

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



SOFIA UNIVERSITY
ST. KLIMENT OHRIDSKI

FACULTY OF BIOLOGY



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Биологически Факултет

КАТЕДРА Генетика

ГЕОРГИ ЙОРДАНОВ МИЛОШЕВ

**“Дизайн и приложение на функционални нуклеинови
киселини за синтетичен контрол на генна експресия“**

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

София

2023 г.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедра „Генетика“ към Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, проведено на 13.07.2023 г., въз основа на ректорска заповед № РД-38-317/05.07.2023 г.

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.
2.

Външни членове на научно жури:

3.
4.
5.

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

Дисертационният труд написан от Георги Йорданов Милошев на тема „Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на генна експресия” съдържа:

Страници: 132

Фигури: 61

Таблицы: 4

Цитирания: 184

Трудът е базиран на 2 научни публикации с участието на докторанта с общ импакт фактор 0,45. Двете статии са публикувани в реферирани в SCOPUS списания и според Scimago Journal and Country Rank (SJR) като общия брой точки от тях са – 32 точки. Публикувана глава от книга с 15 точки.

1. Engineering a Plasmid as a Reporter System for Quantifying Gene Expression in Escherichia Coli – Georgi Y. Miloshev, Martina Traykovska, Dimitrios Kaloudas & Robert Penchovsky, *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* 75 (1), 2022, vol. 75, no. 1, pp. 56–61, ISSN: 13101331

IF: 0,326

Q3, 15 точки

DOI: <https://doi.org/10.7546/CRABS.2022.01.07>,

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=31728&tip=sid>

<http://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/article/view/7/7>

2. Small RNA-based systems for sensing and therapeutic applications – Robert Penchovsky, Georgi Y. Miloshev, Nikolett Pavlova, Katya B Popova, Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Lozena A. Otcheva, Traykovska. Martina, *New Frontiers and Applications of Synthetic Biology*, 2022, Paperback ISBN: 9780128244692, eBook ISBN: 9780323859868, p.103-121, глава от книга, 15 точки

DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824469-2.00004-X>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012824469200004X?via%3Dihub>

3. Various therapies against SARS-CoV-2 – Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Martina Traykovska, Georgi Y. Miloshev, Robert Penchovsky, *Acta Microbiologica Bulgarica* Volume 39 / 1 (2023), 39(1), pp. 3–11

IF: 0,11

Q4, 12 точки

<https://actamicrobio.bg/archive/issue-2-2020/amb-2-2020-article-1.pdf>

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=34601&tip=sid&clean=0>

Общо: IF: 0,45

Квартил (Q) според SCOPUS: 42 точки.

Думи на благодарност

Изразявам своята благодарност към проф. д-р Роберт Пенчовски и членовете на Катедра „Генетика“ на Биологически Факултет, при Софийски Университет “Св. Климент Охридски”, за възможността да работя върху темата “**Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на генна експресия**” на територията на катедра “Генетика”.

Научно-изследователската дейност е извършена в лабораторията на проф. д-р Роберт Пенчовски, и е подкрепена от следните научни проекти:

1. „Дизайн на функционални нуклеинови киселини за синтетична регулация на генната при прокариоти и еукариоти”, КП-06-Н31/18/13.12.2019, финансиран от Фонд „Научни Изследвания“, комисия по Биологически Науки, ръководител на проекта проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски – **ОСНОВЕН ПРОЕКТ**.

2. „Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти”, ДН13/14/20.12.2017, финансиран от Фонд „Научни Изследвания“, комисия по Медицински Науки, ръководител на проекта проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски.

3. „Създаване на антисенс олигонуклеотиди, които специфично инхибират бактериалния растеж на *Helicobacter pylori* и *Porphyromonas gingivalis*“, КП-06-М33/5/18.12.2019, финансиран от Фонд „Научни Изследвания“, комисия по Медицински Науки, ръководител на проекта гл. ас. д-р Мартина Трайковска

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| СЪДЪРЖАНИЕ..... | 5 |
| 1.ВЪВЕДЕНИЕ | 6 |
| 2.ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ | 13 |
| 2.1.ЦЕЛИ..... | 13 |
| 2.2.ЗАДАЧИ | 13 |
| 3.МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 14 |
| 3.1. МАТЕРИАЛИ..... | 14 |
| 3.1.1. Биоинформатични инструменти..... | 14 |
| 3.1.2. Материали използвани в експериментите..... | 15 |
| 3.2. МЕТОДИ..... | 18 |
| 3.2.1. Софтуерни методи | 18 |
| 3.2.2. Използвани китове и протоколи..... | 19 |
| 4. РЕЗУЛТАТИ | 22 |
| 4.1. ДИЗАЙН НА АНТИСЕНС ОЛИГОНУЛЕОТИДИ ЗА И ИНХИБИРАНЕ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ ПРИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 22 |
| 4.2. КЛОНИРАНЕ НА КОНСТРУКТА ЗА КОНТРОЛ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ В ПЛАЗМИД ЗА ЕКСПРЕСИЯ НА <i>ESCHERICHIA COLI</i> С РЕПОРТЕРЕН ГЕН ЗА <i>LAC Z</i> | 28 |
| 4.3. ДИЗАЙН НА СТРАТЕГИЯ ЗА OFF SWITCH КОНТРОЛ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ ПРИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> ... | 39 |
| 4.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ТЕСТВАНЕ НА АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИТЕ ЗА OFF SWITCH КОНТРОЛ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ ПРИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 41 |
| 4.5. ДИЗАЙН НА СТРАТЕГИЯ ЗА OFF SWITCH КОНТРОЛ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ С ИЗПОЛЗВАНЕТО НА СИНТЕТИЧЕН ХАМЪРХЕД РИБОЗИМ В <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 52 |
| 4.6. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ТЕСТВАНЕ НА АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИТЕ ЗА OFF SWITCH КОНТРОЛ НА ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ В РИБОЗИМ ПРИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 55 |
| 5. ДИСКУСИЯ | 59 |
| 6. ИЗВОДИ..... | 62 |
| 7. ПРИНОСИ..... | 64 |
| ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ | 65 |
| СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ | 66 |
| СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ | 67 |
| БИБЛИОГРАФИЯ..... | 69 |

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Използването на антисенс олигонуклеотиди (АСО) в биологията и медицината е ключово за решаването на редица проблеми, свързани с лечението и профилактиката на различни заболявания, както и възникването на антибиотична резистентност, довеждаща до неефективност на назначената терапия, продължителен болничен престой, високи болнични разходи и дори смърт. Антисенс олигонуклеотидите са къси едноверижни молекули с оптимална дължина от 20-25 нуклеотида, които могат директно да се свързват със структури в генома, например с бактериални рибопревключватели и да регулират тяхната проява. Изучаването и изследването им е важно, защото те имат редица потенциални приложения. Възможно е да се създават антисенс олигонуклеотиди, чиито мишени са патогенни бактерии, SARS-CoV-2 и много други болестотворни причинители. За да се осигури проникването им в бактерия, те могат да се свържат с носител – клетъчно проникващ пептид (КПП) или липопротеин (Traykovska et al., 2018; Traykovska and Penchovsky, 2022). Въз основа на своя дизайн, АСО хибридизират комплементарно с таргетната секвенция и в резултат на това успяват да регулират генната експресия. Механизмът на действие на антисенс олигонуклеотидите е добре изучен и в случай на нововъзникваща антибиотична резистентност или при появата на мутации, техният дизайн може да бъдат лесно преработен и да позволи оптимизираното им последващо приложение. На пазара вече има одобрени АСОи, прилагани се в терапията на невродегенеративни заболявания и атеросклероза (Bennett et al., 2021; Amanat et al., 2022).

COVID-19 съдържа едноверижна РНК, в който всички основни гени са разположени в 5'-края на РНК, която се транскрибира в иРНК. (Valsamatzi-Panagiotou, Traykovska, Georgi Y. Miloshev, Penchovsky, 2023). Чрез намирането на нуклеотидната последователност на тези гени, което се прави от специализирани софтуерни програми, можем да проектираме АСО, който да се свърже специфично с комплементарната последователност на таргетната иРНК. 5'-краят на иРНК е отговорен за синтезата на гените за репликация и транскрипция. В този случай бихме могли да инхибираме транслацията и синтезата на основните белтъци, участващи в репликацията на геномната РНК. Тези предимства са значителни и ги превръщат в бъдещ терапевтичен агент срещу различни бактериални и вирусни инфекции (Penchovsky and Traykovska, 2015; Penchovsky, 2019; Valsamatzi-Panagiotou, 2020; Popova and Penchovsky, 2021).

Регулирането на рибопревключватели чрез АСОи дава възможност на информационните РНК молекули да регулират експресията си, без да са необходими регулаторни белтъци. По този начин, жизненоважни метаболити за бактериите и вирусите

няма да бъдат синтезирани от клетките или транспортирани вътре в тях от външната среда. Резултатът от тази намеса е смъртта на съответните вируси и бактерии. Това от друга страна налага и използването на метод за проектиране на рибозими (ензими, изградени от РНК). Нашите методи са много ефективни по отношение на времетраене и лабораторен труд, защото можем да произведем в рамките на няколко минути желаните последователности на високоскоростни алостерични рибозими, които могат да работят в клетката. Методите и техниките, на които залагам в дисертацията си, са от областите на генетиката, биоинформатиката, синтетичната биология и микробиологията. Също така използвам и техники за клониране. Всичко това има огромно практическо приложение.

Друг начин за регулиране на генната експресия е използването в практиката на нови подходи за анализ и дизайн на комплекс от мрежи в живи клетки с много приложения във фармацевтичната и биотехнологичната индустрии. Разработването на нови универсални стратегии за екзогенен контрол на генната експресия се основават на дизайнерски алостерични рибозими, които могат да функционират в клетката. Синтетичните рибопревключватели се получават чрез патентована изчислителна система, която осигурява бърза работа и точни модулни проекти с различни булеви логически функции. Рибопревключвателите могат да бъдат проектирани да функционират в клетката при наличието или отсъствието на РНК(и) или малки молекули, а също и за активиране или инхибиране на генната експресия на всеки екзогенен белтък. В допълнение, рибопревключвателите могат да бъдат проектирани да индуцират РНК интерференция или микроРНК пътища, които могат условно да регулират експресията на ключови белтъци в клетката. Това може да доведе до предотвратяване на развитието на различни заболявания. Следователно, синтетични рибопревключватели могат да се използват като универсални клетъчни биосензори. С помощта на съвременните технологии, индикативните РНК(и) могат да бъдат точно идентифицирани чрез използване на технологии за секвениране от следващо поколение и с висока точност. Методите могат да се използват не само за екзогенен контрол на генната експресия, но също и за препрограмиране на клетъчната смърт, противоракови и антивирусни генни терапии. Такива подходи могат да се използват като мощни молекулярни лекарства на бъдещето.

Технологията за инхибиране на гени, базирана на антисенс олигонуклеотиди (АСО), е широко застъпена. Както вече беше описано, АСОи са химически модифицирани едноверижни къси нуклеинови киселини, които се свързват специфично с таргетната РНК и инхибират експресията им по два различни механизма. Те могат да разделят таргетната РНК чрез действието на РНКаза Н или предотвратяване на транслацията на иРНК (Martinovich et al., 2018). Дължината на антисенс олигонуклеотидите обикновено варира от

13 до 50 нуклеотида с оптимален диапазон от 20 - 25 нуклеотида (Chen et al., 2020; Katzmann et al., 2020). Като синтетични олигонуклеотиди, АСО са проектирани така, че да бъдат комплементарни на таргетната иРНК. Има три поколения АСО въз основа на техните химически модификации. АСО от първо поколение имат фосфорно-отиоатен гръбнак, модифициран чрез заместване на несдвоенния кислород във фосфодиестерната връзка със серен атом. Тази модификация позволява разделянето на иРНК чрез РНаза Н. АСО от второ поколение имат повишена медицинска защита, но не предизвикват разделяне на иРНК чрез РНКаза Н. Те имат 2 прим алкилови модификации на рибоза и 2 прим-О-метил или 2 прим О-метоксиетил заместване. Белтъчните нуклеинови киселини и други заключени нуклеинови киселини са част от третото поколение АСО. Те имат висока химическа устойчивост срещу ДНазите и висок афинитет и специфичност към свързването на РНК. Въпреки това, те също не могат да индуцират РНаза Н за разделяне на таргетната РНК. Комбинация от модификации от първо и второ поколение на един АСО влияе върху специфичното разграждане на иРНК от РНаза Н, осигурявайки продължителна стабилност поради метилиране и забавена ензимна хидролиза на ДНК/РНК поради серния атом. АСО, които действат чрез РНаза Н имат многооборотна функция, противоположна на чистите АСО от второто и третото поколение, които работят само по еднооборотен начин.

АСО, със специфична несдвоена последователност на ЦЦА в 3 прим-края, могат да работят чрез действието на рибонуклеаза Р (РНаза Р), което води до разделяне на иРНК и последващо инхибиране на експресията на белтъци. За предотвратяване на транслацията се използва пептидни нуклеинови киселини или заключени нуклеинови киселини. Те се свързват комплементарно с иРНК и предизвикват пространствено разрушаване на таргетната РНК (Penchovsky and Traykovska, 2015; Valsamatzi-Panagiotou et al., 2020). АСО са химически модифицирани ДНК олигомери. Те образуват ДНК и РНК хибриди с таргетната молекула (Bajan and Hutvagner, 2020; Rinaldi and Wood, 2018). АСО са широко използвани през последните 20 десетилетия при лечението на много различни заболявания, като например макулна дегенерация, цитомегаловирусен ретинит, хиломикронемия, мускулна дистрофия тип Дюшен и гръбначно-мускулна атрофия и хиперхолестеролемия. Досега има шест сертифицирани АСО лекарства, включително eteplirsen, fomivirsen, mila sen, nusinersen, pegaptanib и volanesorsen (Martinovich et al., 2018; Khetarpal et al., 2019; Lim et al., 2017). АСО са едни от най-обещаващите бактериални химически агенти, които имат много предимства, включително бързи, екстензивни и точни процедури за рационален дизайн на лекарства и специфично насочване срещу глобални проблеми като бактериалната резистентност. Пептид, проникващ в клетката, като рVЕС, може да бъде прикрепен към тях и да проникне във всеки тип клетка (Penchovsky and Traykovska, 2015).

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) е РНК-управлявана ДНК ендонуклеазна система, известна като CRISPR-асоциирана бактериална адаптивна имунна система. Тази система улавя и съхранява вирусни последователности в генома, които се експресират като водещи РНК, които директно свързват CAS протеини за разрушаване на вирусна инфекция (Jakhanwal et al., 2021). CRISPR/Cas9-медираната система за редактиране на генома се основава на къси РНК молекули. Тази системата може да се използва като специфична ДНК последователност за разделяне и лигиране за редактиране на гени *in vivo* (Zhang et al., 2017a). Късите РНК молекули са некодиращи къси РНК, които се свързват с таргетните ДНК последователности (Kaloudas et al., 2018 г.).

Първо, те се свързват с ензима CAS9 и късите РНК последователности насочват комплекса към таргетното място на ДНК, където CAS9 разрязва таргетната ДНК верига, защото действа като ендонуклеаза. Късите РНК-и могат да бъдат в две форми. Първата е синтетична транс-активираща CRISPR РНК и синтетична CRISPR РНК. Тя е предназначена да раздели таргетното място. Втората форма е такава синтетична РНК, която се състои както от транс-активираща CRISPR РНК, така и от синтетична CRISPR РНК като единична конструкция. Комплексът, образуван от транс-активираща CRISPR РНК и синтетична CRISPR РНК, има водеща роля за ензима CAS9. Транс-активираща CRISPR РНК е отговорна за ендонуклеазната активност на CAS9 и синтетична CRISPR РНК се свързва със специфичния ДНК регион. Транс-активираща CRISPR РНК се свързва с ензима, образувайки стволова бримка. Синтетична CRISPR РНК идентифицира специфичната комплементарна област и предизвикват разделянето ѝ от CAS9 след свързването му с ефекторния комплекс. РНК определят активността на CAS9 (Jakhanwal et al., 2021).

CRISPR-Cas има съществена роля в генното инженерство и редактирането на генома (Jakhanwal et al., 2021; Schmidt и Platt, 2017; Stella et al., 2017; Kim and Lu, 2019; Marchisio and Huang, 2017). Водещите РНК могат да свързват антисенс РНК последователности и регулират модификацията на РНК. Късите РНК-и могат да инхибират таргетната РНК в еукариотните клетки и се нуждаят от екзогенна експресия на CAS9 за разлика от РНаза Н и РНаза П, които присъстват в еукариотните клетки. Те също се използват в РНК мутагенезата, където заместват аденозин с инозин в специфичното таргетно място и модифицират генетичния код (Lee et al., 2016).

РНК синтетичната биология е една от най-развиващите се области на съвременната синтетична биология. Това се дължи главно на различните инструменти за РНК инженерство и синтез, разработени и усъвършенствани в продължение на много години. Такива инструменти включват SELEX на РНК аптамери и алостерични рибозими, компютърен дизайн на алостерични рибозими и РНК-базирани сензори. Освен това

синтетичните РНК-и могат лесно да се синтезират чрез *in vitro* транскрипция. Бъдещата перспектива на РНК синтетичната биология е много обещаваща, защото ще даде възможност да се използват РНК аптамери, алостерични рибозими и външно насочени РНК последователности за много различни приложения в нанобиотехнологиите и фармацевтичната индустрия. РНК-базираните наномашини могат да се използват за молекулярни компютри и молекулярни сензори, които могат да работят *in vitro* и *in vivo*. Може да се препрограмира апоптозата, като се използва синтетичен контрол на генната експресия, базиран на алостерични рибозими. РНК и ДНК аптамерите могат да се използват за инхибиране на вирусни инфекции. АСО и външно насочените РНК последователности могат да инхибират експресията на всяка РНК в клетката и да спират вирусни и бактериални инфекции. Следователно има безброй възможности пред синтетичната РНК биология за разработване на революционни приложения, базирани на вече наличните инструменти.

РНК синтетичната биология е развиваща се изследователска област, която не остарява поради развитието на много полезни инструменти, които имат ценни приложения. Такива малки инструменти, базирани на РНК, включват молекулярни сензори, РНК компютърни устройства, екзогенни генни контролни елементи, АСОи. Тези молекулярни инструменти, базирани на РНК аптамери, алостерични рибозими и модифицирани олигонуклеотиди са били използвани в различни фармацевтични и биотехнологични приложения. Те включват различни терапевтични средства, базирани на аптамери, рибозими, АСОи и къси РНК-и. Освен това, аптамерите и алостеричните рибозими се използват за екзогенен контрол на генната експресия *in vivo* и за приложения за биоразпознаване и компютърни изчисления *in vitro*. Усъвършенстваните инженерни методи на функционални малки РНК са ключ в разработването и прилагането на тези молекули в различни биотехнологични приложения.

Синтетичната биология е изследователска област, която придоби популярност през последните години. Приложенията на синтетичната биология обхващат областите на фармацевтичните биотехнологии и откриване на лекарства чрез нови методи и стратегии като метаболитно инженерство, препрограмиране на клетъчната съдба, производство на лекарства в генетично модифицирани организми, молекулярни лепила, функционални нуклеинови киселини и редактиране на генома (Pavlova et. al. 2022). Синтетичната биология е интердисциплинарна изследователска област с нови концепции за проектиране на различни биологични системи *in vitro* и *in vivo* (Traykovska et.al. 2018; Penchovsky et. al. 2000; Penchovsky 2012). Тя използва инженерни принципи за създаване и сглобяване на биологични компоненти, включително инструменти на различни изследователски дисциплини като нанотехнологии, инженерство на функционални нуклеинови киселини,

молекулярна биология, репродуктивна медицина, генна терапия, генно инженерство, системна биология, биофизика, молекулярни компютри, инструменти за редактиране на гени, дизайн на лекарства и фармацевтично инженерство (Chappell et. al. 2015; Hollywood et. al. 2018; Liu & Pakrasi 2018; MacDonald & Deans 2016; Alnasser 2021; Kopka & Fernie 2018; Jagadevan et. al. 2018; Cantelli et. al. 2021). Освен това дава възможност за справяне с промените в климата чрез производство на биогорива и премахване на замърсители чрез биоремедиация (Jagadevan et. al. 2018; Kaloudas et. al. 2021). Две от основните цели на синтетичната биология са да препрограмира клетки или организми, както и да създаде нови живи клетки. Първият използва метаболитно/генно инженерство и техниките на молекулярната биология. Създаване на изцяло жива клетка *de novo* чрез самосглобяване на синтетични молекули е една от най-фундаменталните и сложни цели за изграждане на изкуствени клетки, известни като протоклетки или синтетични клетки (Buddingh, van Nest 2017). Бактериалният геном е преработен с добавени предварително дефинирани характеристики като генетично модифицирани организми (ГМО), които произвеждат химикали за производство на лекарства, почистване на замърсяването на околната среда, инструменти за доставяне на лекарства и биосензорни функции (Liu, 2021; Deckers et.al. 2020).

След създаването на първия синтетичен геном, следващата стъпка е инженерството на вериги за генна експресия при прокариотни и еукариотни организми с малки молекули като лекарства, хранителни вещества или лиганди. Изключително важно и от съществено значение е да се произвеждат метаболити, нови методи за генна терапия, както и да се прави мониторинг на околната среда (Penchovsky, Stoilova 2013). Производството на бета лактами, пеницилин, терпеноиди (милирадиан, олеанолова киселина, хидрокортизон), омега-3 ейкозапентаенова киселина, флавоноиди (нарингенин), алкалоиди (бензилизохинолинови алкалоиди), стилбеноиди (ресвератрол) и витамин С са направени в дрожди с помощта на стандартизирани компоненти, известни като BioBricks (BBs) (Deepika M, Sumathy 2020; Staal et.al. 2019). BB се състоят от ДНК последователности с различни функции, лесно комбинирани в различни вериги на генна експресия. Въз основа на групирани често срещани се междусистемни къси палиндромни последователности (CRISPR)/CAS9, инструментът за редактиране на генома разкрива нови възможности за пренаписване на генома на всяка жива клетка, което разширява нашите способности за препрограмиране (van der Weyden et.al. 2021; Liang et.al.2020; Ghaemi et. al. 2021; Hartz et.al. 2021; Sharma et.al. 2021). CRISPR-CAS9 има се използва като мощен инструмент за ефективно инженерство на *Saccharomyces cerevisiae*, клетъчни линии и други (Rainha et.al. 2020). Всички споменати инструменти или технологии са приложени или скоро ще бъдат приети.

Предсказването на нови молекули с биоактивност е от съществено значение за оптимизиране процесът на откриване на лекарства, който изисква молекулярно представяне (Kumar et.al. 2022).

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

2.1. Цели

Целта на настоящата докторска дисертация е създаване на нов универсален метод за контрол на генна експресия при *Escherichia coli* чрез използването на синтетични антисенс олигонуклеотиди, които инхибират LacZ експресията.

2.2. Задачи

За постигането на целта, бяха поставени следните задачи:

1. Дизайн на антисенс олигонуклеотиди за инхибиране на генна експресия при *Escherichia coli*.
2. Клониране на конструкта за контрол на генна експресия в плазмид за експресия на *Escherichia coli* с репортерен ген за LacZ.
3. Дизайн на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*.
4. Експериментално тестване на антисенс олигонуклеотидите за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*.
5. Дизайн на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия с използването на синтетичен хамърхед рибозим в *Escherichia coli*.
6. Експериментално тестване на антисенс олигонуклеотидите за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозим при *Escherichia coli*.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

3.1.1. Биоинформатични инструменти

За извършването на биоинформатични анализи използвах следните база данни с отворен достъп:

1. Чуждестранни бази данни.

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 информация, която е обособена в отделни бази данни:

- Pubmed (научни публикации);
- Gene;
- Genome;
- Nucleotide;
- Protein (белтъци);
- PubChem (химични процеси);
- SNP;
- BLAST (търсене на подобни райони).

Част от тези бази данни с публикации използвах за написването на „Литературния обзор” и вникването в дълбочина в проблема.

Rfam 14.8 - <https://rfam.xfam.org/>

База данни, която съдържа колекция от РНК семейства, всяко от които е представено от множество подравнявания на последователности, консенсусни вторични структури и ковариантни модели. Използвах я за нуклеотидните последователности на бактериалните рибопревключватели и рибозими.

RNAfold web server - <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>

Свободно достъпен софтуер, който изчислява нагъването на вторични структури на едноверижни РНК и ДНК. Използвах я за изчисляване и визуализация на нагъването на вторичните структури на антисенс олигонуклеотидите в нуклеотидната последователност на LacZ, както и за мутациите, използвани за генна експресия.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, (<http://www.genome.jp/kegg/>) -
KEGG – енциклопедия с гени и геноми.

От раздела KEGG PATHWAY взех информация за всички ензими и метаболити, които участват в биохимичните реакции на бактериите.

2. Бази данни и приложения, разработени от проф. д-р Роберт Пенчовски

Motif searcher – <https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=43>

Програмата позволява търсенето на един или повече мотиви в ДНК, РНК и белтъчни последователности, които ние сами подаваме на програмата.

RevComOligo - <https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=41>

Програмата се използва за получаване на комплементарна секвенция на предварително зададена такава в посока 5'-3'.

Restriction Mapping - <https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=44>

Програмата се използва за откриване на секвенции на рестрикционни ензими по предварително зададена нуклеотидна секвенция. Базата данни разпознава 1502 ензима. Можете също така да се избере търсене в базата данни само на ензими, които режат на една, две или три позиции. Освен това може да се избере и само име(на) на ензима от списък, и така да се визуализира неговата секвенция.

PCR

Annealing

Temperature

Calculator

-

<https://penchovsky.atwebpages.com/applications.php?page=49>

Програмата се използва за изчисляване на температурата на свързване при полимеразна верижна реакция (PCR), като се въвеждат секвенцията на двата праймера (reverse и forward).

3.1.2. Материали използвани в експериментите

1. Използвани бактериални среди:

LB среда – За направата на 1 литър от нея следвах следния протокол - 10g триптон, 5g дрожден екстракт и 10g NaCl.

2. Използвани бактериални щамове:

За целта на експеримента използвах компетентни клетки *E.coli* HB101, 1 набор (100 µl x10), който поръчах от TAKARA Bio INC, Япония.

