

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



SOFIA UNIVERSITY
ST. KLIMENT OHRIDSKI

FACULTY OF BIOLOGY



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Биологически Факултет

Катедра Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

НА

**Докторска дисертация за придобиване на образователна и
научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3**

Биологически науки – „Генетика- Биоинформатика“

на тема:

**ДИЗАЙН НА ХИМЕРНИ АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ
И НАЧАЛНА ОЦЕНКА НА ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА
ТЕРАПЕВТИЧНИ ЦЕЛИ**

Изготвил:

Екатерини Валсаматзи- Панайоту

Научен ръководител:

проф. д-р Роберт Пенчовски

гр. София, България

2021г.

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

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

Научно жури:

Вътрешни членове на научно жури:

1. проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски
2. доц. д-р Тания Иванова Топузова-Христова

Външни членове на научно жури:

3. академик проф. д.б.н. Иван Георгиев Иванов
4. академик проф. д.б.н. Атанас Иванов Атанасов
5. проф. д.б.н. Иван Илиев Атанасов

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

Дисертационният труд, написан от Катерини Валсаматзи-Панайоту на тема „Дизайн на химерни антисенс олигонуклеотиди и начална оценка на тяхното използване за терапевтични цели”, включва:

Страници: 128

Фигури: 30

Таблицы: 4

Цитирания: 169

Трудът е базиран на 2 глави от книги и 1 научна публикация с участието на докторанта с общ импакт фактор IF:0.16 и с общ Scimago Journal and Country Rank (SJR) 42 точки.

1. Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Katya B. Popova, and Robert Penchovsky “Drug discovery for targeting drug-resistant bacteria” (2020), Panwar H., Sharma C., Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 46. Sustainable Agriculture Reviews, vol 46. Springer, (pp.205-228), Cham. ISBN 978-3-030-53024-2, https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2_9

2. Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Martina Traykovska, Robert Penchovsky - “Mechanisms of antibacterial drug resistance and approaches to overcome it” (2020), Prashant Kesharwani, Sidharth Chopra, Arunava Dasgupta, Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria, Elsevier, (pp.9–37)., ISBN 9780128184806, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818480-6.00002-3>

3. Robert Penchovsky and Aikaterini Valsamatzi - Engineering antisense oligonucleotides as antibacterial agents – 2019, Arch Clin Microbiol, 1989-8436, Q4 – 12 т. (Medicine), IF – 0,16

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100225606&tip=sid>

Участие в научни конференции на докторанта:

22-23.04.2019 – участие в EuroSciCon Conference of Microbiology and Virology - Конференция по Микробиология и Вирусология, гр. Атина, Гърция.

<https://penchovsky.atwebpages.com/conferences.php?page=26>

Съдържание

1. Въведение.....	6
2. Цели и задачи.....	8
2.1. Цел.....	8
2.2. Задачи.....	8
3. Материали и методи.....	9
3.1. Материали.....	9
3.1.1. Биоинформатични бази данни и програми.....	9
3.1.2. Материали използвани в лабораторните <i>in vitro</i> експерименти.....	11
3.1.3. Използвана апаратура.....	13
3.2. Методи.....	16
3.2.1. Биоинформатични методи.....	16
3.2.2. Експериментална работа.....	16
4. Резултати.....	18
4.1. Дизайн на първи химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 1).....	19
4.1.1. Мишена на АСО 1.....	19
4.1.2. Дизайн на химерен АСО 1.....	20
4.1.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 1 за терапевтични цели.....	25
4.2. Дизайн на втори химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 2).....	27
4.2.1. Мишена на АСО 2.....	27
4.2.2. Дизайн на химерен АСО 2.....	29
4.2.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 2 за терапевтични цели.....	32
4.3. Дизайн на трети химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 3).....	34
4.3.1. Мишена на АСО 3.....	34
4.3.2. Дизайн на химерен АСО 3.....	36
4.3.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 3 за терапевтични цели.....	39
4.4. Дизайн на четвърти химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 4).....	45
4.4.1. Мишена на АСО 4.....	45
4.4.2. Дизайн на химерен АСО 4.....	45
4.4.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 4 за терапевтични цели.....	47
4.5. Експериментална проверка на инхибиращия ефект на клетъчно проникващия пептид рVЕС като самостоятелен агент в клетката.....	48
5. Обсъждане.....	49
6. Изводи.....	53

7. Приноси.....	55
Използвани съкращения.....	57
Използвани съкращения на Английски език	58
Списък на таблиците.....	59
Списък на фигурите.....	59
Библиография	61
Автобиография на Катерини Валсаматзи-Панайоту.....	64

1. Въведение

Настоящата докторска дисертация представлява задълбочен анализ в областта на синтетичната биология и биоинформатиката. Тя се основава на сериозно научно изследване за разработването на нови антисенс олигонуклеотиди, които могат да се насочат към човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*, заразяващ хора от различни ареали и отговорен за редица кожни инфекции и инфекции на меките тъкани. За постигане на целта на настоящата теза са проектирани и определени четири нови антисенс олигонуклеотида. Три от тях са насочени към различна цел от бактериалния геном, а един е произволно създаден и няма специфична мишена от генома на *S. aureus*. След първичните биоинформатични и геномни анализи, АСО са синтезирани и след това подложени на оценка за техните антибактериални свойства *in vitro* и възможността им да се използват като терапевтични агенти. Освен четирите АСО, клетъчно проникващият пептид – рVEC се проверява дали инхибира растежа на бактерията във високи концентрации. Всички изследвания са проведени *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Заплахата от множество различни антибиотик-нечувствителни бактерии, както и затрудненото създаване на нови антибактериални препарати, поради високата скорост, с която възниква антибиотичната резистентност, налагат прилагането на нови стратегии и търсенето на нови мишени от бактериалните клетки. Антибиотичната резистентност се определя като способността на бактериите да оцеляват в антибиотични концентрации, които са способни да инхибират или убиват други бактерии от същия вид (1). Тя е следствие от прекомерната употреба на антибиотици срещу бактериални и небактериални инфекции, както при хора, така и при животни. Едни от най-обещаващите агенти, които започват да се прилагат през последните години са антисенс олигонуклеотидите (АСО).

АСО проникват в клетката гостоприемник чрез клетъчна ендоцитоза. АСО представляват немодифицирани или химично модифицирани къси едноверижни нуклеинови киселини, които се свързват специфично с иРНК и предизвикат разкъсването на структурата ѝ. В резултат на ензимно разкъсване от РНаза Н (RNase H), експресията на белтъци с важно действие за преживяването и деленето на бактерията е инхибирана.

На база химична структура и модификации, АСО биват три генерации. АСО от първа генерация имат фосфоротиоатен скелет, модифициран чрез замяна на несдвоения кислород във фосфодиестерната връзка от серен атом. Тази модификация насърчава

разцепването на иРНК от РНаза Н. АСО от втора генерация, имат повишена свързваща активност към иРНК, но не водят до разцепването на иРНК от РНаза Н, в резултат на 2'-алкилови модификации на рибозата и 2'-О-метил, или 2'-О-метоксиетил замени. В трета генерация АСО се откриват пептидни нуклеинови киселини и други модифицирани олигомери. АСО, обект на настоящата докторска дисертация, са химерни и използват модификации от първа и втора генерация повлияващи специфичното разграждане на иРНК от РНаза Н, с удължена стабилност заради метилирането и забавена ензимна хидролиза на ДНК/РНК, благодарение на серния атом.

АСО могат да повлияят функцията на рибонуклеаза Р (RNase P), която представлява ендорибонуклеазен ензим и разрязва некодиращи РНК и иРНКи, при които се наблюдава връзка между едноверижния регион и 5'-края на двуверижния регион. РНаза Р обикновено се свързва с тРНК (2, 3). В настоящата докторска дисертация, един от създадените АСО прилича на тРНК, която се свързва комплементарно с ензима и довежда до разцепване на иРНК и последваща инхибирана експресия на белтъка.

На нивото на трансляция се използва друг механизъм, който включва синтетични АСО - пептидна нуклеинова киселина (ПНК). ПНК се свързва комплементарно с иРНК и довежда до стерично препятстване на едната от рибозомните субединица (4, 5). Механизмите на АСО, които бяха използвани в настоящата докторската дисертация, включват прилагането на Рназа Р като мишена. Два АСО биват проектирани и синтезирани да се свързват с различни участъци от бактериална РНаза Р.

Третият проектиран и синтезиран антисенс олигонуклеотид, обект на настоящата докторска дисертация, е насочен срещу РНК полимераза (RNAP), която представлява ензим, участващ в иницирането, удължаването и прекратяването на първата фаза на генна експресия, транскрипция, която включва синтеза на РНК молекула от ДНК шаблон. До този момент, РНК полимераза е мишена за 10 вече създадени антибиотика (6).

До този момент АСО се прилагат успешно в редица терапии върху широк спектър от заболявания като невродегенеративни и нервно-мускулни нарушения (амиотрофична странична склероза, атеросклероза, болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, болест на Хънтингтън, мускулни дистрофии, възпалителни заболявания на червата, атеросклероза и ракови заболявания).

2. Цели и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящата докторска дисертация е да бъде извършен дизайн на три химерни антисенс олигонуклеотида, които специфично да се свързват с предварително избрани три мишени от генома на човешки патогенни бактерии и един химерен антисенс олигонуклеотид, който няма специфична цел от бактериалните геноми, и да се направи последваща оценка на тяхното използване за терапевтични цели.

2.2. Задачи

Да се извърши цялостен биоинформатичен и геномен анализ на човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus* и по-специално на части от **Рибонуклеаза Р (Ribonuclease P, RNase P) – *rnpB* и *rnpA***, и последователности от **иРНК** за β -субединицата на **полимераза Р (RNA polymerase)**.

Да се изберат три специфични мотива от генома на човешки патогенни бактерии - част от РНК от РНаза Р, иРНК на РНаза Р, бактериалната РНК полимераза, които да бъдат използвани като мишени за антибактериално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди.

Да се усвоят методи за компютърен дизайн на алостерични рибозими и антисенс олигонуклеотиди. Да се направи дизайн на три химерни антисенс олигонуклеотида, които специфично да се свързват с избраните три антибактериални мишени комплементарни на част от РНК от РНаза Р, иРНК на РНаза Р, бактериалната РНК полимераза.

Да се извърши биоинформатичен и геномен анализ на целия геном на *Staphylococcus aureus* и BLAST анализ на всички генетични последователности на видове в база данни NCBI. Да се направи дизайн на четвърти антисенс олигонуклеотид, който не притежава специфична мишена в бактериалния геном на патогенната бактерия *Staphylococcus aureus*, нито в някой от представените организми в NCBI.

Да се усвоят методи за инхибиране на гена експресия с антисенс олигонуклеотиди при бактерии. Да се провери експериментално ефективността на действието и специфичността на четирите химерните антисенс олигонуклеотиди *in vitro* в бактериалния човешки патоген *Staphylococcus aureus*.

Да се провери експериментално инхибиращият ефект на клетъчно проникващия белтък рVEC във висока концентрация.

3. Материали и методи

3.1. Материали

3.1.1 Биоинформатични бази данни и програми

Motif searcher – програма на проф. Роберт Пенчовски (<https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=43>). Програмата Motif searcher е вградена в уебсайта на проф. д-р Роберт Пенчовски и позволява търсенето на един или повече мотиви в ДНК, РНК и белтъчни последователности, които ние сами подаваме на програмата (7).

Rswitch - База данни на проф. Роберт Пенчовски (<https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=58>). Rswitch е база данни, която проф. д-р Роберт Пенчовски създава през 2020г. Тя е със свободен достъп до секвенциите на различни патогенни бактерии и съдържа информация за използването на рибопревключватели като антибактериални лекарствени цели. Всеки рибопревключвател е представен с пореден номер, име, аптамерни последователности, вторични структури, множествени подравнения, консервативни мотиви и биохимични пътища (8).

Rfam 14.1. (<https://rfam.xfam.org/>) Rfam е база данни, със свободен достъп, която предоставя съвкупност от над 3446 РНК фамилии (некодиращи РНК гени, цис-регулаторни елементи и саморазцепващи се РНКи) с техните РНК последователности, вторични структури, разпределение и филогенетични дървета. От нея бяха свалени последователностите от различни бактериални щамове на човешкия патоген *Staphylococcus aureus*.

NCBI – National Center of Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). NCBI е една от най-големите бази данни със свободен достъп и съдържа структурирана информация в отделни бази данни, свързани с основния уебсайт. Такива бази данни са Pubmed (научни публикации), Gene, Genome, GenBank и Nucleotide (ДНК последователности и пр.) Protein (белтъци), PubChem (химични процеси), BLAST (търсене на подобни райони). Научните публикации послужиха за детайлното представяне на проблема с антибиотичната резистентност, описан в Литературния обзор.

Expasy Swiss Bioinformatics Resource Portal
(<https://www.expasy.org/resources>).

Expasy е шведски биоинформатичен портал, източник на информация на геноми, метагеноми и транскриптомни данни, данни за белтъци и протеоми и еволюционна и популационна генетика.

Clustal W/Clustal X <http://www.clustal.org/clustal2/>

Clustal W/Clustal X е най-използвания биоинформатичен софтуер за подравняване на последователностите (alignment), който позволява откриване на подобности в две или повече последователности. С помощта на тази програма бяха анализирани наличните последователности от генома на *Staphylococcus aureus* и бяха избрани 3 участъка, към които след това бяха насочени специфични химерни антисенс олигонуклеотида.

RNAfold web server

(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) RNAfold е свободно достъпен софтуер, който изчислява нагъването на вторични структури на едноверижни РНК и ДНК. С помощта на RNAfold бяха нагънати вторичните структури на три избрани мотива от генома на *Staphylococcus aureus* и изчислена свободната енергия на термодинамичното свързване.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>).

KEGG: Киото енциклопедия на гени и геноми е база данни със свободен достъп, в която има данни за метаболитни процеси при различни организми и свързаните с тях биохимични пътища (KEGG pathways). Настоящата база данни послужи за анализиране на описаните биохимични пътища при човешкия патоген *Staphylococcus aureus*.

Текстови редактор Notepad ++.

Notepad ++ бе използвана за събиране и текстова редакция на част от РНК секвенцията на РНаза Р, секвенцията на иРНК на РНаза Р, и бактериалната секвенция на РНК полимераза при човешки патогенни бактерии.

3.1.2. Материали използвани в лабораторните *in vitro* експерименти

Клетки на човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

За целта на експеримента са използвани клетки *Staphylococcus aureus* щам ATCC 25923 придобити от Катедра Медицинска Микробиология на Медицински Университет в град София, България. Те са Грам-положителни бактерии със сферична форма с размери 0,8-1µm и оптимална температура +37 °C и pH 7.

Хранителна среда - LB (Lysogeny broth, Broth Miller, Luria Bertoni) – течна и твърда хранителна среда.

За целта на настоящата докторска теза е необходимо използването на течна и твърда хранителна среда LB. Течната хранителна среда се използва за бактериалния растеж на overnight бактериалните култури, последващото разреждане на прорасналите култури и определяне на бактериалния растеж на пробите, третирани с ACO 1, ACO 2, ACO 3, ACO 4 и контролните пробите. Течната хранителна среда LB служи и за калибриране при отчитане на пробите със спектрофотометър. За приготвянето ѝ в обем от 500 мл. са необходими 5 гр. триптон OXOID LP0042, 2,5 гр. дрождев екстракт OXOID LP0021, 5гр. NaCl и 500 мл. вода. Твърдата хранителна среда се използва за растеж на бактериалните *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 overnight върху петриева паничка. Тя се приготвя по същия протокол, като освен изброените съставки се добавят и 7,5 гр. агар на 500мл среда.

Използвани антисенс олигонуклеотиди (ACO, ASO) и клетъчно проникващ белтък (КПП, CPP).

В рамките на лабораторните експерименти за постигане на поставените цели и задачи бе тествана терапевтичната активност на четири химерни ACO (ACO 1, ACO 2, ACO 3 и ACO 4, Таблица 1.), чийто дизайн създадохме ние и подадохме за нуклеотиден синтез в американската компания GeneLink (<http://www.genelink.com/>).

АСО	КПП рVEC прикачен към различни олигонуклеотиди	Мишена	Дължина в аар и nt
АСО 1	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys T1G1C1T2C2C2T2A2C2C2A2A2A2T2T2T2G2G2A1T1T1	Части от РНК на РНаза Р	рVEC: 18аар PS-ДНК: 21nt
АСО 2	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys A1T1T1C2T2G2T2A2T2T2T2G2T1A1A1	иРНК за РНаза Р	рVEC: 18аар PS-ДНК: 15nt
АСО 3	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys G1T1T1T2G2G2T2C2C2C2T2C2A2G2G2T2G2T2T2-T1C1A1	иРНК за β-субединицата на РНК полимераза	рVEC: 18аар PS-ДНК: 22nt
АСО 4	Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys U1A2C2G2C2T2C2G2G2A2C1	Няма специфична цел	рVEC: 18аар PS-ДНК: 11n
рVEC	рVEC: Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys	Няма специфична цел	рVEC: 18аар

Таблица 1. Използвани АСО и клетъчно проникващи пептидни последователности за тестване на антибактериалната им активност в *in vitro* експерименти обект на настоящата докторска теза със *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. PS-ДНК означава фосфоротионатна ДНК. С е „1“ отбелязана „2-O-CH₃“ модификация на ДНК олигомерите, докато „2“ показва PS-модификация на ДНК на ДНК олигомерите. С „аар“ са отбелязани аминокиселинните остатъци, а с „nt“ нуклеотидите.

3.1.3. Използвана апаратура

Компютър и софтуерни програми – за извършване на биоинформатичните и геномни анализи, обработката на данни, анализ на получените резултати, създаването на фигурите и написването на научния текст.

BLAST алгоритъм за търсене на подобности – Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Алгоритъмът за търсене на подобност позволява сравняването на нуклеотидни или белтъчни последователности с последователности, които са известни и качени в най-голямата база данни – NCBI. След предлагане на мотив от бактериалния геном, който да бъде използван за комплементарно специфично насочване на АСО е необходимо той да бъде проверен дали присъства в човешкия геном. С помощта на BLAST, в рамките на биоинформатичните анализи, за постигане на целта на настоящата докторска теза, проверихме дали прицелването в определен от нас целеви мотив би засегнало човек или друг организъм – мишка, пробиотични бактерии и други.

Уеб сървър **Vienna RNAfold web server, (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)**. Уеб сървърът Vienna RNAfold позволява анализирането на нуклеотидни последователности и изчисляването на вторичните им структури. Нуклеотидните последователности се въвеждат във FASTA файлове или се вписват директно и могат да бъдат едноверижни ДНК или РНК последователности. Настоящото ограничение за изчисляване на статистическа функция (partition function) е 7500 нуклеотида, а за предсказване на минимална свободна енергия е 10 000нт. Всички целеви последователности на отделните АСО-и бяха компютърно тествани в уеб сървъра и техните вторични структури бяха изчислени. Те позволиха разглеждането на структурата им и последващото им представяне в създадените от нас фигури с помощта на Adobe Illustrator.

