



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΤΟΥΣ
ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ (ΝΑΤ)**

ΠΑΠΑΚΩΣΤΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΤΟΥΣ
ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ (ΝΑΤ)**

ΠΑΠΑΚΩΣΤΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπακώστα Κωνσταντίνου: 30-11-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 603^α/24-4-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φριλίγγος Ευστάθιος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Μέλη

Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Διαλλινάς Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας Τμήμα Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-4-2007

«Διερεύνηση του μηχανισμού πρόσληψης πουρινών στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT)»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 704^α/25-1-2011

1. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Δραΐνας Κωνσταντίνος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Διαλλινάς Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Τμήμα Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών
5. Φριλίγγος Ευστάθιος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Χριστοφορίδης Σάββας Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 7-2-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Πολλοί είναι οι άνθρωποι που συνεισέφεραν με το δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Αν. Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω δίπλα του και μου προσέφερε απλόχερα όλες τις γνώσεις του. Ήταν αυτός που με καθοδήγησε από την αρχή μέχρι το τέλος, τόσο πειραματικά όσο και θεωρητικά, με ουσιαστικές υποδείξεις και αμείωτο ενδιαφέρον, και μου μετέδωσε τον ενθουσιασμό του για την επιστήμη. Πάντα υπήρξε πρόθυμος, ώστε να δημιουργηθεί ένα κλίμα συνεργασίας που να αποδώσει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Αν. Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά και Επικ. Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου, για τις γνώσεις που μου προσέφεραν στα θέματα της ειδικότητάς τους.

Επίσης ευχαριστώ τον Επικ. Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας) για τη συμβολή του στο θέμα των αζωτοδεσμευτικών ριζοβακτηρίων.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων.

Κατά τη διάρκεια περάτωσης της διατριβής μου είχα τη χαρά να συνεργαστώ με τους Λμπανοβνού Σωτηρία, Βούρβου Ελένη, Βλαντό Βασίλη και Μπότου Μαρία στα πλαίσια της πτυχιακής τους διατριβής και τον Αλέξανδρο Καλλή στα πλαίσια της μεταπτυχιακής του διατριβής. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Δρ. Καρατζά Παναγιώτα και Δρ. Ταβουλάρη Σωτηρία για τη βοήθεια τους στο ξεκίνημα μου στο εργαστήριο, και τους Δρ. Μερμελέκα Γιώργο, και τις Υ.Δ. Γεωργοπούλου Κατερίνα και Καρενά Κατερίνα οι οποίοι συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της δουλειάς αυτής με ιδιαίτερο ενθουσιασμό και τους ευχαριστώ θερμά για την εποικοδομητική συνεργασία. Ιδιαίτερα όμως ευχαριστώ τον Δρ. Μερμελέκα Γιώργο και την Υ.Δ. Γεωργοπούλου Κατερίνα, γιατί καθώς

γνωρίζομασταν από τα φοιτητικά μας χρόνια και γίναμε πολύ καλοί φίλοι, συνεργαστήκαμε σε ένα κλίμα που ήταν πάντα το ιδανικότερο, εντός και εκτός του εργαστηρίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τη στήριξη τους όλα αυτά χρόνια, και κυρίως τη Βέρα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με στήριξαν ουσιαστικά όλα αυτά τα χρόνια και με έμαθαν να αγωνίζομαι για αυτά που πιστεύω, και τα αδέρφια μου που ήταν πάντα κοντά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Μηχανισμοί των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς	3
1.2 Δομικές μελέτες για πρωτεΐνες μεταφοράς δευτερογενούς τύπου	7
1.2.1 Δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς με το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων	8
1.2.2 Δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς με το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος	13
1.2.3 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς που δεν ομαδοποιούνται με βάση κάποιο από τα γνωστά μηχανιστικά μοτίβα	20
1.3 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων	27
1.3.1 Σημασία της μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	27
1.3.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	30
1.3.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2	33
1.4 Αξιοποίηση πουρινών σε βακτηριακά συστήματα	47
1.4.1. Η πορεία καταβολισμού των πουρινών	47
1.4.2 Καταβολισμός των πουρινών στα βακτήρια	50
1.5 Σκοπός της εργασίας	53
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
2.1 Όργανα	57
2.2 Χημικά Αναλώσιμα	58
2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	60
2.4 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	63
2.4.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA	63
2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)	63
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)	67
2.4.4 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασυνδυασμός)	76

2.4.5 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων	77
2.4.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και υπομόνωση πλασμιδιακού DNA	78
2.5 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων	80
2.5.1 Ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα (10 mL)	80
2.5.2 Ανάπτυξη σε μεγάλη κλίμακα (1 L)	80
2.6 Δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport Assays)	81
2.6.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα	81
2.6.1.1 Ανάλυση κινητικής	82
2.6.1.2 Πρόσληψη ξανθίνης παρουσία ανταγωνιστών	82
2.6.1.3 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM	83
2.6.1.4 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM παρουσία ή απουσία μη ραδιενεργού προσδέτη (ανταγωνιστή)	83
2.6.1.5 Επίδραση χλωριούχου καδμίου (CdCl ₂)	84
2.6.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay) σε μεμβρανικά κυστίδια	84
2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	86
2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών	87
2.8.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	87
2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	87
2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	88
2.9 Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)	89
2.10 <i>In silico</i> αναλύσεις	91

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **93**

3.1. Σχέσεις δομής-λειτουργίας του μεταφορέα ξανθίνης XanQ: Ο ρόλος του δωδέκατου διαμεμβρανικού τμήματος (TM12, αλληλουχία 419-450)	95
3.1.1. Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στη διαμεμβρανική έλικα TM12	96
3.1.2. Ανάλυση μεταλλαγμάτων της έλικας TM12 στο υπόστρωμα του XanQ φυσικού τύπου	99
3.1.3. Αναλυτική μεταλλαξιγένεση της Ile-432, στο υπόστρωμα του XanQ φυσικού τύπου	101
3.1.4. Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων της Ile-432 στο υπόστρωμα του XanQ φυσικού τύπου	105

3.1.5. Αναλυτική μεταλλαξιγένεση της Pe-432 στο υπόστρωμα του XanQ χωρίς κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys-less)	107
3.1.6. Μελέτη επίδρασης του <i>N</i> -αιθυλμηλεϊμιδίου (^N EM) στην ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης	110
3.1.7. Επίδραση αναλόγων ξανθίνης στην αναστολή της ενεργότητας της N430C από το NEM.	112
3.1.8. Μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ της έλικας TM12 και της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα XanQ: Ανάλυση διπλών μεταλλαγμάτων	115
3.1.9. Ανάλυση διπλών μεταλλαγμάτων στις θέσεις Gln-324 (μοτίβο-υπογραφή) και Pe-432 (έλικα TM12)	117
3.1.10. Ανάλυση μεταλλαγμάτων που εισάγουν ζεύγη κυστεϊνών στις περιοχές του μοτίβου-υπογραφή και της έλικας TM12 και μελέτη της επίδρασης ιόντων Cd ²⁺	121
3.2. Κλωνοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός νέων μεταφορέων από την οικογένεια NAT/NCS2	125
3.2.1. Κλωνοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των ομολόγων του XanQ από την <i>E. coli</i>	126
3.2.1.1. Αρχικοί έλεγχοι υπερέκφρασης και ενεργότητας των ομολόγων (screening)	126
3.2.1.2. Εκτενέστερος λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα YgfU	130
3.2.1.3. Εκτενέστερη μελέτη του μεταφορέα RutG και σύγκριση με τον UraA	134
3.2.2. Κλωνοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός ομολόγων του XanQ από το συμβιωτικό ριζοβακτήριο <i>Sinorhizobium meliloti</i> SM1021	138
3.2.3. Λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός θερμόφιλου και ενός ψυχρόφιλου μεταφορέα NAT	145
3.2.3.1. Λειτουργικός χαρακτηρισμός του MoorT	157
3.2.3.2. Λειτουργικός χαρακτηρισμός του PsychT	159
3.3. Μελέτη της μοριακής βάσης των διαφορών εξειδίκευσης μεταξύ μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2: Το παράδειγμα του ζεύγους των ομολόγων YgfU (μεταφορέας ουρικού στην <i>E. coli</i>) και XanQ (μεταφορέας ξανθίνης στην <i>E. coli</i>)	152
3.3.1. Μεταλλαξιγένεση του YgfU στις θέσεις His-37 (TM1) και Thr-100 (TM3)	153
3.3.1.1. Μεταλλαξιγένεση του YgfU στη θέση His-37 (TM1)	154
3.3.1.2. Μεταλλαξιγένεση του YgfU στη θέση Thr-100 (TM3)	156
3.3.2. Σημειακή μεταλλαξιγένεση του YgfU και του XanQ σε θέσεις σημαντικών καταλοίπων του XanQ που διαφέρουν στον YgfU	160
3.3.2.1. Μεταλλαξιγένεση του YgfU σε δυνητικά σημαντικές θέσεις καταλοίπων που διαφέρουν στον XanQ	161

3.3.2.2. Μεταλλαξιγένεση του XanQ σε δυνητικά σημαντικές θέσεις καταλοίπων που διαφέρουν στον YgfU	164
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	167
4.1 Συμβολή της παρούσας διατριβής στην ανάλυση της οικογένειας NAT	169
4.2 Συμμετοχή της έλικας TM12 στον μοριακό μηχανισμό του XanQ	171
4.3 Νέα χαρακτηρισμένα ομόλογα από την οικογένεια NAT/NCS2 – Νέα στοιχεία για φυσιολογικούς ρόλους μεταφορέων NAT	176
4.4 Η εξέλιξη της εξειδίκευσης πρόσληψης πουρινών	184
5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	195
6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	203
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	221
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	223
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	226
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	232

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- AMP:** μονοφωσφορική αδενοσίνη (adenosine monophosphate)
- ATP:** τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
- Avidin-HRP:** σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης
- BAD:** τομέας δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain)
- BSA:** αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)
- DMSO:** διμεθυλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)
- DTT:** διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)
- EDTA:** αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid)
- GFP:** πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein)
- GMP:** μονοφωσφορική γουανοσίνη (guanosine monophosphate)
- His₁₀:** αλληλουχία 10 καταλοίπων ιστοιδινών
- IPTG:** ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (isopropyl-β-D-thiogalactoside)
- KPi:** Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου
- LacY-epitope:** αλληλουχία του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της διαπεράσης λακτόζης
LacY (επίτοπος LacY)
- lacZ p/o:** υποκινητής/χειριστής του οπερονίου της λακτόζης (promoter/operator)
- LB:** Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (ή Luria Broth)
- NAT:** Οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (Nucleobase – Ascorbate Transporters)
- NCS2:** Οικογένεια-2 συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – κατιόντων (Nucleobase – Cation Symporters-2)
- NEM:** (*N*-ethylmaleimide), *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο
- PCR:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
- PMS:** μεθοσουλφονικό φαιναζίνιο (phenazinemethosulphate)
- PVDF:** διφθοριούχο πολυ-βινυλιδένιο (polyvinylidene difluoride)
- RSO:** (Right Side Out vesicles), κυστίδια ορθού προσανατολισμού
- SDS:** θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate)

TBST: ρυθμιστικό διάλυμα Tris που περιέχει Triton X-100 (Tris Buffered Saline-Triton X-100)

TC system: Διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας των πρωτεϊνών μεταφοράς (Transport Commission system)

TDG: β-D-γαλακτοπυρανοσίλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο

TMP: μονοφωσφορική θυμιδίνη (thymine monophosphate)

Αμινοξέα:

A ή Ala: αλανίνη

C ή Cys: κυστεΐνη

D ή Asp: ασπαρτικό

E ή Glu: γλουταμικό

F ή Phe: φαινυλαλανίνη

G ή Gly: γλυκίνη

H ή His: ιστιδίνη

I ή Ile: ισολευκίνη

K ή Lys: λυσίνη

L ή Leu: λευκίνη

M ή Met: μεθειονίνη

N ή Asn: ασπαραγίνη

P ή Pro: προλίνη

Q ή Gln: γλουταμίνη

R ή Arg: αργινίνη

S ή Ser: σερίνη

T ή Thr: θρεονίνη

V ή Val: βαλίνη

W ή Trp: τρυπτοφάνη

Y ή Tyr: τυροσίνη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μηχανισμοί των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς

Από τη συστηματική ανάλυση των γονιδιωμάτων τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών, προκύπτει ότι, κατά μέσο όρο, 30% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος από αυτές τις πρωτεΐνες (5-15% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων, ανάλογα με το είδος οργανισμού) είναι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Markowitz et al., 2008; <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>) (Ren et al., 2004; <http://www.membranetransport.org>). Αυτή η μεγάλη συχνότητα γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες αντανακλά και τη μεγάλη βιολογική σημασία τους. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε ενσωματωμένες (integral) και περιφερειακές (peripheral ή extrinsic), ανάλογα με τη δομική-λειτουργική σχέση που έχουν με τη μεμβράνη. Οι ενδομεμβρανικές (ενσωματωμένες) είναι δυνατόν να λειτουργούν σε συνέργεια με τις περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα στα συστήματα των μεμβρανικών υποδοχέων (integral) – πρωτεϊνικών κινασών (peripheral), έναν από τους γνωστούς μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης. Συνοπτικά, οι λειτουργικοί μηχανισμοί όπου συμμετέχουν μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να καταταγούν σε δύο ομάδες: μηχανισμοί **μεταγωγής σήματος** (signal transduction), που ελέγχουν την επικοινωνία και τις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου με το περιβάλλον του ή με άλλα κύτταρα για παράδειγμα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων, και μηχανισμοί **μεταγωγής ενέργειας** (energy transduction), που αξιοποιούν ή δημιουργούν διαβαθμίσεις πρωτονίων (ηλεκτροχημικό δυναμικό) και χημική ενέργεια (ATP) και ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις ιόντων, μεταβολιτών, αλλά και κυτταροτοξικών ουσιών.

Οι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς ανήκουν στη δεύτερη ομάδα, των μηχανισμών μεταγωγής ενέργειας, καθώς συμμετέχουν στη μεταφορά μορίων μέσω της μεμβράνης (μηχανικό έργο) και μπορούν να παράγουν διαβαθμίσεις συγκέντρωσης των υποστρωμάτων τους αξιοποιώντας άλλες μορφές ενέργειας (διαβαθμίσεις ιόντων, ATP). Ταυτόχρονα βέβαια, η μεταφορά μορίων, απλών οργανικών ενώσεων και ιόντων, αποτελεί τη βάση της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος. Την ανάγκη αυτή εξασφαλίζουν πολλοί διαφορετικοί εξειδικευμένοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς, διασφαλίζοντας την πρόσληψη των θρεπτικών πηγών άνθρακα, αζώτου, θείου ή φωσφόρου, τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης μεταβολιτών, τον έλεγχο της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης, του pH και των συνθηκών λειτουργίας ενζυμικών ή άλλων μηχανισμών του κυττάρου, τη ρύθμιση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος και του κύκλου λειτουργίας νευροδιαβιβαστών, ορμονών ή άλλων διακυτταρικών σημάτων και την άμυνα του

οργανισμού μέσω της ενεργού εκροής φαρμάκων, αντιβιοτικών, αντιϊκών παραγόντων και τοξινών ή τέλος ρύθμιση της ανακατανομής αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι το ασκορβικό και το ουρικό οξύ (Hediger, 2000).

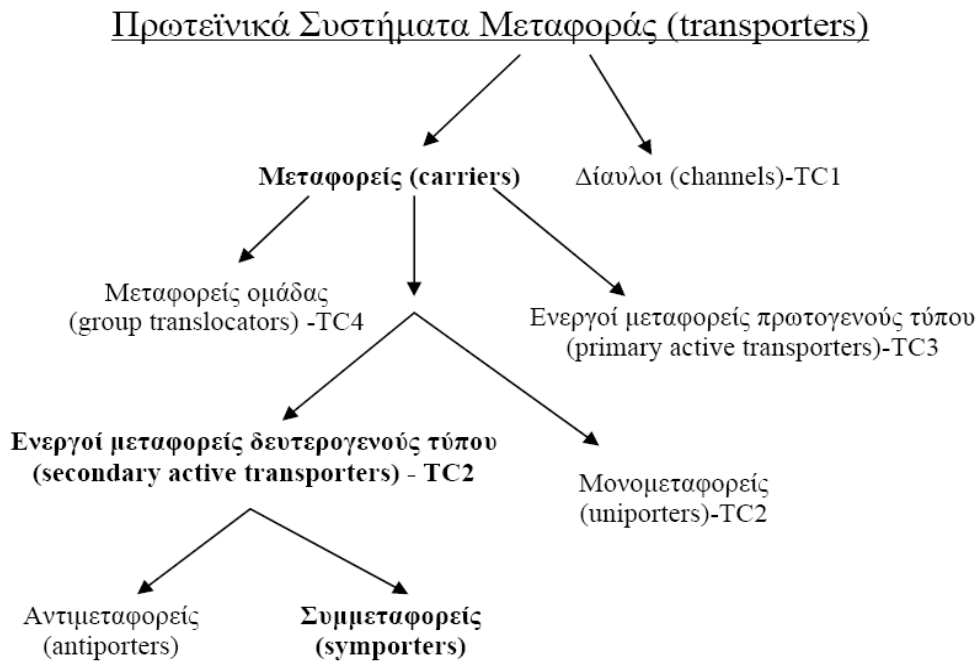
Για τις πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς έχει καθιερωθεί ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας (Transport Commission, TC system, 1999) (<http://www.tcdb.org>) (Saier, 2000; Saier *et al.*, 2009). Με βάση αυτό το σύστημα (**Εικόνα 1.1**), οι πρωτεΐνες μεταφοράς ταξινομούνται σε **διαύλους** (channels) (**TC1**) και **μεταφορείς** (carriers) (**TC2, TC3, TC4**), ενώ κατατάσσονται σε ξεχωριστές κατηγορίες οι μεταφορείς που συμμετέχουν στα συστήματα ροής ηλεκτρονίων (electron transport chains, ETS), όπως στην αναπνευστική αλυσίδα (**TC5**), οι πρωτεΐνες που λειτουργούν σε συνεργασία με άλλους, γνωστούς μεταφορείς (**TC8**) και πιθανοί μεταφορείς που δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (**TC9**).

Οι διαύλοι (**TC1**) επιτελούν πάντα διευκολυνόμενη διάχυση, δηλαδή δεν συσσωρεύουν αλλά απλώς εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις ιόντων ή μικρομορίων από τις δύο πλευρές της μεμβράνης (equilibrative transport) [π.χ. ο διάυλος K^+ (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2003)] και λειτουργούν με απλό τρόπο, εναλλάσσοντας μια ανοιχτή διαμόρφωση (open conformation) και μια κλειστή διαμόρφωση (closed conformation). Η εναλλαγή μεταξύ ανοιχτής και κλειστής διαμόρφωσης επιτυγχάνεται με ανταπόκριση είτε σε ειδικά χημικά σήματα (ligand gating), είτε στη διαφορά δυναμικού της μεμβράνης (voltage gating).

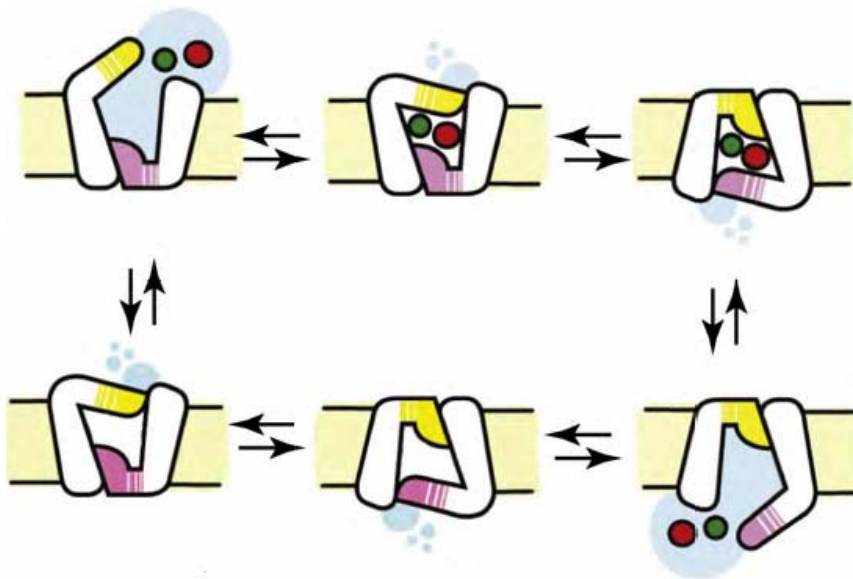
Οι μεταφορείς (**TC2, TC3, TC4**) επιτελούν κυρίως αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς, που επιτρέπουν «ασύμμετρη» συσσώρευση ιόντων ή μικρομορίων προς τη μία πλευρά της μεμβράνης, ακόμη και αντίθετα με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης (concentrative transport) και έχουν μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων (**Εικόνα 1.2**) (Saier *et al.*, 2000). Για τις αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς είναι απαραίτητη η αξιοποίηση μιας μορφής ενέργειας για την μεταφορά ενός υποστρώματος από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Η ενέργεια αυτή, μπορεί να προέρχεται είτε από μία «πρωτογενή» πηγή, όπως είναι η υδρόλυση του ATP, οπότε οι μεταφορείς ονομάζονται **πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς πρωτογενούς τύπου** [**Primary-TC3 active transporters** [π.χ. αντλία Na^+ /ATPase (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009)] είτε από μια «δευτερογενή» πηγή ενέργειας (ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων), οπότε μιλάμε για **πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου**, (**Secondary-TC2 active transporters**, π.χ. μεταφορέας λακτόζης, Guan and Kaback, 2006)].

Στην κατηγορία των μεταφορέων δευτερογενούς τύπου κατατάσσονται **συμμεταφορείς** (symporters, π.χ. συμμεταφορέας γλυκόζης: νατρίου, hSGLT1 (Huntley *et al.*, 2006; Faham *et al.*, 2008)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς την ίδια κατεύθυνση, και **αντιμεταφορείς** [antiporters, π.χ. αντιμεταφορέας ATP/ADP του βοός, (Pebay-Reygoula *et al.*, 2003)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς αντίθετες κατευθύνσεις. Στις ίδιες οικογένειες που περιλαμβάνουν μεταφορείς ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου, μπορεί να ανήκουν και **μονομεταφορείς** [uniporters, π.χ. μονομεταφορέας γλυκερόλης GlpF της *E. coli* (Sweet *et al.*, 1990) και οι μονομεταφορείς γλυκόζης GLUT1-13 (Joost and Thorens, 2000; Zhao and Keating, 2007)], οι οποίοι καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ενός μόνο είδους μορίου διαμέσου της μεμβράνης, επιτελώντας διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion). Πολλοί μεταφορείς μπορούν να καταλύουν περισσότερες από μια αντιδράσεις (δηλ. συμμεταφορά και αντιμεταφορά), ενώ σημειακές μεταλλαγές μπορούν να μετατρέψουν συμμεταφορείς σε αντιμεταφορείς ή μονομεταφορείς (Franco and Brooker, 1994, Lolkema and Poolman, 1995; Shroers *et al.*, 1997).

Τέλος, μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς που εντοπίζονται μόνο στα βακτήρια (Barabote and Saier, 2005) και ονομάζονται μεταφορείς ομάδας (**TC4, group translocators**) τροποποιούν τα υποστρώματά τους κατά τη διαμεμβρανική μεταφορά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, το σύστημα φωσφοτρανσφεράσης (PTS) της γλυκόζης που χρησιμοποιεί η *E. coli* σαν βασικό μηχανισμό πρόσληψης γλυκόζης και τροποποιεί το υπόστρωμα με φωσφορυλίωση κατά την μεταφορά ώστε να δεσμεύεται εξωκυτταρικά γλυκόζη αλλά στο κυτταρόπλασμα να αποδίδεται 6-φωσφορική γλυκόζη. Η ενεργότητα της φωσφοτρανσφεράσης της γλυκόζης εξαρτάται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) (Tchieu *et al.*, 2001; Saier *et al.*, 2005) και ρυθμίζεται, σε πρωτεωμικό επίπεδο, από την αλληλεπίδραση με την κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή της περμεάσης λακτόζης LacY (Seok *et al.*, 1997; Sondej *et al.*, 1999; Sondej *et al.*, 2002; Cochu *et al.*, 2005).



Εικόνα 1.1. Ταξινομικές ομάδες των πρωτεϊνών μεταφοράς με βάση το διεθνές σύστημα ταξινόμησης και ονοματολογίας TC (<http://www.tcdb.org>)



Εικόνα 1.2. Μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης για τη συμμεταφορά ιόντος-υποστρώματος (από Boudker *et al.*, 2010). Έξι στάδια διαμορφωτικών αλλαγών ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα που εκτελεί ενεργό μεταφορά, εξαρτώμενη από τη διαβάθμιση πρωτονίων (κόκκινη σφαίρα: υπόστρωμα, πράσινη σφαίρα: πρωτόνιο).

1.2 Δομικές μελέτες για πρωτεΐνες μεταφοράς δευτερογενούς τύπου

Σήμερα, λόγω της πολυπλοκότητας και των ιδιαίτερων δομικών χαρακτηριστικών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, έχουν αναλυθεί ελάχιστες δομές. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια των πρωτεϊνών «δευτερογενούς» ενεργού μεταφοράς ως προς τα υποστρώματα που χρησιμοποιούν (ιόντα, σάκχαρα, αμινοξέα, νουκλεοτιδικές βάσεις και νουκλεοτίδια, αντιβιοτικά, λιπόφιλα φάρμακα) και ως προς την πρωτοταγή δομή ή δομική αρχιτεκτονική τους, καθώς κατατάσσονται σε 200 τουλάχιστον διακριτές γονιδιακές οικογένειες, ενώ ο αριθμός των πιθανών ομολόγων αυξάνεται καθημερινά από τις αναλύσεις γονιδιωμάτων που ολοκληρώνονται ή είναι υπό εξέλιξη (Markowitz *et al.*, 2008).

Οι εικόνες αναλυτικών δομών που διαθέτουμε σήμερα από κρυσταλλογραφικά δεδομένα για πρωτεΐνες δευτερογενούς τύπου είναι σχετικά λίγες (βλ. παρακάτω). Βέβαια, τα συμπεράσματα από την ερμηνεία αυτών των στατικών εικόνων δομών θα πρέπει να συνδυαστούν με λειτουργικά γενετικά και βιοχημικά δεδομένα και συστηματικές αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης και σημειακής στόχευσης για να επιτραπεί κατανόηση των μηχανισμών ενεργού μεταφοράς στο μοριακό επίπεδο. Ένα τέτοιο επίπεδο συνδυασμού δομικών και λειτουργικών δεδομένων έχει επιτευχθεί σε ελάχιστες περιπτώσεις, με κορυφαίο παράδειγμα την περμεάση λακτόζης (Kaback *et al.*, 2007, 2011).

Οι δομές που έχουμε μέχρι τώρα για πρωτεΐνες δευτερογενούς τύπου εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά: **1)** Οι δομές αυτές προέρχονται από προκαρυωτικά ομόλογα, συνήθως θερμοφίλων βακτηρίων ή θερμοσταθερών μεταλλαγμάτων προκαρυωτικών πρωτεϊνών, και σε συνδυασμό με μοντελοποίηση χρησιμοποιούνται για τη μελέτη ευκαρυωτικών ομολόγων, και **2)** Παρά τη μεγάλη ποικιλία των οικογενειών μεταφορέων ως προς το μεταφερόμενο υπόστρωμα και τον τρόπο λειτουργίας, οι περισσότεροι μεταφορείς εμπίπτουν σε δύο γενικές κατηγορίες δομικών-μηχανιστικών μοτίβων, αυτό του **διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων** (rocker switch), που αντιπροσωπεύεται κυρίως από την περμεάση λακτόζης LacY, δομικό πρότυπο για τη Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (MFS) αλλά και άλλες πρωτεΐνες με μικρότερη συγγένεια αλληλουχίας (Abramson *et al.*, 2004) και αυτό της **ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος** (gated porter), που αντιπροσωπεύεται κυρίως από τον μεταφορέα αμινοξέων LeuT, βακτηριακό ομόλογο των μεταφορέων νευροδιαβιβαστών του ανθρώπου (σεροτονίνης, ντοπαμίνης, νοραδρεναλίνης) (Krishnamurthy *et al.*, 2009), αλλά και πρωτεΐνες άλλων οικογενειών μεταφορέων όπου ανήκει και ο συμμεταφορέας νατρίου:γλυκόζης του εντερικού επιθηλίου (Abramson and Wright, 2009). Η ερμηνεία

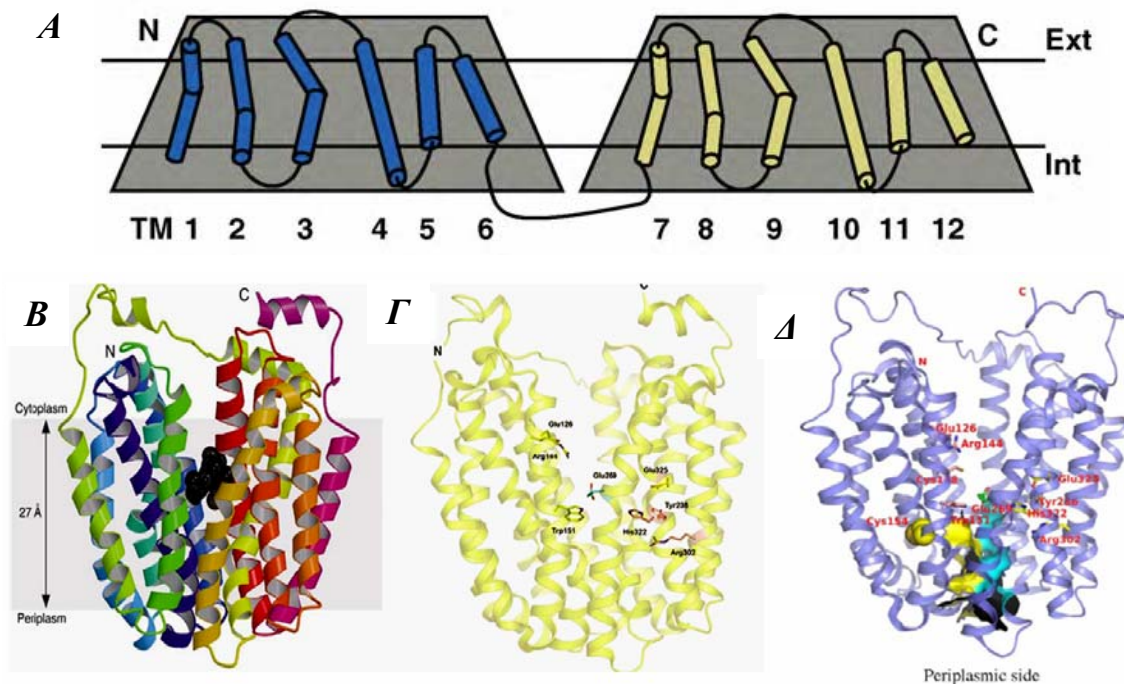
των δομικών δεδομένων και στις δύο περιπτώσεις είναι σύμφωνη με την κλασική ιδέα (Widdas, 1952) του μηχανισμού **εναλλασσόμενης πρόσβασης** του υποστρώματος σε ένα υδρόφιλο κέντρο δέσμευσης (alternating access model) (Karpowich and Wang, 2008). Στη συνέχεια, αναφέρονται όλες οι δομές που έχουν αναλυθεί μέχρι τώρα.

1.2.1 Δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς με το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων

Η περμεάση λακτόζης (LacY)

Πριν 8 χρόνια δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή της LacY με ευκρίνεια ανάλυσης 3,5 Å (Abramson *et al.*, 2003). Πρόκειται ουσιαστικά για την πρώτη δομή ενός μεταφορέα δευτερογενούς τύπου που δόθηκε από κρυσταλλογραφία. Η δομή έχει λυθεί συμπλεγμένη με ένα ανάλογο λακτόζης (β-D-γαλακτοσυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοσίδιο, TDG) και χρησιμοποιώντας τη μεταλλαγμένη μορφή LacY-C154G (Abramson *et al.*, 2003). Ακόμα πιο πρόσφατα, δημοσιεύθηκε και η δομή της φυσικού τύπου LacY (Guan *et al.*, 2007). Στην πρώτη περίπτωση επιλέχθηκε η μεταλλαγμένη μορφή της περμεάσης (C154G) με βάση προηγούμενες μοριακές και βιοχημικές μελέτες λόγω του ότι δεσμεύει το υπόστρωμα (λακτόζη ή άλλο γαλακτοσίδιο) με υψηλή συγγένεια, αλλά έχει αμελητέα ικανότητα μεταφοράς, ενώ, επιπλέον δεν υπόκειται σε σημαντικές αλλαγές διαμόρφωσης κατά τη δέσμευση του υποστρώματος και παράλληλα έχει υψηλή θερμοσταθερότητα και μικρή τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων (Smirnova and Kaback., 2003). Η κρυσταλλική δομή του μορίου εμφανίζει δύο διακριτές περιοχές (domains), που αντιστοιχούν σε δύο δέσμες των έξι διαμεμβρανικών α-ελίκων, μία N-τελική και μία C-τελική (six-helix bundles, N6 και C6) (**Εικόνα 1.3A**): οι δύο αυτές περιοχές (N6 και C6 domains), παρά τον χαμηλό βαθμό ομολογίας στις αλληλουχίες τους, εμφανίζουν μεταξύ τους μια ψευδοσυμμετρία, που είναι ένδειξη εξέλιξης μέσω ενδομοριακού αναδιπλασιασμού (Saier, 2000; Poolman *et al.*, 2007) (**Εικόνα 1.3**). Σε όψη παράλληλα προς τη μεμβράνη, η πρωτεΐνη εμφανίζει μια εσωτερική υδρόφιλη κοιλότητα ανοιχτή προς την κυτταροπλασματική πλευρά, όπου είναι συνδεδεμένο το υπόστρωμα (TDG) : αυτό το «κέντρο» δέσμευσης υποστρώματος σχηματίζεται ουσιαστικά μεταξύ των δύο δομικά ομόλογων περιοχών N6 και C6 (Abramson *et al.*, 2003) (**Εικόνα 1.3B**). Τα ίδια γενικά δομικά στοιχεία εμφανίζει και η κρυσταλλική δομή της φυσικού τύπου LacY (ευκρίνεια ανάλυσης 3.6 Å) (Guan *et al.*, 2007) (**Εικόνα 1.3A**), καθώς και η κρυσταλλική δομή του LacY-C154G απουσία υποστρώματος, που δόθηκε σε δύο διαφορετικά pH, 6.5 και 5.6, σε ευκρίνειες

ανάλυσης 2.95 Å και 3.3 Å, αντίστοιχα (Mirza *et al.*, 2006) (**Εικόνα 1.3Γ**). Οι διαφορετικές αυτές κρυσταλλογραφικές δομές δίνουν και άλλες σημαντικές λεπτομέρειες στην διαμόρφωση του μορίου που ερμηνεύουν α) την προσαρμογή της διαμόρφωσης γύρω από το ενεργό κέντρο κατά τη δέσμευση υποστρώματος (induced fit) (Mirza *et al.*, 2006) και β) τον «φαινότυπο» του ανενεργού μεταλλάγματος C154G, το οποίο δεσμεύει αλλά δεν μεταφέρει το υπόστρωμα, γιατί δεν γίνονται οι κατάλληλες αλλαγές διαμόρφωσης (Guan *et al.*, 2007).



Εικόνα 1.3 Α. Δευτεροταγής δομή της LacY, αλλά και όλης της οικογένειας MFS, όπου φαίνονται οι δομικές επαναλήψεις των 6 TM (Boudker *et al.*, 2010).

Β. Η κρυσταλλική δομή της LacY (C154G) με το υπόστρωμα, σε όψη παράλληλη με την μεμβράνη (Abramson *et al.*, 2003). Το υπόστρωμα TDG φαίνεται προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (με μαύρο χρώμα) το οποίο είναι ανοικτό προς την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.

Γ. Η κρυσταλλική δομή της φυσικού τύπου LacY (Mirza *et al.*, 2006).

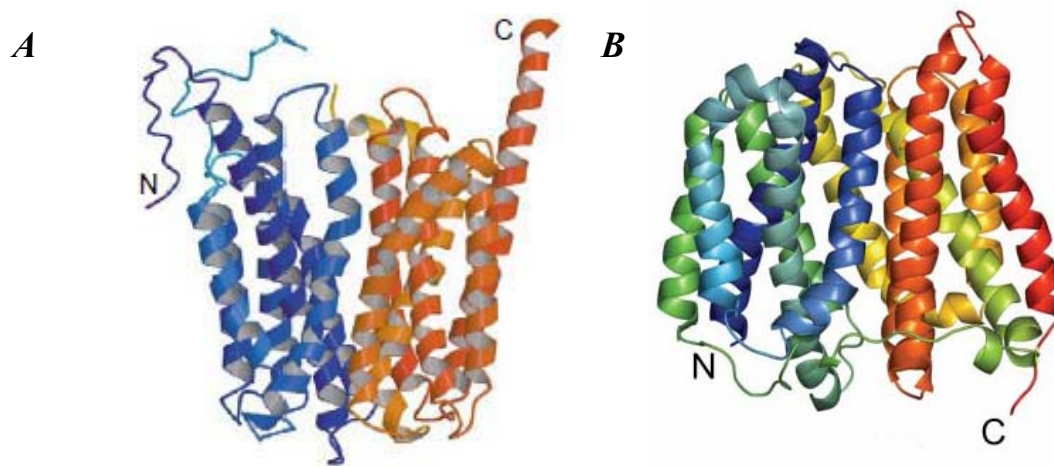
Δ. Η κρυσταλλική δομή της φυσικού τύπου LacY (Guan *et al.*, 2007).

Και στις τρεις περιπτώσεις, οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες εμφανίζονται οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές (N6 και C6). Μεταξύ της N-τελικής και C-τελικής περιοχής α-ελίκων (N6 και C6), δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα.

Επιπλέον δομές από την οικογένεια MFS

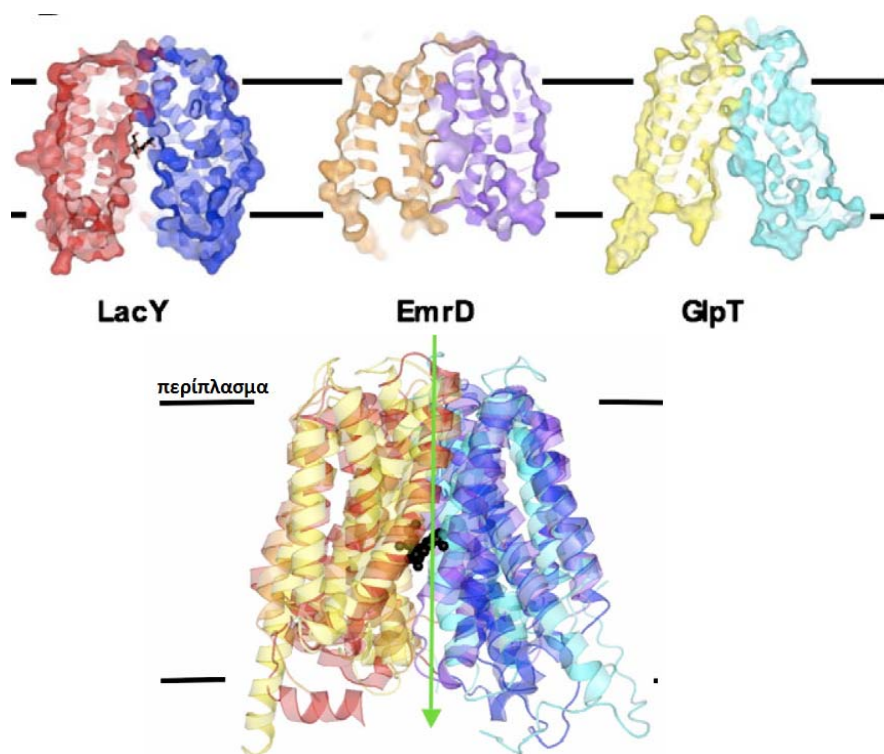
Στο ίδιο τεύχος του περιοδικού *Science* που δημοσίευσε την πρώτη δομή της LacY (Abramson *et al.*, 2003), δημοσιεύθηκε και η κρυσταλλική δομή (σε ευκρίνεια 3.3 Å) του αντιμεταφορέα τριφωσφορικής γλυκερόλης/φωσφορικού GlpT της *E. coli* (Huang *et al.*, 2003), ενός ακόμη μέλους

της υπεροικογένειας MFS (Saier, 2000). Η κρυσταλλική αυτή δομή (**Εικόνα 1.4A**) αφορά μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα και παρουσιάζει δύο δομικά παρόμοιες ψευδοσυμμετρικές περιοχές των έξι διαμεμβρανικών α -ελίκων η κάθε μία (N6 και C6), όπως ακριβώς και στην LacY (Abramson *et al.*, 2003) (**Εικόνα 1.5**). Αν και η δομή αυτή δόθηκε απουσία υποστρώματος, η δομή της GlpT είναι πολύ παρόμοια με αυτήν της LacY που ανήκει στην ίδια υπεροικογένεια (Lemieux *et al.*, 2004).



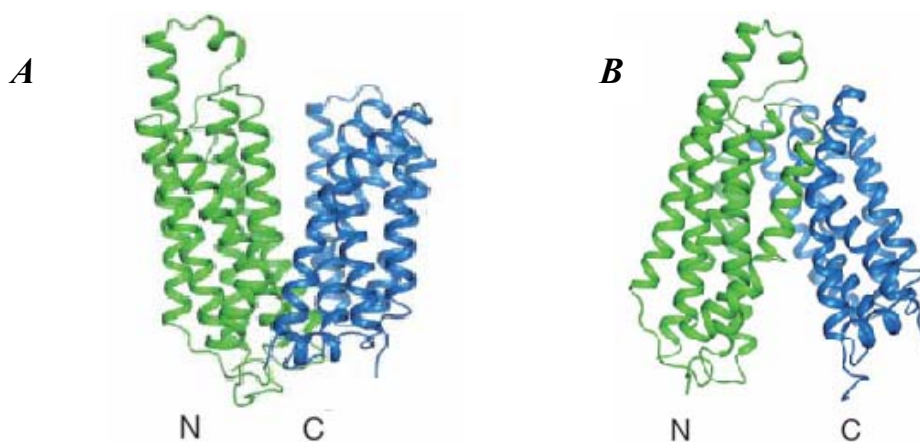
Εικόνα 1.4 **A.** Μεταφορέας GlpT της *E. coli* (Lemieux *et al.*, 2004): Οι 12 διαμεμβρανικές α -έλικες εμφανίζονται και πάλι οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές (N6 και C6). Μεταξύ της N6 (μπλε) και C6 (κόκκινο), δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα, όπως και στην LacY. **B.** Μεταφορέας EmrD, ο οποίος βρίσκεται σε διαμόρφωση ενδιάμεση αλλά ανοιχτή στο κυτταρόπλασμα (Yin *et al.*, 2006).

Επίσης στο περιοδικό *Science*, δημοσιεύτηκε η δομή ενός άλλου μέλους της MFS (σε ευκρίνεια 3.5 Å) (Yin *et al.*, 2006). Πρόκειται για τον μεταφορέα EmrD ο οποίος είναι αντιμεταφορέας φαρμάκων: H^+ που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη στην *E. coli* και επιτρέπει την εκροή μιας ποικιλίας αμφιπαθικών ενώσεων. Η δομή δείχνει μια πρωτεΐνη ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 1.4B**), σε μια λιγότερο ανοιχτή διαμόρφωση σε σχέση με αυτές των LacY και GlpT (**Εικόνα 1.5**). Σχηματίζει όπως και οι άλλες γνωστές δομές την ίδια κεντρική κοιλότητα, η οποία όμως περιέχει υδρόφοβα κατάλοιπα, κάτι που συμφωνεί με το είδος των μεταφερόμενων υποστρωμάτων.



Εικόνα 1.5 (πάνω) Σύγκριση των δομών των LacY, EmrD και GlpT, με τις δομικά συμμετρικές περιοχές να χρωματίζονται διαφορετικά σε κάθε περίπτωση. **(κάτω)** Αλληλοεπικάλυψη των δομών του LacY, GlpT και EmrD με μοντελοποίηση. Οι 6 έλικες της N-περιοχής είναι χρωματισμένες μπλέ (LacY), γαλάζιο (GlpT) και μώβ (EmrD). Οι 6 έλικες της C-περιοχής είναι χρωματισμένες κόκκινο (LacY), κίτρινο (GlpT) και πορτοκαλί (EmrD). Το υπόστρωμα της LacY TDG φαίνεται σαν μαύρες σφαίρες (από Forrest *et al.*, 2011).

Όλες οι προηγούμενες κρυσταλλικές δομές από την υπεροικογένεια MFS δείχνουν μια παρόμοια διαμόρφωση δομής, ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. Μια νέα όμως κρυσταλλική δομή έρχεται να συμπληρώσει την γενική εικόνα, καθώς δείχνει μια πρωτεΐνη ανοιχτή προς το εξωτερικό του κυττάρου. Πρόκειται για τη δομή του συµμεταφορέα L-φουκόζης:H⁺, FucB από την *E. coli*, σε ευκρίνεια 3.1 Å (Dang *et al.*, 2010) (**Εικόνα 1.6A**). Η αποκάλυψη της δομής της πρωτεΐνης σε συνδυασμό με βιοχημικά και βιοφυσικά δεδομένα οδήγησε στην αποσαφήνιση του ενεργού κέντρου του μορίου (Dang *et al.*, 2010). Επίσης, έγινε μοντελοποίηση της πιθανής δομής του FucB με διαμόρφωση ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα, με βάση τη δομή της LacY (**Εικόνα 1.6B**). Προτείνεται ότι ο μεταφορέας υποβάλλεται σε συγκεκριμένες περιστροφές των δύο ψευδοσυμμετρικών περιοχών του, η οποία γίνεται δυνατή από την ύπαρξη μιας ευλύγιστης υδρόφιλης περιοχής μεταξύ των διαμεμβρανικών ελίκων 6 και 7, για να μπορέσει να πάρει τις δύο ουσιαστικές του διαμορφώσεις, δηλαδή με την κοιλότητα ανοιχτή είτε προς το κυτταρόπλασμα είτε προς το περίπλασμα (Dang *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.6 **A.** Μεταφορέας FucB της *E. coli* (Dang *et al.*, 2010), όπου εμφανίζονται και πάλι οι δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές, με διαμόρφωση ανοιχτή προς το περίπλασμα αυτήν τη φορά. **B.** Μεταφορέας FucB, σε διαμόρφωση ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα έπειτα από μοντελοποίηση (Dang *et al.*, 2010).

Οι αρκετές δομές που έχουν δημοσιευτεί από μέλη της υπεροικογένειας MFS, που στην καλύτερα μελετημένη περίπτωση της LacY, συνοδεύονται από εκτεταμένα λειτουργικά γενετικά, βιοχημικά και βιοφυσικά δεδομένα και συστηματικές αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης και σημειακής στόχευσης, έχουν οδηγήσει στη διαλεύκανση του γενικού μηχανισμού μεταφοράς. Οι δύο δομικά ομόλογες περιοχές (N6-C6) σχηματίζουν την κοιλότητα του κέντρου δέσμευσης και τα κατάλοιπα που σχηματίζουν το κέντρο δέσμευσης βρίσκονται στη βάση της κοιλότητας αυτής περίπου στο μέσο του μορίου. Η δέσμευση του υποστρώματος δίνει το έναυσμα για το άνοιγμα της κοιλότητας στη μία πλευρά με ταυτόχρονο κλείσιμό της από την άλλη πλευρά, μέσω της δυναμικής κίνησης των δύο ημιμορίων (N6-C6), επιτρέποντας την εναλλασσόμενη πρόσβαση του κέντρου δέσμευσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης (Kaback *et al.*, 2011). Αυτός ο μηχανισμός μεταφοράς είναι χαρακτηριστικός για την οικογένεια MFS, που καλύπτει περίπου το 25% των πρωτεϊνών δευτερογενούς τύπου, και αναφέρεται συχνά σαν μοτίβο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων (rocker switch) για να τονιστούν οι απότομες αλλαγές διαμόρφωσης που φαίνεται να συμβαίνουν.

Με το ίδιο δομικό-μηχανιστικό μοτίβο μοντελοποιούνται και άλλες λιγότερο συγγενικές πρωτεΐνες, όπως ο μεταφορέας μελιβιόζης της *E. coli* MelB (Yousef and Guan, 2009) αλλά και οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας ENT που μεταφέρουν το υπόστρωμά τους με διευκολυνόμενη διάχυση και όχι με ενεργό μεταφορά (Papageorgiou *et al.*, 2008; Valdes *et al.*, 2009).

1.2.2 Δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς με το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος

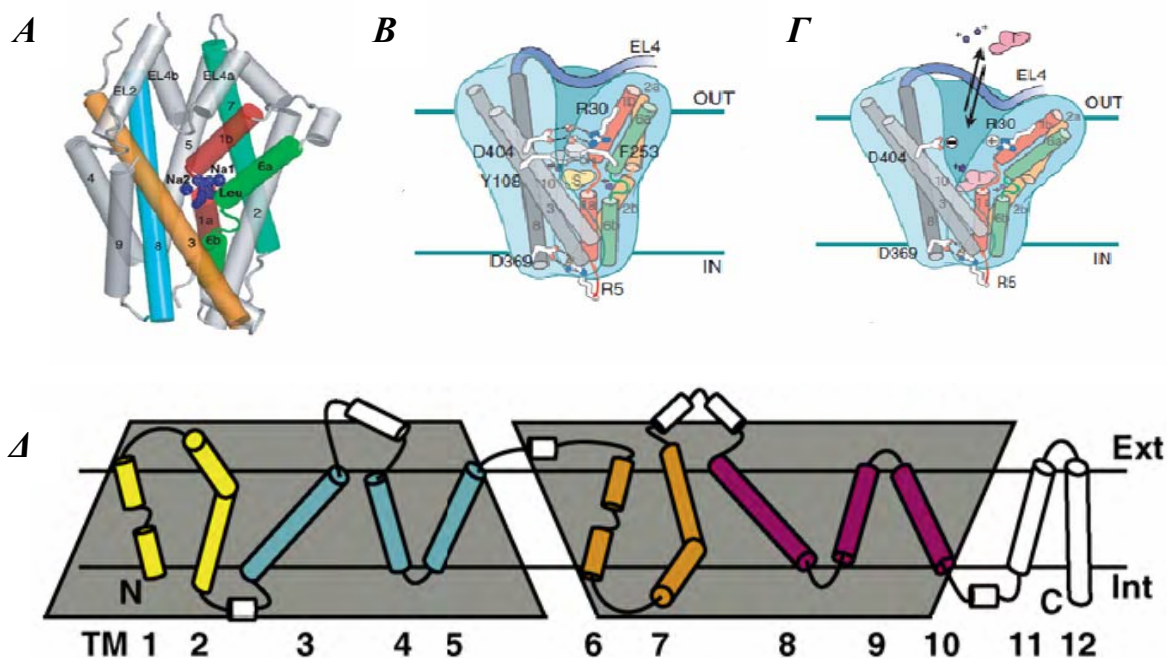
Ο μεταφορέας LeuT_{Aa}

Μια ακόμη κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα δευτερογενούς τύπου αφορά έναν μεταφορέα της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών/νατρίου (NSS). Οι μεταφορείς NSS στον άνθρωπο, τερματίζουν την μετάδοση σήματος στη σύναψη χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικές διαβαθμίσεις, με τις οποίες επιτρέπουν την επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών από τη σύναψη στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων και της νευρογλοίας και αποτελούν στόχους πολλών θεραπευτικών και ψυχοτρόπων ουσιών, ενώ η δυσλειτουργία τους έχει συσχετισθεί με πολλές ασθένειες του νευρικού συστήματος. Η πρώτη κρυσταλλική δομή που λύθηκε για έναν μεταφορέα NSS, το 2005, και σε εξαιρετικά υψηλή ευκρίνεια (1.9 Å), αφορά ένα βακτηριακό ομόλογο από το θερμοφιλο βακτήριο *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}). Η δομή δείχνει μια διαμόρφωση του μεταφορέα που φέρει συνδεδεμένο ένα μόριο υποστρώματος (λευκίνης) και δύο ιόντα νατρίου (Yamashita *et al.*, 2005) (**Εικόνα 1.7**).

Πιο πρόσφατα, παρουσιάστηκαν και άλλες κρυσταλλικές δομές του ίδιου ομόλογου (LeuT_{Aa}), που είχαν λυθεί παρουσία των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (TCAs) χλομιπραμίνης (chlomipramine) (Singh *et al.*, 2007) ή δεσιπραμίνης (desipramine) (Zhou, Z., *et al.*, 2007), αναλόγων της ιμιπραμίνης (imipramine), τα οποία φαίνονται να δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις από ό,τι το υπόστρωμα (Singh *et al.*, 2007) και, ακόμη πιο πρόσφατα, λύθηκαν τρεις αντίστοιχες δομές του LeuT_{Aa} παρουσία των φαρμάκων σερτραλίνης (sertraline), R-φλουοξετίνης ή S-φλουοξετίνης (fluoxetine) (Prozac), που ανήκουν στην κατηγορία των επιλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs) (Zhou, Z., *et al.*, 2009). Η φυσιολογική σημασία των νεότερων αυτών δομών είναι εντόνως αμφισβητούμενη γιατί τα φάρμακα που αναστέλλουν τους ομόλογους μεταφορείς νευροδιαβιβαστών στον άνθρωπο δεν αναμένεται να έχουν κάποιον αντίστοιχο ρόλο στα βακτηριακά συστήματα (Rudnick, 2007).

Και οι 6 ανωτέρω κρυσταλλικές δομές του LeuT_{Aa} παρουσιάζουν την ίδια γενική εικόνα. Ο πυρήνας της πρωτεΐνης αποτελείται από τα δέκα πρώτα διαμεμβρανικά τμήματα, με την περιοχή των τμημάτων 6-10 να εμφανίζει ψευδοσυμμετρία προς αυτήν των 1-5 μέσω ενός υποθετικού άξονα συμμετρίας στο επίπεδο της μεμβράνης, σε ανεστραμμένη διευθέτηση (inverted repeat) (**Εικόνα 1.7Δ**) (Forrest *et al.*, 2008). Το υπόστρωμα και τα δύο ιόντα νατρίου εμφανίζονται προσδεδεμένα εντός του πυρήνα (core) της πρωτεΐνης, στο μέσο της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας. Συνολικά, και οι 6 δομές παρουσιάζουν το LeuT_{Aa} σε μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι «κλειστή», δηλαδή αποκλεισμένη

από τη πρόσβαση στο υδατικό περιβάλλον, και το υπόστρωμα «παγιδευμένο» στο κέντρο δέσμευσης (substrate occluded state) (**Εικόνα 1.7B**). Ωστόσο, έχει δημοσιευθεί μια ακόμη κρυσταλλική δομή του LeuT_{Aa} (Singh *et al.*, 2008), η οποία διαφέρει από τις υπόλοιπες γιατί παρουσιάζει μια διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το εξωτερικό του κυττάρου («locked open»), παρουσία ενός ανταγωνιστικού αναστολέα του LeuT_{Aa}, της τρυπτοφάνης (Singh *et al.*, 2008) (**Εικόνα 1.7Γ**). Από την ανάλυση του ενεργού κέντρου σε όλες αυτές τις δομές, φαίνεται ότι καθοριστικό ρόλο στη δέσμευση της λευκίνης και των 2 ιόντων Na⁺ έχουν δύο μερικώς αποδιπλωμένες περιοχές στο κέντρο των διαμεμβρανικών α-ελίκων TM1 και TM6. Ακόμα δύο έλικες (TM5 και TM10) φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς εναλλάξ επιτρέπουν ή απαγορεύουν την πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης.

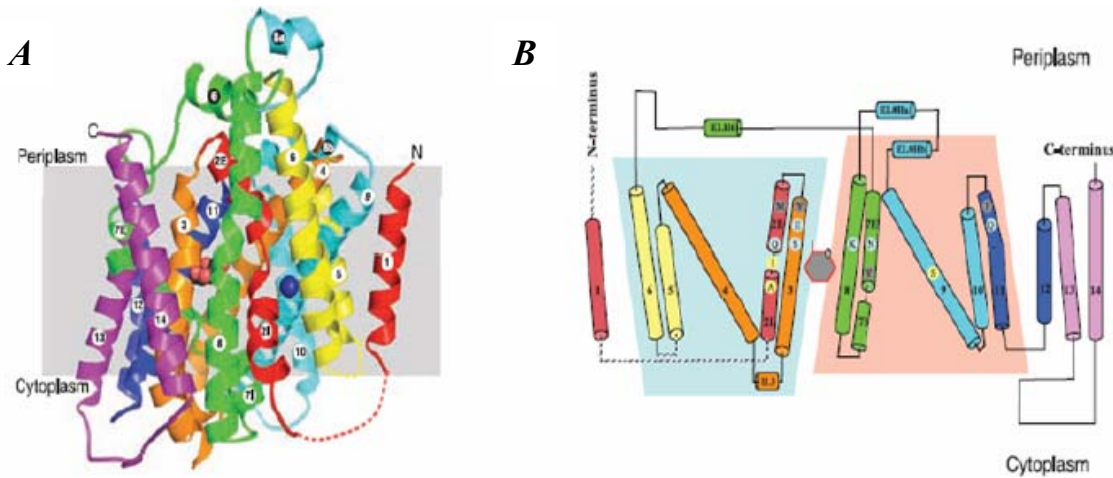


Εικόνα 1.7 Α. Μεταφορέας LeuT_{Aa} του *Aquifex aeolicus* (Yamashita *et al.*, 2005). Β. Σχηματική απεικόνιση του κέντρου δέσμευσης του LeuT_{Aa}, με διαμόρφωση μερικώς «ανοιχτή» και το υπόστρωμα (λευκίνη) «αποκλεισμένο» (Yamashita *et al.*, 2005), Γ. Σχηματική απεικόνιση του κέντρου δέσμευσης του LeuT_{Aa}, με διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το εξωτερικό και το υπόστρωμα (τρυπτοφάνη) προσβάσιμο από το εξωτερικό περιβάλλον (Singh *et al.*, 2008), Δ. Σχηματική απεικόνιση δευτεροταγούς δομής και τοπολογική οργάνωση του LeuT_{Aa}, όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρία των δύο τμημάτων (TMs 1-5 και TMs 6-10) (Boudker *et al.*, 2010).

Η επίλυση της δομής του υπερθερμόφιλου ομολόγου LeuT_{Aa} σε πολύ μεγάλη ευκρίνεια ανάλυσης (1.45-1.9 Å) ήταν κάτι το ασυνήθιστο για μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η δομή αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την διερεύνηση του μηχανισμού λειτουργίας των ευκαρυωτικών ομολόγων της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών: Na⁺ (NSS family), όπως των μεταφορέων σεροτονίνης hSERT, και ντοπαμίνης hDAT (Singh, 2008). Επίσης, βοήθησε στην ανάλυση ενός κέντρου δέσμευσης ιόντων Cl⁻, το οποίο χρησιμοποιούν μόνο τα ευκαρυωτικά και όχι τα προκαρυωτικά ομόλογα (Zomot *et al.*, 2007; Forrest *et al.*, 2007; Tavoulari *et al.*, 2011), στη διερεύνηση της δράσης γνωστών φαρμάκων που έχουν ως στόχους τους μεταφορείς αυτούς [imipramine, ibogaine, Prozac (Tavoulari *et al.*, 2009)], και στην παρουσίαση νέων στοιχείων για το μηχανισμό της εναλλασσόμενης πρόσβασης (alternate access), που προτείνουν ότι κατά τις εναλλαγές διαμόρφωσης υπάρχει μια δέσμη ελίκων που μετατοπίζονται (rocking bundle) και μια δέσμη ελίκων που παραμένουν στην ίδια θέση (scaffold) (Forrest *et al.*, 2008, 2011).

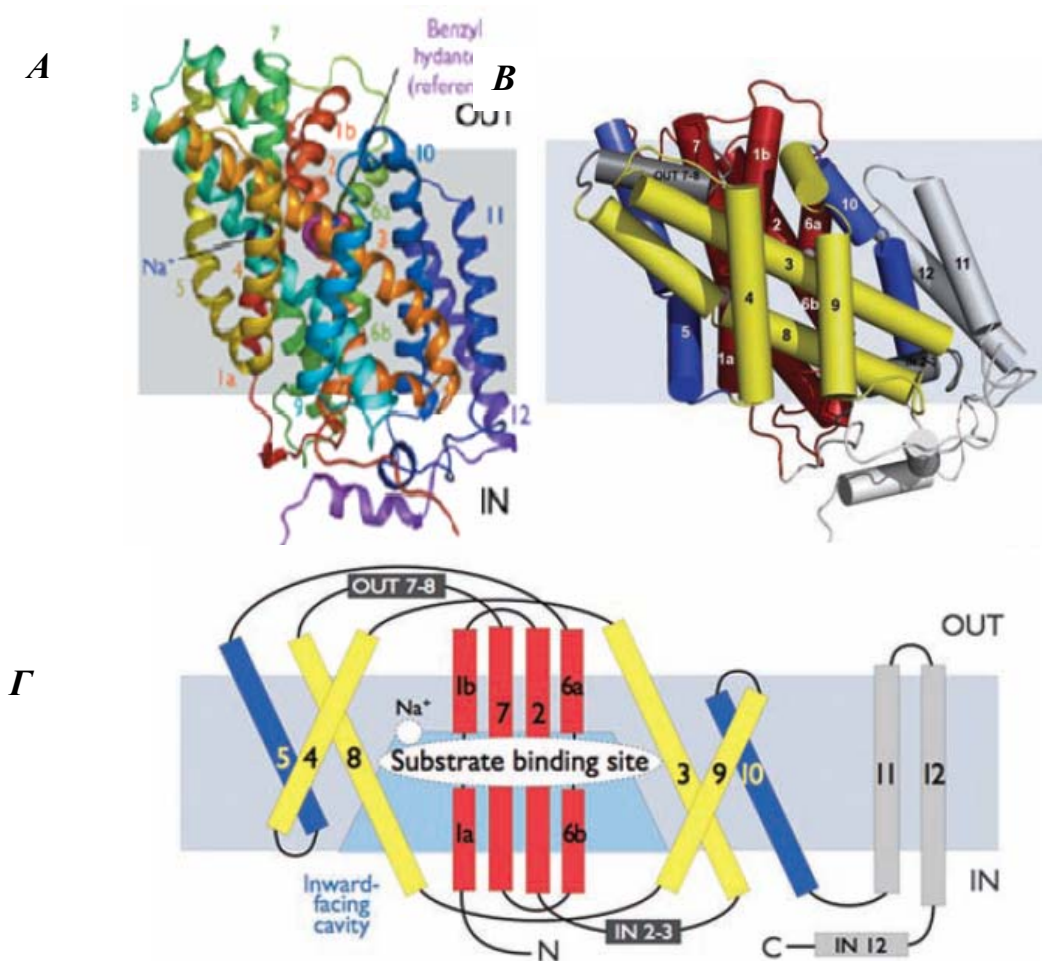
Επιπλέον δομές του μοτίβου της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος

Το 2008 έγινε γνωστή η κρυσταλλική δομή του συμμεταφορέα Na⁺: γαλακτόζης από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Vibrio parahaemolyticus* vSGLT, που είναι μέλος της οικογένειας συμμεταφορέων νατρίου (solute sodium symporters, SSS family), (Faham *et al.*, 2008) (**Εικόνα 1.8**). Η οικογένεια των μεταφορέων SSS περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συμμεταφέρουν Na⁺ με σάκχαρα, αμινοξέα, ιόντα ή βιταμίνες. Ορισμένες από αυτές είναι σημαντικές για τη φυσιολογία του ανθρώπου όπως οι συμμεταφορείς Na⁺:γλυκόζης/γαλακτόζης (hSGLT1, hSGLT2), που ελέγχουν την πρόσληψη γλυκόζης από το εντερικό επιθήλιο (Wright *et al.*, 2007). Η ανάλυση της δομής του vSGLT είναι στα 3.0 Å και εμφανίζεται μια διαμόρφωση μερικώς ανοιχτή προς το εσωτερικό. Σχηματίζεται ένας πυρήνας από 2 μονάδες των 5 διαμεμβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM2-TM6 και TM7-TM11), με το υπόστρωμα (γαλακτόζη) να είναι συνδεδεμένο στο κέντρο του πυρήνα και αποκλεισμένο από το εξωτερικό περιβάλλον (occluded state). Η γενική δομική οργάνωση παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τη δομή του LeuT, (**Εικόνα 1.9B**), παρά το ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές οικογένειες μεταφορέων.



Εικόνα 1.8 **A.** Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα vSGLT, όπου φαίνονται τα δύο διαμεμβρανικά τμήματα που δεν συμμετέχουν στον πυρήνα του μεταφορέα (μοβ χρώμα) και οι δύο μονάδες (TM2-6, γαλάζιο, πράσινο, μπλε και TM7-11, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο) που σχηματίζουν τον πυρήνα της πρωτεΐνης. **B.** Σχήμα της δευτεροταγούς δομής του vSGLT, όπου φαίνονται οι δύο δομικά ομόλογες μονάδες, TM2-6 και TM7-11 (Faham *et al.*, 2008).

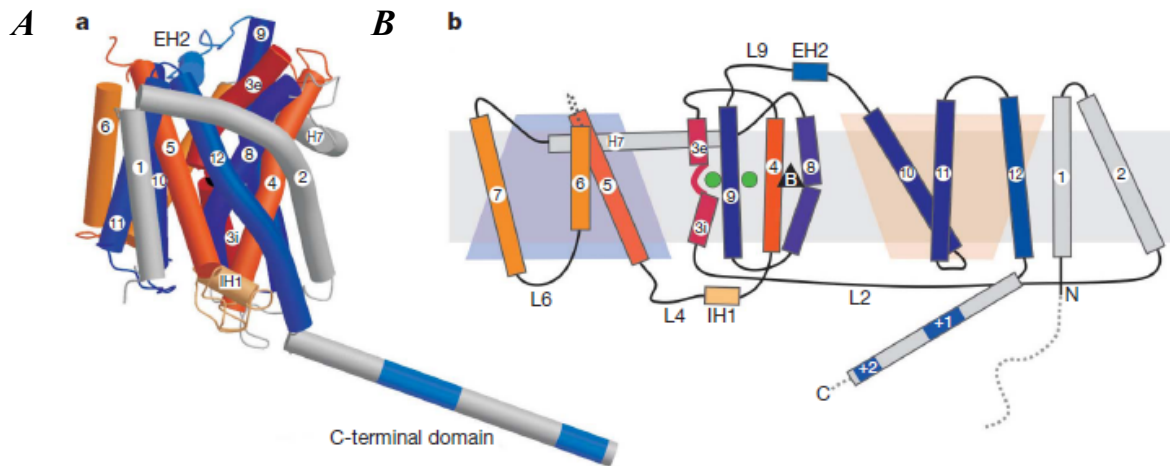
Το 2008, επίσης, δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή από ένα μέλος της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NCS1 (Nucleobase Cation Symporter 1 family), η οποία περιορίζεται φυλογενετικά σε Βακτήρια, Μύκητες και Φυτά και είναι διαφορετική από την οικογένεια NAT/NCS2 που εξετάζουμε στην παρούσα διατριβή (Weyand *et al.*, 2008) (**Εικόνα 1.9**). Πρόκειται για τον μεταφορέα Mhp1 από το *Microbacterium liquefaciens*, που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα ινδολυλ-μεθυλ και βενζυλ-υδαντοΐνες (indolyl methyl- and benzyl-hydantoins). Η ανάλυση της δομής είναι σε ευκρίνεια 2.85 Å και εμφανίζεται μια διαμόρφωση μερικώς ανοιχτή προς το εξωτερικό (**Εικόνα 1.9A**). Σχηματίζεται ένας πυρήνας από 2 μονάδες των 5 διαμεμβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM1-TM5 και TM6-TM10), με το υπόστρωμα (βενζυλ-υδαντοΐνη) να είναι συνδεδεμένο στο κέντρο του πυρήνα και αποκλεισμένο από το εξωτερικό περιβάλλον (occluded state). Η γενική δομή παρουσιάζει την ίδια δομική οργάνωση με το LeuT και το vSGLT (**Εικόνα 1.9Γ**). Εντελώς πρόσφατα (Shimamura *et al.*, 2010), δημοσιεύτηκε μια ακόμα δομή του Mhp1 σε ευκρίνεια 3.8 Å με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό (**Εικόνα 1.9B**). Οι διαφορετικές διαμορφώσεις των μεταφορέων αυτού του τύπου που δείχνουν οι κρυσταλλικές δομές μας επιτρέπουν μοντελοποίηση νέων δομικών ομολόγων και μια πιο γενική ερμηνεία του μηχανισμού λειτουργίας τους (Diallinas, 2008).



Εικόνα 1.9 **A.** Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα Mph1, όπου φαίνονται με χρώματα οι δύο μονάδες (TM1-5, γαλάζιο, πράσινο, μπλε και TM 6-10 κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο) που σχηματίζουν τον πυρήνα της πρωτεΐνης (Weyand *et al.*, 2008). **B.** Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα Mph1 ελεύθερου υποστρώματος με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό (Shimamura *et al.*, 2010). **Γ.** Σχηματική τοπολογία και δευτεροταγής δομή του μεταφορέα, όπου φαίνονται με κόκκινο χρώμα οι διαμεμβρανικές έλικες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του πυρήνα και με κίτρινο οι έλικες που παραμένουν σταθερές κατά την εναλλαγή διαμορφώσεων (scaffold). Με μπλε χρώμα είναι οι δύο έλικες 5 και 10 που φαίνεται να συμμετέχουν εναλλάξ στον αποκλεισμό ή απελευθέρωση της πρόσβασης στο υπόστρωμα (Shimamura *et al.*, 2010).

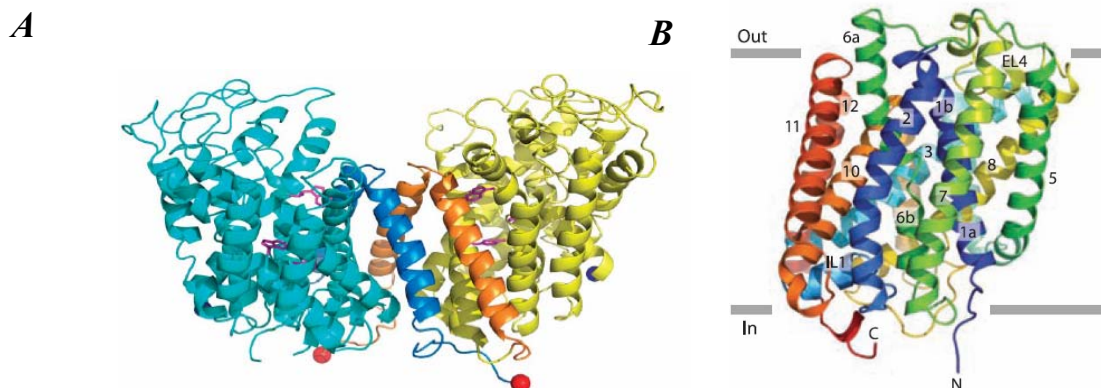
Άλλη μια δομή που ανήκει στον ίδιο γενικό δομικό τύπο είναι του συμμεταφορέα βεταΐνης: Na^+ από το *Corynebacterium glutamicum*, BetP, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων βεταΐνης/ χολίνης/ καρνιτίνης (BTT). Πρόκειται για μια οικογένεια μεταφορέων των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται από τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής ωσμωτικής πίεσης και είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά ωσμωλυτικών μορίων μέσα στο κύτταρο ώστε να επανέλθει η ισορροπία, ανταποκρινόμενοι στο υπερωσμωτικό στρες. Πρόσφατα αναλύθηκε η δομή του μεταφορέα BetP σε ανάλυση 3.3 Å (Ressl *et al.*, 2009), η οποία, αν εξαιρέσουμε το εκτενές C-τελικό άκρο (**Εικόνα 1.10A**), εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τις γνωστές δομές του LeuT, Mph1 και vSGLT, καθώς

περιλαμβάνει 2 δομικές μονάδες (TM5-7 και TM10-12) με αντίστροφη ψευδοσυμμετρία κατά το επίπεδο της μεμβράνης (**Εικόνα 1.10B**).



Εικόνα 1.10 **A.** Η δομή του μονομερούς του μεταφορέα BetP, **B.** σχηματική απεικόνιση δευτεροταγούς δομής, τοπολογική οργάνωση του BetP, όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρία των δύο τμημάτων (TMs 5-7 και TMs 10-12), σκιασμένα τρίγωνα (ροζ και γαλάζιο), καθώς και το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος (μαύρο τρίγωνο: betaine) (Ressl et al., 2009).

Μια πέμπτη ομάδα πρωτεϊνών που κατατάσσονται στο ίδιο δομικό πρότυπο με τον LeuT είναι η υπεροικογένεια μεταφορέων αμινοξέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων APC, που έχει πολύ σημαντικούς ρόλους στη φυσιολογία πολλών οργανισμών αλλά και του ανθρώπου. Πρόσφατα δημοσιεύθηκαν αρκετές περιπτώσεις δομών από μέλη της υπεροικογένειας αυτής. Η πρώτη αφορά τον αντιμεταφορέα L-αργινίνης:αγματίνης της *E. coli* AdiC, ο οποίος συμμετέχει σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε συνθήκες υψηλής οξύτητας. Μάλιστα, δύο σχεδόν ταυτόχρονες δημοσιεύσεις δίνουν παρόμοια εικόνα. Η πρώτη δομή είναι σε ευκρίνεια 3.6 Å (Gao et al., 2009), και η δεύτερη σε ευκρίνεια 3.2 Å (Fang et al., 2009) και δείχνουν μια πρωτεΐνη με διαμόρφωση ανοιχτή στο εξωτερικό ελεύθερη υποστρώματος (**Εικόνα 1.11A**). Και αυτή η δομή εμφανίζει το ίδιο δομικό μοτίβο της αντίστροφης ψευδοσυμμετρικής ενδομοριακής οργάνωσης. Η δεύτερη περίπτωση αφορά το μεταφορέα ArcT από το θερμόφιλο *Methanocaldococcus jannaschii*, ο οποίος είναι ένας H⁺ εξαρτώμενος μεταφορέας αμινοξέων. Η δομή σε ευκρίνεια 2.35 Å (Shaffer et al., 2009) εμφανίζει μια πρωτεΐνη με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό (**Εικόνα 1.11B**) η οποία είναι και πάλι παρόμοια με αυτή του LeuT όπως και του AdiC, όμως ένα κατάλοιπο λυσίνης (Lys-158) βρίσκεται σε θέση ανάλογη με αυτή του δεύτερου ιόντος νατρίου στον LeuT, δείχνοντας πως μεταφορείς εξαρτώμενοι από διαφορετικά ιόντα μπορούν να έχουν παρόμοιες αρχές κατά το μηχανισμό μεταφοράς.



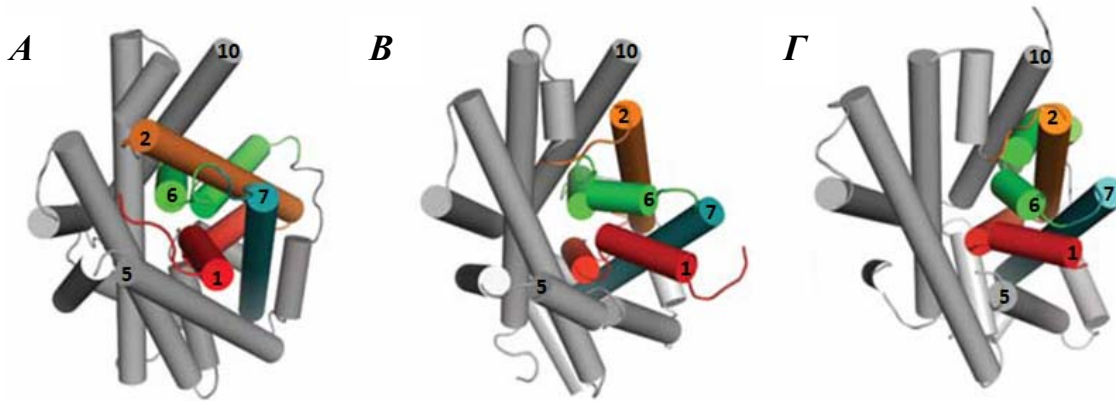
Εικόνα 1.11 **A.** Η δομή του διμερούς AdiC (Fang *et al.*, 2009). **B.** Η δομή του ApcT (Shaffer *et al.*, 2009).

Γενική μηχανιστική θεώρηση

Βλέπουμε ότι πρωτεΐνες ενεργού δευτερογενούς μεταφοράς από εντελώς διαφορετικές οικογένειες, δηλαδή μέλη της υπεροικογένειας NSS (μεταφορείς σεροτονίνης, ντοπαμίνης, νοραδρεναλίνης) (Yamashita *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008; Faham *et al.*, 2008; Forrest *et al.*, 2008), APC (μεταφορείς αμινοξέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων) (Gao *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Shaffer *et al.*, 2009), της οικογένειας NCS1 (μεταφορείς κυτοσίνης-ουρακίλης-θειαμίνης-αλλαντοΐνης) (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010), της SSS (μεταφορείς σακχάρων-αμινοξέων-βιταμινών) (Faham *et al.*, 2008) ή της BTT (μεταφορείς βηταΐνης-χολίνης-καρνιτίνης) (Ressler *et al.*, 2009), μοιράζονται το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος. Αυτή η πληθώρα των δομών από τόσο διαφορετικά συστήματα, σε συνδυασμό με σημαντικό όγκο βιοχημικών δεδομένων, έχει οδηγήσει σε μια αρκετά καλή κατανόηση του γενικού μηχανισμού μεταφοράς.

Κατ'αρχήν, όλες αυτές οι πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το συνολικό αριθμό των ελίκων τους, έχουν τις 2 ψευδοσυμμετρικές μονάδες των 5 διαμεμβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM1-TM5 και TM6-TM10, αρίθμηση από το LeuT), οι οποίες μεταξύ τους σχηματίζουν το κέντρο δέσμευσης και το μονοπάτι μεταφοράς. Οι έλικες 1, 2 και 6 και 7 σχηματίζουν μια δομή η οποία είναι σημαντική για τη δέσμευση του υποστρώματος, η οποία είναι και αυτή που περιστρέφεται κατά τη μεταφορά (rocking bundle), ενώ οι έλικες 3, 4 και 8, 9 σχηματίζουν 2 διασταυρούμενα μοτίβα V φτιάχνοντας ένα σύμβολο δίσκου (#) τα οποία κινούνται ελάχιστα κατά τη μεταφορά (scaffold). Ακόμη 2 έλικες, οι 5 και 10, οι οποίες συνδέουν τα δύο μέρη μεταξύ τους, είναι περισσότερο εύκαμπτες και μια κάμψη στο μέσο τους επιτρέπει την εναλλασσόμενη πρόσβαση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης κατά τη μεταφορά (**Εικόνα 1.12**). Επίσης συγκεκριμένα κατάλοιπα έχουν καίρια σημασία για την εξειδίκευση

της μεταφοράς καθώς λειτουργούν ως πύλες επιτρέποντας μόνο τα κατάλληλα κάθε φορά υποστρώματα να εισέλθουν στην κεντρική κοιλότητα που περιέχει το κέντρο δέσμευσης (Forrest *et al.*, 2008, 2009, 2011).



Εικόνα 1.12 **A.** Κρυσταλλογραφική δομή του LeuT ανοιχτή προς το εξωτερικό. **B.** Μοντελοποιημένη δομή του LeuT ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. **Γ.** Κρυσταλλογραφική δομή του vSGLT ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα η οποία συμπίπτει με την προβλεπόμενη από τη μοντελοποίηση του LeuT (Forrest *et al.*, 2009).

1.2.3 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς που δεν ομαδοποιούνται με βάση κάποιο από τα γνωστά μηχανιστικά μοτίβα

Αν και ένας πολύ μεγάλος αριθμός δευτερογενών μεταφορέων μοντελοποιείται με βάση τα 2 πιο κοινά μηχανιστικά μοτίβα, του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων (rocker switch) και της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου (gated porter), υπάρχει ένας μεγάλος επίσης αριθμός οικογενειών των οποίων οι δομές αποτελούν από μόνες τους ξεχωριστές κατηγορίες.

Δομές με αντίστροφη εσωτερική ψευδοσυμμετρία

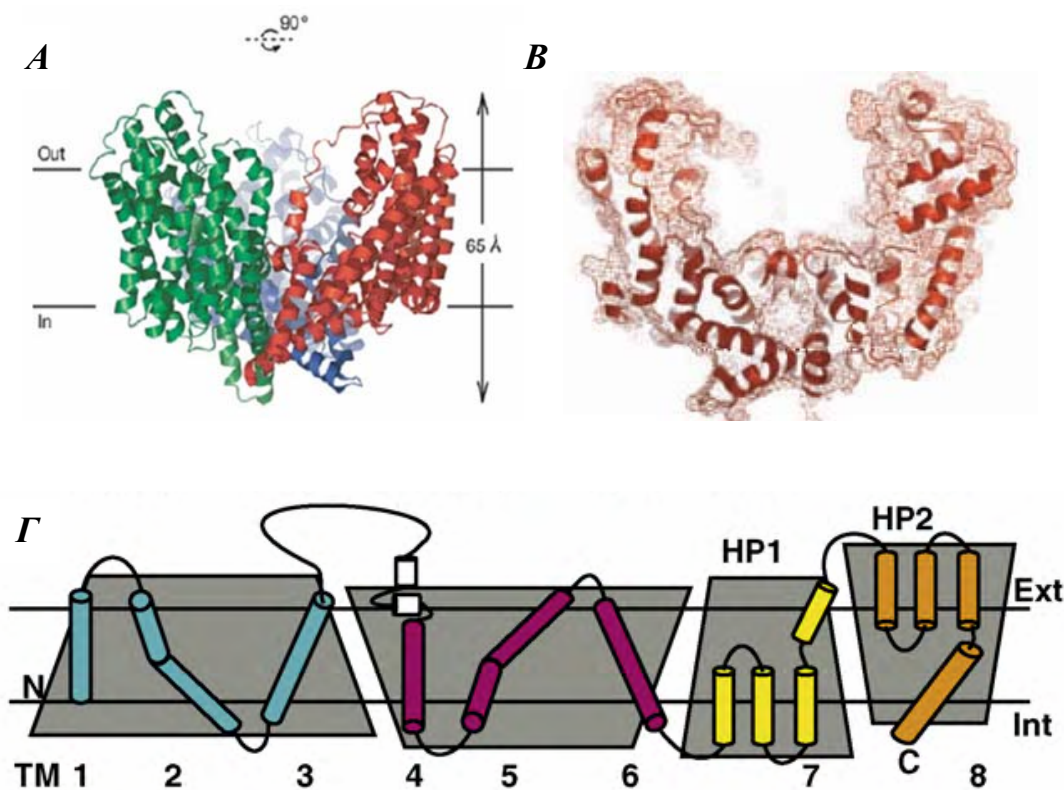
Υπάρχουν ακόμα 2 δομές οι οποίες αν και εμφανίζουν ομοιότητες με αυτές του δομικού τύπου του LeuT, καθώς διατηρούν την αντίστροφη ψευδοσυμμετρία κατά το επίπεδο της μεμβράνης, εντούτοις διαφέρουν σε σημαντικές λεπτομέρειες.

