



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ София

Биологически Факултет

**Катедра Генетика**

**Мартина Трайковска**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за придобиване на образователна и  
научна степен „ДОКТОР“**

**Професионално направление 4.3 Биологични науки**

**Генетика – Синтетична Биология**

**на тема:**

**Инженерство на функционални нуклеинови киселини**

**и приложението им в областите на**

**молекулярната генетика и синтетичната биология**

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

**гр. София**

**2017**

Дисертационния труд е обсъден на апробация (разширено заседание) на катедра Генетика към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 28.06.2017 г. и е насрочен за защита пред научно жури, потвърдено със Заповед N<sup>0</sup>.....на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“.

Научни рецензенти:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

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

**Дисертационния труд съдържа:**

Страници: 133; Фигури: 37; Таблици: 7; Цитирания: 146

**Дисертационния труд е базиран на 2 публикации с участието на докторанта с общ импакт фактор от 4, както и двете се реферирани в SCOPUS:**

1. Penchovsky, R. & Traykovska, M. „Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do?” Expert Opinion on Drug Discovery, 10, 631-650 (2015) – Impact factor (IF:3.5)

2. Penchovsky, R. & Traykovska, M. Chapter 12: Synthetic Approaches to Biology: Engineering gene control circuits, synthesizing, and editing genomes, Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering: An Imprint of IGI Global, ISBN13: 9781466698116, 330-360 (2016)

**Участие в конференции:**

Penchovsky, R., Traykovska, M., „Engineering microfluidic and nucleic acid based biosensing devices with versatile applications to modern biotechnology”, International conference: “Bioscience-development and new opportunities, 20-22 ноември, 2013, Международна конференция “Климентови дни“-2013.

## 1. Използвани съкращения

**АСО** – антисенс олигонуклеотид

**АСОи** – антисенс олигонуклеотиди

**АР** – антибиотична резистентност

**АБ** – антибиотик

**АТФ** – аденинтрифосфат

**бд** – базови двойки

**ГИ** – гастроинтестинален тракт

**ГМФ** – гуанинмонофосфат

**ГТФ** – гуанинтрифосфат

**ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина

**ЕДТА** – етилендиаминтетраацетат

**иРНК** – информационна рибонуклеинова киселина

**кДНК** – копи ДНК

**КПП** – клетъчно проникващ пептид

**Kd** – константа на дисоциация

**ЛНА** – затворена нуклеинова киселина

**МИК** – минимална инхибираща концентрация

**МАТ** – метиладенозин трансфераза

**НТР** – нетранслиран район

**ПНК** – пептид нуклеинова киселина

**РНК** – рибонуклеинова киселина

**РСМ** – рибозим свързващо място

**САМ** – С-аденозил метионин

**САХ** – С-аденозил хомоцистеин

**ФМН** – флавин мононуклеотид  
**ФАД** – флавин аденин динуклеотид  
**СРР** – cell penetrating protein (клетъчно проникващ пептид)  
**ЕДС** – 1-Етил-3-(диметиламинопропил)карбодимид  
**GlcN6P** - глюкозамин-6-фосфат  
**glmS** – глюкозамин-6-фосфат активираща рибозима  
**HTS** – методи за скрининг с висока чувствителност  
**MDR** – мултирезистентни бактерии  
**ON** – over night (бактериална култура прорастната през нощта)  
**РТ** – пиритиамин  
**РТПР** – пиритиамин пирофосфат  
**РСR** – полимеразна верижна реакция  
**SD** – Шайн-Далгарно последователности  
**ТРР** – тиамин пирофосфат

## **2. Въведение**

Настоящата докторска дисертация е свързана с наскоро възникнала област в биологията – Синтетичната биология и приложението на нейните методи за създаването на нови антибактериални агенти. Използвайки постиженията на различни клонове на съвременната биология, синтетичната биология търси и изработва начини за създаване и използване на изкуствено получени молекули, които да изпълняват важни регулаторни функции в клетката. Тези синтетични молекули се свързват с различни молекулни мишени в клетката, които могат да се използват за контрол на генната експресия на гени, участващи във важни метаболитни пътища. Например, използването на антисенс олигонуклеотиди (АСОи) за инхибиране на специфични бактериални РНКи дава възможност за създаване на нови антибактериални агенти, които да се ефективни срещу патогенни бактерии с резистентност срещу вече съществуващите антибиотици (Multi Drug Resistant bacteria - MDR). Тази технология дава възможността да се създадат нови антибактериални агенти чрез репрограмиране на специфични биохимични пътища в клетката, при използване на бактериални рибопревключватели като мишени за тези АСОи.

Рибопревключвателите са функционални, некодиращи РНК домени със сложна вторична и третична структура, които са разположени в 5'-нетранслирания район (НТР) на бактериални иРНКи. Тези РНК домени контролират експресията на гени, които имат важна функция за клетъчния метаболизъм. Основните два елемента на рибопревключвателите са ефекторен домен и експресионна платформа. Ефекторният домен има свойството да свързва

специфично малки ефекторни молекули, наричани още и лиганди. Докато експресионната платформа е отговорна за промяната в генната експресия след свързване на съответната ефекторна молекула с аптамерния домен. Този начин на контрол на генната експресия чрез рибопревключватели може да се използва за инхибиране на бактериалния растеж, чрез специфично свързване с АСОи, тъй като по този начин ще се блокира експресията на важни метаболитни пътища в клетката.

Използването на АСО технологията дава възможност за използване на бактериални рибопревключватели като мишени за откриване на нови антибактериални агенти. В основата на тази технология е използването на АСОи, които хибридизират със специфични за бактерията иРНКи, които са отговорни за синтезата на жизнено важни протеини. Самите АСОи съдържат модификации, които ги правят устойчиви към клетъчните нуклеазни ензими. АСОи имат способността да се свързват специфично с бактериални рибопревключватели разположени в 5'-НТР на иРНКи и да потиснат растежа на бактериалните клетки.

Експериментите, описани в настоящата докторска дисертация, убедително доказват инхибирането на бактериалния растеж на три патогенни бактерии при човека: *Listeria monocytogenes*, която е безусловна за човека патогенна бактерия, условните патогенни бактерии *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* и непатогенната бактерия *Bacillus subtilis*. Инхибирането на бактериалния растеж изцяло се дължи на специфичното свързване на АСОи, АСО-1 и АСО-3. АСО-1 е проектиран да се свърже специфично с рибопревключвателя за флавин мононуклеотид (ФМН), докато АСО-3 е проектиран да се

свърже специфично с рибопревключвателя за С-аденозил метионин (SAM-I). Тези рибопревключватели са едни от най-разпространените сред човешките патогенни бактерии (ФМН рибопревключвателя се среща в 30 патогенни за човека бактерии, докато SAM-I се среща в 9 патогенни за човека бактерии). АСОи се свързват с комплементарна последователност от аптамерния домен на съответния рибопревключвател. Използваните от нас АСОи съдържат от първо поколение, при които един от несвързаните кислородни атоми от фосфодиестерната връзка е заменен с атом на сяра (PS-модифицирани) и от второ поколение АСОи, при които съдържат 2'-О-метил (2'-ОМе) и 2'-О-метоксиетил (2'-МОЕ) модификации. АСОи са ковалентно свързани с рVEС клетъчно проникващия пептид (КПП), който подпомага тяхното навлизане в бактериалната клетка. АСО, свързан с рVEС КПП, представлява химерна молекула. След навлизане в клетката, което става с помощта на рVEС КПП, само АСО се свързва специфично с рибопревключвателя. Използваните АСОи ихнибират растежа на по-горе описаните бактерии като имат бактериостатичен ефект. Специфичността на действие на АСОи за инхибиране на бактериалния растеж е доказана, чрез използването на неспецифични АСОи, които нямат съответния рибопревключвател, както и отделни експерименти само с рVEС КПП и само с АСОи.

Определена е минималната ихнибираща концентрация МИК-80 на АСОи, при която се наблюдава 80% инхибиране на бактериалния растеж на експериментално тестваните бактерии. Тази концентрация за ФМН рибопревключвателя е 4,5 µg/ml, докато за SAM-I рибопревключвателя е 4,4 µg/ml. Тези концентрации са в рамките на терапевтичните стойности на вече известни и използвани



антибиотици. При тези концентрации също се наблюдава и минимална токсичност или липса на такава в еукариотни клетки. Проведени се токсикологични експерименти в човешка клетъчна линия от недребноклетъчен рак на белия дроб A549 с МИК-80 концентрации на АСОи. Установено е, че при тези концентрации използваните АСОи нямат токсичен ефект.

До днес, рибопревключватели не са открити в животни и хора. Това ги прави още по-подходящи мишени за създаване на нови антибактериални агенти. Когато се атакува определена иРНК, чрез АСО, който се свързва с определен риборевключвател присъстващ в патогенна бактерия, ще може да се инхибира бактериалния растеж без да се повлияе човешкия метаболизъм.

Познати са 19 класове рибопревключватели, като повечето от тях могат да служат като мишени за създаване на нови антибактериални агенти, тъй като се срещат при болшинството патогенни бактерии и заедно с това са отговорни за синтезата на важни метаболити в бактериалната клетка.

Аз за първи път прилагам АСО технологията за създаване на нови антибактериални агенти, които използват за мишени бактериални рибопревключватели. Моите проучвания върху рибопревключвателите, както биоинформатични, така и лабораторни, показват, че те се подходящи мишени за създаване на нови антибактериални агенти. Това дава надежда в борбата с антибактериалната резистентност при патогенните бактерии, които предизвикват тежки заболявания при човека много, от които могат да имат и летални последици. В този смисъл представената докторска дисертация има не само чисто академична стойност за създаване на

нов метод за доказване на молекулната функция на рибопревключвателите и последствието от тяхното инхибиране *in vivo*, но има и значителни потенциални приложения във фармацевтичната индустрия за създаване на нови антибактериални агенти.

### **3. Цели и задачи**

Целта на настоящата докторска дисертация е използването на бактериални рибопревключватели като мишени за създаване на нови антибактериални агенти чрез използване на методите на Синтетичната биология с използването на антисенс химерни олигонуклеотиди.

Задачи:

1. Биоинформатичен анализ на разпространението на бактериалните рибопревключватели в геномите на човешки патогенни бактерии.
2. Биоинформатичен анализ на биохимични пътища контролирани от рибопревключватели при патогенни за човека бактерии.
3. Избор на два рибопревключватели като подходящи мишени за откриване на нови антибактериални агенти базиран на получените резултати от задача 1 и 2.
4. Дизайн на антисенс олигонуклеотиди, които специфично се свързват с набелязаните антибактериални мишени определени в задача 3 при човешки бактериални патогени.
5. Експериментално тестване на действието на антисенс олигонуклеотидите (получени като резултат от задача 4) в бактериални човешки патогени.
6. Тестване на специфичността и ефективността на действие на антисенс олигонуклеотидите при три основни човешки бактериални патогени – *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia*

*coli* и в непатогенни бактерии като *Bacillus subtilis* използвани в контролни експерименти.

7. Тестване на токсичността на действие на използваните антисенс олигонуклеотиди в човешки клетъчни линии получена от недребно клетъчен рак на белия дроб (A549).

## **4. Материали и методи**

### **4.1 Материали**

Използваните от мен материали за разработването на тази докторска дисертация са:

#### **4.1.1 Използвани база данни**

- Нуклеотидните последователности на ФМН и САМ-I рибопревключвателите при отделните човешки патогенни бактерии са взети от базата данни **Rfam 12.0**, (<http://rfam.xfam.org/>). Тя представлява база данни – колекция от РНК семейства, всяко от които е представено чрез множествоно подравняване на последователности, консенсусни вторични структури и коварианти модели.
- **NCBI data base**, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Базата данни NCBI представлява Национален център за биотехнологична информация, подкрепяща науката и здравето.
- **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**, (<http://www.genome.jp/kegg/>) – KEGG – енциклопедия за гени и геноми. Тя е създадена като източник за разбиране на сложните биохимични процеси протичащи в биологичните системи каквито са клетките, организмите и екосистемите. Аз основно използвах KEGG PATHWAY частта от KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. В

него са маркирани основните ензими и метаболити, които участват в биохимичните реакции на бактериите.

- **ExpASY Bioinformatic Resource Portal**, (<http://www.expasy.org/>). Този портал, позволява достъп до научни бази данни и софтуерни продукти в различните области на науката, включващи протеомика, геномика, биологични системи, популационна генетика, транскриптомика и др. Служи за откриване на поредния номер на ензимите.

#### 4.1.2 Използвани бактериални среди и бактериални щамове

1. Използвани бактериални щамове за целта на експериментите – *E. coli* щам K12, *B. subtilis* щам 168, *S. aureus* щам ATCC 25923 и *L. monocytogenes* щам ATCC 8932.
2. **1 I LB среда** съдържаща: 10 грама Vacto-tryptone (OXOID LP0042, England), 5 грама дрождев екстракт (OXOID LP0021, England) и 10 грама NaCl.

#### 4.1.3 Използвани нуклеинови киселини

1. **АСОи** – всеки проектиран да се свърже с комплементарната аптамерна последователност на съответния рибопревключвател в съответната бактерия и да инхибира бактериалния растеж. Използват се пет различни концентрации на АСОи - 2000 nM; 1000 nM; 700 nM; 350 nM; 150 nM. За всяка концентрация се правят по три повторения за съответната бактерия.

**Таблица 1.**

последователност на АСО-1 за ФМН	5'-T <sub>1</sub> T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> A <sub>1</sub> C <sub>1</sub> T <sub>1</sub> -3'
последователност на АСО-2 за ФМН	5'-A <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> C <sub>1</sub> T <sub>1</sub> -3'

последователност на ФМН аптамерния домен	5'-AGUCUGGAUGGGAGAA-3'
последователност на АСО-3 за САМ-I	5'-T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>1</sub> T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> -3'
последователност на САМ-I аптамерния домен	5'-GAGUGGUGGAGGGA-3'

## 2. Използвани ДНК последователности

Използваните праймери са в концентрация от 0,2 pmol и се пречистени чрез HPLC (high-performance liquid chromatography) от фирмата Integrated DNA Technologies, United States.

