

уPGI Ab в отрицателната контрола (Δpgi щама) е неспецифично и най-вероятно резултат от несъвършенство на разработения от нас IP-протокол

За да проверим това свое предположение, проведохме още един контролен експеримент, в който използвахме само щама див тип, но в контролата не добавяхме anti-уPGI Ab. Както се вижда от **Фиг. 5** в този тип отрицателна контрола също присъстваше ДНК, което потвърди нашето предположение, че това е неспецифично съутаена ДНК. По-голямото количество ДНК, копреципитирана с anti-уPGI Ab и в двата експеримента с *E. coli* в щама с интактен *pgi*-ген показва, че най-вероятно *E. coli* Pgi се свързва с ДНК не само в *in vitro* условия (gel-shift), но и *in vivo* (IP).

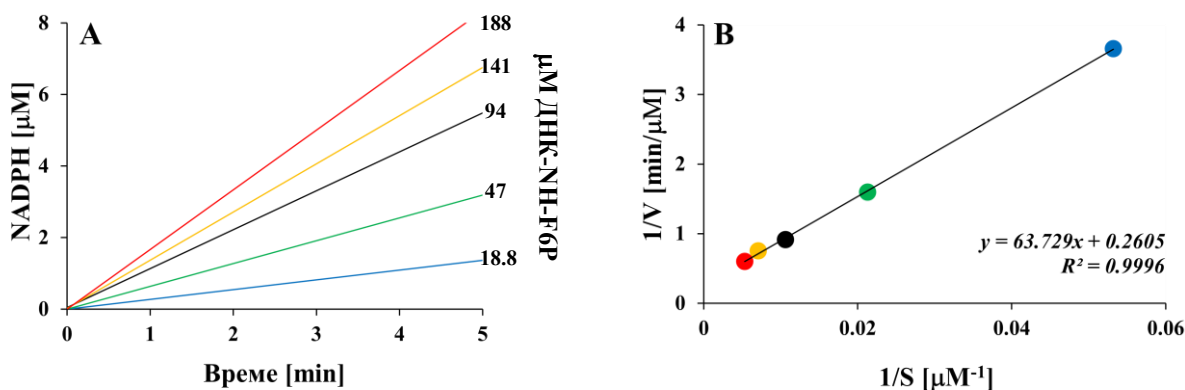
5. ДНК-NH-F6P-ДЕГЛИКАЗНА АКТИВНОСТ НА *E. coli* Pgi СЪС СУБСТРАТ ДВОЙНОВЕРИЖНА ДНК

Следваща стъпка беше да проверим дали *E. coli* Pgi проявява ДНК-NH-F6P дегликазна активност. За целта използвахме високомолекулна ДНК от тестиси на херинга, която се предлага като търговски продукт. В резултат на вариране на различни параметри (Doyshev *et al.*, 2021), като оптимални за получаване на ДНК с високо специфично (на mg ДНК) съдържание на F6P-остатъци бяха намерени следните условия: Разтваряне на 2.5 mg/ml ДНК (натриева сол) в дейонизирана вода и коригиране на pH до 7.0 с H_3PO_4 . Гликиране на така получената ДНК с 0.1 M G6P за 21 дни на 37°C в присъствие на 0.02% натриев азид като антисептик. Пречистване на гликираната ДНК от несвързания G6P се чрез петкратни филтрувания през филтри с 3 kDa отрез в буфер със състав 50 mM Tris HCl pH 7.5, 3.34 mM MgCl_2 , 0.67 mM NADP^+ . В резултат на така проведеното гликиране получихме ДНК-NH-F6P с високо специфично съдържание на F6P-остатъци 107 nmol на mg ДНК, което означава формиране на един F6P-остатък на всеки 15 нд (~ оборот и половина на двойната спирала). Така получената ДНК-NH-F6P използвахме като субстрат в дегликазната реакция като варирахме концентрацията на F6P-остатъците в интервала от 18.8 μM до 188 μM . Измерените начални скорости на дегликиране са представени на **Фиг. 6А**.

За изчисляване на привидните кинетични константи V_{max} и K'_m използвахме Lineweaver-Burk плот (**Фиг. 6В**), който улеснява пресмятанията, тъй като представлява двойно реципрочна линеаризация на параболичното уравнение на Michaelis-Menten за зависимостта на скоростта на ензимната реакция от субстратната концентрация $v = V_{\text{max}}$

$[S]/K_m + [S]$. Така изчислихме следните привидни кинетични константи за *E. coli* Pgi със субстрат двойноверижна ДНК-NH-F6P:

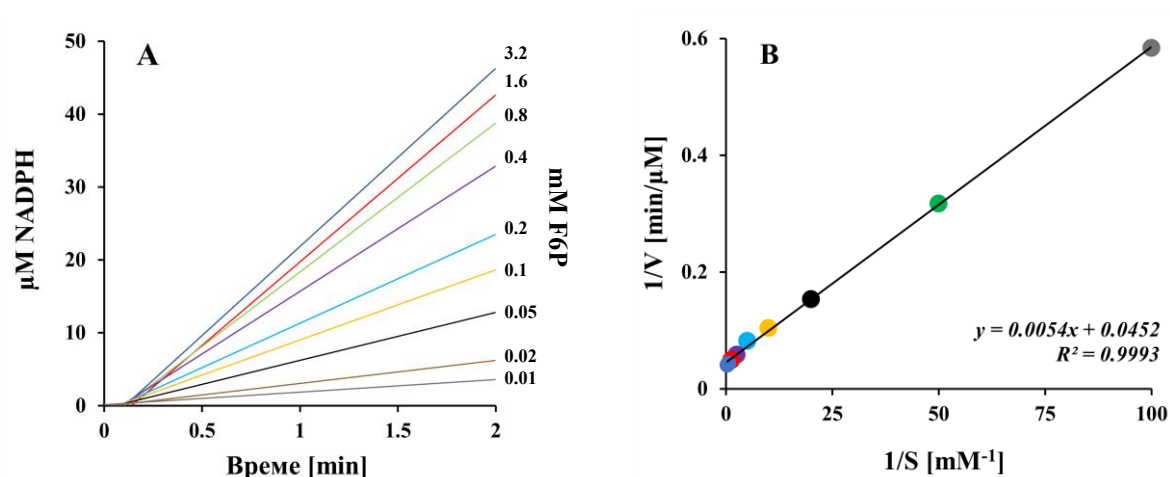
$$V'_{\max}, 3.8 \mu\text{M NADPH}/\text{min}; K'_m, 0.2 \text{ mM}; k'_{\text{cat}}, 52.5 \text{ s}^{-1}; k'_{\text{cat}}/K'_m, 0.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