Μεταφορέας Gl_{Tph}

Οι μεταφορείς γλουταμικού (excitatory amino acid transporters EAAT1-5 στον άνθρωπο) καταλύουν την επαναπρόσληψη γλουταμικού από τη σύναψη στον ενδοκυτταρικό χώρο του προσυναπτικού νευρώνα ή των νευρογλοιακών κυττάρων, χρησιμοποιώντας προϋπάρχουσες διαβαθμίσεις ιόντων (Slotboom *et al.*, 1999).

Το 2004 δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή, σε ευκρίνεια 3.2 Å, ενός ομολόγου των ευκαρυωτικών μεταφορέων γλουταμικού (Gl_{Tph}) από το υπερθερμόφιλο αρχαίο *Pyrococcus horikoshii* (Yernool *et al.*, 2004) (**Εικόνα 1.13Α**). Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του Gl_{Tph} η οποία μπορεί να εκφραστεί ετερόλογα στη μεμβράνη της *E. coli* K-12 σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η δομή δείχνει ένα ομοτριμερές σε μορφή αβαθούς λεκάνης (basin) με ένα υδρόφιλο κοίλωμα ανοικτό προς την εξωκυτταρική πλευρά στον υδατικό διαλύτη. Στο κατώτατο όριο του ανοικτού αυτού κοιλώματος, δημιουργούνται τρεις διακριτές θέσεις δέσμησης υποστρώματος (binding sites), μία για κάθε υπομονάδα του τριμερούς. Επιπρόσθετα, μεταξύ των τριών υπομονάδων σχηματίζεται ένας διαμεμβρανικός πόρος που θα μπορούσε να λειτουργήσει ανεξάρτητα ως διάυλος ιόντων Cl⁻, όπως είχε προταθεί για τους μεταφορείς γλουταμικού EAAT4 και EAAT5 από μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας (Ariza *et al.*, 1997; Kavanaugh, 2004) (**Εικόνα 1.13Β**). Πρόσφατα έγινε λειτουργική ανάλυση του μεταφορέα Gl_{Tph}, μετά από απομόνωση και ανασύσταση σε λιποσωμάτια, η οποία υποδεικνύει ότι ο Gl_{Tph} έχει υψηλή εξειδίκευση για ασπαρτικό (K_m 0.12 μM) και η λειτουργία του εξαρτάται από ιόντα Na⁺ (Ryan *et al.*, 2009), αν και αρχικά είχε προταθεί ότι πρόκειται για μεταφορέα γλουταμικού (Raunser *et al.*, 2006).

Ένα σημαντικό αποτέλεσμα που έχει προκύψει από την δομική μελέτη του Gl_{Tph} είναι ότι διαλευκάνθηκε η τοπολογική οργάνωση του C-τελικού μέρους του μορίου, για την οποία οι αλγόριθμοι πρόβλεψης και τα αρχικά βιοχημικά πειράματα έδιναν αντικρουόμενα αποτελέσματα: για πρώτη φορά, σε έναν μεταφορέα δευτερογενούς τύπου, βρέθηκαν τόσο εκτεταμένα στοιχεία μικρών, μη διαμεμβρανικών, αμφιπαθικών τμημάτων (interrupted helices) και ενδιάμεσων, επανεισερχόμενων συνδετικών θηλειών (φουρκετών) (re-entrant loops) (HP1, HP2) (Yernool *et al.*, 2004) (**Εικόνα 1.13Γ**). Η παρουσία τέτοιων στοιχείων, τα οποία δε μπορούσε να προβλέψει η αρχική τοπολογική ανάλυση, φαίνεται να σχετίζεται με σημαντικές θέσεις καταλοίπων που παίζουν ρόλο στη δέσμηση και μεταφορά του υποστρώματος.

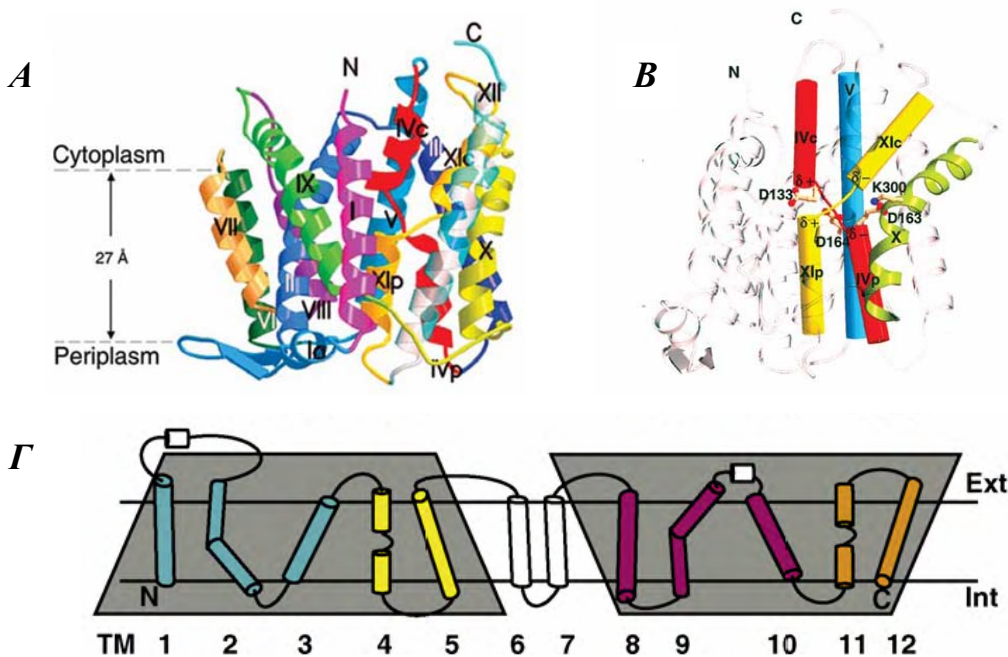


Εικόνα 1.13 **A.** Μεταφορέας Glt_{Ph} του *Pyrococcus horikoshii* (Yernool *et al.*, 2004). Η κρυσταλλική δομή δείχνει ένα ομοτριμερές σε μορφή αβαθούς λεκάνης με ένα υδρόφιλο κοίλωμα ανοιχτό προς την εξωκυτταρική πλευρά στον υδατικό διαλύτη. **B.** Μεταξύ των τριών μονομερών σχηματίζεται ένας πόρος που μπορεί να λειτουργεί ανεξάρτητα ως διάυλος Cl⁻ (Kavanaugh, 2004). **Γ.** Η δευτεροταγής δομή του μεταφορέα Glt_{Ph}, όπως προέκυψε μετά την λύση της κρυσταλλικής δομής, όπου φαίνονται η ψευδοσυμμετρική οργάνωση των TM1-3 και TM4-6 και οι δύο σημαντικές επανεισερχόμενες θηλειές, HP1 και HP2 (από Boudker *et al.*, 2010).

Μεταφορέας NhaA

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης νατρίου/ πρωτονίων και του ενδομοριακού όγκου από αντιμεταφορείς Na⁺/H⁺ έχει ουσιαστική σημασία για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επίσης η προσαρμογή σε περιβάλλοντα με ακραίες τιμές αλατότητας και pH σε φυτά και βακτήρια ή σε καρδιακά μυϊκά κύτταρα απαιτεί τη δράση τέτοιων αντιμεταφορέων, των οποίων η δραστηριότητα ελέγχεται από το pH. Ομόλογα τέτοιων αντιμεταφορέων υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς. Ένα ομόλογο από την *E. coli* κρυσταλλώθηκε σε ευκρίνεια 3.4 Å (Hunte *et al.*, 2005) (**Εικόνα 1.14**). Πρόκειται για τον NhaA, ο οποίος είναι ο κύριος αντιμεταφορέας τέτοιου τύπου στην *E. coli* και τα εντεροβακτήρια, και λειτουργεί χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων για να εξαγει ιόντα νατρίου από το κύτταρο. Η δράση του ελέγχεται αυστηρά από το pH, κάτι που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του ενδοκυττάρου pH, με βέλτιστη λειτουργία σε αλκαλικό

και καταστολή σε όξινο pH. Η δομή δείχνει μια διαμόρφωση «κλειδωμένη» σε όξινο pH, και ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. Παρατηρείται και εδώ αντίστροφη ψευδοσυμμετρική οργάνωση (**Εικόνα 1.14Γ**) με χαρακτηριστικό γνώρισμα τη σταυρωτή σύζευξη των ελίκων 4 και 11 (**Εικόνα 1.14B**). Η δομή σχηματίζει μια αρνητικά φορτισμένη χοάνη ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα στα άκρα της οποίας υπάρχουν κατάλοιπα ευαίσθητα στο pH. Η χοάνη αυτή προσελκύει κατιόντα, από τα οποία μόνο τα μεταφερόμενα ($\text{Na}^+ / \text{Li}^+$) έχουν πρόσβαση προς το κέντρο δέσμευσης στην κεντρική κοιλότητα της δομής. Σε συνθήκες όξινου pH τμήμα της έλικας 11 κλείνει την πρόσβαση προς το κέντρο δέσμευσης και η πρωτεΐνη παραμένει ανενεργή. Όταν συνδεθεί το κατιόν, η πρωτεΐνη «ανοίγει» προς το περίπλασμα, απελευθερώνει το κατιόν ($\text{Na}^+ / \text{Li}^+$) και στο κέντρο δέσμευσης δεσμεύονται 2 πρωτόνια, κάτι που επαναφέρει τη δομή στον προσανατολισμό προς το κυτταρόπλασμα. Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την αποπρωτονίωση του μεταφορέα. Τα διαθέσιμα βιοχημικά δεδομένα φαίνεται να επιβεβαιώνουν αυτήν την εικόνα. Αυτός ο μηχανισμός προβλέπει ότι ο κύκλος της μεταφοράς υποστρώματος διεκπεραιώνεται με περιορισμένες μόνο κινήσεις στο κέντρο του μορίου, κάτι που συμβαδίζει με την πολύ υψηλή δραστηριότητα του NhaA καθώς είναι ένας από τους πιο γρήγορους μεταφορείς που υπάρχουν.



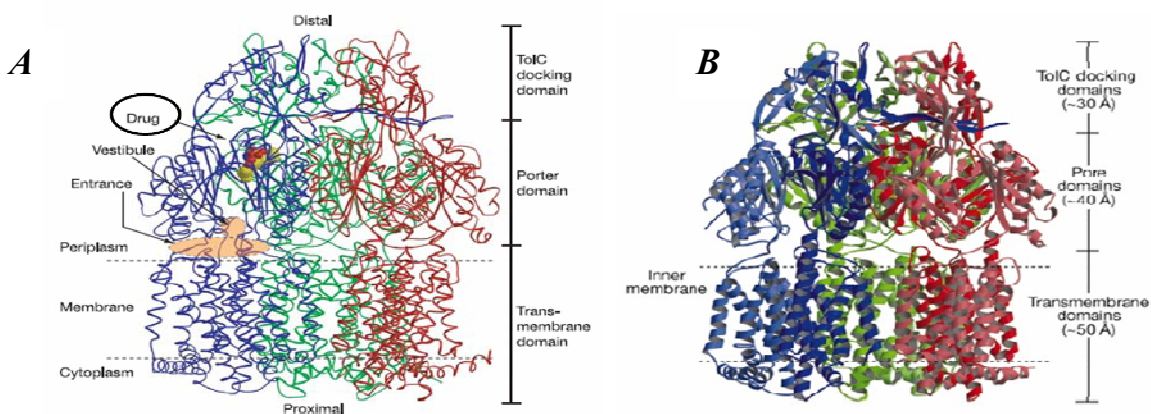
Εικόνα 1.14 **A.** Κρυσταλλική δομή του NhaA (Hunte *et al.*, 2005). **B.** Λεπτομέρεια από τη δομή όπου φαίνεται η σταυρωτή σύζευξη των ελίκων 4 (κόκκινο) και 11 (κίτρινο) (Hunte *et al.*, 2005). **Γ.** Δευτεροταγής δομή όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρική εσωτερική οργάνωση (Boudker *et al.*, 2010).

Δομές που δεν υπενθυμίζουν άλλα δομικά πρότυπα

Άλλες 2 γνωστές δομές αρκετά μελετημένων πρωτεϊνών δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν δομικά με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Πρόκειται για τον AcrB και τον αντιμεταφορέα ATP/ADP.

Μεταφορέας AcrB

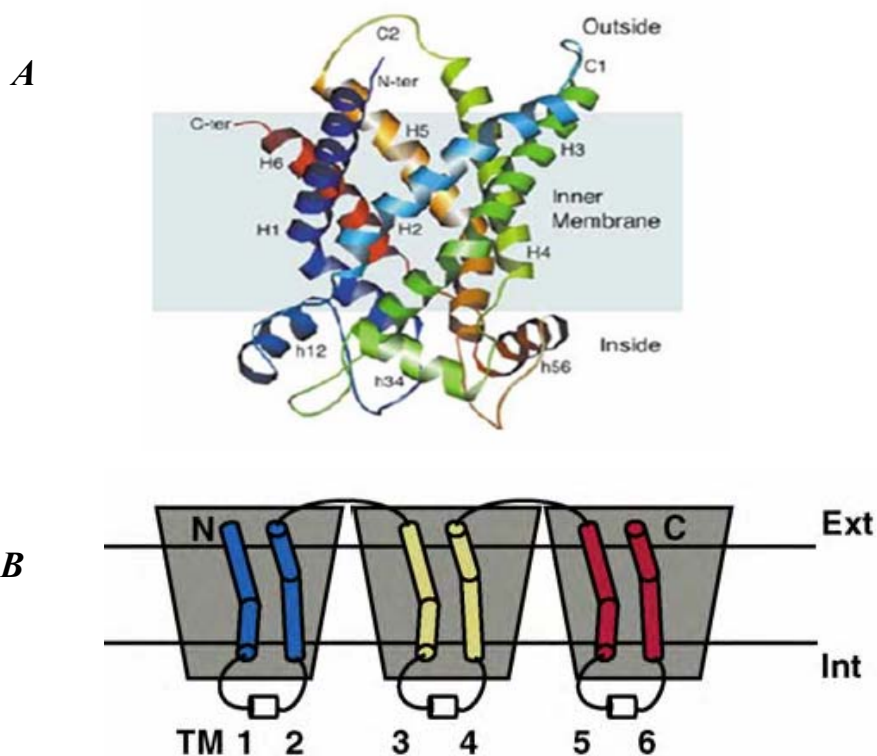
Ο μεταφορέας AcrB της *E. coli* έχει κρυσταλλωθεί με ευκρίνεια 3.5Å και πιο πρόσφατα κρυσταλλώθηκε με την παρουσία του υποστρώματος σε ακόμα μεγαλύτερη ανάλυση 2.8 Å (Murakami *et al.*, 2002, 2006) (Εικόνα 1.15). Ο μεταφορέας αυτός συνεργαζόμενος με μια ακόμη ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη (AcrA) και με έναν διάυλο της εξωτερικής μεμβράνης (TolC), καταλύει την εκροή μιας μεγάλης ποικιλίας τοξικών ουσιών από το εσωτερικό του κυττάρου κατευθείαν στο θρεπτικό μέσο, παρακάμπτοντας το περίπλασμα (Zgurskaya and Nikaido, 1999; Nikaido, 2000). Η κρυσταλλική δομή παρουσιάζει τρία πρωτομερή AcrB σε ομοτριμερές σε σχήμα «μέδουσας». Κάθε πρωτομερές αποτελείται από μια διαμεμβρανική περιοχή των 50 Å και από ένα προεξέχον “κράνος” των 70 Å. Η κορυφή του κράνους ανοίγει εν είδει χοάνης μέσω της οποίας το TolC ενδέχεται να αγκυροβολεί στην AcrB. Ένας πόρος που δημιουργείται από τρεις α-έλικες συνδέει τη χοάνη αυτή με μια κεντρική κοιλότητα στο βάθος του κράνους (Εικόνα 1.15B). Στην διαμεμβρανική περιοχή κάθε πρωτομερές έχει 12 διαμεμβρανικές α-έλικες. Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής παρουσία του υποστρώματος, υποδεικνύει ότι το υπόστρωμα συνδέεται σε ένα από τα τρία πρωτομερή και δε φαίνεται να υπάρχει υπόστρωμα στην κεντρική κοιλότητα του συμπλόκου (Εικόνα 1.15A).



Εικόνα 1.15 A. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου του μεταφορέα AcrB, μαζί με υπόστρωμα (Murakami *et al.*, 2006). **B.** Η δομή του AcrB απουσία υποστρώματος (Murakami *et al.*, 2002).

Αντιμεταφορέας ATP/ADP

Το 2003 δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή του αντιμεταφορέα ATP/ADP του βοός (Pebay-Reyroula *et al.*, 2003) (Εικόνα 1.16). Ο μεταφορέας ανήκει στην οικογένεια των μιτοχονδριακών μεταφορέων (MCF), οι οποίοι χρησιμοποιούν την ηλεκτροχημική διαβάθμιση για ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ του μιτοχονδριακού στρώματος και του κυτταροδιαλύματος και λειτουργούν κατά κανόνα ως ομοδιμερή. Το μονομερές του αντιμεταφορέα ATP/ADP αποτελείται από 3 επαναλήψεις των 2 TM. Η δομή του δόθηκε σε μεγάλη αναλυτική ευκρίνεια (2.2 Å) χρησιμοποιώντας την μεμβρανική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με έναν ισχυρό αναστολέα, το καρβοξυατρακτυλοσίδιο (carboxyatractyloside), το οποίο παγιδεύει τη διαμόρφωση προς την πλευρά που είναι ανοιχτή στον διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο (Berg *et al.*, 2005). Ένα ομοδιμερές από δύο μόρια των έξι διαμεμβρανικών α -ελίκων διαμορφώνει μια συμπαγή διαμεμβρανική δομή. Μεταξύ των δύο μονομερών αποκαλύπτεται ένα βαθύ κοίλωμα στην επιφάνεια προς τον διαμεμβρανικό χώρο και το κοίλωμα αυτό αντιστοιχεί στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης.



Εικόνα 1.16 **A.** Η κρυσταλλική δομή του αντιμεταφορέα ATP/ADP του βοός, που ανήκει στην μεγάλη οικογένεια μεταφορέων των μιτοχονδρίων (MCF) (Pebay-Reyroula *et al.*, 2003) **B.** Δευτεροταγής δομή που φαίνονται οι δομικές επαναλήψεις των 2 TM (από Boudker *et al.*, 2010).

Δομικά «άγνωστες» οικογένειες

Παρά την πρόοδο που παρατηρείται το τελευταίο διάστημα στην παραγωγή κρυσταλλικών δομών διαμεμβρανικών μεταφορέων και ιδιαίτερα μεταφορέων δευτερογενούς μεταφοράς, υπάρχουν οικογένειες οι οποίες παρά τη σημαντικότητα και την εξελικτική τους διατήρηση στερούνται κρυσταλλικών δομών και κατά συνέπεια δεν έχουμε σαφή εικόνα για την τοπολογική δομική τους οργάνωση και το μηχανισμό μεταφοράς. Η μελέτη αυτών των πρωτεϊνών στηρίζεται επί του παρόντος στα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης και σε βιοχημικές, βιοφυσικές και μοριακές μεθόδους που ξεκινούν από στοχευμένες εφαρμογές μεταλλαξιγένεσης. Σ' αυτή τη κατηγορία δομικά «άγνωστων» μεταφορέων ανήκουν σημαντικές ομάδες, όπως η οικογένεια NAT/NCS2 και άλλοι μεταφορείς νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων που εξετάζονται παρακάτω (κεφάλαιο 1.3).

Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για τη δομική-λειτουργική μελέτη αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στηρίζονται κυρίως σε συστηματικές εφαρμογές μεταλλαξιγένεσης και πειράματα σημειακής στόχευσης (site-directed techniques) τα οποία μπορεί να γίνουν σε διάφορα επίπεδα (in vivo, σε μεμβρανικά κυστίδια, μετά από απομόνωση του μεταφορέα και ανασύστασή του σε λιποσωμάτια) εφαρμόζοντας κατάλληλες βιοχημικές ή βιοφυσικές τεχνικές. Μια από τις αποδοτικότερες προσεγγίσεις είναι αυτή της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) η οποία έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μας δώσει μια πολύ καλή γενική εικόνα τόσο για τα σημαντικά κατάλοιπα του μορίου (Frillingos et al., 1998), όσο και για τη δομική οργάνωση των διαμεμβρανικών ελίκων (Sorgen *et al.*, 2002) και για το μηχανισμό της εναλλαγής διαμορφώσεων κατά τη δέσμευση υποστρώματος (Kaback, 2011).

Βασικά στοιχεία, επίσης, της γενικής δομής των διαμεμβρανικών αυτών πρωτεϊνών όπως η τοπολογική τους οργάνωση μπορούν να προβλεφθούν με υπολογιστικά προγράμματα και να εξετασθούν πειραματικά με μοριακές-βιοχημικές τεχνικές (von Heijne, 1992). Οι υπολογιστικές στρατηγικές (αλγόριθμοι πρόβλεψης) βασίζονται στο ότι οι περιοχές α-έλικας είναι αμφιπαθικές και εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό υδροφοβικότητας από τα υδρόφιλα συνδετικά τμήματα (Claros and von Heijne, 1994). Οι βιοχημικές τεχνικές βασίζονται συνήθως σε τροποποίηση του πρωτεϊνικού μορίου, με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση και κατασκευή χμιαϊκών πρωτεϊνών, μέσω της οποίας μπορεί να εξετασθεί η προσβασιμότητα συγκεκριμένων θέσεων σε υδρόφιλα αντιδραστήρια ή η λειτουργικότητα πρωτεϊνών (GFP, ενζύμων) που έχουν προστεθεί ως σήματα αναφοράς (van Geest and Lolkema 2000).

1.3 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Η πρόσληψη πουρινών και πυριμιδινών είναι βασική βιολογική διαδικασία τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μελέτες μοριακής γενετικής και φυσιολογίας αποδεικνύουν την ύπαρξη πολλών ειδικών συστημάτων μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων σε διάφορα είδη βακτηρίων (Andersen *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2003; Karatza and Frillingos, 2005) και μυκήτων (Diallinas *et al.*, 1998; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005, 2006; Vlanti *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Diallinas, 2007; Hamari *et al.*, 2009), ενώ παρόμοια συστήματα είναι γνωστά σε πολλά είδη Φυτών (Argyrou *et al.*, 2001; Maurino *et al.*, 2006), Μεταζώων (Yao *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2006), Πρωτοκτίστων (de Koning *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2009) αλλά και τον άνθρωπο.

1.3.1 Σημασία της μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Νουκλεοτιδικές βάσεις εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας κυτταρικές διεργασίες σε όλους τους οργανισμούς. καθώς αποτελούν απαραίτητα συστατικά των νουκλεοτιδίων των νουκλεϊκών οξέων αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και καταβολικά σαν πηγές αζώτου ή άνθρακα. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) που περιέχει την πουρίνη αδενίνη αποτελεί το παγκόσμιο νόμισμα ελεύθερης ενέργειας σε όλα τα βιολογικά συστήματα, ενώ παράγωγα νουκλεοτιδίων συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η UDP-γλυκόζη στη σύνθεση του γλυκογόνου. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως τα cAMP και cGMP αποτελούν «αγγελιοφόρους» που μεταβιβάζουν ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά σήματα (Berg *et al.*, 2005). Οι νουκλεοτιδικές βάσεις παίζουν κεντρικό ρόλο και στα φυτά, όπου εκτός από τη σύνθεση του DNA και RNA σε όλους τους φυτικούς οργανισμούς, στα τροπικά όσπρια, η μεταφορά και αποθήκευση του αζώτου με τη μορφή ουρεΐδων (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό) εξαρτάται από τη βιοσύνθεση και καταβολισμό των νουκλεοτιδικών βάσεων (Schubert and Boland, 1990). Παράγωγα νουκλεοτιδικών βάσεων είναι ενώσεις όπως κυτοκινίνες, καφεΐνη και αλκαλοειδή, ενώ παράλληλα, η αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη και ξανθίνη μπορούν να αποτελέσουν και μοναδικές πηγές αζώτου για το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Vogels and van der Drift, 1976). Στα θηλαστικά, η αδενίνη, γουανίνη, και η υποξανθίνη οδηγούνται στα μονοπάτια περίσωσης πουρινών για την παραγωγή ATP και GTP και για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ή οξειδώνονται καταβολικά σε ξανθίνη ή ουρικό οξύ ή

ουρείδες (Fox and Kelley, 1978). Το ουρικό οξύ ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, έχει επιπρόσθετη σημασία λόγω της ιδιότητάς του να δρά ως αντιοξειδωτικό στον ορό του αίματος (Enomoto *et al.*, 2002a, 2002b).

Με βάση τα παραπάνω, δεν είναι τυχαίο ότι πολλά δομικά ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά, αντιϊκά ή αντικαρκινικά φάρμακα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντικαρκινικού φαρμάκου είναι η 5-φθοροουρακίλη (5-fluorouracil, 5-FU) η οποία αναστέλλει τη λειτουργία ενζύμων που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση πυριμιδινών (Haydon, 2003) με συνέπεια την παρεμπόδιση της σύνθεσης DNA και της ταχείας διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Gibbs *et al.*, 2008), ενώ σε συνδυασμό χορήγησής της μαζί με οξυπλατίνη η βιωσιμότητα των ασθενών αυξάνεται εντυπωσιακά (Andre *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2005). Επίσης, η 5-FU χρησιμοποιείται και ως «προφάρμακο» (prodrug) στη διαγονιδιακή θεραπεία του καρκίνου σε συνδυασμό με την απαμινάση της κυτοσίνης (Hwang *et al.*, 2005).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιμικροβιακού φαρμάκου αποτελεί η αλλοπουρινόλη που χρησιμοποιείται μαζί με την οξυπουρινόλη, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (Spector and Johns, 1970; Pacher *et al.*, 2008), με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνθεσης ουρικού οξέος (Pea, 2005). Με όμοιο τρόπο, χρησιμοποιείται και για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας (Berg *et al.*, 2005) καθώς και της υπερουριχαιμίας (Rott and Agudelo, 2003; Terkeltaub, 2003; Bieber and Terkeltaub, 2004; Schlesinger, 2004; Pea, 2005; Wortmann, 2005). Έχοντας ως βάση την αναστολή της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης, γίνονται προσπάθειες για την παραγωγή συνθετικών πουρινών με βάση την αλλοπουρινόλη για την αντιμετώπιση και θεραπεία καρκίνων (Pacher *et al.*, 2008).

Τα φάρμακα acyclovir (9-μεθυλο-9H-γουανίνη) (Gnann *et al.*, 1983; Elion, 1993) και ganciclovir (διϋδροξυ-προποξυ-μεθυλο-γουανίνη) (Martin *et al.*, 1983; Matthews and Boehme, 1988) χρησιμοποιούνται ως αντιϊκά εναντίον ερπητοϊών αναστέλλοντας τη δράση της ιϊκής DNA πολυμεράσης. Επίσης λειτουργούν ως «προφάρμακα» κατά την αντιμετώπιση καρκίνου με γονιδιακή θεραπεία (Rosenberg *et al.*, 2002), όταν χρησιμοποιείται το σύστημα κινάσης θυμιδίνης (HSVtk) και ερπητοϊού (Altaner, 2008). Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τη δράση της DNA πολυμεράσης των καρκινικών κυττάρων και αφετέρου ανταγωνίζονται το dGTP κατά τη σύνθεση του DNA, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (Fillat *et al.*, 2003). Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την επιλογή

περιπτώσεων έκτοπης ενσωμάτωσης διαγονιδίων, κατά την στρατηγική γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Lodish *et al.*, 2007).

Όπως και σε πολλές άλλες περιπτώσεις φαρμακευτικών αγωγών, συχνά παραβλέπεται ή δεν έχει εξετασθεί λόγω έλλειψης δεδομένων ο ρόλος των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που είναι υπεύθυνες για την κυτταρική πρόσληψη των ουσιών αυτών. Έτσι, η χρήση αυτών των φαρμάκων δεν έχει βασιστεί σε συστηματική μελέτη των μοριακών μηχανισμών πρόσληψής τους από τα κύτταρα στόχους με αποτέλεσμα την μειωμένη απόδοση κατά την κλινική εφαρμογή τους, με βασικότερες αιτίες: (α) σοβαρές παρενέργειες λόγω κυτταροτοξικής δράσης σε δευτερογενείς στόχους, (β) μη πρόσληψη από τα κύτταρα-στόχους, (γ) ανεπιθύμητη επαγωγή δευτερογενούς ανθεκτικότητας στα κύτταρα-στόχους.

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι μόνο η βαθιά γνώση του φυσιολογικού ρόλου των πρωτεϊνών και του μηχανισμού μεταφοράς των εκάστοτε υποστρωμάτων θα μπορέσει να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση του σχεδιασμού των πουρινικών φαρμάκων και στην ανακάλυψη νέων, πιο αποτελεσματικών πρωτοκόλλων θεραπειών (Freeman *et al.*, 1993; Mesnil and Yamasaki 2000; Nicholas *et al.*, 2003). Τέτοια φάρμακα μπορεί να είναι ειδικοί αναστολείς των αντίστοιχων μεταφορέων των καρκινικών, ιϊκών ή βακτηριακών κυττάρων-στόχων ή ανάλογα πουρινών-πυριμιδινών που λειτουργούν ως μεταφερόμενα υποστρώματα αλλά προσλαμβάνονται μόνο από τους μεταφορείς των κυττάρων-στόχων και είναι τοξικά μόνο για τα κύτταρα-στόχους. Προς αυτήν την κατεύθυνση εφαρμογής κινούνται σήμερα και οι μελέτες των λειτουργικών μηχανισμών των διαμεμβρανικών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων ή νουκλεοσιδίων που είναι σε εξέλιξη σε σχέση, κυρίως, με δυνατότητες στοχευμένης αντιμικροβιακής θεραπείας. Για παράδειγμα, τα πρωτόζωα των γενών *Leishmania* και *Trypanosoma* δεν έχουν την δυνατότητα να συνθέτουν τα ίδια νουκλεοτιδικές βάσεις και βασίζονται αποκλειστικά στους ξενιστές για τις πουρίνες που έπειτα αξιοποιούνται μέσω των μονοπατιών περίσωσης (Landfear *et al.*, 2004; de Koning *et al.*, 2005). Η δημιουργία στοχευμένων φαρμάκων που θα αναστέλλουν τους μεταφορείς των πουρινών ή τους μηχανισμούς αξιοποίησής τους αποτελεί απώτερο στόχο των ερευνητών που μελετούν την πρόσληψη νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων από τα παρασιτικά πρωτόζωα (Landfear, 2009). Τέτοιες στρατηγικές γίνονται ολοένα πιο αναγκαίες καθώς διαρκώς οι βάσεις δεδομένων εμπλουτίζονται με νέους πιθανούς μεταφορείς, μεγάλο μέρος των οποίων ανήκουν σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

1.3.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Οι γνωστοί μέχρι σήμερα μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων και οι πιθανές πρωτεΐνες που αντιστοιχούν σε γονίδια με ομολογίες αλληλουχίας έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις κύριες οικογένειες (Diallinas and Gournas, 2008), ενώ υπάρχουν και δύο ακόμη που περιορίζονται μόνο σε Φυτά (Desimone *et al.*, 2002).

Ευρύτερα διαδεδομένη κατά την εξέλιξη είναι η οικογένεια των Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων–Ασκορβικού (Nucleobase–Ascorbate Transporters, **NAT**) (de Koning & Diallinas, 2000) ή οικογένεια-2 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων–Κατιόντων (Nucleobase–Cation Symporters-2, **NCS2**) (TC 2.A.40, <http://www.tcdb.org>), για την οποία θα μιλήσουμε αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο (1.3.3). Πρόκειται για οικογένεια με πάνω από 1000 μέλη από όλα τα φύλα οργανισμών, από τα αρχαία μέχρι τον άνθρωπο, που όμως δεν έχει γνωστό πρότυπο δομής από κρυσταλλογραφική ανάλυση.

Η οικογένεια Μεταφορέων Πουρινών AzgA (Purine Transporters, **AzGA**) ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS) (TC 2.A.1.40) και αντιπροσωπεύεται κυρίως από τον μεταφορέα AzgA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* που μεταφέρει αδενίνη-υποξανθίνη-γουανίνη (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2006, 2008). Η οικογένεια AzgA περιλαμβάνει επίσης δύο μεταφορείς από το φυτό *Arabidopsis thaliana* τους AtAzg1 και AtAzg2 (Mansfield *et al.*, 2009), τον PbuG από τον *Bacillus subtilis* που μεταφέρει υποξανθίνη και γουανοσίνη (Johansen *et al.*, 2003) και ομόλογα άγνωστης λειτουργίας από αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά, ενώ δεν υπάρχει στα Μετάζωα.

Η οικογένεια Μεταφορέων Σχετιζόμενων με Πουρίνες (Purine Related Transporters, **PRT**) (de Koning & Diallinas, 2000) ή οικογένεια-1 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων–Κατιόντων (Nucleobase–Cation Symporters-1, **NCS1**) (TC 2.A.39) περιλαμβάνει πάνω από 300 μέλη από αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά, αλλά δεν υπάρχει στα Μετάζωα. Γνωστοί μεταφορείς NCS1 είναι οι μεταφορείς ουρακίλης Fur4 των *Saccharomyces cerevisiae* και *Schizosaccharomyces pombe* (Jund *et al.*, 1988), ο μεταφορέας αλλαντοΐνης Dal4 του *S. cerevisiae* (Yoo *et al.*, 1992) οι μεταφορείς αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης-κυτοσίνης Fcy2 του *S. cerevisiae* (Weber *et al.*, 1990) και Fcy21p της *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2006), οι μεταφορείς πουρινών-κυτοσίνης FcyB (Vlanti and Diallinas, 2008) και ουρακίλης FurD (Amillis *et al.*, 2007) του *Aspergillus nidulans*, ο μεταφορέας πουρινών-κυτοσίνης AffcyB του παθογόνου *Aspergillus fumigatus* (Vlanti and Diallinas, 2008), ο

μεταφορέας κυτοσίνης CodB της *E. coli* (Danielsen *et al.*, 1992) και ο μεταφορέας αλλαντοΐνης PucI του *B. subtilis* (Schultz *et al.*, 2001). Πρόσφατα έχει αναλυθεί η κρυσταλλική δομή ενός μέλους (Mph1) της οικογένειας από το *Microbacterium liquefaciens* σε δύο διαμορφώσεις (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010) και ανήκει στο δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του LeuT, όπως είδαμε παραπάνω (κεφάλαιο 1.2). Παρ' ό,τι υπάρχει ήδη ένα μοντέλο δομικής οργάνωσης που στηρίζεται σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα, η μελέτη των σχέσεων δομής- λειτουργίας στην οικογένεια NCS1 με βιοχημικά και μοριακά γενετικά πειράματα δεν έχει προχωρήσει σε σημαντικό βαθμό.

Η οικογένεια Μεταφορέων Εξισορρόπησης συγκεντρώσεων Νουκλεοσιδίων (Equilibrative Nucleoside Transporters, ENT) (TC 2.A.57) περιλαμβάνει ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς νουκλεοσιδίων και/ή νουκλεοτιδικών βάσεων καθώς και κυτταροτοξικών αναλόγων τους που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα. Περιλαμβάνει ομόλογα από πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως Μύκητες, Πρωτόκτιστα και Μετάζωα, αλλά δε συναντάται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (de Koning *et al.*, 2005). Έχουν μελετηθεί οι μεταφορείς hENT1, hENT2 (Griffiths *et al.*, 1997), hENT3 και hENT4 (Hyde *et al.*, 2001) στον άνθρωπο, καθώς και οι ομόλογοι μεταφορείς σε τρωκτικά (Yao *et al.*, 1997; Kiss *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2005). Ιδιαίτερα επίσης έχουν μελετηθεί οι μεταφορείς ENT στα παρασιτικά πρωτόζωα όπου δεν υπάρχουν μηχανισμοί σύνθεσης πουρινών *de novo* (Lanfear *et al.*, 2004), και η εξασφάλιση πουρινών επιτυγχάνεται με πρόσληψή τους μέσω μεταφορέων της οικογένειας ENT (www.bioparadigms.org/slc/intro.asp). Από τα παρασιτικά πρωτόζωα, η *Leishmania major* περιέχει 6 μέλη (NT1.1, NT1.2 και NT2 μεταφορείς νουκλεοσιδίων, NT3 μεταφορέας υποξανθίνης, αδενίνης, γουανίνης και ξανθίνης, NT4 μεταφορέας αδενίνης, και LmU1 μεταφορέας ουρακίλης) (Papageorgiou *et al.*, 2005; Ortiz *et al.* 2007, 2009), η *L. donovani* έχει 3 μέλη (LdNT1.1 και LdNT1.2, μεταφορείς αδενοσίνης και πυριμιδινών και LdNT2, μεταφορέας ινoσίνης και γουανοσίνης) (Liu *et al.*, 2006), στο *Trypanosoma brucei* έχουν χαρακτηριστεί οι TbNT2 (μεταφορέας αδενοσίνης, ινoσίνης, γουανοσίνης), TbAT1 (μεταφορέας αδενοσίνης και αδενίνης) (de Koning *et al.*, 2005) και ο NBT1 που μεταφέρει νουκλεοτιδικές βάσεις (αδενίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, γουανίνη), νουκλεοσίδια (γουανοσίνη και ινoσίνη) και αλλοπουρινόλη (Burchmore *et al.*, 2003), ενώ μεταφορείς ENT είναι γνωστοί επίσης στο *Plasmodium falciparum* (PfNT1, μεταφορέας νουκλεοσιδίων/αναλόγων, αδενίνης, υποξανθίνης) (Carter *et al.*, 2000a) και στο *Toxoplasma gondii* [TgAT, μεταφορέας αδενοσίνης και πιθανός μεταφορέας υποξανθίνης και γουανίνης) (Chiang *et al.*, 1999)]. Όπως αναφέραμε παραπάνω (κεφάλαιο 1.2), οι μεταφορείς της

οικογένειας ENT μοντελοποιούνται με βάση το γενικό δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της LacY χωρίς όμως να ανήκουν στην υπεροικογένεια MFS (Valdes *et al.*, 2009).

Δύο οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων απαντώνται μόνο στα Φυτά, η οικογένεια των Περιμεασών Οργανοκατιόντων των Φυτών (Plant Organocation Permease, **POP**) (TC 2.A.7.14) και η οικογένεια των Μεταφορέων Ενεργού Πρόσληψης Νουκλεοτιδικών βάσεων (Nucleobase Uptake Transporters, **NBUT**) (TC 2.A.7.19). Ο μόνος μεταφορέας της οικογένειας POP που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά είναι ο AtPUP1 της *Arabidopsis thaliana*, που είναι εξειδικευμένος μεταφορέας αδενίνης και κυτοσίνης και συμεταφέρει τα υποστρώματα αυτά μαζί με πρωτόνια (Gillissen *et al.*, 2000). Ανάλογα πουρινών (π.χ. υποξανθίνη), φυτοορμόνες (π.χ. κυτοκινίνες) και αλκαλοειδή (π.χ. καφεΐνη) είναι ισχυροί αναστολείς του μεταφορέα AtPUP1 που ανταγωνίζονται την πρόσληψη αδενίνης και κυτοσίνης (Gillissen *et al.*, 2000; Burkle *et al.*, 2003). Ωστόσο, στην *A. thaliana* υπάρχουν 14 ακόμη ομόλογα που δεν έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά. Η οικογένεια NBUT αποτελείται από μεταφορείς που έχουν ως υποστρώματα ουρεΐδες, κυτοσίνη και ανάλογα πουρινών-πυριμιδινών. Αντιπροσωπευτικά μέλη είναι οι μεταφορείς αλλαντοΐνης AtUPS1 και AtUPS2 της *A. thaliana*, από τους πρώτους μεταφορείς αλλαντοΐνης που έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί σε φυτά, και μεταφέρουν επίσης ουρικό οξύ και ξανθίνη (Desimone *et al.*, 2002). Ομοίως, ο PvUPS1, ένας άλλος ομόλογος μεταφορέας που ταυτοποιήθηκε στο φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), έχει ως βασικό υπόστρωμα την αλλαντοΐνη αλλά δεσμεύει επίσης ουρικό και ξανθίνη (Pelissier *et al.*, 2004).

Στα θηλαστικά, υπάρχουν και άλλες διακριτές οικογένειες μεταφορέων, διαφορετικές από όλες τις παραπάνω, οι οποίες δεν μπορούν να χαρακτηριστούν γενικά ως μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων, αλλά περιλαμβάνουν πρωτεΐνες μεταφοράς ουρικού οξέος (Diallinas and Gournas, 2008), όπως είναι ο μεταφορέας URAT1 του νεφρικού επιθηλίου (Enomoto *et al.*, 2002), οι μεταφορείς UAT, Oat1, Oat3, MRP2, MRP4 και Oatv1 (Bakhiya *et al.*, 2003; Jutabba *et al.*, 2003; Van Aubel *et al.*, 2005) και ο μεταφορέας SLCA9 (παλαιότερη ονομασία GLUT9) του νεφρικού επιθηλίου (Caulfield *et al.*, 2008). Για παράδειγμα, ο μεταφορέας ουρικού SLCA9 που έχει συνδεθεί με υπερουριχαιμία ανήκει στη γνωστή οικογένεια μονομεταφορέων γλυκόζης (GLUT1-14) που περιλαμβάνει κυρίως μεταφορείς σακχάρων (γλυκόζης, φρουκτόζης) και ανήκει στην ευρύτερη υπεροικογένεια MFS (Wright *et al.*, 2010).

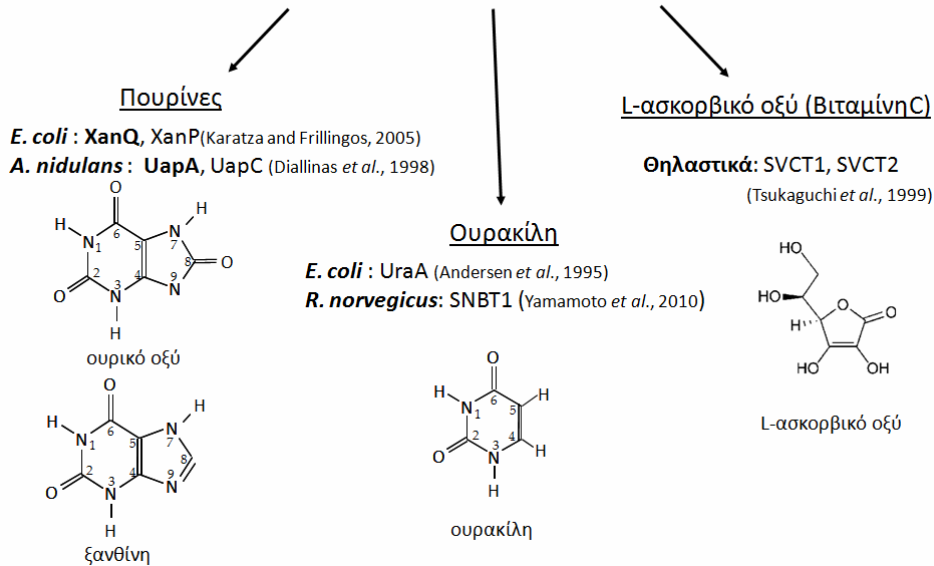
1.3.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2

Η οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT/NCS2), στην οποία ανήκει ο μεταφορέας XanQ και οι υπόλοιποι μεταφορείς που μελετώνται στην παρούσα διατριβή, είναι η μεγαλύτερη και πιο συντηρημένη οικογένεια νουκλεοτιδικών βάσεων. Αν και περιλαμβάνει περισσότερες από 1000 πιθανές πρωτεΐνες από όλες τις ταξινομικές ομάδες οργανισμών, ελάχιστες έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί, με αποτέλεσμα να παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι οι μηχανισμοί λειτουργίας τους ή και ο φυσιολογικός τους ρόλος. Επιπλέον, δεν υπάρχει διαθέσιμη καμιά κρυσταλλική δομή που να επιτρέπει μοντελοποίηση των μεταφορέων NAT σε υψηλό επίπεδο ανάλυσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η οικογένεια NAT/NCS2 (<http://www.tcdb.org>, TC2.A.40) έχει ελάχιστη συγγένεια με την οικογένεια μεταφορέων NCS1 (<http://www.tcdb.org>, TC2.A.39), ένα μέλος της οποίας κρυσταλλώθηκε πρόσφατα και εμπίπτει στο δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του LeuT (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010).

Τα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 που προέρχονται από μικροοργανισμούς ή φυτά είναι ειδικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρινών ή πυριμιδινών) (de Koning and Diallinas, 2000; Gounas *et al.*, 2008), ενώ τα μέλη που προέρχονται από τον άνθρωπο και άλλα πρωτεύοντα είναι ειδικοί μεταφορείς L-ασκορβικού (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Επίσης, στα άλλα θηλαστικά μπορεί να υπάρχουν τόσο ομόλογα που μεταφέρουν ασκορβικό όσο και ομόλογα που μεταφέρουν ουρακίλη και πουρίνες (Yamamoto *et al.*, 2010) (**Εικόνα 1.17**).

Σε σχέση με τα γνωστά υποστρώματα των μεταφορέων NAT, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι ουρακίλη, ουρικό οξύ και ξανθίνη έχουν εντελώς διαφορετική χημική δομή από το L-ασκορβικό. Αξίζει, πάντως, να σημειωθεί ότι το ασκορβικό και το ουρικό έχουν παρόμοιες και συμπληρωματικές λειτουργίες στα θηλαστικά. Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που απαλλάσσουν το πλάσμα του αίματος από δραστικές μορφές οξυγόνου (Ames *et al.*, 1981; Frei *et al.*, 1989; Nyssonen *et al.*, 1997). Το ασκορβικό οξύ, επιπρόσθετα, είναι απαραίτητο για αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου διατηρεί τα ιόντα μεταλλικών συμπαραγόντων στην ανηγμένη τους μορφή και απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες, προφυλάσσοντας τους ιστούς από οξειδωτική καταστροφή. Επιπλέον, το ουρικό σταθεροποιεί το ασκορβικό οξύ στα βιολογικά υγρά (Sevanian *et al.*, 1991). Η σπουδαιότητα του ουρικού οξέος ως αντιοξειδωτικού είναι ιδιαίτερα εμφανής σε είδη που δεν μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό οξύ. Κατά πόσον το γεγονός αυτό είναι σύμπτωση ή έχει παίξει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του μεταφορέα ασκορβικού των θηλαστικών από έναν μεταφορέα ουρικού παραμένει άγνωστο (Hediger, 2002).

Οικογένεια NAT/NCS2 συμμεταφορείς νουκλεοβάσεων : κατιόντων

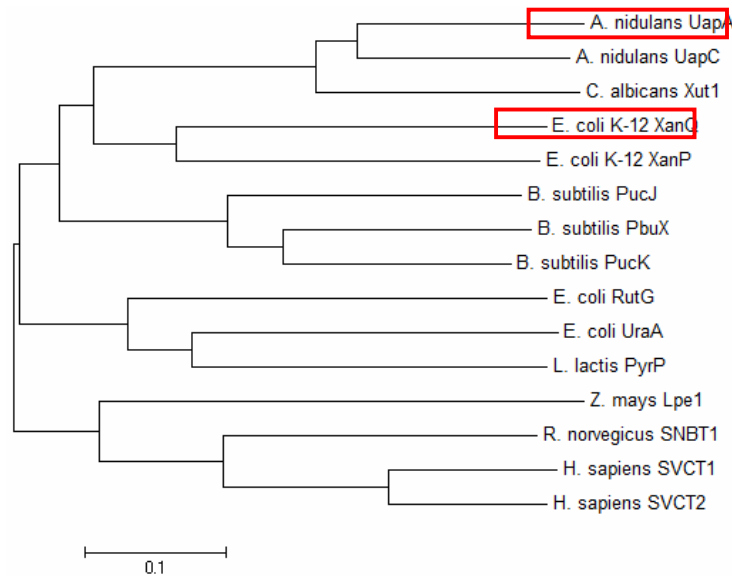


Εικόνα 1.17 Διαχωρισμός της οικογένειας NAT σε τρεις ομάδες ανάλογα με το υπόστρωμα που μεταφέρουν και τα καλύτερα μελετημένα μέλη της κάθε ομάδας. Μεταφορείς οξειδωμένων πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, XanQ και UapA αντίστοιχα), μεταφορείς ουρακίλης (UraA, rSNBT1) και μεταφορείς L-ασκορβικού (SVCT1 και SVCT2).

Μια ανάλυση με βάση γνωστά γονιδιώματα που έχουν κατατεθεί (<http://img.jgi.doe.gov/>, <http://www.membranetransport.org/>), δείχνει ότι από τα Αρχαία το 27% των γονιδιωμάτων (n=23) περιέχει πιθανά γονίδια για μεταφορείς NAT, από τα Ευκάρυα το 68% (n=13) και από τα Βακτήρια το 61% (n=671) (Καρλετίδης Γ., 2010, Διπλωματική εργασία). Συχνά υπάρχουν πολλά ομόλογα NAT στον ίδιο οργανισμό. Τα περισσότερα από τα 23 Αρχαία που περιέχουν γονίδια NAT έχουν μόνο ένα (69%) ή δύο (20%) ομόλογα στο γονιδιώμα τους, ενώ τα Βακτήρια μπορεί να περιέχουν ένα (33%), δύο (28%), τρία ή τέσσερα (10%), ή και περισσότερα γονίδια NAT στο γονιδιώμα τους, με την *E. coli* να έχει το μεγαλύτερο αριθμό (10 ομόλογα). Από τα 13 Ευκάρυα, τα περισσότερα έχουν ένα (50%) ή δύο (20%) γονίδια NAT, αλλά ορισμένα φυτά έχουν μεγάλο αριθμό ομολόγων, όπως η *Arabidopsis thaliana* που έχει 14 γονίδια για μεταφορείς NAT (Καρλετίδης Γ., 2010, Διπλωματική εργασία).

Λίγα σχετικά μέλη της οικογένειας NAT έχουν κλωνοποιηθεί και μελετηθεί σε γενετικό και μοριακό επίπεδο (**Εικόνα 1.18**). Έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά οι μεταφορείς του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* UapA (μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης) (Diallinas & Scazzocchio 1989) και UapC (μεταφορέας πουρινών με ευρύτερη εξειδίκευση) (Diallinas *et al.*, 1995), οι μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* YgfO και YicE (Karatza and Frillingos, 2005), που πρόσφατα μετονομάστηκαν σε

XanQ και XanP αντίστοιχα (www.ecogene.org), οι μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης Lpe1 της *Zea mays* (Argyrou *et al.*, 2001), Xut1 της *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2005), AfUapA του *A. fumigatus* (Goudela *et al.*, 2006), οι μεταφορείς ξανθίνης PbuX και ουρικού PucJ και PucK του *Bacillus subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997, Schultz *et al.*, 2001), οι μεταφορείς ουρακίλης UraA της *E. coli* (Andersen *et al.*, 1995) και PyrP του *Lactococcus lactis* (Martinussen *et al.*, 2001), και οι μεταφορείς ασκορβικού SVCT1 και SVCT2 των θηλαστικών (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Εντελώς πρόσφατα, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε ένας ομόλογος μεταφορέας από θηλαστικά που λειτουργεί ως μεταφορέας ουρακίλης κυρίως και με μικρότερη συγγένεια ως μεταφορέας ξανθίνης, υποξανθίνης, γουανίνης ή θυμίνης. Πρόκειται για τον μεταφορέα rSNBT1 ο οποίος απομονώθηκε από το εντερικό επιθήλιο του επίμουσ (Yamamoto *et al.*, 2010). Ο SNBT1 έχει μεγάλη ομολογία (50% ταυτότητα) με τους μεταφορείς ασκορβικού SVCT1 και SVCT2, ενώ τα ορθόλογά του στα πρωτεύοντα φαίνεται να έχουν απενεργοποιηθεί εξελικτικά και παραμένουν ως ψευδογονίδια.



Εικόνα 1.18 Φυλογενετικό δένδρόγραμμα χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT/NCS2. Σε κόκκινα πλαίσια φαίνονται οι δύο καλύτερα μελετημένοι μεταφορείς. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Mega 3.0.

Από τα 15 ομόλογα που έχουν χαρακτηριστεί, οι μόνοι εκτενώς μελετημένοι μεταφορείς NAT είναι ο UapA του ασκομύκητα *A. nidulans*, που λειτουργεί ως συμμεταφορέας ουρικού:H⁺ ή ξανθίνης:H⁺, και ο μεταφορέας XanQ, ειδικός συμμεταφορέας ξανθίνης:H⁺, από το εντεροβακτήριο *E. coli*. Από τα υπόλοιπα γνωστά μέλη, αρκετά έχουν αναγνωρισθεί με *in silico* αναλύσεις σε συνδυασμό με γενετική-φυσιολογική ανάλυση βακτηριακών οπερονίων (Xi *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001; Loh *et al.*, 2006) και περιορισμένη ή και καθόλου βιοχημική ανάλυση, και οι λειτουργίες τους παραμένουν

σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστες. Στα Φυτά, εξάλλου, έχουν αναγνωρισθεί 14 μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 από την *Arabidopsis thaliana* (AtNAT1-12) βάσει φυλογενετικής-γονιδιωματικής ανάλυσης και αναλύσεων έκφρασης (με χίμαιρες GFP) για ορισμένα από αυτά, χωρίς να υπάρχουν καθόλου λειτουργικά δεδομένα ή φαινότυποι από μία σειρά στελεχών με απαλοιφές (knock-out) των AtNAT που εξετάστηκαν (Maurino *et al.*, 2006).

Συνοπτικά, οι μελέτες που έχουν γίνει για τις σχέσεις δομής- λειτουργίας αφορούν κατά κύριο λόγο τον συμμεταφορέα ουρικού/ξανθίνης:H⁺ UapA (Papageorgiou *et al.*, 2008) και τον συμμεταφορέα ξανθίνης:H⁺ XanQ (Georgoroulou *et al.*, 2010). Αν και δεν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο αναλυτικό μοντέλο τριτοταγούς δομής, προσπάθειες κρυστάλλωσης και κρυσταλλογραφικής ανάλυσης τόσο του XanQ (H. Ronald Kaback, UCLA) όσο και του UapA (Bernadette Byrne, Imperial College, London) βρίσκονται σε εξέλιξη. Επίσης, σε σχετικά μικρό βαθμό έχουν μελετηθεί ο μηχανισμός και οι σχέσεις δομής-λειτουργίας στα ομόλογα hSVCT1 και hSVCT2 του ανθρώπου (Varma *et al.*, 2008; Ormazabal *et al.*, 2010).

Το μοτίβο-«υπογραφή» της οικογένειας NAT

Το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT (**Εικόνα 1.19**) είναι μια χαρακτηριστική συντηρημένη αλληλουχία 10 ή 11 αμινοξέων που προκύπτει από ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT και περιλαμβάνεται στην ευρύτερη περιοχή που ανακαλύφθηκε από πειράματα χιμαιρικών πρωτεϊνών (Diallinas *et al.*, 1998). Η αλληλουχία του μοτίβου ³²⁴(Q/E/P-N-X-G-X-X-X-T-(K/R/G))³³³ (η αρίθμηση αντιστοιχεί στο μεταφορέα XanQ) ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» γιατί εκτός από τη συντήρηση της αλληλουχίας σε συγκεκριμένες θέσεις έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένες διαφορές εξειδίκευσης μεταξύ των μεταφορέων της οικογένειας NAT (Diallinas *et al.*, 1998; Amillis *et al.*, 2000). Τα κατάλοιπα Asn-325, Gly-327 και Thr-332 είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλα τα μέλη από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο. Το κατάλοιπο 324 παρουσιάζει υψηλή συντήρηση μεταξύ όλων των μελών, είτε ως Gln κυρίως στους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος (UapA, UapC, XanQ, XanP, PbuX, PucJ, PucK, Xut1), είτε ως Glu στους μεταφορείς ουρακίλης (UraA, PyrP, rSNBT1) και στους μεταφορείς πουρινών των φυτών (Lpe1), είτε ως Pro στους μεταφορείς ασκορβικού του ανθρώπου (SVCT1, SVCT2). Το κατάλοιπο 333, συντηρείται είτε ως Lys ή Arg στους μεταφορείς ακορβικού (SVCT1, SVCT2), ουρακίλης (UraA, PyrP), ουρικού (PucJ), ουρικού ή ξανθίνης (UapA, UapC, Xut1, Lpe1) και

Gly στους μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* (XanQ, XanP) και στον μεταφορέα ξανθίνης του *B. subtilis* (PbuX). Βάσει αυτού του μοτίβου συντήρησης, αλλά και πειραμάτων μεταλαξίγνεσης, έχει προταθεί συμμετοχή του καταλοίπου Gly/Arg/Lys-333 στον καθορισμό της εξειδίκευσης ως προς την διάκριση υποστρωμάτων μεταξύ ουρικού και ξανθίνης και μεταξύ αναγνώρισης ή μη υποκαταστάσεων στη θέση 8 του πουρινικού δακτυλίου (Goudela *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006). Ο ρόλος του μοτίβου «υπογραφή» NAT έχει μελετηθεί αναλυτικά στους μεταφορείς UapA, και XanQ και παρουσιάζεται παρακάτω.

PbuX _B. subtilis	293	Q	N	V	G	L	V	Q	L	T	G	³⁰²	(xanthine)
PucK _B. subtilis	293	Q	N	V	G	I	V	Q	L	S	K	³⁰⁴	(uric acid)
PucJ _B. subtilis	298	Q	N	A	G	L	L	Q	L	T	K	³⁰⁷	(uric acid)
YcpX _E. coli	310	Q	N	I	G	I	I	S	L	T	K	³¹⁹	(purines)
XanQ _E. coli	324	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	³³³	(xanthine)
XanP _E. coli	336	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	G	³⁴⁵	(xanthine)
UapC _A. nidulans	407	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R	⁴¹⁶	(uric acid/xanthine)
AfUapA _A. fumigatus	406	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K	⁴¹⁵	(uric acid/xanthine/oxypourinol)
Xut1 _C. albicans	386	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K	³⁹⁵	(uric acid/xanthine)
UapA _A. nidulans	406	Q	N	N	G	V	I	S	I	T	R	⁴¹⁷	(uric acid/xanthine)
PyrP _L. lactis	306	E	N	I	G	V	M	A	I	T	K	³¹⁵	(uracil)
UraA _E. coli	290	E	N	I	G	V	M	A	I	T	R	²⁹⁹	(uracil)
SVCT1 _H. sapiens	388	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K	³⁹⁷	(ascorbate)
SVCT2 _H. sapiens	443	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K	⁴⁵²	(ascorbate)
SNBT1 _R. norvegicus	397	E	N	V	G	A	L	G	I	T	K	⁴⁰⁶	(uracil/purines)
Lpe1 _Z. mays	346	E	N	A	G	L	L	A	V	T	R	³⁵⁵	(uric acid/xanthine)

Εικόνα 1.19 Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου NAT ³²⁴QNXGXXXXTG³³³, 16 χαρακτηρισμένων NAT/NCS2 μεταφορέων συμπεριλαμβανομένων των *E. coli* XanQ (P67444), XanP (P0AGM9), και UraA (P0AGM7), *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140), και PucJ (O32139), *Clostridium perfringens* YcpX (P50487), *Lactococcus lactis* PyrP (Q9CF78), *A. nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P487777), *Aspergillus fumigatus* AfUapA (XP748919), *Candida albicans* Xut1 (AAX2221), *Zea mays* Lpe1 (Q41960), *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (Q9UHI7) και SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3), *Ratus norvegicus* SNBT1 (D2KX48). Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

Ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα *A. nidulans*

Ο ασκομύκητας *Aspergillus nidulans* έχει δύο μεταφορείς NAT, τους UapA και UapC. Ο UapC είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης (K_m 5 μ M), χαμηλότερης συγγένειας μεταφορέας ουρικού (K_m 130 μ M) και πολύ μικρής συγγένειας για άλλα ανάλογα πουρινών που φαίνεται να μεταφέρει επίσης (Diallinas *et al.*, 1995). Ο UapA, που είναι περισσότερο εξειδικευμένος, έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ως προς τις σχέσεις δομής-λειτουργίας του. Πρόκειται για έναν υψηλής συγγένειας (K_m 7-8 μ M) συμμεταφορέα ουρικού:H⁺ ή ξανθίνης:H⁺, αλλά με ικανότητα αναγνώρισης

αρκετών αναλόγων ξανθίνης, όπως 2-θειουρικό οξύ, 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη (Diallinas & Scazzocchio 1989).

Η πρώτη προσπάθεια για την αναγνώριση σημαντικών περιοχών για τη λειτουργία του μεταφορέα UapA έγινε με πειράματα ανάλυσης χμιαρικών πρωτεϊνών μεταξύ UapA και του ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέα UapC, που παρήχθησαν με πειράματα λειτουργικής συμπλήρωσης *in vivo* (*in vivo complementation*) (Diallinas *et al.*, 1998). Στη συνέχεια, έγινε εντοπισμός των σημαντικών καταλοίπων με πειράματα μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης και κατασταλτικών μεταλλαγών δεύτερης θέσης (*second-site suppressor mutations*) επιλεγμένων μεταλλαγμάτων (Diallinas *et al.*, 1998). Τα πειράματα αυτά υπέδειξαν μια ευρεία περιοχή 70 περίπου καταλοίπων του UapA η οποία θεωρήθηκε κρίσιμη για την αναγνώριση των υποστρωμάτων και την εξειδίκευση των μεταφορέων, η οποία εντοπίζεται μεταξύ των ελίκων TM8 και TM9 στο τοπολογικό μοντέλο των 12 διαμεμβρανικών τμημάτων. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση μια ακόμη χμιαρική πρωτεΐνη, με αντικατάσταση της κρίσιμης αυτής περιοχής του UapA από την αντίστοιχη αλληλουχία του UapC, και αποδείχθηκε ότι αυτή η χμιαρική πρωτεΐνη συμπεριφέρεται λειτουργικά όπως ο UapC (Diallinas *et al.*, 1998). Συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών της οικογένειας NAT/NCS2 αποκάλυψε ότι η περιοχή των 70 καταλοίπων περιλαμβάνει μια χαρακτηριστική υποπεριοχή αλληλουχίας, που αναγνωρίστηκε ως μοτίβο «υπογραφή» (βλ. παραπάνω).

Σε επόμενες έρευνες του εργαστηρίου του Γ. Διαλλινά, αναδείχθηκε η σχέση της περιοχής του μοτίβου-«υπογραφή» με την πρόσδεση και τη μεταφορά του υποστρώματος (Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2010). Σε πειράματα ανάπτυξης του ασκομύκητα με μοναδική πηγή αζώτου ουρικό ή ξανθίνη ή και άλλες πουρίνες, οι μεταλλαγές δύο συντηρημένων αμινοξέων του μοτίβου, των Gln-408 ή Asn-409, είχαν τις σοβαρότερες επιπτώσεις, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα κατάλοιπα είναι ουσιαστικής σημασίας για τη λειτουργία του UapA. Μεταλλαγές στα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα Gly-411 και Thr-416 βρέθηκε ότι αλλάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα ώστε να αναγνωρίζει, με μικρότερη συγγένεια, υποξανθίνη και αδενίνη (Koukaki *et al.*, 2005), ενώ η μεταλλαγή R417G οδηγεί σε αδυναμία αναγνώρισης αναλόγων με υποκαταστάσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της πουρίνης (8-αζαξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη) (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Παράλληλα, τα αποτελέσματα οδήγησαν στην πρόταση ότι τα Gln-408 και Asn-409 είναι απαραίτητα για τη δέσμευση και τη μεταφορά του υποστρώματος, αντίστοιχα. Πειράματα ανταγωνισμού με ανάλογα πουρινών υπέδειξαν ότι το μετάλλαγμα Q408E μπορεί να εμπλέκεται άμεσα στη δέσμευση υποστρώματος σχηματίζοντας

δεσμό υδρογόνου με το άζωτο N9-H των πουρινών 7-δεαζαξανθίνης, υποξανθίνης ή γουανίνης ή με την κετοομάδα C8=O του ουρικού οξέος (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Μια πιο πρόσφατη μελέτη τυχαίας μεταλλαξιγένεσης υπέδειξε ότι στην ευρύτερη περιοχή αλληλουχίας μεταξύ των ελίκων TM8 και TM9 υπάρχουν δύο ακόμα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα, Gln-356 και Asp-388, που είναι ουσιαστικά για τη λειτουργία του μεταφορέα (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Εκτός της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», έχουν μελετηθεί και άλλες περιοχές του UapA όπως η έλικα TM12, για την οποία προτάθηκε ότι η Phe-528 στο μέσο της έλικας λειτουργεί ως μοριακό «φίλτρο» για την αναγνώριση των κατάλληλων πουρινών στον UapA και τον αποκλεισμό των πουρινών που δεν είναι υποστρώματα, χωρίς όμως να αποτελεί τμήμα του κέντρου δέσμευσης (Vlanti *et al.*, 2006). Ακολούθως, βρέθηκε επίσης ότι και τα κατάλοιπα Thr-526 (έλικα TM12) και Gln-113 (υδρόφιλο τμήμα μετά την έλικα TM1) μπορεί να λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο αφού μεταλλαγές τους «χαλαρώνουν» την εξειδίκευση του μεταφορέα UapA, αλλά και πάλι χωρίς να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του κέντρου δέσμευσης του UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Εξάλλου, η μελέτη του συντηρημένου μοτίβου Gln-85-His-86 στο μέσον της έλικας TM1 του UapA υπέδειξε ότι το κατάλοιπο Gln-85 είναι σημαντικό για τη συγγένεια δέσμευσης και την εξειδίκευση, ενώ η His-86 παίζει ρόλο στην έκφραση και την ορθή στόχευση του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη (Pantazopoulou and Diallinas, 2006). Η μελέτη ενός μοτίβου «επανάληψης λευκινών» (leucine zipper) που υπάρχει μόνο στον UapA και όχι σε άλλους μεταφορείς NAT και αποτελείται από τρία κατάλοιπα λευκίνης που εντοπίζονται στην ίδια πλευρά α-έλικας του TM1 (Leu-77, Leu-84, Leu-91) υποδεικνύει ότι το μοτίβο λευκινών παίζει ρόλο στη συναρμογή της TM1 με άλλες έλικες του UapA για το καταλληλότερο πακετάρισμα της δομής (Pantazopoulou and Diallinas, 2006).

Πρόσφατα, ο συνδυασμός μελετών στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και κατασταλικών μεταλλαγών που απομονώθηκαν επιλέγοντας για στελέχη του ασκομύκητα με ικανότητα αύξησης σε αδενίνη, οδήγησε την ομάδα Γ. Διαλλινά να προτείνει ένα μοντέλο λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της TM1, της TM12, και της ευρύτερης περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», κατά το οποίο η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζει την συγγένεια δέσμευσης και την εξειδίκευση του UapA για το ουρικό οξύ, που αποτελεί το κυρίως υπόστρωμα του μεταφορέα (Parageorgiou *et al.*, 2008). Επίσης, μια τελευταία μελέτη από το εργαστήριο αυτό υποδεικνύει ότι κατάλοιπα των ελίκων TM9 και TM10 μπορεί να εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταφοράς υποστρώματος και προτείνει ότι υπάρχουν

σημαντικές θέσεις τόσο στην κυτταροπλασματική όσο και την εξωκυττάρια πλευρά του UapA οι οποίες καθορίζουν επιλεκτικά την πρόσβαση των υποστρωμάτων στο μονοπάτι μεταφοράς εν είδει πύλης (selective gates) (Kosti *et al.*, 2010).

Οι μελέτες του UapA μας δίνουν μια σημαντική βάση σύγκρισης για την κατανόηση των διαφορών αναγνώρισης υποστρωμάτων και εξειδίκευσης, σε σχέση με τον άλλο πολύ καλά μελετημένο μεταφορέα NAT, από ένα πρότυπο βακτηριακό σύστημα, τον XanQ.

Ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ του εντεροβακτηρίου *E. coli*

Από τα 10 ομόλογα NAT που περιέχει η *E. coli* στο γονιδίωμα της, οι σχέσεις δομής-λειτουργίας έχουν μελετηθεί εκτενώς με μεταλλαξιγένεση στον μεταφορέα XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Πρόκειται για έναν υψηλής συγγένειας συμμεταφορέα ξανθίνης:H⁺ (K_m 4-5 μ M) (Karatza and Frillingos, 2005). Παρά το γεγονός ότι η *E. coli* δεν χρησιμοποιεί πουρίνες (εκτός αδερίνης) ως μοναδική πηγή αζώτου και δεν μπορούν να εφαρμοσθούν πρωτόκολλα δοκιμασιών αύξησης (growth assays) σε ξανθίνη, υποξανθίνη ή ουρικό, όπως στο σύστημα του *A. nidulans*, υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής άλλων μεθοδολογιών, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και βιοφυσικής, κυρίως, που προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στο βακτηριακό αυτό σύστημα.

Το βακτηριακό σύστημα της *E. coli* K-12 επέτρεψε την κατασκευή ενός πλήρως λειτουργικού μεταφορέα XanQ χωρίς εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) και την εφαρμογή των στρατηγικών της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) (Frillingos *et al.*, 1998), οι οποίες είναι σημαντικά εργαλεία για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και την κατανόηση του μηχανισμού. Η συστηματική σημειακή μεταλλαξιγένεση και μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα XanQ, που βρίσκεται σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας, έχει αναδείξει μερικές σημαντικές περιοχές αλληλουχίας και κατάλοιπα κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία του μεταφορέα (Karatza *et al.*, 2006; Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010).

Οι αρχικές μελέτες εστιάστηκαν στην μεταλλαξιγένεση της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή» NAT, η οποία στον XanQ περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 324-333 (QNNGVIQMTG), και μικρών περιοχών αλληλουχίας ανοδικά (GSLPLTTFA) και καθοδικά (VASRYVG) του μοτίβου (Karatza *et al.*, 2006). Η ανάλυση των υψηλά συντηρημένων καταλοίπων του μοτίβου, Gln-324, Asn-325, Gly-327, Thr-332 και Gly-333, έδωσε αποτελέσματα που είναι όμοια με τη γενική εικόνα των

αποτελεσμάτων για τα αντίστοιχα κατάλοιπα του UapA (Karatza *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325 είναι αναντικατάστατα για τη μεταφορά υποστρώματος και, μάλιστα, το Gln-324 φαίνεται ότι χρειάζεται για τη δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος με υψηλή συγγένεια, εφόσον τα μεταλλάγματα Q324E και Q324N έχουν εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια μεταφοράς (15 φορές μεγαλύτερη K_m από τον φυσικού τύπου XanQ) και δεν αναγνωρίζουν κανένα από τα ανάλογα ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκαν ως προσδέτες. Επίσης, αντικατάσταση των καταλοίπων Thr-332 και Gly-333, ενώ δεν οδηγεί σε απενεργοποίηση, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην εξειδίκευση αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης, αναγνωρίζοντας υποκαταστάσεις στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Η αντικατάσταση του Gly-327 με Pro, Cys, ή Ala οδηγεί σε αύξηση της V_{max} κατά 2-3 φορές, χωρίς σημαντική επίπτωση στην K_m ή στην εξειδίκευση (Karatza *et al.*, 2006).

Η ανάλυση της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το ειδικό SH-αντιδραστήριο *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) έδειξε ότι όλες οι θέσεις καταλοίπων στην περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» είναι προσβάσιμες σε αλκυλίωση από το NEM και ορισμένες από αυτές είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση του αντίστοιχου μεταλλάγματος κυστεΐνης (single-Cys mutant) από το NEM, γεγονός που υποδεικνύει συμμετοχή των θέσεων αυτών στον μηχανισμό λειτουργίας. Οι ευαίσθητες σε NEM θέσεις εντοπίζονται σε συνεχόμενα κατάλοιπα της αλληλουχίας του μοτίβου «υπογραφή» (323-329) και σε μία πλευρά α -έλικας στην αλληλουχία καθοδικά του μοτίβου (332, 333, 336, 339) (Karatza *et al.*, 2006). Επίσης, βρέθηκαν δύο κατάλοιπα με πιθανώς σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα του μορίου του XanQ, ένα πριν (Pro-318) και ένα μετά (Gly-340) το μοτίβο «υπογραφή», των οποίων η μεταλλαξιγένεση οδηγούσε σε μηδενική ή ελάχιστη έκφραση στη μεμβράνη (Karatza *et al.*, 2006).

Πρόσφατα, μια συστηματική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης των πολικών καταλοίπων αμινοξέων του XanQ που προβλέπεται ότι βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα οδήγησε στην αποκάλυψη δύο ακόμα αναντικατάστατων καταλοίπων για τη λειτουργία του μεταφορέα, του Glu-272, στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8, και του Asp-304, στην έλικα TM9a που βρίσκεται πριν από την αλληλουχία του μοτίβου «υπογραφή», καθώς και δύο καταλοίπων με σημαντικό ρόλο στη συγγένεια δέσμευσης πουρινών ή στην εξειδίκευση, της His-31, στο μέσο της έλικας TM1, και της Asn-93, στο μέσο της έλικας TM3 (Karena and Frillingos, 2009). Τόσο ο χημικός χαρακτήρας της πλευρικής αλυσίδας όσο και ο λειτουργικός ρόλος των τεσσάρων αυτών καταλοίπων φαίνεται να είναι γενικά συντηρημένος κατά την εξέλιξη, μεταξύ των ομολόγων μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2, βάσει της εκτενούς βιοπληροφορικής ανάλυσης που έγινε (Karena and Frillingos, 2009)

και της σύγκρισης με δεδομένα που υπάρχουν για άλλους χαρακτηρισμένους μεταφορείς της οικογένειας (Pantazopoulou and Diallinas, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Varma *et al.*, 2008).

Εντελώς πρόσφατα, μια εκτενέστερη μελέτη κυστεϊνικής σάρωσης και επίδρασης αλκυλιωτικών παραγόντων (NEM/MTSES⁻) ανέδειξε νέα σημαντικά κατάλοιπα στις περιοχές ανοδικά του μοτίβου «υπογραφή» (αλληλουχία 272-305) (Mermelekas *et al.*, 2010) και αποκάλυψε το ρόλο καταλοίπων που ήταν γνωστό ότι ήταν σημαντικά από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας (Georgopoulou *et al.*, 2010).

Πιο αναλυτικά, βρέθηκε ότι το κατάλοιπο Asn-325, το οποίο είναι αναντικατάστατο (Karatza *et al.*, 2006), συμμετέχει στην πρόσδεση του υποστρώματος, καθώς η παρουσία υποστρώματος το προστατεύει πλήρως από τη δράση των NEM και MTSES⁻. Αντίθετα, το ευαίσθητο σε NEM κατάλοιπο Ala-323 φαίνεται να ανταποκρίνεται στη δέσμευση του υποστρώματος με μια συγκεκριμένη αλλαγή διαμόρφωσης (η παρουσία του υποστρώματος αυξάνει την ευαισθησία του στο NEM). Τα κατάλοιπα Thr-332, Gly-333 και Ser-336, τα οποία εντοπίζονται στην ίδια πλευρά α-έλικας (TM9b) βρίσκονται κοντά στο κέντρο δέσμευσης και αποτελούν μέρος του μονοπατιού μεταφοράς του υποστρώματος (Georgopoulou *et al.*, 2010).

Επίσης, η περιοχή που ήταν γνωστό ότι περιέχει τα αναντικατάστατα Glu-272 και Asp-304 (Karena and Frillingos, 2009) βρέθηκε να περιέχει μια σειρά σημαντικών για τη λειτουργία του μεταφορέα καταλοίπων. Αυτά είναι τα Ala-273, Gly-275, Ser-284 (υψηλή ευαισθησία σε NEM η οποία, στην περίπτωση της Gly-275, αυξάνεται παρουσία του υποστρώματος), Tyr-293, Arg-296, Gly-300 και Val-301 (χαμηλή ευαισθησία σε NEM), η Gly-305 που είναι σημαντική για την έκφραση στη μεμβράνη και την ενεργότητα, το μοτίβο ²⁷⁸-TATA-²⁸¹ το οποίο είναι συντηρημένο στα μέλη που μεταφέρουν ξανθίνη και/ή ουρικό οξύ, και φαίνεται να είναι σημαντικό για το κατάλληλο πακετάρισμα της δομής αλληλεπιδρώντας με άλλες περιοχές του μορίου με αποτέλεσμα οι μεταλλαγές του να επηρεάζουν δραματικά την έκφραση και/ή την ενεργότητα, και το Asp-276 όπου είναι απαραίτητη η παρουσία μιας καρβοξυλομάδας (Mermelekas *et al.*, 2010). Άρα αποκαλύπτεται ότι εκτός από το πολύ σημαντικό και ήδη μελετημένο μοτίβο «υπογραφή» (³²³-AQN³²³XG³²⁴XXXX³²⁸TG³³³), υπάρχουν άλλα δύο συντηρημένα και σημαντικά μοτίβα, το ²⁷²-EXXGD²⁷⁵XXAT²⁸¹ στο περιπλαστικό άκρο του TM8 και το ³⁰⁰-G³⁰⁰XX³⁰³DG³⁰⁵ στο TM9a. Είναι ενδιαφέρον ότι η ευρύτερη αλληλουχία 100 περίπου αμινοξέων που περιλαμβάνει τις TM8, ενδιάμεση υδρόφιλη περιοχή, TM9a, μοτίβο «υπογραφή», και TM9b (κατάλοιπα 257-354) δε φαίνεται να περιέχει άλλα σημαντικά κατάλοιπα

εκτός των τριών συντηρημένων μοτίβων που αποκαλύφθηκαν (Mermelekas *et al.*, 2010) (**Εικόνα 1.20**).

Από το σύνολο λοιπόν των αποτελεσμάτων του εργαστηρίου μας προκύπτει ένα πιο λεπτομερές μοντέλο για την γενική τοπολογική οργάνωση του XanQ στην περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» (**Εικόνα 1.20**). Στο νέο μοντέλο, τα NEM/MTSES⁻-ευαίσθητα κατάλοιπα του μοτίβου (323-329) σχηματίζουν μια επανεισερχόμενη θηλειά (reentrant loop) στραμμένη προς την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα του μορίου και με πρόσβαση στο κέντρο δέσμησης υποστρώματος, στις κορυφαίες θέσεις της οποίας τοποθετούνται τα αναντικατάστατα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325, που συμμετέχουν στο κέντρο δέσμησης (Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Οι θέσεις των καταλοίπων που είναι ευαίσθητα στο NEM καθώς και τα 4 αναντικατάστατα Glu-272, Asp-304, Gln-324 και Asn-325 έχουν προσέγγιση σε αυτήν την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα. Η μία όψη α -έλικας του αμέσως επόμενου αμφιπαθικού τμήματος TM9b με τα NEM-ευαίσθητα κατάλοιπα Gly-333 και Ser-336 που παίζουν ρόλο στην εξειδίκευση (Georgoroulou *et al.*, 2010) σχηματίζει μια συνέχεια του κέντρου δέσμησης/μεταφοράς υποστρώματος. Επίσης, η μία όψη α -έλικας του αμφιπαθικού τμήματος TM8 καθώς και η αμέσως επόμενη αλληλουχία στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας (272-281) περιέχει το μοτίβο ²⁷²-EXXGDXXAT-²⁸¹, που περιέχει κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν έμμεσα στο σχηματισμό μέρους του ενεργού κέντρου του XanQ.

(3) η λειτουργία επιτρέπεται ακόμη και με μεγάλες αλλαγές, αλλά αύξηση του μεγέθους της πλευρικής ομάδας με αλκυλίωση (NEM, MTSES) οδηγεί σε απενεργοποίηση (κατάλοιπα ευαίσθητα σε αλκυλίωση).

Οι θέσεις αυτές είναι πιθανό να εμπλέκονται ενεργά στον μηχανισμό αναγνώρισης-μεταφοράς υποστρώματος και καθορισμού της εξειδίκευσης. Όπως είναι αναμενόμενο, πολλές από τις πλευρικές ομάδες που υποδεικνύει ως σημαντικές η ανάλυση του XanQ βρίσκονται σε θέσεις υψηλής εξελικτικής συντήρησης (Karena and Frillingos, 2009) ή διατηρούν αντίστοιχο λειτουργικό ρόλο στον ομόλογο μεταφορέα UapA του *A. nidulans* (Papageorgiou *et al.*, 2008).

Όπως όμως έχει αναφερθεί, παρά τη σημασία των μεταφορέων NAT και το μεγάλο αριθμό των μελών που περιέχει η οικογένεια, ελάχιστα από αυτά έχουν χαρακτηριστεί και μελετηθεί. Γι' αυτό το λόγο δεν είναι δυνατό να αξιοποιηθεί η σημαντική γνώση που έχει αποκομιστεί έως τώρα από τη μελέτη κυρίως δύο ομολόγων, του XanQ και του UapA, για την εξακρίβωση των καταλοίπων που είναι σημαντικά για το μηχανισμό μεταφοράς σε επίπεδο οικογένειας πλέον, και για τις παρατηρούμενες διαφορές στην εξειδίκευση μεταξύ των μελών. Προς αυτή την κατεύθυνση, είναι απαραίτητος ο λειτουργικός χαρακτηρισμός νέων ομολόγων και η μελέτη μεταλλαξιγένεσης στις δυνητικά σημαντικές θέσεις, ώστε αφενός να διευρυνθεί το φάσμα των γνωστών εξειδικεύσεων της οικογένειας, και αφετέρου να επιτραπεί η καλύτερη κατανόηση των αναντικατάστατων στοιχείων του κέντρου δέσμευσης και του μηχανισμού ενεργού μεταφοράς καθώς και των στοιχείων που καθορίζουν τις διαφορές εξειδίκευσης.

Δεδομένου ότι XanQ και UapA διαφέρουν με συγκεκριμένο τρόπο ως προς τη συγγένεια και την εξειδίκευση του ουρικού οξέος, της ξανθίνης και των άλλων αναλόγων πουρινών (Goudela *et al.*, 2005) και ότι τα μέχρι τώρα αποτελέσματα από τα δύο συστήματα μεταφορέων συμφωνούν σε πολύ σημαντικό βαθμό (Diallinas and Gournas, 2008; Mermelekas *et al.*, 2010), η συγκριτική ανάλυση των δύο συστημάτων δίνει ήδη μια ισχυρή μοριακή βάση για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NAT, κάτι που να αναμένεται να ενισχυθεί ακόμη περισσότερο στο μέλλον με τον χαρακτηρισμό περισσότερων μελών.

A

H31	TM1	συγγένεια δέσμευσης	Karena and Frillingos, 2009
N93	TM3	εξειδίκευση	Karena and Frillingos, 2009
Q258	TM8	NEM ευαίσθητο	Karena and Frillingos, 2009
V261	TM8	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
E272	TM8	αναντικατάστατο	Karena and Frillingos, 2009
A273	TM8	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
G275	TM8	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
D276	TM8	απαραίτητη καρβοξυλομάδα	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
S284	IL8-9	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
D304	TM9a	αναντικατάστατο	Karena and Frillingos, 2009
G305	TM9a	έκφραση/ενεργότητα	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
P318	TM9a	έκφραση	Karatza <i>et al.</i> , 2006
Q324	μοτίβο	αναντικατάστατο/δέσμευση	Karatza <i>et al.</i> , 2006
N325	μοτίβο	αναντικατάστατο/δέσμευση	Georgopoulou <i>et al.</i> , 2010
N326	μοτίβο	NEM ευαίσθητο	Karatza <i>et al.</i> , 2006
G327	μοτίβο	NEM ευαίσθητο	Karatza <i>et al.</i> , 2006
T332	μοτίβο	εξειδίκευση	Karatza <i>et al.</i> , 2006
G333	μοτίβο	εξειδίκευση	Karatza <i>et al.</i> , 2006
V334	TM9b	NEM ευαίσθητο	Karatza <i>et al.</i> , 2006
S336	TM9b	NEM ευαίσθητο	Karatza <i>et al.</i> , 2006
V339	TM9b	NEM ευαίσθητο	Karatza <i>et al.</i> , 2006
N430	TM12	NEM ευαίσθητο	παρούσα εργασία
I432	TM12	εξειδίκευση/περιορισμοί	παρούσα εργασία

B

Y293	IL8-9	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
R296	IL8-9	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
G300	TM9a	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
V301	TM9a	NEM ευαίσθητο	Mermelekas <i>et al.</i> , 2010
F322	μοτίβο	NEM ευαίσθητο	Karatza <i>et al.</i> , 2006
A323	μοτίβο	NEM ευαίσθητο	Georgopoulou <i>et al.</i> , 2010
V426	TM12	NEM ευαίσθητο	παρούσα εργασία

Πίνακας 1.1. Πίνακας στον οποίο φαίνονται **(A)** οι δυνητικά σημαντικές θέσεις που προκύπτουν από τη μεταλλαξιγένεση του XanQ, και **(B)** οι θέσεις χαμηλότερης ευαισθησίας στο NEM ($IC_{50} > 100 \mu M$). Εκτός από τις θέσεις φαίνεται η πιθανή θέση στο μόριο, η σημασία τους και η αντίστοιχη δημοσίευση.