**Таблица 2.**

праймери за ФМН		Температура на топене
прав праймер (19 нуклеотида)	5'-AAATTCATCTTCGGGGTCG-3'	49.5°C
обратен праймер (23 нуклеотида)	5'-CATACTTATTGTGATAAGACGTT-3'	48.4°C
праймери за САМ-I		
прав праймер (20 нуклеотида)	5'-ATCCTGAGTGGTGGAGGGAC-3'	58.5°C
обратен праймер (20 нуклеотида)	5'-ACGGTTTGGCACCTTTCTTT-3'	55.4°C

## 4.1 Методи

Използваните от мен методи за разработването на тази докторска дисертация са:

### 4.2.1 Използвани софтуерни програми

- **BLAST алгоритъм за търсене**, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Basic Local Alignment Search Tool открива локални региони на подобност между последователностите. Програмата сравнява нуклеотидни или последователности на протеини с последователности от бази данни и изчислява статистическите прилики. Той може да се използва още и за откриване на еволюционни връзки между последователностите и по този начин да помага идентифицирането на членове от генни семейства.
- **Clustal W/Clustal X**, (<http://www.clustal.org/>) – Clustal X е интерфейс за Windows на Clustal W multiple sequence alignment program (програма за множествено подравняване на последователности). Той работи със последователности. Те могат да бъдат предварително написани на Notepad++ и записани във fasta-format файл и непосредствено след това да се използват от програмата ClustalX (2.0). Последователностите се вкарват чрез FILE менюто. Всичките последователности трябва да се включат в един файл под формата на fasta-format. Не трябва да има празни пространства между буквите от последователностите. С помощта на опцията Multiple alignment може да се направи множествено подравняване на последователностите от fasta-file. По този начин, чрез оцветяване на еднаквите нуклеотиди в един цвят се вижда подравняването между анализирани последователности.

- **Vienna RNAfold web server**, (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Този интернет сървър дава предположение за вторичните структури на едноверижни РНК и ДНК последователности. Дължината на последователностите не трябва да е повече от 7500 нуклеотида за статистическа функция (partition function) и до 10 000 нуклеотида за минимална свободна енергия.

#### 4.2.2 Използвани протоколи

1. **QIAGEN, QIAprep Spin Miniprep kit** (Basel, Switzerland) – кит за изолиране на тотална РНК от *S. aureus*. Тоталната РНК е изолирана както е описано в упътванията на производителя.
2. **Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA purification kit** (NYSE: TMO, USA) - кит за изолиране на геномна ДНК от *S. aureus*. Геномната ДНК е изолирана както е описано в упътванията от производителя.
3. **Хидролизиране на ДНК с ензима дезоксирибонуклеаза I (DNase I)**, (EURx Ltd. Poland) – изолираната РНК се третира с ензима DNase I с цел премахване на наличието на двойно верижна ДНК. Пробите съдържащи 3 µl изолирана РНК; 1 µl реакционен буфер; 1 µl DNase I ензима и 5 µl вода се нагряват до 37°C за 2 часа с цел хидролизиране на ДНК. Реакцията се спира чрез нагряване на пробите на 65°C за 10 минути в присъствие на ЕДТА, което води до инактивиране на ензима DNase I.
4. **PCR реакции** – използва се стандартен PCR протокол - 10 x Taq буфер; 10mM смес от dNTPs; 0,1 - 1µM прав и обратен праймер за съответния рибопревключвател (ФМН и SAM); 25mM MgCl<sub>2</sub>; 10pg - 1µg матрична ДНК; 1,25u Taq полимеразен ензим; стерилна вода. Условиата, при които се провеждат PCR реакциите са: heated LTD 112°C, свързване при 95°C за 15 минути, брой цикли Т 31,

денатурация при 95°C за 1 минута, градиент при 55°C за 1,5 минути, свързване при 72°C за 1 свързване при 72°C за 1 минута. Пробите се пускат на 2% агарозен гел за 45 минути. Слага се и 1000 бд ДНК стълба за определяне на дължината на амплифицирания продукт.

**5. Преципитация на PCR пробите** – към пробите се добавя 3,3 М натриев ацетат и три обема абсолютен изстуден етанол. Пробите се слагат на -80°C за 10 минути, след което се центрофугират в предварително изстудена центрофуга на 4°C за 20 минути. Пробите се центрофугират при 4000 RPM. След центрофугиране се излива супернатантата, а на дъното на епендорфката остава амплифицирания продукт. Прави се промивка с 70% етанол и след това пробите се разтварят в 10 µl стерилна вода. Пробите се нанасят на 2% агарозен гел.

**6. Пептидна конюгация на pVEC КПП с (PS) тиол-модифицираните АСОи, чрез EDC свързващ реагент**

1. В първата реакция, PS-модифицирания АСО реагира с EMCH (N-ε-maleimidocaproic acid hydrazide TFA) и в резултат се образува АСО-хидразид, като продукт от реакцията.
2. Във втората реакция, EDC (carbodiimide crosslinker) свързващ агент, реагира с карбоксилната група на пептида, за да се образува междинно съединение, пептид-ацилсуреа реактивен естер. Аминно групата на съединението АСО-хидразид, което се образува в първата реакция реагира с карбоксилната група на пептида, като измества пептид-ацилсуреа реактивния естер, се получава ковалентно свързване на пептида с PS-модифицирания АСО и се освобождава исоуреа.



**7. Тестване токсичността на използваните АСО в човешки клетъчни линии:**

1. Използва се човешка клетъчна линия, получена от недребноклетъчен рак на белия дроб (A549), която е култивирана като монослойна култура в хранителна среда D-MEM, към която са добавени антибиотиците пеницилин (100 U/ml) и стрептомицин (100 µg/ml), а също и 10% фетален телешки серум.
2. Клетките са преброени с електронен брояч (Invitrogen™, Countes™, Automated Cell Counter), съгласно инструкциите на Фирмата-производител като е използван разтвор на трипаново синьо (0.2 % разтвор във фосфатно-солеви буфер, PBS), който е прибавян към клетъчната суспензия в съотношение 1:1 (vol : vol) непосредствено преди отчитането на резултата.
3. На 2 август 2016г. са посетили клетките от линия A549 в 96- ямкова плака (по 100 000 в ямка) и на 24ия час от култивирането им, при експоненциална фаза на растеж на клетките, към културалната среда са добавени 4 антисенс олигонуклеотиди с номера 1,2,3 и 4. С 1 и 2 са третирани 2 ямки, а с 3 и 4 - 4 ямки. 8 на брой ямки служат за контрола и те не са третирани с антисенс олигонуклеотидите.
4. Клетъчната преживяемост е отчетена на 48-ят час от третирането на клетките (5 август) с изследваните олигонуклеотиди чрез т.нар. МТТ тест. Той е проведен, както е описано от Mosmann (1983). За целта беше приготвен разтвор (5 mg/mL) на тиазол блу тетразолиум бромид (thiazolyl blue tetrazolium bromide) в стерилен PBS с pH 7.2, който до провеждането на експеримента беше съхраняван при -20°C. От него беше приготвян ex tempore работен разтвор, съдържащ 1 част изходен разтвор и 9 части среда без серум (vol : vol). След

внимателно изсмукване на културалната среда, към всяка ямка бяха добавяни по 100  $\mu\text{L}$  работен разтвор на тиазол блу тетразолиум бромид. Последва инкубация в продължение на 3 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> с внимателно отстраняване на разтвора от плаката. Към всяка ямка бяха добавени по 100  $\mu\text{L}$  разтвор, съдържащ смес от DMSO и абсолютен етилов алкохол (1 : 1, vol. : vol).

5. Резултатите са отчетени чрез измерване на екстинкцията с помощта на ELISA – reader (TECAN, SunriseTM, Grodig/Salzburg, Austria) при дължина на вълната  $\lambda = 540/620 \text{ nm}$ .

#### **8. Протокол за синхронизиране на бактериалната култура**

Клетките бяха взети от глицеролни култури и култивирани ON на 37°C за *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *E. coli*, а *B. subtilis* на 30°C с аерация до достигане на оптическа плътност от 0,7 (OD600 nm), което съответства на средната експоненциална фаза на растеж. След това бактериалните клетки бяха разреждени с LB среда 1:1000. След разреждане в предварително стерилизирани кювети се залагат контроли, които съдържат разредените бактериални клетки, стерилна вода и MgCl<sub>2</sub> (подпомага бактериалния растеж), както отделно и проби съдържащи съответния ACO за съответния рибопревключвател. Както за контролите, така и за пробите се правят по три измервания като на края се смята средната аритметична стойност от трите измервания както за контролите, така и за пробите. Оптическата плътност се измерва на всеки половин час в продължение на осем часа. Действието на ACO се определя като зависимост от времето и оптическата плътност на бактериалните клетки.

## **5. Резултати**

### **5.1 ФМН рибопревключвател**

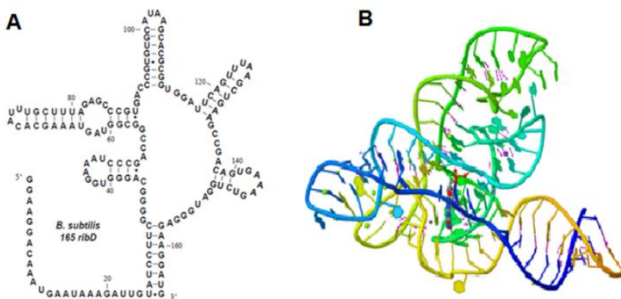
Пълното наименование на рибопревключвателя за ФМН е флавин мононуклеотиден рибопревключвател. В научната литература се среща още и като флавинов рибопревключвател и РФН елемент <sup>1, 2</sup>. Неговата последователност представлява високо консервативна РНК, която се открива в 5'-НТР на прокариотни иРНКи, отговорни за синтеза на флавиномононуклеотид и един протеин, отговорен за неговия транспорт. Този елемент е метаболит-зависим рибопревключвател, който директно свързва флавиномононуклеотид (ФМН) в отсъствието на белтъци. Той е един от най-разпространените при бактериите, срещащ се в над 3000 бактерии<sup>3</sup>.

Рибофлавинът, познат още като витамин В<sub>2</sub>, е изключително важен участник в метаболизма на много организми. Той е прекурсор на коензимите флавин-аденин динуклеотид (ФАД) и ФМН<sup>4</sup>. Повечето микроорганизми, растения и гъби са способни да го синтезират сами, но при гръбначните животни това не е възможно.

Ролята на флавиновите ензими в обмяната на веществата е изключително голяма и разнообразна. Те вземат участие в окислението на мастните киселини до ацетил-КоА в окислителното декарбоксилиране на пирогроздената и алфа-кетоглутаровата киселини (липоатдеhidрогеназа), окислението на янтарната киселина в цикъла на Кребс (сукцинилхидрогеназа), в окислителното фосфолиране - на стадия на пренос на електроните и протоните от никотинамидните коферменти към цитохром С (НАД-Н-цитохром с-редуктаза), по този начин играе ключова роля в процесите на

биологичното окисление и енергообразуване. Поради всичко това флавинът е жизнено важен метаболит при бактерии и еукариоти.<sup>5</sup>

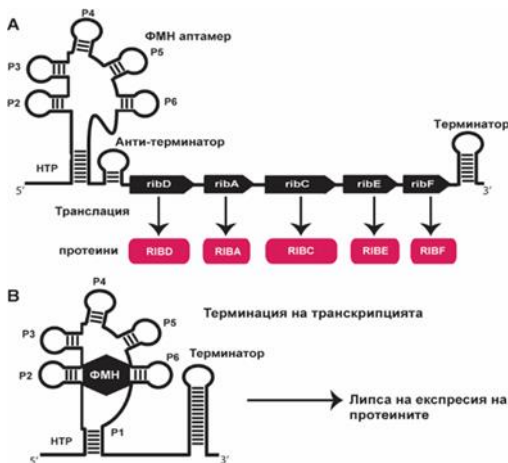
Структурата на флавиновия рибопревключвател съдържа шест стема, които формират пеперудо-подобна структура, прикрепена заедно чрез срещуположно насочени и идентично сгнати периферни области (Фигура 1А).<sup>6</sup> ФМН е разположен асиметрично в свързващия сайт и специфично се свързва с РНК чрез взаимодействия с хромофорният и изоалоксазиновият пръстен и  $Mg^{2+}$  - опосредствани контакти с фосфатен остатък. ФМН е показан в червено (Фигура 1В).<sup>7</sup>



**Фигура 1. Структура на ФМН рибопревключвател.** (А) Структурен модел на консервативната последователност на ФМН рибопревключвателя при *B. subtilis*. Той е изграден от шест стемови лупа, а със символите “А”, “U”, “С”, “G”, са отбелязани пуриновите и пиримидиновите бази - аденин, урацил, цитозин и гуанин, участващи в структурата му. (В) Третична структура на ФМН рибопревключвателя, свързващ ФМН.

ФМН рибопревключвателят регулира генната експресия чрез терминация на транскрипцията или чрез превенция на транслацията в различни гени. При *ribD* оперона, който кодира полицистронна иРНК отговорна за експресия на ензимите участващи в синтезата на рибофлавин, генната експресия се контролира чрез терминация на транскрипцията<sup>8</sup>. В отсъствие на ФМН, *ribD* оперона изцяло се

транскрибира и всичките пет ензима се синтезират (Фигура 2А). В този случай, ФМН аптамера не е изцяло структуриран и се образува малък анти-терминаторен ствол (Фигура 2А). Но когато рибопревключвателя се свърже с ФМН, образува се ствол терминиращ транскрипцията, който спира транскрипцията на *ribD* иРНК, преди да бъде синтезирана кодиращата част (Фигура 2В).

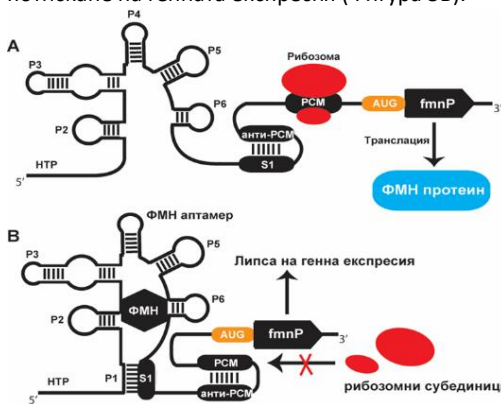


**Фигура 2. Регулация на генната експресия чрез терминацията на транскрипцията с помощта на ФМН рибопревключвателя.**  
ФМН

рибопревключвателя е локализиран в 5'-НТР на полицистронната иРНК, която кодира пет протеина

отговорни за био синтеза на ФМН в бактериалните клетки. (А) В отсъствие на ФМН, аптамера се нагъва в структура, която позволява образуването на анти-терминатор и в същото време изключва образуването на терминатор близо 5'-НТР. В резултат се транскрибира цялата полицистронна иРНК в пет протеина, които участват в синтеза на ФМН. (В) В присъствие на ФМН, аптамера се нагъва в структура, която улеснява образуването на терминатор в 5'-НТР. Следователно транскрипцията на полицистронната иРНК се терминира предварително. В резултат на това в клетката липсва синтеза на протеините нужни за биосинтез на ФМН.

