



Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Биологически факултет

Катедра „Генетика“

Автореферат към

**Дисертационен труд за придобиване на образователна и
научна степен „Доктор“**

на Лозена Адриянова Отчева

Професионално направление „4.3. Биологически науки“

Специалност „Генетика – генно инженерство“

на тема:

**„Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс-
олигонуклеотиди като антибактериални агенти“**

Научен ръководител проф. Д-р Роберт Димитров Пенчовски

Дисертационния труд е базиран на следните 2 публикации с участието на докторанта :

1. Popova, K. B., Otcheva, L. A., Traykovska, M., & Penchovsky, R. (2018). RNA as A Potent Target for Antibacterial Drug Discovery. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 10(2), 7752-7754.

2. Lozena A. Otcheva, Nikolett Pavlova, Katya B. Popova, Martina Traykovska and Robert Penchovsky (2020). Why some riboswitches are suitable targets for antibacterial drug discovery? EC Microbiology

Дисертационният труд е осъществен благодарение на проекта „Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс-олигонуклеотиди като антибактериални агенти“ (DN13/14/20.12.2017).

Дисертационния труд е базиран на участието на докторанта в 14-ти конгрес на микробиолозите в България с международно участие на 10-13.10.2018г. в гр. Хисаря, България. Представени са постери на тема "Control of Gene Expression by Bacterial Riboswitches and Their Application as Drug Targets" и "Probing General Toxicity of Antisense Oligonucleotides to and Mammalian Cells".

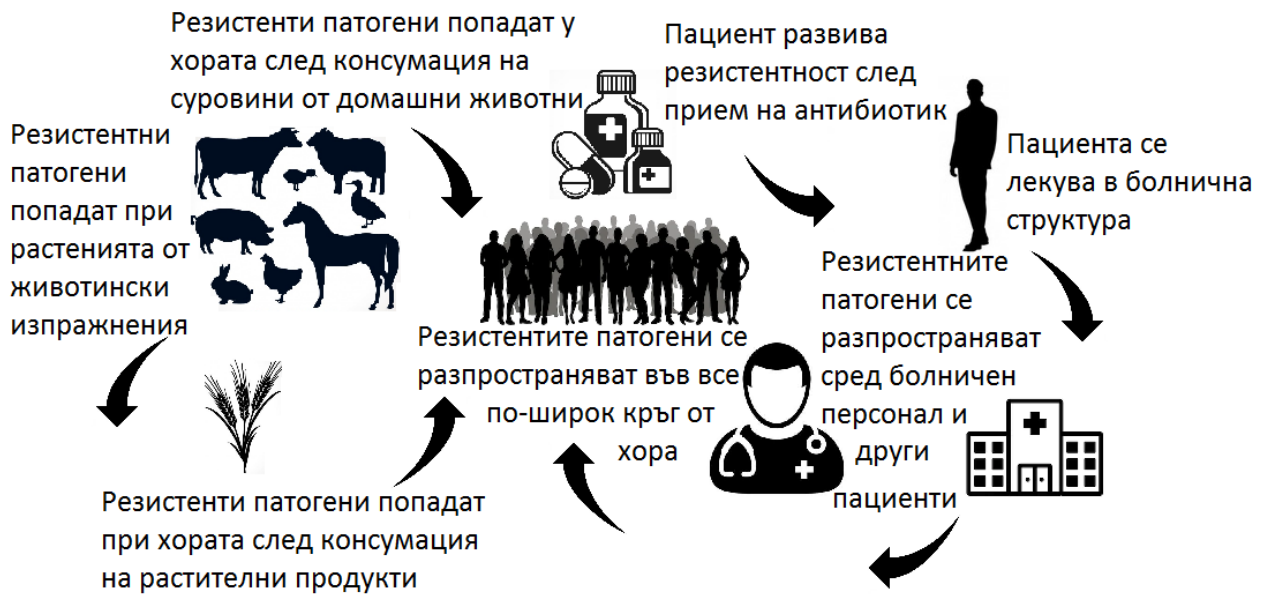
Съдържание :

1. Увод.....	с.5
2. Цел и задачи.....	с.7
3. Материали и методи	с.8
3.1 Материали.....	с.8
3.2 Методи.....	с.9
3.2.1 Биоинформатични методи	с.9
3.2.2 Синхронизиране на бактериална култура	с.10
4. Резултати.....	с.12
4.1. Използването на иРНК, кодираща ензима аденилат киназа (АДК) като мишена на нови антибактериални агенти.....	с.12
4.1.1 Резултати от използваните бази данни, от биоинформатичния анализ на вторичната структура, от анализа на взаимовръзките структура-активност. Резултати от множественото подравняване.....	с.12
4.1.2 Метаболитни пътища с участието на ензима АДК.....	с.22
4.1.3 Механизъм на действие на използваните АСО-и, АСО1 и АСО3и.....	с.23
4.1.4 Резултати <i>in vitro</i> . Експериментално тестване на АСО1, АСО2, АСО3 и КПП рVЕС за антибактериална активност при <i>S. aureus</i>	с.27
4.2 Използването на ТПФ рибопревключвателя (РП) като мишена на нови антибактериални агенти.....	с.33
4.2.1 Резултати от използваните бази данни.....	с.33
4.2.2 Метаболитен път на ТПФ рибопревключвателя.....	с.34
4.2.3 Резултати от биоинформатичния анализ на ТПФ рибопревключвателя.	

Резултати от множественото подравняване.....	с.36
4.2.4 Механизъм на действие на АСО4. Специфично свързване при бактерии, при които се открива ТПФ рибопревключвателя (пр. <i>L.monocytogenes</i>).....	с.40
4.2.5 Резултати in vitro. Експериментално тестване in vitro на АСО4 за антибактериална активност при <i>L. monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> и <i>B. subtilis</i>	с.42
5. Приноси	с.47

1. Увод

Антибиотичната резистентност (АР) е сериозен глобален проблем, застрашаващ здравето на населението. Клиничната антибиотична резистентност се характеризира с неуспеха на антибиотичните терапевтични техники при третирането на патогенни микроорганизми, които преди са били податливи на същите терапевтични техники. АР при патогенни микроорганизми се свързва с висока заболяемост и смъртност. АР може да се появи като естествен еволюционен процес в следствие на продължително излагане на антибиотици. С увеличаване на употребата на антибиотици този естествен процес на естествена селекция при микроорганизмите се увеличава. Главната причина за АР е неправилната употреба на антибиотични средства. Неправилната употреба на антибиотиците се състои в неправилното лечение от страна на квалифицирания лекуващ персонал (пр. изписване на антибиотична терапия без провеждане на антибиограма), отпускане на неназначени антибиотици от страна на квалифициран персонал (пр. отпускане на антибиотици без лекарско предписание от фармацевтите) и злоупотреба с антибиотици от страна на населението (пр. самолечение при медицински неквалифициран индивид или лечение от страна на медицински неквалифициран индивид към болен). Причина за АР може да бъде добавянето на антибиотик към храните, с цел превенция на инфекция, при домашни животни, отглеждани с цел консумация. Този процес води до пренасяне на резистентни микроорганизми от животните към консуматорите им. Причина за АР може да стане добавянето на антибиотични пестициди, с цел превенция на инфекция при домашни растения, отглеждани с цел консумация. Този процес води до пренасяне на резистентни микроорганизми от реколтата към консуматорите ѝ. Антибиотичното замърсяване на водите, използвани от бозайници за пиене и битова необходимост, води до пренасяне на резистентни микроорганизми чрез водата. Това води до появата на АР при нормално населяващи бозайниците бактерии, които предават АР на патогенните бактерии чрез описаните по-долу механизми на разпространение на АР (фиг.1.).



Фиг. 1. Възникване и кръговрат на резистентните патогени сред населението

АР е сериозен икономически проблем в световен мащаб. Срещаните икономически затруднения включват разходи за хоспитализация на индивиди, засегнати от резистентни патогени, извънреден труд и усилия на квалифициран обслужващ персонал, отсъствие от работното място на трудоспособни индивиди, засегнати от резистентни патогени, понижаване трудоспособността на засегнатите индивиди и др. Икономическите последици от заразяването на част от населението води до понижаване на благосъстоянието на цялото население.

От откриването на първите антибиотици и от появата на АР към антибиотичната терапия се провеждат непрекъснати научни изследвания и проектиране на нови антибиотици в борбата с резистентните микроорганизми. Основни необходими познания за проектирането на нови антибиотици включват познанията, придобити от *in vitro* експерименти с микроорганизма мишена, познания относно механизмите на резистентност при различните микроорганизми, механизмите на действие на различните антибиотици, познания за метаболизма на микроорганизмите. Фармацевтичната индустрия е със слаб интерес към инвестиране в разработване на антибиотици поради риска от появата на резистентност, поради която финансовата възвръщаемост би била по-малка, отколкото финансовата възвръщаемост и печалба при други фармацевтични продукти. В разработването на нов антибиотик е необходим внимателен избор при микроорганизмите на неактакувана до момента мишена с ниска или никаква вероятност за развитие на резистентност от страна на третирания микроорганизъм.

2. Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е създаването на химерни АСО-и с антибактериална активност към патогенни бактерии, които се свързват специфично с бактериалната иРНК, кодираща ензима аденилат киназа (АДК) при *S. aureus* и АСО-и, които се свързват специфично с ТПФ РП-я при *L. monocytogenes*.

Задачите, които си поставихме за постигане на поставената цел, са следните:

- 1) Чрез извършването на биоинформатичен анализ, да установим разпространението на последователността мишена в иРНК, кодираща АДК при патогенните бактерии (*S. aureus*). Да направим оценка на най-подходящата мишенна последователност, сред няколко възможни последователности, чрез инструментите на биоинформатиката.
- 2) Да анализираме метаболитните пътища, контролирани от ТПФ РП-я при патогенните бактерии чрез методите на биоинформатиката и използването на бази данни. Да анализираме метаболитните пътища, контролирани от бактериалната АДК при *S. aureus* чрез методите на биоинформатиката и използването на бази данни.
- 3) Да проектираме дизайна на АСО-и, способни да се свържат специфично с набелязаните мишени, в ТПФ РП-я и в иРНК, кодираща АДК и АСО с уникална последователност, който не се свързва с мишена поради липса на специфичност.
- 4) Да установим най-подходящ като преносител на АСО-и през клетъчните стени и мембрани КПП. Установяването на най-подходящ КПП се извършва чрез експерименти *in vitro* на патогенни бактерии, третирани с една и съща АСО-на последователност, свързана с различни КПП. Да докажем липса на антибактериална активност при провеждане на *in vitro* експерименти с *S. aureus*, третирани единствено с КПП.
- 5) Изработените АСО-и да бъдат тествани за антибактериална активност *in vitro* върху клетки на патогенните бактерии *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* и непатогена *B. subtilis*.

3. Материали и методи

3.1 Материали

Използваните биоинформатични инструменти, реактиви и апаратура са описани подробно в раздел „Материали“ от дисертационния труд. Използваните антисен-олигонуклеотиди (АСО) и клетъчно-проникващи пептиди (КПП) в експериментите *in vitro* са дадени в тбл.1.

Нуклеотидна/пептидна последователност	Вид	Предназначение
5'-AAATGTGGGGTATTGGGAATTTTCUU-3'	Олигонуклеотид	Последователност, използвана в дизайна на АСО1 и АСО3
5'-UACGCTCGGAC-3'	Олигонуклеотид	Последователност, използвана в дизайна на АСО2
5'-CAATCCCTACGC-3'	Олигонуклеотид	Последователност, използвана в дизайна на АСО4
NH2-LLIILRRRIRKQAHANSK (кадхерин – англ. <i>VE-cadherin</i>)	Олигопептид (КПП)	КПП, използван в дизайна на АСО1, АСО2 и АСО4
NH2-RRIRPRPPRLPRPRPR (бактенецин – англ. <i>bactenecin-7 (Bac7)</i>)	Олигопептид (КПП)	КПП, използван в дизайна на АСО3

Тбл.1. В таблицата са показани олигонуклеотидните и пептидните последователности, използвани в дизайна на АСО1, АСО2, АСО3 и АСО4, проектирани за целта на дисертационния труд.

Използваните бактерии в експериментите *in vitro* са дадени в тбл.2.

Вид бактерия	Експеримент
<i>S. aureus</i> , щам АТСС 25923.	Бактериите са третираны с АСО1, АСО2, АСО3 и рVEC
<i>L. monocytogenes</i> , щам 52873	Бактериите са третираны с АСО4
<i>B. subtilis</i> , щам 168	Бактериите са третираны с АСО4
<i>E. coli</i> , щам О19:Н7	Бактериите са третираны с АСО4

Тбл.2. В таблицата са посочени видовете бактерии, участващи в проведените *in vitro* експерименти.

3.2 Методи

3.2.1 Биоинформатични методи

Биоинформатичните методи, приложени за целта на настоящия дисертационен труд, извършихме с използването на гореспоменатите биоинформатични инструменти (вж. раздел „Материали“). Този тип методи включва следните стъпки:

1) Анализ на гени и геноми с цел избор на подходяща мишенна последователност

Генните последователности на бактериалните видове, обект на проведените експерименти, описани в настоящата дисертация, са налични в гореспоменатите бази данни, пр. NCBI, KEGG и др. (вж. раздел „Материали“).

2) Анализ на метаболитни пътища на патогенни бактерии

Анализа на жизнено важни за оцеляването на бактериите метаболитни пътища е необходимо, за да бъде избран подходящ метаболитен път, който да бъде блокиран при патогените мишена. Метаболитните пътища са анализирани с помощта на гореспоменатите биоинформатични инструменти, пр. KEGG Pathway (вж. раздел „Материали“).

3) Определяне на мишенни последователности

Установихме наличието или липсата на дадена мишенна последователност при третираните бактерии. Наличието или липсата на мишенната последователност ние установихме чрез използването на гореспоменатите бази данни, пр. BLAST NCBI (вж. раздел „Материали“). Определихме най-подходящата мишенна последователност сред няколко последователности. Мишенната последователност трябва да отговаря на определени критерии. Тя трябва да се характеризира с ОКП, която не образува сдвоявания между базови двойки по дължината си. За целта ние извършихме биоинформатичен анализ на ОКП-и на възможните последователности чрез биоинформатичния инструмент RNAfold web server. С използването на RNAfold web server ние извършихме анализ на вторичната структура на иРНК. Вторичната структура на иРНК, получена с използването на RNAfold web server позволява оценка на региони достъпни или недостъпни за свързване с АСО-а. Благодарение на получената вторична структура ние избрахме мишенни последователности, достъпни за свързване с АСО. Чрез биоинформатичния анализ ние направихме подбор на най-подходящата/най-подходящите мишенна/и последователност/и (вж. раздел „Резултати“).

4) Множествено подравняване

Чрез множественото подравняване на последователности и бактериални гени последователности ние потвърдихме наличието или липсата на мишенната последователност

при анализираниите бактерии. Множественото подравняване ние извършихме с програмата Clustal W/Clustal X (вж. раздел „Материали“).

3.2.2 Синхронизиране на бактериална култура

Течната LB среда и вода сме стерилизирали с помощта на автоклав. След процеса на стерилизация стерилните течна LB среда и вода сме филтрували допълнително чрез стерилен филтър за спринцовка.

Бактериите *S. aureus*, щам ATCC 25923, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* и *E.coli* са ни любезно предоставени, за целта на проведените експерименти, от Департамента по микробиология на Медицински университет, София. *S. aureus* ние е предоставен, за целта на проведените експерименти, в блюдо на Петри с кръвен агар.

Инокулат от единична колония от всяка от гореспоменатите бактерии сме поставили в 20 ml LB във флакон от 50ml. Флаконът със съдържание на инокулата в LB среда сме поставили overnight (ON) в инкубатор на 37°C (изключение прави *B. subtilis*, който расте на 30°C) за 8ч. След 8 часа получената бактериална култура сме хомогенизирали чрез третиране на флакона с вортекс миксер. 100 µl от ON културата се прехвърлят чрез микропипета в кювета от 1ml. Измерената от нас оптична плътност с помощта на спектрофотометър е 0,9 ОП при дължина на вълната 600 nm. Изпълнили сме две последователни разреждания на бактериалната ON култура. Постигнахме разреждане 1:1000 на бактериалната култура спрямо LB средата. За приготвянето на бактериални контролни проби ние използвахме определен обем от второто финално разреждане и стерилна вода. Тоталния обем на бактериалните контролни проби е 100 µl.

АСО-ите, използвани в експериментите са ни предоставени в прахообразна форма. За провеждането на експериментите АСО-ите сме разтворили в DMSO и стерилна вода и сме ги загрели до 70°C до пълното разтваряне на АСО-ите. При пълното разтваряне на АСО-ите разтвора придобива бистър вид.

