



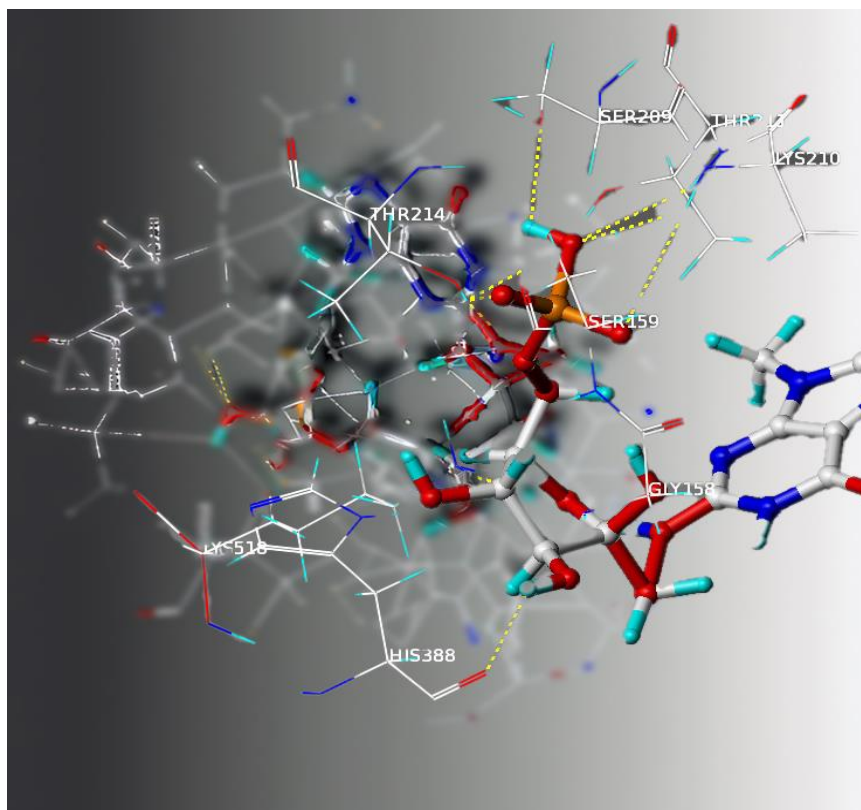
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“

# АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“  
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ 4.3 Биологически науки, специалност Молекулярна биология

**ЕЛИЦА ХРИСТОВА БОТЕВА**

## ДНК ДЕГЛИКИРАЩА АКТИВНОСТ НА ГЛИКОЛИТИЧНИЯ ЕНЗИМ ФОСФОГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗА



НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ ПРОФ. Д-Р РУМЯНА МИРОНОВА

София, 2024

***СЪРДЕЧНИ БЛАГОДАРНОСТИ НА НАУЧНИЯ МИ РЪКОВОДИТЕЛ – ПРОФ. Д-Р МИРОНОВА, КОЯТО  
МИ ОКАЗА БЕЗЦЕННА ПОМОЩ И ПОДКРЕПА  
В ЦЕЛИЯ ПРОЦЕС ПО ИЗРАБОТКА НА ДИСЕРТАЦИЯТА  
И МЕ ВДЪХНОВИ ДА ВЪРВЯ ПО ПЪТЯ НА НАУКАТА***

***СПЕЦИАЛНИ БЛАГОДАРНОСТИ НА ПРОФ. Д-Р ЦВЕТАН ГАНЧЕВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТИТЕ СВЪРЗАНИ  
С МОЛЕКУЛНОТО МОДЕЛИРАНЕ***

# СЪДЪРЖАНИЕ

1.	ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД	1
2.	ВЪВЕДЕНИЕ	2
3.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	3
4.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	4
5.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	5
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	35
7.	ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	36
8.	НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ	37
9.	НАУЧНИ ФОРУМИ	37
10.	ЛИТЕРАТУРА	38

