



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ

**ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ-
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ NAT ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΕΡΜΕΛΕΚΑΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ

**ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ-
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ NAT ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΕΡΜΕΛΕΚΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

«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)».

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η χρηματοδότηση ήταν από το Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ-2003) της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας (Υπουργείο Ανάπτυξης), στα πλαίσια του Γ' Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης.

Αρκετοί άνθρωποι, με τον δικό τους τρόπο ο καθένας, είχαν τη δική τους συνεισφορά στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο, που η καθοδήγησή του ήταν καθοριστική για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Καταρχήν θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στο ξεκίνημα αλλά και κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Πάντα ήταν εκεί όταν τον χρειάστηκα και εκτός από γνώση μου δίδαξε και τον τρόπο που πρέπει να αντιμετωπίζεται η έρευνα, από τα καθαρά τεχνικά ζητήματα και την εξεύρεση νέων πληροφοριών, μέχρι τον επιστημονικό τρόπο έκφρασης και παρουσίασης, της ερμηνείας που δίδεται στα πειραματικά δεδομένα. Παράλληλα, τον ευχαριστώ γιατί μου έδωσε τη δυνατότητα να ταξιδέψω στο εξωτερικό (εργαστήριο J. C. Voss, UC Davis), βλέποντας τον τρόπο λειτουργίας των ερευνητικών εργαστηρίων στο εξωτερικό, αποκομίζοντας πολύτιμες εμπειρίες. Έτσι, με δεδομένη και την ομοιότητα του χαρακτήρα μας, δημιουργήθηκε ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας με απώτερο σκοπό το καλύτερο αποτέλεσμα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά, που αν και δεν είχαμε συχνή επαφή οι παρατηρήσεις του και οι προτάσεις του σε σχέση με αυτή την εργασία έφταναν σε εμένα μέσω του κ. Φριλίγγου, και την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων δομικών αναλύσεων, που, με εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές, με οδήγησε στην κατανόηση και στην ερμηνεία αυτών των πειραμάτων.

Στα πλαίσια της παρουσίας μου στο ερευνητικό εργαστήριο του John Voss στο Davis της California για τρεις μήνες περίπου, είχα την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με πολύ σημαντικούς ανθρώπους του Πανεπιστημίου του Davis αλλά και του Los Angeles. Ο ίδιος ο John Voss, αλλά και η ερευνητική του ομάδα (Jens Lagerstedt, Madhu Bundamacunda), ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν και στο ερευνητικό κομμάτι αλλά και στην προσαρμογή μου εκτός εργαστηρίου στη ζωή στις ΗΠΑ και γι' αυτό τους ευχαριστώ θερμά. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Demosthenes Paragiannis και την σύζυγό του Alice που με φιλοξένησαν στο σπίτι τους κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο Davis, προσφέροντάς μου τα πάντα για μια ευχάριστη διαμονή. Τέλος, είχα την ευκαιρία να συναντήσω τον Dr. H. R. Kaback στο UCLA καθώς και όλη την εργαστηριακή του ομάδα, οι οποίοι ήταν πολύ πρόθυμοι να μου διδάξουν τα μυστικά της έρευνας των μεταφορέων (σχεδόν τρεις δεκαετίες στο συγκεκριμένο εργαστήριο ασχολούνται με τον συμμεταφορέα λακτόζης: H⁺ της *E. coli*, LacY).

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων για τη φιλική τους στάση, καθώς και όλα τα μέλη των εν λόγω εργαστηρίων, από όπου κέρδισα αρκετούς σημαντικούς φίλους.

Συνεργάστηκα με παιδιά από το τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, την Ελένη Βούρβου και τη Σωτηρία Λιμπανοβνού, στα πλαίσια της πτυχιακής τους εργασίας, καθώς και με τον Αλέξανδρο Καλλή στα πλαίσια της μεταπτυχιακής του διατριβής, οι οποίοι συνέβαλαν ουσιαστικά στην εργασία μου και τους ευχαριστώ θερμά.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να αναφερθώ στα μέλη του εργαστηρίου μας, την Υ.Δ. Κατερίνα Καρενά και τον Υ.Δ. Κων/νο Παπακώστα, με τους οποίους είχα άριστη συνεργασία σε όλα τα επίπεδα: τους ευχαριστώ για την αλληλοβοήθεια, το άριστο κλίμα στο εργαστήριο και την ψυχολογική υποστήριξη. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Υ.Δ. Κατερίνα Γεωργοπούλου, με την οποία γνωριζόμαστε σχεδόν μια δεκαετία, από τα φοιτητικά μας χρόνια, και η οποία ήταν πάντα δίπλα μου όταν την είχα ανάγκη είτε επιστημονικά, είτε ψυχολογικά και αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς ανθρώπους για τη ζωή μου, που γνώρισα στα Γιάννενα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υλική και ψυχολογική στήριξη που χωρίς δισταγμό μου προσέφεραν πάντα.

Δεν νοιώθω την ανάγκη να αφιερώσω αυτήν την εργασία στον εαυτό μου, γιατί τελικά εγώ βγαίνω κερδισμένος από τον κόπο που κατέβαλα τόσα χρόνια. Ανταμείβομαι από την επιστημονική γνώση και εμπειρία που απέκτησα, την εμπειρία για τον τρόπο που πρέπει να λειτουργώ και να σκέφτομαι γενικότερα, αλλά και από τους νέους πολύτιμους φίλους που γνώρισα.

Νοιώθω όμως την ανάγκη να αφιερώσω αυτήν τη δουλειά στη μνήμη του πατέρα μου Εμμανουήλ Α. Μερμελέκα (1937-2006), που με προέτρειψε να ασχοληθώ με αυτό το αντικείμενο και με αξιοπρέπεια, επιμονή και πολύ κόπο να το πετύχω. Δυστυχώς, όμως, έφυγε ξαφνικά από τη ζωή βλέποντας το ξεκίνημα μόνο αυτής της προσπάθειας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς	2
1.1.1 Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς	3
1.2 Δομικές-κρυσταλλογραφικές μελέτες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς	6
1.2.1 Κρυσταλλικές δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς δευτερογενούς τύπου	8
1.3 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων	23
1.3.1 Σημασία της μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	23
1.3.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	26
1.3.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 και το μοτίβο «υπογραφή» NAT	31
1.3.3.1 Το μοτίβο «υπογραφή» NAT	38
1.3.3.2 Ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα <i>A. nidulans</i>	39
1.3.3.3 Ο μεταφορέας ξανθίνης YgfO του εντεροβακτηρίου <i>E. coli</i>	43
1.4 Διαμεμβρανική τοπολογία των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2	49
1.4.1 Το πρόβλημα στις προβλέψεις τοπολογίας των μεταφορέων NAT	50
1.5 Στρατηγικές μελέτης της τοπολογίας διαμεμβρανικών μεταφορέων	52
1.5.1 Υπολογιστικά προγράμματα ανάλυσης της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών	54
1.5.2 Πειραματικές προσεγγίσεις μελέτης της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών	56
1.5.2.1 Στρατηγικές σύντηξης γονιδίων (gene fusion analysis)	57
1.5.2.2 Στρατηγικές ελέγχου προσβασιμότητας (accessibility analysis)	61
1.6 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) και Ανάλυση Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (Substituted Cysteine Accessibility Method, SCAM)	65
1.6.1 Αρχές της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης και της μεθόδου SCAM	67
1.6.1.1 Ειδικά –SH-αντιδραστήρια και σήμανση κυστεϊνών	69
1.6.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου SCAM και της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης	76
1.7 Σκοπός της εργασίας	78

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Όργανα	80
2.2 Χημικά αναλώσιμα	82
2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	84
2.4 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	87
2.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)	87
2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)	87
2.4.3 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασυνδυασμός)	93
2.4.4 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων	94
2.4.5 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	95
2.5 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων	96
2.6 Δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assays)	97
2.6.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα	97
2.6.1.1 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα και επίδραση NEM	98
2.6.1.2 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM παρουσία ή απουσία μη ραδιενεργού υποστρώματος (ξανθίνης)	98
2.6.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay) σε μεμβρανικά κυστίδια	99
2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	101
2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών	102
2.8.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	102
2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	102
2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	103
2.8.4 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)	104
2.9 Απεικονιστική ανάλυση του YgfO με μικροσκοπία φθορισμού GFP	105
2.10 Απομόνωση του μεταφορέα YgfO-His₁₀	106
2.10.1 Σε μικρή κλίμακα (10 mL κυτταρική καλλιέργεια)	106
2.10.2 Σε μεγάλη κλίμακα (1L κυτταρική καλλιέργεια)	107
2.11 Τεχνικές δομικού χαρακτηρισμού του YgfO σε διάλυμα απορρυπαντικού	110
2.11.1 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR)	110
2.11.2 Κυκλικός διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)	111

2.11.3 Φθορισμομετρία τρυπτοφανών	111
2.12 Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)	113
2.13 Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών (cysteine accessibility assay)	115
2.13.1 Σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού	115
2.13.2 Σε ακέραια κύτταρα (<i>in vivo</i>)	117
2.13.3 Σε κλάσματα μεμβρανών	118
2.13.4 Επιλογή του κατάλληλου απορρυπαντικού εκχύλισης των μεμβρανικών πρωτεϊνών	119
2.14 <i>In silico</i> αναλύσεις	120

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και αρχικός χαρακτηρισμός του YgfO σε διάλυμα απορρυπαντικού	122
3.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός του YgfO	122
3.1.1.1 Επιλογή μεταφορέα NAT για δοκιμές υπερέκφρασης-απομόνωσης	123
3.1.1.2 Επιλογή στελέχους <i>E. coli</i> για την υπερέκφραση του YgfO-His ₁₀	128
3.1.1.3 Πρόσδιορισμός κατάλληλων συνθηκών για την απομόνωση του YgfO-His ₁₀	130
3.1.2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού: ο YgfO-His ₁₀ έχει υψηλό ποσοστό α-έλικας	134
3.1.3 Φθορισμομετρία τρυπτοφανών: ο YgfO αναγνωρίζει ειδικά ξανθίνη	136
3.1.3.1 Φθορισμομετρία τρυπτοφανών – Φυσικού τύπου YgfO και YgfO/W-less (W73F)	136
3.1.3.2 Επίδραση υποστρωμάτων στη φυσικού τύπου YgfO (single W73)	139
3.1.3.3. Επίδραση υποστρωμάτων και πολικών αντιδραστηρίων στον φυσικού τύπου YgfO	141
3.1.4 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός: ο YgfO-His ₁₀ διατηρεί χαρακτηριστικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής στο μοτίβο-υπογραφή NAT	143
3.2 Τοπολογική οργάνωση του μεταφορέα YgfO	146
3.2.1 Μοντέλο τοπολογίας του YgfO βάσει θεωρητικών αλγορίθμων πρόβλεψης	147
3.2.2 Το C-τελικό άκρο του YgfO είναι προσανατολισμένο προς το κυτταρόπλασμα	151
3.2.3 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης σε κορυφαίες θέσεις των υδρόφιλων-συνδετικών τμημάτων	153
3.2.3.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης	153
3.2.4 Ανάλυση προσβασιμότητας του YgfO σε υδρόφιλα αντιδραστήρια: τα διαμεμβρανικά τμήματα 8-12 δεν εμφανίζουν σαφή τοπολογική διευθέτηση	156

3.3 Ανάλυση προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών του μοτίβου «υπογραφή» της οικογένειας NAT (αλληλουχία 323-333) 159

3.3.1 Η περιοχή του μοτίβου υπογραφή είναι προσβάσιμη από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον 161

3.3.2 Η N325C προστατεύεται από το MTSES⁻ παρουσία υποστρώματος (ξανθίνη) 162

3.3.3 Η ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το MTSES⁻ υπενθυμίζει την περιοδικότητα ευαισθησίας από το *N*-αιθυλμλεϊμίδιο 164

3.4 Σχέσεις δομής-λειτουργίας της περιοχής ανοδικά του μοτίβου-υπογραφή NAT (αλληλουχία 266-314) 168

3.4.1 Μεταλλαξιγένεση τρυπτοφανών - Ενδείξεις για τη δομική- λειτουργική ιδιαιτερότητα της περιοχής Y266-V314 169

3.4.1.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμάτων μοναδικής τρυπτοφάνης 170

3.4.2 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στην περιοχή Y266-V314 173

3.4.2.1 Γενική εικόνα από την ανάλυση των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης 174