3. Използвани нуклеинови киселини:

Използвани антисенс олигонуклеотиди – 9 различни концентрации, чийто дизайн създадохме ние и подадохме за нуклеотиден синтез в американската компания GeneLink (<http://www.genelink.com/>). Различните концентрации се използват за различно процентно инхибиране на бактериалния растеж. Експериментите с всяка една от концентрациите бяха повторени 3 пъти и беше взета средна стойност.

Използвани праймери (ДНК последователности) – Олигонуклеотидите бяха поръчани от фирмата Microsynth AG · Schützenstrasse 15 · P.O. Box · 9436 Balgach · Switzerland.

Таблица 1. Използвани праймери и антисенс олигонуклеотиди

| | Олигонуклеотиди | Концентрация |
|---|--|---------------------|
| 1 | 5'- GATCCTACAACAAGGTACCGACCTAGCAGGAGGTATTAATAT GGTCCTCGAGGTC-3' | 41,7 nmol/707,8 µg |
| 2 | 5'- GATCGACCTCGAGGACCATATTAATACCTCCTGCTAGGTCGGT ACCTTGTTGTAG-3' | 42,4 nmol/715,5 µg |
| 3 | 5'- GATCTGTGAGCTTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACTGG TAC-3' | 41,3 nmol/586,8 µg |
| 4 | 5'-CAGTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAAAGCTCACA-3' | 81,0 nmol/941,3 µg |
| 5 | 5'- CATCCTTGGTACTTACAGCTTACGAGTCCCAAATAGGACGAA ACGCGACACACACCACTAAACCGTGCAGTGTTTCGCGTCCTGT AATCCACAAGGAGGTATTAATATGC-3' | 80,9 nmol/2732,9 µg |
| 6 | 5'- TCGAGCATATTAATACCTCCTTGTGGATTACAGGACGCGAAAC ACTGCACGGTTTAGTGGTGTGTGTCGCGTTTCGTCCTATTTGG GACTCGTAAGCTGTAAGTACCAAGGATGGTAC-3' | 81,6 nmol/2979,6 µg |

| | | |
|----|--|----------------------|
| 7 | 5'- CATCCTTGGTACTTACAGCTTACGAGTCCCAAATAGGACCAAA CGCGACACACACCACTAAACCGTGCAGTGTTTCGCGTCCTGTA ATCCACAAGGAGGTATTAATATGC-3' | 77,8 nmol/2627,8 µg |
| 8 | 5'- TCGAGCATATTAATACCTCCTTGTGGATTACAGGACGCGAAAC ACTGCACGGTTTAGTGGTGTGTGTCGCGTTTGGTCCTATTTGG GACTCGTAAGCTGTAAGTACCAAGGATGGTAC-3' | 81,9 nmol/ 2992,4 µg |
| 9 | 5'- ACAGCGCGTCGTGATTAGC - 3' | 33,9 nmol/197,6 µg |
| 10 | 5'- ACAAGGTACCGACCTAGCAG - 3' | 45,4 nmol/277,6 µg |
| 11 | 5'- ATACCACTGGCGGTGATAC - 3' | 249,8 nmol/429,8 µg |
| 12 | 5'- CACCACTAAACCGTGCAGTG - 3' | 36,2 nmol/ 219,8 µg |
| 13 | 5'- CAGGCTCGCATGGCTCGCC - 3' | 33,6 nmol/ 239,3 µg |
| 14 | 5'- GTCCGAGCGTACCGAGCGG - 3' | 43,0 nmol/ 249,8 µg |
| 15 | 5'- СТАТТТGGGACTCATCAG - 3' | 36,2 nmol/ 219,8 µg |

4. Използвана апаратура:

Хладилник с фризер HOTPOINT – използва се за съхранение на различни реактиви.

Фризер ARCTICO -86°C – използва се за съхранение на глицеролни култури.

Автоклав – BIOBASE Table Top Autoclave Class N Series – използва се за стерилизиране на бактериални среди, инструменти и консумативи

Електронна везна – XS Instruments BALANCE mod. BL 224 BASIC - 220 gr. – използва се за прецизно измерване на количеството на различните реактиви, използвани за провеждането на експериментите.

Спектрофотометър - ONDA UV-21 e UV/VIS – използва се за измерване на оптичната плътност при прорастване на бактериална култура.

pH метър - XS Instruments Cond 50 VioLab bench – използва се оптимизиране на pH на различните компоненти и реактиви, използвани при Бета-галактозидазен анализ.

Вортекс - Fisherbrand™ Analog Vortex Mixer – използва се за хомогенизиране на различни реактиви в Епендорф епруветки.

Клатачка - Argolab Shaker Incubator SKI 4 – използва се за поддържане и оптимизиране на условия за инокулиране на бактериалните култури.

Термостат – Biosan Bio TDB-100, Dry block thermostat – използва се инкубиране и поддържане на определена температура за различните реакции – рестриктазна, лигазна, Beta-Galactosidase Assay.

Нанодроп - BioDrop - Micro-Volume Measurement Platforms – използва се за измерване на концентрацията на плазмидна ДНК след нейното изолиране, както и за измерване на концентрацията на различните антисенс олигонуклеотиди.

Центрофуга – NEYA centrifuge 16 R – използва се хомогенизиране при определени условия (температура, обороти).

PCR – LifeECO Thermal Cycler – използва се за размножаване на клониране фрагменти.

Електрофореза - multiSUB Midi, Midi Horizontal Electrophoresis System – използва се за определяне на големината на различни фрагменти, както и визуализация на резултати след проведена полимеразна верижна реакция.

Power Supplies consort EV3330 – използва се за хранване на електрофорезата.

Трансилюминатор - Analytik jena UVP Benchtop Transilluminators – използва се за визуализация на резултатите от агарозен гел след проведена електрофореза.

3.2. Методи

3.2.1. Софтуерни методи

Чуждестранни софтуерни програми:

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

Това е програма, която се използва за сравняване и подравняване на няколко различни последователности. С програмата лесно се откриват съвпадения в секвенциите. За по-лесно обработване на секвенциите предварително написах секвенциите в Notepad++. Файлът се записва във fasta формат. По този начин, чрез оцветяване на еднаквите нуклеотиди в един цвят се вижда подравняването между анализирани последователности и се създават мотиви.

Notepad++ - <https://notepad-plus-plus.org/>

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

Basic Local Alignment Search Tool - BLAST алгоритъм за търсене, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Basic Local Alignment Search Tool открива и сравнява региони на подобност между нуклеотидни последователности. Използвах я за сравняване на различните секвенции на антисенс олигонуклеотидите, бактериални секвенции, човешки секвенции.

SnapGene Viewer – Тази програма я използвах за удобно разглеждане на плазмидни секвенции и за визуализация на резултатите след проведено секвениране. Клонираните фрагменти бяха изпратени за секвениране в Macrogen Europe (Meibergdreef 57, 1105 BA Amsterdam, Netherlands).

OriginLab – Тази програма използвах за направата на графиките за дисертацията, както и за научните публикации. Чрез нея и лесно анализирах резултатите от проведените експерименти.

3.2.2. Използвани китове и протоколи

1) протоколи

Химическа трансформация на компетентни клетки на *E.coli* с плазмид pRS414 по следния протокол:

1. Компетентните клетки се слагат на лед
2. 3 микролитра плазмид pRS414
3. Инкубират се върху лед за 30 мин
4. Инкубират се на 42 градуса за 30 сек.
5. Инкубират се върху лед за 5 мин
6. Добавя се 800 микролитра SOC (900 LB + 100 0,2 M Glu)
7. Инкубира се върху клатчка за 1 час на 37 градуса
8. Нанасят се върху петрита

Електропорация – използван е електропоратор Eppendorf Eporator® със следния протокол:

1. Компетентните клетки се слагат на лед
2. 3 микролитра плазмид се слагат в 40 микролитра КК.
3. Кюветата се поставя в електропоратора на 1700 V.
4. Добавя се 1 милилитър SOC
5. Инкубира се за 50-60 мин. на клатачка на 37 градуса.
6. Нанасят се в петрита

Рестриктазна реакция (в краен обем 50 микролитра) – Използвал съм три рестриктази (BamH I, Xho I, Kpn I).

- 20 µl плазмидна ДНК
- 5 µl буфер
- 5 µl дестилирана вода
- 10 µl първа рестриктаза
- 10 µl втора рестриктаза

Лигазна реакция (в краен обем 20 микролитра) – паралелно се правят няколко реакции. Използван е ензимът – T4 DNA Ligase на Thermo Fisher Scientific

- 2 µl T4 ДНК лигазен ензим
- 2 µl ДНК лигазен буфер
- 6 µl векторна ДНК,
- 4 µl инсертна ДНК
- 6 µl вода
- Рестриктазна реакция -

PCR реакция – използва се стандартен протокол в краен обем 25 µl

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

Условията за провеждане на PCR реакцията са heated LTD 112 °C, свързване при 94 °C за 1 мин., денатурация при 94 °C за 30 сек., градиент при 55 °C за 30 сек., свързване при 72 °C за 1 мин., 30 цикли. След проведената реакция пробите се пускат на 2% агарозен гел за 1 час и 30 мин. Като първоначално електрофорезата се пуска на 40V за 15 мин., за да може пробите по-лесно да навлязат в гела, след това се пуска на 65V. Първата проба съдържа стълбица – 1000/3000 бд ДНК, с помощта на която се определя дължината на амплифицирания продукт.

Бета-галактозидазен анализ.

Бета-галактозидазният анализ беше извършен с цел количествено определяне на нивото на промоторна активност. Клетките на *E. coli* се остават да прораснат за една нощ в LB среда, която съдържа ампицилин (100 mg/L) и се инкубират на 37°C с разклащане. Пермеабилзиращ разтвор (80 µl) от (100 mM двуосновен натриев фосфат (Na₂HPO₄), 20 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,8 mg/mL СТАВ (хексадецилтриметиламониев бромид), 0,4 mg/mL натриев деоксихолат, 5,4 µL/mL бета-меркаптоетанол) се добавя, след което се измерва абсорбцията при 600 nm (Abs 600). По 20 µl от ON културата се добавя към епруветки, които съдържат пермеабилзиращия разтвор и 600 µl субстратен разтвор, съдържащ ONPG. След като се получи достатъчно наситен цвят, се добавят 700 µl стоп разтвор (1 M натриев карбонат (Na₂CO₃) и се хомогенизира добре. След това епруветките се центрофугират на пълна скорост за 5-10 минути. Супернатантата се излива в кювети и се измерва абсорбцията при 420 nm (Abs 420.)

2) Китове

Изолиране на плазмидна ДНК със следните китове:

EURx – GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit

Sigma-Aldrich - GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

Qiagen - QIAquick Gel Extraction Kit

Bioanalysis - Plasmid DNA purification kit

Други китове:

Thermo Fisher Scientific Inc - GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit

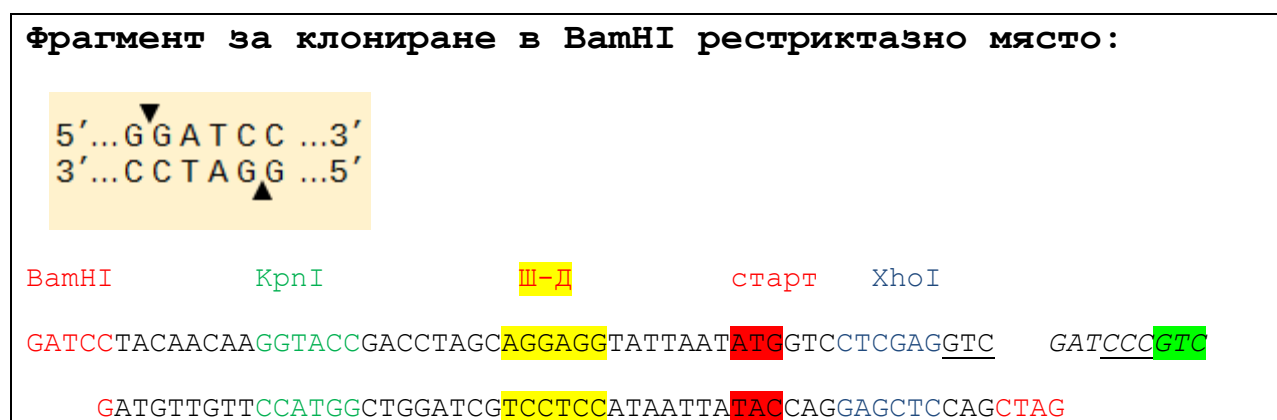
Sigma-Aldrich - GenElute Bacterial Genomic DNA | NA2110-1KT

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Дизайн на антисенс олигонуклеотиди за инхибиране на генна експресия при *Escherichia coli*.

Бактериалните оперони са полицистронни транскрипти, които могат да произвеждат множество белтъци от един иРНК транскрипт (S'aenz-Lahoya et al., 2019). Лактозният оперон (*lac* оперон) е необходим за транспорта и метаболизма на лактозата в *Escherichia coli* (*E. coli*) (Clark et al., 2019). Генът *LacZ* се транслира с помощта на бета-галактозидазата - вътреклетъчен ензим, който разгражда дизахаридна лактоза до глюкоза и галактоза, които се използват като източници на енергия (Juers et al., 2012). Цветен индикатор за бета-галактозидазна активност е орто-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG), който се разтваря и предизвиква интензивно жълто съединение (ортонитрофенол). Това съединение абсорбира при дължина на вълната 420 nm, при което става възможно измерване на бета-галактозидазна активност (Smale, 2010). β -галактозидазата хидролизира о-нитрофенил- β -D-галактопиранозидния субстрат, който дава стехиометрично жълто о-нитрофенол оцветяване и безцветна галактоза. *LacZ* може да се използва като репортерен ген в различни системи за генна експресия, не само в *E. coli*, а също и в други микробни видове (Evans et al., 2013; Juárez-Rodríguez et al., 2013; Son et al., 2008; Lewandoski, Smith, 1988). Използването на генът за *lacZ* заедно с инициращия АТГ кодон и консенсусната последователност на *E. coli* – Шайн-Далгарно, са използвани за ранни проучвания за генериране на *lacZ* репортерни системи за мониторинг на транскрипцията при сливане на оперони (Lewandoski, Smith, 1988). В своята работа аз използвах плазмид рRS414, който се състои от около 10 kb за създаване на нова *lacZ* репортерна система, включваща промотор, Шайн-Далгарно и АТГ кодона в рамката на гена *lacZ*. Въмкнатият промоторен елемент е РL последователност от 38 базови двойки на бактериофага λ (Tomich et al., 1988). Анализът на бета-галактозидазата разкрива високи нива на активност в пробите в сравнение с отрицателната контрола, лишена от бактериофага λ , която не показва активност. Мониторингът на бета-галактозидаза може също да се използва като маркер за изследване на ефектите от активността на алостеричните рибозими и олигонуклеотиди. Новосъздадената система може да бъде приложена в синтетичната биология за контрол на генната експресия при синтетични дизайнерски рибозими и антисенс олигонуклеотиди (Brunner, Vujard, 1987; Penchovsky, Breaker, 2005; Penchovsky, 2014). Други генни контролни елементи могат да действат като превключватели за контрол на генната експресия.

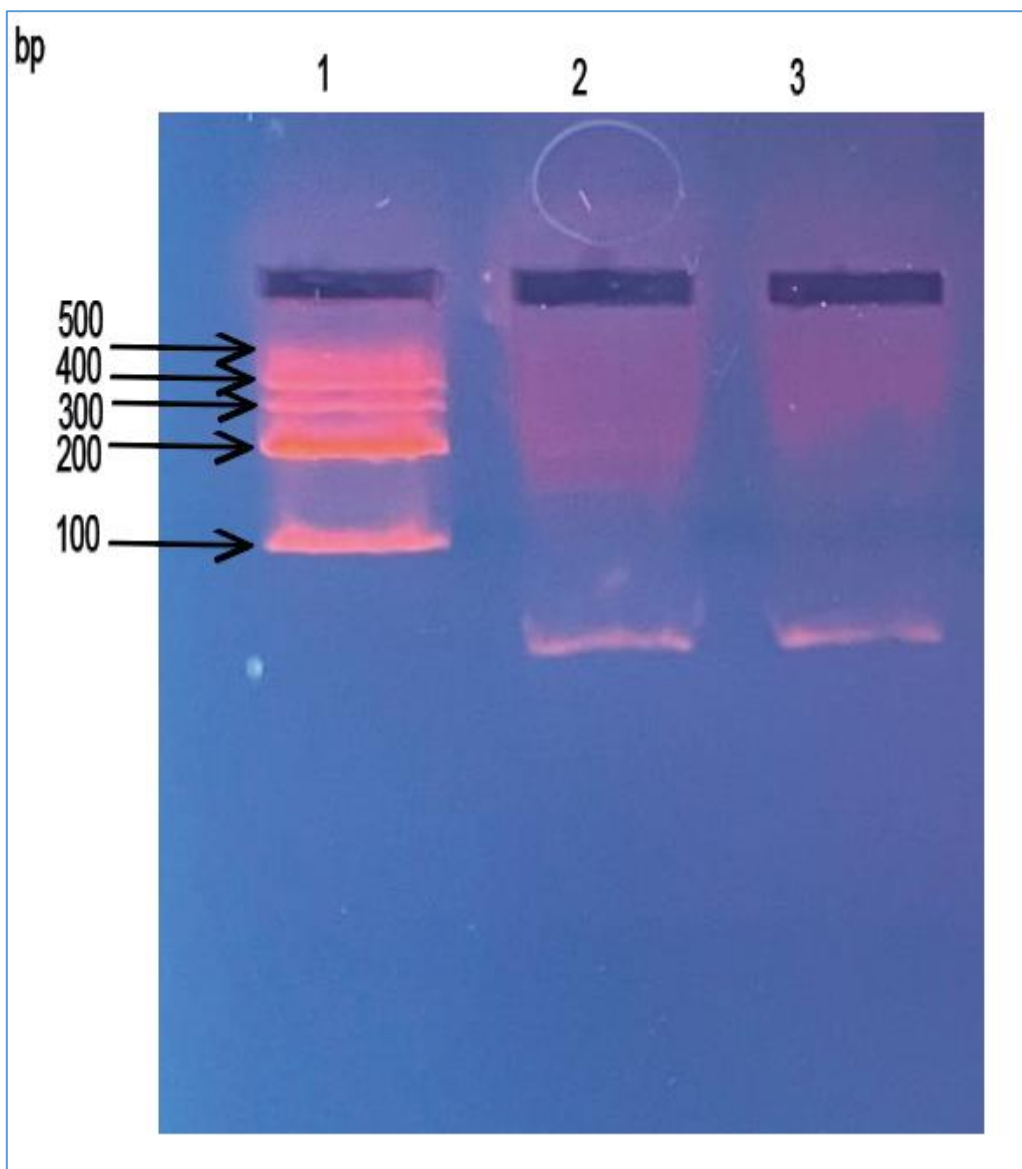
Беше създаден ДНК фрагмент, който носи KpnI рестриктазно място и секвенцията на Шайн-Далгарно, както и кодон за начало на транскрипцията АТГ в рамка с lacZ, чрез хибридизация с два деоксиолигомера (фигура 1). Първият фрагмент, въвеждащ KpnI мястото в pRS414 плазмид, използва BamHI и XhoI рестриктазни сайтове, разположени върху плазмид (фигура 1).



Фигура 1. ДНК фрагмент, показващ мястото на рестриктазите BamHI, KpnI, XhoI, секвенцията на Шайн-Далгарно и АТГ кодона върху плазмид pRS414. С различни цветове са маркирани секвенциите на рестриктазите.

Източник: Miloshev et.al. (2021) *Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli*

Въвеждането на рестриктазното място на KpnI беше проверено чрез рестрикционно картиране на генерираните клонове от KpnI ендонуклеаза (Фигура 2). Беше използван 1% агарозен гел, оцветен с GelRed (Biotium, Fremont, CA) за визуализиране на рестрикционното картиране.



Фигура 2. Рестрикционно картиране на генерираните клонове от KpnI ендонуклеаза. (1% агарозен гел). Проба 1 съдържа контролната стълба от 500бд, която служи за определяне на размера на останалите проби. Проби 2 и 3 съдържат амплифицирани чрез PCR реакция клонове, включващи KpnI ендонуклеаза.

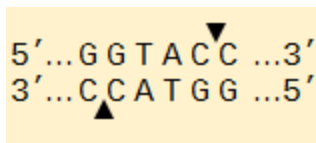
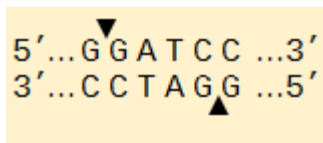
Източник: Miloshev et.al. (2021) Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli

PL промоторната последователност от 38 базови двойки беше клонирана между BamHI и новото KpnI рестрикционно място (Фигура 3). Промоторният фрагмент се генерира чрез загряване на дезоксиолигомерите. Въвеждането на рестриктазното място на KpnI и BamHI беше проверено чрез рестрикционно картиране на генерираните клонове от KpnI и BamHI ендонуклеази (Фигура 4). Беше използван 1% агарозен гел, оцветен с GelRed (Biotium, Fremont, CA) за визуализиране на рестрикционното картиране.

Промотор:

TGTGAGCTTTGACATAAAATACCACTGGCGGTGATACTNNNNN+1

Клониране с BamHI и KpnI

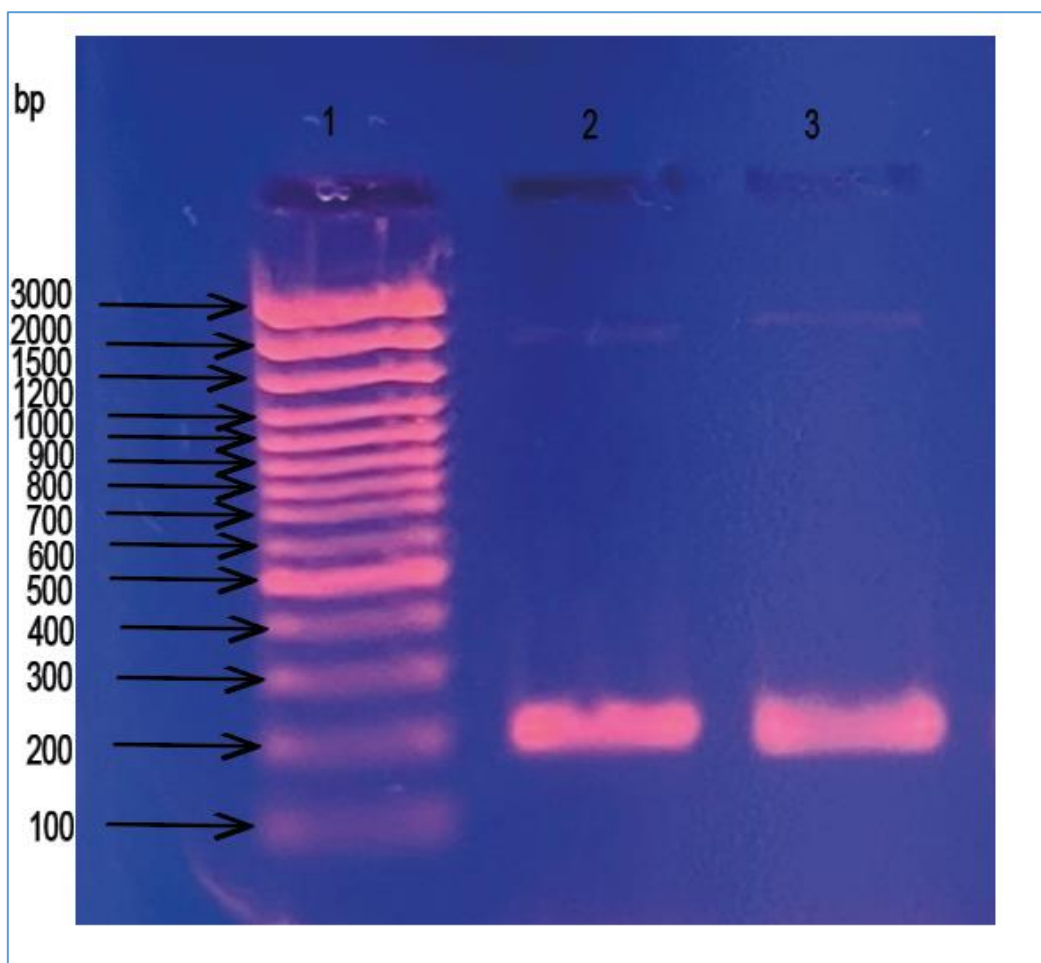


GATCTGTGAGCTTTGACATAAAATACCACTGGCGGTGATACTGGTAC

ACACTCGA AACTGTATTTATGGTGACCGCCA STATGAC

Фигура 3. Клониране на промотора с BamHI и KpnI рестриктазно място. BamHI и KpnI се използват за вкарване на промоторния фрагмент. С различни цветове са маркирани секвенциите на рестриктазите.

Източник: Miloshev et.al. (2021) Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli



Фигура 4. Рестрикционно картиране на генерираните клонове от KpnI и BamHI ендонуклеази. (1% агарозен гел). Проба 1 съдържа контролната стълба от 100бд-3000бд, която служи за определяне на размера на останалите проби. Проби 2 и 3 съдържат амплифицирани чрез PCR реакция клонове, включващи KpnI и BamHI ендонуклеази.