**ПУБЛИЧНАТА ЗАЩИТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ЩЕ СЕ СЪСТОИ НА 29.10.2024 Г.**

**В ЗАСЕДАТЕЛНАТА ЗАЛА НА ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И**

**ГЕНЕТИКА - БАН УЛ. „АКАД. Г. БОНЧЕВ“ 21 ЕТ.2**

## **ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

Дисертационният труд включва Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати, Обсъждане на резултатите, Изводи, Приноси, Научни публикации, Научни форуми и Литература. Общият обем на дисертацията е 177 страници, в които са включени 3 таблици, 55 фигури и 287 литературни източника.

**Настоящият дисертационен труд е извършен с финансовата подкрепа на:**

Фонд „научни изследвания“ към МОН с договор номер ДИД02/31/17.12.2009 г. и ДН01/5/16.12.2016 г.; DAAD стипендия реф. номер 91573793, 2015 г. и програма за подпомагане на младите учени в БАН с номер ДФНП-79/28.04.2016 г.

## ВЪВЕДЕНИЕ

В началото на миналия век френският химик Луи Камий Майяр провежда изследвания върху синтеза на пептиди. По онова време, когато механизмите на белтъчния биосинтез са все още загадка, той се опитва да разбере естествения начин на полимеризация на аминокиселините при „меки“ физиологични условия. За тази цел той използва D-глюкоза, широко разпространена захар в биологичните системи, като мек кондензиращ агент. Така той открива, че чрез своята алдехидна група глюкозата може да взаимодейства с аминокиселините. С това свое откритие Майяр не само допринася за развитието на органичната химия, но и гениално предсказва, че "Последиците от тези факти ще се окажат интересни в различни области на науката, не само в човешката физиология и патология".

Значението на **Майяровата реакция** в хранителната химия е осъзнато скоро, където тя придобива популярност под названието **реакция на покафеняване** поради характерния цвят на термично обработваните храни. Едва в края на 70-те години на миналия век обаче става ясно, че Майяровата реакция протича и в човешкия организъм и е причина за образуването на гликирания хемоглобин, който днес е рутинно използван маркер за диагностика и мониторинг на диабета. За Майяровата реакция, протичаща при физиологични условия в живите организми, се въвежда терминът **гликиране**. Тази реакция протича спонтанно (генетически непрограмирано) и заедно с други спонтанни химични реакции в организма уврежда структурата и функцията на биологичните макромолекули (основно белтъци и ДНК), като по този начин допринася за редица патологии и процесите на стареене при човека.

В процеса на еволюцията организмите са развили различни стратегии и механизми за предпазване срещу вредните последствия от гликирането. На тази тема е посветен и настоящият дисертационен труд. Изследванията ни започнаха с наблюдението, че в чревната бактерия *Escherichia coli* съществува механизъм за отстраняване на фруктозо-6-фосфатни остатъци от ДНК и приключиха с констатацията, че това се дължи на гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза, който в един каталитичен акт възстановява структурата на ДНК и освобождава захарта за използване в метаболитните пътища.

## ЦЕЛ

ДА СЕ ИДЕНТИФИЦИРА И ОХАРАКТЕРИЗИРА ДЕГЛИКИРАЩАТА АКТИВНОСТ В *ESCHERICHIA COLI* K12, ОТГОВОРНА ЗА ОТСТРАНЯВАНЕТО НА ФРУКТОЗО-6-ФОСФАТНИ ОСТАТЪЦИ ОТ ДНК

## ЗАДАЧИ

**Първата група задачи, която си поставихме включваше:**

1. Хроматографско фракциониране на лизат от *E. coli*
2. Двудимензионална (2D) електрофореза на хроматографска фракция, обогатена на ДНК-НН-F6P дегликазна активност
3. Секвениране на индивидуалните белтъци след 2D-електрофорезата