ФИГ. 6. НАЧАЛНИ СКОРОСТИ (А) и LINEWEAVER-BURK ПЛОТ (В) на дегликиране на нативна двойноверижна ДНК-NH-F6P, катализирано от лизат на *E. coli* щам BW28357 (див тип) при концентрация на тоталния бактериален белтък 16 μg/ml, което отговаря на 0.02 U/ml Pgi активност

За да сравним кинетиките на дегликиране на ДНК-NH-F6P и на изомеризация на F6P до G6P, катализирани от *E. coli* Pgi, проведохме същите изследвания с F6P като естествен субстрат на ензима (Фиг. 7). Изчислихме следните привидни кинетични константи на *E. coli* Pgi със субстрат F6P:

$$V'_{\max}, 22.1 \mu\text{M NADPH}/\text{min}; K'_m, 0.1 \text{ mM}; k'_{\text{cat}}, 242.0 \text{ s}^{-1}; k'_{\text{cat}}/K'_m, 2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



ФИГ. 7. (А) НАЧАЛНИ СКОРОСТИ и (В) LINEWEAVER-BURK ПЛОТ на изомеризация на F6P до G6P, катализирано от лизат на *E. coli* щам BW28357 (див тип) при концентрация на тоталния бактериален белтък 16 μg/ml (0.02 U/ml Pgi активност)

В литературата са публикувани данни за Михаелисовата константата на пречистен *E. coli* Pgi ензим за субстрат F6P, която е K_m , 0.2 mM (Schreyer & Böck, 1980). Измерената от нас по-ниска константа K'_m (0.1 mM), респективно по-висок афинитет на ензима към F6P, може да се дължи на привидно завишаване на началните скорости на ензимните реакции поради изтегляне на продукта 6-фосфоглюконолактон по веригата на отваряне на пръстена от 6-фосфоглюконолактоназата, както и на последвали превръщания на този продукт от други ензими, присъстващи в бактериалния лизат. По-важното е, че измереният от нас афинитет на Pgi към ДНК-NH-F6P е от същия порядък (K'_m , 0.2 mM), което подсказва, че афинитетът на ензима към F6P не се влияе съществено от това дали F6P е в свободна форма или присъединен към двойноверижна ДНК. Каталитичната ефективност (k'_{cat}/K'_m) на Pgi като дегликаза, обаче, се оказва около 6 пъти по-ниска, отколкото като изомеразата, което се дължи основно на по-ниската му (около 5 пъти) каталитична константа (k'_{cat}) със субстрат ДНК-NH-F6P.

Друг важен въпрос за нас беше дали дегликазната активност, която Pgi прояви в нашите изследвания, е нов (друг) вид ензимна активност, различна от нейната изомеразна активност. За да отговорим на този въпрос използвахме добре известния конкурентен инхибитор на изомеразата еритрозо-4-фосфат (E4P) (Grazi *et al.*, 1960). Провеждането на ензимния тест с 50 μ M концентрация на субстрата ДНК-NH-F6P в присъствието на 1 mM E4P доведе до 100% инхибиране на дегликазната реакция, което за нас означаваше, че дегликирането на ДНК се дължи на автентичната изомеразна активност на фосфоглюкозоизомеразата.

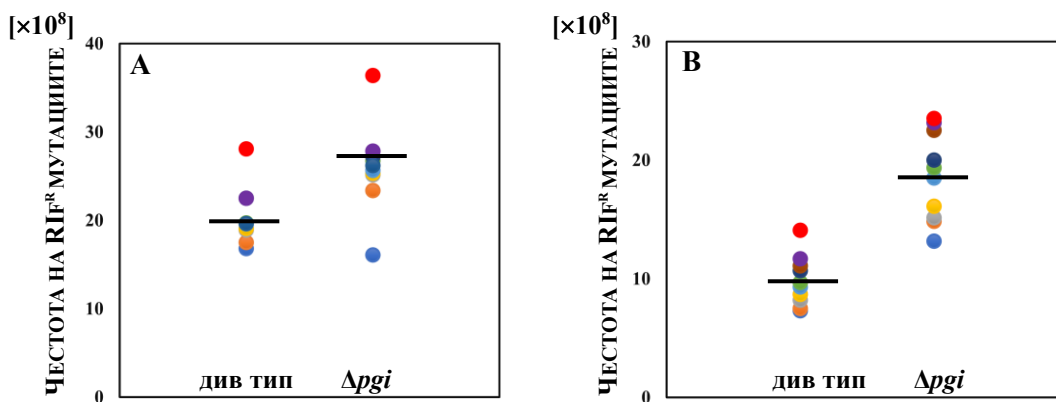
6. ФИЗИОЛОГИЧНА РОЛЯ НА ДНК-NH-F6P ДЕГЛИКАЗНАТА АКТИВНОСТ НА PGI

Резултатите, представени в предходната точка, показват, че в условия *in vitro* *E. coli* Pgi разпознава двойноверижна ДНК-NH-F6P като субстрат и катализира отстраняването на F6P-остатъците от нея под формата на G6P, т. е. действа като дегликаза. Най-важният въпрос за нас беше дали *E. coli* Pgi проявява същата активност и в условия *in vivo*. Тук е мястото да отбележим, че вътреклетъчният метаболит на *E. coli* е доминиран от малко на брой молекули като 10-те най-често срещани метаболити съставляват около 77% от целия метаболит. Сред тях са редуциращите захари G6P, F6P и глюкозо-1-фосфат, които общо съставляват около 4% от общата 300 mM метаболитна концентрация (Bennett *et al.*, 2009).