След това беше създаден друг фрагмент, съдържащ антисенс олионуклеотид, който инхибира бактериалния растеж. Структурата на фрагмента може да се види на фигура 5. Антисенс олионуклеотидите имат следната нуклеотидна последователност:

1 – 5'-CAGGCTCGCATGGCTCGCC-3'

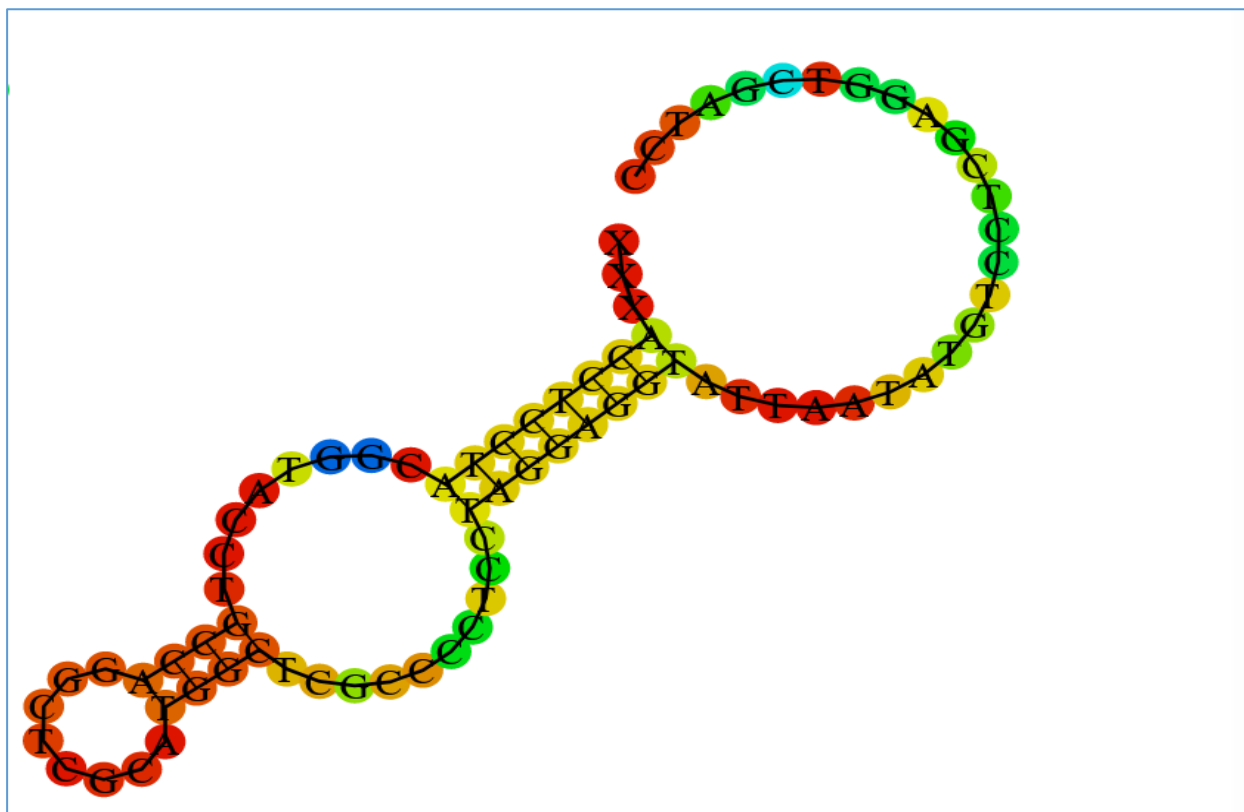
2 – 5'-GTCCGAGCGTACCGAGCGG-3'

| | | | | |
|-----------------|------------|-------|----------|--|
| KpnI | Ш-Д | старт | ACO | XhoI |
| CGGTAC | TAGCAGGAGG | CTAGT | TATTAAT | ATGGTCCGAGCGTACCGAGCGGTCTCGAGGTCGATCC |
| CATGGCCATGGATCG | TCC TCC | GATCA | ATAAATTA | TACCAGGCTCGCATGGCTCGCCAGGAGCTCCAGCTAGGAGCT |

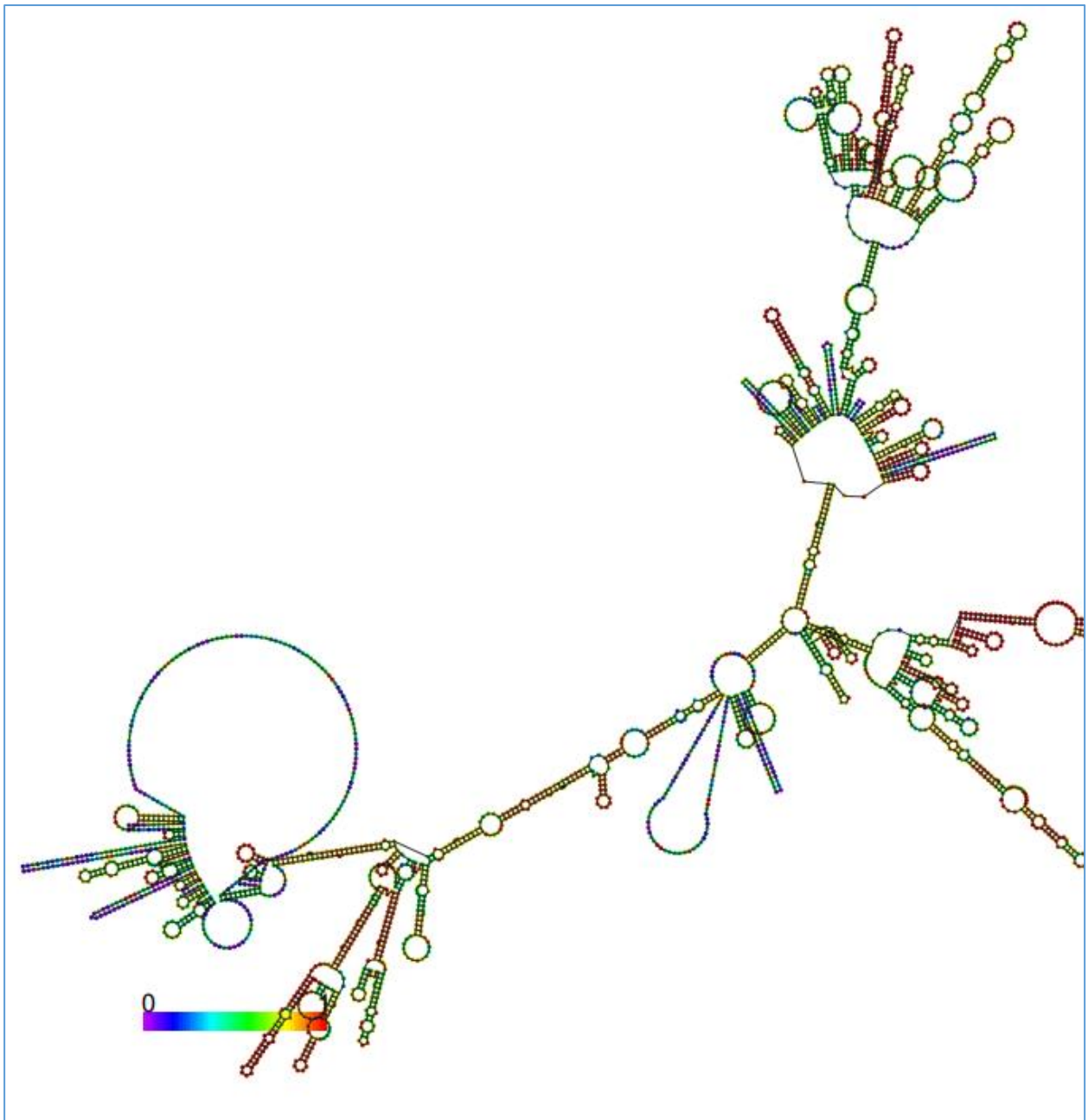
Фигура 5. Структура на фрагмента, съдържаща антисенс олионуклеотид, който инхибира бактериалния растеж. ДНК фрагмент, показващ мястото на рестриктазите KpnI и XhoI, секвенцията на Шайн-Далгарно и АТГ кодона върху плазмида pRS414. С различни цветове са маркирани секвенциите на рестриктазите.

Източник: Miloshev et al. (2021) *Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli*

Предполагаемата вторичната структура на секвенцията бе установена със свободно достъпния софтуер RNA Fold <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> (фигура 6). Вторичната структура на секвенцията на АСО в структурата на целия плазмид може да бъде видяна на фигура 7.



Фигура 6. Предполагаема вторична структура на фрагмента, получена чрез RNA fold.



Фигура 7. Предполагаема вторичната структура на секвенцията в структурата на целия плазмид, получена чрез *RNA fold*.

Целта на клонирането е получаването на ензими, които да се тестват като алостерични рибозими за синтетичен контрол на генна експресия.

Бяха поръчани олигонуклеотиди и праймери от Invitrogen by Thermo Fisher Scientific. Праймерите бяха избрани чрез алгоритъма на BLAST (*фигура 8*).

| Primer pair 1 | | | | | | | | | |
|----------------|----------------------|-----------------|--------|-------|------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | ATGGGTAAAGTCTTGGCGG | Plus | 20 | 1676 | 1695 | 60.04 | 55.00 | 3.00 | 1.00 |
| Reverse primer | GGCGTATCGCCAAAATCACC | Minus | 20 | 1839 | 1820 | 59.97 | 55.00 | 6.00 | 1.00 |
| Product length | 164 | | | | | | | | |
| Primer pair 2 | | | | | | | | | |
| Forward primer | GGCGGTGATTTTGGCGATAC | Plus | 20 | 1817 | 1836 | 59.97 | 55.00 | 2.00 | 0.00 |
| Reverse primer | AATGCGGGTCGGTTCACCTA | Minus | 20 | 2455 | 2436 | 60.04 | 50.00 | 3.00 | 2.00 |
| Product length | 639 | | | | | | | | |
| Primer pair 3 | | | | | | | | | |
| Forward primer | GAACCATCCGCTGTGTACA | Plus | 20 | 1231 | 1250 | 60.04 | 55.00 | 6.00 | 3.00 |
| Reverse primer | GTATCGCCAAAATCACCGCC | Minus | 20 | 1836 | 1817 | 59.97 | 55.00 | 2.00 | 1.00 |
| Product length | 606 | | | | | | | | |
| Primer pair 4 | | | | | | | | | |
| Forward primer | TACGATGCGCCATCTACAC | Plus | 20 | 335 | 354 | 59.97 | 55.00 | 8.00 | 1.00 |
| Reverse primer | TACCGTAGGTAGTCACGCA | Minus | 20 | 820 | 801 | 60.04 | 55.00 | 4.00 | 0.00 |
| Product length | 486 | | | | | | | | |
| Primer pair 5 | | | | | | | | | |
| Forward primer | TAAAGTAAAGCGACCCGATT | Plus | 20 | 2436 | 2455 | 60.04 | 50.00 | 3.00 | 3.00 |
| Reverse primer | CCACTGGTGTGGCCATAAT | Minus | 20 | 2905 | 2886 | 60.03 | 55.00 | 5.00 | 3.00 |
| Product length | 470 | | | | | | | | |

Фигура 8. Избраните праймери, получени чрез алгоритъма на BLAST.

4.2. Клониране на конструкта за контрол на генна експресия в плазмид за експресия на *Escherichia coli* с репортерен ген за Lac Z.

За целта на клонирането бяха използвани компетентни клетки на *E. coli* от щама HB101 (Takara Bio INC, Япония). Бактериите се отглеждат в LB среда, която съдържа ампицилин (100 mg/L). Точността на клонираните последователности беше проверена чрез секвениране (Mastogen Europe, Холандия). Картата на pRS414 плаزمида е изобразена на фигура 9. Пълната последователност на pRS414ge плазмида е дадена на <https://penchovsky.atwebpages.com/research.php?page=11>.

| | | | | | |
|--|------------|-------------|------------|-------|-------------|
| VamHI | промоторна | KpnI | Ш-Д | старт | XhoI |
| | секвенция | | | кодон | |
| <p>GATCTTGTGAGCTTTGACATAAAATACCACTGGCGGTGATACTGGTACCTAGCAGGAGGTATTAATATCGTCTCGAGGTTCGATC</p> <p>CTAGAACACTCGAAACTGTATTATGGTGACCGCCASTATGACCATGGATCGTCTCCATAATTAACAGGAGCTCCAGCTAG</p> | | | | | |

Фигура 9. Карта на pRS414 плазмида.

Източник: Miloshev et al. (2021) *Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli*

След това беше извършен бета-галактозидазен анализ с цел количествено определяне на нивото на промоторна активност. Клетките на *E. coli* се остават да прораснат за една нощ в LB среда, която съдържа ампицилин (100 mg/L) и се инкубират на 37°C с разклащане. Пермеабелизиращ разтвор (80 µl) от (100 mM двусъосновен натриев фосфат

(Na₂HPO₄), 20 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,8 mg/mL СТАВ (хексадецилтриметиламониев бромид), 0,4 mg/mL натриев деоксихолат, 5,4 µL/mL бета-меркаптоетанол) се добавя, след което се измерва абсорбцията при 600 nm (Abs 600). По 20 µl от ON културата се добавя към епруветки, които съдържат пермеабилзиращия разтвор и 600 µl субстратен разтвор, съдържащ ONPG. Времето на добавяне се записва. От всяка проба бяха направени три повторения за три времеви точки съответно от 15, 20 и 30 минути. След като се получи достатъчно наситен цвят, се добавят 700 µl стоп разтвор (1 М натриев карбонат (Na₂CO₃) и се хомогенизира добре. След това епруветките се центрофугират на пълна скорост за 5-10 минути. Супернатантата се излива в кювети и се измерва абсорбцията при 420 nm (Abs 420.) Формулата на Miller (Jonoska, Seeman 2001) се използва за изчисляване на единиците на Miller (MU) на ензимната активност:

$$MU = 1000 \times \frac{Abs\ 420}{Abs\ 600 \times V \times T}$$

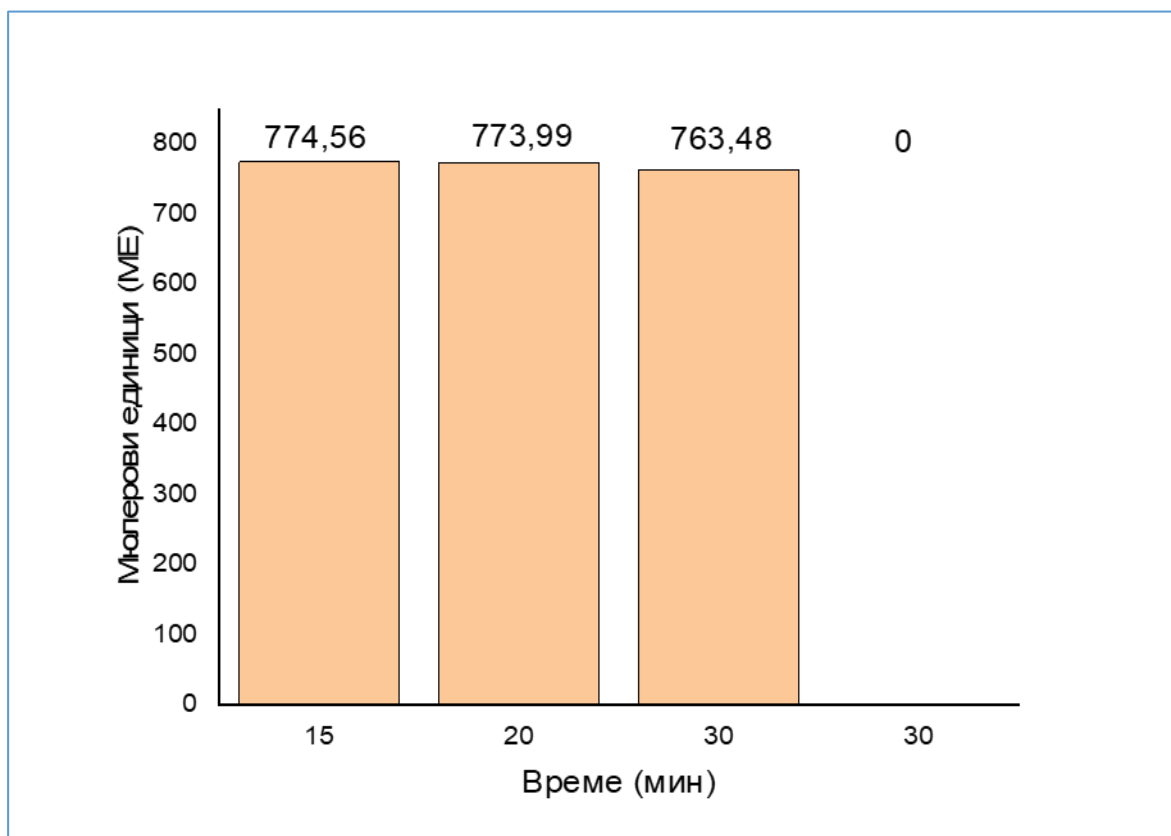
където T е времето на реакция в минути и V е обемът на културата, използван в анализа. Всеки експеримент се утвърждава и средната стойност на A420 се използва за изчисляване на MU за всяка проба.

Високи нива на ензимна активност бяха отчетени във всички бета-галактозидазни анализи през трите тествани времеви точки от 15, 20 и 30 минути, съответно. За измерването на 15тата минута бяха получени 774,56 MU. Подобна активност беше получена и при другите времеви точки със 773,99 MU и 763,48 MU съответно от 20 и 30 минути (таблица 2).

Таблица 2. Резултати от всички Бета-галактозидазни анализи през трите тествани времеви точки от 15, 20 и 30 минути, съответно. Бяха направени по три повторения и беше отчетена средна стойност.

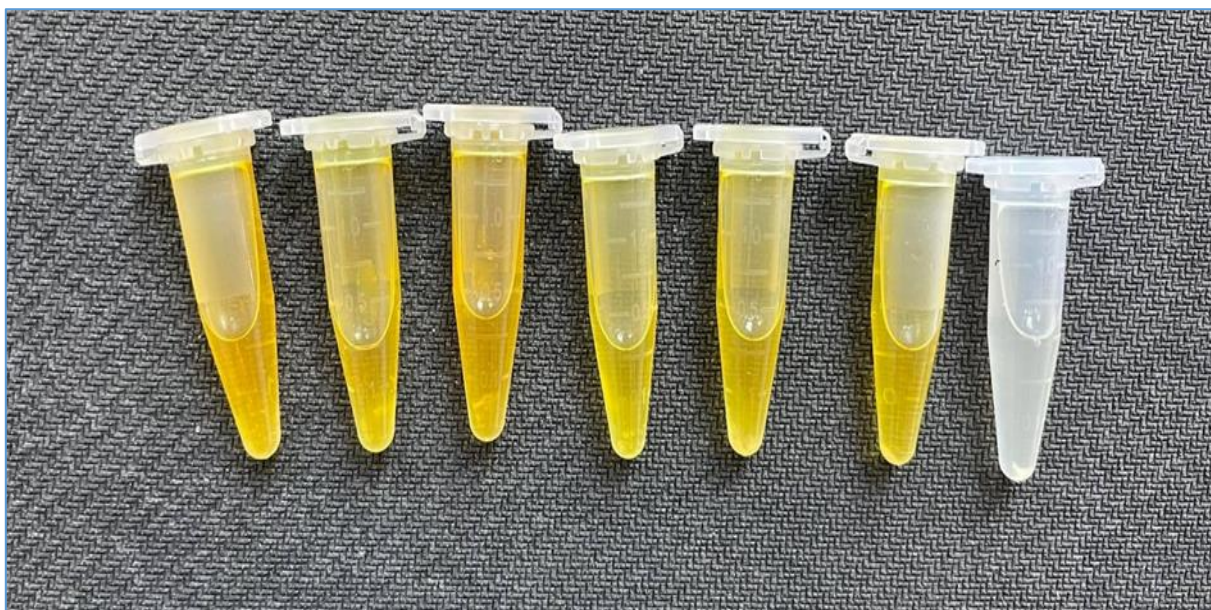
| | | λ = 600 nm (Abs 600) | λ = 420 nm (Abs 420) | ME |
|----|---------|----------------------|----------------------|--------|
| 1. | 15 мин. | 0,587 | 0,911 | 775,97 |
| 2. | 15 мин. | 0,587 | 0,905 | 770,87 |
| 3. | 15 мин. | 0,587 | 0,915 | 779,39 |
| 4. | 20 мин. | 0,587 | 0,913 | 777,68 |
| 5. | 20 мин. | 0,587 | 0,910 | 775,13 |
| 6. | 20 мин. | 0,587 | 0,903 | 769,17 |
| 7. | 30 мин. | 0,587 | 0,912 | 759,79 |
| 8. | 30 мин. | 0,587 | 0,902 | 768,31 |
| 9. | 30 мин. | 0,587 | 0,895 | 762,35 |

Силният промотор на констативния бактериофаг λ , експресиращ гена *lacZ*, даде сходни резултати за всички точки при трикратен анализ. Всички три времеви точки на анализа с PL промотора показват MU над 760, което показва по-високо ниво на ензимна активност. Отрицателната контролна проба, лишена от λ фаговия промотор, не показва никаква активност на бета-галактозидазата в 30-минутната времева точка, както се очаква, поради липсата на промотор от плазмида (фигура 10).



Фигура 10. Графично изобразяване на бета-галактозидазата ензимната активност през трите тествани времеви точки от 15, 20 и 30 минути.
Отрицателната контролна проба, лишена от λ фаговия промотор, не показва никаква активност на бета-галактозидазата в 30-минутната времева точка.

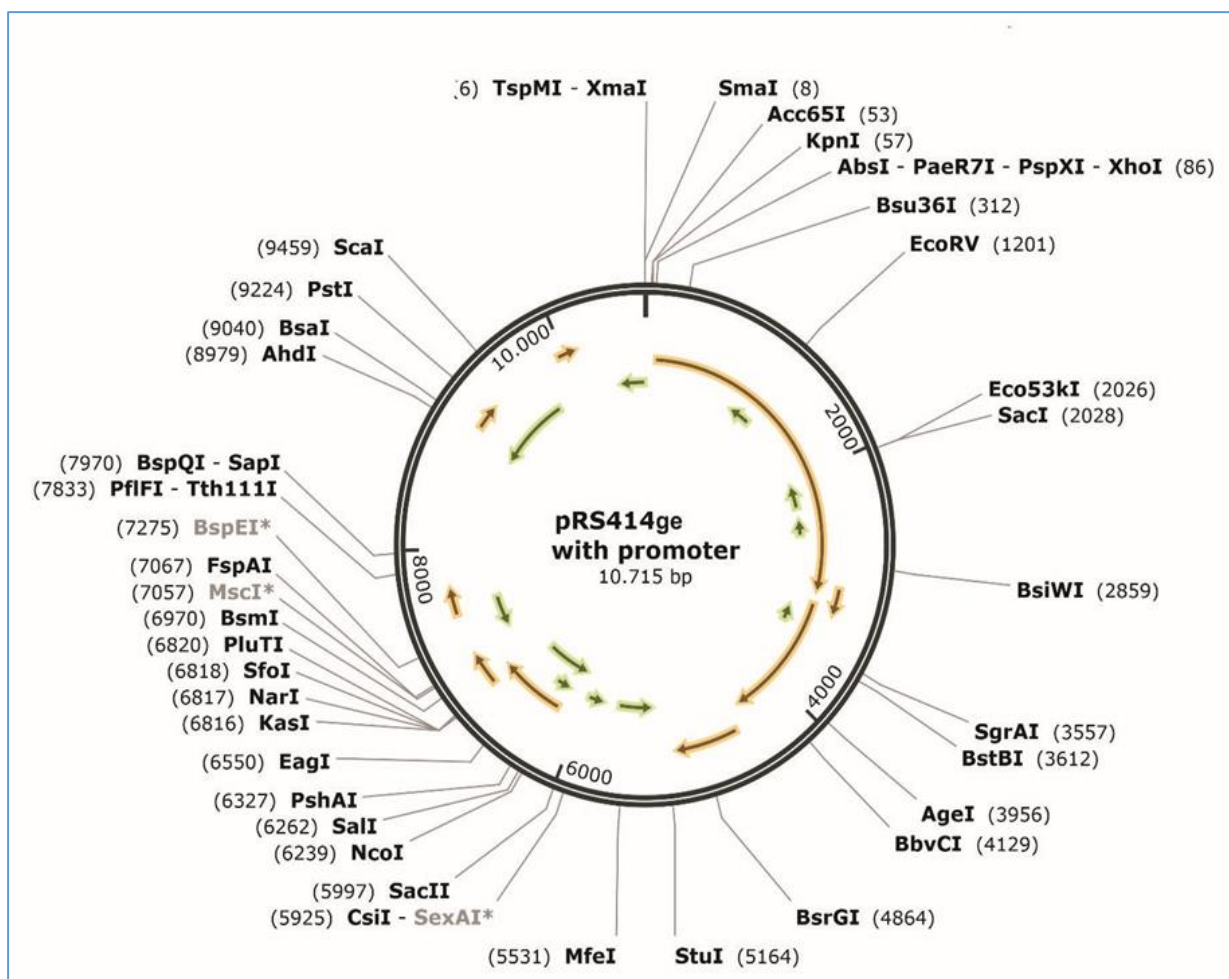
В отсъствието на промотора бета-галактозидазните анализи показват 11,08 MU, но само като фонен сигнал. Тези резултати показват, че генерираната генна репортерна конструкция, използваща pRS414 плазмида, работи ефективно и дава очакваните резултати относно ензимната активност на бета-галактозидазата сред тестваната проба и отрицателната контрола, лишена от PL промотора в моментите, които са били тествани (фигура 11). Експериментите бяха повторени 3 пъти.