**След идентифицирането на ензима фосфоглюкозоизомеразата (Pgi) като вероятен носител на наблюдаваната ДНК-НН-F6P дегликазна активност си поставихме следните задачи:**

4. Изследване на фосфоглюкозоизомеразата на *E. coli* за ДНК-свързваща активност
5. Измерване на кинетичните константи на *E. coli* Pgi със субстрат ДНК-НН-F6P
6. Изследване на честотата на спонтанните мутации в *E. coli* щамове див тип и с делетиран ген за Pgi
7. Изследване на човешка PGI (hPGI) за ядрена локализация и ДНК-свързваща активност
8. Изследване на hPGI за ДНК-НН-F6P дегликираща активност
9. Изследване на изоформите на hPGI за наличие на сигнал за ядрена локализация
10. Сравняване на *E. coli* Pgi и hPGI с ДНК-репаративни ензими
11. Моделиране на гликиран ДНК-олигонуклеотид и свързването му с PGI чрез молекулен докинг *in silico*
12. Симулиране на изтръгването на гликиран гуанинов остатък от вътрешността на двойната спирала
13. Симулиране на навлизането на гликиран гуанинов остатък в каталитичния център на PGI

## МАТЕРИАЛИ

В изследванията използвахме следните бактериални щамове:

ЩАМ	ГЕНОТИП
<b>BW37935</b>	$\Delta(araD-araB)567, \Delta(lacA-lacZ)514(::kan), lacIp-4000(lacIq), \lambda^-, rpoS396(Am), rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514, \Delta frlB$
<b>BW28357</b>	$F^-, \Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda^-, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$
<b>BW28358</b>	$F^-, \Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda^-, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514, \Delta pgi, kan^r$

В изследванията използвахме човешките клетъчни линии от ембрионален бъбрек HEK293 и от простатен карцином PC3.

## МЕТОДИ

**Култивиране на *E. coli* и на човешки клетъчни линии**

**Изолиране на клетъчни лизати, субклетъчни фракции и ДНК**

**Гликиране на ДНК и ПНК:ДНК хибрид**

**Хроматографски методи** (обратнофазова течна хроматография под високо налягане (RP-UPLC), анионообменна хроматография, гел-филтрация чрез високоефективна течна хроматография (HPLC))

**Електрофоретични методи** (полиакриламидна електрофореза (SDS-PAGE), метод за отместване на комплекс белтък-ДНК в гел (GEL-SHIFT), двумензионална електрофореза (2D), агарозна електрофореза)

**Имунологични методи** (имуноблотинг, имунопреципитация на бактериални и еукариотни клетки, индиректна флуоресцентна микроскопия)

**Количествени методи** (флуориметрично измерване на ДНК концентрация със SYBR GREEN I, определяне на белтъчна концентрация, количествено определяне на Аматори продукти (APs), нефлуоресцентни и флуоресцентни AGEs в ДНК и количествено определяне на G6P в бактериални лизати)

**Ензимни тестове** (полимеразна верижна реакция (PCR), ДНК дегликазна активност, фосфоглюкозоизомеразна активност)

**Определяне честотата на спонтанните мутации в *E. coli***

**Мас-спектрални методи** (протеомен анализ, мас-спектрален анализ на ДНК/ПНК:ДНК хибрид)

**Статистически анализи**

**Биоинформатични анализи**

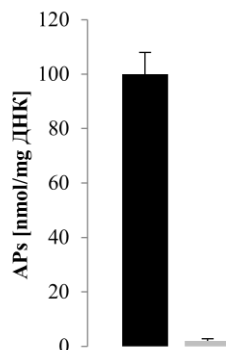
**Молекулно моделиране, докинг и молекулна динамика**

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. ПРЕДВАРИТЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА МИРОНОВА И СЪТР.