Освен това концентрацията на G6P (1.32 mM) в *E. coli*, култивирана в среда с глюкоза, е около 25 пъти по-висока от тази на самата глюкоза (0.057 mM) (Hoque *et al.*, 2011). Тези данни показват, че субстратът на Pgi, G6P, освен централен въглеводороден метаболит (Rajas *et al.*, 2019), е една от основните редуциращи захари, които могат да инициират Майярова реакция в *E. coli*. Това се потвърждава и от мутагенното действие на G6P, което е демонстрирано в редица изследвания (Lee & Cerami, 1987; Bucala *et al.*, 1984; Bucala *et al.*, 1985). Остатъците от F6P в ДНК-NH-F6P са на практика лезиите в ДНК, причинени от G6P чрез Майяровата реакция. Ето защо ако ензимът Pgi действа като дегликаза, то той би трябвало да принадлежи към групата на ензимите за поправка на ДНК с перфектно (error-free) действие като напр. *O*⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазата (Yarosh, 1985), тъй като Pgi възстановява нативната структура на ДНК, катализирайки реакцията:



В този контекст е логично да се очаква, че случаите на Pgi дефицит биха довели до повишена мутабилност на ДНК. Проверихме това свое предположение като сравнихме честотите, с които *E. coli* щамове див тип и Δpgi мутират от рифампицинова чувствителност (Rif^s) към устойчивост (Rif^r). За тази цел култивирахме клетките в минимална среда M63GG, която съдържа 1.8% глюкоза и 0.2% глюконат. Добре известно е, че в такава среда, доминирана от глюкоза, *E. coli* щамове с Pgi дефицит натрупват значително по-голямо количество G6P в сравнение с щамове див тип (Lee & Cerami, 1987; Hoque *et al.*, 2011), което се дължи на гликолитичния блок.



ФИГ. 8. ЧЕСТОТА НА СПОНТАННИТЕ RIF^r МУТАЦИИ В *E. COLI* ДИВ ТИП И Δpgi

Честота на Rif^r-мутациите, възникващи в експоненциална (А) и стационарна (В) фази на растеж. Медианите са отбелязана с черни линии върху графиката.

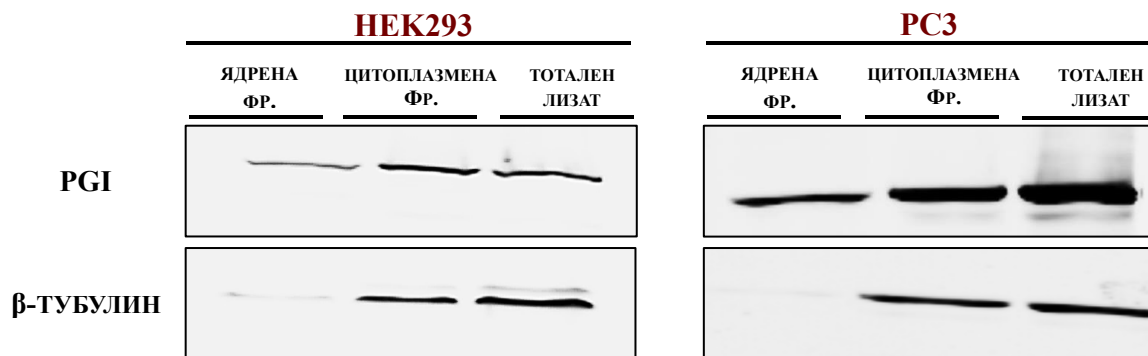
Мутационните анализи демонстрираха убедителна разлика в честотата на спонтанните мутации в двата щам (Фиг. 8). Както експоненциалните, така и стационарните (адаптивни) мутации показаха статистически значимо по-висока честота в щам с делетиран *pgi*-ген, отколкото в изогенния щам с интактен *pgi*-ген. Изразени в числени стойности, които са представени като медиани на графиката, тези честоти са: експоненциални мутации 19.6×10^{-8} за щам див тип срещу 26.2×10^{-8} за Δpgi ($p < 0.025$, $n=10$) и стационарни мутации 9.5×10^{-8} за щам див тип vs. 19.9×10^{-8} за Δpgi ($p < 0.005$, $n=10$).

7. ЯДРЕНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ЧОВЕШКА PGI – ИМУНОБЛОТИНГ И ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНА МИКРОСКОПИЯ

Фосфоглюкозоизомеразата е висококонсервативен ензим. Например, *E. coli* Pgi и човешката фосфоглюкозоизомераза (hPGI) показват 65% хомология в аминокиселинната си последователност и почти перфектно структурно подобие при наслагване на пространствените им (3D) структури (RMSD, 0.92 Å). Сравняване чрез множествено подравняване (multiple alignment) на първичните структури на про- и еукариотни фосфоглюкозоизомеразы показва наличието на няколко консервативни участъка, което предполага че всички те имат общ еволюционен произход и използват идентичен каталитичен механизъм (Sun *et al.*, 1999). Освен това новооткритите бактериални хистони (Pani *et al.*, 2023) предполагат сходство в пространствената организация на ДНК молекулата в про- и еукариоти. Ето защо ние предполагахме, че фосфоглюкозоизомеразата действа като ДНК-NH-F6P-дегликаза (ДНК-репаративен ензим) във всички организми, от бактерии до човек. За експериментална проверка на тази хипотеза изследвахме hPGI за ядрена локализация, тъй като е логично един ДНК-репаративен ензим да се открива в ядрата на еукариотните клетки. Ядрената локализация на ензима изследвахме чрез два метода – имуноблотинг и индиректна имунофлуоресценция.

