на ТПФ е много важен за специфичното разпознаване от рибопревключвателя. Пирофосфатната част е от значение за свързващия афинитет (субмикромоларен)(112).

Тиаминът е един от клетъчните метаболити, способни да регулират собственото си производство чрез директно свързване към регулаторните области напред (upstream) по посока на thiC и thiM в рамките на полицистронни иРНК в *E. coli*. Без тиамин бактериите не могат да оцелеят. Суперпътят на биосинтез I на тиамин дифосфат в *E. coli*

включва няколко пътища: биосинтез на тиамин дифосфат-I (thiamine diphosphate biosynthesis I), тиамин salvage II, тиаминови, тиамин фосфатни и тиамин пирофосфатни пътища. HET и HMP се регулират от thiBPQ ABC транспортер и thiMD оперон в *E. coli*. HMP киназата (thiD) катализира превръщането на хидроксиметилпиримидин в HMP-P и впоследствие този ензим катализира превръщането на HMP-P в HMP-PP. Освен това, хидроксиетилтиазол киназата (thiM) катализира АТФ-зависимо фосфорилиране на 4-метил-5-(β -хидроксиетил) тиазол, за да се получи 4-метил-5-(β -хидроксиетил) тиазол фосфат. Тиамин киназата (thiK) катализира фосфорилирането на хидроксилната група на тиамин (Фигура 4). Този ензим е спасителен ензим (salvage enzyme) и позволява на клетката да използва рециклиран тиамин като алтернатива на неговия синтез *de novo*. Той не се контролира от ТПФ рибопревключвателя.

Вземайки под внимание всичко описано до тук, заключаваме, че биосинтетичният път на тиамин може да бъде разрушен чрез блокиране на тиамин фосфат синтаза (ThiE), която се контролира от ТПФ рибопревключвателя и тиамин киназата (ThiK). Ако тези два пътя са блокирани, клетката няма да може да оцелее (Фигура 25). Открити са бактерии, в които ТПФ рибопревключвателя контролира не само биосинтезата на ТПФ, а също и транспортния белтък (113). В тези случаи, рибопревключвателят може да бъде отнесен към предходната категория с най-подходящите рибопревключватели-мишени. При човешкия бактериален патоген *Treponema denticola*, който се открива в устната кухина, липсва път на биосинтеза *de novo* на тиамин трифосфат и той се нуждае от екзогенен ТПФ за да расте. Предполага се, че бактериите получават екзогенен ТПФ заедно с транспорта на тиамин. Те идентифицират генния клъстер, който кодира ТПФ ABC-преносителя с ТПФ-свързващия белтък TDE0143, трансмембранната пермеаза TDE0144 и АТФазата TDE0145. Трите гена са ко-транскрибирани и нагъват оперона *tbrABCtd*, който се иницира от σ^{70} -подобен промотор. В своите експерименти J. Vian и колектив показват, че нивото на експресия на *tbrABCtd* се регулира отрицателно от извънклетъчния ТПФ и се медуира от ТПФ-чувствителния рибопревключвател Tdthi-box (113).



Фигура 25. Биосинтетичен път на тиамин пирофосфат в *E. coli* K-12 субстрат MG1655. Известните реакции и биохимични пътища са показани с линии със стрелки. Ензимните етапи, катализирани от ТПФ генни продукти, са показани в сиво. Тиаминов фосфат се образува чрез свързване на НМР-РР и НЕТ-Р. Пиримидиновата част на тиамин, НМР-РР, се синтезира от аминокимдазол риботид (AIR, АИР). Тиазоловата част на тиамин в *Escherichia. coli* е получена от L-тирозин, L-цистеин и 1-деокси-D-ксилоулозо-5-фосфат. Червените X-ве показват стъпките, които ще потиснат биосинтетичните и транспортните пътища на ТПФ, посредством регулиране на рибопревключвателя на риболовния ТПФ. Фигурата е направена от нас в Adobe Illustrator и е публикувана в Expert Opinion on Therapeutic Targets през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (59)

4.3.2.2 Глюкозамин-6-фосфатен рибопревключвател (GlmS рибопревключвател).

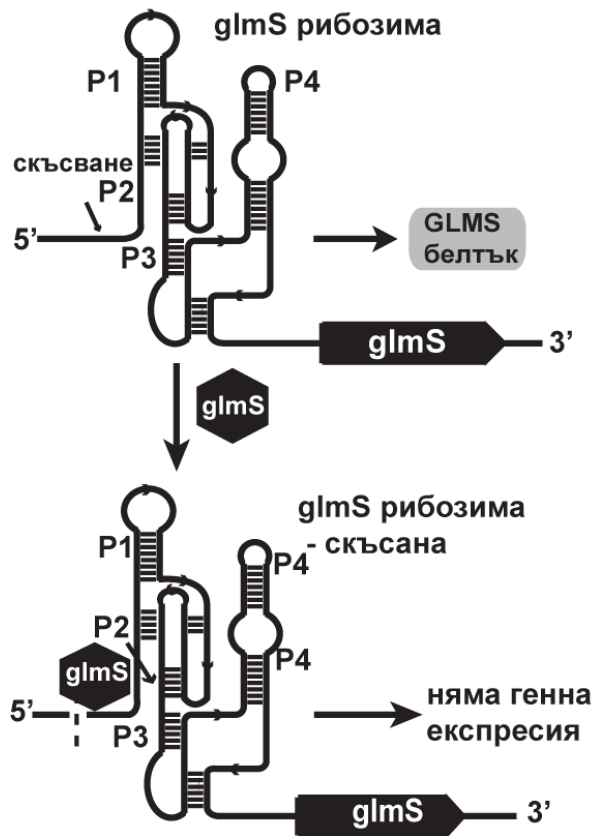
Глюкозамин-6-фосфатният рибопревключвател (GlmS рибопревключвател, glucosamine-6-phosphate riboswitch, GlmS riboswitch) е рибонуклеинова структура, разположена в 5'-НТР на гена, кодиращ глюкозамин-6-фосфат синтетаза в грам-положителни бактерии (114). Той е едновременно рибозима и рибопревключвател. GlmS рибопревключвателят се открива в 26 вида патогенни бактерии, причиняващи инфекциозни заболявания като антракс, ботулизъм, листериоза и менингит (Таблица 5). Тези заболявания изискват сериозно медицинско лечение. Глюкозамин-6-фосфат рибопревключвателят се открива в 920 вида бактерии според база данни Rfam. Шест вида от споменатите бактерии, в които той се открива са патогенни за човека. Те присъстват в списъка на приоритетите на СЗО за откриване на нови антибиотици.

Структурата на рибопревключвателя GlmS е установена чрез рентгено-структурен анализ (Фигура 13) (84). Той представлява двукомпонентна рибозима, в която молекулата на glmS лиганда се свързва с каталитичното ядро на рибозима, индуциращо саморазцепване, и експресионна платформа, регулираща генната експресия чрез дестабилизиране на иРНК (115). Глюкозамин-6-фосфатният рибопревключвател е първата каталитична РНК, открита в природата, която се активира от малка молекула, служеща като кофактор (116, 117).

Метаболитът глюкозамин-6-фосфат е от важно значение за синтеза на клетъчната стена при бактериите. Той участва в Гликолизата. В резултат на неговото свързване към каталитичния център на рибопревключвателя глюкозамин-6-фосфат, настъпват леки конформационни промени, довеждащи до самоскъсване на точно определено място предхождано от дестабилизиране на иРНК (118). Глюкозамин—фосфатният рибопревключвател контролира генната експресия чрез самоскъсване (108), (119) Това самоскъсване е показано на Фигура 26.

Shuller и Колектив демонстрират за първи път антибактериалната активност на карба- α -D-глюкозамин (CGlcN) *in vivo* (120). Принципът на действие на карба-съединението, действащо върху GlmS рибопревключвателя/рибозима (Фигура 1), предоставя доказателство, че CGlcN-медираното инхибиране на растежа се дължи на глюкозамин-6-фосфатното активиране и възбуждане за самоскъсване. В началото авторите анализират влиянието на CGlcN върху бактериалния растеж. След това те инкубират *Bacillus subtilis* 168 в присъствието на нарастващи концентрации на карба- α -

D-глюкозамин. Въз основа на оптичната плътност, кривите на растежа показват, че CGlcN инхибира бактериалния растеж по начин, свързан с концентрацията, започвайки с 150 μM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Карба- α -D-глюкозаминът е насочен към ендogenous път на активация и следователно използва пролекарствен механизъм (120).

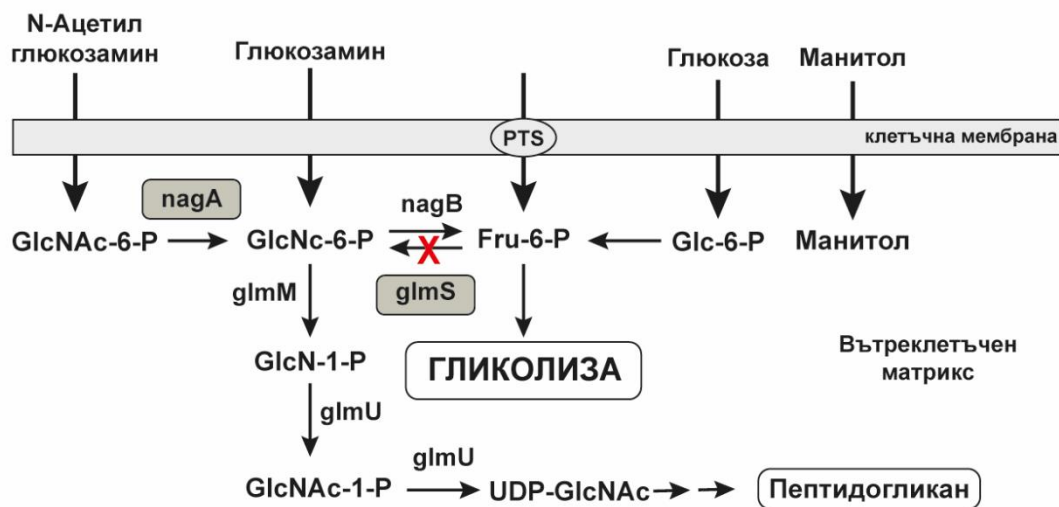


Фигура 26. Регулация на гена експресия чрез рибупревключвател-медирано дестабилизиране на иРНК.

Глюкозамин-6-фосфатният рибупревключвател е уникална метаболит-чувствителна рибозима, откривана в 5'-НТР на иРНК, кодираща ензима глутамин-фруктозо-6-фосфат аминотрансфераза в някои човешки патогенни бактерии. Тази рибозима осъществява самоскъсване в присъствието на глюкозамин-6-фосфат. **А.** В отсъствие глюкозамин-6-фосфат, *glmS* рибозимата е неактивна и ензимът глутамин-фруктозо-6-фосфат аминотрансфераза се експресира. **Б.** Рибозимата самоскъсва своята структура на

показаното място и по този начин дестабилизира *glmS* иРНК, като предотвратява транслацията на ензима глутамин-фруктозо-6-фосфат аминотрансфераза.

Глюкозамин-6-фосфатът заема централно място в синтеза на клетъчната стена и Гликолизата при бактерии. В началните етапи, водещи до образуването на пептидогликанов прекурсор, глюкозамин-6-фосфатът реагира последователно с уридин дифосфат-N-ацетилглюкозамин, докато влезе в пътя на Гликолизата, глюкозамин-6-фосфат изомеризиран чрез NagB до фруктозо-6-фосфат (Фигура 27). Блокирането на синтеза на глюкозамин-6-фосфат ще доведе до невъзможност клетъчната стена на бактериите да се образува. Това по всяка вероятност ще бъде смъртоносно за бактериалната клетка. Възможно е да се блокира този път, който може да доведе до образуването на глюкозамин-6-фосфат чрез ензима глутамин-фруктозо-6-фосфат аминотрансфераза. (Фигура 27). В лабораторията на доц. д-рРоберт Пенчовски вече са получени някои експериментални данни, които предполагат, че пътят на nagA не е достатъчен за снабдяване на бактериите с необходимото количество глюкозамин-6-фосфат.



Фигура 27. Инхибиране на синтеза на глюкозамин-6-фосфат. При едновременното блокиране на *GlmS* и *nagA*, контролирани от *GlmS* рибопревключвателя, ще се наблюдава блокиране на синтеза на глюкозамин-6-фосфат в бактерията. Със сива овална форма са отбелязани ензимите, които са под контрола на глюкозамин-6-фосфагния рибопревключвател. Фигурата е направена от нас в Adobe Illustrator и е публикувана в Expert Opinion on Therapeutic Targets през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (59).