Приготвянето на бактериалните проби *S. aureus*, третирани с АСО1, сме изпълнили като към гореспоменатия фиксиран обем от второто финално разреждане са добавени 250nM, 500nM и 1000nM от АСО1 във всяка отделна проба. Всички проби са с общ обем 100µl. За достигането на общия обем от 100µl сме добавили стерилна вода към някои от пробите, според необходимост. Приготвянето на бактериалните проби *S. aureus*, третирани с АСО2 е изпълнено с прибавянето на 1000 nM към гореспоменатия фиксиран обем от второто финално разреждане. Общия обем на пробите, третирани с АСО2 е 100µl. Приготвянето на бактериалните проби, третирани с олигопептида pVEC сме изпълнили с прибавянето на 1000nM към гореспоменатия фиксиран обем от второто разреждане. Общия обем на пробите,

третиран с рVЕС е 100µl. Количеството от гореспоменатото бактериално разреждане е еднакво във всички приготвени проби.

Приготвянето на бактериалните проби *L.monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с АСО1, сме изпълнили като към гореспоменатия фиксиран обем от второто финално разреждане сме добавили 150nM, 350nM, 700nM, 1000nM и 2000nM от АСО4 във всяка отделна проба. Всички проби са с общ обем 100µl. За достигането на общия обем от 100µl сме добавили стерилна вода към някои от пробите, според необходимост. Приготвянето на бактериалните проби *E. coli*, третирани с АСО4 сме изпълнили с прибавянето на 2000 nM към гореспоменатия фиксиран обем от второто финално разреждане. Общия обем на пробите, третирани с АСО4 е 100µl. Количеството от гореспоменатото бактериално разреждане е еднакво във всички приготвени проби.

Всички проби първоначално сме приготвили в епруетка тип Еппендорф от 1,5ml. Приготвените проби сме разбъркали с помощта на вортекс миксер. Съдържанието на приготвените проби сме прехвърлили в кювета от 1ml с помощта на микропипета. Всички проби, намиращи се в кювети сме покрили с алуминиево фолио и запечатали с парафилм М. Всички проби сме инкубирали на 37°C в инкубатор-клатачка. Всички проби, контролни и със съдържание на определена концентрация АСО, сме приготвили в брой равен на 3. В края на проведения експеримент сме изчислили средноаритметичните стойности за трите контроли и средноаритметичните стойности за пробите със съответните концентрации на АСО. Оптическата плътност на пробите сме измервали на всеки 30' в продължение на близо 8 часа. Съхранението на използваните бактерии за продължителен период от време сме осъществили чрез приготвянето на глицеролни култури. Глицеролните култури сме приготвили като 500µl сме прехвърлили в епруетка тип Еппендорф от 1,5ml заедно с 500µl глицерин 60%. Приготвените глицеролни култури сме разбърквали с Вортекс миксер до достигането на хомогенност на бактериалната глицеролна култура. Приготвените глицеролни култури ние сме съхранявали при -80°C. Глицеролните култури сме приготвяли на всеки две седмици. Използваните за целта на експериментите бактерии сме поддържали чрез шрихиране на инокулат от единична колония върху твърда LB среда в блюдо на Петри. Блюдото на Петри с нанесените бактерии се оставя ОН в инкубатор на 37°C (30° при *B. subtilis*).

Биологичните отпадъци от проведените *in vitro* експерименти, необходими за целта на настоящата дисертация, сме изхвърляли в съгласие с наредба №1 от 9.02.2015г за изискванията към дейностите по събиране и третиране на отпадъците на територията на лечебните и здравните заведения.

4. Резултати

4.1 Използването на иРНК, кодираща ензима аденилат киназа (АДК) като мишена на нови антибактериални агенти

4.1.1 Резултати от използваните бази данни, от биоинформатичния анализ на вторичната структура, от анализа на взаимовръзките структура-активност. Резултати от множественото подравняване

Аденилат киназата (АДК) е ензим, който регулира хомеостазата в клетките на прокариоти и еукариоти като катализира превръщането на адениновите нуклеотиди аденозин монофосфат (АМФ), аденозин дифосфат (АДФ) и аденозин трифосфат (АТФ). АДК е важен ензим за метаболизма и оцеляването на *S. aureus* и други патогенни бактерии. иРНК, кодираща ензима АДК може да бъде използвана като мишена за нови антибактериални агенти при мултирезистентни щамове патогенни бактерии.

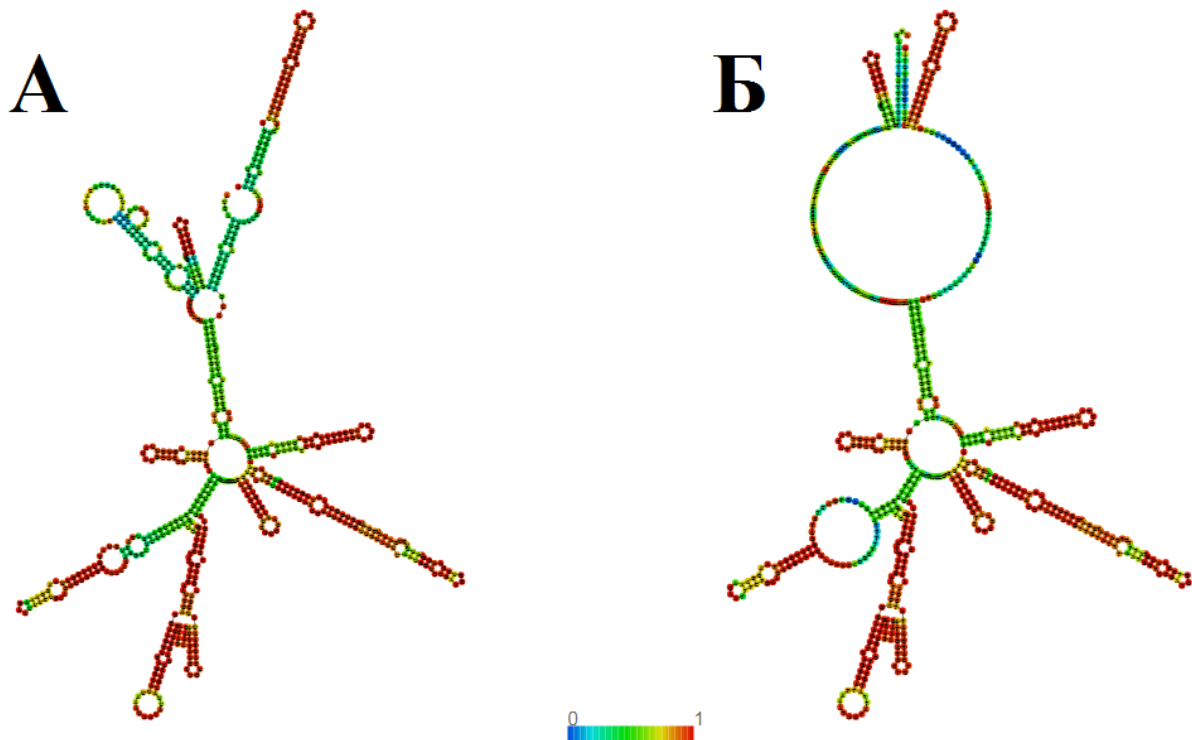
Последователността AAGAAATCCCAATACCCACATTT открихме в гена, кодиращ АДК на над 100 бактерии от рода *Staphylococcus* с използването на базата данни <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (вж. раздел „Материали“ и раздел „Методи“). Гореспоменатата последователност сме открили в 5 патогенни бактерии, от които 4 щамове на *Staphylococcus* с използването на базата данни <https://www.patricbrc.org/app/BLAST> (вж. раздел „Материали“ и раздел „Методи“). Наличието на дадената последователност в ограничен брой бактериални видове дава възможност за специфичност в действието на новия антибиотик към конкретен патоген (*S. aureus*).

	Бактериален патоген	% припокриване при търсенето
1	<i>S. aureus</i> NCTC 8325	100
2	<i>S. aureus</i> N315	100
3	<i>S. aureus</i> DSM 20231	100
4	<i>S. simiae</i> CCM 7213	100
5	<i>Clostridium scatologenes</i> ATCC 25775	100

Тбл.3. Патогенни бактерии, при които е открита дадената последователност според базата данни PATRIC.

Вторичната структура на иРНК, кодираща АДК сме получили с помощта на биоинформатичния инструмент RNAfold web server. Резултатите могат да се проверят на уеб адреса: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=XIKPF7Uslw&r=36>. Биоинформатичния

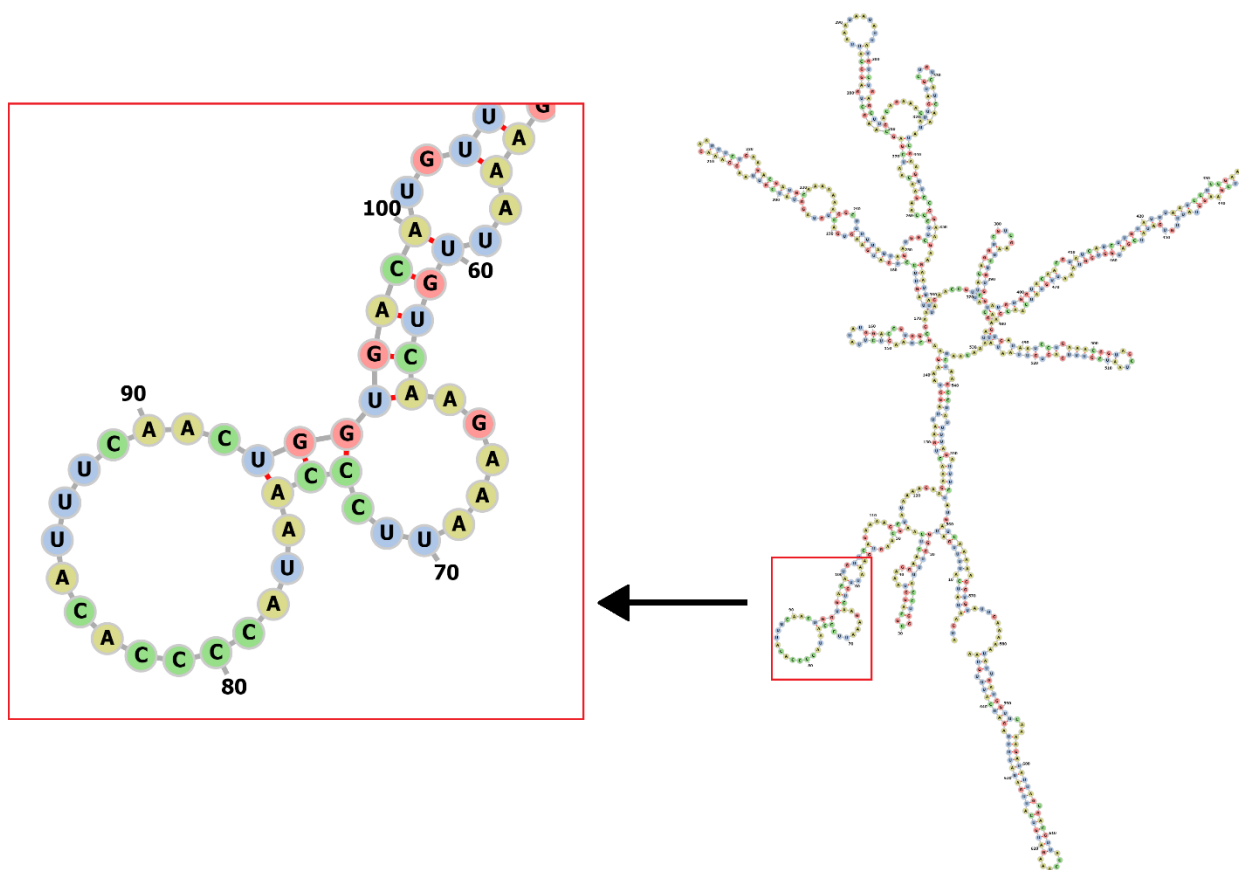
инструмент RNAfold web server предсказва оптимална вторична структура на молекулата с минимум свободна енергия (MSE) от -168.60 kcal/mol. Биоинформатичния инструмент представя система за обозначаване на нуклеотиди със скоби и точки. Според тази система за обозначаване знаците '(' и ')' отговарят съответно на 5' и 3' от сдвоени бази, докато знаците '.' отговарят на несдвоените бази. Биоинформатичния инструмент предсказва и т.н. центроидна вторична структура. Центроидната структура е структура с минимум общо разстояние на сдвоените бази от всички структури в термодинамичния ансамбъл.



Фиг.2. Графично представяне на предполагаемата, според RNAfold webserver, вторична структура на иРНК, кодираща ензима аденилат киназа (АДК). На фиг.2.А. е показана вторичната структура с минимална свободна енергия (MSE). На фиг.2.Б. е показана центроидната вторична структура, която е предполагаемата вторична структура с минимум общо разстояние на сдвоените бази от всички структури в термодинамичния ансамбъл. Вероятността за сдвояване на базите се увеличава от 0 до 1, от тъмно син през светло син, зелен, жълт до червен.

Участъкът от иРНК, кодираща ензима АДК, съответстващ на генната последователност ААGАААТТСССААТАССССАСАТТТСААСТ (от нуклеотид номер 64 до нуклеотид номер 94) е подходящ за мишена поради наличието на минимален брой

сдвоявания по продължение на своята дължина според резултатите от предполагаемата вторична структура и резултатите от системата с точки и скоби, получени от нас чрез използването на биоинформатичния инструмент RNAfold webserver. Последователността AAGAAATTCCCAATACCCCACATTTCAACT е открита в поне 100 щама *S. aureus*, според базата данни NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последователността AAGAAATTCCCAATACCCCACATTT е подходяща за мишена поради наличието на неголям брой сдвоявания по дължината и сред цялата иРНК, където се намира последователността. Сдвояванията по дължината на участъка мишена, които сме открили, са само 4 на брой, според структурата MCE и само 1 на брой сдвояване, според центроидната структура, получени от биоинформатичния инструмент RNAfold web server. По дължината на цялата иРНК молекула сме открили участъци с повече сдвоявания, на места, достигащи до над 10 сдвоявания, според биоинформатичния инструмент RNAfold web server. Тези участъци сме определили като неподходящи за мишена на АСО-иди поради по-ниската вероятност АСО-ите да се свържат с тях. Системата на обозначаване със скоби и точки на сдвоени и свободни бази, съответно, предоставена от RNAfold web server, ни дава възможност за преценка и избор на последователност, подходяща за мишена на АСО-и. С помощта на биоинформатичния инструмент сме установили, че най-подходящия участък за мишена е този между 64 и 94 нуклеотид. Участъкът съдържа най-малко сдвоявания, общо 5 на брой, в цялата иРНК, кодираща ензима АДК.



Фиг.3. В дясно е показана вторичната структура като Forna на иРНК, кодираща ензима АДК, според биоинформатичния инструмент RNAfold webserver. В ляво, е показан уголемен участъкът, подходящ за мишена.

Благодарение на биоинформатичния инструмент RNAfold web server сме направили подробен анализ на обратно комплементарните последователности, с дължина от 25 нуклеотида, които могат да се свържат с участъка от нуклеотид 64 до нуклеотид 94. Обратно комплементарната последователност (ОКП), използвана за направата на АСО, не трябва да образува сдвоявания по своята дължина, за да е достатъчно ефективна в своето действие. ОКП сме получили чрез онлайн приложението, разработено от д-р Роберт Пенчовски (<http://penchovsky.atwebpages.com/revcom.php>).

	№	Последователност в иРНК	ОКП	Вероятност на сдвояване дадена в скоби и точки
1	64-88	AAGAAAUUCCCAAU ACCCACAUUU	AAAUGUGGGGUAUU GGGAAUUUCU
2	65-89	AGAAAUUCCCAAU ACCCACAUUUC	GAAAUGUGGGGUAUU GGGAAUUUCU	((((.....)))).
3	66-90	GAAAUUCCCAAUACCC ACAUUCA	UGAAAUGUGGGGUAU UGGGAAUUUC
4	67-91	AAAUUCCCAAUACCC ACAUUCA	UUGAAAUGUGGGGUA UUGGGAAUUU
5	68-92	AAUCCCAAUACCCACA UUUCAAC	GUUGAAAUGUGGG GUAUUGGGAAU
6	69-93	AUCCCAAUACCCACA UUUCAACU	AGUUGAAAUGUGGG GUAUUGGGAAU
7	70-94	UCCCAAUACCCACA UUUCAACUG	CAGUUGAAAUGUGGG UAUUGGGAA

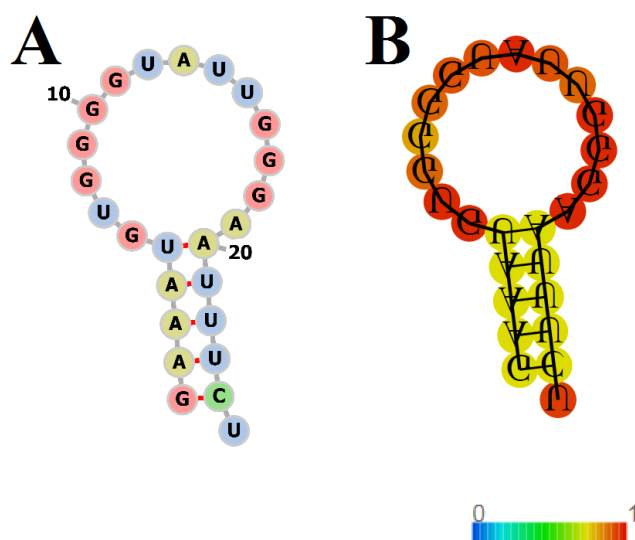
Тбл.4. Таблицата представя ОКП-и на 7-те възможни последователности, с дължина 25 нуклеотида, от нуклеотид 64 до нуклеотид 94 и вероятността за образуването на сдвоени участъци по дължината им чрез системата за обозначаване на бази с точки и скоби. Във втората колона от таблицата с цифри, отговарящи на номера на началния и крайния нуклеотид, е обозначена дължината на последователностите. В третата и четвъртата колона са обозначени последователностите и ОКП-и съответно с букви. В петата колона е отразена вероятността за образуване на сдвоявания по дължината на ОКП, на всяка от посочените последователности, според системата за обозначаване на вероятности с точки и скоби. Резултатите за вероятностите на сдвояване са получени с помощта на инструмента RNAfold webserver. Системата от точки и скоби сочи 6 от зададените от нас ОКП без сдвоявания по дължината и 1 (65-89) с тенденция за образуване на сдвоявания по дължината.