1.4 Αξιοποίηση πουρινών σε βακτηριακά συστήματα

1.4.1. Η πορεία καταβολισμού των πουρινών

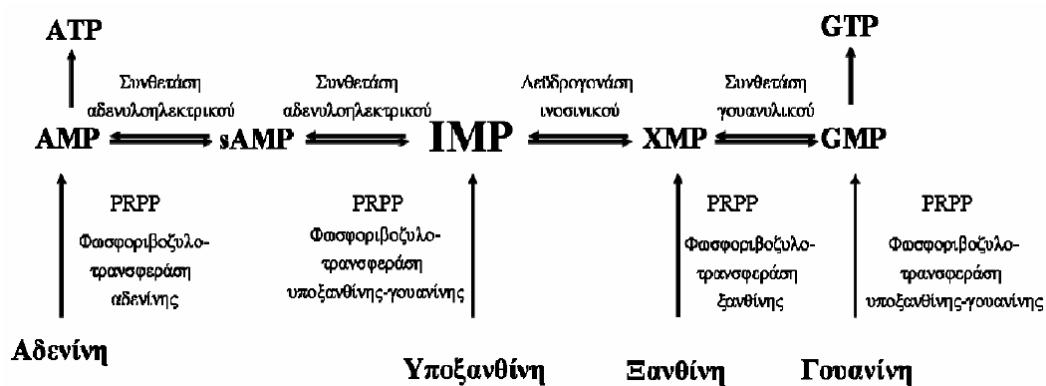
Οι πουρινικές βάσεις μπορούν να συντεθούν *de novo* αρχίζοντας από απλά αρχικά συστατικά όπως 5-φωσφοριβοζυλο-1-πυροφωσφορικό (PRPP), αμινοξέα, CO₂ και όξινο ανθρακικό. Εναλλακτικά, βάσεις πουρινών που απελευθερώνονται από την αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων, μπορούν να περισωθούν και να ανακυκλωθούν με ιδιαίτερη εξοικονόμηση ενέργειας μέσω των μονοπατιών περίσωσης (purine salvage pathways) (Εικόνα 1.21) ή να αποικοδομηθούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου (Εικόνα 1.22). Ακολούθως πραγματοποιείται περαιτέρω αποικοδόμηση η οποία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών οργανισμών.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.22, η αδενίνη και η γουανίνη μετατρέπονται με τα κατάλληλα ένζυμα (απαμινάσες) σε υποξανθίνη και ξανθίνη αντίστοιχα. Με το ένζυμο αφυδρογονάση ξανθίνης η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και αυτή σε ουρικό οξύ. Αυτό είναι και το βασικό στάδιο του καταβολισμού των πουρινών, καθώς η μετατροπή σε ουρικό οξύ απομακρύνει τις πουρίνες από τα μονοπάτια περίσωσης. Στη συνέχεια το ουρικό οξύ μετατρέπεται σε αλλαντοΐνη, με μια πορεία της οποίας τα στάδια μόλις πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν πλήρως (Lee *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006). Κατά την πορεία αυτή, το ουρικό οξύ μετατρέπεται σε 5-υδροξυ-ισοουρικό (HIU) με τη δράση της οξειδάσης ουρικού οξέος (ουρικάσης). Το 5-υδροξυ-ισοουρικό μπορεί και από μόνο του να μετατραπεί σε αλλαντοΐνη (χρόνος ημιζωής *in vitro* 30 min), παράγοντας ρακεμικό μείγμα αλλαντοΐνης. Επειδή όμως η αλλαντοϊνάση είναι ειδική για να αναγνωρίζει μόνο (S+)-αλλαντοΐνη, βρέθηκε ότι υπάρχει ένα ενδιάμεσο βήμα στο οποίο το HIU μετατρέπεται ενζυμικά με τη δράση της υδρολάσης του HIU σε 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοϊμιδαζολίνη (OHCU) η οποία με τη σειρά της μετρέπεται σε (S+)-αλλαντοΐνη με δράση της αποκαρβοξυλάσης της OHCU. Η (S+)-αλλαντοΐνη μέσω της αλλαντοϊνάσης δίνει αλλαντοϊκό και το αλλαντοϊκό με τη σειρά του μπορεί να μετατραπεί μέσω της δράσης της αμιδοϋδρολάσης του αλλαντοϊκού σε ουρεϊδογλυκολικό, αυτό σε ουρία μέσω της ουρεϊδογλυκολάσης και με τη δράση της ουρεάσης σε αμμωνία και CO₂. Από το στάδιο του αλλαντοϊκού και μετά, υπάρχουν αρκετά εναλλακτικά καταβολικά μονοπάτια.

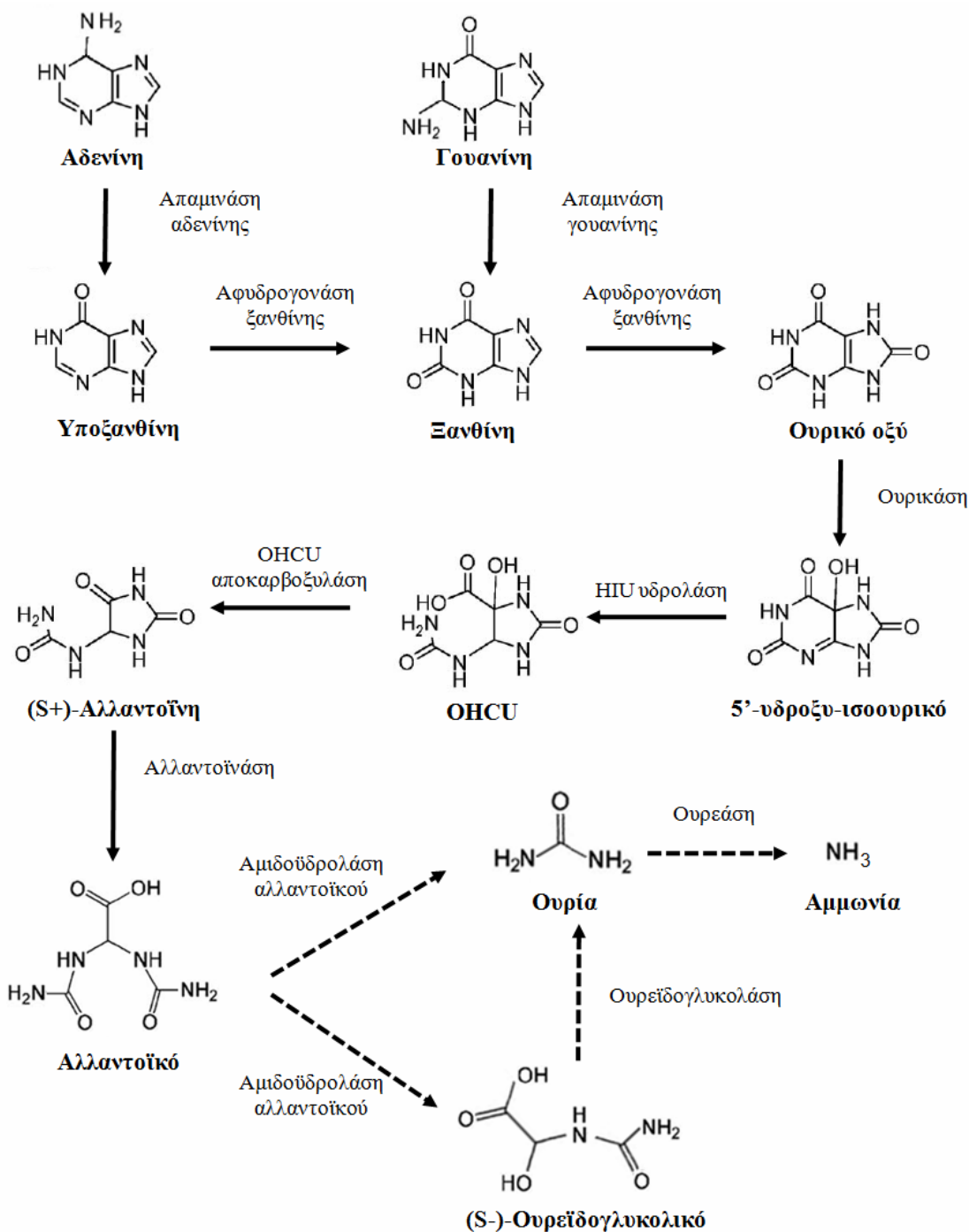
Μερικοί οργανισμοί αποικοδομούν τις πουρίνες πλήρως σε CO₂ και αμμωνία, ενώ άλλοι οργανισμοί διαθέτουν μερικά μόνο στάδια καταβολισμού των πουρινών, με αποτέλεσμα την μερική

αποικοδόμηση τους. Στον άνθρωπο και τα πρώτιστα, στα πτηνά, στα ουρικοτελικά ερπετά και σε όλα σχεδόν τα έντομα, το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών είναι το ουρικό, λόγω της απουσίας των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τον περαιτέρω καταβολισμό του (ουρικάση, αλλαντοϊνάση, ουρέαση). Στον άνθρωπο και τα πρώτιστα έρευνες έχουν αποδείξει ότι το υπεύθυνο γονίδιο για την οξειδωση του ουρικού οξέος (οξειδάση ουρικού οξέος ή ουρικάση) είναι ψευδογονίδιο (Oda *et al.*, 2002). Ωστόσο στα θαλάσσια ασπόνδυλα και στα μαλάκια, τα ένζυμα αυτά υπάρχουν με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών να είναι η αμμωνία (Fujiiwara and Noguchi, 1995). Στα περισσότερα φυτά, τελικά προϊόντα αποικοδόμησης των πουρινών είναι η αμμωνία και το CO₂ (Ashihara and Crozier, 2000). Στις ρίζες των ψυχανθών το άζωτο που δεσμεύεται από τα βακτήρια μετρέπεται σε αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό για την ευκολότερη μεταφορά του αζώτου σε ιστούς, καθώς οι ενώσεις αυτές έχουν αναλογία αζώτου προς άνθρακα 1:1 (Raso *et al.*, 2007; Quiles *et al.*, 2009). Τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες (Scazzocchio 1994, Schultz *et al.*, 2001) καταβολίζουν τις πουρίνες πλήρως σε ουρία και αμμωνία. Σημαντική εξαίρεση, μεταξύ άλλων, αποτελεί το εντεροβακτήριο *E. coli*, στο οποίο ο καταβολισμός των πουρινών φαίνεται να φτάνει μέχρι την παραγωγή αλλαντοΐνης ή αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000).

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στα είδη των γενών *Bacillus*, *Klebsiella* και *Escherichia*, τα γονιδιώματα των μεταφορέων πουρινών καθώς και τα αντίστοιχα γονίδια καταβολισμού και βιοσύνθεσης πουρινών είναι οργανωμένα σε οπερόνια και ρυθμίζονται σε μεταγραφικό επίπεδο από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων τους στο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 1.21. Μονοπάτι περίσωσης πουρινών. PRPP, 5-φασφοριβοζυλο-πυροφωσφορικό, AMP, αδενυλικό (μονοφωσφορική αδενοσίνη), sAMP, αδενυλοηλεκτρικό, IMP, ινοσινικό (μονοφωσφορική ινοσίνη), XMP Ξανθυλικό (μονοφωσφορική Ξανθοσίνη), GMP, γουανυλικό (μονοφωσφορική γουανοσίνη).



Εικόνα 1.22 Πορεία καταβολισμού των πουρινών. Πλήρες σχήμα που δείχνει τον καταβολισμό των πουρινών καθώς και τα ένζυμα που καταλύουν το κάθε στάδιο καταβολισμού. Στην *E. coli* K-12, ο καταβολισμός των πουρινών μπορεί να φτάσει μέχρι την παραγωγή αλλαντοΐνης ή αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000), αλλά δεν έχουν χαρακτηριστεί τα ενδιαμέσως ένζυμα καταβολισμού του ουρικού (ουρικάση, HIU υδρολάση). **HIU**, 5-υδροξυ-ισοουρικό, **OHCU**, 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεΐδοϊμιδαζολίνη.

1.4.2. Καταβολισμός των πουρινών στα βακτήρια

Το Gram-θετικό βακτήριο εδαφοβακτήριο *Bacillus subtilis* έχει αναπτύξει ένα ιδιαίτερα ελεγχόμενο σύστημα για τη χρήση μιας σειράς μικρομοριακών ενώσεων ως πηγών αζώτου, όταν οι προτιμώμενες πηγές αζώτου, π.χ. γλουταμικό και αμμωνία, εξαντλούνται από το θρεπτικό μέσο. Ένα σύστημα τέτοιου τύπου έχει προσδιορισθεί στο είδος αυτό και για τη χρήση πουρινών ως πηγών αζώτου. Πράγματι, τόσο η αδενίνη, η υποξανθίνη και η ξανθίνη, όσο και το ουρικό, η αλλαντοΐνη και η ουρία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον *B. subtilis* ως πηγές αζώτου (Christiansen *et al.*, 1997, Cruz-Ramos *et al.*, 1997). Μελέτες αερόβιας ανάπτυξης στελεχών του *B. subtilis* υπέδειξαν ότι ο καταβολισμός των πουρινών φτάνει μέχρι την παραγωγή αμμωνίας και CO₂ (Christiansen *et al.*, 1997, Nygaard *et al.*, 2000, Schultz *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, ο καταβολισμός της γουανίνης σε ξανθίνη, το πρώτο βήμα αποικοδόμησης της γουανίνης, πραγματοποιείται από το ένζυμο απαμινάση της γουανίνης. Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gde*, επάγεται όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (Nygaard *et al.*, 2000). Επίσης, 14 γονίδια που βρίσκονται σε μια ομάδα (cluster) γονιδίων στο 284-285 min του γονιδιώματος του *B. subtilis*, οργανώνονται σε μικρά οπερόνια, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ή ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι καταβολισμού και μεταφοράς των πουρινών και επάγονται από την παρουσία πουρινών στο θρεπτικό μέσο (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό και ουρικό) (Schultz *et al.*, 2001). Η δυνατότητα του *B. subtilis* να χρησιμοποιεί τις πουρίνες ως μοναδική πηγή αζώτου και η οργάνωση σε οπερόνια των αντίστοιχων έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθεί πιο αναλυτικά ο καταβολισμός των πουρινών και να εξιχνιαστεί η πορεία της μετατροπής του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη (εικόνα 1.16) (Lee *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006).

Στην περίπτωση του μεταφορέα ξανθίνης PbuX του *B. subtilis*, η έκφραση των γονιδίων του αντίστοιχου οπερονίου εξαρτάται από τη δράση του μεταγραφικού αναστολέα PurR και από την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων 5-φωσφοριβοζυλο-1-πυροφωσφορικού (PRPP). Ο μεταγραφικός αναστολέας PurR συνδέεται στους υποκινητές των εκάστοτε γονιδίων αναστέλλοντας τη μεταγραφή τους. Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει πουρίνες, αυξάνονται τα επίπεδα του PRPP, το οποίο με τη σειρά του συνδέεται με το μεταγραφικό αναστολέα PurR, εμποδίζοντας τον να συνδεθεί στον υποκινητή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων (Schultz *et al.*, 2001). Στον ίδιο οργανισμό, έχει χαρακτηριστεί και ένας δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκονται με τη μεταφορά (PbuX

μεταφορέας ξανθίνης, PbuG μεταφορέας υποξανθίνης-γουανίνης) και τη σύνθεση των πουρινών (Johansen *et al.*, 2003). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η παρουσία υποξανθίνης και γουανίνης στο θρεπτικό μέσο, οδηγεί το σχηματισμό πρόωρου σήματος τερματισμού της μεταγραφής, εμποδίζοντας την RNA πολυμεράση να ολοκληρώσει την μεταγραφή, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων, σε σχέση με τα λειτουργικά, μεταγραφημάτων (Christiansen *et al.*, 1997, Johansen *et al.*, 2003). Η μετα-μεταγραφική αυτή ρύθμιση αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς του γενικότερου τύπου ρύθμισης που είναι γνωστός με το όνομα “riboswitches” (Mandal *et al.*, 2003, Mandal and Breaker, 2004).

Το Gram-αρνητικό παθογόνο εντεροβακτήριο *Klebsiella pneumoniae* μπορεί και χρησιμοποιεί την αδενίνη και την υποξανθίνη ως μοναδικές πηγές αζώτου σε αερόβιες συνθήκες, και πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε το γενετικό σύστημα για την μετατροπή της υποξανθίνης σε αλλαντοΐνη (de la Riva *et al.*, 2008; O’Leary *et al.*, 2009). Πρόκειται για το *hpx* σύστημα το οποίο περιέχει 7 γονίδια οργανωμένα σε 2 μικρά οπερόνια με το ρυθμιστικό μόριο να είναι το HpxR. Η ρυθμιστική αυτή πρωτεΐνη κρατά σε καταστολή το πρώτο οπερόνιο *hpxDE*, όταν υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα αζώτου. Όταν αυτή η διαθεσιμότητα ελλεισθεί η καταστολή μειώνεται και η παρουσία της υποξανθίνης έμμεσα οδηγεί σε απελευθέρωση της μεταγραφής του οπερονίου, το οποίο ελέγχει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και ουρικό οξύ. Η συσσώρευση του ουρικού οξέος προκαλεί την ενεργοποίηση του οπερονίου *hpxPQT*, το οποίο μαζί με το προϊόν του γονιδίου *hpxO* (HIU υδρολάση) είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη (de la Riva *et al.*, 2008).

Το Gram-αρνητικό εντεροβακτήριο *E. coli*, σε αντίθεση με τον *B. subtilis*, την *K. pneumoniae* και άλλα βακτήρια, δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει άλλες πουρίνες εκτός από αδενίνη (ή αδενοσίνη) σαν μοναδική πηγή αζώτου στην αερόβια ανάπτυξη της. Επίσης, έχει δειχθεί ότι μπορεί κάτω από αναερόβιες συνθήκες να χρησιμοποιήσει την αλλαντοΐνη ως μοναδική πηγή αζώτου (Cusa *et al.*, 1999). Μπορεί ωστόσο, να χρησιμοποιήσει πουρίνες όπως υποξανθίνη, γουανίνη (γουανοσίνη) ή ξανθίνη (ξανθοσίνη) για να ενδυναμώσει την αερόβια ανάπτυξη όταν χρησιμοποιείται αμμώνιο ή ασπαρτικό ως βασική πηγή αζώτου (Xi *et al.*, 2000; Karatza and Frillingos, 2005). Αν και οι παρατηρήσεις αυτές υπονοούν ότι οι εξωγενείς πουρίνες χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων διαμέσου των μονοπατιών περίσωσης τους (Zaklin and Nygaard 1996), είναι γνωστό ότι οι πουρίνες καταβολίζονται μερικώς μέχρι την παραγωγή της αλλαντοΐνης ή του αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000). Είναι επομένως πιθανόν, οι αντίστοιχοι μεταφορείς και ένζυμα να μην παράγονται ή να

μην είναι ενεργά σε επίπεδα επαρκή ώστε να υποστηρίξουν την πλήρη ανάπτυξη, εξαιτίας χαμηλής ικανότητας πρόσληψης ή χαμηλής δραστηριότητας του υποκινητή ή ανεπαρκούς ρύθμισης των αντίστοιχων γονιδίων στο μεταγραφικό επίπεδο (Xi *et al.*, 2000, Reitzer and Schneider 2001).

Ωστόσο, ανάλυση του γονιδιώματος της *E. coli* με υπολογιστικά προγράμματα, υπέδειξε την ύπαρξη πέντε σ^{54} - εξαρτώμενων υποκινητών σε μια ομάδα (cluster) 23 γονιδίων στο 65 min του γονιδιώματος (Xi *et al.*, 2000). Τέτοιοι υποκινητές συνήθως ελέγχουν γονίδια τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αζώτου, όπως η συνθετάση της γλουταμίνης και τα ένζυμα καταβολισμού της αργινίνης (Schneider *et al.*, 1998). Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των γονιδίων που βρίσκονται στην αντίστοιχη περιοχή υποστηρίζει ότι είναι πιθανόν να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον καταβολισμό και την διαμεμβρανική μεταφορά των πουρινών. Σε αυτήν την περιοχή λοιπόν της αλληλουχίας εντοπίζονται 3 μεταφορείς NAT, ο XanQ, ο οποίος έχει χαρακτηριστεί στο εργαστήριό μας και αποτελεί πρότυπο βακτηριακό σύστημα για τη μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια NAT, και οι μεταφορείς YgfQ και YgfU, οι οποίοι αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να συνεισφέρει στην κατανόηση του μηχανισμού και της επιλεκτικότητας αναγνώρισης νουκλεοτιδικών βάσεων από τους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2, χρησιμοποιώντας τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli* τόσο ως μοντέλο μελέτης για την ανάλυση του ρόλου νέων περιοχών του μορίου που δεν είχαν μελετηθεί όσο και ως βάση σύγκρισης για τη λειτουργική διερεύνηση νέων ομολόγων.

Πιο συγκεκριμένα, οι στόχοι ήταν:

- 1) Ανάλυση του ρόλου της έλικας TM12 του XanQ στην εξειδίκευση και στον μηχανισμό μεταφοράς πουρινών με χρήση της στρατηγικής της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis).** Το ζητούμενο ήταν να μελετηθεί το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα (TM12) (κατάλοιπα 419-450) και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις του με την περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» (κατάλοιπα 300-340), η οποία περιέχει σημαντικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου δέσμευσης.
- 2) Κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός νέων ομολόγων μεταφορέων του XanQ,** δηλαδή μια σειρά ομολόγων από την *E. coli* που δεν είχαν μελετηθεί στο παρελθόν (YgfU, RutG, και άλλα 5), και ομόλογα του XanQ από συμβιωτικά ριζοβακτήρια (*Sinorhizobium meliloti*), ψυχρόφιλα (*Psychrobacter cryohalolentis*) ή θερμόφιλα βακτήρια (*Moorella thermoacetica*). Πέρα από τον εμπλουτισμό της λειτουργικής βάσης δεδομένων για την οικογένεια NAT, το ζητούμενο εδώ ήταν να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε νέα λειτουργικά προφίλ εξειδίκευσης και να κατανοήσουμε καλύτερα τους πιθανούς συσχετισμούς μεταξύ αλληλουχίας και επιλεκτικότητας του μεταφορέα ως προς το υπόστρωμα.
- 3) Μελέτη της μοριακής βάσης διαφορών εξειδίκευσης κατά την εξέλιξη των μεταφορέων NAT,** με εφαρμογή στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στους νεο-χαρακτηριζόμενους μεταφορείς. Σε έναν από τους νέους μεταφορείς που παρουσίαζε διαφορά στην εξειδίκευση (YgfU), θελήσαμε να μελετήσουμε το βαθμό λειτουργικής συντήρησης και το ρόλο των «δυναμικά σημαντικών» θέσεων, χρησιμοποιώντας σαν στόχους μεταλλαξιγένεσης την ομάδα των σημαντικών καταλοίπων που έχουν προκύψει από τη διεξοδική ανάλυση του XanQ (βλ. Πίνακα 1.1).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Όργανα

Κατά την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα:

Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California),

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5415 D.

Φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory products GmbH, Hanau, Germany),

Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California),

Συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Mini Trans-Blot transfer (Bio-Rad, Hercules, California),

Φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (Speedvac concentrator) (Savant Instruments, Hicksville, New York),

Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut), ο οποίος είναι εγκατεστημένος στο χώρο του εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής,

Συσκευή ταχείας διήθησης (glass filter holder assembly) (Fischer Scientific, Pittsburg, PA),

Συσκευή υπερήχων, digital sonifier model 250-D (Branson Ultrasonics, Danberry, Connecticut), η οποία ήταν εγκατεστημένη στο χώρο του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων (I.B.E.I),

Υπερφυγόκεντρος Beckman Optima™ ULtracentrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, California),

2.2. Χημικά αναλώσιμα

Η ραδιενεργός [³H] ξανθίνη (18 Ci/mmol), [¹⁴C]ουρικό οξύ (50 mCi/mmol), και [³H]ουρακίλη (59 Ci/mmol) ήταν από την εταιρεία Moravek Biochemicals (Brea, California) και οι φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις (ξανθίνη, ουρικό οξύ, υποξανθίνη, ουρακίλη, γουανίνη, αδερίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη, 1-μεθυλοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη) από την Sigma (St. Louis, Missouri).

Τα oligo-δεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) συντέθηκαν κατά παραγγελία από την εταιρεία BioSpring GmbH (Frankfurt, Germany).

Ένζυμα κλωνοποίησης- ανασυνδυασμού του DNA : Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η Phusion High Fidelity DNA πολυμεράση (Phusion High Fidelity PCR system) από την εταιρεία Tools for Molecular Biology- FINNZYMES (Espoo, Finland), είτε η Platinum Pfx DNA πολυμεράση της εταιρείας Invitrogen (Groningen, Netherlands). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI*, *ApaI*, *HindIII*, *EcoRV*, η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4, που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ανασύνδεσης (ligation) και η αλκαλική φωσφατάση [για την αποφωσφορυλίωση των πλασμιδιακών φορέων (vectors)] ήταν είτε της εταιρείας MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Germany) είτε της εταιρείας Takara (BIO INC, Japan). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NotI*, *HpaI* ήταν της εταιρείας New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts).

Αντισώματα (antibodies) : Το αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών (anti-PentaHis-HRP) είναι της εταιρείας Qiagen (West Sussex, UK). Το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης ραπανιού (avidin-HRP) ήταν της εταιρείας Amersham Pharmacia Bio-Tech (Uppsala, Sweden).

Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών : Χρησιμοποιήθηκαν οι GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus ready to use, της Fermentas (St. Leon-Rot, Germany), για ηλεκτροφορήσεις DNA, και Prestained SDS-PAGE Standards, Low-Range Bio-Rad Laboratories (Hercules, California) για ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.

Συσκευασίες υλικών (kits) : (1) Για απομόνωση DNA: Συσκευασία υλικών καθαρισμού τμημάτων DNA από δείγματα πήγματος αγαρόζης Nucleospin Extract II Macherey-Nagel (Duren, Germany), Συσκευασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany). (2) Για αποτύπωση Western: Συσκευασία πρωτοκόλλου ενισχυμένης

χημειοφωταύγειας ECL™ Western BLotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

SH- αντιδραστήρια (thiol- reactive reagents) : Το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) ήταν της εταιρείας Sigma (St. Louis, Missouri).

Χλωριούχο κάδμιο (Cadmium Chloride) της εταιρείας Sigma.

Τα υπόλοιπα χημικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων διαλυμάτων ήταν της υψηλότερης απαιτούμενης καθαρότητας και κατά κύριο λόγο αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma (St. Louis, Missouri).

2.3. Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

- *E. coli* **TOP10F'** (F' {LacL^q, Tn10 (Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) φ80LacZΔM15 ΔLacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara-Leu)7697 gaLU gaLK rpsL(Str^R) endA1 nupG) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (μετά από την αντίδραση λιγάσης (Ligation) σε μεγάλη κλίμακα λόγω του μεγάλου βαθμού επιδεκτικότητας (competence efficiency) που διαθέτει.
- *E. coli* **T184** (LacL⁺ O⁺ Z⁻ Y⁻ (A), prsL, met⁻, thr⁻, recA, hsdM, hsdR/F⁻, LacI^q, O⁺, Z^{D118} (Y⁺, A⁺) (Teather *et al.*, 1980): χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση των διαπερασών XanQ εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης, LacZ(p/o), υπό το μεταγραφικό έλεγχο του ισοπρόπυλο-β, D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Το γονιδίωμα του στελέχους T184 δεν περιέχει ενδογενή γονίδια που να επάγονται από IPTG(Lac Z⁻ Y⁻).
- *E. coli* **XL1-Blue** (endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 reLA1 Lac gLnV44 F'[Tn10 proAB⁺ LacI^q Δ(LacZ)M15] hsdR17(rk⁻ mk⁺) (Stratagene): χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των διαπερασών της οικογένειας NAT στην *E. coli*, καθώς επίσης και για τον έλεγχο της έκφρασης της ομόλογης πρωτεΐνης MoorT από το θερμόφιλο βακτήριο *Moorella thermoacetica*.
- *E. coli* **C41(DE3)** (F⁻ ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)(DE3)) (Lucigen): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.

Τα αρχικά πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- **pT7-5** : φορέας κλωνοποίησης των υπό μελέτη γονιδίων με στόχο την υπερέκφρασή τους μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης, *lacZ*(p/o) [πρόκειται για πλασμίδιο μετρίου αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο (medium copy number), βλ. Sahin-Toth *et al.*, 1995b].
- **pT7-5/xanQ-Cys-less-His₁₀** (Karatza *et al.*, 2006): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), υπο τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.

- **pT7-5/*xanQ*-His₁₀** (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ φυσικού τύπου (wt), υπο τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/*mely*-BAD** (Frillingos and Kaback, 2001): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*mely*) της διαπεράσης μελιβιόζης MelY του *Enterobacter cloacae* (Tavoulari and Frillingos, 2008) υπο τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (**Biotin Acceptor Domain**) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1993) ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- **pT7-5/*xanQ*-Cys-less-X(323, 332, 339)C-His₁₀**: πρόκειται για ανασυνδυασμένα pT7-5 που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριό μας (Karatza *et al.*, 2006).
- **pT7-5/*xanQ*-Q324(E, N)C-His₁₀**: πρόκειται για ανασυνδυασμένα pT7-5 που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριό μας (Karatza *et al.*, 2006).
- **pT7-5/*moorT*-BAD** (Γ. Μερμελέκας, 2009, Διδ. Διατριβή): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*moorT*) του MoorT από το θερμόφιλο *Moorella thermoacetica* και την αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatza and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/*xanQ*-N93T-BAD** (Karena and Frillingos, 2009), **pT7-5/*xanQ*-D276M-BAD** (Mermelekas *et al.*, 2010), **pT7-5/*xanQ*-G333R-BAD** (Karatza *et al.*, 2006): πρόκειται για ανασυνδυασμένα pT7-5 που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριό μας.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν ήταν:

- **pT7-5/*xanQ*-Cys-less-X#C-BAD**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), και ένα επιπλέον κατάλοιπο κυστεΐνης (single-Cys mutant, διαπεράση μοναδικής κυστεΐνης) που έχει εισαχθεί αντί του X στη θέση # και αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatza and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/*xanQ*-X#Y-BAD**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με συγκεκριμένη αντικατάσταση αμινοξέος (X σε Y) στη θέση # και αλληλουχία της περιοχής

δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatza and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.

- **pT7-5/*xanQ*-Cys-less-(323, 332, 339)C/(429, 430)C-His₁₀**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), και δύο επιπλέον κατάλοιπα κυστεΐνης (double-Cys mutant) στις αντίστοιχες θέσεις, και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) στο C-τελικό άκρο. Τέτοιου τύπου πλασμίδια κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μοτίβου-υπογραφή και της έλικας TM12 του XanQ.
- **pT7-5/*xanQ*-Q324(E,N)/I432S-BAD**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*ygfO*) του XanQ με αντικατάσταση στη θέση 324 και αλλαγή στη θέση 432 με σερίνη, και αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatza and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/X-BAD**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν τα γονίδια που είναι μέλη της οικογένειας NAT από την *E. coli*, το ριζόβιο συμβιωτικό *Sinorhizobium meliloti* και το ψυχρόφιλο *Psychrobacter cryohalolentis* K5, και αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatza and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/*ygfU*-X#Y-BAD**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*ygfU*) του YgfU με συγκεκριμένη αντικατάσταση αμινοξέος (X σε Y) στη θέση # και αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatza and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.

2.4. Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Οι τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA (τεχνικές κλωνοποίησης DNA ή γενετικής μηχανικής) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων από επιλεγμένα τμήματα DNA μέσω μιας διαδοχικής σειράς *in vivo* και *in vitro* σταδίων, δηλ. παραγωγή πολλών κλώνων DNA (**DNA cloning**) καθώς επίσης και ανασυνδυασμό αυτών των προς μελέτη τμημάτων με την τελική εισαγωγή τους σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς (**DNA recombination**). Το σύνολο των σχετικών τεχνικών αναφέρεται ως *τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA* (**recombinant DNA technology**) όπου χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα μοριακά εργαλεία και μέθοδοι..

2.4.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB)

Πεπτόνη 1% (w/v), Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), NaCl 1% (w/v).

Χρωμοσωμικό DNA απομονώθηκε από το στέλεχος T184 της *E. coli*, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως γενετικό υπόβαθρο σε αντιδράσεις PCR. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης μετά από ανάπτυξη των κυττάρων T184 στους 37°C για 16 h σε πλήρες θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB) που περιείχε στρεπτομυκίνη (τελική συγκέντρωση 10 µg/mL).

2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *psyhT* (*gene ID*: 4034500), ομολόγου του *ygfO* (*xanQ*), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR ενός σταδίου με εκμαγείο ολικό γονιδιωματικό DNA του ψυχρόφιλου Gram-αρνητικού βακτηρίου *Psychrobacter cryohalolentis* K5 (Bakermans, C., *et al.*, 2003). Το γονιδιωματικό DNA του *Psychrobacter cryohalolentis* K5 μας παραχωρήθηκε ευγενώς από την Dr. Corien Bakermans (Michigan State University). Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια NAT από το Gram-αρνητικό ριζόβιο συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* SM1021 (*gene IDs*, *Q92X28*: 1236465 , *Q92WQ0*: 1236610,

Q92LL9: 1234706) χρησιμοποιήθηκε η PCR ενός σταδίου με εκμαγείο ολικό γονιδιωματικό, το οποίο μας παραχωρήθηκε ευγενώς από τον Δρ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των γονιδίων που προβλέπονται ως μέλη της οικογενείας NAT από την *E. coli*, με εκμαγείο ολικό γονιδιωματικό DNA από κύτταρα T184 που απομονώθηκε (βλ. παραπάνω). Πρόκειται για τα γονίδια *uraA*, *ygfQ*, *yicO*, *rutG*, *ybbY*, *purP* και *yjcD*. Επίσης, κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της φωσφοριβοσυλοτρανσφεράσης της ουρακίλης (*urp*, gene ID: 946979) από την *E. coli*. Οι εκκινητές για τις αντιδράσεις σχεδιάστηκαν ώστε να εισαχθούν οι περιοριστικές θέσεις των *Bam*HI και *Apa*I στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων, αντίστοιχα, και να επιτραπεί στη συνέχεια ένθεση (insertion) των προϊόντων PCR στην αλληλουχία του πλασμιδίου pT7-5 (Sahin-Tóth *et al.*, 1995b), με αντικατάσταση του περιοριστικού θραύσματος *Bam*HI/*Apa*I στον φορέα (vector) pT7-5/*melY*-BAD (βλ. ανωτέρω). Τέλος, το γονίδιο *ygfU* είχε ήδη κλωνοποιηθεί στο εργαστήριο μας στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5 από τη Δρ. Παναγιώτα Καρατζά (Π. Καρατζά, 2006, διδ. διατριβή), και έγινε νέα κλωνοποίηση από το πλασμίδιο ώστε να εισαχθεί η περιοριστική θέση του ενζύμου *Apa*I στο 3' άκρο του γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις φαίνονται πιο κάτω, στον **Πίνακα 2.1**.

Αναλυτικά σε κάθε αντίδραση PCR στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή αντίστοιχες ποσότητες προϊόντων PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης και καθαρισμό.
- 0.3 μM από κάθε εκκινητή
- 1X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Phusion HF polymerase buffer) που περιέχει 7.5 mM MgCl₂.
- 0.25 mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP)
- 1 U/μL DNA πολυμεράση (Phusion HF)
- Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη millipore μέχρι τελικό όγκο 100 μL.

Κατά κανόνα, η PCR εφαρμόστηκε σε 30 κύκλους, με τις εξής εναλλαγές θερμοκρασίας :

	94 °C για 5 min

(αποδιάταξη δίκλωνου DNA)	4 °C για 1 min
	5-68 °C * για 1 min
(πρόσδεση εκκινήτων)	2 °C για 2 min

(επιμήκυνση του DNA)	72 °C για 7 min

*Η θερμοκρασία εξαρτάται από το T_m των εκκινήτων κάθε φορά

Ανασυνδρασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητών
pT7-5/ <i>ygfU</i> - BAD	LacZ (p/o) sense 5'- ATG/ATT/ACG/GAT/TCA/CTG/GCC/GTC - 3' YgfU antisense 5'-CT/ATA/ <u>AGG/GCC/CTC/TCC/ATG/CTC</u> -3'
pT7-5/ <i>ybbY</i> - BAD	YbbY sense 5'-TAA/GGT/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/TTC/AAC/TTC/AAC/TTC/GCA/GTC/AGC/C -3' YbbY antisense 5'-TC/AAC/ <u>AGG/GCC/CTC</u> /AAT/AGC/TTC/CCA/AGG/AAT/AAG/G -3'
pT7-5/ <i>ygfQ</i> - BAD	YgfQ sense 5'-GAG/GAC/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/TCT/GGA/GAT/ATC/CTA/CAA/ACA/CC -3' YgfQ antisense 5'-AG/AAT/ <u>CGG/GCC/CAT</u> /TGC/CCA/ACC/ACC/TGC/ATA/AAA/TGC -3'
pT7-5/ <i>yjcD</i> - BAD	YjcD sense 5'-GGA/TGT/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/TCT/ACT/CCA/TCA/GCT/CGT/ACC -3' YjcD antisense 5'-AT/GAA/ <u>AGG/GCC/CAT</u> /AGC/CCA/ACC/ACC/AGC/ATA/GAA/GGT/C -3'
pT7-5/ <i>rutG</i> - BAD	RutG sense 5'-AGG/AGA/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/GCA/ATG/TTC/GGT/TTT/CCT/CAC/TG -3' RutG antisense 5'-TT/TTC/ <u>TGG/GCC/CGG</u> /TTC/TTG/ATG/AAC/AAC/TTC/TGG/CGG/TG -3'
pT7-5/ <i>yicO</i> - BAD	YicO sense 5'-TGG/ACA/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/AAC/AAC/GAC/AAC/ACC/GAT/TAC/GTG -3' YicO antisense 5'-GC/CAG/ <u>TGG/GCC/CTC</u> /CAC/AAG/AAT/AAT/CTT/AAG/TGC/AAA/C -3'
pT7-5/ <i>purP</i> - BAD	PurP sense 5'-CGG/AAA/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/AGT/CAT/CAA/CAT/ACC/ACC/CAG/AC -3' PurP antisense 5'-TA/TCG/ <u>AGG/GCC/CTG</u> /AGC/GTC/GAT/AAA/GAC/AAT/CTT/CAG -3'
pT7-5/ <i>uraA</i> - BAD	UraA sense 5'-GAA/GAT/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/ACG/CGT/CGT/GCT/ATA/GGG/GTG/AGT/G -3' UraA antisense 5'-TC/GGT/ <u>AGG/GCC/CTT</u> /GTC/TGT/TAT/ATC/CGC/GTC/TTC/TGC -3'
pT7-5/ <i>upp</i> - BAD	upp sense 5'-AGG/AGA/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/AAG/ATC/GTG/GAG/GTC/AAA/CAC/CC -3' upp antisense 5'-CGT/CAT/ <u>GGA/TCC</u> /ATC/CCT/GTA/TTA/GGT/GTT/ATA/GGC/GGC -3'
pT7-5/ <i>psychT</i> -BAD	PsychT sense 5'-GAG/AAA/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/AGC/GAG/CAC/ACC/CAA/GGA/AAT/CCC -3' PsychT antisense 5'-CT/TCA/ <u>CGG/GCC/CGC</u> /AGC/TTC/TCT/AGC/AGG/TTT/TAC/GTC/ATC -3'
pT7-5/ <i>Q92X28-ABH</i>	Q92X28 sense 5'-GGG/AGG/ <u>GGA/TCC</u> /ATG/AAT/ACG/GAT/TCG/AAG/TGC/GAT/GC -3' Q92X28 antisense 5'-AT/ATT/ <u>AGG/GCC/CCC</u> /ACC/ATG/TCG/CAT/GGC/ACC/TTC/ACC/GAG -3'

pT7-5/ <i>Q92WQ0</i> -ABH	Q92WQ0 sense 5'-GGA/GGA/ GGA/TCC /ATG/AAT/ACG/GAT/TCG/AAG/TGC/GAT/GC -3' Q92WQ0 antisense 5'-TT/TTA/ TGG/GCC/CCC /AGG/ATG/TCG/CAT/AGC/GCC/TTC/ACC/GAG -3'
pT7-5/ <i>Q92LL9</i> -ABH	Q92LL9 sense 5'-GAG/GAG/ GGA/TCC /TTG/GCA/AAC/AGT/GCA/GAG/GAA/ACC/GTA/TC -3' Q92LL9 antisense 5'-AT/TAT/ GGG/GCC/CTG /TGC/TTC/CGC/TGC/AAG/CAC/AGC/CAC/TTC -3'
pT7-5/ <i>upp/ uraA</i> -BAD	upp sense 5'-AGG/AGA/ GGA/TCC /ATG/AAG/ATC/GTG/GAG/GTC/AAA/CAC/CC -3' UraA antisense 5'-TC/GGT/ AGG/GCC/CTT /GTC/TGT/TAT/ATC/CGC/GTC/TTC/TGC -3'

Πίνακας 2.1. Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες των γονιδίων και εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Υπογραμμισμένες και με έντονα γράμματα φαίνονται οι αλληλουχίες που εισάγουν τις θέσεις περιορισμού *Bam*HI (**GGATCC**), *Hind*III (**AAGCCT**) στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων.

2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τα μεταλλάγματα του XanQ (μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης, σημειακά μεταλλάγματα σε γενετικό υπόβαθρο φυσικού τύπου ή διπλά μεταλλάγματα), και τα μεταλλάγματα του YgfU χρησιμοποιήθηκε η PCR δύο σταδίων (**Εικόνα 2.1**).

Στην PCR δύο σταδίων (Ho *et al.*, 1989, Frillingos *et al.*, 1994, Karatza *et al.*, 2006), χρησιμοποιούνται συμπληρωματικοί εκκινητές (primers) για να δημιουργηθούν, από τα γονιδια-στόχοι, τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (1^ο στάδιο). Τα προϊόντα του 1^{ου} σταδίου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν, και χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στο 2^ο στάδιο, όπου και, με τη χρήση κατάλληλων εξωτερικών εκκινητών (ίδιοι με το 1^ο στάδιο), επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από την συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία (contig) όλων των προηγούμενων τμημάτων (2^ο στάδιο) (**Εικόνα 2.1**). Η παραπάνω μεθοδολογία, που περιγράφεται και ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension) (Ho *et al.*, 1989) αποτελεί μέθοδο εκλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χμαιρικών γονιδίων, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και δημιουργία γονιδίων χωρίς κωδικόνια Cys (Cys-less) με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση σε πολλές θέσεις (Frillingos and Kaback, 2001; Karatza *et al.*, 2006; Tavoulari and Frillingos, 2008). Η PCR δύο σταδίων επίσης χρησιμοποιείται και για την κατασκευή διαπερασών με διπλή μετάλλαξη. Ως γενετικό υπόβαθρο στην αντίδραση χρησιμοποιείται ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει τη μια μετάλλαξη

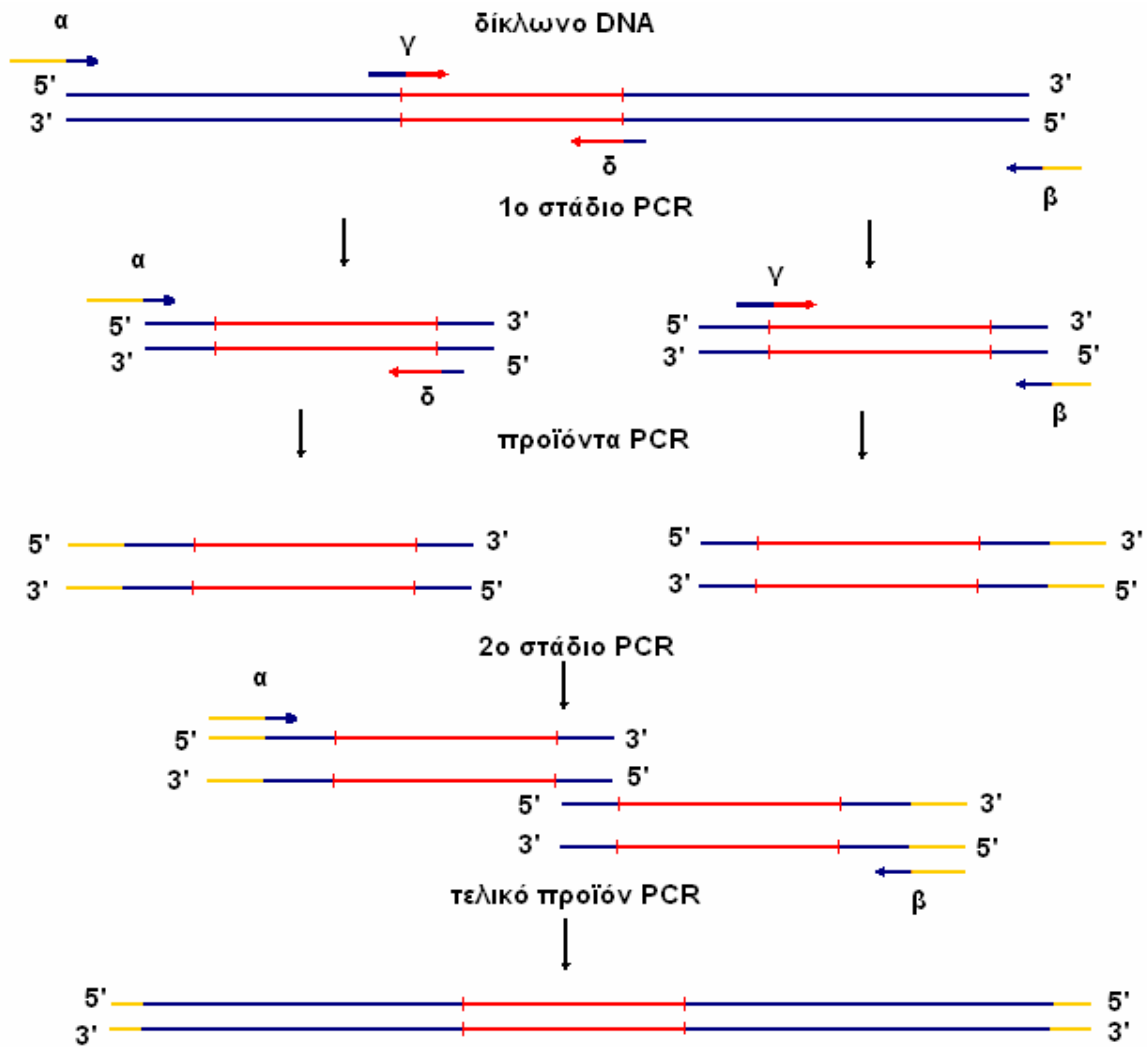
σε μία από τις δύο θέσεις (~1 µg/µL) και οι εσωτερικοί εκκινητές για την εισαγωγή της δεύτερης μετάλλαξης στην αντίστοιχη θέση. Στο τέλος κάθε σταδίου, τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε 1% πήγμα αγαρόζης και ανακτώνται με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA από πήγμα αγαρόζης Nucleospin Extract II Macherey-Nagel (Duren, Germany).

Αναλυτικά σε κάθε στάδιο PCR στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή αντίστοιχες ποσότητες προϊόντων PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης και καθαρισμό.
- 0.3 µM από κάθε εκκινητή
- 1X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Phusion HF polymerase buffer) που περιέχει 7.5 mM MgCl₂.
- 0.25 mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP)
- 1 U/µL DNA πολυμεράση (Phusion HF)
- Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη millipore μέχρι τελικό όγκο 100 µL.

Κατά κανόνα, η PCR εφαρμόστηκε σε 30 κύκλους, με τις εξής εναλλαγές θερμοκρασίας :

	Για το πρώτο στάδιο		Για το δεύτερο στάδιο
	94 °C για 5 min		94 °C για 5 min
	-----		-----
(αποδιάταξη δίκλωνου DNA)	64 °C για 1 min		94 °C για 1 min
	60 °C για 1 min		50 °C για 2 min
(πρόσδεση εκκινητών)	72 °C για 1.5 min		72 °C για 2 min
	-----		-----
(επιμήκυνση του DNA)	72 °C για 7 min		72 °C για 7 min



Εικόνα 2.1. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου PCR δύο σταδίων.

Οι δύο εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις PCR για το πλασμίδιο pT7-5 είναι:

LacZ (p/o) sense	5'- ATGATTACGGATTCACTGGCCGTC - 3'
Y _K (pT7-5) – His ₁₀ antisense	5'- GACGGGGAGTCAGGCAACTATGG - 3'

Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις PCR φαίνονται στους **Πίνακες 2 - 6**. Οι εκκινητές για μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης στην έλικα TM12 του XanQ (single – Cys mutants) και τη μεταφορά των αντίστοιχων μεταλλάξεων στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.2**, για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων της εκτεταμένης μεταλλαξιγένεσης της θέσης 432 του XanQ σε γενετικό υπόβαθρο ελεύθερο κυστεϊνών και φυσικού τύπου, καθώς και της μεταλλαξιγένεσης με πολύ συντηρημένα κατάλοιπα σε σημαντικές θέσεις της έλικας TM12, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.3**, για την κατασκευή των διπλών μεταλλαγμάτων του XanQ για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ της έλικας TM12 και της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή» NAT του XanQ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.4**. Οι εκκινητές για την κατασκευή των σημειακών μεταλλαγμάτων του YgfU στις θέσεις που διαφέρει από το XanQ, και του XanQ στις θέσεις που διαφέρει από το YgfU, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.5**.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer)
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- L420C- BAD	5'-CC/GAA/ATT/TTT/AAG/ATC/ TGC /CCA/GCC/TC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- P421C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- P421C- BAD	5'-C/GAA/ATT/TTC/AAG/ATC/CTG/ TGC /GCC/TCT/ATT/TAT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- A422C- BAD	5'-C/GAA/ATT/TTC/AAG/ATC/CTG/CCG/ TGC /TCT/ATT/TAT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- S423C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S423C- BAD	5'-G/CCA/GCC/ TGC /ATC/TAC/GTA/TTA/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I424C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I424C- BAD	5'-G/CCA/GCC/TCC/ TGC /TAT/GTA/TTA/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- Y425C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- Y425C- BAD	5'-CCA/GCC/TCT/ATC/ TGC /GTC/TTA/GTT-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- V426C- BAD	5'-CC/TCT/ATT/TAC/ TGC /CTG/GTC/GAA/AAC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- L427C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- L427C- BAD	5'-CC/TCT/ATT/TAC/GTC/ TGC /GTC/GAA/AAC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- V428C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- V428C- BAD	5'-CC/TCT/ATT/TAC/GTC/CTG/ TGT /GAA/AAC/CC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- E429C- BAD	5'-GTA/TTA/GTT/ TGC /AAC/CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- N430C- BAD	5'-GTA/TTA/GTT/GAA/ TGC /CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- P431C- BAD	5'-GTT/GAA/AAC/ TGC /ATC/TCT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432C- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ TGC /TCT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- C433- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ATT/ TGT /GCT/GGC/GG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- A434C- BAD	5'-AT/CGC/AGT/TAA/CCC/ACC/ ACA /AGA/AAT/AGG-3' (antisense)
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- G435C- BAD	5'-ATC/GCA/GTT/AAC/ ACA /AGC/AGA/AAT/AGG-3' (antisense)
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- G436C- BAD ή pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G436C- BAD	5'-CT/GCT/GGC/ TGC /TTA/ACT/GCG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- L437C- BAD	5'-CT/GCT/GGC/GGT/ TGT /ACT/GCG/ATT/T-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- T438C- BAD	5'-CT/GGC/GGG/CTG/ TGC /GCG/ATT/TTA/T-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- A439C- BAD	5'-GGC/GGG/TTA/ACT/ TGC /ATC/CTG/TTA/AAT/ATT/ATC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I440C- BAD	5'-T/GGC/GGG/TTA/ACT/GCG/ TGT /TTG/TTA/AAT/ATT/ATC/C-3'

pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- L441C- BAD	5'-T/GGC/GGG/TTA/ACT/GCG/ATT/ TGC /TTA/AAT/ATT/ATC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- L442C- BAD	5'-T/GGC/GGG/TTA/ACT/GCG/ATT/TTA/ TGC /AAT/ATT/ATC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- N443C- BAD	5'-T/GGC/GGG/TTA/ACT/GCG/ATT/TTA/TTG/ TGT /ATT/ATC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I444C- BAD	5'-GCG/ATT/TTA/CTG/AAT/ TGC /ATC/CTC/CCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I445C- BAD	5'-CG/ATT/TTA/CTG/AAT/ATC/ TGC /CTC/CCT/GG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- L446C- BAD	5'-CG/ATT/TTA/CTG/AAT/ATC/ATC/ TGC /CCT/GGT/GG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- P447C- BAD	5'-CG/ATT/TTA/CTG/AAT/ATT/ATC/CTC/ TGT /GGT/GGC/TAC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- G448C- BAD	5'-C/CTC/CCT/ TGT /GGT/TAC/CGA/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- G449C- BAD	5'-C/CTC/CCT/GGT/ TGT /TAC/CGA/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- Y450C- BAD	5'-CT/GGT/GGC/ TGT /CGA/CAG/GAA/AAC-3'

Πίνακας 2.2. Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του ελεύθερου κυστεϊνών (C-less) και του φυσικού τύπου(wt) *xanQ* με εισαγωγή νέων κωδικονίων κυστεϊνης σε επιλεγμένες θέσεις στην περιοχή της έλικας TM12 και οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων που εισάγουν την αλλαγή στη θέση του αμινοξέος με κυστεΐνη.

Ανασυνδρασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer)
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- P421G- BAD	5'-C/GAA/ATT/TTC/AAG/ATC/CTG/ GGT /GCC/TCT/ATT/TAT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- N430T- BAD	5'-GTA/TTA/GTC/GAG/ ACG /CCT/ATT/TGT/GCT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432F- BAD	5'-GAA/AAC/CCG/ TTC /TGT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432L- BAD	5'- GAA/AAC/CCT/ CTG /TGT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432M- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ ATG /TGT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432A- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ GCA /TGT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432Q- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ GAG /TGT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432S- BAD	5'- GAA/AAC/CCT/ TCG /TGT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432N- BAD	5'-GAA/AAC/CCG/ AAC /TGT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432Q- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ CAG /TGT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432T- BAD	5'- GAA/AAC/CCG/ ACC /TGT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- I432V- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ CTC /TGT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G436C- BAD	5'- GT/GCT/GGC/ TGC /TTA/ACT/GCG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432A- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ GCA /TCT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432L- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ CTG /TCT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432S- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ TCG /TCT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432F- BAD	5'-GAA/AAC/CCG/ TTC /TCT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432W- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ TGG /TCT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432Q- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ CAG /TCT/GCT/GGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)- I432M- BAD	5'-GAA/AAC/CCT/ ATG /TCT/GCT/GGC -3'

Πίνακας 2.3. Ανασυνδρασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του ελεύθερου κυστεϊνών (C-less) και του φυσικού τύπου(wt) *xanQ* με σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή της 12^{ης} έλικας και πιο ειδικά στη θέση 432, και οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων που εισάγουν την αλλαγή στη θέση του αμινοξέος.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Γενετικό υπόβαθρο	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer)
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-I432S/Q324E- BAD	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q324E- His ₁₀	5'- GAA/AAC/CCT/ TCG /TGT/GCT/GGC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-I432S/Q324N- BAD	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q324N- His ₁₀	
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-A323C/E429C- His ₁₀	pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-A323C- His ₁₀	5'-GTA/TTA/GTT/ TGC /AAC/CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-A323C/N430C- His ₁₀		5'-GTA/TTA/GTT/GAA/ TGC /CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-V339C/E429C- His ₁₀	pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-V339C- His ₁₀	5'-GTA/TTA/GTT/ TGC /AAC/CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-V339C/N430C- His ₁₀		5'-GTA/TTA/GTT/GAA/ TGC /CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-T332C/E429C- His ₁₀	pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-T332C- His ₁₀	5'-GTA/TTA/GTT/ TGC /AAC/CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (C-less)-T332C/N430C- His ₁₀		5'-GTA/TTA/GTT/GAA/ TGC /CCG/ATC/TCT/GCT/G-3'

Πίνακας 2.4. Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του ελεύθερου κυστεϊνών (C-less) και του φυσικού τύπου(wt) *xanQ* με διπλές μεταλλάξεις , το γενετικό υπόβαθρο το οποίο χρησιμοποιήθηκε και φέρει τη μια μετάλλαξη, και οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των διπλών μεταλλαγμάτων του *XanQ* για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ της 12^{ης} έλικας και της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή» NAT. Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι βάσεις που εισάγουν την αντίστοιχη αλλαγή κωδικονίου.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer)
pT7-5/ <i>ygfU</i> - H37K- BAD	5'-GGT/CTG/CAA/ <u>AAG</u> /GTC/CTT/GTC-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - H37L- BAD	5'-GGT/CTG/CAA/ <u>CTT</u> /GTC/CTT/GTC-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - H37N- BAD	5'-GGT/CTG/CAA/ <u>AAC</u> /GTC/CTT/GTC-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - T100A- BAD	5'-GTG/ATT/ATG/TCG/GTG/ <u>GCT</u> /TTT/GCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - T100S- BAD	5'-GTG/ATT/ATG/TCG/GTG/ <u>TCT</u> /TTC/GCT/GCT/G-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - T100N- BAD	5'-GTG/ATT/ATG/TCG/GTG/ <u>AAC</u> /TTC/GCT/GCT/G -3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - S256Q- BAD	5'-GAT/CCC/GTT/ <u>CAG</u> /ATT/CTG/ACC -3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - T259V- BAD	5'-CC/ATT/CTG/ <u>GTC</u> /ATG/ACT/GCC -3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - S271A- BAD	5'-G/TTT/ATC/GAG/ <u>GCC</u> /ATG/GGG/ATG -3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - M274D- BAD	5'-G/TCA/ATG/GGT/ <u>GAC</u> /TTC/CTG/GCA/C -3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - V282S- BAD	5'-GGT/GAA/ATC/ <u>AGC</u> /GGT/CGT/AAA/CTC -3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - V320N- BAD	5'- CT/CAA/AAC/ <u>AAC</u> /GGC/CTG/GTT/AG-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - R327G- BAD	5'- AGC/GTG/ACG/ <u>GGT</u> /GTT/CAT/AGC-3'
pT7-5/ <i>ygfU</i> - S426N- BAD	5'-CTG/CTA/CAT/ <u>AAC</u> /GGC/ATC/ATG/CTC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- Q258S- BAD	5'-GC/TTC/CAT/ <u>TCG</u> /TTC/CTG/GTG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- V261T- BAD	5'-CAT/CAG/TTC/CTG/ <u>ACT</u> /GTT/GGC/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- A273S- BAD	5'-GTG/CTG/GAA/ <u>AGT</u> /GTC/GGC/GAT/ATC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> O (wt)- S284V- BAD	5'-GCA/ATG/GTT/ <u>GTT</u> /CGC/CGA/CCC/ATT/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- N326V- BAD	5'-GCG/CAA/AAT/ <u>GTC</u> /GGG/GTT/ATT/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- N430S- BAD	5'-GTA/TTA/GTT/GAA/ <u>TCC</u> /CCG/ATC/TGT/GCT/G -3'

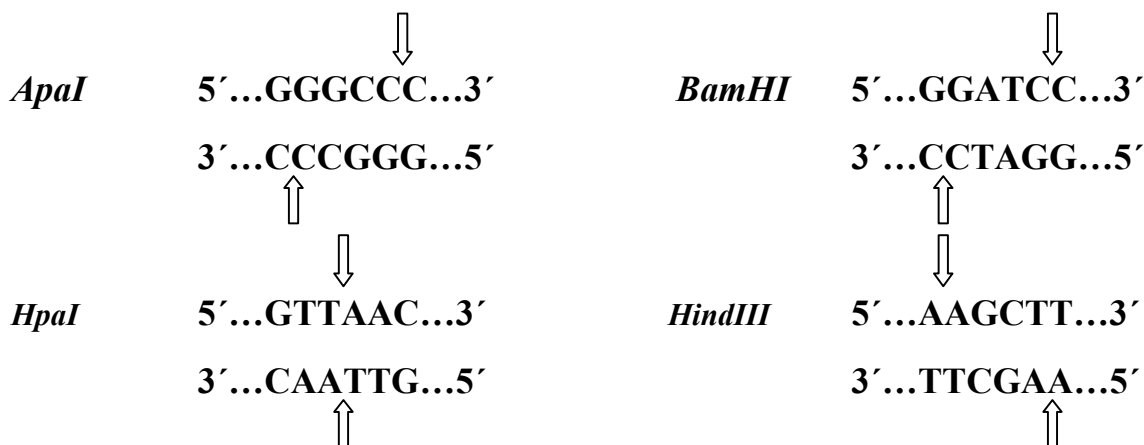
Πίνακας 2.5. Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες του φυσικού τύπου(wt) *xanQ* και του *ygfU* με σημειακές μεταλλάξεις σε σημαντικές θέσεις που οι δύο πρωτείνες διαφέρουν μεταξύ τους, και οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν. Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι βάσεις που εισάγουν την αντίστοιχη αλλαγή κωδικονίου.

2.4.3 Κατασκευή ανασυνδυσμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασυνδυασμός)

Οι πλασμιδιακοί φορείς και τα προς ένθεση DNA επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης με περιοριστικά ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον πλασμιδιακό φορέα όσο και στα ενθέματα.

Για την κατασκευή των ανασυνδυσμένων πλασμιδίων που φέρουν τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης, τις σημειακές μεταλλάξεις στις σημαντικές θέσεις του XanQ, τις σημειακές μεταλλάξεις στις σημαντικές θέσεις του YgfU και τα ομόλογα της οικογένειας NAT έγιναν περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα και *BamHI* και *ApaI*, τόσο στα ενθέματα (προϊόντα PCR) όσο και στους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς (pT7-5/*mely*-BAD, pT7-5/*ygfO*-His₁₀). Κατ'εξάιρεση, στις κατασκευές XanQ/single-Cys-A434C-BAD, XanQ/single-Cys-G435C-BAD έγιναν πέψεις με τα ένζυμα *BamHI* και *HpaI*, και στις κατασκευές XanQ/single-Cys-A439C-BAD, XanQ/single-Cys-I440C-BAD, XanQ/single-Cys-L441C-BAD, XanQ/single-Cys-L442C-BAD, XanQ/single-Cys-N443C-BAD έγιναν περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα *HpaI* και *HindIII*. Στον πλασμιδιακό φορέα (pT7-5/*xanQ/C-less*-His₁₀) έγιναν περιοριστικές πέψεις με τα ίδια ένζυμα ανάλογα με την περίπτωση. Στις συγκεκριμένες κατασκευές ακολουθούν επιπλέον περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα *BamHI* και *ApaI* για την ένθεση τους στο φορέα pT7-5/*mely*-BAD. Στην περίπτωση του *urpRutG*, έγινε στα ήδη κλωνοποιημένα *urp* και *RutG* πέψη μόνο με το *BamHI* και ακολουθήθηκε η κανονική διαδικασία.

Στις αντιδράσεις των πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων με αλκαλική φωσφατάση, για την αποφυγή ανεπιθύμητης ανασύνδεσης των ανοιχτών άκρων του φορέα πριν την αντίδραση με το ένθεμα. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης (1%), απομονώθηκαν και ανασυνδέθηκαν με τη χρήση T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση λιγάσης έγινε στους 16 °C, 15 h, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL, με μοριακή αναλογία στις ποσότητες ενθέματος και φορέα 3:1.



Εικόνα 2.2. Θέσεις αναγνώρισης αλληλουχίας για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν.

2.4.4 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Βλ. εδάφιο 2.4.1.

SOB

Εκχύλισμα ζύμης 0.5 % (w/v), Τρυπτόνη 2% (w/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM.

TB

Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM.

Κύτταρα από όλα τα κυτταρικά στελέχη *E. coli* προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Στα πειράματα αρχικού μετασχηματισμού των προϊόντων ανασυνδυασμού DNA (ligation products) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* Top10F'. Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (εδάφιο 2.4.5), για τα πειράματα έκφρασης-λειτουργικής ανάλυσης των μεταλλαγμάτων του XapQ, αλλά και των μελών της οικογένειας NAT χρησιμοποιήθηκαν τα *E. coli* T184 και XL1-blue, για τα πειράματα έκφρασης και ενεργότητας του MoorT χρησιμοποιήθηκαν τελικά τα *E. coli* XL1-blue, και τέλος δοκιμάστηκαν και όλα τα άλλα στελέχη που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3 για τον έλεγχο της βέλτιστης έκφρασης του YgfU.

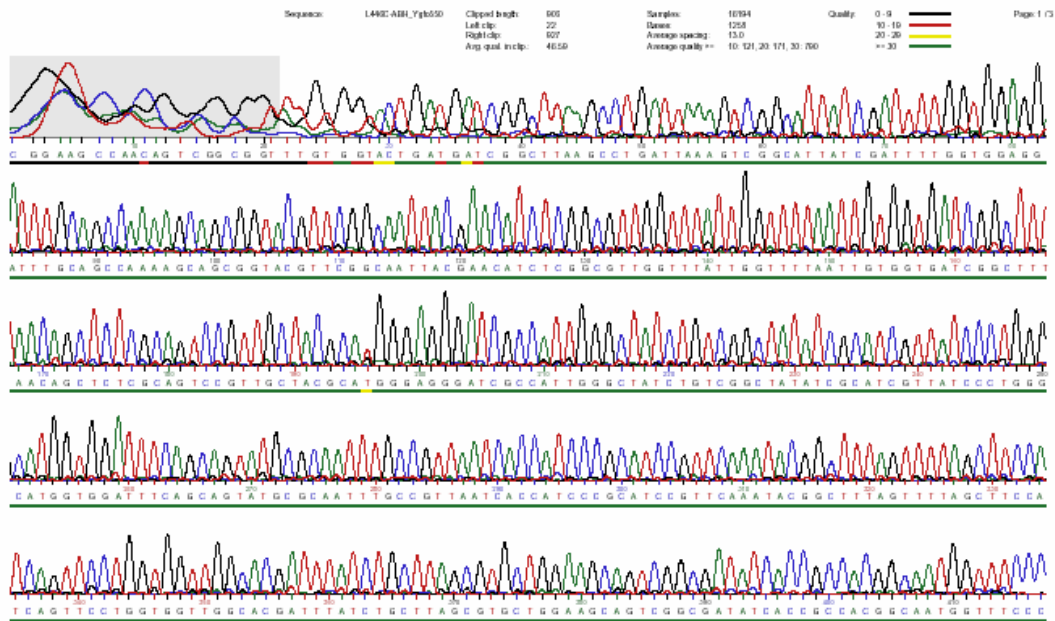
Συγκεκριμένα στην προετοιμασία των κυττάρων, αρχικά γίνεται καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB (10 mL) στους 37 °C για 16 h. Αν κάποιο κυτταρικό στέλεχος

έχει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (π.χ. T184 σε στρεπτομυκίνη) τότε η ανάπτυξη γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται 1/25 (τελικός όγκος 250 mL) σε θρεπτικό υλικό SOB (με ανάλογη παρουσία αντιβιοτικού αν είναι απαραίτητη). Ακολουθεί ανάπτυξη στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει 0.6. Τα κύτταρα αφήνονται για 10 min στον πάγο, συλλέγονται με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 10 min, 4 °C) και αραιώνονται σε 80 mL ψυχρού διαλύματος TB. Ακολούθως, αφήνονται εκ νέου σε πάγο για 10 min, φυγοκεντρούνται όπως ανωτέρω και επαναιωρούνται σε 20 mL διαλύματος TB που περιέχει 7% v/v διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO). Τα επιδεκτικά πλέον κύτταρα είναι έτοιμα να μετασχηματιστούν ή εναλλακτικά να αποθηκευτούν στους -80 °C.

2.4.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Επιδεκτικά κύτταρα που λαμβάνονται από τους - 80 °C αφήνονται να επανέλθουν αργά στον πάγο (0-4 °C). Στη συνέχεια, πλασμιδιακό DNA από προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης ή από απομόνωση DNA (mini ή maxi-prep) προστίθεται σε αυτά και ακολουθεί επώση για 5 min στον πάγο (0-4 °C). Τέλος, τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία προθερμασμένα στους 37 °C, με θρεπτικό μέσο επιλογής LB-άγαρ (1.5 %) που περιέχει αμπικιλίνη (100 µg/mL). Μονές αποικίες από την στερεή καλλιέργεια λαμβάνονται μετά από 16 h επώσης (37 °C) και αναπτύσσονται περαιτέρω, σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (2-3 mL), παρουσία αμπικιλίνης.

Στη συνέχεια, γίνεται απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του πακέτου απομόνωσης DNA Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany). Ακολουθεί έλεγχος αλληλούχισης (sequencing), προς επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις, σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας, από την εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Ακολουθεί εκ νέου μετασχηματισμός κυττάρων, συνήθως *E. coli* T184, με το (επιβεβαιωμένο πλέον) πλασμιδιακό DNA και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει 30% γλυκερόλη στους - 80 °C.



Εικόνα 2.3. Τμήμα της αλληλουχίας περμεάσης μοναδικής κυστεΐνης (L446C), όπως προκύπτει από τον αυτόματο αναλυτή αλληλούχησης της εταιρείας MWG.

2.5. Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων

2.5.1 Ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα (10 mL)

(για Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε αέραια κύτταρα)

Κύτταρα *E. coli* που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 3 mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL), αν πρόκειται για κύτταρα T184, ή μόνο αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) για τα υπόλοιπα στελέχη *E. coli*, για 16 h, στους 37 °C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται αραίωση σε LB (1 mL πλήρους καλλιέργειας + 9 mL νέου LB), πάλι παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, και ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 2 h (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης). Προστίθεται ισοπροπυλο-θειο- β ,D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM, για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για 2 h ακόμη.

2.5.2 Ανάπτυξη σε μεγάλη κλίμακα (1 L)

(για Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων)

Κύτταρα *E. coli* T184 ή XL1-blue που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/mL), και, στην περίπτωση των T184, αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL), στις ίδιες συνθήκες όπως στη μικρή κλίμακα. Κατόπιν, γίνεται αραίωση σε LB δύο δοχεία (5 mL πλήρους καλλιέργειας + 495 mL νέου LB) και ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 3.5 h (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης), προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM για την επαγωγή της έκφρασης του XanQ, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για 2.5 h ακόμη.

2.6. Δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assays)

2.6.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα KPi (pH 7.5)

KH₂PO₄/ K₂HPO₄ 0.1 M.

Διάλυμα τερματισμού (pH 5.5)

KPi 0.1 M, LiCl 0.1 M.

Υγρό σπινθηρισμού (scintillation buffer)

Τολουόλιο 66% (v/v), Triton-X 33% (v/v), 2,5-διφαινυλ-οξαζολη (PPO) 4% (w/v), 1,4-δισ(5-φαινυλοξαζολ-2-υλ)βενζόλιο (POPOP) 0.04% (w/v).

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αφού αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα, δηλ. 10 mL καλλιέργειας). Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 6000 rpm στους 4 °C για 10 min, εκπλένονται δυο φορές με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi. Η τελική επαναϊώρηση των κυττάρων γίνεται σε 1mL του ίδιου διαλύματος και ακολούθως οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ομαλοποιούνται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD420) και προσθήκη του κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος έτσι ώστε η τελική τιμή της OD420 να ισούται με 10. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL βάσει αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς. (Frillingos *et al.*, 1994; Karatza and Frillingos, 2004). Η προετοιμασία αυτή των κυττάρων γίνεται για κάθε τύπο διαμεμβρανικής μεταφοράς (κινητική ανάλυση, παρουσία ανταγωνιστών, επίδραση NEM, επίδραση CaCl).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (18 Ci/mmol), [³H]ουρακίλης (59 Ci/mmol) (τελική συγκέντρωση 0,1μM ως 250μM), ή [¹⁴C]ουρικού οξέος (50 mCi/mmol) (τελική συγκέντρωση 50μM ως 1mM) πραγματοποιήθηκε σε 50 μL κυττάρων, στους 25 °C (37 °C για την ξανθίνη στο YgfU), για διάφορους χρόνους (5 sec ως 15 min) (Karatza and Frillingos 2005). Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με 2X3 mL διαλύματος τερματισμού με ταχεία διήθηση (rapid filtration) υπό κενό σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm (Frillingos *et al.*, 1994). Ο ηθμός μεταφέρθηκε σε κατάλληλα σωληνάρια (scintillation vials) και επώαστηκε για 24 ώρες σε υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid), (8 mL), για να απελευθερωθεί στο διάλυμα η παγιδευμένη ραδιενέργεια. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter) του

Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος και του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής.

2.6.1.1 Ανάλυση κινητικής

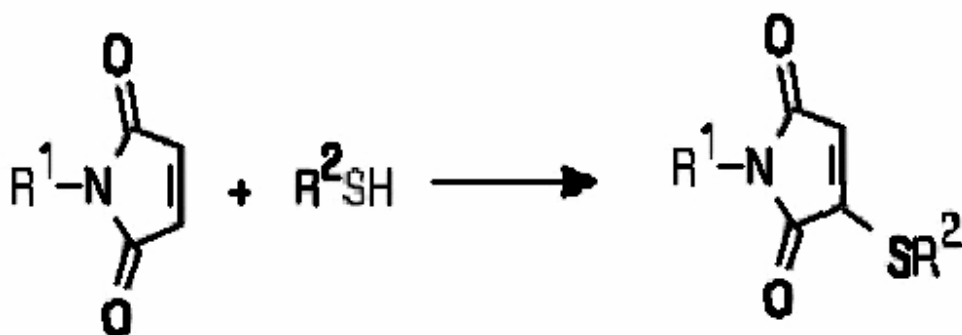
Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης, στην περίπτωση της ανάλυσης κινητικής πρόσληψης ξανθίνης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης των υποστρώματων μετρείται στα 5 και 10 sec και οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιούνται είναι από 0.1 μM έως 100 μM , για τα μεταλλάγματα του XanQ και τα ομόλογα, και μετρείται στα 5, 10 και 20 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος από 40 μM έως 250 μM για το YgfU και τα μεταλλάγματα του. Στην περίπτωση της ανάλυσης κινητικής πρόσληψης ουρικού οξέος, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης των υποστρώματων μετρείται στα 10, 20 και 30 sec και οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιούνται είναι από 50 μM έως 1mM. Οι V_{\max} και K_m εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 4* (<http://www.graphpad.com/>).

2.6.1.2 Πρόσληψη ξανθίνης παρουσία ανταγωνιστών

Στα πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης ξανθίνης, πραγματοποιείται προεπάση των κυττάρων με μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (0.1 μM έως 1 mM) για 5 min και στη συνέχεια δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς με [^3H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρούνται στα 5 και 10 min και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) υπολογίζονται με το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 4*. Οι τιμές K_i που δίδονται προκύπτουν από την εφαρμογή του τύπου των Cheng and Prusoff (1973) [$K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$] (όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H]ξανθίνης). Οι μη σημασμένοι πιθανοί προσδέτες που χρησιμοποιούνται είναι ξανθίνη, ουρικό οξύ, υποξανθίνη, ουρακίλη, γουανίνη, αδενίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη, 1-μεθυλοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη.

2.6.1.3 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM

Στα πειράματα επίδρασης *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) (**Εικόνα 2.3**) στην ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης, τα κύτταρα προεπωάζονται με διάφορες συγκεντρώσεις NEM (5 μ M έως 2 mM) για 10 min στους 25 °C και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διθειοθρεϊτόλης (DTT) (10X μοριακή συγκέντρωση έναντι του μηλεϊμιδίου). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης γίνεται με την παρουσία μεθοσουλφονικού φαινιζινίου (phenazine methosulfate, PMS, 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971; Karatza and Frillingos, 2005).



Εικόνα 2.4. Αντίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) με τις SH-ομάδες των κυστεϊνών (από Molecular Probes, www.probes.invitrogen.com).

2.6.1.4 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM παρουσία ή απουσία μη ραδιενεργού προσοδέτη (ανταγωνιστή)

Προετοιμάζονται κυτταρικά δείγματα με ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL (βλ. ανωτέρω). Στη συνέχεια χωρίζονται 4 δείγματα των 500 μ L κυτταρικού εναιωρήματος: στα δύο από αυτά προστίθεται ο μη ραδιενεργός ανταγωνιστής τελικής συγκέντρωσης 1 mM και στα άλλα δύο KOH σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Τα δείγματα προεπωάζονται για 10 min, στους 25 °C, και, στη συνέχεια, προστίθεται NEM σε τελική συγκέντρωση από 20 μ M έως 1 mM, ανάλογα με το μετάλλαγμα και την επιθυμητή εφαρμογή (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008). Η αντίδραση του NEM τερματίζεται με την προσθήκη 10X μοριακής συγκέντρωσης DTT έναντι του NEM. Στη συνέχεια για την απομάκρυνση από το κάθε δείγμα της περίσσειας του ανταγωνιστή και των NEM και DTT γίνεται αραίωση σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος KP_i (0.1 M, pH 7.5) και φυγοκεντρική

ανάκτηση των κυττάρων (6000 rpm, 10 min, 4°C). Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 40 mL του ίδιου διαλύματος και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4°C). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, τοποθετείται σε μικροσωληνάρια τύπου erppendorf και ακολουθούν τρεις φυγοκεντρήσεις σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erppendorf (13000 rpm, 1 min). Η τελική επαναιώρηση γίνεται σε 0.6 mL. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 420 nm και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ομαλοποιείται ώστε η τιμή απορρόφησης OD₄₂₀ να είναι 10. Ακολουθεί δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς, με την επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα να γίνεται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS, 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Konings *et al.*, 1971; Mermelekas *et al.*, 2010).

2.6.1.5 Επίδραση χλωριούχου καδμίου (CdCl₂)

Για τα πειράματα της επίδρασης του χλωριούχου καδμίου (CdCl₂) (Broke *et al.*, 2001), γίνεται προεπώαση 50 µl κυτταρικού δείγματος με ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL, με διάφορες συγκεντρώσεις CdCl₂ (1 µM έως 20 mM) στους 25 °C, 10 min, και ακολουθεί δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης 1µM παρουσία του CdCl₂. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης μετρείται στα 5 και 10 sec. Τα αποτελέσματα αναλύονται με το πρόγραμμα *Prism4*.

2.6.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay) σε μεμβρανικά κυστίδια

Τα μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out, RSO) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς εφόσον έχουν ακέραιη την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη των αρχικών κυττάρων, όπου εκφράζεται ο εξεταζόμενος μεταφορέας ή μεταλλάγματά του και, παράλληλα, έχουν ακέραιη την συσκευή της αναπνευστικής αλυσίδας στο εσωτερικό αυτής της μεμβράνης. Για να γίνει δοκιμασία ενεργού μεταφοράς (active transport assay) σε κυστίδια RSO για μεταφορείς δευτερογενούς τύπου, που εξαρτώνται από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων, όπως είναι και ο XanQ (Karatzas and Frillingos, 2005), απαιτείται ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας, με τεχνητούς δότες ηλεκτρονίων υπό συνθήκες καλής οξυγόνωσης (Konings *et al.*, 1971). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή είναι η εξής:

Διάλυμα μεμβρανικών κυστιδίων (για την παρασκευή των κυστιδίων, βλ. παρακάτω), που λαμβάνονται από καταψύκτη (-80 °C), αραιώνεται 10 φορές σε διάλυμα 0.1 M KPi pH 7.5, 10 mM MgSO₄. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [8-³H]ξανθίνης (18 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μM) σε 50 μL κυστιδίων για διάφορους χρόνους (5 sec ως 2 min). Η υπόλοιπη διαδικασία είναι όπως στα ακέραια κύτταρα με τη διαφορά ότι στην περίπτωση των κυστιδίων η διαδικασία γίνεται πάντοτε παρουσία μεθοσουλφονικού φαινιζινίου (PMS, 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), τα οποία χρησιμοποιούνται ως τεχνητοί δότες ηλεκτρονίων (e⁻) για την ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας στο σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Konings *et al.*, 1971).

2.7. Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Διαλύματα

Διάλυμα επαναιώρησης

Tris-HCl, pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, Na₂EDTA 1 mM.

Διάλυμα σακχαρόζης

Tris-HCl, pH 8 25 mM, Σακχαρόζη 45% (w/v), Na₂EDTA 1 mM.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την παρασκευή κλάσματος μεμβρανών από την εσωτερική μεμβράνη κυττάρων *E. coli* περιλαμβάνει οσμωτικό σοκ, επώαση με EDTA/λυσοζύμη και κατεργασία με υπερήχους (Konings *et al.* 1971 ; Frillingos *et al.* 1994). Αναλυτικότερα, μετά την ανάπτυξη των κυττάρων σε μικρή κλίμακα, συλλέγονται με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4°C) και επαναιωρούνται σε 10 mL διαλύματος επαναιώρησης. Μετά από νέα φυγοκέντρηση γίνεται επαναιώρηση σε 1 mL του ίδιου διαλύματος (το οποίο περιέχει και αναστολείς πρωτεασών...) και φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erppendorf (13000 rpm, 5 min). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος σακχαρόζης (επίσης με αναστολείς πρωτεασών). Ακολουθεί επώαση στους 4 °C για 20 min, συλλογή του κυτταρικού ιζήματος, όπως παραπάνω, και επαναιώρηση σε 0.8 mL ddH₂O και επώαση στους 4 °C για 10 min. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη λυσοζύμης (0.125 mg/mL τελική συγκέντρωση) και επώαση στους 4 °C για 30 min. Στη συνέχεια γίνεται ομοιογενοποίηση του κυτταρολύματος με υπερήχους (συσκευή 250-D της Branson Ultrasonics), όπου εφαρμόζονται 2 ώσεις των 15 sec σε ένταση 40%. Μετά από φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erppendorf (13000 rpm, 5 min) για την απομάκρυνση των άθραυστων κυττάρων (cell debris), ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση (Optima Ultracentrifuge, 90000 rpm, 20 min, 4 °C) όπου συλλέγεται το ίζημα των μεμβρανών. Το κλάσμα των μεμβρανών επαναδιαλυτοποιείται σε 40 µL ddH₂O και φυλάσσεται στους 4 °C, για ηλεκτροφορητική ανάλυση και ανοσοαποτύπωση μέσα στα επόμενα 24ωρα.