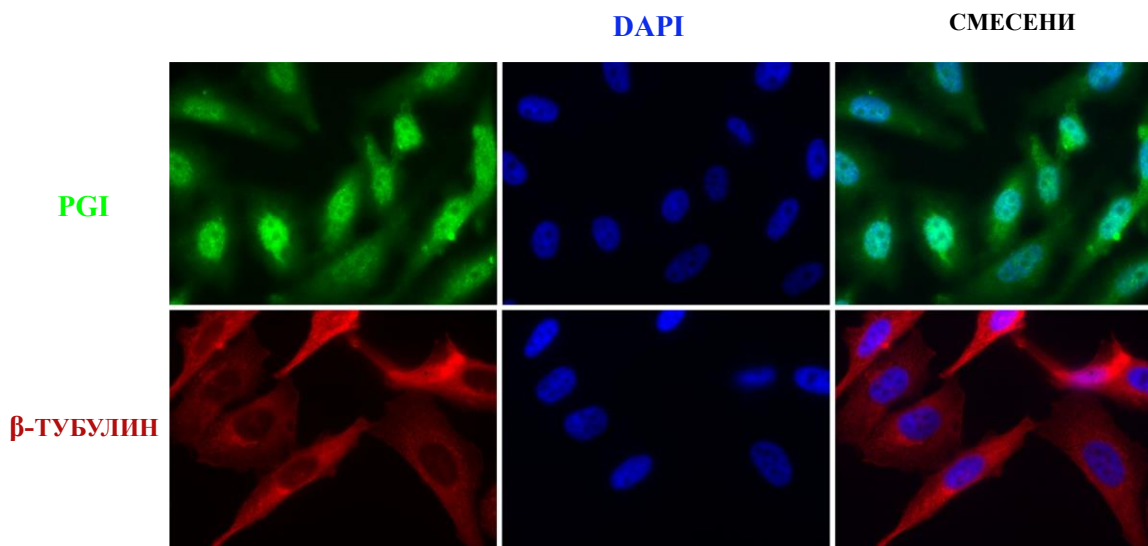
Проведохме имуноблотинг с цитоплазмена и ядрена фракции, изолирани от двете клетъчни линии, клетки от простатен карцином (PC3) и човешки ембрионален бъбрек (HEK293). За оценка на ефективността на разделяне на ядрените от цитоплазмените фракции използвахме антитяло срещу цитоплазмения маркер β -тубулин. Получените резултати (Фиг. 9) ясно показаха наличие на hPGI в ядрените фракции и на двете клетъчни линии и потвърдиха, като hPGI се експресира по-силно в PC3 в сравнение с HEK293,

вероятно поради добре известният Warburg ефект на засилена гликолиза в ракови клетки. Ядрените фракции и на двете клетъчни линии реагираха пренебрежимо слабо с anti-h β -тубулин Ab. От друга страна, количеството h β -тубулин в цитоплазмените фракции и тоталните лизати е почти еднакво, което свидетелства за успешно субклетъчно фракциониране. Човешката изомераза се открива и в двете изследвани фракции на двете клетъчни линии. При това количеството ензим в ядрата е най-малко и заедно с това в цитоплазмата се равнява на общото количество изомераза в тоталния лизат, което и следва да се очаква при добро разделяне на ядрените от цитоплазмените фракции.



Фиг. 9. ИМУНОБЛОТИНГ НА КЛЕТЪЧНИ ЛИЗАТИ ОТ HEK293 И PC3 КЛЕТКИ С anti-hPGI И anti-h β -тубулин антитела. На старт са нанесени по 20 μ g белтък за HEK293 клетките и по 15 μ g белтък за PC3.

Потърсихме и друго, независимо доказателство за ядрена локализация на hPGI в условия *ex vivo*. За целта проведохме индиректна имунофлуоресцентна микроскопия. В тези експерименти се спряхме на раковата клетъчна линия PC3, поради това че те експресират по-силно hPGI от HEK293 клетките, които култивирахме при нормогликемични условия. Като маркер за цитоплазмена локализация използвахме отново β -тубулина, като фиксираните с 2% формалдехид клетки бяха третираны с първични anti-hPGI или anti-h β -тубулин антитела, последвано от вторично флуоресцентно антитяло (Alexa Fluor® 488). Ядрата бяха оцветявани с багрилото DAPI, което се свързва здраво с области в ДНК, богати на базовата двойка А-Т. Получените резултати, представени на **Фиг. 10** показват, че hPGI (зелена флуоресценция, горен панел) се локализира както в цитоплазмата така и в ядрата на PC3 клетките. В същото време, очаквано h β -тубулин (червена флуоресценция, долен панел) се откриваше само в цитоплазмата на клетките.



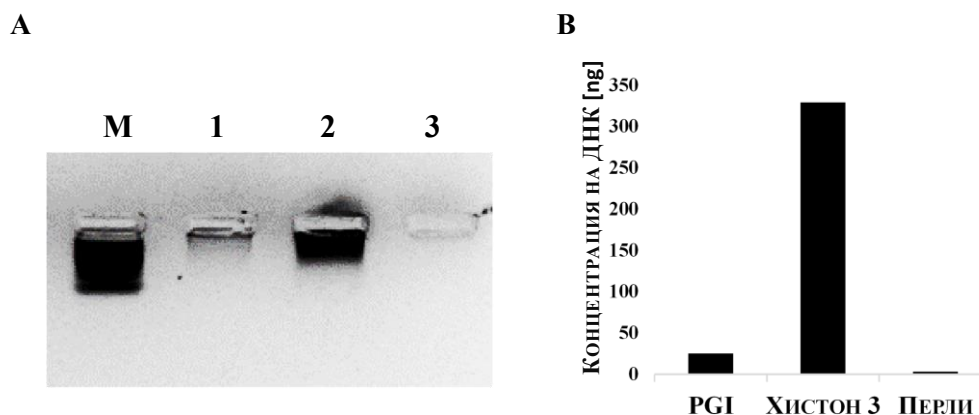
Фиг. 10. ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНА МИКРОСКОПИЯ НА РС3 КЛЕТКИ, КУЛТИВИРАНИ В СРЕДА С 5 mM ГЛЮКОЗА ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА hPGI И h β -ТУБУЛИН. Клетките са фиксирани с 2% формалдехид.

Имуноблотингът и флуоресцентната микроскопия убедително демонстрираха присъствието на hPGI в ядрата на изследваните клетки. Други изследователи също съобщават за ядрена локализация на hPGI. Например, Funasaka *et al.* (2005) показват присъствие на hPGI в ядрата на BT-549 клетки от карцином на гърдата при нормоксия и засилена транслокация на ензима в ядрата при хипоксия, което най-вероятно се дължи на свръхекспресия на hPGI при тези условия. Друго изследване демонстрира, че hPGI участва в изомеризацията на G6P до F6P в интактни ядра на ракови и неракови клетки, което води до синтеза или разграждане на гликоген (Sun *et al.*, 2019). Това е директно доказателство, че hPGI може да катализира обратимата изомеризация на G6P до F6P в ядрата. Гликогеновият метаболизъм преминава през усвояване или освобождаване на ключовия метаболит G6P, който се импортира в ядрата чрез глюкозо-6-фосфатен транспортер. От друга страна глюкозата, глюкозните транспортери GLUT1/GLUT4 и ензимът хексокиназа, който фосфорилира глюкозата до G6P като първа стъпка в гликолизата, имат изключително извънядрена локализация. Интересно е, че подобно на животинските клетки, складиращи гликоген като енергийно депо в мембранно-ограничени органели (ядра и митохондрии), растителните клетки натрупват скорбяла в пластиди, като основен участник в този процес е пластидна изоформа на фосфоглюкозоизомеразата (Jiao *et al.*, 2022).