Adobe Illustrator – представлява една от най-често използваните програми за създаване на илюстрации с голяма резолюция и огромен асортимент от предоставени инструменти. Работата с програмата е лесна и благодарение на нейните възможности бяха създадени фигурите в настоящата докторска дисертация, както и тези включени в научните публикации и книги.

Origin Pro 8 – с нейна помощ, бяха анализирани получените експериментални данни от лабораторните експерименти. С програмата OriginPro бяха създадени и част от диаграмите.

Фризер Forma 700 series се използва за съхранение на бактериални *Staphylococcus aureus ATCC 25923* глицеролни култури и хладилник **НОТРОИТ**, за съхранение при 4 °C на температурно-чувствителни реактиви като АСО 1, АСО 2, АСО 3, LB хранителни среди и др.

Инкубатор за култивиране на бактерии Memmert. Използваният от нас инкубатор има автоматичен стерилизационен цикъл и дигитален контрол на влажността, температурата и нивото на CO₂.

Комбиниран инкубатор с клатене Enviromental Shaker Incubator ES-20. Използва се за култивиране на бактерия *Staphylococcus aureus ATCC 25923* след третирането му с АСО 1, АСО 2 или АСО 3 в условия на скорост на въртене 220 rpm и температура от +37 °C.

Термостат Bio TDB-100 – използван за разтопяване на АСО 1, АСО 2 и АСО 3. Термостатът с мощност от 200W позволява контрол на температурата на топене в диапазона от +25 °C до +100 °C.

Електронна везна KERN 250-3 – използвана за прецизното измерване на реактивите, участващи в състава на течната и твърдата LB хранителна среда. Максималното измерено тегло за едно измерване е 250 гр., а минималното количество е 2 гр.

Вортекс MIX 603.0129.02 – използван за хомогенизирането на различни проби в Епендорф епруветки. Мощността на уреда е 45 W и позволява регулирането на скоростта му на въртене от 100 rpm до 3000 rpm.

Автоклав SANYO MLS-3781L – извършва стерилизация в диапазона от 115 °C до 135 °C. Уредът е използван за разтваряне и стерилизиране на течна и твърда LB хранителна среда в продължение на 180 минути на +120 °C. и за автоклавирането на инструментите и посудата, които позволяват

Спектрофотометър Ultrospec 1000E UV/Visible. Спектрофотометърът бе използван за измерване на плътността на прорастване на третираните и нетретираните бактериални култури от *Staphylococcus aureus ATCC 25923* с АСО 1, АСО 2, АСО 3, АСО 4 и КПП при дължина на вълната от 600 nm. Уредът притежава възможност за измерване при дължина на вълната от 200-900 nm.

Електрофореза Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 3500 – за определяне на големината на амплифицираните фрагменти и установяване на ефект след третиране на *Staphylococcus aureus ATCC 25923* с АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4.

Вертикален Ламинарен бокс клас II, Linea blue air mini flow FLV - използван за работа в стерилни условия с петри, кювети, реактиви, течна и твърда LB хранителна среда, *Staphylococcus aureus ATCC 25923* и антисенс олигонуклеотидите АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4.

3.2. Методи

3.2.1. Биоинформатични методи

В настоящата докторска дисертация се използват редица биоинформатични методи, които позволяват да бъдат предварително анализирани големи обеми от информация и геномни данни. Вследствие на анализирания геномни последователности, генерираните FASTA файлове, проведеното множество подравняване (multiple alignment) от програмата Clustal X и проведеният BLAST анализ, бяха избрани три мотива от геномни последователности, към които специфично да се насочат три отделни АСО. Благодарение на BLAST анализа бе проверено дали трите специфични мотива от бактериалната последователност се откриват в човешкия геном. На база биоинформатичните анализи бе направен и дизайн на четирите АСО – АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4, последващо те бяха тествани лабораторно за да бъде направена оценка за тяхното използване за терапевтични цели. Благодарение на прецизния предварителен биоинформатичен анализ, времето за лабораторни изследвания бе оптимизирано и успеваемостта на експериментите бе повишена.

3.2.2. Експериментална работа

Култивиране на бактериални клетки *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. За обект на извършените експериментални лабораторни задачи е избран бактериален човешки патоген *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Течната LB хранителната среда се приготвя съобразно протокола и съдържа: 10 г. Триптон OXOID LP0042, 5 гр. дрождев екстракт OXOID LP0021, 10 гр. NaCl и 1000 мл. вода за обем от 1000 мл. Готовата среда се автоклавира на +120 °C за 30 минути и след това се охлажда и прибира в хладилник за съхранение на +4 °C. За култивирането на бактериалния щам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в течната LB среда се използват 5 µl от размразената бактериалната култура в 15мл. LB хранителна среда, или се взема 1 колония от посявка на петри в 25 мл. LB хранителна среда. След поставянето на бактериите в течната хранителна среда, те се култивират за интервала от 12 до 18 часа в термостат на +37 °C с аерация. След изтичане на времето за култивиране, флаконите със среда и бактерии се изваждат за третиране с АСО и определяне на бактериалната преживяемост или се преместват за съхранение в хладилник на 4 °C.

Твърдата LB хранителна среда се приготвя в обем от 1000 л. съобразно протокола и съдържа: 10 г. Триптон OXOID LP0042, 5 гр. дрождев екстракт OXOID LP0021, 10 гр. NaCl, 15 гр. агар и вода до 1000 мл. Средата се автоклавира при описаните по-горе условия и след изстиване се прибира за съхранение при +4 °C в хладилник с капациите на петриевите панички надолу. Култивирането на бактериалния щам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 може да се осъществи по два различни начина – от размразени глицеролни култури, посредством шпатула на Дригалси или чрез йозе. При първия метод се отмерва с пипета 5 µl размразена бактериална глицеролна култура, която се посява с кръгови движения по повърхността на твърдата хранителна среда, предварително разлята в петри. При втория метод, се използват 5 µl размразена бактериална глицеролна култура, която се разнася с щрихови движения по повърхността на хранителната среда в петри. Готовите петрита се обръщат с капациите на долу и се култивират overnight, в термостат, при температура от +37 °C.

За да бъдат съхранени по-дълго време клетъчните култури от *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 е необходимо тяхното замразяване. То се осъществява, след като една бактериална колония от петри се инокулира в 20 мл. течна LB хранителна среда и се инкубира overnight в термостат при +37 °C и аерация. При достигане на оптична плътност (OD) OD₆₀₀ в диапазона от 0,6-0,8 инокулатът минава през вортекс за 2 секунди и се разлива в стерилни Епендорф епруветки с обем на течността 500 µl. Постепенно се добавят 500 µl глицерол (60%). Епруветките се затварят, запечатват се с парафилм и се прибират за съхранение на -80 °C.

Експериментално определяне на бактериална преживяемост

След достигане на стойности на оптична плътност при дължина на вълната от 600nm се прави разреждане на инокулата с течна хранителна LB среда в съотношение в 1:1000. От ново получения инокулат се отпипетират в стерилни кювети по 100 µl за контролите и в останалите кювети с проби за различните АСО концентрации на АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4 по-малко микролитри при краен обем от 100 µl. За всяка отделна проба с различна концентрация на АСО се правят по три измервания срещу контрола. За определяне на бактериалната преживяемост се измерва OD₆₀₀ на кюветите чрез фотоспектрометър на всеки 30 минути. Всяка една от кюветите с пробите се култивира между всяко отделно повторение на измерването в инкубатор с клатачка при +37 °C. Всички получени резултати се анализират с помощта на програмата OriginPro 8.

4. Резултати

За осъществяване на основната цел на настоящата докторска дисертация са проведени биоинформатични анализи и лабораторни експерименти с четири проектирани за първи път антисенс олигонуклеотида и клетъчно проникващия пептид рVЕС. Три от антисенс олигонуклеотидите са проектирани и насочени към специфични участъци от бактериалния геном на човешкия патоген *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Първият антисенс олигонуклеотид (АСО 1) е насочен да се свърже с участъци от РНК на рибонуклеаза Р. Вторият антисенс олигонуклеотид (АСО 2) е насочен към иРНК на РНаза Р. Третият антисенс олигонуклеотид (АСО 3) е насочен към иРНК на β -субединицата на РНА полимерата при бактерията. Четвъртият антисенс олигонуклеотид (АСО 4), бе проектиран да няма специфична цел от бактериалния геном. Четирите антисенс олигонуклеотида са химерни АСО, свързани с клетъчно проникващ пептид – рVЕС. Допълнителни анализи бяха проведени и върху самостоятелния инхибиращ ефект на клетъчно проникващия пептид рVЕС. Всеки един от проведените експерименти е извършен четирикратно, като е изчислена средната стойност на измерванията и въз основа на нея се проектираха графики, които показват стандартното отклонение, отразяващо количеството на вариация или дисперсия на набор от стойности. Като резултат от експерименталната проверка се потвърди бактерициден ефект на три от антисенс олигонуклеотидите, което ги превръща в потенциални терапевтични агенти, които могат да бъдат приложени като част от антибактериална терапия при инфекции, причинени от *Staphylococcus aureus*. Всеки от експериментите е извършен четири пъти.

Staphylococcus aureus е Грам-положителна сферична бактерия, откриваща се в дихателните пътища на човек и върху кожата и лигавиците му. Бактерията е част от списъка с човешките патогенни бактерии, които водят до бактериални инфекции и усложнения като инфектирани рани, пневмония, остеомиелит и дори отравяне на кръвта, довеждащо сепсис. Една група от стафилококите проявяват резистентност към метицилиновите антибиотични препарати. Те се отбелязват като MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Инфекциите причинени от MRSA бактериални щамове често продължават по-дълго, изискват по-сериозно антибиотично лечение, изключващо метицилинови препарати и по-високи разходи за медицински грижи. Бактериалният щам ATCC 25923, като клиничен изолат, често се използва за лабораторни анализи на антибиотичната чувствителност на бактерията спрямо различни антибактериални агенти.

4.1. Дизайн на първи химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 1)

4.1.1. Мишена на АСО 1

Първият антисенс олигонуклеотид, обект на настоящата докторска дисертация, е проектиран така, че да бъде насочен и да се свърже комплементарно с участъци от РНК на рибонуклеаза Р (РНaza Р) при човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Рибонуклеаза Р (РНaza Р, RNase Р, EC 3.1.26.5) е рибонуклеаза, рибозима, т.е. рибонуклеинова киселина, която катализира разцепването на РНК. Нейната основна функция е да раздели прекурсорната последователност от 5'-края на пре-тРНК. РНaza Р при човек е отговорна за правилната и ефективна транскрипция на малки некодиращи РНК, като тРНК, 5S рибозомална РНК и SRP частиците, транскрибирани от РНК Полимераза III (9-14). Структурата на РНaza Р при бактерии е изградена от два компонента - РНК верига, наречена М1 РНК, и полипептидна белтъчна верига, наречена С5 белтък, която повишава афинитета за свързване на рибозомата с нейния субстрат. При *in vivo* експерименти и М1 РНК и С5 белтъка са необходими, за да функционира правилно РНaza Р рибозимата. Експерименти *in vitro* показват, че М1 РНК може самостоятелно, без присъствието на С5 белтъка да упражнява каталитична функция (15). Структурните елементи на Рибонуклеаза Р могат да бъдат наречени и по втори начин М1 е познат още като Р RNA, а малкият белтъчен компонент се нарича рибонуклеазен Р протеин - RnpA. RnpA се предполага, че може да представлява обещаваща нова антибиотична терапевтична стратегия за лечение на инфекции, причинени от *Staphylococcus aureus*.

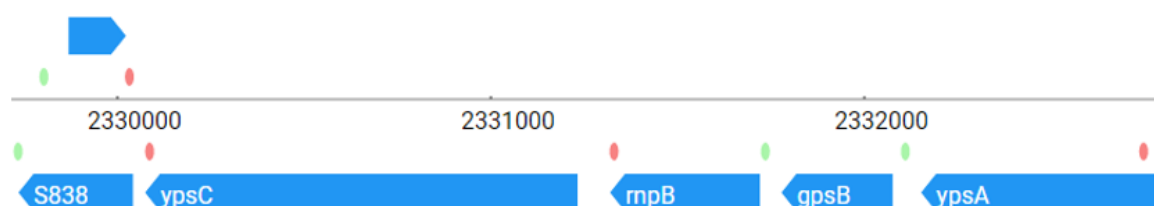
4.1.2. Дизайн на химерен АСО 1

След извършване на биоинформатичен и геномен анализ на целия геном на бактерията *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, бе избрана част от генетичната последователност на бактерията за Рибонуклеаза Р, позната като *rnpB* рибонуклеаза с дължина 349 нуклеотида. Тя е показана на Фигура 1. Синонимно наименование, с които се открива рибонуклеаза *rnpB* в литературата, е *rnaP*. РНК компонентата от РНаза Р, *rnpB* е отговорна за разрязването на прекурсорните последователности от 5'-края на пре-тРНК. Продуктът на *rnpB* представлява каталитична субединица, рибозома, част от структурата на рибонуклеаза Р. Функцията му е есенциална за бактериите и по тази причина го избираме за цел, към която да насочим антисенс олигонуклеотид, който да блокира генната му експресия и да доведе до невъзможност бактериалната РНаза Р да функционира (16-20).

Рибонуклеаза *rnpB* при *Staphylococcus aureus*

```
GAGGAAAGTCCGGGCTCACACAGTCTGAGATGATTGTAGTGTTTCGTGCTTGATGAAAC
AATAAATCAAGGCATTAATTTGACGGCAATGAAATATCCTAAGTCTTTTCGATATGGATAGA
GTAATTTGAAAGTGCCACAGTGACGTAGCTTTTATAGAAATATAAAAGGTGGAACGCGG
TAAACCCCTCGAGTGAGCAATCCAAATTTGGTAGGAGCACTTGTTTAACGGAATTCAAC
GTATAAACGAGACACACTTCGCGAAATGAAGTGGTGTAGACAGATGGTTATCACCTGAG
TACCAGTGTGACTAGTGACGTGATGAGTACGATGGAACAGAACGCGGCTTAT
```

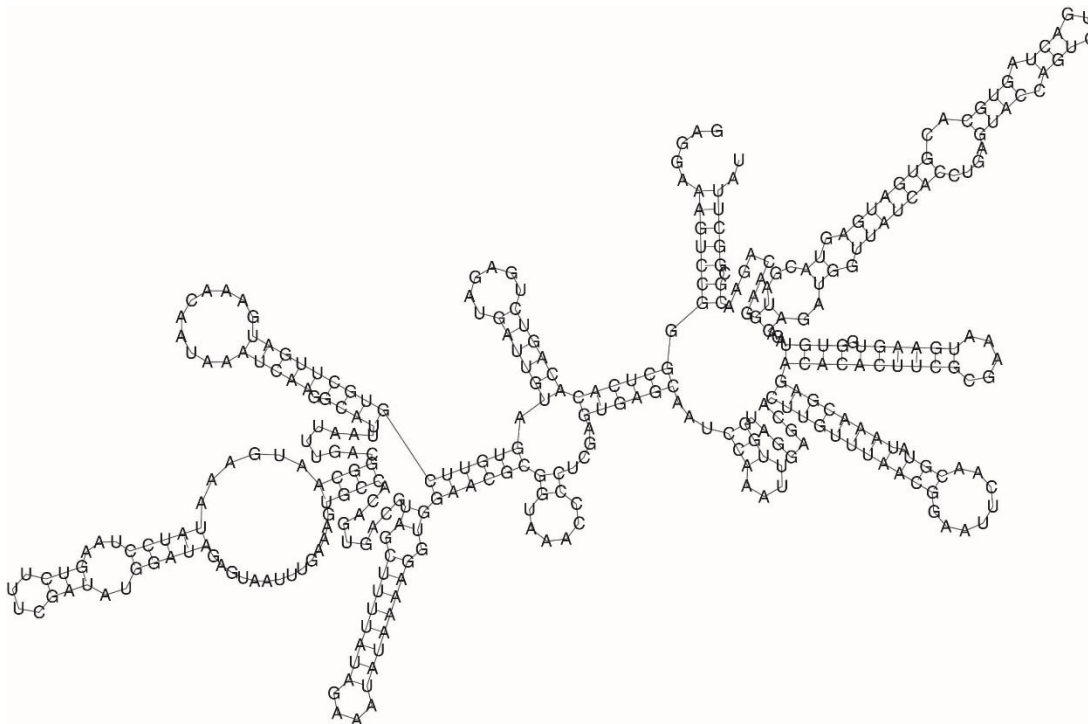
Локализиране на *rnpB* в *Staphylococcus aureus*



Фигура 1. Рибонуклеаза *rnpB* *Staphylococcus aureus*. На фигурата е показана генетична последователност на рибонуклеаза *rnpB* при *Staphylococcus aureus*. Показана е още локализацията на гена *rnpB* в генома на бактерията. В синьо са показани отделните гени. В зелено е маркиран 5'-краят на всеки транскрипт, а в червено 3'-краят му. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

С известната ни секвенция от Фигура 1. с помощта на RNA fold server, създадохме нагънат модел на вторичната ѝ структура, както и изчислихме нейната минимална свободна енергия. Получената вторична секвенция е представена на Фигура 2. и в детайли могат да бъдат разгледани на следния уеб адрес: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=gjj7HzYBvb>

Резултати за минимална прогноза за свободна енергия на оптималната вторична структура на участъка от РНaza P в човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus* е -81,00 kcal/mol.



Фигура 2. Вторична структура на gnrV рибонуклеаза. Структурата е създадена на база генетичната последователност на gnrV рибонуклеаза от *Staphylococcus aureus* с дължина 349 нуклеотида с помощта на Vienna RNAfold server.