Вторият вариант на генна регулация включва модулация на инициацията на процеса трансляция – т.е превенция на трансляцията<sup>9</sup>. Този начин на контрол е доста по-рядко разпространен и включва промяна на достъпа до Шайн-Делгарно (SD), последователността. В отсъствие на ФМН, рибозим-свързващото място - РСМ на ураА иРНК е достъпно за свързване на 30S рибозомните субединици. В резултат, рибофлавиновия транспортерен протеин се синтезира (Фигура 3А). В присъствието на ФМН, свързването му успява да блокира мястото за свързване на малката рибозомна субединица, а това води до потискане на генната експресия (Фигура 3В).



**Фигура 3. Регулация на генната експресия чрез превенция на трансляцията с помощта на ФМН рибопревключвателя.**

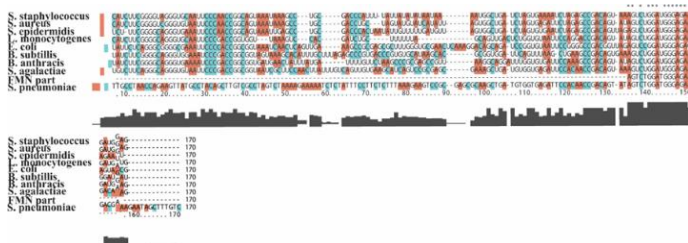
(А) В отсъствие на ФМН, РСМ е едно верижно и достъпно рибозомална субединица да се свърже с иРНК и да иницира трансляцията на *fmnP* протеина. (В) Когато ФМН е достъпен в клетката, свързва се с аптамера, което води до конформационна промяна и дава възможност на РСМ да хибридува с анти – РСМ последователността. Това прави РСМ недостъпно за малката рибозомна субединица. В резултат иРНК не може да се транслира.

### 5.1.1 Човешки патогенни бактерии, в които се открива ФМН рибопревключвателя

Флавиновият рибопревключвател е един от най-разпространените рибопревключватели при бактериите. В Rfam базата данни ФМН рибопревключвателят се открива при 3098 вида организми – бактерии и неклассифицирани видове от царството Археа. От тях 30 са патогенни за човека бактерии. Тези резултати се получени чрез биоинформатично търсене на последователности в Rfam базата данни. Той се среща както и при Грам-положителни, така и при Грам-отрицателни бактерии. Патогенните бактерии, в които присъства са: *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Francisella tularensis*, *Salmonella typhi*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*.

На Фигура 4 е показано множественото подравняване на последователността на аптамерната част на ФМН рибопревключвателя при 9 бактерии, 8 от които са патогенни. Тези бактерии включват 3 представители на семейство *Staphylococcaceae*, 2 представители на семейство *Streptococcaceae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis* и *Escherichia coli*. Те включват, както и Грам-положителни така и Грам-отрицателни бактерии. От Фигура 4 се вижда, че аз съм избрала

консервативен регион от аптамерната последователност, който се среща при всички 9 бактерии. Освен това избраният таргетен регион на ФМН рибопревключвателя е несдвоен, както е видно от Фигура 1А. Това го прави особено подходяща мишена за хибридизация с АСО.



**Фигура 4.** Множествено подравняване на секвенциите на аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя. Съпадението на базите между различните секвенции е показано в еднакъв цвят.

### 5.1.2 Биологичен път на синтез на ФМН под контрол на ФМН рибопревключвателя

ФМН и ФАД са жизнено важни метаболити за бактериалните клетки. Те участват в редокс-системите и процесите, които включват метаболизма на мазнините, кетоните и редукцията на метхемоглобин при еукариоти.

Оперонът *ribD* кодира пет гена (*ribD*, *ribA*, *ribE*, *ribC*, *ribF*) за синтезата на пет ензима от биохимичния път за синтезата на ФМН (Фигура 5)<sup>10</sup>.

Синтезирането на ФМН е част от пуриновия метаболизъм и глюкозния метаболизъм и пентозофосфатния път (ПФП) (pentose and glucose derogatory transformations). То започва с превръщането на гуанинтрифосфат (ГТФ) (guanine three phosphate-GTF) в присъствието на три молекули вода до 2,5-диамино-6-(5-фосфо-D-рибозиламино)-пиримидин-4(3Н)-он (2,5-diamino-6-(5phospho-D-ribosylamin)-



pyrimidine-4(3H)-on) под контрола на ензима ГТФ циклохидролаза, който се кодира от *ribA* гена, който пък е част от *ribD* оперона.

Втората реакция се осъществява под контрола на диаминохидроксифосфорибозиламинопиримидин деаминазата, която се кодира от *ribD* гена, който е част от *ribD* оперона. Тя представлява превръщане на 2,5-диамино-6-(5-фосфо-D-рибозиламино)-пиримидин-4(3H)-он ((2,5-diamino-6-(5phospho-D-ribosylamin)-pyrimidine-4(3H)-on) в 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибозиламино) урацил ((5-amino-6-(5-phospho-D-amino ribosyl) uracil), при което се отделя амоняк (Фигура 5).

Третата реакция също е под контрола на *ribD* гена. Тя се катализира от ензима 5-амино-6-(5-фосфорибозиламино) урацил редуктаза, който се кодира от *ribD* гена, който е част от *ribD* оперона. Съединението, което се получава е 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибитиламино) урацил (5-amino-6-(5-phospho-D-amino ribityl) uracil) (Фигура 5).

Четвъртата реакция от биохимичния път на синтез на ФМН е реакцията, при която от 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибитиламино) урацил (5-amino-6-(5-phospho-D-amino ribosyl) uracil) се получава 5-амино-6-рибитил-аминоурацил (5-amino-6-ribityl amino uracil). Тя се осъществява с помощта на ензими от класа на фосфатазите и по-точно: 5-амино-6-(5-фосфо-D-рибитиламино) урацил фосфатаза. Полученият при четвъртата реакция метаболит служи за субстрат за получаване на 6,7-диметил-8 (1-D-рибитил) лумазин ((6,7-dimethyl-8 (1-D-ribityl) lumazine) в петата реакция от синтезата на ФМН. Реакцията се осъществява благодарение на кодирания от *ribE* ензим – 6,7-диметил-8-рибитиллумазин синтаза (Фигура 5).

Съединението 6,7-диметил-8(1-D-рибитил) лумазин (6,7-dimethyl-8(1-D-ribityl) lumazine)) се получава още от 1-деокси-L-глицеро-тетрулозо-4-фосфат, част от ПФП. До 1-деокси-L-глицеро-тетрулозо-4-фосфат се достига от D-рибулозо-5-фосфат (D-ribulose-5-phosphate) и ензима 3,4-дихидрокси-2-бутанон 4-фосфат синтаза, която се кодира от *ribE* гена (Фигура 5).

Шестата реакция от биохимичния път за синтезата на ФМН е под контрола на *ribC* гена и се осъществява с помощта на ензимът рибофлавин синтетеза, която се кодира от *ribC* гена (Фигура 5). В резултат на неговото действие от 6,7-диметил-8(1-D-рибитил) лумазин ((6,7-dimethyl 8(1-D-ribityl) lumazine) се получава рибофлавин (riboflavin). От рибофлавин лесно може да се получи рибитол (ribitol), който след това влиза в цикъла на пентозо- и глюкозните превръщанията. Флавин редуктазата е ензим, който катализира следната химична реакция:

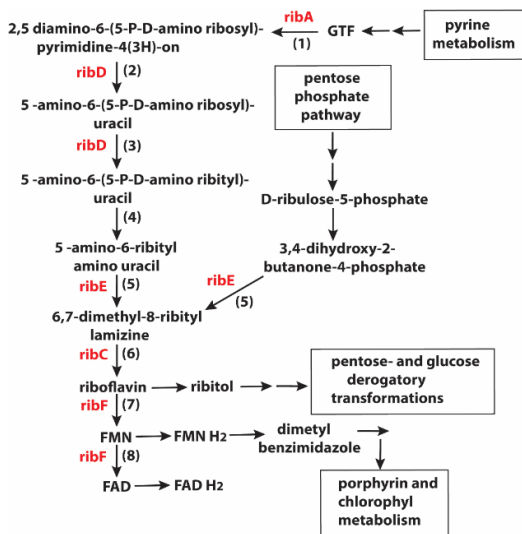


Ензимът се открива при много организми - животни и бактерии. Бактериите окисляват редуцирания флавин мононуклеотид до окислен ФМН и го пренасят чрез свободна фузия и генерира светлина. При хора, флавиновата редуктаза често катализира НАДФН-зависимата редукция на флавин мононуклеотид, който участва в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

От рибофлавин, обаче, под въздействието на ензима рибофлавин киназа кодиран от *ribF* гена, се синтезира ФМН (Фигура 5). Полученият ФМН може да се превърне лесно и бързо в ФМНН<sub>2</sub>, а от него да се получи диметил бензимидазол (dimethyl benzimidazole). Тези два

метаболита са част от порфириновия метаболизъм и метаболизма на хлорофила.

ФМН може да се превърне и във ФАД под въздействието на ензима ФМН аденилилтрансфераза. Той също се кодира от гена *ribF*. Както и *ribD*, така и *ribF* гена кодира ензим с двойна функция. ФАД бърза се превръща във ФАДН<sub>2</sub>. Той също участва в порфириновия метаболизъм и метаболизма на хлорофила (porphyrin and chlorophyll metabolism) (Фигура 5).



**Фигура 5.**  
**Биохимичен път за синтезата на ФМН и рибофлавин при бактерии.**

Синтезата на ФМН е част от пуриновия метаболизъм, глюкозния метаболизъм и пентозо-фосфатния път.

### 5.1.3 Дизайн на антисенс олигонуклеотиди

При дизайн на АСО-1, който се свързва с комплементарна последователност от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя с цел инхибиране на бактериалния растеж, аз съм използвала комбинация от първо и второ поколение АСОи. Проектирания АСО-1 е с дължина от 16 нуклеотида, който има следната последователност -

5'-TTCTCCCATCCAGACT. За да може да се разпознае от RNase H ендонуклеазата и тя да задейства ензимното разграждане на иРНК и с това да се инхибира бактериалния растеж, АСО-1 е РS-модифициран в средните 10 нуклеотида. При тези модификации един от кислородните атома на фосфодиестерната връзка се замества с атом на сяра. Тези модификации са характерни за първо поколение АСО. Те дават възможност за функционирането на RNase H, за разлика от второ и трето поколение АСОи. Заедно с това, модификациите от второ поколение повишават стабилността на АСО-1 срещу ендо и екзонуклеазните ензими. Такива модификации включват 2'-О-метил (2'-МЕ) и 2'-О-метоксиетил (2'-ОМЕ). С тази модификация са модифицирани крайните нуклеотиди от 5' и 3' края на АСО-1. Последователността на АСО-1 със всичките модификации е 5'-T<sub>1</sub>T<sub>1</sub>C<sub>1</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>1</sub>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub> (Фигура 6).

АСО-1 е ковалентно свързан с рVЕС клетъчно проникващия пептид (КПП) – cell-penetrating peptide (CPP). Заедно те представляват една химерна молекула. рVЕС КПП притежава способността да преминава през клетъчната стена, както при прокариоти така и при еукариоти. рVЕС КПП не е токсичен сам по себеси както за бактерии така и за еукариотни клетки в концентрациите, които съм го използвала. Той навлиза през клетъчната стена, чрез температуро-независим и рецепторо-независим механизъм. рVЕС КПП се характеризира със следната последователност H<sub>2</sub>N-KSKAHNAQKRIRRRRIILL. рVЕС е пептид съставен от 17 аминокиселинни остатъци, като N-краят е хидрофобен, средната част е положително заредена, тъй като е богата на Arg, а C-краят е хидрофилен. След навлизане в бактерията само антисенс олигонуклеотидната секвенция хибридира с комплементарната

аптамерна секвенция от рибопревключвателя и функцията на рVEC КПП не е необходима.

#### **5.1.4 Използване на ФМН рибопревключвателя като мишена за откриване на нови антибиотици**

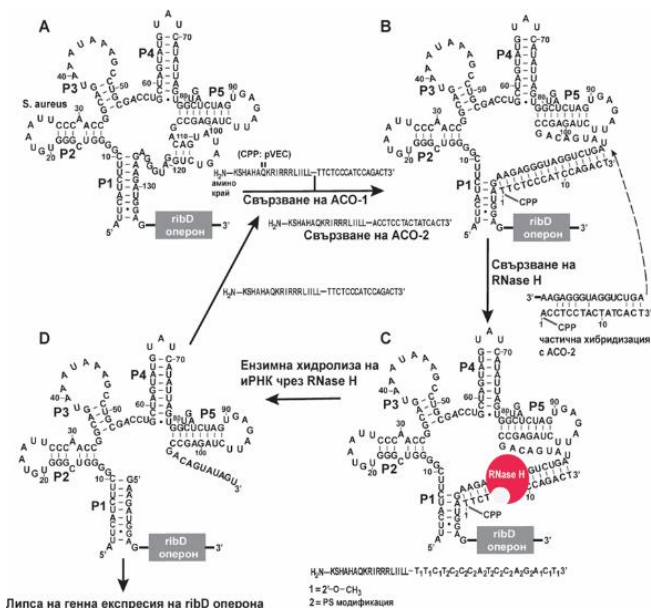
Тъй като, една основна част от биохимичните реакции, включени в синтеза на флавина се контролират от рибопревключватели за ФМН, именно те могат да бъдат използвани като мишени с цел блокиране синтеза на ФМН. Освен това, синтезът на ФМН е изключително праволинеен каскаден процес, в който отсъстват много допълнително разклонени реакции. Това е изключително благоприятно, защото реакциите са взаимосвързани една с друга и при блокирането само на една, синтезът на всички следващи метаболити ще бъде преустановен.

При блокирането на експресията на *ribD* оперона в бактериални клетки на *S. aureus* чрез АСО-1, се осъществява контрол на синтеза на ФМН чрез ФМН рибопревключвателя, тъй като този оперон се намира под негов контрол (виж раздел 5.Резултати, точка 5.1.2, Фигура 5).

Както беше описано в предишната точка, АСО-1 е със следващата последователност 5'-TTCTCCCATCCAGACT. Тъй като АСО-1 е ковалентно свързано с рVEC КПП, цялостната последователност ще е H<sub>2</sub>N-KSKANAQKRIRRRRIILL -TTCTCCCATCCAGACT-3' (Фигура 6А).

При навлизане на АСО-1 в бактериалната клетка с помощта на рVEC КПП, само АСО-1 хибридизира с комплементарна част от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя (Фигура 6В). Образува се двойно верижна молекула, в която РS-модификациите активират ендонуклеаза RNase H, която ензимно хидролизира иРНК от двойноверижната молекула, докато АСО-1 остава интактен (Фигура 6С). Това води до липса на генна експресия на *ribD* оперона, тъй като

полистронната иРНК се подлага на ензимно разграждане чрез RNase H. рVEС КПП е нужен до стадия на навлизане на химерната молекула в клетката. АСО-1 е свободен и може да започне нов цикъл на свързване, т.е. участва в множествени цикъла на инхибиране на генната експресия чрез ензимно разграждане полистронната иРНК чрез RNase H (Фигура 6D).