През 2005 г. Mironova *et al.* показват, че хромозомната ДНК на *E. coli* се гликира при естествени физиологични условия *in vivo*. Още в тази публикация те си поставят логичния въпрос за мутагенната природа на продуктите на гликиране в ДНК и за евентуалните механизми на тяхната поправка. Групата съсредоточава вниманието си върху ранните продукти на гликиране (APs), предполагайки че тяхното отстраняване (репарация) би предпазило ДНК от натрупването на AGEs, скъсвания на ДНК веригите и образуването на ковалентни междуверижни шивки. Те изследват ефекта на шест известни инхибитори на гликирането (аминогуанидин, ацетилсалицилова киселина, тиамин (витамин В1), витамините на витамин В6 пиридоксал-5'-фосфат, пиридоксамин и пиридоксин) в две концентрации 1 mM и 0.1 mM върху *E. coli*. Използват щам AB1157 на *E. coli*, увреден в катаболизма на три редуциращи захари - галактоза (galK2), арабиноза (araC14) и ксилоза (xylA5), който натрупва значително повече продукти на гликиране, поради метаболитния блок (Ханджийски и сътр., 2012). Резултатите от изследването показват, че инхибиторите на гликирането повлияват едновременно нивата на APs в хромозомната ДНК на *E. coli* и честотата на спонтанните мутации на бактериите от рифампицинова чувствителност (Rif<sup>s</sup>) към устойчивост (Rif<sup>r</sup>), като количеството APs в ДНК корелира със спонтанната мутагенеза.

Като следващата стъпка, те проверяват дали бактериални лизати могат да катализират освобождаване на гликираната ДНК от захарните адукти. За тази цел те получават субстрат ДНК-NH-F6P, чрез гликиране на ДНК с редуциращата захар глюкозо-6-фосфат (G6P), който субстрат третира с бактериален лизат от *E. coli* и отчитат количеството



Фиг. 1. КОЛИЧЕСТВО APs в ДНК-NH-F6P преди (■) и след (■) третиране с лизат от *E. coli*



APs преди и след третиране с лизата (Фиг. 1). Резултатът е почти напълно отстраняване на Амадори продуктите от ДНК след третиране с лизата. Въз основа на тези наблюдения, авторите изказват хипотезата, че в *E. coli* съществува специална ензимна активност, която катализира отстраняването на фруктозо-6-фосфатни остатъци от гликирана ДНК.

Проверката на тази хипотеза се превърна в крайъгълен камък на настоящия дисертационен труд.

## 2. ХРОМАТОГРАФСКО ФРАКЦИОНИРАНЕ НА БАКТЕРИАЛЕН ЛИЗАТ

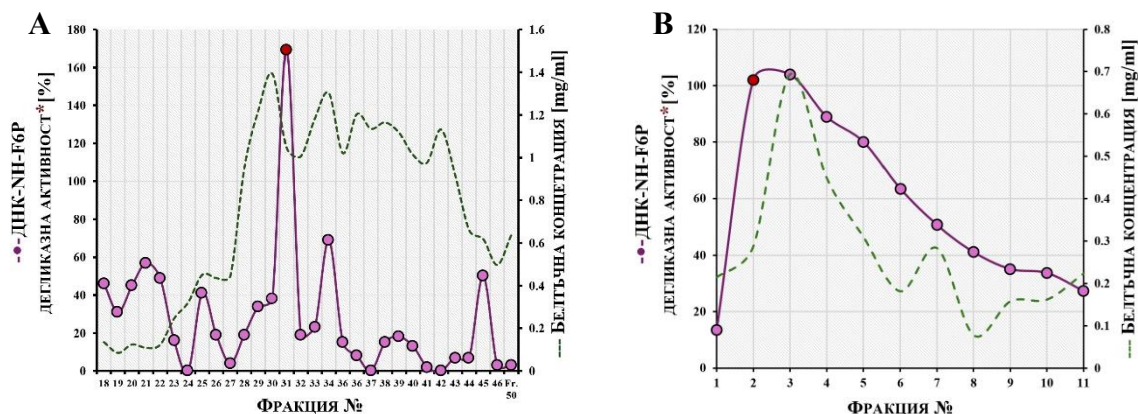
Цел на тези експерименти беше изолирането на белтъчна фракция от *E. coli* щам BW37935 (*ΔfrlB*), максимално обогатена на ДНК-NH-F6P-дегликазна активност, секвениране на белтъците от тази фракция и идентифициране на дегликазата. Възползвахме се от удобството на метода за откриване на ДНК-NH-F6P-дегликазна активност в обратната реакция – формиране на ДНК-NH-F6P при инкубиране на ДНК с глюкозо-6-фосфат (G6P) в присъствие на лизат от *E. coli* щам BW37935, подобно на известната *E. coli* фруктозолизин-6-фосфат дегликаза (*FrlB*), която в обратната на дегликиране реакция катализира натрупването на фруктозо-6-фосфатни (F6P) остатъци върху аминокиселината лизин в присъствие на G6P. Проведохме редица предварителни експерименти, за да оптимизираме реакцията по отношение на концентрация на ДНК, степен на нейното фрагментиране, състав на буфера и време на инкубиране (Doyshev *et al.*, 2021).

