

ДИЗАЙН НА АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ  
И ПРИЛОЖЕНИЕТО ИМ  
КАТО АНТИБАКТЕРИАЛНИ АГЕНТИ:  
ПРИНЦИПИ, МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ  
И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА



Martina Traykovska • Robert Penchovsky

DESIGN OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES  
AND THEIR APPLICATIONS  
AS ANTIBACTERIAL AGENTS:  
PRINCIPLES, MECHANISMS OF ACTION  
AND CHALLENGES

Sofia • 2025

St. Kliment Ohridski University Press

Мартина Трайковска • Роберт Пенчовски

ДИЗАЙН НА АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ  
И ПРИЛОЖЕНИЕТО ИМ  
КАТО АНТИБАКТЕРИАЛНИ АГЕНТИ:  
ПРИНЦИПИ, МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ  
И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА

София • 2025

Университетско издателство „Св. Климент Охридски“



### Рецензенти

акад. проф. д-р Иван Георгиев Иванов,  
Институт по молекулярна биология (ИМБ) – БАН

акад. проф. д-р Атанас Иванов Атанасов,  
Селскостопанска академия – БАН

проф. д-р Радостина Ивайлова Александрова,  
Институт по експериментална морфология,  
патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) – БАН

### Научни редактори

проф. д-р Петя Койчева Христова,  
катедра „Обща и промишлена микробиология“,  
Биологически факултет,  
Софийски университет „Св. Климент Охридски“

гл. ас. д-р Николет Илиева Павлова,  
Лаборатория по Синтетична Биология и Биоинформатика,  
Биологически Факултет,  
Софийски университет „Св. Климент Охридски“

© 2025 Мартина Трайковска, Роберт Пенчовски  
© 2025 Антонина Георгиева, дизайн на корицата  
© 2025 Университетско издателство „Св. Климент Охридски“

ISBN 978-954-07-6132-9

# СЪДЪРЖАНИЕ

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Благодарности</b>                                                                     | 9  |
| <b>Информация за професионалното развитие на авторите</b>                                | 11 |
| <b>Резюме</b>                                                                            | 13 |
| <b>Summary</b>                                                                           | 15 |
| <b>Въведение</b>                                                                         | 17 |
| <b>Глава I. Класове антибиотици и механизми на действие</b>                              | 21 |
| 1.1. Различни класове антибиотици                                                        | 21 |
| 1.2. Механизми на действие на антибиотиките                                              | 29 |
| 1.2.1. Инхибитори на репликацията на бактериалната ДНК                                   | 30 |
| 1.2.2. Инхибитори на транскрипцията на бактериалната ДНК                                 | 32 |
| 1.2.3. Инхибитори на белтъчния синтез                                                    | 32 |
| 1.2.4. Инхибитори на метаболизма на фолиевата киселина                                   | 34 |
| 1.2.5. Инхибитори на синтеза на цитоплазмената мембрана                                  | 35 |
| 1.2.6. Инхибитори на синтеза на клетъчната стена                                         | 37 |
| <b>Глава II. Механизми на възникване и разпространение на антибиотична резистентност</b> | 42 |
| 2.1. Причини за възникване на антибиотична резистентност при бактериите                  | 42 |
| 2.2. Механизми на възникване на антибиотична резистентност при бактериите                | 49 |
| 2.2.1. Модификации на антибиотик                                                         | 49 |
| 2.2.2. Разграждане на антибиотика                                                        | 51 |
| 2.2.3. Промени в таргетните места на свързване на антибиотика                            | 53 |
| 2.2.3.1. Предпазване на мишената                                                         | 54 |
| 2.2.3.2. Модификации на мишената                                                         | 55 |
| 2.2.3.2.1. Модификации на мишената чрез възникване на точкови мутации                    | 55 |
| 2.2.3.2.2. Ензимна модификация на мишената                                               | 56 |
| 2.2.3.2.3. Промяна или заобикаляне на мишената                                           | 57 |