4.3.2.3 Частично подходящи рибопревключватели за използване като антибактериални лекарствени мишени: Пуринов рибопревключвател и Кобаламинов рибопревключвател

Третата група рибопревключватели са частично подходящите рибопревключватели. Те синтезират ключови метаболити за бактериите. При бактериите, в които се откриват, се наблюдават един алтернативен или няколко алтернативни биосинтетични пътя на ключовия метаболит за бактерията, които не са под контрола на рибопревключвателя. В този случай, трябва да се инхибира не само функцията на рибопревключвателя, но и алтернативните биосинтетични пътища в бактерията.

От осемте избрани и анализирани рибопревключвателя, Пурновият и Кобаламиновият рибопревключвател регулират синтеза на аденин, гуанин и витамин В12, които са важни, есенциални метаболити. В представителите, в които се откриват рибопревключвателите се наблюдават алтернативни метаболитни пътища за синтез на тези метаболити, които не са под контрола на рибопревключвателите.

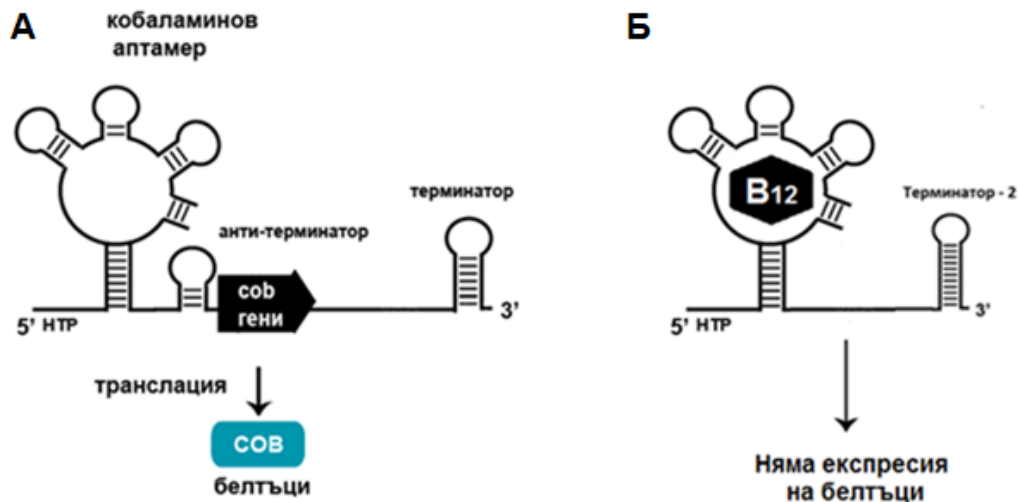
4.3.2.3.1 Кобаламинов рибопревключвател

Кобаламиновият рибопревключвател (Кобаламин рибопревключвател, Cobalamin riboswitch) е цис-регулаторен елемент, намиращ се в 5'-НТР на свързаните с витамин В12 гени в бактерии, водещо до регулация и контрол на конкретен белтък (121).

Кобаламиновият рибопревключвател е изграден от аптамерна част и експресионна платформа. Аптамерната част е метаболит-свързващата част, чиято структура служи като прецизен сензор за откриване на специфични метаболити – в случая Витамин В12. Алостеричното прегрупиране в иRNA структурата се медуира чрез свързване на лиганда (Фигура 7). Кобаламиновият рибопревключвател се среща при 5174 вида, 36 вида от които са човешки патогени (Таблица 1, Таблица 2). Рибопревключвателят Кобаламин регулира генната експресия чрез превенция на трансляцията (Фигура 28) и терминация на транскрипцията (Фигура 28).

Рибопревключвателят се намира в 5'-НТР на иРНК, която кодира белтъци, отговорни за биосинтеза на Витамин В12 в гени на бактерии - *cob*. В отсъствието на Витамин В12 в средата аптамерната част на рибопревключвателя се нагъва в структура, позволяваща образуването на анти-терминатор и не позволява образуването на терминатор в близост до 5'-НТР. Всички тРНКи транскрибират и синтезират белтъци,

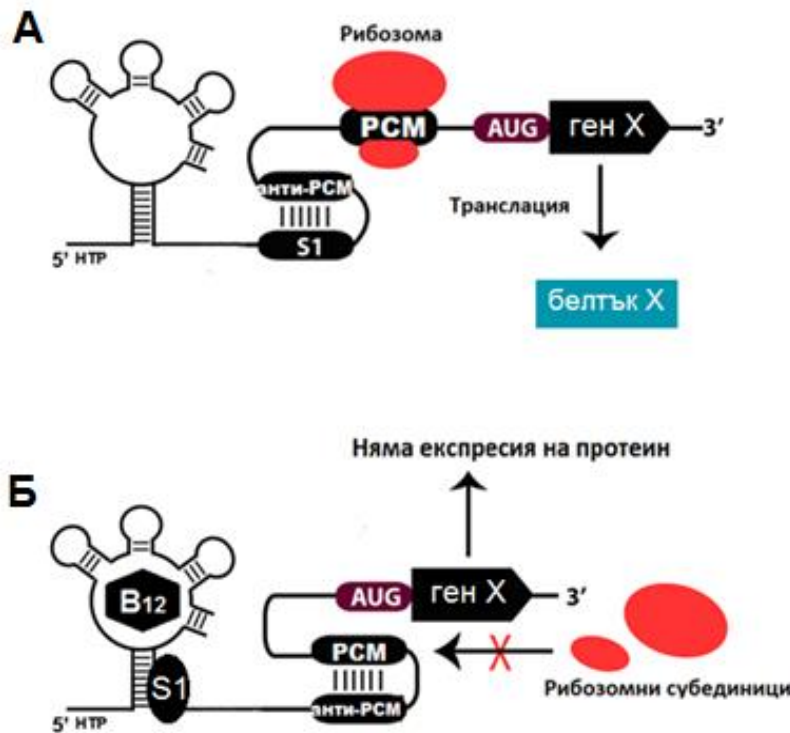
които участват в синтеза на Витамин В12. В присъствие на Витамин В12, аптамерът се свързва с лиганда и настъпват конформационни промени водещи до образуване на структура - терминатор в 5'-НТР. Следователно, транскрипцията на иРНК е преждевременно прекратена. В резултат на това не се синтезират ензими за биосинтеза на витамина в бактериите.



Фигура 28. Терминация на транскрипцията при бактерии посредством Кобаламиновия рибопревключвател. Рибопревключвателят се намира в 5'-НТР на иРНК, която кодира белтъци, отговорни за биосинтеза на Витамин В12 при бактерии. **А.** При липса на кобаламин в средата, аптамерът се нагъва в структура, позволяваща формирането на анти-терминатор и непозволяваща образуването на терминатор близо до 5'-НТР. Цялата иРНК се транскрибира и се синтезират белтъците, които участват в синтеза на витамин В12. **Б.** Когато витамин В12 присъства в средата, аптамерът се свързва с него и настъпва нагъване на структурата му, което улеснява образуването на терминатор в 5'-НТР. Впоследствие, транскрипцията на иРНК е преждевременно терминирана. В резултат на това, не се произвеждат ензими за биосинтеза на Витамин В12 в бактерията.

Кобаламинът регулира генната експресия и по втори начин - чрез превенция на транскрипцията. В отсъствие на кобаламин, мястото за свързване на рибозомата (PCM, RBS) е достъпно за малката рибозомна субединица. Тя се свързва с иРНК, за да инициира транслацията на "X1 белтъка". "X1" може да носи много имена, защото за отделните бактерии ензимите, участващи в синтеза на кобаламин, се наричат по различен начин. Когато кобаламин присъства в клетката, той се свързва с аптамера на кобаламиновия

рибопревключвател. Това свързване води до конформационна промяна, която прави възможна хибридизацията на РСМ с антисенс-РСМ- последователност. По този начин, РСМ става недостъпно за свързване на малката рибозомна субединица. В резултат, иРНК не може да се транслира. Наблюдава се транслационен контрол.



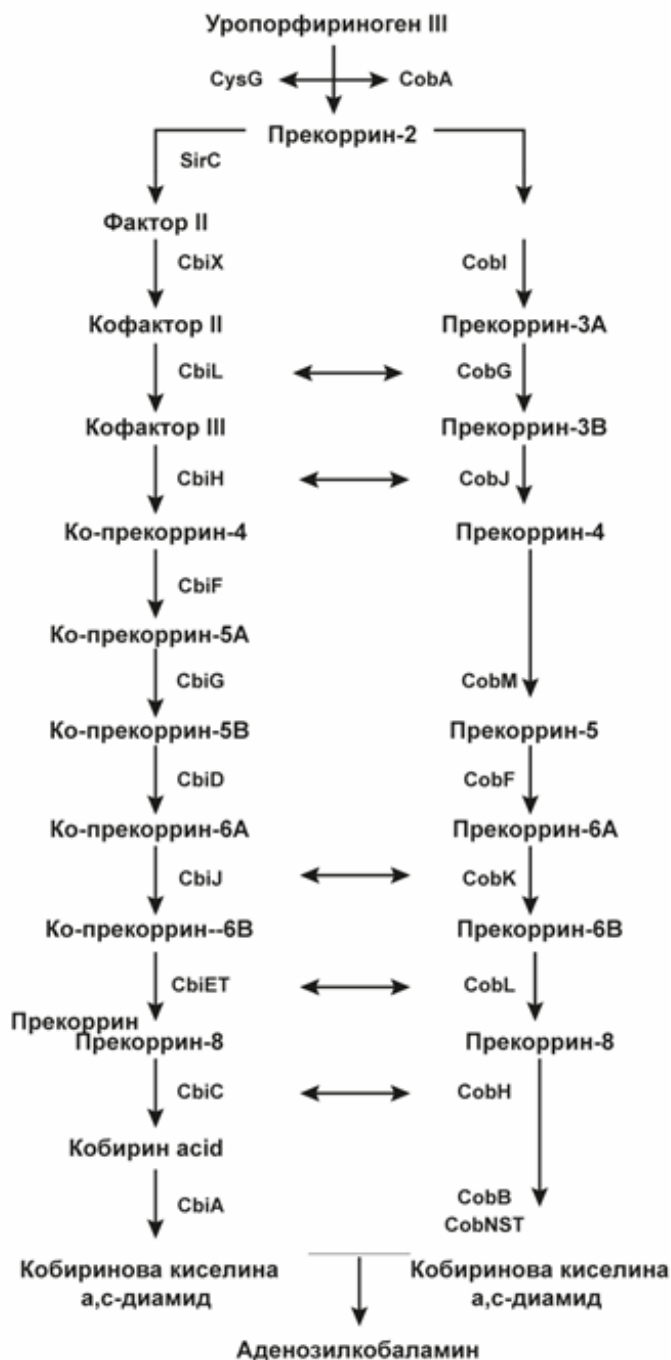
Фигура 29.
Регулация на генната експресия чрез транслационен контрол от кобаламиновия рибопревключвател.

А. В отсъствие на Витамин В12, мястото за свързване на рибозомата (PCM, RBS) е достъпно за малката рибозомна субединица. Тя се свързва с иРНК, за

да започне транслацията на белтъка X1. X1 е примерно наименование, защото ензимите участващи в синтеза на витамина В12 са наречени по различен начин в различни видове бактерии. **Б.** Когато Витамин В12 присъства в клетката, той се свързва с аптамера на кобаламиновия рибопревключвател. Това свързване води до конформационна промяна, която прави възможна хибридизацията на РСМ с антисенс-РСМ-секвенция.

Кобаламинът се синтезира в два различни биохимични пътя в аеробни и анаеробни бактерии. Рибопревключвателят контролира различни гени в двата биохимични пътя. Част от синтезираните белтъци в анаеробния и аеробния метаболизъм на бактериите са подобни. Те имат хомоложност от 20 до 40% в кодиращите ги гени (Фигура 29). Примери за такива двойки хомоложни гени са CbiET-CobL, CbiA-CobV, Cbic-CobH, CbiJ-CibK, CbiL-CobI и CysG-CobA. Повечето патогенни бактерии обитават анаеробната среда, но има и представители, които се срещат върху епидермиса и са аеробни видове. Не всички стъпки от биосинтетичните пътища за кобаламин са контролирани от рибопревключватели. Следователно, за да се получи инхибиране на

растежа и /или размножаването на двата типа бактерии, аеробните и анаеробните пътища за синтеза на кобаламин в бактериалните клетки трябва да бъдат блокирани паралелно.



Фигура 30. Аеробен и анаеробен биосинтетичен път на Кобаламин рибопревключвателя.