Фигура 11. Резултати от експериментално тестване на бета-галактозидазна активност.
*Пожълтелите епруветки показват високи нива на бета-галактозидазна активност.
Безцветната епруветка не показва оцветяване в отсъствието на промотора и то само като фонен сигнал (отрицателна контрола).*

С този експеримент доказах, че новата репортерна *lacZ* система за РНК синтетични биологични изследвания е създала нов *rRS414* ген репортерен плазмид. За създаването на репортерната система се използват ДНК фрагмент, носещ *KpnI* рестриктазно място, секвенцията на Шайн-Далгарно и иницираща транскрипцията АТГ кодон в рамката на гена *lacZ*. Добавих и *BamHI* и *XhoI* рестриктазните сайтове на плазмид. Представеното изследване въвежда промоторната последователност на λ фаг PL от 38 базови двойки в плазмид като *BamHI* – *KpnI* фрагмент, използвайки новото *KpnI* място, въведено в предишния етап. Анализът на бета-галактозидазната активност потвърди точността на експресионната система, тъй като ензимната активност беше получена във всички тествани проби, с изключение на отрицателната контрола. Силният промотор на λ фаг PL експресира репортерния *lacZ* ген, конститутивен през цялото време, осигурявайки подобни резултати по време на анализа на активността. Новогенерираната система е успешно използвана за синтетичен контрол на генна експресия за дизайнерски рибозими и антисенс олигонуклеотид. Плазмидът, използван за експеримента, не е новият *rRS414* плазмид от 4788 базови двойки и е проектиран да прилага синтетичната експресия на гени в *E. coli*. Дадена е пълната последователност на нашия нов *rRS414ge* плазмид, съдържащ PL промотора (фигура 12) на λ фага и има дължина от 10715 bp. Новият *rRS414ge* е уникален инструмент за експерименти за генетичен контрол в областта на РНК синтетичната биология, тъй като предлага едноетапно клониране на различни алостерични рибозими,

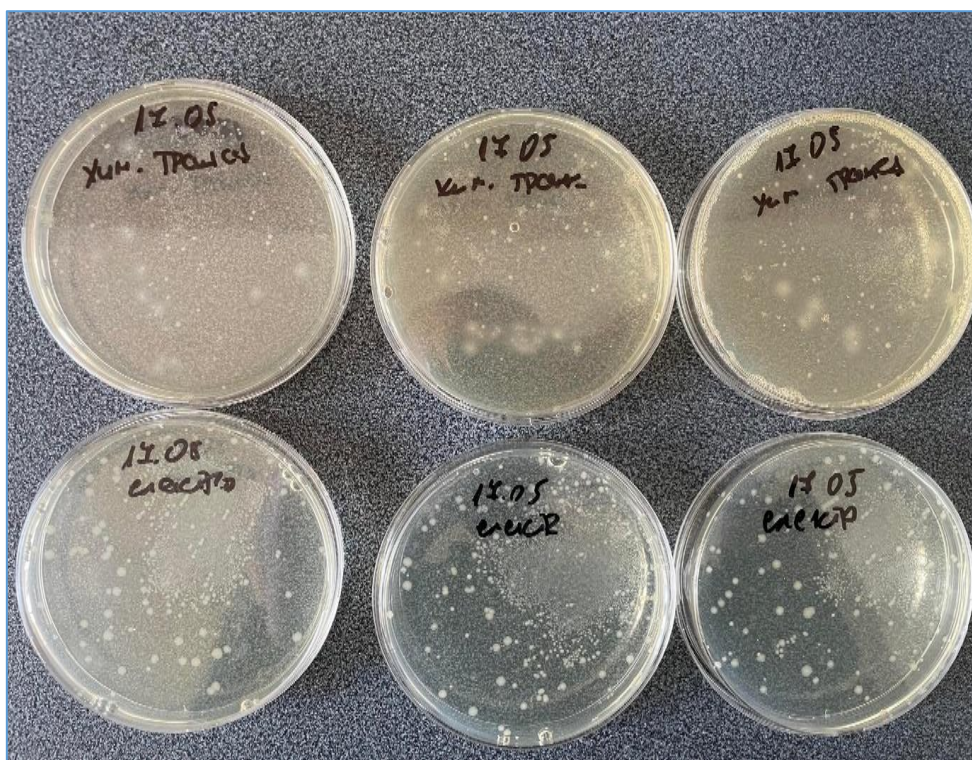
секвенция на Шайн-Далгарно и таргетни сайтове за антисенс олигонуклеотиди, което е много удобен и точен набор за генна експресия. Представеният плазмид е достъпен за академични изследвания след заявка.



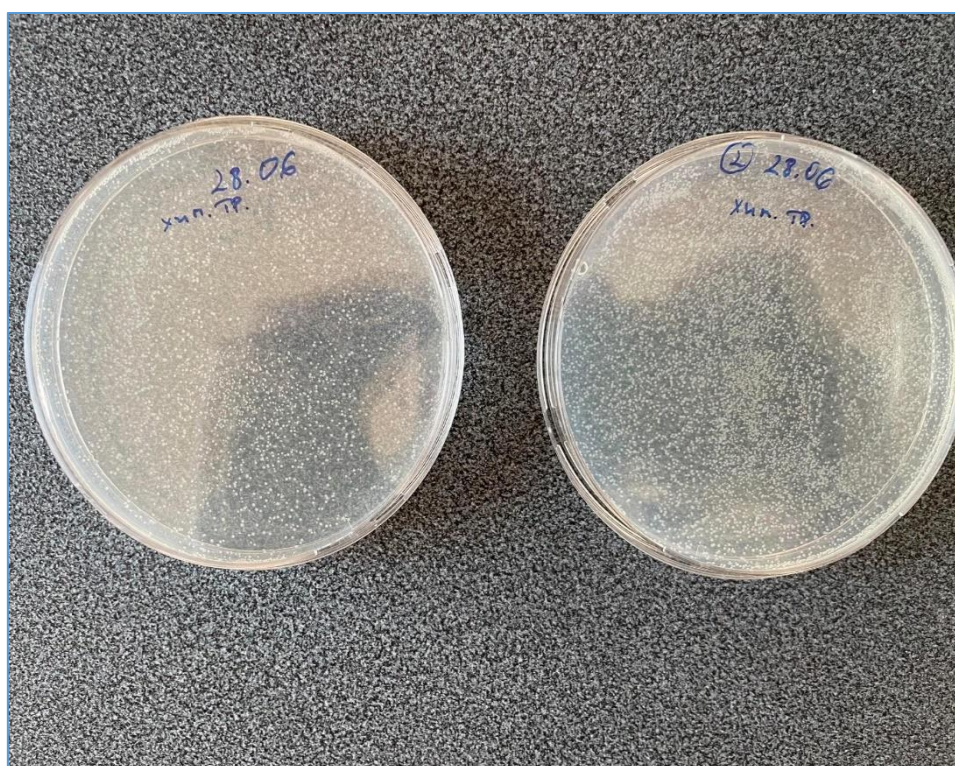
Фигура 12. Карта с рестриктазните места на генерирания плазмид pRS414 (10715 kb), включваща рестриктазното място за KpnI и PL промотора.

Източник: Miloshev et al. (2021) *Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli*

Беше извършена рестриктазна реакция, последващо лигиране, след което беше направена химическа трансформация и електропорация. Резултатите от химическата трансформация и електропорацията могат да бъдат видени на фигура 13, фигура 14, фигура 15 и фигура 16. Експериментите бяха повторени няколко пъти с цел да се изолира добра и видима единична колония. Резултатите от електропорацията показват видимо по-добри резултати след трансформация, в сравнение с резултатите от химическата трансформация.



Фигура 13. Сравнение на резултати от петрита, третиран с химическа трансформация и електропорация. При електропорация се визуализират по-добри резултати. На първия ред са петрита след химическа трансформация, на втория ред са петрита след електрорация.

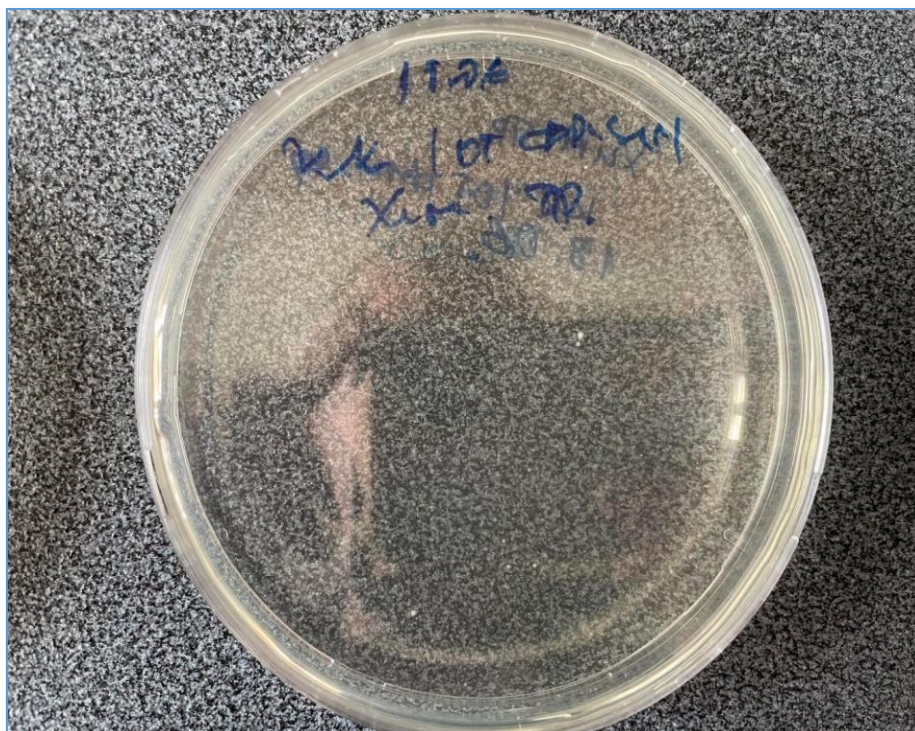


Фигура 14. Резултати на петрита след химическа трансформация. Наблюдават се множество колонии.



Фигура 15. Единични колонии.

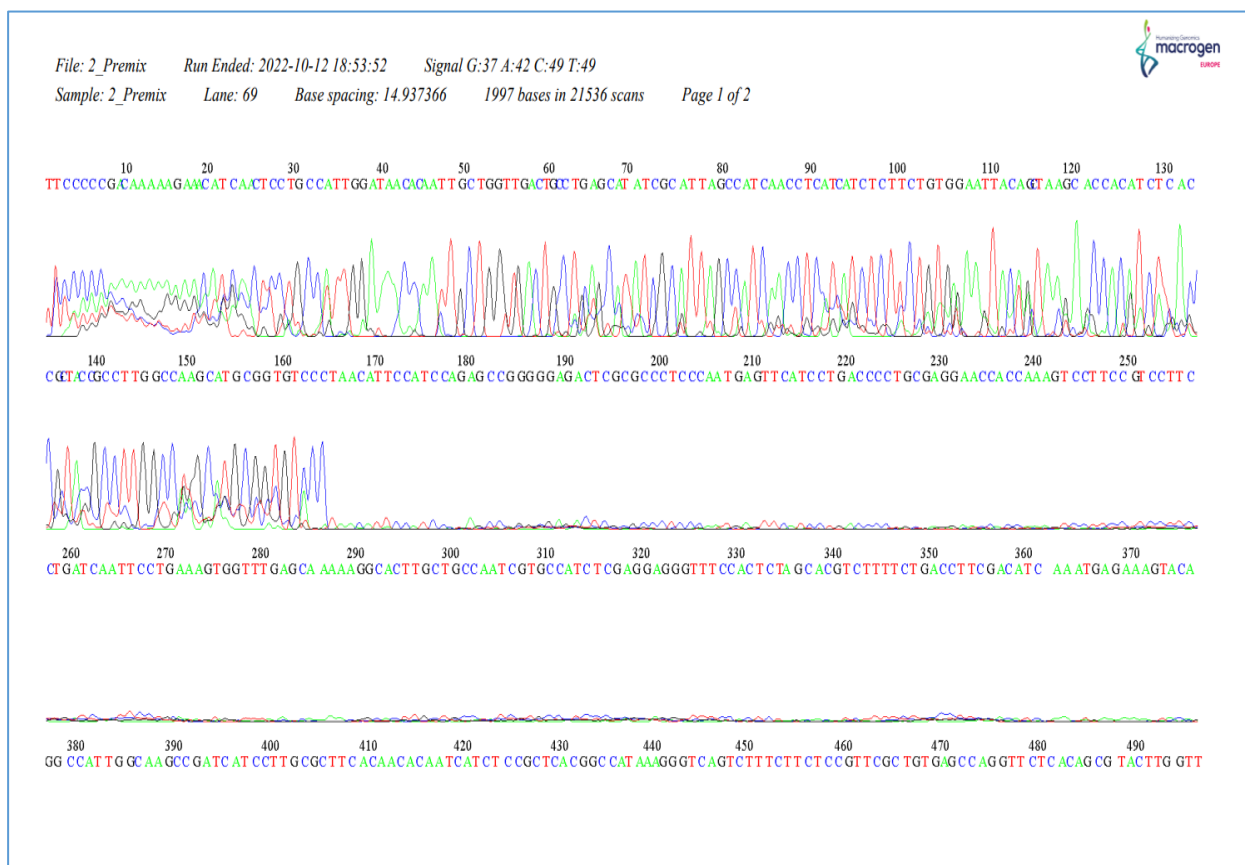
Експериментът беше повторен няколко пъти с цел изолиране на единична колония.



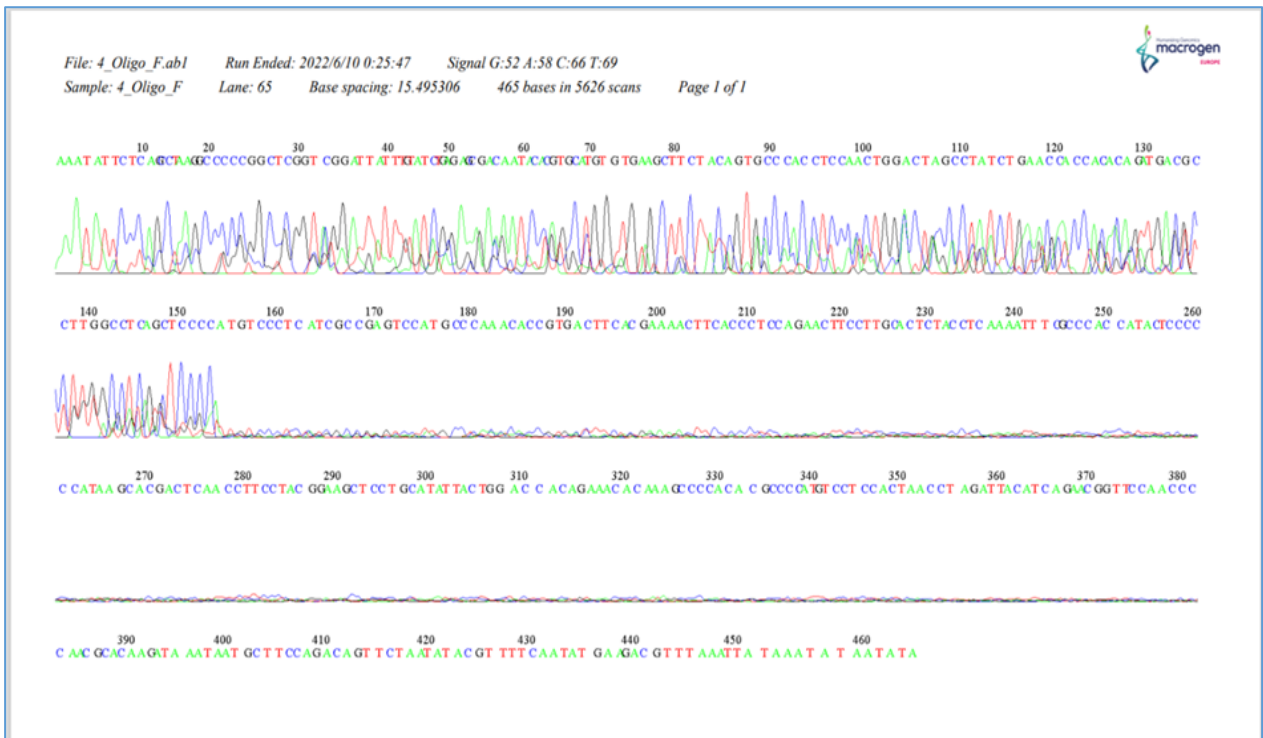
Фигура 16. Единични колонии.

Експериментът беше повторен няколко пъти с цел изолиране на единична колония.

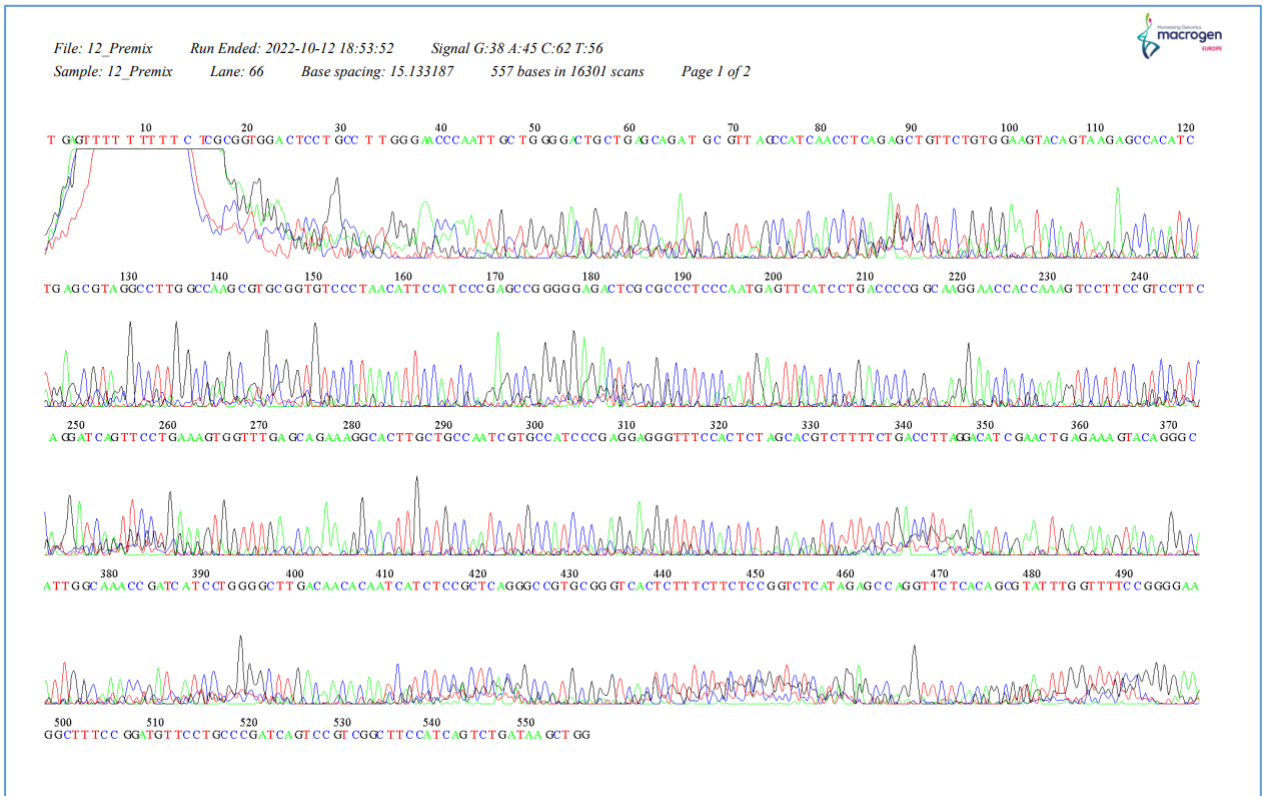
Бяха подбрани няколко клона, които се късат с ензима KpnI и ги изпратихме за секвениране в MacroGene Europe. Резултатите от секвенирането са видими на фигури 17, 18 и 19. Резултатите от направеното секвениране доказаха наличието на използваните рестриктазни нуклеотидни последователности, секвенцията на Шайн-Далгарно, старт кодона, както и наличието на използвания АСО. За извършването на секвенирането беше изолирана плазмидна ДНК с *Sigma-Aldrich - GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*. Бяха подготвени 20 различни проби в краен обем от 10 микролитра и концентрация 150 нанограма на микролитър. Концентрацията на изолираната плазмидна ДНК беше установена с нанодроп от *BioDrop*. Крайният резултат от секвенирането беше получен 2 месеца след изпращането.



Фигура 17. Секвениране, направено от MacroGene Europe.
Изразените цветни пикове показват наличието на добър резултат след направения PCR.
Различните пикове съответстват на отделните нуклеотиди.

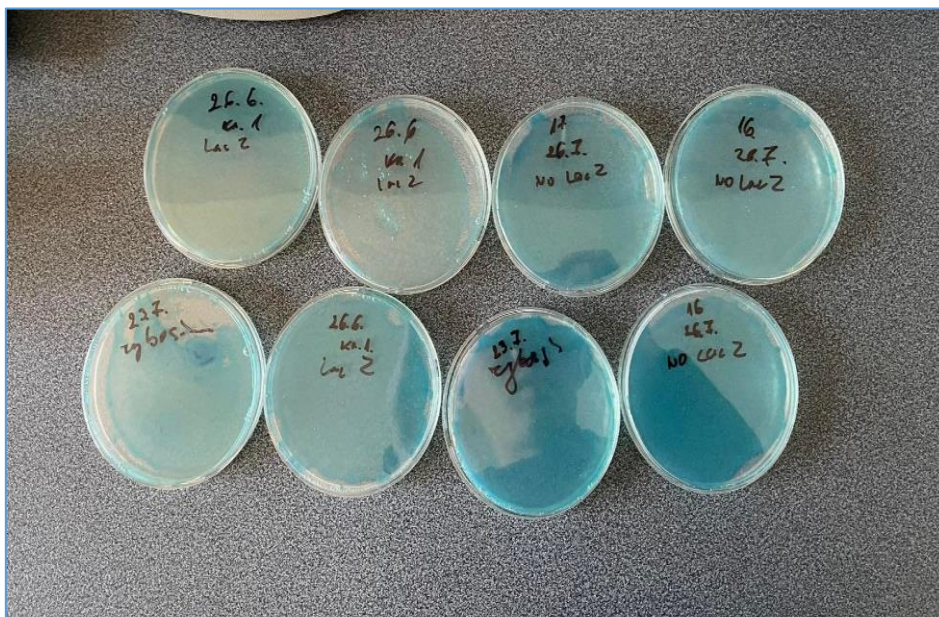


Фигура 18. Секвениране, направено от MacroGene Europe
 Изразените цветни пикове показват наличието на добър резултат след направения PCR.
 Различните пикове съответстват на отделните нуклеотиди.

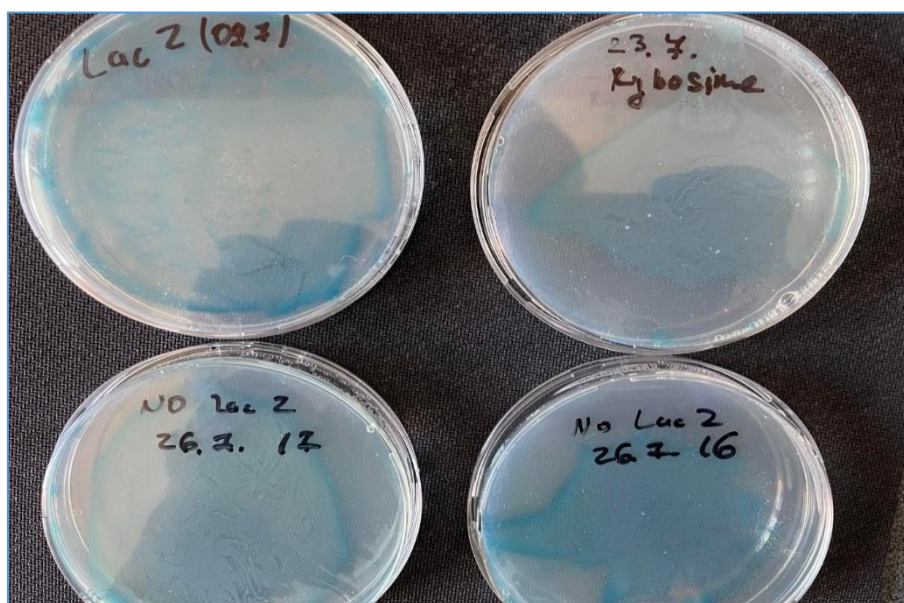


Фигура 19. Секвениране, направено от MacroGene Europe.
 Изразените цветни пикове показват наличието на добър резултат след направения PCR.
 Различните пикове съответстват на отделните нуклеотиди.

Експресията на LacZ беше тествана и по скрининг метода на X gal. 0,2 грама (200 мг), заедно с 10 мл. DMF (N,N - диметилформаид). Добавят се и 0,238 гр. 100 mM изопротил-бета-D-тиогалактопиранозид. Добавя се 100 мл. дестилирана вода и се изливат в петри, съдържащо хранителна среда (Лизогенен бульон) и агар. Петритата се оставят да престоят за една нощ на 37 градуса. След 12 часа отчитам наличието на специфичния син цвят характерен за X gal метода. Това беше извършено с цел потвърждаване на резултатите. Резултатите са видими на фигури 20 и 21.

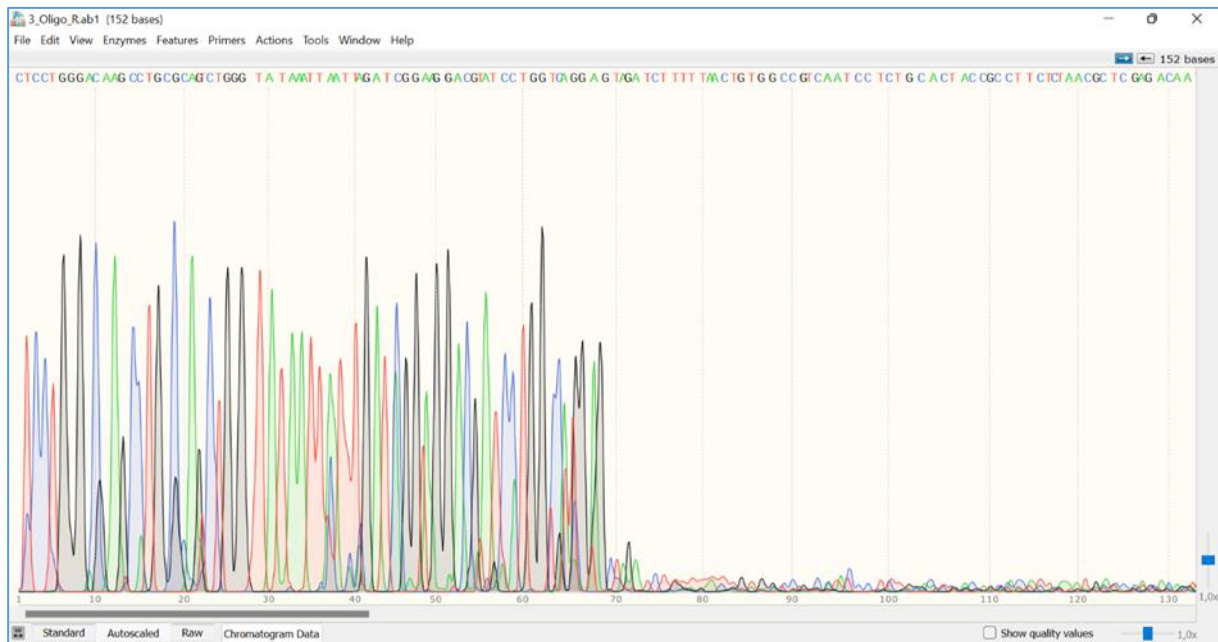


Фигура 20. Резултати от Експресията на LacZ, тествана по скрининг метода на X gal. Наблюдава се характерно синьо оцветяване.