3.4.2.2 Εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση στην περιοχή 278-281 (Thr-Ala-Thr-Ala) 178

3.4.2.3 Μεταλλαξιγένεση των Asp-276 και Ile-277 181

3.4.2.4 Ανάλυση της επίδρασης του NEM στα μεταλλάγματα A273C, G275C και S284C 181

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Γενική τοπολογική οργάνωση του μεταφορέα YgfO (XanQ) 186

4.2 Τοπολογική-λειτουργική οργάνωση του μοτίβου-υπογραφή 189

4.3 Ρόλος της περιοχής ανοδικά του μοτίβου (μεταξύ TM8 και TM9a-b) 195

4.4 Ένα θερμόφιλο λειτουργικό ομόλογο του YgfO 202

4.5 Η απομόνωση του YgfO σε καθαρή μορφή ως έναυσμα για περαιτέρω μελέτες 204

5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ 207

6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ 215

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
Avidin-HRP: σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης
BAD: τομέας δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain)
BSA: αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)
C-less ή Cys-less: (περμεάση) ελεύθερη κυστεϊνών
CD: κυκλικός διχρωισμός
DDM: *n*-δωδεκυλο-β-D-μαλτοπυρανοσίδιο (*n*-dodecyl-β,D-maltopyranoside)
DMSO: διμεθυλο-σουλφοξειδίο (dimethyl sulfoxide)
DTT: διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)
EDTA: αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid)
EPR: Electron Paramagnetic Resonance (Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός)
FC-14: Fos – choline 14
GFP: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein)
His₁₀: αλληλουχία 10 καταλοίπων ιστοιδινών
HRP-protein A: πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με υπεροξειδάση ραπανιού (horseradish peroxidase-protein A)
IPTG: ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσίδιο (isopropyl-β,D-thiogalactopyranoside)
KP_i: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου
LacY-epitope: αλληλουχία του C-τελικού 12πεπτιδίου της περμεάσης λακτόζης LacY
lacZ p/o: υποκινητής/χειριστής του οπερονίου της λακτόζης (promoter/operator)
LB: Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (ή Luria Broth)
MTSES: αιθυλο-σουλφονυλ-μεθανοθειοσουλφονικό (άλας νατρίου) [Sodium (2-Sulfonatoethyl)methanethiosulfonate]
MTS-SL: 1-Οξυλ-2,2,5,5-τετραμεθυλο-πυρολινο-αιθυλ-μεθανοθειοσουλφονικό
NAT: Οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (Nucleobase – Ascorbate Transporters)
NCS2: Οικογένεια-2 συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – κατιόντων (Nucleobase – Cation Symporters-2)
NEM: *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (*N*-ethylmaleimide)
OGM: πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide)
PAGE : Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
PMS: μεθοσουλφονικό φαιναζίνιο (phenazine methosulphate)
PVDF: διφθοριούχο πολυ-βινυλιδένιο (polyvinylidene difluoride)
RSO: (κυστίδια) ορθού προσανατολισμού (Right-Side-Out)
SCAM: μέθοδος ελέγχου προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (Substituted Cystein Accessibility Method)
SDS: θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate)
SDSL: Site Directed Spin Labeling
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)
TM: (transmembrane segment) = διαμεμβρανικό τμήμα
W-less ή Trp-less: (περμεάση) ελεύθερη τρυπτοφανών

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

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς

Τα εξωτερικά και εσωτερικά «σύνορα» των κυττάρων σχηματίζονται από τις βιολογικές μεμβράνες, οι οποίες λειτουργούν σαν διαχωριστικές επιφάνειες επιτρέποντας τη διαμερισματοποίηση εντός του ίδιου του κυττάρου αλλά και τον διαχωρισμό του από τα υπόλοιπα κύτταρα. Οι κυτταρικές μεμβράνες δεν αποτελούν αδρανή συστήματα, αλλά λειτουργούν σαν ελεγχόμενοι φραγμοί διαπερατότητας, ρυθμίζοντας την κίνηση των βιομορίων από και προς το εσωτερικό του κυττάρου ή των οργανιδίων που οριοθετούνται στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Για να εκπληρωθεί ο ρόλος των κυτταρικών μεμβρανών είναι απαραίτητη η παρουσία οργανωμένων πρωτεϊνικών συστημάτων στη μεμβράνη, που συγκροτούνται από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε ενσωματωμένες (integral) και σε περιφερικές (peripheral ή extrinsic). Οι ενδομεμβρανικές (ενσωματωμένες) πρωτεΐνες είναι δυνατόν να λειτουργούν σε συνέργεια με τις περιφερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα στα συστήματα των μεμβρανικών υποδοχέων (integral) – πρωτεϊνικών κινασών (peripheral), σε έναν από τους γνωστούς μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης.

Συνοπτικά, οι λειτουργίες που καταλύονται από ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μηχανισμούς μεταγωγής σήματος (signal transduction) και μεταγωγής ενέργειας (energy transduction), όπως είναι: (α) υποδοχείς σημάτων σε μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης, (β) έλεγχος της επικοινωνίας και των αλληλεπιδράσεων του κυττάρου με το περιβάλλον του ή με άλλα κύτταρα, (γ) οξειδοαναγωγικά ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα, (δ) πρόσληψη μικρομορίων που χρησιμοποιούνται ως μεταβολικά ενδιάμεσα, ρύθμιση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ιόντων ή απέκκριση κυτταροτοξικών ουσιών (Alberts *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2005).

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>).

Η μεταφορά μορίων, απλών οργανικών ενώσεων και ιόντων, αποτελεί τη βάση της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος. Την ανάγκη ακριβώς της πρόσληψης και ανακατανομής στον οργανισμό μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα,

νουκλεοτιδικές βάσεις, ιόντα, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές κ.ά, εξασφαλίζουν πολλοί διαφορετικοί εξειδικευμένοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς. Συνολικά, οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών διασφαλίζουν την αξιοποίηση των θρεπτικών πηγών άνθρακα, αζώτου, θείου, φωσφόρου (Diallinas *et al.*, 1998; Abramson *et al.*, 2003), τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης μεταβολιτών (Lemieux *et al.*, 2004; Yemool *et al.*, 2004), τον έλεγχο της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003), του pH και των συνθηκών λειτουργίας ενζυμικών ή άλλων μηχανισμών του κυττάρου, τη ρύθμιση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος και του κύκλου λειτουργίας των νευροδιαβιβαστών, των ορμονών και άλλων διακυτταρικών σημάτων (Yamashita *et al.*, 2005) και την άμυνα του οργανισμού μέσω της ενεργού εκροής φαρμάκων, αντιβιοτικών, αντιικών παραγόντων και τοξινών (Murakami and Yamaguchi, 2003) ή, τέλος, ρύθμιση της ανακατανομής αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι το ασκορβικό και το ουρικό οξύ (Tsukaguchi *et al.*, 1999; Hediger, 2000a,b).

1.1.1 Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς

Για τις πρωτεΐνες μεταφοράς έχει ήδη καθιερωθεί ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας (Transport Commission, TC system, 1999) (<http://www.tcdb.org>) (Saier, 2000; Busch and Saier 2002; Chang *et al.*, 2004, Saier *et al.*, 2006). Σύμφωνα λοιπόν με αυτό το σύστημα (**Εικόνα 1.1**), οι πρωτεΐνες μεταφοράς ταξινομούνται σε **διαύλους** (channels) (**TC1**) και σε **μεταφορείς** (carriers) (**TC2, TC3, TC4**), ενώ κατατάσσονται σε ξεχωριστές κατηγορίες οι μεταφορείς που συμμετέχουν στα συστήματα ροής ηλεκτρονίων (ETS), όπως στην αναπνευστική αλυσίδα (**TC5**), πρωτεΐνες που λειτουργούν σε συνεργασία με άλλους, γνωστούς μεταφορείς (**TC8**) και πιθανοί μεταφορείς που δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (**TC9**).

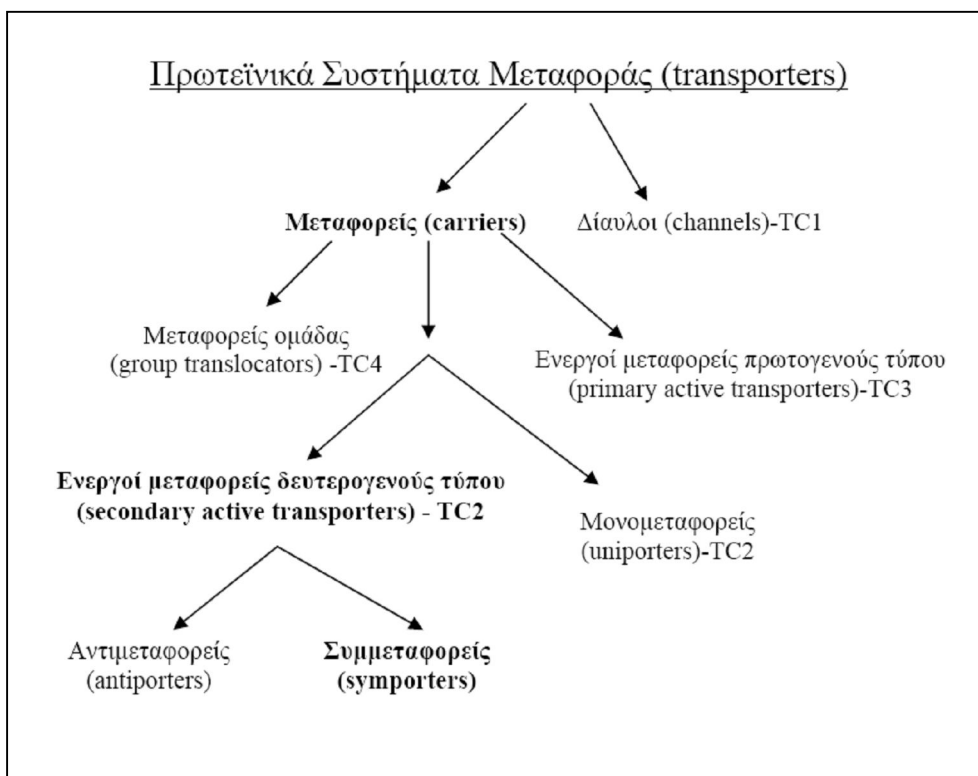
Οι διαύλοι (TC1) επιτελούν πάντα διευκολυνόμενη διάχυση, δηλαδή δεν συσσωρεύουν αλλά απλώς εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις ιόντων ή μικρομορίων εκατέρωθεν της μεμβράνης (equilibrative transport) [π.χ. ο διάυλος K^+ (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2003)] και λειτουργούν με απλό τρόπο, εναλλάσσοντας 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 ενάντια στην διαβάθμιση συγκεντρώσεών τους (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 το ATP, οπότε οι μεταφορείς ονομάζονται πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς **πρωτογενούς τύπου (Primary-TC3 active transporters** [π.χ η αντλία καλίου-νατρίου ή $K^+,Na^+/ATPase$ (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009)] είτε, έμμεσα, από μια «δευτερογενή» πηγή ενέργειας (ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων), έτσι, μιλάμε για πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς **δευτερογενούς τύπου, [Secondary-TC2 active transporters**, π.χ. ο μεταφορέας λακτόζης LacY ή περμεάση λακτόζης (Newman *et al.*, 1981; Viitanen *et al.*, 1986; Abramson *et al.*, 2003; Guan and Kaback, 2006)].