8. ДНК-СВЪРЗАЩА АКТИВНОСТ НА hPGI – ChIP-АНАЛИЗ

Резултатите от нашите изследвания, както и публикувани литературни данни, недвусмислено показват, че hPGI изпълнява не само цитоплазмени но и ядрени функции. Дали тези функции се ограничават само до изомеризацията на G6P по време на гликогеновата синтеза в ядрата? Фактът, че съществуват специални транспортери за пренасяне на G6P от цитоплазмата в ядрото означава, че в контекста на хроматина ДНК е достъпна за взаимодействие с тази захар. Ето защо е съвсем логично да се очаква, че в ядрата на човешки клетки може да се формира ДНК-NH-F6P лезията, която, в случай, че е вярна нашата хипотеза, би могла да се поправя от дегликазната активност на ядрената hPGI.

Тези наши разсъждения станаха причина да изследвахме hPGI за ДНК-свързваща активност чрез ChIP-анализ на PC3 клетки с anti-hPGI антитяло ковалентно свързано към магнитни перли с BS³-омрежител с дължина на спейсера 11 Å, което позволява по-голяма свобода на движение на антитялото за напасване към антигена (hPGI) и предотвратява отделянето на антитялото в имунопреципитата в стъпката на еулуирането му от перлите. Като положителна контрола за специфично белтък-ДНК взаимодействие използвахме антитялото срещу хистон H3, който присъства обилно в хроматиновата структура на еукариотните ядра. Като отрицателна контрола проведохме ChIP с магнитни перли, несвързани с антитяло. Получените три преципитата обработихме с търговски набор реагенти за ДНК гел-филтрация и измерихме количеството на ДНК след оцветяването ѝ с



ФИГ. 11. (А) ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА В 2% АГАРОЗЕН ГЕЛ НА ДНК ОТ PC3 КЛЕТКИ, ИМУНОПРЕЦИПИТИРАНА С anti-hPGI Ab (1), С anti-hH3-ХИСТОН Ab (2) И С МАГНИТНИ ПЕРЛИ БЕЗ ПРИСЪЕДИНЕНО КЪМ ТЯХ АНТИТЯЛО (3); М-МОЛЕКУЛЕН МАРКЕР (1000 нд DNA ladder); (В) SYBER GREEN I ФЛУОРИМЕТРИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА ДНК В ИМУНОПРЕЦИПИТАТИТЕ С anti-hPGI Ab (PGI), С anti-hH3-ХИСТОН Ab (Хистон 3) И КОНТРОЛА (Перли)

флуоресцентното багрило Syber Green I (λ_{ex} , 497 nm; λ_{em} , 520 nm), което позволява измерването на ДНК концентрации от порядъка на pg/ μ l. В трите преципитата измерихме следните количества утаена ДНК – 15 ng в отрицателната контрола, 47 ng в пробата с антитялото срещу hPGI и 479 ng в пробата с антитялото срещу човешки хистон H3 (**Фиг. 11В**). Този резултат беше потвърден и чрез провеждане на агарозна електрофореза. За да визуализираме по-ясно малките количества ДНК, оцветихме гела със Syber Green I вместо с етидиев бромид и съкратихме времето за електрофореза на 10 мин, което може да обясни неразделянето на маркерните ивици на гела във **Фиг. 11А**.

9. СЕКВЕНИРАНЕ НА ИМУНОПРЕЦИПИТИРАНИТЕ БЕЛТЪЦИ

След обработка на РСЗ клетките с 2% формалдехид в техните лизати се откриват високомолекулни комплекси, реагиращи с anti-hPGI Ab. Тези комплекси се разпадат до голяма степен в последната стъпка от ChIP-протокола, включваща разрушаване на генерираните от формалдехида напречни сшивки (старт 2-anti-hPGI). Логично е да се допусне, че тези високомолекулни агрегати се дължат не само на показаното по-горе взаимодействие на hPGI с ДНК, но и с ядрени белтъци. За да проверим това свое допускане, предприехме секвениране на белтъците от хроматиновия имунопреципитат чрез LC-MS/MS (протеомен анализ). Получените мас-спектри обработихме с две софтуерни платформи: платената платформа на Thermo Scientific™ **Proteome Discoverer** и **MaxQuant**. За да анотира пептидите, алгоритъмът на MaxQuant изисква референтен човешки протеом във fasta формат, който заимствахме от базата данни Uniprot. Платформата Proteome Discoverer анотира общо 41 белтъка в имунопреципитата, а MaxQuant – 35 белтъка. Както очаквахме, двете платформи анотираха с най-голяма достоверност и най-много уникални пептиди човешката фосфоглюкозоизомераза (Proteome Discoverer - 8 пептида; MaxQuant - 13 пептида).

Двете платформи посочват с висока достоверност присъствие на следните белтъци в хроматиновия имунопреципитат: Хистон H4, 14-3-3 белтък и убиквитин-40S/60S рибозомален белтък S27a (Ub-RPS27a). За разлика от Proteome Discoverer, MaxQuant идентифицира и глицералдехид-3-фосфатдехидрогеназата (GAPDH) сред белтъците, съутаени с hPGI (**Таблица 2**). Специфичното съутаяване на тези белтъци се доказва от факта, че нито един от тях не присъстваше в отрицателната контрола.