Лизатът от *E. coli* щам BW37935 беше фракциониран в две хроматографски стъпки. Първата стъпка включваше анионообменна колонна хроматография на DEAE (Diethylaminoethyl) сефароза G25 поради следните причини: Описаната от Wiame *et al.* (2002) *E. coli* фруктозамин *FrlB*-дегликаза е „кисел“ белтък с теоретично pI 4.96 (ExPASy pI/Mw tool). От друга страна има данни, че изоелектричните точки на белтъците корелират с тяхната субклетъчна локализация като в бактерии и археи преобладават отрицателно заредените цитоплазмени белтъци. В същото време pI на ДНК свързващите белтъци варира в широки граници от 4.5 до 10 (Tokmakov *et al.*, 2021). Например, AlkD ДНК гликозилазата, наскоро открит ензим от системата на BER в *Bacillus cereus*, е ДНК свързващ белтък с pI 6.5 (ExPASy pI/Mw tool) (Mullins *et al.*, 2015).

В резултат от проведената хроматография на DEAE-Sepharose G25 с градиент на NaCl от 0 до 0.75 M получихме 60 фракции, които бяха тествани за ДНК-NH-F6P-

дегликазна активност и за белтъчна концентрация. Резултатът от хроматографския анализ (фракции 18 - 47) е показан на следващата **Фиг. 2А**. ДНК-НН-Ф6Р-дегликазната активност се елуираше основно във фракции 28 – 35 като най-обогатена на тази активност беше фракция 31, елуираща се при 0.32 М NaCl и с ~70% по-висока дегликазна активност от тази на нефракционирания лизат. Тази фракция беше също така със сравнително висока белтъчна концентрация (1.04 mg/ml) като се има предвид най-високата белтъчна концентрация 1.39 mg/ml, измерена във фракция 29.

Фракция 31 от анионообменната хроматография с най-висока ДНК-НН-Ф6Р-дегликазна активност беше подложена на гел-филтрация чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) на колона TSK-G3000 SW. Бяха получени 11 фракции, които бяха тествани за ДНК-НН-Ф6Р-дегликазна активност и белтъчна концентрация. Хроматографският профил на елуирания белтък е показан на **Фиг. 2В**. От представената хроматограма се вижда, че най-обогатени на ДНК-НН-Ф6Р-дегликазна активност са фракции 2 и 3, с тази разлика, че белтъчната концентрация на фракция 2 (0.29 mg/ml) е по-ниска от тази на фракция 3 (0.69 mg/ml). Това означава, че специфичната (отнесена към mg белтък) дегликазна активност на фракция 2 е над два пъти по-висока от тази на фракция 3. Ето защо HPLC фракция 2 беше тази, с която продължихме по-нататъшните си изследвания.