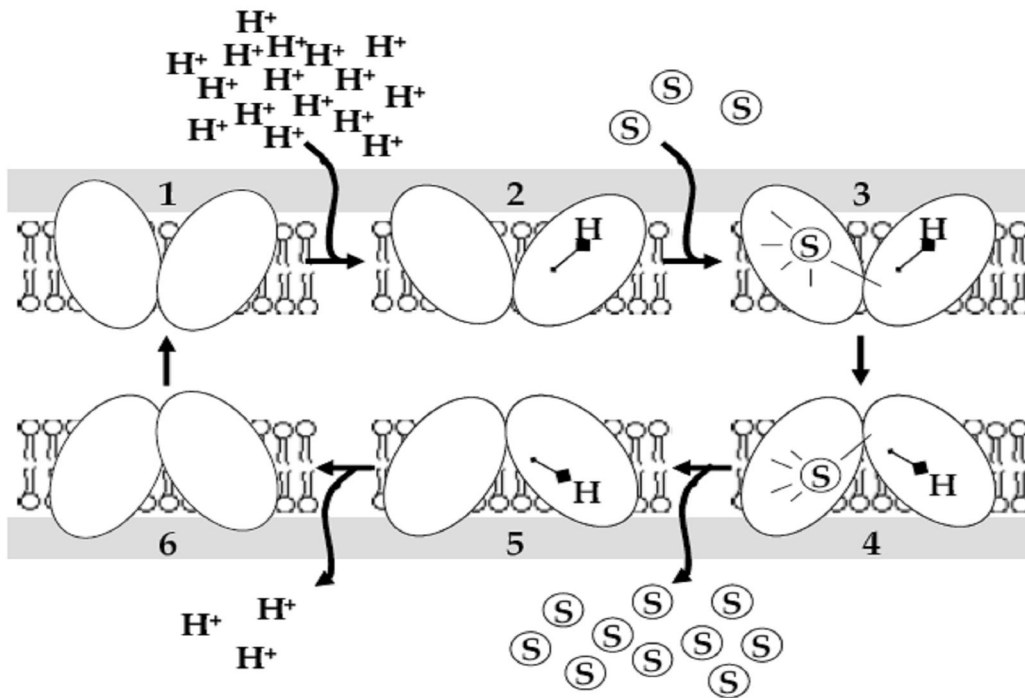
Στην κατηγορία των μεταφορέων δευτερογενούς τύπου κατατάσσονται **μονομεταφορείς** [uniporters, π.χ. μονομεταφορέας γλυκερόλης GlpF της *E. coli* (Sweet *et al.*, 1990) και οι μονομεταφορείς γλυκόζης GLUT1-13 (Joost and Thorens, 2000; Zhao and Keating, 2007)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ενός μόνο είδους μορίου διαμέσου της μεμβράνης, ανεξάρτητα από την κίνηση άλλων ειδών μορίων, επιτελώντας διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion), **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-Peyroula *et al.*, 2003)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς διαμετρικά αντίθετες κατευθύνσεις. Πολλοί μεταφορείς μπορούν να καταλύουν περισσότερες από μια αντιδράσεις (δηλ. συμμεταφορά και αντιμεταφορά), καθώς επίσης και σημειακές μεταλλάξεις 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, σε μια διαδικασία που 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 ενεργού μεταφοράς. Έξι στάδια διαμορφωτικών αλλαγών ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα που εκτελεί ενεργό μεταφορά, εξαρτώμενη από τη διαβάθμιση πρωτονίων (S, υπόστρωμα, H^+ , πρωτόνιο)

1.2 Δομικές-κρυσταλλογραφικές μελέτες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς

Η απομόνωση και καθαρισμός των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς αποτελεί ένα σημείο-κλειδί για τη μελέτη τους. Οι δυσκολίες, όμως, που υπάρχουν για την απομόνωση ενός μεταφορέα σε μεγάλη κλίμακα και, κατ' επέκταση, τη διατήρηση της δομής του σε διαλυτή μορφή είναι πολλές και οφείλονται κυρίως στην πολυπλοκότητα της οργάνωσης αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες, καταρχήν, θα πρέπει να εξαχθούν από τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα χωρίς να αποδιαταχθεί η υδροφοβική και αμφιπαθική τους φύση. Για να ξεπεραστεί αυτή η δυσκολία, είναι απαραίτητη η παρουσία ενός απορρυπαντικού (ή απορρυπαντικού και μίγματος φωσφολιπιδίων) που να επιτρέπει διαλυτοποίηση του μεταφορέα και διατήρηση της λειτουργικής δομής του, όσο αυτό είναι εφικτό, σε αραιό διάλυμα απορρυπαντικού (Guan *et al.*, 2006). Συνήθως χρησιμοποιούνται ήπια απορρυπαντικά, όπως το n-δωδεκυλο-β,D-μαλτοπυρανοσίδιο (DDM) (Seelert *et al.*, 2000; Tlapak-Simmons *et al.*, 1999)

και το Fos-choline-14 (Lewinson *et al.*, 2008; Zeisig *et al.*, 2003). Το DDM είναι το πιο κοινό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται σε κρυσταλλογραφικές μελέτες μεμβρανικών μεταφορέων, προκαρυωτικής προέλευσης (Abramson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Yernool *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005; Weyand *et al.*, 2008; Faham *et al.*, 2008; Sennhauser *et al.*, 2009). Σε *in vitro* πειράματα, μεταφορείς όπως η περμεάση λακτόζης (LacY) έχειδειχθεί ότι διατηρούν τη λειτουργική δομή τους μετά από απομόνωση και διαλυτοποίηση σε DDM, βάσει του ότι διατηρούν την ικανότητα δέσμευσης ειδικών υποστρωμάτων με διαφορές σταθερών δέσμευσης που αντιστοιχούν σε αυτές που προσδιορίζονται *in situ* (Wu *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; Wu and Kaback, 1994; Frillingos *et al.*, 1998). Παράλληλα, μετά την διαλυτοποίηση των απομονωμένων μεταφορέων, μπορεί να επιτευχθεί ανασύσταση της απομονωμένης πρωτεΐνης σε λιποσωμάτια (proteoliposomes). Με την ανασύσταση σε πρωτεολιποσωμάτια μπορεί να γίνει και λειτουργικός έλεγχος, με πειράματα ελέγχου πρόσδεσης υποστρώματος (Quick and Javitch, 2008), ενεργού μεταφοράς μετά από τεχνητή εφαρμογή της κατάλληλης διαβάθμισης ιόντων (Newman *et al.*, 1981; Viitanen *et al.*, 1984; Ryan *et al.*, 2009) ή και αντιδράσεων ανταλλαγής (exchange) ή εκροής (efflux) (Viitanen *et al.*, 1984; Zomot *et al.*, 2007).

Η παραγωγή μεγάλης ποσότητας και καθαρότητας πρωτεΐνης, της τάξης των mg, σε διαλυτή μορφή, παρέχει τη δυνατότητα να εφαρμοστούν δομικές αναλυτικές τεχνικές χαμηλής ή υψηλότερης ευκρίνειας, όπως για παράδειγμα η κρυσταλλογραφία. Με την κρυσταλλογραφία μπορεί να δοθεί η δομή μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφοράς σε υψηλή ανάλυση (high resolution), αλλά και δεδομένα για διαφορετικές διαμορφώσεις (όταν επιτευχθεί ανάλυση μιας σειράς δομών σε διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης ως προς την παρουσία υποστρωμάτων, προσδετών, pH, ή και διαφορετικών μεταλλαγμάτων του ίδιου μεταφορέα, όπως π.χ. έχει γίνει με την διαπεράση λακτόζης LacY και με τον μεταφορέα LeuT_{Ab}, βλ. παρακάτω, 1.2.1), την τοπολογία (με χαρακτηριστική περίπτωση αυτήν του μεταφορέα Glp_{Ph}, για τον οποίο η τοπολογική οργάνωση του C-τελικού ημίσεος αποκαλύφθηκε ουσιαστικά με την κρυσταλλική δομή, βλ. παρακάτω, 1.2.1 και 1.5) και το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος (Abramson *et al.*, 2003). Στη συνέχεια, αυτά τα πολύτιμα στοιχεία σε συνδυασμό και με πειραματικές στρατηγικές ανάλυσης ή υπολογιστικά προγράμματα μπορούν να οδηγήσουν στην ερμηνεία του μηχανισμού λειτουργίας, της ίδιας της πρωτεΐνης ή ομολόγων της (Kaback *et al.*, 2007; Tavoulari and Frillingos, 2008; Forrest *et al.*, 2008; Tavoulari *et al.*, 2009). Σήμερα, λόγω της πολυπλοκότητας και των ιδιαίτερων δομικών χαρακτηριστικών αυτών των πρωτεϊνών, έχουν

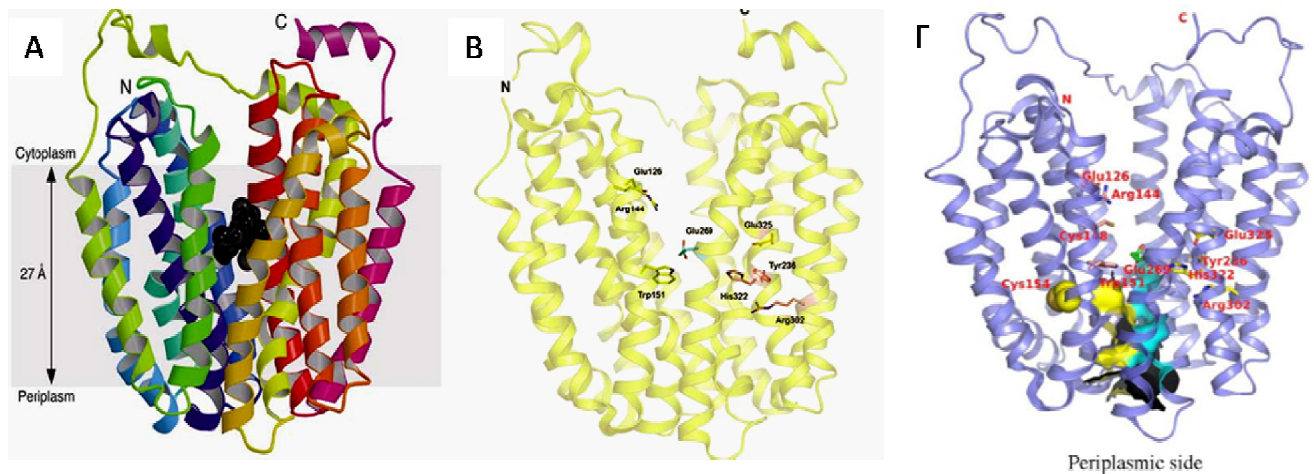
αναλυθεί ελάχιστες δομές. Στη συνέχεια, αναφέρονται οι δομές που έχουν αναλυθεί μέχρι τώρα για πρωτεΐνες μεταφοράς δευτερογενούς τύπου. Οι δομές αυτές προέρχονται από προκαρυωτικά ομόλογα και σε συνδυασμό με μοντελοποίηση χρησιμοποιούνται για τη μελέτη ευκαρυωτικών ομολόγων: για παράδειγμα, η εξαιρετικής ευκρίνειας (1.9 Å) κρυσταλλική δομή του μεταφορέα LeuT από το θερμόφιλο βακτήριο *Aquifex aeolicus*, ομόλογου της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών:Na⁺ (NSS family), χρησιμοποιείται για την μελέτη των ομολόγων της οικογένειας αυτής στον άνθρωπο [π.χ. του μεταφορέα σεροτονίνης, hSERT (Zomot *et al.*, 2007; Forrest *et al.*, 2007; Forrest *et al.*, 2008; Tavoulari *et al.*, 2009)].

1.2.1 Κρυσταλλικές δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς δευτερογενούς τύπου

1) Η διαπεράση της λακτόζης (LacY)

Πρόσφατα δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή της LacY σε ευκρίνεια ανάλυσης 3.5 Å (Abramson *et al.*, 2003). Η δομή αυτή έχει λυθεί παρουσία υποστρώματος (β-D-γαλακτοπυρανοσυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο, TDG) και χρησιμοποιώντας τη μεταλλαγμένη μορφή LacY-C154G (Abramson *et al.*, 2003). Ακόμη πιο πρόσφατα, δημοσιεύθηκε και η δομή της φυσικού τύπου LacY (Guan *et al.*, 2007). Στην πρώτη περίπτωση, επιλέχθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή της περμεάσης (C154G) για την οποία μοριακές βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες είχαν δείξει 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 έχει υψηλή θερμοσταθερότητα και μικρή τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων (Smirnova and Kaback., 2003). Η κρυσταλλική δομή του μορίου εμφανίζει δύο διακριτές δομικές 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): 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 παράλληλη 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 1.3A**). Τα ίδια γενικά δομικά στοιχεία εμφανίζει και η κρυσταλλική δομή της φυσικού τύπου LacY (ευκρίνεια ανάλυσης 3.6 Å) (Guan *et al.*, 2007) (**Εικόνα 1.3Γ**), 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 1.3B**). Παρά ταύτα, 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 (έλικες IV, V και VIII) κατά την 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 μπορεί να επιτευχθούν οι κατάλληλες αλλαγές διαμόρφωσης που απαιτεί ο μηχανισμός (Kaback *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2007).