ТАБЛИЦА 2. БЕЛТЪЦИ, КОПРЕЦИПИТИРАНИ С ANTI- hPGI AB В CHIP АНАЛИЗА

PROTEOME DISCOVERER				
ACCESSION	DESCRIPTION	PEP SCORE	COVERAGE	MW
P06744-2	Glucose-6-phosphate isomerase [OS=Homo sapiens]	15.06	18.4	64.28
P63104	14-3-3 protein zeta/delta [OS=Homo sapiens]	2.60	5.7	27.70
P62805	histone H4 [OS=Homo sapiens]	1.23	9.7	11.36
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a [OS=Homo sapiens]	1.08	5.8	5.70
MAXQUANT				
ACCESSION	DESCRIPTION	PEP SCORE	COVERAGE	MW
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase [OS=Homo sapiens]	323.31	23.8	63.14
P62805	histone H4 [OS=Homo sapiens]	85.10	9.7	11.36
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein S27a [OS=Homo sapiens]	15.57	12.5	14.73
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [OS=Homo sapiens]	11.93	4.2	5.70
P27348	14-3-3 protein zeta/delta [OS=Homo sapiens]	2.60	5.7	27.70

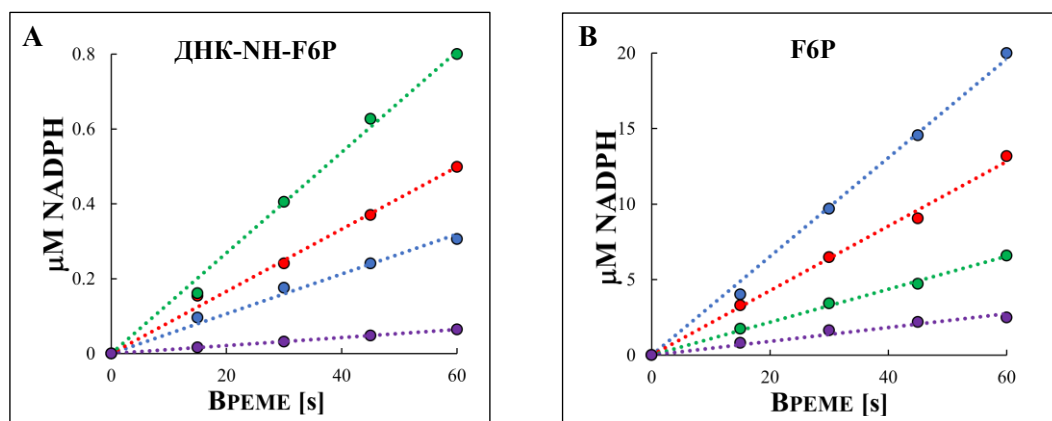
Белтъците са подредени според броя идентифицирани пептиди (PEP Score) и степента, в която те покриват аминокиселинната последователност на белтъците (Coverage).

Всички белтъци, съгатаени с hPGI в хроматиновата имунопреципитация с anti-hPGI Ab, имат връзка с процесите на ДНК увреждане, което е в подкрепа на предположената от нас ДНК-NH-F6P-дегликазна (репаративна) функция на ензима. Ub-RPS27a е слят (fusion) белтък, чиито продукти на разграждане са юбиквитин и RPS27. RPS27 се свръхекспресира в отговор на клетката към образуването на междуверижни сшивки в ДНК (Li *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2020). Такива сшивки се формират, напр., между аденина и абазични места в ДНК (Price *et al.*, 2014). В същото време е добре известно, че гликирането на базите в ДНК води до дестабилизиране на гликозидната връзка и появата на абазични места (Seidel & Pischetsrieder, 1998). 14-3-3 е сред белтъците, индуцирани от p53 в отговор на увреждания в ДНК (Yang *et al.*, 2006). Хистоните, в това число и хистон H4, участват в генната регулация чрез ремоделиране на хроматина и са обвързани с почти всички ДНК процеси, в т. ч. с процесите на увреждане и поправка на ДНК (Kumar *et al.*, 2020). Потвърждение на получените от нас резултати е изследването на Das *et al.* (2016), които провеждат ChIP на миши ракови клетки с антитяло срещу GAPDH – ензим, който беше идентифициран от платформата MaxQuant в нашия преципитат с anti-hPGI Ab. В преципитата с антитяло срещу GAPDH Das *et al.* (2016) се откриват още два други гликолитични ензима - PGI и пируваткиназа (PKM). За трите гликолитични ензима (GAPDH, PGI и PKM) е показано, че се транслоцират в ядрото (Sun *et al.*, 2019). GAPDH е регулатор на хистоновото ацетилиране и хроматиновата структура, а неговата 37-kDa субединица изпълнява функцията на ДНК-

репаративен ензим (урацил ДНК-гликозилаза) от системата на BER (Meyer-Siegler *et al.*, 1991). Множеството функции на hPGI и на съутените с ензима белтъци, както и комплексната природа на вътреклетъчните процеси, налагат допълнителни изследвания, за да може да се разгърне пълната картина на техните взаимодействия и евентуална роля в поправката на гликирана ДНК.

10. ДНК-NH-F6P-ДЕГЛИКАЗНА АКТИВНОСТ НА hPGI

След получените убедителни данни, както за присъствието на hPGI в ядрата на еукариотни клетки и директното свързване на ензима с ДНК, решихме да проведем ензимен тест с hPGI, за да проверим дали човешката PGI функционира и като ДНК-NH-F6P дегликаза. Като източник на PGI ензимна активност използваме тотален лизат, ядрена и цитоплазмена фракции от PC3 клетките. Проведохме PGI ензимния тест с двата субстрата – с гликирана ДНК (ДНК-NH-F6P) за изследване на евентуална дегликазна активност (Фиг. 12А) на hPGI и с F6P за тестиране на изомеразната активност на ензима (Фиг. 12В). Като отрицателна контрола проведохме ензимния тест без добавяне на лизат, т. е. без източник на hPGI ензимна активност. Субстратът ДНК-NH-F6P беше получен по същия начин, както е описан в предходните точки.



Фиг. 12. НАЧАЛНИ СКОРОСТИ НА ДЕГЛИКИРАНЕ НА 20 μ M ДНК-NH-F6P (А) и на изомеризация на 3.3 mM F6P (В), инициирани с 16 μ g/ml общ белтък от тотален лизат (●), цитоплазмена (●) и ядрена (●) фракции на PC3 клетки и контрола без добавяне на лизати (●).