2.8. Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.8.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης έγινε με βάση το πρωτόκολλο του πακέτου BCA Protein Assay Reagent kit (της Pierce). Το πρωτόκολλο βασίζεται στο συνδυασμό της αναγωγής του Cu^{2+} σε Cu^+ σε αλκαλικό περιβάλλον, με την υψηλής ευαισθησίας χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού (Cu^+), σε μήκος κύματος 562 nm, χρησιμοποιώντας δις-κιγχνικό οξύ (bichichonic acid). οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων υπολογίζονται από καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης.

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Διαλύματα

Διάλυμα διαχωρισμού pH 8.8

Tris-HCl 1.5 M, SDS 0.4% (w/v).

Διάλυμα επιστοιβάξης pH 6.8

Tris-HCl 0.5 M, SDS 0.4% (w/v).

30% Ακετυλαμίδιο/Bis 37.5:1 (Biorad)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Tris-HCl, pH 8.3 25 mM, Γλυκίνη 0.192 M, SDS 0.1% (w/v).

10% (w/v) Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (APS)

Διάλυμα φόρτωσης 4X

Tris-HCl pH 6.8 250 mM, SDS 9.2 % (w/v), Μπλε της βρωμοφαινόλης 0.2 % (w/v), Γλυκερόλη 40% (v/v), DTT 100 mM.

Πήκτωμα διαχωρισμού (100 mL)

30% ακρυλαμίδιο 42 mL, Διάλυμα διαχωρισμού 25mL, dH₂O 32 mL, 10% SDS 1 mL, 10% APS 1 mL, TEMED 0.05 mL.

Πήκτωμα επιστοίβαξης (30 mL)

30% ακρυλαμίδιο 4.5 mL, Διάλυμα διαχωρισμού 7.5 mL, dH₂O 17.4 mL, 10% SDS 0.3 mL, 10% APS 0.3 mL, TEMED 0.03 mL.

Για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθείται η κλασική διαδικασία όπως περιγράφεται από τον Laemmli (1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πήκτώματα 12% (w/v), ως πήκτωμα διαχωρισμού (running gel), και 5% (w/v) ως πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel). Πριν από την ηλεκτροφόρηση, προστέθηκε στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) από διάλυμα 4x. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι η Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Ως δείκτης πρότυπων μοριακών βαρών χρησιμοποιείται ο Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, της εταιρείας Bio-Rad Laboratories.

2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διαλύματα

Διάλυμα μεταφοράς

Tris-HCl pH 8.3 25 mM, Γλυκίνη 192 mM, Μεθανόλη 20% (v/v).

Διάλυμα Western TBST 10X

Tris-HCl pH 7.4 0.1 mM, NaCl 1.5 M, Triton-X 2% (v/v).

Μετά τον διαχωρισμό ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri) σε διάλυμα μεταφοράς, για 4 h στα 400 mA. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται για 16 h σε διάλυμα TBST-5% αλβουμίνης ορού βοός (BSA) (blocking buffer) για τη δέσμευση των κενών θέσεων.

Στη συνέχεια ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με τα εξής αντισώματα ή πρωτεΐνες:

- Επώαση με αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των 10 ιστιδινών συζευγμένο με υπεροξειδάση (anti-PentaHis-HRP) σε αραιώση 1:5000 σε TBST-5% BSA για 1 h, γίνονται 6 εκπλύσεις με 1X TBST και στη συνέχεια ανίχνευση του σήματος.
- Επώαση με σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 σε TBST-5% BSA για 1 h και στη συνέχεια 8 εκπλύσεις με 1X TBST.

2.9. Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)

Διαλύματα (αρχικές συγκεντρώσεις)

1 M KP_i pH 6.6, 1M $MgSO_4$, 0.5 M K_2EDTA pH 7.0, 30% σακχαρόζη (w/v), 1 M Tris-HCl pH 8

Τα μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out, RSO) αποτελούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για την μελέτη μεμβρανικών πρωτεϊνών *in situ*. Στην ουσία πρόκειται για βακτηριακά κύτταρα στα οποία έχει αφαιρεθεί αφενός το κυτταρικό τοίχωμα και η εξωτερική μεμβράνη, και αφετέρου τα εσωτερικά συστατικά του κυτταροπλάσματος, διατηρώντας στο ακέραιο την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη (Kaback, 1974; Konings *et al.*, 1971). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο μας αποτελεί προσαρμογή γνωστών πρωτοκόλλων απομόνωσης κυστιδίων (Kaback, 1971; Frillingos and Kaback, 1996), όπως παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω (Γ. Μερμελέκας, 2009, Διδακτορική διατριβή) :

- Γίνεται ανάπτυξη κυττάρων *E.coli*, των στελεχών T184 και XL1-blue σε μεγάλη κλίμακα
- Στη συνέχεια συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4°C, Beckmann JA-14)
- Γίνεται έκπλυση με διάλυμα 0.1 M KP_i pH 6.6 και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4 °C, Beckmann JA-14).
- Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα 30 mM Tris-HCl pH 8, 30% σακχαρόζη σε αναλογία 100 mL διαλύματος/ g κυττάρων.
- Στη συνέχεια προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και K_2EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM, ακολουθεί αργή ανάδευση για 1 h.
- Για τη συλλογή του προϊόντος της κυτταρικής λύσης γίνεται φυγοκέντρηση (6000 rpm, 30 min, 25 °C, Beckmann JA-14)
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 10 mL διαλύματος 0,1 M KP_i pH 6.6, 20 mM $MgSO_4$, 30% σουκρόζη, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNAase. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε 1000 mL προθερμασμένου (37°C) 50 mM KP_i pH 6.6 και επωάζεται υπό ανάδευση για 15 min στους 37 °C.
- Προσθήκη K_2EDTA pH 7.0 σε τελική συγκέντρωση 10 mM συνεχίζεται η επώαση για άλλα 15 min και στη συνέχεια προστίθεται $MgSO_4$ σε τελική συγκέντρωση 15 mM για ακόμη 15 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (8500 rpm, 1 h, 4 °C, Beckmann JA-14)

- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 88 mL παγωμένου διαλύματος 0,1 M KP_i pH 6.6, 10 mM K_2EDTA .
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2500 rpm, 30 min , 4 °C, Beckmann JA-20)
- Συλλέγεται το υπερκείμενο, και το ίζημα αναδιαλύεται σε 44 mL διαλύματος 0,1 M KP_i pH 6.6, 10 mM K_2EDTA και γίνεται νέα φυγοκέντρηση (2500 rpm, 30 min , 4 °C, Beckmann JA-20), συλλέγεται πάλι το υπερκείμενο.
- Φυγοκέντρηση των υπερκειμένων για τη συλλογή των μεμβρανικών κυστιδίων (15000 rpm, 30 min , 4 °C, Beckmann JA-20).
- Το ίζημα, που περιέχει τα μεμβρανικά κυστίδια, αναδιαλύεται σε 44 mL διαλύματος 0.1 M KP_i pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$ και νέα φυγοκέντρηση (15000 rpm, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-20).
- Το τελικό ίζημα των κυστιδίων διαλυτοποιείται σε 500 μL διαλύματος 0.1 M KP_i pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$ και φυλασσονται στους -80 °C αφού πρώτα καταψυχθούν σε υγρό άζωτο.
- Ακολουθεί μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA (εδάφιο 2.7.1)

2.10. *In silico* αναλύσεις

Η ανάλυση γονιδιωμάτων για την ύπαρξη γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 βασίζεται στις βάσεις δεδομένων TransportDB (<http://www.membranetransport.org>) TC-DB (<http://www.tcdb.org>) και COGs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), καθώς και στις πλήρεις αλληλουχίες γονιδιώματος μικροοργανισμών που καταγράφονται από το Joint Genome Institute (Walnut Creek, California) (Markowitz *et al.*, 2008) (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>).

Για τα ομόλογα YgfO και YicE (Karatza and Frillingos, 2005), χρησιμοποιούνται οι νεότερες ονοματολογίες XanQ και XanP, αντίστοιχα, όπως αναφέρονται σήμερα με βάση τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών αυτών και τη φυλογενετική τους ανάλυση, στην ηλεκτρονική τράπεζα EcoGene (The EcoGene database of *E. coli* sequence and function, www.ecogene.org).

Για την κατασκευή του τοπολογικού μοντέλου του YgfU χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) (Granseth *et al.*, 2005).

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων των γονιδίων NAT/NCS2 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA 3.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (<http://www.megasoftware.net/>), ενώ οι αναλύσεις στοίχισης των κωδικοποιουσών αλληλουχιών των γονιδίων έγιναν με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Σχέσεις δομής-λειτουργίας του μεταφορέα ξανθίνης XanQ: Ο ρόλος του δωδέκατου διαμεμβρανικού τμήματος (TM12, αλληλουχία 419-450)

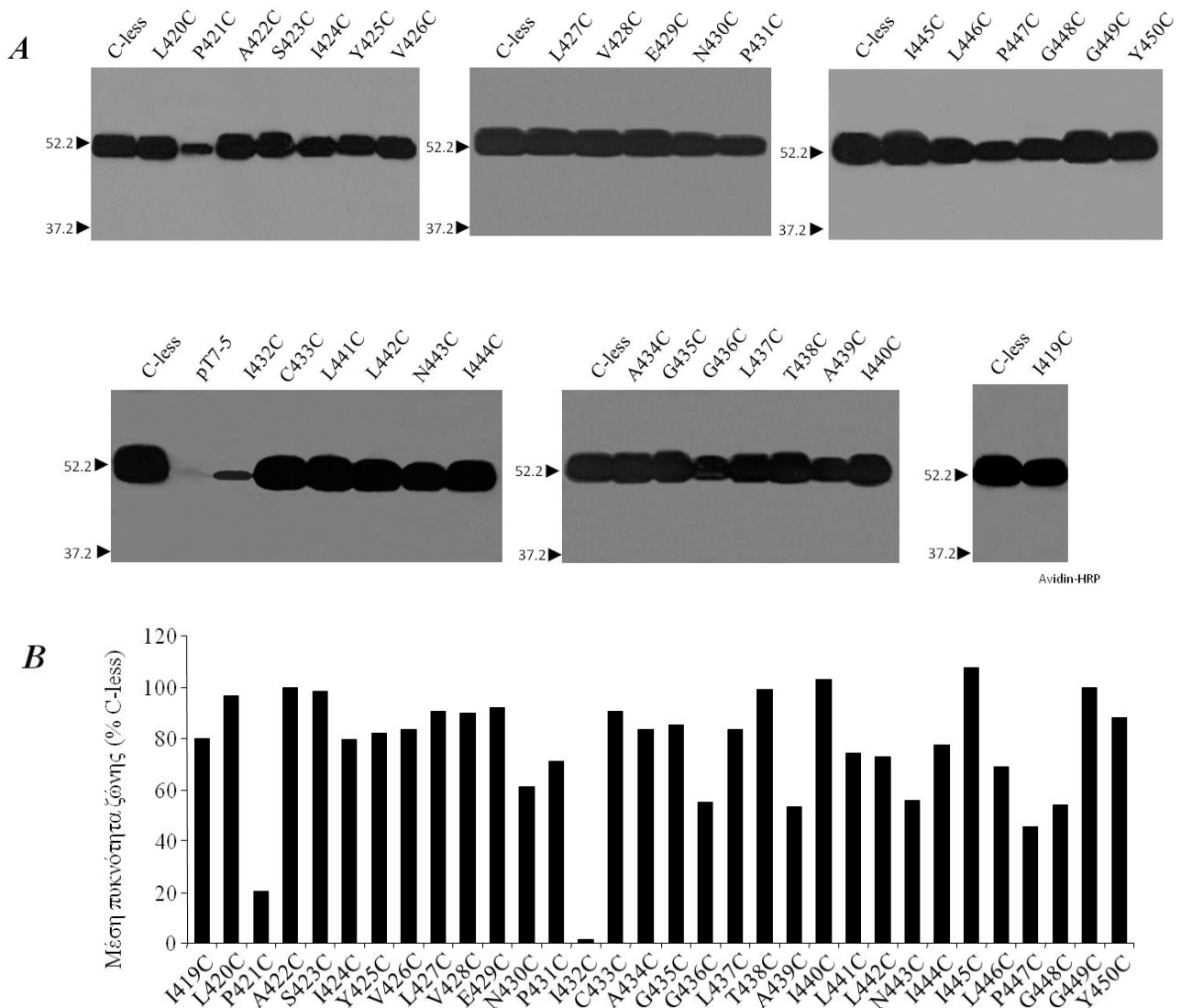
Το έναυσμα για τη μελέτη αυτή δόθηκε από τα αποτελέσματα της συνεργαζόμενης ομάδας του Γ. Διαλλινά (Τομέας Βοτανικής, ΕΚΠΑ) για το δωδέκατο διαμεμβρανικό τμήμα (TM12) του μεταφορέα ουρικού οξέος/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*. Για τον μεταφορέα αυτόν είχε προταθεί ότι περιέχει ένα είδος μοριακού φίλτρου στο μέσο του TM12, μια φαινυλαλανίνη (Phe) στη θέση 528, που καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την εξειδίκευση των μεταφερομένων υποστρωμάτων χωρίς όμως να αποτελεί μέρος του κέντρου δέσμησης *per se*, και ότι αντικατάσταση της Thr-526 που βρίσκεται στην ίδια πλευρά α-έλικας οδηγεί σε «χαλάρωση» της εξειδίκευσης του μεταφορέα UapA χωρίς να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008). Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι ενώ η έλικα TM12 στην οικογένεια NAT δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη (βλ. Εισαγωγή), περιέχει μια κεντρική αλληλουχία τριών καταλοίπων, ενός πολικού (Asn/Thr/Ser), ενός αμινοξέος που προσδίδει δομική ευκαμψία ή προκαλεί κάμψη της έλικας (Gly/Pro) και ενός ογκώδους υδρόφοβου (Phe/Ile), όπου ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας συντηρείται.

Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα από την κατασκευή χμιαρικού μεταφορέα που περιέχει τις 11 πρώτες έλικες του XanQ και την δωδέκατη του UapA (N11-C1), ο οποίος εμφανίζει κανονική έκφραση στη μεμβράνη αλλά καθόλου ενεργότητα, υποδηλώνουν ότι η έλικα TM12 του XanQ μπορεί να περιέχει σημαντικά κατάλοιπα (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή – υπό συγγραφή). Για τους λόγους αυτούς, η έλικα TM12 επελέγη ως στόχος μεταλλαξιγένεσης για εισαγωγή νέων καταλοίπων Cys στο γενετικό υπόβαθρο μιας λειτουργικής περμεάσης XanQ ελεύθερης κυστεϊνών (C-less), η οποία έχει ήδη κατασκευασθεί στο εργαστήριό μας από προηγούμενες μελέτες (Karatza *et al.*, 2006).

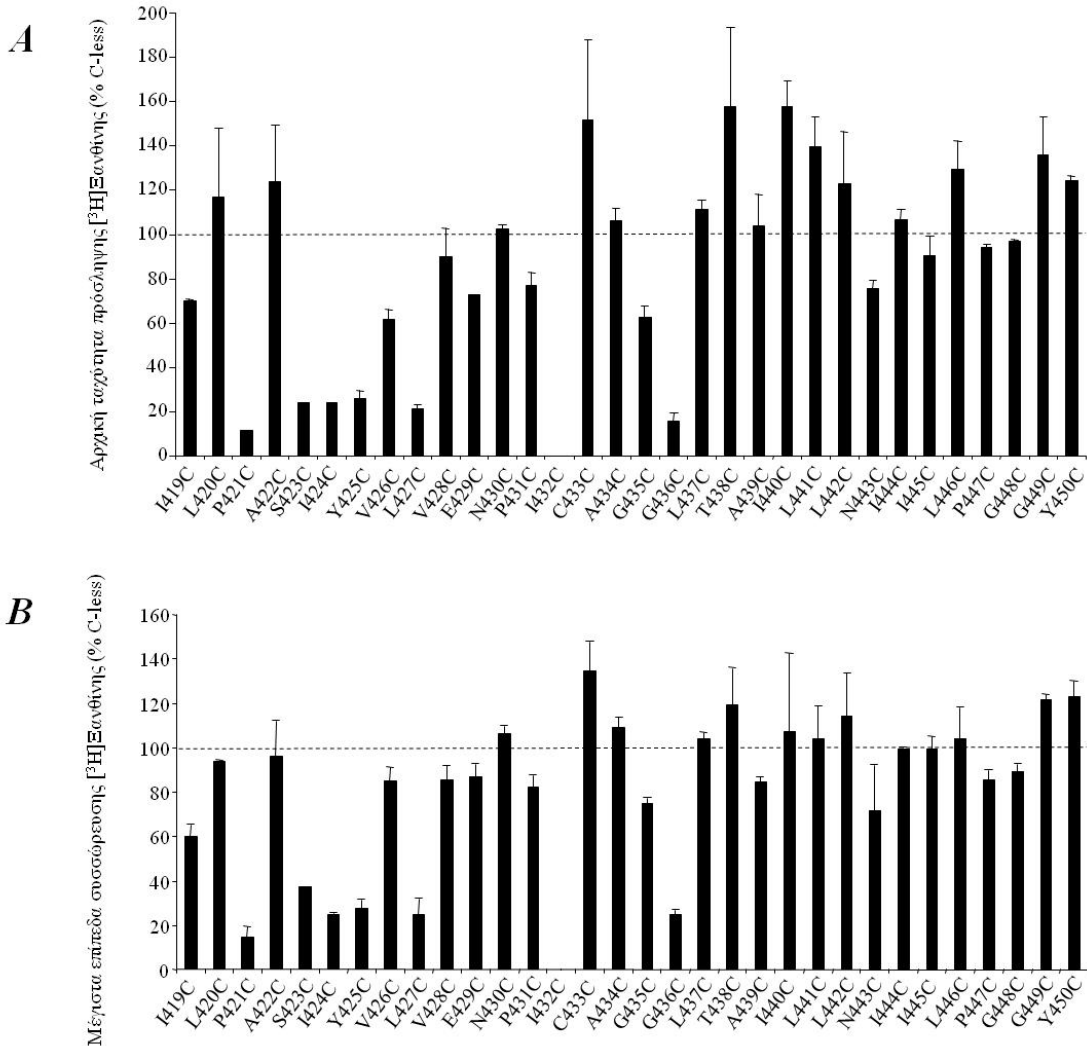
3.1.1. Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στη διαμεμβρανική έλικα TM12

Χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο την περμεάση χωρίς εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών (C-less XanQ), κατασκευάστηκαν 32 μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης (single-Cys mutants), δηλαδή κάθε αμινοξύ στην αλληλουχία ⁴¹⁹ILPASIYVLVENPICAGGLTAILLNIIPLPGGY⁴⁵⁰ (υπογραμμισμένη φαίνεται η αλληλουχία της έλικας) αντικαταστάθηκε ξεχωριστά με Cys. Όλες αυτές οι περμεάσες φέρουν επίσης στο C-τελικό άκρο το 12πεπτίδιο της LacY (LacY-epitope) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης από την αποκαρβοξυλάση οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (biotin-acceptor domain, BAD) (Karatza and Frillingos, 2005).

Τα επίπεδα έκφρασης των 32 μεταλλαγμάτων φαίνονται στην **Εικόνα 3.1** και τα επίπεδα ενεργότητάς τους στην **Εικόνα 3.2**. Οι περμεάσες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων *E. coli* T184, εκτός από τις P421C και I432C, οι οποίες έχουν ελάχιστη έως μηδενική έκφραση. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM). Από τις 32 περμεάσες, οι 25 εμφανίζουν αρχική ταχύτητα μεγαλύτερη από 60% σε σχέση με τη C-less XanQ, με μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης μεγαλύτερα του 70%. Οι υπόλοιπες 7 περμεάσες έχουν επίπεδα αρχικής ταχύτητας και μέγιστης πρόσληψης υποστρώματος χαμηλότερα του 25%. Από αυτές, οι έξι (P421C, S423C, I424C, Y425C, L427C, G436C) εμφανίζουν ενεργότητα από 11% έως 25% σε σχέση με την C-less XanQ, ενώ η ενεργότητα της I432C είναι σχεδόν μηδενική. Για τις περμεάσες P421C και I432C η χαμηλή ενεργότητα συσχετίζεται και με τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης.



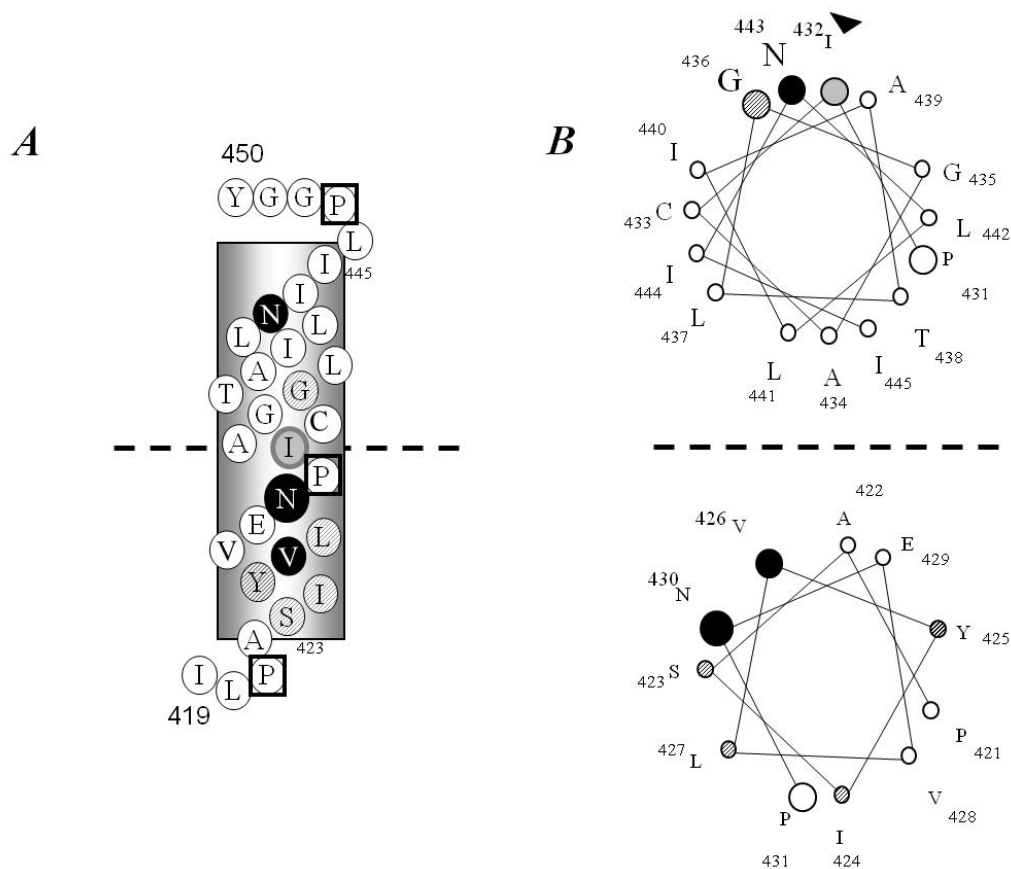
Εικόνα 3.1. Ανάλυση της έκφρασης μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης της έλικας TM12 του XanQ στη μεμβράνη της *E. coli*. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με pT7-5/*xanQ*(*Cys-less*)-*BAD* ή pT7-5/*xanQ*(*single-Cys*)-*BAD* που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών. Δείγματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (Avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). **(A) Εικόνες των western.** Κύτταρα μετασχηματισμένα μόνο με το pT7-5 δεν παρουσιάζουν έκφραση της περμεάσης στη μεμβράνη. Στο αριστερό μέρος των ηλεκτροφορημάτων σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). **(B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης στη μεμβράνη.** Τα επίπεδα έκφρασης για κάθε μετάλλαγμα δίνονται ως ποσοστά % επί του αντίστοιχου επιπέδου του XanQ (*C-less*)-*BAD*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 4 προσδιορισμών από 2 ανεξάρτητα πειράματα, με τυπικές αποκλίσεις <15%. Ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων και ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης έγινε με το πρόγραμμα Quantity-one (BioRad).



Εικόνα 3.2. Ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης της έλικας TM12 του XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια *pT7-5/xanQ (Cys-less)-BAD* ή *pT7-5/xanQ (single-Cys)-BAD* συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. **(A) Αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης (V₀).** Η ταχύτητα πρόσληψης μετρήθηκε σε χρόνους 15 sec και 30 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της XanQ (C-less)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. **(B) Μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state).** Τα επίπεδα ξανθίνης μετρήθηκαν σε χρόνους 2 min και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ (C-less)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.1.2. Ανάλυση μεταλλαγμάτων της έλικας TM12 στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου

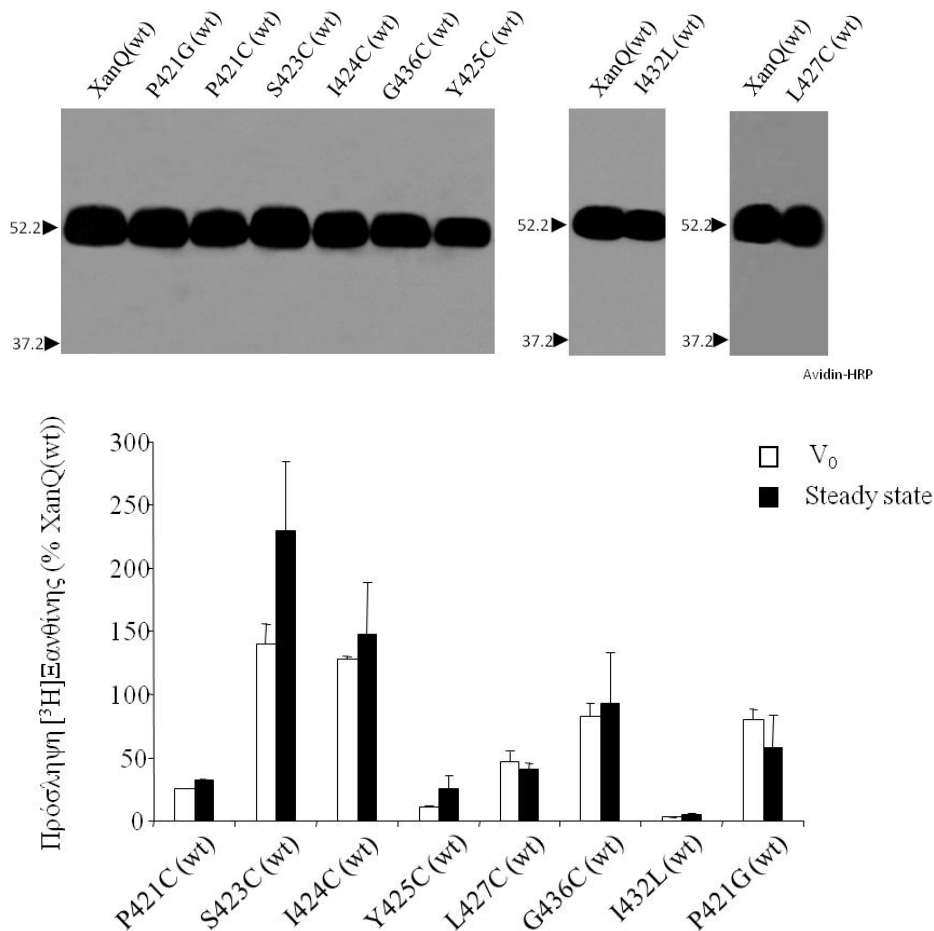
Από τη σάρωση μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνών προέκυψαν σημαντικές θέσεις καταλοίπων οι οποίες συγκεντρώνονται κυρίως στην περιπλασμική πλευρά της α-έλικας (**Εικόνα 3.3**).



Εικόνα 3.3. Δευτεροταγής δομή της πιθανής διαμεμβρανικής έλικας TM12 του XanQ (*A*) και προβολές α-έλικας (*B*) για την αλληλουχία των καταλοίπων 431-447 (*πάνω*) και 421-436 (*κάτω*). Τα τρία κατάλοιπα προλίνης (Pro-421, Pro-431 και Pro-447) τονίζονται μέσα σε τετράγωνα. Τα κατάλοιπα Pro-421, Ser-423, Ile-424, Tyr-425, Leu-427 και Gly-436 όπου τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης έχουν χαμηλή ενεργότητα (20-30% σε σχέση με τον φυσικό τύπο) φαίνονται σε γκρι φόντο. Σε γκρι φόντο φαίνεται και το Ile-432 (στη μέση του TM12) όπου το μετάλλαγμα μοναδικής κυστεϊνης εμφάνιζε σχεδόν μηδενική έκφραση στη μεμβράνη. Υπάρχουν επίσης τρεις θέσεις όπου τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το NEM, όπως δείχνουμε παρακάτω (εδάφιο 3.1.6): αυτά φαίνονται σε σκούρο φόντο (Val-426, Asn-430, και Asn-443).

Οι θέσεις αυτές μελετήθηκαν περαιτέρω με μεταφορά των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης σε γενετικό υπόβαθρο φυσικού τύπου και την εισαγωγή των πιο συντηρητικών κατά το δυνατόν μεταλλαγών (**Εικόνα 3.4**). Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν τα

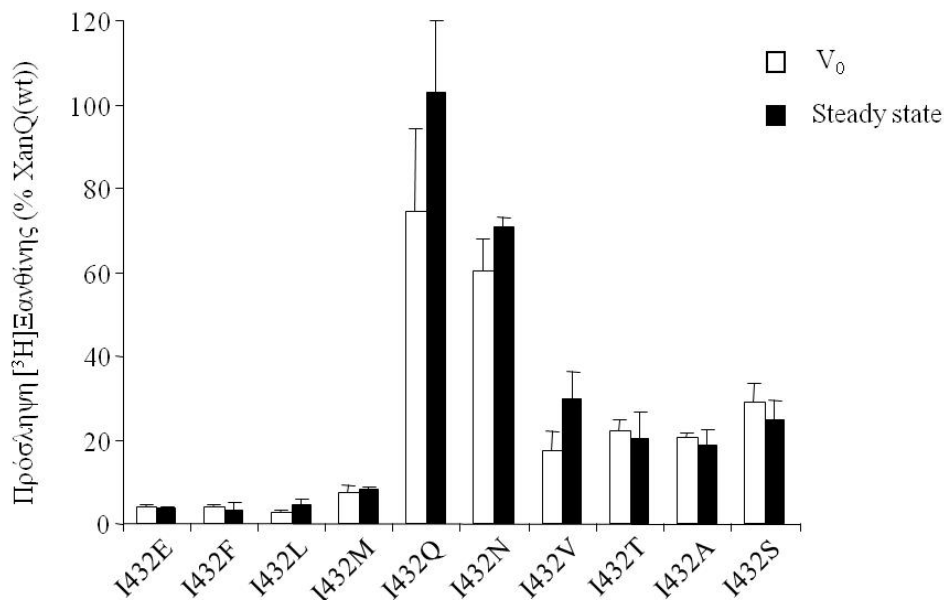
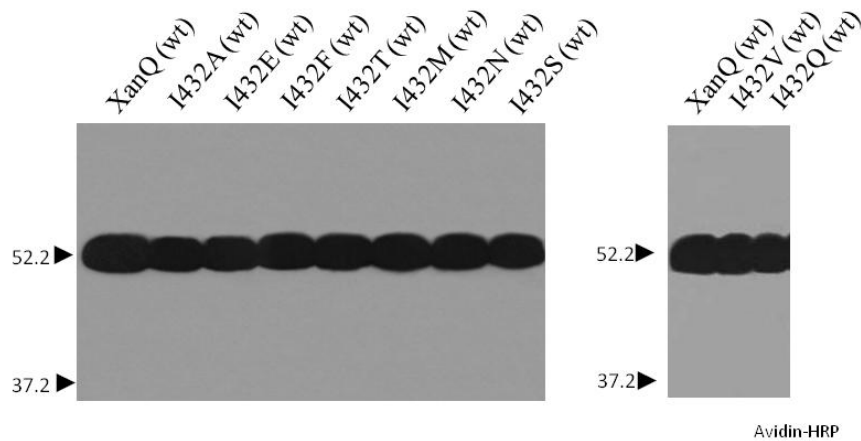
μεταλλάγματα P421C(wt), S423C(wt), I424C(wt), Y425C(wt), L427C(wt), G436C(wt), P421G(wt) και I432L(wt). Βρέθηκε ότι τα S423C(wt), I424C(wt), G436C(wt) και P421G(wt) έχουν υψηλή ενεργότητα, το L427C(wt) έχει ενεργότητα περίπου 50% του XanQ, τα P421C(wt) και Y425C(wt) έχουν χαμηλή ενεργότητα (15-30%), ενώ το I432L(wt) είναι ανενεργό. Όλες αυτές οι περμεάσεις εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη, συγκρίσιμα με τα επίπεδα έκφρασης του φυσικού τύπου.



Εικόνα 3.4. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας μεταλλαγμάτων της έλικας TM12 στο γενετικό υπόβαθρο του φυσικού τύπου XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(wild-type)-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (*πάνω*) ή η ενεργότητα (*κάτω*). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V₀) μετρήθηκε σε 15 sec και 30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 2 min και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ(wild-type)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.1.3. Αναλυτική μεταλλαξιγένεση της Pe-432, στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου

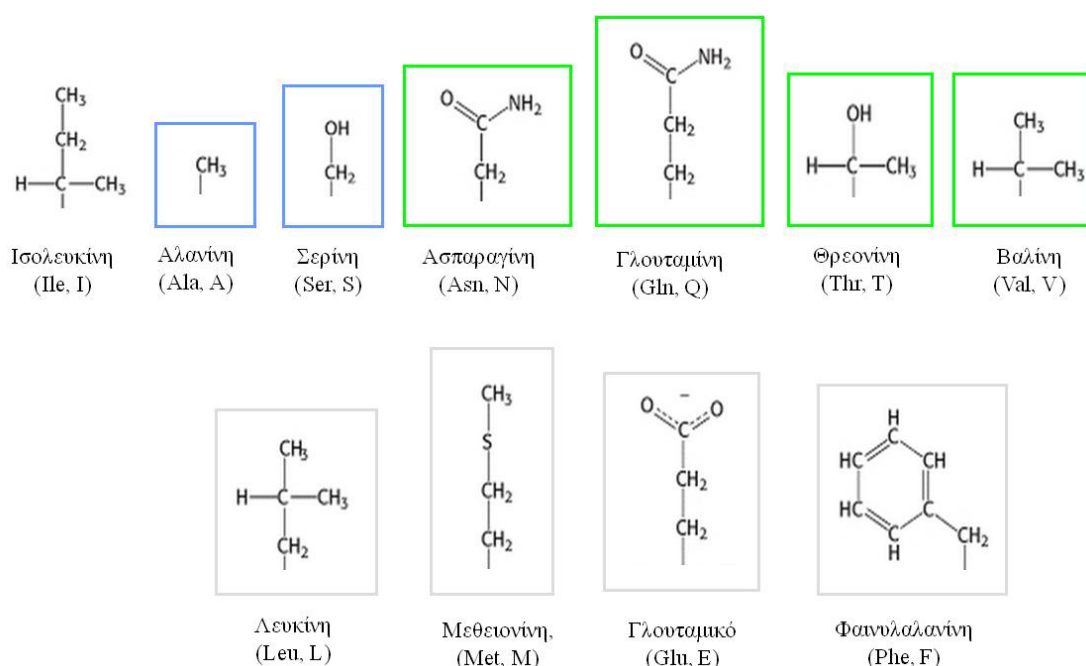
Ακολούθησε εκτενής μεταλλαξιγένεση στη θέση 432 (αντίστοιχη με τη θέση Phe-528 του UapA) όπου η Pe αντικαταστάθηκε από μία σειρά αμινοξέων με μεγάλες διαφορές στην πολικότητα και στον όγκο της πλευρικής ομάδας. Συγκεκριμένα, η Pe-432 αντικαταστάθηκε από Leu, Met, Glu, Phe, Ala, Ser, Thr, Val, Asn και Gln. Ενώ όλες οι κατασκευές εκφράζονται σε κανονικά επίπεδα στη μεμβράνη, οι αντικαταστάσεις με Leu, Met, Glu και Phe οδηγούν σε ανενεργές κατασκευές, οι αντικαταστάσεις με Ala, Ser, Thr και Val οδηγούν σε χαμηλή ενεργότητα (<20% του XanQ), και οι αντικαταστάσεις με Asn και Gln σε υψηλή ενεργότητα (60-80%) (**Εικόνα 3.5**). Όλα αυτά δείχνουν ότι μόνο αλλαγές μέσα σε συγκεκριμένο εύρος όγκου και προσανατολισμού της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος δίνουν κατασκευές με υψηλή ενεργότητα στη θέση 432 (**Εικόνες 3.6, 3.7**). Πειράματα κινητικής ανάλυσης (**Πίνακας 3.1**) έδειξαν ότι τα μεταλλάγματα που εισάγουν αλλαγές με μικρές πλευρικές αλυσίδες (Ala, Ser) έχουν χαμηλή V_{max} , τα μεταλλάγματα με αμινοξέα ενδιάμεσου όγκου (Asn, Gln, Thr, Val) έχουν V_{max} που πλησιάζει ή υπερβαίνει αυτή της φυσικού τύπου περμεάσης, ενώ τα μεταλλάγματα με αλυσίδες μεγάλου όγκου (Leu, Phe) έχουν αμελητέες V_{max} .



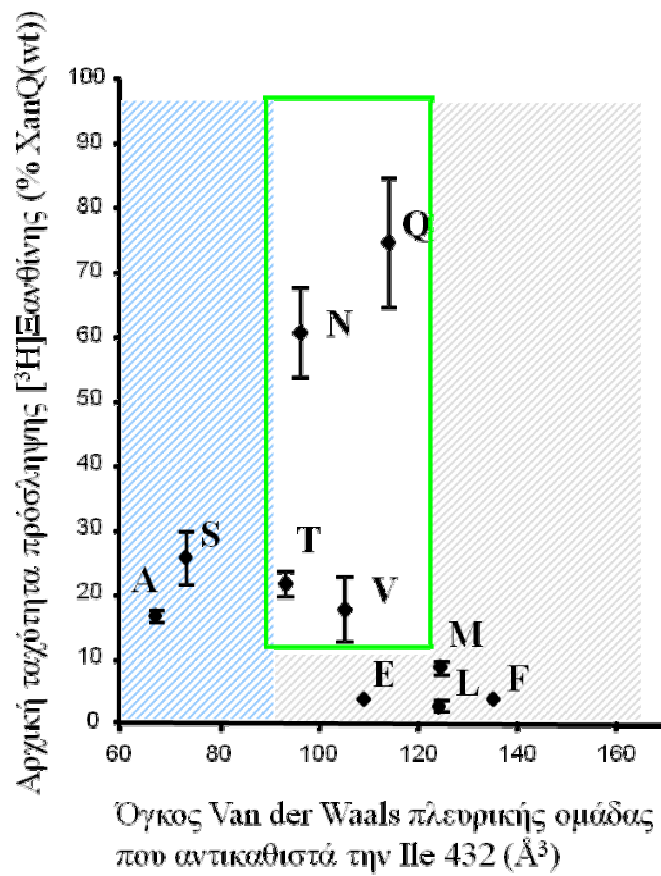
Εικόνα 3.5. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας μεταλλαγμάτων της θέσης Pe-432 στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ(wild-type)-BAD* συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (πάνω) ή η ενεργότητα (κάτω). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V₀) μετρήθηκε σε 15 sec και 30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 2 min και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ(wild-type)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
XanQ (wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
XanQ (C-less)	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.9	1858
I432A(wt)	1.6 ± 0.5	0.5 ± 0.1	313
I432S(wt)	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	833
I432N(wt)	2.6 ± 0.5	4.7 ± 0.2	1808
I432Q(wt)	5.0 ± 0.7	9.5 ± 0.4	1900
I432T(wt)	11.7 ± 1.5	5.7 ± 1.2	487
I432V(wt)	16.0 ± 3.4	5.4 ± 1.7	338
I432L(wt)	nd	nd	
I432F(wt)	nd	nd	
I432L (C-less)	9.1 ± 0.7	12.1 ± 0.4	1330
N430C (C-less)	9.9 ± 1.8	23.1 ± 1.6	2333

Πίνακας 3.1. Τιμές K_m και V_{\max} περμεασών με μεταλλάξεις στην έλικα TM12 του XanQ. Κύτταρα E. coli T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (0.1 - 100 μM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι K_m και V_{\max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. Για τα μεταλλάγματα I432L(wt) και I432F(wt) η κινητική ανάλυση έδειξε πολύ χαμηλές τιμές V_0 σε όλες τις συγκεντρώσεις ξανθίνης και δεν μπόρεσαν να εξαχθούν μετρήσιμα αποτελέσματα (nd, not determined).



Εικόνα 3.6. Συντακτικός χημικός τύπος των πλευρικών ομάδων της ισολευκίνης και των αμινοξέων που αντικαθιστούν την Ile-432, στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου. Χρωματικός κώδικας: Πράσινο πλαίσιο, αντικαταστάσεις που οδηγούν σε υψηλές V_{\max} . Μπλε πλαίσιο, αντικαταστάσεις που οδηγούν σε χαμηλές V_{\max} . Γκρι πλαίσιο, αντικαταστάσεις που οδηγούν σε ανενεργά μεταλλάγματα.



Εικόνα 3.7. Συσχετισμός μεταξύ της ενεργότητας του μεταλλάγματος και του όγκου Van der Waals της πλευρικής ομάδας που αντικαθιστά την Ile-432, στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου.

3.1.4. Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων της Pe-432 στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ φυσικού τύπου.

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της θέσης 432 στην αναγνώριση του υποστρώματος και των προσδετών (ανάλογα ξανθίνης, πυριμιδίνες και φάρμακα) από το μεταφορέα τα ενεργά μεταλλάγματα της θέσης Pe-432 αναλύθηκαν με πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) από μη σημασμένους προσδέτες. Στα πειράματα όπου ο ανταγωνιζόμενος προσδέτης είναι σε περίσσεια συγκέντρωσης (1 mM, 1000 φορές περισσότερα μόρια από το σημασμένο υπόστρωμα), όλα τα μεταλλάγματα εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ με το XanQ, αλλά με μικρότερη ικανότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων αναλόγων, κυρίως της 1-μεθυλοξανθίνης και της 6-θειοξανθίνης (**Πίνακας 3.2**). Ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1 μM έως 1 mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC₅₀ και εξ αυτών οι τιμές K_i (**Πίνακας 3.3**). Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι τα μεταλλάγματα I432N(wt), I432V(wt) and I432T(wt) έχουν χαμηλότερη συγγένεια (μεγαλύτερες K_i) για την 1-μεθυλοξανθίνη, (>25 φορές υψηλότερη K_i από αυτήν του XanQ), 6-θειοξανθίνη (7,5 έως >25 φορές υψηλότερη K_i) και 3-μεθυλοξανθίνη (4 έως 6,5 φορές υψηλότερη K_i), παρόμοια ή υψηλότερη συγγένεια για τη 2-θειοξανθίνη και την 9-μεθυλοξανθίνη και καθόλου διαφορές για πουρίνες και ανάλογα υποστρώματος που δεν αναγνωρίζονται από την περμεάση φυσικού τύπου. Το μετάλλαγμα I432Q(wt) έχει επίσης χαμηλότερη συγγένεια (μεγαλύτερη K_i) για την 1-μεθυλοξανθίνη (>25 φορές υψηλότερη K_i από αυτήν του XanQ) και την 6-θειοξανθίνη (10 φορές υψηλότερη K_i), λίγο μεγαλύτερη συγγένεια για τη 2-θειοξανθίνη και την 3-μεθυλοξανθίνη και καθόλου αλλαγές στην αναγνώριση των άλλων αναλόγων (**Πίνακας 3.3**).

Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [³ H]ξανθίνης που διατηρείται							
	XanQ(wt)	I432Q	I432N	I432V	I432T	I432S	I432A	I432L(C-less)
-	100	100	100	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	87	76	65	62	68	70	75
Υποξανθίνη	96	80	114	90	81	95	73	74
Αδενίνη	96	92	154	102	87	109	72	90
Γουανίνη	94	86	86	105	99	100	62	71
Ουρακίλη	101	96	156	92	108	101	76	95
1-Μεθυλοξανθίνη	19	63	67	76	78	53	54	75
2-Θειοξανθίνη	13	18	12	18	25	37	21	25
3-Μεθυλοξανθίνη	25	30	44	72	79	60	32	10
6-Θειοξανθίνη	20	56	36	65	85	52	47	47
7-Μεθυλοξανθίνη	105	75	88	78	83	73	66	50
8-Μεθυλοξανθίνη	96	40	66	87	92	156	26	51
9-Μεθυλοξανθίνη	13	15	12	28	36	39	53	24
Αλλοπουρινόλη	106	81	119	75	80	83	54	82
Οξυπουρινόλη	31	5	12	36	44	33	17	4

Πίνακας 3.2. Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων στη θέση 432 της έλικας TM12 του XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες και αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από 3 πειράματα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) να είναι πάντα < 20%.

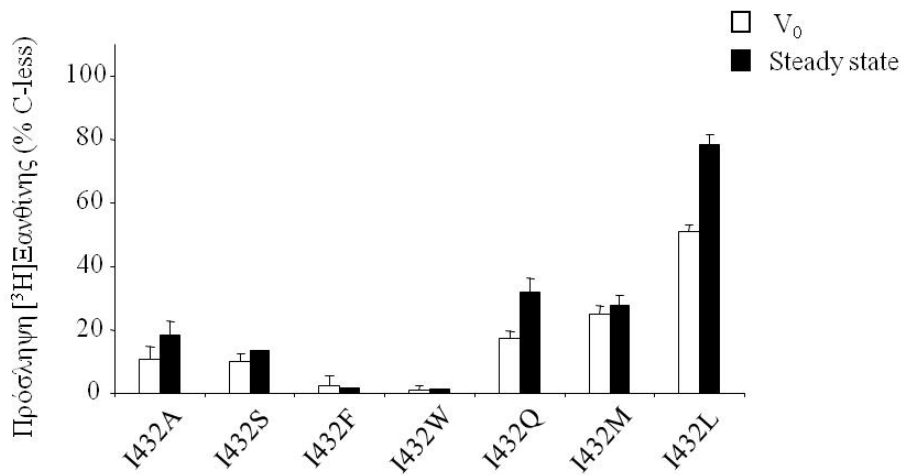
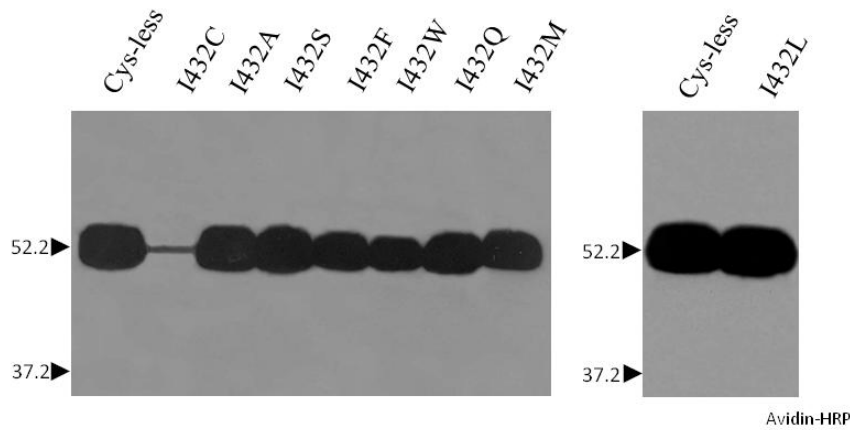
Ανταγωνιστής	K_i (μM)					
	XanQ(wt)	I432Q(wt)	I432N(wt)	I432V(wt)	I432T(wt)	I432L(C-less)
Ουρικό οξύ	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1-Μεθυλοξανθίνη	36	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
2-Θειοξανθίνη	91	42	31	8	16	79
3-Μεθυλοξανθίνη	72	18	314	460	471	306
6-Θειοξανθίνη	41	416	301	941	>1000	798
7-Μεθυλοξανθίνη	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
8-Μεθυλοξανθίνη	>1000	833	>1000	>1000	>1000	>1000
9-Μεθυλοξανθίνη	53	38	76	9	10	159

Πίνακας 3.3. Τιμές K_i των μεταλλαγμάτων στη θέση 432 του XanQ για μια σειρά αναλόγων ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1 μM – 1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} από 3 πειράματα εξήχθησαν με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H]ξανθίνης. Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ του XanQ και των μεταλλαγμάτων παρουσιάζονται με έντονα γράμματα.

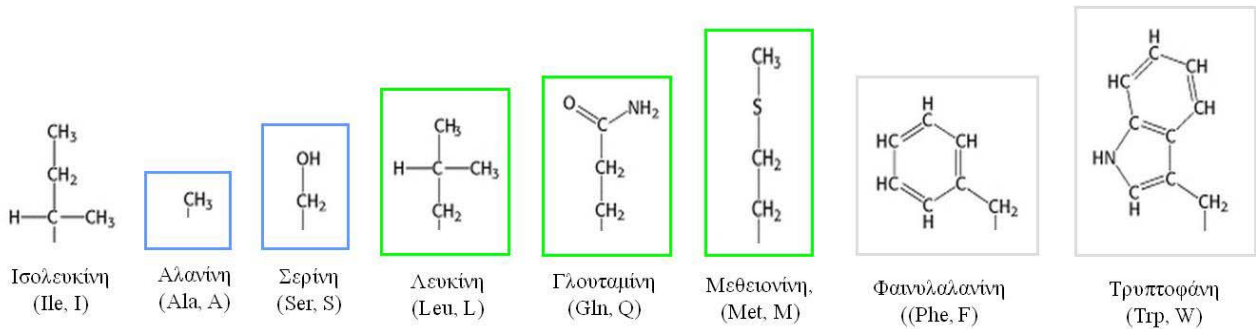
3.1.5. Αναλυτική μεταλλαξιγένεση της Pe-432 στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ χωρίς κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys-less).

Για να μελετηθεί αν υπάρχει επίδραση από την γειτονική εγγενή κυστεΐνη του μορίου (Cys-433) κατασκευάστηκε μια σειρά μεταλλαγμάτων της Pe-432 στο γενετικό υπόβαθρο της περμεάσης XanQ ελεύθερης κυστεϊνών (C-less). Συγκεκριμένα, η Pe-432 αντικαταστάθηκε από Leu, Met, Phe, Ala, Ser, Trp, Cys, και Gln. Όλες οι κατασκευές εκτός της I432C εκφράζονται κανονικά στη μεμβράνη. Αλλαγές της Pe-432 με ογκώδη κατάλοιπα (Phe, Trp) οδηγούν σε ανενεργά μόρια, αλλαγές με κατάλοιπα ίδιου ή παρόμοιου όγκου οδηγούν σε ενδιάμεσες (Leu) ή χαμηλές ενεργότητες (Met, Gln), ενώ αλλαγές με μικρές πλευρικές αλυσίδες καταλήγουν σε πολύ χαμηλές ενεργότητες (Ser, Ala) (**Εικόνα 3.8**). Στο πιο ενεργό μετάλλαγμα, το I432L(C-less), έγινε κινητική ανάλυση της πρόσληψης [³H]ξανθίνης και του ανταγωνισμού της πρόσληψης [³H] ξανθίνης από μη σημασμένους προσδέτες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η I432L(C-less) έχει παρόμοια V_{max} με αυτήν του XanQ(C-less) αλλά χαμηλότερη συγγένεια (K_m 1,6 φορές υψηλότερη) (**Πίνακας 3.1**), καθώς και χαμηλότερη συγγένεια αναγνώρισης (μεγαλύτερες K_i) για την 1-μεθυλοξανθίνη, (>25 φορές υψηλότερη K_i από αυτήν του XanQ), 6-θειοξανθίνη (20 φορές υψηλότερη K_i), 3-μεθυλοξανθίνη (4 φορές υψηλότερη K_i) και 9-μεθυλοξανθίνη (3 φορές υψηλότερη K_i) (**Πίνακες 3.2, 3.3**).

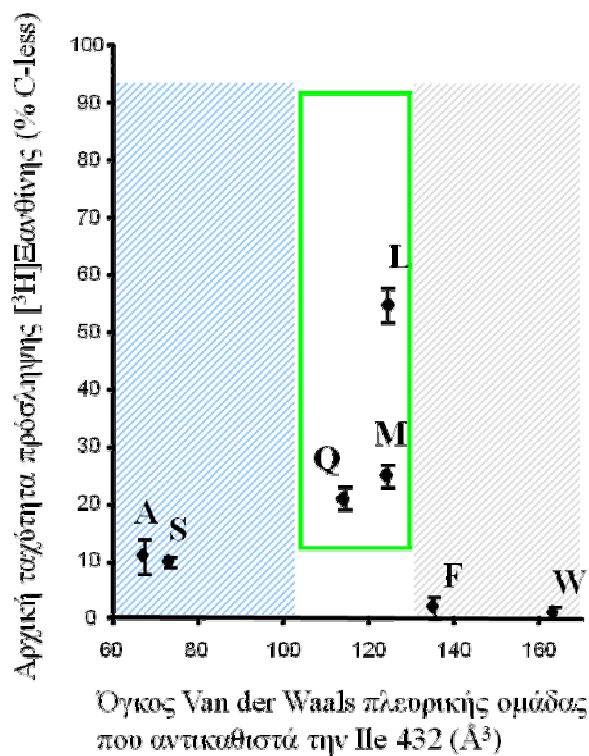
Συνολικά, φαίνεται ότι οι ιδιότητες των μεταλλαγμάτων της Pe-432 στο ελεύθερο κυστεϊνών γενετικό υπόβαθρο είναι παρόμοιες με αυτές στο γενετικό υπόβαθρο φυσικού τύπου (απενεργοποίηση με αντικατάσταση από ογκώδεις πλευρικές ομάδες, υψηλή ενεργότητα αλλά μειωμένη συγγένεια μεταφοράς υποστρώματος και συγγένεια αναγνώρισης ανταγωνιστών με αντικατάσταση από ομάδες ενδιάμεσου όγκου, και χαμηλή ενεργότητα με αντικατάσταση από μικρές πλευρικές ομάδες) (**Πίνακες 3.1, 3.2, 3.3**), αλλά το «επιτρεπόμενο» εύρος του όγκου των αντικαταστάσεων έχει μετατοπιστεί προς τα πάνω (110-130 Å³) σε σχέση με το αντίστοιχο επιτρεπόμενο εύρος για το γενετικό υπόβαθρο φυσικού τύπου (90-120 Å³) (**Εικόνες 3.7, 3.10**).



Εικόνα 3.8. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας μεταλλαγμάτων της θέσης **Ile-432** στο γενετικό υπόβαθρο του **XanQ** χωρίς εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών (**Cys-less**). Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια **pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD** συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (**πάνω**) ή η ενεργότητα (**κάτω**). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωτάγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V₀) μετρήθηκε σε 15 sec και 30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 2 min και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



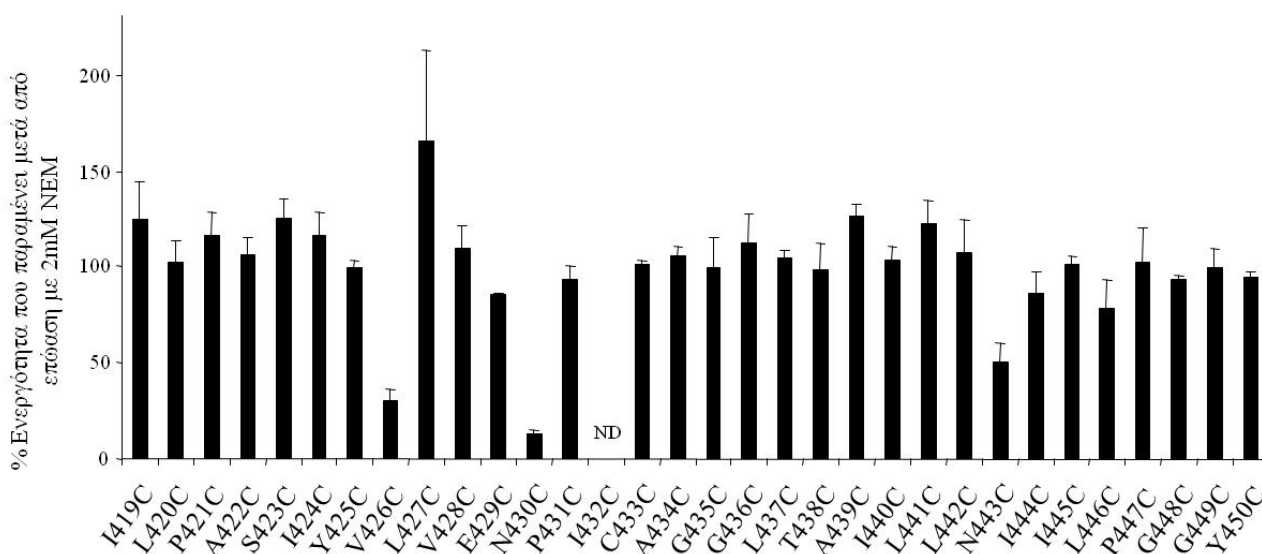
Εικόνα 3.9. Συντακτικός χημικός τύπος των πλευρικών ομάδων της ισολευκίνης και των αμινοξέων που αντικαθιστούν την Ile-432, στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ ελευθέρου κυστεΐνών (Cys-less). Χρωματικός κώδικας: Πράσινο πλαίσιο, αντικαταστάσεις που οδηγούν σε υψηλές V_0 . Μπλε πλαίσιο, αντικαταστάσεις που οδηγούν σε χαμηλές V_0 . Γκρι πλαίσιο, αντικαταστάσεις που οδηγούν σε ανενεργά μεταλλάγματα.



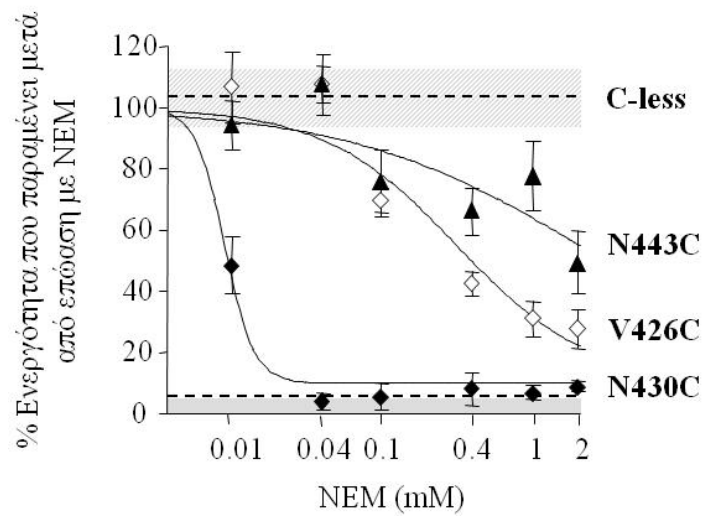
Εικόνα 3.10. Συσχετισμός μεταξύ της ενεργότητας του μεταλλάγματος και του όγκου Van der Waals της πλευρικής ομάδας που αντικαθιστά την Ile-432, στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ ελευθέρου κυστεΐνών (Cys-less).

3.1.6. Μελέτη επίδρασης του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης

Ακολούθησε μελέτη της επίδρασης του ειδικού SH-αντιδραστηρίου *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης για όλες τις περμεάσες μοναδικής κυστεΐνης στην έλικα TM12, με εξαίρεση την I432C που είχε σχεδόν μηδενική ενεργότητα. Η προεπόωση με 2 mM NEM βρέθηκε ότι μειώνει την ενεργότητα μόνο σε τρεις από τις περμεάσες, στη N443C κατά 50%, στη V426C κατά 70%, και στη N430C κατά 85% (Εικόνα 3.11). Με πειράματα δοσοεξάρτησης για εύρος συγκεντρώσεων NEM από 5 μ M έως 2 mM υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀ για τις τρεις αυτές «ευαίσθητες» περμεάσες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η περμεάση N430C είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο NEM (IC₅₀ 10 μ M), ενώ η V426C, η θέση της οποίας βρίσκεται στην ίδια πλευρά της πιθανής α -έλικας (Εικόνα 3.3), είναι λιγότερο ευαίσθητη (IC₅₀ 0,4 mM) και η N443C έχει ακόμη χαμηλότερη ευαισθησία (IC₅₀ 2 mM) (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.11. Επίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) (2 mM) στις ενεργότητες των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης στην έλικα TM12 του XanQ. Κύτταρα T184 που εκφράζουν τις περμεάσες επώαση με 2 mM NEM για 10 min στους 25 °C. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης ακολούθησε δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μ M), παρουσία 0.2 mM μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) και 20 mM ασκορβικού καλίου. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που εκφράζουν την περμεάση XanQ (Cys-less)-BAD ή κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με κενό φορέα (pT7-5). Για το μετάλλαγμα I432C, που έχει σχεδόν μηδενική αρχική ταχύτητα, δεν έγινε προσδιορισμός (ND, not determined). Οι τιμές παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών απουσία NEM, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

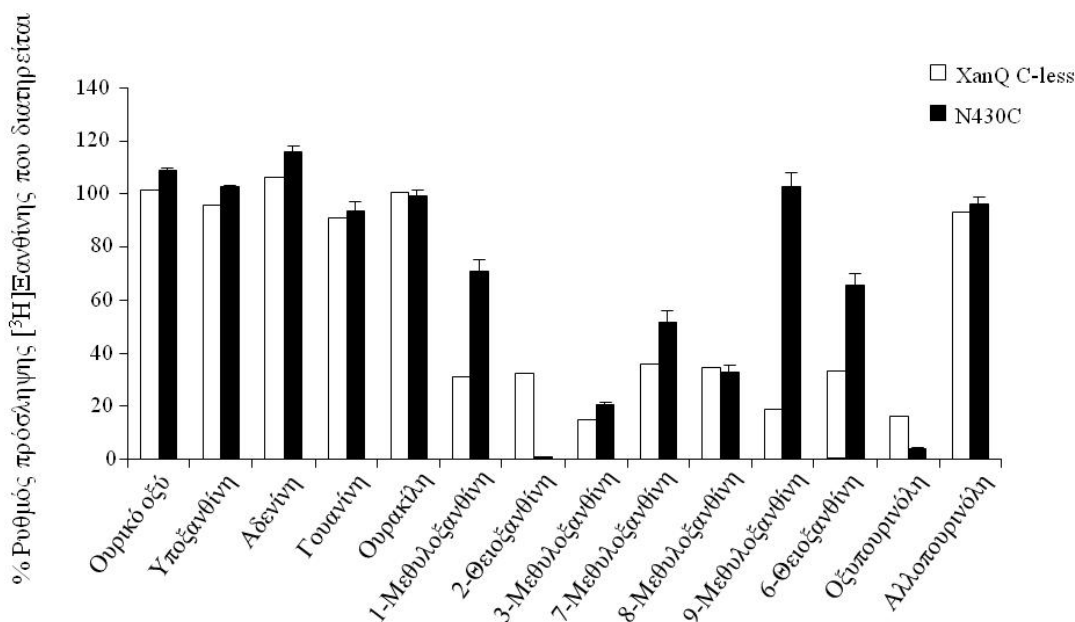


Εικόνα 3.12. Δοσοεξάρτηση της επίδρασης του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων V426C, N430C, και N443C του XanQ(C-less)-BAD. Κύτταρα T184 που εκφράζουν τις περμεάσες επώαστηκαν με τις συγκεντρώσεις NEM που φαίνονται, για 10 min στους 25 °C. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης ακολούθησε δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), παρουσία 0.2 mM μεθοσουλφονικού φαιναζίνιου (PMS) και 20 mM ασκορβικού καλίου. Μετρήθηκαν οι αρχικές ταχύτητες και οι τιμές προσαρμόστηκαν στις κατάλληλες εξισώσεις για να υπολογισθούν οι συγκεντρώσεις NEM που προκαλούν 50% αναστολή ενεργότητας (IC₅₀), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών απουσία NEM, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. Επίσης παρουσιάζονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για το C-less ως διακεκομμένη γραμμή και γκρι ζώνη αντίστοιχα.

3.1.7. Επίδραση αναλόγων ξανθίνης στην αναστολή της ενεργότητας της N430C από το NEM

Στην περμεάση N430C, η οποία είναι πολύ ευαίσθητη στην επίδραση του NEM, έγιναν κινητική ανάλυση της πρόσληψης ξανθίνης (**Πίνακας 3.1**), πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) από μη σημασμένους προσδέτες (**Εικόνα 3.13**), και επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση που μπορεί να έχει η παρουσία υποστρώματος (ξανθίνης) ή αναλόγων του υποστρώματος στην απενεργοποίηση από το NEM (**Εικόνες 3.14, 3.15**). Από τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης προκύπτει ότι η N430C έχει πολύ υψηλή V_{max} αλλά σημαντικά μειωμένη συγγένεια για τη μεταφορά ξανθίνης (διπλάσια K_m από την C-less XanQ) (**Πίνακας 3.1**). Το προφίλ εξειδίκευσης δείχνει ότι η N430C εμφανίζει μικρότερη ικανότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων αναλόγων, κυρίως της 1-μεθυλοξανθίνης, της 6-θειοξανθίνης και της 9-μεθυλοξανθίνης, απ' ό,τι η C-less XanQ, ενώ αναγνωρίζει καλύτερα ορισμένα άλλα ανάλογα όπως η 2-θειοξανθίνη και η οξυπουρινόλη (**Εικόνα 3.13**). Πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1 μM έως 1 mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} και εξ αυτών οι τιμές K_i , έδειξαν ότι η N430C έχει πολύ υψηλή συγγένεια αναγνώρισης για τη 2-θειοξανθίνη (K_i 9 μM) ενώ αναγνωρίζει με πολύ χαμηλή ή αμελητέα συγγένεια μια σειρά άλλων αναλόγων δηλ. 3-μεθυλοξανθίνη (K_i 356 μM), 6-θειοξανθίνη, 1-μεθυλοξανθίνη και 9-μεθυλοξανθίνη (**Πίνακας 3.4**).

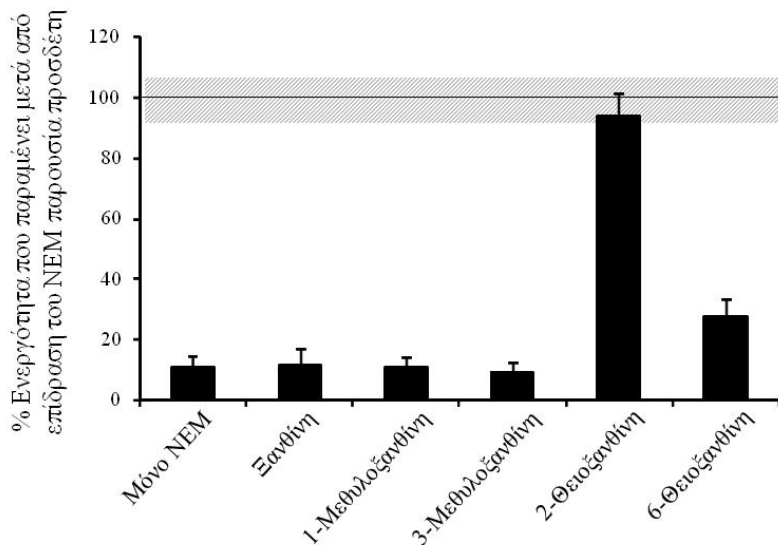
Στα πειράματα όπου μετρήθηκε η επίδραση υποστρώματος ή αναλόγων υποστρώματος στην αναστολή από το NEM βρέθηκε ότι η 2-θειοξανθίνη, ένα μη-μεταφερόμενο υπόστρωμα υψηλής συγγένειας (K_i 9 μM), μπορεί να προστατεύσει απόλυτα από την επίδραση του NEM (**Εικόνα 3.14**). Από πειράματα δοσοεξάρτησης βρέθηκε ότι η 2-θειοξανθίνη προστατεύει με EC_{50} 0,15 mM (**Εικόνα 3.15**). Άλλα ανάλογα υποστρώματος, τα οποία όμως αναγνωρίζονται με μειωμένη ή ελάχιστη συγγένεια (**Πίνακας 3.4**), προστατεύουν εν μέρει (6-θειοξανθίνη) ή καθόλου (1-μεθυλοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη) (**Εικόνα 3.14**). Επίσης, η ίδια η ξανθίνη φαίνεται ότι δεν προστατεύει από την επίδραση του NEM, γεγονός που θα πρέπει να οφείλεται στο ότι η ξανθίνη είναι το μεταφερόμενο υπόστρωμα και έτσι παραμένει στην περιοχή του κέντρου δέσμησης για σχετικά μικρό χρόνο, εφόσον το πείραμα γίνεται σε συνθήκες πλήρους ενεργότητας, σε άθικτα κύτταρα.



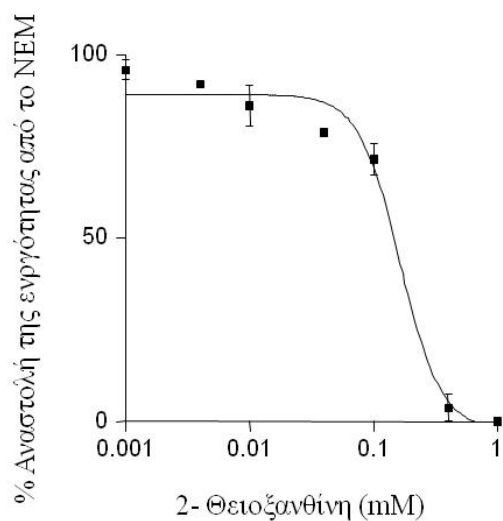
Εικόνα 3.13. Προφίλ εξειδίκευσης της περμεάσης N430C. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την N430C υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C μετά από προεπάση με τους μη σημασμένους προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V₀) προσδιορίστηκαν σε 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. Οι λευκές μπάρες δείχνουν τις αντίστοιχες τιμές που λαμβάνονται με T184 τα οποία εκφράζουν την C-less XanQ, όπως έχουν προκύψει από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου (Καρατζά Π., 2006, Διδακτορική διατριβή).

Ανταγωνιστής	Ενεργότητα (%) που παραμένει για την N430C παρουσία 1 mM ανταγωνιστή	K _i (μM)
Ουρικό οξύ	100	>1000
1-Μεθυλοξανθίνη	72	>1000
2-Θειοξανθίνη	2	9
3-Μεθυλοξανθίνη	23	356
6-Θειοξανθίνη	65	950
9-Μεθυλοξανθίνη	90	>1000

Πίνακας 3.4. Τιμές K_i της περμεάσης N430C για μια σειρά αναλόγων ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1 μM – 1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες (V₀) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC₅₀ από 3 πειράματα εξήχθησαν με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, K_i=IC₅₀/[1+(L/K_m)], όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H] ξανθίνης.



Εικόνα 3.14. Επίδραση ξανθίνης και αναλόγων ξανθίνης στην αναστολή της ενεργότητας της N430C από το NEM. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την κατασκευή υποβλήθηκε σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM), μετά από προεπώαση με 100 μM NEM (10 min), παρουσία ή απουσία προσδέτη (1 mM), και έκπλυση της περίσσειας υποστρώματος και αντιδραστηρίων, με φυγοκέντρηση, μετά τον τερματισμό της αντίδρασης. Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V_0) [³H]ξανθίνης, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα, ως ποσοστά επί της πλήρους ενεργότητας της N430C. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για την πλήρη ενεργότητα της N430C (απουσία NEM) δίνονται ως οριζόντια γραμμή και γκρι ζώνη, αντίστοιχα.



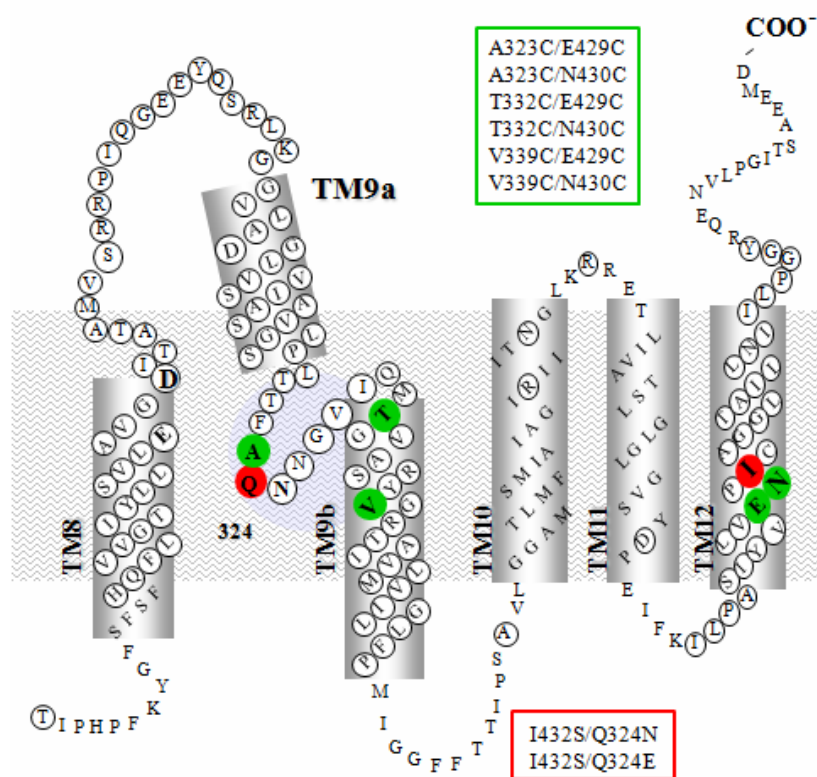
Εικόνα 3.15. Δοσοεξάρτηση της επίδρασης της 2-θειοξανθίνης στην αναστολή της ενεργότητας της N430C από το NEM. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την N430C υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM), μετά από προεπώαση με 100 μM NEM (10 min), παρουσία ή απουσία 2-θειοξανθίνης (στις συγκεντρώσεις που φαίνονται), και έκπλυση της περίσσειας υποστρώματος και αντιδραστηρίων με φυγοκέντρηση, μετά τον τερματισμό της αντίδρασης. Η επίδραση στην αναστολή της ενεργότητας υπολογίστηκε, σε κάθε συγκεντρώση 2-θειοξανθίνης, ως ποσοστιαία απόκλιση του αντίστοιχου ρυθμού πρόσληψης υποστρώματος από το ρυθμό πρόσληψης που μετράται απουσία NEM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της επίδρασης NEM απουσία του αναλόγου υποστρώματος, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.1.8. Μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ της έλικας TM12 και της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα XanQ: Ανάλυση διπλών μεταλλαγμάτων

Η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα XanQ περιέχει κατάλοιπα σημαντικά για τη λειτουργία και εξειδίκευση του κέντρου δέσμησης υποστρώματος και ορισμένα από αυτά (Gln-324, Asn-325) φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα με τη δέσμηση της ξανθίνης (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή – υπό συγγραφή). Από την άλλη πλευρά, όπως δείξαμε με τη μελέτη μεταλλαξιγένεσης της έλικας TM12, η κεντρική περιοχή της TM12 περιέχει δύο τουλάχιστον σημαντικά κατάλοιπα, από τα οποία το ένα (Asn-430) φαίνεται να είναι κοντά στο κέντρο δέσμησης αφού προστατεύεται πλήρως από αλκυλίωση παρουσία 2-θειοξανθίνης (εδάφιο 3.1.7), και το άλλο (Ple-432) υπόκειται σε αυστηρούς περιορισμούς ως προς το μέγεθος και τη γεωμετρία της πλευρικής ομάδας που μπορεί να το υποκαταστήσει (εδάφια 3.1.3 έως 3.1.5). Δεδομένα επίσης από τον ομόλογο μεταφορέα UarA του ακομύκητα *A. nidulans* είχαν υποδείξει ότι υπάρχει λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών του μοτίβου-υπογραφή και της έλικας TM12 του UarA η οποία φαίνεται να συνεισφέρει στον καθορισμό της εξειδίκευσης που εμφανίζει αυτός ο μεταφορέας για το ουρικό οξύ (Parageorgiou *et al.*, 2008). Σε μια προσπάθεια να μελετηθεί η πιθανή λειτουργική ή και φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο μοριακών περιοχών στον μεταφορέα XanQ, προχωρήσαμε σε κατασκευή και ανάλυση διπλών μεταλλαγμάτων που περιέχουν αντικαταστάσεις και στις δύο αυτές περιοχές (**Εικόνα 3.16**).

Οι μελέτες έγιναν σε δύο κατευθύνσεις. Καταρχήν, κατασκευάστηκαν διπλά μεταλλάγματα με αντικαταστάσεις τόσο στη θέση Gln-324 του μοτίβου (Q324N ή Q324E, που από μόνη της οδηγεί σε ελάχιστη ενεργότητα με εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια δέσμησης και αδυναμία αναγνώρισης όλων σχεδόν των αναλόγων ξανθίνης (Karatza *et al.*, 2006)) όσο και στη θέση Ple-432 του TMS12 (I432S, που από μόνη της οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα ενεργότητας και με μειωμένη συγγένεια για την αναγνώριση ορισμένων αναλόγων, όπως δείξαμε στο εδάφιο 3.1.4) στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ(wt). Τα μεταλλάγματα αυτά εξετάστηκαν ως προς την έκφραση, ενεργότητα και προφίλ εξειδίκευσής τους για να διαπιστωθεί κατά πόσον η ταυτόχρονη παρουσία των δύο μεταλλαγμάτων στο ίδιο μόριο μπορεί να επαναφέρει ως ένα βαθμό την υψηλή ενεργότητα ή εξειδίκευση του XanQ ή να επηρεάσει τα λειτουργικά χαρακτηριστικά με διαφορετικό τρόπο. Επίσης, κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα διπλών κυστεϊνών μεταξύ των δύο περιοχών του μεταφορέα στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ(C-less). Η εισαγωγή των διπλών αντικαταστάσεων με κατάλοιπα Cys έγινε σε θέσεις οι οποίες αναμένεται να είναι προσβάσιμες από το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον (βλ. **Εικόνα 3.16**), με

στόχο τα ενεργά μεταλλάγματα να εξετασθούν στη συνέχεια ως προς την επίδραση ιόντων καδμίου (Cd^{2+}). Όπως έχει δειχθεί σε άλλες περιπτώσεις περμεασών (Perez-Garcia *et al.*, 1996; Benitah *et al.*, 1996; Brocke *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2005; Zomot *et al.*, 2005), μια ενδεχόμενη αναστολή της ενεργότητας από ιόντα Cd^{2+} μπορεί να αποδοθεί στο ότι το αντίστοιχο ζεύγος κυστεϊνών δημιουργεί κέντρο συντονισμού για δέσμευση του Cd^{2+} και ότι η δέσμευση αυτή παρεμποδίζει τον λειτουργικό κύκλο της εναλλαγής διαμορφώσεων του μεταφορέα κατά τον μηχανισμό.



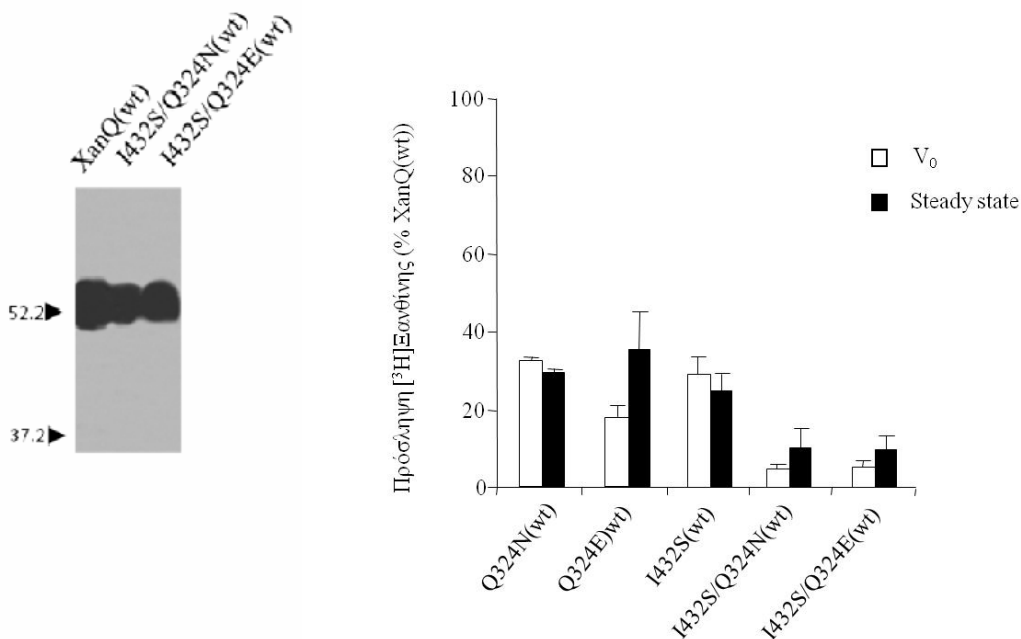
Εικόνα 3.16. Μοντέλο του XanQ που δείχνει τις περιοχές του μοτίβου «υπογραφή» και της έλικας TM12 και τις αντίστοιχες θέσεις καταλοίπων στις οποίες έγιναν οι διπλές αντικαταστάσεις. Με κόκκινο χρώμα οι θέσεις που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο περιοχών και σε κόκκινο πλαίσιο τα διπλά μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν (3.1.9). Με πράσινο χρώμα οι θέσεις που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της εγγύτητας των δύο περιοχών και σε πράσινο πλαίσιο τα διπλά μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν (3.1.10).

3.1.9. Ανάλυση διπλών μεταλλάξεων στις θέσεις Gln-324 (μοτίβο-υπογραφή) και Ile-432 (έλικα TM12)

Τα μεταλλάγματα του XanQ που φέρουν διπλές αντικαταστάσεις στις θέσεις Gln-324 και Ile-432 κατασκευάστηκαν για να εξετασθεί κατά πόσον οι δύο αυτές σημαντικές θέσεις του μοτίβου-υπογραφή και της TM12, αντίστοιχα, μπορεί να αλληλεπιδρούν λειτουργικά. Όπως προαναφέραμε, υπήρχαν ήδη ενδείξεις ότι οι δύο αυτές θέσεις βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη από τα προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας (Parakostas *et al.*, 2008). Στο μυκητιακό ομόλογο UapA, μάλιστα, η Gln-408 του μοτίβου-«υπογραφή» (Gln-324 στον XanQ) έχει προταθεί ότι δρά συνεργειακά με τη Phe-528 (αντίστοιχη με την Ile-432 στον XanQ) συμβάλλοντας στην επιλεκτικότητα του μεταφορέα UapA ως προς τα μεταφερόμενα υποστρώματα (Vlanti *et al.*, 2006).