|                                                                                                              |                                                                                                   |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.4.                                                                                                       | Препотвратяване на достъпа на антибиотика до мишената                                             | 58  |
| 2.2.4.1.                                                                                                     | Понижаване на пермеабилитета на клетъчната мембрана                                               | 58  |
| 2.2.4.2.                                                                                                     | Ефлуксни помпи                                                                                    | 59  |
| 2.2.5.                                                                                                       | Резистентност чрез глобални адаптации на бактериалната клетка                                     | 61  |
| <b>Глава III. Множествена антибиотична резистентност (MAP) – разпространение и риск за здравето</b>          |                                                                                                   | 63  |
| 3.1.                                                                                                         | Разпространение на MAP при бактериите                                                             | 63  |
| 3.1.1.                                                                                                       | Метицилин-резистентен <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)                                         | 65  |
| 3.1.2.                                                                                                       | Ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE)                                                           | 66  |
| 3.1.3.                                                                                                       | Карбапенем-резистентен <i>Acinetobacter baumannii</i> (CRAB)                                      | 67  |
| 3.1.4.                                                                                                       | Мултирезистентни щамове на <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                          | 68  |
| 3.1.5.                                                                                                       | <i>Enterobacteriaceae</i> резистентни към карбапенем                                              | 68  |
| <b>Глава IV. Бактериалните рибопревключватели като нови мишени за създаване на антибактериални лекарства</b> |                                                                                                   | 70  |
| 4.1.                                                                                                         | Разпространение на рибопревключвателите                                                           | 72  |
| 4.2.                                                                                                         | Структурна организация на рибопревключвателите и видове лиганди                                   | 77  |
| 4.3.                                                                                                         | Структура, функция и механизми на действие на най-разпространените бактериални рибопревключватели | 81  |
| 4.3.1.                                                                                                       | ФМН рибопревключвател                                                                             | 81  |
| 4.3.2.                                                                                                       | САМ-I рибопревключвател                                                                           | 88  |
| 4.3.3.                                                                                                       | Рибопревключвател за лизин                                                                        | 91  |
| 4.3.4.                                                                                                       | ТПФ рибопревключвател                                                                             | 92  |
| 4.3.5.                                                                                                       | glmS рибопревключвател                                                                            | 98  |
| 4.3.6.                                                                                                       | Пуринови рибопревключватели                                                                       | 100 |
| 4.3.7.                                                                                                       | Рибопревключвател за кобаламин (витамин B12)                                                      | 102 |
| <b>Глава V. Видове антисенс олигонуклеотиди, механизми на действие, стабилност и приложение</b>              |                                                                                                   | 104 |
| 5.1.                                                                                                         | Първо поколение антисенс олигонуклеотиди                                                          | 106 |
| 5.2.                                                                                                         | Второ поколение антисенс олигонуклеотиди                                                          | 108 |
| 5.3.                                                                                                         | Трето поколение антисенс олигонуклеотиди                                                          | 108 |
| 5.3.1.                                                                                                       | Заклучена нуклеинова киселина                                                                     | 109 |