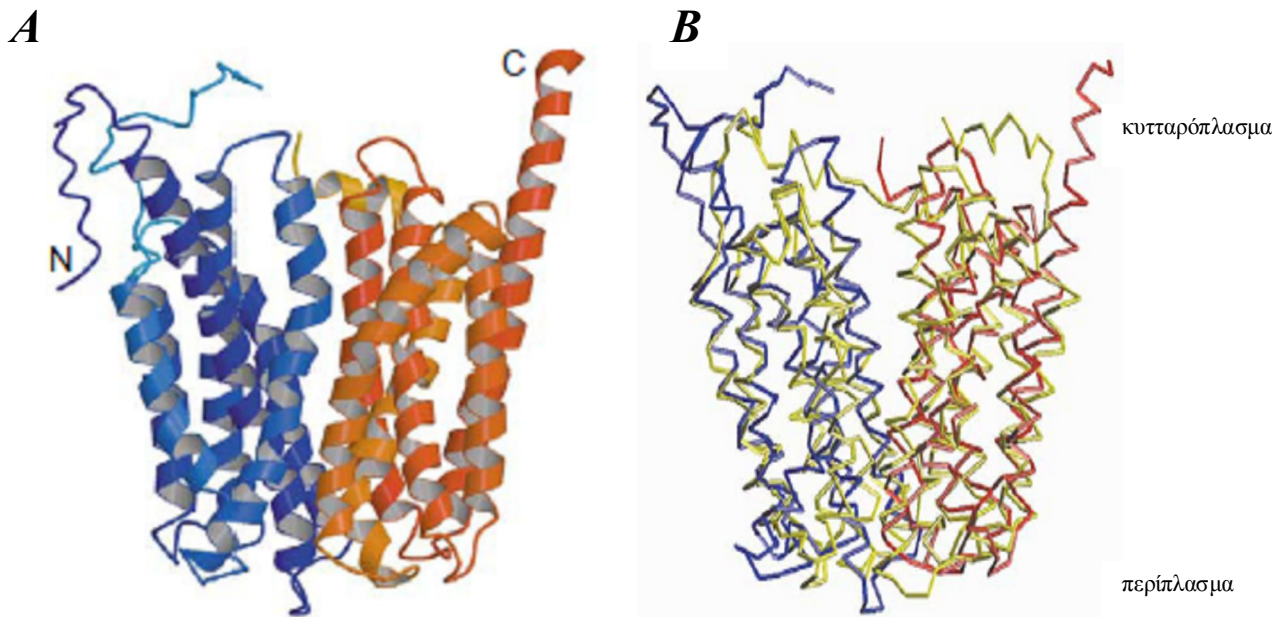
Εικόνα 1.3 A: Η κρυσταλλική δομή της LacY μαζί με υπόστρωμα (TDG), σε όψη παράλληλη προς την μεμβράνη (Abramson *et al.*, 2003). Οι 12 διαμεμβρανικές α -έλικες φαίνονται με διαφορετικό χρώμα η κάθε μια. Το υπόστρωμα TDG φαίνεται προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (με μαύρο χρώμα) το οποίο είναι ανοικτό προς την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.

B: Η κρυσταλλική δομή της LacY χωρίς συνδεδεμένο υπόστρωμα, σε όψη παράλληλη προς την μεμβράνη (Mirza *et al.*, 2006). Οι 12 διαμεμβρανικές α -έλικες εμφανίζονται και πάλι οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές. Μεταξύ της αμινο-τελικής και καρβοξυ-τελικής περιοχής α -ελίκων, δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα. Τα κατάλοιπα που είναι σημαντικά για τη δέσμευση του υποστρώματος (Glu126, Arg144 και Trp151) φαίνονται με κίτρινο χρώμα, ενώ αυτά που εμπλέκονται στη μετακίνηση του H^+ (Tyr236, Arg302, His322 και Glu325) φαίνονται με ροζ χρώμα. Το κατάλοιπο Glu269 που φαίνεται με γαλάζιο χρώμα εμπλέκεται τόσο στη δέσμευση του υποστρώματος όσο και στη μετακίνηση του H^+ .

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

2) Μεταφορέας GlpT

Πρόσφατα, στο ίδιο τεύχος του περιοδικού *Science* που δημοσίευσε την δομή της LacY (Abramson *et al.*, 2003), δημοσιεύθηκε και η κρυσταλλική δομή (σε ευκρίνεια 3.3 Å) του αντιμεταφορέα τριφωσφορικής γλυκερόλης/ανόργανου φωσφόρου GlpT της *E. coli* (Huang *et al.*, 2003), ενός ακόμη μέλους της Μείζονος Υπεροικογένειας Δευκολυνόμενης Μεταφοράς (MFS) (Saier, 2000). Η κρυσταλλική αυτή δομή (**Εικόνα 1.4A**) αφορά μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα και παρουσιάζει δύο δομικά παρόμοιες περιοχές (domains) που συνδέονται μεταξύ τους με ένα μεγάλο υδρόφιλο συνδετικό τμήμα. Οι δύο περιοχές παρουσιάζουν συμμετρία και αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα α-ελίκων η κάθε μία, όπως ακριβώς και στην LacY (Abramson *et al.*, 2003) (**Εικόνα 1.4B**). Στο κέντρο των περιοχών αυτών δημιουργείται το ενεργό κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Συνολικά, η δομή της GlpT είναι πολύ παρόμοια με αυτήν της LacY που ανήκει στην ίδια υπεριογένεια (Abramson *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2004).

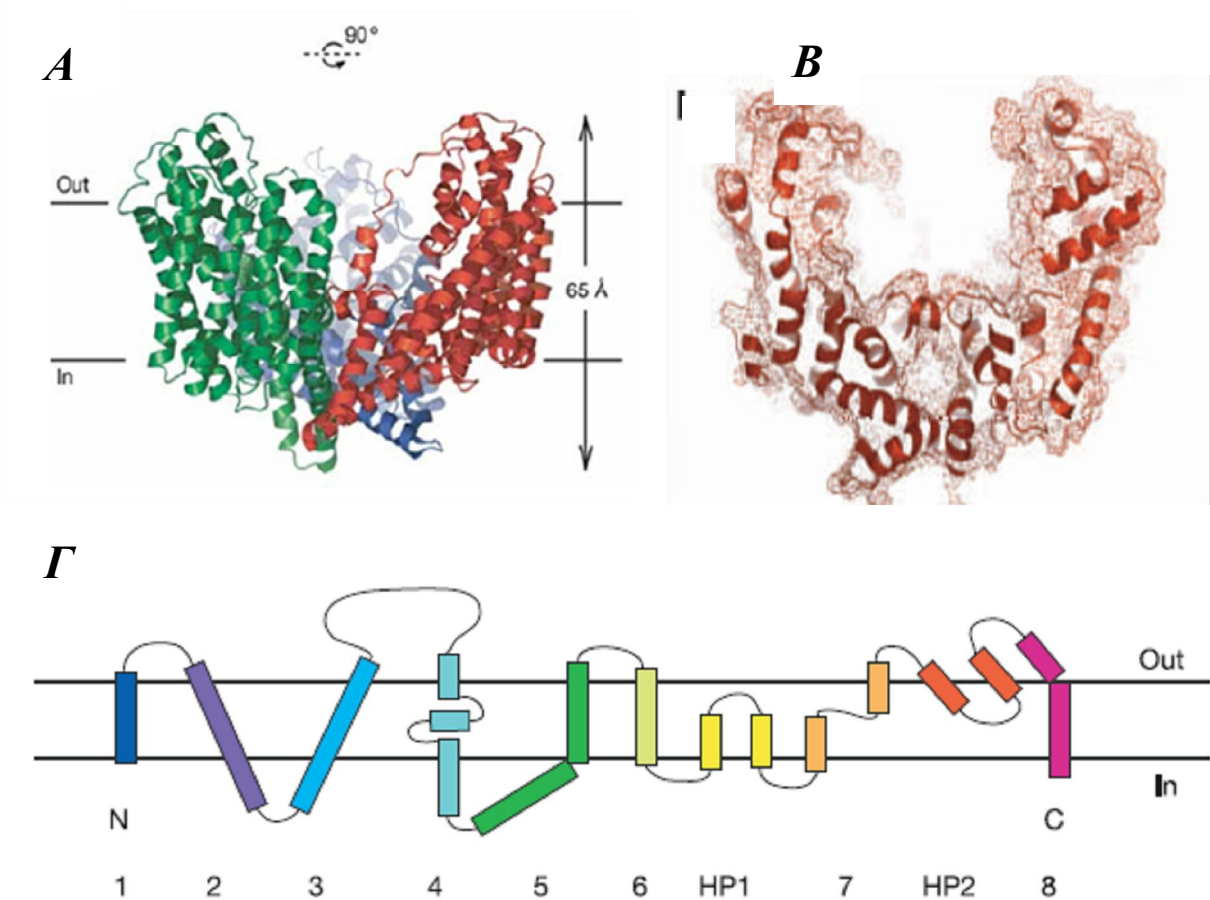


Εικόνα 1.4 **A.** Μεταφορέας GlpT της *E. coli* (Lemieux *et al.*, 2004): Οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες εμφανίζονται και πάλι οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές. Μεταξύ της N-τελικής (μπλε χρώμα) και C-τελικής περιοχής α-ελίκων (κόκκινο χρώμα), δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα, όπως και για την διαπεράση της λακτόζης. **B.** Σύγκριση των δομών της LacY (κίτρινο χρώμα) και του GlpT (μπλε και κόκκινο χρώμα, για το N-τελικό και το C-τελικό άκρο αντίστοιχα).

3) Μεταφορέας Glt_{Ph}

Οι μεταφορείς γλουταμικού (excitatory amino acid transporters EAAT1-5 στον άνθρωπο) είναι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που καταλύουν την πρόσληψη γλουταμικού από τη σύναψη στον ενδοκυτταρικό χώρο του προσυναπτικού νευρώνα ή των νευρογλοιακών κυττάρων, χρησιμοποιώντας προϋπάρχουσες διαβαθμίσεις ιόντων (Slotboom *et al.*, 1999). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι μεταφορείς γλουταμικού είναι ουσιώδεις για την φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία και εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως, επιληψία και νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η εγκεφαλική ισχαιμία (Camacho and Massieu, 2006). Πρόσφατα δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή, σε ευκρίνεια 3.2 Å, ενός ομολόγου των ευκαρυωτικών μεταφορέων γλουταμικού (Glt_{Ph}) από το υπερθερμόφιλο αρχαίο *Pyrococcus horikoshii* (Yernool *et al.*, 2004) (**Εικόνα 1.5A**). Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του Glt_{Ph} με πολλαπλές σημειακές μεταλλάξεις και 7 κατάλοιπα ιστιδινών σε μη-συντηρημένες θέσεις των προβλεπόμενων συνδετικών τμημάτων και η οποία μπορεί να εκφραστεί ετερόλογα στη μεμβράνη της *E. coli* K-12 σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η δομή δείχνει ότι ο μεταφορέας Glt_{Ph} είναι ένα ομοτμερές σε μορφή αβαθούς λεκάνης (basin) με ένα υδρόφιλο κοιλώμα 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: κάθε μια από τις θέσεις δέσμησης διαμορφώνεται από δύο φουρκέτες στο μέσον διαμεμβρανικών ελίκων, που προσεγγίζονται από αντίθετες θέσεις της μεμβράνης. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η μεταφορά του γλουταμικού επιτυγχάνεται με κινήσεις των φουρκετών αυτών, οι οποίες επιτρέπουν εναλλακτική προσβασιμότητα του κέντρου δέσμησης από τις δύο πλευρές της μεμβράνης. Επίσης, προτείνουν ότι, 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 (Agiza *et al.*, 1997; Kavanaugh, 2004) (**Εικόνα 1.5B**). Πρόσφατα έγινε λειτουργική ανάλυση του μεταφορέα Glt_{Ph}, μελετώντας απομονωμένη πρωτεΐνη που είχε ανασυσταθεί σε λιποσωμάτια, η οποία υποδεικνύει ότι ο μεταφορέας Glt_{Ph} είναι μεταφορέας με υψηλή εξειδίκευση για ασπαρτικό με K_m της τάξης των ~120 nM και παράλληλα η λειτουργία του εξαρτάται από την παρουσία Na⁺ (Ryan *et al.*, 2009), παρά το γεγονός ότι αρχικά είχε προταθεί ότι πρόκειται για μεταφορέα γλουταμικού (Raunser *et al.*, 2006). Τέλος, ένα σημαντικό αποτέλεσμα που έχει προκύψει από

την κρυσταλλική μελέτη του Glt_{Ph} είναι ότι διαλευκάνθηκε η τοπολογική οργάνωση του C-τελικού ημίσεος του μορίου, για την οποία οι αλγόριθμοι πρόβλεψης και τα αρχικά βιοχημικά πειράματα (βλ. κεφάλαιο 1.5) 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) (Yernool *et al.*, 2004) (Εικόνα 1.5Γ).