Представени са основни превръщания, през които изходното съединение преминава в образуването на Витамин Б12. Двата биохимични пътя са паралелни. Между ензимите от двата биосинтетични пътя има двупосочни стрелки. Те отразяват хомоложност от 20% до 40% между гените, кодиращи ензимите. Фигурата е направена от нас в Adobe Illustrator и е публикувана в Expert Opinion on Therapeutic Targets през 2019, след което е преведена и приложена в настоящата Докторска дисертация (59).

4.3.2.3.2 Пуринов рибопревключвател

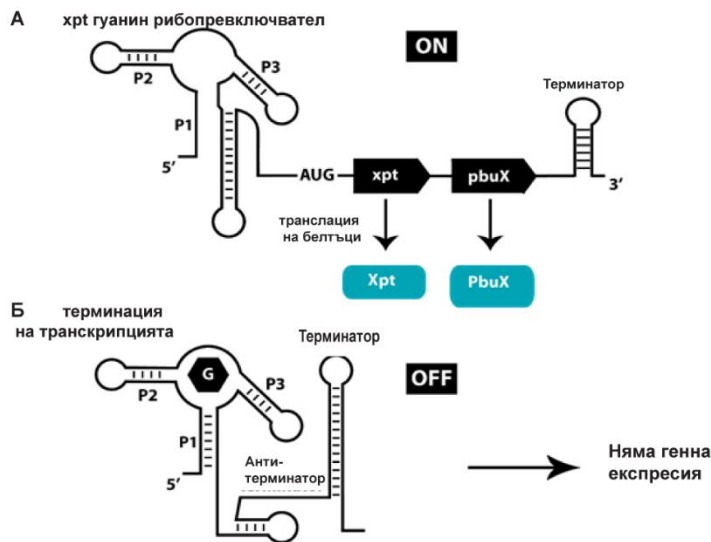
Пуриновите рибопревключватели (Пуринов рибопревключвател, Purine riboswitch, Adenine riboswitch, Guanine riboswitch) са последователности от рибонуклеотиди в определена иРНК, които селективно разпознават и свързват пуринови лиганди – аденин

и гуанин. В групата на пуриновите рибопревключватели са включени аденин-чувствителни рибопревключватели и гуанин-чувствителни рибопревключватели. Те са открити предимно в бактерии. Открити са в общо 985 вида, от които 962 вида са бактерии (Таблица 1). От тях, 17 вида са човешки патогенни бактерии. Три от 17-те вида бактерии са включени в списъка на СЗО, за които са необходими спешно нови антибактериални агенти (Таблица 2).

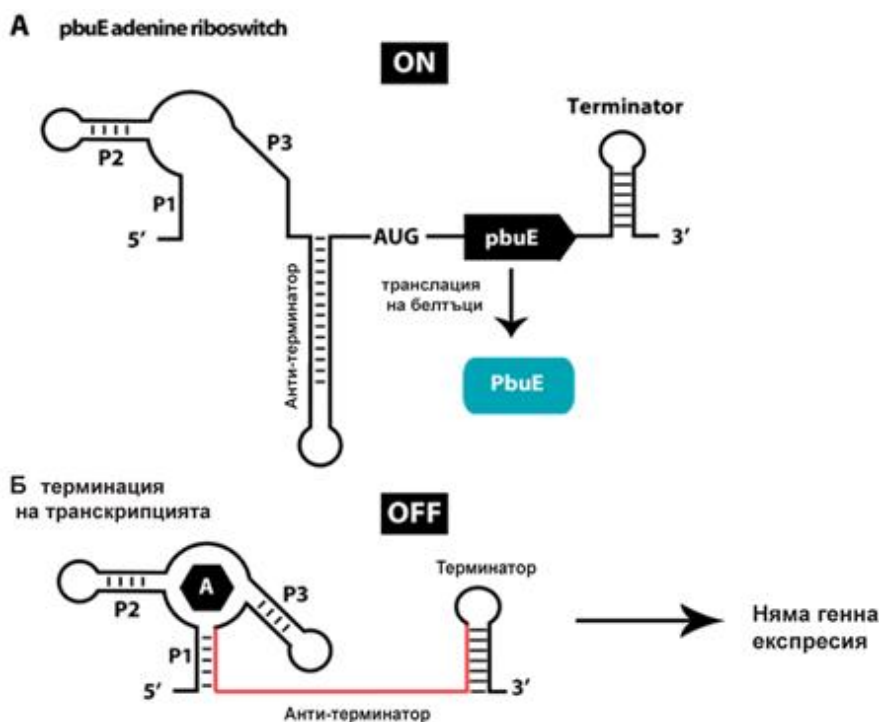
Пуриновите рибопревключватели са РНК структури, регулиращи биосинтеза на белтъците, които улесняват Пуриновия метаболизъм (122). Гуаниновите и адениновите аптамерни части са идентични с изключение на единична нуклеотидна разлика в 74 позиция, която води до лигандната специфичност (Фигура 11). Промяната на почти всяка функционална група върху пуриновия хетероцикъл води до значителна загуба на афинитет на свързване, което показва, че целият лиганд взаимодейства с иРНК. В литературата се откриват данни за аналог на гуанина, известен като 6-N-хидроксиламинопурин или G7, който е предназначен за селективно прицелване към гуаниновите рибопревключватели и може да инхибира растежа на *B. subtilis* (123).

Двата най-проучвани пуринови рибопревключвателя са рбуЕ за аденин и хрт за гуанин. Фигури за регулацията, която те осъществяват, представяме по-долу (Фигура 30 и Фигура 31). Генът рбуЕ кодира ефлуксна помпа за пуриновите бази. Хрт генът кодира специфичен ксантин-фосфорибозил трансферазен белтък, който участва в Пуриновия метаболизъм. Хрт гуаниновият рибопревключвателен аптамер се стабилизира с гуанин по начин, който позволява на рибопревключвателя да свързва по-лесно магнезий. Настъпват конформационни промени, довеждащи до нагъването на иРНК. По този начин генът хрт престава да се транслира (Фигура 30) (124).

Гуаниновият рибопревключвател контролира много оперони, които трябва да бъдат потиснати. Едно скорошно проучване показва, че многократните опити за премахване на purR-операона изцяло в хрт-рбуХ, рбуG, purG троен нокаут шам (triple knockout strain) са неуспешни. Едновременното потискане на всички тези генни продукти може напълно да инхибира бактериалния растеж. Антимикробният гуанинов аналог (6-N-хидроксиламинопурин, G7) се насочва избирателно към гуаниновите рибопревключватели и свързвайки се с тях да инхибира растежа на *B. subtilis*. Към настоящия момент, *Bacillus subtilis* е бактерия, за която не е известно да причинява заболяване, и следователно ефикасността на антимикробните съединения, които са насочени към рибопревключватели при видове патогенни бактерии, трябва да бъдат оценени, за да се установи допълнително клиничното предназначение.



5'-НТР (GENE ON) се формира анти-терминаторна структура, която не влияе върху генната експресия на xpt-pbuX оперона. **Б.** Ако в клетката има гуанин (GENE OFF), той се свързва с рецептора и стабилизира стълба P1, който позволява образуването на терминаторна структура.



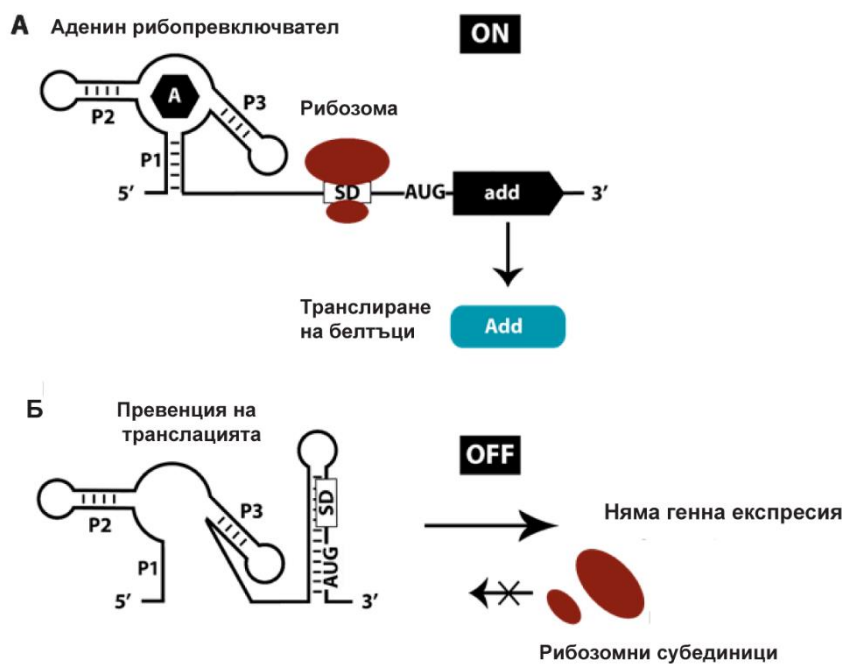
пречи на експресията на pbuE гена. **Б.** В присъствие на аденин (GENE OFF), той се свързва с рецептора и стабилизира стълба P1, довеждащо до образуването на терминатор. В червено е показана разгънатата анти-терминаторна позиция в експресионната платформа.

Фигура 31. Терминация на транскрипцията при *Bacillus subtilis* посредством xpt гуанин-чувствителния рибопревключвател. **А.** Когато не присъства гуанин в клетката по време на синтеза на the

Фигура 32. Терминация на транскрипция в *Bacillus subtilis* от аденин-чувствителния рибопревключвател pbuE. **А.** Когато аденин не присъства по време на синтеза в 5'-НТР (GENE ON) се формира анти-терминаторна структура, която не

Генът *added* кодира аденозин деаминаза. Адениновият рибопревключвател upstream представя стартовия кодон и Shine-Dalgarno последователността в присъствието на аденин. Това води до транслацията на аденозин деаминаза чрез метаболитен механизъм с отрицателна обратна връзка, който регулира количеството аденин, синтезиран в клетката. По същия начин, *rbuE* генът кодира ефлуксна помпа. Свързването на аденин с *rbuE*-адениновата рибопревключвател разрушава структурата на терминатора, който преди това е блокирал достъпа до експресионната платформа. По този начин присъствието на аденин може да повиши ефлукса на аденин от клетката.

Грам-отрицателните бактерии осъществяват регулирането на генната си експресия посредством превенция на транслацията. Грам-положителните бактерии регулират генната си експресия чрез терминацията на транскрипцията. Някои пуринови рибопревключватели използват механизъм за термиране на транскрипция/антитерминация за регулиране на генната експресия.



Фигура 33.

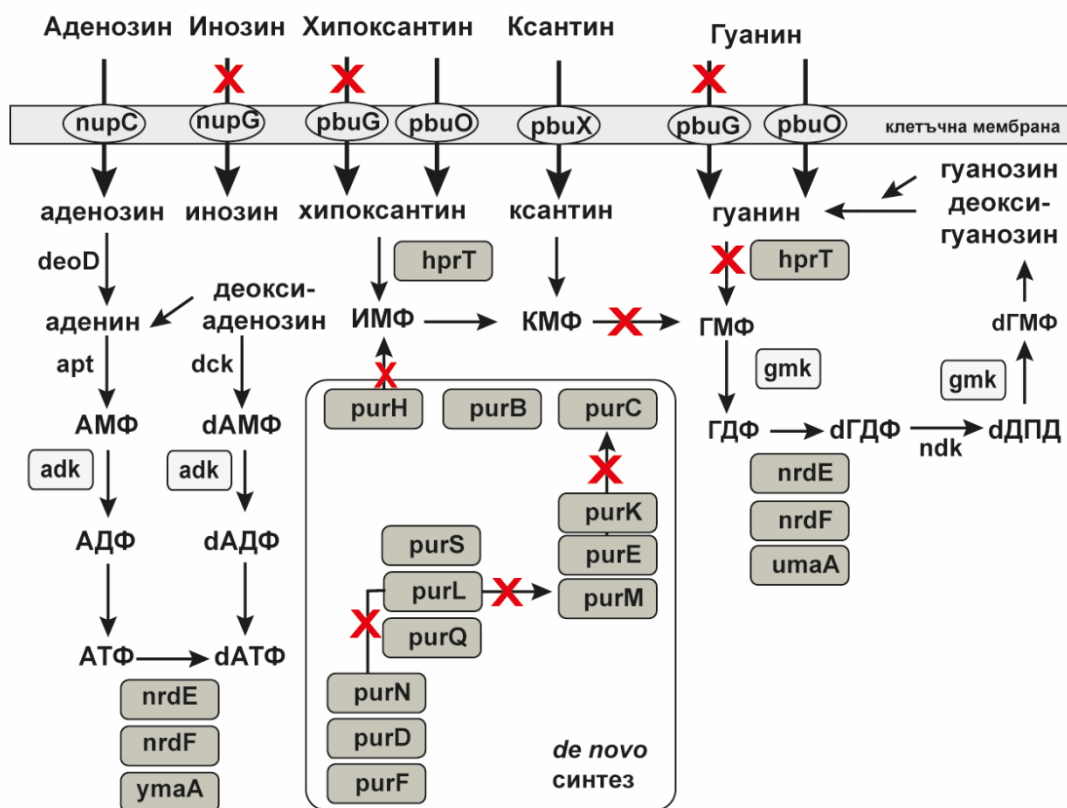
Превенция на транслацията от Add аденин-чувствителен рибопревключвател в *Clostridium perfringens*.