След определянето на участъка от геномната бактериална ДНК, отговарящ за рибонуклеаза gnrV се избира малък фрагмент, който започва от 197 позиция от секвенцията на фигура 13. Този фрагмент има дължина 21 нуклеотида и следната последователност: 5'-AATCCAAATTTGGTAGGAGCA-3'. Той бива използван от нас за създаване на специфичен комплементарен антисенс олигонуклеотид, който да го открие и да се свърже с него като образува връзки. Избраната мишена е специфична за бактериалния щам на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Антисенс олигонуклеотида, който проектирахме е химерен АСО с модификации от първа и втора генерация. В 5'-края и 3'-края на антисенс олигонуклеотида е направена замяна на фосфодиестерната връзка с фосфотиоатна връзка. При тази модификация, единият от кислородните атоми е заменен със серен атом. Тази PS модификация е характерна за първа генерация АСО. В допълнение на това, един от водородните атоми е заменен с O-CH₃ група, при което се наблюдава модификацията на АСО от втора генерация – метилиране. По този начин основната последователност на антисенс олигонуклеотида има дължина 21 нуклеотида и изглежда така:

5'-T1G1C1T2C2C2T2A2C2C2A2A2A2T2T2T2G2G2A1T1T1-3'. След всеки един от нуклеотидите присъства число 1 или 2. С тях се отбелязват модификациите от първа и втора генерация както следва:

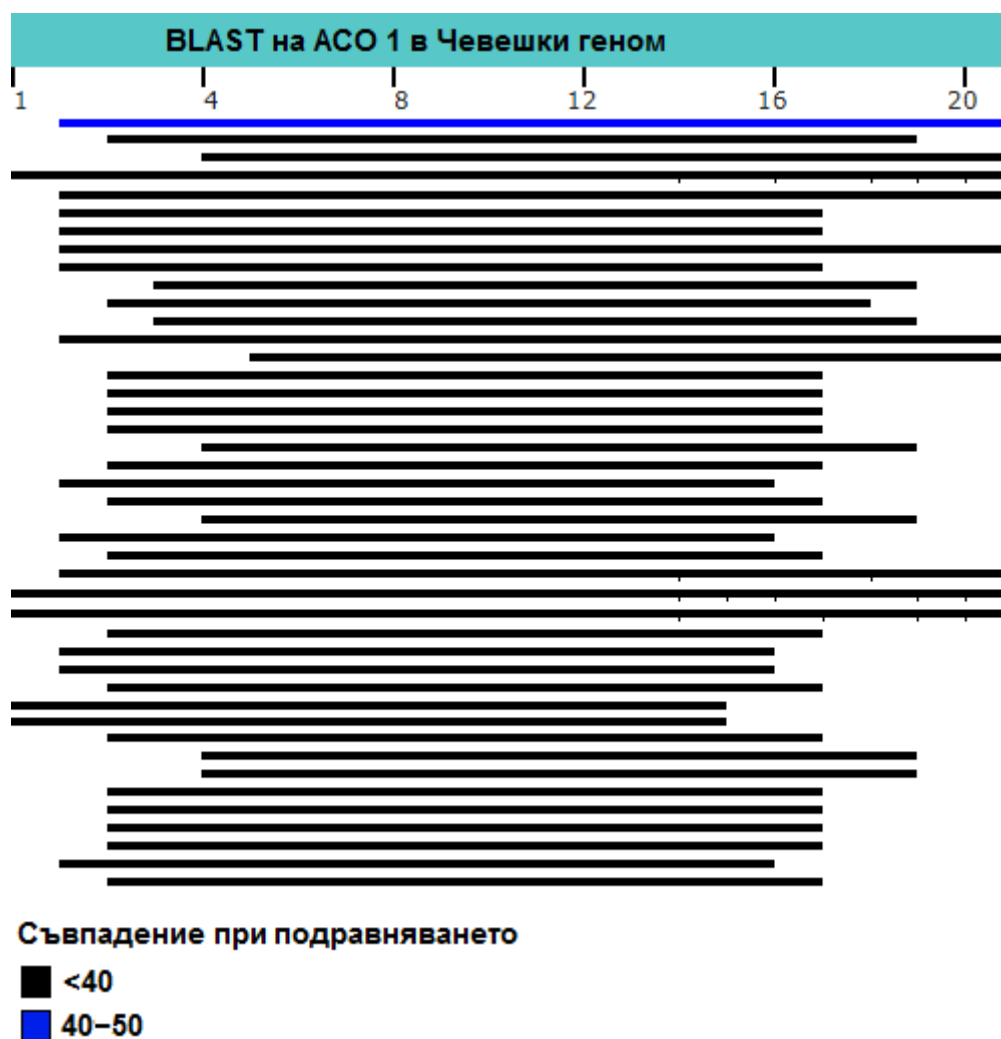
- с число „1“ са отбелязани 2'-O-CH₃ модификациите от втора генерация
- с число „2“ са отбелязани фосфотиоатните модификации, PS модификации от първа генерация.

Получената структура на АСО 1 след модификациите осигурява едновременното активиране на РНаза Н-зависимата хидролиза на целевата секвенция - *grpB* рибонуклеаза, както и по-висока специфичност на свързване между АСО 1 и целта му. Структурата осигурява и предпазването на АСО 1 от ендонуклеазно и екзонуклеазно ензимно разграждане *in vivo*.

Проектирахме към АСО 1 да бъде прикрепен клетъчно проникващ пептид – рVEC, който да позволи нашия терапевтичен агент да навлезе в бактериалната клетка и да успее да се свърже със своята мишена и след това да прояви функцията си към нея.

Механизмът на действие на АСО 1 е показан на Фигура 3. След проникване в клетката с помощта на рVEC, АСО 1 се насочва към своята цел – участъкът от РНаза Р, за която е проектиран - 5'-AATCCAAATTTGGTAGGAGCA-3', започващ от 197 позиция. Химерният антисенс олигонуклеотид 5'-T1G1C1T2C2C2T2A2C2C2A2A2A2T2T2T2G2G2A1T1T1-3' разпознава своята цел и хибридизира напълно комплементарно с нея. РНаза Н-зависимата хидролиза се активира, като РНаза Н се насочва към мястото на свързване на АСО 1 и мишената и предизвиква разкъсване в структурата на иРНК. В резултат на това разкъсване не се наблюдава генна експресия на *grpB*, т.е бактериалната клетка не би могла да синтезира Рибонуклеаза RnpB.

За да бъде един антисенс олигонуклетид пригоден за използване върху причинители на бактериални инфекции в човека, е необходимо, неговата цел да не се открива в човешкия геном или ако се открива, то да се припокрива частично с тази на АСО. По тази причина, за да проверим дали целта на АСО 1 се открива в човешкия геном, извършихме допълнителни BLAST анализи и RefSeq от База данни Nacional Center of Biotechnology Information, NCBI. Резултатите от Basic local alignment tool анализа, показаха липса на съвпадение с пълния набор нуклеотиди на АСО 1. Според резултатите от анализа, последователността на АСО 1 се открива в една единствена генетична последователност от човешки ВАС clone СТА-360L10 от 7, със съвпадение от 40-50%. При всички останали частични съвпадения, процентът е под 40%.

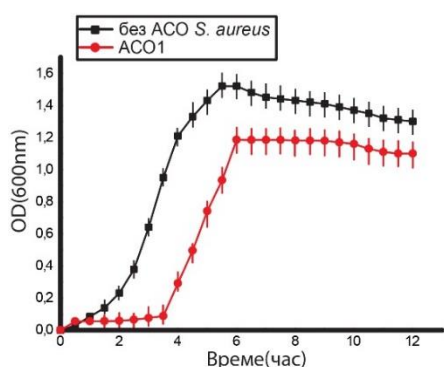
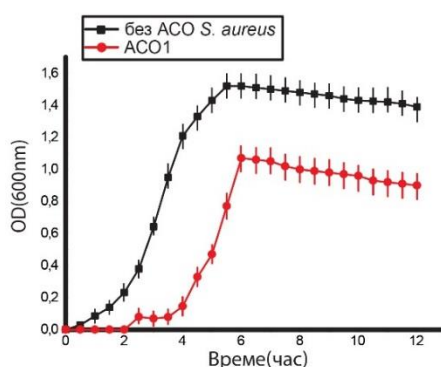
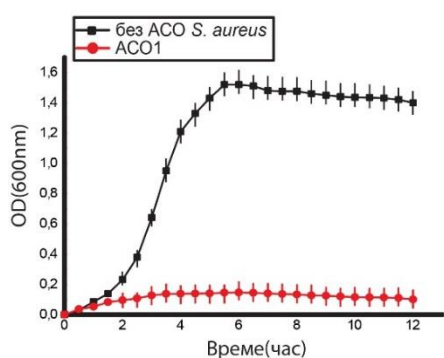
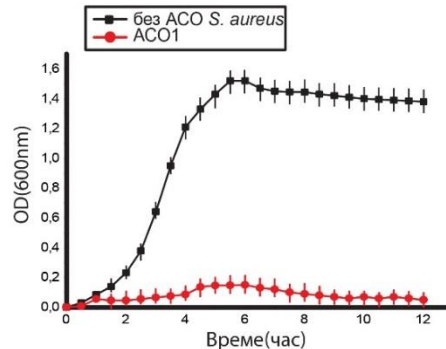


Фигура 4. Резултат от BLAST анализ на последователността на АСО 1 в човешки геном.

4.1.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 1 за терапевтични цели

След проведените биоинформатични и геномни анализи по отношение на АСО 1 и възможността да го насочим към *rnpB* от РНаза Р и след всички заключения, които последваха от тях, пристъпихме към провеждане на лабораторни анализи, *in vitro*, върху клетъчни култури на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Протоколът за осъществяване на експериментите е посочен в т. 4.2.2. “Експериментална работа”.

Бактериалните колонии, които бяха използвани за провеждане на експеримента, се съхраняваха като глицеролна култура при -80 °С. След изваждане от фризера бактерията се култивира за една нощ в LB среда в инкубатор Memmert при +37 °С. Експериментите с бактериите започват в момента, в който те достигнат своята експоненциална фаза на растеж. За да се установи тя, се правят измервания със спектрофотометричен апарат. Измерването се осъществява с оптимална оптична плътност OD при 600 nm дължина на вълната със стойности в диапазона от 0,5 до 0,9 nm. При навлизане на бактериите в експоненциалната фаза на растеж се прави разреждане 1: 1000 от бактериалния инокулат с течна LB среда. В Кювета се смесват разредените бактериални клетки, стерилна вода и $MgCl_2$. Приготвят се кювети, в които няма АСО 1, които се използват за контрола. Измерва се оптичната плътност на всяка една от кюветите на всеки 30 минути в продължение на осем часа, при дължина на вълната 600nm. Проведохме поредица от експерименти, в които тествахме действието на АСО 1 при различни негови концентрации, които биваха съпоставени с контролни проби. Тестваните концентрации са 750 nM, 1500 nM, 2100 nM и 4500 nM. От получените експериментални резултати се вижда, че в пробите, съдържащи най-високата концентрация АСО 1, а именно 4500 nM, се наблюдава максималното инхибиране на бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus*. Експериментът беше повторен четири пъти. При всяко едно от повторенията, резултатите се потвърдиха. При концентрация от 750 nM на АСО 1, бактериалния растеж достига максимум около 1,1 оптични единици след инкубационно време от шест часа. При концентрация от 1500 nM на АСО 1, максимумът на бактериалната плътност достига около 1,0 оптични единици след инкубационно време от шест часа. При концентрация от 2100 nM на АСО 1, плътност от 0,1 оптични единици се достигат след инкубационно време от четири часа. При концентрация от 4500 nM, максимална плътност от 0,2 се достига след шест часа инкубационно време. Получените резултати са показани на Фигура 5.

А АСО1 концентрация 750nM**Б АСО1 концентрация 1500nM****В АСО1 концентрация 2100nM****Г АСО1 концентрация 4500nM**

Фигура 5. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които са насочени към части от РНК на РНКаза Р при *Staphylococcus aureus*. На фигурата са показани четири отделни експеримента проведени в присъствие и отсъствие на АСО 1. Всеки експеримент е повторен четири пъти и е изчислена средната стойност от четирите измервания, въз основа на която бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 . Кривите на бактериален растеж в червен цвят и червени кръгове отговарят на бактериалния растеж в присъствие на антисенс олигонуклеотида и показват неговата инхибираща гnrV активност. Кривите в черен цвят, с черни квадрати отговарят на бактериалния растеж без присъствието на АСО 1. **(А.)** АСО 1 в концентрация от 750 nM инхибира растежа на бактериите. **(Б.)** АСО 1 в концентрация от 1500 nM инхибира бактериалния растеж. **(В.)** При концентрация от 2100 nM, АСО 1 инхибира в по-голяма степен бактериалния растеж. **(Г.)** В най-висока концентрация от 4500 nM, АСО 1 проявява най-голям инхибиращ ефект по отношение на бактериалния растеж. Изчисленият MIC95 за АСО 1, който хибридува до неговата комплементарна последователност и контролира генната експресия, е MIC95 2100 nM. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.2. Дизайн на втори химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 2)

4.2.1. Мишена на АСО 2

Вторият антисенс олигонуклеотид, обект на настоящата докторска дисертация, е проектиран така, че да бъде насочен и да се свърже комплементарно с участък от РНК на рибонуклеаза Р познат като *rnpA* при човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Бактериалната RnpA представлява белтъчен компонент от РНаза Р, който извършва срязване на прекурсорните секвенции от 5'-края на пре-тРНКи. Генът *rnpA* има последователност от 354 нуклеотида. Намира се в локус BSU_41050, между *yidc1* и *S2* (Фигура 6).

Белтъкът RnpA, кодиран от *rnpA*, представлява субстрат специфичния белтъчен компонент на РНаза Р с дължина 116 аминокиселинни остатъка. Молекулната му маса е 13,66 kDa, с изоелектрична точка 10,80, и пореден номер Е.С. 3.1.26.5. Той е от важно значение за бактерията и може да бъде наречен есенциален за нея. RnpA изпълнява два много важни за бактерията клетъчни процеса. Първият е, че белтъкът RnpA медира РНК деградацията. Вторият е, че когато работи в синхрон с RnpB, образува холоензима РНаза Р, който има отношение за узряването на тРНКи (21-26).

В последните две години, RnpA се разглежда от учените като обещаваща нова цел за откриване на лекарствени препарати и по-конкретно по отношение на устойчивия на метицилин *Staphylococcus aureus*. Открита е малка молекула наречена RNPA2000. С нея се правят много проучвания, за да се уточни нейната структурна активност, което води и до откриването на нови аналози притежаващи клетъчна токсичност. Поради негативния ефект на токсичността, която се натрупва в следствие на приложението им, те не могат да бъдат подходящи за приложение при човек като антибактериални терапевтични агенти.

Изхождайки от публикуваните научни резултати за наблюдаване на бактерициден ефект, при приложение на агент, който да инхибира *rnpA*, ние използваме *rnpA* за цел на нашия втори експеримент. Към нея предлагаме да бъде насочен химерен антисенс олигонуклеотид – АСО 2, който да се свърже комплементарно с участък от своя вариант на химерен антисенс олигонуклеотид и да инхибира *rnpA* и в следствие белтъка RnpA.

Елементът rnpA при *Staphylococcus aureus*

ATGTTATTGGAAAAAGCTTACCGAATTA AAAAGAATGCAGATTTTCAGAGAATATATAAA
AAAGGTCATTCTGTAGCCAACAGACAATTTGTTGTATACACTTGTAATAATAAAGAAATA
GACCATTTTCGCTTAGGTATTAGTGTTTCTAAAAAACTAGGTAATGCAGTGTTAAGAAAC
AAGATPAAAAGAGCAATACGTGAAAATTTCAAAGTACATAAGTCGCATATATTGGCCAAA
GATATTATTGTAATAGCAAGACAGCCAGCTAAAGATATGACGACTTTACAAATACAGAAT
AGTCTTGAGCACGTA CT TAAAATTGCCAAAGTTTTTAATAAAAAGATTAAGTAA

Локализиране на rnpA в *Staphylococcus aureus*



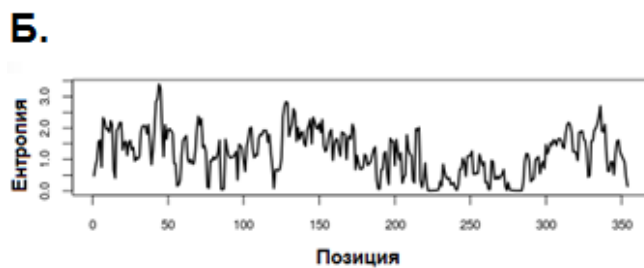
Фигура 6. Белтъчен компонент на РНаза Р rnpA при *Staphylococcus aureus*. На фигурата е показана генетична последователност на белтъчния компонент rnpA при човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*. Показана е и локализацията на гена rnpA в генома на бактерията. В синьо са оцветени отделните гени и нови РНК функции. В зелено е маркиран 5'-краят на всеки транскрипт. Авторска фигура на Екатерина Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.2.2. Дизайн на химерен АСО 2

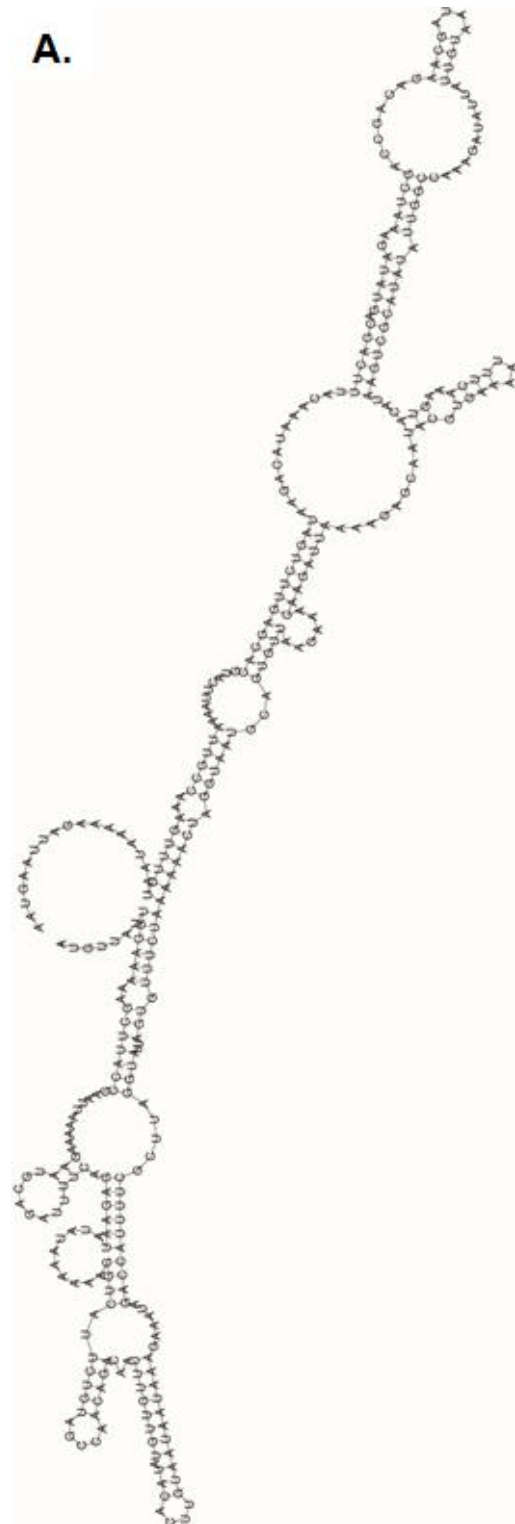
След извършване на биоинформатичен геномен анализ на целия геном на бактерията *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, избрахме да използваме генетичната последователност на бактерията за Рибонуклеаза Р, позната като *rnpA*, кодираща белтъчната компонента на РНаза Р, с дължина 354 нуклеотида. Тя е представена на Фигура 6.