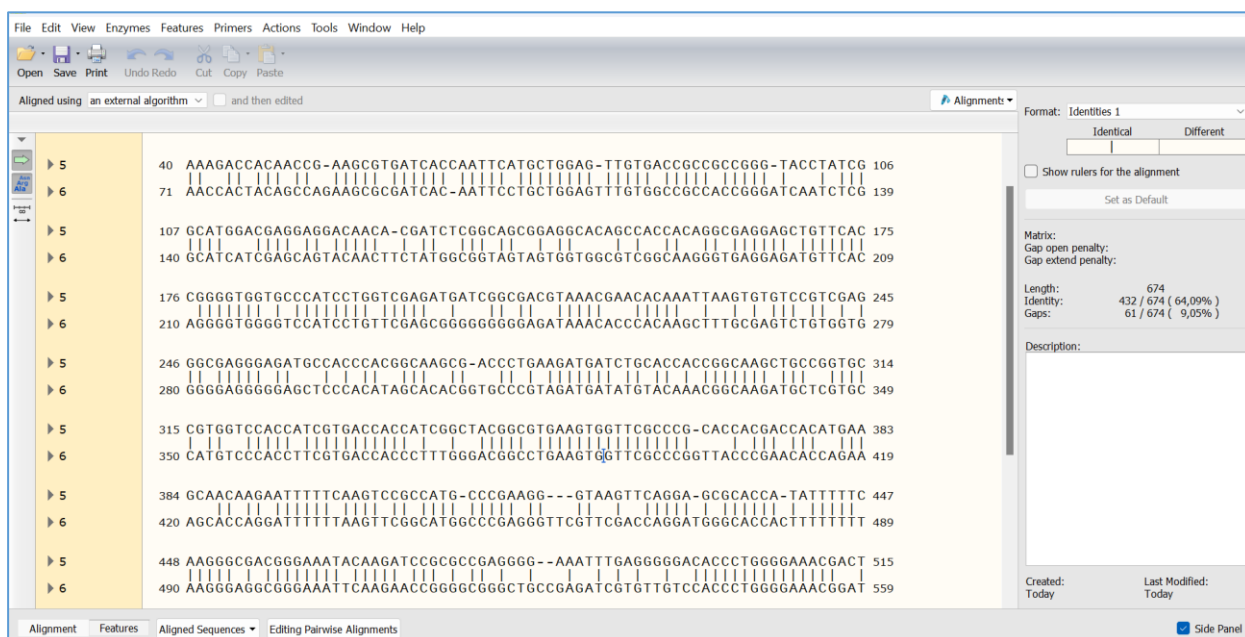
Фигура 21. Резултати от Експресията на LacZ, тествана по скрининг метода на X gal. Наблюдава се характерно синьо оцветяване.

Секвенциите бяха анализирани биоинформатично с програмите ClustalX32 и SnapGene с цел потвърждаване на резултатите от извършеното клониране. Резултатите са видими на фигури 22. и 23. Видими са резултатите от множествоно подравняване на секвенцията на плазмидата със секвенцията на плазмидата, съдържащ клонираните фрагменти.



Фигура 22 – Биоинформатичен анализ със SnapGene.

Съпадението на базите между различните последователности е показано с изразените цветни пикове.

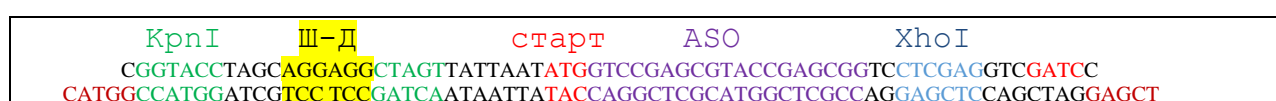


Фигура 23. Биоинформатичен анализ с ClustalX 32.

Съпадението на базите между различните последователности е показано със свързване между тях.

4.3. Дизайн на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*.

При дизайна на стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli* аз съм използвал комбинация от първо и второ поколение АСОи. Целта на стратегията е инхибиране на бактериалния растеж като АСО хибридизира с таргетната секвенция. Проектираният АСО е с дължина от 19 нуклеотида и има следната последователност: 5'- CAGGCTCGCATGGCTCGCC- 3'. Структурата на фрагмента може да бъде видяна на фигура 24.

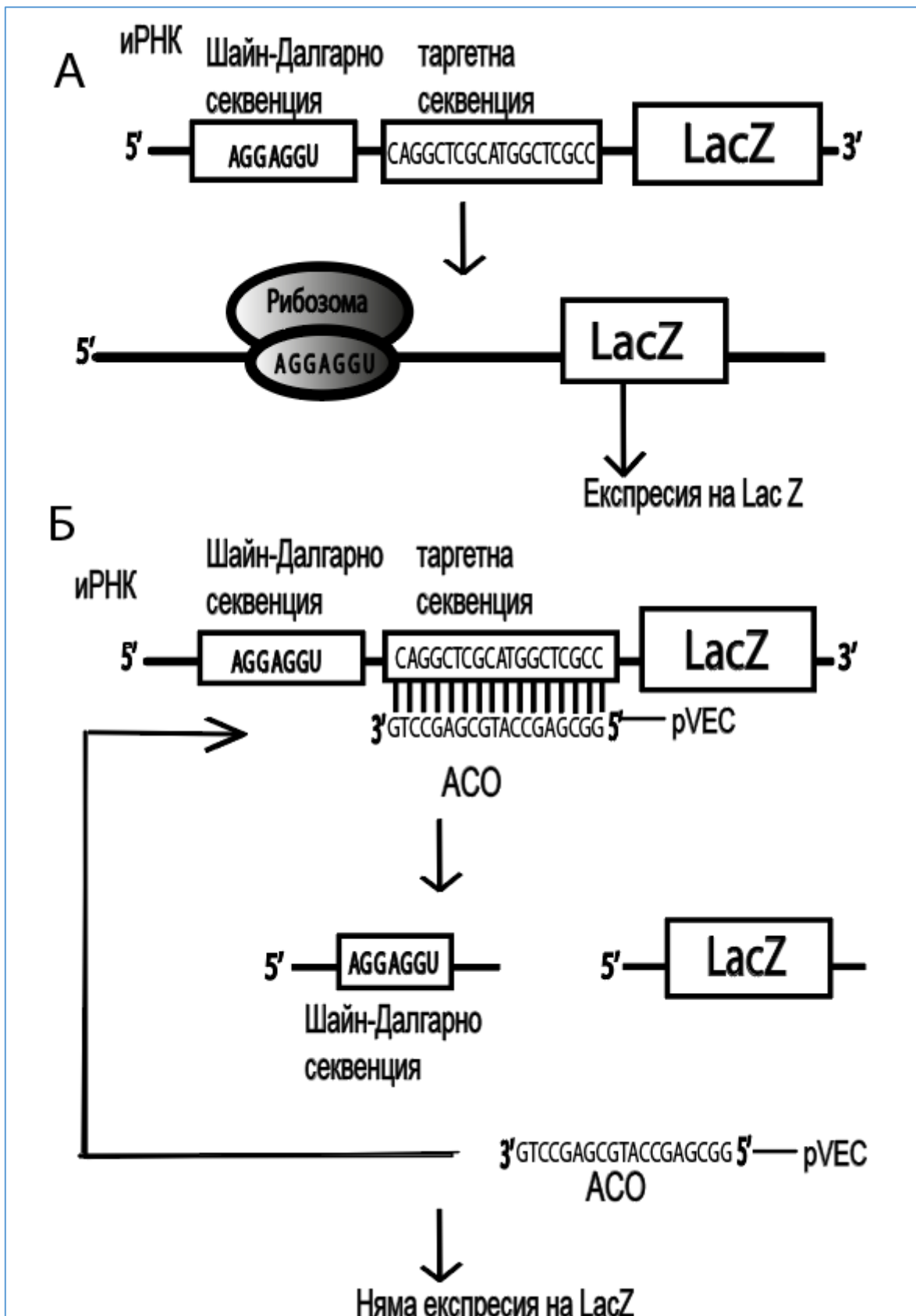


Фигура 24. Структура на фрагмента, съдържаща антисенс олионуклеотид, който инхибира бактериалния растеж. С различни цветове са маркирани секвенциите на рестриктази.
Източник: Miloshev et.al. (2021) *Engineering a plasmid as a reporter system for quantifying gene expression in escherichia coli*

За да може да се разпознае от РНаза Н ендонуклеаза и да хибридизира с нея, за да задейства ензимното разграждане на иРНК и така да се инхибира бактериалния растеж, АСО е модифициран в средните 11 нуклеотида. При такава модификация един от кислородните атоми на фосфодиестерната връзка се замества със серен атом. Тази модификация е характерна за АСОи от първо поколение. Това дава възможност на РНаза Н да функционира, за разлика от второ и трето поколение АСОи. Модификациите от второ поколение повишават стабилността на АСОи срещу еднонуклеази и екзонуклеази. Така се модифицират крайните нуклеотиди от 5' и 3' края. След модификациите последователността на АСО е 5'- C₂A₂G₂G₂C₁T₁C₁G₁C₁A₁T₁G₁G₁C₁T₁C₂G₂C₂C₂- 3'.

Стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli* може да се види на фигура 25. При свързването на АСО с таргетната секвенция, се разкъсва секвенцията на Шайн-Далгарно, и съответно не се наблюдава генна експресия.

АСО е свързан ковалентно с клетъчно проникващ пептид - рVEC (КПП). Образува се химерна молекула. рVEC КПП има способността да преминава през клетъчната стена на прокариотни клетки, но също и през клетъчната стена на еукариотни клетки. Използваната концентрация на рVEC КПП не е токсична за прокариотните клетки, в случая клетките на *Escherichia coli*.



Фигура 25. Схематично изобразяване на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*

А-Наличие на генна експресия - при отсъствие на АСО. Б- При свързването на АСО с таргетната секвенция, разкъсва се секвенцията на Шайн-Далгарно, и съответно не се наблюдава генна експресия.

pVEC КПП не изисква специфична температура за да навлезе през клетъчна та стена. КПП има следната последователност LLILRRRIRKQAHANHSK, която се кодира от следните аминокиселини H₂N-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-his-Ser-Lys-OH. pVEC е съставен от 18 аминокиселини. Азотният край на КПП е хидрофобен, а въглеродният край е хидрофилен. Средната му част е положително заредена, защото има много аргининови остатъци. След като навлезе в бактерията само АСО хибридизира с таргетната секвенция.

За целта на експеримента бяха използвани клетки на *E. coli* от щама HB101 (Takara Bio INC, Япония). Бактериите се отглеждат в LB среда, която съдържа ампицилин (100 mg/L).

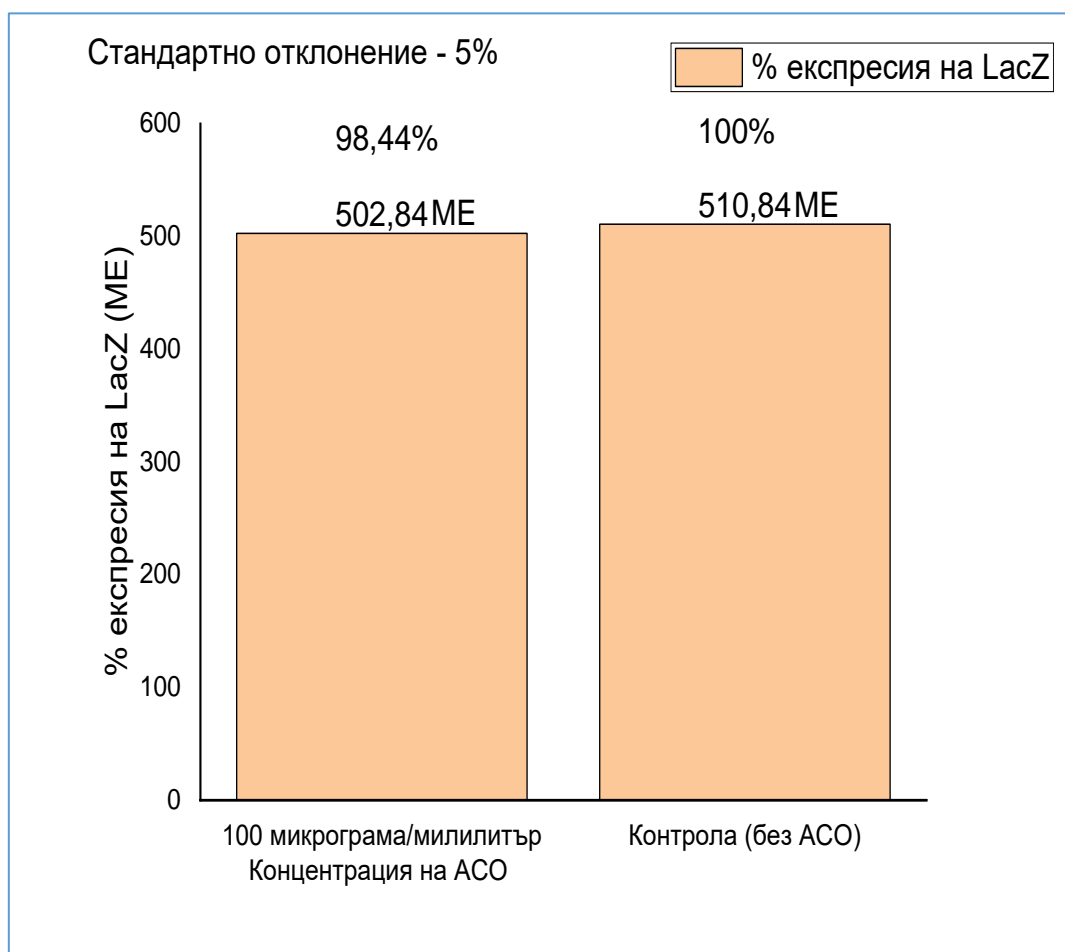
4.4. Експериментално тестване на антисенс олигонуклеотидите за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*.

За изпълнението на тази задача тествах антисенс олигонуклеотиди с 9 различни концентрации (таблица) с цел да се установи процентът на инхибиране на бактериалния растеж на *Escherichia coli* при различна концентрация. Експериментите бяха повторени 3 пъти и беше взета средна стойност.

Таблица 3. 9 различни концентрации на АСО, използвани за установяване на процента на инхибиране на бактериален растеж на *Escherichia coli*

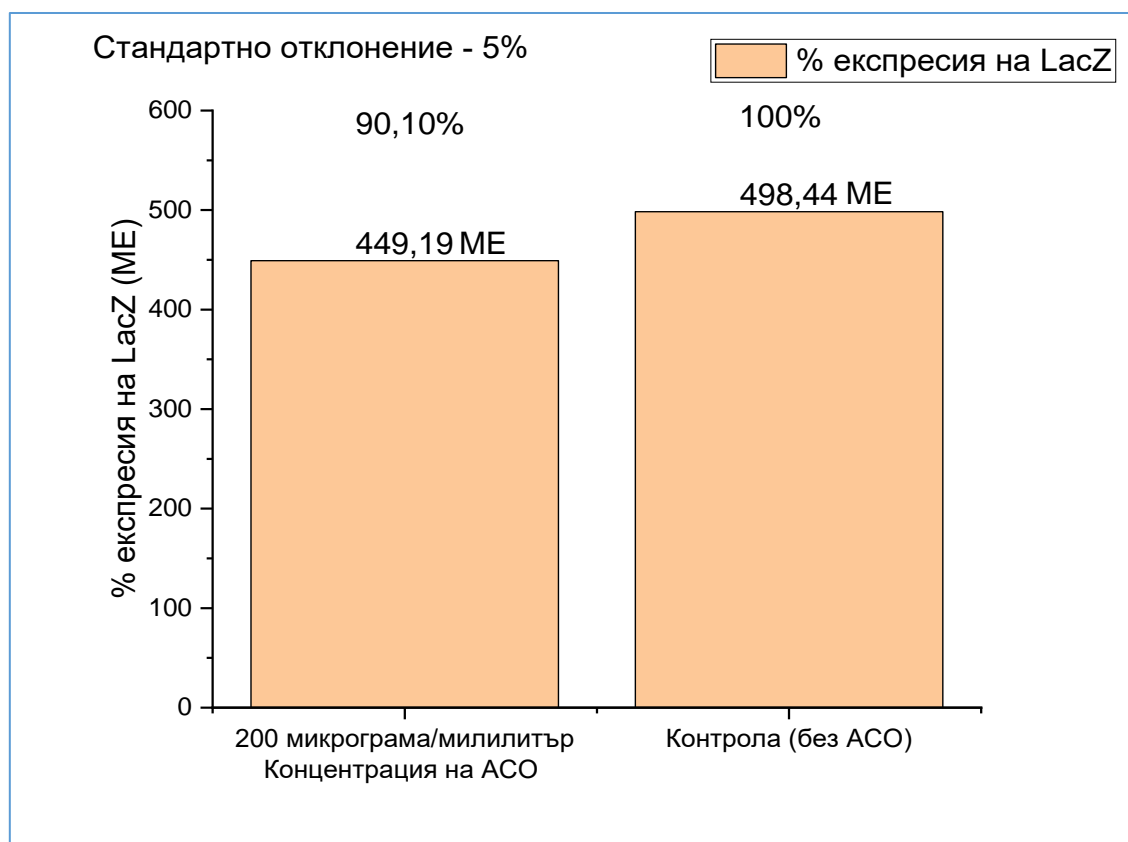
| | |
|----|---------------------------|
| 1. | 100 микрограма/милилитър |
| 2. | 200 микрограма/милилитър |
| 3. | 279 микрограма/милилитър |
| 4. | 559 микрограма/милилитър |
| 5. | 840 микрограма/милилитър |
| 6. | 1119 микрограма/милилитър |
| 7. | 1440 микрограма/милилитър |
| 8. | 1678 микрограма/милилитър |
| 9. | 2238 микрограма/милилитър |

Експериментът беше започнат с концентрация на антисенс олигонуклеотида от 100 микрограма/милилитър. За целта на експеримента беше заложена бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разреждане на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 100 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 502,84 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 510,84 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 98,44% експресия на LacZ и съответно 1,56% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 26).



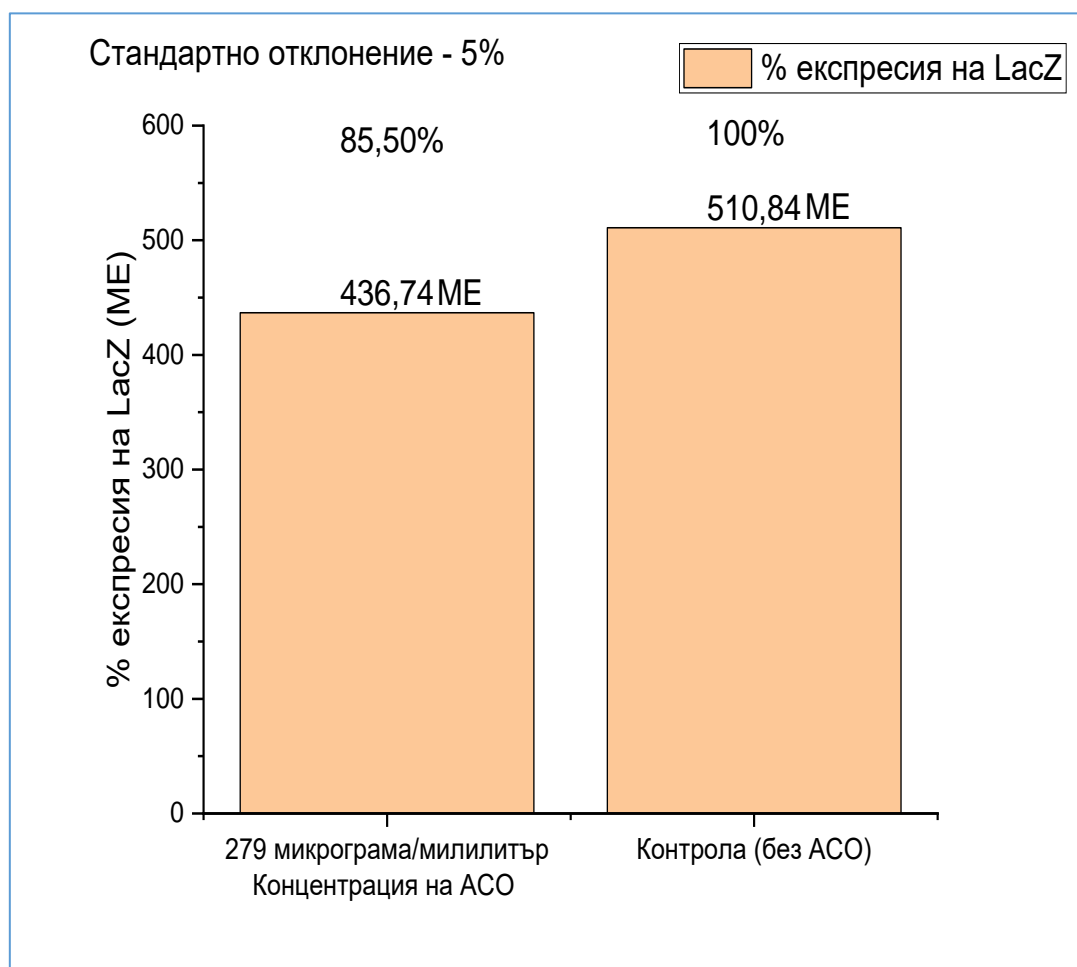
Фигура 26. При концентрация на АСО от 100 микрограма/милилитър се наблюдава 98,44% експресия на LacZ (502,84 МЕ) и съответно 1,56% инхибиране на бактериалния растеж.

Експериментът беше продължен с концентрация на антисенс олигонуклеотида от 200 микрограма/милилитър. За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубиране се прави разреждане на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 200 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 449,19 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 498,44 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 90,10% експресия на LacZ и съответно 9,90% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 27)



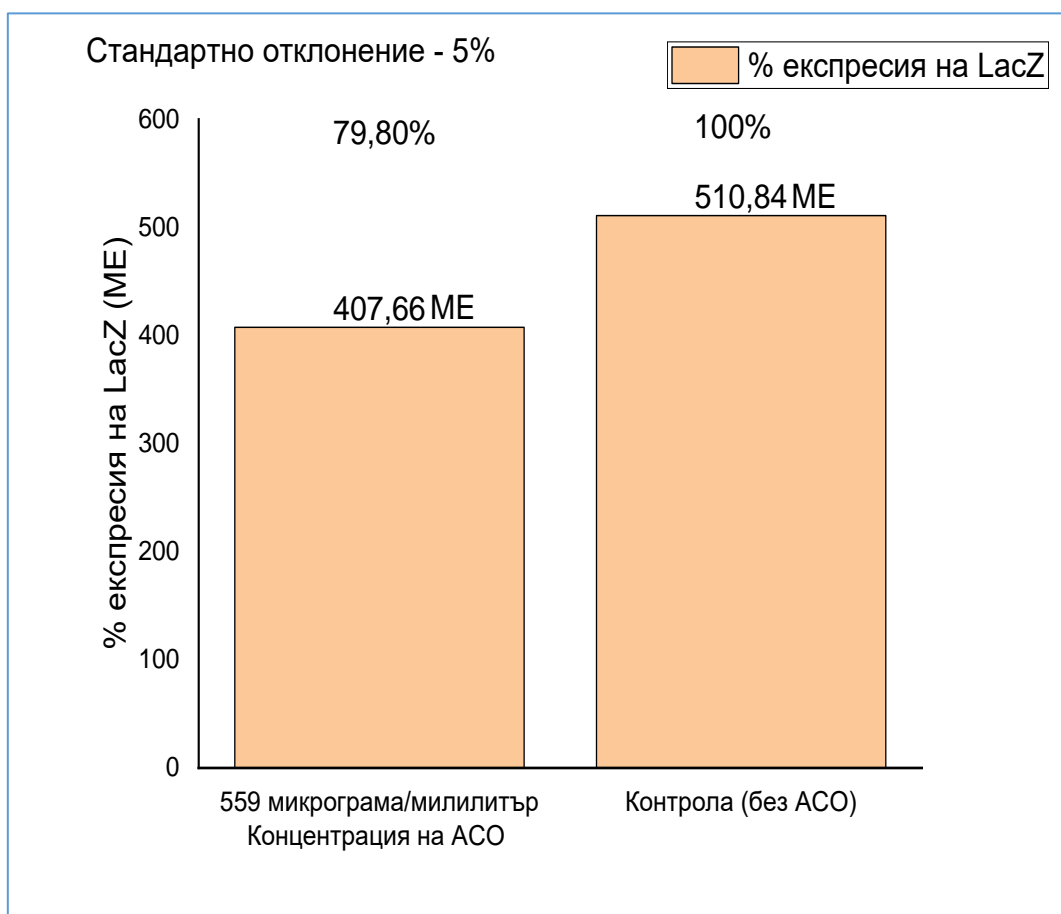
Фигура 27. При концентрация на АСО от 200 микрограма/милилитър се наблюдава 90,10% експресия на LacZ (449,19 МЕ) и съответно 9,90% инхибиране на бактериалния растеж.

След това тествах бактериалната преживяемост с концентрация на антисенс олигонуклеотида от 279 микрограма/милилитър. За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разредка на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 279 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 436,74 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 510,84 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 85,50% експресия на LacZ и съответно 14,50% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 28).