А. Когато аденинът присъства в свързващия джоб (GENE ON), адениновият рибопревключвател, който е разположен upstream, излага

началния кодон на гена и последователността на Shine-Dalgarno (SD), позволявайки транслацията на *add*. **Б.** В отсъствие на аденин (GENE OFF), се образува структура, подобна на ствол, която отделя последователността Shine-Dalgarno (SD) и не се осъществява генна експресия.

Пурините играят важна роля в нуклеотидния синтез и репликацията на ДНК. Те са компоненти в жизнено важни биомолекули като АТФ, ГТФ, цикличен АМФ, НАДН и коензим Аденинът и гуанинът са биологично синтезирани като нуклеотиди и по-специално като рибозиди, т.е. бази, прикрепени към рибозо-5-фосфат. Съществуват алтернативни биохимични пътища за синтез на аденин и гуанин, които не са под контрола на рибопревключвателите (Фигура 33).

За да бъдат използвани пуриновите рибопревключватели като мишени за антибактериални агенти, могат да се приложат няколко стратегии. Първата е свързана с регулация на *adk*. Генът *adk* контролира синтеза на Adk - аденилат киназа, която е фосфотрансферазен ензим, катализиращ интерконверсията на аденинови нуклеотиди и играе важна роля в клетъчната енергийна хомеостаза. Втория вариант за регулация е репресията на *gmk* гена, който кодира Gmk - гуанилат киназата. Тя представлява ензим, който катализира АТФ-зависимото фосфорилиране на ГМФ. Третият начин е репресията на *purB* гена (част от *purR* оперона, контролиран от гуаниновия рибосвича) и *art* гена. PurB - аденилосукцинат лиаза (ASL) е ензим, който катализира две реакции в *de novo* Пуриновия биосинтетичен път. ASL разделя сукциниладенозин монофосфат (SAMP) на аденозин монофосфат (АМФ) и фумарат. ASL е важен за клетките, защото участва в синтеза на пурины, които са необходими за клетъчната репликация. Той помага да се регулират метаболитните процеси чрез контролиране на нивата на АМФ и фумарат в клетката. Art, аденин фосфорибозилтрансферазата, е ензим, участващ в пътя на спасяване на пуриновите нуклеотиди. Той функционира като катализатор за реакцията между аденин и фосфорибозилпирофосфат (PRPP) за образуване на АМФ. Последният възможен вариант за инхибиране, който предлагаме е инхибирането на *hprT* и *guaA* гените. HprT, хипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазата (HGPRase) функционира основно в спасяване на пурины от разградена ДНК за повторно въвеждане в пуринови синтетични пътища. Тя катализира реакцията между гуанин и фосфорибозил пирофосфат (PRPP) за образуване на ГМФ, или между хипоксантин и фосфорибозил пирофосфат (PRPP) за образуване на инозин монофосфат (IMP). GuaA, ГМФ синтаза (GMPS), е ензим, който превръща ксантозин монофосфат (XMP) в гуанозин монофосфат (ГМФ, GMP).



Фигура 34. Пуринови метаболитни пътища в *Bacillus subtilis*. Червените кръстове показват биосинтетични пътища на АМФ и ГМФ, които ще бъдат потиснати ако бъде блокиран Пуриновия рибопревключвател. Фигурата е създадена с Adobe Illustrator. Публикувана е в Expert Opinion on Drug Targets през 2019г. от нас и е преведена на български език за да бъде приложена и да онагледява настоящата Докторска дисертация (59).

4.3.2.4 Неподходящи рибопревключватели за използване като антибактериални лекарствени мишени – САХ рибопревключвател

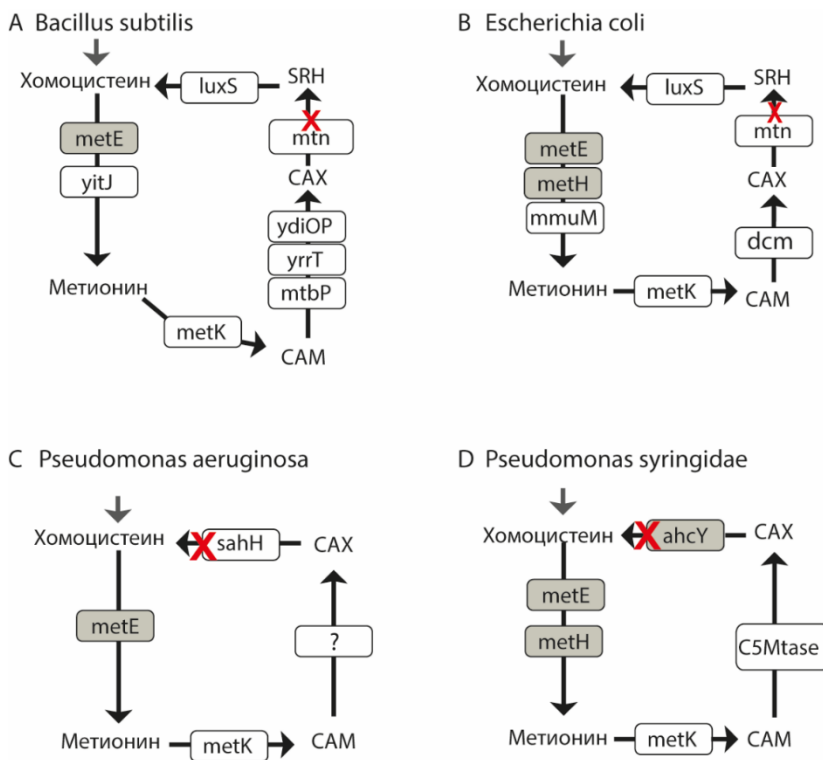
Единственият от подбраните и допълнително анализирани осем рибопревключвателя, който причислихме към групата на неподходящите рибопревключватели за антибактериални лекарствени прицелни мишени е S-аденозилхомоцистеновият рибопревключвател. Той не контролира синтеза на важен за клетката метаболит, а контролира разграждането му.

4.3.2.4.1 S-аденозилхомоцистенов рибопревключвател

S-аденозилхомоцистеновият рибопревключвател (САХ рибопревключвател, SAH riboswitch) разпознава и свързва хомоцистеин в своята аптамерна част (Фигура 35). Метаболитът САХ се получава, в следствие на метилиране на САМ.

САХ рибопревключвателят се открива в 687 вида организми, от които 668 вида са бактерии. От тях 8 вида са патогенни бактерии (Таблица 1 и Таблица 2). Три от 8-те вида патогенни бактерии са включени в списъка на СЗО за бактерии, срещу които спешно трябва да се създадат или открият нови антибиотици.

Мотивът на САХ е силно консервативен в последователност и структура. Той се открива в 50 регулаторни конфигурации в гени, свързани с метаболизма на САХ, преимуществено в β - и някои γ -протеобактерии, и особено в род *Pseudomonas*. В ahcY иРНК на бактерията *Pseudomonas syringae*, при свързване на метаболит с аптамера на САХ рибопревключвателя, той преодолява структурните промени и активира експресията на низходящия (downstream) ген *in vivo*. САХ аптамерът образува чувствителният компонент на САХ-свързващите рибопревключватели. Ако високите нива на САХ в бактерията са токсични, потискането на специфичните гени в САХ цикъла трябва да повиши токсичността, което би довело до клетъчна смърт. Това към момента не е лабораторно тествано.



Фигура 35: Рибопревключвателят САХ при четири бактерии.

А. *Bacillus subtilis*. Репресия на *mtn*. Генният продукт *Mtn* е аденозилмоцистеинова нуклеозидаза, участваща в метаболизма на метионин, катализираща реакцията: S-аденозил-L-хомоцистеин + H₂O ↔ (5-деокси-D-рибос-5-ил) -L-хомоцистеин + аденин. *Mtn*-генът не се контролира от САХ рибопревключвателя, но може да потисне растежа на *Bacillus subtilis*.

Б. *Escherichia coli*. Репресия на *mtn*.

В. *Pseudomonas aeruginosa*. Репресия на *sahH*. *SahH* генният продукт аденозилхомоцистеиназа е ензим, който катализира химичната реакция: S-аденозил-L-хомоцистеин + H₂O ↔ L-хомоцистеин + аденозин. *SahH* генът не се контролира от САХ рибопревключвателя, но може да потисне растежа на *Pseudomonas aeruginosa*.

Г. *Pseudomonas syringidae*. Репресията на *ahcY*. Генният продукт на *AhcY* е аденозилхомоцистеиназа и катализира същата химична реакция, както е описано в примера за *Pseudomonas aeruginosa*. Единствената разлика е, че *ahcY* се контролира от САХ рибопревключвателя.

5. ОБСЪЖДАНЕ

Една от най-неотложните здравни теми според СЗО, на която учените отделят внимание и полагат ежедневен труд, е създаването на нови антибактериални лекарства. То е необходимо поради огромния брой на резистентните към антибиотици щамове човешки патогенни бактерии, причиняващи инфекции и водещи до продължителен болничен престой, усложнен здравен статус и увеличаване на смъртността при хората в световен мащаб.

За да бъде намален непрекъснато нарастващият брой на антибиотик-резистентните бактерии, трябва да бъде намалена употребата на антибиотици под формата на хапчета, суспензии и дори кремове. По този начин ще се ограничи непрекъснатата безразборна експозиция на бактериите с антибиотичите. Силно положителен ефект би имало и внедряването на задължителни микробиологични изследвания като антибиограми, които да дадат предварителен отговор дали конкретният бактериален щам ще се повлияе от предписаните антибиотици, още преди те да бъдат употребени от пациента. Така неуспешното лечение на инфекциозните заболявания ще се намали и няма да се налага прием на един, а след това втори или трети вид антибиотик, както и няма да има необходимост от удължаване на курса на конкретен антибиотик за да се достигне до желанния резултат. Друга добра практика, която трябва да бъде широко приложена е популяризирането и приложението на антибактериалните програми за ваксинация. Разработването на нови антибиотици, които могат да се справят с мултирезистентните бактериални патогени е спешно и критично необходимо.

Към настоящия момент е доказано, че различни типове РНК са подходящи за използване като антибактериални лекарствени цели. В много антибактериални лекарства, които днес се предлагат, предписват и продават в аптечната мрежа, свързването на лиганда към целевата РНК е по-скоро случайно взаимодействие, отколкото селективна функция на тези РНК. Селективната функция, която рибопревключвателите (генни регулаторни елементи, разположени в 5'-НТР на иРНК) притежават може да бъде използвана за антибактериални цели. Рибопревключвателите са изключително чувствителни, разпознават и свързват в аптамерната си част специфични малки молекули в клетката. Тези молекули могат да бъдат най-разнообразни лиганди - коензими, сигнални молекули, йони, аминокиселини и др. За всеки отделен рибопревключвател лигандите, които той разпознава и свързва са строго специфични.

Рибопревключвателите са молекулни сензори. Свързвайки специфичния си лиганд, те регулират експресията на жизненоважни метаболити за бактерията. Любопитен факт е, че в Грам-отрицателни бактерии рибопревключвателите регулират генната експресия чрез превенция на траслацията, докато в Грам-положителните бактерии благоприятстват терминацията на транскрипцията. Съществуват много категорични преимущества при използването на рибопревключвателите като лекарствени мишени.

Бактериалните рибопревключватели са широко разпространени генетични контролни елементи, открити в над 6000 различни бактерии. Те се откриват както в Грам-положителни, така и в Грам-отрицателни бактерии. Някои от рибопревключвателите са представени в повече от една бактерия. Например, ТПФ рибопревключвателят се открива в 48 вида бактерии, ФМН рибопревключвателят в 41 вида бактерии, Кобаламин рибопревключвателят в 36 вида бактерии, Лизин рибопревключвателят в 25 вида човешки бактериални патогени. До този момент няма данни рибопревключвателите да са открити в човешкия геном.