	ОКП	Резултат в RNAfold web server
64-88	AAAUGUGGGGUAUUGGGA AUUUCU	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=KBZ0GeNcyf
65-89	GAAAUGUGGGGUAUUGGG AAUUUCU	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=00oU3S6QVW
66-90	UGAAAUGUGGGGUAUUGG GAAUUUC	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=27gHJAS1LG
67-91	UUGAAAUGUGGGGUAUUG GGAAUUU	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=k4hPq0_xSm

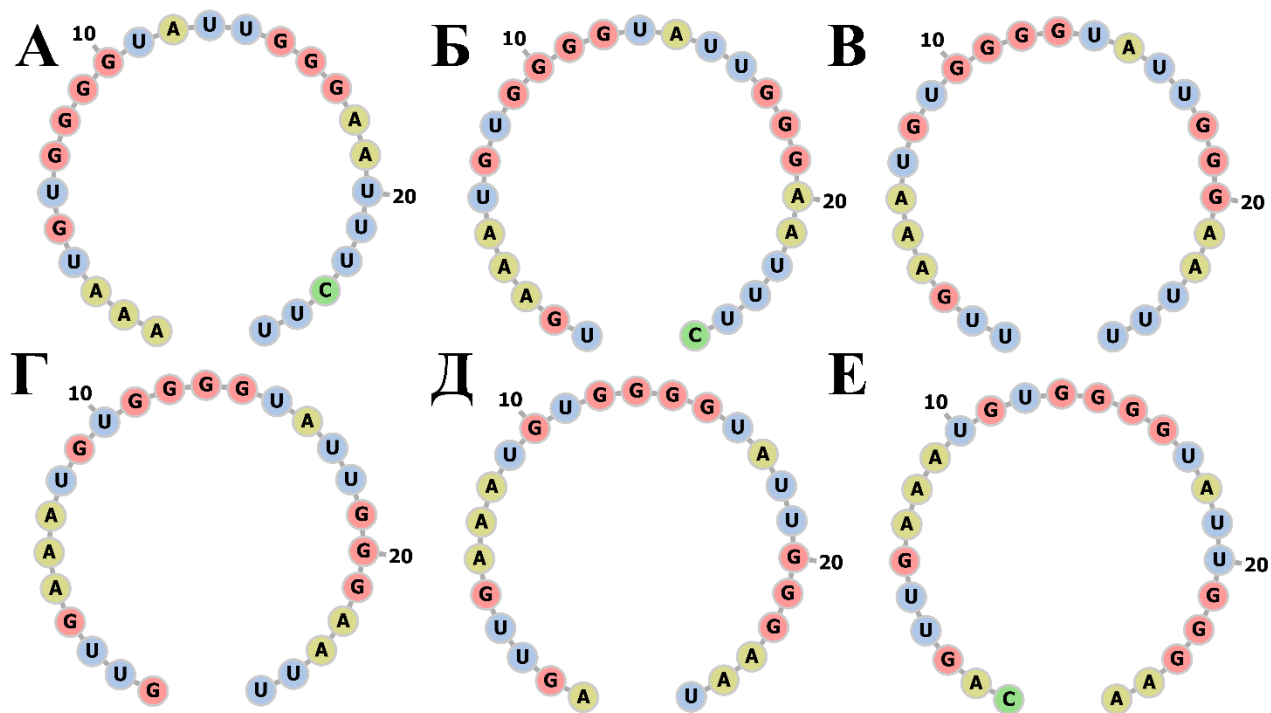
68-92	GUUGAAAUGUGGGGUAUU GGGAAUU	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=2j78mSfcKu
69-93	AGUUGAAAUGUGGGGUAU UGGGAAU	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=Ug4v0ljho6
70-94	CAGUUGAAAUGUGGGGUA UUGGGAA	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=Xe0S2eEYN8

Тбл.5. Таблицата представя ОКП-и на 7-те възможни последователности, с дължина 25 нуклеотида, от нуклеотид 64 до нуклеотид 94 и резултатите на вероятните им вторични структури, които сме получили с помощта на биоинформатичния инструмент RNAfold webserver. Резултатите от биоинформатичния анализ за всяка посочена последователност могат да бъдат проверени на посочените в трета колона уеб адреси.

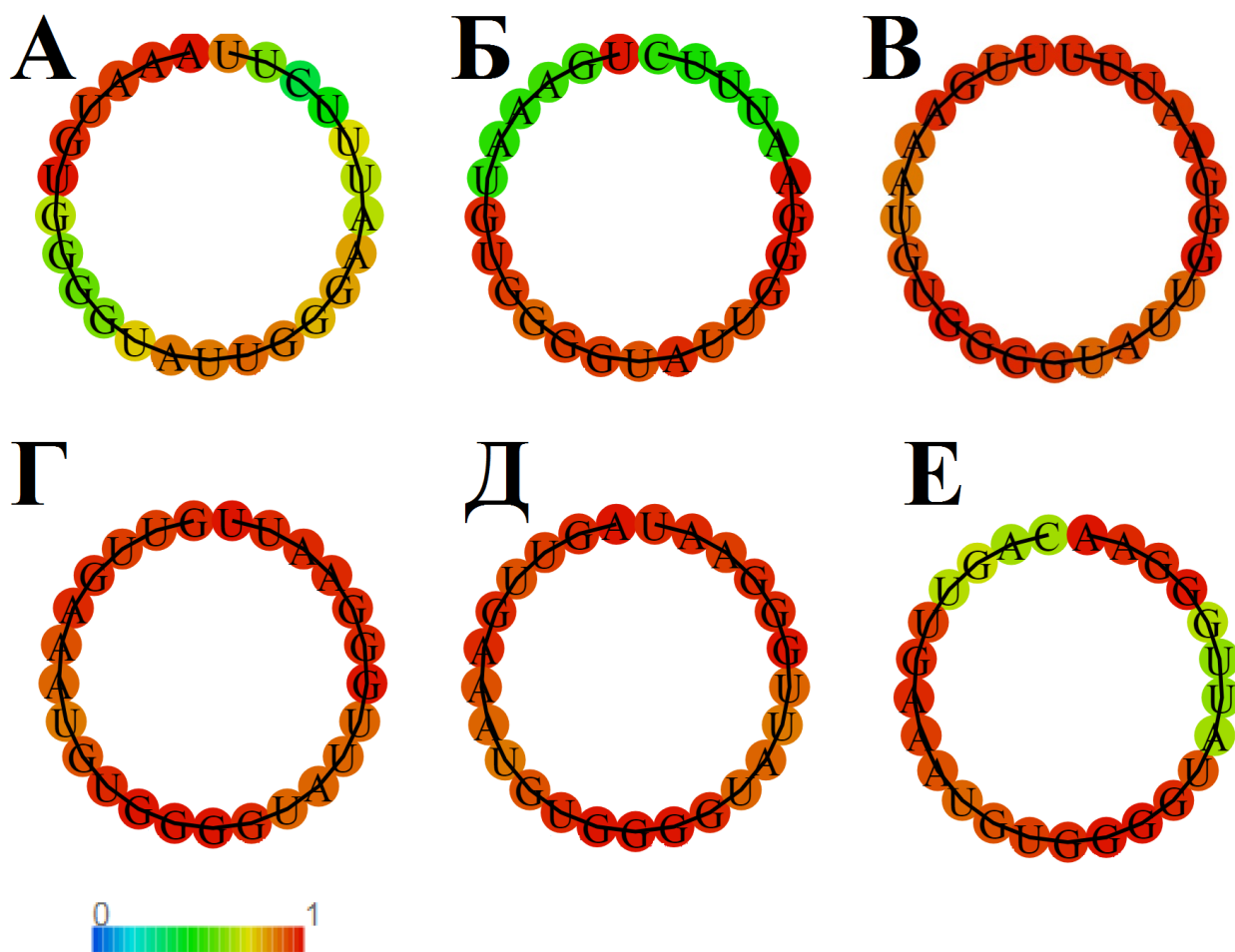
Резултатите, получени от нас, отразени чрез системата с точки и скоби, посочват 6 от анализираните 7 ОКП като последователности с ниска или никаква вероятност да образуват сдвоявания. Резултатите, получени от нас, на ОКП на нуклеотидите от 65 до 89, според системата с точки и скоби, посочва въпросната ОКП като последователност с голяма вероятност на образуване на сдвоявания по своята дължина.



Фиг.4. На фиг.4.А е показана вторичната структура като Forna на ОКП на последователност от нуклеотид 64 до нуклеотид 89. На фиг.4.Б е показана вероятността на сдвояване на базите. Вероятността за сдвояване на базите се увеличава от 0 до 1, от тъмно син през светло син, зелен, жълт до червен.



Фиг.5. На фигурата са показани вторичните структури като Forna на 6-те ОКП с ниска или никаква вероятност на сдвояване, според системата с точки и скоби. Фиг.5.А, фиг.5.Б, фиг.5.В, фиг.5.Г, фиг.5.Д, фиг.5.Е – Forna на ОКП на последователности 1, 3, 4, 5, 6 и 7 съответно.



Фиг.6. На фиг.6. А, Б, В, Г, Д, Е са показани вторични структури на ОКП на последователностите 1, 3, 4, 5, 6 и 7. Всеки нуклеотид е оцветен в различен цвят според вероятността да образува сдвоявания, според резултатите от биоинформатичния инструмент RNAfold webserver. Вероятността за сдвояване на базите се увеличава от 0 до 1, от тъмно син през светло син, зелен, жълт до червен. На фиг. 6.В, 6.Г и 6.Д са показани ОКП-ти, дадени като последователностите с най-голяма вероятност на образуване на сдвоявания. На фиг.6.В, 6.Г и 6.Д всички 25 нуклеотида са посочени с голяма вероятност на образуване на сдвоявания. На фиг.6.А, 6.Б и 6.Е, ОКП с най малка вероятност на образуване на сдвоявания е последователността от фиг.6.А.

Според резултатите за вероятност на сдвояване, получени от нас чрез използването на RNAfold webserver, ОКП 2, 4, 5 и 6 се изключват като неподходящи за проектирането на АСО. Различните вероятности на сдвояване за всеки единичен нуклеотид са показани на фиг.19. Вероятността за сдвояване на базите, посочена в RNAfold webserver, се увеличава от 0 до 1, от тъмно син през светло син, зелен, жълт до червен. Според получените от нас резултати ОКП на последователност 2, с вероятност на сдвояване 1 са 7 нуклеотида, с

вероятност на сдвояване близка до 1 са 7 нуклеотида, с вероятност на сдвояване между 0 и 1 е 1 нуклеотид и с вероятност на сдвояване, близка до 0 са 10 нуклеотида. При ОКП на последователности 4, 5 и 6 всички 25 нуклеотида са посочени с голяма вероятност на образуване на сдвоявания. Според получените от нас резултати ОКП на последователност 4, вероятност на сдвояване 1 се отнася за 17 нуклеотида (оцветени в червен цвят), и 8 нуклеотида са с вероятност близка до 1 (оцветени в оранжев цвят). Според получените от нас резултати ОКП на последователност 5, вероятността за сдвояване е 1 за 16 нуклеотида (оцветени в червено) и близка до 1 за 9 нуклеотида (оцветени в оранжево). Според получените от нас резултати ОКП на последователност 6, вероятност на сдвояване е 1 за 10 нуклеотида (оцветени в червено) и близка до 1 за 15 нуклеотида (оцветени в оранжево). При последователностите 1, 3 и 7, ОКП с най-малка вероятност на образуване на сдвоявания е ОКП последователност 1. Според получените от нас резултати ОКП на последователност 3, с вероятност за сдвояване 1 са 8 нуклеотида (оцветени в червено), с вероятност за сдвояване близка до 1 са 7 нуклеотида (оцветени в оранжево), с вероятност за сдвояване, близка до 0 са 10 нуклеотида (оцветени в зелено). Според получените от нас резултати ОКП на последователност 7, с вероятност за сдвояване 1 са 11 нуклеотида (оцветени в червено), с вероятност за сдвояване близка до 1 са 5 нуклеотида (оцветени в оранжево), с вероятност на сдвояване близка до 0 са 9 нуклеотида (оцветени в зелено). Според получените от нас резултати ОКП на последователност 1, с вероятност на сдвояване 1 са 6 нуклеотида, с вероятност за сдвояване близка до 1 са 6 нуклеотида (оцветени в червено), с вероятност между 0 и 1 са 2 нуклеотида (оцветени в светло зелено), с вероятност на сдвояване близка до 0 са 11 нуклеотида (оцветени в зелено). Получените от нас резултати са събрани в табл.6. Броя нуклеотиди с определена вероятност на сдвояване е показан в проценти. Според получените от нас резултати ОКП 1 е избрана като най-подходяща за използването и като АСО.

ОПК	Вероятност, близка до 0	Вероятност между 0 и 1	Вероятност, близка до 1	Вероятност 1
1	44%	8%	24%	24%
2	40%	4%	28%	28%
3	40%	-	28%	32%
4	-	-	32%	68%
5	-	-	36%	64%
6	-	-	60%	40%
7	36%	-	20%	44%

Тбл.6. Таблицата отразява в проценти (%) броя нуклеотиди с дадена вероятност на образуване на сдвояване.

Последователност 1 определихме като най-подходяща за мишена, тъй като ОКП-та на нея последователност, е с ниска вероятност на образуването на сдвояване по своята дължина, според резултатите, получени от биоинформатичния инструмент RNAfold web server. Резултатите за последователностите на АСО1 и АСО3 могат да се видят на уеб адреса <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=wBMOjjk666>.

Структурата МСЕ и центроидната структура на последователността на ОКП на последователност 1 съвпадат. Системата за обозначаване със скоби и точки на сдвоени и свободни, предоставена от RNAfold web server, дава едни и същи резултати за структурата МСЕ и за центроидната структура на ОКП на последователност 1.

Седемте ОКП, от иРНК участъка от нуклеотид 64 до нуклеотид 94, разглеждаме като макромолекули с общо ядро от 19 нуклеотида. Всяка ОКП последователност се характеризира с различни субституенти под формата на нуклеотиди от към 5' и/или 3' края (фиг.7.).

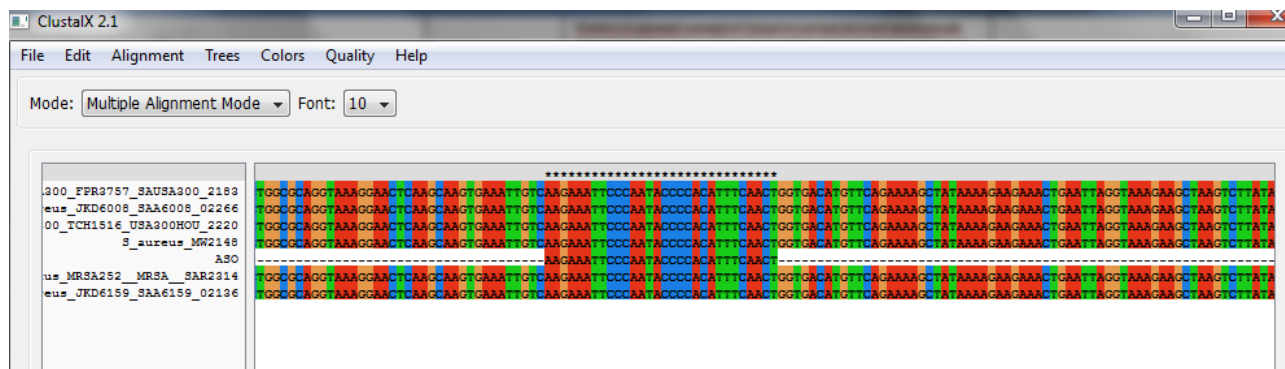


Фиг 7. На фигурата са показани седемте ОКП на иРНК региона от нуклеотид 64 до нуклеотид 94. Общото за всички ОКП ядро от 19 нуклеотиди е обозначено със звездички. Фигурата е направена чрез множествено подравняване на седемте ОКП с програмата ClustalW/ClustalX.