**Фигура 6. Специфично насочване на ФМН аптамера на полистронната ribD иРНК чрез химерен АСО-1.** (А) Химерния АСО-1 се свързва специфично с комплементарна последователност от ФМН аптамерния домен. Докато химерния АСО-2 само частично се свързва с аптамерния домен. (В) След свързване на химерния АСО-1 с ФМН аптамера, се образува двойно верижна молекула. (С) PS-модификациите на АСО-1 активират ендонуклеазния ензим RNase H, който се свързва с двойноверижната молекула и задейства

ензимната хидролиза на иРНК. (D) Хидролизирането води до липса на генна експресия на *ribD* оперона.

Използвала съм и АСО-2, който за разлика от АСО-1, не се свързва изцяло комплементарно с аптамерната последователност на ФМН рибопревключвателя. При АСО-2 се наблюдава само частична хибридизация и не може да инхибира бактериалния растеж. Чрез липсата на АСО-2 да инхибира бактериалния растеж, се доказва специфичността на действие на АСО-1.

### **5.1.5 Доказване на инхибиторното действие на антисенс олигонуклеотидите върху бактериалния растеж**

Инхибиторното действие на АСО-1 проектиран да се свързва с комплементарен участък от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя, аз съм го доказала в клетки на условните патогенни за човека бактерии *S. aureus* и *E. coli* и в безусловната патогенна за човека бактерия *L. monocytogenes*.

В пробите съдържащи най-високата концентрация на АСО-1, 2000 пМ, се наблюдава максимално инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes*, *E. coli* и *S. aureus*. Точно това експериментално се наблюдава на Фигура 7А. Черната линия показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes* в присъствие на АСО-1, който достига максимум от около 0,3 оптически единици след инкубиране от четири часа. Червената линия показва бактериалния растеж на *E. coli* в присъствие на АСО-1, която достига максимум от около 0,3 оптически единици след инкубиране от четири часа. АСО-1 в най-голяма степен инхибира бактериалния растеж на *S. aureus*, което е показано със синята линия на Фигура 7А. Бактериалния растеж на *S. aureus* достига максимум от около 0,2 оптически единици в присъствие на АСО-1 след инкубиране

от три часа и половина. Бактериалния растеж на трите бактерии, *L. monocytogenes* (черната линия на Фигура 7А), *E. coli* (червената линия на Фигура 7А) и *S. aureus* (синята линия на Фигура 7А) в присъствие на АСО-1 достига минимум от по-малко от 0,1 оптически единици след инкубиране от седем часа.

АСО-2, за разлика от АСО-1, не се свързва специфично с РНК в *L. monocytogenes* (зелената линия на Фигура 7А) и *E. coli* (лилавата линия на Фигура 7А) и поради това не инхибира растежа на тези бактерии. Те достигат максимум от 1,3 оптически единици след инкубиране от четири часа. АСО-2 служи като негативна контрола с цел доказване специфичното инхибиращо действие на АСО-1. Това доказва съществуващите литературни данни за рVЕС КПП, че той самият не инхибира растежа на бактериите. Заедно с това, липсата на инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *E. coli* в присъствието на АСО-2 е индикатор, че ДНК частта от химерния олигомер не хибридува неспецифично с РНК експресирани в тези две бактерии. Бактериалния растеж на двете бактерии, *L. monocytogenes* (зелената линия на Фигура 7А) и *E. coli* (лилавата линия на Фигура 7А) в присъствие на АСО-2 достига минимум от по-малко от 0,3 оптически единици след инкубиране от седем часа.

Следващите проби са с 1000 nM концентрация на АСО-1. Тази концентрация на АСО-1 потиска в същата степен бактериалния растеж на *L. monocytogenes*, *E. coli* и *S. aureus* (Фигура 7В) също като по-високата концентрация на АСО-1 (Фигура 7А). В присъствие на АСО-1, бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия на Фигура 7В) и *E. coli* (червената линия на Фигура 7В) достига максимум от по-малко от 0,4 оптически единици след инкубиране от четири часа.



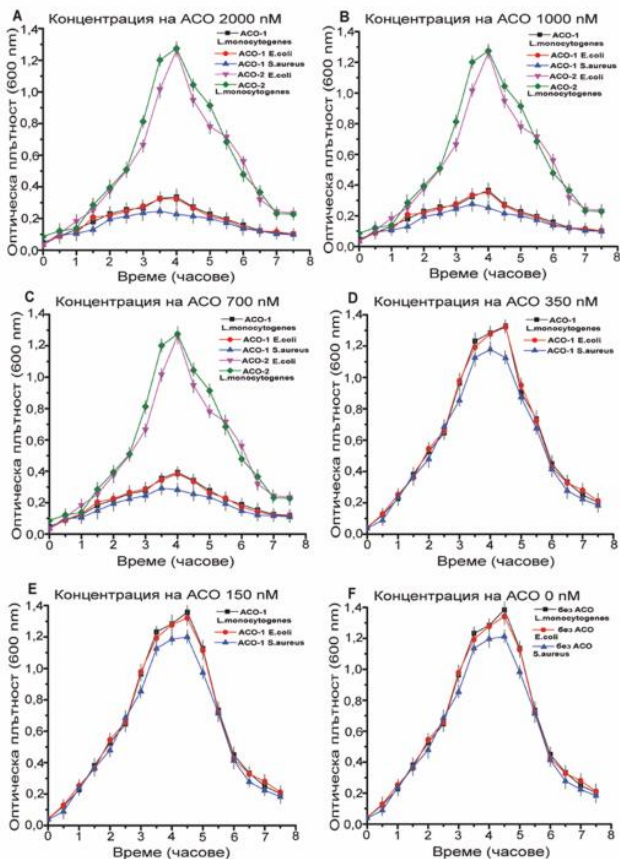
Докато бактериалния растеж на *S. aureus* достига максимум от по-малко от 0,3 оптически единици инкубиране от три часа и половина, както е показано със синята линия на Фигура 7В. АСО-2 не инхибира бактериалния растеж на *E. coli* (лилавата линия на Фигура 7В) и *L. monocytogenes* (зелената линия на Фигура 7В), които достигат максимум от 1,3 оптически единици след инкубиране от четири часа. В присъствие на АСО-1, бактериалния растеж на трите бактерии, *S. aureus* (синята линия на Фигура 7В), *E. coli* (червената линия на Фигура 7В) и *L. monocytogenes* (черната линия на Фигура 7В) достига минимум от 0,1 оптически единици след инкубиране от седем часа. Докато в присъствие на АСО-2, бактериалния растеж на *E. coli* (лилавата линия на Фигура 7В) и *L. monocytogenes* (зелената линия на Фигура 7В) достига минимум от около 0,3 оптически единици след инкубиране от седем часа.

При следващата концентрация на АСО-1 от 700 nM също се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes*, *E. coli* и *S. aureus* в същата степен (Фигура 7С), както и при предишните две по-високи показани на Фигура 7А и Фигура 7В. Черната линия показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes* в присъствие на АСО-1, който достига максимум от около 0,4 оптически единици след инкубиране от четири часа. Докато червената линия показва бактериалния растеж на *E. coli*, която достига същия максимум както *L. monocytogenes* в присъствие на АСО-1. Синята линия показва бактериалния растеж на *S. aureus* в присъствие на АСО-1, който достига максимум от по-малко от 0,3 оптически единици след инкубиране от три часа и половина. В присъствие на АСО-2, бактериалния растеж на *E. coli* (лилавата линия на Фигура 7С) и *L. monocytogenes* (зелената

линия на Фигура 7C) достига същия максимум както при предишната по-висока концентрация показана на Фигура 7B. В присъствие на АСО-1, бактериалния растеж на трите бактерии *S. aureus* (синята линия на Фигура 7C), *L. monocytogenes* (черната линия на Фигура 7C) и *E. coli* (червената линия на Фигура 7C), достига минимум от 0,1 оптически единици след инкубиране от седем часа. Докато в присъствие на АСО-2, бактериалния растеж на *E. coli* (лилавата линия на Фигура 7C) и *L. monocytogenes* (зелената линия на Фигура 7C) достига минимум от около 0,3 оптически единици след инкубиране от седем часа.

При концентрация на АСО-1 от 350 nM, не се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes* и *E. coli*. Само при *S. aureus* се наблюдава малка степен на инхибиране на бактериалния растеж (Фигура 7D). В присъствие на АСО-1, бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия на Фигура 7D) и *E. coli* (червената линия на Фигура 7D) достига максимум от 1,3 оптически единици след инкубиране от четири часа и половина. Докато бактериалния растеж на *S. aureus* достига максимум от 1,1 оптически единици след инкубиране от четири часа (синята линия на Фигура 7D).

При най-ниската концентрация на АСО-1 от 150 nM, изцяло липсва инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия на Фигура 7E), *E. coli* (червената линия на Фигура 7E) и *S. aureus* (синята линия на Фигура 7E). Последните две най-ниски концентрации на АСО-1 не могат да инхибират бактериалния растеж на тестваните бактерии. Кинетиката на растежа на тези бактерии е идентична с пробите, в които няма АСО-1 (Фигура 7F).

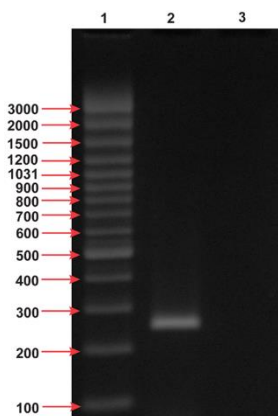


**Фигура 7. Инхибиране на бактериалния растеж с помощта на АСО свързващ се с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя. (А) АСО-1 в концентрация от 2000 nM, се свързва с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия), *E. coli* (червената линия) и най-много на *S. aureus* (синята линия). В сравнение с АСО-1, АСО-2 не инхибира бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (зелената линия) и *E. coli* (лилавата линия). (В) АСО-1 в концентрация от 1000 nM, се свързва с аптамерния домен на ФМН**

рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия), *E. coli* (червената линия) и най-много на *S. aureus* (синята линия). В сравнение с АСО-1, АСО-2 не инхибира бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (зелената линия) и *E. coli* (лилавата линия) (С) АСО-1 в концентрация от 700 nM, се свързва с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия), *E. coli* (червената линия) и най-много на *S. aureus* (синята линия). Докато АСО-2 не инхибира бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (зелената линия) и *E. coli* (лилавата линия) (D). АСО-1 в концентрация от 350 nM, се свързва с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя и почти не се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия), *E. coli* (червената линия) и *S. aureus* (синята линия). (E) АСО-1 в концентрация от 150 nM, се свързва с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя и изцяло липсва инхибиране на бактериалния растеж на *L. monocytogenes* (черната линия), *E. coli* (червената линия) и *S. aureus* (синята линия). (F) Бактериален растеж на *L. monocytogenes*, *E. coli* и *S. aureus* без АСО-1.

Аз изолирах тотална РНК от *S. aureus* както в присъствие, така и в отсъствие на АСО-1. Получената тотална РНК след нейното изолирано беше третирана с DNase, която е пречистена от RNase активност, за да се отстранят всичките следи от геномна ДНК, която може да се получи с изолирането на тотална РНК. Тази тотална РНК беше транскрибирана в ДНК чрез обратна транскриптаза, със съответните праймери. С такава получена кДНК проведох PCR. Преди да се нанесат на гела, пробите бяха преципитирани. Резултатите от проведената гел електрофореза доказват инхибиращото действие на АСО-1 върху иРНК за *ribD* оперона. В отсъствие на АСО-1, иРНК изцяло се транскрибира в резултат, на което се наблюдава специфична амплификация, както е показано на Фигура 8, проба 2. За разлика от това в присъствие на

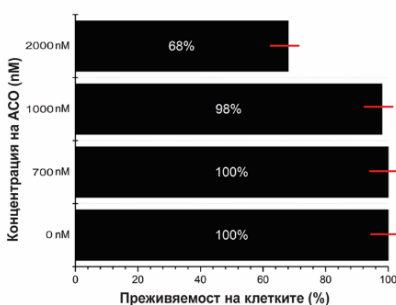
АСО-1, който тотално, изцяло инхибира иРНК на *gibD* оперона не се наблюдава никаква амплификация както е показано на Фигура 8, проба 3. За определяне на приблизителната големина на амплифицираните PCR продукти използвах ДНК стълба от 1000 базови двойки (бд) (Фигура 8, проба 1). Амплифицирания регион съответства на фрагмент с големина до 263 бд, както е видно от Фигура 8. Правия праймер започва от 1458797 и завършва в 1458816, докато обратния праймер започва от 1458534 и завършва в 1458557. Не се наблюдава никакво друго неспецифично амплифициране, което показва, че съм подбрала оптимални условия за описаната PCR реакция.



**Фигура 8. Гел електрофореза PCR на ФМН иРНК от *S. aureus*. (проба 1) 1000 бд стълба за определяне на големината на иРНК. (проба 2) Амплифицираната иРНК получена чрез PCR реакция в отсъствие на АСО-1. (проба 3) Липса на иРНК амплификация на част от *gibD* иРНК заради нейното инхибиране в присъствие на АСО-1.**

Аз тествах АСО-1 в еукариотни клетки с цел определяне на степента на неговата токсичност. За тази цел използвах човешка клетъчна линия на недребноклетъчен рак на белия дроб А549. Използвах трите най-високи концентрации на АСО-1, 2000 nM, 1000 nM, 700 nM, както и липса на АСО-1 като контрола на преживяемостта (Фигура 9). При най-високата концентрация на АСО-1 от 2000 nM се наблюдава 68% преживяемост на А549 клетките (Фигура 9). При

концентрация от 1000 nM на ACO-1 преживяемостта на A549 клетките е 98%. Докато при концентрацията от 700 nM на ACO-1 не се наблюдава никаква токсичност (Фигура 9). При тази концентрация се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж в еднаква степен, както при най-високата концентрация на ACO-1 от 2000 nM и 1000 nM. Следователно имам концентрация, при която максимално се инхибира растежа на *S. aureus* и същевременно се наблюдава липса на токсичност по отношение на човешки клетъчни линии. Това показва, че ACO-1 би могъл успешно да се тества в по-нататъчни предклинични и клинични изследвания като антибактериален агент .