Структурата на рибопревключвателите, механизмът на регулиране на генната им експресия и свързаните с тях метаболитни процеси са добре проучени. Рибопревключвателите не се срещат при бозайници. Това намалява риска от нежелани странични ефекти. Една от най-важните задачи на новите антибиотици е да бъдат безвредни за хората, без странични ефекти или причиняващи съвсем леки и поносими неразположения. Например, β -лактамните антибиотици са споменати като един от най-безопасните класове антибиотици, налични в болниците. По презумпция, те са безопасни, с изключение на ефектите, свързани със свръхчувствителност, потискане на костния мозък, прималяване и др. Доказано е, че нивото на използвания Рибофлавин „рег ос“ от диетата или чрез добавка много рядко предизвиква странични ефекти или токсичност.

Свободният рибофлавин, който не се превръща в ФМН или ФАД, се екскретира от бъбреците, оцветявайки урината в жълт цвят. Той също може да се секретира в извънклетъчните течности посредством преносител-транспортър. Това е силно окуражаващо за последващи проучвания по темата. От друга страна, страничният ефект може да бъде полезен или дори търсен за антибактериалното действие на съединението, което се насочва към рибопревключвателя. Например, S-аденозил-(L)-хомоцистеин във високи нива е токсичен за клетката.

Поради високата консервативност в части на своите аптамери, рибопревключвателите са изключително подходящи мишени за насочване и създаване на нови лекарства. Когато един рибопревключвател е представен в много бактерии с много по-близка консервативна последователност, той може да се използва като мишена за прицелване на антибиотици с широк спектър на действие. Допускаме на база предходните твърдения, че антибиотиците, които са насочени специфично към конкретен рибопревключвател, няма да имат токсичен ефект върху животните и човека.

С всичко описано до тук, потвърждаваме, че рибопревключвателите са подходящи мишени за насочване на нови рибопревключвател-чувствителни антибиотици. Освен прилики, рибопревключвателите имат свои особености. Точно те позволяват, след извършване на обширен биоинформатичен и геномен анализ, рибопревключвателите да се разделят на категории по пригодност за използването си като антибактериални мишени.

Според нашата класификация, има рибопревключватели, които са изключително подходящи за използване като антибактериални мишени. Те контролират генната експресия и респективно синтезирането на ключови метаболити за бактериите. Ако тези метаболити се внасят отвън в клетката, то рибопревключвателите регулират и генната експресия на белтъците преносители. При тях не се наблюдават алтернативни пътища за синтез на ключовия метаболит, които да не са под контрола на рибопревключвателя. Пример за много подходящи рибопревключватели са Флавиновият рибопревключвател, Лизиновият рибопревключвател и S-аденозин-метиониновият-I рибопревключвателят. Към всеки един от споменатите рибопревключвателя може да се насочи по един единствен рибопревключвател-чувствителен агент. Той ще се свърже от рибопревключвателя в аптамерната му част и ще блокира регулаторната му функция и по този начин ще инхибира синтеза на ключовия метаболит. Ако има транспортен белтък, който се контролира от рибопревключвателя трябва да се провери дали има консервативен мотив между рибопревключвателя контролиращ вътребактериалния синтез и този, който контролира синтеза на транспортния белтък. При наличие на такъв общ консервативен мотив, рибопревключвател-чувствителният агент - АСО или друг, може да бъде един и да се насочи към двата рибопревключвателя едновременно. Ако има сериозни различия в нуклеотидната им секвенция, които се покажат след множественото подравняване (multiple alignment), ще бъдат разработени два АСО, които ще инхибират паралелно рибопревключвателите, отговорни за синтеза на транспортния белтък и

вътребактериалния синтез на ключовия метаболит в конкретната бактерия или селекция от бактерии.

Във втората категория са тези рибопревключватели, които регулират синтеза на ключови метаболити, но при наличие на транспорт през мембраната на същия метаболит, той не се регулиран от тях. При тези рибопревключватели не се наблюдават биосинтетични пътища, които да са алтернативни и които да не са под контрола на рибопревключвателите. Примери за такива рибопревключватели са Тиамин пирофосфатният рибопревключвател и Глюкозамин-6-фосфатният рибопревключвател. Двата рибопревключвателя от осемте, на които извършихме обширен биоинформатичен и геномен анализ, са подходящи мишени за разработване на рибопревключвател-чувствителни антибактериални агенти. Има някои бактериални видове, при които ТПФ рибопревключвателя контролира и транспорта на ключовия метаболит, затова той би могъл да се причисли към предходната категория. За да се постигне бактериостатичен ефект е необходимо да се използват АСО, които да се насочат към рибопревключвателите, отговорни за синтеза и едновременно с това антибактериален агент, който да регулира транспорта на бактерията. В някои от случаите, внесените количества на метаболита не са достатъчни за продължи да живее пълноценно бактерията и се наблюдава бактериостатичния ефект.

В третата категория са частично подходящите рибопревключватели. В нея присъстват класове рибопревключватели, които регулират генната експресия на ключови метаболити за бактериите и едновременно с това не регулират белтъците транспортъори (при наличието на такива). Това, което ги отличава от останалите и ги прави частично подходящи е това, че при тях се наблюдават алтернативни пътища за синтез на същия ключов метаболит, които не са под техен контрол. По този начин насочвайки рибопревключвател-чувствителен агент (АСО), то той ще се свърже с рибопревключвателя и ще преустанови синтеза на метаболита, но няма да инхибира алтернативните пътища. Следователно, за да се постигне желаният антибактериален ефект, е необходимо да се провери дали количествата на алтернативно синтезирания метаболит ще бъдат достатъчни за да продължи да функционира бактерията. В тази категория са рибопревключвателите Пурин и Кобаламин. В двата случая трябва да се проведат задълбочени лабораторни експерименти и на практика да се провери до каква степен алтернативните им биосинтетични пътища компенсират блокирания рибопревключвател-регулиран синтез.

В четвъртата категория са рибопревключвателите, които не контролират биосинтезирането на ключови метаболити, а разграждането им и респективно имат алтернативни пътища за биосинтез на метаболити. Пример за такъв рибопревключвател е S-аденозилхомоцистеиновият рибопревключвател. Той регулират гените, участващи в рециклирането на САХ, за да се синтезира повече САМ. Той е изключително свързан със САМ рибопревключвателя. Високи нива от САХ в клетката са токсични. Това, че клетката не може да преодолее токсичността на САХ самостоятелно, при евентуално насочване на АСО към САХ рибопревключвателя, би могло да се използва като стратегия при потенциални лабораторни експерименти.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на извършения биоинформатичен и геномен анализ на рибопревключватели и свързани с тях биохимични пътища при видове човешки патогенни бактерии и използването им като мишени за създаване на нови антибактериални агенти и откритата информация и получените резултати – за разпространението на отделните рибопревключватели, направихме заключения за възможността рибопревключвателите да бъдат използвани като мишени за откриване на нови антибиотици и отправихме конкретни предложения за възможни стратегии на действие.

1. Извършихме биоинформатичен анализ за разпространението на 28 рибопревключвателя.

1.1 Установихме, че те се откриват в трите Домена - Бактерии, Археи и Еукариоти. Установихме, че рибопревключвателите са открити в над 6000 различни Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии. До този момент, рибопревключвателите не са открити в човешкия геном.

1.2 Установихме броят видове, в които се откриват рибопревключвателите и го представихме в табличен вид (Таблица 1). ТПФ е най-широко разпространеният бактериален рибопревключвател. Той се открива при повече от 6200 вида. Кобаламиновият рибопревключвател се открива в над 5000 вида, а ФМН рибопревключвателят в над 3200 вида.

1.3 Установихме броят бактериални видове, в които се откриват рибопревключвателите и го представихме в табличен вид (Таблица 1) Установихме, че рибопревключвателите се откриват предимно в бактериални видове. PreQ1-II рибопревключвателят се среща едва в 65 вида, от които 58 вида бактерии. Констатирахме, че 23 от анализирания рибопревключватели се откриват в диапазона между 1000 до 100 бактерии. Това са рибопревключвателите Пурин, GlnS, Гуанидин-II, Моко, Mn²⁺, Гуанидин-I, САХ, Гуанидин-III, САМ-II /САМ-V, PreQ1-I, САМ-IV, c-di-GMP-II, САМ-САХ, адокобаламин, и Глутамин. Едва три рибопревключвателя се откриват в по-малко от 100 вида. Това са Mg²⁺сензор, PreQ1-II и PreQ1-III.

1.4 Съставихме списък от 59 вида човешки патогенни бактерии. Анализирания от нас рибопревключватели се откриват в общо 49 вида човешки патогенни бактерии. По-конкретно, ТПФ рибопревключвателят се открива в 48

вида, ФМН в 41 вида, Кобаламин в 36 вида, Лизин в 25 вида, Глюкозамин-6-фосфат в 26 вида, САМ-I в 20 вида, Пурин в 17 вида човешки патогенни бактерии. Благодарение на биоинформатичния анализ, които извършихме, правим извода, че от всички разгледани 28 рибопревключватели, 12 рибопревключвателя се откриват в повече от 10 вида човешки бактериални патогена. 10 рибопревключвателя се срещат в повече от 15 вида човешки бактериални патогена. 7 от споменатите рибопревключвателя се откриват в повече от 20 вида бактериални патогени.

1.5 Установихме, че броят на видовете, в които конкретен рибопревключвател се открива не е правопрпорционален на броя на бактериалните човешки патогени, в чиито геноми присъства същият рибопревключвател. Mg^{2+} сензор се открива в 40 организмови вида, от които 33 вида са бактерии, 9 вида от тях са човешки бактериални патогени. За разлика от него, рибопревключвателят Молибденов кофактор се открива в повече от 700 бактерии, от които 9 вида са бактериални човешки патогени.

1.6 Представихме данни, в колко общо видови секвенции се среща всеки един от изследваните 28 рибопревключвателя. От тях отделихме и бактериалните секвинции. Кобаламиновият рибопревключвател е представен в повече от 14200 секвенции, от които 9343 са бактериални. Той е най-разпространеният рибопревключвател, в достъпните бактериални секвенции. ТПФ рибопревключвателят се открива в 12593 секвенции, от които 8762 секвенции са бактериални. В най-малко секвенции се откриват Mg^{2+} рибопревключвател и PreQ1-III рибопревключвателят.

1.7 Широкото разпространение на рибопревключвателите в човешките бактериални патогенни видове е предпоставка за успешното им приложение като антибактериални лекарствени мишени. С данните получени от анализа доказваме, че един рибопревключвател се открива в повече от една бактерия и че в един вид бактерия може да има повече от един клас рибопревключватели. Съставихме Таблица 2, благодарение на която бактериалните патогенни видове могат да се групират и срещу тези, имащи общ рибопревключвател, да се насочи един общ антибактериален агент, които да прояви антибактериално действие с широк спектър.

2. Проучихме и анализирахме организацията на структурата на рибопревключвателите и видовете лиганди, които биват разпознавани от 28 рибопревключвателя.

2.1 Разгледахме детайлно данните от разпространението на рибопревключвателите и избрахме 7 от най-разпространените рибопревключватели сред видовете и проучихме структурата им. Това са ТПФ, ФМН, Пурин, Кобаламин, Лизин, Глюкозамин-6-фосфат и САМ-I рибопревключвателите. Те са изградени от аптамерна част и експресионна платформа. Обработихме техните първични нуклеотидни последователности с помощта на биоинформатични програми и направихме 2Д структури, както и 3Д нагънати структури, които представихме на фигури (от Фигура 7 до Фигура 13). Представихме и специфичните лиганди, които те избирателно разпознават и свързват, и филогенетичните им дървета.

2.2 Проучихме всички 26 лиганда, които се разпознават от 28 рибопревключвателя обект на настоящата Докторска дисертация. Групирахме лигандите в девет отделни категории по тип – коензими (9), нуклеотидни производни (4), сигнални молекули (4), йони (4), аминокиселини (3) и други метаболити (2).

2.3 При геномният анализ на нуклеотидните секвенции на рибопревключвателите наблюдаваме консервативност по отношение на аптамерната част между рибопревключвателите в един и в различни класове. Установявайки консервативния мотив, той може да бъде прицелен от един АСО, който да регулира повече от един рибопревключвател.

3. Извършихме допълнителни по-детайлни биоинформатични и геномни анализи на седемте предходно избрани рибопревключвателя, с които определихме пригодността им за използване като антибактериални агенти. Анализирахме и рибопревключвателя САХ, защото той е част от синтеза на САМ.