Εικόνα 1.5 **A.** Μεταφορέας Glt_{Ph} του *Pyrococcus horikoshii* (Yernool *et al.*, 2004). Η κρυσταλλική δομή δείχνει ένα τριμερές σε μορφή αβαθούς λεκάνης με ένα υδρόφιλο κοίλωμα ανοικτό προς την εξωκυτταρική πλευρά στον υδατικό διαλύτη. Στο κατώτατο όριο του ανοικτού αυτού κοιλώματος δημιουργούνται τρεις ανεξάρτητες θέσεις δέσμησης υποστρώματος (binding sites). **B.** Μεταξύ των τριών υπομονάδων σχηματίζεται ένας διαμεμβρανικός πόρος που θα μπορούσε να λειτουργήσει ανεξάρτητα ως διάλυος ιόντων Cl^- (Kavanaugh, 2004). **Γ.** Η δευτεροταγής δομή του μεταφορέα Glt_{Ph} , όπως προέκυψε μετά την λύση της κρυσταλλικής δομής, όπου φαίνονται οι δύο σημαντικές επανεισερχόμενες θηλειές, HP1 και HP2.

4) Μεταφορέας LeuT_{Aa}

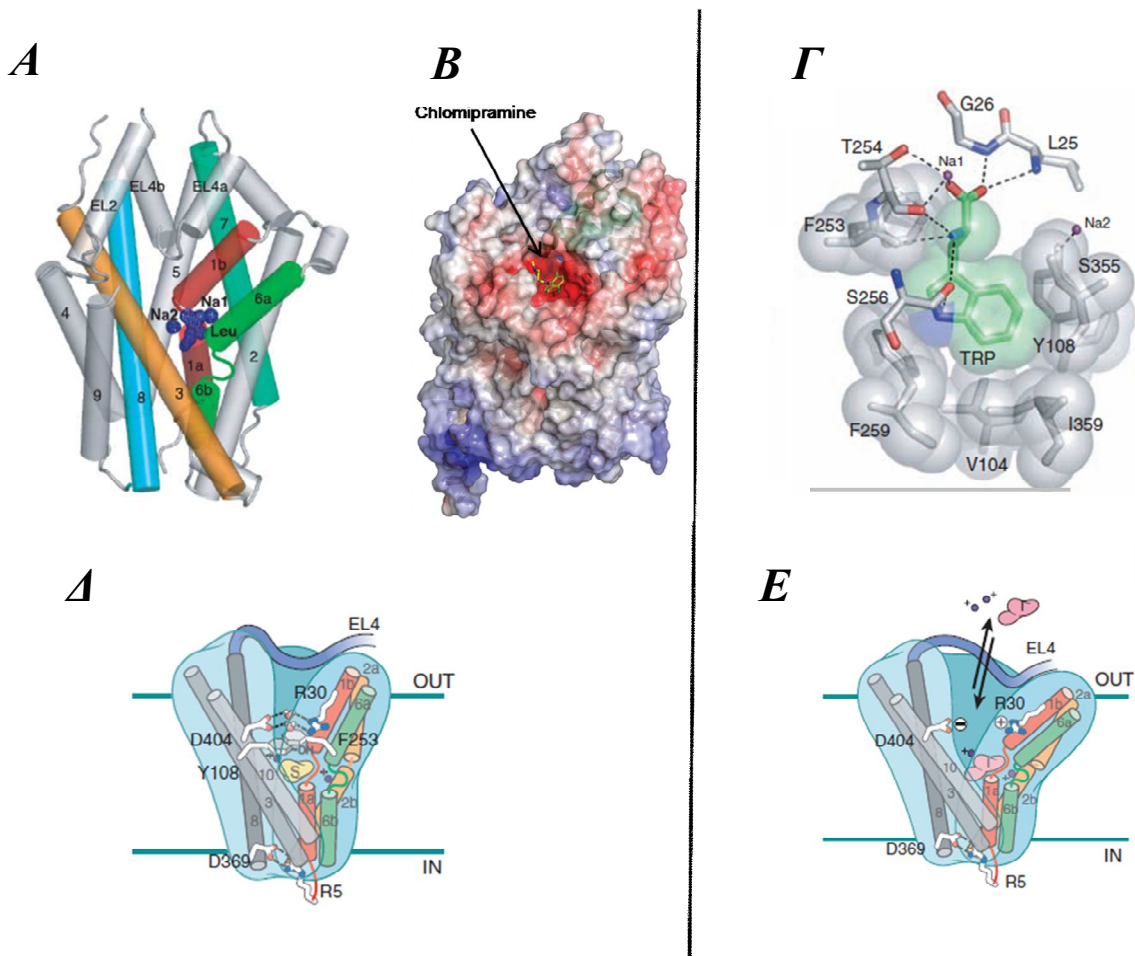
Μια ακόμη κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα δευτερογενούς τύπου αφορά έναν μεταφορέα της οικογένειας συµμεταφορέων νευροδιαβιβαστών/νατρίου (NSS). Οι μεταφορείς NSS στον άνθρωπο, όπως για παράδειγμα ο μεταφορέας σεροτονίνης SERT, τερματίζουν την μετάδοση σήματος στη σύναψη χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικές διαβαθμίσεις, με τις οποίες επιτρέπουν την επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών από τη σύναψη στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων και της νευρογλοίας. Οι μεταφορείς αυτοί 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 μάλιστα σε εξαιρετικά υψηλή ευκρίνεια (1.9 Å), ασυνήθιστη για πρωτεΐνες αυτού του τύπου, αφορά ένα βακτηριακό ομόλογο από το θερμόφιλο 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 1.6Α**). Πιο πρόσφατα, παρουσιάσθηκαν και άλλες κρυσταλλικές δομές του ίδιου ομολόγου (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 νεώτερων αυτών δομών είναι εντόνως αμφισβητούμενη γιατί τα φάρμακα που δεσμεύονται και αναστέλλουν τους ομολόγους μεταφορείς νευροδιαβιβαστών στον άνθρωπο, όπως π.χ. τον hSERT (Tavoulari *et al.*, 2009), δεν αναμένεται να έχουν κάποιον αντίστοιχο ρόλο στα βακτηριακά συστήματα μεταφορέων (Rudnick, 2007) (**Εικόνα 1.6Β**).

Συνολικά, και οι 6 ανωτέρω κρυσταλλικές δομές του μεταφορέα LeuT_{Aa} παρουσιάζουν την ίδια γενική εικόνα: συγκεκριμένα, 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 και, μάλιστα, σε ανεστραμμένη διεύθετηση (inverted repeat) (Εικόνα 1.6ΣΤ) (Forrest *et al.*, 2008). Το υπόστρωμα και τα δύο ιόντα νατρίου εμφανίζονται προσδεδεμένα εντός του πυρήνα (core)

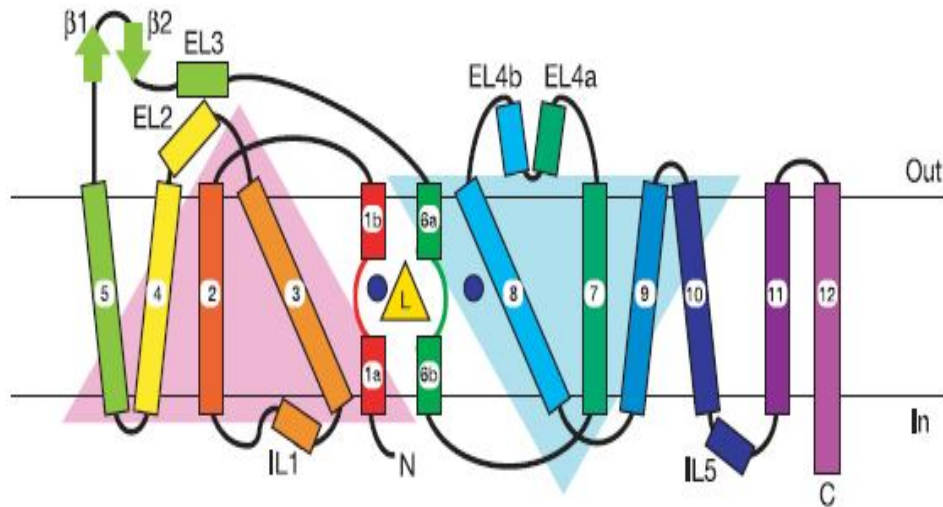
της πρωτεΐνης, στο μέσον της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, σε μια αποκλεισμένη θέση δέσμησης όπου απουσιάζουν μόρια ύδατος. Το κρυσταλλωμένο πρωτεϊνικό μόριο εμφανίζεται ως ομοδιμερές, με δύο τέτοιες θέσεις δέσμησης (Εικόνα 1.6Α). Οι θέσεις δέσμησης της λευκίνης και των ιόντων Na^+ καθορίζονται από μερικώς αποδιπλωμένες α -έλικες, με τα άτομα της πεπτιδικής αλυσίδας και τα δίπολα των ελίκων να έχουν κεντρικό ρόλο στην δέσμηση των υποστρωμάτων αυτών. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι δομές παρουσιάζουν το LeuT_{Aa} σε μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι «κλειστή» και το υπόστρωμα «παγιδευμένο» στο κέντρο δέσμησης (substrate occluded state) (Εικόνα 1.6Δ). Ωστόσο, μια ακόμη κρυσταλλική δομή του LeuT_{Aa} δημοσιεύθηκε πρόσφατα (Singh *et al.*, 2008), η οποία διαφέρει από όλες 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 1.6Γ,Ε). Κεντρικό ρόλο στην δέσμηση υποστρώματος και στις 7 δομές που έχουν παρουσιασθεί έως σήμερα φαίνεται να έχουν δύο ενδιάμεσες ενδομεμβρικές θηλειές που σχηματίζονται στο κέντρο των διαμεμβρανικών τμημάτων 1 και 6 διακόπτοντας τη συνέχεια των α -ελίκων στα τμήματα αυτά (1a + 1b, 6a + 6b): αν και το αποτέλεσμα αυτό είχε διαφανεί από προγενέστερες βιοχημικές μελέτες με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης (βλ. κεφάλαιο 1.6), η ακριβής δευτεροταγής δομή και τοπολογία του LeuT_{Aa} δεν δόθηκε παρά μόνον μετά την επίλυση των κρυσταλλικών δομών (Εικόνα 1.6ΣΤ).

Αν και οι λειτουργικές ιδιότητες του υπερθερμόφιλου ομολόγου LeuT_{Aa} δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως [π.χ. ως προς το υπόστρωμα που μεταφέρει: η πρώτη κρυσταλλική δομή είχε λυθεί παρουσία λευκίνης, που είναι ασθενές υπόστρωμα (Yamashita *et al.*, 2005), ενώ, κατά τη διάρκεια άλλων μελετών, αποκαλύφθηκε ότι μεταφέρει κυρίως αλανίνη (Singh *et al.*, 2007)], η σημασία της επίλυσης της δομής του σε πολύ μεγάλη ευκρίνεια ανάλυσης (1.45-1.9 Å) ήταν καταλυτική για τη μελέτη των γνωστών ομολόγων του μεταφορέων νευροδιαβιβαστών. Πράγματι, η κρυσταλλική δομή του LeuT_{Aa} έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα 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): από τα σημαντικά στοιχεία για τους μεταφορείς αυτούς, τα οποία ερευνήθηκαν μετά την παρουσίαση της δομής του LeuT_{Aa} , με συνδυασμό βιοχημείας και βιοπληροφορικής, είναι η ανάλυση ενός κέντρου δέσμησης ιόντων Cl^- , το οποίο χρησιμοποιούν μόνο τα ευκαρυωτικά και όχι τα προκαρυωτικά ομόλογα NSS (Zomot *et al.*,

2007; Forrest *et al.*, 2007), η διερεύνηση του τρόπου δέσμησης και του μηχανισμού αναστολής μιας σειράς γνωστών φαρμάκων που έχουν ως στόχους του μεταφορείς αυτούς, π.χ. imipramine, ibogaine, Prozac (Tavoulari *et al.*, 2009), και η παρουσίαση νέων στοιχείων για την κατανόηση του μηχανισμού της εναλλασσόμενης πρόσβασης του κέντρου δέσμησης (alternate access), μέσω του συντονισμού ελίκων που μετατοπίζονται κατά τις εναλλαγές διαμόρφωσης (rocking bundle) και ελίκων που παραμένουν στην ίδια θέση (scaffold) (Forrest *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.6 **A.** Μεταφορέας LeuT_{Aa} του *Aquifex aeolicus* με την παρουσία λευκίνης (Yamashita *et al.*, 2005), **(B)** με την παρουσία του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου chlomiipramine (Singh *et al.*, 2007), **(Γ)** με την παρουσία τρυπτοφάνης (Singh *et al.*, 2008). **Δ.** Σχηματική απεικόνιση του κέντρου δέσμησης του LeuT_{Aa}, με διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το κυτταρόπλασμα και το υπόστρωμα (λευκίνη) «αποκλεισμένο» (Yamashita *et al.*, 2005), **Ε.** Σχηματική απεικόνιση του κέντρου δέσμησης του LeuT_{Aa}, με διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το εξωτερικό και το υπόστρωμα (τρυπτοφάνη) προσβάσιμο από το εξωτερικό περιβάλλον (Singh *et al.*, 2008).