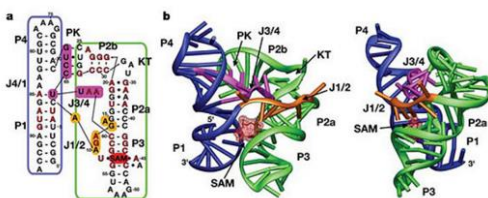
**Фигура 9. Определяне токсичността на ACO в човешка клетъчна линия получена от недребноклетъчен рак на белия дроб.**

## 5.2 Рибопревключватели за С-аденозил метионин (SAM)

SAM рибопревключвателя е разположен в 5'-НТР на полицистронни иРНКи в бактерии. Тези иРНКи кодират протеини, участващи в биосинтезата на метионин или цистеин в Грам-позитивните бактерии. Този рибопревключвател известен и като С-бокс (S-box leader), също в литература се среща и като SAM-I рибопревключвател. SAM – С-аденозил метионин (S-Adenosyl Methionine) е важен коензим във всички организми включително и в бактерии. Той се синтезира директно от метионин чрез SAM синтетазата и служи като донор на метилни групи за модификация на

протеини и нуклеинови киселини. Съществуват аналогични рибопревключватели за SAM, които се характеризират с различна вторична структура на аптамерния домен. Всичките специфично се свързват със SAM или негови производни (SAM-I, SAM-II, SAM-III) и контролират метаболизма на сярата в много бактериални видове<sup>11</sup>.

По отношение на структурата, SAM рибопревключвателя е съставен от четири разклонения свързани с два комплекта от коаксално подредени спирали, разположени една до друга (Фигура 10). Те са свързани чрез лупа разположен на края от ствол P2 и J3/4 връзките. Свързването се улеснява от протеин-независим луп, който индуцира извивка за 100° в P2. SAM се свързва с джоба образуван от хеликсите P1, P2 и J1/2. Ефектора придобива компактна конформация чрез свързване с издутината на P3 чрез водородни връзки и консервативен G в J1/2, където метионина се свързва върху аденина и го стабилизира.<sup>12,13, 14</sup>



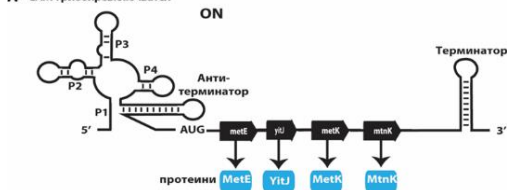
**Фигура 10. Структура на SAM рибопревключвателя.**

(А) Вторична структура на аптамерния домен на

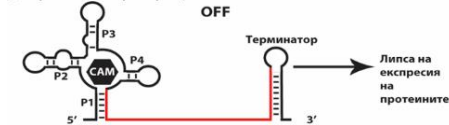
SAM-I рибопревключвателя, която отразява третичната организация; нуклеотидите, които имат 95% консервативност са подчертани в червено. Стрелките показват посоката на основата на РНК. (Б) 3D структура на SAM-I рибопревключвателя. На първата картинка е показан изгледа на SAM-I рибопревключвателя в ляво-въртяща посока, а на втората в дясно-въртяща посока. SAM е показан в червено.

CAM-I рибопревключателя контролира генната експресия чрез терминацията на транскрипцията. Един от опероните, който се контролира от този рибопревключател е С-бокс оперона, които кодира ензими участващи в биохимичния път за синтез на SAM. При липса на SAM се образува анти-терминатор, който не повлиява генната експресия и позволява изцяло да се транскрибира иРНК (Фигура 11А). Когато SAM се свърже с аптамерния домен на CAM-I, стабилизира хеликс P1 и следователно се образува терминатор, който блокира транскрипцията на иРНК (Фигура 11В)<sup>15, 16</sup>.

А CAM-I рибопревключател



В Терминация на транскрипцията



**Фигура 11. Регулация на генната експресия чрез терминацията на транскрипцията чрез SAM – I рибопревключателя.**

(А) В отсъствие на SAM по време на синтеза на 5'- НТР (ON), се образува анти

-терминатор, който не повлиява генната експресия (Б) В присъствие на SAM (OFF), SAM се свързва с рецептора и стабилизира хеликс P1, в резултат на което се образува терминатор. Червената линия показва не нагънатата част от анти-терминатора в експресионната платформа. Свързването на SAM води до липса на експресия на ензимите от С-бокс оперона.

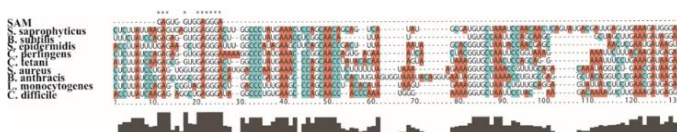
### 5.2.1 Човешки патогенни бактерии, в които се открива CAM-I рибопревключателя

Рибопревключателя за CAM-I се среща само при Грам-положителни патогенни бактерии. От общо 41 бактерии, този рибопревключател присъства в 9 патогенни бактерии: *Bacillus*



*anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus epidermidis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* u *Clostridium perfringens*. Тези резултати са получени чрез биоинформатично търсене на аптамерни консенсусни последователности на SAM-I рибопревключвателя в Rfam базата данни.

На Фигура 12 е показано множественото подравняване на последователностите на аптамерната част на SAM-I рибопревключвателя при 9 бактерии, 8 от които са патогенни. Тези бактерии включват 3 представители на семейство *Staphylococcaceae*, 3 представители на семейство *Clostridium*, 2 представители на семейство *Bacillus* от което само *Bacillus anthracis* е патогенен, докато *Bacillus subtilis* е непатогенен и *Listeria monocytogenes*. От Фигура 12 се вижда, че аз съм избрала консервативен регион от аптамерната последователност, който се среща при всички 9 бактерии.



**Фигура 12. Множествено подравняване на последователностите на аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя в 9 патогенни бактерии. Съпадението на базите между различните последователности е показано в еднакъв цвят.**

Поради това аз избрах тази последователност като таргетен регион за хибридикация с нашия АСО, който ще бъде общ за всичките 3 експериментално тествани бактерии, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* и *S. aureus* показани на Фигура 13.



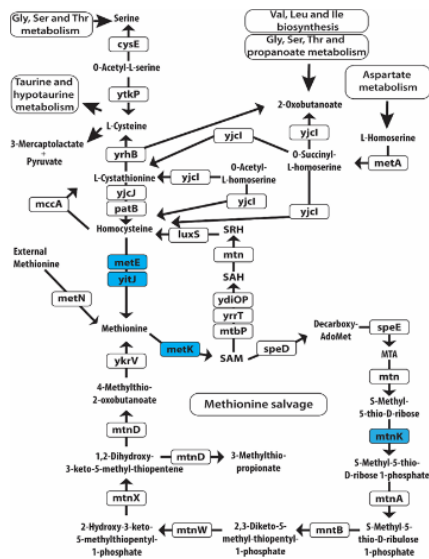
**Фигура 13.** Множествено подравняване на последователностите на аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя на експериментално тестваните бактерии. Съпадението на базите между различните последователности е показано в еднакъв цвят.

### 5.2.2 Биологичен път на синтез на SAM под контрол на SAM-I рибопревключвателя

Метионина е важна аминокиселина, която при хората и животните не се синтезира de novo. В бактериите, метионина се синтезира от L-аспарат, която се получава от метаболизма на аспартата.

Пътя на биосинтез на метионин от L-аспарат (L-aspartate) започва със следващите реакции на превръщане на продуктите: L-хомосерин (L-homoserine) → O-сукцинил-L-хомосерин (O-succinyl-L-homoserine) → L-цистатионин (L-cystathionine) → хомоцистеин → метионин (Фигура 14). Първо аспартатът се превърща чрез β-аспартил семиалдехид в L-хомосерин. След това чрез ензима MetA, който се кодира от metA гена, L-хомосерина се превърща в O-сукцинил-L-хомосерин. Той от друга страна реагира с L-цистеина, който е донор на сяра т.е. неговата хидроксилна група се замества с цистеин. Продукта, който се получава е L-цистатионин. Цистеина е сяро-съдържаща аминокиселина. Тя се синтезира от аминокиселината серин, чрез метаболитния път на синтез на глицин, серин и треонин. Освен това L-цистеина може да се метаболизира до 3-меркаптолактат и пируват. Получения L-цистатионин се разцепва и се получава хомоцистеин. Той може отново да се превърне в L-цистатионин и после в L-цистеин получен от серина. Докато превръщането на хомоцистеина в метионина се осъществява чрез метилиране на тиолната група. В тази химична реакция участват

C-метилтрансферазните ензими MetE и YitJ, които се кодират от гените *metE* и *yitJ*, които са част от C-бокс оперона, който е под контрол на SAM-I рибопревключвателя, който контролира генната експресия чрез терминацията на транскрипцията. SAM се синтезира от метионина и АТФ чрез ензима SAM-синтетазата (също известен и като метионин аденозил трансфераза-MAT). Този ензим се кодира от *metK* гена, който също е част от C-бокс оперона. SAM е донор на метилна група в много важни реакции, включително ДНК метилирането, чрез което се осъществява контрол на генната експресия.



**Фигура 14. Биологичен път на синтез на SAM.** Ензимните стъпки катализирани от генните продукти на C-бокс са показани в синьо. SAM се синтезира от АТФ и метионин от SAM синтетазата кодирана от *metK* гена. SAM също може да се използва за регенериране на метионин чрез пътя на възстановяване на метионин.

SAM също така се използва за получаване на метионин в пътя на възстановяване на метионина. C-аденозил-(L)-хомоцистеин-CAH (S-adenosyl-L-homocystein; SAH) се получава чрез метилтрансферазни ензими. Освен това, CAH първо се хидролизира до C-рибозил-L-хомоцистеин (S-rybosyl-L-homocystein; SRH) чрез MTA/SAH

нуклеозидазата, която се кодира от MtnK гена, последвано от превръщане на L-хомоцистеин (L-homocistein) от C-робозилхомоцистеин лиаза (S-robosoiilhomocistein liase; LuxS). mtnK гена, който също е част от от C-бокс оперона и е под контрол на SAM-I рибопревключвателя участва в процеса на възстановяване на метионина. Пътя за синтез на метионин е универсален път, които превърща сяро-съдържащите метаболити до аминокиселината метионин.<sup>17</sup>

### **5.2.3 Дизайн на антисенс олигонуклеотиди**

За дизайн на АСО-3 използвах консервативна част от последователността на SAM-I рибопревключвателя показана на Фигура 12. АСО-3 за SAM-I е изчислен да е комплементарен на въпросната таргетна последователност, която е част от аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя. Моята цел с този дизайн на АСО-3 е специфично да инхибирам бактериалния растеж на бактериите посочени на Фигура 13. При синтезата на АСО-3 съм използвала комбинация от първо и второ поколение АСОи. С модификациите от първо поколение са модифицирани централните нуклеотиди, а с модификации от второ поколение са модифицирани крайните нуклеотиди. Синтезираният АСО-3 е с дължина от 15 нуклеотида, който има следната последователност 5'-TCCCTCCACCACTC. Последователността на АСО-3 с всичките модификации е 5'-T<sub>1</sub>C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub>C<sub>1</sub> (Фигура 15).

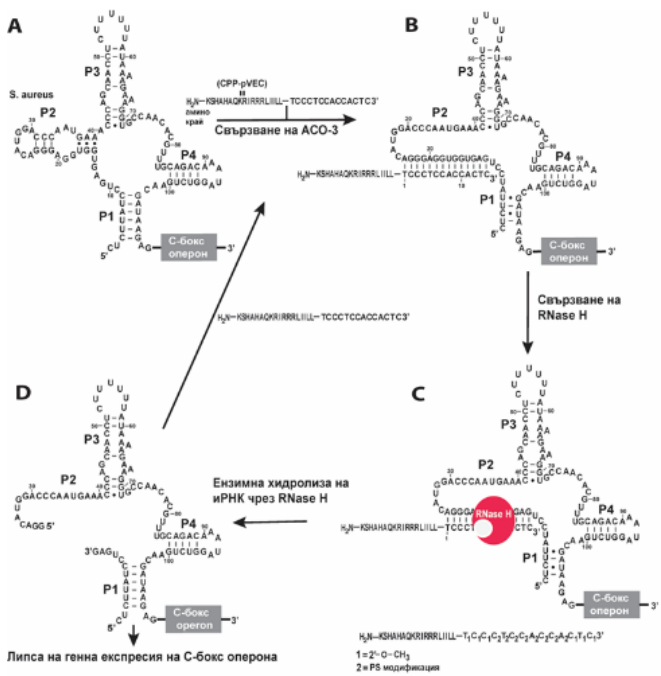
Както и АСО-1 описан в точка 5.1.3, така и АСО-3 е свързан ковалентно с дифулфидна връзка с рVЕС КПП. Заедно те представляват една химерна молекула (Фигура 15). При навлизане на АСО-3 в бактериалната клетка с помощта на рVЕС КПП, само АСО-3

хибридизира с комплементарна част от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя (Фигура 15).

#### **5.2.4 Използване на САМ-I рибопревключвателя като мишена за откриване на нови антибиотици**

При блокиране експресията на С-бокс оперона в бактериални клетки на *S. aureus*, чрез АСО-3, се инхибира транскрипцията на полицистронната иРНК (Фигура 15). Последователността на АСО-3 е следната: 5'-TCCCTCCACCACTC. Тъй като АСО-3 е ковалентно свързан с рVEС КПП, цялостната последователност на химерната молекула е H<sub>2</sub>N-KSKАНАQKRIRRRRIILL-TCCCTCCACCACTC-3' (Фигура 15А).

След навлизане на АСО-3 в бактериалната клетка с помощта на рVEС КПП, само АСО-3 хибридизира с неговата комплементарна последователност от аптамерния домен на САМ-I рибопревключвателя (Фигура 15В). Образува се двойно верижна молекула, в която РS-модификациите активират ендонуклеаза RNase H (Фигура 15С). Това води до липса на експресия на С-бокс оперона, тъй като иРНК се подлага на ензимно разграждане чрез RNase H, докато АСО-3 остава интактен и може да започне нов цикъл на свързване с иРНК т.е. участва в множествени цикъла на инхибиране на генната експресия чрез ензимно разграждане полицистронната иРНК (Фигура 15D).



**Фигура 15.** Специфично ензимно хидролизиране на SAM-I аптамера на полицистронната C-бокс иРНК чрез химерен ACO-3. (A) ACO-3 се свързва специфично с комплементарна последователност от SAM-I аптамерния домен. (B) След свързване на химерния ACO-3 със SAM-I аптамера, се образува двойно верижна молекула. (C) PS-модификациите на ACO-3 активират ендонуклеазния ензим RNase H, която се свързва с двойноверижната молекула и задейства ензимната хидролиза на полицистронната иРНК. (D) Ензимното разграждане на иРНК води до липса на генна експресия на C-бокс оперона.