3.1 Проверихме всеки един от 8 рибопревключвателя в кои видове бактериални човешки патогена се открива. Данните представихме в Таблица 2.

3.2 Съставихме списък от три критерия, върху които базирахме своите анализи. Критериите са: Контролира ли рибопревключвателят синтеза на ключов за клетката метаболит? Има ли активен транспорт отвън-вътре на метаболита и

той контролира ли се от рибопревключвателя? Има ли алтернативен биосинтетичен път, който да не се контролира от рибопревключвателя?

3.3 Проверихме в кои биохимични пътища участва всеки един от избраните рибопревключватели. Седем от избраните рибопревключватели участват в синтеза на ключови метаболити за бактериите. САХ е единственото изключение, защото той регулира не синтез, а разграждане. Установихме, че рибопревключвателят САМ участва в синтеза на метионин, ТПФ и ФМН в Пуриновия метаболизъм, Лизин в образуването на пептидогликан и синтеза на лизин, Пурин в синтеза на аденин и гуанин.

3.4 Заключихме, че рибопревключвателите ФМН, САМ-I и Лизин, освен синтез на ключови метаболити, контролират транспортни белтъци, внасящи ключовите метаболити отвън-вътре в клетката. Наблюдаваме определени ТПФ рибопревключватели, в определени бактерии, които също осъществяват регулация върху гени, отговорни за експресията на белтъци транспортиращи ключови метаболити.

3.5 Разгледахме обстойно биохимичните пътища, в които участват рибопревключвателите и отделихме налични алтернативни пътища за синтез на ключови метаболити за бактерията, които да не са под контрола на рибопревключвателите Пурин, Кобаламин и САХ.

3.6 Давайки отговор на въпросите по критериите, групирахме рибопревключвателите в четири категории. Най-подходящите (++++) рибопревключватели контролират синтеза на съществен метаболит и неговия транспорт вътре в бактерията. При тях, не се открива алтернативен биосинтетичен път на метаболита. Такива са Лизин, САМ и ФМН рибопревключвателите. Много подходящи рибопревключватели (++) са тези, които контролират биосинтеза на ключов метаболит за бактерията, но не контролират неговия клетъчен внос отвън. От избраните от нас 8 рибопревключвателя, това са ТПФ и Глюкозамин-6-фосфат рибопревключвателите. При определени случаи ТПФ може да се отнесе и към най-подходящите рибопревключватели. Частично подходящи рибопревключватели (+) са тези, които имат алтернативни биосинтетични пътища, които не са под контрола на рибопревключвателя и не контролират неговия транспорт. Към тази категория се отнасят рибопревключвателите Кобаламин и Пурин. Неподходящи рибопревключватели (-) са тези, които не контролират биосинтетични пътища на жизненоважни метаболити за бактерията.

Те контролират пътищата на разграждане на основните метаболити. В тази категория отнесохме САХ рибопревключвателя.

3.7 Информацията за структурата на рибопревключвателите, за механизма им на действие, за основните биохимични пътища, в които те участват и метаболитите, чиято генна експресия регулират и начина, по който я регулират, представихме във вид на фигури (от Фигура 14 до Фигура 35).

3.8 Въз основа на данните от изпълнението на Задача №1, Задача №2 и Задача №3, посредством биоинформатични и геномни анализи на рибопревключвателите, правим предложение за всеки един от изследваните от нас рибопревключватели как да бъде деактивиран и това да доведе до леталност на патогенните бактерии или до спиране на растежа им. Всеки един от 8 детайлно анализирани от нас рибопревключвателя би могъл да се използва като подходяща мишена за рибопревключвател-чувствително антибактериално лекарство. Рибопревключвателите от категория „най-подходящи рибопревключватели“ и тези от категория „подходящи рибопревключватели“ могат да бъдат прицелени с един или два АСО, които директно да се свържат с аптамерните им части и да преустановят транскрипцията или да терминират транслацията в бактериите. При рибопревключвателите от третата и четвъртата категория е необходимо да се провери дали количествата внесен екзогенен метаболит и алтернативно синтезиран метаболит са достатъчни за да продължи да съществува бактерията ако основния път за синтез, който е регулиран от рибопревключвател бъде инхибиран.

3.9 В своята Докторска дисертация предлагаме стратегии за деактивиране функцията на 8 рибопревключвателя – ТПФ, ФМН, САМ, САХ, Глюкозамин-6-фосфат, Пурин, Лизин и Кобаламин. Част от стратегиите, както и данните от геномните анализи, послужиха за създаване на специфични рибопревключвател-насочени АСО-антибактериални лекарства и тестването им в Лабораторията на доц. д-р Роберт Пенчовски.

7. ИЗВОДИ

1. Бактериалните рибопревключватели са широко разпространени генетични контролни елементи, открити в над 6000 вида Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии. В еден вид бактерия се откриват повече от един клас рибопревключватели и един рибопревключвател се открива в повече от една бактерия.

2. Общо 24 от проучените от нас рибопревключватели се откриват в диапазона от 5600 вида до 100 вида бактерии. Сред тях са рибопревключвателите ФМН, ТПФ, Пурин, GlnS, SAM-I, SAH, Лизин и Кобаламин. Рибопревключвателите Mg^{2+} сензор, PreQ1-II и PreQ1-III се откриват в по-малко от 100 вида бактерии. Поради редуцирания брой на видовете, е възможно селективното насочване на антибактериален агент към тези рибопревключватели в патогенните бактериални щамове, без да се засегнат пробиотичните бактерии.

3. Някои от рибопревключвателите се откриват предимно в бактериални видове. PreQ1-II рибопревключвателят се среща в 65 вида, от които 58 вида са бактериални и от тях 4 вида са човешки бактериални патогени. Няма пряка зависимост между разпространението на рибопревключвателя в организмите и това във видовете човешки патогенни бактерии. Mg^{2+} сензор се открива в 40 вида, от които 33 вида са бактерии, а 9 вида от тях са човешки бактериални патогени, а рибопревключвателят Моко се открива в повече от 700 вида бактерии, от които 9 вида са бактериални човешки патогени.

4. Дванадесет рибопревключвателя от рибопревключвателите, обект на настоящата теза, се откриват в повече от 10 вида човешки бактериални патогена. Десет рибопревключвателя се срещат в повече от 15 вида човешки бактериални патогени. Седем от споменатите рибопревключвателя се откриват в повече от 20 вида бактериални патогени.

5. Двадесет и осемте класа рибопревключватели, обект на настоящата Докторска теза, усещат, разпознават и свързват специфично 26 различни лиганда, групирани в 9 отделни категории по тип – коензими, нуклеотидни производни, сигнални молекули, йони, аминокиселини и други метаболити.

6. Седем от подложените на пълен биоинформатичен и геномен анализ класове рибопревключватели, контролират пътища на синтез на ключови метаболити. SAH рибопревключвателят участва в път за разграждане. Това автоматично категоризира SAH рибопревключвателя като неподходяща антибактериална мишена. Неговата

трансформация в SAM може да бъде спряна чрез насочване на антибактериално лекарство. Това от своя страна е успешна стратегия за блокиране на синтеза на S-аденозилметионин, който е важен за бактериите. При много високо токсично ниво на концентрацията на метаболита SAH в клетката, бактерията не може да го избегне. Този негативен ефект би могъл да бъде използван в антибактериалната терапия.

7. ФМН, SAM-I и Лизин рибопревключвателите са най-подходящите антибактериални лекарствени цели, тъй като тяхното инхибиране ще доведе до потискане на растежа на бактериалните клетки и/или смърт при всички условия.

8. Много подходящи са рибопревключвателите за глюкозамин-6-фосфат и ТПФ. Използването им като мишени за насочване на антибактериални лекарства, ще доведе до потискане на растежа на бактериалните клетки. При някои бактерии може да се наложи да се инхибират допълнителни клетъчни мишени, за да се постигне категорично потискане на бактериалния растеж.

9. Частично подходящи рибопревключватели са Пурин и Кобаламин рибопревключвателите. Част от бактериите, в които се откриват те, имат алтернативни пътища, за синтез на ключови метаболити, които не са под контрола на рибопревключвателите. За да се постигне потискане на бактериалния растеж е необходимо те да бъдат паралелно инхибирани или да не успяват да синтезират достатъчно количество от ключовия бактериален метаболит.

10. Направените заключения в следствие на извършени прецизни и детайлни биоинформатични и геномни анализи на човешките бактериални патогени, рибопревключвателите и техните секвенции, са от огромно значение за съвременното Здравеопазване. АСОи могат да бъдат точно проектирани, създадени и синтезирани, за да бъдат комплементарни на иРНК на рибопревключвателя и да бъдат разпознати от рибопревключвателя специфично. Те блокират синтеза на ключови метаболити за бактериите и водят до бактериостатичен ефект.

11. Биоинформатичните и геномните анализи спестяват време и ресурси на учените. Благодарение на тях и описаните от нас критерии определящи пригодността на конкретните рибопревключватели като мишени за антибактериални агенти, се избират най-подходящите рибопревключватели, в една или повече бактерии. Това позволява да се постигне специфично и тясно-спектърно антибактериално действие или разгърнато, широкоспектърно действие на антибактериалния агент в един или повече видове бактерии едновременно.

8. ПРИНОСИ

Настоящата работа представлява първият широкообхватен биоинформатичен и геномен анализ на 28 рибопревключватели и свързани с тях биохимични пътища при човешки патогенни бактерии и използването им като мишени за създаване на нови антибактериални агенти. Това е първият анализ, който позволява да бъдат доказани всички преимущества на рибопревключвателите като подходящи мишени за разработване на нови антибактериални лекарства. Благодарение на него може да се даде обективна оценка за пригодността на всеки един от анализирания рибопревключватели като мишена за разработване на нови лекарства.

1. Направен е първият пълен, детайлен и широко обхватен биоинформатичен и геномен анализ на 28 класа рибопревключватели, обхващащ гените на видове организми, предоставящ данни за разпространението на рибопревключвателите в еукариоти, бактерии и археи. Получени са данни за разпространението на рибопревключвателите в 49 вида човешки патогенни бактерии.

2. Представени са на едно място всички 26 метаболита, които се разпознават специфично от откритите рибопревключватели и са групирани в 6 категории по тип – коензими (9), нуклеотидни производни (4), сигнални молекули (4), йони (4), аминокиселини (3) и други метаболити (2).

3. Направена е селекция на 8 от най-разпространените рибопревключватели, които след това са детайлно проучени и анализирани. За всеки един от тях е направен геномен анализ, който предоставя информация за консервативността на аптамерната част, вторичната и третичната структура на рибопревключвателя, както и специфичния метаболит, който той разпознават и свързва. Представена е онагледена информация за механизмите на регулация на генната експресия – терминация на транскрипцията, превенция на трансляцията и дестабилизиране на иРНК.

4. Анализирани са биохимичните пътища, в които участват ФМН, Пурин, ТПФ, Глюкозамин-6-фосфат, Кобаламин, Лизин, САМ и САХ рибопревключвателите. Представена е информация кои ключови метаболити са под контрола на рибопревключвател-регулираната генна експресия. Рибопревключвателите ФМН, САМ-I и Лизин, освен синтез на ключови метаболити, контролират транспортни белтъци, внасящи ключовите метаболити отвън-вътре в клетката. При рибопревключвателите

Пурин, Кобаламин и САХ се наблюдават алтернативни биосинтетични пътища за ключови бактериални метаболити, които не са под техен контрол.

5. За първи път е представена класификация за пригодността на осемте гореспоменати рибопревключвателя в използването им като антибактериални лекарствени мишени, базирана на постулирани критерии:

- Контролира ли рибопревключвателят синтеза на ключов за клетката метаболит?
- Има ли активен транспорт отвън-вътре на метаболита и той контролира ли се от рибопревключвателя?
- Има ли алтернативен биосинтетичен път за синтез на метаболитите, който да не се контролира от рибопревключвателя?

Най-подходящите мишени за разработване на антибактериални лекарства от анализиранияте осем рибопревключвателя са ФМН, Лизин и САМ рибопревключвателите. Много подходящите рибопревключватели са Глюкозамин-6-фосфат и ТПФ. Частично подходящи рибопревключватели са Кобаламин и Пурин. Неподходящ е САХ рибопревключвателят. За всеки един от цитираните рибопревключватели са предложени стратегии за специфично свързване на конкретен рибопревключвател, което води до невъзможност да се синтезира ключовият метаболит и последващ бактериостатичен ефект или дори бактерициден ефект. Те могат да се използват като мишени за създаване на тясноспектърни и широкоспектърни антибактериални лекарства, в зависимост от това каква част от аптамерния им домен се прицели.