С помощта на Vienna RNA fold server изчислихме модел на вторичната ѝ структура и нейната минимална свободна енергия. Получената вторична секвенция е представена на Фигура 7. Оптималната вторична структура има минимална свободна енергия -55.00 kcal/mol. Свободната енергия на термодинамичното свързване е -61,17 kcal/mol.

Всички останали математически изчислени модели и данни, въз основа на анализа са достъпни на следния уеб адрес: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=Ia98DspQ9V>



Фигура 7. Вторична структура на *rnpA* при *Staphylococcus aureus*. (А.) Структурата е създадена на база генетичната последователност на *rnpA* от *Staphylococcus aureus* с помощта на Vienna RNAfold server. (Б.) На фигурата е показана още и позиционната ентропия на всяка една от позициите.



След провеждане на задълбочен биоинформатичен и геномен анализ на известната бактериална ДНК, кодираща белтъчната компонента RnpA, от нея избрахме малък фрагмент, който започва от 286 позиция от последователността показана на Фигура 6. Този фрагмент има дължина 15 нуклеотида и следната последователност:

5'-TTACAAATACAGAAT-3' и ни служи за създаване на специфичен антисенс олигонуклеотид, който да я открие и да се свърже с нея пълно комплементарно. Избраната от нас мишена е специфична за бактериалния щам на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

За да достигне до избраната от нас целева последователност, създадохме химерен АСО с модификации от първа и втора генерация – АСО 2. На неговите 5'- и 3'-краища проектирахме замяна на фосфодиестерната връзка с фосфотиоатна връзка. В следствие на нея, единият от кислородните атоми се заменя със серен атом. Същата модификация, характерна за първа генерация АСО, приложихме и при АСО 1. В допълнение на нея, проектирахме замяна на един от водородните атоми с O-CH₃ група. По този начин придадохме свойства на АСО 2 като на антисенс олигонуклеотид от втора генерация. Тъй като нашата целева мишена има дължина от 15 нуклеотида, то за да е напълно комплементарен с нея, проектираният от нас АСО 2 също има дължина от 15 нуклеотида. Проектирахме основната му последователност да изглежда така:

5'- A1T1T1C2T2G2T2A2T2T2T2G2T1A1A1-3', като

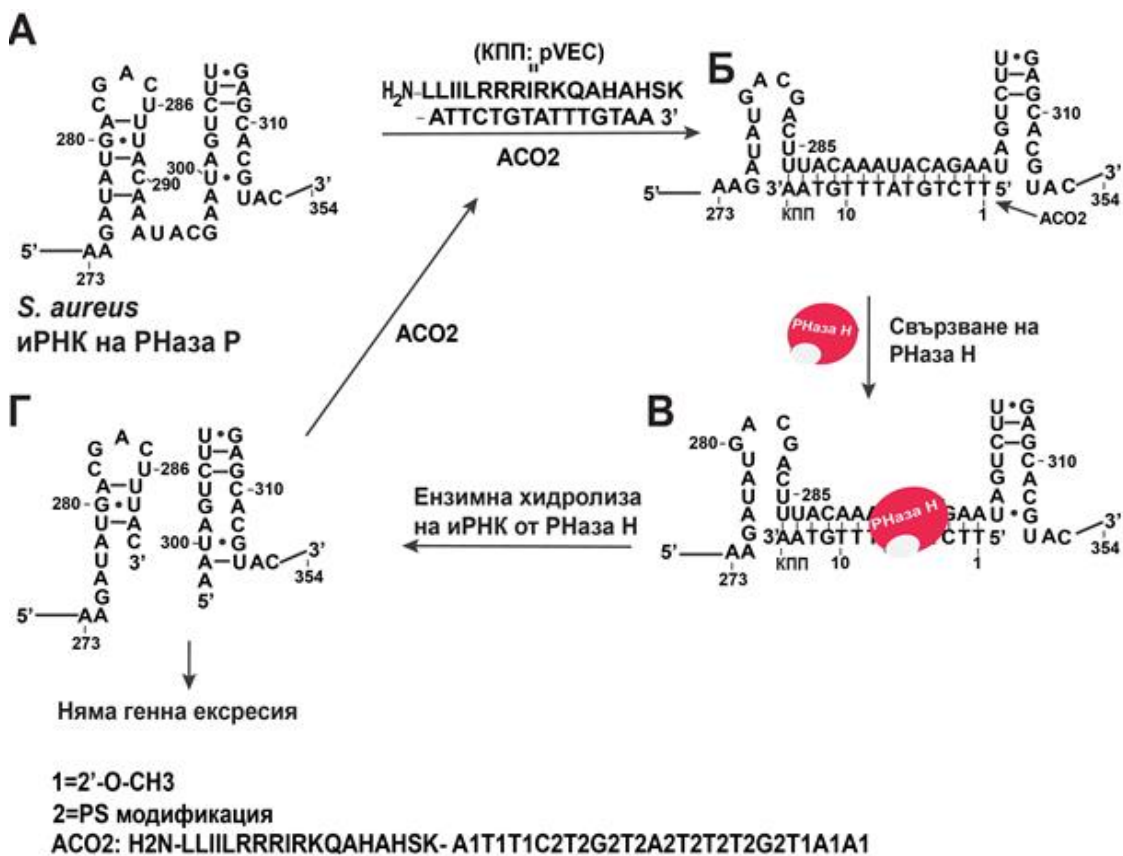
- с число „1“ са отбелязани 2'-O-CH₃ модификациите от втора генерация
- с число „2“ са отбелязани фосфотиоатните модификации от първа генерация.

В този вид, АСО 2 има структура, която му осигурява активиране на РНаза Н-зависимата хидролиза на целевата секвенция – *rnpA* от РНаза Н и високия афинитет за свързване между него и мишената му. Благодарение на модификациите, които претърпяха нуклеотидите му, АСО 2, подобно на АСО 1 е предпазен от ензимно разграждане *in vivo* в бактерията гостоприемник.

За да може да прониква в клетката, проектирахме към АСО 2 да бъде прикрепен клетъчно проникващия пептид – pVEC. Той има 18 аминокиселинни остатъка и следната последователност: Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys.

Финалният вид на АСО 2 изглежда така: H₂N-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys-A1T1T1C2T2G2T2A2T2T2T2G2T1A1A1-3'.

Механизмът на действие на АСО 2 е показан на Фигура 8. След проникването си в клетката, с помощта на рVЕС, АСО 2 се насочва към своята цел – частта от РНаза Р, за която е проектиран - *rnpA*, започваща от 289 позиция. Химерният антисенс олигонуклеотид АСО 2 разпознава своята цел и хибридизира напълно комплементарно с нея. В следствие на образуването на комплекс, РНаза Н-зависимата хидролиза се активира, и РНаза Н се насочва към мястото на свързване на АСО 2 и мишената. В следствие на действието на ензима, структурата на иРНК бива разкъсана и генната експресия на *rnpA* е нарушена.



Фигура 8. Схематично представяне на механизма на специфично насочване на химерния АСО 2 към части от РНК на РНаза Р на бактерията *Staphylococcus aureus*. (А.) Част от генетична последователност на *rnpA* от бактерията, към която се насочва АСО 2. (Б.) Комплементарно свързване на АСО 2 с участък от *rnpA*. (В.) Образуване на двойноверижна молекула (Г.) Ензимна хидролиза на РНК и преустановена генна експресия. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

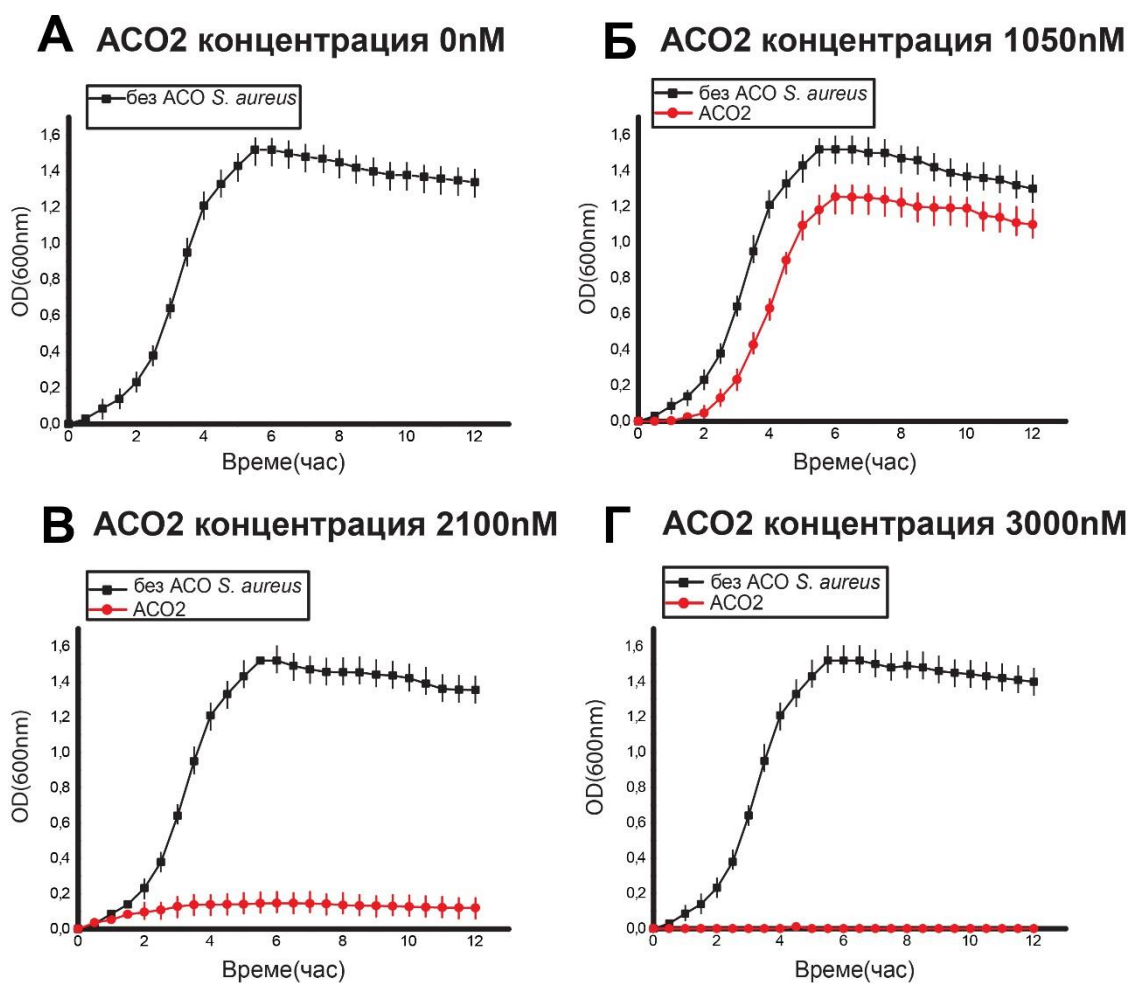
4.2.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 2 за терапевтични цели

Аналогично с АСО 1, след провеждане на всички биоинформатични и геномни анализи по отношение на АСО 2, и потвърдената възможност да го насочим към *grpA* от РНаза Р, пристъпихме към провеждане на лабораторни анализи, *in vitro*, върху култури на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Всички стъпки по отношение на протокола за осъществяване на експериментите са посочени в т. 4.2.2. “Експериментална работа” и в т. 5.1.3 “Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 1 за терапевтични цели”.

За да проверим ефекта от приложението на АСО 2 и за да можем да направим първична оценка на възможността той да бъде тестван *in vivo* и прилаган като антибактериален агент, проведохме поредица от експерименти, в които тествахме действието му при различни негови концентрации. Тестваните концентрации са 0 nM, т.е без присъствието на АСО 2, 1050 nM, 2100 nM и 3000 nM.

Резултатите, които получихме от проведените експерименти представяме върху четири графики на Фигура 9. Всяка една от графиките е създадена с помощта на програмата Origin Pro 2016 и след това събрани на обща фигура и надписани в Adobe Illustrator CC 2018.

На Фигура 9 е видно, че в пробите, съдържащи най-високата концентрация на АСО 2 - 3000 nM, се наблюдава максималното инхибиране на бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus*. При експериментите проведени с концентрация 1050 nM от АСО 2, бактериалният растеж достига максимална стойността около 1,2 оптични единици след шест часа инкубационно време. При концентрация 2100nM на АСО 2, бактериалният растеж достига максимум около 0,1 оптични единици след три часа и половина инкубационно време. Експериментът беше повторен четири пъти. При всяко едно от повторенията, резултатите се потвърждаваха.



Фигура 9. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които са насочени към части на *rnpA* на РНКаза Р при *Staphylococcus aureus*. На фигурата са показани четири отделни експеримента, проведени в присъствие и отсъствие на АСО 2. Всеки експеримент е повторен четири пъти и е изчислена средната стойност от четирите измервания, въз основа на която бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 . Кривите на бактериален растеж в червен цвят и червени точки отговарят на бактериалния растеж в присъствие на антисенс олигонуклеотида АСО 2 и показват неговата инхибираща *rnpA* активност. Кривите в черен цвят, с черни квадрати отговарят на бактериалния растеж без присъствието на АСО 2. (А.) Бактериалният растеж на *S. aureus* без добавяне на АСО. (Б.) АСО 2 в концентрация от 1050 nM. (В.) При концентрация от 2100 nM, АСО 2. (Г.) При концентрация от 3000 nM, АСО 2 проявява максимален инхибиращ ефект върху бактериалния растеж. Изчисленият MIC95 за АСО 2, който хибридизира с неговата комплементарна последователност от *rnpA* и контролира генната му експресия, е MIC95 2100 nM. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.3. Дизайн на трети химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 3)

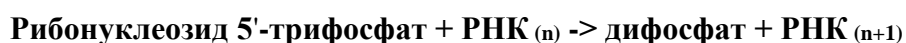
4.3.1. Мишена на АСО 3

Третият антисенс олигонуклеотид, обект на настоящата докторска дисертация, е проектиран така, че да бъде насочен и да се свърже комплементарно с участък от иРНК за β -субединицата на РНК полимеразата при човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Бактериалната РНК полимеразата е ензим, който се състои от пет субединици - две α , една β , една β' и една ω субединица. РНК полимеразата участва в иницирането, удължаването и прекратяването на първата фаза на гена експресия - транскрипцията, която включва синтеза на РНК молекула върху ДНК матрица. В следствие на свързване на РНК с промоторна ДНК молекула, започва процеса на транскрипция. Към настоящия момент, РНК полимеразата вече се използва като мишена за антибактериална терапия за 10 антибиотични препарата (6, 27-32).

Бактериалната РНК полимеразата представлява подходяща цел за насочване на антисенс олигонуклеотиди. След биоинформатичен анализ, избрахме за обект на нашия трети експеримент β -субединицата на бактериалната РНК полимеразата, която е позната още като E.C. 2.7.7.6 и има важна роля за бактерията. Тя участва в транскрипцията, а нейният ген е локализиран в BSU_01070 и има дължина от 3582 базови двойки. На Фигура 10. са показани 485 базови двойки от 3582 базови двойки на цялата последователност на *proV*. Цялата генетична последователност на β -субединицата на РНК полимеразата може да бъде открита в Бази данни NCBI, Subwiki и UniProt.

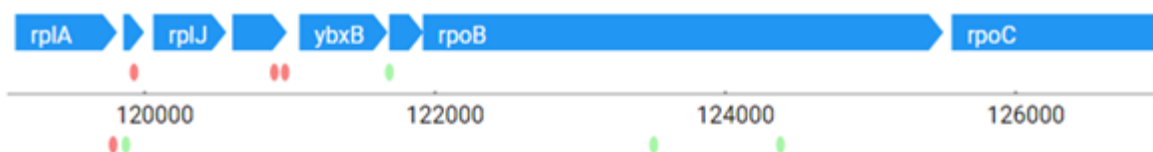
Генът *proV* се разполага между *ubxB* и *proC*, в SigA регулона. На Фигура 10 е показана неговата локализация в бактерията *Staphylococcus aureus*. Белтъкът RpoV е с дължина от 1193 аминокиселинни остатъка и молекулно тегло 133,38 kDa, с изоелектрична точка 4,73. Белтъкът RpoV катализира реакцията на превръщане на рибонуклеозид 5'-трифосфат в дифосфат:



иРНК на β -субединицата на РНК полимераза при *Staphylococcus aureus* - *groB*

```
AAACGTCGTCTATCAGCATTAGGACCTGGTGGTTTAAACACGTGAACGTGCTCAAATGGA  
AGTACGTGACGTTCACTACTCTCACTATGGCCGTATGTGTCCAATTGAAACACCTGAGGG  
ACCAAACATTGGATTGATTAACCTCATTATCAAGTTATGCACGTGTAAATGAATTCGGCTTT  
ATTGAAACACCATATCGTAAAGTTGATTTAGATACACATGCTATCACTGATCAAATTGACT  
ATTTAACAGCTGACGAAGAAGATAGCTATGTTGTAGCACAAGCAAACCTCTAAATTAGAT  
GAAAATGGTCGTTTCATGGATGATGAAGTTGTATGTCGTTTCCGTGGTAAACAATACAGTT  
ATGGCTAAAGAAAAAATGGATTATATGGATGTATCGCCGAAGCAAGTTGTTTCAGCAGC  
GACAGCATGTATTCCATTCTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCATTGATGGGTGCGA  
ACATGCA
```

Локализация на иРНК на β -субединицата на РНК полимераза при *Staphylococcus aureus*