### **5.2.5 Доказване на инхибиращото действие на антисенс олигонуклеотидите за SAM-I върху бактериалния растеж**

Инхибиращото действие на АСО-3, проектиран да се свързва с комплементарен участък от аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя, аз съм го доказала в клетки на безусловната патогенна за човека бактерия *L. monocytogenes* и условната патогенна за човека бактерия *S. aureus*.

В пробите съдържащи най-високата концентрация на АСО-3, 2000 nM, се наблюдава максимално инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus* и *L. monocytogenes* (Фигура 16А). Със синя линия е показан бактериалния растеж на *L. monocytogenes* в отсъствие на АСО-3, който достига максимум от около 1,3 оптически единици след инкубиране от три часа и половина. За разлика от това за същата бактерия в присъствие на АСО-3 се наблюдава максимум от по-малко от 0,3 оптически единици след инкубиране от четири часа (лилавата линия на Фигура 16А). За *S. aureus* се наблюдава максимум от около 1,3 оптически единици след инкубиране от четири часа в отсъствие на АСО-3 (черната линия на Фигура 16А). За разлика от това при *S. aureus* в присъствие на АСО-3 се наблюдава максимум от 0,3 оптически единици след инкубиране от четири часа (червената линия на Фигура 16А). При двете бактерии, *S. aureus* и *L. monocytogenes* се наблюдава минимум на бактериалния растеж от около 0,3 оптически единици в отсъствие на АСО-3 след инкубиране от пет часа и половина (синята и черната линия Фигура 16А). Докато минимума на бактериалния растеж за двете бактерии, *S. aureus* и *L. monocytogenes* е около 0,1 оптически единици в присъствие на АСО-3 след инкубиране от пет часа и половина (лилавата и червената линия на Фигура 16А).

Следващите проби са с 1000 nM концентрация на АСО-3 (Фигура 16В). Тази концентрация на АСО-3 потиска в същата степен бактериалния растеж на *L. monocytogenes*, както при по-високата концентрация на АСО-3 показана на Фигура 17А. Докато при *S. aureus* се наблюдава по-силно инхибиране (Фигура 16В). Лилавата линия показва бактериалния растеж на *L. monocytogenes* в присъствие на АСО-3, който достига максимум от по-малко от 0,4 оптически единици след инкубиране от четири часа (Фигура 16В). С червена линия е показан бактериалния растеж на *S. aureus* в присъствие на АСО-3, който достига максимум от по-малко от 0,3 оптически единици след инкубиране от три часа и половина (Фигура 16В). Бактериалния растеж на двете бактерии *S. aureus* и *L. monocytogenes* в отсъствие на АСО-3 достига максимум от около 1,3 оптически единици, като *L. monocytogenes* достига този максимум след инкубиране от три часа и половина, *S. aureus* достига този максимум след четири часа (синята и черната линия на Фигура 16В). Двете бактерии *S. aureus* и *L. monocytogenes*, достигат минимум на бактериалния им растеж в присъствие на АСО-3 от 0,1 оптически единици, докато в отсъствие на АСО-3 от по-малко от 0,3 оптически единици след инкубиране от седем часа и половина.

При следващата концентрация на АСО-3 от 700 nM показана на Фигура 16С се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus* и *L. monocytogenes* в същата степен, както и при предходните две по-високи концентрации показани на Фигура 16А и Фигура 16В. В присъствие на АСО-3, *L. monocytogenes* достига максимум на бактериалния растеж от около 0,4 оптически единици след инкубиране от четири часа (лилавата линия на Фигура 16С). Докато *S.*

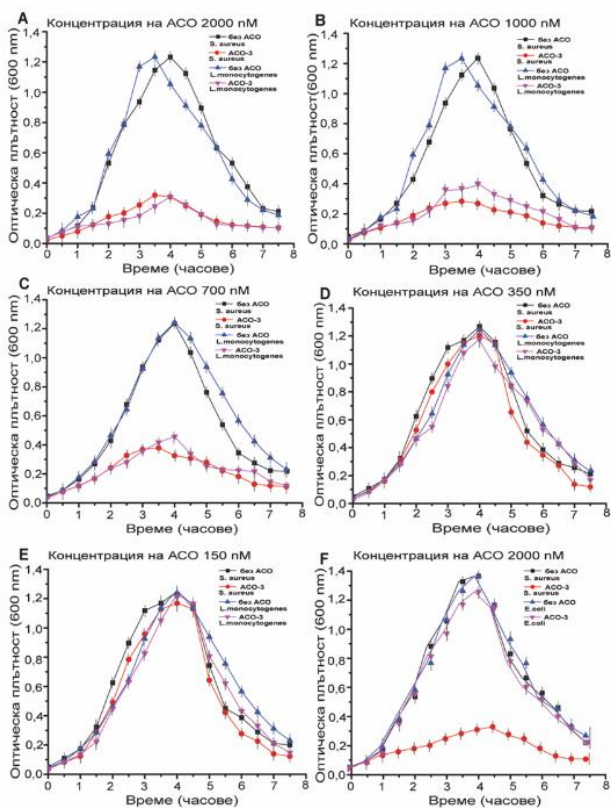


*aureus* в присъствие на АСО-3 достига максимум на бактериалния растеж от около 0,3 оптически единици след инкубиране от три часа и половина (червената линия на Фигура 16С). Синята и черната линия показват максимума на бактериалния растеж на двете бактерии *S. aureus* и *L. monocytogenes* в отсъствие на АСО-3 от 1,3 оптически единици след инкубиране от четири часа (Фигура 16С). При двете бактерии *S. aureus* и *L. monocytogenes* се наблюдава минимум от 0,1 оптически единици след инкубиране от седем часа в присъствие на АСО-3 обозначен с лилавата и червената линия на Фигура 16С. Докато и при двете бактерии *L. monocytogenes* и *S. aureus* се наблюдава минимум от 0,2 оптически единици след инкубиране от седем часа в отсъствие на АСО-3 (синята линия и черната линия на Фигура 16С).

При следващата концентрация на АСО-3 от 350 nM почти не се наблюдава разлика в бактериалния растеж на *S. aureus* и *L. monocytogenes* в присъствие и отсъствие на АСО-3 (Фигура 16D). При двете бактерии в присъствие на АСО-3 се наблюдава максимум на бактериалния им растеж от около 1,2 оптически единици (лилавата и червената линия на Фигура 16D) след инкубиране от четири часа и не се различава от бактериалния растеж в отсъствие на АСО-3 (синята и черната линия на Фигура 16D).

При най-ниската концентрация на АСО-3 от 150 nM изцяло липсва инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus* и *L. monocytogenes* (Фигура 16Е). Двете бактерии достигат максимум на бактериалния растеж, както в отсъствие (синята и черната линия на Фигура 16Е), така и в присъствие на АСО-3 (лилавата и червената линия на Фигура 16Е) от 1,3 оптически единици след четири часа. Най-високата концентрация на АСО-3 от 2000 nM се използва и в клетки на *E. coli*, но

не се наблюдава инхибиране на бактериалния й растеж, тъй като липсва SAM-I рибопревключвателя и ACO-3 не може да се свърже специфично. Кинетиката на растежа на *E.coli* в присъствие на ACO-3 (лилавата линия на Фигура 16F) е идентична с пробите, в които няма ACO-3 (черната линия на Фигура 16F за *S. aureus* и синята линия на Фигура 16F за *E. coli*).

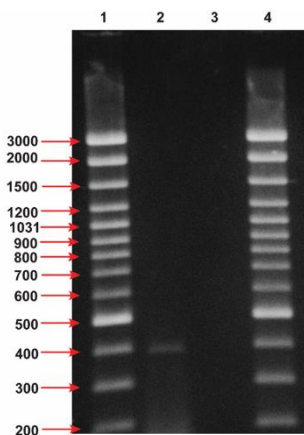


**Фигура 16. Инхибиране на бактериалния растеж с помощта на ACO свързващ се с аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя. (A) ACO-3 в концентрация от 2000 nM, се свързва с аптамерния домен на SAM-I**

рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на *S. aureus* (червената линия) и *L. monocytogenes* (лилавата линия). (B) ACO-3 в концентрация от 1000 nM се свързва с аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на *S. aureus* (червената линия) и *L. monocytogenes* (лилавата линия). (C) ACO-3 в концентрация от 700 nM, се свързва с аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя и инхибира бактериалния растеж на *S. aureus* (червената линия) и *L. monocytogenes* (лилавата линия). (D) ACO-3 в концентрация от 350 nM, се свързва с аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя и не се наблюдава инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus* (червената линия) и *L. monocytogenes* (лилавата линия). (E) ACO-3 в концентрация от 150 nM, се свързва с аптамерния домен на SAM-I рибопревключвателя и изцяло липсва инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus* (червената линия) и *L. monocytogenes* (лилавата линия). (F) Бактериален растеж на *E. coli* при концентрация на ACO-3 от 2000 nM.

Аз изолирах тотална РНК от *S. aureus* както в присъствие, така и в отсъствие на ACO-3 в концентрация от 2000 nM и в отсъствие на ACO-3, както е описано в раздел 4. Материали и методи, точка 4.2 Методи, подточка 4.2.2 (1). Получената тотална РНК след нейното изолиране беше третирана с DNase, която е пречистена от RNase активност (виж раздел 4. Материали и методи, точка 4.2 Методи, подточка 4.2.2 (3), за да се премахнат всички следи от геномна ДНК, която може да се получи като примес заедно с изолирането на тотална РНК. Тази тотална РНК беше транскрибирана в ДНК чрез обратна транскриптаза, със съответните праймери. С така получената кДНК проведех PCR както е описано в раздел 4. Материали и методи, точка 4.2 Методи, подточка 4.2.2 (4). Нуклеотидната последователност на правия и обратен праймер е показана в раздел 4. Материали и методи, точка 4.1 Материали, подточка 4.1.4, Таблица 2. Пробите, преди да се

нанесат на гела бяха преципитирани, както е описано в раздел 4. Материали и методи, точка 4.2 Методи, подточка 4.2.2 (5). Резултатите от проведената гел електрофореза доказват инхибиращото действие на АСО-3 върху иРНК за С-бокс оперона (Фигура 17). В отсъствие на АСО-3, иРНК изцяло се транскрибира в резултат на което се наблюдава специфична амплификация, както е показано на Фигура 17, проба 2. За разлика от това, в присъствие на АСО-3 не се наблюдава никаква амплификация. Това означава, че АСО-3 напълно инхибира експресията на САМ-I, както е показано на Фигура 17, проба 3.

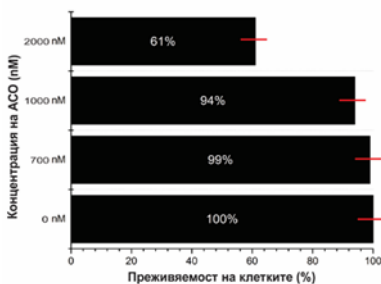


**Фигура 17. Гел електрофореза на PCR амплифицираната САМ-I иРНК от *S. aureus*. (проби 1 и 4) 1000 бд стълба за определяне на големината на иРНК. (проба 2) Амплифицираната иРНК получена чрез PCR реакция в отсъствие на АСО-3. (проба 3) Липса на иРНК амплификация на част от С-бокс иРНК заради нейното инхибиране в присъствие на АСО-3.**

За определяне на приблизителната големина на амплифицираните PCR продукти използвах ДНК стълба от 1000 бд (Фигура 17, проба 1 и 4). Амплифицирания регион съответства на фрагмент с големина от около 396 бд, както е видно от Фигура 17, проба 2. Правия праймер започва от 1818942 и завършва в 1818962, докато обратния праймер започва от 1818546 и завършва в 1818566. Това съответства на очакваната големина на амплифицирания регион от моите праймери, които са между мястото на хибридизация на АСО-3. Не се наблюдава

никакво друго неспецифично амплифициране, което показва, че съм подбрала оптимални условия за описаната PCR реакция.

Тествах АСО-3 в еукариотни клетки с цел определяне на степента на неговата токсичност. За тази цел отново използвах човешка клетъчна линия на недребноклетъчен рак на белия дроб А549, както е описано в раздел 4. Материали и методи, точка 4.2 Методи, подточка 4.2.2 (7). За тази цел използвах трите най-високи концентрации на АСО-3, 2000 nM, 1000 nM, 700 nM, както и липса на АСО-3 като контрола за преживяемост на клетките (Фигура 18). При най-високата концентрация на АСО-3 от 2000 nM се наблюдава 61% преживяемост на А549 клетките (Фигура 18). Докато при концентрация от 1000 nM на АСО-3 преживяемостта на А549 клетките е 94%, а при концентрация от 700 nM се наблюдава липса на токсичност. Както и АСО-1, така и АСО-3 при концентрация от 700 nM се наблюдава липса на токсичност в еукариотните клетки. При тази концентрация на АСО-3 от 700 nM, също се наблюдава и максимално инхибиране на бактериалния растеж на *S. aureus*.



**Фигура 18.** *Определяне токсичността на АСО-3 в човешка клетъчна линия получена от недребноклетъчен рак на белия дроб.*

Следователно имам концентрация, при която максимално се инхибира растежа на *S. aureus* и същевременно се наблюдава липса на токсичност по отношение на човешки клетъчни линии. Това показва,

че АСО-3 би могъл успешно да се тества в по-нататъчни предклинични и клинични изследвания като антибактериален агент, кандидат за нов антибиотик.

## **6. Дискусия**

Развиването и постиженията на АСО технологията през последните години доведе до възможността за специфично инхибиране на всяка експресирана иРНК в клетката. Аптамерните домени на рибопревключвателите се много подходящи мишени за действието на много АСОи.<sup>18,19</sup>

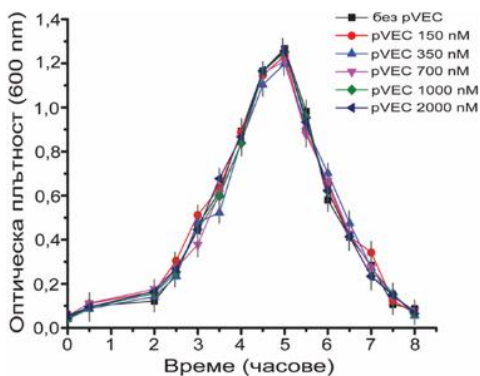
В основата на тази технология е използването на АСОи, които представляват модифицирани ДНК или РНК последователности, които хибридизират комплементарно с таргетната иРНК. Тези АСОи инхибират експресията на иРНКи и по този начин могат да инхибират ключови метаболитни пътища. Аз смятам, че специфичното инхибиране на ниво на иРНК чрез АСОи е много продуктивна стратегия за развиване на нови антибактериални агенти.<sup>20,21</sup>

Както беше описано в раздел 2. Въведение, разработени са три поколения АСОи. Всяко поколение се характеризира с определен тип модификации. Аз в моите експерименти използвах химерни АСОи, които притежават модификации характерни за първо и второ поколение АСОи. Аз използвах комбинация от тези две модификации, защото РS-модификациите от първо поколение активират ендонуклеазния ензим RNase H, който разпознава двойно-верижната молекула, която се образува при специфичното свързване на АСОи със съответния рибопревключвател. С този тип модификация са модифицирани централните нуклеотиди на АСОи. Но тази модификация сама по себе си не е толкова ефективна в защитата на

АСОи от нуклеазните ензими в клетката и модифицирани по такъв начин АСОи може да взаимодействат неспецифично с протеини по повърхността на клетката или вътре в нея. Затова аз използвах и модификации характерни за второ поколение АСОи. С този тип модификация са модифицирани крайните 5' и 3' нуклеотиди на АСОи. Тези модификации защитават АСОи от нуклеазна атака на ензимите вътре в клетката. Но ако и централните нуклеотиди на АСОи са модифицирани по този начин, те ще инхибират действието на RNase H (това беше направено в изпълнение на точка 4 от раздел 3. Цел и задачи).