ΣΤ

Εικόνα 1.6. ΣΤ. Σχηματική απεικόνιση δευτεροταγούς δομής και τοπολογική οργάνωση του LeuT_{La}, όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρία των δύο τμημάτων (TMs 1-5 και TMs 6-10), με σκιασμένα τρίγωνα (ροζ και γαλάζιο) (Yamashita *et al.*, 2005).

5) Μεταφορέας vSGLT

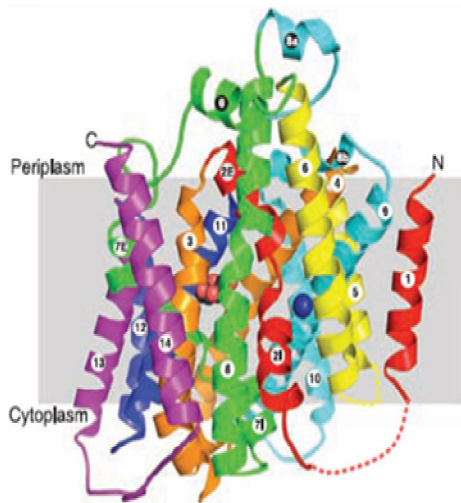
Παράλληλα έγινε γνωστή η κρυσταλλική δομή ενός μέλους της οικογένειας συμμεταφορέων υποστρώματος και ιόντων νατρίου (Solute:Sodium Symporters, SSS family), του συμμεταφορέα γαλακτόζης/γλυκόζης:Na⁺ από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Vibrio parahaemolyticus*, vSGLT (*Vibrio sodium-glucose transporter*) (Faham *et al.*, 2008) (**Εικόνα 1.7A**). Η οικογένεια των μεταφορέων SSS περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συμμεταφέρουν Na⁺ με σάκχαρα, αμινοξέα, ιόντα ή βιταμίνες. Μέλη αυτής της οικογένειας είναι σημαντικά για τη φυσιολογία του ανθρώπου όπως οι συμμεταφορείς Na⁺:γλυκόζης/γαλακτόζης (hSGLT1, hSGLT2), που ελέγχουν την πρόσληψη γλυκόζης από το εντερικό επιθήλιο ενώ δυσλειτουργία του hSGLT1 συσχετίζεται με σύνδρομο δυσαπορρόφησης γλυκόζης/γαλακτόζης (Loo *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2007). Η ανάλυση της δομής του vSGLT είναι στα 3.0 Å και η πρωτεΐνη εμφανίζεται να αποτελείται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα με διαμόρφωση 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 (core) αποκλεισμένο από το εξωτερικό περιβάλλον (**Εικόνα 1.7A1**) (Faham *et al.*, 2008). Η δομή αυτή παρουσιάζει ομοιότητες με τη δομή του LeuT, την ύπαρξη δηλαδή, των δύο δομικά ομόλογων

μονάδων ανεστραμμένης οργάνωσης (inverted repeats) (TM 2-6 και TM 7-11) (**Εικόνα 1.7A2**), παρά το γεγονός ότι πρόκειται για διαφορετικές οικογένειες μεταφορέων.

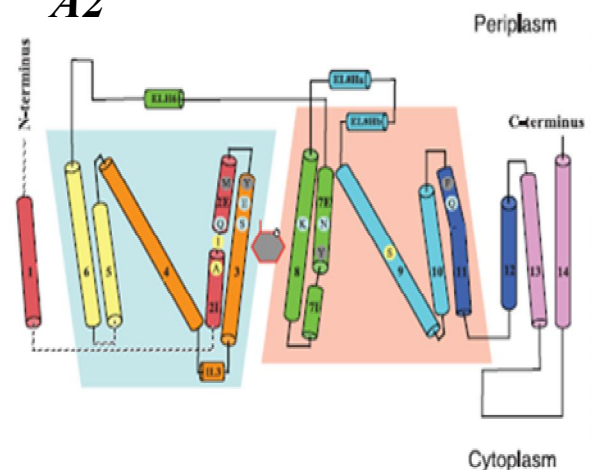
6) Μεταφορέας Mph1

Τελευταία, δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή ενός μέλους της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NCS1 (Nucleobase:Cation Symporter 1 family) (Weyand *et al.*, 2008) (**Εικόνα 1.7B**). Πρόκειται για τον μεταφορέα Mph1 από το *Microbacterium liquefaciens*, που είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά ινδολυλο-μεθυλ- και βενζυλ-υδαντοϊνών (indolyl methyl-, benzyl-hydantoin). Η ανάλυση της δομής είναι σε ευκρίνεια (resolution) 2.85 Å και η πρωτεΐνη εμφανίζεται να αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό. Σχηματίζεται ένας πυρήνας από 2 μονάδες των 5 διαμεμβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM1-TM5 και TM6-TM10), με το υπόστρωμα (βενζυλ-υδαντοΐνη) συνδεδεμένο στο κέντρο του πυρήνα αποκλεισμένο από το εξωτερικό περιβάλλον (**Εικόνα 1.7B1**) (Weyand *et al.*, 2008). Η δομή αυτή, επίσης παρουσιάζει την ίδια δομική οργάνωση με τον LeuT και τον vSGLT (τις δύο δομικά ομόλογες μονάδες των 5 ελίκων με ανεστραμμένη ψευδοσυμμετρική οργάνωση) (**Εικόνα 1.7B2**), παρά το γεγονός ότι πρόκειται για διαφορετικές οικογένειες μεταφορέων.

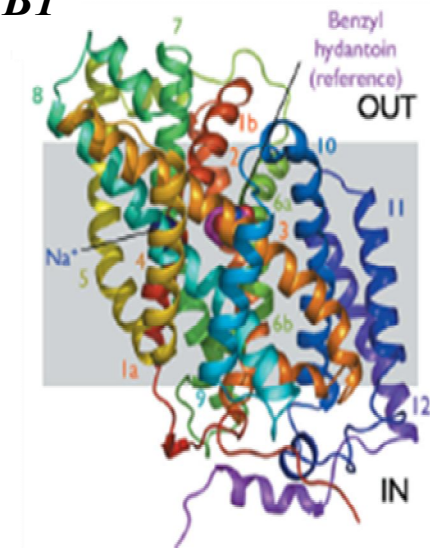
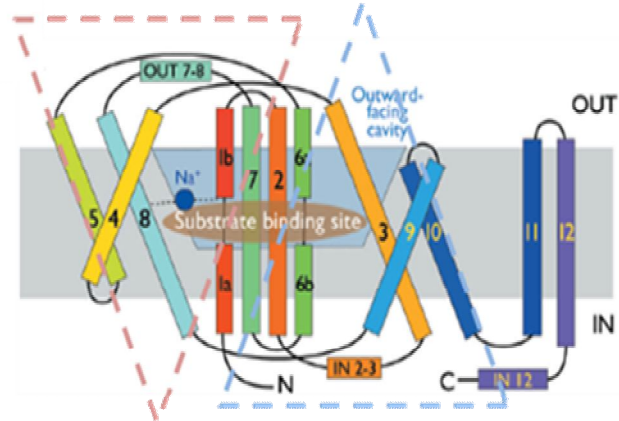
A1



A2



Εικόνα 1.7 A. **A1.** Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα vSGLT, από την οικογένεια SSS, όπου φαίνονται τα δύο διαμεμβρανικά τμήματα που δεν συμμετέχουν στον πυρήνα του μεταφορέα (μοβ χρώμα) και οι δύο μονάδες (TM1-5, γαλάζιο, πράσινο, μπλε και TM 6-10 κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο) που σχηματίζουν τον πυρήνα της πρωτεΐνης (Faham *et al.*, 2008). **A2.** Σχηματική απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής του μεταφορέα vSGLT, όπου φαίνονται οι δύο δομικά ομόλογες μονάδες, TM2-6 και TM7-11, γαλάζιο και ροζ σκιασμένα τρίγωνα αντίστοιχα (Faham *et al.*, 2008).

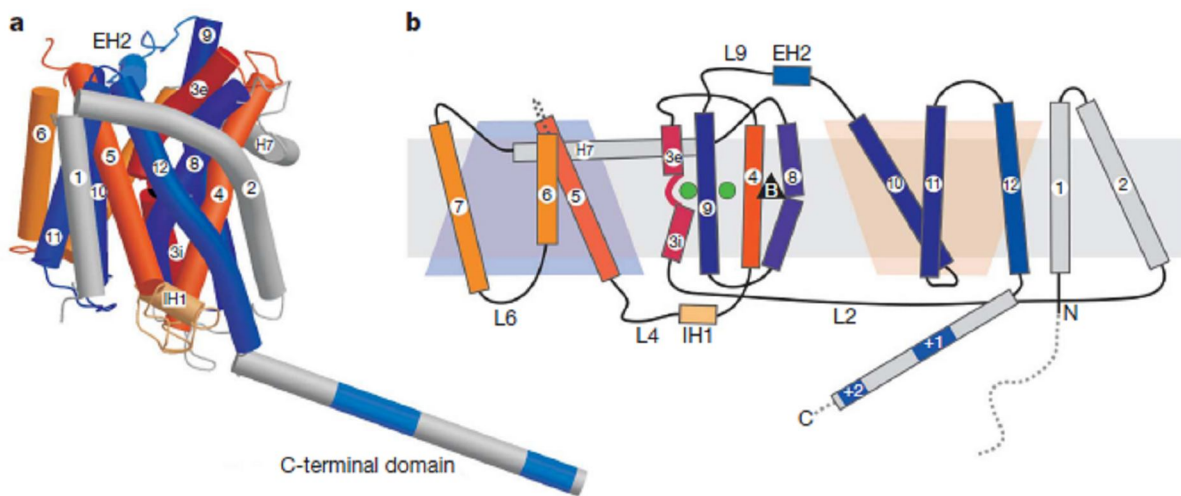
B1**B2**

Εικόνα 1.7 Β. Β1. Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα Mph1, από την οικογένεια NCS1, όπου φαίνονται τα δύο διαμεμβρανικά τμήματα που δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό του πυρήνα του μεταφορέα (λευκό χρώμα) και 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). **Β2.** Σχηματική τοπολογία και δευτεροταγής δομή του μεταφορέα, όπου φαίνονται οι δύο δομικά ομόλογες μονάδες, TM1-5 και TM6-10, με γαλάζιο και ροζ τρίγωνα, αντίστοιχα (Weyand *et al.*, 2008).