Με *in vitro* μεταλλαξιγένεση του XanQ(wt), κατασκευάστηκαν οι περμεάσες I432S/Q324E και I432S/Q324N, οι οποίες βρέθηκε ότι παρουσιάζουν κανονική έκφραση στη μεμβράνη αλλά πολύ χαμηλή ενεργότητα μεταφοράς, κάτι που αναμενόταν εν μέρει λόγω της χαμηλής ενεργότητας και των μονών μεταλλάξεων (**Εικόνα 3.17**). Αντίθετα, όμως, με τα μεταλλάγματα Q324N και Q324E που έχουν εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια για ξανθίνη (K_m 76.0 και 71.2 μ M) (Karatza *et al.*, 2006), τα διπλά μεταλλάγματα I432S/Q324N και I432S/Q324E εμφανίζουν σχετικά κανονική συγγένεια μεταφοράς ξανθίνης (K_m 6.4 και 11.8 μ M), προσεγγίζοντας την τιμή K_m του XanQ φυσικού τύπου (**Πίνακας 3.5**). Επίσης, όπως προκύπτει από πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης από μια σειρά αναλόγων και άλλων πουρινών (**Πίνακας 3.6**), το προφίλ εξειδίκευσης του διπλού μεταλλάγματος I432S/Q324E εμφανίζει ενδιαφέρουσες διαφορές σε σχέση με την Q324E (**Εικόνα 3.18**). Συγκεκριμένα, η περμεάση I432S/Q324E φαίνεται να επιτρέπει πρόσδεση 9-μεθυλοξανθίνης και οξυπουρινόλης και, εν μέρει, της 2-θειοξανθίνης και της 3-μεθυλοξανθίνης, αναλόγων τα οποία δεν αναγνωρίζονται από την Q324E αλλά αναγνωρίζονται από την XanQ(wt) και σε μικρότερο βαθμό από την I432S. Επίσης η I432S/Q324E παρουσιάζει μια καινούργια ιδιότητα, ότι αναγνωρίζει σε σημαντικό βαθμό τις πουρίνες υποξανθίνη, αδενίνη και γουανίνη, που δεν αναγνωρίζονται καθόλου από τον XanQ(wt) ή από τα άλλα μεταλλάγματα (**Πίνακας 3.6**). Αυτή η τελευταία παρατήρηση δείχνει ότι στο διπλό μετάλλαγμα έχουμε μια ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ των θέσεων I432S και Q324E που οδηγεί σε ένα νέο φαινότυπο. Αντίθετα, δεν υπάρχουν ενδείξεις αλληλεπίδρασης από την ανάλυση του άλλου διπλού μεταλλάγματος, I432S/Q324N, του οποίου το προφίλ εξειδίκευσης δε διαφέρει πολύ από το Q324N, γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την ειδικότητα της

αλληλεπίδρασης μεταξύ I432S και Q324E. Επειδή για την περμεάση I432S/Q324E βρέθηκε ότι αναγνωρίζει και υποξανθίνη (η ενεργότητα αναστέλλεται κατά 67% παρουσία περίσσειας υποξανθίνης, Πίνακας 3.6), έγιναν και πειράματα ελέγχου της δυνατότητας πρόσληψης [³H]υποξανθίνης (1 – 100 μM) τόσο από το διπλό μετάλλαγμα όσο και από τα υπόλοιπα μεταλλάγματα. Στις δοκιμασίες αυτές, καμιά από τις περμεάσεις δεν φάνηκε να μπορεί να μεταφέρει υποξανθίνη, όπως άλλωστε ισχύει και για τον φυσικού τύπου XanQ (Karatzas and Frillingos, 2005).



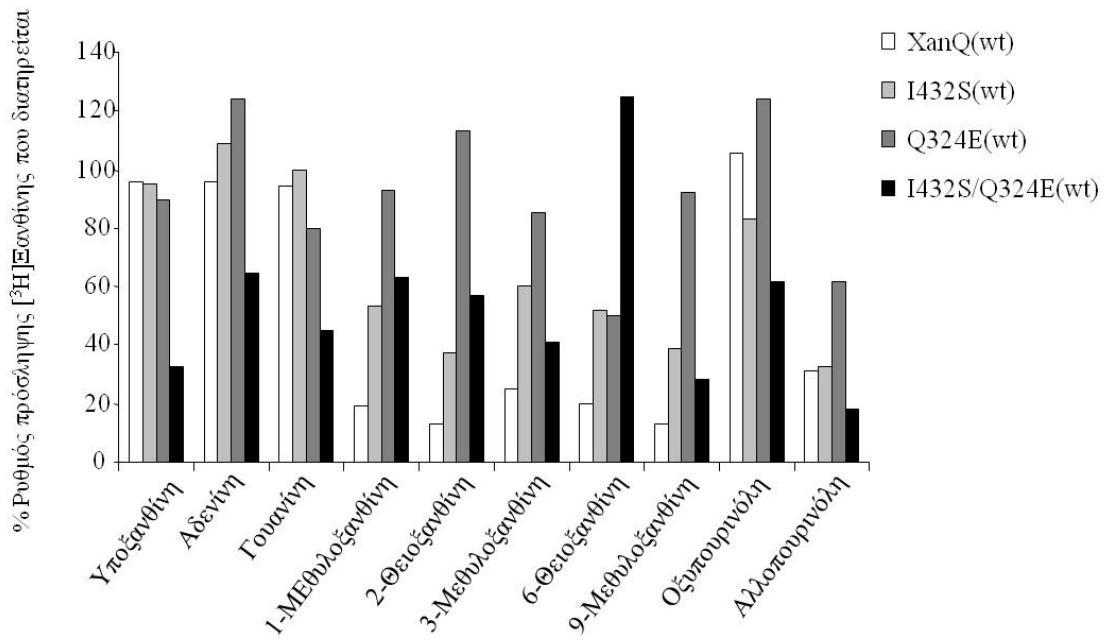
Εικόνα 3.17. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας περμεασών με διπλά μεταλλάγματα στις θέσεις Ile-432 (έλικα TM12) και Gln-324 (μοτίβο «υπογραφή») του XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(wild type)-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (αριστερά) ή η ενεργότητα (δεξιά). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωτάγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V₀) μετρήθηκε σε 15 sec και 30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 2 min και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ(wild type)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
XanQ (wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
I432S(wt)	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	833
Q324N(wt)	76.0 ± 19.1	44.5 ± 4.7	586
I432S/Q324N(wt)	6.4 ± 2.7	3.6 ± 0.5	563
Q324E(wt)	71.2 ± 12.2	12.6 ± 0.4	177
I432S/Q324E(wt)	11.8 ± 3.9	4.4 ± 0.5	373

Πίνακας 3.5. Τιμές K_m και V_{max} περμεασών με διπλά μεταλλάγματα στις θέσεις Ile-432 (έλικα TM12) και Gln-324 (μοτίβο «υπογραφή») του XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (0,1 - 100 μM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V_0) προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. Τα μεταλλάγματα Q324N(wt) και Q324E(wt) είχαν κατασκευασθεί και ελεγχθεί στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης από το εργαστήριό μας (Karatzas et al., 2006).

Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [^3H]ξανθίνης που διατηρείται					
	wt	I432S	Q324N	I432S/Q324N	Q324E	I432S/Q324E
-	100	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	68	143	99	122	78
Υποξανθίνη	96	95	125	100	90	33
Αδενίνη	96	109	90	142	124	65
Γουανίνη	94	100	97	64	80	45
Ουρακίλη	101	101	128	103	98	86
1- Μεθυλοξανθίνη	19	53	90	92	93	63
2-Θειοξανθίνη	13	37	123	98	113	57
3- Μεθυλοξανθίνη	25	60	79	69	85	41
6- Θειοξανθίνη	20	52	61	68	50	125
7- Μεθυλοξανθίνη	105	73	69	74	112	66
8- Μεθυλοξανθίνη	96	156	70	75	75	78
9- Μεθυλοξανθίνη	13	39	117	110	92	28
Αλλοπουρινόλη	106	83	105	91	124	62
Οξυπουρινόλη	31	33	69	57	62	18

Πίνακας 3.6. Προφίλ εξειδίκευσης περμεασών με διπλά μεταλλάγματα στις θέσεις Ile-432 (έλικα TM12) και Gln-324 (μοτίβο-υπογραφή) του XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις περμεάσες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V_0) προσδιορίστηκαν σε 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες και αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από 3 πειράματα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) να είναι σε όλες τις περιπτώσεις < 20%. Τα μεταλλάγματα Q324N(wt) και Q324E(wt) είχαν κατασκευασθεί και ελεγχθεί στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης από το εργαστήριό μας (Karatzas et al., 2006). Με έντονα στοιχεία φαίνονται οι διαφορές σε σχέση με το προφίλ του φυσικού τύπου.

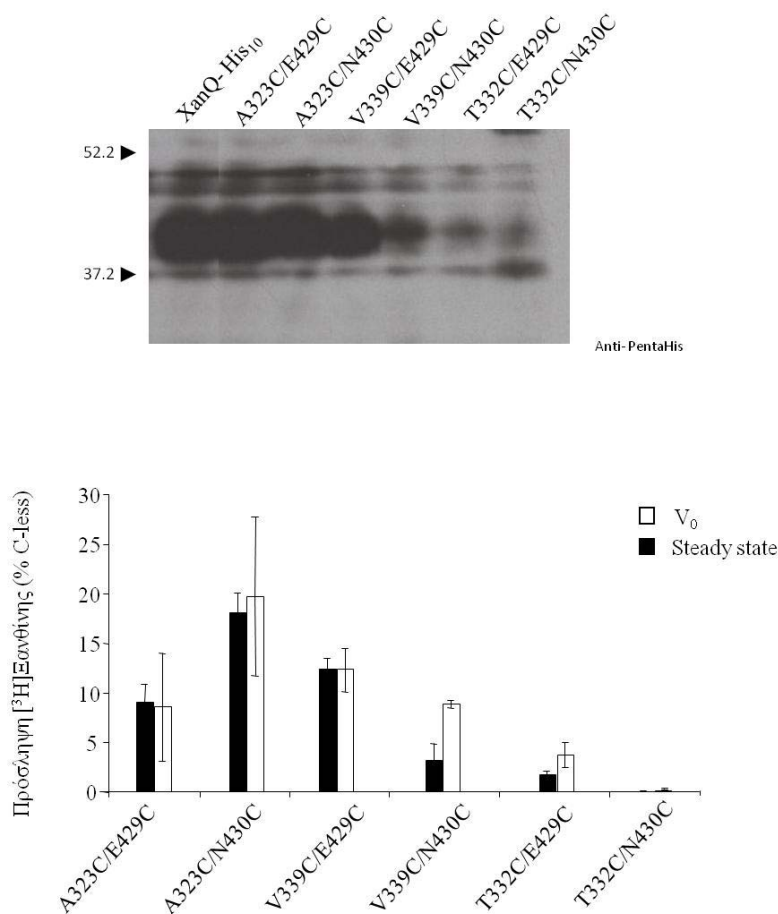


Εικόνα 3.18. Σύγκριση των προφίλ εξειδίκευσης των περμεασών I432S, Q324E και I432S/Q324E. Τα δεδομένα έχουν ληφθεί από τον Πίνακα 3.6.

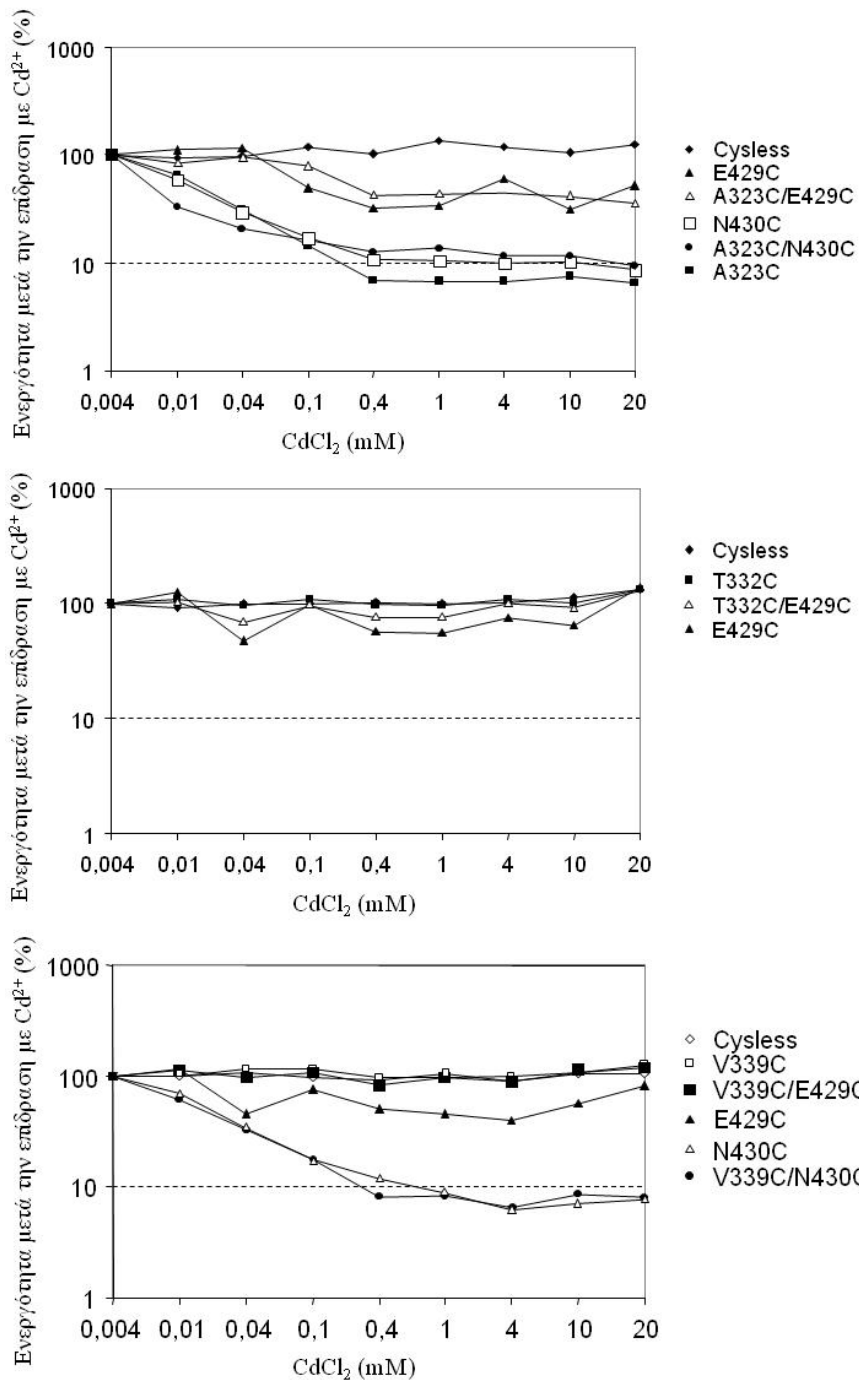
3.1.10. Ανάλυση μεταλλαγμάτων που εισάγουν ζεύγη κυστεϊνών στις περιοχές του μοτίβου-υπογραφή και της έλικας TM12 και μελέτη της επίδρασης ιόντων Cd²⁺

Για να μελετηθεί κατά πόσον η κεντρική περιοχή της διαμεμβρανικής έλικας 12 βρίσκεται κοντά με τα σημαντικά κατάλοιπα του μοτίβου «υπογραφή» στην τρισδιάστατη δομή της περμεάσης XanQ, μπορούμε να στηριχτούμε στην κατασκευή και ανάλυση διπλών μεταλλαγμάτων κυστεϊνών στο γενετικό υπόβαθρο της C-less περμεάσης. Ένας απλός σχετικά έλεγχος για την πιθανότητα φυσικής αλληλεπίδρασης του ζεύγους κυστεϊνών, που έχει εφαρμοσθεί και πρωτύτερα στο εργαστήριό μας (Καρενά Αικ., Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, 2007), είναι να ελεγχθεί η επίδραση ιόντων καδμίου (Cd²⁺) στην ενεργότητα, καθώς είναι γνωστό ότι δύο γειτονικές κυστεΐνες μπορούν να σχηματίσουν κέντρο συντονισμού για δέσμευση του δισθενούς καδμίου (Zomot *et al.*, 2005). Για να μπορεί να πετύχει ένα τέτοιο πείραμα, θα πρέπει οι θέσεις των κυστεϊνών να είναι προσβάσιμες από τα ιόντα, άρα και από το εξωτερικό υδρόφιλο περιβάλλον, και να είναι σε περιοχές του μορίου που έχουν σημασία στον μηχανισμό της μεταφοράς (Zomot *et al.*, 2005). Γι αυτούς τους λόγους, κατασκευάστηκαν διπλά μεταλλάγματα με συνδυασμούς θέσεων οι οποίες είναι προσβάσιμες σε αλκυλιωτικά αντιδραστήρια, με βάση τις προηγούμενες μελέτες μας για την TM12 και το μοτίβο-υπογραφή. Επιλέχθηκαν τα μεταλλάγματα A323C, T332C και V339C (περιοχή του μοτίβου «υπογραφή», Karatza *et al.*, 2006) και τα μεταλλάγματα E429C και N430C για την έλικα TM12. Κατασκευάστηκαν λοιπόν οι περμεάσες διπλών κυστεϊνών A323C/E429C, A323C/N430C, V339C/E429C, V339C/N430C, T332C/E429C και T332C/N430C. Όλες οι περμεάσες έχουν κανονική έκφραση και ενεργότητα εκτός από τις T332C/E429C και T332C/N430C που έχουν πολύ μικρή ή μηδενική έκφραση και ενεργότητα, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.19**). Στις ενεργές περμεάσες μελετήθηκε η επίδραση επίδραση ιόντων καδμίου (Cd²⁺) για να εξετασθεί η εγγύτητα μεταξύ των θέσεων που μελετώνται. Ελέγχθηκε λοιπόν η επίδραση χλωριούχου καδμίου στην ενεργότητα των περμεασών διπλών κυστεϊνών A323C/E429C, A323C/N430C, T332C/E429C, V339C/E429C και V339C/N430C, αλλά και των αντίστοιχων περμεασών με μονές κυστεΐνες, δηλ. των A323C, T332C, V339C, E429C, και N430C (**Εικόνα 3.20**). Από την ανάλυση αυτή προκύπτουν δύο στοιχεία: (1) οι A323C και N430C αντιδρούν από μόνες τους ισχυρά με τα ιόντα Cd²⁺ κάτι που σημαίνει ότι είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο, εξωκυτταρικό περιβάλλον, και θα μπορούσαν να δεσμεύουν το κάδμιο με διαμοριακή αλληλεπίδραση κυστεϊνών μεταξύ δύο μορίων περμεάσης, (2) δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για το αν το κεντρικό τμήμα της έλικας 12 βρίσκεται κοντά, στην τριτοταγή δομή, με

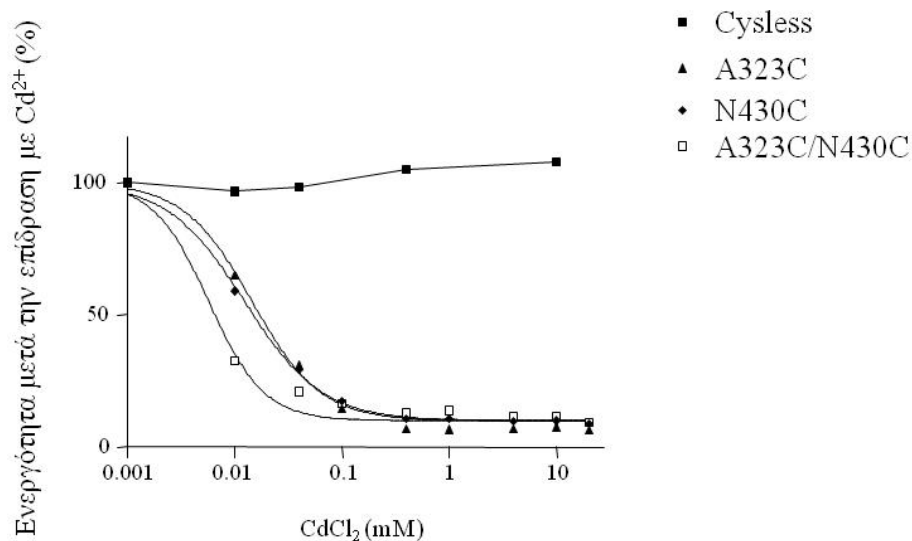
την περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» NAT, αφού κανένα από τα διπλά μεταλλάγματα δεν έδειξε ιδιαίτερα αυξημένη ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το κάδμιο. Παρ' όλα αυτά, όταν προσαρμόσαμε τα δεδομένα μας στις κατάλληλες εξισώσεις για υπολογισμό των τιμών IC_{50} του καδμίου διαπιστώσαμε ότι για το ζεύγος των Ala-323 και Asn-430, η ήδη σημαντική αναστολή ενεργότητας των A323C και N430C (IC_{50} 13 μ M και 10 μ M αντίστοιχα), γίνεται ακόμα μεγαλύτερη στο διπλό μετάλλαγμα A323C/N430C (IC_{50} 2 μ M, **Εικόνα 3.21**).



Εικόνα 3.19. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας των διπλών μεταλλαγμάτων κυστεϊνών μεταξύ της έλικας TM12 και του μοτίβου-υπογραφή του XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ(C-less)*-His₁₀ συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (**πάνω**) ή η ενεργότητα (**κάτω**). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι των ιστιδινών (anti-PentaHis) σε αραιώση 1:5000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης περοξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μ M), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 15 sec και 30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 2 min και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ (Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



Εικόνα 3.20. Επίδραση CdCl₂ στην ενεργότητα των περμεασών διπλών κυστεϊνών. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(C-less)-BAD, pT7-5/*xanQ*(single-Cys)-His₁₀ και pT7-5/*xanQ*(double-Cys)-His₁₀ τα οποία φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, μετά από προεπώαση με CdCl₂ (1 μM - 20 mM, 10 min, 25 °C). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V₀) ξανθίνης, όπως μετρήθηκαν σε 5 – 10 sec, ως ποσοστά % επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία CdCl₂ για κάθε μετάλλαγμα.



Εικόνα 3.21. Ανάλυση της επίδρασης του CdCl₂ στην ενεργότητα των A323C, N430C και A323C/N430C ΧανQ. Τα δεδομένα, που έχουν ληφθεί από την Εικόνα 3.20, παρουσιάζονται εδώ σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στην εξίσωση για σιγμοειδή δόσοεξάρτηση $y = B + (T - B) / (1 + 10^{(log IC_{50} - log x)^h})$, όπου B και T είναι οι ελάχιστες και μέγιστες τιμές του y, αντίστοιχα, και h ο συντελεστής Hill, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism 4. Από την εξίσωση υπολογίζεται ότι οι τιμές IC₅₀ (συγκεντρώσεις CdCl₂ που προκαλούν αναστολή της ενεργότητας στο 50%) είναι 13 μM (A323C), 10 μM (N430C) και 2 μM (A323C/N430C).

3.2. Κλωνοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός νέων μεταφορέων από την οικογένεια NAT/NCS2

Παρά τη σημασία της οικογένειας NAT και το μεγάλο αριθμό των μελών που περιέχει (πάνω από 1000 πιθανά γονίδια από όλο το φάσμα των οργανισμών), ελάχιστα από αυτά (λιγότερα από 15, πριν τη παρούσα Διατριβή) έχουν χαρακτηριστεί και μελετηθεί (βλ. Εισαγωγή). Όπως αναφέραμε, μάλιστα, μόνο δύο μεταφορείς, οι XanQ και UapA, έχουν αναλυθεί με εκτενή μεταλλαξιγένεση, ενώ δεν είναι γνωστό κάποιο πρότυπο δομής από κρυσταλλογραφία με βάση το οποίο να μπορούμε να μοντελοποιήσουμε τους μεταφορείς αυτούς. Αυτό σημαίνει ότι η πληροφορία για τα σημαντικά κατάλοιπα που έχουν βρεθεί από τους δύο μεταφορείς XanQ και UapA δεν αρκεί για την ερμηνεία όλων των πιθανών διαφορών εξειδίκευσης που μπορεί να υπάρχουν μεταξύ των μεταφορέων της οικογένειας NAT. Είναι σημαντικό στο πλαίσιο αυτό να γίνει λειτουργικός χαρακτηρισμός και άλλων μεταφορέων, ιδιαίτερα από γονίδια που εμφανίζουν συγκεκριμένες αλλαγές σε σημαντικά κατάλοιπα αλλά και υψηλή ομοιότητα αλληλουχίας με τα λειτουργικώς γνωστά γονίδια (*uapA* και *xanQ*), ώστε να επιτραπεί ο εμπλουτισμός των χαρακτηρισμένων NAT μεταφορέων με νέα λειτουργικά προφίλ. Η συγκριτική ανάλυση των νέων συστημάτων θα δώσει μια ισχυρή μοριακή βάση για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NAT και καλύτερη κατανόηση των σημαντικών περιοχών που σχηματίζουν το κέντρο δέσμευσης ή συμμετέχουν στον μηχανισμό ενεργού μεταφοράς, και αναμένεται να διατηρούνται ακόμη και μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων ομολόγων ή ομολόγων με μεγάλες διαφορές εξειδίκευσης.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγινε κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός μεταφορέων που είναι συγγενή ομόλογα του XanQ, όπως παράλογα από την *E. coli* ή ορθόλογα από συμβιωτικά ριζοβακτήρια (*Sinorhizobium meliloti*), ψυχρόφιλα (*Psychrobacter cryohalolentis* K5) ή θερμοφιλα βακτήρια (*Moorella thermoacetica*). Οι μελέτες αυτές έγιναν για να εμπλουτιστεί η λειτουργική βάση δεδομένων της οικογένειας NAT με το χαρακτηρισμό νέων ομολόγων, και θα επιτραπεί η καλύτερη κατανόηση των σημαντικών περιοχών που σχηματίζουν το κέντρο δέσμευσης ή συμμετέχουν στον μηχανισμό ενεργού μεταφοράς, και διατηρούνται ακόμη και μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων ομολόγων ή ομολόγων με μεγάλες διαφορές εξειδίκευσης.

3.2.1. Κλωνοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός ομολόγων του XanQ από την *E. coli*

Στο γονιδίωμα της *E. coli* φαίνεται να υπάρχουν 9 ομόλογα του XanQ, που ταξινομούνται ως δυνητικοί μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού/ουρακίλης, τα οποία ανήκουν στον βασικό πυρήνα των 3000 περίπου γονιδίων της *E. coli* που απαντώνται με τις ίδιες πρακτικά αλληλουχίες σε όλα τα κατατεθέντα γονιδιώματα (> 50), τόσο του εργαστηριακού K-12 όσο και των παθογόνων στελεχών *E. coli* (O157:H7, CFT073). Η φυσιολογική σημασία αυτού του λειτουργικού «πλεονάσματος» γονιδίων (redundancy) δεν έχει κατανοηθεί με ακρίβεια, λόγω των χαμηλών ενδογενών επιπέδων των αντίστοιχων ενεργοτήτων, της έλλειψης φαινοτύπου που να συνδέεται με χρωμοσωμική απαλοιφή κάποιου από αυτά τα γονίδια και της αδυναμίας χρήσης των αντίστοιχων νουκλεοτιδικών βάσεων ως βασικών πηγών αζώτου σε καλλιέργειες *E. coli* (Karatza and Frillingos, 2005). Ωστόσο, τα 10 ομόλογα NAT παρέχουν μια σημαντική βάση για συγκριτική ανάλυση πολλών πιθανών διαφορετικών ενεργοτήτων με διακριτές προτιμήσεις υποστρώματος, στο ίδιο κυτταρικό περιβάλλον, μέσω υπερέκφρασης των γονιδίων αυτών από IPTG-επαγόμενα συστήματα. Με τον τρόπο αυτό, προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει ότι δύο από τα ομόλογα της *E. coli* (XanQ, XanP) λειτουργούν ως ειδικοί, υψηλής συγγένειας (5 μ M) συμμεταφορείς ξανθίνης:H⁺ (Karatza and Frillingos, 2005). Ένας από τους επιμέρους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθούν και τα υπόλοιπα ομόλογα NAT της *E. coli* και να συσχετισθούν, αν γίνεται, με κάποιο συγκεκριμένο μεταφερόμενο υπόστρωμα και λειτουργικό ρόλο. Από τα αποτελέσματά μας, προέκυψε ο διεξοδικός χαρακτηρισμός ενός ακόμη νέου μεταφορέα NAT από την *E. coli*, του YgfU, ο οποίος ευθύνεται για την πρόσληψη ουρικού από το βακτήριο αυτό, όπως θα δούμε στη συνέχεια.

3.2.1.1. Αρχικοί έλεγχοι υπερέκφρασης και ενεργότητας των ομολόγων (screening)

Όπως είπαμε, το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 περιέχει συνολικά 10 ομόλογα που ανήκουν στην οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2, τα οποία προβλέπεται ότι μπορεί να λειτουργούν ως μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων. Πρόκειται για τα γονίδια *xanP*, *xanQ*, *uraA*, *ygfU*, *yedG*, *ybbY*, *yjcD*, *yicO*, *yieG* και *ygfQ*. Από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, η XanQ και η XanP έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης (Karatza and Frillingos, 2005), η UraA φαίνεται να είναι μεταφορέας ουρακίλης (Andersen *et al.*, 1995), η YgfU αναφέρεται ως πιθανός μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού, η RutG

αναφέρεται ως πιθανός μεταφορέας ουρακίλης (Parales *et al.*, 2010) και οι υπόλοιπες (YbbY, YjcD, YicO, YieG, YgfQ) ως πιθανοί μεταφορείς ξανθίνης ή ουρακίλης (www.ecogene.org). Από τη φυλογενετική ταξινόμηση γονιδιακών προϊόντων που κωδικοποιούνται σε πλήρη γονιδιώματα και την κατάταξη τους σε ομάδες ορθόλογων πρωτεϊνών (Clusters of Orthologous Groups of proteins, COGs) 6 από τα 10 παράλογα που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2, τα XanQ, XanP, YgfU, RutG, YbbY και UraA τοποθετούνται στην ομάδα COG2233, και 4 παράλογα, τα YjcD, YgfQ, YicO και PurP τοποθετούνται στην ομάδα COG2252 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) δείχνει ότι οι XanQ, XanP, YgfU RutG και UraA διατηρούν την χαρακτηριστική αλληλουχία του μοτίβου «υπογραφή» [Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-T-[R/K/G] (Diallinas *et al.*, 1998, Karatza and Frillingos, 2005) (Εικόνα 3.22), και υποδεικνύει ότι η RutG είναι συγγενέστερη προς τον μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E. coli* (35% ταυτότητα καταλοίπων, 80% ταυτότητα στο μοτίβο) (Karatza and Frillingos, 2005).

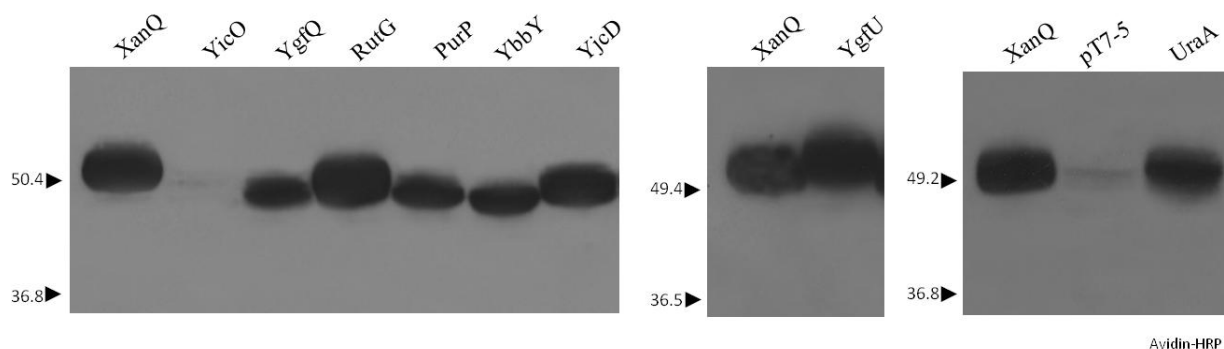
COG 2233	XanQ	324	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³³³	ξανθίνη (Karatza and Frillingos, 2005)
	XanP	336	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	G ³⁴⁵	42 % ξανθίνη (Karatza and Frillingos, 2005)
	YgfU	318	Q	N	V	G	L	V	S	V	T	R ³²⁷	30 %
	UraA	290	E	N	I	G	V	M	A	I	T	R ²⁹⁹	22 % ουρακίλη (Andersen <i>et al.</i> , 1995)
	RutG	309	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K ³¹⁸	21 % ουρακίλη ; (Parales <i>et al.</i> , 2010)
	YbbY	306	S	S	I	G	L	L	T	Q	T	G ³¹⁵	17 %
COG 2252	YgfQ	328	E	S	A	A	G	T	A	A	G	G ³³⁷	10 %
	YjcD	322	E	S	A	A	G	T	A	A	G	G ³³¹	12 %
	YicO	345	E	S	T	S	G	V	A	V	G	G ³⁵⁴	9 %
	PurP	318	E	S	S	S	G	V	S	V	G	G ³²⁷	11 %

Εικόνα 3.22. Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου NAT³²⁴QNXGXXXXTG³³³, των 10 NAT/NCS2 ομολόγων από την *E. coli*, των XanQ (P67444), XanP (P0AGM9), UraA (P0AGM7), YgfU (Q46821), RutG (P75892), YbbY (P77328), YgfQ (Q46817), YjcD (P0AF52), YicO (P31440) και PurP (P31466). Στα δεξιά φαίνεται το ποσοστό ταυτότητας με τον XanQ. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

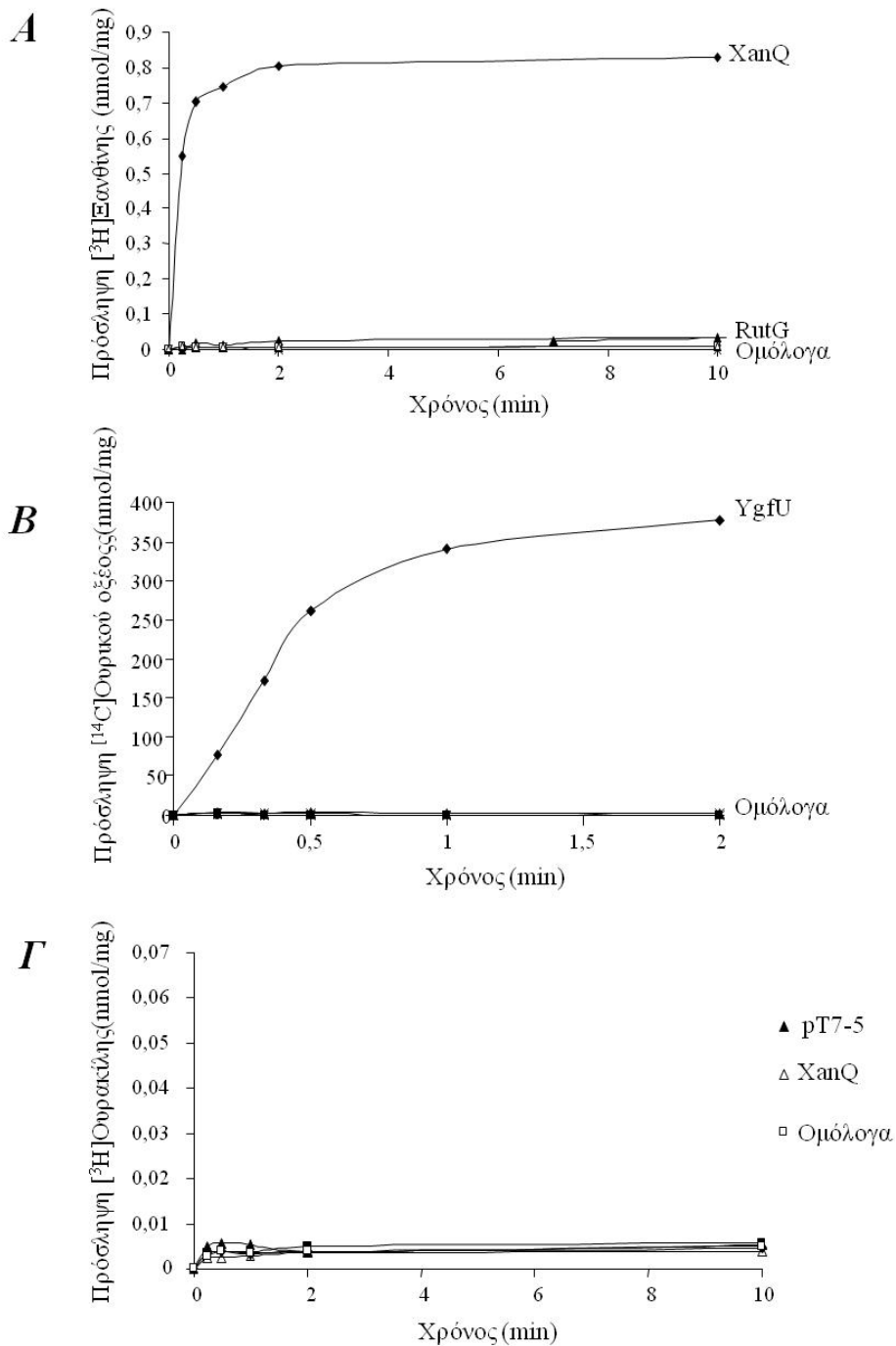
Έγινε λοιπόν κλωνοποίηση και προσπάθεια υπερέκφρασης και λειτουργικής μελέτης των 8 μελών της *E. coli* που δεν είχαν χαρακτηρησθεί επαρκώς ή και καθόλου έως σήμερα δηλ. των πιθανών μεταφορέων ουρακίλης RutG (Parales *et al.*, 2010) και UraA (Andersen *et al.*, 1995) και 6 γονιδίων για τα οποία δεν είχε υποδειχθεί κάποιος λειτουργικός ρόλος (YbbY, YgfQ, YgfU, YjcD, YicO, PurP).

Αυτά τα 8 γονίδια κινητοποιήθηκαν με PCR από το γονιδίωμα και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5, αφού ενσωματώθηκε στο C-τελικό άκρο ο επίτοπος BAD που επιτρέπει αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP (περιοχή δέσμευσης βιοτίνης της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae*) (Karatzas and Frillingos, 2005).

Έγινε μετασηματισμός σε κύτταρα T184 και επαγωγή των γονιδίων από τα αντίστοιχα πλασμίδια μέσω IPTG και ελέγχθηκε η έκφραση των γονιδιακών προϊόντων στη μεμβράνη. Υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη είχαν οι πιθανοί μεταφορείς YgfU, RutG, UraA, YjcD και YbbY, ενώ χαμηλή έκφραση είχαν οι YgfQ, και PurP και ελάχιστη έως μηδενική έκφραση ο YicO (Εικόνα 3.23). Ο έλεγχος για την ικανότητα μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος, [³H]ξανθίνης και [³H]ουρακίλης σε κύτταρα T184, έδειξε ότι από τους 7 πιθανούς μεταφορείς που εκφράζονται στη μεμβράνη, μόνο ο YgfU μεταφέρει ουρικό οξύ (Εικόνα 3.24A), ενώ σημαντική ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, στους 25 °C, εμφανίζει μόνο ο RutG, σε επίπεδα πάντως πολύ μικρότερα από αυτά του γνωστού μεταφορέα ξανθίνης XanQ (Εικόνα 3.24B). Τέλος δεν παρατηρείται ενεργός μεταφορά ουρακίλης από κανένα πιθανό μεταφορέα, ούτε από τους UraA και RutG (Εικόνα 3.24Γ). Η δυνατότητα πρόσληψης ουρακίλης που έχει προταθεί για τον UraA με βάση πειράματα λειτουργικής συμπλήρωσης (Andersen *et al.*, 1995) και για τον RutG με βάση ανάλυση του οπερονίου του αντίστοιχου γονιδίου (Loh *et al.*, 2006) μπορεί να οφείλεται σε ενεργότητα διευκολυνόμενης εισροής υποστρώματος (facilitated diffusion). Το θέμα αυτό εξετάζεται παρακάτω, στο εδάφιο 3.2.1.3.



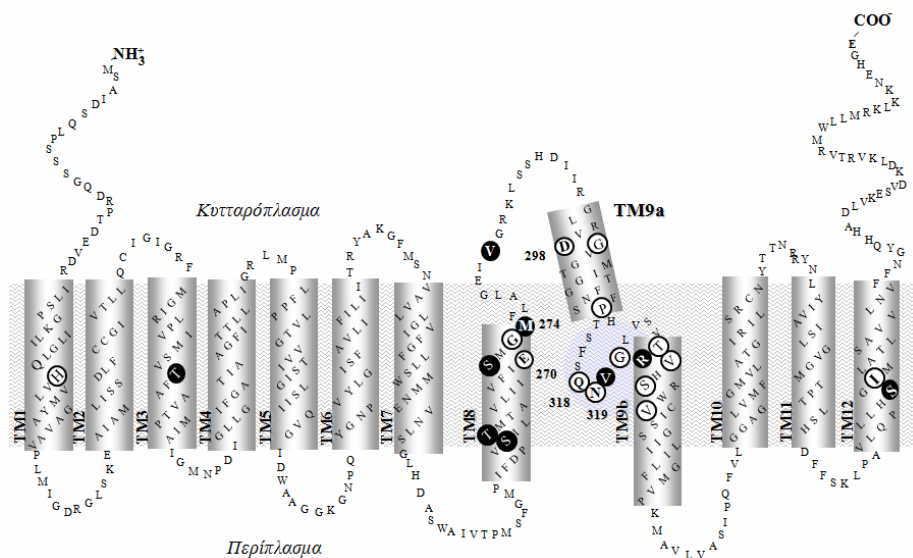
Εικόνα 3.23. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των ομολόγων NAT/NCS2 της *E. coli*, μετά από εξωχρωμοσωμική υπερέκφραση. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*x-BAD* συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να παρασκευασθούν κλάσματα κυτταροπλασματικών μεμβρανών και να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη. Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



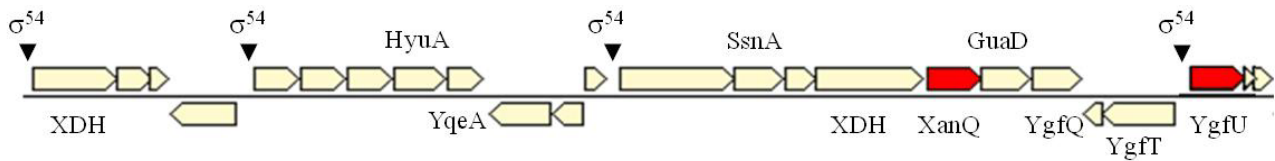
Εικόνα 3.24. Συγκριτική ανάλυση της ικανότητας πρόσληψης ξανθίνης (Α), ουρικού (Β) και ουρακίλης (Γ) από τα ομόλογα NAT/NCS2 της *E. coli*. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5 συνελήγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς (Α) [³H]ξανθίνης (1 μM), (Β) [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM) και (Γ) [³H]ουρακίλης (1 μM) στους 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Ομόλογα = όλα τα υπόλοιπα υπόλοιπα εκτός από αυτά που αναφέρονται ολογράφως σε κάθε περίπτωση.

3.2.1.2. Εκτενέστερος λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα YgfU

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα, φαίνεται ότι ο YgfU μπορεί να λειτουργεί στην *E. coli* ως ειδικός μεταφορέας ουρικού οξέος. Με βάση την αλληλουχία, ο YgfU αποτελείται από 482 κατάλοιπα και έχει ταυτότητα 30% με τον XanQ. Επίσης τα γονίδια των XanQ και YgfU βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους στο γονιδίωμα της *E. coli* καθώς επίσης και με γονίδια αφυδρογονασών της ξανθίνης (XDH), γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να αποτελούν μέρος ενός γενετικού συστήματος αξιοποίησης πουρινών (Εικόνα 3.26). Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών δείχνει ότι από τις 23 θέσεις που έχουν προσδιορισθεί ως «σημαντικές» με βάση την ανάλυση μεταλλαξιγένεσης του XanQ (βλ. Εισαγωγή), οι 14 συντηρούν την ίδια πλευρική ομάδα και στον YgfU (61%) και μόνο 9 διαφέρουν (Εικόνα 3.25). Εξάλλου, προηγούμενες μελέτες (Karatza *et al.*, 2006, Koukaki *et al.*, 2005, Goudela *et al.*, 2006) έχουν αποδείξει ότι τα 2 τελευταία κατάλοιπα του μοτίβου «υπογραφή», Thr και Gly/Arg/Lys, είναι σημαντικά για την εξειδίκευση του μεταφορέα. Όσον αφορά το τελευταίο κατάλοιπο, συντηρείται ως Gly σε μεταφορείς ξανθίνης (XanQ, XanP, PbuX) και ως Arg ή Lys σε μεταφορείς ουρικού οξέος (PucK, PucJ) ή ουρικού οξέος/ξανθίνης της οικογένειας NAT (UapA, UapC, Xut1, Lpe1). Στον YgfU στην αντίστοιχη θέση βρίσκεται ένα κατάλοιπο αργινίνης, οπότε θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι ο YgfU είναι μεταφορέας ουρικού οξέος ή ουρικού οξέος/ξανθίνης, κάτι που από τα αρχικά πειράματα φαίνεται να υποστηρίζεται.



Εικόνα 3.25. Μοντέλο εργασίας του YgfU. Τονισμένες με άσπρο φόντο φαίνονται οι θέσεις που έχουν βρεθεί ότι είναι σημαντικές στον XanQ και διατηρούνται στον YgfU, και με μαύρο οι θέσεις που έχουν βρεθεί σημαντικές στον XanQ και διαφέρουν στον YgfU.



Εικόνα 3.26. Εικόνα που δείχνει τη θέση 65min του γονιδιώματος της *E. coli*.

XDH: Αφυδρογονάση ξανθίνης (Xi *et al.*, 2000)

XanQ: Μεταφορέας ξανθίνης (Karatza and Frillingos, 2005)

YgfU: Μεταφορέας ουρικού (Παρούσα εργασία)

YgfQ: Πιθανός NAT μεταφορέας (EcoGene)

YgfT: Ομόλογο αφυδρογονάσης μυρμηκικού (Βλ. Συζήτηση)

GuaD: Απαμινάση γουανίνης (Maynes *et al.*, 2000)

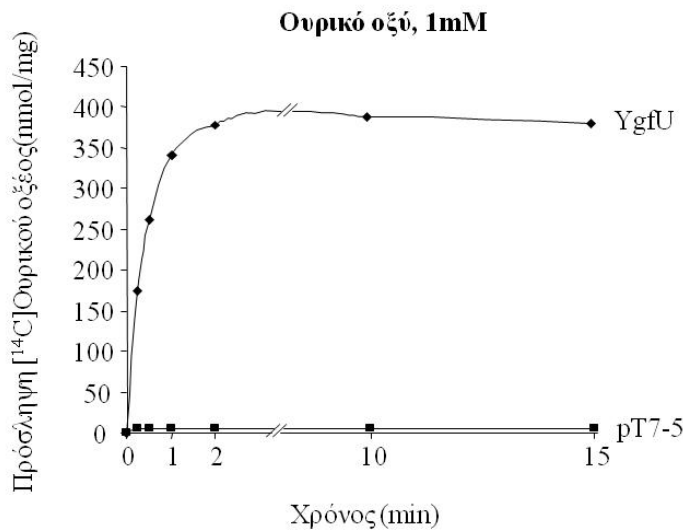
SsnA: Πιθανή αλλαντοϊνάση (Xi *et al.*, 2000)

YqeA: Πιθανή κινάση καρβαμυλικού (Xi *et al.*, 2000)

HyuA: Πιθανή αλλαντοϊνάση (Xi *et al.*, 2000)

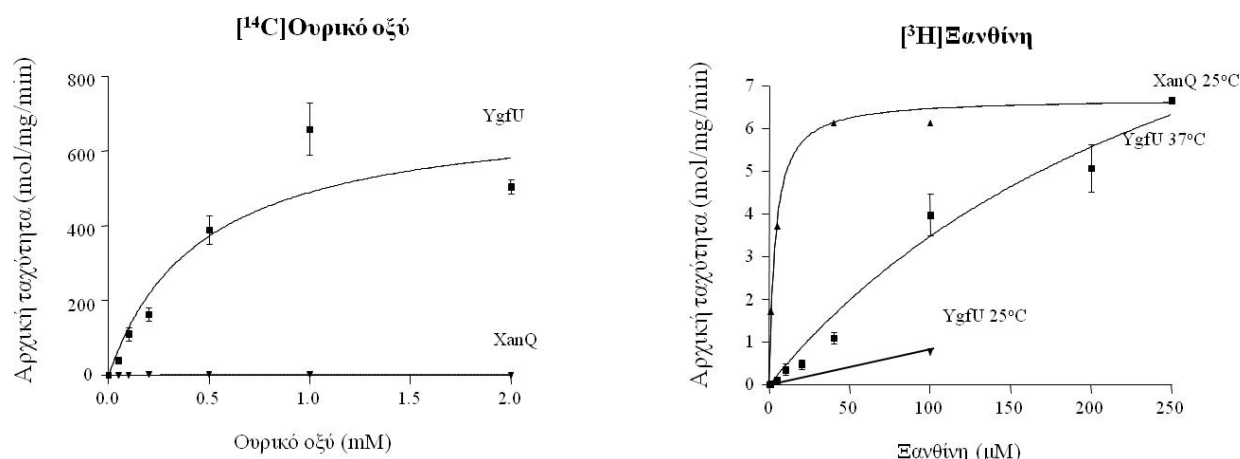
σ^{54} : Πιθανοί υποκινητές (Xi *et al.*, 2000)

Στη συνέχεια, ο μεταφορέας YgfU εξετάστηκε διεξοδικά ως προς την ικανότητα ενεργού μεταφοράς, σε εύρος συγκεντρώσεων των πιθανών υποστρωμάτων [³H]ξανθίνης (0.1-100 μ M) ή [¹⁴C]ουρικού (0.04 - 2mM). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο YgfU φαίνεται ότι μεταφέρει [¹⁴C]ουρικό οξύ (1 mM) στους 25 °C, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με πειράματα χρονικής προόδου της αντίδρασης μεταφοράς για μεγαλύτερους χρόνους, όπου βρέθηκε ότι η αρχική ταχύτητα πρόσληψης ουρικού (5-30 sec) είναι $610 \pm 120 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης (τα οποία επιτυγχάνονται στα 2-15 min) είναι $381 \pm 4 \text{ nmol/mg}$ δηλ. αντιστοιχούν σε δημιουργία διαβάθμισης συγκέντρωσης ουρικού 128-φορές μεγαλύτερη στο εσωτερικό του κυττάρου απ'ότι στο εξωτερικό, λαμβάνοντας υπ'όψιν ότι ο εσωτερικός όγκος των κυττάρων *E. coli* είναι 5.8 μ L/mg ολικής πρωτεΐνης. Άρα πρόκειται για πρωτεΐνη ενεργού μεταφοράς που επιτρέπει τη συσσώρευση του υποστρώματος αντίθετα προς τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης. (**Εικόνα 3.27**). Η δοκιμασία μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μ M) στους 25 °C και 37 °C δείχνει πρόσληψη ξανθίνης σε αμελητέα επίπεδα, ενώ μόνο σε συγκέντρωση [³H]ξανθίνης 100 μ M και στους 37 °C παρατηρείται μεταφορά σε ανιχνεύσιμα επίπεδα (**Εικόνα 3.28**).



Εικόνα 3.27. Ενεργότητα πρόσληψης ουρικού οξέος σε κύτταρα *E. coli* που υπερεκφράζουν τον YgfU. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση του YgfU από πλασμίδιο pT7-5/ygfU-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM), στους 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση.

Η κινητική ανάλυση μεταφοράς υποστρώματος δείχνει ότι στους 25 °C, ο YgfU μεταφέρει ουρικό με σχετικά χαμηλή συγγένεια (K_m 0.5 ± 0.1 mM) και υψηλή ικανότητα μεταφοράς (V_{max} 715 ± 81 nmol.mg⁻¹.min⁻¹), και στους 37 °C, έχει ανιχνεύσιμη ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης, με σχετικά χαμηλή V_{max} (14.0 ± 4.3 nmol.mg⁻¹.min⁻¹) και χαμηλή συγγένεια (K_m 0.3 ± 0.1 mM) (**Εικόνα 3.27, Πίνακας 3.7**). Οι αντίστοιχες τιμές συγγένειας υποστρώματος τόσο για τον XanQ, τον κύριο μεταφορέα ξανθίνης της *E. coli*, όσο και τον XanP, που εμφανίζει πολύ πιο χαμηλά επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας, είναι πολύ υψηλότερες (K_m 3 με 5 μM) (Karatzá and Frillingos, 2005). Πειράματα ανταγωνισμού της μεταφοράς ουρικού οξέος από άλλες φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα πουρινών δεν οδήγησαν σε ασφαλή συμπεράσματα, λόγω της χαμηλής συγγένειας δέσμευσης/μεταφοράς ουρικού. Συνοπτικά, φαίνεται ότι ο μεταφορέας YgfU μπορεί να μεταφέρει, με σχετικά χαμηλή συγγένεια (0.3 έως 0.5 mM), τόσο ουρικό όσο και ξανθίνη, αλλά είναι εξειδικευμένος κυρίως για τη μεταφορά ουρικού. Η φυσιολογική σημασία αυτής της ενεργότητας για την κυτταρική λειτουργία των εντεροβακτηρίων, δεδομένου μάλιστα ότι το ουρικό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί καταβολικά από την *E. coli* ως πηγή ενέργειας (Karatzá and Frillingos, 2005), αποτελεί ένα ενδιαφέρον ερώτημα προς περαιτέρω διερεύνηση.



Εικόνα 3.28. Σύγκριση της κινητικής μεταφοράς υποστρώματος μεταξύ των μεταφορέων YgfU και XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση της υπό μελέτης περμεάσης από πλασμίδια pT7-5/*ygfU*-BAD και pT7-5/*xanQ*-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος και [³H]ξανθίνης, σε εύρος συγκεντρώσεων που φαίνεται στην εικόνα, στους 25 °C και στους 37 °C, αντίστοιχα. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 15, 30 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Φαίνονται οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	Ξανθίνη	
		V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
XanQ (wt) (25 °C)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
YgfU (37 °C)	300 ± 90	14 ± 4	46
YgfU (25 °C)	nd	nd	
Περμεάση	K_m (mM)	Ουρικό οξύ	
		V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
YgfU	0.5 ± 0.1	715 ± 81	1430
XanQ (wt)	nd	nd	

Πίνακας 3.7. Τιμές K_m και V_{max} των XanQ και YgfU για ξανθίνη και για ουρικό οξύ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (0,1 - 250 μM) στους 25 °C και τους 37 °C, και μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (0.05 - 2 mM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V_0) προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Τα K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.2.1.3. Εκτενέστερη μελέτη του μεταφορέα RutG και σύγκριση με τον UraA

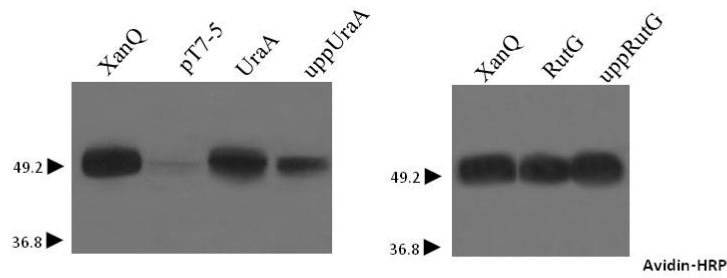
Από τα αποτελέσματα της αρχικής ανάλυσης των ομολόγων της *E. coli* φάνηκε ότι ο μεταφορέας RutG μπορεί να μεταφέρει ξανθίνη. Ωστόσο, ο RutG έχει προταθεί στη βιβλιογραφία ότι μεταφέρει ουρακίλη. Συγκεκριμένα, φαίνεται να συμμετέχει σε ένα οπερόνιο *rut* (*pyrimidine utilization*) στην *E. coli* για τη μεταβολική αξιοποίηση πυριμιδινών (Loh *et al.*, 2006; Parales *et al.*, 2010) και προτείνεται ότι είναι μεταφορέας ουρακίλης λόγω της συγγένειας της αλληλουχίας του, και ειδικότερα της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», με τον μεταφορέα UraA που είχε αναφερθεί ως μεταφορέας ουρακίλης (Andersen *et al.*, 1995). Γι'αυτούς τους λόγους προχωρήσαμε σε μια εκτενέστερη μελέτη του RutG.

Αρχικά έγινε κινητική ανάλυση για τη μεταφορά ξανθίνης. Βρέθηκε ότι ο RutG είναι μεταφορέας ξανθίνης χαμηλής συγγένειας, με K_m 0.15 mM, δηλαδή 30 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του XanQ (Πίνακας 3.8). Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την πιθανότητα ο RutG να είναι και μεταφορέας ουρακίλης, χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις [³H]ουρακίλης 1-100 μM και διαφορετικές συνθήκες στη δοκιμασία μεταφοράς.

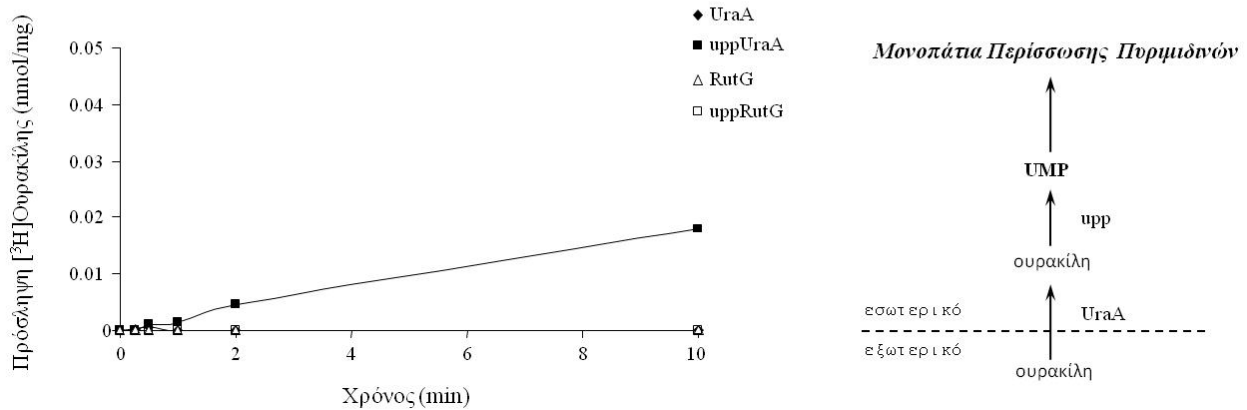
Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι τα πειράματα που υποδεικνύουν ότι ο UraA είναι μεταφορέας ουρακίλης (Andersen *et al.*, 1995) είχαν στηριχτεί αποκλειστικά σε μελέτες σταδιακής απενεργοποίησης γονιδίων της *E. coli* και ότι η ενεργότητα πρόσληψης ουρακίλης είχε μετρηθεί σε στελέχη *E. coli* που περιείχαν μια μεγάλη γονιδιωματική περιοχή που περιλαμβάνει τόσο το γονίδιο *uraA* όσο και το γειτονικό του (ανοδικά) γονίδιο *urp*. Η παρουσία του *urp* μαζί με το *uraA* φαινόταν να είναι απαραίτητη για τη μεταφορά ουρακίλης, γιατί όταν απενεργοποιείτο γενετικά το *urp*, χανόταν η ενεργότητα μεταφοράς ουρακίλης από τα *uraA*⁺ στελέχη. Το γονίδιο *urp* κωδικοποιεί για το ένζυμο Upp (φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση της ουρακίλης), το οποίο φαίνεται να καταναλώνει την προσλαμβανόμενη ουρακίλη προωθώντας την στην οδό περίσωσης πυριμιδινών (Andersen *et al.*, 1995) (Εικόνα 3.29). Κατά συνέπεια, προκαλείται μια συνεχής «εξαφάνιση» του υποστρώματος στο εσωτερικό του κυττάρου, που διατηρεί συνεχώς μια διαβάθμιση συγκέντρωσης από το εξωτερικό προς το εσωτερικό, δηλαδή συνθήκες παθητικής μεταφοράς (διευκολυνόμενης διάχυσης).

Για να εξετασθούν λοιπόν τόσο η πιθανότητα ενεργού μεταφοράς όσο και αυτή της διευκολυνόμενης διάχυσης ουρακίλης από τον RutG, σε σύγκριση με τον UraA, δημιουργήθηκαν και αναλύθηκαν κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν είτε μόνο τον UraA ή τον RutG είτε τους ίδιους μεταφορείς συγχρόνως με το ένζυμο Upp (από πλασμίδια pT7-5/*urp-rutG-BAD* και pT7-5/*urp-uraA-*

BAD). Τα κύτταρα αυτά εξετάστηκαν για την έκφραση των UraA ή RutG και την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης και ουρακίλης. Βρέθηκε ότι, όταν εκφράζεται μαζί με το Upp, ο μεταφορέας UraA (θα αναφέρεται uppUraA) εκφράζεται στη μεμβράνη σε χαμηλότερα επίπεδα από τον UraA, ενώ ο μεταφορέας RutG που εκφράζεται μαζί με το Upp (θα αναφέρεται uppRutG) εκφράζεται στη μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα, παρόμοια με τον XanQ, τον UraA και τον RutG (**Εικόνα 3.29**). Ο uppUraA μεταφέρει ουρακίλη (1 μM) σε χαμηλά επίπεδα, κάτι το οποίο ίσως οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης, αλλά ο uppRutG δε φαίνεται να μεταφέρει καθόλου ουρακίλη (1 μM). Επίσης, ούτε ο UraA ούτε ο RutG μεταφέρουν ουρακίλη σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, όταν δεν έχουν εκφραστεί μαζί με το Upp (**Εικόνα 3.29**). Παρόμοια αποτελέσματα πήραμε και όταν μετρήσαμε τη δυνατότητα πρόσληψης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ουρακίλης (100 μM). Αντίθετα, στη δοκιμασία πρόσληψης ξανθίνης, φαίνεται ότι ούτε ο uppUraA ούτε ο UraA μεταφέρουν αυτό το υπόστρωμα (σε συγκεντρώσεις 1 μM και 100 μM), ενώ ο RutG έχει παρόμοια ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης (συγκεντρώσεις 1 μM και 100 μM) ανεξάρτητα αν εκφράζεται μόνος του (RutG) ή μαζί με τον Upp (uppRutG) (**Εικόνα 3.30**).



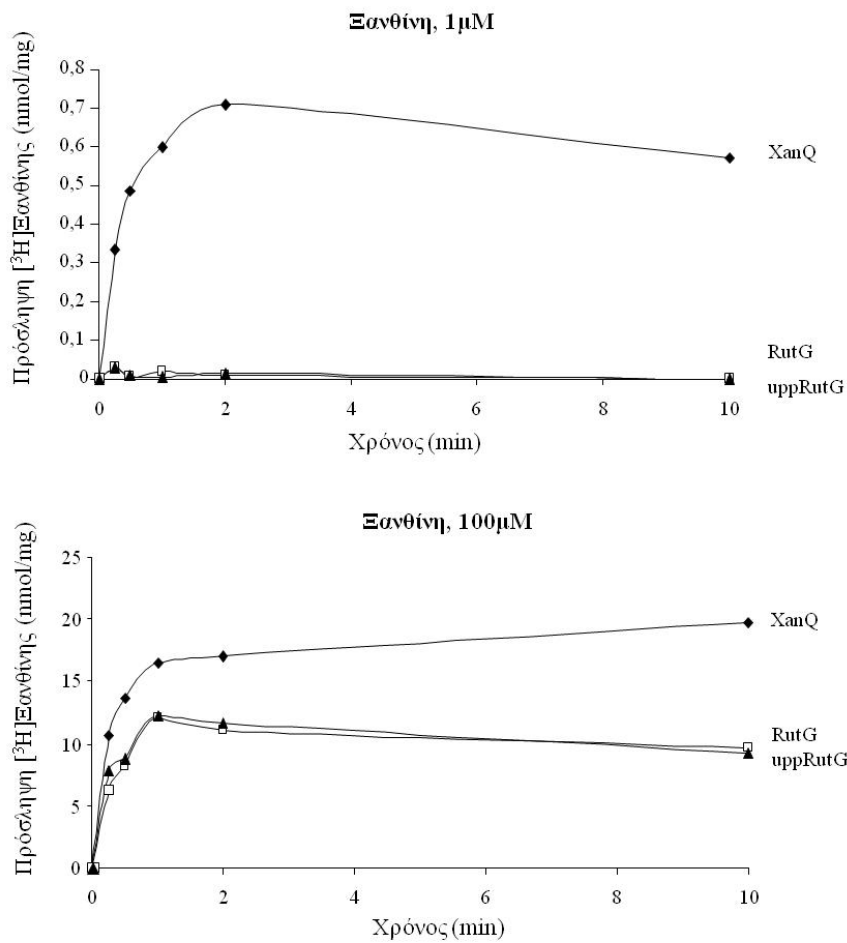
Ουρακίλη, 1μM



Εικόνα 3.29. Ανάλυση έκφρασης και ενεργότητας των UraA, uppUraA, RutG και uppRutG. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των UraA και RutG από τα πλασμίδια pT7-5/*uraA-BAD* (UraA), pT7-5/*upp-uraA-BAD* (uppUraA), pT7-5/*rutG-BAD* (RutG) ή pT7-5/*upp-rutG-BAD* (uppRutG) συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (πάνω) ή η ενεργότητα πρόσληψης ουρακίλης (κάτω). Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία μεταφοράς [³H]ουρακίλης (1 μM), στους 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Στα δεξιά φαίνεται η πιθανή τύχη της ουρακίλης μετά την πρόσληψή της από τον μεταφορέα UraA, με συμμετοχή του ενζύμου Upp που προωθεί την ουρακίλη στο μονοπάτι περίσωσης πυριμιδινών.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
XanQ (wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
RutG	146 ± 84	18.2 ± 5.6	124

Πίνακας 3.8. Τιμές K_m και V_{max} του RutG και σύγκριση με τον XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τους μεταφορείς υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (0,1 - 100 μM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V_0) προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



Εικόνα 3.30. Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης σε κύτταρα *E. coli* που υπερεκφράζουν τον RutG (ή uppRutG) και σύγκριση με τον XanQ και τον UraA (ή uppUraA). Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*-BAD, pT7-5/*rutG*-BAD (RutG), pT7-5/*upp-rutG*-BAD (uppRutG), pT7-5/*uraA*-BAD (UraA) ή pT7-5/*upp-uraA*-BAD (uppUraA) συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM, 100 μM), στους 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές για τον UraA ή τον uppUraA ήταν αμελητέες (ίσες ή μικρότερες του αρνητικού μάρτυρα) σε κάθε περίπτωση.

3.2.2. Κλωνοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός ομολόγων του XanQ από το συμβιωτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* SM1021

Γονίδια για πιθανούς μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 βρίσκονται σε όλες τις κατηγορίες οργανισμών και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στα Βακτήρια, όπου υπάρχουν στη μεγάλη πλειοψηφία των ειδών Βακτηρίων (βλ. Εισαγωγή). Μάλιστα, εμφανίζουν συχνά σποραδικά μοτίβα κατανομής στα βακτηριακά γονιδιώματα δηλ. απαντώνται έντονες διαφορές ακόμα και στον αριθμό των αντίστοιχων ομολόγων ανάμεσα στα γονιδιώματα στενά συγγενικών οργανισμών. Τέτοιες διαφορές κατά την εξέλιξη μπορεί να συνδέονται με συγκεκριμένες οικολογικές προσαρμογές ή διαφορές φυσιολογίας, που θα μπορούσαν να μας δώσουν υποδείξεις για καινούργια γονίδια και για τον λειτουργικό-φυλογενετικό τους ρόλο (Boussau and Daubin, 2010).

Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα είναι η διαφορετική κατανομή ομολόγων NAT που υπάρχει ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αζωτοδεσμευτικών ριζοβακτηρίων των ψυχανθών, μια ομάδα μικροοργανισμών που δεν έχουν μελετηθεί καθόλου ως προς το μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων (Flemetakis *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα, με βάση όσα γνωρίζουμε από τις αναλύσεις των γονιδιωμάτων τους, βλέπουμε ότι τα γονίδια NAT περιορίζονται σε ριζοβακτήρια που επάγουν στα φυτά το σχηματισμό μη-καθορισμένων φυματίων (με συνεχή μεριστωματική δραστηριότητα, και όλα τα διαδοχικά στάδια συμβιωτικής αλληλεπίδρασης σε διακριτές ζώνες ανάπτυξης), όπως είναι το *Sinorhizobium meliloti*, με 4 γονίδια για πιθανούς μεταφορείς NAT/NCS2 και 1 για NCS1 (**Πίνακας 3.9**). Ριζοβακτήρια που σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια (όπου η μεριστωματική δραστηριότητα περιορίζεται χρονικά στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του συμβιοσώματος), όπως βακτήρια των γενών *Mesorhizobium* και *Rhizobium*, δεν διαθέτουν καθόλου ομόλογα της οικογένειας NAT στο γονιδιώμα τους (**Πίνακας 3.9**). Θα ήταν λοιπόν ενδιαφέρον να χαρακτηριστούν λειτουργικά τα γονίδια NAT που συναντάμε στο *Sinorhizobium meliloti* (Q92X28, Q92WQ0, Q92LL9, Q92LL8).

Ριζοβακτήριο	Αριθμός ομολόγων των οικογενειών:	
	NCS1	NAT/NCS2
ΕΙΔΗ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΥΝ ΜΗ-ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΑ ΦΥΜΑΤΙΑ		
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	0	3
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0	2
<i>Bradyrhizobium sp. bTAi1</i>	0	1
<i>Bradyrhizobium sp. ORS278</i>	0	1
<u>Sinorhizobium meliloti</u>	1	4
<i>Sinorhizobium medicae</i>	1	3
ΕΙΔΗ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΥΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΑ ΦΥΜΑΤΙΑ		
<u>Mesorhizobium loti</u>	1	0
<i>Mesorhizobium sp. BNC1</i>	2	0
<i>Rhizobium etli sp. CFN42</i>	1	0
<i>Rhizobium etli sp. CIAT652</i>	1	0
<i>R. leguminosarum bv.trifolii</i>	1	0
<i>R. leguminosarum bv.viciae</i>	1	0
<i>R. leguminosarum sp. NGR234</i>	1	0

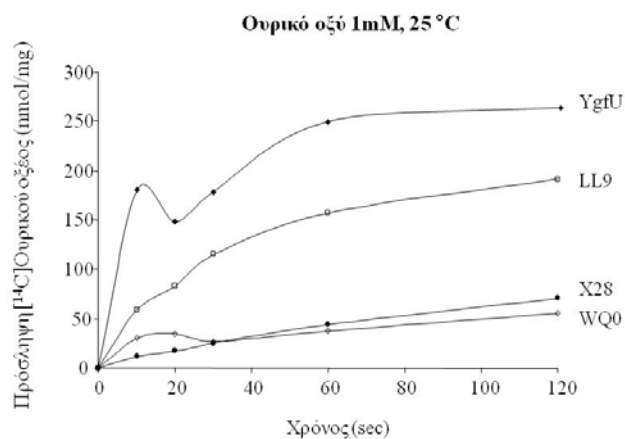
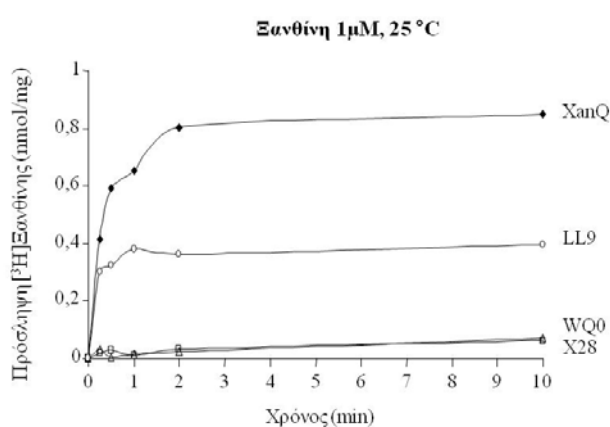
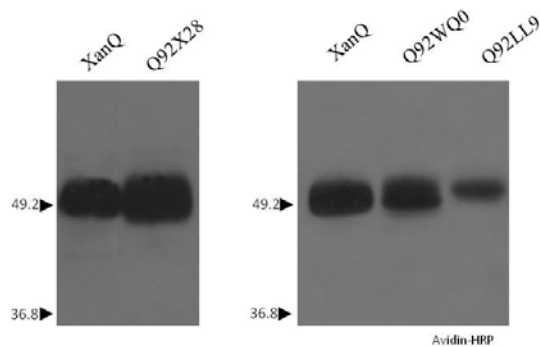
Πίνακας 3. 9. Κατανομή και αριθμός γονιδίων της οικογένειας NAT/NCS2 καθώς και άλλων γονιδίων πιθανών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων (οικογένειας NCS1) στα 13 προσδιορισμένα γονιδιώματα ριζοβακτηρίων (Joint Genome Institute / Integrated Microbial Genomes). Τα δύο είδη που υπογραμμίζονται αποτελούν οργανισμούς-μοντέλα για τα συμβιωτικά φυμάτια των δύο βασικών τύπων (μη καθορισμένα ή καθορισμένα φυμάτια).

XanQ_ <i>E. coli</i>	324	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³³³	
Q92LL9_ <i>S. meliloti</i>	310	Q	N	V	G	L	V	A	V	T	G ³¹⁹	27 %
Q92X28_ <i>S. meliloti</i>	316	Q	N	V	G	L	L	Q	I	T	R ³²⁵	27 %
Q92WQ0_ <i>S. meliloti</i>	307	E	N	V	G	I	V	R	A	T	N ³¹⁶	22 %

Εικόνα 3.31. Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου NAT³²⁴QNXGXXXXTG³³³, μεταξύ του μεταφορέα XanQ (P67444) και τριών NAT/NCS2 ομολόγων από το ριζοβακτήριο *S. meliloti* SM1021 δηλ. των Q92LL9 (LL9), Q92X28 (X28) και Q92WQ0 (WQ0). Στα δεξιά φαίνεται το ποσοστό ταυτότητας με τον XanQ. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

Τρία γονίδια από τα ομόλογα NAT κινητοποιήθηκαν με PCR από το γονιδίωμα του *S. meliloti* SM1021 (γονιδιωματικό DNA μας παραχωρήθηκε από τον Εμμανουήλ Φλεμετάκη, από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας). Τα τρία αυτά γονίδια (Q92X28, Q92WQ0, Q92LL9) μας κινούν το ενδιαφέρον γιατί είναι συγγενικά προς τον XanQ (**Εικόνα 3.31**) αλλά δεν εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας με ομόλογα NAT που συναντάμε σε ριζοβακτήρια άλλων γενών εκτός του *Sinorhizobium*. Έπειτα από εισαγωγή της δομικής περιοχής δέσμευσης βιοτίνης (biotin-acceptor domain) στο C-τελικό άκρο, τα 3 γονίδια κλωνοποιήθηκαν σε

πλασμιδιακό φορέα pT7-5 και επιβεβαιώθηκε η αλληλουχία τους. Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* T184, όπου έγινε έλεγχος για τα επίπεδα της ετερόλογης έκφρασης των ομολόγων στη μεμβράνη της *E. coli* και για τη μεταφορά ξανθίνης, ουρικού οξέος και ουρακίλης. Βρέθηκε ότι τα ομόλογα Q92X28 και Q92WQ0 εκφράζονται στη μεμβράνη των T184 σε υψηλά επίπεδα, συγκρίσιμα με του μεταφορέα XanQ της *E. coli*, ενώ ο Q92LL9 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα (**Εικόνα 3.32**). Πειράματα ενεργού μεταφοράς πρόσληψης υποστρωμάτων και κινητικής ανάλυσης αποκάλυψαν ότι ο Q92LL9 (LL9) αποτελεί μεταφορέα τόσο ξανθίνης (υψηλής συγγένειας, K_m 7.3 ± 3.0 μM , V_{\max} 19.8 ± 3.2 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) όσο και ουρικού (υψηλής ενεργότητας, αλλά σχετικά χαμηλής συγγένειας, K_m 0.9 ± 0.3 mM , V_{\max} 447 ± 37 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Αντίθετα, οι Q92X28 (X28) και Q92WQ0 (WQ0) είναι αποκλειστικά μεταφορείς ουρικού, χαμηλής συγγένειας (για το X28, K_m 0.6 ± 0.1 mM , V_{\max} 58 ± 13 $\text{nmol}/\text{mg}/\text{min}$, για το WQ0, K_m 0.5 ± 0.2 mM , V_{\max} 44 ± 2 $\text{nmol}/\text{mg}/\text{min}$) και δε μεταφέρουν ξανθίνη (**Πίνακας 3.10**). Κανένα από τα 3 ομόλογα δε βρέθηκε να μεταφέρει ουρακίλη.



Εικόνα 3.32. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας για τις ομόλογες πρωτεΐνες από το *Sinorhizobium meliloti*.

Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5 που φέρουν τα γονίδια, συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (*πάνω*) ή η ενεργότητα (*κάτω*). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραίωση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, και [¹⁴C]ουρικού οξέος, στους 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση.

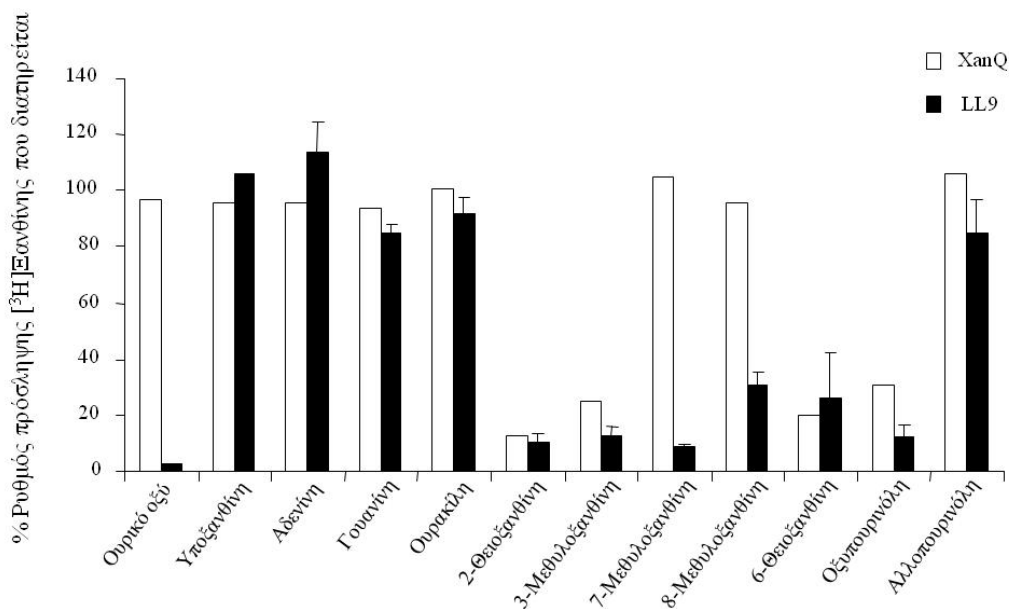
Περμεάση	K_m (μM)	Ξανθίνη	
		V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
XanQ (wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
YgfU	nd	nd	
LL9	7.3 ± 3	19.8 ± 3.2	2712
X28	nd	nd	
WQ0	nd	nd	

Περμεάση	K_m (mM)	Ουρικό οξύ	
		V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
YgfU	0.5 ± 0.1	715 ± 81	1430
XanQ	nd	nd	
LL9	0.9 ± 0.3	447 ± 37	496
X28	0.6 ± 0.1	58 ± 13	96
WQ0	0.5 ± 0.2	44 ± 2	88

Πίνακας 3.10. Τιμές K_m και V_{max} του XanQ, του YgfU και των ομόλογων από το *Sinorhizobium meliloti* SM1021 για ξανθίνη και για ουρικό οξύ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (0.1 - 100 μM) στους 25 °C, και μεταφοράς [^{14}C]ουρικού οξέος (0.05 - 1mM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. Οι τιμές για τα X28 και WQ0 δεν προσδιορίστηκαν για την ξανθίνη λόγω χαμηλών τιμών.

Από τα παραπάνω πειράματα, φάνηκε ότι και τα τρία ομόλογα μεταφέρουν ουρικό οξύ (με χαμηλή συγγένεια) αλλά μόνο ο μεταφορέας LL9 είναι υψηλής συγγένειας και υψηλής ενεργότητας μεταφορέας ξανθίνης, άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πειράματα ανταγωνισμού από ανάλογα υποστρώματος. Για να διαπιστωθεί λοιπόν το προφίλ της εξειδίκευσης του LL9, ακολούθησαν πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [^3H]ξανθίνης (1 μM) από μια σειρά πιθανών προσδετών. Στα πειράματα που ο προσδέτης προστίθεται σε μεγάλη περίσσεια (1 mM, 1000 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από το σημασμένο υπόστρωμα) (Εικόνα 3.33), φάνηκε ότι ο LL9 έχει διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης από τον XanQ, κυρίως γιατί αναγνωρίζει πολύ καλά όλα τα ανάλογα που διαφέρουν από τη ξανθίνη στις θέσεις 7 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου (7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, ουρικό, οξυπουρινόλη) (Πίνακας 3.11). Ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1 μM έως 1 mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} και εξ αυτών οι τιμές K_i . Προκύπτει ότι, σε σχέση με τον XanQ, ο LL9 αναγνωρίζει με χαμηλότερη συγγένεια την 6-θειοξανθίνη (τριπλάσιο K_i) αλλά έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την 3-μεθυλοξανθίνη

(υποτριπλάσιο K_i), ενώ αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια τρία υποστρώματα ή προσδέτες που δεν αναγνωρίζονται από τον XanQ, δηλαδή το ουρικό οξύ (K_i 15 μ M) και τα ανάλογα 7-μεθυλοξανθίνη (K_i 162 μ M) και 8-μεθυλοξανθίνη (K_i 176 μ M).



Εικόνα 3.33. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα LL9. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση της περμεάσης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H]ξανθίνης (1 μ M) στους 25 $^{\circ}$ C μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (V_0) προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Ανταγωνιστής	K_i (μM)	
	XanQ(wt)	LL9
Ουρικό οξύ	>1000	15
2- Θειοξανθίνη	91	99
3- Μεθυλοξανθίνη	72	26
6- Θειοξανθίνη	41	140
7- Μεθυλοξανθίνη	>1000	162
8- Μεθυλοξανθίνη	>1000	176
Οξυπουρινόλη	53	39

Πίνακας 3.11. Τιμές K_i του μεταφορέα LL9 για μια σειρά αναλόγων ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1 μM – 1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} από 3 πειράματα εξήχθησαν με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης. Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ του XanQ και του LL9 παρουσιάζονται με έντονα γράμματα.

3.2.3. Λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός θερμόφιλου και ενός ψυχρόφιλου μεταφορέα NAT

Ένα μειονέκτημα στη μελέτη των μεταφορέων της οικογένειας NAT είναι ότι δεν υπάρχει ακόμα κάποιο αναλυτικό πρότυπο δομής από κρυσταλλογραφία και δεν έχουμε δεδομένα σε υψηλή ευκρίνεια για το μηχανισμό. Μέσω συνεργασιών του εργαστηρίου μας, υπάρχει ενδιαφέρον για κρυστάλλωση ομολόγων του XapQ που προέρχονται από θερμόφιλους οργανισμούς και αναμένεται γενικά να εμφανίζουν μεγαλύτερη διαμορφωτική σταθερότητα σε μέσες θερμοκρασίες, το οποίο αποτελεί πλεονέκτημα σε διαδικασίες κρυστάλλωσης, ιδιαίτερα προκειμένου περί μεμβρανικών μεταφορέων (Stroud *et al.*, 2009). Επίσης, δυνητικά ομόλογα από ψυχρόφιλους οργανισμούς προσφέρουν το πλεονέκτημα ότι μελέτη ανάπτυξης και λειτουργικής ανάλυσης μπορεί να γίνει σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, όπου ελαχιστοποιείται η δράση άλλων πιθανών συστημάτων μεταφοράς με επικαλυπτόμενες εξειδικεύσεις (Conde *et al.*, 2010).

Για τους λόγους αυτούς, επιχειρήθηκε κλωνοποίηση, υπερέκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των δύο πιο συγγενικών ομολόγων του XapQ που προέρχονται από έναν θερμόφιλο και έναν ψυχρόφιλο μικροοργανισμό (**Εικόνα 3.34**). Πρόκειται για το ομόλογο MoorT από το μη παθογόνο κλοστρίδιο *Moorella thermoacetica* (MoorT), που αναπτύσσεται βέλτιστα σε 60 °C και pH 6.0 (Drake and Daniel, 2004), και το ομόλογο PsychT από το ψυχρόφιλο γ-πρωτεοβακτήριο *Psychrobacter cryohalolentis* K5 (PsychT), που αναπτύσσεται βέλτιστα σε 22 °C, αλλά αυξάνεται και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (έως -10 °C) και είναι ανθεκτικό σε υψηλή αλατότητα (έως 1.7 M NaCl) (Bakermans and Nealson, 2004).