Наличието на множество сдвоени участъци в иРНК, кодираща АДК намалява вероятността от образуване на неспецифични свързвания. Дължината от 25 нуклеотида на АСО1 и АСО3 ние избрахме, така че да покрива максимално мишенния район от 30 нуклеотида. АСО с дължина повече от 25 нуклеотида би навлязъл в клетката по-трудно. При дължина на АСО с повече от 25 нуклеотида вероятността за образуване на сдвояване се увеличава.

Множественото подравняване, ние изпълнихме с програмата Clustal W/X чрез резултати, които получихме от базата данни (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), от базата

данни КЕГ (<https://www.genome.jp/kegg/>), които показват пълно съвпадение между участъка от нуклеотид 64 до нуклеотид 94 с последователностите на поне 100 щама *S. aureus*, от които поне 4 патогенни. Чрез множественото подравняване и резултатите, които получихме от базите данни, ние установихме, че последователността ААGАААТТСССААТАССССАСАТТТСААСТ е консервативна за почти всички представители на *S. aureus*.



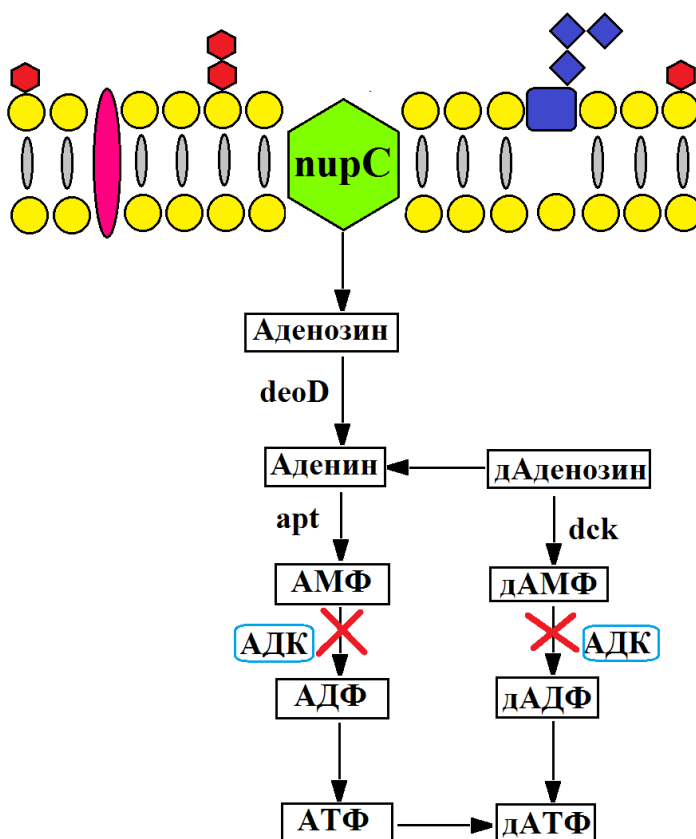
Фиг.8. На фигурата е показано множествено подравняване региона от гена, кодиращ ензима АДК, с най-малко сдвоявания по своята дължина. Съпадението на базите е отразено с еднакъв цвят. Общите за всички бактерии нуклеотиди са отбелязани със звездички. Множественото подравняване е извършено с последователностите от гена, кодиращ АДК на няколко патогенни мултирезистентни стафилококи и извадения участък с най-малък брой сдвоявания, от нуклеотид 64 до нуклеотид 94, подходящ за мишена на АСО.

На база резултатите, които получихме от базите данни, биоинформатичните анализи, множественото подравняване, резултатите от използваните източници за патогенността и резистентността на различни щамове *S. aureus*, ние избрахме последователността ААGАААТТСССААТАССССАСАТТТ като мишена за АСО-и.

4.1.2 Метаболитни пътища с участието на ензима АДК

Аденозина е пренасян от нуклеозидна пермеаза (NupC). Аденозина е превърнат в аденин чрез пуринова нуклеозидна фосфорилаза (DeoD). Аденинът се превръща в аденозин монофосфат (АМФ) чрез аденин фосфорибозил трансфераза (АРТ). Превръщането на АМФ в аденозин дифосфат (АДФ), катализирана от аденилат киназа (АДК), е блокирана поради сръзването на иРНК на АДК от РНКаза Н. В същото време дезоксиаденозин се фосфорилира в дезокси аденозин монофосфат (дАМФ) от деоксицитидин киназа (дЦК). Аналогично процесът на превръщане на дАМФ в дезокси аденозин дифосфат (дАДФ), също катализирано от АДК, е блокиран. Като резултат синтезата на АТФ е блокирана. Генната експресия на

АДК е по този начин блокирана. По този начин е прекъснат метаболитен път, отговорен за важни за оцеляването на бактериалната клетка метаболити .



Фиг.9. Метаболитен път на ензима аденилат киназа (АДК). С червен знак X на фигурата е отбелязан пътят, блокиран от действието на АСО 1 и АСО 3. На фигурата се наблюдават двата възможни блокирани пътя под действието на АСО1 и АСО3. Първият път започва от аденозин през аденин и АМФ до АДТФ. Вторият път започва от дезоксиаденозин през дАМФ до дАДФ.

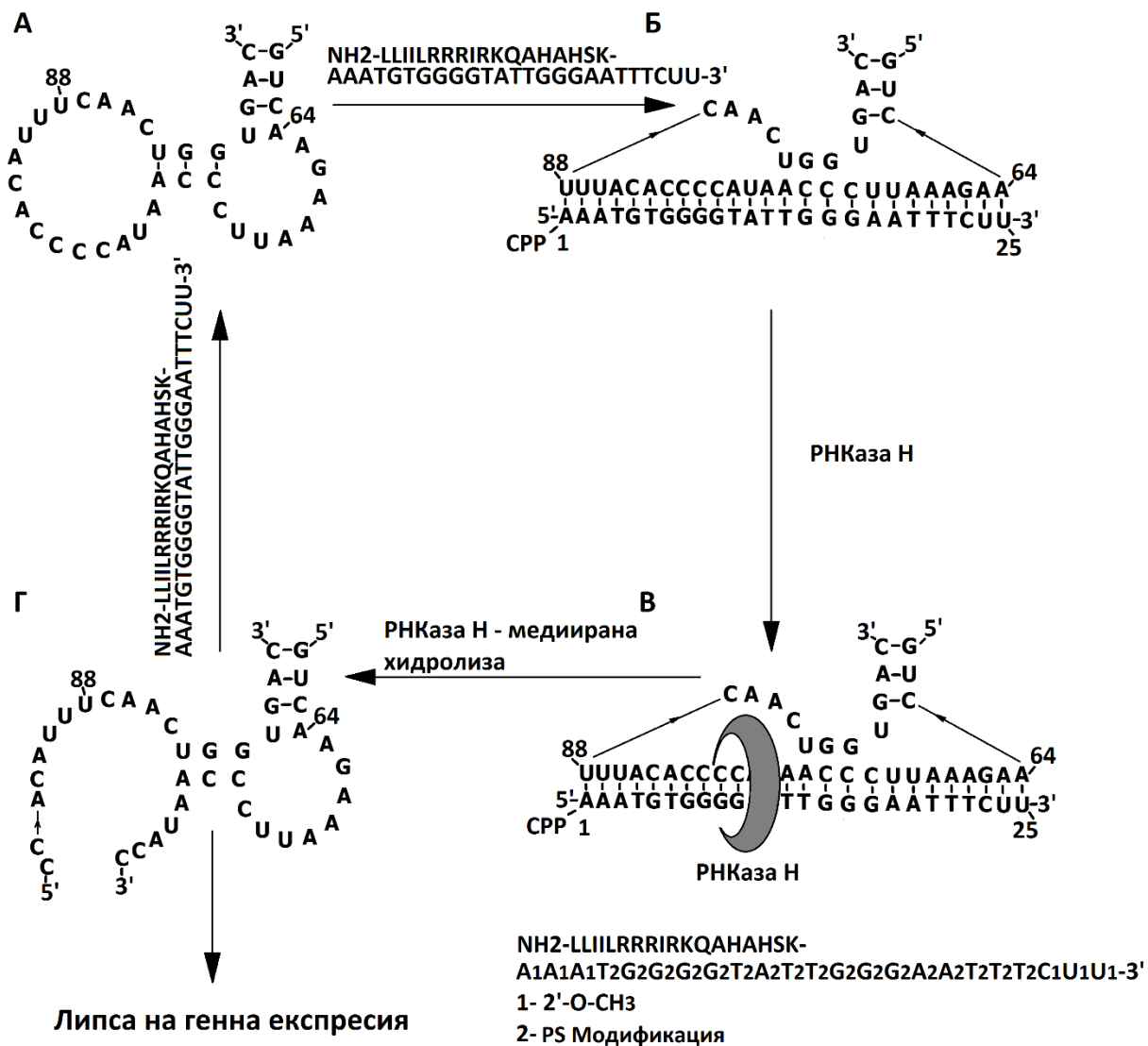
4.1.3 Механизъм на действие на използваните АСО-и, АСО1 и АСО3и. Избор на КПП

АСО-ите, АСО1, АСО2 и АСО3 навлизат в бактериалните клетки с помощта на клетъчно-проникващия пептид (КПП) рVЕС за АСО1 и АСО2 и bac7 за АСО3. КПП-и рVЕС и bac7 са свързани с 5'-края на двата АСО-а посредством своя карбоксил край. АСО-ите проникват през двойния липиден слой на бактериалната клетъчна мембрана благодарение на хидрофобните характеристики на N-края на КПП. След навлизането в клетката, АСО1 и АСО3 се свързват специфично с иРНК на гена, кодиращ ензима АДК. АСО1 и АСО3 се свързват със своята мишена по антисенс начин от нуклеотид 64 до

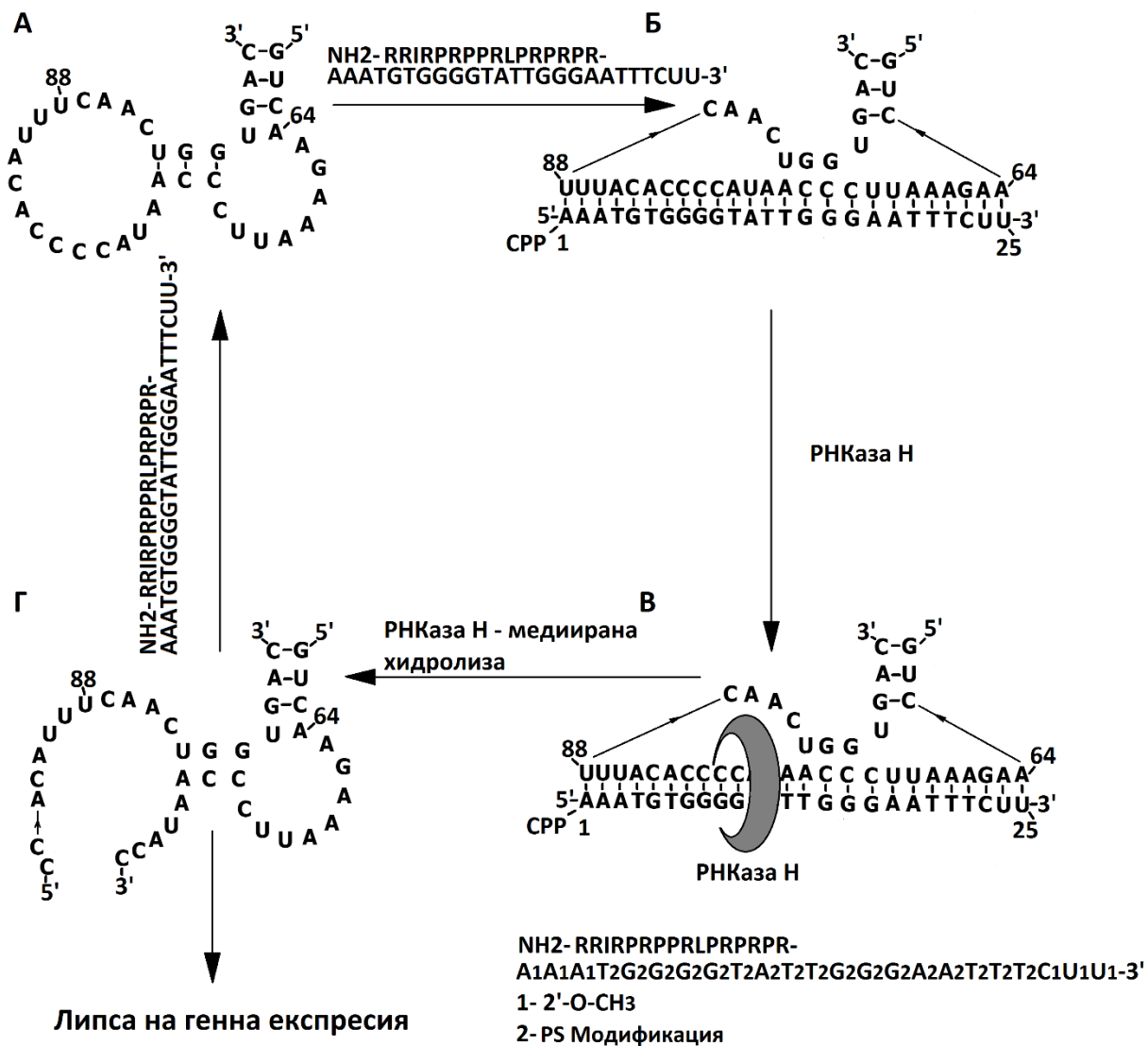
нуклеотид 88 на иРНК, кодираща АДК. Специфичното свързване между АСО1/АСО3 и мишенната иРНК последователност на АДК води до образуването на хибрид.

Новообразувания хибрид е разпознат от ензима РНКаза Н. Ендонуклеазния ензим РНКаза Н разпознава ДНК/РНК хибриди и катализира свързването на хибридният участък чрез хидролиза. Каталитичната дейност на ензима води до срязване на мишенната РНК последователност. АСО1/АСО3 е освободен в клетката. АСО1/АСО3 се свързва с нова иРНК молекула. Описаните събития в клетката се повтарят многократно.

АСО2, навлиза в бактериалната клетка благодарение на КПП рVЕС. При АСО2 рVЕС се свързва с АСО-а посредством карбоксилния си край с 5'-края на АСО2. АСО2 преминава двойния липиден слой на бактериалните мембрани благодарение на хидрофобния N-край на рVЕС. След навлизането в бактериалната клетка АСО2, характерен с единствена по рода си последователност, не се свързва с иРНК на гостоприемника. Неспособен да се свърже с бактериалния геном, АСО2 не осъществява антибактериална дейност.



Фиг.10. Механизъм на действие АСО1. На фигурата е показано специфично свързване на АСО1 с иРНК, кодираща ензима АДК на *S. aureus*. На фиг.10.А е показана вторичната структура на участъка мишена от иРНК, кодираща АДК. На фиг.10.Б АСО1 се свързва с нуклеотидната последователност от 64 до 88 по антисенс начин. На фиг.10.В образуваната хибридна двойноверижна структура е разпозната от ензима РНКаза Н. На фиг.10.Г е показана хидролизата, с помощта на ензима РНКаза Н, на последователността мишена от иРНК. След хидролизата на участъка мишена АСО1е освободен и готов да се свърже с друга мишена.



Фиг.11. Механизъм на действие АСОЗ. На фигурата е показано специфичното свързване на АСОЗ с иРНК, кодираща ензима АДК на *S. aureus*. На фиг.11.А е показана вторичната структура на участъка мишена от иРНК, кодираща АДК. На фиг.11.Б АСОЗ се свързва с нуклеотидната последователност от 64 до 88 по антисенс начин. На фиг.11.В образуваната хибридна двойноверижна структура е разпозната от ензима РНКзаза Н. На фиг.11.Г е показана хидролизата, с помощта на ензима РНКзаза Н, на последователността мишена от иРНК. След хидролизата на участъка мишена АСОЗ е освободен и готов да се свърже с друга мишена.

4.1.4 Резултати *in vitro*. Експериментално тестване на АСО1, АСО2, АСО3 и КПП рVЕС за антибактериална активност при *S. aureus*

Всички приготвени от нас проби за целта на експериментите следват закона на Буге - Ламберт-Беер. Според закона на Буге -Ламберт-Беер оптичката плътност (ОП) расте заедно с бактериалния растеж в пробите.