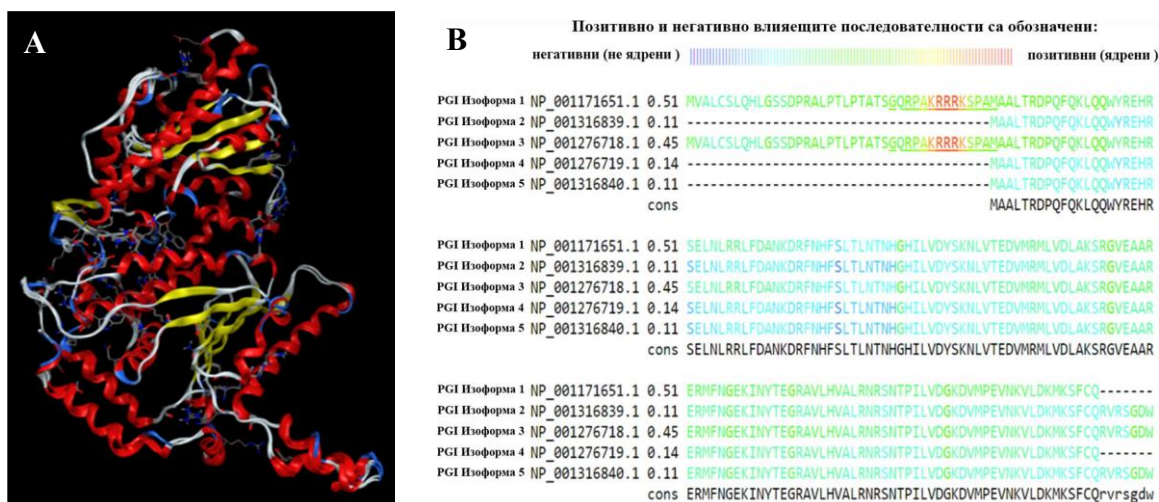
Сравнихме началните скорости на двата типа реакции (дегликиране и изомеризация), получени с тоталния лизат от PC3 клетките с тези, които бяхме получили с лизата от *E. coli* щама с интактна Pgi, като използвахме крайна концентрация на тоталния белтък в ензимните тестове 16 μ g/ml, аналогично с тестовете с *E. coli* Pgi. Интересното е, че

в този случай наблюдавахме сравними скорости на дегликиране на 20 μM ДНК-NH-F6P с лизатите от PC3 клетките и *E. coli* – $V'_0=0.32 \mu\text{M NADPH/min}$ за PC3 клетките и $V'_0=0.27 \mu\text{M NADPH/min}$ за *E. coli*. Сравними бяха и скоростите на изомеризация на 3.3 mM F6P до G6P - $V'_0=19.8 \mu\text{M NADPH/min}$ за PC3 клетките и $V'_0=22.6 \mu\text{M NADPH/min}$ за *E. coli*. Тези резултати говорят за близки специфични активности и кинетични параметри на бактериалния и човешкия ензим в качеството им на изомеризи и дегликази, което се подкрепя и от литературни данни за сходния афинитет към F6P ($K_m \sim 0.2 \text{ mM}$) на hPGI (Welch, 1971) и *E. coli* Pgi (Schreyer & Böck, 1980).

Интересно беше наблюдението, че цитоплазмената фракция от PC3 клетките демонстрира по-висока активност от ядрената при използването на F6P като субстрат (**Фиг. 12В**). Със субстрат ДНК-NH-F6P в дегликазната реакция (**Фиг. 12А**) резултатът беше обратен – ядрената фракция прояви по-висока активност от цитоплазмената. Акцентиране върху този факт, тъй като от имуноблотинга на **Фиг. 9** по-горе ясно се вижда, че при еднакво количество белтък (15 μg за PC3 клетките), нанесено на белтъчния гел, цитоплазмената фракция съдържа по-голямо количество hPGI от ядрената. От това следва, че при по-малко относително количество (на mg общ белтък) ядрената hPGI проявява по-голяма ДНК-NH-F6P дегликазна активност от цитоплазмената. От тези наблюдения следва изводът, че най-вероятно предпочитан субстрат за ядрената hPGI е ДНК-NH-F6P пред свободен F6P, а за цитоплазмената обратно – свободен F6P пред такъв, свързан с ДНК (ДНК-NH-F6P). Тези експериментални данни са логични и добре се съгласуват с предположената от нас ДНК-NH-F6P-дегликазна (репаративна) активност на фосфоглюкозоизомеразата. Предпочитанието на ядрената hPGI към ДНК-NH-F6P пред свободен F6P може да се обясни с приоритизиране на поправката на ДНК пред участието на свободната захар в ядрения гликогенов метаболизъм, дискутиран по-горе. В контекста на нашето изследване предполагахме, че в цитоплазмата и ядрата на човешките клетки функционират различни изоформи на ензима. Това добре се съгласува с резултатите от нашите биоинформатични изследвания, които демонстрираха наличие на силен сигнал за ядрена локализация в две от изоформите на hPGI (следваща точка).

11. СИГНАЛ ЗА ЯДРЕНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ИЗОФОРМИТЕ НА hPGI

Проведените от нас изследвания показаха, че както бактериалната, така и човешката фосфоглюкозоизомераза проявяват ДНК-NH-F6P дегликазна активност. Сравняването на аминокиселинните последователности на *E. coli* Pgi (P0A6T1) и каноничната Изоформа 2 на *H. sapiens* PGI (P06744) показва изключително висока степен на хомология от 65%. Наличието на кристалографски структури на *E. coli* Pgi (3NBU) и *H. sapiens* PGI (1JLH) ни позволи да сравним и пространствените им структури в софтуерната платформа MOE, разработена от Chemical Computing Group (Molecular Operating Environment (MOE), 2024), както и допълнително чрез програмата PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC), резултатът от което показва напълно припокриване на двете кристалографски структури (RMSD 0.92 Å) (Фиг. 13А), което е доказателство за високата консервативност на ензима, а следователно и за функционалното му сходство в про- и еукариоти.



Фиг. 13. (А) СРАВНЯВАНЕ НА 3D СТРУКТУРИТЕ НА *E. COLI* PGI (3NBU) И *H. SAPIENS* PGI (1JLH); (В) NLS СИГНАЛ (KRRRK) ЗА ЯДРЕНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ИЗОФОРМИ 1 И 3 НА hPGI

Известно е, че човешката фосфоглюкозоизомераза се среща в 5 различни изоформи (Sun *et al.*, 1990). Макар че ядрената локализация на hPGI е документирана в няколко изследвания (Funasaka *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2019), до момента в литературата няма данни за това, коя(и) от изоформите на hPGI се траслоцира и функционира в ядрата на човешките клетки. Ето защо за нас беше интересно да проверим петте изоформи на hPGI за наличие на сигнал за ядрена локализация (NLS). За целта проведехме BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) анализ, който показва че Изоформи 1 и 3 притежават допълнителен участък от около 40 аминокиселини в N-края си, който отсъства в останалите изоформи. Анализ с програмата NucPred (Stockholm Bioinformatics Center) предсказа наличието точно в този участък на силен NLS с базичен мотив от лизинови и аргининови остатъци (**KRRRK**) (**Фиг.13В**). С независимата програма NLS-Mapper (Keio University) същият сигнал (**GQRPAKRRRK**) се класифицира с числен израз 13.5, като белтъци с числена стойност над 8 се класифицират като такива, имащи предимно ядрена локализация.