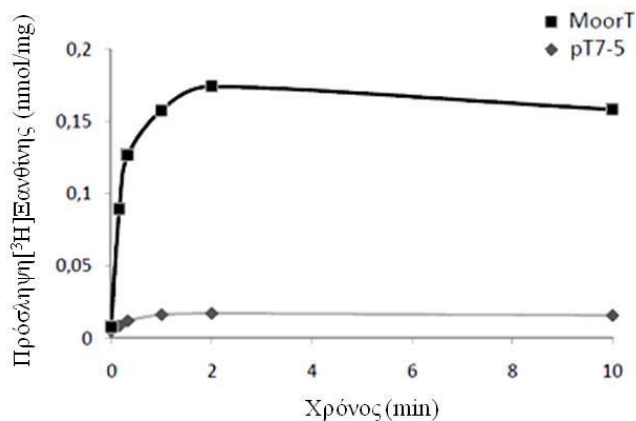
Μετά την κινητοποίηση των ομολόγων από το αντίστοιχο γονιδιωματικό DNA, εισαγωγή της δομικής περιοχής δέσμευσης βιοτίνης (BAD) στο C-τελικό άκρο, και κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5, επιβεβαίωση της αλληλουχίας και μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* XL1-Blue και/ή T184, έγιναν έλεγχοι για μεταφορά ξανθίνης, ουρικού οξέος και ουρακίλης, σε ένα εύρος θερμοκρασιών και pH.

XanQ_ <i>E. coli</i>	324	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³³³	
MoorT_ <i>M. thermoacetica</i>	307	Q	N	I	G	V	I	S	I	T	G ³¹⁶	30 %
<i>P. abysii/furiosus</i>	302	E	N	I	G	L	V	A	L	T	K ³¹¹	27 %
<i>T. thermophilus</i>	306	E	N	T	G	V	L	A	V	T	R ³¹⁵	25 %
PsychT_ <i>P. cryohalolentis</i>	320	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³²⁹	41 %
<i>S. halifaxensis</i>	326	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³³⁵	43 %
<i>C. psychrerythraea</i>	301	Q	N	V	G	I	V	G	M	T	G ³¹⁰	34 %

Εικόνα 3.34. Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου NAT³²⁴QNXGXXXXTG³³³, μεταξύ συγγενικών ομολόγων NAT/NCS2 από θερμοφιλα και ψυχρόφιλα βακτήρια ή αρχαία που έχουν σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας με τον μεταφορέα XanQ. Στοίχίζονται από την *E. coli*, ο XanQ (P67444), από τη *Moorella thermoacetica* το MoorT (Q2RGM9), δύο στενά συγγενικοί μεταξύ τους μεταφορείς από τα ζεόφιλα *Pyrococcus abysii* και *Pyrococcus furiosus* (Q9V0K0, και Q8U1G8 αντίστοιχα), ένα ομόλογο από τον *Thermus thermophilus* (Q72H20), και από ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς, το PsychT από το *Psychrobacter cryohalolentis* K5 (Q1Q9G3), ένα ομόλογο από τη *Shewanella halifaxensis* HAW-EB4 (B0TLJ0), και ένα ομόλογο από τη *Colwellia psychrerythraea* (Q481N1). Στα δεξιά φαίνεται το ποσοστό ταυτότητας με τον XanQ. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

3.2.3.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του MoorT

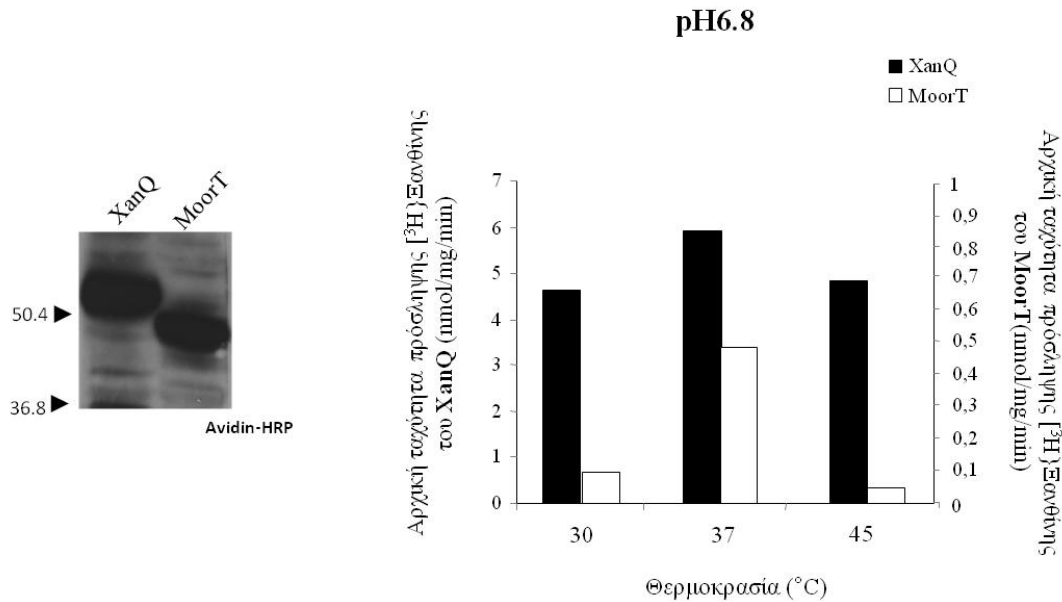
Το πειραματικό μέρος για τον θερμοφιλο μεταφορέα MoorT είχε ξεκινήσει σε συνεργασία με τον Γιώργο Μερμελέκα, ο οποίος ασχολήθηκε κυρίως με την υπερέκφραση και απομόνωση αυτού του ομολόγου (Μερμελέκας Γ., 2009, Διδακτορική διατριβή). Από τα αρχικά αυτά πειράματα, είχε βρεθεί ότι ο MoorT μπορεί να εκφραστεί σε υψηλά επίπεδα (συγκρίσιμα με αυτά του XanQ) στη μεμβράνη κυττάρων *E. coli* XL1-Blue (όχι όμως και σε T184) και εμφανίζει μικρή αλλά σημαντική ενεργότητα μεταφοράς [³H]ξανθίνης, με βέλτιστο σε pH 6.6 και 6.8, και θερμοκρασία 37 °C, ενώ δε μεταφέρει ουρικό οξύ ή ουρακίλη (**Εικόνα 3.35**). Ωστόσο, η μελέτη των κυττάρων δεν έδωσε αποτελέσματα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (45 °C, 56 °C) γιατί η υψηλή θερμοκρασία επηρέαζε τη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Στην παρούσα διατριβή, μελετήσαμε την ενεργότητα του MoorT σε μεμβρανικά κυστίδια, που έχουν μεγαλύτερη σταθερότητα, ώστε να μπορέσουμε να εξετάσουμε και συνθήκες θερμοκρασίας πάνω από 37 °C.



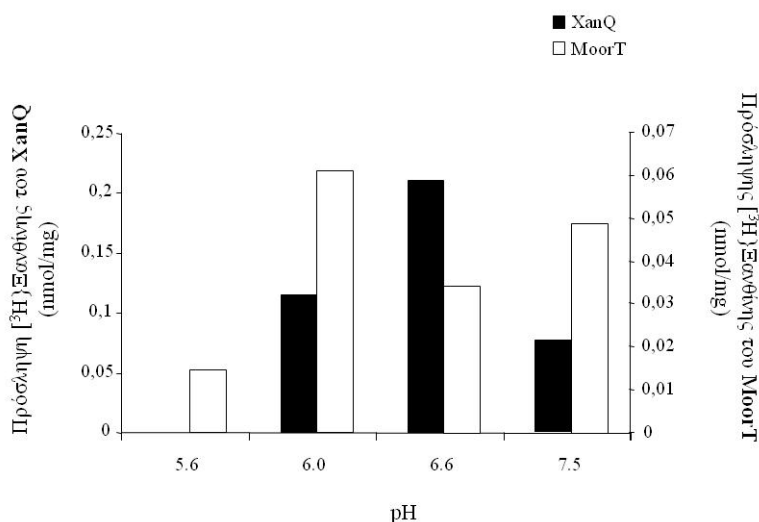
Εικόνα 3.35. Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης του MoorT στους 37 °C και pH 6.8. Κύτταρα *E. coli* XL1-blue που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση του μεταφορέα από πλασμίδιο pT7-5/*moorT*-BAD και κύτταρα που φέρουν το κενό πλασμίδιο pT7-5 συνελέγησαν με φυγοκέντρωση και επαναωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, για να προσδιορισθεί η ενεργότητα. Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 37 °C και pH 6.8, όπου εμφανίζεται η βέλτιστη ενεργότητα (Μερμελέκας Γ., 2009, Διδ. διατριβή).

Για την περαιτέρω μελέτη του MoorT, κατασκευάστηκαν μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSO) από κύτταρα XL1-Blue που εκφράζουν το μεταφορέα. Η αρχική ανάλυση δείχνει ότι τα κυστίδια είναι ενεργά και η μεταφορά [³H]ξανθίνης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα κυστίδια (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης, 1 mg/mL) ενεργοποιούνται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), δηλαδή ενός συστήματος που λειτουργεί ως τεχνητός δότης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Kaback, 1971). Το γεγονός ότι η ενεργότητα του MoorT παρατηρείται μόνο όταν ενεργοποιηθεί η αναπνευστική αλυσίδα σημαίνει ότι πρόκειται για έναν μεταφορέα που λειτουργεί με ενεργό μεταφορά. Τα κυστίδια που εκφράζουν τον MoorT υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), σε pH 6.8 και θερμοκρασίες 30 °C, 37 °C και 45 °C. Η βέλτιστη πρόσληψη παρατηρείται στους 37 °C (**Εικόνα 3.36**). Αυτή η θερμοκρασία επιλέχθηκε στη συνέχεια για τη μελέτη της πρόσληψης ξανθίνης σε διάφορες συνθήκες pH. Τα κυστίδια υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε θερμοκρασία 37 °C, και σε pH 5.6, 6, 6.6 και 7.5. Φαίνεται ότι η βέλτιστη ενεργότητα για τα κυστίδια που εκφράζουν το μεταφορέα MoorT εμφανίζεται σε pH 6.0, ενώ για κυστίδια που εκφράζουν το μεταφορέα XanQ είναι σε pH 6.6 (**Εικόνα 3.37**). Ωστόσο, η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης που έχει ο MoorT στις βέλτιστες συνθήκες (37 °C, pH 6.0, σε κυστίδια RSO παρουσία PMS και ασκορβικού καλίου) είναι πολύ μικρή, περίπου 10% σε σχέση με την αντίστοιχη ενεργότητα του XanQ (**Εικόνα 3.37**). Κινητική ανάλυση της πρόσληψης ξανθίνης από το μεταφορέα MoorT για ένα εύρος συγκεντρώσεων [³H]ξανθίνης (1-100 μM) δεν

έδωσε αποτελέσματα, γιατί οι τιμές ενεργότητας ήταν πολύ χαμηλές και δεν ήταν δυνατόν να υπολογισθούν K_m και V_{max} .



Εικόνα 3.36. Ανάλυση της έκφρασης και επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα μεμβρανικών κυστιδίων που εκφράζουν τους μεταφορείς XanQ ή MoorT. Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSO) παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* XL1-blue που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*-BAD ή pT7-5/*moorT*-BAD και προσδιορίστηκε η έκφραση στη μεμβράνη (αριστερά) και η ενεργότητα (δεξιά). Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημιοφωταγεία (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Τα κυστίδια υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), σε θερμοκρασίες 30 °C, 37 °C και 45 °C, σε pH 6.8. Η πειραματική δοκιμασία γίνεται σε κυστίδια (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης, 1 mg/mL) που ενεργοποιούνται παρουσία μεθουλοφονικού φαιναζινίου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM). Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης (V_0) μετρήθηκε σε 10 - 30 sec. Οι τιμές για τον αρνητικό μάρτυρα (κυστίδια που δεν έχουν ενεργοποιηθεί δηλ. χωρίς PMS/ασκορβικό) αφαιρούνται από τις τελικές μετρήσεις, σε κάθε περίπτωση.

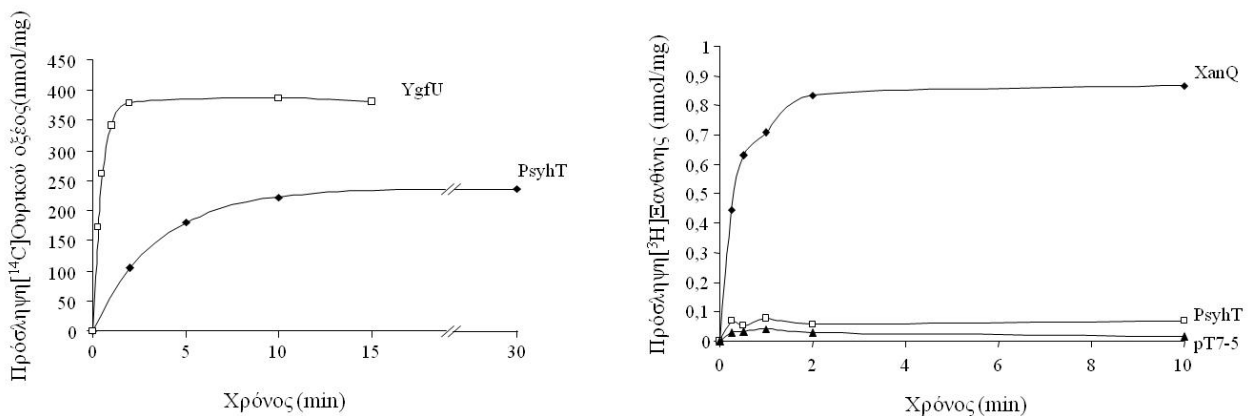
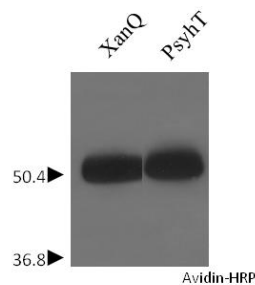


Εικόνα 3.37. Επίδραση του pH στην ενεργότητα μεμβρανικών κυστιδίων που εκφράζουν τους μεταφορείς XanQ ή MoorT. Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSO) παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* XL1-blue που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*-BAD ή pT7-5/*moorT*-BAD και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), σε θερμοκρασία 37 °C, και pH 5.6, 6.0, 6.6 και 7.5. Η πειραματική δοκιμασία γίνεται σε κυστίδια (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης, 1 mg/mL) που ενεργοποιούνται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζίνιου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM). Οι τιμές για τον αρνητικό μάρτυρα (κυστίδια που δεν έχουν ενεργοποιηθεί δηλ. χωρίς PMS/ασκορβικό) αφαιρούνται από τις τελικές μετρήσεις, σε κάθε περίπτωση.

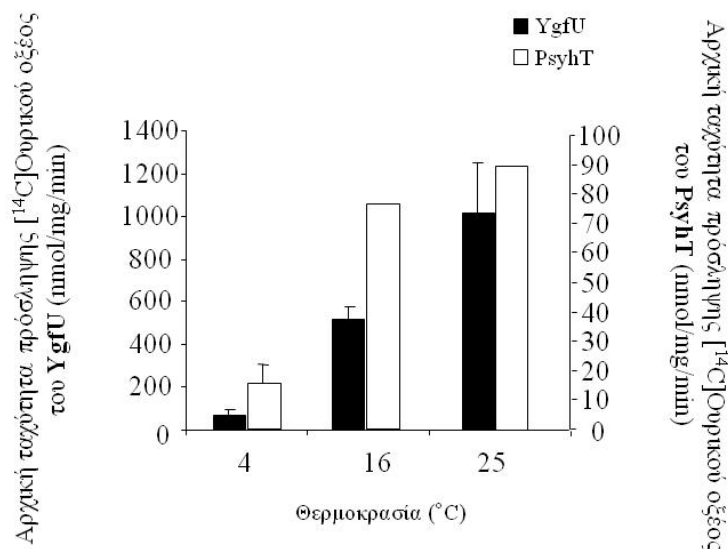
3.2.3.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του PsychT

Το ομόλογο PsychT από το *Psychrobacter cryohalolentis* K5 βρέθηκε ότι μπορεί να εκφραστεί σε υψηλά επίπεδα (συγκρίσιμα με αυτά του XanQ) στη μεμβράνη κυττάρων *E. coli* T184 και ότι έχει υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος, καθώς και μικρή ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης, στους 25 °C (**Εικόνα 3.39**). Για να βρεθεί η βέλτιστη θερμοκρασία, η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς έγινε επίσης στις θερμοκρασίες των 4 °C και των 16 °C, με τη βέλτιστη πρόσληψη να παρατηρείται στους 25 °C, αλλά με πολύ υψηλή ενεργότητα και στους 16 °C (**Εικόνα 3.40**). Σε σχέση με τον μεταφορέα ουρικού οξέος YgfU που χαρακτηρίστηκε επίσης στην παρούσα διατριβή (3.2.1.2), ο PsychT εμφανίζει ενεργότητα (αρχική ταχύτητα πρόσληψης ουρικού) 90 nmol/mg/min, ή 9% του YgfU, στους 25 °C, 80 nmol/mg/min, ή 16% του YgfU, στους 16 °C, και 15 nmol/mg/min, ή 30% του YgfU, στους 4 °C (**Εικόνα 3.40**). Τέλος, επειδή ο *P. cryohalolentis* είναι ανθεκτικός και σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας, η ενεργότητα του ετερόλογα εκφρασμένου PsychT μετρήθηκε σε διάφορες τιμές ιοντικής ισχύος, δηλ. με προσθήκη KCl (0 έως 1.5 M) στο διάλυμα της αντίδρασης, στους 16 °C. Βρέθηκε ότι τόσο ο PsychT όσο και ο μεταφορέας YgfU που χρησιμοποιήθηκε σαν control διατηρούν υψηλή

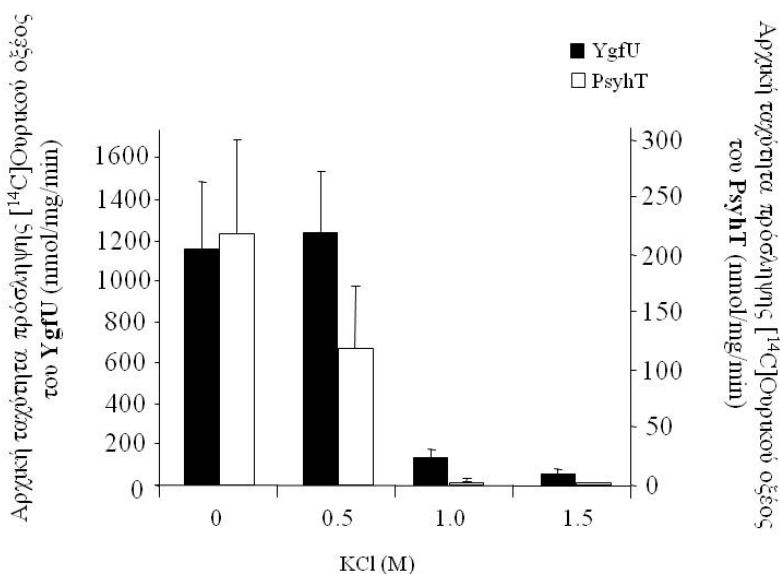
ενεργότητα μεταφοράς υποστρώματος σε συγκεντρώσεις KCl έως 0.5 M αλλά η ενεργότητα μειώνεται δραματικά, και στις δύο περιπτώσεις, σε συγκεντρώσεις KCl 1 M και 1.5 M. Μάλιστα, ο ετερόλογα εκφρασμένος *PsychT* φαίνεται να είναι λιγότερο ανθεκτικός σε υψηλές συγκεντρώσεις KCl από τον *YgfU* (Εικόνα 3.41). Συνοπτικά, ο *PsychT* φαίνεται ότι μεταφέρει κυρίως ουρικό, αλλά στο σύστημα έκφρασης που τον εξετάσαμε (*E. coli*) δεν εμφανίζει την αναμενόμενη ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές θερμοκρασίας και υψηλές τιμές αλατότητας, πράγμα που οφείλεται πιθανότατα στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης.



Εικόνα 3.38. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας του μεταφορέα *PsychT*. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*-BAD, pT7-5/*ygfU*-BAD ή pT7-5/*psychT*-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (πάνω) ή η ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος (κάτω δεξιά) και ξανθίνης (κάτω αριστερά). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM) και [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των εγμάτων, σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 3.39. . Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των μεταφορέων YgfU και PsyhT. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfU-BAD ή pT7-5/psyhT-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM) στους 4 °C, 16 °C και 25 °C, pH 7.5. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Φαίνονται οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



Εικόνα 3.40 . Επίδραση της ιοντικής ισχύος στην ενεργότητα των μεταφορέων YgfU και PsyhT. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfU-BAD ή pT7-5/psyhT-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM) παρουσία συγκεντρώσεων 0 έως 1.5 M KCl. Η αντίδραση για το PsyhT έγινε στους 16 °C και για το YgfU στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα (V_0) μετρήθηκε σε 15 και 30 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση.

3.3. Μελέτη της μοριακής βάσης των διαφορών εξειδίκευσης μεταξύ μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2: Το παράδειγμα του ζεύγους των ομολόγων YgfU (μεταφορέας ουρικού στην *E. coli*) και XanQ (μεταφορέας ξανθίνης στην *E. coli*)

Από τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των ομολόγων της *E. coli* (βλ. εδάφιο 3.2.2) φαίνεται ότι δύο συγγενικά ομόλογα (XanQ, YgfU) εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα στη κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά έχουν σαφή διαφορά λειτουργικής εξειδίκευσης: το XanQ είναι ειδικός μεταφορέας ξανθίνης, υψηλής συγγένειας (K_m 5 μ M), και δε μεταφέρει ούτε αναγνωρίζει ως προσδέτη ουρικό οξύ, ενώ το YgfU είναι χαμηλής συγγένειας (K_m 0.5 mM) μεταφορέας ουρικού και δε μεταφέρει ξανθίνη (στους 25 °C). Αυτή η διαφορά εξειδίκευσης μεταξύ ουρικού και ξανθίνης φαίνεται να συνδέεται με λίγες σχετικά αλλαγές σε θέσεις σημαντικών καταλοίπων, όπως προκύπτουν από την ανάλυση κυστεϊνικής σάρωσης του XanQ (Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010). Παρά το ότι τα δύο ομόλογα έχουν σχετικά περιορισμένη ομοιότητα αλληλουχιών (ταυτότητα καταλοίπων ~ 30%), από τις 23 θέσεις καταλοίπων που έχουν προσδιορισθεί ως σημαντικές στον XanQ (βλ. Εισαγωγή), μόνο οι 9 διαφέρουν.

Για να μελετηθεί η μοριακή βάση αυτής της διαφοράς στην εξειδίκευση κατασκευάστηκαν με *in vitro* μεταλλαξιγένεση σημειακά μεταλλάγματα που αλλάζουν τις πλευρικές ομάδες συντηρημένων καταλοίπων (π.χ. His-31 στον XanQ/ His-37 στον YgfU), και σημειακά μεταλλάγματα του YgfU και του XanQ στις 9 θέσεις όπου οι αλληλουχίες του XanQ και του YgfU διαφέρουν. Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας (MWG Sequencing), τα μεταλλάγματα εξετάστηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους στη μεμβράνη και συγκρίθηκαν με τους φυσικού τύπου μεταφορείς YgfU και XanQ ως προς την ενεργότητα μεταφοράς [14 C]ουρικού και [3 H]ξανθίνης. Από τα πειράματα αυτά, που αντιπροσωπεύουν μια πρώτη σειρά μεταλλαξιγένεσης για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας στον μεταφορέα YgfU, προέκυψε ένα σημαντικό εύρημα, ότι η θέση του υδρόφιλου καταλοίπου Thr-100 (Asn-93 στον XanQ), στο μέσο περίπου της έλικας TM3, συνεισφέρει στην εξειδίκευση με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που είχε προταθεί για την αντίστοιχη θέση του XanQ (Karena and Frillingos, 2009). Και στις δύο περιπτώσεις, η εισαγωγή στη θέση αυτή μιας πλευρικής ομάδας μικρού μεγέθους (Ala) οδηγεί σε διεύρυνση της εξειδίκευσης, καθώς επιτρέπει ενεργό

μεταφορά τόσο του ουρικού (που δεν μεταφέρεται από τον XanQwt) όσο και της ξανθίνης (που δεν μεταφέρεται από τον YgfUwt, παρά μόνο σε μικρό βαθμό στους 37 °C).

3.3.1. Μεταλλαξιγένεση του YgfU στις θέσεις His-37 (TM1) και Thr-100 (TM3)

Από την ομάδα των 23 καταλοίπων αμινοξέων που έχουν διαπιστωθεί ότι είναι σημαντικά για την ενεργότητα και το μηχανισμό λειτουργίας του XanQ (Εισαγωγή, Πίνακας 1.1), τα περισσότερα βρίσκονται στη περιοχή μεταξύ των TM8 και TM9b που περιλαμβάνει και το μοτίβο-υπογραφή (Εικόνα 3.24) καθώς και στην έλικα TM12 που εξετάσαμε στην παρούσα διατριβή. Και οι δύο αυτές περιοχές αλληλουχίας έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές τόσο στον XanQ της *E. coli* (Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010) όσο και στον ομόλογο μεταφορέα UapA του *Aspergillus nidulans* (Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2010), ενώ τα δεδομένα και για τους δύο μεταφορείς συγκλίνουν στα ίδια περίπου συμπεράσματα: ότι η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή εμπλέκεται άμεσα στο κέντρο δέσμευσης πουρινών και ότι η κεντρική περιοχή του TM12 αλληλεπιδρά με το κέντρο δέσμευσης συμβάλλοντας στην εξειδίκευση.

Αντίθετα με τα παραπάνω, δύο από τις σημαντικές θέσεις καταλοίπων του XanQ στο κέντρο περίπου των ελίκων TM1 (His-31) και TM3 (Asn-93) φαίνεται να έχουν διαφορετικό ρόλο στον ομόλογο μεταφορέα UapA. Για τον XanQ, οι θέσεις αυτές έχει υποδειχθεί πρόσφατα ότι σχετίζονται είτε με τον καθορισμό της υψηλής συγγένειας για δέσμευση και μεταφορά ξανθίνης (His-31) είτε με τον καθορισμό της εξειδίκευσης έναντι διαφορετικών αναλόγων πουρινών (Asn-93) (Karena and Frillingos, 2009). Μάλιστα, αντικαταστάσεις του Asn-93 με μικρές πλευρικές ομάδες (Ala, Ser) οδηγούν σε ανιχνεύσιμη ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος (Karena and Frillingos, 2009). Στον UapA, η μεταλλαξιγένεση των αντίστοιχων θέσεων καταλοίπων έδειξε ότι η His-86 (TM1) σχετίζεται περισσότερο με τη σωστή στόχευση ή τη σταθερότητα του μορίου στη μεμβράνη (Pantazopoulou and Diallinas, 2006), ενώ η Ser-153 (TM3) δε φαίνεται να έχει σημαντική συνεισφορά στη συγγένεια δέσμευσης ή στο προφίλ αναγνώρισης άλλων αναλόγων ξανθίνης (S. Amillis & G. Diallinas, προσωπική επικοινωνία). Αυτές οι διαφορές στην πιθανή σημασία των ελίκων TM1 και TM3 μας δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση, δεδομένου μάλιστα ότι τα κατάλοιπα που βρίσκονται στις αντίστοιχες θέσεις είναι ιδιαίτερα συντηρημένα κατά την εξέλιξη της οικογένειας NAT/NCS2: στο κέντρο της έλικας TM1 υπάρχει σχεδόν πάντοτε His, ενώ στο μέσο της έλικας TM3 υπάρχει

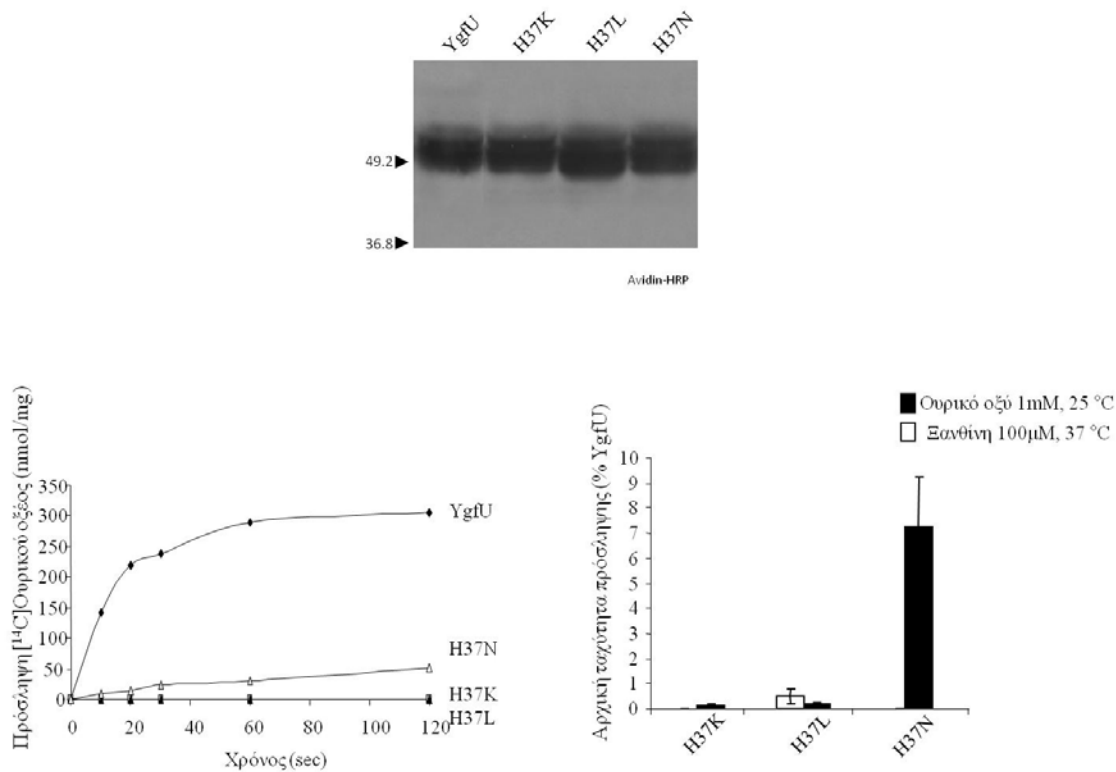
πολικό αμινοξύ (Asn, Thr ή Ser) και σε λίγες περιπτώσεις (όπως στα ομόλογα SVCT1-2 που μεταφέρουν ασκορβικό) Ala.

Με βάση τη γνώση αυτή, έγινε εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση στις αντίστοιχες θέσεις His-37 (TM1) και Thr-100 (TM3) του YgfU, ώστε να εξετασθεί αν οι αντικαταστάσεις τους έχουν παρόμοιες επιδράσεις στη συγγένεια και/ή εξειδίκευση και στον μεταφορέα YgfU. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν και ελέγχθηκαν τα μεταλλάγματα H37K, H37L, H37N, T100A, T100S και T100N.

3.3.1.1 Μεταλλαξιγένεση του YgfU στη θέση His-37 (TM1)

Έγιναν αντικαταστάσεις της His-37 (TM1) του YgfU με ένα πολικό αμινοξύ (Asn), ένα υδρόφιλο με θετικό φορτίο (Lys) και ένα υδρόφοβο (Leu). Οι αντικαταστάσεις με Leu ή Lys οδηγούν σε υψηλά επίπεδα έκφρασης αλλά αμελητέα ενεργότητα (**Εικόνα 3.40**). Η αντικατάσταση με Asn οδηγεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης και σημαντική αλλά πολύ μικρή ενεργότητα πρόσληψης ουρικού οξέος (λιγότερο από 10% σε σχέση με τον φυσικού τύπου YgfUwt) (**Εικόνα 3.40**). Η μειωμένη ενεργότητα του μεταλλάγματος H37N σχετίζεται όχι μόνο με μικρή V_{max} αλλά και σημαντικά μειωμένη συγγένεια ($K_m \sim 1.4$ mM, τριπλάσια περίπου του YgfUwt) (**Πίνακας 3.12**). Κανένα από τα τρία μεταλλάγματα δε μεταφέρει ξανθίνη, ακόμη και σε συνθήκες που ο YgfU(wt) έχει ανιχνεύσιμη ενεργότητα (100 μ M, 37 °C) (βλ. Εικόνα 3.27).

Συνολικά, η His-37 φαίνεται να είναι πολύ σημαντική για την ενεργότητα του YgfU. Από τα τρία μεταλλάγματα που εξετάσαμε, προκύπτει ότι η παρουσία στη θέση αυτή ενός υδρόφοβου ή ενός θετικά φορτισμένου καταλοίπου οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση, ενώ η παρουσία ενός πολικού καταλοίπου διατηρεί την ενεργότητα μεταφοράς ουρικού, αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα και με μειωμένη συγγένεια. Οι επιπτώσεις των αντίστοιχων αντικαταστάσεων στην His-31 του XanQ (Karena and Frillingos, 2009) ήταν λιγότερο δραματικές και ως ένα βαθμό διαφορετικές. Παρουσία Lys (ή και Arg) οδηγούσε σε απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη, παρουσία της υδρόφοβης Leu οδηγούσε σε μικρή ενεργότητα με μεγάλη μείωση της συγγένειας, ενώ παρουσία Asn (ή και Gln) οδηγούσε σε πολύ υψηλή ενεργότητα και κανονική συγγένεια αναγνώρισης υποστρώματος καθώς και των περισσότερων αναλόγων. Φαίνεται λοιπόν ότι η σημασία της συντηρημένης His στην έλικα TM1 μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο έντονη ανάλογα με τον μεταφορέα, ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις σημαντικό ρόλο παίζει η διατήρηση στη θέση αυτή ενός πολικού αμινοξέος που μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου.



Εικόνα 3.41. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας μεταλλαγμάτων του YgfU στη θέση His-37. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfU-BAD που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγές (H37N, H37K, H37L) συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (*πάνω*) ή η ενεργότητα (*κάτω*). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^{14}\text{C}]$ ουρικού οξέος (1 mM), στους 25 °C, και $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (100 μM), στους 37 °C. Παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονικής προόδου για την αντίδραση πρόσληψης ουρικού (*κάτω αριστερά*) και η σύγκριση των τιμών ενεργότητας (αρχικής ταχύτητας πρόσληψης υποστρώματος) τόσο για το ουρικό όσο και για τη ξανθίνη (*κάτω δεξιά*). Για το ουρικό οξύ, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 10, 20 και 30 sec και μέγιστα επίπεδα (steady state) σε 1 - 2 min. Για την ξανθίνη, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 15, 30 sec και μέγιστα επίπεδα (steady state) σε 2 και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της YgfU-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Περμεάση	K_m (mM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
YgfU	0.5 ± 0.1	715 ± 81	1430
H37N	1.37 ± 0.8	22.2 ± 7.9	16
H37K	nd	nd	
H37L	nd	nd	

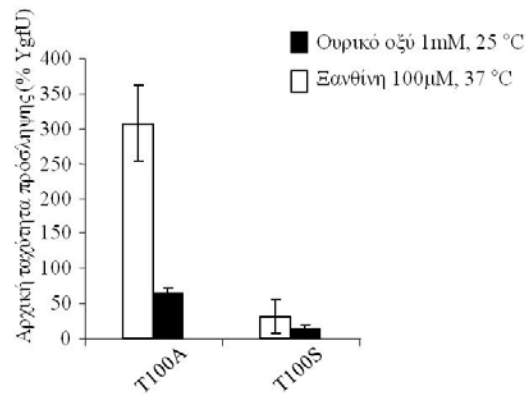
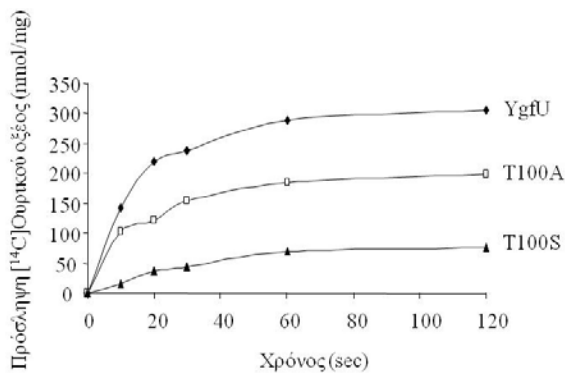
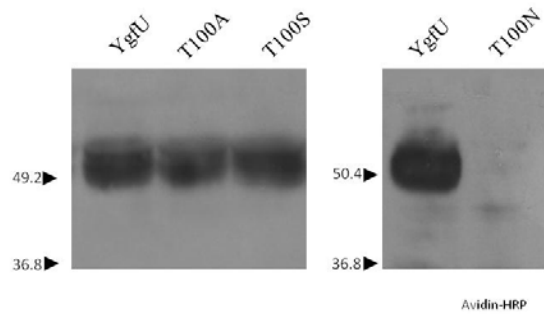
Πίνακας 3.12. Τιμές K_m και V_{max} των μεταλλαγμάτων του YgfU στη θέση His-37. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (0.05 - 1mM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.3.1.2 Μεταλλαξιγένεση του YgfU στη θέση Thr-100 (TM3)

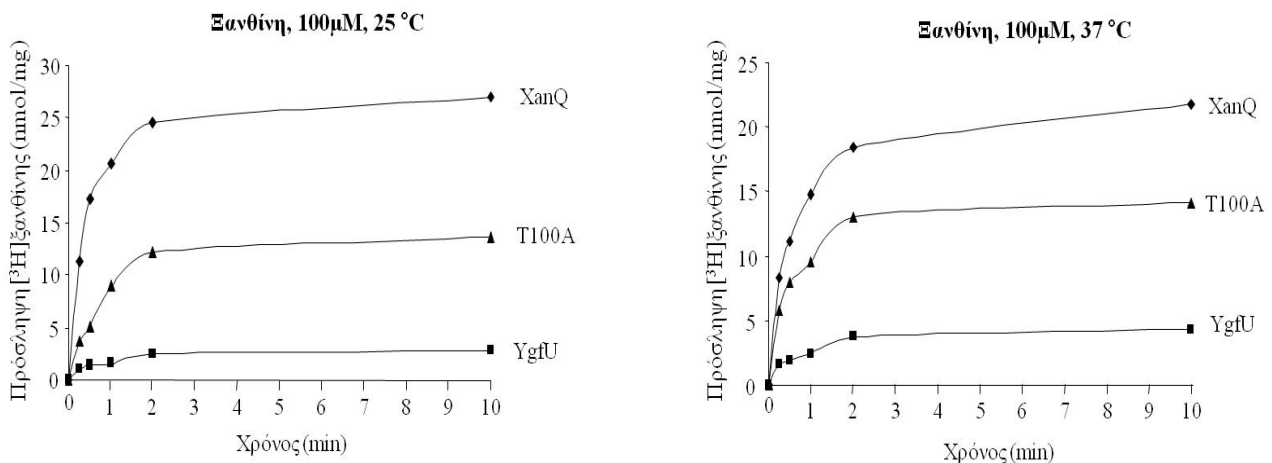
Έγιναν αντικαταστάσεις της Thr-100 (TM3) του YgfU με ένα μικρό υδρόφοβο αμινοξύ (Ala), ένα πολικό μικρού μεγέθους (Ser) και ένα πολικό μεγαλύτερου μεγέθους, παρόμοιου με τη θρεονίνη (Asn). Η αντικατάσταση με Asn (T100N) οδηγεί σε πλήρη απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη (**Εικόνα 3.42**). Η αντικατάσταση με Ser (T100S) οδηγεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη και σημαντική ενεργότητα, αλλά μειωμένη σε σχέση με τον YgfU(wt) τόσο για το ουρικό (15%) όσο και για τη ξανθίνη (50%, στις συνθήκες που εξετάστηκαν) (**Εικόνα 3.42**). Η μειωμένη ενεργότητα του T100S φαίνεται να σχετίζεται με σημαντικά μειωμένη συγγένεια για το ουρικό ($K_m \sim 1.9$ mM, τετραπλάσια περίπου του YgfUwt) αλλά και τη ξανθίνη (**Πίνακας 3.13**). Η αντικατάσταση με Ala (T100A) οδηγεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη και ενεργότητας, με αντιστροφή της προτίμησης για το μεταφερόμενο υπόστρωμα, αφού μεταφέρει τη ξανθίνη με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα απ' ό,τι ο YgfU(wt) (τριπλάσια ενεργότητα, σε συνθήκες 100 μM, 37 °C) ενώ μεταφέρει το ουρικό με πιο μικρή ταχύτητα (50%, σε συνθήκες 1 mM, 25 °C) (**Εικόνα 3.42**). Σε κινητική ανάλυση βρέθηκε ότι ο T100A μεταφέρει ξανθίνη (37 °C) με δεκαπλάσια V_{max} απ' ό,τι ο YgfU(wt) αλλά παρόμοια K_m , ενώ μεταφέρει το ουρικό με παρόμοια V_{max} αλλά μειωμένη συγγένεια (διπλάσια K_m) (**Πίνακας 3.13**). Τέλος, το μετάλλαγμα T100A βρέθηκε ότι έχει σημαντική ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης ακόμα και στους 25 °C όπου ο YgfU(wt) έχει ελάχιστα ανιχνεύσιμη ενεργότητα (**Εικόνα 3.43**).

Όπως και στην περίπτωση του YgfU(wt), λόγω της μικρής σχετικά συγγένειας για ξανθίνη (K_m 0.24 mM) δεν κατέστη δυνατό να γίνουν πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του μεταλλάγματος T100A.

Συνολικά, η Thr-100 (TM3) φαίνεται να είναι σημαντική για την εξειδίκευση του μεταφορέα YgfU ως προς το ουρικό, εφόσον η αντικατάστασή της με Ala (και, σε μικρότερο βαθμό, με Ser) επιτρέπει καλύτερη αναγνώριση και μεταφορά ξανθίνης σε σχέση με το ουρικό. Η αντικατάσταση με Ala, ειδικά, επιτρέπει πολύ υψηλότερη ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης από τον YgfU(wt) και αντιστρέφει την προτίμηση υποστρώματος μεταξύ ουρικού και ξανθίνης. Οι επιπτώσεις των αντίστοιχων αντικαταστάσεων στην Asn-93 του XanQ (Karena and Frillingos, 2009) ήταν παρόμοιες καθώς η παρουσία αμινοξέων μικρού μεγέθους στη θέση αυτή (Ala, Ser) επέτρεπε πρόσληψη ουρικού οξέος (ενός υποστρώματος που δεν αναγνωρίζεται από τον XanQwt) καθώς και αναγνώριση αναλόγων που διαφέρουν από τη ξανθίνη στη θέση 8 του πουρινικού δακτυλίου. Άρα, και στις δύο περιπτώσεις, η εισαγωγή στη θέση αυτή της TM3 μιας πλευρικής ομάδας μικρού μεγέθους (Ala ή Ser) επιτρέπει διεύρυνση της εξειδίκευσης.



Εικόνα 3.42. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας για τα μεταλλάγματα στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στη θέση 100. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfU-BAD που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγές (T100A, T100S, T100N) συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (*πάνω*) ή η ενεργότητα (*κάτω*). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίησή του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταγεία (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM), στους 25 °C, και [³H]ξανθίνης (100 μM), στους 37 °C. Παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονικής προόδου για την αντίδραση πρόσληψης ουρικού (*κάτω αριστερά*) και η σύγκριση των τιμών ενεργότητας (αρχικής ταχύτητας πρόσληψης υποστρώματος) τόσο για το ουρικό όσο και για τη ξανθίνη (*κάτω δεξιά*). Για το ουρικό οξύ, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 10, 20 και 30 sec και μέγιστα επίπεδα (steady state) σε 1 - 2 min. Για την ξανθίνη, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 15, 30 sec και μέγιστα επίπεδα (steady state) σε 2 και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της YgfU-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



Εικόνα 3.43. Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης του μεταλλάγματος T100A στους 37 °C και στους 25 °C. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5 που φέρουν τα αντίστοιχα γονίδια συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (100 μM), στους 25 °C, και τους 37 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση.

Περμεάση	K_m (μM)	Ξανθίνη	
		V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
XanQ (wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
YgfU (37 °C)	300 ± 90	14 ± 4	46
T100A (37 °C)	240 ± 5	132 ± 20	550
T100S (37 °C)	nd	nd	

	K_m (mM)	Ουρικό οξύ	
		V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
YgfU	0.5 ± 0.1	715 ± 81	1430
T100A	0.9 ± 0.4	700 ± 160	777
T100S	1.86 ± 0.7	296 ± 87	159

Πίνακας 3.13. Τιμές K_m και V_{max} των των μεταλλαγμάτων του YgfU στη θέση Thr-100. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (0.1 - 250 μM) στους 25 °C και τους 37 °C, και μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (0.05- 2mM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.3.2. Σημειακή μεταλλαξιγένεση του YgfU και του XanQ σε θέσεις σημαντικών καταλοίπων του XanQ που διαφέρουν στον YgfU

Οι 23 θέσεις που έχουν προσδιορισθεί ως σημαντικές από τη συστηματική μεταλλαξιγένεση του XanQ εμφανίζουν υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης στην οικογένεια NAT/NCS2 (Πίνακας 1.1, Εισαγωγή). Στον YgfU, μόνο 9 από τα 31 κατάλοιπα που βρίσκονται στις θέσεις αυτές διαφέρουν από τα αντίστοιχα του XanQ. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τις εξής θέσεις καταλοίπων: Asn-93, Gln-258, Thr-261, Ala-273, Asp-276, Ser-284, Asn-326, Gly-333 και Asn-430 (κατάλοιπα του XanQ που έχουν καταγραφεί ως σημαντικά για την ενεργότητα, εξειδίκευση αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης, ή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από *N*-αιθυλομηλεϊμίδιο), όπου η αλληλουχία του ομόλογου μεταφορέα YgfU διαφέρει, έχοντας Thr-100, Ser-256, Val-259, Ser-271, Met-274, Val-282, Val-320, Arg-327 και Ser-426, αντίστοιχα. Οι διαφορές αυτές (βλ. Εικόνα 3.24) εντοπίζονται κυρίως στο μοτίβο-υπογραφή (Val/Asn-320, Arg/Gly-327) και στην ευρύτερη περιοχή ανοδικά του μοτίβου που περιλαμβάνει την έλικα TM8 (Ser/Gln-256, Val/Thr-259, Ser/Ala-271, Met/Asp-274) και την υδρόφιλη συνδετική περιοχή TM8-TM9a (Val/Ser-282), καθώς και στις έλικες TM3 (Thr/Asn-100) και TM12 (Ser/Asn-426). Όπως έχει φανεί από παλαιότερες μελέτες με άλλες οικογένειες διαμεμβρανικών μεταφορέων (Tavoulari and Frillingos, 2008), τέτοιες διαφορές σε δυνητικώς σημαντικά κατάλοιπα μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν ένας αρχικός κύκλος μεταλλαξιγένεσης για να ερευνηθεί η μοριακή βάση των αντίστοιχων διαφορών εξειδίκευσης.

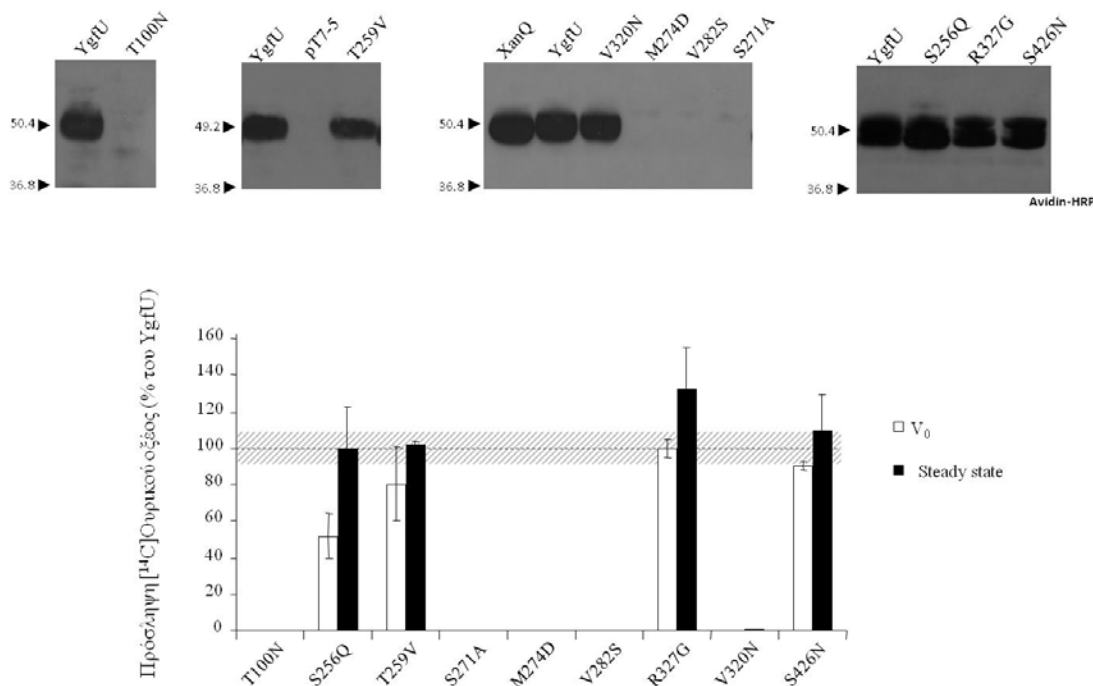
Ακολουθώντας αυτή τη λογική, έγινε στοχευμένη σημειακή μεταλλαξιγένεση των 9 δυνητικά σημαντικών θέσεων καταλοίπων σε κάθε μεταφορέα ξεχωριστά, δηλαδή κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα του YgfU όπου τα κατάλοιπα των σημαντικών θέσεων αντικαταστάθηκαν με τα αντίστοιχα του XanQ και μεταλλάγματα του XanQ όπου τα κατάλοιπα των σημαντικών θέσεων αντικαταστάθηκαν με τα αντίστοιχα του YgfU. Κατασκευάστηκαν έτσι 15 νέα μεταλλάγματα, 9 για το YgfU και 6 για το XanQ, τα οποία, μαζί με τρία μεταλλάγματα του XanQ (N93T, D276M, G333R) που υπήρχαν στο εργαστήριό μας από προηγούμενες μελέτες, εξετάστηκαν ως προς το λειτουργικό τους προφίλ.

3.3.2.1. Μεταλλαξιγένεση του YgfU σε δυνητικά σημαντικές θέσεις καταλοίπων που διαφέρουν στον XanQ

Στο γενετικό υπόβαθρο του YgfU, τα κατάλοιπα των 9 σημαντικών θέσεων αντικαταστάθηκαν με μεταλλαξιγένεση από τα αμινοξέα που απαντώνται στον XanQ, δηλ. χρησιμοποιήθηκε το ήδη κατασκευασμένο T100N και κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα, S256Q, V259T, S271A, M274D, V282S, V320N, R327G και S426N. Μετά την επιβεβαίωση των αλληλουχιών, τα μεταλλάγματα του YgfU ελέγχθηκαν για την ικανότητα μεταφοράς ουρικού οξέος και τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη. Τα μεταλλάγματα T100N, S271A, M274D, και V282S δεν εκφράζονται καθόλου στη μεμβράνη. Από τα υπόλοιπα, που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα, το V320N είναι ανενεργό, και τα S256Q, T259V, R327G και S426N εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ουρικού σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του YgfU(wt) (Εικόνα 3.44). Η ανάλυση κινητικής στα ενεργά μεταλλάγματα δείχνει ότι τα S256Q και T259V διαφέρουν ελάχιστα από τον YgfU, έχοντας παρόμοιες κινητικές σταθερές για πρόσληψη ουρικού (K_m 0.79 ± 0.13 mM, V_{max} 698 ± 50 nmol.mg⁻¹.min⁻¹ και K_m 0.77 ± 0.31 mM, V_{max} 808 ± 150 nmol.mg⁻¹.min⁻¹, αντίστοιχα), ενώ τα R327G και S426N έχουν μειωμένη συγγένεια για ουρικό οξύ (K_m 1.9 - 2.2 mM) (Πίνακας 3.14). Από την άλλη πλευρά, τα ενεργά μεταλλάγματα μεταφέρουν ξανθίνη σε ανιχνεύσιμα αλλά πολύ χαμηλά επίπεδα, παρόμοια με αυτά του YgfU(wt), και δεν υπάρχει ένδειξη ότι μπορεί να αλλάζει η προτίμηση επιλογής υποστρώματος μεταξύ ουρικού και ξανθίνης (Εικόνα 3.45).

Συνολικά, είναι ενδιαφέρον ότι από τη σειρά των 9 μεταλλαγμάτων του YgfU, αυτά που έχουν δραματική επίπτωση στη δομική σταθερότητα και δίνουν μηδενική έκφραση στη μεμβράνη εντοπίζονται στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8 (S271A, M274D, V282S) και στην έλικα TM3 (T100N), ενώ το V320N που οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση είναι στο μοτίβο-υπογραφή δίπλα στις συντηρημένες θέσεις Asn-325 και Gln-324 που έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στη δέσμευση υποστρώματος τόσο στον UapA όσο και στον XanQ (Georgoroulou *et al.*, 2010). Αντίθετα, δεν επηρεάζουν καθόλου τα μεταλλάγματα που εντοπίζονται στην περιπλαστική πλευρά της TM8 (S256Q, T259V), αλλά ούτε και στην έλικα TM12 στη θέση της Asn/Ser-430 που φαίνεται να βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης τόσο στον XanQ όσο και στον UapA (S426N) ή στη θέση της Gly/Arg-333 του μοτίβου-υπογραφή που έχει συνδεθεί από τα πειράματα του XanQ και του UapA με τον καθορισμό της εξειδίκευσης (R327G).

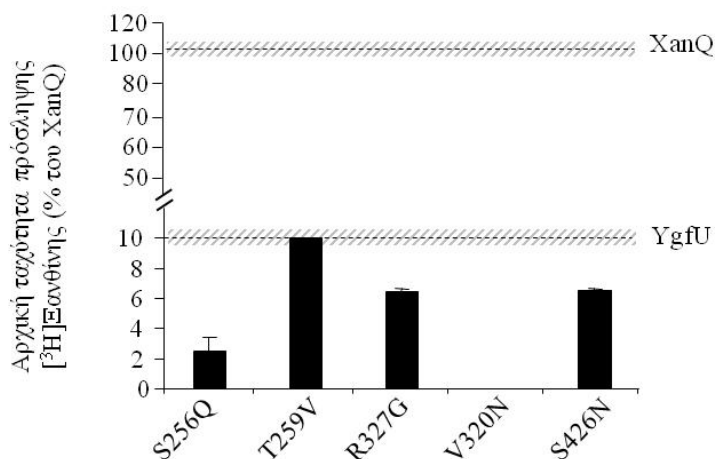
Τα αποτελέσματα αυτά δεν μας δίνουν κάποια ένδειξη για πιθανούς μοριακούς καθοριστές που συνεισφέρουν στη διαφορά εξειδίκευσης, αλλά θεωρούμε ότι στο μοριακό υπόστρωμα του YgfU ορισμένες σημαντικές θέσεις καταλοίπων (όπως οι Gly/Arg-333 και Asn/Ser-430) συνεισφέρουν λιγότερο καθοριστικά και ο ρόλος τους θα μπορούσε να φανεί μόνο με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση. Αυτό το θέμα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Από την άλλη πλευρά, η πρώτη αυτή σειρά μεταλλαξιγένεσης του YgfU υποδεικνύει ότι κατάλοιπα του κυτταροπλασματικού άκρου του TM8 και της αμέσως επόμενης περιοχής μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δομική οργάνωση του μορίου, πιθανόν μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με άλλες περιοχές, όπως είχε προταθεί για το μοτίβο E(A/S)xGDxxAT του TM8 στην περίπτωση του XanQ (Mermelekas et al., 2010).



Εικόνα 3.44. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας μεταλλαγμάτων του YgfU σε θέσεις δυνητικά σημαντικών καταλοίπων που διαφέρουν στον XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfU-BAD που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγές συνελήγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (πάνω) ή η ενεργότητα (κάτω). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταγεία (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (2 mM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V₀) μετρήθηκε σε 10, 20 και 30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ουρικού (steady state) σε 1 - 2 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της YgfU- BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Περμεάση	K_m (mM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
YgfU	0.5 ± 0.1	715 ± 81	1430
S256Q	0.8 ± 0.1	698 ± 50	872
T259V	0.77 ± 0.31	808 ± 150	1049
R327G	2.2 ± 0.98	2064 ± 565	938
S426N	1.86 ± 0.9	1761 ± 522	946
V320N	nd	nd	

Πίνακας 3.14. Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων του YgfU σε θέσεις δυνητικά σημαντικών καταλοίπων που διαφέρουν στον XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (0.05- 2mM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



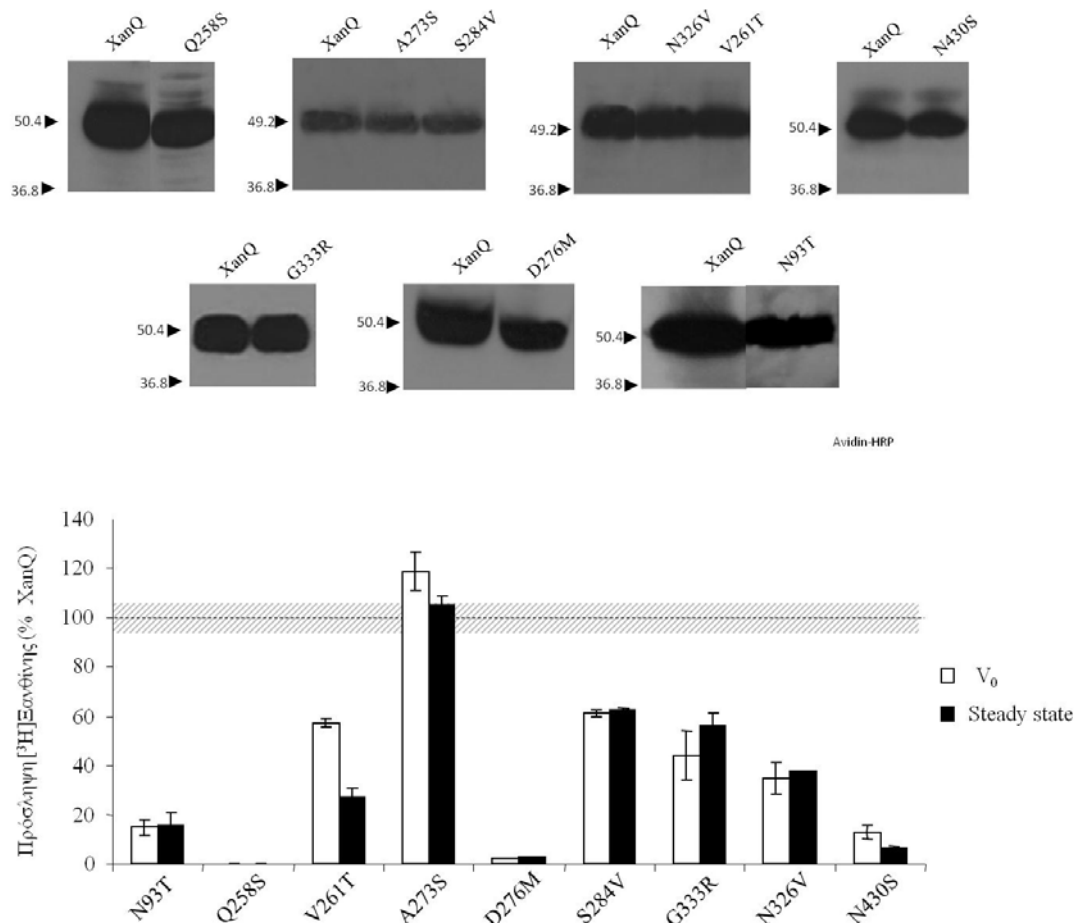
Εικόνα 3.45. Ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης για μεταλλάγματα του YgfU σε θέσεις δυνητικά σημαντικών καταλοίπων. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfU-BAD που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγές συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (100 μM), στους 37 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 15 και 30 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της XanQ- BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.3.2.2. Μεταλλαξιγένεση του XanQ σε δυνητικά σημαντικές θέσεις καταλοίπων που διαφέρουν στον YgfU

Στο γενετικό υπόβαθρο του XanQ, έγιναν αντίστροφες αντικαταστάσεις στις 9 θέσεις σημαντικών καταλοίπων του XanQ όπου ο YgfU διαφέρει, ώστε να ελεγχθεί αν προκύπτουν συγκεκριμένες διαφορές στην ενεργότητα ή εξειδίκευση. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα του XanQ Q258S, V261T, A273S, S284V, N326V και N430S, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση και τη λειτουργικότητα, παράλληλα με τα N93T (Karena and Frillingos, 2009), D276M (Mermelekas *et al.*, 2010) και G333R (Georgoroulou *et al.*, 2010), που είχαν κατασκευασθεί στα πλαίσια προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου. Όλα τα μεταλλάγματα εκφράζονται στη μεμβράνη των *E. coli* T184 σε υψηλά επίπεδα. Από αυτά, χαμηλές έως μηδενικές τιμές ενεργότητας για ξανθίνη εμφανίζουν τα 4, δηλαδή τα N93T και N430S (<15% του XanQ), το σχεδόν ανενεργό D276M και το ανενεργό Q258S, ενώ τα υπόλοιπα έχουν υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης (τα V261T, S284V, G333R και N326V έχουν 40-60%, ενώ το A273S ~100%) (Εικόνα 3.46). Κανένα από τα μεταλλάγματα δε μεταφέρει ουρικό οξύ. Περαιτέρω κινητική ανάλυση των ενεργοτήτων μεταφοράς ξανθίνης αποκαλύπτει ότι τα V261T, S284V και G333R έχουν παρόμοια K_m και V_{max} με τον XanQ, ενώ τα N93T ($K_m \sim 12 \mu\text{M}$), N326V ($K_m \sim 12 \mu\text{M}$), N430S ($K_m \sim 12 \mu\text{M}$) και A273S (K_m 24 μM) έχουν μειωμένη συγγένεια για ξανθίνη σε σχέση με τον XanQwt (Πίνακας 3.15).

Συνολικά, βλέπουμε ότι η επίδραση των «κατοπτρικών» αντικαταστάσεων του XanQ είναι λιγότερο έντονη (ιδιαίτερα ως προς την έκφραση στην μεμβράνη) σε σχέση με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις του YgfU. Ως προς την ενεργότητα, τα μεταλλάγματα του XanQ που οδηγούν σε δραματική αναστολή ή απενεργοποίηση εντοπίζονται στην έλικα TM8 (Q258S, D276M), ενώ αυτά που εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για τη ξανθίνη είναι στις έλικες TM3 (N93T), TM8 (A273S), TM12 (N430S) και στο μοτίβο-υπογραφή (N326V). Βέβαια, όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, δύο από αυτά τα μεταλλάγματα επηρεάζουν το προφίλ εξειδίκευσης, δηλαδή το N93T μειώνει τη συγγένεια για όλα σχεδόν τα ανάλογα πουρινών (Karena and Frillingos, 2009), ενώ το G333R αναγνωρίζει ανάλογα που διαφέρουν από τη ξανθίνη στις θέσεις 7 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου και εν μέρει το ουρικό (Georgoroulou *et al.*, 2010). Ωστόσο, όπως αποδείξαμε στη παρούσα διατριβή, κανένα από αυτά τα μεταλλάγματα δε μεταφέρει ουρικό και δεν υπάρχει ένδειξη για μεταβολή του λειτουργικού προφίλ του ενός μεταφορέα σε αυτό του άλλου. Ξεκινώντας από τα δεδομένα που παρουσιάσαμε για τις μονές μεταλλαγές, είναι πιθανό ότι περαιτέρω μελέτες

συνδυαστικής μεταλλαξιγένεσης ή κατασκευής χιμαιρικών YgfU/XanQ μεταφορέων θα οδηγήσουν τελικά στον αναλυτικότερο προσδιορισμό των διαφορετικών καταλοίπων και περιοχών του μορίου που ελέγχουν τον τρόπο αναγνώρισης της θέσης 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου και τη διάκριση μεταξύ ουρικού (υπόστρωμα του YgfU) και ξανθίνης (υπόστρωμα του XanQ).



Εικόνα 3.46. Ανάλυση της έκφρασης και της ενεργότητας μεταλλαγμάτων του XanQ σε θέσεις σημαντικών καταλοίπων που διαφέρουν στον YgfU. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγές συνελήγησαν με φυγοκέντρωση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να προσδιορισθεί η έκφραση στη μεμβράνη (πάνω) ή η ενεργότητα (κάτω). Κλάσματα κυτταρικών μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V_0) μετρήθηκε σε 15, 30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 2 και 10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά % επί των τιμών της XanQ(wild-type)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
XanQ (wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
N93T	11.6 ± 2.9	5.0 ± 0.4	431
V261T	7.4 ± 0.7	23.2 ± 0.8	3135
N326V	11.4 ± 1.4	23.1 ± 1.0	2026
N430S	12.0 ± 1.3	6.6 ± 0.3	550
A273S	24.1 ± 0.5	113 ± 3.5	4688
S284V	5.1 ± 0.5	8.8 ± 0.3	1725
G333R	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.2	857
D276M	nd	nd	
Q258S	nd	nd	

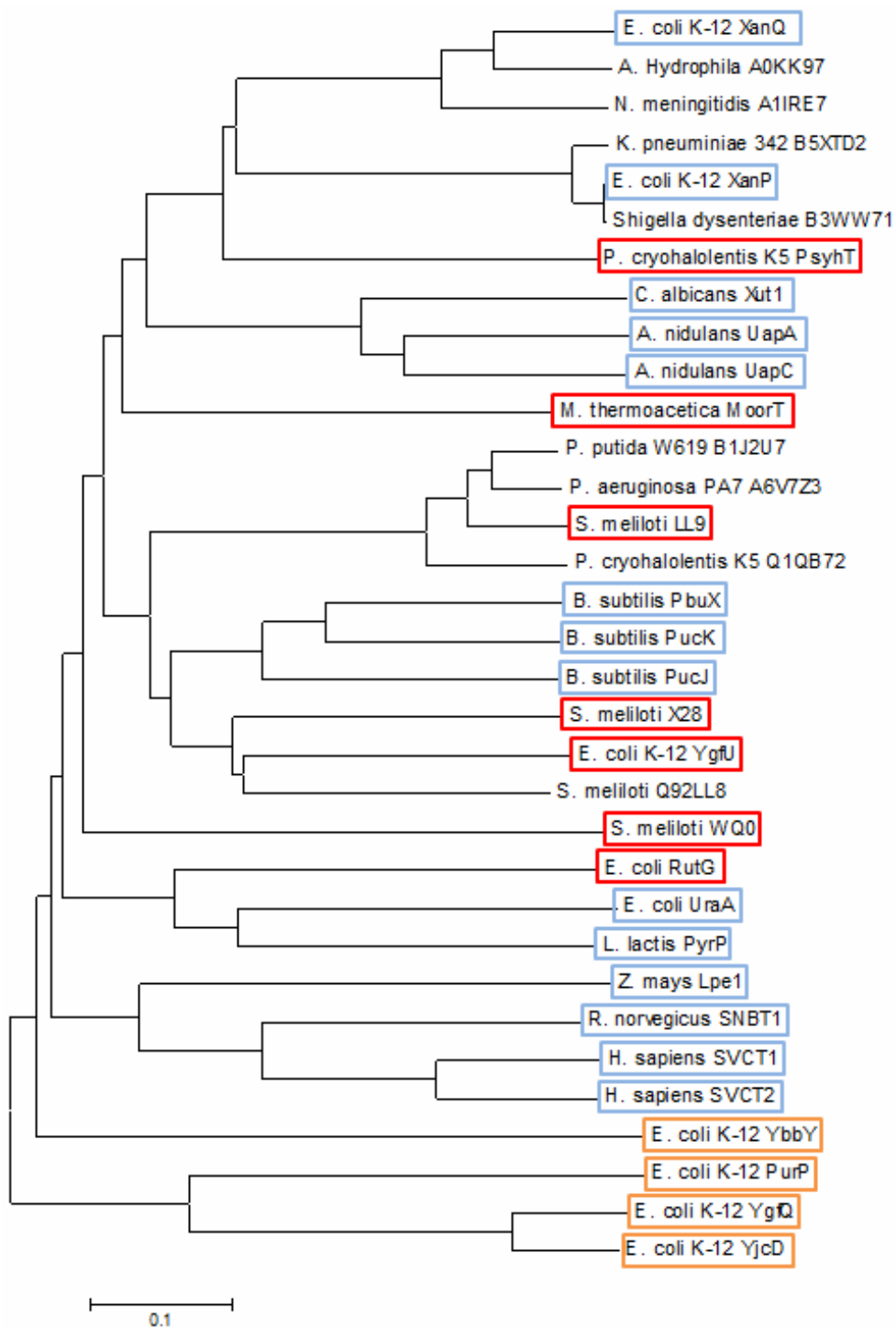
Πίνακας 3.15. Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων του XanQ σε θέσεις σημαντικών καταλοίπων που διαφέρουν στον YgfU. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις κατασκευές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (0.1 - 100 μM) στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis- Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συμβολή της παρούσας διατριβής στην ανάλυση της οικογένειας NAT

Η παρούσα διατριβή συμβάλλει στη διαλεύκανση των σχέσεων δομής- λειτουργίας της οικογένειας NAT/NCS2, με δύο τρόπους: αφενός, με τον λειτουργικό χαρακτηρισμό νέων ομολόγων μεταφορέων, που εμπλουτίζουν τη βάση μελέτης για την εξελικτικά ευρεία αυτή οικογένεια και, αφετέρου, με την αναγνώριση νέων μοριακών περιοχών και πλευρικών ομάδων αμινοξέων που είναι σημαντικές στο μηχανισμό ενεργού μεταφοράς και εξειδίκευσης, τόσο στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ (Karatza and Frillingos, 2005), ο οποίος χρησιμοποιείται σαν μοντέλο μελέτης στο εργαστήριό μας, όσο και στον μεταφορέα ουρικού YgfU που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά με την παρούσα διατριβή.

Στην πρώτη ενότητα της εργασίας, η συστηματική ανάλυση του διαμεμβρανικού τμήματος TM12 του XanQ αποκαλύπτει δύο κατάλοιπα σημαντικά για τη λειτουργία του μεταφορέα, τα Ile-432 και Asn-430, στο μέσο της πιθανής έλικας, τα οποία είναι σημαντικά για την εξειδίκευση του μεταφορέα και το Asn-430 βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης. Στη δεύτερη ενότητα, χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά μια σειρά από νέους μεταφορείς NAT, από βακτηριακά ομόλογα συγγενικά του XanQ, δηλαδή 2 νέοι μεταφορείς από την *E. coli*, ένας μεταφορέας ουρικού οξέος χαμηλής συγγένειας (YgfU) και ένας μεταφορέας ξανθίνης χαμηλής συγγένειας (RutG), 3 μεταφορείς από το ριζόβιο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* οι οποίοι είναι μεταφορείς ουρικού (X28, WQ0) ή ουρικού και ξανθίνης (LL9), καθώς και δύο ομόλογα από ακραιόφιλους οργανισμούς, ο μεταφορέας ουρικού PsychT από τον ψυχρόφιλο *Psychrobacter cryohalolentis* και ο μεταφορέας ξανθίνης MoorT από το θερμόφιλο κλοστρίδιο *Moorella thermoacetica*. (Εικόνα 4.1). Στην τρίτη ενότητα, επιχειρήσαμε να εφαρμόσουμε μια προσέγγιση για την αποκάλυψη μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τις διαφορές εξειδίκευσης μεταξύ συγγενικών ομολόγων, βασιζόμενοι στην ομάδα των δυνητικά σημαντικών καταλοίπων που έχουν βρεθεί από τη μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του XanQ. Από την πρώτη αυτή προσέγγιση, που περιλάμβανε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα ουρικού YgfU και εισαγωγή των «αντίστροφων» αντικαταστάσεων στις αντίστοιχες θέσεις του XanQ, πήραμε στοιχεία που αναδεικνύουν κυρίως το ρόλο της Thr-100 (Asn-93 στον XanQ), στο μέσο της έλικας TM3, για τον καθορισμό της επιλογής υποστρώματος μεταξύ ουρικού/ξανθίνης.



Εικόνα 4.1. Φυλογενετικό δενδρόγραμμα μελών της οικογένειας NAT/NCS2. Το δέντρο υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Mega 3.0. Ομόλογα που έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά φαίνονται σε μπλε πλαίσιο (όσα ήταν γνωστά πριν την παρούσα διατριβή) και κόκκινο πλαίσιο (αυτά που χαρακτηρίστηκαν στην παρούσα διατριβή), ενώ σε πορτοκαλί πλαίσιο φαίνονται τα υπόλοιπα ομόλογα της *E. coli* που μελετήθηκαν αλλά για τα οποία δε βρέθηκε κάποια πιθανή λειτουργία.

4.2 Συμμετοχή της έλικας TM12 στον μοριακό μηχανισμό του XanQ

Με χρήση της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης στην έλικα TM12 του XanQ και με εκτενείς σημειακές μεταλλαξιγένεσεις σε θέσεις που θεωρήθηκαν ως σημαντικές, ανακαλύφθηκαν δύο κατάλοιπα που είναι σημαντικά για την λειτουργία του μορίου, τα Asn-430 και Ile-432 τα οποία βρίσκονται στο μέσο της πιθανής διαμεμβρανικής έλικας. Αν και δεν είναι αναντικατάστατα, φαίνεται ότι προκαλούν συγκεκριμένους στερεοχημικούς περιορισμούς στη δέσμευση του υποστρώματος ή αναλόγων του, οι οποίοι οδηγούν σε μεταλλάγματα με μειωμένη ή καθόλου ενεργότητα και μειωμένη συγγένεια για τη μεταφορά ξανθίνης και την αναγνώριση αναλόγων με ογκώδεις υποκαταστάτες. Τέτοιοι περιορισμοί πιθανότατα επιδρούν άμεσα στην περίπτωση του Asn-430, όπως αποδεικνύουν τα πειράματα επίδρασης αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων (NEM), όμως φαίνεται ότι η επίδραση είναι έμμεση στην περίπτωση του Ile-432 το οποίο βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά της προβλεπόμενης έλικας. Σε κάθε περίπτωση, φαίνεται ότι τα Asn-430 και Ile-432 *per se* ή ο σχετικά πολικός χαρακτήρας της αντίστοιχης πλευρικής αλυσίδας δεν είναι αναντικατάστατα για τη μεταφορά ξανθίνης, αποκλείοντας την άμεση συμμετοχή των θέσεων αυτών στην πρόσδεση ξανθίνης μέσω ειδικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Ile-432) ή δεσμών υδρογόνου (Asn-430).

Η Asn-430 βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης

Ως προς την Asn-430, τα ευρήματά μας ότι το μετάλλαγμα μοναδικής κυστεϊνής N430C είναι πολύ ευαίσθητο σε απενεργοποίηση από το NEM (IC_{50} 10 μ M) και ότι παρουσία ενός μη-μεταφερόμενου υψηλής συγγένειας αναλόγου ξανθίνης, της 2-θειοξανθίνης, προστατεύει απόλυτα από την επίδραση αυτή, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αυτό το κατάλοιπο βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Το γεγονός ότι το φυσιολογικό υπόστρωμα, η ξανθίνη, δεν προστατεύει σε παρόμοιες συνθήκες (\leq 1mM) (Εικόνα 3.14) μπορεί να σημαίνει ότι η συγγένεια πρόσδεσης της ξανθίνης είναι χαμηλότερη από αυτή της 2-θειοξανθίνης, ή ότι λόγω της μεγάλης ταχύτητας μεταφοράς το μεταφερόμενο υπόστρωμα μένει για λιγότερο χρόνο στο κέντρο δέσμευσης από ένα μη-μεταφερόμενο ανάλογο, οπότε δεν παρουσιάζει κάποια ανάλογη προστασία. Παρόμοια εικόνα, δηλαδή υψηλή ενεργότητα, ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM και άλλα αλκυλιωτικά αντιδραστήρια, και απόλυτη προστασία από την απενεργοποίηση από ένα μη-μεταφερόμενο ανάλογο υψηλής συγγένειας αλλά μικρότερη προστασία από το μεταφερόμενο

υπόστρωμα, έχει παρατηρηθεί και σε άλλη μία περίπτωση μεταλλάγματος δευτερογενούς μεταφορέα. Πρόκειται για το Cys-148 στην περμεάση λακτόζης LacY της *E. coli* (Frillingos *et al.*, 1998), το οποίο είχε προταθεί ότι βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμησης και αυτή η εγγύτητα αποδείχθηκε τελικά με την επίλυση της δομής της LacY (Abramson *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2007).

Η Ile-432 είναι απαραίτητη για την εξειδίκευση ενώ Ile-432 και Asn-430 δρουν συνδυαστικά για την επιλεκτικότητα ως προς τη μεταφορά ξανθίνης

Ως προς το Ile-432, το οποίο βρίσκεται στην άλλη πλευρά της διαμεμβρανικής α-έλικας αλλά στο ίδιο βάθος στη μεμβράνη με το Asn-430, τα αποτελέσματά μας από την εκτενή μεταλλαξιγένεση δείχνουν ότι μπορεί να επηρεάζει τη δέσμηση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμησης έμμεσα. Απαιτείται στη συγκεκριμένη θέση ένα κατάλοιπο με πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένου μεγέθους και προσανατολισμού για να επιτρέπεται η σωστή πρόσδεση και μεταφορά του υποστρώματος. Μια αντικατάσταση της Ile-432 που δίνει πιο μεγάλο όγκο ή παρόμοιο όγκο και διαφορετικό προσανατολισμό πλευρικής ομάδας (όπως Phe, Trp, Met ή ακόμα και Leu) οδηγεί σε απενεργοποίηση γιατί μπορεί να εμποδίζει έμμεσα την πρόσδεση ή μεταφορά του υποστρώματος, μέσω στερεοχημικών παρεμποδίσεων και ανεπιθύμητης αναδιάταξης των ελίκων που επηρεάζουν το κατάλοιπο Asn-430 το οποίο βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμησης. Για τον ίδιο λόγο αλλαγές της Ile-432 με μικρότερο όγκο πλευρικής ομάδας (Ala, Ser, Thr, Val) μπορεί να επιτρέπουν την πρόσληψη ξανθίνης, έστω και με μειωμένη συγγένεια, όμως εμποδίζουν την αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης με ογκώδεις αντικαταστάσεις στον πυριμιδινικό δακτύλιο, κάτι που φαίνεται ιδιαίτερα από την αδυναμία αναγνώρισης των αναλόγων 1-μεθυλοξανθίνη και 6-θειοξανθίνη (Πίνακας 3.3).

Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα από το εργαστήριό μας από την κατασκευή ενός χιμαιρικού μεταφορέα που περιέχει τις 11 πρώτες έλικες του XanQ και την δωδέκατη του UapA (N11-C1) και μεταλλαξιγένεση του χιμαιρικού μεταφορέα αυτού (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή, υπό συγγραφή) υποδεικνύουν ότι τα κατάλοιπα Asn-430 και Ile-432 μπορεί να δρουν συνδυαστικά για τη ρύθμιση της εξειδίκευσης του XanQ ενώ σε ένα διαφορετικό ενδομοριακό περιβάλλον, όπως αυτό της χίμαιρας N11-C1, μπορεί να είναι απαραίτητα για την εξασφάλιση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης. Συγκεκριμένα, ο χιμαιρικός μεταφορέας N11-C1 είναι ανενεργός και εκφράζεται ελάχιστα στη μεμβράνη. Όταν στις αντίστοιχες θέσεις του N11-C1 όπου υπάρχουν Thr ή Phe εισήχθη ξανά η Asn-430 (T526N) ή η Ile-432 (F528I), παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης στη μεμβράνη αλλά όχι

στην ενεργότητα. Όταν όμως εισήχθησαν και τα δύο κατάλοιπα μαζί (T526N/F528I) παρατηρήθηκε κανονική έκφραση στη μεμβράνη και μικρή αλλά σημαντική ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Ωστόσο, ο μεταλλαγμένος αυτός μεταφορέας (N11/C1/T526N/F528I) είχε διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης από τον XanQ, κυρίως επειδή επέτρεπε την αναγνώριση αναλόγων με τροποποιήσεις στις θέσεις 7 και 8 (7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, οξυπουρινόλη). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι δύο θέσεις στο μέσο της έλικας TM12 (Asn/Thr-430, Ile/Phe-432) δρουν συνδυαστικά για την εξασφάλιση της επιλεκτικότητας ως προς το ειδικό υπόστρωμα που μεταφέρεται (ξανθίνη) αλλά η βέλτιστη εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση των αναλόγων ξανθίνης εξαρτάται και από άλλους μοριακούς καθοριστές στην έλικα TM12 (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή, υπό συγγραφή).

Αν και το δωδέκατο διαμεμβρανικό τμήμα δεν παρουσιάζει υψηλή συντήρηση στους μεταφορείς NAT, είναι αξιοσημείωτο ότι, στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας, στη θέση του Asn-430 συντηρείται ένα αμινοξύ με δυνατότητα για δεσμούς υδρογόνου (Asn, Thr ή Ser) και στη θέση του Ile-432 συντηρείται ένα υδρόφοβο αμινοξύ (Ile, Phe ή Met), ενώ ανάμεσα στις 2 θέσεις παρεμβάλλεται πάντοτε Gly ή Pro. Στην αλληλουχία του μυκητιακού ομολόγου UapA, στις αντίστοιχες θέσεις των Ile-432 και Asn-430 υπάρχουν τα Phe-528 και Thr-526. Όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή (κεφάλαιο 1.3.3), η Phe-528 φαίνεται να λειτουργεί ως μοριακό «φίλτρο» για την αναγνώριση των κατάλληλων πουρινών στον UapA και τον αποκλεισμό των πουρινών που δεν είναι υποστρώματα, χωρίς όμως να αποτελεί άμεσα τμήμα του κέντρου δέσμευσης (Vlanti *et al.*, 2006). Είναι χαρακτηριστικό ότι η αντικατάσταση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης Phe-528 οδηγεί σε δυνατότητα πρόσληψης υποστρωμάτων που κανονικά δε μεταφέρονται από τον UapA, όπως γουανίνη και υποξανθίνη, χωρίς όμως να επηρεάζεται η μεταφορά των φυσιολογικών υποστρωμάτων ουρικού και ξανθίνης (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006). Επίσης, έχει βρεθεί ότι και το κατάλοιπο Thr-526 «χαλαρώνει» την εξειδίκευση του μεταφορέα UapA, αλλά και πάλι χωρίς να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη (Parageorgiou *et al.*, 2008). Επομένως, τόσο στον XanQ όσο και στον UapA, τα δύο σημαντικά κατάλοιπα της έλικας TM12 φαίνεται ότι συνεισφέρουν στην επιλεκτικότητα για τη βέλτιστη δέσμευση και μεταφορά πουρινών. Αυτός ο ρόλος είναι ίσως πιο καθοριστικός στον XanQ όπου η αναγνώριση του υποστρώματος και των αναλόγων του υπόκειται σε περισσότερους στερεοχημικούς περιορισμούς απ' ό,τι στον UapA (Goudela *et al.*, 2005).