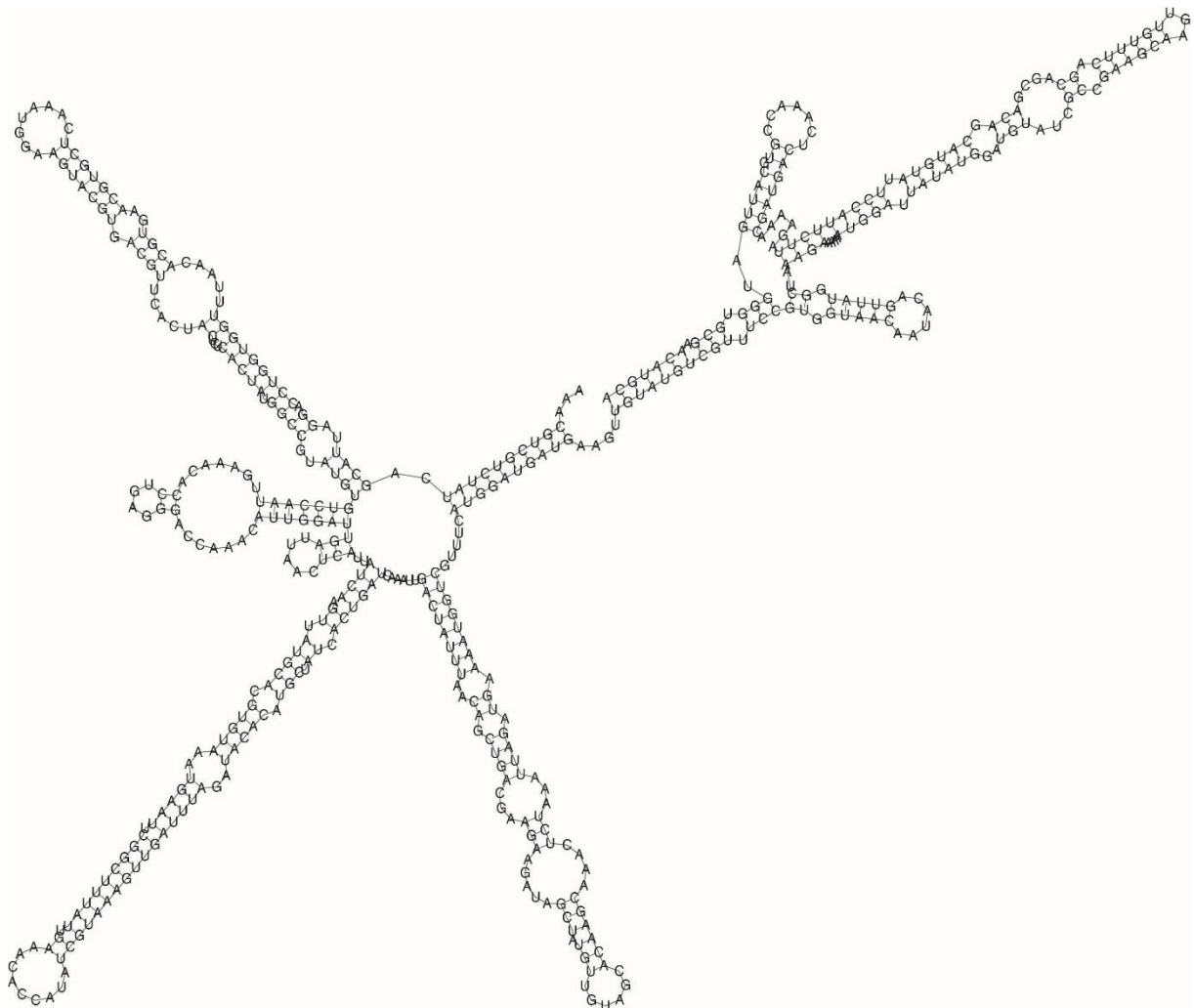


Фигура 10. β -субединицата на бактериалната РНК полимераза при *Staphylococcus aureus*. На фигурата е показана генетична последователност на β -субединицата на РНК полимераза при човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*, наричана още *groB*. На фигурата е показана още и локализацията на гена *groB* в генома на бактерията. В синьо са оцветени отделните гени и нови РНК функции. В зелено е маркиран 5'-краят на всеки транскрипт, а в червено 3'-краят му. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.3.2. Дизайн на химерен АСО 3

След извършване на биоинформатичен и геномен анализ на целия геном на бактерията *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, разгледахме генетичната последователност на бактерията за бета субединицата на РНК полимераза, кодирана от гена *groB*, с дължина 485 базови двойки и избрахме участък от нея (Фигура 10).

Изчислихме модела на вторичната ѝ структура и нейната минимална свободна енергия с интегрираната програма за изчисляване на оптимална вторична структура на Vienna RNA alifold web server. Получената вторична секвенция е представена на Фигура 11.



Фигура 11. Вторична структура на *groB* при *Staphylococcus aureus*. (А.) Структурата е създадена на база генетичната последователност на *groB* от *Staphylococcus aureus* с помощта на Vienna RNAfold server.

Оптималната вторична структура има минимална свободна енергия -121.50 kcal/mol. Свободната енергия на термодинамичното свързване е -132.05 kcal/mol. Всички останали математически изчислени модели и данни, въз основа на анализа са достъпни на следния уеб адрес:

<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=D4TS97mrzE>

От голямата генетична последователност на *rpoB*, избрахме фрагмент, който започва от 105 позиция от секвенцията на Фигура 10. и има дължина 22 нуклеотида. Неговата нуклеотидна последователност е:

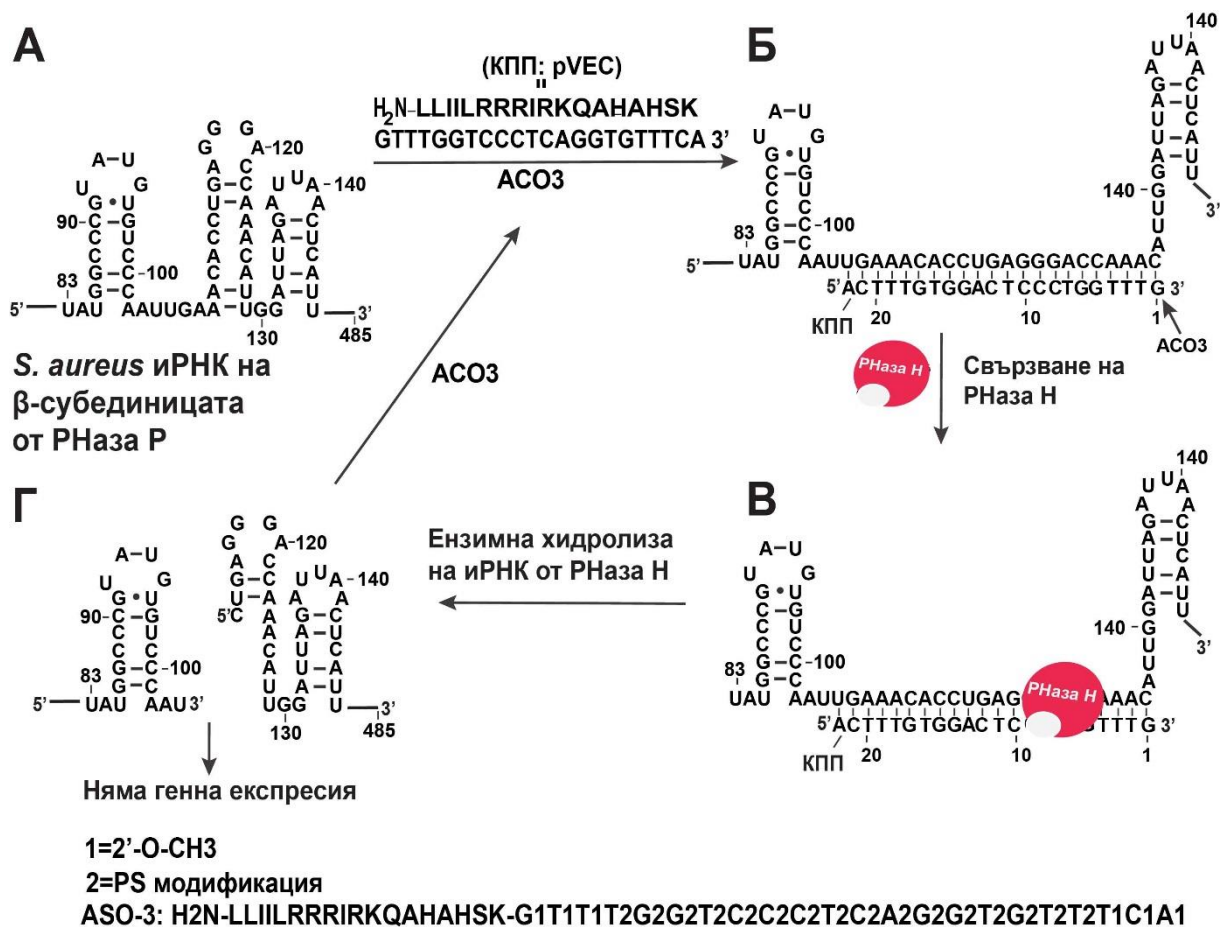
5'-TGAAACACCTGAGGGACCAAAC-3', която ни служи за проектирането на специфичен антисенс олигонуклеотид – АСО 3, който да я открие и да се свърже с я пълно комплементарно. Избраната от нас целева секвенция е специфична за бактериалния щам на *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.

Проектирахме 5'- и 3'-краища на АСО 3 да бъдат модифицирани с фосфотиоатна връзка, т.е единият от кислородните атоми да е заменен със серен атом. Същата модификация, характерна за първа генерация АСО, приложихме и при АСО 1 и при АСО 2. В допълнение на нея, проектирахме замяна на един от водородните атоми с 2'-O-CH₃ група и по този начин АСО 3 притежава и характеристики, подобни на тези на АСО от втора генерация. Целевата мишена е дълга 22 нуклеотида, затова и АСО 3 е 22 нуклеотида, за да може да се свързва абсолютно комплементарно с нея. Проектираният от нас АСО 3 има следната основна последователност: 5'-A1T1T1C2T2G2T2A2T2T2T2G2T1A1A1-3', като

- с число „1“ са отбелязани 2'-O-CH₃ модификациите от втора генерация
- с число „2“ са отбелязани фосфотиоатните модификации от първа генерация.

АСО 3 има структура, която му осигурява активиране на РНаза Н-зависимата хидролиза на целевата секвенция – част от *rpoB* от РНаза Н и високия афинитет за свързване между него и мишената му. Благодарение на модификациите, които претърпяха нуклеотидите му, АСО 3, подобно на АСО 1 и АСО 2 е предпазен от ензимно разграждане *in vivo* в бактерията гостоприемник. Към АСО 3 е свързан клетъчно проникващ пептид – pVEC. Финалният вид на АСО 3 има следната последователност: H₂N-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys G1T1T1T2G2G2T2C2C2C2T2C2A2G2G2T2G2T2T2-T1C1A1-3'.

Механизмът на действие на АСО 3 е показан на Фигура 12. След навлизането си в клетката, АСО 3 се насочва към своята цел – бета субединицата от РНК полимеразата, за която е проектиран – част от *groB*, започваща от 105 позиция. Химерният антисенс олигонуклеотид АСО 3 разпознава своята цел и хибридизира напълно комплементарно. Те образуват комплекс, който провокира РНaza Н-зависимата хидролиза и в резултат на това РНaza Н се насочва към мястото на свързване на АСО 3 и мишената, като нанася срязване в структурата на иРНК и нарушава генната експресия на *groB*.



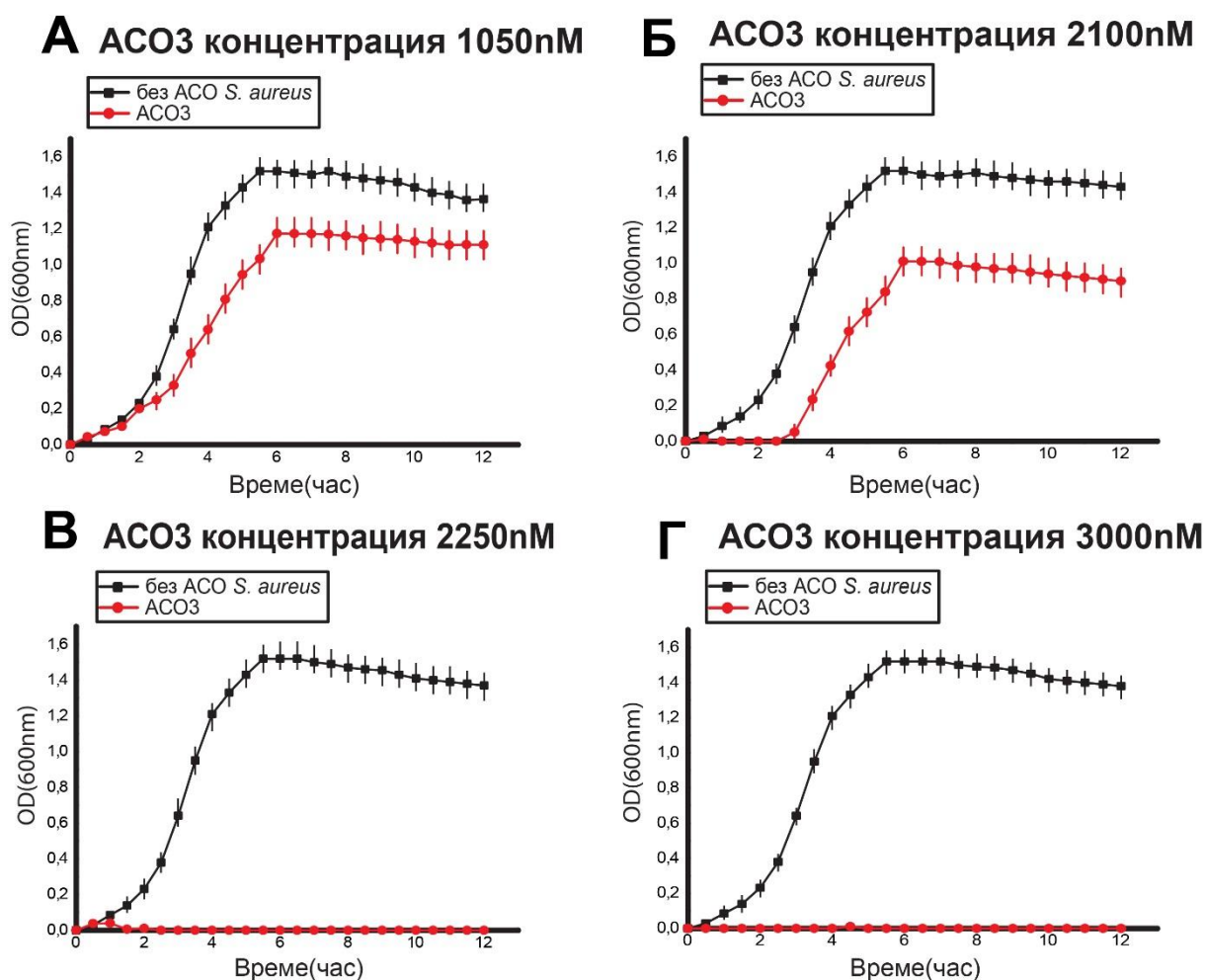
Фигура 12. Схематично представяне на механизма на специфично насочване на химерния АСО 3 към β -субединицата на РНК полимераза на бактерията *Staphylococcus aureus*. (А.) Част от генетична последователност на *groB* от бактерията, към която се насочва АСО 3. (Б.) Комплементарно свързване на АСО 3 с участък от *groB*. (В.) Образуване на двойноверижна молекула (Г.) Ензимна хидролиза на РНК и преустановена генна експресия. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.3.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 3 за терапевтични цели

Всички проведени биохимични и геномни анализи потвърдиха възможността АСО 3 да бъде насочен към бета субединицата на бактериалната РНК полимераза. Те позволиха да направим прецизна химерна структура и непосредствено след това да тествахме в лабораторни условия неговия ефект *in vitro* в култури на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Изследванията протекоха както е описано в т. 4.2.2. “Експериментална работа”, в т. 5.1.3 “Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 1 за терапевтични цели” и т. 5.2.3 “Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 2 за терапевтични цели”.

За да проверим реалния ефект от приложението на АСО 3 и за да можем да направим първична оценка на възможността той да бъде прилаган като антибактериален агент, проведохме поредица от експерименти, в които тествахме действието му при различни негови концентрации - 1050 nM, 2100 nM, 2250 nM и 3000 nM. Експериментът беше повторен четири пъти. При всяко едно от повторенията, резултатите се потвърждаваха.

Резултатите, които получихме от проведените експерименти са представени в графика на Фигура 13.



Фигура 13. Инхибиране на бактериалния растеж от АСО 3 към β -субединицата на РНК полимераза на бактерията *Staphylococcus aureus*. На фигурата са показани четири отделни експеримента проведени в присъствието и отсъствието на АСО 3. Всеки експеримент е повторен четири пъти и е изчислена средната стойност от четирите измервания, въз основа на която бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 . Кривите на бактериален растеж в червен цвят и червени точки отговарят на бактериалния растеж в присъствие на антисенс олигонуклеотида АСО 3 и показват неговата инхибираща активност. Кривите в черен цвят, с черни квадрати отговарят на бактериалния растеж без присъствието на АСО 3. (А.) Концентрация от 1050 nM на АСО 3. (Б.) Концентрация от 2100 nM на АСО 3. (В.) АСО 3 в концентрация от 2250 nM. (Г.) Концентрация от 3000 nM на АСО 3 се наблюдава максимално инхибиране на бактериалния растеж. Изчисленият MIC₉₅ за АСО 3, който хибридизира със своята комплементарна целева последователност и контролира генната експресия, е MIC₁₀₀ 2250 nM. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

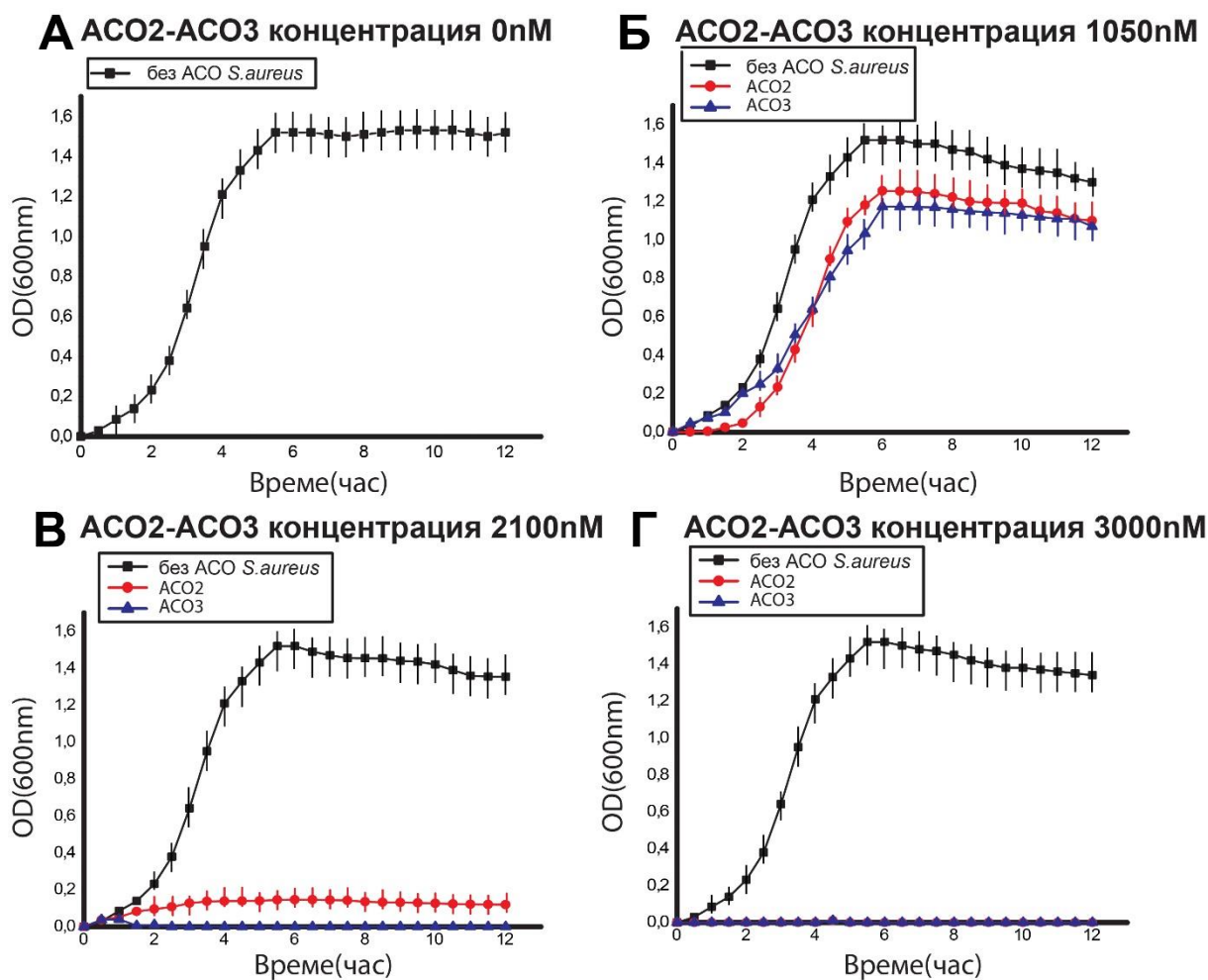
За да бъдат оценени възможностите за приложение на отделните антисенс нуклеотиди, е добре да се направи сравнителен анализ на показаните инхибиторни ефекти на всеки един от тях в различна концентрация. Резултатите са показани графично на Фигура 14.