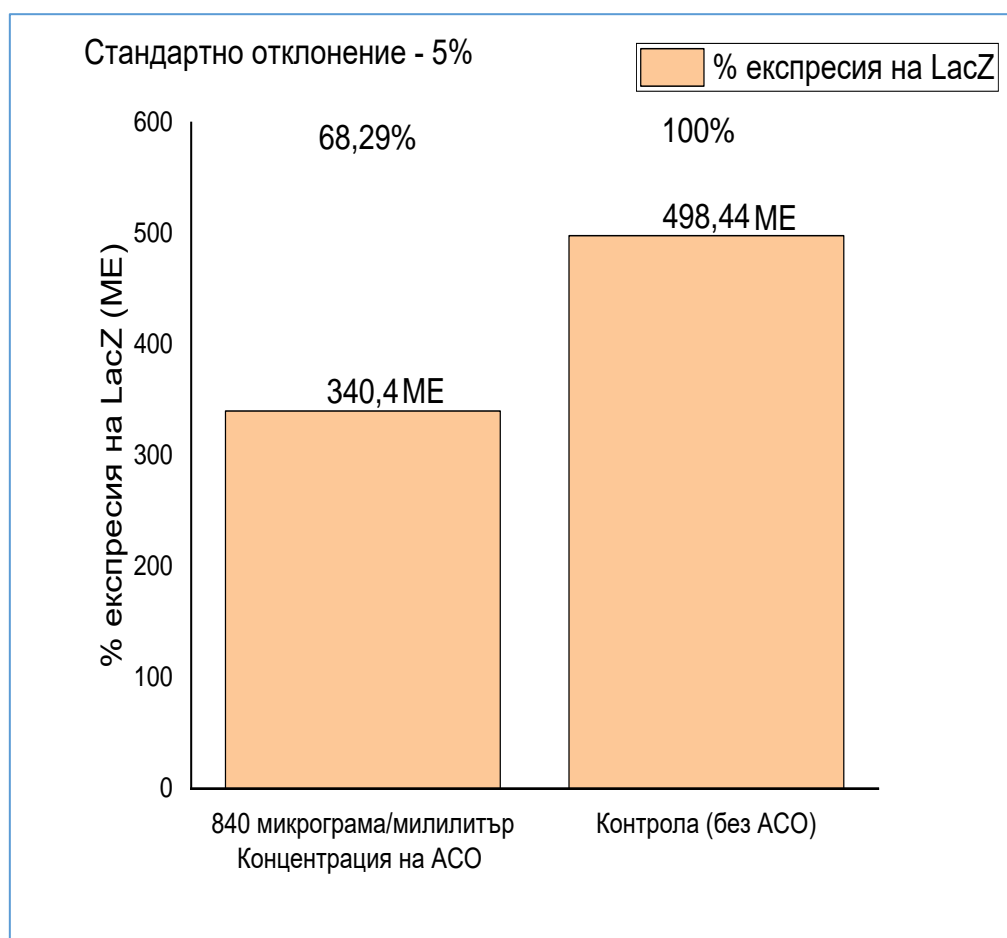
Фигура 28. При концентрация на АСО от 279 микрограма/милилитър се наблюдава 85,50% експресия на LacZ (436,74 МЕ) и съответно 14,5% инхибиране на бактериалния растеж.

Експериментът беше продължен с концентрация на антисенс олигонуклеотида от 559 микрограма/милилитър. За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разреждане на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 559 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 407,66 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 510,84 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 79,80% експресия на LacZ и съответно 20,20% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 29).



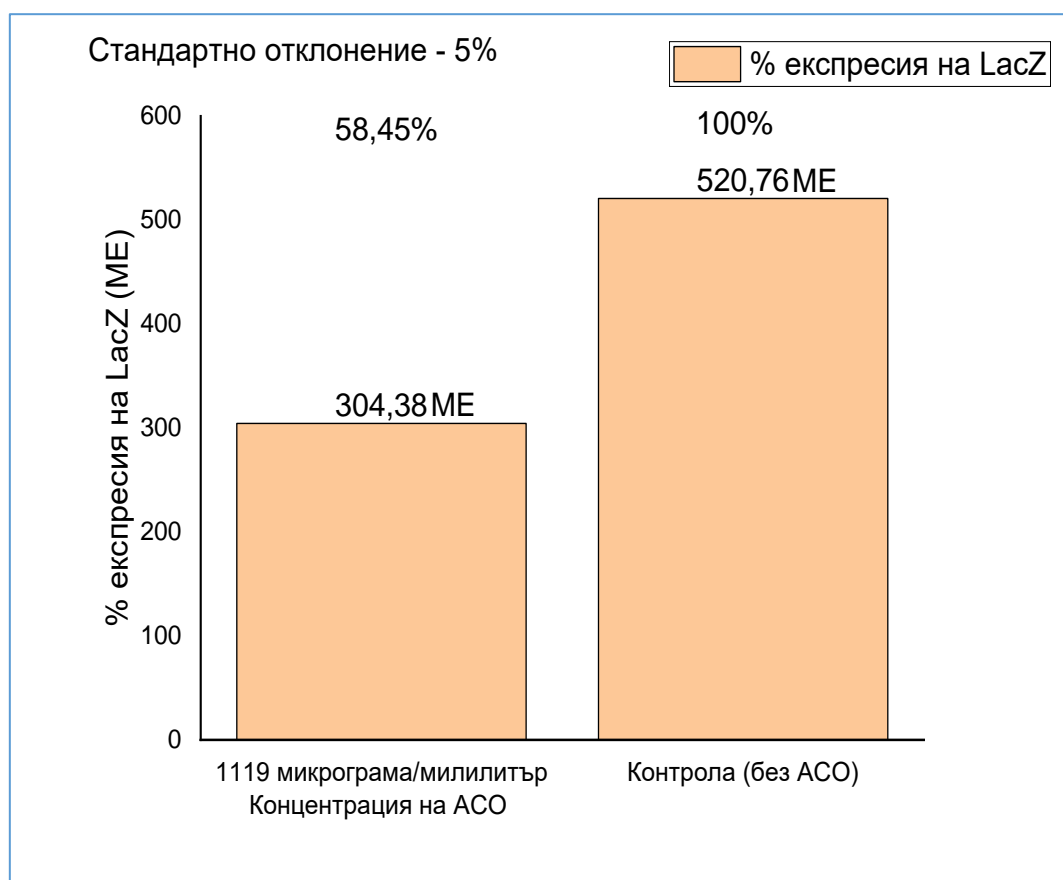
Фигура 29. При концентрация на АСО от 559 микрограма/милилитър се наблюдава 79,80% експресия на LacZ (407,66 МЕ) и съответно 20,20% инхибиране на бактериалния растеж.

Беше тестван процентът на инхибиране на бактериалния растеж при концентрация на антисенс олигонуклеотида от 840 микрограма/милилитър (фигура 30). За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирването се извършва на клатчка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разредка на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 840 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 340,40 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 498,44 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 68,29% експресия на LacZ и съответно 31,71% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 30).



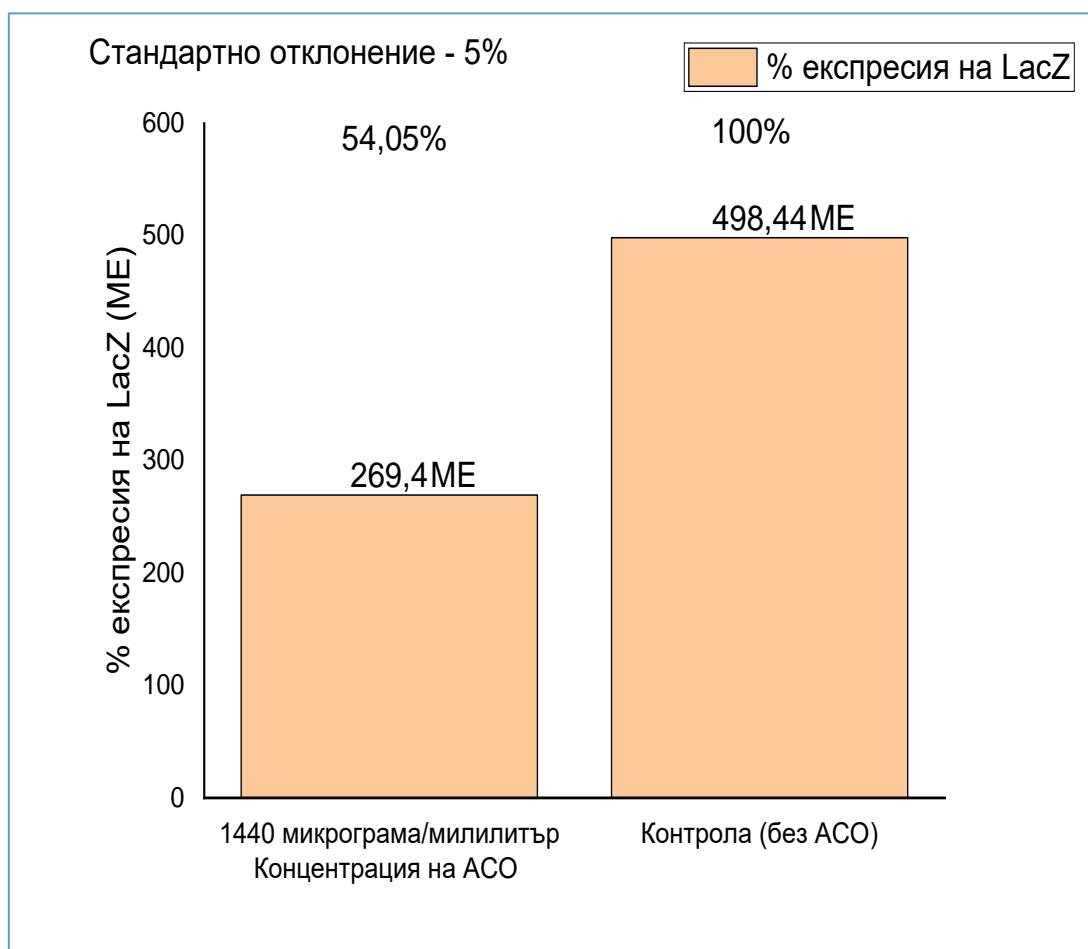
Фигура 30. При концентрация на АСО от 840 микрограма/милилитър се наблюдава 68,29% експресия на LacZ (340,40МЕ) и съответно 31,71% инхибиране на бактериалния растеж.

Продължих експеримента с цел тестване на процента на инхибиране на бактериалния растеж при концентрация на антисенс олигонуклеотида от 1119 микрограма/милилитър (фигура 31). За целта беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разредка на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 1119 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 304,38 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 520,76 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 58,45% експресия на LacZ и съответно 41,55% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 31).



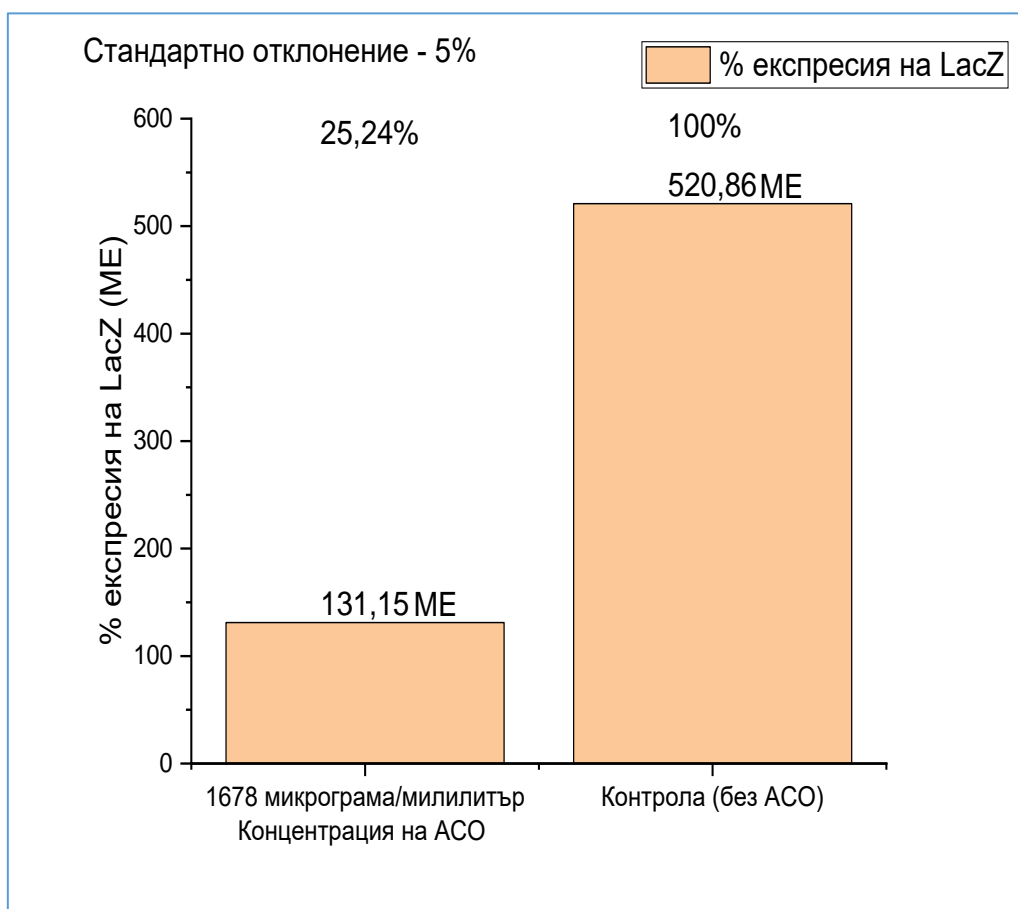
Фигура 31. При концентрация на АСО от 1119 микрограма/милилитър се наблюдава 58,45% експресия на LacZ (304,38МЕ) и съответно 41,55% инхибиране на бактериалния растеж.

Беше тестван процентът на инхибиране на бактериалния растеж при концентрация на антисенс олигонуклеотида от 1440 микрограма/милилитър (фигура 32). За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разредка на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 1440 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 269,40 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 498,44 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 54,05% експресия на LacZ и съответно 45,95% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 32).



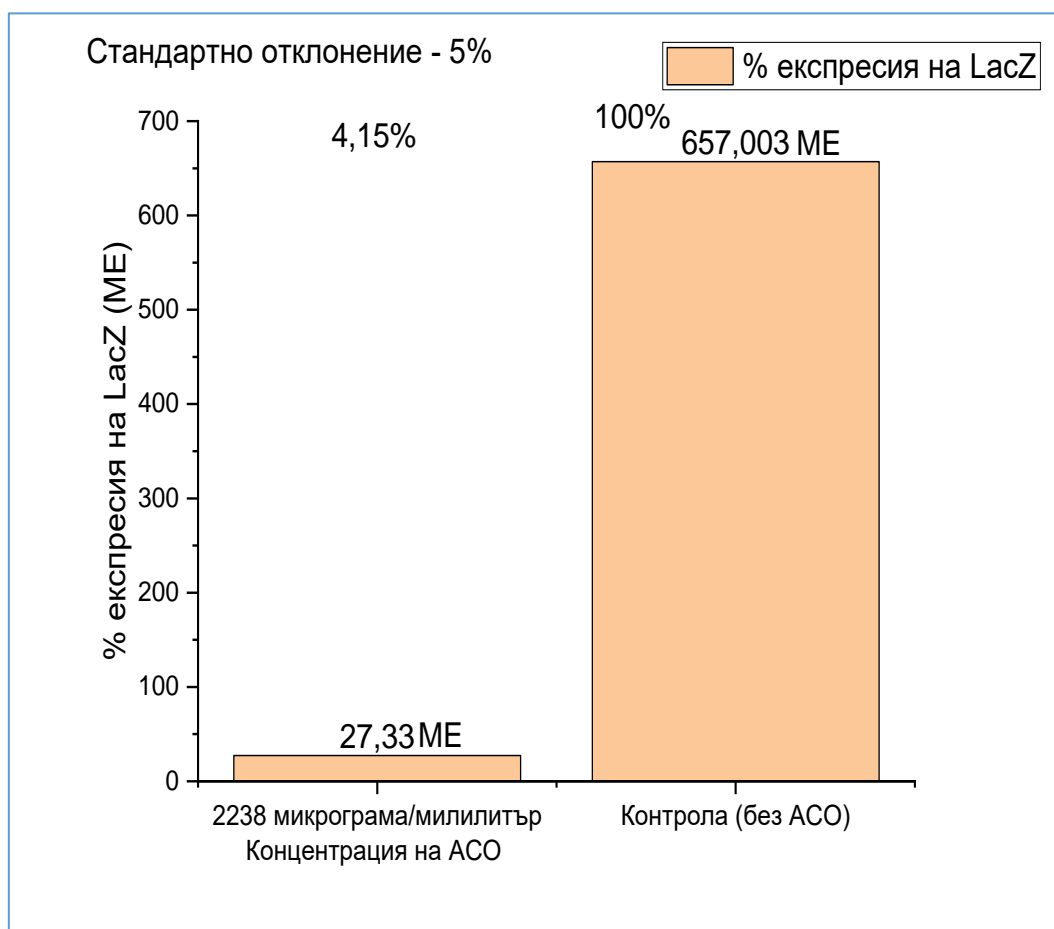
Фигура 32. При концентрация на АСО от 1440 микрограма/милилитър се наблюдава 54,05% експресия на LacZ (269,40 МЕ) и съответно 45,95% инхибиране на бактериалния растеж.

Беше тестван и процентът на инхибиране на бактериалния растеж при концентрация на антисенс олигонуклеотида от 1678 микрограма/милилитър (фигура 33). За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разреждане на бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 1678 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 131,15 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 520,86 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 25,24% експресия на LacZ и съответно 74,76% инхибиране на бактериалния растеж (фигура 33).



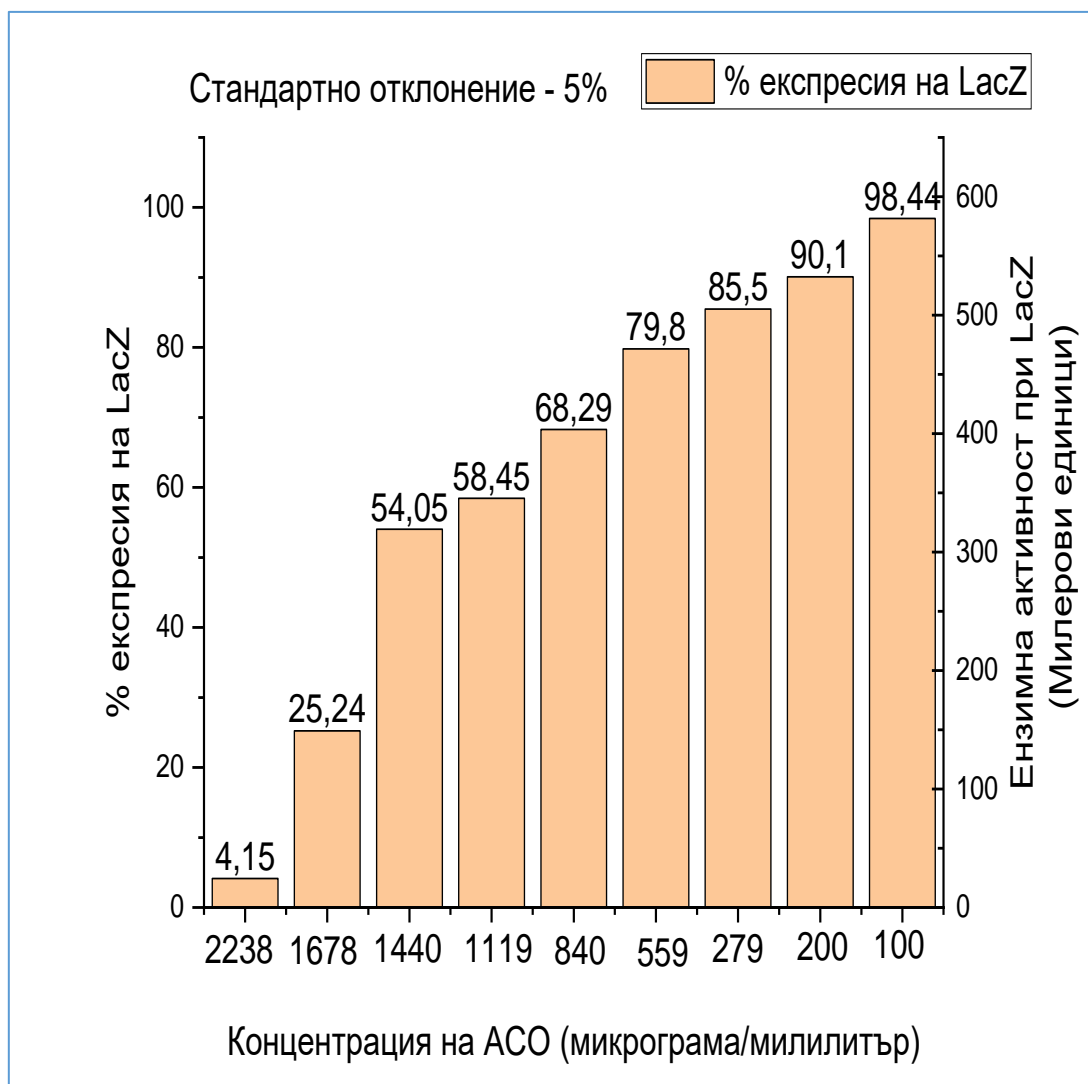
Фигура 33. При концентрация на АСО от 1678 микрограма/милилитър се наблюдава 25,24% експресия на LacZ (131,15 МЕ) и съответно 74,76% инхибиране на бактериалния растеж.

Последният антисенс олигонуклеотид, който използвах за целта на експеримента беше с концентрация от 2238 микрограма/милилитър (*фигура 34*). За целта на експеримента беше заложена нова бактериална култура (в рамките на 8-9 часа) във флакон, съдържащ 20 милилитра Лизогениев бульон и 20 микролитра ампицилин (100 mg/L). Култивирането се извършва на клатачка при постоянна температура от 37°C и 200 оборота в минута. След инкубирането се прави разреждане бактериалната култура в отношение 1:1000 и тестването се прави в интервал от 6-8 часа. Залагат се 3 епруветки, съдържащи бактериална култура без антисенс олигонуклеотид и 2 епруветки, съдържащи бактериална култура и 2238 микрограма/милилитър антисенс олигонуклеотид. На всеки 30 минути се отчита прорастването на бактериална култура. Когато бъде отчетено спиране на бактериалния растеж, се прави Бета-галактозидазен анализ по описания вече протокол. Средната стойност на бета-галактозидазната активност на бактериалните култури, съдържащи АСО е 27,33 МЕ, а тази на бактериалните култури без АСО е 657,003 МЕ. При такава концентрация на антисенс олигонуклеотида се наблюдава 4,15% експресия на LacZ и съответно 95,85% инхибиране на бактериалния растеж (*фигура 34*).



Фигура 34. При концентрация на АСО от 2238 микрограма/милилитър се наблюдава 4,15% експресия на LacZ (27,33 МЕ) и съответно 95,85% инхибиране на бактериалния растеж.

Установих, че с повишаване на концентрацията на АСО, се понижава процентът на експресия на LacZ и съответно се повишава процентът на инхибиране на бактериалния растеж. Експериментите с всяка една от концентрациите бяха повторени 3 пъти и беше взета средна стойност. За всеки експеримент използвах и контрола, която съдържа бактериална култура без наличие на антисенс олигонуклеотид. Обобщена графика може да бъде видяна на фигура 35. АСО беше поръчан от Invitrogen by Thermo Fisher Scientific.



Фигура 35. Обобщена графика, показваща процента на експресия на LacZ при използване на различна концентрация от антисенс олигонуклеотида.

4.5. Дизайн на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия с използването на синтетичен хамърхед рибозим в *Escherichia coli*.

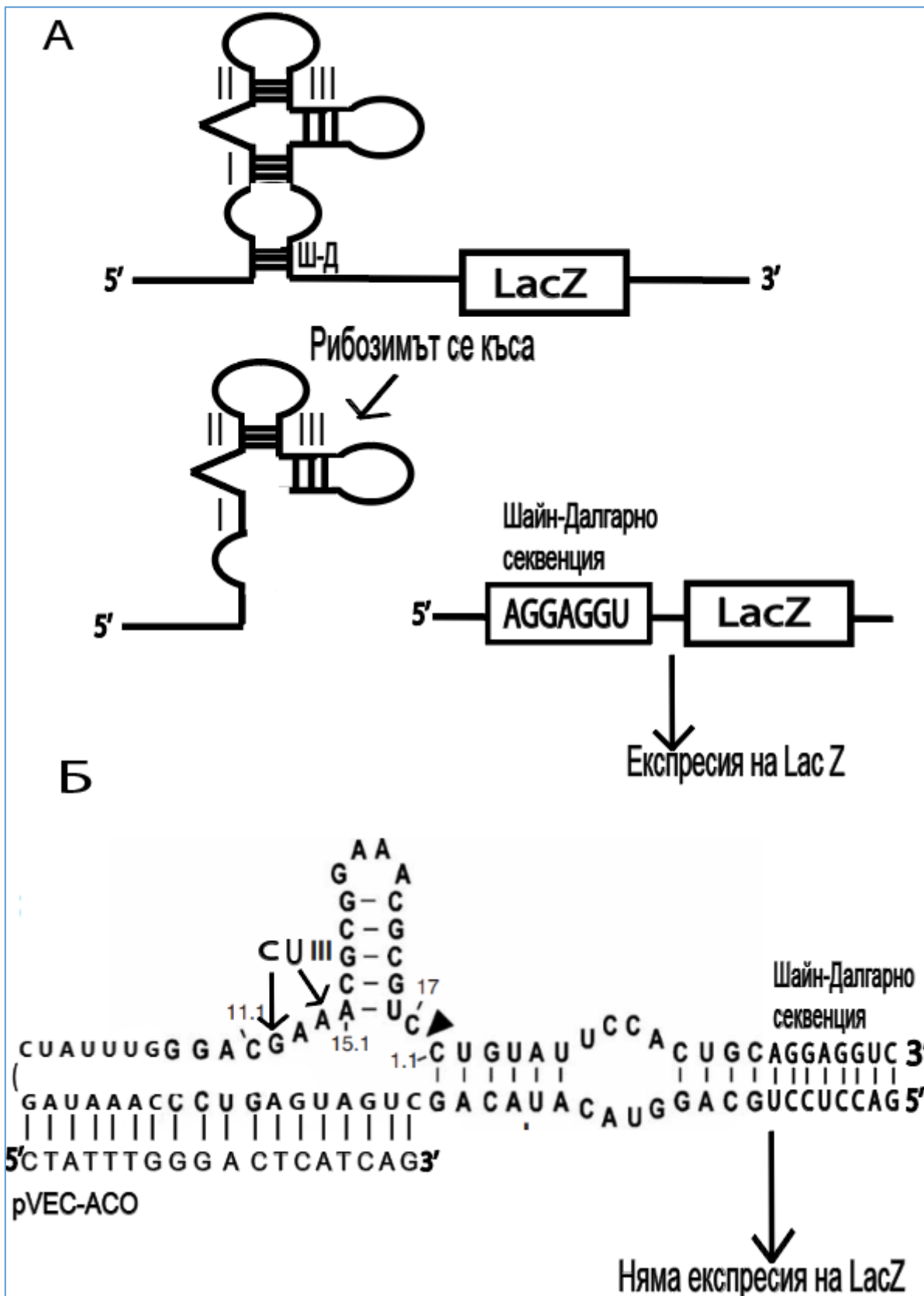
При дизайна на стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия с използването на хамърхед рибозим при *Escherichia coli*, аз съм използвал комбинация от първо и второ поколение АСОи. Целта на стратегията е инхибиране на бактериалния растеж като АСО хибридизира с алостеричен рибозим. Проектираният АСО е с дължина от 18 нуклеотида и има следната последователност: 5'- СТАТТТGGGACTCATCAG - 3'.