7) Ο μεταφορέας BetP

Ο μεταφορέας BetP είναι ένας μεταφορέας που λειτουργεί σαν τριμερές και είναι συμμεταφορέας βεταΐνης:Na⁺ από το *Corynebacterium glutamicum*. Ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων βεταΐνης/χολίνης/καρνιτίνης, που αποτελεί μια οικογένεια μεταφορέων των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται από τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής ωσμωτικής πίεσης και περιλαμβάνει μεταφορείς που είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά ωσμωλυτικών μορίων μέσα στο κύτταρο ώστε να επανέλθει η ισορροπία, ανταποκρινόμενοι στο υπερωσμωτικό στρες. Πρόσφατα, αναλύθηκε η δομή του μονομερούς του μεταφορέα BetP σε ευκρίνεια 3.3 Å (Ressl *et al.*, 2009), η οποία, αν εξαιρέσουμε το εκτενές C-τελικό άκρο, εμφανίζει τον μεταφορέα BetP με κυλινδρικό σχήμα και να αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα και μια α-έλικα με κάμψη (έλικα 7) στο περιπλασματικό μέρος της μεμβράνης (**Εικόνα 1.8α**). Παράλληλα, αποκαλύφθηκε και το κέντρο δέσμευσης της βεταΐνης, στο οποίο συνεισφέρουν τμήματα της 4ης, 8ης και 9ης έλικας, ενώ για τη δέσμευση των ιόντων νατρίου, τμήματα των ελίκων 7 και 3. Τέλος, και η δομή αυτή εμφανίζει ομοιότητα με τις ήδη γνωστες δομές του LeuT, Mph1 και vSGLT, καθώς

περιλαμβάνει 2 διακριτές δομικές μονάδες (TM5-7 και TM10-12) με αντίστροφη ψευδοσυμμετρία κατά το επίπεδο της μεμβράνης (**Εικόνα 1.8b**) (Ressl *et al.*, 2009). Συνολικά, επομένως, τέσσερις κρυσταλλικές δομές διαφορετικών μεταφορέων που έχουν λυθεί έως σήμερα εμφανίζουν το ίδιο δομικό μοτίβο της αντίστροφης ψευδοσυμμετρικής ενδομοριακής οργάνωσης και, μάλιστα, και άλλες, εξελικτικά διακριτές οικογένειες μεταφορέων, όπως η υπεροικογένεια μεταφορέων αμινοξέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων (APC) (Vangelatos *et al.*, 2009), μπορούν να μοντελοποιηθούν με επιτυχία βάσει του δομικού αυτού μοτίβου.

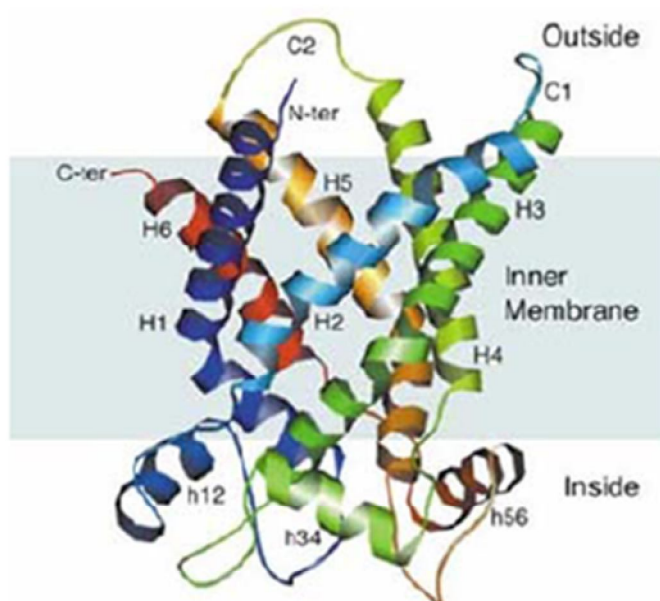


Εικόνα 1.8 a) Η δομή του μονομερούς του μεταφορέα BetP, **b)** σχηματική απεικόνιση δευτεροταγούς δομής, τοπολογική οργάνωση του BetP, όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρία των δύο τμημάτων (TMs 5-7 και TMs 10-12), σκιασμένα τρίγωνα (ροζ και γαλάζιο), καθώς και το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος (μαύρο τρίγωνο= betain) (Ressl *et al.*, 2009).

8) Αντιμεταφορέας ATP/ADP

Πρόσφατα επίσης, έχει δημοσιευθεί η κρυσταλλική δομή του αντιμεταφορέα ATP/ADP του βοός (Rebay-Peyroula *et al.*, 2003), που ανήκει στην μεγάλη οικογένεια μεταφορέων των μιτοχονδρίων (MCF). Η δομή αυτή (**Εικόνα 1.9**) 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 ανοικτή στον διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο (Berg *et al.*, 2005). Ένα ομοδιμερές από δύο μόρια των έξι διαμεμβρανικών α-ελίκων διαμορφώνει μια συμπαγή

διαμεμβρανική περιοχή, η οποία αποκαλύπτει ένα βαθύ κοίλωμα στην επιφάνεια προς τον χώρο μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών. Τα υποστρώματα δεσμεύονται στο κατώτατο όριο του κοιλώματος αυτού, και η μεταφορά τους, κατά τους συγγραφείς, επάγεται από την παροδική μετάπτωση του κοιλώματος σε διάυλο μεταφοράς νουκλεοτιδικών υποστρωμάτων.

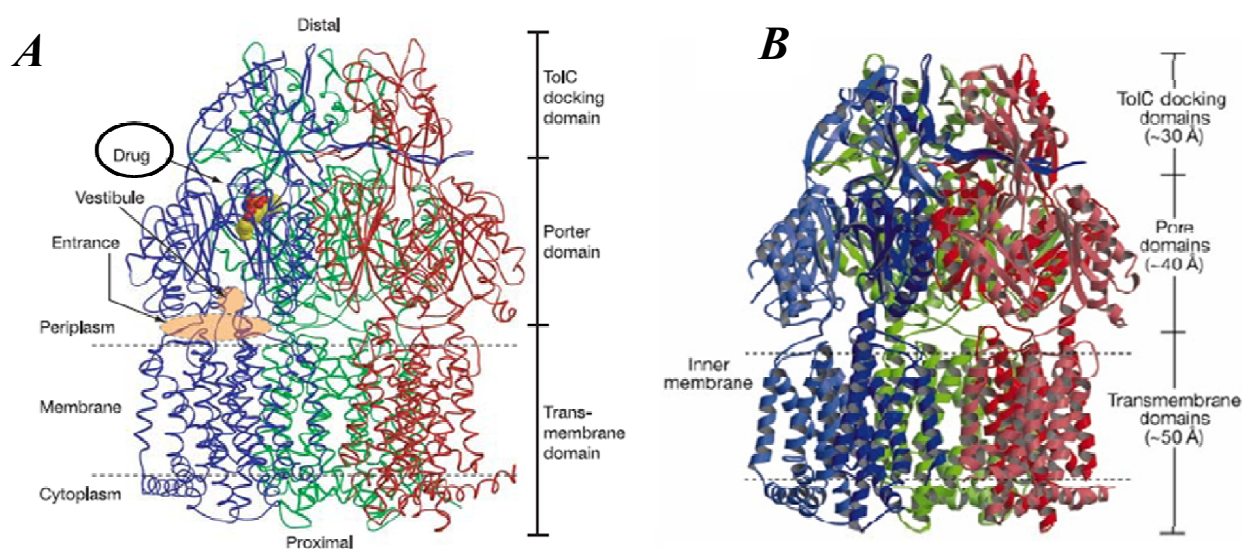


Εικόνα 1.9 Η κρυσταλλική δομή του αντιμεταφορέα ATP/ADP του βοός, που ανήκει στην μεγάλη οικογένεια μεταφορέων των μιτοχονδρίων (MCF) (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).

9) Μεταφορέας AcrB

Ένα ακόμη παράδειγμα μεμβρανικού μεταφορέα που έχει κρυσταλλωθεί με ευκρίνεια 3.5 Å αποτελεί ο μεταφορέας AcrB της *E. coli* (Murakami *et al.*, 2002) και, πιο πρόσφατα, κρυσταλλώθηκε παρουσία υποστρώματος σε ευκρίνεια 2.8 Å (Murakami *et al.*, 2006). 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), και χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική ενέργεια διαβάθμισης πρωτονίων (Thanassi *et al.*, 1997). Η κρυσταλλική δομή παρουσιάζει τρία πρωτομερή AcrB που είναι οργανωμένα ως 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 1.10B**). Η κοιλότητα έχει τρεις προθαλάμους στην πλευρά του κράνους που οδηγούν στο περίπλασμα. Στην διαμεμβρανική περιοχή, κάθε πρωτομερές έχει 12 διαμεμβρανικές α-έλικες. Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής που έγινε με την παρουσία του υποστρώματος, υποδεικνύει ότι το υπόστρωμα συνδέεται σε ένα από τα τρία πρωτομερή και δε φαίνεται να υπάρχει υπόστρωμα στην κεντρική κοιλότητα του συμπλέγματος (**Εικόνα 1.10A**).



Εικόνα 1.10 **A.** Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα AcrB, συνδεδεμένος με υπόστρωμα, όπου φαίνεται ο σχηματισμός του ως τριμερές και η θέση όπου προσδένεται το υπόστρωμα (Murakami *et al.*, 2006). **B.** Η δομή του AcrB χωρίς την παρουσία υποστρώματος η οποία είναι εντελώς όμοια με αυτή που αναλύθηκε με την παρουσία υποστρώματος αναδεικνύοντας την εγκυρότητα της δεύτερης (Murakami *et al.*, 2002).

Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές των μεταφορέων ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου προέρχονται, κατά συντριπτική πλειοψηφία, από προκαρυωτικά ομόλογα, από βακτήρια (LacY, GlpT, LeuT_{Aa}, vSGLT, Mph1, BetP, AcrB) ή αρχαία (Glt_{Ph}), και συχνά από θερμοφιλά ή υπερθερμοφιλά ομόλογα (LeuT_{Aa} Glt_{Ph}) ή από θερμοσταθερά μεταλλάγματα (LacY-C154G), σε μερικές περιπτώσεις, μάλιστα, χωρίς να υπάρχουν επαρκή λειτουργικά δεδομένα για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες που κρυσταλλώθηκαν

(LeuT_{Aa} GltP_b, Mph1), ενώ πληροφορίες από περισσότερες της μιας κρυσταλλογραφικές αναλύσεις για διαφορετικές λειτουργικές συνθήκες (π.χ. με και χωρίς υπόστρωμα ή αναστολείς) και/ή διαφορετικές διαμορφώσεις του μορίου, συνδυασμένες με επαρκή ανάλυση μεταλλαξιγένεσης και βιοχημικών μελετών, υπάρχουν σε δύο μόνο περιπτώσεις (LacY, LeuT_{Aa}). Όπως φάνηκε, η ανάλυση αυτών, αλλά και άλλων κρυσταλλικών δομών που θα έρθουν στο μέλλον, ρίχνει φως σε σημαντικά στοιχεία του μηχανισμού και των σχέσεων δομής-λειτουργίας των πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς και επιτρέπει ορθολογικότερο σχεδιασμό αναλύσεων μεταλλαξιγένεσης για την κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων περιοχών του μορίου. Από την άλλη πλευρά, όμως, δεν αναιρεί σε καμία περίπτωση την αξία των προγενέστερων βιοχημικών-βιοφυσικών αναλύσεων, αλλά την αναδεικνύει ακόμη περισσότερο (Kaback *et al.*, 2007; Guan and Kaback, 2006).

1.3 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Η μεταφορά πουρινών και πυριμιδινών αποτελεί μια βασική βιολογική διεργασία τόσο για τους προκαρυωτικούς όσο και για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πρόσφατες 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). Παρόμοια βιολογικά συστήματα μεταφοράς είναι πλέον γνωστό ότι υπάρχουν στα περισσότερα είδη οργανισμών που περιλαμβάνουν 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.

Στη συνέχεια εξετάζεται η σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων για τους οργανισμούς και κατ' επέκταση η σημασία της μελέτης των συστημάτων μεταφοράς αυτών των μορίων στα κύτταρα. Παράλληλα, αναφέρονται οι διάφορες οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων, με μεγαλύτερη έμφαση στην οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT/NCS2 family) στην οποία ανήκει ο μεταφορέας YgfO που μελετάται στην παρούσα διατριβή. Παρά το γεγονός ότι, σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ταξινόμησης (TC) (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>) (Saier, 2000), στην οικογένεια αυτή [<http://www.tcdb.org/tcdb/>, TC2.A.40 (NCS2)], έχουν καταταχθεί πολλές πιθανές πρωτεΐνες, ελάχιστες είναι αυτές που έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί (βλ. 1.3.3), με αποτέλεσμα να παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι οι μηχανισμοί λειτουργίας τους ή και ο φυσιολογικός τους ρόλος.