|                                                                                                                            |                                                                                                                                               |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.2.                                                                                                                     | Пептид нуклеинова киселина                                                                                                                    | 110 |
| 5.3.3.                                                                                                                     | Морфолинови олигонуклеотиди                                                                                                                   | 111 |
| <b>Глава VI. Фактори, влияещи върху терапевтичната активност на антисенс олигонуклеотидите</b>                             |                                                                                                                                               | 112 |
| 6.1.                                                                                                                       | Биодоставка на антисенс олигонуклеотиди                                                                                                       | 112 |
| 6.1.1.                                                                                                                     | Биодоставка на антисенс олигонуклеотиди чрез клетъчно проникващи пептиди                                                                      | 114 |
| 6.1.2.                                                                                                                     | Биодоставка на антисенс олигонуклеотиди чрез липозоми                                                                                         | 116 |
| 6.1.3.                                                                                                                     | Биодоставка на антисенс олигонуклеотиди чрез антители                                                                                         | 118 |
| 6.2.                                                                                                                       | Стабилност на антисенс олигонуклеотидите                                                                                                      | 119 |
| 6.3.                                                                                                                       | Токсичност на антисенс олигонуклеотидите                                                                                                      | 119 |
| <b>Глава VII. Рационален дизайн при създаване на нови антисенс олигонуклеотиди като антибактериални лекарства</b>          |                                                                                                                                               | 121 |
| <b>Глава VIII. Антисенс олигонуклеотиди, инхибиращи функцията на рибопревключвателите като антибактериални агенти</b>      |                                                                                                                                               | 125 |
| 8.1.                                                                                                                       | Дизайн на АСО-и, които се свързват с аптамерната част на ТПФ рибопревключвателя и инхибират бактериалния растеж на <i>Helicobacter pylori</i> | 126 |
| 8.1.1.                                                                                                                     | Дизайн на антисенс олигонуклеотиди за свързване с аптамерния домейн на ТПФ рибопревключвателя                                                 | 127 |
| 8.1.2.                                                                                                                     | Инхибиране на бактериалния растеж на <i>H. pylori</i> чрез инхибиране на експресията на ТПФ иРНК от антисенс олигонуклеотиди                  | 128 |
| <b>Глава IX. Перспективи за създаване и прилагане на нови лекарства, базирани на синтетичните антисенс олигонуклеотиди</b> |                                                                                                                                               | 134 |
| <b>Дискусия</b>                                                                                                            |                                                                                                                                               | 140 |
| <b>Заклучение</b>                                                                                                          |                                                                                                                                               | 144 |
| <b>Използвани съкращения</b>                                                                                               |                                                                                                                                               | 146 |
| <b>Описание на основните понятия</b>                                                                                       |                                                                                                                                               | 149 |
| <b>Използвана литература</b>                                                                                               |                                                                                                                                               | 150 |





## БЛАГОДАРНОСТИ

Изказваме най-искрените си благодарности към рецензентите на тази монография за оказаната подкрепа и насърчение при поемането по трудния, но вълнуващ път на науката и академичната кариера.

Искаме да благодарим и на редакторите за техните съвети, насоки и препоръки, които ни помогнаха при оформянето на нашата монография.

Изследванията в тази монография са финансирани от ФНИ МОН по проект КП-06-Н63/1/13.12.2022 с научен ръководител проф. д-р Роберт Пенчовски и КП-06-М63/6/15.12.2022 с научен ръководител гл. ас. д-р Мартина Трайковска.



## ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРОФЕСИОНАЛНОТО РАЗВИТИЕ НА АВТОРИТЕ

Гл. ас. д-р Мартина Трайковска е преподавател и изследовател в Лабораторията по синтетична биология и биоинформатика към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Лабораторията е създадена през 2023 г. под ръководството на проф. д-р Роберт Пенчовски. В нея той предава своя опит и знания, придобити в Германия и САЩ, които преплита с иновативни подходи в реални и успешни проучвания в областта на синтетичната биология и биоинформатиката. Това е предпоставка за последващата отличната реализация на студентите, придобиващи знания и практически умения във важни области от съвременната биология.

Под ръководството на проф. Пенчовски, гл. ас. д-р Мартина Трайковска защитава дипломната си работа по генно и клетъчно инженерство, а след това и докторската теза по генетика, към катедра „Генетика“ на Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“. През последните 6 години тя успешно води упражнения по дисциплините молекулярна генетика, синтетична биология, въвеждане в биоинформатиката и биоинформатика и молекулярна еволюция и ръководи научни проекти с насоченост към дизайн на антисенс олигонуклеотиди. Гл. ас. д-р Трайковска е носител на първа награда за най-успешен проект в областта на биологичните науки за 2021 г., представен на Софийския фестивал на науката 15–16 май 2021 г., както и първа награда за най-добра научна работа на млад микробиолог в страната, присъдена ѝ от Фондация „Акад. проф. д-р Стефан Ангелов“. Тя е автор на 25 научни статии с общ импакт фактор 35 и над 200 цитирания, от които 150 са в Scopus.