**ФИГ. 2. ФРАКЦИОНИРАНЕ НА ЛИЗАТ ОТ *E. COLI* ЩАМ BW37935**

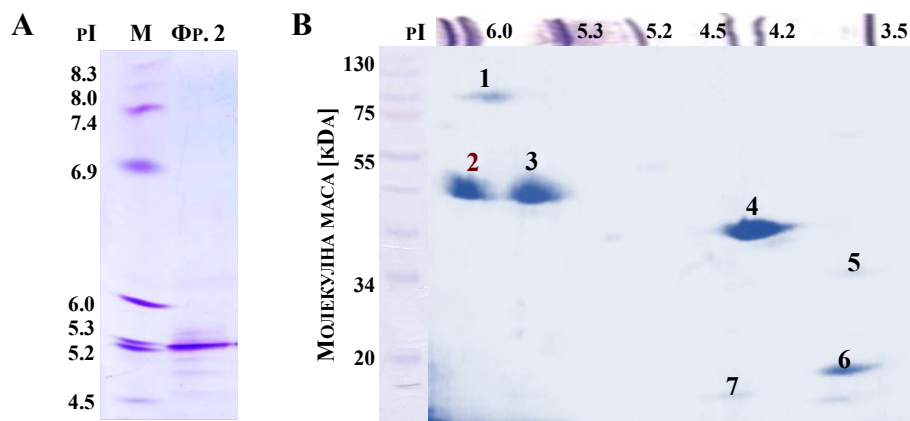
**(А)** Анионообменна хроматография на DEAE-Sepharose G25, където \*активността на фракции 18-47 е представена като процент от активността на тоталния лизат;

**(В)** HPLC гел-филтрация на фракция 31,\*където дегликазната активност на фракциите е представена като процент от активността на фракция 31

### 3. ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА БЕЛТЪЦИТЕ ОТ HPLC-ФРАКЦИЯ 2

След като се убедихме, че HPLC-фракция 2 действително проявява ДНК-НН-Ф6Р-дегликазна активност в правата реакция, т. е. че може да катализира отстраняването на Ф6Р-остатъци от ДНК, я подложихме на 2D-електрофореза. Резултатът от разделянето на белтъците от тази фракция по изоелектрична точка и молекулна маса е показан на **Фиг. 3**.

От **Фиг. 3А** се вижда, че белтъците от HPLC-фракция 2 имат изоелектрични точки под рІ 6.0, което беше очаквано, тъй като първата хроматографска стъпка на фракциониране



**ФИГ. 3. 2D-ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА НА HPLC-ФРАКЦИЯ 2**

(А) Първо направление - разделяне на белтъците по изоелектрична точка;  
(В) Второ направление - разделяне на белтъците по молекулна маса

на бактериалния лизат беше проведена на анионообменен (DEAE) носител. Близките изоелектрични точки на белтъците от тази фракция са резултат от елуирането им при една и съща солева концентрация (0.32 M NaCl, фракция 31), което отразява близкия им електричен заряд. Резултатът от разделянето на белтъците по второ направление (SDS-PAGE) е представен на **Фиг. 3В**. На SDS-полиакриламидния гел идентифицираме ясно седем петна (номерирани с цифри от 1 до 7), които бяха изрязани и изпратени за секвениране по поръчка на американската компания Applied Biomics (Hayward, CA).

От сервизната фирма получихме информация, че всички петна са идентифицирани еднозначно (С.І.=100%) като в **Таблица 1** е показано на кои белтъци отговарят тези петна.

**ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛТАТИ ОТ СЕКВЕНИРАНЕТО НА БЕЛТЪЦИТЕ ОТ HPLC-ФРАКЦИЯ 2**

Петно №	<i>E. coli</i> БЕЛТЪК	МОЛЕКУЛНА МАСА [DA]	ИЗОЕЛЕКТРИЧНА ТОЧКА pI
1	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase [ <i>Escherichia coli</i> E110019]	70 784.8	5.45
2	<b>phosphoglucose isomerase [Escherichia coli E24377A]</b>	<b>61 433.0</b>	<b>5.90</b>
3	tryptophanase [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai]	52 755.6	5.90
4	asparaginase	34 066.1	5.02
5	malate dehydrogenase [ <i>Escherichia coli</i> 536]	32 331.2	5.61
6	beta-lactamase TEM-96 [ <i>Escherichia coli</i> ]	31 437.2	5.84
7	autonomous glycy radical cofactor GrcA [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	14 283.4	5.09

Всички седем белтъка, които идентифицирахме, се оказаха известни, охарактеризирани във функционално отношение белтъци. Вниманието ни беше привлечено от **фосфоглюкозоизомеразата** (Pgi, PGI) като потенциална ДНК-НН-F6P-дегликаза по следните причини: **1)** G6P, който е субстрат за фосфоглюкозоизомеразата в гликолизата, беше редуциращата захар, която използвахме в нашите изследвания за получаването на ДНК-НН-F6P; **2)** предварителен биоинформатичен анализ показва, че единствената известна досега в *E. coli* дегликаза (FrlB-дегликазата) принадлежи към семейството на захарните изомеразы (SIS). На практика реакцията на дегликиране представлява една изомеразна реакция, в която кетоамините изомеризират до алдимини преди да се разпаднат до свободни амини и алдози; **3)** В литературата има данни, че въвеждането на плазмид в щамове на *E. coli* с инактивиран *pgi* ген води до повишаване честотата на мутации в плаزمид (Lee & Cerami, 1987). Обяснението на този факт от авторите на статията е, че тези щамове натрупват по-голямо количество G6P, който действа като мутаген. В контекста на нашите изследвания обаче обяснението би могло да бъде друго, също толкова логично – че тези щамове са с ДНК-НН-F6P репаративен дефицит.

Полученият резултат беше изненадващ за нас, тъй като фосфоглюкозоизомеразата е ензим с добре известна функция в енергийния метаболизъм на всички организми. С развитието на протеомиката през последните десетилетия обаче става все по-ясно, че ензимите не са „еднопрофилни” и че цитозолните, в т. ч. гликолитичните ензими могат да изпълняват допълнителни функции, включително ядрени на ниво ДНК регулации и

репарация. Например, показано е, че човешката урацил-ДНК-гликозилаза е всъщност мономерната (37-kDa) субединица на глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназата (Meurer-Siegler *et al.*, 1991). Публикувани са също данни, че човешката  $\alpha$ -енолаза свързва специфични ДНК последователности в различни клетъчни типове и регулира експресията на HSD3B-гените, кодиращи хидроксистероиддехидрогенази (Wang *et al.*, 2005). Дали фосфоглюкозоизомеразата е подобен ензим, асоциира ли се той *in vivo* с ДНК и други белтъци и доколко наблюдаваната от нас *in vitro* ДНК-NH-F6P-дегликазна активност на ензима се проявява при физиологични условия *in vivo* – това бяха все интересни за нас въпроси, на които потърсихме отговор в следващите ни изследвания.