Използва се алостеричен хамърхед рибозим. За въвеждането на АСО се използва рVЕС КПП. Образува се химерна молекула. рVЕС КПП има способността да преминава през клетъчната стена на прокариотни клетки, но също и през клетъчната стена на еукариотни клетки. Използваната концентрация на рVЕС КПП не е токсична за прокариотните клетки, в случая клетките на *Escherichia coli*.

рVЕС КПП не изисква специфична температура за да навлезе през клетъчната стена. КПП има следната последователност LLILRRRIRKQAHANSK, която се кодира от следните аминокиселини H₂N-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-his-Ser-Lys-OH. рVЕС е съставен от 18 аминокиселини. Азотният край на КПП е хидрофобен, а въглеродният край е хидрофилен. Средната му част е положително заредена, защото има много аргининови остатъци. След като навлезе в бактерията само АСО хибридизира с таргетната секвенция.

За целта на експеримента бяха използвани клетки на *E. coli* от щама HB101 (Takara Bio INC, Япония). Бактериите се отглеждат в LB среда, която съдържа ампицилин (100 mg/L).

Стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli* може да се види на фигура 36. Когато алостеричният хамърхед рибозим не е свързан с АСО, късането на алостеричния рибозим не се блокира, не се блокира и секвенцията на Шайн-Далгарно, следователно той се къса и се наблюдава генна експресия. Когато алостеричният хамърхед рибозим взаимодейства с АСО между стем I и стем II разкъсването на алостеричния рибозим се блокира, блокира се и секвенцията на Шайн-Далгарно, и съответно не се наблюдава генна експресия.



Фигура 36. Схематично изобразяване на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозим при *Escherichia coli*.

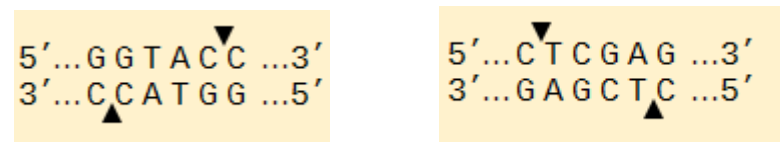
(А) При наличието на алостеричен хамърхед рибозим, който не е свързан с АСО, разкъсването на алостеричния рибозим не се блокира и се наблюдава генна експресия. (Б). При наличието на алостеричен рибозим, който взаимодейства с АСО, разцепването на алостеричния рибозим се блокира, блокира се и секвенцията на Шайн-Далгарно и не се наблюдава генна експресия.

Беше създаден ДНК фрагмент, който носи KpnI и XhoI рестриктазно място и секвенцията на Шайн-Далгарно, както и кодон за начало на транскрипцията АТГ в рамка с lacZ, чрез хибридизация с два деоксиолигомера (фигура 37).

Рибозим :

ATCCTTGGTACTTACAGCTTACGAGTCCCAAATAGGAC (G/C) AAACGCGACACACACCACTAAACCGTG
CAGTGTTCGCGTCCCTGTAATCCAC AAGGAGG TATTAAT ATG

Клониране с KpnI и XhoI



CATCCTTGGTACTTACAGCTTACGAGTCCCAAATAGGAC AAACGCGACACACACCACTAAACCGTGCAGTGTTCGCGTCCCTGTAATCCAC AAGGAGG TATTAAT ATG C
CATGGTAGGAACCATGAATGTCGAATGCTCAGGGTTTATCCTG TTTGCGCTGTGTGGTGATTTGGCACGTCACAAAGCGCAGGACATTAGGTG TTCCTCCATAATTAAC GAGCT

Фигура 37. Клониране на алсторейчна рибозима с KpnI и XhoI рестриктазно място. KpnI и XhoI се използват за вкарване на фрагмента на рибозимът. С различни цветове са маркирани секвенциите на рестриктазите, използвани за клонирането.

Беше проверена стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозим при *Escherichia coli* чрез 5 различни мутации на ACO (mismatch). Тестването беше направено с помощта на свободно достъпен софтуер RNAcofold Webserver - <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAcofold.cgi>. Установих, че когато има мутации в секвенцията на ACO, не се наблюдава желанния ефект. Секвенцията на ACO е следната:

5'-СТАТТТGGGACTCATCAG-3'. Чрез RNAcofold Webserver резултатът от стойността на термодинамичната стабилност на ACO и секвенцията на рибозимът е **-43.70 kcal/mol**.

При наличие на една мутация в секвенцията - 5'-СТАТТТCGGACTCATCAG-3', стойността на термодинамичната стабилност на ACO и секвенцията на рибозимът е **-37.22 kcal/mol**.

При наличие на две мутации в секвенцията 5'-СТАТТТCGCACTCATCAG-3', стойността на термодинамичната стабилност на ACO и секвенцията на рибозимът е **-33.03 kcal/mol**. При

наличие на три мутации в секвенцията 5'-СТАТТТСССАСТСАТСАГ-3', стойността на термодинамичната стабилност на АСО и секвенцията на рибозимът е **-17.43 kcal/mol**. При наличие на четири мутации в секвенцията 5'-СТАТТТСССАСТГАТСАГ-3', стойността на термодинамичната стабилност на АСО и секвенцията на рибозимът е **-11.09 kcal/mol**. При наличие на пет мутации в секвенцията 5'-СТАТТТСССАСТГАТГАГ-3', стойността на термодинамичната стабилност на АСО и секвенцията на рибозимът е **-6.43 kcal/mol**. Това показва, че наличието на мутации в секвенцията на АСО, не показват желанния ефект.

4.6. Експериментално тестване на антисенс олигонуклеотидите за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозим при *Escherichia coli*.

При експерименталното тестване на АСО за стратегията OFF switch контрол на генната експресия с използването на синтетичен хамърдхед рибозим при *Escherichia coli*, установих, че когато има мутации в рибозимът, той не се разделя от таргетната секвенция и секвенцията Шайн-Далгарно се блокира, което води до отсъствие на генна експресия. Съответно когато има див тип рибозим (без хибридизация с АСО), той се разделя от таргетната секвенция, деблокира се секвенцията на Шайн-Далгарно и се наблюдава генна експресия. Многократно извърших анализ на OFF switch контрол на генна експресия. След направата на дизайна, беше извършен бета-галактозидазен анализ с цел количествено определяне на нивото на промоторна активност. Клетките на *E. coli* се остават да прораснат за една нощ в LB среда, която съдържа ампицилин (100 mg/L) и се инкубират на 37°C с разклащане. Пермеабелизиращ разтвор (80 µl) от (100 mM двуосновен натриев фосфат (Na₂HPO₄), 20 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,8 mg/mL СТАВ (хексадецилтриметиламониев бромид), 0,4 mg/mL натриев деоксихолат, 5,4 µL/mL бета-меркаптоетанол) се добавя, след което се измерва абсорбцията при 600 nm (Abs 600). По 20 µl от ON културата се добавя към епруветки, които съдържат пермеабелизиращия разтвор и 600 µl субстратен разтвор, съдържащ ONPG. Времето на добавяне се записва. От всяка проба бяха направени три повторения. След като се получи достатъчно наситен цвят, се добавят 700 µl стоп разтвор (1 M натриев карбонат (Na₂CO₃) и се хомогенизира добре. След това епруветките се центрофугират на пълна скорост за 5-10 минути. Супернатантата се излива в кювети и се

измерва абсорбцията при 420 nm (Abs 420.) Формулата на Miller (Jonoska, Seeman 2001) се използва за изчисляване на единиците на Miller (MU) на ензимната активност:

$$MU = 1000 \times \frac{Abs\ 420}{Abs\ 600 \times V \times T}$$

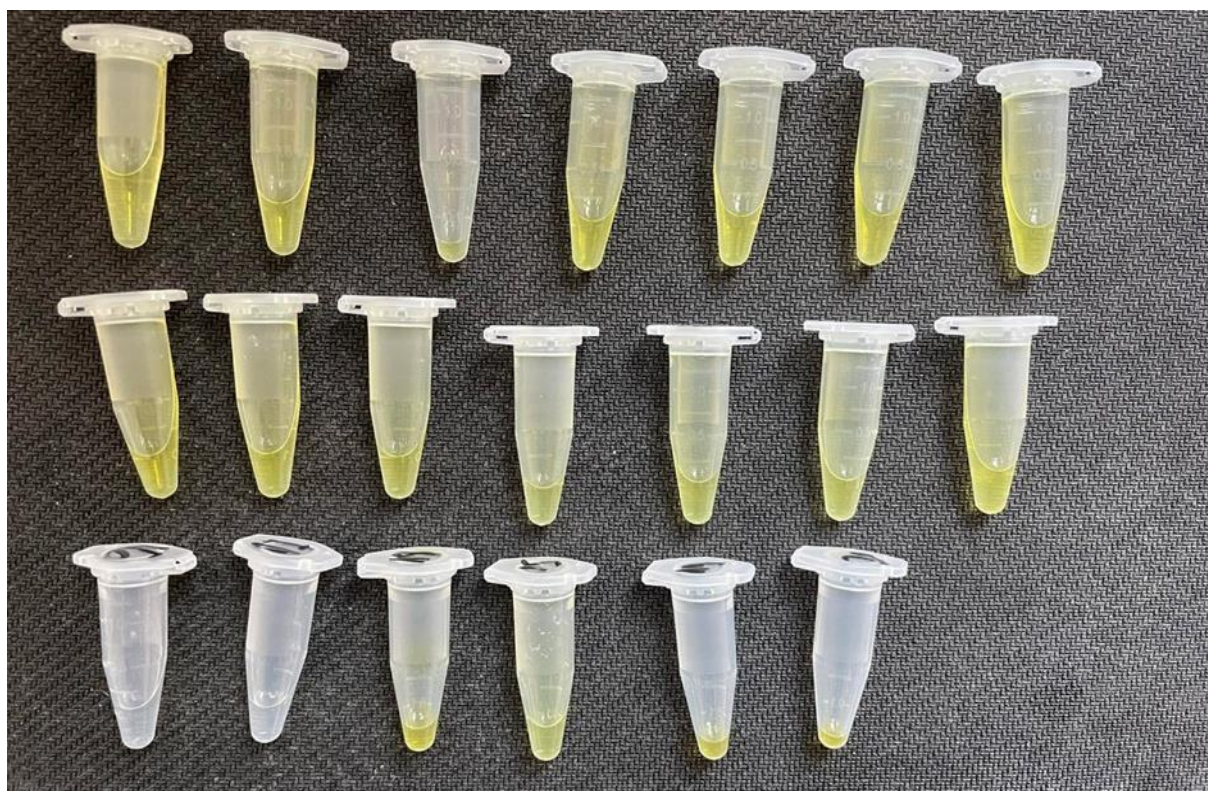
където T е времето на реакция в минути и V е обемът на културата, използван в анализа. Всеки експеримент се утвърждава и средната стойност на A420 се използва за изчисляване на MU за всяка проба.

Бяха тествани 20 проби, 18 от които съдържат само див тип рибозим и 2 проби, съдържащи див тип рибозим, хибридогенезис с АСО. За целта на експеримента бяха заложили и 3 проби, служещи за контроли, които съдържат само бактериална култура. Високи нива на ензимна активност бяха отчетени във всички бета-галактозидазни анализи, с изключение на двете проби (фигура 38), съдържащи рибозим и АСО (таблица 4). Оцветени са в червено на таблица 4. В трите контролни проби се отчита само фонен сигнал. Стойностите на всички измервания са усреднени и са представени на фигура 39.

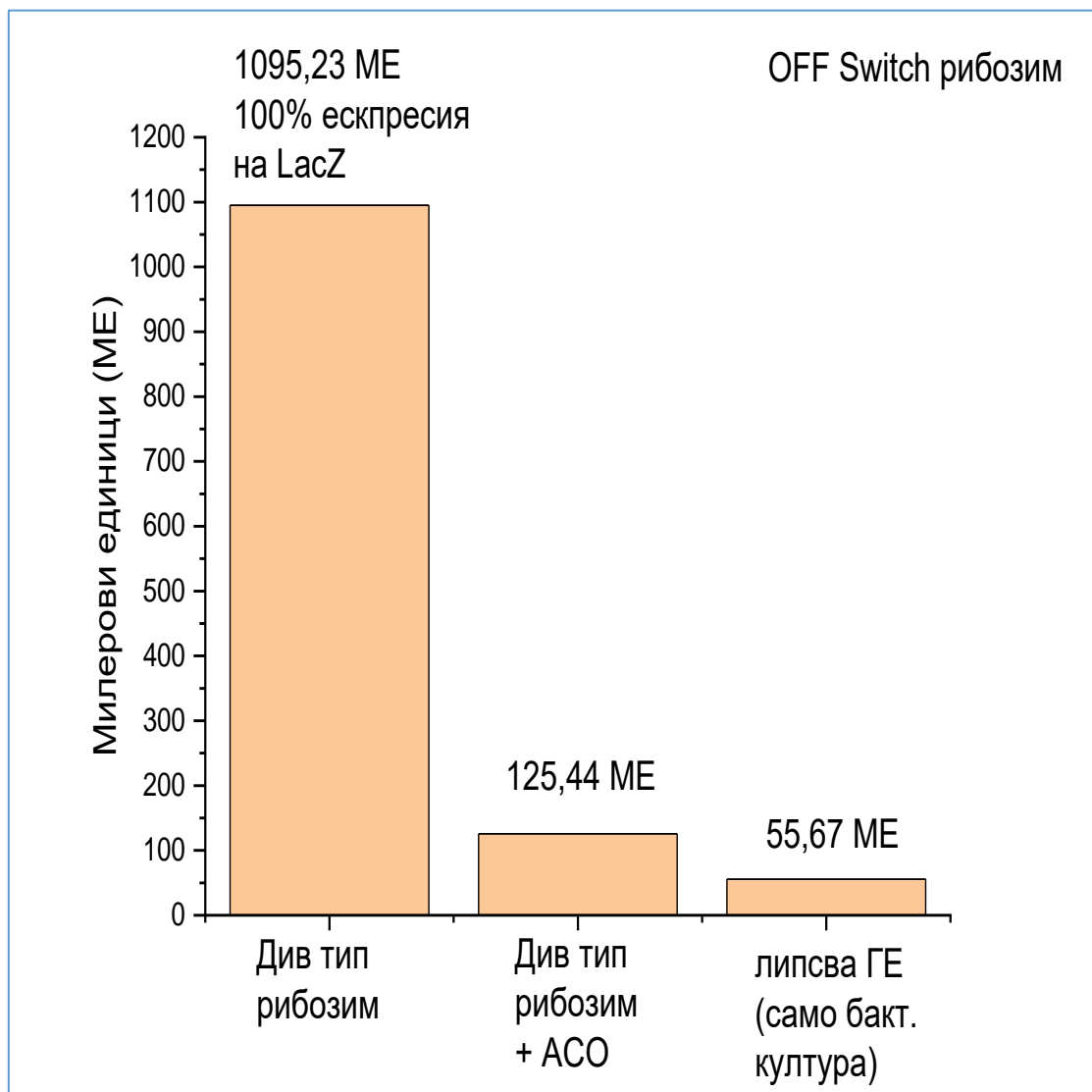
Таблица 4. Резултати от всички Бета-галактозидазни анализи. Бяха направени по три повторения и беше отчетена средна стойност.

| | $\lambda = 600\text{ nm}$ (Abs 600) | $\lambda = 420\text{ nm}$ (Abs 420) | ME |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|---------|
| 1. | 0,315 | 0,520 | 768,09 |
| 2. | 0,287 | 0,660 | 1069,69 |
| 3. | 0,293 | 0,686 | 1090,62 |
| 4. | 0,325 | 0,738 | 1057,30 |
| 5. | 0,295 | 0,716 | 1129,33 |
| 6. | 0,338 | 0,724 | 997,24 |
| 7. | 0,313 | 0,749 | 1114,58 |
| 8. | 0,309 | 0,752 | 1132,53 |
| 9. | 0,324 | 0,715 | 1027,29 |
| 10. | 0,334 | 0,729 | 1025,31 |
| 11. | 0,335 | 0,730 | 1013,88 |

| | | | |
|-----|-------|-------|---------|
| 12. | 0,259 | 0,676 | 1215,82 |
| 13. | 0,290 | 0,700 | 1123,59 |
| 14. | 0,307 | 0,710 | 1075,75 |
| 15. | 0,287 | 0,716 | 1160,45 |
| 16. | 0,285 | 0,075 | 131,58 |
| 17. | 0,273 | 0,068 | 119,30 |
| 18. | 0,298 | 0,800 | 1250 |
| 19. | 0,254 | 0,780 | 1428,57 |
| 20. | 0,342 | 0,760 | 1034,01 |
| 21. | 0,342 | 0,040 | 58,48 |
| 22. | 0,395 | 0,045 | 56,81 |
| 23. | 0,393 | 0,041 | 52,16 |



Фигура 38. Резултати от експериментално тестване на бета-галактозидазна активност.
 Пожълтелите епруветки (18) показват високи нива на бета-галактозидазна активност.
 Безцветните епруветки (2) не показват оцветяване при наличие на див тип рибозим и АСО.



Фигура 39. Резултати от експериментално тестване на бета-галактозидазна активност на на антисенс олигонуклеотидите за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозим при *Escherichia coli*.

Наблюдават се усреднените стойности от бета-галактозидазната активност в Милерови единици на див тип рибозим (1095,23 ME), див тип рибозим с АСО (125,44 ME) и отрицателна контрола (55,67) – само фонов сигнал.

5. ДИСКУСИЯ

Към настоящия момент, РНК синтетичната биология е един от най-сериозно развиващите се дялове на синтетичната биология, благодарение на широко приложимите разнообразни инструменти за РНК инженерство и синтез. Малките РНК-базирани инструменти включват редица алостерични рибозими, молекулярни сензори, антисенс олигонуклеотиди, РНК изчислителни устройства, екзогенни генни контролни елементи и други, чието широко приложението е в областта на медицината и фармацията. Те могат да бъдат използвани като биосензори за скрининг на заболявания, за разработването на терапевтични вещества с подчертан антибиотичен ефект или други с медикаментозен ефект в поддържащите терапии на различни групи социално-значими заболявания. Функционалните нуклеинови киселини предизвикват предварително определени биохимични промени в различните организми и включително при човека. Първото лекарство, базирано на антисенс олигонуклеотидните технологии, бива одобрено през 1998 г. и носи името Фомивирсен (Fomivirsen). Шест години след него се създава и одобрява за приложение аптамер-базираното лекарство Пегаптаниб (Pegaptanib). АСОи имат способността да регулират генната експресия чрез комплементарното си свързване към последователност в рамките на таргетната иРНК. Това се случва по 4 основни механизма – превенция на транслацията, терминация на транскрипция, транс-регулация и саморазкъсване на бактериален рибозим. Поради дълбокото познаване на химизма на нуклеиновите киселини, различни техники биват прилагани за прецизиране и специфичен дизайн с цел синтетичен контрол на генна експресия. Ендогенните и екзогенните нуклеинови киселини са в основата на повечето инфекциозни заболявания, вродени дефекти, свързани с възрастта разстройства, онкологията и автоимунните заболявания. Това разширява възможностите им за приложение.

В настоящата докторска теза бива демонстрирана нова *lacZ* система за РНК синтетични биологични изследвания, която представлява ДНК фрагмент, носещ *KpnI* място, секвенцията Шайн-Далгарно и иницирането на транскрипция със старт АТГ кодон в рамката към *lacZ* гена. Първият фрагмент, въвеждащ *KpnI* мястото в *pRS414* плазмид, използва *BamHI* и *XhoI* рестриктазни сайтове, разположени върху плазмид, а *PL* промоторната последователност от 38 базови двойки е клонирана между *BamHI* и новото *KpnI* рестриктазно място. Новата система се прилага успешно и оказва контрол на генната експресия върху синтетични дизайнерски рибозими и антисенс олигонуклеотиди. Пълната последователност на нашия нов плазмид *pRS414ge*, съдържа *PL* промотора на λ фага има

дължина от 10715 базови двойки. Той представлява уникален инструмент за експерименти като предлага едноетапно клониране на различни алостерични рибозими, секвенцията на Шайн-Далгарно и таргетни домейни за антисенс олигонуклеотиди, заедно с много удобен и точен масив за генна експресия. При дизайна на стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*, проектираният АСО представлява химерен антисенс олигонуклеотид с характеристики, присъщи на първо и второ поколение. Той бива разпознат от РНаза Н ендонуклеаза и последващо хибридизира с нея, а от друга страна бива модифициран, за да има по-голяма стабилност към екзо- и ендонуклеази. При комплементарно хибридиране с целевата секвенция, АСО (5'-C2A2G2G2C1T1C1G1C1A1T1G1G1C1T1C2G2C2C2- 3') и ковалентно прикрепен клетъчно проникващ пептид pVEC (LLIILRRRIRKQAHANHSK, кодиран от H2N-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Lys-Gln-Ala-His-Ala-his-Ser-Lys-OH), осигурява регулацията на генната експресия и инхибира бактериалния растеж. За първи път се наблюдава специфично инхибиране на конкретния ген. За установяването на конкретни стойности и процента на инхибиране на бактериалния растеж на *Escherichia coli* антисенс олигонуклеотида бива тестван трикратно с 9 различни концентрации. Резултатите показват, че с увеличаване концентрацията на АСО, бактериалната преживяемост намалява. При концентрация на АСО от 2238 микрограма/милилитър инхибирането на бактериалния растеж достига почти до 96%. Високата постигната ефективност, предполага последващото широко използване на тези универсални методи за контрол на генна експресия върху всеки един избран ген, който бъде таргетиран. След биоинформатично и геномно проучване към него може да се насочи прецизно създаден химерен АСО, който да осигури превенция на транслацията, терминация на транскрипция, транс-регулация и саморазкъсване на бактериален рибозим.

При дизайна на стратегията за OFF Switch контрол на генна експресия с използването на синтетичен хамърдхед рибозим при *Escherichia coli*, се прилага втори АСО с последователност от 5'-СТАТТТGGGACTCATCAG - 3', към който отново е прикрепен клетъчно проникващ пептид. Образува се химерна молекула, която преминава през клетъчната стена на прокариотни клетки, но също е възможно да проникне и в еукариотни клетки. При анализа на 20 проби, 18 от които съдържат само див тип рибозим и 2 проби, съдържащи див тип рибозим, хибридирирал с АСО се установяват високи нива на ензимна активност във всички бета-галактозидазни анализи, с изключение на двете проби съдържащи рибозим и АСО. Това потвърждава универсалността на метода и възможността той да бъде прилаган в различни бактериални линии с цел регулация на генната експресия.

Когато алостеричният хамърхед рибозим не е свързан с АСО, късането на алостеричния рибозим не се блокира, не се блокира и секвенцията на Шайн-Далгарно, следователно той се къса и се наблюдава генна експресия. Когато алостеричният хамърхед рибозим взаимодейства с АСО между стем I и стем II разкъсването на алостеричния рибозим се блокира, блокира се и секвенцията на Шайн-Далгарно, и съответно не се наблюдава генна експресия. При приложение на Switch системите, контролът на генна експресия е много бърз. Като се вмъкне ефектор, Switch действието се наблюдава веднага.

След като всички задачи бяха извършени, а поставените цели постигнати по отношение на дизайна и приложението на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на генна експресия, се потвърждава уникалността и широката приложимост на методите при прокариоти. А, поради своята универсалност и висока резултативност, успешно разширяват ползите които РНК синтетично-биологичните методи осигуряват. Постигнатото би следвало да бъде разгледано като многоспектърност в процеса по откриване на нови мишени, разработването на лекарства и други терапевтични медикаменти, които чрез регулация на генната експресия да окажат благотворно действие върху социума.

6. ИЗВОДИ

1. Новосъздадената *lacZ* репортерна система може да има приложение в синтетичната биология за контрол на генната експресия при синтетични дизайнерски рибозими и антисенс олигонуклеотиди.
2. Доказано беше, че има високи нива на ензимна активност във всички бета-галактозидазни анализи през трите тествани времеви точки от 15, 20 и 30 минути, съответно. За измерването на 15тата минута бяха получени 774,56 MU. Подобна активност беше получена и при другите времеви точки със 773,99 MU и 763,48 MU съответно от 20 и 30 минути.
3. Беше направен дизайн на стратегия за OFF Switch синтетичен контрол на генна експресия при *Escherichia coli* чрез комбинация от първо и второ поколение АСОи. Беше проектиран АСО с дължина от 19 нуклеотида, който има следната последователност: 5'- CAGGCTCGCATGGCTCGCC- 3'. АСО беше модифициран в средните 11 нуклеотида, за да задейства ензимното разграждане на иРНК и така да се инхибира бактериалния растеж.
4. Чрез 9 различни концентрации на АСО се доказва инхибиращо му действие върху бактериалния растеж. С повишаване на концентрацията на АСО, се понижава процентът на бактериална преживяемост и съответно се повишава процентът на инхибиране на бактериалния растеж. При концентрация на АСО от 2238 микрограма/милилитър инхибирането на бактериалния растеж е 96%.
5. Беше направен дизайн на стратегия за OFF Switch синтетичен контрол на генна експресия с използването на хамърдхед рибозим при *Escherichia coli*. Проектираният АСО е с дължина от 18 нуклеотида и има следната последователност: 5'- СТАТТТGGGACTCATCAG - 3'.
6. При визуализиране на предполагаемата вторична структура на молекулата, беше установено, че при наличието на мутации в секвенцията на АСО, при хибридизация с хамърдхед рибозим, не се наблюдава желания ефект. При наличие на пет мутации в

секвенцията, стойността на термодинамичната стабилност на АСО и секвенцията на рибозимът е -6.43 kcal/mol .