Проф. Пенчовски е професор по молекулярна генетика, синтетична биология и биоинформатика и ръководител на лаборатория по синтетична биология и биоинформатика. Той получава докторската си степен по генетика в Кьолнския университет, Германия, и провежда постдокторантурата си в Йейлския университет, Ню Хейвън, САЩ. През годините е работил като софтуерен инженер, биотехнологичен консултант и изследовател по молекулярна биология в Института по молекулярна биология в София, България, и

В бившия Институт по молекулярна биотехнология в Йена, Германия (днес Институт по изследване на молекулните механизми на стареенето „Лайбниц“, Германия).

Проф. Пенчовски е ръководител на 13 научни проекта. Това позволява на студентите му и младите учени, под негово ръководство, да се докоснат до съвременната наука на територията на Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“ и да участват в проучвания, които са публикувани във високо импактирани списания като: Nature Biotechnology, Nature Methods, ACS Synthetic Biology, RSC Chemistry World и др. Проектът „Дизайн и експериментално валидиране на химерни антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти“ (договор ДН13/14/20.12.2017 г. с ФНИ) е един от най-успешните проекти в България. Резултатите от него са представени в 20 публикации с импакт фактор 84 точки, Q1-4-254 (<https://penchovsky.atwebpages.com/research.php?page=13>).

Основните дисциплини, които проф. Пенчовски преподава са молекулярна генетика на бакалаври от специалност „Молекулярна биология“ и „Синтетична биология“, биоинформатика и молекулярна еволюция, геномика и живите организми като информационни системи на магистри от специалност „Генно и клетъчно инженерство“ и „Генетика и геномика“. Атестат за методичната работа на професора е и това, че за последните 5 години, 6 млади учени, защитиха своите докторски дисертации под ръководството на проф. Пенчовски. За последните 12 години, 7 магистри по „Молекулярно (генно) и клетъчно инженерство“ и 9 магистри по „Генетика и геномика“ на английски и български език защитиха своите магистърски дипломни работи. Сред тях има хора от 5 различни националности. Научните статии на проф. Пенчовски са с общ импакт фактор над 250 точки и с над 1420 цитирания, от които 1011 са в Scopus.

## РЕЗЮМЕ

През последните няколко десетилетия антибиотичната резистентност (AR; antibiotic resistance – AR) се очертава като значително предизвикателство за съвременната медицина поради нарастването на броя на патогенни бактериални щамове, устойчиви към всички известни антибиотици. Смъртността на хора, причинена от резистентни бактериални щамове, в световен мащаб нараства, а успоредно с това се повишава необходимостта от създаване на нови антибиотици. В тази монография са описани методите за създаване на антисенс олигонуклеотиди (АСО-и) като нови антибактериални агенти, механизмите на тяхното действие и предизвикателствата за техните приложения. АСО-ите са проектирани специфично да се свързват с рибопревключватели, които се намират в генома на почти всички патогенни бактерии. Повечето бактериални рибопревключватели са разположени в 5'-нетранслирания район (5'-НТР; 5' -untranslated region – 5'-UTR) на информационни рибонуклеинови киселини (иРНК; messenger RNAs – mRNAs). Повечето от тях функционират като алостерични цис-действащи елементи, контролиращи генната експресия на важни за бактерията гени. До днес няма данни за открити рибопревключватели в човешкия геном, което ги прави подходяща мишена за създаване на нови антибактериални агенти. Те регулират синтеза на жизненоважни клетъчни метаболити в различни патогенни бактерии по механизма на обратната негативна връзка – свързват се директно с крайния метаболит от биосинтетичния път. Контролът на генната експресия се осъществява на ниво транскрипция или трансляция. Чрез използване на рибопревключватели като мишени ние разработваме иновативни стратегии за създаване на нови антибактериални агенти, които биха могли да се използват и срещу резистентни към антибиотици бактерии. Това допринася за развитието на по-ефективни методи за създаване на нови антибактериални агенти. Представеният в настоящата монография иновативен подход се основава на рационален дизайн и приложение на химерни АСО-и като антибактериални агенти. Дизайнът на АСО-ите се базира на изцяло биоинформатичен анализ, чрез който прецизно се определя нуклеотидната им последователност с цел специфично свързване с таргетния рибопревключвател. АСО-ите са химически модифицирани, за да се повиши тях-