12. ПРОСТРАНСТВЕНИ СТРУКТУРИ НА *E. COLI* Pgi И *S. ENTERICA* FrlB

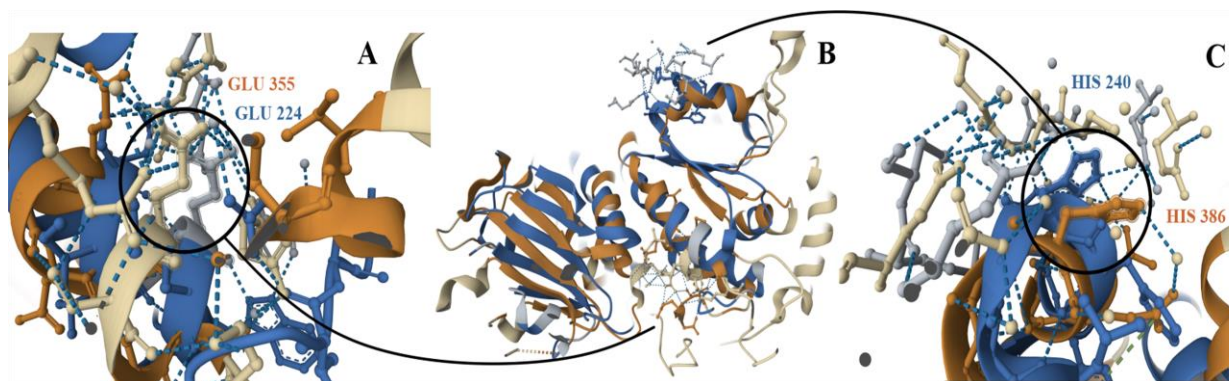
Бактериалните FrlB ензими катализират отстраняването на –NH-F6P остатъци от гликиран лизин. Нашите биоинформатични анализи показаха, че Pgi и FrlB принадлежат към едни и същи белтъчни семейства - суперсемейството на фосфоглюкозоизомеразите и това на захарните изомеразы, като и двата ензима имат по два захарно изомеразни домена (SIS), единият (SIS1) е отговорен за свързване със захарния субстрат, а в другият, (SIS2), е поместен каталитичният център на ензима. Ето защо решихме да направим по-детайлен анализ на каталитичните центрове на тези ензими.

Известно е, че в SIS домените на ензимите от фосфоглюкозоизомеразното суперсемейство отварянето на захарния пръстен се катализира от консервативни аминокиселинни остатъци **His** и **Lys/Arg** (Lee *et al.*, 2001); Davies & Muirhead, 2003; Solomons *et al.*, 2004), а обратимата алдо-кето изомеризация от остатъци на глутаминовата киселина (**Glu**) (Read *et al.*, 2001; Jeffery *et al.*, 2001). Фосфоглюкозоизомеразата на *E. coli* функционира като хомодимер с два идентични каталитични центъра, които се формират на границата между двете мономерни субединици на ензима. Кристалографската структура на *E. coli* Pgi (получена при 2.05 Å) е публикувана през 2012 г. и чрез сравняването ѝ с 3D структурите на други фосфоглюкозоизомеразы е установено, че каталитичните аминокиселинни остатъци в нея включват **Glu355** (изомеризация) и **Arg270** и **His386** (отваряне на пръстена) като His386 се предоставя от партньорския мономер (Totir *et al.*, 2012).

До момента липсват кристалографски данни за 3D структурата на *E. coli* FrlB, но съвсем наскоро беше разшифрована пространствената структура на *S. enterica* FrlB, получена при висока разделителна способност от 1.8 Å (Kovvali *et al.*, 2023). За да сравним

третичните структури на FrlB дегликазите на *E. coli* и *S. enterica* генерирахме 3D структурата на *E. coli* FrlB чрез изкуствения интелект AlphaFold на белтъчната структурна база данни DeepMind (Varadi *et al.*, 2022). Тези наши сравнителни анализи показаха, че двете FrlB дегликази притежават 28% хомология на ниво първична и абсолютно припокриване на ниво третична структура (RMSD 1.94 Å). Публикуваните кристалографски данни за *S. enterica* FrlB показват, че този ензим, подобно на *E. coli* Pgi, също е димер, като предполагаемите каталитични остатъци **Glu224** и **His240** също се доставят от отделните мономерни. Чрез биоинформатични подходи не са открити каталитични остатъци **Lys/Arg** в FrlB ензимите на *E. coli* и *S. enterica*, съответстващи на тези остатъци във фосфоглюкозоизомеразите. По отношение на *E. coli* FrlB авторите изказват предположението, че каталитичният **Lys** остатък в този ензим се доставя директно от субстрата **Lys-N⁶H-F6P** (Wiame *et al.*, 2002).

Въз основа на горепосочените структурни данни предположихме, че каталитичните аминокиселинни остатъци **Glu355** и **His386** на *E. coli* Pgi могат да съответстват на **Glu224** и **His240** в активното място на *S. enterica* FrlB. За да проверим тази хипотеза, анализирахме кристалната структура на *S. enterica* FrlB (8GLR) за структурно сходство с тази на *E. coli* Pgi (3NBU), като използвахме jFATCAT алгоритъма на PDB платформата RCSB. **Фиг. 14** показва, че въпреки ниската хомология на последователностите (17%) и умерено структурно сходство (RMSD 3.28 Å) на двата белтъка, се наблюдава добро припокриване на техните каталитични участъци - **Pgi Glu355** е пространствено близко разположен до



ФИГ. 14. ПРОСТРАНСТВЕНО ПОДРАВНЯВАНЕ НА *E. COLI* PGI И *S. ENTERICA* FRLB

(B) Субединица A на *E. coli* Pgi (3NBU, кафяво и бежово) е сравнена със субединица A на *S. enterica* FrlB (8GLR, синьо и сиво).

Увеличен изглед на **Glu** (A) и **His** (C) аминокиселинните остатъци от активните центрове на двата ензима.