7. ПРИНОСИ

- 1. За първи път е доказано специфично инхибиране на гenna експресия чрез нов универсален метод за контрол на гenna експресия при *Escherichia coli* чрез използването на АСОи.**
- 2. За първи път е доказано експериментално инхибиращото действие на специфични АСОи, хибридизирали с рибозим при *Escherichia coli*. Създадените конструкции представляват универсални методи и могат да се използват за контрол на експресията на всеки ген.**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АСО – антисенс олигонуклеотиди

АСОи – антисенс олигонуклеотиди

ГМО – генетично модифициран организъм

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

иРНК – информационна РНК

инРНК – интерфериращи РНК

КПП – клетъчно проникващ пептид

РНК – рибонуклеинова киселина

ХХР – хамърхед рибозим

BBs – BioBricks

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

СТАВ - Cetyltrimethylammonium Bromide/ хексадецилтриметиламониев бромид

EGS – External guide sequence/ Външно насочени последователности

glmS - глюкозамин-6-фосфат активиращ рибозим

HPC – High performance computing/ висока компютърна производителност

NGS – Next-generation sequencing/ новогенерационно секвениране

PAGE - Polyacrylamide gel electrophoresis/ полиакриламидна гел електрофореза

PCR - Polymerase chain reaction/ полимеразна верижна реакция

SD - Shine–Dalgarno sequence/ Шайн-Далгарно секвенция

SELEX – Систематична еволюция на лиганди чрез експоненциално обогатяване

SNP – single-nucleotide polymorphism

UTR – Untranslated region/ нетранслиран регион

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

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 1. Използвани праймери антисенс олигонуклеотиди.

Таблица 2. Резултати от всички Бета-галактозидазни анализи през трите тествани времеви точки от 15, 20 и 30 минути, съответно. Бяха направени по три повторения и беше отчетена средна стойност.

Таблица 3. 9 различни концентрации на АСО, използвани за установяване на процента на инхибиране на бактериален растеж на *Escherichia coli*.

Таблица 4. Резултати от всички Бета-галактозидазни анализи. Бяха направени по три повторения и беше отчетена средна стойност.

СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ

- Фигура 1.** ДНК фрагмент, показващ мястото на рестриктазите BamHI, KpnI, XhoI, секвенцията на Шайн-Делгарно и АТГ кодона върху плазмид рRS414. С различни цветове са маркирани секвенциите на рестриктази.
- Фигура 2.** Рестрикционно картиране на генерираните клонове от KpnI ендонуклеаза. (1% агарозен гел).
- Фигура 3.** Клонирание на промотора с BamHI и KpnI рестриктазно място. BamHI и KpnI се използват за вкарване на промоторния фрагмент.
- Фигура 4.** Рестрикционно картиране на генерираните клонове от KpnI и BamHI ендонуклеази (1% агарозен гел).
- Фигура 5.** Структура на фрагмента, съдържаща антисенс олионуклеотид, който инхибира бактериалния растеж.
- Фигура 6.** Предполагаема вторична структура на фрагмента, получена чрез RNA fold.
- Фигура 7.** Предполагаема вторичната структура на секвенцията в структурата на целия плазмид, получена чрез RNA fold.
- Фигура 8.** Избраните праймери, получени чрез алгоритъма на BLAST.
- Фигура 9.** Карта на рRS414 плазмид.
- Фигура 10.** Графично изобразяване на бета-галактозидазата ензимната активност през трите тествани времеви точки от 15, 20 и 30 минути.
- Фигура 11.** Резултати от експериментално тестване на бета-галактозидазна активност.
- Фигура 12.** Карта с рестриктазните места на генерирания плазмид рRS414 (10715 kb), включваща рестриктазното място за KpnI и PL промотора.
- Фигура 13.** Сравнение на резултати от петрита, третирани с химическа трансформация и електропорация. При електропорация се визуализират по-добри резултати.
- Фигура 14.** Резултати на петрита след химическа трансформация.
- Фигура 15.** Единични колонии.
- Фигура 16.** Единични колонии.
- Фигура 17.** Секвениране, направено от *Macrogen Europe*.
- Фигура 18.** Секвениране, направено от *Macrogen Europe*.
- Фигура 19.** Секвениране, направено от *Macrogen Europe*.
- Фигура 20.** Резултати от Експресията на LacZ, тествана по скрининг метода на X gal.
- Фигура 21.** Резултати от Експресията на LacZ, тествана по скрининг метода на X gal.
- Фигура 22.** Биоинформатичен анализ със SnapGene.

Фигура 23. Биоинформатичен анализ с ClustalX 32.

Фигура 24. Структура на фрагмента, съдържаща антисенс олионуклеотид, който инхибира бактериалния растеж.

Фигура 25. Схематично изобразяване на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия при *Escherichia coli*.

Фигура 26. При концентрация на АСО от 100 микрограма/милилитър се наблюдава 98,44% експресия на LacZ (502,84 МЕ) и съответно 1,56% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 27. При концентрация на АСО от 200 микрограма/милилитър се наблюдава 90,10% експресия на LacZ (449,19 МЕ) и съответно 9,90% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 28. При концентрация на АСО от 279 микрограма/милилитър се наблюдава 85,50% експресия на LacZ (436,74 МЕ) и съответно 14,5% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 29. При концентрация на АСО от 559 микрограма/милилитър се наблюдава 79,80% експресия на LacZ (407,66 МЕ) и съответно 20,20% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 30. При концентрация на АСО от 840 микрограма/милилитър се наблюдава 68,29% експресия на LacZ (340,40МЕ) и съответно 31,71% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 31. При концентрация на АСО от 1119 микрограма/милилитър се наблюдава 58,45% експресия на LacZ (304,38МЕ) и съответно 41,55% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 32. При концентрация на АСО от 1440 микрограма/милилитър се наблюдава 54,05% експресия на LacZ (269,40 МЕ) и съответно 45,95% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 33. При концентрация на АСО от 1678 микрограма/милилитър се наблюдава 25,24% експресия на LacZ (131,15 МЕ) и съответно 74,76% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 34. При концентрация на АСО от 2238 микрограма/милилитър се наблюдава 4,15% експресия на LacZ (27,33 МЕ) и съответно 95,85% инхибиране на бактериалния растеж.

Фигура 35. Обобщена графика, показваща процента на експресия на LacZ при използване на различна концентрация от антисенс олигонуклеотида.

Фигура 36. Схематично изобразяване на стратегия за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозима при *Escherichia coli*.

Фигура 37. Клониране на алсторейчна рибозима с KpnI и XhoI рестриктазно място.

Фигура 38. Резултати от експериментално тестване на бета-галактозидазна активност.

Фигура 39. Резултати от експериментално тестване на бета-галактозидазна активност на на антисенс олигонуклеотидите за OFF Switch контрол на генна експресия в рибозима при *Escherichia coli*.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Alnasser SM. Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. *Gene* 769, 145246 (2021).
2. Amanat, M., Nemeth, C., Fine, A., et. al. (2022). Antisense Oligonucleotide Therapy for the Nervous System: From Bench to Bedside with Emphasis on Pediatric Neurology. *Pharmaceutics* 2022, 14(11), 2389; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112389>
3. Bajan, S., Hutvagner, G., (2020). RNA-based therapeutics: from antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cells* 9 (1): [//doi.org/10.3390/cells9010137](https://doi.org/10.3390/cells9010137)
4. Bennett, F., Kordasiewicz H., et. al. (2021). Antisense drugs make sense for neurological diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 61:831-852. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023738>
5. Brunner M., H. Bujard (1987) Promoter recognition and promoter strength in the *Escherichia coli* system, *EMBO J.*,6(10), 3139–3144.
6. Buddingh BC, van Hest JCM. Artificial cells: synthetic compartments with life-like functionality and adaptivity. *Acc. Chem. Res.* 50(4), 769–777 (2017).
7. Cantelli CR, Dassonville-Klimpt A, Sonnet P. A review of current and promising nontuberculous mycobacteria antibiotics. *Future Med. Chem.* 13(16), 1367–1395 (2021).
8. Chappell J, Watters KE, Takahashi MK, Lucks JB. A renaissance in RNA synthetic biology: new mechanisms, applications and tools for the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 28, 47–56 (2015).
9. Chen, S., Sbu, N., Veedu, R.N., (2020). Antisense oligonucleotides as potential therapeutics for type 2 diabetes. *Nucleic Acid. Ther.* <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0891>
10. Clark D. P., N. J. Pazdernik, M. R. McGehee (2019) Chapter 16 – Regulation of Transcription in Prokaryotes. In: Clark D. P., Pazdernik N. J., McGehee M. R., editors. *Molecular Biology (Third Edition)*, Academic Cell, 522–559.
11. Deckers M, Deforce D, Fraiture MA, Roosens NHC. Genetically modified microorganisms for industrial food enzyme production: an overview. *Foods* 9(3), 326–346 (2020).
12. Deepika M, Sumathy J. Production of BioBricks using microbes. *Int. J. Curr. Res. Multi. (IJCRM)* 5(1), 13–27 (2020).
13. Evans A. S., C. Pybus, E. J. Hansen (2013) Development of a LacZ-based transcriptional reporter system for use with *Moraxella catarrhalis*, *Plasmid*, 69(2), 180–185, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.11.003>.
14. Ghaemi A, Bagheri E, Abnous K, Taghdisi SM, Ramezani M, Alibolandi M. CRISPR-CAS9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy. *Life Sci.* 267, 118969 (2021).
15. Hartz P, Gehl M, Konig L, Bernhardt R, Hannemann F. Development and application of a highly efficient CRISPR-CAS9 system for genome engineering in *Bacillus megaterium*. *J. Biotechnol.* (2021).
16. Hollywood KA, Schmidt K, Takano E, Breitling R. Metabolomics tools for the synthetic biology of natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 54, 114–120 (2018).
17. Jagadevan S, Banerjee A, Banerjee C et al. Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. *Biotechnology for Biofuels* 11, 185 (2018).
18. Jakhanwal, S., Cress, B.F., Maguin, P., et al., (2021). A CRISPR-Cas9-integrase complex generates precise DNA fragments for genome integration. *Nucleic Acids Res.* 49 (6), 3546-3556. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab123>.

19. Jonoska N., N. C. Seeman (2001) Ohio Library and Information Network. DNA computing: 7th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA 7, Tampa, FL, USA, June 10–13, 2001: revised papers, Lecture notes in computer science, vol. 2340
20. Ju'arez-Rodr'iguez M. D., A. Torres-Escobar, D. R. Demuth (2013) Construction of new cloning, lacZ reporter and scarless–markerless suicide vectors for genetic studies in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Plasmid*, 69(3), 211–222, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.01.002>.
21. Juers D. H., B. W. Matthews, R. E. Huber (2012) LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance, *Protein Sci.*, 21(12), 1792–1807. doi: 10.1002/pro.2165
22. Kaloudas, D., Pavlova, N., Penchovsky, R., (2018). EBWS: essential bioinformatics web services for sequence analyses. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* <https://doi.org/10.1109/TCBB.2018.2816645>
23. Katzmann, J.L., Packard, C.J., Chapman, M.J., et al., (2020). Targeting RNA with antisense oligonucleotides and small interfering RNA: JACC state-of-the-art review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 76 (5), 563-579. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.070>
24. Khetarpal, S.A., Wang, M., Khera, A.V., (2019). Volanesorsen, familial chylomicronemia syndrome, and thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* 381 (26), 2582-2584. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1912350>
25. Kim, T., Lu, T.K., (2019). CRISPR/Cas-based devices for mammalian synthetic biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 52, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.015>
26. Kopka J, Fernie AR. Editorial overview: plant synthetic and systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, viii–xi (2018).
27. Kumar SA, Kumar TDA, Beeraka NM et al. Machine learning and deep learning in data-driven decision making of drug discovery and challenges in high-quality data acquisition in the pharmaceutical industry. *Future Med. Chem.* 14(4), 245–270 (2022).
28. Lee, R.T., Ng, A.S., Ingham, P.W., (2016). Ribozyme mediated gRNA generation for in vitro and in vivo CRISPR/Cas9 mutagenesis. *PLoS One.* 11 (11), e0166020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166020>.
29. Lewandoski M., I. Smith (1988) Use of a versatile lacZ vector to analyze the upstream region of the *Bacillus subtilis* spoOF gene, *Plasmid*, 20(2), 148–154, doi: [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(88\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0147-619X(88)90018-2).
30. Liang Z, Qin Z, Riker AI, Xi Y. CRISPR/CAS9 ablating viral microRNA promotes lytic reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 533(4), 1400–1405 (2020).
31. Lim, K.R.Q., Maruyama, R., Yokota, T., (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug. Des. Devel. Ther.* 11, 533-545. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97635>
32. Liu C. Liability for transboundary damage of genetically modified organisms: existing patterns and application. *Beijing Law Review* 12(1), 11 (2021).
33. Liu D, Pakrasi HB. Exploring native genetic elements as plug-in tools for synthetic biology in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microb. Cell Fact.* 17(1), 48 (2018).
34. MacDonald IC, Deans TL. Tools and applications in synthetic biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105(Pt A), 20–34 (2016).
35. Marchisio, M.A., Huang, Z., (2017). CRISPR-Cas type II-based synthetic biology applications in eukaryotic cells. *RNA Biol.* 14 (10), 1286-1293. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1282024>

36. Martinovich, K.M., Shaw, N.C., Kicic, A., et al., (2018). The potential of antisense oligonucleotide therapies for inherited childhood lung diseases. *Mol. Cell Pediatr.* 5 (1), 3. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40348-018-0081-6>
37. Miloshev, G., Traykovska, M., Dimitrios Kaloudas & Robert Penchovsky (2022) Engineering a Plasmid as a Reporter System for Quantifying Gene Expression in *Escherichia Coli*, *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* 75 (1), 2022
38. Pavlova, N., et al. (2022). "Versatile tools of synthetic biology applied to drug discovery and production." *Future Med Chem* 14(18): 1325-1340.
39. Penchovsky, R., & Breaker, R. R. (2005). Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes. *Nature Biotechnology*, 23(11), 1424–1433. doi:10.1038/nbt1155
40. Penchovsky, R., Birch-Hirschfeld, E., & Mc-Caskill, J. S. (2000). End-specific covalent photodependent immobilisation of synthetic DNA to paramagnetic beads. *Nucleic Acids Research*, 28(22), E98. doi:10.1093/nar/28.22.e98
41. Penchovsky, R., (2012). Engineering gene control circuits with allosteric ribozymes in human cells as a medicine of the future. *Quality Assurance in Healthcare Service Delivery, Nursing and Personalized Medicine: Technologies and Processes*, IGI Global 22. <https://doi.org/10.4018/978-1-61350-120-7.ch005>.
42. Penchovsky R, Stoilova C. (2013) Riboswitch-based antibacterial drug discovery using high-throughput screening methods. *Expert Opin. Drug Discov.* 8(1), 65–82 (2013).
43. Penchovsky, R., (2014). Computational design of allosteric ribozymes as molecular biosensors. *Biotechnol. Adv.* 32 (5), 1015-1027. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.05.005>
44. Penchovsky, R., Traykovska, M., (2015). Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opin. Drug. Discov.* 10 (6), 631-650. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1048219>
45. Popova, K. and Penchovsky, R. (2021). Current Activators of the glmS Riboswitch. *Biomed J Sci & Tech Res* 33(1)-2021. BJSTR. MS.ID.005348.
46. Rinaldi, C., Wood, M.J.A., (2018). Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 14 (1), 9-21, <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
47. S'aenz-Lahoya S., N. Bitarte, B. García, S. Burgui, M. Vergara-Irigaray et al. (2019) Noncontiguous operon is a genetic organization for coordinating bacterial gene expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1733.doi: 10.1073/pnas.1812746116.
48. Schmidt, F., Platt, R.J., (2017). Applications of CRISPR-Cas for synthetic biology and genetic recording. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 5, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.050.008>.
49. Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee SS, Chakraborty C. CRISPR-CAS9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Mol. Ther.* 29(2), 571–586 (2021).
50. Smale S. T. (2010) Beta-galactosidase assay, *Cold Spring Harbor protocols*, 2010(5), pdb.prot5423. doi: 10.1101/pdb.prot5423.
51. Son M. S., D. T. Nguyen, Y. Kang, T. T. Hoang (2008) Engineering of FRT– lacZ fusion constructs: Induction of the *Pseudomonas aeruginosa* fadAB1 operon by medium and long chain-length fatty acids, *Plasmid*, 59(2), 111–118, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2007.12.002>.

52. Staal J, Alci K, Schampelaire WD, Vanhoucke M, Beyaert R. Engineering a minimal cloning vector from a pUC18 plasmid backbone with an extended multiple cloning site. *BioTechniques* 66(6), 254–259 (2019).
53. Stella, S., Alcon, P., Montoya, G., (2017). Class 2 CRISPR-Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (11), 882-892. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3486>
54. Tomich C. S. C., P. S. Kaytes, M. K. Olsen, H. Patel (1988) Use of lacZ expression to monitor transcription, *Plasmid*, 20(2), 167–170, doi: [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(88\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0147-619X(88)90022-4).
55. Traykovska M, Miedema S, Penchovsky R. Clinical trials of functional nucleic acids: antisense oligonucleotides and aptamers. *Int. Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCE)* 7(2), 46–60 (2018).
56. Traykovska, M. and R. Penchovsky (2022). "Engineering Antisense Oligonucleotides as Antibacterial Agents That Target FMN Riboswitches and Inhibit the Growth of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*." *ACS Synth Biol* 11(5): 1845-1855.
57. van der Weyden L, Jonkers J, Adams DJ. The use of CRISPR/CAS9-based gene editing strategies to explore cancer gene function in mice. *Curr. Op. Gen. & Dev.* 66, 57–62 (2021).
58. Valsamatzi-Panagiotou, A., Traykovska, M., Miloshev, G., Penchovsky, R. (2023) Various therapies against SARS-CoV-2, *Acta Microbiologica Bulgarica* Volume 39 / 1 (2023)
59. Valsamatzi-Panagiotou, A., Traykovska, M., Penchovsky, R., (2020). Chapter 2 - Mechanisms of antibacterial drug resistance and approaches to overcome. In: Kesharwani, P., Chopra, S., Dasgupta, A. (Eds.), *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*. Academic Press, pp. 9-37.
60. Zhang, T., Gao, Y., Wang, R., et al., (2017). Production of guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR using ribozymes and RNA polymerase II promoters. *Bio-protocol* 7 (4), e2148. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2148>.

АВТОБИОГРАФИЯ

Лична информация:

Име: Георги Йорданов Милошев

Дата на раждане: 06.05.1994 г.

Адрес: гр. София, ж.к. Манастирски ливади бл. 179А

Телефон: 0898 876 457

Имейл: georgi_miloshev@abv.bg

Трудов опит:

15.09.2019 г. – учител по биология и здравно образование в 125 СУ „Боян Пенев“

01.10.2022 г. - учител по биология и здравно образование в Образователен център "Иновейшън"

03.05.2015-30.08.2020 г. – кредитен консултант в „БНП Париба Лични финанси“

Образование и обучение:

15.07.2019-15.07.2022 г. – редовен докторант по професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма „Генетика – Биоинформатика“ към катедра „Генетика“, СУ "Св. Климент Охридски", със заповед на Ректора проф. дфн Атанас Герджиков с No РД 20-1188/08.07.2019.

2020-2021 - СДК "Учител по биология" - СУ "Св. Климент Охридски"

2017-2019 - Магистър по Генетика и геномика, СУ "Св. Климент Охридски"

2013-2017 - Бакалавър по Молекулярна биология, СУ "Св. Климент Охридски"

Научни публикации:

Small RNA-based systems for sensing and therapeutic applications - Robert Penchovsky, [Georgi Y. Miloshev](#), Nikolett Pavlova, Katya B Popova, Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Lozena A. Otcheva, Traykovska. Martina, *New Frontiers and Applications of Synthetic Biology*, 2022, Paperback ISBN: 9780128244692, eBook ISBN: 9780323859868, p.103-121, втори автор съм

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S978012824469200004X?via%3Dihub>

Engineering a Plasmid as a Reporter System for Quantifying Gene Expression in *Escherichia Coli* - Georgi Y. Miloshev, Martina Traykovska, Dimitrios Kaloudas & Robert Penchovsky, *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* 75 (1), 2022, Q3, IF: 0,326, vol. 75, no. 1, pp. 56–61, ISSN: 13101331, първи автор съм

DOI: <https://doi.org/10.7546/CRABS.2022.01.07>,

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=31728&tip=sid>

<http://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/article/view/7/7>

Versatile tools of synthetic biology applied to drug discovery and production - Nikolet Pavlova, Georgi Y Miloshev, Antoniya V Georgieva, Martina Traykovska & Robert Penchovsky, *Future Medicinal Chemistry* Vol. 14, No. 18 Review 2022, Q2, IF: 4,7 <https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0063>, втори автор съм

<https://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc-2022-0063>

Various therapies against SARS-CoV-2 - Aikaterini Valsamatzi-Panagiotou, Martina Traykovska, Georgi Y. Miloshev, Robert Penchovsky, *Acta Microbiologica Bulgarica* Volume 39 / 1 (2023), Q4, IF: 0,11

<https://actamicrobio.bg/archive/issue-2-2020/amb-2-2020-article-1.pdf>

Участие в проекти:

1. „Дизайн на функционални нуклеинови киселини за синтетична регулация на генната при прокариоти и еукариоти”, КП-06-Н31/18/13.12.2019, финансиран от Фонд „Научни Изследвания“, комисия по Биологически Науки, ръководител на проекта проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски – ОСНОВЕН ПРОЕКТ.

2. „Дизайн и експериментално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти”, ДН13/14/20.12.2017, финансиран от Фонд „Научни Изследвания“, комисия по Медицински Науки, ръководител на проекта проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски.

3. „Създаване на антисенс олигонуклеотиди, които специфично инхибират бактериалния растеж на *Helicobacter pylori* и *Porphyromonas gingivalis*”, КП-06-М33/5/18.12.2019, финансиран от Фонд „Научни Изследвания“, комисия по Медицински Науки, ръководител на проекта гл. ас. д-р Мартина Трайковска

Награди:

24.05.2023 г. - Пластика "Сова" и грамота за **принос към столичното образование**

Награждаваща институция: Регионално управление на образованието - София-град

26.05.2022 г. - **Докторант на годината** за академичната 2021/2022 г.

Награждаваща институция: СУ "Св. Климент Охридски"

24.05.2022 г. - **Учител на годината** за учебната 2021/2022 г.

Награждаваща институция: 125 СУ "Боян Пенев"

Преподавателска дейност:

По време на докторантурата водих практически упражнения по Генетика на студенти от специалности „Биология и химия“, „Биология и английски език“ през академичната 2020/2021 г.

Учител по биология и здравно образование в прогимназиален и гимназиален етап в 125 СУ „Боян Пенев“ от 2019 г. досега.

Подготовка на кандидат-студенти по биология в Образователен център "Иновейшън" от 2022 г. досега.

Доброволческа дейност:

Лидер в Международната Награда на херцога на Единбург от 01.11.2019 г.

Допълнителни обучения и семинари:

Младежки обмен по програмата Еразъм + в Трабзон, Турция в периода 13.08-23.08.2014 г. на тема „Children'SOUL“, включващ 33 младежи от България, Гърция, Литва и Турция.

Студентска практика в реална работна среда в ИБИР-БАН, 240 часа, изработени в периода 01.07-23.09.2014 г. Реализирана по оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013.

Практическо обучение в реална работна среда в ИБИР-БАН, 240 часа, изработени в периода 12.03-08.06.2018 г. Реализирано по оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020.

Преддипломна практика в Генетична лаборатория на САГБАЛ „Д-р Щерев“ в периода 05.07-31.12.2018 г.

Тренировъчен курс по програмата Еразъм + в Нагиборсони, Унгария в периода 06.09-15.09.2019 г. на тема „Beyond fear“, включващ 32 младежи от България, Гърция, Литва, Унгария, Италия, Украйна и Хърватия.

Обучение за лидер в “Международната награда на херцога на Единбург“, 09.11-10.11.2019 г. в София.

Обучение на тема „Обучения на учители по биология и здравно образование, които от учебната 2020/2021 г. ще преподават по учебните програми за профилирана подготовка в XI и XII клас“ по Национална програма „Квалификация“ 2020 г., проведено в НЦПКПС – гр. Баня в периода 20.07-21.07.2020 г.

Обучение на тема “Иновативни методи на преподаване, игра, уеб инструменти“, проведено от Школо в периода 08.09-09.09.2020 г. в 125 СУ “Боян Пенев“.

Обучение на тема „Изграждане на умения за насърчаване на личностното развитие на децата и учениците. Ефективни техники за управление на групата и класа, оценка на резултатите и измерване на постиженията“ – 30.10-01.11.2020 г. в гр. Дупница, Академия за иновативни учители „Има защо!“ – Стратегия ЕООД.

Обучение на тема “Google за образованието“, проведено от ОРАК инженеринг ЕООД, онлайн в периода 27.11-30.11.2020 г.

Обучение на тема „Google chromebook“ – 28.08-29.08.2021 г., проведено в 125 СУ „Боян Пенев“ от Център за творческо обучение на Google.

Обучение на тема „Обучения на учители по биология и здравно образование, които от учебната 2021/2022 г. ще преподават по учебните програми за профилирана подготовка в XII клас“ по Национална програма „Квалификация“ 2020 г., проведено в НЦПКПС – гр. Баня в периода 20.09-21.09.2021 г. и онлайн на 13.11 и 20.11.2021 г.

Курс по “Методика на обучението по БДП в VIII – XII клас“ – Русенски университет „Ангел Кънчев“, завършен на 27.10.2021 г. с продължителност 32 часа.

Обучение на тема „Индивидуален подход при изявени ученици“ – 18.12-19.12.2021 г. – ИМИ към БАН.

Обучение на тема „Екипна работа за педагогически специалисти - развитие на умения за ефективно екипно взаимодействие в училищен екип“, проведено от Школо в периода 16.04-17.04.2022 г. в Боровец.

Преминато обучение по КППР и АВД по проект „Споделена библиотека за животоспасяващи умения“ от фондация „Първите три минути“ – 21.03 (онлайн) и 04.06.2022 г. (присъствено) в гр. София.

Участие в конкурс „Моето работно място“ – БГ наука.

Участие в Национална конференция за иновативно обучение и добри практики в образованието „Училище за бъдеще“ 5.0 – 21.,22.,23.10.2022 г. в Пампорово

Обучение на тема „Устойчивост на стрес и бърнаут“, проведено от Школо в периода 22.04-23.04.2023 г. в гр. Пловдив.

Езици:

Български език – майчин език

Английски език – B2 Certificate

Руски език – основно ниво (писмено и говоримо)

Френски език – основно ниво (писмено и говоримо)