Аз не избрах модификации от трето поколение АСОи, защото например ПНК, която е от това поколение би трябвало да хибридизира с район на иРНК където е началото на трансляцията, а не толкова с аптамерния домен на рибопревключвателя. Освен това, при третото поколение АСОи не се наблюдават последователни цикли на действие, както при първото поколение. Действа еднократно с хибридиране с една определена РНК молекула.

Използваните от мен АСОи са ковалентно свързани с рVЕС КПП, който улеснява тяхното навлизане в бактериалната клетка. Аз избрах рVЕС КПП, защото при концентрациите, които аз използвах от 2000 nM; 1000 nM; 700 nM; 350 nM; 150 nM, няма антибактериално действие. Това е доказано и от моя експеримент проведен само с рVЕС КПП (Фигура 19).



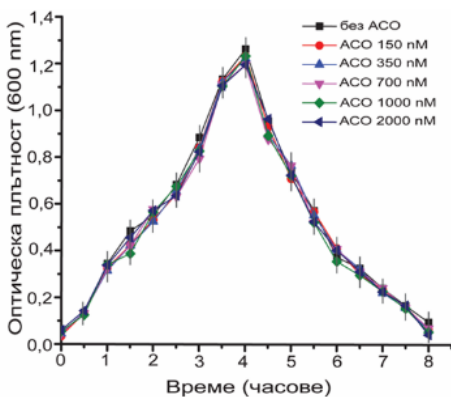
**Фигура 19. Тестване на антибактериалната активност само на pVEC КПП при всичките концентрации в бактериални клетки на *S. aureus***

Резултатите от експеримента доказват, че pVEC КПП сам по себе си не инхибира бактериалния растеж. Също така установено е, че прониква еднакво ефективно, както в бактериални, така и в еукариотни клетки и сам по себе си няма токсичен ефект дори и при най-високата използвана от мен концентрация от 2000 nM. Това дава възможност за тестване на АСОи в човешка клетъчна линия за евентуална токсичност.

Аз проведох и допълнителен експеримент, който показва, че АСОи сами по себеси, без да са ковалентно свързвани с pVEC КПП, не могат да преминат през клетъчната стена на бактериалната клетка (Фигура 20).

Резултатите от проведения експеримент показват, че АСО при всичките от мен използвани концентрации не може да инхибира бактериалния растеж, тъй като не е свързан с pVEC КПП и не може да премине през бактериалната клетъчна стена.





**Фигура 20. Тестване на антибактериалната активност само на АСО при всичките концентрации в бактериални клетки на *S. aureus*.**

Използваните от мен АСО-1, който инхибира биохимичния път за синтез на ФМН и АСО-3, който инхибира биохимичния път за синтез на САМ, успешно инхибират растежа на експериментално тестваните бактерии (това беше направено в изпълнение на точки 2 и 3 от раздел 3. Цел и задачи). PCR резултатите с обратна транскриптаза доказват, че използвания АСО-1 хибридизира с консервативна последователност от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя и успешно потиска бактериалния растеж на безусловната за човека патогенна бактерия *L. monocytogenes* и условните патогенни за човека бактерии *E. coli* и *S. aureus*. Действието на АСО-1 е тествано в пет концентрации: 2000 nM, 1000 nM, 700 nM, 350 nM и 150 nM. На основа на тези резултати аз изчислих и минималната инхибираща концентрация (МИК-80, която инхибира 80% от растежа на клетките). Тази концентрация АСО-1 е 700 nM (4,5 µg/ml). АСО-1 е ковалентно свързан с рVEC КПП, който осигурява навлизането му в бактериалните клетки. Те представляват една химерна молекула. След навлизане на химерната молекула в клетката, само АСО-1 хибридизира с комплементарна последователност от ФМН рибопревключвателя. Устойчивостта на рVEC е важна само до

навлизането му в клетката. Неговото разграждане в клетката от вътреклетъчните протеази, по никакъв начин не повлиява инхибиращото действие на АСО-1 вътре в бактерията. АСО-1 блокира експресията на *ribD* полицистронната иРНК, която кодира пет ензими (RIBA, RIBD, RIBC, RIBE, RIBF) участващи в биохимичния път на синтез на ФМН чрез блокиране на транскрипцията и *uraA* гена, отговорен за синтез на транспортния протеин на ФМН от околната среда в клетката, чрез превенция на транслацията. Аз при проектирането на АСО-1 избрах консервативна последователност, която се среща и при двата аптамерни домена на ФМН рибопревключвателя. Ефекта, който се наблюдава в резултат на действието на АСО-1 се дължи на два основни фактори: при първия се изключва регулацията на ФМН рибопревключвателя и при втория се дестабилизира иРНК на *ribD* оперона. Резултатите от експериментите показват, че АСО-1 има бактериостатичен ефект, тъй като забавя и в крайна сметка спира делението на тестваните от нас бактерии: *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *E. coli* (това беше направено в изпълнение на точка 5 от раздел 3. Цели и задачи). Но последователността на АСО-1, която е показана на Фигура 17 за множествено подравняване, освен тези бактерии могат да се инхибират и още пет други патогенни бактерии: *S. pneumoniae*, *B. anthracis*, *S. aepidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. agalactiae*, както и непатогенната бактерия *B. subtilis*. Чрез модификации в последователността на АСО-1 може да се инхибира растежа и на още 22 патогенни бактерии, които съдържат ФМН рибопревключвателя (това беше направено в изпълнение на точка 1 от раздел 3. Цел и задачи).

Инхибирането на експериментално тестваните бактерии се дължи на специфичното свързване на АСО-1 с аптамерната последователност, което не се наблюдава при АСО-2. АСО-2 не оказва влияние върху бактериалния растеж дори и при най-високо тестваната концентрация от 2000 nM, тъй като не се свързва специфично с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя. АСО-2 също така е ковалентно свързан с рVЕС КПП и навлиза в клетката, но въпреки това той няма специфична мишена, тъй като не хибридизира специфично с някоя иРНК в тестваните бактерии (това беше направено в изпълнение на точка 6 от раздел 3. Цел и задачи).

Резултатите от експериментите проведени с АСО-3, който хибридизира с консервативна последователност от аптамерния домен на САМ-I рибопревключвателя показват, че той успешно инхибира бактериалния растеж на тестваните бактерии. PCR резултатите с обратна транскриптаза доказват, че използваният АСО-3 хибридизира с консервативна последователност от аптамерния домен на САМ-I рибопревключвателя и успешно инхибира бактериалния растеж на безусловната за човека патогенна бактерия *L. monocytogenes* и условната патогенна бактерия *S. aureus*. Подобно на АСО-1, АСО-3 тествани са пет концентрации на АСО-3: 2000 nM, 1000 nM, 700 nM, 350 nM и 150 nM. Отново аз изчислих МИК-80, която за АСО-3 е 700 nM (4,4 µg/ml). Както и АСО-1, така и АСО-3 е ковалентно свързан с рVЕС КПП. АСО-3 блокира експресията на С-бокс полицистронна иРНК, която съдържа информация за синтез на ензими от биохимичния път за синтеза на САМ (MetE, MetK, MtnK, YitJ). Блокирането на генната експресия е чрез терминация транскрипцията на полицистронната иРНК. АСО-3 също има бактериостатичен ефект, тъй като забавя и в

крайна сметка спира деленето на тестваните бактерии: *L. monocytogenes* и *S. aureus* (това беше направено в изпълнение на точка 5 от раздел 3. Цел и задачи). Отново при проектирането избрах консервативна последователност, така че инхибирането се дължи на специфичното свързване на АСО-3 с аптамерната последователност на САМ-I рибопревключвателя. Последователността на АСО-1, която е показана на Фигура 12 за множествено подравняване, могат да се инхибират и още шест други патогенни бактерии: *C. perfingens*, *C. tetani*, *C. difficile*, *B. anthracis*, *S. epidermidis* и *S. apropycticus* (това беше направено в изпълнение на точка 1 от раздел 3. Цел и задачи). Специфичното свързване на АСО-3 е доказано и чрез инхибиране растежа на непатогенната за човека бактерия *B. subtilis*. И при нея бактериалния растеж се инхибира в еднаква степен, както и при по-горе експериментално тествани две бактерии. С цел да докажем, че АСО-3 се свързва специфично с аптамерния домен на САМ-I рибопревключвателя и липсва неспецифично свързване, ние проведохме и негативен контролен експеримент с условната за човека патогенна бактерия *E. coli*. При нея изцяло липсва инхибиране на растежа, тъй като в нейния геном не присъства САМ-I рибопревключвателя и АСО-3 няма специфична мишена, която да инхибира (това беше направено в изпълнение на точка 6 от раздел 3. Цел и задачи). Поради факта, че АСО-1 и АСО-3 не са комплементарни помежду си, те могат да се използват едновременно в бактерии, които имат и двата рибопревключватели и едновременно да се свържат с двата аптамера.

Проведените от мен експерименти за тестване на токсичността на АСО-1 (виж раздел 5. Резултати, точка 5.1.5, Фигура 9) и АСО-3 (виж

раздел 5. Резултати, точка 5.2.5, Фигура 19) в човешка клетъчна линия от недребноклетъчен рак на белия дроб A549 показват, че при концентрация от МИК-80 (700 nM) и двата АСОи не са токсични за еукариотните клетки. Преживяемостта на клетките в присъствие на АСОи е еднаква с тази в отсъствие на АСОи (това беше направено в изпълнение на точка 7 от раздел 3. Цел и задачи).

При проектиране на моите АСОи аз избрах консервативен участък от аптамера. Този участък е важен за образуване на вторична и третична структура, както и е от особено значение за функцията на самия аптамерен домен. Ако в този консервативен участък възникнат мутации, те ще променят вторичната структура на рибопревключвателя, а това ще повлияе и на хибридизацията на АСОи с аптамерния домен. От друга страна в понататъчните предклинични и клинични изследвания, чрез намалената хибридизация на АСОи с аптамерния домен на съответния рибопревключвател, може лесно да се детектират мутациите, които биха довели до възникване на антибиотична резистентност в патогенните бактерии.

За моите експериментално тествани АСОи аз изчислих МИК-80, тъй като тази концентрация се използва за определяне концентрацията, при която действат вече известните и прилагани антибиотици.

Аз не съм направила експерименти с посявка върху петри с АСО-1 и АСО-3, защото самите АСОи са високомолекулни и не могат да преминат през агара.

Резултатите от проведените от мен експерименти показват, че аз имам 100% успеваемост в дизайн на АСОи, тъй като и двата АСОи, които бяха направени за ФМН и САМ-I рибопревключвателите доказаха очакваните от мен резултати в експериментално тестваните

бактерии без да съм направила дизайн на допълнителни АСОи. Това потвърждава ефективността на принципите в приложения от мен дизайн.

На база на използване на такива АСОи, които са проектирани специфично да се свързват с аптамерния домен на съответния рибопревключвател, се дава възможност за създаване на широкоспектърни и тясноспектърни антибактериални агенти. Широкоспектърните могат да се създадат като се използват консервативни участъци от аптамерния домен на съответния рибопревключвател, чиито последователности се срещат при много патогенни бактерии. Докато тясноспектърните антибиотични агенти могат да се създадат чрез използване на части от аптамерния домен, които са специфични за точно определена бактерия. Установено е и че бактериите развиват по-рядко антибиотична резистентност срещу антибактериални агенти, които имат бактериостатичен ефект в сравнение с антибиотици, които директно убиват клетките и имат бактерициден ефект.

Освен рVЕС КПП се разработени и други КППи, които подпомагат навлизането на модифицираните АСОи проектирани да се свързват с определен рибопревключвател и осъществяват контрол върху генната експресия. Но тези КППи се характеризират със специфична селективност. Те могат да проникват само в бактериални клетки, но не могат да проникват в еукариотни клетки. С такъв подход може минимално да се намалят страничните ефекти, които може да имат нашите химерни молекули.

Освен, че могат да се проектират АСОи, които да се свързват със съответни рибопревключватели и да инхибират бактериалния растеж

чрез контрол на генната експресия, могат да се проектират и АСОи, които да се използват като потенциална антиракова терапия.

За разлика от нормалните клетки, в раковите клетки се експресират анти-апоптични протеини, които блокират апоптозата. Тези протеини директно инхибират крайните ефекторни каспази, които участват в задействането на програмираната клетъчна смърт. Някои от анти-апоптичните протеини се експресират по време на ембрионалното развитие, но липсват в крайно диференцираните тъкани.

Основната цел в използването на АСОи при раковите клетки е блокиране на експресията на анти-апоптичните протеини. Този подход се основава чрез насочване на АСОи в мястото на инициация на транслацията на иРНКи, където се намира АТГ старт кодона. Причина за избиране на това място е, че най-вероятно е едновременно и е достъпно за свързване с АСО.

Един такъв АСО, който има голям терапевтичен потенциал, е 18 бд PS-АСО облимерсен (G3139; Genasense; Genta Incorporated, Berkeley Heights, NJ, USA). Този АСО е насочен срещу първите шест кодона на bcl-2 иРНК от отворената рамка на четене и е показал обещаващи терапевтични ефекти в няколко вида рак. Bcl-2 е свръх експресиран в раковите клетки, контролира анти апоптичния път и допринася за резистентността към химиотерапия. Чрез насочване към bcl-2 иРНК, облимерсен повишава ефикасността на цитотоксичните агенти в третирането на рак.