На Фигура 14А. е представен единствено бактериалния растеж, в отсъствие на антисенс олигонуклеотиди. Тази крива служи като контрола-ориентир на нормалния бактериален растеж.

На Фигура 14Б. са представени АСО 2 и АСО 3 в концентрация от 1050 nM. Черната линията с квадратите показва бактериалния растеж без присъствието на антисенс олигонуклеотид. Червената линия с кръгове показва бактериалния растеж в присъствието на АСО 2 в концентрация от 1050 nM, който достига максимум при плътност около 1,2, след шестия час от инкубирането. Линията с триъгълниците показва бактериалния растеж при прилагане на АСО 3 в концентрация 1050 nM, която достига максимална оптична плътност - около 1,1, след инкубационно време от шест часа. Инхибиращият ефект на АСО 3 е по-слаб в сравнение с инхибиращия ефект на АСО 2 при тази концентрация.

На Фигура 14В. са представени резултатите за АСО 2 и АСО 3 при концентрация от 2000 nM. Максималната оптична плътност от 0,1 при тази концентрация, се достига след три часа инкубация. АСО 3 проявява максимален инхибиторен ефект още на третия час при тази концентрация. Видимо е, че при тази концентрация АСО 3 има по-добър инхибиращ ефект в сравнение с АСО 2.

На Фигура 14Г. са представени АСО 2 и АСО 3 в концентрация 3000 nM. И двата АСО имат сходен ефект върху бактериалния растеж при изследваните концентрации.



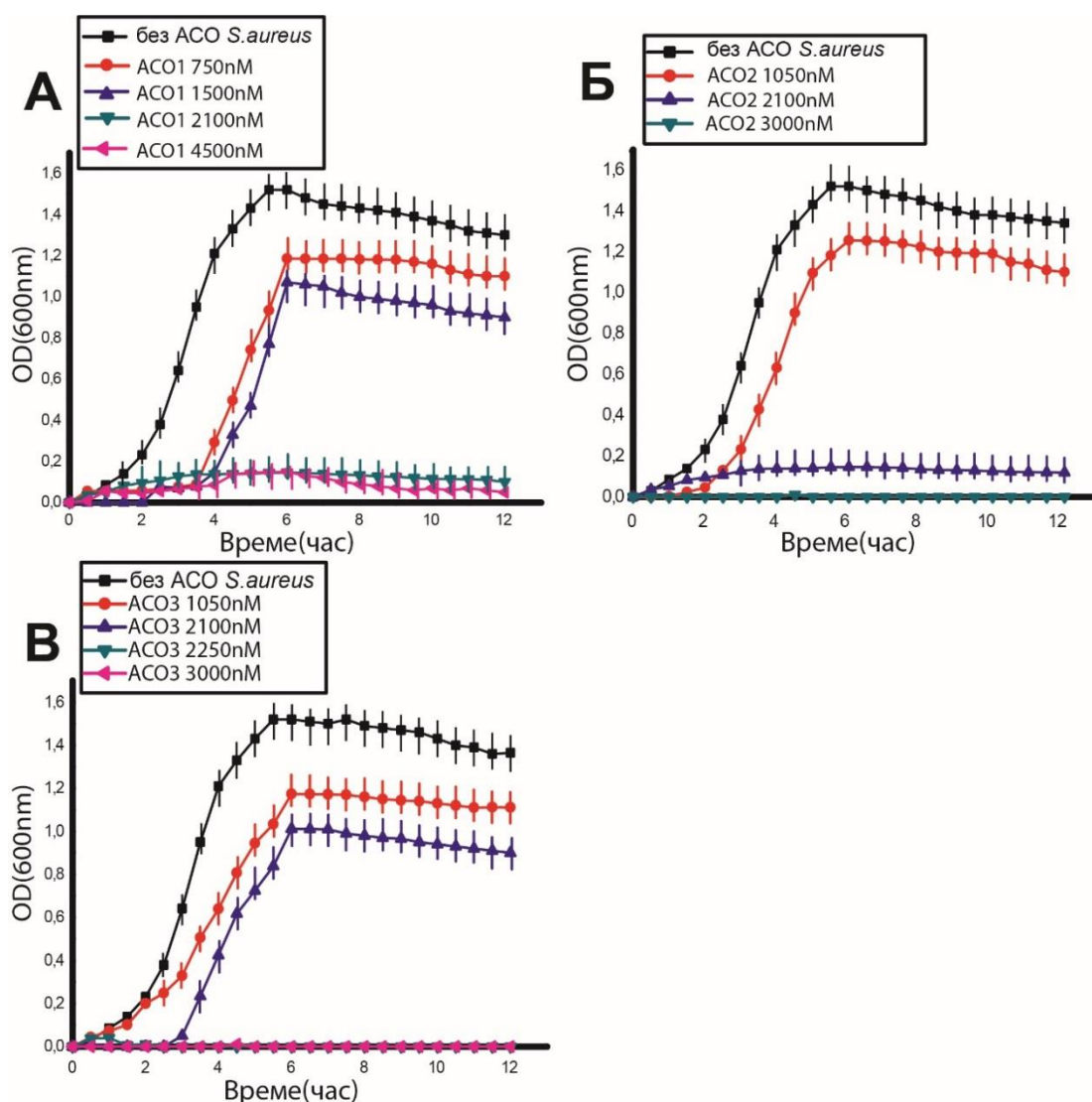
Фигура 14. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които имат различни цели в *Staphylococcus aureus*. Показани са отделни експерименти, извършени в присъствието и отсъствието на АСО 2 и АСО 3. Всеки експеримент е повторен четири пъти, изчислена е средната стойност от четирите измервания и след това бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 (А.) Бактериален растеж на *Staphylococcus aureus* без присъствието на АСО. (Б.) Съпоставяне на АСО 2 и АСО 3 в концентрация 1050 nM. АСО 3 проявява по-добър инхибиторен ефект в сравнение с АСО 2. (В.) Съпоставяне на АСО 2 и АСО 3 в концентрация 2000 nM. АСО 2 показва инхибиращ ефект, докато АСО 3, показва максимално инхибиране на бактериалния растеж. (Г.) Съпоставяне на АСО 2 и АСО 3 в концентрация от 3000 nM. Двата АСО проявяват най-висок инхибиращ ефект по отношение на бактериалния растеж. Изчисленият MIC95 за АСО 2 и АСО 3, които хибридизират със своята комплементарна целева последователност и регулират генна експресия, е MIC95 при 2100 nM. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

За по-добро анализиране на резултатите и за прецизен избор на точна концентрация за всеки един от трите антисенс олигонуклеотида (АСО 1, АСО 2 и АСО 3) са направени обобщени диаграми, обединени на Фигура 15. На различните части от фигурата са показани трите различни антисенс олигонуклеотида в различни концентрации.

На Фигура 15А. е показан бактериалния растеж на *S. aureus* с различни концентрации на АСО 1. Черната линията с правоъгълниците показва контролно развитие на бактерията без присъствие на АСО 1. Червената линията с кръгове показва бактериален растеж в присъствие на АСО 1 при концентрация 750 nM. Лилавата линия с триъгълници показва развитието на бактериите в присъствието на АСО 1 при концентрация 1500 nM. Тюркоазената линията с обърнати надолу триъгълници показва растежа на бактериите в присъствието на АСО 1 в концентрация 2100 nM. Розовата линията с обърнати вляво триъгълници показва крива на развитие в присъствието на АСО 1 при концентрация 4500 nM. При нея се наблюдава максималния инхибиращ ефект на антисенс олигонуклеотида.

На Фигура 15Б. е показан бактериалния растеж на *S. aureus* в присъствието на различни концентрации на АСО 2. Черната линия с квадратите показва бактериален растеж без присъствието на АСО 2. Червената линия с кръговете показва в присъствието на АСО 2 с концентрация 1050 nM. Лилавата линия с триъгълници показва растежа на бактериите в присъствието на АСО 2 при концентрация 2100 nM. Тюркоазената линията с обърнатите надолу триъгълници показва развитието на бактериите в присъствието на АСО 2 при концентрация от 3000 nM. Това е най-високата тествана концентрация на АСО 2. При нея се наблюдава максимален инхибиращ ефект на АСО 2.

На Фигура 15В. е показан бактериалния растеж на *S. aureus* с различни концентрации на АСО 3. Черната линия с правоъгълниците показва бактериален растеж без присъствието на АСО 3. Червената линия с кръгове показва бактериален растеж в присъствието на АСО 3 с концентрация 1050 nM. Лилавата линия с триъгълници показва растежа на бактериите в присъствието на АСО 3 с концентрация 2100nM. Линията с обърнатите надолу триъгълници показва растежа на бактериите в присъствието на АСО 3 с концентрация 2250 nM. Розовата линия с обърнати вляво триъгълници показва бактериалния растеж с присъствието на АСО 3 в концентрация 3000nM, която има максимален инхибиращ ефект.



Фигура 15. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които имат различни цели в *Staphylococcus aureus*. Показани са отделни експерименти, извършени в присъствието и отсъствието на АСО 1, АСО 2 и АСО 3. Всеки експеримент е повторен четири пъти, изчислена е средната стойност от четирите измервания и след това бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 . **(А.)** Растежна крива на *Staphylococcus aureus* без АСО и при различни концентрации на АСО 1 - 750 nM, 1500 nM, 2100 nM и 4500 nM. **(Б.)** Развитие на *Staphylococcus aureus* без АСО и при различни концентрации на АСО 2 - 1050 nM, 2100 nM и 3000 nM **(В.)** Бактериален растеж на *Staphylococcus aureus* без АСО и при различни концентрации на АСО 3 - 1050 nM, 2100 nM, 2250 nM и 3000 nM. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.4. Дизайн на четвърти химерен антисенс олигонуклеотид и начална оценка на неговото използване за терапевтични цели (АСО 4)

4.4.1. Мишена на АСО 4

АСО 1, АСО 2 и АСО 3 показват добра инхибираща активност върху бактериалния растеж на човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*, което означава, че те могат да бъдат използвани като антибактериални агенти. Всеки един от тях е насочен към специфична мишена от бактериалната клетка – *rnpB*, *rnpA* и *rpoB*. За да проверим дали антисенс олигонуклеотидите, които имат произволна генетична последователност, или такава, която не се открива в бактериалния геном ще проявят инхибираща активност върху бактериалния растеж, решихме да създадем антисенс олигонуклеотид – АСО 4, който да няма мишена в *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. По този начин можем да проследим бактериалния растеж при неспецифично насочване на антисенс олигонуклеотид.

4.4.2. Дизайн на химерен АСО 4

Направихме биоинформатично проучване на целия бактериален геном на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и генерирахме съвършено произволна последователност от нуклеотиди - 5'-GTCCGAGCGTA-3'. След избора на нуклеотиди, направихме повторен BLAST анализ на секвенцията в бактериалния геном, за да сме уверени, че тя не се открива в бактерията и може да послужи за проектиране на АСО 4 с качества на неспецифично свързващ се агент. Проектираната от нас нуклеотидна последователност на АСО 4 има следния вид: 5'-UACGCTCGGAC-3'. Отново, аналогично с останалите три антисенс олигонуклеотида – АСО 1, АСО 2 и АСО 3, заложихме метилиране на крайните нуклеотиди на последователността, а на всички останали централни нуклеотиди - PS-модификация. След модификациите, АСО 4 придобива следния вид: 5'-U₁A₂C₂G₂C₂T₂C₂G₂G₂A₂C₁-3'.

- с число „1“ са отбелязани 2'-O-CH₃ модификациите от втора генерация
- с число „2“ са отбелязани фосфотиоатните модификации от първа генерация.

Към АСО 4 присъединихме клетъчно проникващ пептид pVEC, с дължина 18 аминокиселинни остатъка и следната последователност: Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-Lys, за да може да прониква лесно в бактериалните клетки.

Финалната последователност на АСО 4, заедно с КПП, придоби следния вид: H₂N-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-His-Ser-LysU₁A₂C₂G₂C₂T₂C₂G₂G₂A₂C₁-3'.

След по-обширен BLAST анализ установихме, че в геномите на представените видове в NCBI база данни не се откриват комплементарни райони на уникалната нуклеотидна последователност, която приемаме за цел на АСО 4. Този факт води до предположението, че *in vitro* и *in vivo* АСО 4 ще представлява нехибридиращ агент, поради уникалността на секвенцията му.

А.

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide que

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange [Query subrange](#)

From

To

Or, upload file No file chosen [No file chosen](#)

Job Title Enter a descriptive title for your BLAST search [Job Title](#)

Align two or more sequences [Align two or more sequences](#)

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.): rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

Nucleotide collection (nr/nt) [Nucleotide collection \(nr/nt\)](#)

Organism Optional exclude [+](#) Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [Organism](#)

Б.

Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

Job Title	ASO 4
RID	WVUDKG5Z013 Search expires on 12-08 15:37 pm Download All Download All Download All
Program	? Citation Citation Citation
Database	nt See details See details
Query ID	lcl Query_10243
Description	None
Molecule type	nucleic acid
Query Length	11
Other reports	?

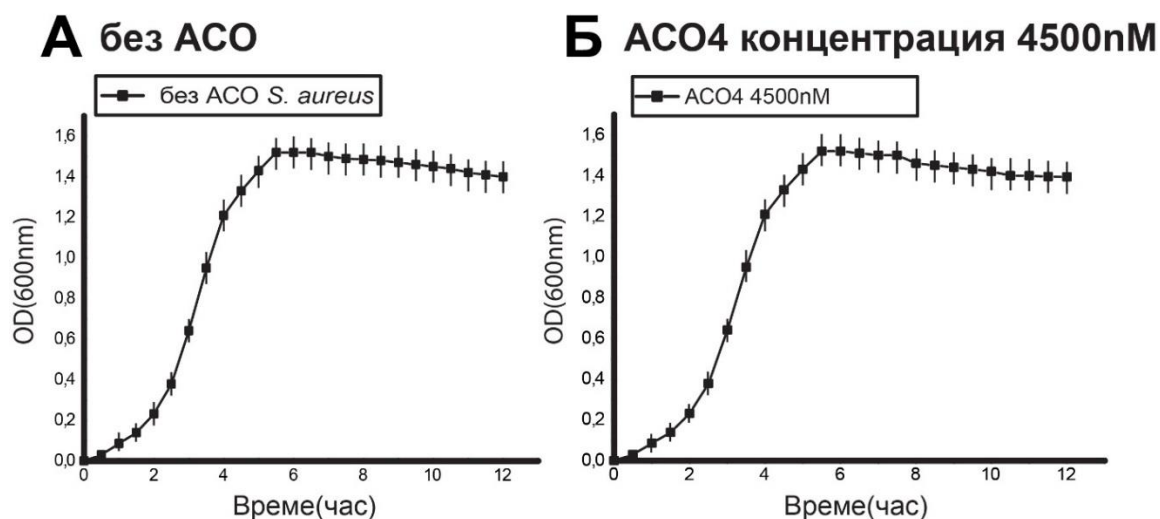
! No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

Фигура 16. BLAST анализ на АСО 4 във всички геноми от NCBI. (А.) Зададени параметри на BLAST анализ за АСО 4. **(Б.)** Получени резултати от търсенето – няма открити подобности между хипотетичната целева последователност и реалните участъци от геномите на видовете в NCBI.

4.4.3. Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 4 за терапевтични цели

Експерименталната проверка на АСО 4 протече аналогично с това на останалите три антисенс олигонуклеотида – АСО 1, АСО 2 и АСО 3.

Тъй като предварително избрахме АСО 4 да има уникална мишена, която да не се открива в нито един вид, то допуснахме, че е необходимо да използваме висока концентрация от него, за да наблюдаваме отсъстващ или частичен инхибиращ ефект на антисенс олигонуклеотида. Концентрацията, която използвахме на АСО 4 е 4500 nM. Контролната проба, в която няма антисенс олигонуклеотид демонстрира подобен бактериален растеж на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 като този в отсъствие на АСО. Това означава, че АСО 4 не хибридизира с бактериалния геном и респективно не инхибира експресията на ключови гени, чиито продукти да са есенциални за бактерията.