ната ефективност, както и устойчивост спрямо действието на нуклеазните ензими в клетката. Освен това АСО-ите се свързват с клетъчно проникващ пептид (КПП; cell penetrating peptide – CPP), чрез който проникват в клетката – както в Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, така и в еукариотни клетки. Освен рационалния дизайн на АСО-и ние избираме конкретни рибопреключватели като мишени за тях по чисто рационални биоинформатични критерии. Тази монография разглежда всички основни аспекти на потенциалното създаване и използване на антибиотици през призмата на антисенс олигонуклеотидната технология като нова гледна точка.

Тази публикация представлява научна монография, както е отбелязано в писмените становища на тримата научни рецензенти. Тя е написана в съответствие с българските нормативните изисквания за монография.

## SUMMARY

Over the past few decades, antibiotic resistance (AR) has emerged as a significant challenge for modern medicine due to the spread of the many pathogenic bacterial strains resistant to all known antibiotics. As a result, the human mortality rate caused by antibiotic-resistant bacterial strains is growing worldwide. Thus, there is a need to develop new antibiotics. This monograph describes methods for creating antisense oligonucleotides (ASOs) as new antibacterial agents, the mechanisms of their action, and the challenges for their applications. ASOs are explicitly designed to bind riboswitch RNAs, which are present in the genome of almost all pathogenic bacteria. Most bacterial riboswitches are located in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of messenger ribonucleic acids (mRNAs; RNAs – mRNAs). Most of them function as allosteric cis-acting elements controlling the gene expression of essential bacterial genes. There is no evidence that riboswitches are found in the human genome, making them suitable targets for developing new antibacterial agents. Riboswitches regulate the synthesis of vital cellular metabolites in various pathogenic bacteria by negative feedback – they bind directly to the final metabolite of the biosynthetic pathway.

The control of gene expression is carried out at a transcriptional or translational level. Using riboswitches as targets, we develop innovative strategies for developing new antibacterial agents that could be used against antibiotic-resistant bacteria. That contributes to creating more efficient methods for developing new antibacterial agents. This monograph presents an innovative approach based on the rational design and application of chimeric ASOs as antibacterial agents. The design of the ASOs is based on entirely bioinformatic analyses, through which their nucleotide sequence is precisely determined to bind to the target riboswitch specifically. ASOs are chemically modified to increase their effectiveness and resistance to the effects of nuclease enzymes in the cell. The ASOs are attached to cell-penetrating peptide (CPP), through which they can penetrate the cell in Gram-negative and Gram-positive bacteria and eukaryotic cells. In addition to the rational design of ASOs, we choose specific riboswitches as targets based on purely rational bioinformatics criteria. This monograph examines all the significant aspects of the potential creation and use of antibiotics through the prism of antisense oligonucleotide technology.

This publication is a scientific monography, as noted in the written opinions of the three scientific reviewers. It is written under the Bulgarian normative requirements for a monography.





## ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години нуклеиновите киселини (НК; nucleic acids – NA) се утвърдиха като подходящ обект за създаване на синтетични биосензори чрез различни инженерни методи, като *in vitro* селекция и компютърна селекция. В допълнение към тях бяха открити нови механизми за контрол на генна експресия чрез различни типове РНК-и, включително микроРНК-и (миРНК-и, microRNAs – miRNAs), малки интерфериращи РНК(и) (миРНК(и); small interfering RNAs – siRNA), рибопревключватели и рибозими (Hombach & Kretz, 2016). Понастоящем има четири различни стратегии за синтетичен контрол на генна експресия, основаващи се на инженерство на НК. Тези стратегии имат за цел да инхибират експресията на специфични РНК-и в клетката като некодиращи РНК-и (нкРНК-и, non-coding RNAs – ncRNAs), антисенс олигонуклеотиди (АСО-и), рибозими и CRISPR-Cas9 системи (Jiang & Doudna, 2017). Всички тези системи за синтетичен контрол на генна експресия могат да бъдат създадени чрез методите на рационален дизайн. За откриване на нови лекарства РНК може да изпълнява ролята на мишена и на лекарство. Тези методи могат да се използват за създаване на нови терапевтични подходи за лечение на различни заболявания чрез модификация на хроматина, придобиване на имунитет чрез РНК-базирана ваксинация, специфично инхибиране на информационна РНК чрез АСО-и, блокиране на сплайсинг на пре-иРНК, блокиране на транслацията на РНК или генно инхибиране, базирано на миРНК(и).

РНК изпълнява най-различни функции в клетката в сравнение с дезоксиноуклеиновата киселина (ДНК; deoxynucleic acid – DNA) и пептидите включително биосензорна функция, пренос и съхранение на генетична информация. Най-важните ѝ роли са транскрипция и транслация на гени, чиито процеси протичат с участието на иРНК, транспортна РНК (тРНК; transport RNA – tRNA) и рибозомна РНК (рРНК; ribosomal RNA – rRNA) (Spirov, 2023). Освен това РНК може да има и каталитична функция, изпълнявана от рибозими, био сензорна функция, изпълнявана от рибопревключватели и генно регулаторна функция изпълнявана от нкРНК-и, рибопревключвателите и някои рибозими като glmS рибозим. Из-

вършвайки гореописаните функции, РНК може да изпълнява своята роля посредством своята първична или третична структура. Тези РНК молекули, които изпълняват своята функция чрез 3D структури, са известни като функционални РНК-и (Dai, Zhang, & Zaleta-Rivera, 2020). Тук се включват рибопревключвателите. Те образуват сложни третични структури подобно на протеините, наречени аптамери, чрез които усещат присъствието на малки молекули в клетката като гуанин, аденин, тиамин пирофосфат (ТПФ; thiamine pyrophosphate – TPP), флавин мононуклеотид (ФМН; flavine mononucleotide – FMN) и много други. Освен това рибопревключвателите могат да хибридуват с други НК-и. Тези уникални свойства на функционалните РНК молекули ги правят много подходящи мишени за откриване на нови лекарства – малки молекули или АСО-и.

РНК е химически по-нестабилна от ДНК поради наличието на 2'-хидроксилната група на рибозата, което при *in line* конформация води до трансестерификация на фосфодиестерната връзка на РНК (Miao & Westhof, 2017). Много каталитични РНК-и, като хамерхед рибозима (вторичната му структура има форма на гърводелски чук), могат да катализират реакцията на трансестерификация с ускоряване от около милион пъти в сравнение със спонтанната некатализирана реакция.

Дестабилизирането на иРНК-и е подход за регулация на генната експресия чрез различни механизми в еукариоти и прокариоти. В еукариотните организми нкРНК-и, които участват в процеса на инхибиране на специфични РНК-и, се класифицират в две групи – миРНК-и и къси некодиращи РНК-и (нкнРНК; short non-coding RNA – sncRNA), които се образуват от дългите некодиращи РНК-и (днкРНК, long non-coding RNA – lncRNA). Откриването на генното заглушаване от нкРНК-и в много различни организми – от растения до бозайници, включително и хора, разшири разбирането на ролята на РНК в клетката (Toden, Zumwalt, & Goel, 2021; Sheikhnia et al., 2024). Това дава възможност за използването им като мишени за откриване и разработване на нови лекарства. Установяване на механизмите на РНК интерференция (РНК(и); RNA interference – RNAi) с цел контрол на генната експресия предоставя молекулярни инструменти, които могат да се използват за разработване на нови лекарства (Agrawal et al., 2003). Към момента са известни няколко лекарствени молекули (лекарства „сираци“) срещу нерв-