Η έλικα TM12 αλληλεπιδρά με το μοτίβο «υπογραφή»

Τα συμπεράσματα μέχρι τώρα προτείνουν ότι το μέσο της διαμεμβρανικής έλικας TM12 βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης στην τριτοταγή δομή (βλ. Εικόνα 3.16). Επιπλέον ευρήματα στον UapA ενισχύουν την πρόταση αυτή καθώς βρέθηκε από μια σειρά διπλών μεταλλάγματων ότι το Phe-528 αλληλεπιδρά λειτουργικά με το Gln-408 (Gln-324 στον XanQ) (Vlanti *et al.*, 2006) στην περιοχή του μοτίβου «υπογραφή», ένα κατάλοιπο που συμμετέχει στη δέσμευση του υποστρώματος (Koukaki *et al.*, 2005), και μια εντελώς πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει αλληλεπίδραση της συνδετικής περιοχής μεταξύ TM8-TM9 του UapA με την υδρόφιλη θηλειά μεταξύ TM1-TM2 και με την έλικα TM12 (Kosti *et al.*, 2010). Η υψηλή συντήρηση του Gln-324 (αρίθμηση από τον XanQ) υποδηλώνει ότι μια παρόμοια αλληλεπίδραση μπορεί να συμβαίνει ανάμεσα στην περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» και την έλικα TM12 και στον XanQ. Όντως, τα δεδομένα από τις μελέτες μας με τα διπλά μεταλλάγματα δείχνουν μια τέτοια αλληλεπίδραση. Αν και το μονό μετάλλαγμα Q324E έχει χαμηλή συγγένεια πρόσληψης ξανθίνης και πολύ χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης για όλα τα ανάλογα (Karatzas *et al.*, 2006), το διπλό μετάλλαγμα I432S/Q324E αναγνωρίζει όπως είδαμε 9-μεθυλοξανθίνη και οξυπουρινόλη και με μικρότερη συγγένεια 2-θειοξανθίνη και 3-μεθυλοξανθίνη και επίσης αναγνωρίζει πουρίνες που δεν είναι κανονικά υποστρώματα του XanQ, δηλαδή υποξανθίνη, αδενίνη και γουανίνη (Εικόνα 3.18). Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στο διπλό μετάλλαγμα F528S/Q408E στον UapA, που αναγνωρίζει κι αυτό υποστρώματα τα οποία δεν μπορούν να αναγνωρισθούν από τα μονά μεταλλάγματα, δείχνοντας διεύρυνση της εξειδίκευσης (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006). Άρα φαίνεται ότι υπάρχει μια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο θέσεων στην έλικα TM12 και στο μοτίβο «υπογραφή».

Η ανάλυση της επίδρασης του χλωριούχου καδμίου στην ενεργότητα των περμεασών διπλών κυστεϊνών δεν οδηγεί σε σαφή συμπεράσματα για το αν οι αντίστοιχες περιοχές της έλικας TM12 και του μοτίβου γειτνιάζουν μεταξύ τους στη τριτοταγή δομή του μορίου, δείχνει ωστόσο ότι οι θέσεις των A323C και N430C αντιδρούν με τα ιόντα Cd^{2+} και είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τα ιόντα καδμίου Cd^{2+} έχει δειχθεί ότι μπορούν να αντιδρούν με την πλευρική αλυσίδα της Cys (Perez-Garcia *et al.*, 1996), και η συγγένεια της αλληλεπίδρασης Cys- Cd^{2+} ενισχύεται σημαντικά, με την ταυτόχρονη δέσμευση και δεύτερης κυστεϊνης με το δισθενές κατιόν καδμίου, ώστε να σχηματισθούν κέντρα συντονισμού για δέσμευση, του τύπου Cys-Cd-Cys (Bénitah *et al.*, 1996). Η ιδιότητα αυτή των ιόντων καδμίου έχει αξιοποιηθεί για αρχικές μελέτες

προσβασιμότητας και ελέγχου της πιθανής γειτνίασης στην τριτοταγή δομή συγκεκριμένων ζευγών καταλοίπων και σε άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς (Brocke *et al.*, 2001; Zomot *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006). Σε πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας, το διπλό μετάλλαγμα του XanQ E429C/H257C βρέθηκε ότι εμφανίζει σημαντική αναστολή ενεργότητας μετά από επώαση με CdCl₂ (IC₅₀ 100 μM). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι οι θέσεις 429 (έλικα TM12) και 257 (έλικα TM8) είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον, και ότι γειτνιάζουν στη δομή της XanQ ώστε να μπορούν να δημιουργούν από κοινού κέντρο συντονισμού για δέσμευση του καδμίου (Καρενά Α., 2009, Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης). Τέτοιο συμπέρασμα εγγύτητας δε μπορεί να εξαχθεί στην περίπτωση των A323C και N430C καθώς οι δύο θέσεις είναι από μόνες τους πολύ προσβάσιμες (IC₅₀ 13 μM και 10 μM αντίστοιχα) και το διπλό τους μετάλλαγμα δε διαφέρει πολύ από τα μονά, αν και εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία στο κάδμιο (IC₅₀ 2 μM). Μια τέτοια ισχυρή επίδραση του CdCl₂ στις θέσεις αυτές δείχνει ότι ίσως δημιουργείται ένα κέντρο συντονισμού μεταξύ της κυστεΐνης και κάποιας άλλης θέσης αντίστοιχα προσβάσιμης από το υδατικό περιβάλλον, η οποία θα μπορούσε να είναι κάποιο κατάλοιπο His του XanQ, καθώς οι ιστιδίνες έχει επίσης προταθεί ότι μπορούν να συνεισφέρουν στο κέντρο συντονισμού του καδμίου (Bénitah *et al.*, 1996). Σε κάθε περίπτωση, πάντως, η ισχυρή αναστολή που παρατηρείται με τα ιόντα καδμίου για τα μεταλλάγματα A323C, N430C και N430C/A323C υποδηλώνει ότι η δέσμευση του καδμίου εμποδίζει κάποια αλλαγή διαμόρφωσης που είναι απαραίτητη στον μηχανισμό δέσμευσης-μεταφοράς υποστρώματος, πράγμα που επιβεβαιώνει, έμμεσα, τον καθοριστικό ρόλο της έλικας TM12 και του μοτίβου «υπογραφή» στη λειτουργία και στην εξειδίκευση του κέντρου δέσμευσης.

Για τη διερεύνηση της εγγύτητας μεταξύ των περιοχών αυτών καθώς και άλλων περιοχών του μορίου του XanQ βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας πειράματα διασταυρωτής σύνδεσης (cross linking) ενώ ξεκάθαρη εικόνα αναμένεται να δοθεί με την πιθανή επίλυση της δομής με κρυσταλλογραφία, από συνεργαζόμενα εργαστήρια.

4.3 Νέα χαρακτηρισμένα ομόλογα από την οικογένεια NAT/NCS2 – Νέα στοιχεία για φυσιολογικούς ρόλους μεταφορέων NAT

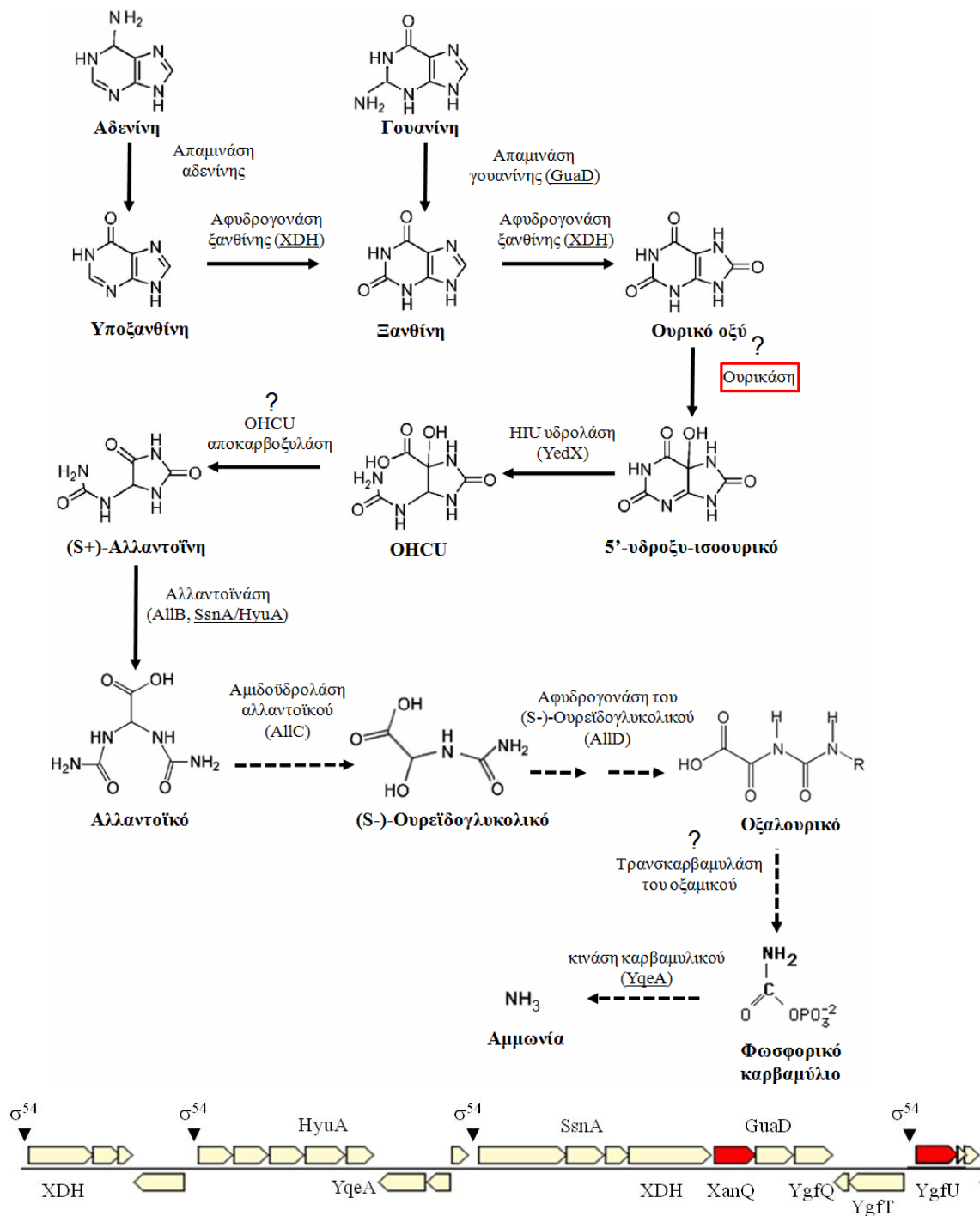
Με τον χαρακτηρισμό μιας σειράς νέων ομολόγων της οικογένειας NAT (βλ. Εικόνα 4.1), διευρύνεται η βάση των λειτουργικών δεδομένων που θα επιτρέψει σύγκριση μεταξύ περισσότερων μεταφορέων με διαφορετικά προφίλ εξειδίκευσης, και μάλιστα στο ίδιο πειραματικό σύστημα (ετερόλογα εκφρασμένοι σε *E. coli* K-12 από IPTG-επαγόμενους φορείς). Ο μετέπειτα στόχος θα είναι να αξιοποιηθεί αυτή η πληροφορία για τη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου μοντέλου των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης για την οικογένεια NAT/NCS2, μέσω στοχευμένης μελέτης του ρόλου των σημαντικών θέσεων καταλοίπων του XanQ που διαφέρουν ή συντηρούνται στους άλλους μεταφορείς. Παράλληλα, ωστόσο, τα νέα λειτουργικά δεδομένα που παρουσιάζουμε έχουν ενδιαφέρον σε σχέση με τη φυσιολογία των μικροοργανισμών και των αντίστοιχων μεταφορέων ουρικού ή ξανθίνης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των YgfU (*E. coli*), RutG (*E. coli*) και LL9 (*S. meliloti*).

Ο YgfU είναι μεταφορέας ουρικού οξέος χαμηλής συγγένειας: Μπορεί το ουρικό οξύ να αξιοποιείται καταβολικά στην *E. coli* ;

Από τα 10 ομόλογα NAT της *E. coli*, μόνο ένα (το YicO) δεν ανιχνεύεται καθόλου στη μεμβράνη μετά από εφαρμογή του πρωτοκόλλου υπερέκφρασης στο πειραματικό μας σύστημα, αφήνοντας την πιθανότητα ότι μπορεί να είναι ψευδογονίδιο. Από τα υπόλοιπα, για τα 4 τα οποία δεν διατηρούν σε σημαντικό βαθμό το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας (Εικόνα 3.22), δεν βρέθηκε καμιά πιθανή λειτουργία. Από τα 5 ομόλογα που μένουν, τα 3 χαρακτηρίστηκαν ως μεταφορείς ξανθίνης (XanQ, XanP, RutG), ενώ το 1 (UraA) φαίνεται να είναι μεταφορέας ουρακίλης αλλά λειτουργεί με διευκολυνόμενη διάχυση και όχι ενεργό μεταφορά (Εικόνα 3.29). Ένα από τα ομόλογα αυτά, ο YgfU, βρέθηκε ότι είναι ένας υψηλής απόδοσης αλλά χαμηλής συγγένειας μεταφορέας ουρικού οξέος (K_m 0.3 mM), ενώ έχει πολύ μικρή ενεργότητα για μεταφορά ξανθίνης, και μόνο στους 37 °C (Εικόνα 3.28). Το αποτέλεσμα αυτό είναι από μόνο του σημαντικό, καθώς είναι η πρώτη φορά που χαρακτηρίζεται ένας μεταφορέας ουρικού οξέος στην *E. coli* και γενικότερα στα εντεροβακτήρια, ενώ δεν είναι γνωστοί οι πιθανοί μηχανισμοί καταβολισμού του ουρικού οξέος στην *E. coli*.

Από τις πουρίνες, η *E. coli* έχει δειχθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιήσει μόνο την αδενίνη ως μοναδική πηγή αζώτου σε αερόβιες συνθήκες, παράγοντας αλλαντοΐνη, και μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει την υποξανθίνη, τη γουανίνη ή την ξανθίνη για να ενδυναμώσει την αερόβια ανάπτυξη όταν χρησιμοποιείται αμμώνιο ή ασπαρτικό ως βασική πηγή αζώτου (Xi *et al.*, 2000; Karatza and Frillingos, 2005). Επίσης, έχει δειχθεί ότι υπό αναερόβιες συνθήκες μπορεί να χρησιμοποιήσει την αλλαντοΐνη ως μοναδική πηγή αζώτου (Cusa *et al.*, 1999). Προκύπτουν λοιπόν ερωτήματα για το πώς παράγεται αλλαντοΐνη στην *E. coli*, και γιατί ένας οργανισμός να διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα αφυδρογονάσης ξανθίνης (XDH, Xi *et al.*, 2000), η οποία μετατρέπει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και μετά σε ουρικό οξύ, απομακρύνοντας τις πουρίνες από τα μονοπάτια περίσωσης, αν δε διαθέτει τους μηχανισμούς εκείνους που θα αξιοποιήσουν το ουρικό οξύ (**Εικόνα 4.2**). Γι' αυτόν το λόγο η ύπαρξη ενός μεταφορέα ουρικού οξέος στην *E. coli* (YgfU) μπορεί να φαίνεται «ανούσια». Μια πρόσφατη μελέτη (Hennebry *et al.*, 2006) στην προσπάθεια να αναζητήσει κάποιον φυσιολογικό ρόλο για το ομόλογο της TLP (Transthyretin-like protein) οικογένειας στην *E. coli* (YedX) το οποίο έχει προταθεί λόγω ομοιότητας με το PucM του *B. subtilis* (Lee *et al.*, 2005) ότι έχει δραστηριότητα HIU υδρολάσης (**Εικόνα 4.2**), πρότεινε ότι ο ρόλος του ουρικού οξέος στην *E. coli* είναι η προστασία από οξειδωτικές (αντιμικροβιακές) ενώσεις και θεωρεί πιθανή την οξειδωτική μη ενζυματική μετατροπή του ουρικού σε 5-υδροξυ-ισοουρικό (HIU). Κάτι τέτοιο φαίνεται να υποστηρίζεται από την περιπλασματική τοποθέτηση του YedX, καθώς το HIU που μπορεί να παραχθεί από την αντιοξειδωτική προστασία του ουρικού οξέος χρησιμοποιείται άμεσα από το ένζυμο.

Κατά συνέπεια, η ύπαρξη ενός μεταφορέα ουρικού οξέος χαμηλής συγγένειας σαν τον YgfU θα μπορούσε να σχετίζεται με την προστασία του κυττάρου υπό έντονα οξειδωτικές συνθήκες. Βέβαια, δεν είναι γνωστό πως θα μπορούσε να ρυθμίζεται φυσιολογικά η έκφραση του YgfU καθώς μπορεί να γίνεται επαγωγή του υπό αναερόβιες συνθήκες, κάτι που συμφωνεί με τη δυνατότητα της *E. coli* να χρησιμοποιεί την αλλαντοΐνη ως μοναδική πηγή αζώτου σε αναερόβιες συνθήκες (Cusa *et al.*, 1999) (Εικόνα 4.1). Ένα δεδομένο που ενισχύει αυτό το ενδεχόμενο είναι ότι, όπως δείχνει ανάλυση της αλληλουχίας με το πρόγραμμα HHPRED, το διπλανό γονίδιο από το *ygfU* στο γονιδίωμα της *E. coli*, το *ygfT*, έχει δομική ομοιότητα με την αφυδρογονάση μυρμηκικού της *E. coli* (Fdh-N) η οποία επάγεται κατά την αναερόβια ανάπτυξη της *E. coli* παρουσία νιτρικού (Jormakka *et al.*, 2002).



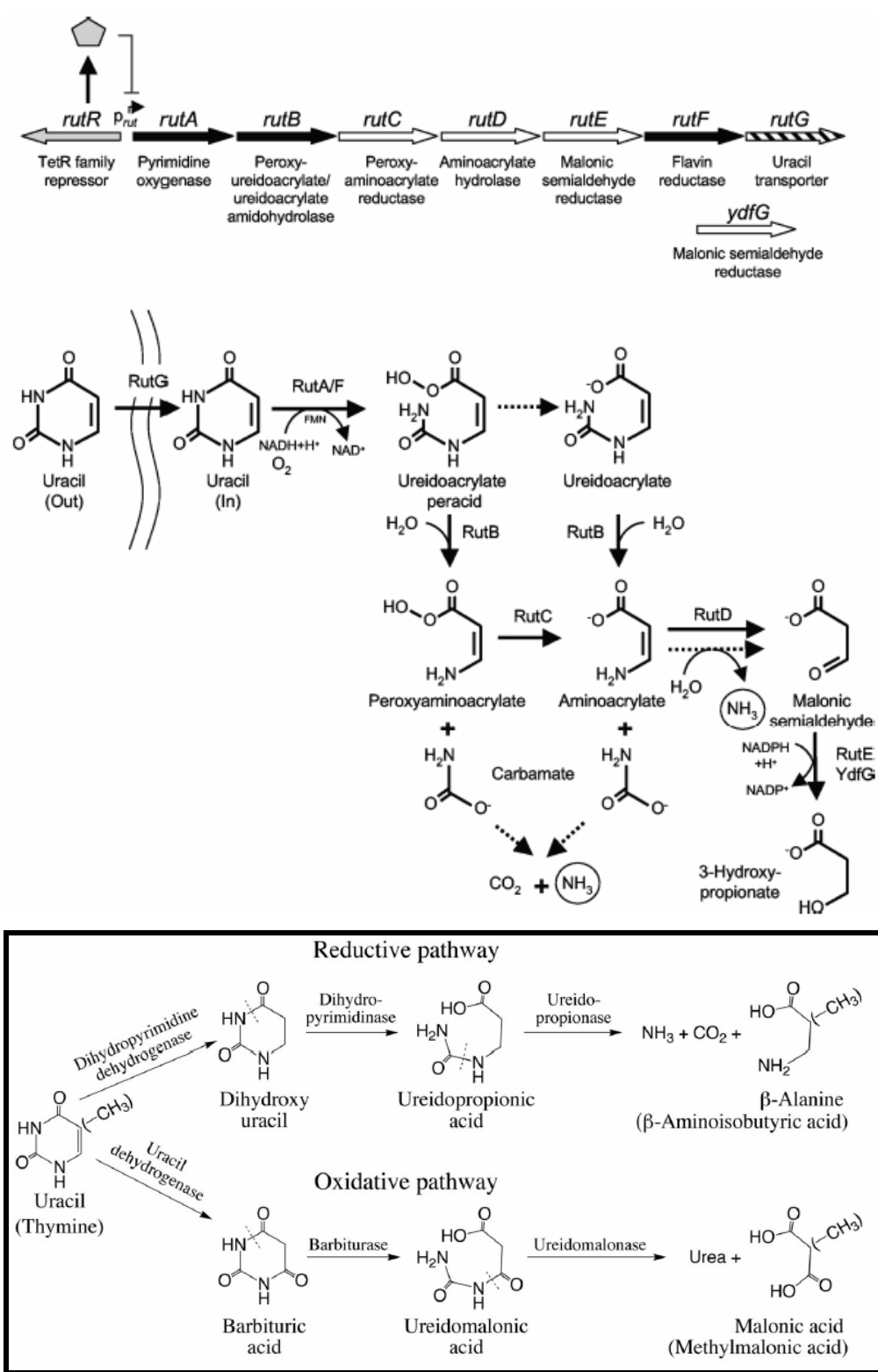
Εικόνα 4.2. Υποθετικό σχήμα καταβολισμού των πουρινών στην *E. coli*. Ο καταβολισμός του αλλαντοϊκού (διακεκομμένες γραμμές) έχει υποθεθεί μόνο σε αναερόβιες συνθήκες (Cusa *et al.*, 1999; Xi *et al.*, 2000). Τα ερωτηματικά σημαίνουν ένζυμα για τα οποία δεν έχουν βρεθεί αντίστοιχα γονίδια. Τα γονίδια που υπογραμμίζονται υπάρχουν στην ομάδα γονιδίων στην ίδια θέση του γονιδιώματος όπου υπάρχουν και τα XanQ και YgfU (κάτω σχήμα).

Η πιθανότητα ενός αντιοξειδωτικού ρόλου για τον μεταφορέα ουρικού YgfU στην *E. coli* υπενθυμίζει τον αντιοξειδωτικό ρόλο που έχει προταθεί για μεταφορείς NAT σε άλλους οργανισμούς. Στα θηλαστικά, ιδιαίτερα, ενώ ο μεταφορέας SVCT1 σχετίζεται περισσότερο με τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασκορβικού σε όλο το σώμα μέσω διαιτητικής απορρόφησης και νεφρικής επαναπρόσληψης, ο SVCT2 σχετίζεται με την πρόσληψη του ασκορβικού από μεταβολικά ενεργούς και εξειδικευμένους ιστούς που χρειάζονται αντιοξειδωτική προστασία (Savini *et al.*, 2007). Επιπλέον πρόσφατες μελέτες απέδειξαν τη συμμετοχή του SVCT2 στην αντιοξειδωτική προστασία στον εγκέφαλο και το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (Qiu *et al.*, 2007; Varma *et al.*, 2008). Επίσης, αντιοξειδωτικό ρόλος έχει προταθεί για τους πιθανούς ομόλογους μεταφορείς ουρικού σε ασπόνδυλα (Gournas and Diallinas, 2008). Είναι εξάλλου γνωστό ότι, παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, το ουρικό οξύ μετατρέπεται μη ενζυματικά σε 5-υδροξυ-ισοουρικό (HIU) και αλλαντοΐνη, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί από την ύπαρξη αλλαντοΐνης στο πλάσμα πτηνών παρότι τα πτηνά δε διαθέτουν δράση ουρικής (Simoyi *et al.*, 2003) και στους μύες μετά από εξαντλητική άσκηση (Hellsten *et al.*, 2001). Στον άνθρωπο, ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, το ουρικό οξύ είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία των νεφρών αλλά και για τη δράση του ως αντιοξειδωτικό στον ορό του αίματος (de Koning and Diallinas 2000, Enomoto *et al.*, 2002a, 2002b). Αρκετές μελέτες (Skinner *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999; Scott and Hooper, 2001; Hellsten *et al.*, 2001) έχουν αποδείξει ότι η μεγάλη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στα σωματικά υγρά προστατεύει από την οξείδωση. Μια τέτοια δράση έχει προταθεί ότι είναι η προστασία των ιστών από τις περοξυνιτρικές εκχύσεις των φλεγμονωδών κυττάρων (Scott and Hooper, 2001), καθώς και προστασία των μυϊκών κυττάρων από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) οι οποίες παράγονται κατά την έντονη δραστηριότητα (Hellsten *et al.*, 2001).

Ο RutG δεν μεταφέρει ουρακίλη, αλλά είναι μεταφορέας ξανθίνης χαμηλής συγγένειας: Ποια είναι η σχέση του με το οπερόνιο *rut* ;

Το RutG βρέθηκε ότι είναι χαμηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης (Εικόνα 3.30) παρά την ομοιότητά του με το μεταφορέα ουρακίλης UraA και σε αντίθεση με μελέτες που δείχνουν ότι ανήκει στο οπερόνιο *rut* που είναι υπεύθυνο για ένα μονοπάτι καταβολισμού της ουρακίλης (Loh *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Parales *et al.*, 2010). Οι μελέτες του οπερονίου *rut* αποκαλύπτουν ένα νέο τρόπο καταβολισμού πυριμιδινών στα εντεροβακτήρια μέσω του οπερονίου *rut* το οποίο μπορεί να χρησιμοποιήσει τις πυριμιδίνες σε θερμοκρασία δωματίου αλλά όχι στους 37 °C, μετατρέποντάς τις σε 3-υδροξυπροπιονικό (Εικόνα 4.3), το οποίο δε χρησιμοποιείται από την *E. coli* και αποβάλλεται. Μια σειρά από παραπροϊόντα όμως του μονοπατιού αυτού ίσως μπορούν να χρησιμοποιηθούν καταβολικά (Kim *et al.*, 2010). Κάθε γονίδιο του οπερονίου καταλύει μια αντίδραση του καταβολικού μονοπατιού ή αδρανοποιεί τοξικά ενδιάμεσα (Εικόνα 4.3).

Το γονίδιο *rutG*, το οποίο σε άλλα πρωτεοβακτήρια απουσιάζει από το οπερόνιο, θεωρείται μεταφορέας πυριμιδινών, χωρίς όμως κάποια πειραματική επιβεβαίωση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι το οπερόνιο δε λειτουργεί σε θερμοκρασία 37 °C οδηγεί σε μια υπόθεση ότι ίσως το οπερόνιο *rut* χρησιμοποιεί ενδοκυττάρια πυριμιδίνες, ανακυκλώνοντας συστατικά του ίδιου του κυττάρου (όπως RNA) σε συνθήκες στις οποίες η *E. coli* βρίσκεται εκτός του εντέρου των θηλαστικών (Parales *et al.*, 2010). Επομένως, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι ο RutG συμμετέχει στο οπερόνιο για την πρόσληψη εξωγενούς ουρακίλης. Η υπόθεση των Parales *et al.* (2010) ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής όπου βρέθηκε ότι ο RutG μεταφέρει ξανθίνη αντί για ουρακίλη. Η λειτουργική συμπλήρωση του *rutG* με το γονίδιο της φωσφοριβοσυλοτρανσφεράσης της ουρακίλης (*urp*) το οποίο καταναλώνει την ουρακίλη προωθώντας την στην οδό περίσωσης πυριμιδινών επίσης δεν οδηγεί σε ανιχνεύσιμη μεταφορά ουρακίλης. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι ο μεταφορέας RutG δεν μπορεί να επιτελέσει ούτε διευκολυνόμενη διάχυση (παθητική μεταφορά) ουρακίλης, σε αντίθεση με το συγγενικό του ομόλογο UraA που φαίνεται ότι λειτουργεί επιτελώντας παθητική μεταφορά ουρακίλης σε συνδυασμό με το ένζυμο Upp (Εικόνα 3.29).



Εικόνα 4.3. Το operόνιο *rut* στην *E. coli* και ο πιθανός του ρόλος στον καταβολισμό ουρακίλης (Parales *et al.*, 2010), σε σχέση με τα κλασικά μονοπάτια καταβολισμού ουρακίλης που ήταν γνωστά παλαιότερα (σε πλαίσιο, από Loh *et al.*, 2006).

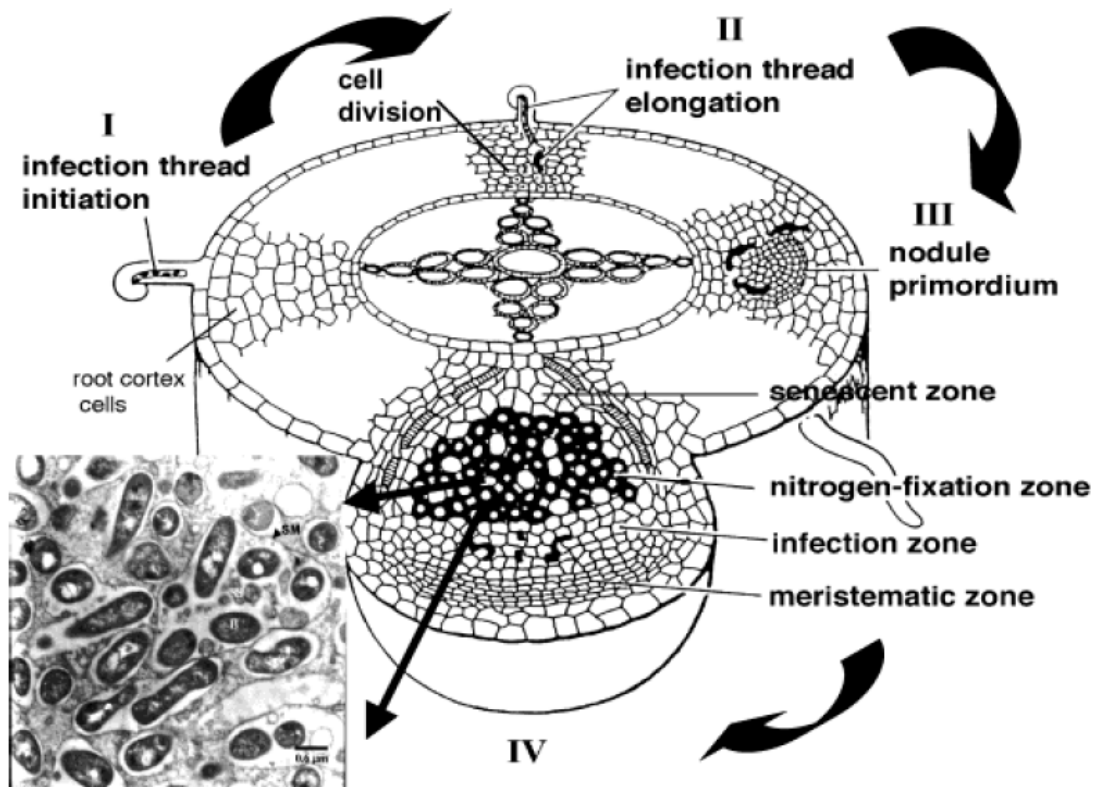
Ο LL9 είναι μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης με ευρεία εξειδίκευση: Μπορούν οι νουκλεοτιδικές βάσεις να συνεισφέρουν ως πηγές αζώτου στα ριζοβακτήρια;

Τα ριζοβακτήρια που σχηματίζουν αζωτοδεσμευτικά συμβιοσώματα στις ρίζες των ψυχανθών δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα ως προς τους μηχανισμούς πρόσληψης και ανταλλαγής μεταβολιτών μεταξύ του βακτηριοειδούς και του φυτικού κυτταροπλάσματος-ξενιστή. Με βάση πρωτεωμικές αναλύσεις, που συγκρίνουν κυρίως την τελική συμβιωτική μορφή (συμβιοσώματα) με μη συμβιωτικές εργαστηριακές καλλιέργειες των ριζοβακτηρίων, φαίνεται ότι το βακτηριακό γονιδίωμα εκφράζει πολλούς μεταφορείς, κυρίως αμινοξέων αλλά και άλλους άγνωστης λειτουργίας που επάγονται μόνο στο συμβιωτικό σύστημα (Djordjevic, 2004). Τέτοιοι μεταφορείς μπορεί να χρησιμεύουν για τροφοδοσία του μικροσυμβιώτη με πηγές ενέργειας ή τροφοδοσία του φυτού με αμμώνιο και αμινομάδες που προέρχονται από την αζωτοδέσμευση. Ωστόσο, το σύστημα της αζωτοδεσμευτικής συμβίωσης είναι πολύπλοκο και διαφέρει από είδος σε είδος ανάλογα με τους συμβιώτες, καθώς και στα γονίδια και που ρυθμίζονται στα διάφορα στάδια του σχηματισμού του φυματίου (Stacey *et al.*, 2006; Capela *et al.*, 2006; Rodriguez-Llorente *et al.*, 2009).

Μια πολύ ενδιαφέρουσα διαφορά που παρατηρήσαμε σε σχέση με τα πιθανά γονίδια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων που υπάρχουν στα γνωστά γονιδιώματα ριζοβακτηρίων (Πίνακας 3.9) είναι ότι διακρίνονται δύο ομάδες. Το *Sinorhizobium meliloti* και άλλα είδη που σχηματίζουν μη-καθορισμένα φυμάτια (φυμάτια όπου η μεριστωματική δραστηριότητα, συνεχίζεται διαρκώς και τελικά συνυπάρχουν όλα τα διαδοχικά στάδια συμβιωτικής αλληλεπίδρασης σε διακριτές ζώνες) (Εικόνα 4.4) έχουν έως και 4 ομόλογα των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 στο γονιδίωμά τους. Αντίθετα, το *Mesorhizobium loti* και άλλα είδη που σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια (φυμάτια όπου η μεριστωματική δραστηριότητα σταματά μετά τα αρχικά στάδια επιμόλυνσης και δεν συνεχίζεται στο τελικό στάδιο του συμβιοσώματος) δεν έχουν καθόλου γονίδια της οικογένειας NAT/NCS2.

Τα ομόλογα NAT του *S. meliloti*, όπως αποδείχθηκε στην παρούσα διατριβή, είναι λειτουργικά και ιδιαίτερα ένα από αυτά (LL9) μπορεί να λειτουργεί πολύ αποδοτικά ως μεταφορέας τόσο ξανθίνης, με υψηλή συγγένεια, παρόμοια με του XanQ (K_m 7 μ M), όσο και ουρικού, με χαμηλή συγγένεια (K_m 0.9 mM) και, μάλιστα, με ευρεία εξειδίκευση αφού αναγνωρίζει πολλά ανάλογα πουρινών (Εικόνα 3.33). Με βάση τη διαφορά στη φυσιολογία μεταξύ των ειδών με μη-καθορισμένα και των ειδών με καθορισμένα φυμάτια, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι πουρίνες που

αναγνωρίζει ο μεταφορέας LL9 χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου από τα αναπτυσσόμενα (μεριστωματικά) κύτταρα του *S. meliloti* είτε στο συμβιωτικό φυμάτιο είτε και σε ελεύθερη βακτηριακή καλλιέργεια. Στο θέμα αυτό δεν υπάρχει καμιά βιβλιογραφική αναφορά μέχρι σήμερα. Για να κατανοηθεί η πιθανή φυσιολογική σημασία που μπορεί να έχουν οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων στην ανάπτυξη του συμβιωτικού φυματίου, έχει ξεκινήσει μια συνεργασία με την εργαστηριακή ομάδα του Δρ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας) που ασχολείται με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και την πρωτεωμική ανάλυση σε πειραματικά μοντέλα ριζοβακτηρίου-φυτού, όπως του *S. meliloti* – *Medicago truncatula* (Flemetakis *et al.*, 2006; Kalloniati *et al.*, 2009; Kouri *et al.*, 2009).



Εικόνα 4.4. Στάδια στην ανάπτυξη του συμβιωτικού φυματίου του *Sinorhizobium meliloti* στα φυτά των γενών *Medicago* και *Melilotus*. Στο τελικό στάδιο (IV) φαίνονται οι διακριτές ζώνες ανάπτυξης όπου διατηρείται και μια ζώνη έντονης μεριστωματικής δραστηριότητας (meristematic zone) (από Djordjevic, 2004).

4.4 Η εξέλιξη της εξειδίκευσης πρόσληψης πουρινών

Από τις συστηματικές μελέτες μεταλλαξιγένεσης στον μεταφορέα XanQ που καλύπτουν μέχρι σήμερα πάνω από το 50% των καταλοίπων του μορίου (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010; Karena, Botou, *et al.*, unpublished results) έχει προκύψει ένα σύνολο σημαντικών θέσεων (κατάλοιπα αναντικατάστατα για τη λειτουργία του μεταφορέα, θέσεις στις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία καταλοίπου με συγκεκριμένο χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας, ή θέσεις που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση με αλκυλίωση) πολλές από τις οποίες έχουν αντίστοιχα σημαντικό ρόλο και στον ομόλογο μεταφορέα UapA (βλ. Εισαγωγή). Σ' αυτές τις σημαντικές θέσεις υπάρχει μεγάλη συντήρηση της πλευρικής ομάδας των καταλοίπων, πολύ μεγαλύτερη από τη συντήρηση της αλληλουχίας σε άλλες θέσεις μεταξύ των διαφορετικών ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 (**Εικόνα 4.5**). Για παράδειγμα, ανάμεσα στον XanQ και στα ομόλογα YgfU και LL9 που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά στην παρούσα διατριβή υπάρχει σχετικά μικρή ταυτότητα καταλοίπων στο σύνολο της αλληλουχίας (30% και 27%, αντίστοιχα), ενώ στις 23 σημαντικές θέσεις που ανακαλύφθηκαν στον XanQ η ταυτότητα καταλοίπων είναι διπλάσια σε ποσοστό (61% και 57%, αντίστοιχα) (**Πίνακας 4.1**). Λόγω των διαφορών στην επιλεκτικότητα υποστρώματος και στο προφίλ εξειδίκευσης που παρουσιάζουν οι διαφορετικοί μεταφορείς NAT (π.χ. XanQ, εξειδικευμένος μεταφορέας ξανθίνης, LL9, μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης με ευρύτερη εξειδίκευση, YgfU, μεταφορέας ουρικού οξέος), η ομάδα των λίγων σχετικά «σημαντικών» θέσεων καταλοίπων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για στοχευμένο σχεδιασμό πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης για να διερευνηθεί ο μηχανισμός και η μοριακή βάση των διαφορών εξειδίκευσης των μεταφορέων αυτών.

Στην παρούσα διατριβή, προσπαθήσαμε να αποδείξουμε την αξία μιας τέτοιας προσέγγισης εφαρμόζοντας μεταλλαξιγένεση σε κατάλοιπα των «σημαντικών» θέσεων του μεταφορέα ουρικού YgfU (**Πίνακας 4.1**) και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αντίστοιχα μεταλλάγματα του μεταφορέα ξανθίνης XanQ. Από την αρχική αυτή διερεύνηση προέκυψαν στοιχεία που επιβεβαιώνουν τη σημασία συντηρημένων θέσεων (όπως της His-31/37 στην έλικα TM1) και αναδεικνύουν το ρόλο άλλων θέσεων στην εξειδίκευση (Asn-93/Thr-100, στην έλικα TM3), ενώ υποδεικνύουν και περιοχές του YgfU που μπορεί να λειτουργούν διαφορετικά από τον XanQ (όπως μεταλλαγές στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8 του YgfU που έχουν δραματική επίπτωση στην έκφραση στη μεμβράνη).

	TM1	TM3	TM8			
	His-31	Asn-93	Val-261	Glu-272	Asp-276	Ser-284
XanQ (ξανθίνη)	VGAITHLLAIF	SIQSVNFSFVT	FHQFLVWGT	IYLLSVLEAV	GDITATAMV	SRRP IQGEE YQSRLKGG
XanP (ξανθίνη)	FAACQHLLAMF	SIQGTSTFNFA	WSLLPLMLV	FMTSLETIGD	ITATSDV	SEQPVSGL YMKRLKGG
YgfU (ουρακό)	ILGLQHVLVMY	VIMSVTFAAVT	FVSILMTAV	LIIVFIESMGM	FALGELV	GRKLS---SHDIIRG
PbuX (ξανθίνη)	SLGLQHVLAMY	VVLGCTFTA	AVS			---EIDLKGG
PucK (ουρακό)	MLGLQHMLAMY	VVLGCTFTA	AVG			---EKDLEKGG
PucJ (ουρακό)	TLSLQHVLAMY	VMLGSSFVA	VT			---DKDLVKG
UraA (ουρακίλη)	PLSLQHFLAMF	AYLGSSFAF	IS			---RDPGLHRS
PyrP (ουρακίλη)	GLSFQHFLAMF	AYMGSSFA	YIG			---KEPGLEKT
RutG (ξανθίνη/ουρακίλη)	VMGVQHAVAMF	SYLGSSAAF	VG			---MDPYMGRA
X28 (ουρακό)	ALGLQHVLVMY	IMMGIGFTA	VP			---EADLARG
WQ0 (ουρακό)	LFGLQHVLVMA	FIMVPGGAP	IA			---AHAIVPAT
LL9 (ξανθίνη/ουρακό)	AYGLQHVLAMY	LVQGVSF	SGVA			---SRRLGDD
PsychT (ξανθίνη/ουρακό)	LGAVQHVLAAF	ALQGTSTFG	LA			---EYKRKGG
MoorT (ξανθίνη)	MYGQHVLAMF	ICMGTAFF	IS			---RRELSGA
UapA (ξανθίνη/ουρακό)	ILGLQHALLAM	SVMGVSF	SI			---FESRIQGA
UapC (ξανθίνη/ουρακό)	LLGLQHALLAM	SVVGTST	FATIT			---FDSRIQGG
Xut1 (ξανθίνη/ουρακό)	ILGFQHALLAM	SVVGTST	FATIT			---PVHAINRG
Lpel1 (ξανθίνη/ουρακό)	LVGFQHVLVML	AVMSGSY	TYIY			---PSVFSRG
SNBT1 (ουρακίλη/πουρτόνες)	FLGLQHFLTAL	ILQGTST	FAFVA			---PKHAINRG
SVCT1 (ασκορβικό)	LLGFQHFLT	LFQSAFA	FALV			---PVHAINRG
SVCT2 (ασκορβικό)	FLGLQHFLT	LFQSAFA	FALV			---PIHAINRG
	...QH..					E .. GD ..AT.

	TM9a	TM9b	TM12							
	Asp-304	Pro-318	Asn-325	Gly-333	Asn-430					
XanQ (ξανθίνη)	VLDG LVS	VIA SAVGS	LP LTTFA	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP	VLVENE	ICAGGLT
XanP (ξανθίνη)	VLANG	LNSFVSA	VFN	TFPN	SCFCG	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP
YgfU (ουρακό)	LRVDG	VGMIGGT	FNS	FPHT	SFSQ	NVGLV	SVTRVHS	RWVCI	SSGI	LILFG
PbuX (ξανθίνη)	YRREG	LAVLLGG	FNA	FPY	TAFS	QNVGL	VQLTGI	KKNAV	VVTG	VILMA
PucK (ουρακό)	YRREG	LAILLGG	FNA	FPY	TAFS	QNVGL	VQLSKM	KSNV	IAIT	GILVA
PucJ (ουρακό)	YRREG	IALLIG	FNA	FPY	NTFA	QNVGL	LQLTKV	KTRNI	VVTAG	CVLVL
UraA (ουρακίλη)	MFANG	LSTVIS	GFFGS	TE	NTTY	GENIG	VMAITR	VYSTW	VIGG	AIFAIL
PyrP (ουρακίλη)	LTGDG	LAQIIAG	FIGA	PPV	TSY	GENIG	VMAITK	HSTY	VLAG	AAVLA
RutG (ξανθίνη/ουρακίλη)	FVGDG	LATMLSG	SVGG	SGV	TTYA	ENIG	VMAITK	VYSTL	VFAA	AVIAM
X28 (ουρακό)	LRTDD	LGNIIG	GIFNT	FTY	TYA	QNVGL	LQLTKV	KTRNI	VVTAG	CVLVL
WQ0 (ουρακό)	IRGDA	VASLVGG	LFGTSL	II	TS	GENV	GIVRA	INVK	SRV	TATAG
LL9 (ξανθίνη/ουρακό)	LRADM	LSSLLAP	IFGS	FTQ	SFA	QNVGL	VQV	TGVK	SRV	VATG
PsychT (ξανθίνη/ουρακό)	VLDG	VNSAIAG	IFNS	FPY	ITFS	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP
MoorT (ξανθίνη)	ISVDG	LLSSIA	VLFNG	LSI	TFS	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP
UapA (ξανθίνη/ουρακό)	VLDG	INSVVA	ALATM	TE	MTTFA	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP
UapC (ξανθίνη/ουρακό)	VLGNG	ITCLLAG	LCTI	TE	MSVFA	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP
Xut1 (ξανθίνη/ουρακό)	VLGDG	ICGILL	STLMTM	TE	MSVFA	QNNGV	IQMIGV	ASRYVGR	TI AVMLVI	LGLFP
Lpel1 (ξανθίνη/ουρακό)	IGNEG	ISII	DGMCG	TLT	GT	AASV	ENAG	LAVTR	VGSRR	VIKIS
SNBT1 (ουρακίλη/πουρτόνες)	IGIEG	LGCLLAG	AWGT	NGT	TSY	ENV	GALGI	TRVGS	RRV	VVYGA
SVCT1 (ασκορβικό)	IFTEG	ICCCI	IAGLL	GTG	NS	TSSS	PNIG	VLGI	TKVGS	RRV
SVCT2 (ασκορβικό)	IFVEG	LSCVLD	GIFGT	GNS	TSSS	PNIG	VLGI	TKVGS	RRV	VVYGA
	...DG..									

Εικόνα 4.5. Στοιχίση αλληλουχιών χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT. Η αρίθμηση είναι από το XanQ. Σε πλαίσια φαίνονται οι θέσεις των 23 σημαντικών καταλοίπων του XanQ (βλ. Πίνακα 4.1). Μοτίβα αλληλουχίας που συντηρούνται σε υψηλό βαθμό (consensus) φαίνονται κάτω από τις στοιχισμένες αλληλουχίες. Στοιχίζονται οι μεταφορές από την *E. coli* XanQ (P67444) και XanP (P0AGM9) (Karatzas and Frillingos, 2005), UraA (P0AGM7) (Andersen *et al.*, 1995), YgfU (Q46821) (παρούσα εργασία), RutG (P75892) (ξανθίνη-παρούσα εργασία/ουρακίλη- Loh *et al.*, 2006), από το *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140), και PucJ (O32139) (Christiansen *et al.*, 1997, Schultz *et al.*, 2001), από το *Sinorhizobium meliloti* SM1021 LL9 (Q92LL9), X28 (Q92X28), WQ0 (Q92WQ0) (παρούσα εργασία), από το *Psychrobacter cryohalolentis* K5 Pcryo_1913 (PsychT) (Q1Q9G3) (παρούσα εργασία), από το *Moorella thermoacetica* Moth_2118 (MoorT) (Q2RGM9) (Μερμελέκας Γ., 2009, Διδ. Διατριβή- παρούσα εργασία), από το *Clostridium perfringens* YcpX (P50487) (Brynestad *et al.*, 1994), από το *Lactococcus lactis* PyrP (Q9CF78) (Turner *et al.*, 1994, Martinussen *et al.*, 2001), από το *A. nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P487777) (Diallinas *et al.*, 1995), από το *Candida albicans* Xut1 (AAX2221) (Goudela *et al.*, 2005), από το *Zea mays* Lpel1 (Q41960) (Argyrou *et al.*, 2001), από το *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (Q9UHI7) και SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3) (Tsukaguchi *et al.*, 1999), από το *Ratus norvegicus* SNBT1 (D2KX48) (Yamamoto *et al.*, 2010). Η στοιχίση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

Κατάλοιπο στο XanQ	Θέση	Κατάλοιπο στο YgfU	Κατάλοιπο στο LL9	Ρόλος του καταλοίπου στον μεταφορέα XanQ
H31	TM1	H37	H31	συγγένεια δέσμευσης
N93	TM3	T100	S93	εξειδίκευση
Q258	TM8	S256	A248	NEM ευαίσθητο
V261	TM8	T259	S251	NEM ευαίσθητο
E272	TM8	E270	E262	αναντικατάστατο
A273	TM8	S271	T263	NEM ευαίσθητο
G275	TM8	G273	A265	NEM ευαίσθητο
D276	TM8	M274	D266	απαραίτητη καρβοξυλομάδα
S284	IL8-9	V282	I274	NEM ευαίσθητο
D304	TM9a	D309	D297	αναντικατάστατο
G305	TM9a	G310	M298	έκφραση/ενεργότητα
P318	TM9a	P312	T304	έκφραση
Q324	μοτίβο	Q318	Q311	αναντικατάστατο/δέσμευση
N325	μοτίβο	N319	N312	αναντικατάστατο/δέσμευση
N326	μοτίβο	V320	V313	NEM ευαίσθητο
G327	μοτίβο	G321	G314	NEM ευαίσθητο
T332	μοτίβο	T326	T319	εξειδίκευση
G333	μοτίβο	R327	G320	εξειδίκευση
V334	TM9b	V328	V321	NEM ευαίσθητο
S336	TM9b	S330	S323	NEM ευαίσθητο
V339	TM9b	V333	V336	NEM ευαίσθητο
N430	TM12	S426	S417	NEM ευαίσθητο
I432	TM12	I428	I419	εξειδίκευση/περιορισμοί

Πίνακας 4.1. Κατάλοιπα των μεταφορέων ουρικού YgfU και ξανθίνης/ουρικού LL9 που υπάρχουν στις θέσεις των 23 σημαντικών καταλοίπων του μεταφορέα ξανθίνης XanQ (βλ. Εισαγωγή). Αναφέρεται επίσης η θέση του καταλοίπου στη δευτεροταγή δομή και ο βασικός ρόλος που έχει προταθεί από την ανάλυση του XanQ.

Η θέση His-31/His-37 στο μέσο της έλικας TM1 είναι σημαντική για την υψηλή συγγένεια και τη δέσμευση

Η ιστιδίνη της θέσης His-31(XanQ)/His-37(YgfU) είναι απόλυτα συντηρημένη στην οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 στο μέσο περίπου της έλικας TM1, και στην προηγούμενη θέση βρίσκεται ένα κατάλοιπο Thr (T30), όπου υπάρχει συντηρημένο ένα κατάλοιπο Gln σε όλους τους άλλους γνωστούς μεταφορείς NAT (**Εικόνα 4.5**). Δεδομένα μεταλλαξιγένεσης της ιστιδίνης αυτής υπάρχουν από αρκετούς μεταφορείς (XanQ, YgfU, UapA, SVCT1, SVCT2) και δείχνουν σε όλες τις περιπτώσεις έναν σημαντικό ρόλο. Από την ανάλυση μιας σειράς μεταλλαγμάτων του XanQ στη θέση αυτή, φαίνεται ότι το His-31 δεν είναι αναντικατάστατο για τη λειτουργία του μεταφορέα, αλλά η παρουσία ενός μη φορτισμένου καταλοίπου με δυνατότητα για δεσμούς υδρογόνου είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του υποστρώματος με υψηλή συγγένεια και υψηλή ενεργότητα μεταφοράς (Karena and Frillingos, 2009). Κάτι παρόμοιο έχει προταθεί για τον μεταφορέα hSVCT1 (Varma *et al.*, 2008) αλλά και για τον hSVCT2 (Ormazabal *et al.*, 2010). Στον μεταφορέα UapA (Pantazopoulou and Diallinas, 2006) έχει προταθεί ότι ο ρόλος της ιστιδίνης είναι περισσότερο για την εξασφάλιση της δομικής σταθερότητας και της σωστής στόχευσης στη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σε όλες τις περιπτώσεις, πάντως, φαίνεται ότι στη θέση αυτή χρειάζεται μια πλευρική ομάδα που να μπορεί να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου.

Η παρούσα διατριβή δείχνει ότι η His-37 (TM1) είναι πολύ σημαντική και στον YgfU. Από τα τρία μεταλλάγματα που εξετάσαμε, προκύπτει ότι η παρουσία στη θέση αυτή ενός υδρόφοβου (Leu) ή ενός θετικά φορτισμένου καταλοίπου (Lys) οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση (Εικόνα 3.41), ενώ η παρουσία ενός πολικού καταλοίπου (Asn) διατηρεί την ενεργότητα μεταφοράς ουρικού, αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα (~8% του YgfU) και με μειωμένη συγγένεια (Πίνακας 3.12). Οι επιπτώσεις των αντίστοιχων αντικαταστάσεων στην His-31 του XanQ (Karena and Frillingos, 2009) ήταν λιγότερο δραματικές και ως ένα βαθμό διαφορετικές. Παρουσία Lys (ή και Arg) οδηγούσε σε απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη, παρουσία της υδρόφοβης Leu οδηγούσε σε μικρή ενεργότητα με μεγάλη μείωση της συγγένειας, ενώ παρουσία Asn (ή και Gln) οδηγούσε σε πολύ υψηλή ενεργότητα και κανονική συγγένεια αναγνώρισης υποστρώματος καθώς και των περισσότερων αναλόγων. Φαίνεται λοιπόν ότι η σημασία της συντηρημένης His στην έλικα TM1 μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο έντονη ανάλογα με τον μεταφορέα, ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις σημαντικό ρόλο παίζει η διατήρηση στη θέση αυτή ενός πολικού αμινοξέος που μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου.

Φαίνεται λοιπόν ότι και στον μεταφορέα XanQ και στον YgfU, ένας βασικός ρόλος της ιστιδίνης της TM1 είναι στη διατήρηση της συγγένειας δέσμησης υποστρώματος. Μια πρόσφατη μελέτη μεταλλαξιγένεσης (Varma *et al.*, 2008) προτείνει έναν παρόμοιο ρόλο και για την αντίστοιχη θέση His-51 από το ομόλογο hSVCT1 του ανθρώπου, όπως και για την His-109 του hSVCT2 (Varma *et al.*, 2008; Ormazabal *et al.*, 2010). Αντίθετα, η ανάλυση της αντίστοιχης θέσης του His-86 στον ομόλογο μεταφορέα UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* δείχνει ότι αλλαγές της ιστιδίνης με αμινοξέα που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου οδηγούν σε μειωμένη έκφραση στο επίπεδο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθώς και ανεπιτυχή στόχευση, με παραμονή της πρωτεΐνης είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο είτε στα χυμοτόπια (Pantazopoulou and Diallinas, 2006).

Εκτός από τα παραπάνω, η εισαγωγή μιας πλευρικής ομάδας ικανής για δεσμούς υδρογόνου με μεγαλύτερη όμως ευλυγισία (H31Q) διαφοροποιεί ως ένα βαθμό το προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα XanQ (Karena and Frillingos, 2009). Μια ανάλογη αλλαγή στην αντίστοιχη θέση του hSVCT1 (H51Q) (Varma *et al.*, 2008) οδηγεί και αυτή σε αλλαγή της εξειδίκευσης.

Συνολικά, τα δεδομένα των 5 μεταφορέων από την *E. coli*, τον ασκομύκητα και τον άνθρωπο δείχνουν ότι στη θέση His-31/37/86/51/109 (TM1) είναι απολύτως απαραίτητη η παρουσία ενός καταλοίπου ικανού να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου, είτε για την αναδίπλωση του μεταφορέα και τη σωστή έκφραση, είτε για την υψηλή συγγένεια και ικανότητα δέσμησης για το υπόστρωμα.

Η θέση Asn-93/Thr-100 στο μέσο της έλικας TM3 έχει σημαντικό ρόλο για την εξειδίκευση

Στη θέση Asn-93(XanQ)/Thr-100(YgfU), στο μέσο της έλικας TM3, οι μεταφορείς NAT δεν εμφανίζουν υψηλή συντήρηση της πλευρικής ομάδας, αλλά εμφανίζεται ένα ενδιαφέρον μοτίβο: στα μέλη της οικογένειας που μεταφέρουν νουκλεοτιδικές βάσεις συντηρείται κατά κανόνα ένα πολικό αμινοξύ (Asn, Thr ή Ser) ενώ στα ομόλογα SVCT1 και SVCT2 που μεταφέρουν ασκορβικό υπάρχει Ala (**Εικόνα 4.5**). Επίσης, οι μεταφορείς που έχουν αναγνωρισθεί ότι μεταφέρουν τόσο ουρικό όσο και ξανθίνη, συντηρούν ένα μικρό πολικό αμινοξύ (Ser) στη θέση αυτή (UapA, UapC, Lpe1, Xut1, AfUapA, LL9, PsyhT) (**Εικόνα 4.5**). Αντίθετα, μεταφορείς που μεταφέρουν μόνο ξανθίνη (XanQ, PbuX) ή μόνο ουρικό (YgfU, PucK) μπορεί να έχουν ένα μεγαλύτερο πολικό αμινοξύ (Asn, Thr) (**Εικόνα 4.5**). Η συγκεκριμένη θέση της TM3 δεν έχει αναλυθεί ιδιαίτερα με μεταλλαξιγένεση σε άλλους ομόλογους μεταφορείς εκτός των XanQ (Karena and Frillingos, 2009) και YgfU (παρούσα

μελέτη), ενώ προκαταρκτικά πειράματα για την αντίστοιχη θέση στον UapA (Ser-153) δεν αποκάλυψαν κάποιο σημαντικό ρόλο (S. Amillis & G. Diallinas, προσωπική επικοινωνία). Ωστόσο, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι και στους 2 μεταφορείς της *E. coli* που εξετάσαμε (XanQ και YgfU), η θέση αυτή πρέπει να παίζει σημαντικό ρόλο για τον καθορισμό της εξειδίκευσης, αφού αλλαγές σε μικρά πολικά (Ser) ή υδρόφοβα (Ala) αμινοξέα οδηγούν και στις δύο περιπτώσεις σε διεύρυνση της εξειδίκευσης.

Στον μεταφορέα YgfU, η Thr-100 (TM3) φαίνεται να είναι σημαντική για την εξειδίκευση του μεταφορέα ως προς το ουρικό, εφόσον η αντικατάστασή της με Ala (και, σε μικρότερο βαθμό, με Ser) επιτρέπει καλύτερη αναγνώριση και μεταφορά ξανθίνης σε σχέση με το ουρικό (Εικόνα 3.42). Η αντικατάσταση με Ala, ειδικά, επιτρέπει πολύ υψηλή ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης, η οποία δεν υπάρχει παρά ελάχιστα στον YgfU(wt), και αντιστρέφει την προτίμηση υποστρώματος μεταξύ ουρικού και ξανθίνης. Οι επιπτώσεις των αντίστοιχων αντικαταστάσεων στην Asn-93 του XanQ (Karena and Frillingos, 2009) ήταν παρόμοιες καθώς η παρουσία αμινοξέων μικρού μεγέθους στη θέση αυτή (Ala, Ser) επέτρεπε πρόσληψη ουρικού οξέος (ενός υποστρώματος που δεν αναγνωρίζεται από τον XanQwt) καθώς και αναγνώριση αναλόγων που διαφέρουν από τη ξανθίνη στη θέση 8 ή 7 του πουρινικού δακτυλίου (8-μεθυλοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη). Άρα, και στις δύο περιπτώσεις, η εισαγωγή στη θέση αυτή της TM3 μιας πλευρικής ομάδας μικρού μεγέθους (Ala ή Ser) επιτρέπει διεύρυνση της εξειδίκευσης. Είναι ενδιαφέρον ότι η νέα επιλεκτικότητα υποστρώματος που προκύπτει για τα μεταλλάγματα αυτά (πρόσληψη τόσο ουρικού όσο και ξανθίνης) «μιμείται» ως ένα βαθμό τα ομόλογα NAT που λειτουργούν ως μεταφορείς ουρικού και ξανθίνης και έχουν Ser σ' αυτή τη θέση της έλικας TM3 (Εικόνα 4.5).

Παρόμοια αλλαγή εξειδίκευσης ή επιλεκτικότητας υποστρώματος δεν παρατηρείται όταν γίνεται αντικατάσταση της Asn-93 (XanQ) ή της Thr-100 (YgfU) με ένα πολικό αμινοξύ ίδιου περίπου ή μεγαλύτερου όγκου (N93T ή Q, και T100N, αντίστοιχα). Στον XanQ, η αντικατάσταση N93T οδηγεί σε κανονική έκφραση με μικρή όμως ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, ενώ η εισαγωγή ενός πιο ογκώδους πολικού καταλοίπου (Gln) ή ακόμη και ενός μικρότερου αλλά λιγότερο πολικού (Cys) ή ενός φορτισμένου αμινοξέος (Asp) διατηρεί την έκφραση αλλά απενεργοποιεί τον μεταφορέα, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο στερεοχημικοί όσο και πολικοί περιορισμοί στη θέση 93 είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία (Karena and Frillingos, 2009). Στον μεταφορέα YgfU, η αντικατάσταση του Thr-100 (TM3) με ένα παρομοίου μεγέθους πολικό κατάλοιπο (Asn) επιφέρει δραματική αλλαγή

καθώς δεν παρατηρείται καθόλου έκφραση στη μεμβράνη (Εικόνα 3.42), υποδεικνύοντας ότι οι στερεοχημικοί περιορισμοί της θέσης αυτής στον YgfU είναι πιο αυστηροί.

Συντήρηση και πιθανές διαφορές των XanQ και YgfU ως προς τους ρόλους της έλικας TM8, της έλικας TM12 και του μοτίβου-υπογραφή

Με βάση τις διαφορές αλληλουχίας του μεταφορέα ουρικού YgfU από τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ σε 9 θέσεις «σημαντικών» καταλοίπων (Πίνακας 4.1), σχεδιάστηκε μια σειρά στοχευμένων μεταλλαξιγενέσεων ώστε να ελεγχθεί πειραματικά αν μπορεί να γίνει τροποποίηση της επιλεκτικότητας υποστρώματος από τον έναν τύπο εξειδίκευσης στον άλλο. Μια ανάλογη προσέγγιση μεταλλαξιγένεσης σε θέσεις-στόχους ομόλογων μεταφορέων με πιθανή εξελικτική συντήρηση στο λειτουργικό τους ρόλο έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν για τη σύγκριση του μεταφορέα μελιβιόζης MelY του *Enterobacter cloacae* και του μεταφορέα λακτόζης LacY της *E. coli* (Tavoulari and Frillingos, 2008). Από τη μελέτη αυτή, είχε προταθεί η μοριακή βάση της διαφοράς επιλεκτικότητας υποστρωμάτων μεταξύ του LacY και του MelY που έχουν επικαλυπτόμενα προφίλ εξειδίκευσης, καθώς μεταφέρουν και οι δύο λακτόζη, μελιβιόζη, και αρκετά άλλα γαλακτοσίδια, αλλά διαφέρουν σε σχέση με ένα ειδικό υπόστρωμα, το μεθυλο-θειογαλακτοσίδιο (TMG) το οποίο μεταφέρεται μόνο από τον LacY και όχι τον MelY. Τα αποτελέσματα της εργασίας είχαν δείξει ότι σημαντική για την ειδικότητα αναγνώρισης του TMG είναι μία βαλίνη (Val-367) η οποία στον MelY αντικαθίσταται με Ala. Αυτή η Val-367 βρίσκεται σε στρατηγική θέση στο μόριο του LacY (Abramson *et al.*, 2003) και συμμετέχει στις συντονισμένες κινήσεις των δύο ομάδων ελίκων (N6 και C6) που χρειάζονται για τις κατάλληλες αλλαγές διαμορφώσεις κατά τη μεταφορά του TMG (Tavoulari and Frillingos, 2008). Για την προηγούμενη αυτή μελέτη, όμως, υπήρχε το πρότυπο της δομής από την κρυσταλλογραφία του LacY, αλλά και μια πολύ μεγάλη συντήρηση αλληλουχίας μεταξύ LacY και MelY (πάνω από 60% ταυτότητα). Στην παρούσα διατριβή, έγινε μια προσπάθεια να εφαρμοσθεί ανάλογη προσέγγιση και για τη μελέτη της μοριακής βάσης των διαφορών μεταξύ δύο ομόλογων της οικογένειας NAT με σχετικά μικρή συγγένεια μεταξύ τους (XanQ-YgfU, ταυτότητα 30%). Τα αποτελέσματά μας δεν έδωσαν κάποια καθαρή αλλαγή εξειδίκευσης για κάποιο από τα μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν, μας οδήγησαν όμως σε ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις, που μπορούν να αποτελέσουν μια βάση για πιο αναλυτική διερεύνηση στο μέλλον.

Από τη σειρά των 9 μεταλλάγματων του YgfU που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.44), αυτά που έχουν δραματική επίπτωση στη δομική σταθερότητα και δίνουν μηδενική έκφραση στη μεμβράνη εντοπίζονται στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8 (S271A, M274D, V282S) και στην έλικα TM3 (T100N), ενώ το V320N που οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση είναι στο μοτίβο-υπογραφή δίπλα στις συντηρημένες θέσεις Asn-325 και Gln-324 που έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στη δέσμευση υποστρώματος τόσο στον UapA όσο και στον XanQ (Georgoroulou *et al.*, 2010). Αντίθετα, δεν επηρεάζουν καθόλου τα μεταλλάγματα που εντοπίζονται στην περιπλαστική πλευρά της TM8 (S256Q, T259V), αλλά ούτε και στην έλικα TM12 στη θέση της Asn/Ser-430 που φαίνεται να βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης τόσο στον XanQ όσο και στον UapA (S426N) ή στη θέση της Gly/Arg-333 του μοτίβου-υπογραφή που έχει συνδεθεί από τα πειράματα του XanQ και του UapA με τον καθορισμό της εξειδίκευσης (R327G). Τα αποτελέσματα αυτά δεν μας δίνουν κάποια ένδειξη για τους μοριακούς καθοριστές που συνεισφέρουν στη διαφορά εξειδίκευσης, αλλά είναι πιθανό ότι στο μοριακό υπόστρωμα του YgfU ορισμένες σημαντικές θέσεις καταλοίπων (όπως οι Gly/Arg-333 και Asn/Ser-430) συνεισφέρουν λιγότερο καθοριστικά και ο ρόλος τους θα μπορούσε να φανεί μόνο με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση. Από την άλλη πλευρά, η πρώτη αυτή σειρά μεταλλαξιγένεσης του YgfU υποδεικνύει ότι κατάλοιπα του κυτταροπλασματικού άκρου του TM8 και της αμέσως επόμενης περιοχής μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δομική οργάνωση του μορίου, πιθανόν μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με άλλες περιοχές, όπως είχε προταθεί για το μοτίβο E(A/S)xGDxxAT του TM8 στην περίπτωση του XanQ (Mermelekas *et al.*, 2010).

Από τη σειρά των 9 μεταλλάγματων που έγιναν στον XanQ (Εικόνα 3.46), η επίδραση των «κατοπτρικών» αντικαταστάσεων φαίνεται να είναι λιγότερο έντονη (ιδιαίτερα ως προς την έκφραση στην μεμβράνη) σε σχέση με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις του YgfU. Ως προς την ενεργότητα, τα μεταλλάγματα του XanQ που οδηγούν σε δραματική αναστολή ή απενεργοποίηση εντοπίζονται στην έλικα TM8 (Q258S, D276M), ενώ αυτά που εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για τη ξανθίνη είναι στις έλικες TM3 (N93T), TM8 (A273S), TM12 (N430S) και στο μοτίβο-υπογραφή (N326V). Βέβαια, όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, δύο από αυτά τα μεταλλάγματα επηρεάζουν το προφίλ εξειδίκευσης, δηλαδή το N93T μειώνει τη συγγένεια για όλα σχεδόν τα ανάλογα πουρινών (Karena and Frillingos, 2009), ενώ το G333R αναγνωρίζει ανάλογα που διαφέρουν από τη ξανθίνη στις θέσεις 7 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου και εν μέρει το ουρικό (Georgoroulou *et al.*, 2010). Ωστόσο, όπως αποδείξαμε στη παρούσα διατριβή, κανένα από αυτά τα μεταλλάγματα δε μεταφέρει ουρικό και δεν υπάρχει ένδειξη για μεταβολή του λειτουργικού προφίλ του ενός μεταφορέα

σε αυτό του άλλου. Ξεκινώντας από τα δεδομένα που παρουσιάσαμε για τις μονές μεταλλαγές, είναι πιθανό ότι περαιτέρω μελέτες συνδυαστικής μεταλλαξιγένεσης ή κατασκευής χιμαιρικών YgfU/XanQ μεταφορέων θα οδηγήσουν τελικά στον αναλυτικότερο προσδιορισμό των διαφορετικών καταλοίπων και περιοχών του μορίου που ελέγχουν τον τρόπο αναγνώρισης της θέσης 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου και τη διάκριση μεταξύ ουρικού (υπόστρωμα του YgfU) και ξανθίνης (υπόστρωμα του XanQ).

Συνολικά, από τα αποτελέσματα μας είναι σαφές ότι δεν παρατηρείται μεταβολή του λειτουργικού προφίλ του XanQ προς αυτό του YgfU ή το αντίστροφο, μέσω των στοχευμένων μεταλλαξιγένεσεων στις θέσεις-κλειδιά. Ωστόσο, εντοπίζονται κάποιες διαφορές στον πιθανό ρόλο συγκεκριμένων θέσεων ή περιοχών των δύο μεταφορέων, ιδιαίτερα στην έλικα TM8.

Συγκεκριμένα, το κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8 του YgfU και η αμέσως επόμενη υδρόφιλη περιοχή φαίνεται να συνδέεται πολύ έντονα με κάποιο δομικό ρόλο αφού οι αλλαγές στην περιοχή αυτή (S271A, M274D, V282S) οδηγούν σε πλήρη απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη, ενώ οι αντίστροφες αλλαγές στον XanQ οδηγούν σε κανονικά επίπεδα έκφρασης και υψηλή ενεργότητα, με εξαίρεση το μετάλλαγμα στη θέση Asp-276 όπου έχει αποδειχθεί (Mermelekas *et al.*, 2010) ότι είναι απαραίτητη μια καρβοξυλομάδα. Στον XanQ έχει επίσης προταθεί ένας ρόλος της αντίστοιχης περιοχής του TM8 στο «πακετάρισμα» της δομής, κυρίως όμως μέσω αλληλεπιδράσεων των καταλοίπων Ala-279 και Thr-280 που βρίσκονται αμέσως μετά το τέλος της TM8 και χωρίς να ανιχνεύονται τόσο έντονες επιπτώσεις των μεταλλαγμάτων στην έκφραση (Mermelekas *et al.*, 2010).

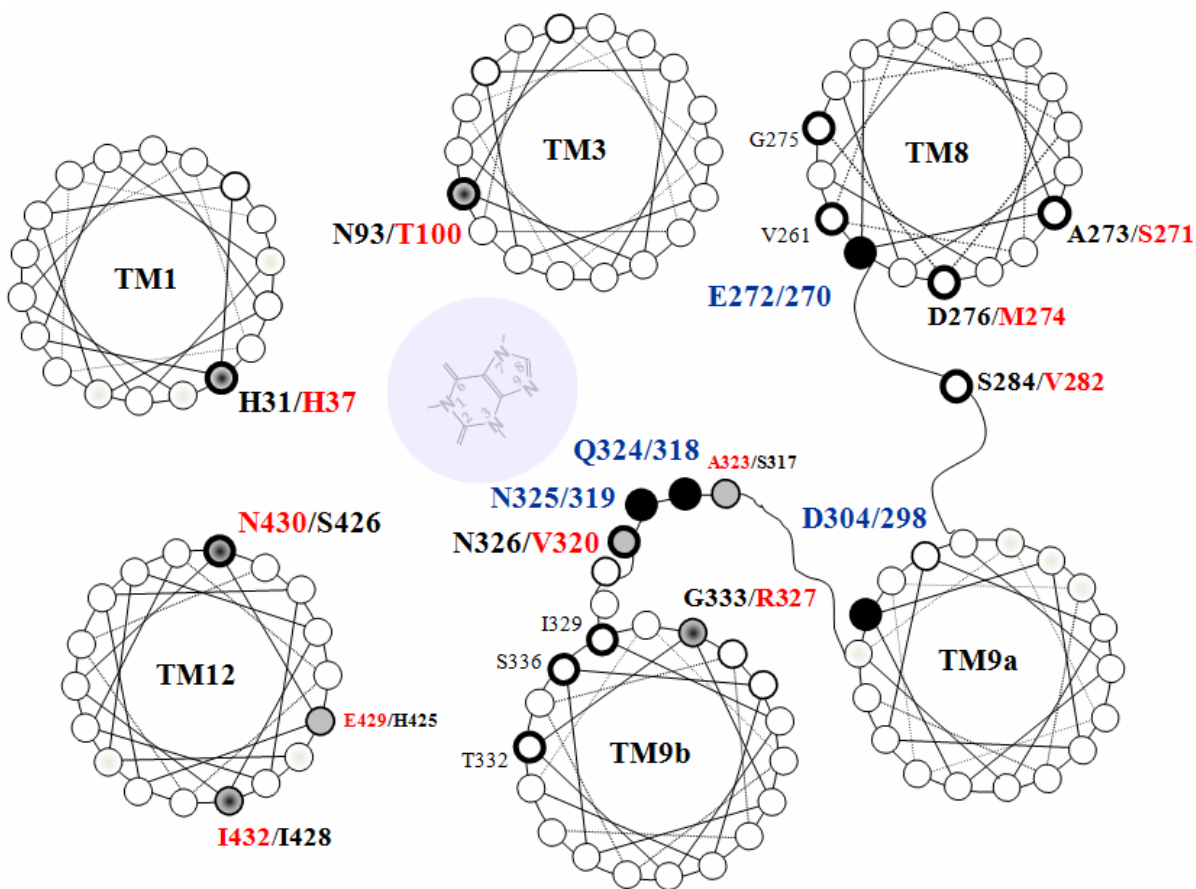
Η αλλαγή της Ser-426 (αντίστοιχη της Asn-430) στην έλικα TM12 του YgfU (S426N) δεν επηρεάζει καθόλου ούτε την έκφραση και την ενεργότητα, αλλά ούτε και την επιλεκτικότητα υποστρώματος, μειώνει ωστόσο σημαντικά τη συγγένεια για το ουρικό οξύ (Πίνακας 3.14), υποδηλώνοντας ότι η έλικα TM12 μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο σε σχέση με την εξειδίκευση όπως έχει φανεί ότι ισχύει στον XanQ (κεφάλαιο 4.2).

Η αλλαγή της Arg-327 (αντίστοιχη της Gly-333) στο μοτίβο-υπογραφή του YgfU (R327G) οδηγεί επίσης σε μειωμένη συγγένεια μεταφοράς ουρικού (Πίνακας 3.14) χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση ή την ενεργότητα, υποδηλώνοντας ότι, όπως και στην περίπτωση του XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Georgoroulou *et al.*, 2010), μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση.

Τέλος, στην περίπτωση της Thr-100/Asn-93 (TM3) εντοπίζονται διαφορές στις ιδιότητες των μεταλλαγμάτων (T100N σε σχέση με N93T), αλλά φαίνεται ότι τόσο στον XanQ όσο και στον YgfU οι θέσεις αυτές σχετίζονται με την εξειδίκευση. Η θέση Thr-100, όπως είπαμε και παραπάνω, μπορεί

να υπόκειται σε αυστηρότερους στερεοχημικούς περιορισμούς απ' ό,τι η αντίστοιχη στον XanQ (Asn-93), αλλά όπως δείχνουν τα πειράματα μεταλλαξιγένεσης σε Ala και Ser θα πρέπει να συνδέεται με την εξασφάλιση της εξειδίκευσης για το ουρικό οξύ.

Οι παραπάνω ομοιότητες στον πιθανό λειτουργικό ρόλο πολλών περιοχών των δύο ομόλογων μορίων μας επιτρέπει να τοποθετήσουμε και τις θέσεις σημαντικών καταλοίπων του YgfU μαζί με τις αντίστοιχες του XanQ σε ένα προκαταρκτικό μοντέλο εργασίας για την οργάνωση των ελίκων του XanQ (Karena and Frillingos, 2009), όπου φαίνονται οι δυνητικές σχέσεις μεταξύ των καταλοίπων που συζητήθηκαν καθώς και η σχέση τους με το πιθανό κέντρο δέσμευσης υποστρώματος (**Εικόνα 4.6**).



Εικόνα 4.6. Μοντέλο της οργάνωσης των ελίκων TM1, TM3, TM8, TM9a, TM9b, TM12 και του μοτίβου-υπογραφή στους μεταφορείς XanQ και YgfU, που βασίζεται σε λειτουργικά δεδομένα και φυλογενετική ανάλυση του XanQ (Karena and Frillingos, 2009). Το υπόστρωμα (ουρικό ή ξανθίνη) φαίνεται σε επαφή με τα κατάλοιπα Asn-325 και Gln-324 του μοτίβου-υπογραφή (Mermelekas *et al.*, 2010). Σε κάθε θέση αναγράφεται πρώτα το κατάλοιπο του XanQ και έπειτα το αντίστοιχο κατάλοιπο του YgfU. Με μπλε φαίνονται τα 4 αναντικατάστατα κατάλοιπα του XanQ (που συντηρούνται και στον YgfU). Με κόκκινο φαίνονται κατάλοιπα του XanQ και του YgfU που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και αναφέρονται στη Συζήτηση. Θέσεις καταλοίπων του XanQ που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από το NEM φαίνονται με μικρότερα γράμματα στις έλικες TM8 και TM9b.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ (NAT)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Η διατριβή αυτή εντάσσεται στα πλαίσια μιας συστηματικής ανάλυσης δευτερογενών ενεργών μεταφορέων της οικογένειας NAT, με σκοπό τη διαλεύκανση των σχέσεων δομής- λειτουργίας της οικογένειας αυτής. Η οικογένεια NAT είναι η εξελικτικά ευρύτερη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων (πάνω από 1000 γονίδια στα γνωστά γονιδιώματα) και περιλαμβάνει μεταφορείς μικροοργανισμών που αναγνωρίζουν ως υποστρώματα πουρίνες, πυριμιδίνες και κυτταροτοξικά τους ανάλογα που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, αλλά και μεταφορείς του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών που είναι εξειδικευμένοι για το L-ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). Παρά τη σημασία της, πολύ λίγα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν προσδιορισθεί λειτουργικά και μόνο δύο έχουν μελετηθεί εκτενώς με μεταλλαξιγένεση, ο XanQ της *Escherichia coli* και ο UapA του *Aspergillus nidulans*, ενώ δεν εμπίπτουν σε κανένα γνωστό αναλυτικό πρότυπο δομής από κρυσταλλογραφία.

Σαν μοντέλο εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος μεταφορέας XanQ από την *E. coli*, ένας ειδικός συμμεταφορέας ξανθίνης: H^+ . Από προηγούμενες μελέτες, με την κατασκευή ενός μεταφορέα XanQ ελεύθερου κυστεϊνών (C-less) έγινε δυνατή στο εργαστήριο η εφαρμογή της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης, η οποία σε συνδυασμό με εκτεταμένες σημειακές αντικαταστάσεις και με αναλύσεις επίδρασης αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων έχει αναδείξει θέσεις καταλοίπων σημαντικές για τον μηχανισμό δέσμευσης και μεταφοράς του υποστρώματος. Αυτές οι σημαντικές θέσεις καταλοίπων αξιοποιούνται στην παρούσα εργασία σαν ομάδα θέσεων-στόχων για την ανάλυση σχέσεων δομής-λειτουργίας νέων μεταφορέων που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά, και ιδίως του μεταφορέα ουρικού YgfU.

Στην παρούσα διατριβή, συμβάλαμε στη διαλεύκανση του μηχανισμού λειτουργίας και εξειδίκευσης των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2, με δύο τρόπους: αφενός, χρησιμοποιώντας το σύστημα έκφρασης της *E. coli*, χαρακτηρίσαμε λειτουργικά 7 νέους

βακτηριακούς μεταφορείς-μέλη της οικογένειας, οι οποίοι εμπλουτίζουν τη βάση μελέτης για την εξελικτικά ευρεία αυτή οικογένεια και υποδεικνύουν μοτίβα αλληλουχίας που μπορεί να συνδέονται με συγκεκριμένες διαφορές εξειδίκευσης, και, αφετέρου, με την αναγνώριση νέων μοριακών περιοχών και πλευρικών ομάδων αμινοξέων που είναι σημαντικές στο μηχανισμό ενεργού μεταφοράς και εξειδίκευσης, δηλαδή κατάλοιπα της έλικας TM12 στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ (Asn-430, Ile-432) και της έλικας TM3 στον μεταφορέα ουρικού YgfU (Thr-100, αντίστοιχο της Asn-93 στον XanQ).

Στο πρώτο μέρος, μελετήθηκε ο ρόλος της έλικας TM12 του μεταφορέα XanQ με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης. Κατασκευάστηκαν 32 μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνής (single-Cys mutants), δηλαδή κάθε αμινοξύ στην αλληλουχία ⁴¹⁹ILPASIYVLVENPICAGGLTAILLNIIILPGGY⁴⁵⁰ αντικαταστάθηκε ξεχωριστά με Cys. Ο έλεγχος της έκφρασης στη μεμβράνη και της δυνατότητας πρόσληψης [³H]ξανθίνης των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνής, σε συνδυασμό με εκτεταμένες σημειακές μεταλλαξιγενέσεις, πειράματα κινητικής ανάλυσης και ανταγωνισμού πρόσληψης υποστρώματος ανέδειξε ως σημαντικό το Ile-432 στο μέσο της πιθανής έλικας. Στη θέση αυτή είναι απαραίτητο ένα κατάλοιπο με πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένου μεγέθους και προσανατολισμού για την σωστή πρόσδεση ή μεταφορά του υποστρώματος, καθώς αντικαταστάσεις με μεγάλο όγκο ή παρόμοιο όγκο και διαφορετικό προσανατολισμό πλευρικής ομάδας οδηγούν σε μειωμένη συγγένεια δέσμευσης ή μεταφοράς υποστρώματος και όλες οι μεταλλαγές που εξετάστηκαν επηρεάζουν επίσης την εξειδίκευση σε σχέση με ορισμένα ανάλογα ξανθίνης. Η επίδραση του *N*-αιθυλμυλεϊμιδίου (NEM) στα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνής έδειξε ότι το μετάλλαγμα N430C είναι πολύ ευαίσθητο στην απενεργοποίηση από το NEM (IC₅₀ 10μM), και ότι η παρουσία ενός μη-μεταφερόμενου υψηλής συγγένειας αναλόγου ξανθίνης, της 2-θειοξανθίνης, προστατεύει απόλυτα από την επίδραση αυτή. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το Asn-430 βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος ενώ η Ile-432, που υπόκειται σε στερεοχημικούς κυρίως περιορισμούς, επιδρά πιθανόν έμμεσα στη δέσμευση των πουρινών.