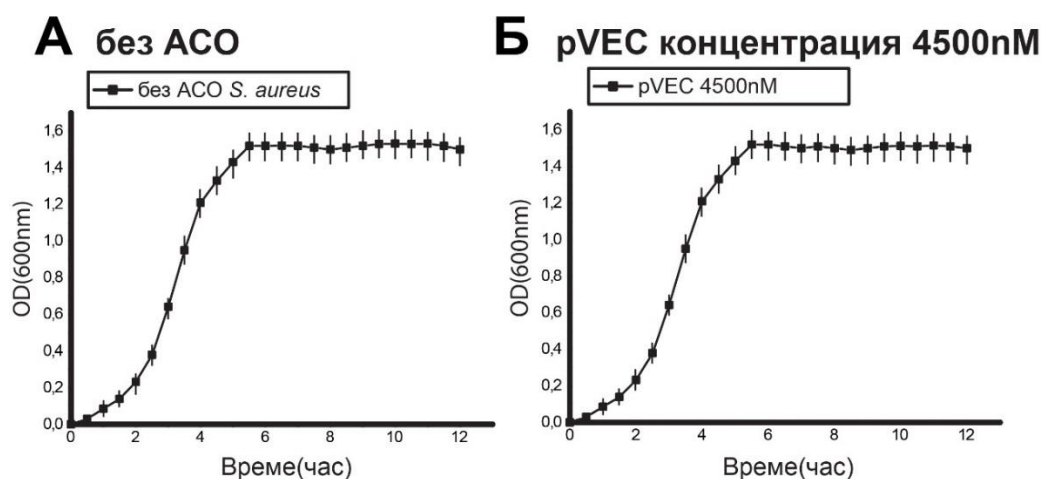


Фигура 17. Експериментална проверка на инхибиращия ефект АСО 4 върху бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Показани са два отделни експеримента, извършени в присъствието и отсъствието на АСО 4. Всеки експеримент е повторен четири пъти, изчислена е средната стойност от четирите измервания и след това бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 . (А.) На графика А. е показан бактериален растеж на *Staphylococcus aureus* в отсъствие на антисенс олигонуклеотид. (Б.) На графика Б. е показан бактериалния растеж в присъствие на АСО 4 във висока концентрация от 4500 nM. АСО 4 няма мишена, към която да се насочи и с която да хибридизира комплементарно в бактерията, по тази причина не може да осъществи ефект на инхибиране на растежа на бактерията. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

4.5. Експериментална проверка на инхибиращия ефект на клетъчно проникващия пептид pVEC като самостоятелен агент в клетката

Проведохме допълнителен експеримент в клетъчна линия на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, която инкубирахме заедно с клетъчно проникващия белтък pVEC, за да анализираме влиянието му върху бактериалния растеж. Чрез този експеримент ще проверим до каква степен резултатите от проведените експерименти с АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4, описани в т. 5.1.3 “Експериментална проверка и тестване и оценка за използването на АСО 2 за терапевтични цели” и 5.3.3 “Експериментална проверка и оценка за използването на АСО 3 за терапевтични цели”, се дължат на действието на АСО или на pVEC.

Третирахме клетките от глицеролна култура на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 с pVEC в концентрация 4500 nM, който не е свързан към АСО. Получените резултати отразяват липсата на инхибиращ ефект при прилагане самостоятелно на pVEC и са показани на Фигура 18.



Фигура 18. Индивидуален инхибиращ ефект на клетъчно проникващия пептид pVEC при *Staphylococcus aureus*. На графиката са представени два експеримента показващи бактериалния растеж на *S. aureus* без наличието на АСО. Всеки експеримент е повторен четири пъти, изчислена е средната стойност от четирите измервания и след това бяха проектирани графиките. Изобразено е стандартното отклонение, което варира от ± 3 до ± 5 . (А.) Първият експеримент показва бактериален растеж на *S. aureus* без АСО и без pVEC. (Б.) Резултатът от втория експеримент показва присъствие на pVEC в концентрация от 4500 nM, който не оказва инхибиращ ефект върху бактериалния растеж. Авторска фигура на Катерини Валсаматзи направена в Adobe Illustrator.

5. Обсъждане

Антибиотичната резистентност е проблем от световен мащаб, който провокира голямата необходимост от разработването на нови агенти, които да могат по-бързо и по-лесно да се адаптират към експоненциално нарастващия брой нови устойчиви на лекарства бактериални щамове. AP налага промяна в подхода за създаване на антибактериални агенти и терапевтичните стратегии, по които да се прилагат те.

Една от най-съвременните и много успешно прилагани стратегии в борбата с антибиотичната резистентност, е антисенс олигонуклеотидната терапия (Antisense oligonucleotide therapy). Тя позволява да бъдат избрани участъци от генома на всяка една отделна бактерия или на група от бактерии, към които да се насочи антисенс олигонуклеотид. Той има специална последователност, която е създадена така, че да разпознава специфично конкретен участък от генома и да се свързва с него, като по този начин упражнява генна регулация.

РНК молекулата има основна роля за експресията на гени и се свързва директно с развитието на заболявания с различна проява. Антисенс олигонуклеотидната технология позволява РНК и нейни фрагменти да бъдат използвани като мишени на различни антисенс олигонуклеотидни препарати. Чрез тях може да бъде инхибирана експресията на конкретен белтък с важно значение за бактерията или дори за инхибирането на цели метаболитни вериги, ако бъдат прицелени ключови звена от тях.

Известни са няколко антисенс олигонуклеотидни препарата, които вече успешно се прилагат в медицинската практика и още много агенти, които са във фаза на клинични изпитания. Едни от тях са свързани с възможността антисенс олигонуклеотиди да се насочват към различни рибопревключватели като флавиновия рибопревключвател (ФМН рибопревключвател, FMN riboswitch), при който се нарушава флавиновата биосинтеза, тиамин пирофосфатния рибопревключвател (ТПФ рибопревключвател, Thiamine pyrophosphate riboswitch, TPP riboswitch), при който се нарушава тиамин пирофосфатния метаболизъм и други мишени от бактериалния геном.

Настоящата докторска дисертация представя експериментална работа, която потвърждава възможността за приложението на антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти срещу важни човешки патогенни бактерии, причиняващи сериозни бактериални инфекции.

За да бъде създаден антисенс олигонуклеотид, който да се прилага успешно в борбата с антибиотичната резистентност, е необходимо да се премине през няколко етапа. Първият етап е свързан с избора на бактерия, срещу която да бъде създадено и насочено антисенс олигонуклеотидно съединение. Вторият етап е свързан с биоинформатичен анализ на генома на избрания конкретен организъм или група организми, при които се откриват потенциални мишени, към които конкретно да се насочи АСО и на всички свързани с него биохимични метаболитни пътища. Проучват се ключовите белтъци, от които зависи неговата преживяемост и делене. Третият етап е проектирането на последователността на антисенс олигонуклеотида и избора на модификации, които да претърпи той, за да може да притежава различна устойчивост на ензимно разграждане или по-висок афинитет за свързване със своята целева мишена (характеристики присъщи на първа, втора, трета генерация или междинна аптамерна структура, т.е с модификации от две отделни генерации). Антисенс олигонуклеотидите позволяват към тях да се прикрепват клетъчно проникващи пептиди, които да осигуряват проникването им в бактерията гостоприемник. След проектирането на АСО или АСО с клетъчно проникващия пептид се преминава към синтезирането му. Синтезираният антисенс олигонуклеотид бива проверен експериментално в различни концентрации, с цел да се наблюдава различна степен на неговото инхибиращо действие върху бактериалния растеж на избрания от нас бактериален вид. След извършване на спектрофотометрични изследвания, получените стойности се вписват в таблици, с които се визуализират резултатите под формата на отделни графики. Последният етап от експеримента е анализът на получените резултати, на база създадените фигури и финалната оценка за възможността новопроктираният антисенс олигонуклеотид да се прилага *in vitro* и *in vivo* за антибактериална терапия.

За постигане на целта на настоящата докторска дисертация, бе избран един бактериален щам, срещу който бяха насочените три специфични антисенс олигонуклеотида и един неспецифичен. Избраният от нас организъм е *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 25923. Той е клиничен изолат, който причинява вътреболнични инфекции и води до разпространението им навън в обществото - между хората. Този бактериален щам често се използва в лабораторни експерименти и е добре проучен, защото е устойчив на много антибиотици и присъства в списъка на СЗО за приоритетно създаване на терапевтични препарати срещу него.

След провеждане на задълбочени биоинформатични и геномни анализи, избрахме три мишени от бактериалния щам *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 25923 – *rnpB*, *rnpA* и *rpoB*. Гените *rnpB* и *rnpA* са отговорни за синтеза на Рибонуклеаза Р и белтъчната компонента на Рибонуклеаза Р. Рибонуклеаза Р представлява рибозима, която катализира разцепването на РНК и разделя допълнителна или предшестваща последователност на РНК от молекулите на тРНК. Генът *rpoB* е отговорен за синтеза на бета субединицата на РНК полимераза, която участва в процеса на транскрипция. Четвъртият експеримент, който бе заложен в настоящата работа, няма своя конкретна мишена. Решихме да създадем антисенс олигонуклеотид, който да няма специфична цел в бактерията и да проверим какъв ще е ефектът от него, като той не се свързва напълно комплементарно с РНК на бактерията. Възможността да се изберат различни цели в бактериалната РНК, е голямо предимство, той като могат да се създадат различни антисенс олигонуклеотидни агенти. Съществуването на повече от един антисенс олигонуклеотиди срещу една бактерия, насочващи се към различни цели в бактериалната РНК, намалява възможността за развитие на бактериална резистентност срещу конкретните антисенс олигонуклеотиди. За да бъдат трите планирани антисенс олигонуклеотиди с размер, който да позволи те да навлизат в бактериалната клетка на *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 25923, бяха направени повторни биоинформатични анализи и от дългите РНК последователности на *rnpB*, *rnpA* и *rpoB* бяха избрани участъци, за които конкретно създадохме АСО 1, АСО 2 и АСО 3. За четвъртия антисенс олигонуклеотид - АСО 4 проведохме биоинформатични анализи и по-конкретно BLAST търсене, с което успяхме да генерираме напълно произволна последователност от нуклеотиди, която да не се открива нито в *Staphylococcus aureus*, нито в друг организъм от база данни NCBI. За да се свържат комплементарно АСО 1, АСО 2 и АСО 3 със своите мишени, генерирахме с помощта на приложенията от официалния уеб сайт на проф. Пенчовски, техните последователности, които са напълно комплементарни с тях. За АСО 4 също генерирахме секвенция, която не се открива в бактериалния геном. Дължината им варира от 11 до 22 нуклеотида. Приложихме модификации на АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4, характерни за първа генерация и втора генерация антисенс олигонуклеотиди и създадохме четири аптамерни структури. Те позволяват на антисенс олигонуклеотидите да имат по-добър афинитет за свързване към своите специфични мишени, да бъдат устойчиви на ензимно разграждане и да провокират РНаза Н-ензимната хидролиза.

За да проникват лесно в бактериалната клетка, проектирахме към АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4 да се свърже клетъчно проникващият пептид рVEC, който има дължина от 18 аминокиселинни остатъка.

След проектирането и синтезирането на АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4 бяха проведени четири лабораторни експеримента в присъствие на АСО с различна концентрация и в тяхно отсъствие. Те потвърдиха очакваните от нас резултати, като АСО 1, АСО 2 и АСО 3 инхибират бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus* и биха били ефективни като антибактериални агенти. За да могат да бъдат използвани на практика за лечение на пациенти с бактериална инфекция, е необходимо да се използват в подходяща концентрация, която да не бъде токсична за човека. Спектрофотометричните резултати показват, че АСО 1 инхибира най-добре бактериалния растеж в концентрация от 4500 nM. АСО 2 проявява максимален инхибиращ ефект върху бактериалния растеж при концентрация от 3000 nM. Същата се отнася и за АСО 3. Сравнихме двата антисенс олигонуклеотида и установихме, че АСО 3 има малко по-добър инхибиращ ефект върху бактериалния растеж, в сравнение с АСО 2 в концентрации от 1050 nM и 2100 nM. Резултатите от приложението на АСО 4 в най-висока концентрация от 4500 nM, показват, че той не проявява инхибиращ ефект на бактериалния растеж. Той няма мишена в бактериалния геном и не се свързва специфично с него, като така не регулира генната експресия на ключови метаболити за бактерията, следователно не може да бъде използван като потенциален антибактериален агент. Той успешно показва липсата на предизвикване на антибактериална активност в *Staphylococcus aureus*.

Експерименталното проверяване на клетъчно проникващия пептид рVEC, потвърди, че той не води до самостоятелно инхибиране на бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus*. Това е важно заключение, за да се потвърди, че показаните инхибиращи ефекти от страна на АСО 1, АСО 2 и АСО 3 са в резултат единствено на тяхното действие.

Резултатите от нашите биоинформатични и геномни анализи, както и от експериментална ни работа са изключително положителни, което потвърждава възможността за използване на АСО 1, АСО 2 и АСО 3 като успешна антисенс олигонуклеотидна терапия за справяне с антибиотичната резистентност и множествената антибиотична резистентност. За да могат да се прилагат в лекарската практика *in vivo*, е необходимо да бъдат направени още експерименти и клиничните изпитания.

6. Изводи

6.1. След провеждането на задълбочен биоинформатичен и геномен анализ на целия геном на *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 в бази данни, бяха разгледани и избрани генните последователности и разположението на гените *rnpB* и *rnpA*, които са отговорни за синтеза на Рибонуклеаза Р и този за β -субединицата на РНК полимераза от човешки патогенни бактерии - *rpoB*.

6.2. От избраните нуклеотидни последователности на *rnpB*, *rnpA* и *rpoB*, на база биоинформатични анализи, бяха избрани три по-къси участъка, които приехме за мишени на последвалите биоинформатични и лабораторни *in vitro* експерименти.

- Избраната мишена за първи антисенс олигонуклеотид, започва от 197 позиция на *rnpB* и е с дължина 21 нуклеотида. Нейната последователност е следната: 5'-ААТССААТТТGGTAGGAGCA-3'.
- Избраната мишена за втори антисенс олигонуклеотид, започва от 286 позиция на *rnpA* и е с дължина 15 нуклеотида. Нейната последователност е следната: 5'-ТТАСААТАСАГААТ-3'.
- Избраната мишена за трети антисенс олигонуклеотид, започва от 105 позиция на *rpoB* и е с дължина 22 нуклеотида. Нейната последователност е следната: 5'-TGAAACACCTGAGGGACCAAAC-3'.

6.3. Използвайки методите за компютърен дизайн на алостерични рибозими и антисенс олигонуклеотиди бяха създадени три антисенс олигонуклеотида. За да бъдат те устойчиви на ензимно разграждане, с висок афинитет за свързване към своите цели и за да предизвикват РНаза Н-индуцирана хидролиза на прицелената иРНК, по време на проектирането им бе заложено метилиране и PS-модификации на нуклеотидите им. Така те придобиват вид на химерни антисенс олигонуклеотиди, които носят характеристики на първа и втора генерация АСО. За да могат да проникват в бактерията гостоприемник, при проектирането на всеки един от тях, бе прикрепен клетъчно проникващ пептид рVEC.

6.4. След като беше направен пълен биоинформатичен и геномен анализ на *Staphylococcus aureus*, бяха избрани уникална нуклеотидна последователност, която не се открива в него с дължина от 11 нуклеотида - 5'-GTCCGAGCGTA-3'. Проведеха се допълнителни BLAST анализи, които потвърдиха, че генерираната случайна секвенция

не се открива в нито един вид, с представен геном в база данни NCBI. Използваната последователност послужи за създаване на четвърти антисенс олигонуклеотид – АСО 4.

6.5. В резултат на експерименталната проверка бе доказано, че три от проектираните антисенс олигонуклеотиди инхибират бактериалния растеж - АСО 1, АСО 2, и АСО 3 в при *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 и могат да бъдат приложени като подходящи антибактериални агенти. При различни концентрации един и същи антисенс олигонуклеотид инхибира бактериалния растеж в различна степен. Трите антисенс олигонуклеотида - АСО 1, АСО 2 и АСО 3, показват антибактериален ефект, който се дължи на тяхното комплементарно свързване с мишените им.

При експерименталната проверка, АСО 4 не проявява антибактериален ефект дори при концентрация от 4500 nM.

6.6 Клетъчно проникващият пептид pVEC не инхибира бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus*, дори при концентрация от 4500 nM. Верификацията доказва, че бактерицидният ефект на АСО 1, АСО 2 и АСО 3 се дължи изцяло на техните свойства да се свързват с последователности от РНК на бактерията и да хибридизират комплементарно с нея, с което предизвикват РНаза Н-зависима хидролиза на целевата РНК и водят до нейното разкъсване и нарушаване на генната експресия.

6.7 В следствие на експерименталните проверки бе потвърдено, че АСО технология е приложима в борбата с антибиотичната резистентност. Тя може да бъде използвана и да инхибира различни бактериални РНКи, които са подходящи лекарствени цели.

Проектирането и разработването на нови терапевтични агенти като АСО намалява значително разходите и времето за разработване на антибактериални лекарствени агенти. В случай, че бактериите развият устойчивост срещу конкретен АСО чрез мутация, целевата последователност, към която е насочен АСО, може лесно да бъде променена, чрез промяна в дизайна на АСО.

7. Приноси

Настоящата докторска дисертация има редица приноси, по отношение на предлагането на нови стратегии и терапевтични агенти, които да бъдат приложени с цел противопоставяне и преустановяване на разпространението на бактериалната антибиотична и множествено-антибиотична резистентност.

1. Извършен е пълен биоинформатичен анализ на генома на приоритетния според СЗО човешки бактериален патоген *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 25923*, от който след това са избрани три участъка - *rnpB*, *rnpA* и *rpoB*, отговорни за синтеза на важни метаболити като Рибонуклеаза Р и β -субединицата на РНК полимераза. Всеки един от тези участъци е с дължина от 15 до 22 нуклеотида и неговата последователност за първи път бива предлагана като потенциална мишена за прицелване с терапевтичен агент – антисенс олигонуклеотид. Нито една от трите нуклеотидни последователности не се открива в генома на човека.

2. Направен е дизайн на четири антисенс олигонуклеотида – АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4. Първите три от тях са проектирани да се насочват към избраните последователности в *rnpB*, *rnpA* и *rpoB*, а четвъртият има уникална целева последователност, която не се открива в генома на нито един от организмите от база данни NCBI. На четирите антисенс олигонуклеотида са приложени модификации, в следствие на които те придобиват аптамерна структура и стават по-устойчиви на ензимно разграждане, с по-висок афинитет към субстрата и предизвикват РНаза Н-индуцирана хидролиза.

3. Резултатите, които специфично насочените АСО 1, АСО 2 и АСО 3 проявяват, са обещаващи за възможно приложение като терапевтични агенти срещу човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*. След четирикратно повторени експерименти, се потвърждава бактерицидният им ефект, като се наблюдава инхибиране в растежа на бактериите в концентрации от 2100 nM до 4500 nM. стана ясно, че АСО 1 проявява максимален инхибиращ ефект при високи концентрации – 4500 nM. АСО 2 и АСО 3 показват бактерициден ефект при концентрация 3000 nM. Мишените на АСО 1, АСО 2 и АСО 3 не се откриват в генома на човек, което означава, че биха могли да се прилагат *in vivo*.