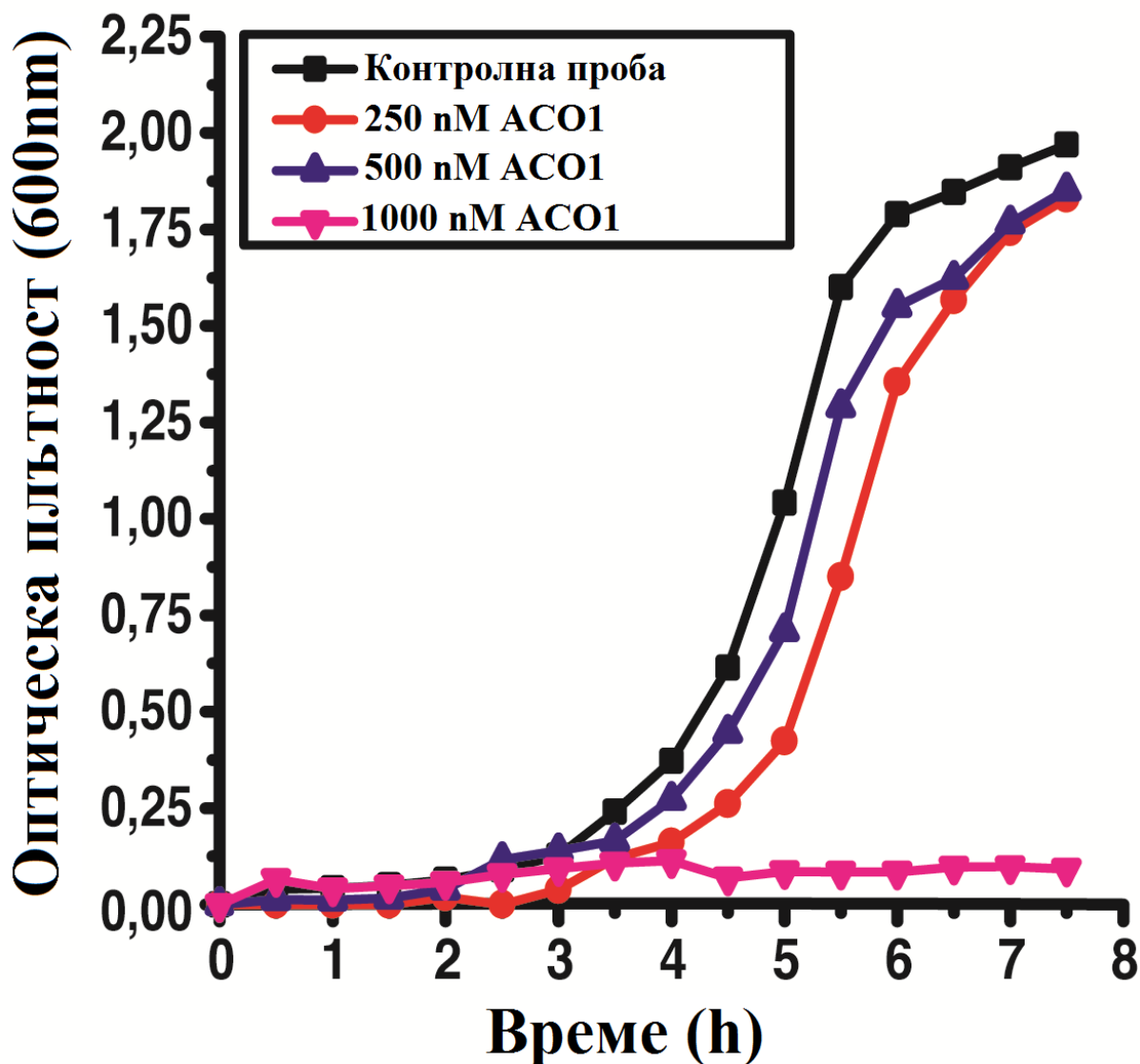
Поставени от нас хипотези преди провеждането на експериментите *in vitro*:

- 1) Специфично свързване с мишената и антибактериална активност на АСО1 и АСО3
- 2) Липса на специфично свързване при използването на АСО2 и липса на антибактериална активност
- 3) Липса на антибактериална активност на КПП рVЕС

Резултатите от експериментите *in vitro*, които получихме са следните:

- 1) Резултати от *in vitro* експериментите с АСО1

Поради клетъчното делене на всеки 30' сме отчитали приблизително удвояване на стойностите на ОП при контролните проби, съдържащи единствено *S. aureus* (криви на растеж, изобразени с черен цвят и черни квадрати по дължината на кривата), при пробите, третирани с 250nM АСО1 (криви на растеж, изобразени в син цвят и триъгълници с връх нагоре по дължината на кривата) и при пробите, третирани с 500nM АСО1 (криви на растеж, изобразени в червен цвят и кръгове по дължината на кривата). В сравнение с контролните проби, пробите, третирани с 500nM АСО1 не отразяват съществен спад в бактериалния растеж. В сравнение с контролните проби, пробите, третирани с 250nM АСО1 отразяват спад в бактериалния растеж с 50% до 5,5 часа от началото на измерването. Контролните проби, пробите, третирани с 250nM АСО1 и пробите, третирани с 500nM АСО1 достигат фаза плато на 7-ми час от началото на измерването. В сравнение с контролните проби, при пробите, третирани с 1000nM АСО1 сме наблюдавали значителен спад в бактериалния растеж. Вероятната причина за значителния спад, който отчетохме, в бактериалния растеж при пробите, третирани с 1000nM АСО1 вероятно се дължи на бактерицидния ефект на АСО1. Стойностите на ОП за пробите, третирани с 1000nM АСО1 остават под 0,25 ОЕ през времето на целия експеримент от 7 часа. Резултатите потвърждават хипотеза 1.

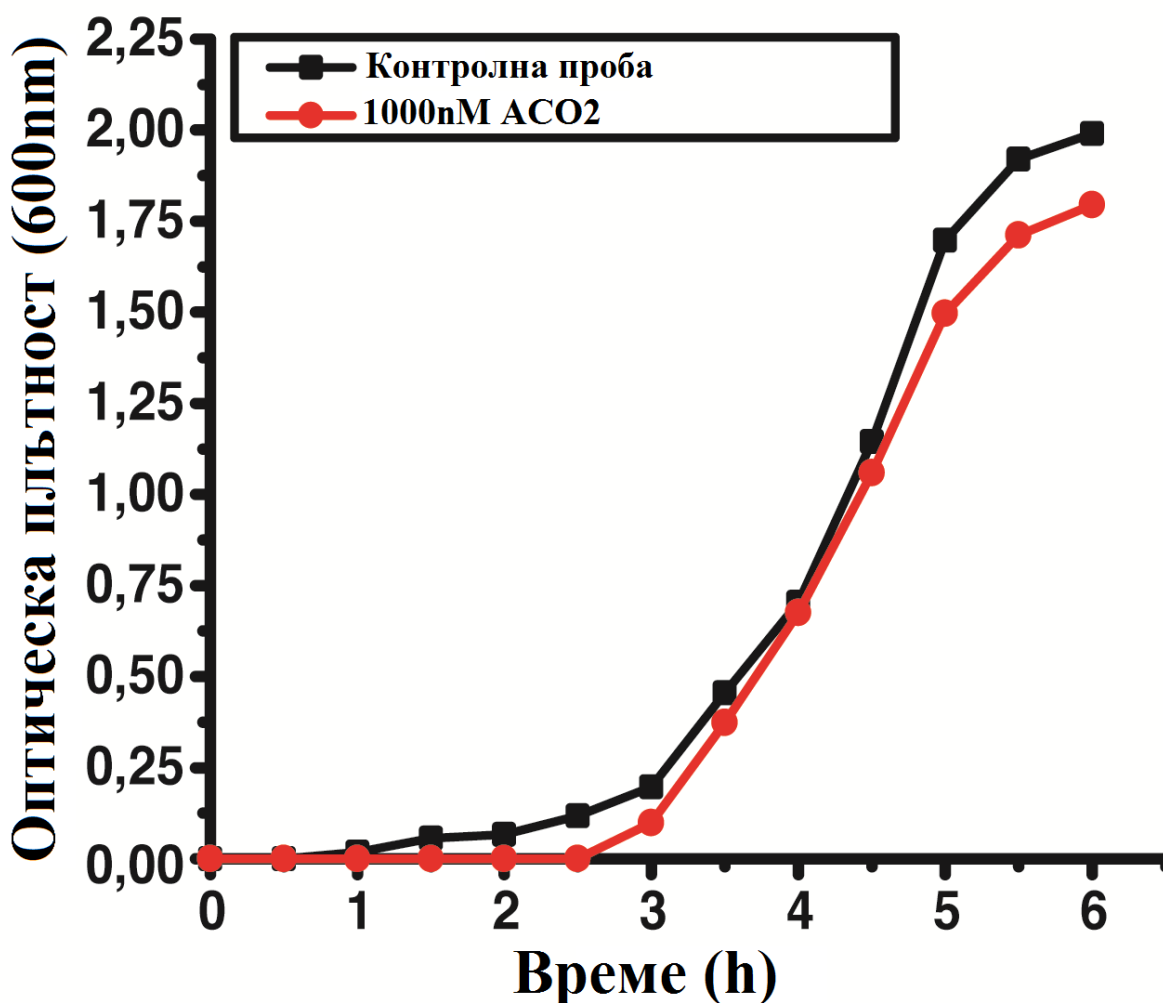


Фиг.12. Растеж на *S. aureus* във времето при оптическа плътност (ОП) от 600nm.

Бактериалния растеж в контролната проба, с нулево съдържание на АСО1, е даден от крива в черен цвят с квадрати. Бактериалния растеж на пробите, третирани с 250nM АСО1 е даден от крива в червен цвят с кръгове. Бактериалния растеж на пробите, третирани с 500nM АСО1 е даден в крива в тъмно син цвят с триъгълници с връх, обърнат нагоре. Бактериалния растеж в пробите, третирани с 1000nM АСО1 е даден в крива в цикламен цвят с триъгълници с връх, обърнат надолу. Триъгълниците, квадратите и кръговете на фигурата са пресечна точка на дадена стойност на ОП в определено време. Най-добър резултат в антибактериално действие сме постигнали при пробите, третирани с 1000nM АСО1. При пробите, третирани с 1000nM АСО1 се наблюдава бактерициден ефект поради специфичното свързване на АСО-а със своята мишена АДК. Изчислената MIC80 за АСО1 е 650nM.

2) Резултатите от експериментите с АСО₂

В сравнение с контролните проби, при пробите, третирани с 1000nM АСО₂ не се наблюдава спад в бактериалния растеж. Контролните бактериални проби (криви на растеж, изобразени в черен цвят с квадрати по дължината на кривата) и пробите, третирани с 1000nM АСО₂ почти удвояват стойностите на ОП, които сме отчетели чрез спектрофотометър на всеки 30'. Отчетените от нас удвоени стойности ОП съответстват на удвояване броя на бактериалните клетки на всеки 30'. Контролните бактериални проби и пробите, третирани с 1000nM АСО₂ достигат фаза плато след 6-ия час при отчетени стойности на ОП 2,1 ОЕ. Резултатите потвърждават хипотеза 2.



Фиг.13. Растеж на *S. aureus* във времето при оптичеста плътност (ОП) от 600nm.

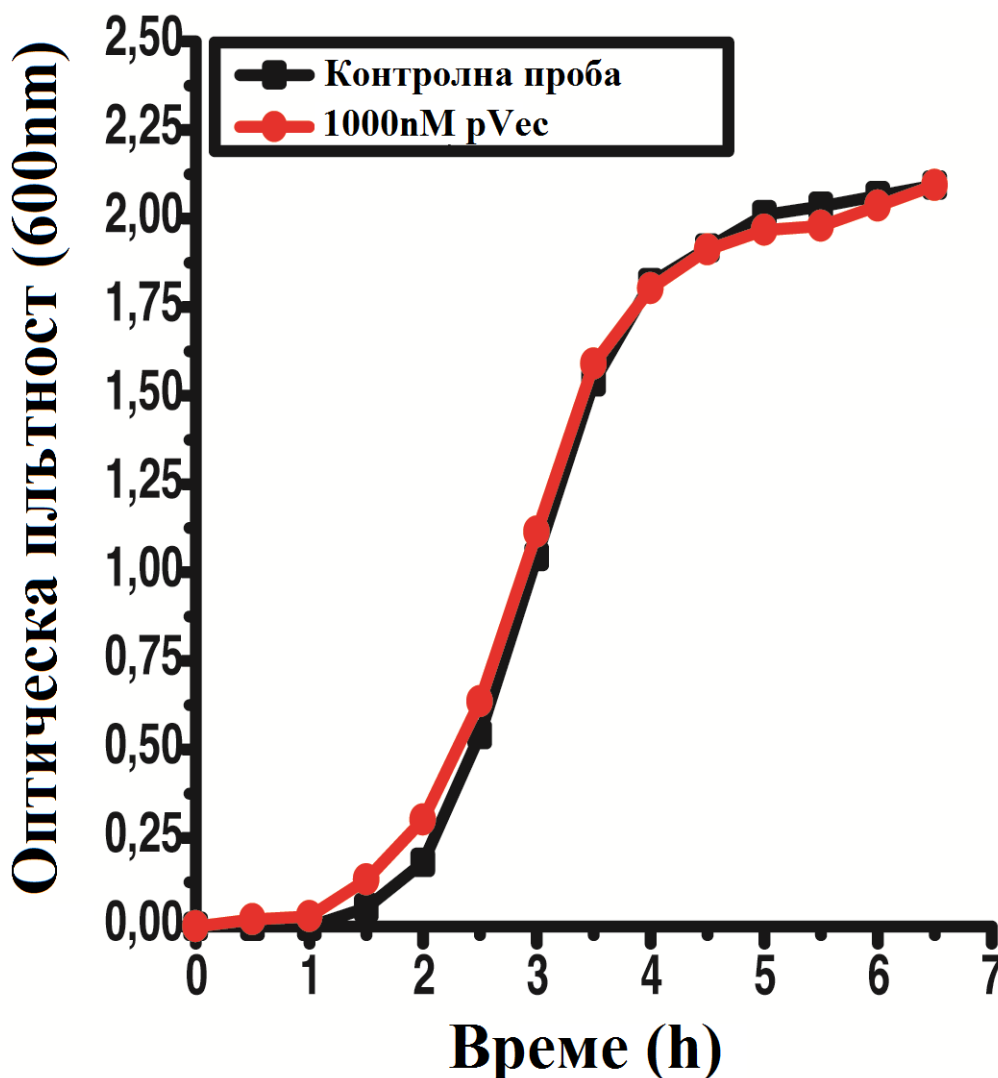
Бактериалния растеж в контролната проба, с нулево съдържание на АСО₂, е даден от крива в черен цвят с квадрати. Бактериалния растеж на пробите, третирани с 1000 nM АСО₂ е даден от крива в червен цвят с кръгове. Квадратите и кръговете на фигурата са пресечна точка на дадена стойност на ОП в определено време. Поради липсата на специфично свързване, при

пробите, третирани с АСО₂ не се наблюдава нито бактериостатичен, нито бактерициден ефект.

3) Резултатите от *in vitro* експериментите с pVEC

В сравнение с контролните проби, при пробите, третирани с 1000nM pVEC не се наблюдава спад в бактериалния растеж. Контролните бактериални проби (криви на растеж, изобразени в черен цвят с квадрати по дължината на кривата) и пробите, третирани с 1000nM pVEC (криви на растеж, изобразени с червен цвят и кръгове по дължината на кривата) почти удвояват стойностите на ОП, отчетени от нас чрез спектрофотометър на всеки 30'.

Контролните бактериални проби и пробите, третирани с 1000nM pVEC достигат фаза плато след 6 часа от началното измерване при стойности на ОП 2,1 ОЕ. Резултатите потвърждават хипотеза 3.



Фиг.14. Растеж на *S. aureus* във времето при оптическа плътност (ОП) от 600nm.