#### 4. ДНК-СВЪРЗВАЩА АКТИВНОСТ НА ДРОЖДЕНА PGI

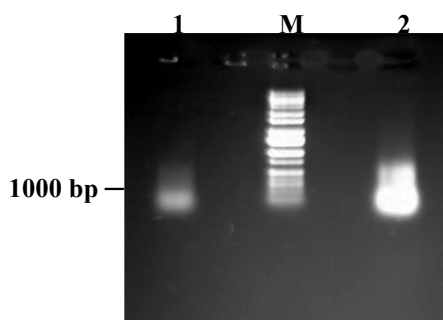
Ако фосфоглюкозоизомеразата проявява ДНК-NH-F6P дегликазна активност тя би трябвало самостоятелно или в комплекс с други белтъци да се свързва с ДНК. От проведените хроматографски анализи е трудно да се предвиди дали някои от белтъците, които се елуират заедно с Pgi в съответните фракции, образуват комплекс с ензима. Това е така, тъй като е възможно евентуални белтъчни комплекси да се разрушат при елуирането им с 0.32 M NaCl (DEAE фракция 31) в първата стъпка на фракциониране чрез анионообменната хроматография. От друга страна, няма литературни данни за ДНК-свързваща активност на нито един от секвенираните белтъци, които се елуираха заедно с Pgi при гел-филтрацията (HPLC фракция 2). Ето защо решихме да изследваме самата фосфоглюкозоизомераза за ДНК-свързваща активност. За тази цел използвахме търговски препарат на пречистена дрождена PGI ( $\gamma$ PGI), поради липсата на *E. coli* Pgi на пазара към



**Фиг. 4.** ДНК-СВЪРЗВАЩА АКТИВНОСТ НА  $\gamma$ PGI Електрофореза в 4% неденатуриращ полиакриламиден гел на контролна ДНК (1) и ДНК инкубирана с  $\gamma$ PGI (2)

този момент и високата хомология (58%) между двата ензима. Разработихме собствен вариант на метода gel-shift (отместване на ДНК в гел) като използвахме ДНК-фрагмент с дължина 500 bp, получен след хидролиза на плазмидна ДНК (pBR322) с рестриктазата *Msp* I. Фрагментът (негликиран) беше инкубиран с уPGI, след което инкубационната смес беше разделена в неденатуриращ (без SDS) хибриден ДНК-белтъчен гел с нисък процент полиакриламид (4%). В този случай събиращият (stacking) 6% гел беше излят с изходен 30% разтвор на акриламид:бис-акриламид в отношение 29.6:0.4, докато разделящият 4% гел беше приготвен с изходен разтвор, съдържащ по-висока концентрация на бис-акриламида, 1% вместо 0.4%. Тъй като ДНК и PGI са отрицателно заредени, това позволява еднопосочно движение на двете макромолекули в нативния гел при провеждане на електрофорезата в посока от катода към анода. След разделянето, оцветихме гела с етидиев бромид за визуализиране на ДНК (Фиг.4). Наблюдавахме слабо забавяне в подвижността на комплекса ДНК – дрождена PGI в сравнение със свободната ДНК, което е доказателство за тяхното взаимодействие.

Потърсихме по-убедително доказателство за ДНК-свързваща активност на Pgi като за целта проведохме имунопреципитация (IP). Направената от нас справка в редица специализирани уебсайтове (Biocompare, CiteAb, iSpyBio и Antibodypedia) показва, че към този момент срещу *E. coli* Pgi се предлага едно единствено антитяло, което не е подходящо за IP-анализ. Ето защо проведохме анализа с антитялото срещу дрождената изомераза (anti-уPGI Ab), което в предварителни експерименти показва, че разпознава Pgi на *E. coli*. Проведохме имунопреципитация с клетки от два щам на *E.coli* див тип (BW28357) и щам с делеция на *pgi* (BW28358). Получихме 1 mg ко-преципитирана ДНК от Δpgi щам и над три пъти повече от щам с интактна Pgi - 3.7 mg. Допуснахме, че съутаявнето на ДНК с anti-



**Фиг. 5. ИМУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ НА *E. COLI* С ANTI-уPGI АВ.** Представена е електрофореза в 2 % агарозен гел на ДНК, преципитирана от *E. coli* щам BW28357 с магнитни перли, не свързани (1) или свързани (2) с anti-уPGI Ab; М (молекулен маркер) - 1000 bp DNA Ladder