Παρά τη σημασία τους και την ευρεία κατανομή τους, ελάχιστοι μεταφορείς από την οικογένεια NAT έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά (15, πριν την παρούσα μελέτη). Στη δεύτερη ενότητα της διατριβής, χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά 2 νέοι μεταφορείς NAT από την *E. coli*, ένας μεταφορέας ουρικού οξέος χαμηλής συγγένειας (YgfU) και ένας μεταφορέας ξανθίνης χαμηλής συγγένειας (RutG), 3 μεταφορείς από το ριζόβιο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* οι οποίοι είναι μεταφορείς ουρικού (X28, WQ0) ή ουρικού και ξανθίνης (LL9), καθώς και δύο ομόλογα

από ακραιόφιλους οργανισμούς, ο μεταφορέας ουρικού PsyhT από τον ψυχρόφιλο *Psychrobacter cryohalolentis* και ο μεταφορέας ξανθίνης MoorT από το θερμόφιλο κλοστρίδιο *Moorella thermoacetica*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον από αυτούς τους μεταφορείς έχει ο YgfU, ένας μεταφορέας ουρικού οξέος χαμηλής συγγένειας ($K_m 0.5 \pm 0.1$ mM) και υψηλής ικανότητας μεταφοράς ($V_{max} 715 \pm 81$ nmol.mg⁻¹.min⁻¹), ο οποίος αποτελεί τον πρώτο μεταφορέα ουρικού που προσδιορίζεται σε ένα εντεροβακτήριο και θέτει ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο αξιοποίησης του ουρικού την *E. coli*. Ο δεύτερος μεταφορέας της *E. coli* που χαρακτηρίσαμε, ο RutG, είναι μεταφορέας ξανθίνης χαμηλής συγγένειας ($K_m 0.15 \pm 0.02$ mM) και δεν φαίνεται να είναι μεταφορέας ουρακίλης όπως έχει προταθεί στη βιβλιογραφία με βάση την γενετική ανάλυση ενός οπερονίου καταβολισμού των πυριμιδινών (του οπερονίου *rut*). Πολύ σημαντικός επίσης ήταν ο χαρακτηρισμός του μεταφορέα Q92LL9 (LL9), από το ριζόβιο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* SM1021, ο οποίος βρέθηκε ότι είναι μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας ($K_m 7.3 \pm 3$ μM, $V_{max} 19.8 \pm 3.2$ nmol.mg⁻¹.min⁻¹) και μεταφορέας ουρικού χαμηλής συγγένειας ($K_m 0.9 \pm 0.3$ mM) και υψηλής απόδοσης ($V_{max} 447 \pm 37$ nmol.mg⁻¹.min⁻¹) και ότι έχει ευρεία εξειδίκευση για αναγνώριση αναλόγων πουρινών. Είναι ο πρώτος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων που αναγνωρίζεται για ένα συμβιωτικό ριζοβακτήριο και υποδηλώνει ότι ίσως το ριζοβακτήριο να χρησιμοποιεί τις πουρίνες ως πηγές αζώτου κατά την ανάπτυξη του συμβιωτικού φυματίου.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής, επιχειρήσαμε να εφαρμόσουμε μια προσέγγιση για την αποκάλυψη μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τις διαφορές εξειδίκευσης μεταξύ συγγενικών ομολόγων NAT, βασιζόμενοι στην ομάδα των δυνητικά σημαντικών καταλοίπων που έχουν βρεθεί από τη μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του XanQ για να αναλύσουμε νέα χαρακτηρισμένα ομόλογα. Από την πρώτη αυτή προσέγγιση, που περιλάμβανε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα ουρικού YgfU και εισαγωγή των «αντίστροφων» αντικαταστάσεων στις αντίστοιχες θέσεις του XanQ, πήραμε στοιχεία που αναδεικνύουν κυρίως το ρόλο της Thr-100 (Asn-93 στον XanQ), στο μέσο της έλικας TM3, για τον καθορισμό της επιλογής υποστρώματος μεταξύ ουρικού/ξανθίνης. Επίσης, η μεταλλαξιγένεση του YgfU οδήγησε στην αναγνώριση του σημαντικού ρόλου της συντηρημένης His-37 (His-31 στον XanQ) στο μέσο της έλικας TM1 για την υψηλή συγγένεια και μεταφορά υποστρώματος.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE PURINE UPTAKE MECHANISM IN THE NUCLEOBASE-ASCORBATE (NAT) TRANSPORTERS

DOCTORATE THESIS BY
PAPAKOSTAS KONSTANTINOS

In our lab we systematically analyze secondary active transporters of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT/NCS2) family, to elucidate the structure-function relationships of the family. The NAT family is an evolutionarily wide family including microbial transporters recognizing as substrates purines, pyrimidines and several purine-based drugs and analogues as well as mammalian and human transporters specialized for the uptake of L-ascorbic acid. Few members of this family are known functionally and only two, the XanQ from *E. coli* and UapA from *Aspergillus nidulans*, have been studied extensively with mutagenesis, while no high-resolution structure is known from crystallography.

As a work model we use the recently cloned and functionally characterized XanQ transporter from *E. coli* K12, a specific, high-affinity xanthine:H⁺ symporter. Previous studies of the lab, based on the engineering of a permease devoid of Cys residues have applied Cys-scanning mutagenesis, extensive site-directed mutagenesis and alkylation, and revealed several residues important for the mechanism of substrate binding and uptake. This important set of residues is used in our study as targets for site-directed mutagenesis to analyze structure-function in newly characterized homologs, especially in the uric acid transporter YgfU.

In this thesis, we contribute to the elucidation of the mechanism of the NAT transporters, in two ways; first, using the system of *E. coli* K12 we cloned and functionally characterized 7 new bacterial members of the NAT family to enrich the characterized NAT transporters and indicate sequence motifs associated with differences in the specificity profile, and, second, we revealed new molecular determinants crucial for the transport mechanism, which are residues of helix TM12 in XanQ (Asn-430, Ile-432) and of helix TM3 in YgfU (Thr-100).

In the first part, we studied the role of the putative TM12 of XanQ, using Cys-scanning mutagenesis in the environment of the Cys-less XanQ permease. We engineered 32 single-Cys mutants, by replacing each amino acid residue in sequence ⁴¹⁹ILPASIYVLVENPICAGGLTAILLNIILPGGY⁴⁵⁰ (putative TM12 underlined) with Cys. Immunoblot analysis and transport assay of the single-Cys mutants, along with extensive site-directed mutagenesis, kinetic analysis of the mutants and ligand competition experiments revealed the important role of Ile-432 in the approximate middle of TM12. At this position a side chain with specific volume and orientation is required for high-affinity transport and mutations of Ile-432 affect both the affinity and the specificity against certain xanthine analogues. Alkylation of single-Cys mutants by *N*-ethylmaleimide showed that N430C is highly sensitive to inactivation, with IC₅₀ 10 μM, and is completely protected against inactivation in the presence of 2-thioxanthine, a high-affinity substrate analogue. The findings suggest that Asn-430 is probably at the vicinity of the binding site while Ile-432 may have an indirect effect on purine binding.

Despite their importance and broad distribution, NAT transporters are poorly studied overall and very few of them have been functionally characterized. In the second part of the thesis, we functionally characterized seven new transporter homologs, two from *E. coli* (YgfU, RutG), three from *Sinorhizobium meliloti* SM1021 (X28, QW0, LL9) and two from extremophilic microorganisms, MoorT from *Moorella thermoacetica* and PsyhT from *Psychrobacter cryohalolentis* K5. Of the newly characterized transporters, YgfU is a low-affinity and high-capacity uric acid transporter (K_m 0.5 ± 0.1 mM, V_{max} 715 ± 81 nmol.mg⁻¹.min⁻¹) being the first such transporter found in enterobacteria and interesting for the putative catabolic usage of uric acid in *E. coli*. The other *E. coli* transporter, RutG, is a low-affinity xanthine transporter (K_m 0.15 ± 0.02 mM) and does not appear to function as a uracil transporter which was previously postulated by others based on genetic analysis of the *rut* operon for pyrimidine catabolism. Importantly, the newly characterized homolog LL9 is a high-affinity xanthine transporter (K_m 7.3 ± 3.0 μM, V_{max} 19.8 ± 3.2 nmol.mg⁻¹.min⁻¹) and low-affinity but high-capacity urate transporter (K_m 0.9 ± 0.3 mM, V_{max} 447 ± 37 nmol.mg⁻¹.min⁻¹) with broad specificity for recognition of purine analogues. This is the first nucleobase transporter found in rhizobia, which indicates a probable role of purines as nitrogen sources during the development of the symbiotic nodule.

In the third part of the thesis, we attempted to apply an approach to reveal molecular mechanisms responsible for the different specificities between related homologs in the NAT family,

using residues corresponding to the set of important positions of XanQ as mutagenesis targets. Our study included site-directed mutagenesis of the newly characterized uric acid transporter YgfU and reverse mutagenesis in XanQ. A major finding from this study is the importance of position Thr-100 (Asn-93 in XanQ) at the middle of TM3 for the selectivity preference between uric acid and xanthine, since small amino acid replacements in both XanQ and YgfU lead to the ability for uptake of both substrates. In addition, the extensive site-directed mutagenesis of YgfU led to the verification of the importance of the conserved His-37 (His-31 in XanQ) at the middle of TM1 for the high affinity and transport of substrate.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abramson, J., H. R. Kaback and S. Iwata (2004). "Structural comparison of lactose permease and the glycerol-3-phosphate antiporter: members of the major facilitator superfamily." *Curr Opin Struct Biol* 14, 413-419.
2. Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback and S. Iwata (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*." *Science* 301: 610-615.
3. Altaner, C. (2008). "Prodrug cancer gene therapy." *Cancer Lett* 270: 191-201.
4. Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6858-6862.
5. Amillis, S., Hamari Z., Roumelioti K., Scazzocchio C., Diallinas G. (2007). "Regulation of Expression and Kinetic Modeling of Substrate Interactions of a Uracil Transporter in *Aspergillus nidulans*". *Mol Membr Biol* 24: 206-214.
6. Amillis, S., G. Cecchetto, V. Sophianopoulou, M. Koukaki, C. Scazzocchio and G. Diallinas (2004). "Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia." *Mol Microbiol* 52: 205-216.
7. Amillis, S., M. Koukaki and G. Diallinas (2001). "Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes." *J Mol Biol* 313: 765-774.
8. Andersen, P. S., D. Frees, R. Fast and B. Mygind (1995). "Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene." *J Bacteriol* 177: 2008-2013.
9. Andre, T., C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Taberero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch and A. de Gramont (2004). "Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer." *N Engl J Med* 350: 2343-2351.
10. Argyrou, E., V. Sophianopoulou, N. Schultes and G. Diallinas (2001). "Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*." *Plant Cell* 13: 953-964.
11. Ashihara, H., Crozier A. (1999). "Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*". *J Agric Food Chem* 47: 3425-3431.
12. Bakermans, C. and K.H. Nealson (2004). "Relationship of Critical Temperature to Macromolecular Synthesis and Growth Yield in *Psychrobacter cryopegella*". *J. Bacteriol.*, 186: 2340-2345.
13. Bakhiya, A., A. Bahn, G. Burckhardt and N. Wolff (2003). "Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux." *Cell Physiol Biochem* 13: 249-256.
14. Baldwin, S. A., G. A. McConkey, C. E. Cass and J. D. Young (2007). "Nucleoside transport as a potential target for chemotherapy in malaria." *Curr Pharm Des* 13: 569-580.
15. Baldwin, S. A., S. Y. Yao, R. J. Hyde, A. M. Ng, S. Foppolo, K. Barnes, M. W. Ritzel, C. E. Cass and J. D. Young (2005). "Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes." *J Biol Chem* 280: 15880-15887.
16. Barabote, R. D. and M. H. Saier, Jr. (2005). "Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system." *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 608-634.
17. Benitah, J.-P., G.F. Tomaselli, E. Marban (1996). "Adjacent Pore-lining Residues Within Sodium Channels Identified by Paired Cysteine Mutagenesis". *Physiology* 93: 7392-7396.

18. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2005) Biochemistry, 5th edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco
19. Bieber, J. D. and R. A. Terkeltaub (2004). "Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease." *Arthritis Rheum* 50: 2400-2414.
20. Boudker, O. and Verdon G. (2010). "Structural perspectives on secondary active transporters" *Trends in Pharmacological Sciences* Vol.31 No.9: 418-426.
21. Boussau, B., Daubin V. (2010). " Genomes as Documents of Evolutionary History". *Trends Ecol Evol* 25: 224-232.
22. Brocke, L., A. Bendaham, M. Grunewald, B. I. Kanner (2002). "Proximity of Two Oppositely Oriented Reentrant Loops in the Glutamate Transporter GLT-1 Identified by Paired Cysteine Mutagenesis". *J Biol Chem* 277: 3985-3992.
23. Brynstad, S., Iwanejko L.A., Stewart G.S., Granum P.E. (1994). "A complex array of Hpr consensus DNA recognition sequences proximal to the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens* type A". *Microbiology* 140: 97-104.
24. Burkle, L., A. Cedzich, C. Dopke, H. Stransky, S. Okumoto, B. Gillissen, C. Kuhn and W. B. Frommer (2003). "Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*." *Plant J* 34: 13-26.
25. Capela, D., Filipe C., Bobik C., Batut J., Bruand C. (2006). "*Sinorhizobium meliloti* Differentiation During Symbiosis with Alfafa: a Transcriptomic Dissection". *Mol Plant Microbe Interact* 19: 363-372.
26. Caprile, T., K. Salazar, A. Astuya, P. Cisternas, C. Silva-Alvarez, H. Montecinos, C. Millan, M. de los Angeles Garcia and F. Nualart (2009). "The Na⁺ dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids." *J Neurochem* 108: 563-577.
27. Carter, N. S., C. Ben Mamoun, W. Liu, E. O. Silva, S. M. Landfear, D. E. Goldberg and B. Ullman (2000). "Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* 275: 10683-10691.
28. Caulfield, M. J., P. B. Munroe, D. O'Neill, K. Witkowska, F. J. Charchar, M. Doblado, S. Evans, S. Eyheramendy, A. Onipinla, P. Howard, S. Shaw-Hawkins, R. J. Dobson, C. Wallace, S. J. Newhouse, M. Brown, J. M. Connell, A. Dominiczak, M. Farrall, G. M. Lathrop, N. J. Samani, M. Kumari, M. Marmot, E. Brunner, J. Chambers, P. Elliott, J. Kooner, M. Laan, E. Org, G. Veldre, M. Viigimaa, F. P. Cappuccio, C. Ji, R. Iacone, P. Strazzullo, K. H. Moley and C. Cheeseman (2008). "SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans". *PLoS Medicine* 5: 1509-1523.
29. Cecchetto, G., S. Amillis, G. Diallinas, C. Scazzocchio and C. Drevet (2004). "The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster." *J Biol Chem* 279: 3132-3141.
30. Christiansen, L. C., S. Schou, P. Nygaard and H. H. Saxild (1997). "Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism." *J Bacteriol* 179: 2540-2550.
31. Claros, M. G. and G. von Heijne (1994). "TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions." *Comput Appl Biosci* 10: 685-686.
32. Cochu, A., D. Roy, K. Vaillancourt, J. D. Lemay, I. Casabon, M. Frenette, S. Moineau and C. Vadeboncoeur (2005). "The doubly phosphorylated form of HPr, HPr(Ser~P)(His-P), is

- abundant in exponentially growing cells of *Streptococcus thermophilus* and phosphorylates the lactose transporter LacS as efficiently as HPr(His~P)." *Appl Environ Microbiol* 71: 1364-1372.
33. Conde, A., G. Diallinas, F. Claumont, M. Chaves, H. Gerós (2010). "Transporters, Channels, or Simple Diffusion? Dogmas, Atypical Roles and Complexity in Transport Systems», *Int J Bioch Cell Biol* 42: 857-868.
 34. Cruz-Ramos, H., Glaser, P., Wray, L. V. Jr., Fisher, S. H. (1997). "The *Bacillus subtilis* ureABC operon". *J Bacteriol* 179: 3371-3373.
 35. Cusa, E., N. Obradors, L. Baldomà, J. Badía, J. Aguilar (1999). "Genetic Analysis of a Chromosomal Region Containing Genes Required for Assimilation of Allantoin Nitrogen and Linked Glyoxylate Metabolism in *Escherichia coli*". *J Bacteriol* 181: 7479-7484.
 36. Dang S., L. Sun, Y. Huang, F. Lu, Y. Liu, H. Gong, J. Wang, N. Yan (2010). "Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation". *Nature* 467: 734-739.
 37. Danielsen, S., M. Kilstrup, K. Barilla, B. Jochimsen and J. Neuhard (1992). "Characterization of the *Escherichia coli* codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase." *Mol Microbiol* 6: 1335-1344.
 38. de Koning, H. and G. Diallinas (2000). "Nucleobase transporters." *Mol Membr Biol* 17: 75-94.
 39. de Koning, H. P., D. J. Bridges and R. J. Burchmore (2005). "Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy." *FEMS Microbiol Rev* 29: 987-1020.
 40. de la Riva, L., J. Badia, J. Aguilar, R. A. Bender, L. Baldoma (2008). "The *hpx* Genetic System for Hypoxanthine Assimilation as a Nitrogen Source in *Klebsiella pneumoniae*: Gene Organization and Transcriptional Regulation". *J Bacteriol* 190: 7892-7903.
 41. Desimone, M., E. Catoni, U. Ludewig, M. Hilpert, A. Schneider, R. Kunze, M. Tegeder, W. B. Frommer and K. Schumacher (2002). "A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in Arabidopsis." *Plant Cell* 14: 847-856.
 42. Diallinas, G. (2008). "Biochemistry. An Almost-Complete Movie". *Science* 322: 1644-1645.
 43. Diallinas, G. and C. Gournas (2008). "Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems." *Channels (Austin)* 2: 363-372.
 44. Diallinas, G., J. Valdez, V. Sophianopoulou, A. Rosa and C. Scazzocchio (1998). "Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues." *EMBO J* 17: 3827-3837.
 45. Diallinas, G., L. Gorfinkiel, H. N. Arst, Jr., G. Cecchetto and C. Scazzocchio (1995). "Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes." *J Biol Chem* 270: 8610-8622.
 46. Djordjevic, M.A. (2004). "*Sinorhizobium meliloti* Metabolism in the Root Nodule: a Proteomic Perspective". *Proteomics* 4: 1859-1872.
 47. Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." *Science* 280: 69-77.
 48. Drake, H. L. and S. L. Daniel (2004). "Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*." *Res Microbiol* 155: 422-436.
 49. Elion, G. B. (1993). "Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity." *J Med Virol Suppl* 1: 2-6.

50. Enomoto, A., H. Kimura, A. Chairoungdua, Y. Shigeta, P. Jutabha, S. H. Cha, M. Hosoyamada, M. Takeda, T. Sekine, T. Igarashi, H. Matsuo, Y. Kikuchi, T. Oda, K. Ichida, T. Hosoya, K. Shimokata, T. Niwa, Y. Kanai and H. Endou (2002). "Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels." *Nature* 417: 447-452.
51. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright and J. Abramson (2008). "The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport." *Science* 321: 810-814.
52. Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, and C. Miller (2009). "Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution". *Nature* 460: 1040-1043.
53. Fillat, C., M. Carrio, A. Cascante and B. Sangro (2003). "Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application." *Curr Gene Ther* 3: 13-26.
54. Flemetakis, E, Efrose R.C., Ott T., Stedel C., Aivalakis G., Udvardi M.K., Katinakis P. (2006). "Spatial and Temporal Organization of Sucrose Metabolism in *Lotus japonicus* Nitrogen-fixing Nodules Suggests a Role for the Elusive Alkaline/Neutral Invertase". *Plant Mol Biol* 62: 53-69.
55. Forrest, L. R. and G. Rudnick (2009). "The Rocking Bundle: A Mechanism for Ion-Coupled Solute Flux by Symmetrical Transporters". *Physiology* 24:377-386.
56. Forrest, L. R., Y. W. Zhang, M. T. Jacobs, J. Gesmonde, L. Xie, B. H. Honig and G. Rudnick (2008). "Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters." *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10338-10343.
57. Forrest, L. R., S. Tavoulari, Y. W. Zhang, G. Rudnick and B. Honig (2007). "Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻-dependent transporters." *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12761-12766.
58. Forrest, L. R., R. Krämer, C. Ziegler (2011). "The structural basis of secondary active transport mechanisms". *Biochim Biophys Acta* 187: 167-188.
59. Fox, I. H. and W. N. Kelley (1978). "The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells." *Annu Rev Biochem* 47: 655-686.
60. Franco, P. J. and R. J. Brooker (1994). "Functional roles of Glu-269 and Glu-325 within the lactose permease of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 269: 7379-7386.
61. Freeman, C. D., D. P. Nicolau, P. P. Belliveau and C. H. Nightingale (1993). "Lomefloxacin clinical pharmacokinetics." *Clin Pharmacokinet* 25: 6-19.
62. Frei, B., L. England and B. N. Ames (1989). "Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma." *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6377-6381.
63. Frillingos, S., M. Sahin-Toth, J. Wu and H. R. Kaback (1998). "Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins." *FASEB J* 12: 1281-1299.
64. Fujiwara, S., Noguchi, T. (1995). "Degradation of purines: only ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals". *Biochem. J.* 312: 315-318
65. Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang, Y. Shi (2009). "Structure and Mechanism of an Amino Acid Antiporter". *Science* 324: 1565-1568.
66. Georgopoulou, E., G. Mermelekas, E. Karena, S. Frillingos (2010). "Purine Substrate Recognition by the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in the YgfO Xanthine Permease". *J Biol Chem* 285: 19422-19433.

67. Gibbs, P., D. Handolias, S. McLaughlin, M. Chapman, J. Johns and I. Faragher (2008). "Single-institution experience of adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy for stage III colon cancer." *Intern Med J* 38: 265-269.
68. Gillissen, B., L. Burkle, B. Andre, C. Kuhn, D. Rentsch, B. Brandl and W. B. Frommer (2000). "A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 12: 291-300.
69. Gnann, J. W., Jr., N. H. Barton and R. J. Whitley (1983). "Acyclovir: mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications." *Pharmacotherapy* 3: 275-283.
70. Goudela, S., U. Reichard, S. Amillis and G. Diallinas (2008). "Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*." *Fungal Genet Biol* 45: 459-472.
71. Goudela, S., H. Tsilivi and G. Diallinas (2006). "Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families." *Mol Membr Biol* 23: 291-303.
72. Goudela, S., P. Karatza, M. Koukaki, S. Frilingos and G. Diallinas (2005). "Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family." *Mol Membr Biol* 22: 263-275.
73. Gournas, C., I. Papageorgiou and G. Diallinas (2008). "The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role." *Mol Biosyst* 4: 404-416.
74. Griesser, H. W., B. Müller-Hill and P. Overath (1983). "Characterization of beta-galactosidase-lactose-permease chimeras of *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 137: 567-572.
75. Griffiths, M., N. Beaumont, S. Y. Yao, M. Sundaram, C. E. Boumah, A. Davies, F. Y. Kwong, I. Coe, C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (1997a). "Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs." *Nature Med* 3: 89-93.
76. Griffiths, M., S. Y. Yao, F. Abidi, S. E. Phillips, C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (1997b). "Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta." *Biochem J* 328: 739-743.
77. Guan, L. and H. R. Kaback (2006). "Lessons from lactose permease." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 67-91.
78. Guan, L., O. Mirza, G. Verner, S. Iwata and H. R. Kaback (2007). "Structural determination of wild-type lactose permease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15294-15298.
79. Guan, L., I. N. Smirnova, G. Verner, S. Nagamori and H. R. Kaback (2006). "Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1723-1726.
80. Hamari, Z., S. Amillis, C. Drevet, A. Apostolaki, C. Vagvolgyi, G. Diallinas, and C. Scazzocchio (2009). "Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*." *Mol. Microbiol.* 73, 43-57.
81. Hediger, M. A. (2002a). "Kidney function: gateway to a long life?" *Nature* 417: 393-395.
82. Hediger, M. A. (2002b). "New view at C." *Nature Med* 8: 445-446.
83. Hellsten, Y., M. Svensson, B. Sjodin, S. Smith, A. Christensen, E.A. Richter, J. Bangsbo (2001). "Allantoin Formation and Urate and Glutathione Exchange in Human Muscle During Submaximal Exercise". *Free Rad Biol Med* 31: 1313-1322.
84. Henneby, S.C., H.M. Wright, V.A. Likic, S.J. Richardson (2006). "Structural and Functional Evolution of Transthyretin and Transthyretin-like Proteins". *Proteins* 64: 1024-1045.

85. Henry, L.K., Field, J.R., Adkins, E.M., Parnas, M.L., Vaughan, R.A., Zou, M.F., Newman, A.H., Blakely, R.D (2006). "Tyr-95 and Ile-172 in Transmembrane Segments 1 and 3 of Human Serotonin Transporters Interact to Establish High Affinity Recognition of Antidepressants". *J Biol Chem* 281: 2012-2023.
86. Huang, Y., M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer and D. N. Wang (2003). "Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*." *Science* 301: 616-620.
87. Hunte, C., E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimon, E. Padan, H. Michel (2005). " Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH". *Nature* 435: 1197-1202.
88. Huntley, S. A., D. Krofchick and M. Silverman (2006). "A glutamine to glutamate mutation at position 170 (Q170E) in the rabbit Na⁺/glucose cotransporter, rSGLT1, enhances binding affinity for Na⁺." *Biochemistry* 45: 4653-4663.
89. Hwang, J. T., J. Ha and O. J. Park (2005). "Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways." *Biochem Biophys Res Commun* 332: 433-440.
90. Hyde, R. J., C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (2001). "The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms." *Mol Membr Biol* 18: 53-63.
91. Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96: 23-28.
92. Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee and R. MacKinnon (2003). "The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* 423: 42-48.
93. Johansen, L. E., P. Nygaard, C. Lassen, Y. Agerso and H. H. Saxild (2003). "Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL)." *J Bacteriol* 185: 5200-5209.
94. Joost, H. G. and B. Thorens (2001). "The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members." *Mol Membr Biol* 18: 247-256.
95. Jormakka, M., S. Tornroth, B. Byrne, S. Iwata (2002). "Molecular Basis of Proton Motive Force Generation: Structure of Formate Dehydrogenase-N". *Science* 295: 1863-181868.
96. Jund, R., E. Weber and M. R. Chevallier (1988). "Primary structure of the uracil transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* 171: 417-424.
97. Jung, D.-K., Y. Lee, S. G. Park, B. C. Park, G.-H. Kim, S. Rhee (2006). "Structural and functional analysis of PucM, a hydrolase in the ureide pathway and a member of the transthyretin-related protein family". *PNAS* 103: 9790-9795.
98. Kaback, H. R., I. Smirnova, V. Kasho, Y. Nie, Y. Zhou (2011). "The Alternating Access Transport Mechanism in LacY". *J Membr Biol* *In press*.
99. Kaback, H.R., Dunten, R., Frillingos, S., Venkatesan P., Kwaw I., Zhang W., Ermolova N. (2007). "Site-directed Alkylation and the Alternating Access Model for LacY". *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 491-494.
100. Kalloniati, C., Tsikou D., Lampiri V., Fotelli M.N., Rennenberg H., Chatzipavlidis I., Fasseas C., Katinakis P., Fletmetakis E. (2009). "Characterization of a *Mesorhizobium loti* alpha-type Carbonic Anhydrase and its Role in Symbiotic Nitrogen Fixation". *J Bacteriol* 191: 2593-2600.

101. Karatza, P. and S. Frillingos (2005). "Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*." *Mol Membr Biol* 22: 251-261.
102. Karatza, P., P. Panos, E. Georgopoulou and S. Frillingos (2006). "Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix." *J Biol Chem* 281: 39881-39890.
103. Karena, E. and S. Frillingos (2009). "Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: His-31 and Asn-93 are crucial for affinity and specificity, Asp-304 and Glu-272 are irreplaceable." *J Biol Chem* 284, 24257-24268.
104. Kato, R., T. Maeda, T. Akaike and I. Tamai (2006). "Characterization of novel Na⁺-dependent nucleobase transport systems at the blood-testis barrier." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E968-975.
105. Kavanaugh, M. P. (2004) "Accessing a transporter structure". *Nature* 431 752-753.
106. Kim, K.S., Pelton J.G., Inwood W.B., Andersen U., Kustu S., Wemmer D.E. (2010). "The Rut Pathway for Pyrimidine Degradation: Novel Chemistry and Toxicity Problems". *J Bacteriol* 192: 4089-40102.
107. Kiss, A., K. Farah, J. Kim, R. J. Garriock, T. A. Drysdale and J. R. Hammond (2000). "Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain." *Biochem J* 352: 363-372.
108. Kong, W., K. Engel and J. Wang (2004). "Mammalian nucleoside transporters." *Curr Drug Metab* 5: 63-84.
109. Kosti, V., I. Papageorgiou, G. Diallinas (2010). "Dynamic Elements at Both Cytoplasmically and Extracellularly Facing Sides of the UapA Transporter Selectively Control the Accessibility of Substrates to Their Translocation Pathway". *J Mol Biol* 397: 1132-1143.
110. Koukaki, M., A. Vlanti, S. Goudela, A. Pantazopoulou, H. Gioule, S. Tournaviti and G. Diallinas (2005). "The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway." *J Mol Biol* 350: 499-513.
111. Kouri, E.D., Labrou N.E., Garbis S.D., Kalliampakou K.L., Stedel C., Dimou M., Udvardi M.K., Katinakis P., Flemetakis E., (2009). "Molecular and Biochemical Characterization of the parvulin-type PPIases in *Lotus japonicas*". *Plant Physiol* 150: 1160-1173.
112. Landfear, S.M. (2009). "Transporters for Drug Delivery and as Drug Targets in Parasitic Protozoa". *Clin Pharmacol Ther* 87: 122-125.
113. Landfear, S. M., B. Ullman, N. S. Carter and M. A. Sanchez (2004). "Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa." *Eukaryot Cell* 3: 245-254.
114. Lee, Y., D. H. Lee, C. W. Kho, A. Y. Lee, M. Jang, S. Choc, C. H. Lee, J. S. Lee, P. K. Myung, B. C. Park, S. G. Park (2005). "Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5- hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction". *FEBS letters* 579: 4769-4774.
115. Lemieux, M. J., Y. Huang and D. N. Wang (2004). "The structural basis of substrate translocation by the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily." *Curr Opin Struct Biol* 14: 405-412.
116. Liu, W., J. M. Boitz, J. Galazka, C. S. Arendt, N. S. Carter and B. Ullman (2006). "Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*." *Mol Biochem Parasitol* 150: 300-307.

117. Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh and P. Matsudaira (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco
118. Loh, K. D., P. Gyaneshwar, E. Markenscoff-Papadimitriou, R. Fong, K.-S. Kim, R. Parales, Z. Zhou, W. Inwood and S. Kustu (2006). "A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism". *Proc. atl. Acad. Sci. USA* 103: 5114-5119.
119. Lolkema, J. S. and B. Poolman (1995). "Uncoupling in secondary transport proteins. A mechanistic explanation for mutants of lac permease with an uncoupled phenotype." *J Biol Chem* 270: 12670-12676.
120. Mandal, M., Boese B., Barrick J. E., Winkler W. C., Breaker R. R. (2003). "Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus subtilis* and other Bacteria". *Cell* 113: 577-586.
121. Mandal, M., and Breaker R. R. (2004). "Gene Regulation by Riboswitches". *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 451-463.
122. Mansfield, T. A., N. P. Schultes and G. S. Mourad (2009). "AtAzc1 and AtAzc2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis." *FEBS Lett* 583: 481-486.
123. Markowitz, V. M., E. Szeto, K. Palaniappan, Y. Grechkin, K. Chu, I.-M. A. Chen, I. Dubchak, I. Anderson, A. Lykidis, K. Mavromatis, N. N. Ivanova and N. C. Kyrpides (2008). "The integrated microbial genomes (IMG) system in 2007: data content and analysis tools extensions." *Nucleic Acids Res* 36: D528-D533.
124. Martin, J. C., C. A. Dvorak, D. F. Smee, T. R. Matthews and J. P. Verheyden (1983). "9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent." *J Med Chem* 26: 759-761.
125. Martinussen, J., J. Schallert, B. Andersen and K. Hammer (2001). "The pyrimidine operon pyrRPB-carA from *Lactococcus lactis*." *J Bacteriol* 183: 2785-2794.
126. Maser, P., C. Sutterlin, A. Kralli and R. Kaminsky (1999). "A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance." *Science* 285: 242-244.
127. Matthews, T. and R. Boehme (1988). "Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir." *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3: S490-494.
128. Maurino, V. G., E. Grube, J. Zielinski, A. Schild, K. Fischer and U. I. Flugge (2006). "Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* 47: 1381-1393.
129. Maynes, J.T., Yuan, R.G., Snyder, F.F (2000). "Identification, Expression, and Characterization of *Escherichia coli* Guanine Deaminase". *J Bacteriol* 182: 4658-4660.
130. Meintanis, C., A. D. Karagouni and G. Diallinas (2000). "Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family." *Mol Membr Biol* 17: 47-57.
131. Mermelekas, G., E. Georgopoulou, A. Kallis, M. Botou, V. Vlantos, S. Frillingos (2010). "Cysteine-scanning Analysis of Helices TM8, TM9a, and TM9b and Intervening Loops in the YgfO Xanthine Permease". *J Biol Chem* 285: 35011-35020.
132. Mesnil, M. and H. Yamasaki (2000). "Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication." *Cancer Res* 60: 3989-3999.
133. Mirza, O., L. Guan, G. Verner, S. Iwata and H. R. Kaback (2006). "Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY." *EMBO J* 25: 1177-1183.

134. Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." *Nature* 450: 1043-1049.
135. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto and A. Yamaguchi (2006). "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." *Nature* 443: 173-179.
136. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." *Nature* 419: 587-593.
137. Newman, M. J., D. L. Foster, T. H. Wilson and H. R. Kaback (1981). "Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 256: 11804-11808.
138. Nicholas, L. M., A. L. Ford, S. M. Esposito, R. D. Ekstrom and R. N. Golden (2003). "The effects of mirtazapine on plasma lipid profiles in healthy subjects." *J Clin Psychiatry* 64: 883-889.
139. Nikaido, H. (2000). "How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells?" *Trends Microbiol* 8: 481-483.
140. Nygaard, P., S. M. Bsted, K. A. Andersen and H. H. Saxild (2000). "*Bacillus subtilis* guanine deaminase is encoded by the *yknA* gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source." *Microbiology* 146: 3061-3069.
141. Nyssonen, K., E. Porkkala-Sarataho, J. Kaikkonen and J. T. Salonen (1997). "Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men." *Atherosclerosis* 130: 223-233.
142. Oda, M., Y. Satta, O. Takenaka, N. Takahata (2002). "Loss of Urate Oxidase Activity in Hominoids and its Evolutionary Implications". *Mol Biol Evol* 19: 640-653.
143. O'Leary, S. E., K. A. Hicks, S. E. Ealick, T. P. Begley (2009). "Biochemical Characterization of the HpxO Enzyme from *Klebsiella pneumoniae*, a Novel FAD-Dependent Urate Oxidase". *Biochemistry* 48: 3033-3035.
144. Ormazabal, V., Zuniga F.A., Escobar E., Aylwin C., Salas-Burgos A., Godoy A., Reyes A.M., Vera J.C., Rivas C.L. (2010). "Histidine Residues in the Na⁺-coupled Ascorbic Acid Transporter-2 (SVCT2) are Central Regulators of SVCT2 Function, Modulating pH Sensitivity, Transporter Kinetics, Na⁺ Cooperativity, Conformational Stability, and Subcellular Localization" *J Biol Chem* 285: 36471-36485.
145. Ortiz, D., M. A. Sanchez, H. P. Koch, H. P. Larsson and S. M. Landfear (2009). "An acid-activated nucleobase transporter from *Leishmania major*." *J Biol Chem*. 284: 16164-16169.
146. Ortiz, D., M. A. Sanchez, S. Pierce, T. Herrmann, N. Kimblin, H. G. Archie Bower and S. M. Landfear (2007). "Molecular genetic analysis of purine nucleobase transport in *Leishmania major*." *Mol Microbiol* 64: 1228-1243.
147. Pantazopoulou, A. and G. Diallinas (2007). "Fungal nucleobase transporters." *FEMS Microbiol Rev* 31: 657-675.
148. Pantazopoulou, A. and G. Diallinas (2006). "The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport." *Mol Membr Biol* 23: 337-348.
149. Papageorgiou, I., C. Gournas, A. Vlant, S. Amillis, A. Pantazopoulou and G. Diallinas (2008). "Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers." *J Mol Biol* 382: 1121-1135.

150. Papageorgiou, I. G., H. P. De Koning, K. Soteriadou, G. Diallinas (2008). "Kinetic and mutational analysis of the *Trypanosoma brucei* NBT1 nucleobase transporter expressed in *Saccharomyces cerevisiae* reveals structural similarities between ENT and MFS transporters". *Parasitology* **38**: 641–653.
151. Papageorgiou, I. G., L. Yakob, M. I. Al Salabi, G. Diallinas, K. P. Soteriadou and H. P. De Koning (2005). "Identification of the first pyrimidine nucleobase transporter in *Leishmania*: similarities with the *Trypanosoma brucei* U1 transporter and antileishmanial activity of uracil analogues." *Parasitology* **130**: 275-283.
152. Papakostas, K., Georgopoulou E., Frillingos S. (2008). " Cysteine-Scanning Analysis of Putative Helix XII in the YgfO Xanthine Permease: Ile-432 and Asn-430 are Important". *J Biol Chem* **283**: 13666-13678.
153. Parales, R.E., Ingraham J.L. (2010). "The Surprising Rut Pathway: an Unexpected Way to Derive Nitrogen from Pyrimidines". *J Bacteriol* **192**: 4086-40888.
154. Pea, F. (2005). "Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions." *Contrib Nephrol* **147**: 35-46.
155. Pebay-Peyroula, E., C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trezeguet, G. J. Lauquin and G. Brandolin (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." *Nature* **426**: 39-44.
156. Pelissier, H. C., A. Frerich, M. Desimone, K. Schumacher and M. Tegeder (2004). "PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean." *Plant Physiol* **134**: 664-675.
157. Perez-Garcia, M.T., N. Chiamvimonvat, E. Marban, G.F. Tomaselli (1996). "Structure of the Sodium Channel Pore Revealed by Serial Cysteine Mutagenesis". *Physiology* **93**: 300-304.
158. Petsko, G. A. and A. R. Rees (1989). "Second structure determinations." *Protein Eng* **3**: 67.
159. Poolman, B., E. R. Geerstma, and D. J. Slotboom (2007). "Biochemistry: a missing link in protein evolution". *Science* **315**: 1229-1231.
160. Qiu, S., L. Li, E. J. Weeber, J. M. May (2007). " L. Ascorbate Transport by Primary Cultured Neurons and its Role in Neuronal Function and Protection Against Excitotoxicity". *J Neur Res* **85**: 1046-1056.
161. Quilles, F.A., Raso M.J., Pineda M., Piedras P. (2009). "Ureide Metabolism During Seedling Development in French Bean (*Phaseolus vulgaris*)". *Physiol Plant* **135**: 19-28.
162. Raso, M. J., M. Pineda, P. Piedras (2007). "Tissue Abundance and Characterization of two Purified Proteins with Allantoinase Activity from French Bean (*Phaseolus vulgaris*)". *Physiol Plant* **131**: 355-366.
163. Raunser, S., M. Appel, C. Ganea, U. Geldmacher-Kaufer, K. Fendler and W. Kuhlbrandt (2006). "Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshii*." *Biochemistry* **45**: 12796-12805.
164. Reitzer, L., Schneider B. L. (2001). "Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*". *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 422-444.
165. Ren, Q., K. H. Kang and I. T. Paulsen (2004). "TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems." *Nucleic Acids Res* **32**: D284-288.
166. Ressler, S., A. C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vornrhein, V. Ott and C. Ziegler (2009). "Molecular basis of transport and regulation in the Na(+)/betaine symporter BetP." *Nature* **458**: 47-52.
167. Rodriguez-Llorente, I., Caviedes M.A., Dary M., Palomares A.J., Canovas F.M., Peregrin-Alvares J.M. (2009). "The Symbiosis Interactom: a Computational Approach Reveals Novel

- Components, Functional Interactions and Modules in *Sinorhizobium meliloti*". BMC Syst Biol 3: 63.
168. Rosenberg, E., W. Hawkins, M. Holmes, C. Amir, R. K. Schmidt-Ullrich, P. S. Lin and K. Valerie (2002). "Radiosensitization of human glioma cells in vitro and in vivo with acyclovir and mutant HSV-TK75 expressed from adenovirus." Int J Radiat Oncol Biol Phys 52: 831-836.
 169. Rott, K. T. and C. A. Agudelo (2003). "Gout." JAMA 289: 2857-2860.
 170. Rudnick, G. (2006). "What is an antidepressant binding site doing in a bacterial transporter?". ACS Chem Biol. 2, 606-609.
 171. Ryan, R. M., E. L. Compton and J. A. Mindell (2009). "Functional characterization of a Na⁺-dependent aspartate transporter from *Pyrococcus horikoshii*." J Biol Chem 284: 17540-17548.
 172. Saier, M. H., R. N. Hvorup and R. D. Barabote (2005). "Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators." Biochem Soc Trans 33: 220-224.
 173. Saier, M. H., Jr. (2000). "Families of transmembrane sugar transport proteins." Mol Microbiol 35: 699-710.
 174. Saier, M. H., Yen, M. R., Noto K., Tamang T.G., Elkan C. (2009). " The Transporter Classification Database: recent advances " Nucleic Acids Res 37: D274-278. Santos, C.X.C., E.I. Anjos, O. Augusto (1999). " Uric Acid Oxidation by Peroxynitrite: Multiple Reactions, Free Radical Formation, and Amplification of Lipid Oxidation". Arch Biochem Bioph 372: 285-294.
 175. Sargent, D. J., H. S. Wieand, D. G. Haller, R. Gray, J. K. Benedetti, M. Buyse, R. Labianca, J. F. Seitz, C. J. O'Callaghan, G. Francini, A. Grothey, M. O'Connell, P. J. Catalano, C. D. Blanke, D. Kerr, E. Green, N. Wolmark, T. Andre, R. M. Goldberg and A. De Gramont (2005). "Disease-free survival versus overall survival as a primary end point for adjuvant colon cancer studies: individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials." J Clin Oncol 23: 8664-8670.
 176. Scazzocchio, C. (1994). "The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation." Prog Ind Microbiol 29: 221-257.
 177. Schlesinger, N. (2004). "Clues to pathogenesis of fibromyalgia in patients with sickle cell disease." J Rheumatol 31: 598-600.
 178. Schneider, B. L., Kiupakis A. K., Reitzer L.J. (1998). "Arginine catabolism and the Arginine Succinyltransferase Pathway in *Escherichia coli*". J Bacteriol 180: 4278- 4286.
 179. Schultz, A. C., P. Nygaard and H. H. Saxild (2001). "Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator." J Bacteriol 183: 3293-3302.
 180. Scott, G.S., D.C. Hooper (2001). "The Role of Uric Acid in Protection Against Peroxynitrite-mediated Pathology". Med Hyp 56: 95-100.
 181. Sevanian, A., K. J. Davies and P. Hochstein (1991). "Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid." Am J Clin Nutr 54: 1129S-1134S.
 182. Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, E. Gouaux (2009). " Structure and Mechanism of a Na⁺-Independent Amino Acid Transporter". Science 325:1010-1014.
 183. Shimamura, T., S. Weyand, O. Beckstein, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, D. Sharples, M. S. P. Sansom, S. Iwata, P. J. F. Henderson, A. D. Cameron (2010). " Molecular Basis of Alternating Access Membrane Transport by the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1". Science 328: 470-473

184. Shinoda, T., H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima (2009). "Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution." *Nature* 459: 446-450.
185. Simoyi, M.F., E. Falkenstein, K. van Dyke, K.P. Blemings, H. Klandorf (2003). "Allantoin, the Oxidation Product of Uric Acid is Present in Chicken and Turkey Plasma". *Comp Biochem Physiol* 135: 325-335.
186. Singh, S. K. (2008). "LeuT: a prokaryotic stepping stone on the way to a eukaryotic neurotransmitter structure." *Channels (Austin)* 2: 380-389.
187. Singh, S. K., C. L. Piscitelli, A. Yamashita and E. Gouaux (2008). "A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation." *Science* 322: 1655-1661.
188. Singh, S. K., A. Yamashita and E. Gouaux (2007). "Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters." *Nature* 448: 952-956.
189. Skinner, K. A., C. R. White, R. Pateli, S. Tani, S. Barnesi, M. Kirk, V. Darley-Usmari, D. A. Parks (1998). "Nitrosation of Uric Acid by Peroxynitrite". *J Biol Chem* 273: 24491–24497.
190. Slotboom, D. J., W. N. Konings and J. S. Lolkema (1999). "Structural features of the glutamate transporter family." *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 293-307.
191. Smirnova, I. N. and H. R. Kaback (2003). "A mutation in the lactose permease of *Escherichia coli* that decreases conformational flexibility and increases protein stability." *Biochemistry* 42: 3025-3031.
192. Sorgen, P.L., Hu Y., Kaback H.R., Girvin M.E. (2002). "An Approach to Membrane Protein Structure Without Crystals". *Proc Natl Acad Sci USA* 22: 14037-14040.
193. Spector, T. and D. G. Johns (1970). "4-Hydroxypyrazolo (3,4-d) pyrimidine as a substrate for xanthine oxidase: loss of conventional substrate activity with catalytic cycling of the enzyme." *Biochem Biophys Res Commun* 38: 583-589.
194. Stroud, R. M., S. Choe, J. Holton, H. R. Kaback, W. Kwiatkowski, D. L. Minor, R. Riek, A. Sali, H. Stahlberg and W. Harries (2009). "Annual progress report synopsis of the Center for Structures of Membrane Proteins." *J Struct Funct Genomics* 10: 193-208.
195. Stacey, G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G.D. (2006). "Genetics and Functional Genomics". *Curr Opin Plant Biol* 9: 110-121.
196. Tavoulari, S. and S. Frillingos (2008). "Substrate selectivity of the melibiose permease (MelY) from *Enterobacter cloacae*." *J Mol Biol* 76: 681–693
197. Tavoulari, S., L. Forrest and G. Rudnick (2009). "Fluoxetine (Prozac) binding to serotonin transporter is modulated by chloride and conformational changes." *J Neurochem* 29:9635-9643.
198. Tavoulari, S., A. N. Rizwan, L. R. Forrest, G. Rudnick (2011). "Reconstructing a Chloride Binding site in a Bacterial Neurotransmitter Transporter Homologue". *J Biol Chem* 286: 2834-2842.
199. Tchieu, J. H., V. Norris, J. S. Edwards and M. H. Saier, Jr. (2001). "The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*." *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 329-346.
200. Terkeltaub, R. A. (2003). "Questions & answers. What's the difference between gout and pseudogout?" *Health News* 9: 16.
201. Traxler, B., D. Boyd and J. Beckwith (1993). "The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins." *J Membr Biol* 132: 1-11.
202. Tsukaguchi, H., T. Tokui, B. Mackenzie, U. V. Berger, X. Z. Chen, Y. Wang, R. F. Brubaker and M. A. Hediger (1999). "A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters." *Nature* 399: 70-75.

203. Valdes, R., S. Arastu-Kapur, S. M. Landfear, U. Shinde (2009). "An *ab Initio* Structural Model of a Nucleoside Permease Predicts Functionally Important Residues". *J Biol Chem* 284: 19067-19076.
204. van Geest, M. and J. S. Lolkema (2000). "Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals." *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 13-33
205. van Iwaarden, P. R., J. C. Pastore, W. N. Konings and H. R. Kaback (1991). "Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues." *Biochemistry* 30: 9595-9600.
206. Varma, S., C. E. Campbell and S.-M. Kuo (2008). "Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters." *Biochemistry* 47: 2952-2960.
207. Viitanen, P., M. J. Newman, D. L. Foster, T. H. Wilson and H. R. Kaback (1986). "Purification, reconstitution, and characterization of the lac permease of *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* 125: 429-452.
208. Vlanti, A., and Diallinas G. (2008). " The *Aspergillus nidulans* FcyB Cytosine-purine Scavenger is Highly Expressed During Germination and in Reproductive Compartments and is Downregulated by Endocytosis". *Mol Microbiol* 68: 959-977.
209. Vlanti, A., S. Amillis, M. Koukaki and G. Diallinas (2006). "A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter." *J Mol Biol* 357: 808-819.
210. Vogels, G. D. and C. Van der Drift (1976). "Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms." *Bacteriol Rev* 40: 403-468.
211. Weber, E., C. Rodriguez, M. R. Chevallier and R. Jund (1990). "The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product." *Mol Microbiol* 4: 585-596.
212. Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E. P. Carpenter, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, J. O'Reilly, P. Ma, M. Saidijam, S. G. Patching, R. J. Hope, H. T. Norbertczak, P. C. Roach, S. Iwata, P. J. Henderson and A. D. Cameron (2008). "Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter." *Science* 322: 709-713.
213. Wortmann, R. L. (2005). "Recent advances in the management of gout and hyperuricemia." *Curr Opin Rheumatol* 17: 319-324.
214. Wright, E. M., B. A. Hirayama and D. F. Loo (2007). "Active sugar transport in health and disease." *J Intern Med* 261: 32-43.
215. Wright, A.F., Rudan I., Hastie N.D., Campell H. (2010). "A Complexity of Urate Transporters". *Kidney Int* 78: 446-452.
216. Xi, H., B. L. Schneider and L. Reitzer (2000). "Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage." *J Bacteriol* 182: 5332-5341.
217. Yamamoto, S., Inoue K., Murata T., Kamigaso S., Yasujima T., Maeda J.Y., Yoshida Y., Ohta K.Y., Yuasa H. (2010). "Identification and Functional Characterization of the First Nucleobase Transporter in Mammals: Implication in the Species Difference in the Intestinal Absorption Mechanism of Nucleobases and their Analogs Between Higher Primates and other Mammals". *J Biol Chem* 285: 6522-6531.
218. Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin and E. Gouaux (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters." *Nature* 437: 215-223.
219. Yao, S. Y., A. M. Ng, W. R. Muzyka, M. Griffiths, C. E. Cass, S. A. Baldwin and J. D. Young (1997). "Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine

- (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues." *J Biol Chem* 272: 28423-28430.
220. Ye, L., Z. Jia, T. Jung and P. C. Maloney (2001). "Topology of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, determined by site-directed fluorescence labeling." *J Bacteriol* 183: 2490-2496.
 221. Yernool, D., O. Boudker, Y. Jin and E. Gouaux (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." *Nature* 431: 811-818.
 222. Yin, Y., He X., Szewczyk P., Nguyen T., Chang G (2006). "Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*". *Science* 312: 741-743.
 223. Yoo, H. S., T. S. Cunningham and T. G. Cooper (1992). "The allantoin and uracil permease gene sequences of *Saccharomyces cerevisiae* are nearly identical." *Yeast* 8: 997-1006.
 224. Zampighi, G., J. Kyte and W. Freytag (1984). "Structural organization of (Na⁺ + K⁺)-ATPase in purified membranes." *J Cell Biol* 98: 1851-1864.
 225. Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (1999). "Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7190-7195.
 226. Zhou, Y., L. Guan, J. A. Freites and H. R. Kaback (2008). "Opening and closing of the periplasmic gate in lactose permease." *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3774-3778.
 227. Zhou, Z., J. Zhen, N. K. Karpowich, C. J. Law, M. E. Reith, and D. N. Wang (2009). "Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT-SSRI structures." *Nature Struct Mol Biol* 16: 652-657.
 228. Zhou, Z., J. Zhen, N. K. Karpowich, R. M. Goetz, C. J. Law, M. E. Reith, and D. N. Wang (2007). "LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake." *Science* 317: 1390-1393.
 229. Zomot, E., Zhou Y., Kanner B.I.(2005) "Proximity of Transmembrane Domains 1 and 3 of the Gamma-aminobutyric Acid Transporter GAT-1 Inferred From Paired Cysteine Mutagenesis". *J Biol Chem* 280: 25512-25516.
 230. Zomot, E., A. Bendahan, M. Quick, Y. Zhao, J. A. Javitch and B. I. Kanner (2007). "Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters." *Nature* 449: 726-730.
 231. Γεωργοπούλου, Α. (υπο συγγραφή). Χαρτογράφηση του κέντρου δέσμευσης και μεταφοράς των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων- ασκορβικού (NAT). Διδακτορική διατριβή,, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 232. Καρατζα, Π. (2006). Ανάπτυξη ενός πρότυπου βακτηριακού συστήματος για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT transporters). Διδακτορική διατριβή, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Βιοτεχνολογία", Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 233. Καρενά, Α. (2007). Ο ρόλος των διαμεμβρανικών καταλοίπων Arg, Asp, Glu, His, Lys στον μεταφορέα ξανθίνης YgfO. Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Βιοτεχνολογία", Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
 234. Καρλετίδης, Γ. (2010). Εξελικτικές συσχετίσεις Στην οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT). Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Βιολογικών Φαρμακίων και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
 235. Μερμελέκας, Γ. (2009). Υπερεκφραση-καθαρισμός και μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NAT σε πρότυπο βακτηριακό σύστημα. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

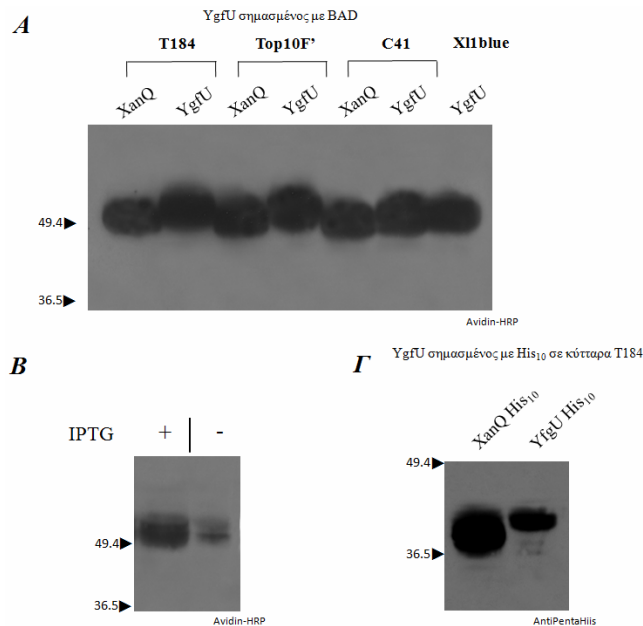
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Συμπληρωματικά στοιχεία για το χαρακτηρισμό του YgfU

Ο μεταφορέας YgfU εξετάστηκε διεξοδικά για τις ιδανικές συνθήκες έκφρασης και ως προς την ικανότητα ενεργού μεταφοράς, σε εύρος θερμοκρασιών (4 °C, 16 °C, 25 °C), και σε ένα εύρος συγκεντρώσεων KCl για την ανθεκτικότητα σε συνθήκες αλατότητας.

Έλεγχος της έκφρασης σε διάφορα κυτταρικά στελέχη.

Βρέθηκε (Εικόνα 1) ότι ο YgfU σημασμένος με BAD εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, παρόμοια με αυτά του XanQ, σε διάφορα στελέχη *E. coli* (T184, Top10F', C41 και XL1-blue), και ότι αυτή η έκφραση είναι απόλυτα επαγόμενη από το IPTG. Επίσης, ο YgfU σημασμένος με τον επίτοπο των ιστιδινών (His₁₀) εκφράζεται σε επίπεδα πολύ μικρότερα του YgfU σημασμένου με BAD.



Εικόνα 1. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του YgfU σε διάφορα στελέχη *E. coli* και με διάφορους τελικούς επιτόπους. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση της υπό μελέτη περμεάσης από πλασμίδια pT7-5/YgfU-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα. Η οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης έγινε με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

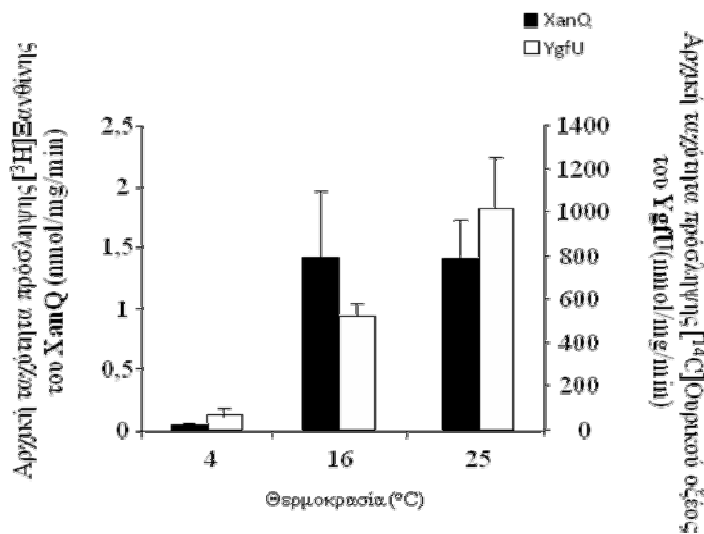
A). Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του YgfU και του XanQ σημασμένων με BAD σε διάφορα στελέχη του εντεροβακτηρίου *E. coli*. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000.

B). Έλεγχος της ετερόλογης έκφρασης του YgfU – BAD σε κύτταρα *E. coli* T184, μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM, 2 h) (+) ή χωρίς επαγωγή (αντίστοιχη καλλιέργεια χωρίς IPTG) (-) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP).

Γ). Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του XanQ-His₁₀ και του YgfU-His₁₀, σε κύτταρα T184 και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος έναντι των ιστιδινών (PentaHis- HRP).

Έλεγχος της ανθεκτικότητας του YgfU σε εύρος θερμοκρασιών.

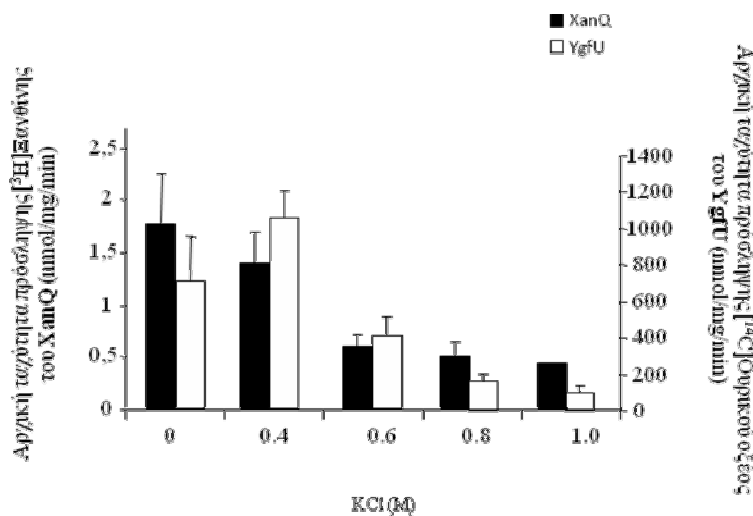
Έλεγχος της ικανότητας λήψης [¹⁴C]ουρικού οξέος σε ένα εύρος θερμοκρασιών δείχνει ότι η πρόσληψη ουρικού οξέος είναι σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερη στους 16 °C από τους 4 °C, και σχεδόν διπλασιάζεται από τους 16 °C στους 25 °C (Εικόνα 2). Στο μεταφορέα XanQ που εξετάστηκε παράλληλα βρέθηκε ότι ενώ στους 4 °C η πρόσληψη ξανθίνης είναι αμελητέα, στους 16 °C φτάνει τα επίπεδα πρόσληψης που παρατηρούνται στους 25 °C. Άρα οι 25 °C είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη μελετη του YgfU.



Εικόνα 2. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των μεταφορέων YgfU και XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση του XanQ ή του YgfU από πλασμίδιο pT7-5/ygfU-BAD ή pT7-5/xanQ-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM) (YgfU, δεξιά) και [³H]ξανθίνης (1 μM) (XanQ, αριστερά), στους 4 °C, 16 °C και 25 °C. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Φαίνονται οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

Έλεγχος ανθεκτικότητας του YgfU στην ιοντική ισχύ.

Η ανθεκτικότητα σε διάφορες συγκεντρώσεις KCl που δείχνει ο YgfU είναι σημαντική, με τα επίπεδα πρόσληψης [¹⁴C]ουρικού οξέος σε συγκέντρωση KCl 0.4 M να είναι παρόμοια με αυτά απουσία KCl (Εικόνα 3). Όταν η συγκέντρωση του KCl φτάνει σε 1 M τότε μόνο παρατηρείται πτώση στη μεταφορά ουρικού οξέος (περίπου 10 φορές χαμηλότερα). Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στον XanQ, με την ενεργότητα να πέφτει κατά 80% στα 0.4 M KCl.



Εικόνα 3. Επίδραση της ιοντικής ισχύος (αλατότητας) στην ενεργότητα των μεταφορέων YgfU και XanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση του XanQ ή του YgfU από πλασμίδιο pT7-5/ygfU-BAD ή pT7-5/xanQ-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (1 mM), για τον YgfU, και [³H]ξανθίνης (1 μM), για τον XanQ, παρουσία 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1 και 1.5 M KCl. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης (V₀) μετρήθηκε σε 15 και 30 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών απουσία KCl.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Πλήρεις κωδικεύουσες αλληλουχίες νέων χαρακτηρισμένων NAT μεταφορέων

YgfU

```
atg agc gcc ata gat tcc caa ctt ccc tca tct tct ggg caa gac cgc cca 51
M S A I D S Q L P S S S G Q D R P 17
act gat gag gtt gac cgc ata tta tca cca gga aag ctg atc ata ctc ggt 102
T D E V D R I L S P G K L I I L G 34
ctg caa cac gtc ctt gtc atg tac gca ggt gca gtc gct gtt cct ctt atg 153
L Q H V L V M Y A G A V A V P L M 51
att ggt gac cga ctg ggc ctc tca aaa gaa gct att gcg atg ctc att agc 204
I G D R L G L S K E A I A M L I S 68
tcg gat ctc ttt tgc tgc ggg atc gtc aca tta ttg caa tgt atc ggt atc 255
S D L F C C G I V T L L Q C I G I 85
ggc cgc ttt atg ggg atc cgc ctg ccg gtg att atg tcg gtg acc ttt gct 306
G R F M G I R L P V I M S V T F A 102
gct gta aca cca atg ata gcc att ggg atg aac ccg gat atc ggc ctg ctg 357
A V T P M I A I G M N P D I G L L 119
ggg ata ttt ggt gcc act atc gcc gcg ggt ttt atc acc aca tta tta gcg 408
G I F G A T I A A G F I T T L L A 136
cca ctt atc ggt cgc ttg atg cct tta ttc ccg cca ctg gtt acc ggt gtg 459
P L I G R L M P L F P P L V T G V 153
gtt att act tct atc ggg ctt agc atc att cag gtg ggt att gac tgg gcc 510
V I T S I G L S I I Q V G I D W A 170
gcc gga ggt aaa ggg aat ccg caa tat ggt aat ccc gtt tat tta ggt atc 561
A G G K G N P Q Y G N P V Y L G I 187
tcc ttt gcc gtc tta att ttt atc ttg ctc att act cgc tat gcg aaa gga 612
S F A V L I F I L L I T R Y A K G 204
ttt atg tcc aac gtc gcc gta tta ctg ggg att gta ttt ggc ttt tta ctt 663
F M S N V A V L L G I V F G F L L 221
tcg tgg atg atg aat gaa gtc aat tta tcc ggg cta cat gat gct tca tgg 714
```

S	W	M	M	N	E	V	N	L	S	G	L	H	D	A	S	W	238
ttt	gcg	att	gtt	acg	ccg	atg	tcg	ttt	ggt	atg	ccg	att	ttc	gat	ccc	gtt	765
F	A	I	V	T	P	M	S	F	G	M	P	I	F	D	P	V	255
tcc	att	ctg	acc	atg	act	gcc	gtg	tta	atc	atc	gtg	ttt	atc	gag	tca	atg	816
S	I	L	T	M	T	A	V	L	I	I	V	F	I	E	S	M	272
ggg	atg	ttc	ctg	gca	ctg	ggt	gaa	ata	gtc	ggt	cgt	aaa	ctc	tct	tcg	cac	867
G	M	F	L	A	L	G	E	I	V	G	R	K	L	S	S	H	289
gat	att	att	cgc	ggg	ctg	cgt	gtc	gat	ggc	gta	ggg	aca	atg	ata	ggc	ggc	918
D	I	I	R	G	L	R	V	D	G	V	G	T	M	I	G	G	306
acg	ttt	aac	agc	ttc	ccc	cac	acg	tca	ttt	tct	caa	aac	gtt	ggc	ctg	gtt	969
T	F	N	S	F	P	H	T	S	F	S	Q	N	V	G	L	V	323
agc	gtg	acg	cgc	gtt	cat	agc	cgc	tgg	gtg	tgt	att	tct	tcg	gga	att	ata	1020
S	V	T	R	V	H	S	R	W	V	C	I	S	S	G	I	I	340
tta	atc	ctg	ttt	ggc	atg	gtg	cca	aaa	atg	gcg	gtg	ctg	gta	gcc	tcc	att	1071
L	I	L	F	G	M	V	P	K	M	A	V	L	V	A	S	I	357
ccg	caa	ttt	gtg	ctg	ggc	ggc	gct	ggt	cta	gtg	atg	ttc	ggc	atg	gta	ctg	1122
P	Q	F	V	L	G	G	A	G	L	V	M	F	G	M	V	L	374
gcg	aca	ggg	att	cga	att	ctg	tcg	cgc	tgt	aac	tac	acc	acc	aac	cgt	tac	1173
A	T	G	I	R	I	L	S	R	C	N	Y	T	T	N	R	Y	391
aac	ctc	tat	att	gtg	gcg	atc	agt	ctc	ggc	gtt	ggc	atg	act	ccg	acg	ctc	1224
N	L	Y	I	V	A	I	S	L	G	V	G	M	T	P	T	L	408
tct	cac	gat	ttc	ttt	tct	aag	tta	ccg	gcc	gta	ctg	caa	ccg	ctg	cta	cat	1275
S	H	D	F	F	S	K	L	P	A	V	L	Q	P	L	L	H	425
agc	ggc	att	atg	ctc	gca	acc	ctt	agc	gcc	gtt	gtg	ctg	aac	gtc	ttc	ttt	1326
S	G	I	M	L	A	T	L	S	A	V	V	L	N	V	F	F	442
aat	ggc	tat	cag	cat	cat	gct	gac	ctg	gtg	aag	gaa	tcc	gtc	tct	gat	aaa	1377
N	G	Y	Q	H	H	A	D	L	V	K	E	S	V	S	D	K	459
gat	tta	aaa	gtc	agg	aca	gta	cgt	atg	tgg	ctt	ctg	atg	cgc	aag	ctg	aag	1428
D	L	K	V	R	T	V	R	M	W	L	L	M	R	K	L	K	476
aaa	aat	gag	cat	gga	gaa	taa											1446
K	N	E	H	G	E												482

RutG

atg gca atg ttc ggt ttt cct cac tgg cag tta aaa tcg acc tct aca gag 51
M A M F G F P H W Q L K S T S T E 17
agc ggc gtg gtc gcg ccg gat gaa cga ttg ccg ttt gct cag acg gca gta 102
S G V V A P D E R L P F A Q T A V 34
atg ggc gtt caa cac gcg gtg gcg atg ttt ggc gcg acg gtg tta atg ccg 153
M G V Q H A V A M F G A T V L M P 51
att ctg atg ggg ctg gat ccc aat ctt tcc att tta atg tcg ggg atc ggc 204
I L M G L D P N L S I L M S G I G 68
acg tta ctg ttt ttc ttt att acc ggc ggg cgc gtc ccc agt tat ctc ggc 255
T L L F F F I T G G R V P S Y L G 85
tcc agc gcg gct ttt gtc ggc gtg gtg atc gcc gcg acg ggc ttt aac ggt 306
S S A A F V G V V I A A T G F N G 102
cag ggc att aac ccg aat atc agc att gcg ctg ggc ggg att atc gcc tgt 357
Q G I N P N I S I A L G G I I A C 119
ggg ctg gtt tat acc gtc att ggc ctg gtg gtg atg aaa atc ggt acg cgc 408
G L V Y T V I G L V V M K I G T R 136
tgg att gaa cga ctg atg ccg ccg gtg gtg acg ggt gcg gtg gtg atg gcg 459
W I E R L M P P V V T G A V V M A 153
att ggc ctg aac tta gcg cct atc gca gtg aaa agt gta tcg gct tcg gcc 510
I G L N L A P I A V K S V S A S A 170
ttt gat agc tgg atg gcg gta atg acg gtg ctg tgt att ggg ctg gtg gcg 561
F D S W M A V M T V L C I G L V A 187
gtg ttt acc cgt ggc atg atc cag cgg tta ttg att ctc gta gga tta att 612
V F T R G M I Q R L L I L V G L I 204
gtc gcc tgt ctg ctg tat ggc gtg atg acc aac gtt tta ggg ctg gga aaa 663
V A C L L Y G V M T N V L G L G K 221
gcc gtc gat ttt act ctc gtc agc cat gct gcc tgg ttc ggt ctg cca cat 714
A V D F T L V S H A A W F G L P H 238
ttt tcc act cct gct ttt aat ggt cag gca atg atg ctg att gcg ccc gtg 765
F S T P A F N G Q A M M L I A P V 255
gcg gtg att ctg gtg gcg gaa aac tta ggt cat ctc aag gca gtc gcc ggg 816
A V I L V A E N L G H L K A V A G 272
atg acc gga cgc aat atg gac ccg tat atg ggg cgg gca ttc gta ggc gat 867
M T G R N M D P Y M G R A F V G D 289

ggt ctg gca acg atg ctt tcc ggc tct gtc ggc ggt agc ggc gtg acc acc 918
 G L A T M L S G S V G G S G V T T 306
 tat gct gaa aat atc ggt gtg atg gcc gtg acc aaa gtc tac tcg acg ctg 969
 Y A E N I G V M A V T K V Y S T L 323
 gtg ttt gtt gct gct gcc gtc atc gcc atg ctg ttg ggc ttt tca ccg aaa 1020
 V F V A A A V I A M L L G F S P K 340
 ttt ggt gcg ctg att cat acc att ccg gcc gcg gtt att ggt ggt gca tca 1071
 F G A L I H T I P A A V I G G A S 357
 att gtt gtg ttc ggg ctg att gcc gtc gca ggc gca agg ata tgg gta caa 1122
 I V V F G L I A V A G A R I W V Q 374
 aac cgt gtc gat tta agc cag aac ggt aat ttg att atg gtc gca gta acc 1173
 N R V D L S Q N G N L I M V A V T 391
 tta gtg ctg ggc gcg ggt gat ttt gct ctc acg ctg ggc ggt ttt acg ttg 1224
 L V L G A G D F A L T L G G F T L 408
 gga ggg att ggt aca gca acc ttt ggc gcg att tta ctc aat gcg ttg tta 1275
 G G I G T A T F G A I L L N A L L 425
 agc aga aag ttg gtt gac gtt cca ccg cca gaa gtt gtt cat cag gag cca 1326
 S R K L V D V P P P E V V H Q E P 442
 taa

LL9

ttg gca aac agt gca gag gaa acc gta tca cca acg cgc ccg gag gat gag	51
L A N S A E E T V S P T R P E D E	17
aag ctc ggc atc ggc gcc aat ctg gcc tat ggc ctg cag cac gta ctg acg	102
K L G I G A N L A Y G L Q H V L T	34
atg tat gga ggc atc gtc gcc gtg ccc ctg ata ctg ggc cag gcc gca ggc	153
M Y G G I V A V P L I L G Q A A G	51
ctc ggc tcc ggc gac atc ggc ctg ctc atc acg gca tcc ctg ttt gcc ggc	204
L G S G D I G L L I T A S L F A G	68
ggc ctc gcc acc att ttg caa acc atg ggc ctg ccc ttc ttc gga agc cag	255
G L A T I L Q T M G L P F F G S Q	85
ttg ccg ctg gtc cag ggc gtt tcc ttt tcc ggc gtg gcg acg atg atc gcc	306
L P L V Q G V S F S G V A T M I A	102
att tcc ggc aat ggg ggg ctt cag tcg gtg ctc ggc gcc gtc att gcc gcc	357
I S G N G G L Q S V L G A V I A A	119
tcg ctg atc ggc ctg ctg ata acg ccc ata ttc tcg cgg atc acc cgc ttt	408
S L I G L L I T P I F S R I T R F	136
ttt ccg ccg ctc gtc acc ggc atc gtg atc acc acc ata gga ctg acg ctg	459
F P P L V T G I V I T T I G L T L	153
atg ccc gtt gcc gcg cgc tgg gcc atg ggc ggc aac agc agt gcg cct gat	510
M P V A A R W A M G G N S S A P D	170
ttc ggc agc ccc gcc aat atc cag ctt gca gcg gtc acg ctc gtc atc gtg	561
F G S P A N I Q L A A V T L V I V	187
ctc ctg ctc agc aag ctc gga agc gcc gcg atc tcg cgg ctc tcg atc ctg	612
L L L S K L G S A A I S R L S I L	204
ctc gcc ctg atc atc ggt acg gtg ata gcc tat ttc gcc ggc atg gct gat	663
L A L I I G T V I A Y F A G M A D	221
ttc tcg cag gtg acc gaa ggg cct ttc ttc gcg ctt ccg ctg gtc ttc cac	714
F S Q V T E G P F F A L P L V F H	238
ttc ggc tat ccg acc ttc gaa gtc gcg gcg atc gct tcg atg ttc atc gtc	765
F G Y P T F E V A A I A S M F I V	255
atc atg gtg acg ctg gtc gag act tcg gcg gac att ctg gcg gtc ggc gaa	816
I M V T L V E T S A D I L A V G E	272
atc atc gag acg aaa gtg gat tcg cgc cgg ctc ggc gac ggc ctc agg gcc	867
I I E T K V D S R R L G D G L R A	289
gac atg ctg tcg agc ctg ctc gca ccg atc ttc ggc tcc ttc acc cag agc	918

D	M	L	S	S	L	L	A	P	I	F	G	S	F	T	Q	S	306
gcc	ttt	gcc	cag	aat	gtc	ggg	ctg	gtg	gcg	gtc	acc	ggg	gtc	aag	agc	cgc	969
A	F	A	Q	N	V	G	L	V	A	V	T	G	V	K	S	R	323
tat	gtc	gtt	gca	acc	ggc	ggc	ctg	ttt	ctc	gtc	acg	ctc	ggt	ctt	ctg	cct	1020
Y	V	V	A	T	G	G	L	F	L	V	T	L	G	L	L	P	340
gtc	atg	ggc	cgc	atc	gtc	gcg	gcg	gtt	ccg	agt	tcc	gtg	ctc	ggc	ggc	gcc	1071
V	M	G	R	I	V	A	A	V	P	S	S	V	L	G	G	A	357
ggc	atc	gtg	ctc	ttc	ggc	acg	gtc	gcg	gcg	agc	ggc	atc	cgc	acc	ctg	tcg	1122
G	I	V	L	F	G	T	V	A	A	S	G	I	R	T	L	S	374
aag	gtg	gac	tac	gcc	aac	aac	atg	aac	ctg	gtc	atc	gtc	gcg	acc	tcg	atc	1173
K	V	D	Y	A	N	N	M	N	L	V	I	V	A	T	S	I	391
ggc	ttc	ggc	atg	att	ccg	atc	gcc	tcg	ccg	acc	ttc	tac	gag	cat	ttc	ccg	1224
G	F	G	M	I	P	I	A	S	P	T	F	Y	E	H	F	P	408
gcc	tgg	gtc	gag	acg	atc	ttc	cat	tcc	ggt	atc	agc	tcc	gcc	gcg	ctg	atg	1275
A	W	V	E	T	I	F	H	S	G	I	S	S	A	A	L	M	425
gcg	atc	agc	ctc	aac	ctg	atc	ttc	aac	cat	atg	acc	gcc	ggg	aac	tcg	gac	1326
A	I	S	L	N	L	I	F	N	H	M	T	A	G	N	S	D	442
cag	caa	tcg	gtg	ttc	gtc	gcc	ggc	acg	gag	cgg	acg	ctg	cgc	tat	cag	gac	1377
Q	Q	S	V	F	V	A	G	T	E	R	T	L	R	Y	Q	D	459
atc	gcg	cgg	ctg	cac	gac	ggc	gac	tat	ttc	ctc	aac	ggc	aag	ctc	tac	gac	1428
I	A	R	L	H	D	G	D	Y	F	L	N	G	K	L	Y	D	476
gcc	aac	ggc	acg	gaa	gtg	ccc	gtg	ctt	gcc	gcg	gaa	gcg	cat	tga			1473
A	N	G	T	E	V	P	V	L	A	A	E	A	H				490

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Χρήση κωδικονίων μεταφορέων NAT

Πίνακας 1. Πίνακας που δείχνει τη χρήση των κωδικονίων /1000 καθώς και το ποσοστό περιεκτικότητας GC% στην *E. coli* K12 και στα γονίδια των XanQ, XanP, YgfU και RutG.

		/1000				
		<i>Escherichia coli</i> K12	XanQ	XanP	YgfU	RutG
Ala	GCG	38.46	17.13	43.10	18.63	47.40
Ala	GCA	21.09	21.41	19.40	8.28	22.57
Ala	GCT	10.74	14.99	4.31	12.42	18.06
Ala	GCC	31.63	21.41	32.33	26.92	31.60
Cys	TGT	5.86	4.28	2.16	4.14	6.77
Cys	TGC	8.00	6.42	6.47	6.21	0.00
Asp	GAT	37.88	17.13	2.16	20.70	15.80
Asp	GAC	20.50	4.28	6.47	12.42	4.51
Glu	GAG	18.35	10.71	6.47	6.21	6.77
Glu	GAA	43.73	21.41	25.86	10.35	9.03
Phe	TTT	19.72	34.26	23.71	33.13	40.63
Phe	TTC	15.03	19.27	17.24	20.70	11.29
Gly	GGG	8.59	17.13	8.62	31.06	29.35
Gly	GGA	9.18	2.14	4.31	10.35	11.29
Gly	GGT	21.28	40.69	34.48	37.27	36.12
Gly	GGC	33.39	57.82	45.26	24.84	47.40
His	CAT	15.81	12.85	4.31	12.42	11.29
His	CAC	13.08	2.14	4.31	6.21	4.51

Ile	ATA	3.71	6.42	0.00	12.42	0.00
Ile	ATT	30.46	55.67	51.72	47.62	45.15
Ile	ATC	18.16	42.83	30.17	41.41	27.09
Lys	AAG	12.10	2.14	2.16	10.35	2.26
Lys	AAA	33.19	12.85	12.93	16.56	13.54
Leu	TTG	11.91	14.99	15.09	10.35	15.80
Leu	TTA	15.23	42.83	12.93	28.99	29.35
Leu	CTG	46.86	36.40	96.98	47.62	49.66
Leu	CTA	5.27	4.28	4.31	4.14	2.26
Leu	CTT	11.91	14.99	10.78	16.56	4.51
Leu	CTC	10.54	12.85	6.47	20.70	13.54
Met	ATG	24.80	38.54	43.10	53.83	51.92
Asn	AAT	21.87	12.85	6.47	12.42	22.57
Asn	AAC	24.40	12.85	30.17	16.56	13.54
Pro	CCG	26.75	12.85	34.48	18.63	22.57
Pro	CCA	6.64	4.28	15.09	14.49	9.03
Pro	CCT	8.40	10.71	10.78	4.14	6.77
Pro	CCC	6.44	12.85	0.00	8.28	6.77
Gln	CAG	27.72	17.13	23.71	8.28	13.54
Gln	CAA	12.10	4.28	21.55	14.49	6.77
Arg	AGG	1.56	0.00	0.00	2.07	2.26
Arg	AGA	1.37	0.00	0.00	0.00	2.26
Arg	CGG	4.10	2.14	2.16	0.00	4.51
Arg	CGA	4.30	8.57	0.00	4.14	6.77
Arg	CGT	21.09	6.42	15.09	6.21	4.51
Arg	CGC	25.97	14.99	12.93	24.84	6.77
Ser	AGT	7.22	6.42	6.47	2.07	2.26

Ser	AGC	16.60	23.55	12.93	16.56	15.80
Ser	TCG	8.00	6.42	15.09	14.49	13.54
Ser	TCA	7.81	14.99	4.31	12.42	2.26
Ser	TCT	5.66	21.41	12.93	14.49	6.77
Ser	TCC	5.47	14.99	23.71	16.56	6.77
Thr	ACG	11.52	19.27	19.40	12.42	24.83
Thr	ACA	6.44	4.28	0.00	12.42	6.77
Thr	ACT	8.00	6.42	8.62	12.42	9.03
Thr	ACC	22.84	23.55	25.86	12.42	20.32
Val	GTG	26.36	21.41	36.64	35.20	56.43
Val	GTA	11.52	10.71	6.47	14.49	20.32
Val	GTT	16.79	38.54	34.48	14.49	22.57
Val	GTC	11.71	27.84	10.78	33.13	27.09
Trp	TGG	10.74	2.14	8.62	10.35	11.29
Tyr	TAT	16.79	14.99	6.47	8.28	9.03
Tyr	TAC	14.64	10.71	10.78	8.28	4.51
End	TGA	0.98	0.00	0.00	0.00	0.00
End	TAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
End	TAA	1.76	2.14	2.16	2.07	2.26
GC %		52.35	48.89	54.9	50.1	53.9

Πίνακας 2. Πίνακας που δείχνει τη χρήση των κωδικονίων /1000 καθώς και το ποσοστό περιεκτικότητας GC% στο *S. meliloti* 1021 και στα γονίδια των LL9, X28, και WQ0.

		/1000			
		<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	LL9	X28	WQ0
Ala	GCG	43.25	42.77	56.03	40.00
Ala	GCA	15.91	14.26	10.78	13.33
Ala	GCT	11.18	4.07	10.78	15.56
Ala	GCC	49.30	59.06	45.26	53.33
Cys	TGT	1.72	0.00	2.16	0.00
Cys	TGC	7.60	0.00	10.78	4.44
Asp	GAT	19.65	8.15	17.24	8.89
Asp	GAC	33.34	20.37	19.40	20.00
Glu	GAG	33.68	16.29	10.78	6.67
Glu	GAA	24.52	12.22	6.47	13.33
Phe	TTT	8.40	12.22	10.78	26.67
Phe	TTC	30.93	44.81	49.57	42.22
Gly	GGG	12.75	12.22	15.09	24.44
Gly	GGA	10.84	8.15	19.40	13.33
Gly	GGT	11.63	6.11	15.09	13.33
Gly	GGC	49.18	83.50	62.50	55.56
His	CAT	10.08	8.15	4.31	2.22
His	CAC	10.95	6.11	2.16	6.67
Ile	ATA	3.99	10.18	8.62	2.22
Ile	ATT	9.15	10.18	10.78	6.67
Ile	ATC	41.36	65.17	66.81	86.67
Lys	AAG	23.97	10.18	15.09	11.11
Lys	AAA	7.91	2.04	4.31	2.22

Leu	TTG	9.64	6.11	6.47	2.22
Leu	TTA	1.06	0.00	0.00	0.00
Leu	CTG	36.07	63.14	49.57	60.00
Leu	CTA	2.73	0.00	0.00	4.44
Leu	CTT	15.83	10.18	10.78	31.11
Leu	CTC	36.20	44.81	43.10	20.00
Met	ATG	24.31	28.51	45.26	28.89
Asn	AAT	9.52	8.15	8.62	2.22
Asn	AAC	16.84	20.37	21.55	13.33
Pro	CCG	27.59	22.40	30.17	46.67
Pro	CCA	4.30	2.04	0.00	2.22
Pro	CCT	5.02	6.11	2.16	2.22
Pro	CCC	13.23	12.22	21.55	11.11
Gln	CAG	22.45	22.40	21.55	26.67
Gln	CAA	6.53	4.07	0.00	4.44
Arg	AGG	6.31	2.04	0.00	0.00
Arg	AGA	3.18	0.00	0.00	2.22
Arg	CGG	17.27	10.18	6.47	11.11
Arg	CGA	5.66	0.00	0.00	2.22
Arg	CGT	8.07	0.00	2.16	8.89
Arg	CGC	32.37	16.29	23.71	15.56
Ser	AGT	3.13	6.11	0.00	4.44
Ser	AGC	15.71	22.40	19.40	15.56
Ser	TCG	18.64	30.55	10.78	22.22
Ser	TCA	3.47	2.04	0.00	0.00
Ser	TCT	3.14	0.00	0.00	2.22
Ser	TCC	13.80	18.33	6.47	8.89

Thr	ACG	21.50	32.59	23.71	33.33
Thr	ACA	4.92	0.00	6.47	2.22
Thr	ACT	3.54	2.04	0.00	2.22
Thr	ACC	21.45	32.59	21.55	26.67
Val	GTG	23.27	32.59	40.95	44.44
Val	GTA	4.42	4.07	4.31	13.33
Val	GTT	9.98	8.15	17.24	4.44
Val	GTC	37.77	46.84	51.72	37.78
Trp	TGG	13.77	4.07	12.93	2.22
Tyr	TAT	11.72	14.26	8.62	4.44
Tyr	TAC	11.06	6.11	6.47	8.89
End	TGA	2.10	2.04	0.00	0.00
End	TAG	0.65	0.00	2.16	2.22
End	TAA	0.51	0.00	0.00	0.00
GC %		62.09	63.2	63.1	62.6