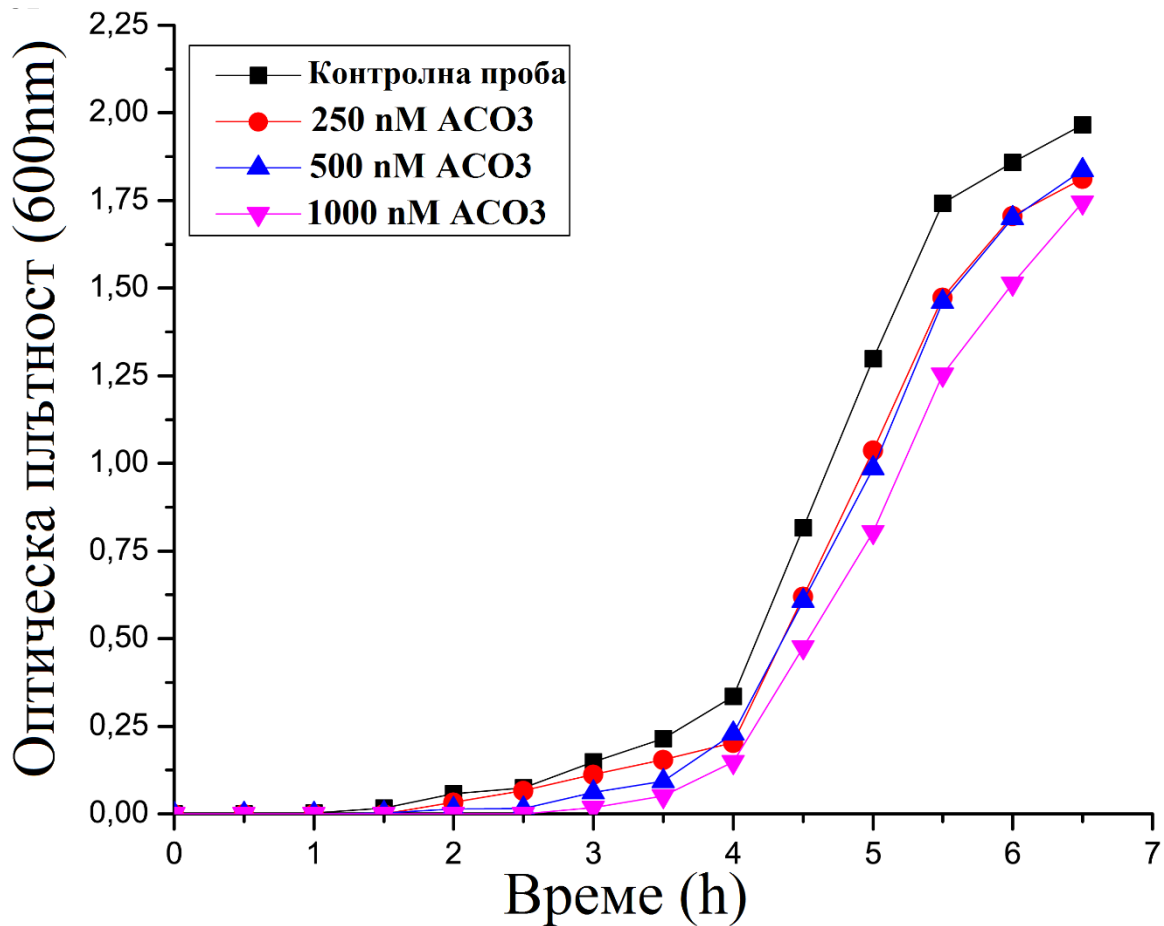
Бактериалния растеж в контролната проба, с нулево съдържание на pVEC, е даден от крива в черен цвят с квадрати. Бактериалния растеж на пробите, третирани с 1000 nM pVEC е даден

от крива в червен цвят с кръгове. Квадратите и кръговете на фигурата са пресечна точка на дадена стойност на ОП в определено време. При пробите, третирани само с рVЕС, в дадената концентрация, не е установен нито бактериостатичен, нито бактерициден ефект.

4) Резултати от експериментите с АСО3

Поради клетъчното делене на всеки 30' сме отчитали приблизително удвояване на стойностите на ОП при всички отчетени от нас проби: контролните проби, съдържащи единствено *S. aureus* (криви на растеж, изобразени с черен цвят и черни квадрати по дължината на кривата), при пробите, третирани с 250nM АСО3(криви на растеж, изобразени в червен цвят и кръгове по дължината на кривата), при пробите, третирани с 500nM АСО3 (криви на растеж, изобразени в син цвят и триъгълници с връх нагоре по дължината на кривата) и при пробите, третирани с 1000 nM АСО3. Растежните криви на пробите, третирани с 250 nM и 500 nM се припокриват по почти цялата дължина на двете криви. В сравнение с контролните проби, пробите, третирани с 250nM и пробите, третирани с 500 nM АСО3 не отразяват съществен спад в бактериалния растеж. В сравнение с контролните проби, пробите, третирани с 1000nM АСО3 отразяват спад в бактериалния растеж с 50% до 5 час от началото на измерването. Всички проби: контролните проби, пробите, третирани с 250nM АСО3, пробите, третирани с 500 nM АСО3 и пробите, третирани с 1000 nM достигат фаза плато на 7-ми час от началото на измерването.

Ниската антибактериална успеваемост на АСО3 в сравнение с АСО1 по всяка вероятност се дължи на по-слабата способност на КПП *bac7* да вмъква АСО в бактериалната клетка. Резултатите, получени от нас, не потвърждават хипотеза 1 поради по-слабата способност на КПП *bac7* да вмъква АСО в бактериалната клетка.



Фиг.15. Растеж на *S. aureus* във времето при оптическа плътност (ОП) от 600nm.

Бактериалния растеж в контролната проба, с нулево съдържание на ASCO₃, е даден от крива в черен цвят с квадрати. Бактериалния растеж на пробите, третирани с 250nM ASCO₃ е даден от крива в червен цвят с кръгове. Бактериалния растеж на пробите, третирани с 500nM ASCO₃ е даден в крива в тъмно син цвят с триъгълници с връх, обърнат нагоре. Бактериалния растеж в пробите, третирани с 1000nM ASCO₃ е даден в крива в цикламен цвят с триъгълници с връх, обърнат надолу. Триъгълниците, квадратите и кръговете на фигурата са пресечна точка на дадена стойност на ОП в определено време.

4.2 Използването на ТПФ рибопревключвателя (РП) като мишена на нови антибактериални агенти

4.2.1 Резултати от използваните бази данни

Тиамин пирофосфат (ТПФ) е активната форма на витамин В1 и коензим в клетките. ТПФ РП-ите са консервативни РНК структури. ТПФ РП-ите са единствените РП-и, открити в еукариотни клетки, освен в бактериални. ТПФ РП-я е открит в някои гъби, растения, алги и протисти. Генната ТПФ-зависима регулация на ТПФ РП-ите при прокариотите включва прекратяване на транскрипцията или предотвратяване на трансляцията. Механизмът на действие на ТПФ РП-я е описан подробно в раздел „Резултати“ от дисертационния труд.

ТПФ РП-я е широко разпространен сред множество бактерии, голяма част патогенни, както установихме чрез използването на базата данни Rfam.



Фиг.16. Разпространение на ТПФ рибопревключвателя. Фигурата е поместена в базата данни Rfam и е налична на веб адреса : <https://rfam.xfam.org/family/RF00059#tabview=tab4> .

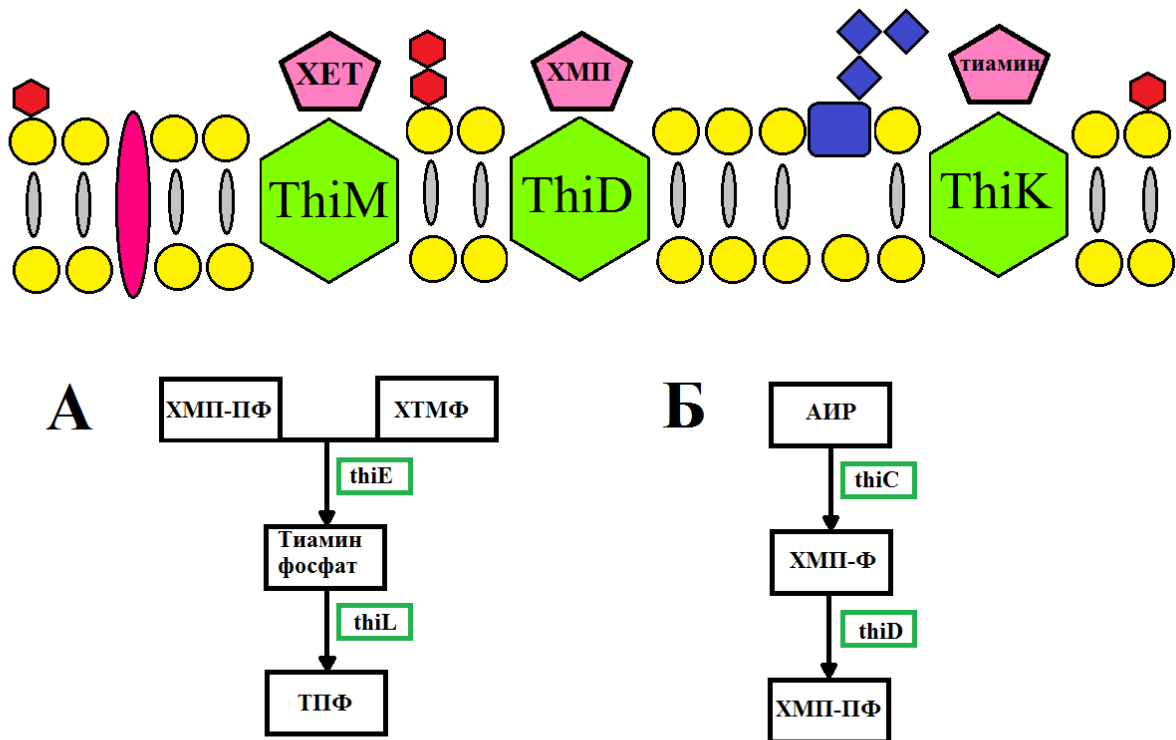
Чрез използването на базите данни и публикации в областта, ние установихме, че ТПФ РП-ят се открива в поне в 27 броя патогенни бактерии, дадени в тбл.12. в раздел „ Резултати“ в дисертационния труд.

4.2.2 Метаболитен път на ТПФ рибопревключвателя

Биосинтеза на тиамин варира в различните организми. Микроорганизми, гъби и растения произвеждат тиамин. Гръбначните организми не произвеждат тиамин. Тиамин фосфат се синтезира чрез свързването на 4-амино-2-метил-5-хидроксиметилпиримидин пирофосфат (ХМП-ПФ, англ. *HMP-PP*) и 4-метил-5-(бета-хидроксиетил)тиазол монофосфат (ХТМФ, англ. *THZ-P*). При *E. coli* тази стъпка е катализирана от ензима тиамин-фосфатна синтаза (англ. *Thiamine-phosphate synthase, thiE*). Следващата стъпка е образуването на тиамин пирофосфат (ТПФ) чрез фосфорилирането на тиамин монофосфат от ензима тиамин-монофосфат киназа (англ. *thiL*). Тази стъпка се нарича биосинтетичен път I на тиамин-дифосфат. Тиамин-монофосфат киназа не е ензим, контролиран от ТПФ РП-я. Възможно е тиамин-фосфатната синтаза да действа на повече субстрати при различните организми *in vivo*. При *B. subtilis*, например, биосинтетичен път II на тиамин-дифосфат се катализира от ензима тиамин-фосфатна синтаза. Друг биосинтетичен път се нарича път на спасяване на тиамин II. Според този биосинтетичен път хидроксиметилпиримидин фосфат (ХМП-Ф, англ. *HMP-P*) се синтезира от 5'-фосфорибозил-5-аминоимидазол (аминоимидазол риботид, АИР, англ. *AIR*), междинен продукт от пуриновия биосинтез с помощта на ензима фосфометилпиримидин синтаза (англ. *thiC*). След това ХМП-Ф е фосфорилиран от бифункционалния ензим хидроксиметилпиримидин/фосфометилпиримидин синтаза (англ. *thiD*) до образуването на 4-амино-2-метил-5-хидроксиметилпиримидин пирофосфат (ХМП-ПФ, англ. *HMP-PP*). Всички реакции, които водят до синтеза на ХМП-ПФ са контролирани от ТПФ РП-я. При *E. coli* тиазоловата част от тиамин е получена от L-тирозин, L-цистеин и 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат. Синтеза на 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат се осъществява от ензима 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат синтаза от глицералдехид трифосфат и пируват, междинни продукти на гликолизата. Аденилирането на серния преносителен белтък (англ. *sulfur carrier protein ThiS*) от АТФ се осъществява от аденилазата на серния преносителен белтък (англ. *thiF*). Подобен биосинтетичен път на спасяване на тиамин II съществува и при *B. subtilis* с използването на ензима глицин оксидаза, продукт на гена *yjbR*. Имената на гените и ензимите са различни при различните бактерии, *E. coli* и *B. subtilis*. Пр. ензима фосфометилпиримидин синтаза (англ. *ThiC*), ензима тиамин-фосфатна синтаза (англ. *ThiE*) и хидроксиетилтиазол киназа *ThiM* при *E. coli* и при *B. subtilis* съответстват на *ThiA*, *ThiC* и *ThiK*. Бифункционалния ензим хидроксиметилпиримидин/фосфометилпиримидин синтаза (англ. *thiD*) при *E. coli* съответства

на два отделни ортолога при *B. subtilis*, продукти на гените *ujbV* и *uwdB*, които кодират поотделно биосинтетична и спасителна хидроксиметилпиримидин киназа.

При прокариотните клетки биосинтеза на хидроксиметилпиримидин (ХМП, англ. *HMP*) и на хидроксиетилтиазол (ХЕТ, англ. *HET*) са най-вариращите стъпки от биосинтетичния път на тиамин. При *E.coli* три различни кинази, *ThiM*, *ThiD*, и *ThiK*, са свързани с вкарването съответно на ХЕТ, ХМП и тиамин от извънклетъчното пространство. Тиамин, тиамин фосфат и тиамин пирофосфат се транспортират активно в ентеричните бактерии с използването на ABC транспортната система, кодирана от гена *thiBPQ*. *B. subtilis* не може да синтезира ХЕТ и ХМП и е принуден да поема тиаминови прекурсори чрез своя специфична транспортна система *YkoEDC*. Биосинтетичният път на тиамин може да бъде прекъснат чрез блокиране на тиамин фосфат синтаза (*ThiE*) и тиамин киназата (*ThiK*), който се контролира от ТПФ РП-я. Ако тези два пътя бъдат блокирани, клетката няма да може да оцелее.

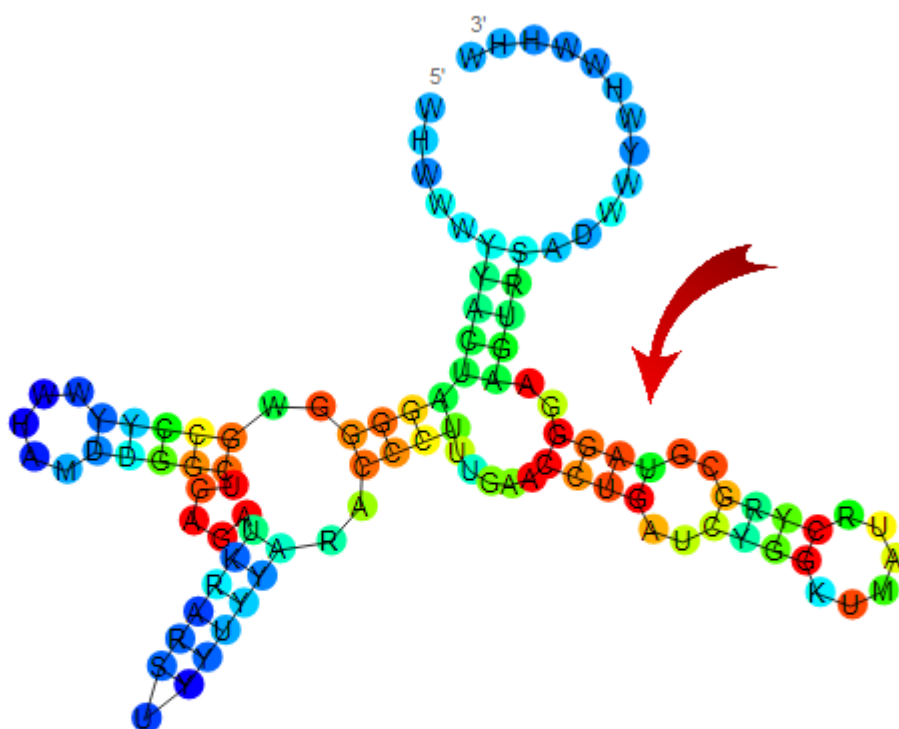


Фиг.17. Биосинтетичен път на ТПФ. На фиг.17.А е изобразен биосинтетичен път I на ТПФ. На фиг.17.Б е изобразен биосинтетичен път II. Биосинтетичен път 2 е контролиран от ТПФ РП.

4.2.3 Резултати от биоинформатичния анализ на ТПФ рибопревключвателя.