Чрез вторичната структура на таргетната иРНК, която се транслира във функционален протеин инхибиращ апоптозата в раковите клетки, може да се идентифицират потенциалните таргетни места, за които

може да се свържат комплементарно АСОи. На основа на идентифицираните таргетни места може да се проектират АСОи, които да са насочени срещу различни райони от таргетната иРНК. По такъв начин чрез използване на АСОи, които се свързват комплементарно с определен район от таргетната иРНК, се блокира експресията на анти-апоптичните протеини в раковите клетки и се възстановява протеазната активност на каспазните ензими, които са нужни, за да се задейства апоптозата.

Всичко това показва, че АСОи могат да се използват като потенциална антиракова терапия чрез блокиране експресията на анти-апоптичните протеини и възстановяване на програмираната клетъчна смърт.

## **7. Изводи**

1. В тази докторска дисертация аз установих чрез търсене в биоинформатични бази данни, че ФМН рибопревключвателят се среща в генома на 30 патогенни бактерии и САМ-I рибопревключвателят в генома на 9 патогенни за човека бактерии.
2. Проведох биоинформатичен анализ на биохимичните пътища за синтез на ФМН и САМ при човешки патогенни бактерии и установих, че и двата биохимични пътища за синтез на ФМН и САМ в патогенните бактерии нямат алтернативни пътища за техния синтез. Въз основа на този биоинформатичен анализ аз заключих, че и двата рибопревключвателя са подходящи мишени за създаване на антибактериални агенти, тъй като инхибиране на тяхната функция би трябвало да доведе до инхибиране растежа на съответните бактерии.



3. Направих дизайн на два АСОи, АСО-1 за ФМН рибопревключвателя и АСО-3 за САМ-I рибопревключвателя. Те са проектирани специфично да се свързват с комплементарна последователност от аптамерните домени на съответните рибопревключватели и да не взаимодействат с други експресирани иРНКи в съответните бактерии. АСО-1 блокира експресията на *ribD* оперона, който съдържа гени кодиращи ензими участващи в биохимичния път за синтез на ФМН. Докато АСО-3 блокира експресията на С-бокс оперона, който съдържа гени кодиращи ензими участващи в биохимичния път за синтез на САМ.
4. Доказах инхибиращото действие на АСО-1 в безусловната за човека патогенна бактерия *L. monocytogenes* и условните патогенни за човека бактерии *E. coli* и *S. aureus* в богатата хранителна среда (LB). Установих МИК-80 с концентрация от 700 nM (4,5 µg/ml) при инхибиране на растежа на горе споменатите бактерии.
5. Доказах инхибиращото действие на АСО-3 в безусловната за човека патогенна бактерия *L. monocytogenes* и условната патогенна за човека бактерия *S. aureus*, както и в непатогенната за човека бактерия *B. subtilis* в богатата хранителна среда (LB). Бактериалния растеж при *B. subtilis* се инхибира в еднаква степен, както и при *L. monocytogenes* и *S. aureus*. Установих МИК-80 с концентрация от 700 nM (4,4 µg/ml) при инхибиране на растежа на горе споменатите бактерии.
6. Доказах специфичността на действие на АСО-1 чрез използване само на рVEС КПП и на АСО-2. АСО-2 не се свързва специфично и комплементарно с аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя и не инхибира бактериалния растеж дори и

- при най-високата концентрация от 2000 nM. Доакто рVЕС КПП сам по себе си не е токсичен, а само улеснява навлизането на АСО-1 през клетъчната стена на бактериалната клетка и не повлиява бактериалния растеж. Инхибирането на растежа на бактериалните клетки се дължи само на свързването на АСО-1 с комплементарна последователност от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя.
7. Доказах специфичността на действие на АСО-3 чрез използване само на рVЕС КПП и чрез негативен контролен експеримент с условната за човека патогенна бактерия *E. coli*. При нея не се наблюдава инхибиране на растежа, тъй като в нейния геном не присъства САМ-I рибопревключвателят и АСО-3 няма специфична мишена, която да инхибира. Доакто рVЕС КПП сам по себе си не е токсичен, а само улеснява навлизането на АСО-1 през клетъчната стена на бактериалната клетка и не повлиява бактериалния растеж. Инхибирането на растежа на бактериалните клетки се дължи само на свързването на АСО-1 с комплементарна последователност от аптамерния домен на ФМН рибопревключвателя.
  8. Доказах, че АСО-1 и АСО-3 имат бактериостатичен ефект, тъй като забавят и в крайна сметка спират деленето на бактериите, което се получава след изчерпване на наличните запаси на ФМН и САМ в бактериалната клетка, които са жизнено важни метаболити.
  9. Доказах, че при концентрация на МИК-80 от 700 nM, АСО-1 и АСО-3 не са токсични за еукариотни клетки в човешка клетъчна линия от недребноклетъчен рак на белия дроб А549.
  10. В дизайна на АСОи за ФМН и САМ-I рибопревключвателите имам 100% успеваемост, тъй като съм направила дизайн на два АСОи,

които са сработили за инхибиране растежа на бактериите. Това говори, че подхода е изключително ефективен.

11. Направените по-горе изводи от 1 до 10 доказват, че има потенциална възможност за използване на АСОи като антибактериални агенти по описаният в тази докторска дисертация метод, които да се свързват комплементарно с аптамерните домени на съответните рибопревключватели и успешно да потискат растежа на 59 патогенни бактерии при човека, при които са установени рибопревключватели. В този смисъл резултатите от тази докторска дисертация могат да имат важно приложение в създаването на нови методи за създаване на нови антибактериални агенти с директни приложения във фармацевтичната и биотехнологичната индустрия.

## **8. Приноси**

1. За първи път са използвани рибопревключватели като мишени за свързване с АСОи, което води до инхибиране растежа на определени бактерии. Създадения метод има потенциал да се използва за създаване на различни АСОи, които да инхибират растежа на 59 бактериални патогенна, в чиито геноми се открити рибопревключватели.
2. Направен е пълен биоинформатичен анализ за наличието на ФМН рибопревключвателя в геномите на всички известни условни и безусловни патогенни при човека, като е установено, че той се среща при 30 от тях. Заедно с това е проведен анализ на биохимичните пътища за синтез на ФМН, които показват, че ФМН рибопревключвателят е подходяща мишена за създаване на нови антибактериални агенти.

3. Създаден е химерен АСО-1 с антибактериални свойства, който се свързва специфично с ФМН рибопревключвателя и инхибира растежа на *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *E. coli*. Подобни АСОи могат да се използват за инхибиране растежа на 30 патогенни бактерии, при които се среща ФМН рибопревключвателя.
4. Доказана е специфичността на действие на АСО-1, както и неговата МИК-80 концентрация от 700 nM (4,5 µg/ml). Установено е, че при тази концентрация АСО-1 няма токсичен ефект върху клетки от човешката линия от недребноклетъчен рак на белия дроб A549. Това създава реална възможност за използването на АСО-1 за ФМН рибопревключвателя в по-нататъчни предклинични и клинични изследвания, които биха могли да доведат до създаване на нови антибактериални лекарства.
5. Направен е пълен биоинформатичен анализ за наличието на САМ-I рибопревключвателя в геномите на всички известни условни и безусловни патогенни при човека, като е установено, че той се среща при 9 от тях. Заедно с това е проведен анализ на биохимичните пътища за синтез на САМ, които показват, че САМ-I рибопревключвателят е подходяща мишена за създаване на нови антибактериални агенти.
6. Създаден е химерен АСО-3 с антибактериални свойства, който се свързва специфично със САМ-I рибопревключвателя и инхибира растежа на *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *B. subtilis*. Подобни АСОи могат да се използват за инхибиране растежа на останалите патогенни бактерии, при които се среща САМ-I рибопревключвателя.

7. Доказана е специфичността на действие на АСО-3, както и неговата МИК-80 концентрация от 700 nM (4,4 µg/ml). Установено е, че при тази концентрация АСО-3 няма токсичен ефект върху клетки от човешката линия от недребноклетъчен рак на белия дроб A549. Това създава реална възможност за използване на АСО-3 за САМ-I рибопревключвателя в по-нататъчни предклинични и клинични изследвания, които биха могли да доведат до създаване на нови антибактериални лекарства.

## 9. Литература

1. Breaker RR. Riboswitches and the RNA World. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2012;4(2).
2. Ott E, Stolz J, Lehmann M, Mack M. The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*. Rna Biology 2009;6(3):276-80.
3. Winkler WC. Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. Current Opinion in Chemical Biology 2005;9(6):594-602.
4. Lee ER, Blount KF, Breaker RR. Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. Rna Biology 2009;6(2):187-94.
5. Mansjo M, Johansson J. The Riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection. Rna Biology 2011;8(4):674-80.
6. Rode AB, Endoh T, Sugimoto N. Key Tertiary Interactions in FMN Riboswitch Aptamers Required for Ligand Binding. Bulletin of the Chemical Society of Japan 2015;88(7):946-48.
7. Cruz JA, Westhof E. The Dynamic Landscapes of RNA Architecture. Cell 2009;136(4):604-09.
8. Pedrolli D, Langer S, Hobl B, et al. The ribB FMN riboswitch from *Escherichiacoli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. Febs Journal 2015;282(16):3230-42.

9. Serganov A, Huang LL, Patel DJ. Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature* 2009;458(7235):233-U10.
10. Grill S, Busenbender S, Pfeiffer M, Kohler U, Mack M. The bifunctional flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase from *Streptomyces davawensis* produces inactive flavin cofactors and is not involved in resistance to the antibiotic roseoflavin. *Journal of Bacteriology* 2008;190(5):1546-53.
11. Corbino KA, Barrick JE, Lim J, et al. Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biology* 2005;6(8).
12. Eschbach SH, St-Pierre P, Penedo JC, Lafontaine DA. Folding of the SAM-I riboswitch A tale with a twist. *Rna Biology* 2012;9(5):535-41.
13. Batey R, Gilbert SD, Montange RK, Stoddard CI. Structure and mechanism of ligand recognition by the SAM and purine riboswitches. *Biophysical Journal* 2007:192a-92a.
14. Soukup J, Ward V. Structural characterization of the S-adenosylmethionine riboswitch. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 2007;233:172-72.
15. Fuchs RT, Grundy FJ, Henkin TM. S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the S-MK box translational riboswitch RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(12):4876-80.
16. Lu CR, Ding F, Chowdhury A, et al. SAM Recognition and Conformational Switching Mechanism in the *Bacillus subtilis* yitJ S Box/SAM-I Riboswitch. *Journal of Molecular Biology* 2010;404(5):803-18.
17. McPhie P, Brown P, Chen B, Dayie TK, Minton AP. Modulation of Conformational Equilibria in the S-Adenosylmethionine (SAM) II Riboswitch by SAM, Mg<sup>2+</sup>, and Trimethylamine N-Oxide. *Biochemistry* 2016;55(36):5010-20.
18. Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibiotic resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opinion on Drug Discovery* 2015;10(6):631-50.
19. Penchovsky R, Stoilova CC. Riboswitch-based antibacterial drug discovery using high-throughput screening methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2013;8(1):65-82.

20. Aghdam EM, Hejazi MS, Barzegar A. Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene* 2016;592(2):244-59.
21. Blount KF, Breaker RR. Riboswitches as new antibiotics targets. *Faseb Journal* 2008;22.

**10. Списък на публикации, върху които е основана тази докторска дисертация**

1. Penchovsky, R. & Traykovska, M. „Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do?” *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10, 631-650 (2015) – Impact factor (IF:4), Реферирана в Scopus.

<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84929933183&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&sid=9EA2479AE731DC3D38C654600586E3F2.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3a230&sot=autdocs&sdt=autdocs&sl=18&s=AU-ID%2856656488000%29&relpos=1&citeCnt=2&searchTerm=>

Установени 9 цитирания:

[https://scholar.google.com/citations?view\\_op=view\\_citation&hl=bg&user=8WhjMXAAAAAJ&citation\\_for\\_view=8WhjMXAAAAAJ:Se3iqnhoufWC](https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=bg&user=8WhjMXAAAAAJ&citation_for_view=8WhjMXAAAAAJ:Se3iqnhoufWC)

2. Penchovsky, R. & Traykovska, M. Chapter 12: Synthetic Approaches to Biology: Engineering gene control circuits, synthesizing, and editing genomes, *Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering: An Imprint of IGI Global*, ISBN13: 9781466698116, 330-360 (2016), Реферирана в Scopus.

<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84981492542&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&sid=9EA2479AE731DC3D38C654600586E3F2.wsnAw8kcdt7IPYLO>

[0V48gA%3a230&sot=autdocs&sdt=autdocs&sl=18&s=AU-ID%2856656488000%29&relpos=0&citeCnt=0&searchTerm](http://0V48gA%3a230&sot=autdocs&sdt=autdocs&sl=18&s=AU-ID%2856656488000%29&relpos=0&citeCnt=0&searchTerm)

## 12. Автобиография

### Лична информация

Име    Мартина Трайковска  
Адрес  ул. „Слав Караславов“ 13, кв. Витоша  
Телефон 0892466205  
e-mail  martins\_bt@hotmail.com  
Националност  Македонско и Българско  
Дата на раждане  02.03.1990

### Трудов стаж

Дати (от-до)  2014-2017  
Име и адрес  СУ „Св.Климент Охридски“ -Биологически  
на работодателя  Биологически факултет  
                  бул. „Драган Цанков“, 8  
Вид на дейността  редовна докторантура  
                  2016-2017  
                  Биолог-специалист на половин работен ден

### Преподавателска дейност

Водене на упражнения по Синтетична биология и Геномика на студенти магистри в магистърски програми „Генетика и Геномика“ и „Генно и клетъчно инженерство“ в катедра Генетика на Биологически Факултет, СУ „Св.Климент Охридски

### Образование и обучение

Дати (от-до)  2014-2017  
Име и вид  СУ „Св.Климент Охридски“



на обучаващата или образователна организация	Биологически факултет Редовна докторантура Биологически науки (Генетика-Синтетична биология)
Дати (от-до)	2012-201
Име и вид на обучаващата организация	СУ „Св. Климент Охридски“ - Биологически факултет
Ниво на придобитата квалификация	Магистърска програма
Наименование на придобитата квалификации	Геннен инженер
Основни застъпени предмети	Генно и клетъчно инженерство Синтетична биология, Биоинформатика Молекулярна биология Имунобиотехнология Геномика
Дати (от-до)	2008-2014
Име и вид на обещаващата организация	СУ „Св. Климент Охридски“ Биологически факултет
Ниво на придобитата квалификация	Бакалавърска степен
Наименование на придобитата	Молекулярен биолог

квалификации

Основни	Молекулярна генетика, Микробиология
застъпени предмети	Молекулярна биология, Биохимия
Езици	Македонски (майчин език) Български, Сръбски, Испански, Френски (сертификат за ниво А1) Английски (сертификат за С1 ниво) Италиански (сертификат за А1 ниво)