6. Всички анализи и получени резултати послужиха в нашата лаборатория да започнем тестването на 4 рибопревключвателя – ФМН, GlnS, ТПФ и САМ-I като антибактериални лекарствени цели при различни видове патогенни бактерии. Доказахме, че прицелването на всички тези рибопревключватели с АСОи, свързани с клетъчно проникващи олигопептиди, инхибира клетъчния растеж на много видове патогенни бактерии. Тези резултати не са обект на настоящата Докторска дисертация. Доц. д-р Роберт Пенчовски има призната международна заявка за патент, озаглавена "Методи за създаване на нови антибактериални агенти, използващи химерни антисенс олигонуклеотиди" за приложението на АСОи като нови лекарствени мишени (92).

АВТОБИОГРАФИЯ НА НИКОЛЕТ ИЛИЕВА ПАВЛОВА

гр. София, България

тел. за връзка: +359885707021,

e-mail: nikolet.pavlova@gmail.co

ОБРАЗОВАНИЕ И ОБУЧЕНИЕ:

- **10.07.2016г.** – зачислен редовен докторант по „Генетика – Биоинформатика” към катедра „Генетика” на Биологически Факултет към Софийски Университет „Св. Климент Охридски” за период от три години със заповед на Ректора проф. д-р Атanas Герджиков с No PД 20-1015/06.07.2016.
- **2014 - 2016г.** Пълен „Отличник на Софийски Университет“, наградена със златна значка на СУ. Магистър „Генетика и геномика. Молекулярна биология” в Биологически Факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски”, гр. София, България. Тема на магистърска теза: „Биоинформатичен и геномен анализ на рибопревключвателите за FMN, GlmS, Cobalamine и Lysine и свързаните с тях информационни РНК при човешки патогенни бактерии за откриване на нови антибиотици”.
- **2014 - 2016г.** Магистър „Управление на проекти. Бизнес администрация” в Международно Висше Бизнес Училище, България. Тема на магистърска теза: „Връзките с обществеността като интерактивна система”.
- **2010 - 2014г.** Бакалавър „Молекулярна биология.” в Биологически Факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски”, гр. София, България.
- **2010 - 2014г.** Бакалавър „Бизнес администрация” в Международно Висше Бизнес Училище, гр. Ботевград, България.
- **2006 - 2010г.** Средно образование - паралелка с интензивно изучаване на „Биология” в Национална природо-математическа гимназия „Акад. Любомир Чакалов”, гр. София, България.

ОСНОВНИ НАУЧНИ ИНТЕРЕСИ:

Основните научни интереси на Николет са в областта на биоинформатиката, генетиката, геномиката, молекулярната биология, мегагеномиката и микробиологията. Под ръководството на доц. Роберт Пенчовски, Николет работи върху биоинформатичния и геномен анализ на рибопревключватели и свързани с тях биохимични пътища при

човешки патогенни бактерии и използването им като мишени за създаване на нови антибактериални агенти.

УЧАСТИЕ В КОНФЕРЕНЦИИ И МЕЖДУНАРОДНИ ОБМЕНИ:

- **Участие в Международната Биоинформатична Конференция „German Conference on Bioinformatics”, 25-28.09.2018г. в гр. Виена, Австрия и представяне на постер:**
„EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses, Nikolett Pavlova, Dimitrios Kaloudas and Robert Penchovsky”
<https://gcb2018.csb.univie.ac.at/posters>
- **Участие в 14-ти Конгрес на Микробиолозите в България с международно присъствие, 10-13.10.2018г., гр. Хисаря, България. Представяне на два постера:**
 - **Bioinformatics Web-based Server for bacterial genome analyses, Nikolett Pavlova and Robert Penchovsky**
НАЙ-ДОБЪР ПОСТЕР – ВТОРА НАГРАДА
 - **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**
НАЙ-ДОБЪР ПОСТЕР – ВТОРА НАГРАДА
- Участие в VII-та Национална конференция с международно участие „Морфологични дни”, 8-10 юни 2018 г., Национален Антропологичен музей, бул. Цариградска шосе 73, гр. София, България.
- Участие в „International BioMedical Congress”, София, България, 16-18.11.2018г.
- Участие и в „Workshop Molecular Life Sciences Education”, 22.11.2013 година в Биологически Факултет към Софийски Университет, България. Събитието се организира от Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Българската общност на биохимици, биофизици и молекулярни биолози (ББМБ) и Биологически Факултет на Софийски Университет. <http://kliments-days.biofac.info>
<http://kliments-days.biofac.info/files/Programme-3-1.pdf>
- Участие в международния обмен с още 17 младежа от България, Словакия и Турция „Lose yourself to health” в гр. Мардин, Турция. Проектът бе посветен на здравословните навици – спорт и хранене.
<https://bulgarianyouthcommunity.wordpress.com/2015/10/09/lose-yourself-to-health/>

- Участие в международния обмен „Stop, Act, Volunteer! Enjoy the seaside”. Проектът цели опознаването и опазването на морските обитатели. <http://www.ataro.eu/en/our-projects/274-stop-act-volunteer-enjoy-the-seaside-youth-mobility-in-eforie-sud>
- Участие в програмата ”Хранене и здраве, издания Ноември 2015, организирана от Медицински Факултет на СУ „Св. Климент Охридски” и Българско дружество по хранене и диететика. <http://www.hranenezdrave.info>

ИЗПОЗВАНО ИМЕ В ПУБЛИКАЦИИ НА ЧУЖД ЕЗИК:

Nikolet Pavlova

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И ПОСТЕРИ:

1. Genome-wide bioinformatics analysis of FMN, SAM-I, glmS, TPP, Lysine, Purine, Cobalamin, and SAH riboswitches for their applications as allosteric antibacterial drug targets in human pathogenic bacteria, Nikolet Pavlova, Robert Penchovsky, 2019, Expert Opinion on Therapeutic targets, IF:4,598, <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1618274>.
2. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria, Nikolet Pavlova, Dimitrios Kaloudas, Robert Penchovsky, 2019, Gene. IF: 2,498, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.036>.
Q1, 25 точки.
3. EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analysis, Dimitrios Kaloudas, Nikolet Pavlova, Robert Penchovsky, IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics (IEEE ACM T COMPUT BI), 2018, DOI: [10.1109/TCBB.2018.2816645](https://doi.org/10.1109/TCBB.2018.2816645), IF: 1,64,
Q2 – 20 точки
4. ExBWS: Essential Extended Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses, Penchovsky Robert, Nikolet Pavlova, Dimitrios Kaloudas (2019), International Journal of Bioinformatics Research and Applications, In press, IF: 0.70
Q4 – 12 точки.

Общо: IF: 9.436

SJR: 82 точки.

5. „EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses, Nikolett Pavlova, Dimitrios Kaloudas and Robert Penchovsky”, German conference on Bioinformatics, 2018. <https://gcb2018.csb.univie.ac.at/posters>
Предишни издания на конференцията фигурират в Scimago Journal and Country Rank (SJR):
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100223335&tip=sid&clean=0>
6. Bioinformatics Web-based Server for bacterial genome analyses, Nikolett Pavlova and Robert Penchovsky, 14th Congress of Microbiology, The best poster competition – Second place award, 2018
7. 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, 14th Congress of Microbiology, 2018

ЦИТИРАНЕ НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И ПОСТЕРИ

„EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses, Nikolett Pavlova, Dimitrios Kaloudas and Robert Penchovsky”, German conference on Bioinformatics, 2018.

1. De Souza, Ronaldo Omizolo, et al. "Comparison of *Treponema pallidum* genomes for the prediction of resistance genes." *Journal of Biosciences* 44.2 (2019): 34.

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. Антисенс олигонуклеотиди, които специфично се свързват с ФМН и САМ рибопревключватели при човешки патогенни бактерии, 80-10-45/10.04.2019, 2019 година – **ОСНОВЕН ПРОЕКТ**
2. Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти, МОН, ДН/13/14/20.12.2017, 2017-2020
3. Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината, МОН, BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017, 2017-2018
4. Нови методи за създаване на антибиотици срещу резистентни щамове на *Escherichia coli*, чрез използване на антисенс олигонуклеотиди, които инхибират биохимични пътища, контролирани от рибопревключватели, ФНИ на СУ, BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017, 2017-2018

5. Нови методи за откриване на антибиотични агенти срещу резистентни щамове на *Staphylococcus aureus* чрез прилагане на антисенс олигонуклеотиди, ФНИ на СУ, 179/ 13.04.2016, 2016-2017
6. Приложение на антисенс олигонуклеотиди за специфично инхибиране на бактериални РНКи, като нов метод за създаване на антибиотици, 12/27.03.2015, 2015

ТРУДОВ СТАЖ:

- Юли 2016 – Юли 2019г.
Докторант в катедра „Генетика”, Биологически Факултет, Софийски Университет ‘Св. Климент Охридски’.
- 2014 - 2019г.
Член в екипа на доц. д-р Роберт Пенчовски – „Penchovsky’s Laboratory.

ЛИЧНИ УМЕНИЯ И КОМПЕТЕНЦИИ:

- Свидетелство за управление на МПС, категория В
- Умения за работа в екип, правилно делегиране на права и задължения, предаване на знания и компетенции и разпределение на времето
- Доброволец към Благотворителен Фонд „MISSIA”

ЕЗИЦИ:

Български език – майчин език

Руски език – писмено и говоримо

Английски език – Second Certificate of English

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(6):631-50.
2. Perez-Gonzalez C, Grondin JP, Lafontaine DA, Carlos Penedo J. Biophysical Approaches to Bacterial Gene Regulation by Riboswitches. *Adv Exp Med Biol.* 2016;915:157-91.
3. Batey RT. Structures of regulatory elements in mRNAs. *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16(3):299-306.
4. Nudler E, Mironov AS. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(1):11-7.
5. Tucker BJ, Breaker RR. Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(3):342-8.
6. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* 2004;20(1):44-50.
7. Machtel P, Bakowska-Zywicka K, Zywicki M. Emerging applications of riboswitches - from antibacterial targets to molecular tools. *J Appl Genet.* 2016;57(4):531-41.
8. Abduljalil JM. Bacterial riboswitches and RNA thermometers: Nature and contributions to pathogenesis. *Noncoding RNA Res.* 2018;3(2):54-63.
9. Batey RT. Riboswitches: still a lot of undiscovered country. *RNA.* 2015;21(4):560-3.
10. Mehta NB, BALAJI P. Riboswitches: classification, function and insilico approach. *Int J.* 2010;1:409-20.
11. Winkler WC, Breaker RR. Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology.* 2003;4(10):1024-32.
12. Pyle AM. Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science.* 1993;261(5122):709-14.
13. Vaidya N, Lehman N. One RNA plays three roles to provide catalytic activity to a group I intron lacking an endogenous internal guide sequence. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(12):3981-9.
14. Hinman MN, Zhou HL, Sharma A, Lou H. All three RNA recognition motifs and the hinge region of HuC play distinct roles in the regulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(9):5049-61.
15. Breaker RR. Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(1):31-9.
16. Roth A, Breaker RR. The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annual review of biochemistry.* 2009;78:305-34.
17. Stormo GD, Ji Y. Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(17):9465-7.
18. Serganov A, Patel DJ. Metabolite recognition principles and molecular mechanisms underlying riboswitch function. *Annu Rev Biophys.* 2012;41:343-70.
19. Garst AD, Edwards AL, Batey RT. Riboswitches: structures and mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(6).
20. Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & biology.* 2002;9(9):1043.
21. Lin J-C, Yoon J, Hyeon C, Thirumalai D. Chapter Ten - Using Simulations and Kinetic Network Models to Reveal the Dynamics and Functions of Riboswitches. In: Chen S-J, Burke-Aguero DH, editors. *Methods in Enzymology.* 553: Academic Press; 2015. p. 235-58.
22. Aboul-ela F, Huang W, Abd Elrahman M, Boyapati V, Li P. Linking aptamer-ligand binding and expression platform folding in riboswitches: prospects for mechanistic modeling and design. *Wiley interdisciplinary reviews RNA.* 2015;6(6):631-50.
23. Regulski EE, Breaker RR. In-line probing analysis of riboswitches. *post-transcriptional gene regulation: Springer;* 2008. p. 53-67.
24. Mandal M, Breaker RR. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nature structural & molecular biology.* 2004;11(1):29-35.
25. Bastet L, Chauvier A, Singh N, Lussier A, Lamontagne AM, Prevost K, et al. Translational control and Rho-dependent transcription termination are intimately linked in riboswitch regulation. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(12):7474-86.
26. Hollands K, Proshkin S, Sklyarova S, Epshtein V, Mironov A, Nudler E, et al. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(14):5376-81.
27. Soukup GA, Breaker RR. Engineering precision RNA molecular switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(7):3584-9.

28. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, Mandin P, et al. A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell*. 2009;139(4):770-9.
29. McCown PJ, Corbino KA, Stav S, Sherlock ME, Breaker RR. Riboswitch diversity and distribution. *Rna*. 2017;23(7):995-1011.
30. Penchovsky R, Stoilova CC. Riboswitch-based antibacterial drug discovery using high-throughput screening methods. *Expert Opin Drug Discov*. 2013;8(1):65-82.
31. Penchovsky R. Computational design of allosteric ribozymes as molecular biosensors. *Biotechnol Adv*. 2014;32(5):1015-27.
32. Penchovsky R, Breaker RR. Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes. *Nat Biotechnol*. 2005;23(11):1424-33.
33. Li S, Breaker RR. Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):3022-31.
34. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D37-D42.
35. Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D32-7.
36. Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, Khanna A, Eddy SR. Rfam: an RNA family database. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):439-41.
37. Nawrocki EP, Burge SW, Bateman A, Daub J, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D130-7.
38. Burge SW, Daub J, Eberhardt R, Tate J, Barquist L, Nawrocki EP, et al. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D226-32.
39. Parasuraman S. Protein data bank. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2012;3(4):351-2.
40. Velankar S, Alhroub Y, Best C, Caboche S, Conroy MJ, Dana JM, et al. PDBe: Protein Data Bank in Europe. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D445-52.
41. Tanabe M, Kanehisa M. Using the KEGG database resource. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2012;Chapter 1:Unit1 12.
42. Kotera M, Hirakawa M, Tokimatsu T, Goto S, Kanehisa M. The KEGG databases and tools facilitating omics analysis: latest developments involving human diseases and pharmaceuticals. *Methods Mol Biol*. 2012;802:19-39.
43. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D353-D61.
44. Karp PD, Ouzounis CA, Moore-Kochlacs C, Goldovsky L, Kaipa P, Ahren D, et al. Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(19):6083-9.
45. Krummenacker M, Paley S, Mueller L, Yan T, Karp PD. Querying and computing with BioCyc databases. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3454-5.
46. Paley S, Karp PD. Update notifications for the BioCyc collection of databases. *Database (Oxford)*. 2017;2017.
47. Karp PD, Billington R, Caspi R, Fulcher CA, Latendresse M, Kothari A, et al. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Brief Bioinform*. 2017.
48. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, et al. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W597-603.
49. Kaloudas D, Pavlova N, Penchovsky R. EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*. 2018.
50. Penchovsky Robert NP, Dimitrios Kaloudas ExBWS: Essential xtended Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*. 2019;In press.
51. Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*. 2003;9(6):644-7.
52. Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, Breaker RR. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*. 2007;447(7143):497-500.
53. Croft MT, Moulin M, Webb ME, Smith AG. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(52):20770-5.
54. Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, Yamashita N, Nishimura A, Nakai S, et al. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett*. 2003;555(3):516-20.

55. Bocobza SE, Aharoni A. Small molecules that interact with RNA: riboswitch-based gene control and its involvement in metabolic regulation in plants and algae. *Plant J.* 2014;79(4):693-703.
56. Wachter A, Tunc-Ozdemir M, Grove BC, Green PJ, Shintani DK, Breaker RR. Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell.* 2007;19(11):3437-50.
57. Barrick JE, Breaker RR. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome biology.* 2007;8(11):R239.
58. Pavlova N, Kaloudas D, Penchovsky R. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria. *Gene.* 2019;708:38-48.
59. Pavlova NaP, Robert. Genome-wide bioinformatics analysis of FMN, SAM-I, glmS, TPP, Lysine, Purine, Cobalamin, and SAH riboswitches for their applications as allosteric antibacterial drug targets in human pathogenic bacteria. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2019;In press
60. Serganov A, Nudler E. A decade of riboswitches. *Cell.* 2013;152(1-2):17-24.
61. Ainala SK, Nguyen-Vo TP, Park S, Kim J-R. Analysis and characterization of coenzyme B12 biosynthetic gene clusters and improvement of B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867. *FEMS Microbiology Letters.* 2018;365(21).
62. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, et al. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell.* 2002;111(5):747-56.
63. Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(25):15908-13.
64. McDaniel BA, Grundy FJ, Artsimovitch I, Henkin TM. Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(6):3083-8.
65. Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol.* 2003;10(9):701-7.
66. Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, Phan AT, et al. Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chemistry & biology.* 2004;11(12):1729-41.
67. Mandal M, Breaker RR. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(1):29-35.
68. Mandal M, Breaker RR. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(6):451-63.
69. Batey RT, Gilbert SD, Montange RK. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature.* 2004;432(7015):411-5.
70. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell.* 2003;113(5):577-86.
71. Mulhbach J, Lafontaine DA. Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(16):5568-80.
72. Witte G, Hartung S, Buttner K, Hopfner KP. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell.* 2008;30(2):167-78.
73. Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, Breaker RR. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nat Chem Biol.* 2013;9(12):834-9.
74. Davies BW, Bogard RW, Young TS, Mekalanos JJ. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell.* 2012;149(2):358-70.
75. Baker JL, Sudarsan N, Weinberg Z, Roth A, Stockbridge RB, Breaker RR. Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science.* 2012;335(6065):233-5.
76. Dann CE, 3rd, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, Winkler WC. Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell.* 2007;130(5):878-92.
77. Dambach M, Sandoval M, Updegrove TB, Anantharaman V, Aravind L, Waters LS, et al. The ubiquitous yybP-ykoY riboswitch is a manganese-responsive regulatory element. *Mol Cell.* 2015;57(6):1099-109.
78. Meyer MM, Hammond MC, Salinas Y, Roth A, Sudarsan N, Breaker RR. Challenges of ligand identification for riboswitch candidates. *RNA Biol.* 2011;8(1):5-10.
79. Price IR, Gaballa A, Ding F, Helmann JD, Ke A. Mn(2+)-sensing mechanisms of yybP-ykoY orphan riboswitches. *Mol Cell.* 2015;57(6):1110-23.
80. Garst AD, Heroux A, Rambo RP, Batey RT. Crystal structure of the lysine riboswitch regulatory mRNA element. *J Biol Chem.* 2008;283(33):22347-51.

81. Serganov A, Huang L, Patel DJ. Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature*. 2008;455(7217):1263-7.
82. McCown PJ, Roth A, Breaker RR. An expanded collection and refined consensus model of glmS ribozymes. *RNA*. 2011;17(4):728-36.
83. McCown PJ, Winkler WC, Breaker RR. Mechanism and distribution of glmS ribozymes. *Methods Mol Biol*. 2012;848:113-29.
84. Cochrane JC, Lipchock SV, Strobel SA. Structural investigation of the GlmS ribozyme bound to its catalytic cofactor. *Chemistry & biology*. 2007;14(1):97-105.
85. Bingaman JL, Gonzalez IY, Wang B, Bevilacqua PC. Activation of the glmS Ribozyme Nucleophile via Overdetermined Hydrogen Bonding. *Biochemistry*. 2017;56(33):4313-7.
86. Bingaman JL, Zhang S, Stevens DR, Yennawar NH, Hammes-Schiffer S, Bevilacqua PC. The GlcN6P cofactor plays multiple catalytic roles in the glmS ribozyme. *Nat Chem Biol*. 2017;13(4):439-45.
87. Collins JA, Irnov I, Baker S, Winkler WC. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes Dev*. 2007;21(24):3356-68.
88. Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR. An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science*. 2010;329(5993):845-8.
89. Sherlock ME, Breaker RR. Biochemical Validation of a Third Guanidine Riboswitch Class in Bacteria. *Biochemistry*. 2017;56(2):359-63.
90. Sherlock ME, Sudarsan N, Stav S, Breaker RR. Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria. *eLife*. 2018;7:e33908.
91. Mehdizadeh Aghdam E, Hejazi MS, Barzegar A. Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene*. 2016;592(2):244-59.
92. PENCHOVSKY R, inventor Methods for creating novel antibacterial agent using chimeric antisense oligonucleotides 2018.
93. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic acids research*. 2002;30(14):3141-51.
94. Serganov A, Huang L, Patel DJ. Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature*. 2009;458(7235):233-7.
95. Imagawa T, Tsurumura T, Sugimoto Y, Aki K, Ishidoh K, Kuramitsu S, et al. Structural basis of free reduced flavin generation by flavin reductase from *Thermus thermophilus* HB8. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(51):44078-85.
96. Tinikul R, Pitsawong W, Sucharitakul J, Nijvipakul S, Ballou DP, Chaiyen P. The transfer of reduced flavin mononucleotide from LuxG oxidoreductase to luciferase occurs via free diffusion. *Biochemistry*. 2013;52(39):6834-43.
97. Mansjo M, Johansson J. The riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection. *RNA biology*. 2011;8(4):674-80.
98. Howe JA, Wang H, Fischmann TO, Balibar CJ, Xiao L, Galgoci AM, et al. Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. *Nature*. 2015;526(7575):672-7.
99. Wang H, Lin M, Xiong J, Lin L, Xiao R, editors. *Workload-Aware Page-Level Flash Translation Layer for NAND Flash-Based Storage Systems*. *Cloud Computing and Security*; 2017 2017//; Cham: Springer International Publishing.
100. Krajewski SS, Ignatov D, Johansson J. Two Are Better Than One: Dual Targeting of Riboswitches by Metabolite Analogs. *Cell Chem Biol*. 2017;24(5):535-7.
101. Epshtein V, Mironov AS, Nudler E. The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(9):5052-6.
102. Montange RK, Batey RT. Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. 2006.
103. Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2003;10(9):701-7.
104. Albers E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB life*. 2009;61(12):1132-42.
105. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic acids research*. 2004;32(11):3340-53.

106. Tomšič J, McDaniel BA, Grundy FJ, Henkin TM. Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in *Bacillus subtilis* exhibit differential sensitivity to SAM in vivo and in vitro. *Journal of bacteriology*. 2008;190(3):823-33.
107. Grundy FJ, Lehman SC, Henkin TM. The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12057-62.
108. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic acids research*. 2003;31(23):6748-57.
109. Edwards TE, Ferre-D'Amare AR. Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition. *Structure*. 2006;14(9):1459-68.
110. Nudler E, Mironov AS. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(1):11-7.
111. Breaker RR. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(2):a003566.
112. Chen L, Cressina E, Dixon N, Erixon K, Agyei-Owusu K, Micklefield J, et al. Probing riboswitch-ligand interactions using thiamine pyrophosphate analogues. *Organic & biomolecular chemistry*. 2012;10(30):5924-31.
113. Bian J, Shen H, Tu Y, Yu A, Li C. The riboswitch regulates a thiamine pyrophosphate ABC transporter of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Bacteriol*. 2011;193(15):3912-22.
114. Teplyakov A, Obmolova G, Badet-Denisot MA, Badet B. The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1999;8(3):596-602.
115. Roth A, Nahvi A, Lee M, Jona I, Breaker RR. Characteristics of the glmS ribozyme suggest only structural roles for divalent metal ions. *Rna*. 2006;12(4):607-19.
116. Pechovsky R. Computational design and biosensor applications of small molecule-sensing allosteric ribozymes. *Biomacromolecules*. 2013;14(4):1240-9.
117. Blount KF, Breaker RR. Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat Biotechnol*. 2006;24(12):1558-64.
118. Urban JH, Vogel J. Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation. *PLoS biology*. 2008;6(3):e64.
119. Lunse CE, Schmidt MS, Wittmann V, Mayer G. Carba-sugars activate the glmS-riboswitch of *Staphylococcus aureus*. *ACS chemical biology*. 2011;6(7):675-8.
120. Schuller A, Matzner D, Lunse CE, Wittmann V, Schumacher C, Unsleber S, et al. Activation of the glmS Ribozyme Confers Bacterial Growth Inhibition. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2017;18(5):435-40.
121. Breaker RR. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(2).
122. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*. 2003;113(5):577-86.
123. Krajewski SS, Isoz I, Johansson J. Antibacterial and antivirulence effect of 6-N-hydroxylaminopurine in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic acids research*. 2017;45(4):1914-24.
124. Reining A, Nozinovic S, Schlepckow K, Buhr F, Fürtig B, Schwalbe H. Three-state mechanism couples ligand and temperature sensing in riboswitches. *Nature*. 2013;499(7458):355-9.