Резултати от множественното подравняване

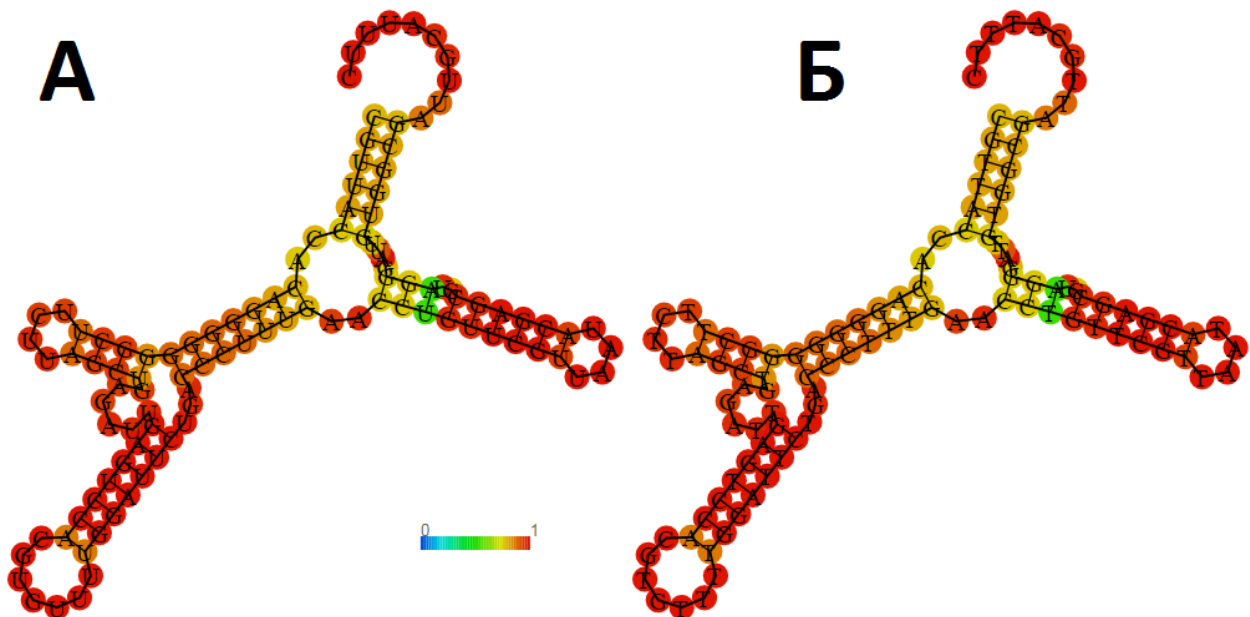
Произведения от нас АСО4 е с дължина от 12 нуклеотида. АСО4 е свързан с КПП рVЕС. АСО4 навлиза през клетъчните мембрани на бактериалните клетки благодарение на КПП рVЕС. ОКП на АСО4 е открита в ТПФ РП-и на патогенни бактерии. Това сме установили чрез използването на последователностите на РП-ите, налични в базата данни Rfam (налична на уеб адреса <https://rfam.xfam.org/>), базата данни NCBI (налична на уеб адреса <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и множествено подравняване, осъществено с програмата ClustalW/ClustalX. ОКП на АСО4 е подходяща за мишена поради наличието по дължината и на малък брой сдвоявания и по-висока консервативност в сравнение с други региони на ТПФ РП-я.



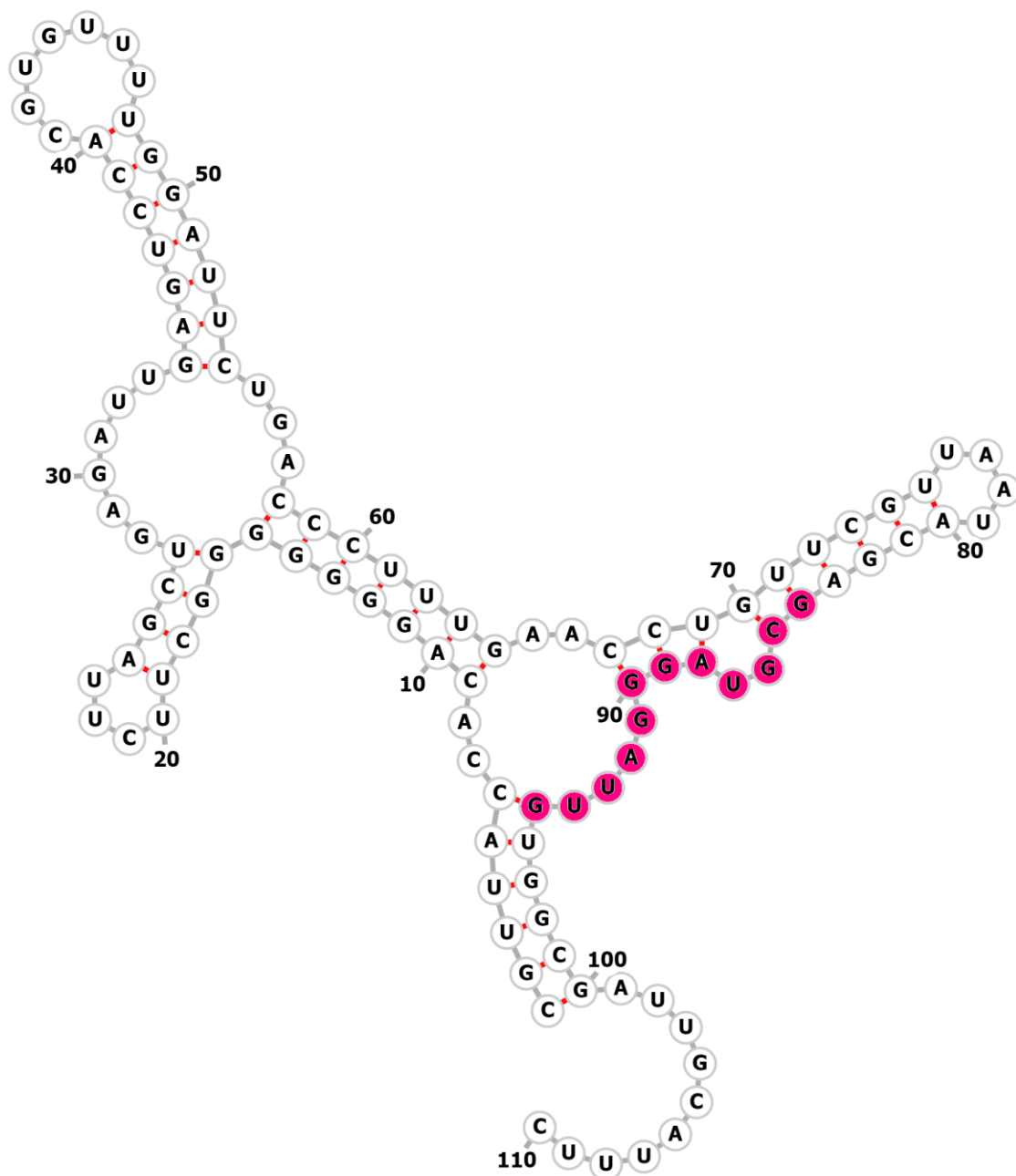
0.00 1.00
Sequence Conservation

Фиг.18. Обща вторична структура на ТПФ рибопревключвател. Фигурата е предоставена от базата данни Rfam. Консервативните бази, еднакви за всички ТПФ рибопревключватели са изобразени с буквите А, G, С и U. Базите, които варират при различните ТПФ рибопревключватели са обозначени с букви, различни от А, G, С и U. Вероятността за консервативност на базите се увеличава от 0 до 1, от лилав, тъмно син, през светло син, зелен, жълт до червен. Базите, дадени в червен цвят са консервативни за всички бактерии, докато базите, дадени в син цвят са силно вариращи сред различните бактерии. Базата данни Rfam предоставя други графични модели на ТПФ рибопревключвателя, налични на уеб адреса <https://rfam.xfam.org/family/RF00059#tabview=tab3>. Червената стрелка показва мишенната последователност на АСО4.

Вторичната структура на ТПФ на *L. monocytogenes* сме получили с помощта на биоинформатичния инструмент RNAfold web server. Резултатите могат да се проверят на уеб адреса: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=pug2wDCJcs> Биоинформатичния инструмент предсказва оптимална вторична структура на молекулата с минимум свободна енергия (MCE) от -31.80 kcal/mol.



Фиг.19. Графично представяне на предполагаемата, според RNAfold webserver, вторична структура на ТПФ рибопревключвателя на *L. monocytogenes*. На фиг.19.А е показана вторичната структура с минимална свободна енергия (MCE). На фиг.19.Б е показана центроидната вторична структура. Вероятността за сдвояване на базите се увеличава от 0 до 1, от тъмно син през светло син, зелен, жълт до червен.



Фиг.20. Предполагамата вторична структура на ТПФ рибопревключвателя на *L.monocytogenes* като *Forna*. Вторичната структура е получена с помощта на биоинформатичния инструмент RNAfold webserver. Оцветените бази отговарят на мишенната последователност на ACO4.

Генната последователност GCGUAGGGAUUG (от нуклеотид номер 84 до нуклеотид номер 95) е подходящ за мишена поради същността му на консервативен район с минимален брой сдвоявания по продължение на своята дължина според резултатите от предполагаемата вторична структура, резултатите от системата с точки и скоби, които ние получихме от биоинформатичния инструмент RNAfold webserver и общата структура на ТПФ РП-я от

базата данни Rfam. Последователността GCGUAGGGAUUG е подходяща за мишена на широкоспектърни антибиотици поради своята консервативност и разпространение сред няколко патогена (вж. резултати от множественото подравняване). Според биоинформатичния инструмент RNAfold webserver по дължината на ОКП, (съответстваща на нуклеотидната последователност на АСО4), вероятността да се образуват сдвоявания е нищожна (фиг. 34). Резултатите могат да се проверят на уеб адреса:

http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=5_4aEHc2WO.

По дължината на ТПФ рибопревключвателя се откриват последователности с много по-малък на брой сдвоявания, подходящи за мишени на АСО-и. Тези последователности не са консервативни (фиг.18.) и са подходящи за мишена при необходимост да се третира един единствен или ограничени на брой патогени.

Ние извършихме множествоно подравняване между ОКП на АСО4 и ТПФ последователностите на различните патогени. ОКП на АСО4 съвпада напълно при *L.monocytogenes*. ОКП на АСО4 съвпада с 11 бази при *B. subtilis*, *B. anthracis*, *S. epidermidis*, 10 бази при *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, 8 бази при *B. abortus*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *C. tetani*, *L. pneumophila*, *N. meningitidis*, *Y. pestis* и *E.coli*, 7 бази при *B. pertussis*, *C. diphtheriae*, *C. perfringens*, *M. tuberculosis*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, 6 бази при *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *E. faecalis*, *S. aureus*. Големия на брой съвпадения в последователностите доказват консервативността на мишенната последователност. Чрез заместване на определени нуклеотиди в АСО4, могат да бъдат проектирани АСО-и, които да са по-специфични за някои от патогените или за конкретен патоген. Пр. АСО4, който има като мишена ТПФ рибопревключвателя на *S. aureus* би имал следната последователност: GTTCAAGGAATT.



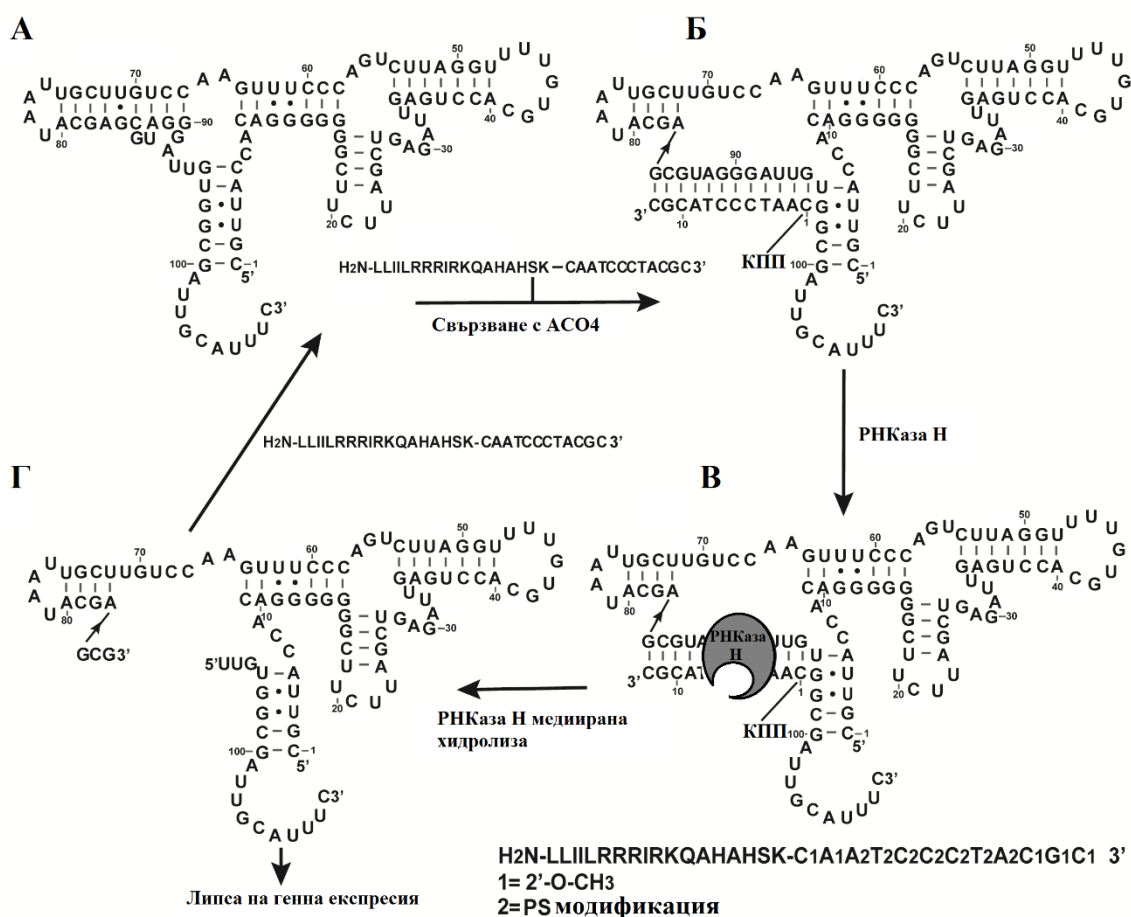
Фиг.21. Множествено подравняване на ОКП на АСО4 и ТПФ рибопревключвателите на патогенните бактерии. Наблюдава се пълно съвпадение от 12 бази за *L. monocytogenes*, съвпадение от 11 бази при три от патогените, 10 съвпадения на бази при 2 от патогените, 8 съвпадения на бази при 8 от патогените, 7 съвпадения на бази при 6 патогена, 6 съвпадения на бази при 4 от патогените.

4.2.4 Механизъм на действие на АСО4. Специфично свързване при бактерии, при които се открива ТПФ рибопревключвателя (пр. *L.monocytogenes*)

Свързването на АСО4 с комплементарната му последователност в общата последователност на ТПФ РП-я води до прекратяване на транскрипцията на полицистронната иРНК. Като резултат генната експресия е блокирана. АСО4, навлиза в бактериалните клетки с помощта на КПП pVEC. КПП pVEC е свързан с 5'-края на двата АСО-а посредством своя карбоксил край. АСО-а прониква през двойния липиден слой на бактериалната клетъчна мембрана, благодарение на хидрофобните характеристики на N-края на КПП. След навлизането в клетката АСО4 се свързва специфично с ТПФ РП-я в иРНК. АСО4 се свързва със своята мишена по антисенс начин от нуклеотид 85 до нуклеотид 96 на ТПФ РП-я. Специфичното свързване между АСО4 и мишенната последователност на ТПФ РП-я води до образуването на хибриден участък. Новообразуваният хибрид е разпознат от ензима РНКаза Н. Ендонуклеазният ензим РНКаза Н разпознава ДНК/РНК хибриди и катализира свързването на хибридният участък чрез хидролиза. Каталитичната дейност на

ензима води до срязване на мишенната РНК последователност. Това води до липса на трансляция на подложената на ензимна деградация от РНКазаН иРНК. След срязването АСО4 е освободен в клетката. АСО4 се свързва с нова иРНК молекула. КПП рVЕС е необходим само, за да въведе АСО-а в клетката. КПП рVЕС се разгражда чрез хидролиза във вътрешността на клетката. Описаните събития в клетката се повтарят многократно.

При липса на специфично свързване при бактерии, при които последователността мишена е с ниско съвпадение на бази в сравнение с ОКП на АСО4 (пр. *E. coli*), липсва антибактериална активност. АСО4 навлиза в бактериалната клетка благодарение на КПП рVЕС. АСО4 преминава двойния липиден слой на бактериалните мембрани, благодарение на хидрофобния N-край на рVЕС. Неспособен да се свърже специфично с бактериалния геном, АСО4 не осъществява антибактериална дейност.