4. Потвърден беше и независимият ефект на всеки един антисенс олигонуклеотид, след като се проведе самостоятелен анализ на клетъчно проникващия пептид - pVЕС във висока концентрация от 4500 nM в бактериални клетки от *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 25923*. Той не проявява инхибиращ ефект върху растежа на бактериите. Това потвърждава, че бактериалният растеж е потиснат в предходните експерименти, благодарение на функциите на антисенс олигонуклеотидната терапия и по-конкретно на прецизно избраната мишена за всеки отделен АСО, правилния му дизайн, за да бъде той комплементарен и направените модификации на структурата му.

Всички описани приноси, които носи настоящата докторска дисертация, след извършване на множество експерименти, потвърждават възможността антисенс олигонуклеотидната терапия да се прилага в бактериални клетки. Те насочват вниманието на учените към продължаване на работата с избраните мишени и с проектираните към тях антисенс олигонукелотиди и последващи анализи *in vivo* и тестване по регламента на клиничните изпитания.

Използвани съкращения

АСО – антисенс олигонуклеотид

АСОи – антисенс олигонуклеотиди

АР – антибиотична резистентност

АБ – антибиотик

АТФ – аденинтрифосфат

бд – базови двойки

ГИТ – гастроинтестинален тракт

ГТФ – гуанин трифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ЕС – Европейски съюз

иРНК – информационна рибонуклеинова киселина

ИФ – Импакт фактор, Impact factor, IF

кДНК – копиДНК

Kd – константа на дисоциация

мМ – микромола, μM

МОН – Министерство на Образованието и Науката на Република България

мРНКи – малки рибонуклеинови киселини, sRNAs

миРНК – микро РНК

НК – нуклеинова киселина

нМ – наномола, nM

НТР – нетранслиран район

нкРНК – нуклеинова РНК

ПГ – пептидоглюкан, PG

ПНК – пептид нуклеинова киселина,

РНК – рибонуклеинова киселина

РСМ – рибозим свързващо място

САЩ – Съединени Американски Щати

СЗО – Световна Здравна Организация, WHO, World Health Organization

пре-тРНК – предшественик на транспортна рибонуклеинова кесилина

тРНК – транспортна рибонуклеинова киселина

яРНК – ядрени рибонуклеинови киселини, sRNA

Използвани съкращения на Английски език

μl – микролитра

A – аденин

C – цитозин

CDC - Центъра за Заболявания и
Контрол на превенцията, Centers for
Disease and Control Prevention

CPP – cell penetrating protein (клетъчно
проникващ белтък)

Downstream - надолу по веригата

G – гуанин

HTS – методи за скрининг с висока
чувствителност

HprT- хипоксантин-гуанин
фосфорибозилтрансфераза, HGPRTase

LB среда – Lysogeny Broth

Leu – Leucine, левцин

LNA – заключена нуклеинова киселина,
ЗНК, locked nucleic acid

MDR – мултирезистентни, устойчиви
срещу много лекарства

MDRB - много-лекарствено устойчиви
бактерии

MRSA – methicillin resistant *S. aureus*,
метицилин-устойчиви *S. aureus*

NGD - no-go degradation, no-go
деградация

NMD - Nonsense-mediated mRNA decay,
нонсенс индуцирана деградация

OD – оптична плътност, optical density

PNA - пептидна нуклеинова киселина

PMO - фосфоамидатният
морфоринов олигомер

RNase P, РНаза P - Рибонуклеаза P,
Ribonuclease P

RNase H, РНаза H – Рибонуклеаза H

U – урацил

Upstream – напред по веригата

SRP - The signal recognition particle
RNA, РНК частица за разпознаване на
сигнала, част от
рибонуклеопротеиновия комплекс на
частиците за разпознаване на сигнала
(SRP). SRP разпознава сигналния
пептид и се свързва с рибозомата,
блокирайки синтеза на белтъци.

Списък на таблиците

Таблица 1. Използвани АСО и клетъчно проникващи пептидни последователности за тестване на антибактериалната им активност в *in vitro* експерименти обект на настоящата докторска теза в *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Списък на фигурите

Фигура 1. Рибонуклеаза *grpB* *Staphylococcus aureus*

Фигура 2. Вторична структура на *grpB* рибонуклеаза.

Фигура 3. Схематично представяне на механизма на специфично насочване на химерния АСО 1 към части от РНК на РНКаза Р на бактерията *Staphylococcus aureus*

Фигура 4. Резултат от BLAST анализ на последователността на АСО 1 в човешки геном

Фигура 5. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които са насочени към части от РНК на РНКазата Р при *Staphylococcus aureus*

Фигура 6. Белтъчен компонент на РНКаза Р *rnpA* при *Staphylococcus aureus*

Фигура 7. Вторична структура на *rnpA* при *Staphylococcus aureus*

Фигура 8. Схематично представяне на механизма на специфично насочване на химерния АСО 2 към части от РНК на РНКаза Р на бактерията *Staphylococcus aureus*

Фигура 9. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които са насочени към части *grpA* на РНКазата Р при *Staphylococcus aureus*

Фигура 10. β -субединицата на бактериалната РНК полимераза при *Staphylococcus aureus*

Фигура 11. Вторична структура на *groB* при *Staphylococcus aureus*

Фигура 12. Схематично представяне на механизма на специфично насочване на химерния АСО 3 към β -субединицата на РНК полимераза на бактерията *Staphylococcus aureus*

Фигура 13. Инхибиране на бактериалния растеж от АСО 3 към β -субединицата на РНК полимераза на бактерията *Staphylococcus aureus*

Фигура 14. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които имат различни цели в *Staphylococcus aureus*

Фигура 15. Инхибиране на бактериалния растеж от антисенс олигонуклеотиди, които имат различни цели в *Staphylococcus aureus*

Фигура 16. BLAST анализ на АСО 4 във всички геноми от NCBI

Фигура 17. Експериментална проверка на инхибиращия ефект АСО 4 върху бактериалния растеж на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Фигура 18. Индивидуален инхибиращ ефект на клетъчно проникващия пептид рVЕС при *Staphylococcus aureus*

Библиография

1. Alos JI. [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):692-9.
2. Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T, Mondragon A. Structure of ribonuclease P--a universal ribozyme. *Curr Opin Struct Biol*. 2006;16(3):327-35.
3. Hartmann E, Hartmann RK. The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends Genet*. 2003;19(10):561-9.
4. Valsamatzi-Panagiotou A, Traykovska M, Penchovsky R. Chapter 2 - Mechanisms of antibacterial drug resistance and approaches to overcome. In: Kesharwani P, Chopra S, Dasgupta A, editors. *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*: Academic Press; 2020. p. 9-37.
5. 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.
6. Mosaei H, Harbottle J. Mechanisms of antibiotics inhibiting bacterial RNA polymerase. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(1):339-50.
7. Kaloudas D, Pavlova N, Penchovsky R. EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*. 2018.
8. Penchovsky R, Pavlova N, Kaloudas D. RSwitch: a novel bioinformatics database on riboswitches as antibacterial drug targets. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*. 2020;PP.
9. Drusin SI, Rasia RM, Moreno DM. Study of the role of Mg(2+) in dsRNA processing mechanism by bacterial RNase III through QM/MM simulations. *J Biol Inorg Chem*. 2020;25(1):89-98.
10. Kumar R, Katwal S, Sharma B, Sharma A, Puri S, Kamboj N, et al. Purification, characterization and cytotoxic properties of a bacterial RNase. *Int J Biol Macromol*. 2020.
11. Rahman MS, Gulshan MA, Matsumura S, Ikawa Y. Polyethylene glycol molecular crowders enhance the catalytic ability of bimolecular bacterial RNase P ribozymes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2020;39(5):715-29.
12. Ostendorf T, Zillinger T, Andryka K, Schlee-Guimaraes TM, Schmitz S, Marx S, et al. Immune Sensing of Synthetic, Bacterial, and Protozoan RNA by Toll-like Receptor 8 Requires Coordinated Processing by RNase T2 and RNase 2. *Immunity*. 2020;52(4):591-605 e6.

13. Gerovac M, El Mouali Y, Kuper J, Kisker C, Barquist L, Vogel J. Global discovery of bacterial RNA-binding proteins by RNase-sensitive gradient profiles reports a new FinO domain protein. *RNA*. 2020;26(10):1448-63.
14. Rahman MS, Matsumura S, Ikawa Y. Effects of external molecular factors on adaptation of bacterial RNase P ribozymes to thermophilic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;523(2):342-7.
15. Reiter NJ, Osterman A, Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T, Mondragon A. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*. 2010;468(7325):784-9.
16. Smith JK, Hsieh J, Fierke CA. Importance of RNA-protein interactions in bacterial ribonuclease P structure and catalysis. *Biopolymers*. 2007;87(5-6):329-38.
17. Buck AH, Dalby AB, Poole AW, Kazantsev AV, Pace NR. Protein activation of a ribozyme: the role of bacterial RNase P protein. *EMBO J*. 2005;24(19):3360-8.
18. Kazantsev AV, Krivenko AA, Pace NR. Mapping metal-binding sites in the catalytic domain of bacterial RNase P RNA. *RNA*. 2009;15(2):266-76.
19. Kazantsev AV, Pace NR. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(10):729-40.
20. Hartmann RK, Gossringer M, Spath B, Fischer S, Marchfelder A. The making of tRNAs and more - RNase P and tRNase Z. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009;85:319-68.
21. Eidem TM, Lounsbury N, Emery JF, Bulger J, Smith A, Abou-Gharbia M, et al. Small-molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA-mediated RNA turnover and tRNA processing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2016-28.
22. Lounsbury N, Eidem T, Colquhoun J, Mateo G, Abou-Gharbia M, Dunman PM, et al. Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA that synergize with mupirocin. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(6):1127-31.
23. Colquhoun JM, Ha L, Beckley A, Meyers B, Flaherty DP, Dunman PM. Identification of Small Molecule Inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(2).
24. Wang X, Wang C, Wu M, Tian T, Cheng T, Zhang X, et al. Enolase binds to RnpA in competition with PNPase in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*. 2017;591(21):3523-35.

25. Ulyanova V, Shah Mahmud R, Laikov A, Dudkina E, Markelova M, Mostafa A, et al. Anti-Influenza Activity of the Ribonuclease Binase: Cellular Targets Detected by Quantitative Proteomics. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
26. Gossringer M, Kretschmer-Kazemi Far R, Hartmann RK. Analysis of RNase P protein (rnpA) expression in *Bacillus subtilis* utilizing strains with suppressible rnpA expression. *J Bacteriol.* 2006;188(19):6816-23.
27. Bai H, Zhou Y, Hou Z, Xue X, Meng J, Luo X. Targeting bacterial RNA polymerase: promises for future antisense antibiotics development. *Infect Disord Drug Targets.* 2011;11(2):175-87.
28. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901-12.
29. Floss HG, Yu TW. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev.* 2005;105(2):621-32.
30. Khesin RB, Mindlin SZ, Il'ina TS, Ovadis MI, Gorlenko ZM. Mechanism of dominance of RNA-polymerase structural gene alleles causing sensitivity to antibiotics. *Mol Biol.* 1971;5(6):693-705.
31. Sardana K, Gupta T, Kumar B, Gautam HK, Garg VK. Cross-sectional Pilot Study of Antibiotic Resistance in *Propionibacterium Acnes* Strains in Indian Acne Patients Using 16S-RNA Polymerase Chain Reaction: A Comparison Among Treatment Modalities Including Antibiotics, Benzoyl Peroxide, and Isotretinoin. *Indian J Dermatol.* 2016;61(1):45-52.
32. Mariani R, Granata G, Maffioli SI, Serina S, Brunati C, Sosio M, et al. Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. Part 3: Chemical derivatization. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(16):3748-52.

Автобиография на Катерини Валсаматзи-Панайоту

гр. Солун, Гърция

дата на раждане: 9 май 1993

тел. за връзка: 00306944063148

e-mail: valsamatziaikaterini@gmail.com

Образование и обучение:

2017 г. Придобрита специалност “Доктор” в Пловдивския Университет, гр. Пловдив, България.

15.01.2018 г. - зачислен докторант със Заповед No № РД-20-86 / 12.01.2018г по Биологически науки: 4.3, Генетика – Биоинформатика, към катедра „Генетика” на Биологически Факултет към Софийски Университет „Св. Климент Охридски” за период от три години.

2020 г. Придобрита магистърска степен по програма „Здравни грижи” - Master of Science in Health & Welfare Units“ в Международен Гръцки Университет, гр. Солун, Гърция (International Hellenic University (IHU) of Thessaloniki).

Основни научни интереси:

Основните научни интереси на Катерини са в областта на медицината, биоинформатиката, генетиката, геномиката и микробиологията. Под ръководството на проф. Роберт Пенчовски, Катерини работи върху дизайна на химерни Антисенс Олигонуклеотиди и началната оценка на тяхното използване за терапевтични цели.

Име, използвано в публикации на чужд език:

Aikaterini Valsamatzi

Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou

Aikaterini Nikolaos Valsamatzi

Езици:

Гръцки език – майчин език

Български език – отлично (говоримо) и отлично (писмено)

Английски език – C2 отлично (говоримо) и отлично (писмено)

Немски език – B2 – основно (говоримо) и основно

Глави в книги, научни публикации и постери:

1. **Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou**, Katya B. Popova, and Robert Penchovsky “Drug discovery for targeting drug-resistant bacteria” (2020), Panwar H., Sharma C., Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 46. Sustainable Agriculture Reviews, vol 46. Springer, (pp.205-228), Cham. ISBN 978-3-030-53024-2, https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2_9

2. **Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou**, Martina Traykovska, Robert Penchovsky - “Mechanisms of antibacterial drug resistance and approaches to overcome it” (2020), Prashant Kesharwani, Sidharth Chopra, Arunava Dasgupta, Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria, Elsevier, (pp.9–37)., ISBN 9780128184806, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818480-6.00002-3>

3. Robert Penchovsky and **Aikaterini Valsamatzi** - Engineering antisense oligonucleotides as antibacterial agents – 2019, Arch Clin Microbiol, 1989-8436, Q4 – 12 т. (Medicine), IF – 0,16 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100225606&tip=sid>

Общо: IF:0.16 SJR: 42 точки.

Публикации, извън обема на докторската теза:

1. Robert Penchovsky, Katya B. Popova, **Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou**, New drug discovery strategies for targeting drug-resistant bacteria, Environmental Chemistry Letters – in press

2. **Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou**, Katya B. Popova, and Robert Penchovsky “Strategies for prevention and containment of antimicrobial resistance”, Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 2. Natural and Synthetic Approaches, Springer, ISBN: 978-3-030-58259-3, DOI: 10.1007/978-3-030-58259-3

3. **Aikaterini Nikolaos Valsamatzi-Panagiotou**, Krastina Hristova Stefanova-Kelly². Guillain-Barre syndrome. Topics in special education Journal 79, 2017 year, 61-69 page.

4. **Aikaterini Nikolaos Valsamatzi-Panagiotou**, Krastina Hristova Stefanova-Kelly². Myasthenia Gravis in childhood. Topics in special education Journal 80, 2018 year, 54-61 page.

5. **Aikaterini Nikolaos Valsamatzi-Panagiotou**, Krastina Hristova Stefanova-Kelly². Muscular dystrophies in children. Topics in special education Journal 81, 2018 year, 53-59 page.
6. **Aikaterini Nikolaos Valsamatzi-Panagiotou**, Krastina Hristova Stefanova-Kelly². Epileptic seizures in children. Topics in special education Journal 82, 2018 year, 53-60 page.
7. **Aikaterini Nikolaos Valsamatzi-Panagiotou**, Krastina Hristova Stefanova-Kelly². Spinal muscular atrophy. Topics in special education Journal 84, 2019 year, 15-20 page.
8. **Aikaterini Nikolaos Valsamatzi-Panagiotou**, Krastina Hristova Stefanova-Kelly². Juvenile idiopathic arthritis. Topics in special education Journal 85, 2019 year, 81-90 page

Участие в конференции и международни обмени:

30.08.2018 – 31.08.2018 – участие в Workshop "Certificate of attendance in 2nd Mediterranean Expert Meeting of Vitamin D in the prevention of health disparities during adulthood", гр. Солун, Гърция.

28.04.2018-01.05.2018 – участие в конференция “2018 Среци на работната група по затлъстяването, диабета и високо рисковите пациенти” (2018 Meetings of Working Group on Obesity, Diabetes and the High-Risk Patient), о-в Халкидики, Гърция.

24.05.2018-26.05.2018 - участие в 17-ти Общогръцки конгрес по Кардиология (17th Pan-Hellenic Cardiology Congress), гр. Солун, Гърция.

22-23.04.2019 – участие в EuroSciCon Conference of Microbiology and Virology - Конференция по Микробиология и Вирусология, гр. Атина, Гърция.

<https://penchovsky.atwebpages.com/conferences.php?page=26>

Участие в научни проекти

1. “Антисенс олигонуклеотиди, които специфично се свързват с ФМН и САМ рибопревключватели при човешки патогенни бактерии”, 2019г., No 2621 към ФНИ на СУ.
2. “Дизайн на функционални нуклеинови киселини за синтетична регулация генната експресия при Прокариоти и Еукариоти – ФМН”, 2019г., No КП-06-Н31/18 от 13.12.2019г., ФНИ и МОН.
3. “Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти”, 2017-2020, МОН, ДН 13/14/20.12.2017
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”, 2017г., ФНИ на СУ, 80-10-100/20.04.2017.
5. “Проект КР-06-Н31/18/13.12.2019 от Фонд Научни Изследвания”.

Трудов стаж:

21.07.2014 г. до 02.08.2014 г. практика в катедрата по гинекология в болница на Медицински университет в гр. Пловдив, България

08.08.2014 г. до 16.08.2014 г. практика в отделение по дерматология като медицинска сестра в болница на Медицински университет в гр. Пловдив, България

20.07.2015 г. практика в отделението по дерматология в болница на Медицински университет в гр. Пловдив, България

31.08.2015 г. до 12.09.2015 г. практика в отделение по ортопедия като лекар.

Януари 2018 – Декември 2020г.

Докторант в катедра „Генетика”, Биологически Факултет, Софийски Университет ‘Св. Климент Охридски’.

Езици:

Гръцки език – майчин език

Български език – отлично (говоримо) и отлично (писмено)

Английски език – С2 отлично (говоримо) и отлично (писмено)

Немски език – В2 – основно (говоримо) и основно

Награди:

Стипендия от Медицински университет Пловдив, България за 2013-2014, 2014-2015 и 2016-2017 учебни години за отличен успех.

Стипендиантски проект BG051PO001-4.2.06 „Студентски стипендии“ за 2013-2014, 2014-2015 и 2015-2016 учебни години.