Фиг.22. Механизъм на действие АСО4. На фигурата е показано специфично свързване на АСО4 с ТПФ рибопревключвателя на *L. monocytogenes*. На фиг. 22.А е показана вторичната структура на ТПФ рибопревключвателя и участъка, избран за мишена. На

фиг.22.Б АСО4 се свързва с нуклеотидната последователност от 83 до 94 по антисенс начин. На фиг.22.В образуваната хибридна двойноверижна структура е разпозната от ензима РНКаза Н. На фиг.22.Г е показана хидролиза, с помощта на ензима РНКаза Н, на последователността мишена от ТПФ рибопревключвателя. След хидролизата на участъка мишена, АСО4 е освободен и готов да се свърже с друга мишена.

4.2.5 Резултати *in vitro*. Експериментално тестване *in vitro* на АСО4 за антибактериална активност при *L. monocytogenes*, *E.coli* и *B. subtilis*

Инхибиращият ефект на АСО4, предназначен да се свързва с комплементарната последователност на аптамерния домен на ТПФ РП-я е демонстриран в клетки на човешките патогенни бактерии *L. monocytogenes* и в непатогенния за човека *B. subtilis*. Всички приготвени проби за целта на експериментите следват закона на Буге -Ламберт-Беер. Според закона на Буге -Ламберт-Беер оптичeskата плътност (ОП) расте заедно с бактериалния растеж в пробите.

Поставени хипотези преди провеждането на експериментите *in vitro*:

- 1) Специфично свързване с мишената и антибактериална активност на АСО4 при *B. subtilis* и *L. monocytogenes*.
- 2) Липса на специфично свързване при използването на АСО4 и липса на антибактериална активност при *E. coli*.

Поради клетъчното делене на всеки 30' ние отчитаме приблизително удвояване на стойностите на ОП при всички контролни проби : пробите, съдържащи единствено *L. monocytogenes* (криви на растеж, изобразени квадрати по дължината на кривата), пробите, съдържащи *B. subtilis* (криви на растеж, изобразени с триъгълници с връх нагоре по дължината на кривата) и пробите, съдържащи *E.coli* (криви на растеж, изобразени квадрати по дължината на кривата). Контролните проби с *L. monocytogenes* достигат фаза плато при отчетени стойности от 1,2 ОЕ по време на 4-ти час от началното измерване. Контролните проби с *B. subtilis* и *E. coli* достигат фаза плато при отчетени стойности от 1,4 ОЕ по време на 4-ти час от началното измерване.

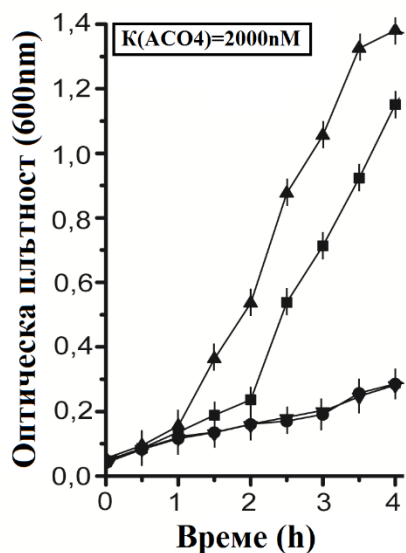
В сравнение с контролните проби с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 150nM АСО4 не отразяват спад в бактериалния растеж. Пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 150nM АСО4, почти удвояват отчетените чрез спектрофотометър стойности на всеки 30'. Пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 150nM АСО4 достигат фаза плато при стойности 1,2 ОЕ и 1,4 ОЕ съответно, на 4-ти час от началното измерване. В сравнение с контролните проби с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 350nM АСО4

не отразяват спад в бактериалния растеж. Пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 350nM АСО₄, почти удвояват отчетените чрез спектрофотометър стойности на всеки 30'. Пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 350nM АСО₄ достигат фаза плато при стойности 1,2 ОЕ и 1,4 ОЕ съответно, на 4-ти час от началното измерване. В сравнение с контролните проби с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, при пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 700nM АСО₄ се наблюдава спад в бактериалния растеж почти двойно след 2 часа от началното измерване и за двата вида бактерии. При пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 700nM, се наблюдава растеж до стойност от 0,4 ОЕ през 3-ти час от началното измерване, докато отчетената стойност на контролните проби по същото време е 1,0 ОЕ. В сравнение с контролните проби с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, при пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 1000 nM и 2000 nM АСО₄ се наблюдава спад в бактериалния растеж почти двойно след 2 часа от началното измерване и за двата вида бактерии. При пробите с *L. monocytogenes* и *B. subtilis*, третирани с 1000 nM и 2000 nM, се наблюдава растеж до стойност от 0,3 ОЕ през 3-ти час от началното измерване, докато отчетената стойност на контролните проби по същото време е 1,0 ОЕ за контролните проби с *L. monocytogenes* и 1,2 ОЕ за контролните проби с *B. subtilis*. В пробите, съдържащи най-висока концентрация на АСО₄, 2000 nM, се наблюдава максимално инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *B. subtilis*. Резултатите потвърждават хипотеза 1 при концентрация на АСО₄ над 700 nM.

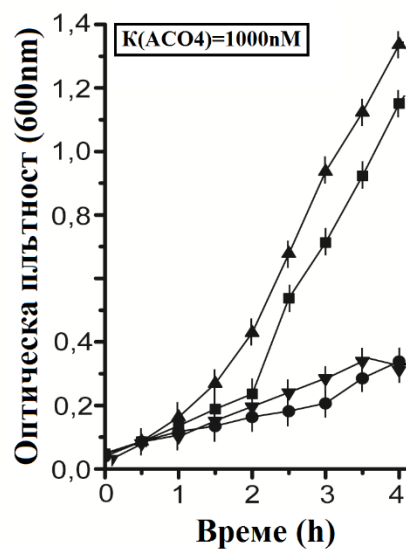
В сравнение с контролните проби с *E. coli*, при пробите с *E.coli*, третирани с 2000 nM АСО₄ не се наблюдава спад в бактериалния растеж. Контролните бактериални проби и пробите, третирани с 2000nM АСО₄ почти удвояват стойностите на ОП, отчетени чрез спектрофотометър на всеки 30'. Отчетените удвоени стойности ОП съответстват на удвояване броя на бактериалните клетки на всеки 30'. Контролните бактериални проби и пробите, третирани с 2000nM АСО₄ достигат фаза плато след 4-ия час при отчетени стойности на ОП 1,2 ОЕ. Резултатите потвърждават хипотеза 2.

КПП рVЕС сам по себе си не е токсичен за клетките. Това е доказано при резултатите от *in vitro* експериментите, описани по-горе. Изчислената MIC₈₀ за АСО, който хибридизира с комплементарната си последователност, разположена в аптамерния домен на ТПФ РП-я и контролира генната експресия, е MIC₈₀ 750 nM.

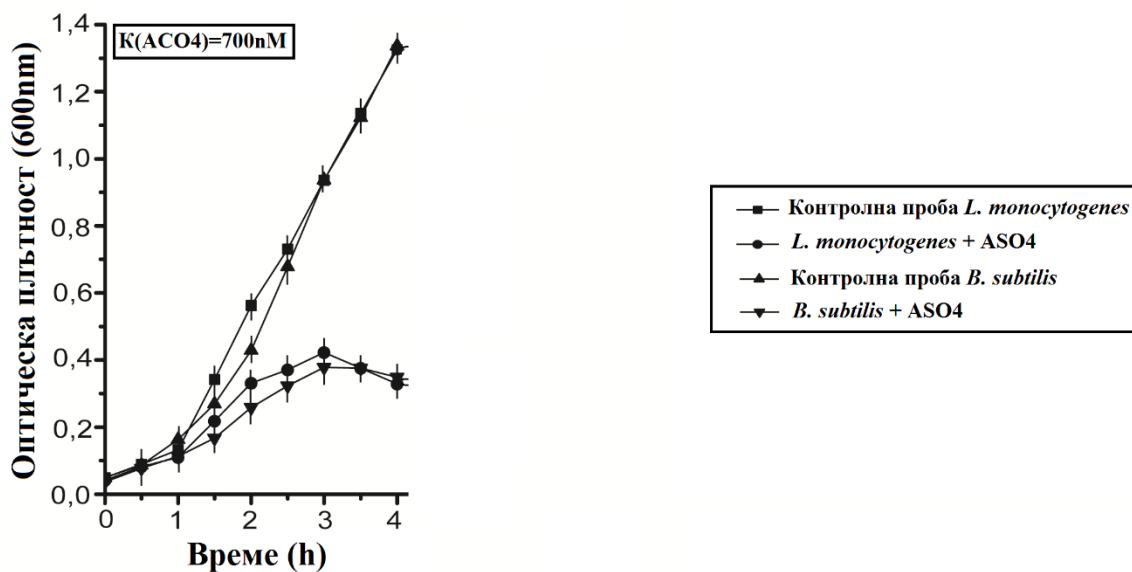
А



Б



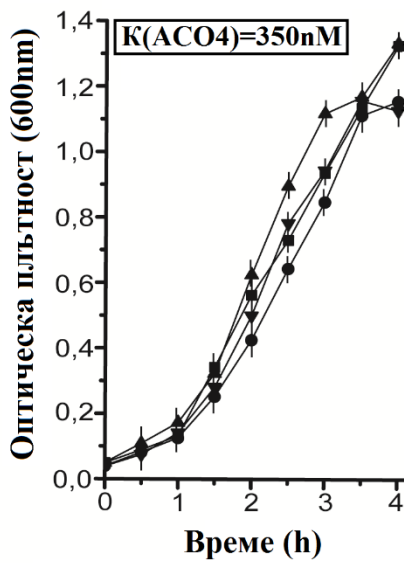
В



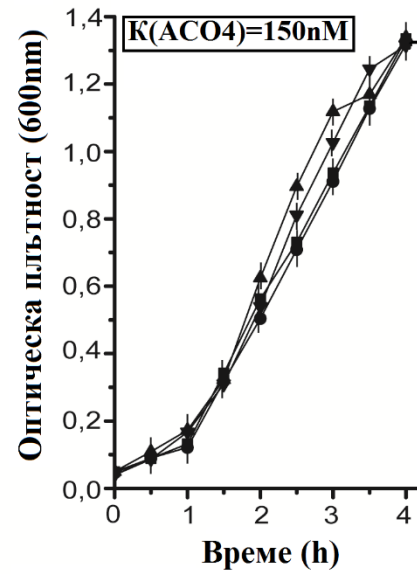
Фиг.23. Фигурата показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *B. subtilis* при проби без АСО4 и проби, третирани с различни концентрации на АСО4. Фиг.23.А показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *B. subtilis* в контролните проби и в проби, третирани с 2000 nM от АСО4. Фиг.23. Б показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *B. subtilis* в контролните проби и в проби, третирани с 1000 nM от АСО4. Фиг.23.В показва бактериалния растеж на на *L. monocytogenes* и *B. subtilis* в контролните проби и в проби,

третиран с 700 nM от АСО4. Кривата на съответната проба може да се разпознае чрез използването на легендата.

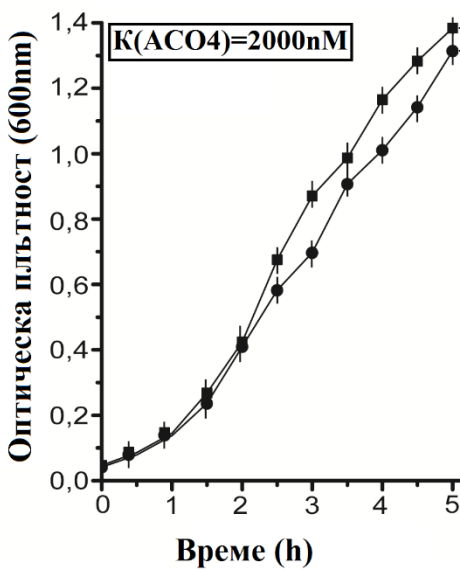
А



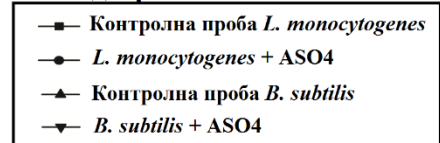
Б



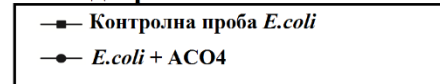
В



Легенда фиг. А и Б



Легенда фиг. В



Фиг.24. Фигурата показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes*, *B. subtilis* и *E. coli* при проби без АСО4 и проби, третирани с различни концентрации на АСО4. Фиг.24.А показва бактериалния растеж на на *L. monocytogenes* и *B. subtilis* в контролните проби и в проби, третирани с 350 nM от АСО4. Фиг.24.Б показва бактериалния растеж на на *L.monocytogenes* и *B. subtilis* в контролните проби и в проби, третирани с 150 nM от АСО4. Фиг.24.В показва бактериалния растеж на на *E.coli* в контролните проби и в проби, третирани с 2000 nM от АСО4. Кривата на съответната проба може да се разпознае чрез използването на легендите.

5. Приноси:

- 1) Ние използвахме иРНК, кодираща ензима АДК и ТПФ РП-я като мишени на АСО-и за първи път. В резултат от специфичното свързване на АСО1 и АСО4 с последователностите мишени демонстрирахме инхибиране растежа на патогенните бактерии *S. aureus* и *L. monocytogenes*. Използвания от нас метод позволява специфичното инхибиране на най-малко 100 щама от рода *Staphylococcus* и поне 27 други патогенни бактерии.
- 2) В резултат от извършения биоинформатичен анализ ние установихме наличието на последователности от иРНК, кодираща АДК, открити при патогенни бактерии, които могат да се използват като мишена на нови антибиотици. В резултат от извършения от нас анализ на биохимичните пътища, в които участва ензима АДК, ние първи установихме, че иРНК, кодираща АДК е подходяща мишена на нови антибиотици.
- 3) Ние изработихме химерните АСО, АСО1 и АСО3, които използват иРНК, кодираща АДК като мишена при *S. aureus* за първи път. Двата, изработени от нас АСО-а, АСО1 и АСО3, са проектирани да се свързват специфично с иРНК, кодираща АДК на *S. aureus*. Тези АСО-и могат да се използват за инхибирането на поне 100 щама *S. aureus*. Ние извършихме за първи път *in vitro* експерименти на *S. aureus*, третирани с АСО1 и АСО3 за доказване на антибактериалната им активност. Чрез извършените от нас *in vitro* експерименти ние доказахме, че АСО1 инхибира бактериалния растеж на *S. aureus*. Ние установихме, че при концентрация от 1000 nM АСО1 има бактерициден ефект при *S. aureus*. Чрез извършените от нас на *in vitro* експерименти ние направихме съпоставка между антибактериалното действие на АСО1 и АСО3 с цел установяване по-подходящия КПП като преносител на АСО в клетката. Чрез получените резултати от експериментите *in vitro* доказахме, че по-силното антибактериално действие на АСО1 се дължи на по-добрата способност на КПП pVЕС, използван при АСО1, на преносител в сравнение с КПП bac7, използван при АСО3. Ние изчислихме MIC80 от 650nM за АСО1.

- 4) Ние извършихме биоинформатичен анализ за установяване на наличие или липса на ТПФ РП във всички патогенни бактерии. Чрез проведения биоинформатичен анализ ние установихме, че ТПФ РП-я се среща при поне 27 патогенни бактерии. ТПФ РП-я е широко разпространен сред патогенните бактерии и дава възможност за използването му като мишена за широкоспектърни антибиотици. Ние използвахме ТПФ РП-я като мишена на АСО-и при *L.monocytogenes* и *B. subtilis*. Специфичното свързване дава възможност за инхибиране растежа на определени патогенни бактерии, при които ТПФ рибопревключвателя е наличен (27 патогенни бактерии). Ние изработихме за първи път химерния АСО4 с антибактериална дейност при *L.monocytogenes* и *B. subtilis*. Доказахме, че АСО4 се свързва специфично с мишенна последователност от ТПФ рибопревключвателя на патогена *L.monocytogenes* и непатогенната бактерия *B. subtilis*. Подобни АСО-и, чрез подходяща замяна на бази по дължината на последователността на АСО4, могат да се използват за инхибирането на поне 27 патогена, при които ТПФ РП-я е наличен. Ние за първи път извършихме *in vitro* експерименти с бактерии, третирани с АСО4, при които ТПФ РП-я е наличен. Чрез проведените от нас *in vitro* експерименти ние доказахме, че АСО4 осъществява антибактериално действие (бактериостатично) при бактериите *L.monocytogenes* и *B. subtilis* поради специфично свързване на АСО-а със своята последователност мишена. Чрез проведените от нас *in vitro* експерименти ние доказахме, че АСО4 не осъществява антибактериално действие при *E. coli* поради липса на специфично свързване с ТПФ РП-я на бактерия. Ние изчислихме MIC80 от 750nM за АСО4.
- 5) Ние изработихме химерен АСО2, характерен с уникална последователност. ОКП на АСО2 не се среща при нито един жив организъм. Чрез проведени от нас *in vitro* експерименти при патогена *S.aureus*, третиран с АСО2, ние доказахме, че АСО с неспецифична последователност не се свързва с бактериалния геном и не инхибира бактериалния растеж.