1.3.1 Σημασία της μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Οι νουκλεοτιδικές βάσεις έχουν κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση όλων των κυττάρων. Εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες της ζωής σε όλους τους οργανισμούς, κυρίως διότι αποτελούν απαραίτητα συστατικά για τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το ενεργειακό νόμισμα ελεύθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα, είναι

ένα νουκλεοτίδιο που περιέχει την πουρίνη αδερίνη. Παράγωγα νουκλεοτιδίων συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η UDP-γλυκόζη στη σύνθεση του γλυκογόνου. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) και η κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP), αποτελούν «αγγελιοφόρους» που μεταβιβάζουν σήματα τόσο εντός όσο και μεταξύ των κυττάρων (Berg *et al.*, 2005). Η βιοχημεία των νουκλεοτιδικών βάσεων παίζει κεντρικό ρόλο και στην εξέλιξη των φυτών. Εκτός από τη σύνθεση του DNA και RNA σε όλους τους φυτικούς οργανισμούς, ιδιαίτερα 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). Επίσης, από τις νουκλεοτιδικές βάσεις παράγονται άλλες ενώσεις όπως κυτοκίνινες, καφεΐνη και αλκαλοειδή, ενώ παράλληλα, η αδερίνη, γουανίνη, υποξανθίνη και ξανθίνη μπορούν να αποτελέσουν και μοναδικές πηγές αζώτου για το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Vogels and van der Drift, 1976). Τέλος, στα θηλαστικά, η αδερίνη, γουανίνη, και η υποξανθίνη οδηγούνται στα μονοπάτια περίσωσης πουρινών για την παραγωγή φωσφορυλιωμένων ενώσεων υψηλής ενέργειας (ATP, GTP) και για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ή οξειδώνονται καταβολικά σε ξανθίνη ή ουρικό οξύ ή ουρεΐδες (Fox and Kelley, 1978). Το ουρικό οξύ, ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, έχει επιπρόσθετη σημασία, όχι μόνο για τη φυσιολογική λειτουργία των νεφρών αλλά και λόγω της ιδιότητάς του να δρά ως αντιοξειδωτικό στον ορό του αίματος (de Koning and Diallinas 2000; Enomoto *et al.*, 2002a, 2002b).

Το γεγονός ότι οι νουκλεοτιδικές βάσεις έχουν τόσο μεγάλη φυσιολογική σημασία για τους οργανισμούς αντανακλάται και στο ότι πολλά δομικά ανάλογά τους χρησιμοποιούνται εκτενώς ως αντιμικροβιακά, αντιϊκά και αντικαρκινικά φάρμακα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντικαρκινικού φαρμάκου είναι η 5-φθορουρακίλη (5-fluorouracil, 5-FU) η οποία αναστέλλει τη λειτουργία ενζύμων που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση πυριμιδινών (Haydon, 2003) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA και, κατά συνέπεια, παρεμπόδιση της ταχείας διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Gibbs *et al.*, 2008), όπου, σε συνδυασμό με χορήγηση οξυπλατίνης, η βιωσιμότητα των ασθενών αυξάνεται εντυπωσιακά (Andre *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2005). Επίσης, η (5-FU) χρησιμοποιείται ως «προφάρμακο» (prodrug) σε πρωτόκολλα

διαγονιδιακής θεραπείας καρκίνου, σε συνδυασμό με την απαμινάση κυτοσίνης (Hwang *et al.*, 2005).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιμικροβιακού φαρμάκου είναι 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). Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας (Berg *et al.*, 2005) και της υπερουριχαιμίας (Rott and Agudelo, 2003; Terkeltaub, 2003; Bieber and Terkeltaub, 2004; Schlesinger, 2004; Pea, 2005; Wortmann, 2005). Εκκινώντας από την δράση αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης, γίνονται προσπάθειες για την παραγωγή συνθετικών πουρινών, με δομική βάση την αλλοπουρινόλη, για πιθανή περαιτέρω εφαρμογή στην 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» (prodrugs) κατά την αντιμετώπιση καρκίνου με γονιδιακή θεραπεία (Rosenberg *et al.*, 2002), όταν χρησιμοποιείται το σύστημα κινάσης της θυμιδίνης (HSVtk) και ερπητοϊού (Altaner, 2008). Η αντιμετώπιση της ασθένειας προέρχεται από το γεγονός ότι καταρχήν τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τη δράση της DNA-πολυμεράσης των καρκινικών κυττάρων και αφετέρου ανταγωνίζονται το νουκλεοτίδιο dGTP κατά τη σύνθεση του DNA, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (Fillat *et al.*, 2003). Μεταξύ των άλλων, έχουν χρησιμοποιηθεί και ως δείκτες αντίστροφης επιλογής (counterselection), για τον αποκλεισμό των περιπτώσεων εκτοπικής (ectopic) ενσωμάτωσης διαγονιδίων, κατά την στρατηγική γονιδιακής στόχευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Lodish *et al.*, 2007).

Ωστόσο, η χρήση αυτών των φαρμάκων δεν έχει βασιστεί σε συστηματική μελέτη των μοριακών μηχανισμών πρόσληψής τους από τα κύτταρα στόχους με αποτέλεσμα μειωμένη απόδοση κατά την κλινική εφαρμογή τους: βασικότερες αιτίες μπορεί να είναι: (α) σοβαρές παρενέργειες λόγω κυτταροτοξικής δράσης σε δευτερογενείς στόχους, (β) μη πρόσληψη από τα κύτταρα-στόχους, (γ) ανεπιθύμητη δευτερογενής επαγωγή ανθεκτικότητας σε κύτταρα-στόχους. Κατά συνέπεια, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αναγνώρισης και πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανακάλυψη νέων, πιο αποτελεσματικών

πρωτοκόλλων θεραπείας (Freeman *et al.*, 1993; Mesnil and Yamasaki 2000; Nicholas *et al.*, 2003).

1.3.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Η φύση της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας αποτελεί εμπόδιο στη διέλευση των νουκλεοτιδικών βάσεων. Η διαμεμβρανική μεταφορά των νουκλεοτιδικών βάσεων επιτυγχάνεται με την παρουσία εξειδικευμένων διαμεμβρανικών μεταφορέων. Μικρός μόνο αριθμός γονιδίων που αφορούν μεταφορείς πουρινών ή/και πυριμιδινών έχει κλωνοποιηθεί και μελετηθεί λεπτομερώς. Συγκεκριμένα, η μεταφορά των νουκλεοτιδικών βάσεων έχει μελετηθεί κατά κύριο λόγο στα βακτήρια των ειδών *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis* (Andersen *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2001; Johansen *et al.*, 2003; Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008), στους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2005, 2006; Paluszynski *et al.*, 2006) και στον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Diallinas 2007; Papageorgiou *et al.*, 2008). Στους περισσότερους μικροοργανισμούς, η μεταβολική αξιοποίηση των πουρινών και των πυριμιδινών πραγματοποιείται με δύο κύριες λειτουργίες. Η μία αφορά τη χρήση εξωγενών βάσεων για τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και η άλλη είναι καταβολική, όπου οι πουρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως πηγές αζώτου (Vogels and van der Drift, 1976; Scazzocchio, 1994). Μελέτες σε φυσιολογικό και γενετικό επίπεδο έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για ειδικούς μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών σε βακτήρια και μύκητες. Επίσης, υπάρχουν στοιχεία ότι είδη Αρχαίων μπορούν να προσλαμβάνουν νουκλεοτιδικές βάσεις από το θρεπτικό τους υλικό (Stuer-Lauridsen and Nygaard, 1998) και ένας μεγάλος αριθμός αλληλουχιών γονιδίων Αρχαίων με άγνωστη λειτουργία παρουσιάζει ομοιότητες με γνωστούς μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων των Βακτηρίων και των Μυκήτων (www.membranetransport.org).

Οι γνωστοί έως σήμερα μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων, καθώς και οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ομολογία με αυτούς, έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις κύριες οικογένειες (Diallinas and Gourmas 2008), ενώ υπάρχουν και δύο ακόμη οικογένειες που εντοπίζονται μόνο σε είδη Φυτών (Desimone *et al.*, 2002). Η κατάταξη έγινε με βάση τρία κυρίως κριτήρια που είναι: (α) η υψηλή ταυτότητα (>21%) και ομοιότητα (>40%) καταλοίπων μεταξύ των

αλληλουχιών των μελών, (β) παρόμοια μοτίβα υδροφοβικότητας με παρουσία 10-14 διαμεμβρανικών τμημάτων α-έλικας και (γ) συντηρημένες αλληλουχίες «μοτίβα» σε ομόλογες θέσεις αλληλουχίας. Η αναγνώριση τέτοιων αλληλουχιών «μοτίβων» διευκολύνει ιδιαίτερα την ταξινόμηση των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες οικογένειες, ακόμα και όταν οι αλληλουχίες στο σύνολο τους παρουσιάζουν μικρή σχετικά ομολογία με τις αντίστοιχες των χαρακτηρισμένων μελών (De Koning and Diallinas, 2000).

Οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT/NCS2)

Η πρώτη και πιο διαδεδομένη φυλογενετικά οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων είναι γνωστή ως οικογένεια Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων – Ασκορβικού (Nucleobase –Ascorbate Transporters, **NAT**) (de Koning and Diallinas, 2000) ή οικογένεια-2 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων – Κατιόντων (Nucleobase – Cation Symporters-2, **NCS2**) (TC 2.A.40, <http://www.tcdb.org>) (Gournas *et al.*, 2008; Pantazopoulou and Diallinas, 2007). Μέλη της οικογένειας NAT απαντώνται σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, με εξαίρεση κάποια παρασιτικά πρωτόζωα και τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Οι μεταφορείς που ανήκουν στην οικογένεια είναι συμμεταφορείς ουρικού οξέος:H⁺ και/ή ξανθίνης:H⁺, συμμεταφορείς ουρακίλης:H⁺ (βακτήρια, μύκητες, φυτά) (Diallinas and Goumas, 2008) και συμμεταφορείς L-ασκορβικού οξέος:Na⁺ (θηλαστικά) (Tsakaguchi *et al.*, 1999; Savini *et al.*, 2008). Τα καλύτερα μελετημένα μέλη της οικογένειας όσον αφορά τις σχέσεις δομής λειτουργίας, είναι οι μεταφορείς ουρικού οξέος:H⁺ UapA και ουρικού οξέος/πουρινών:H⁺ UapC από τον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1989; Gorfinkiel *et al.*, 1993; Diallinas *et al.*, 1995; Papageorgiou *et al.*, 2008) και ο μεταφορέας ξανθίνης:H⁺ YgfO από το εντεροβακτήριο *E. coli* (Karatzas and Frillingos, 2005; Karatzas *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008). Για την οικογένεια αυτή θα μιλήσουμε αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο (1.3.3).

Οικογένεια μεταφορέων πουρινών AzgA

Η δεύτερη οικογένεια, η οποία αναγνωρίστηκε πρόσφατα, ονομάζεται οικογένεια Μεταφορέων Πουρινών AzgA (Purine Transporters, **AzgA**) και ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS) (TC 2.A.1) (<http://www.tcdb.org>). Η οικογένεια (TC 2.A.1.40) αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα **AzgA** του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* που μεταφέρει τις νουκλεοτιδικές βάσεις αδενίνη-υποξανθίνη-γουανίνη (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2006, 2008), καθώς και δύο μεταφορείς που χαρακτηρίστηκαν εντελώς πρόσφατα, AtAzg1 και AtAzg2, από το φυτό

Arabidopsis thaliana (Mansfield *et al.*, 2009). Ένας ακόμη μεταφορέας που έχει ταξινομηθεί στην οικογένεια αυτή προέρχεται από το Gram-θετικό βακτήριο *B. subtilis* και είναι ο PbuG που μεταφέρει υποξανθίνη και γουανοσίνη (Johansen *et al.*, 2003). Η οικογένεια AzgA περιλαμβάνει επίσης μεταφορείς άγνωστης λειτουργίας από διάφορους οργανισμούς όπως αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά (*Neurospora crassa*, *S. pombe*, *P. abyssi*, *Trichodesmium erythaeum*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*), ενώ φαίνεται ότι δεν υπάρχει στα Μετάζωα. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο AzgA δεν παρουσιάζει σημαντικές ομολογίες στην αλληλουχία του με κανέναν άλλο χαρακτηρισμένο μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων από τις άλλες 5 γνωστές οικογένειες (Cecchetto *et al.*, 2004). Η προβλεπόμενη τοπολογία των μεταφορέων AzgA είναι συμβατή με την ύπαρξη 10-12 διαμεμβρανικών τμημάτων α-έλικας (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2006).

Οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-κατιόντων 1 (NCS1)

Η τρίτη οικογένεια, γνωστή ως 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**) (Saier *et al.*, 2006). (TC 2.A.39, <http://www.tcdb.org>), αποτελείται από πάνω από 200 πρωτεΐνες προερχόμενες από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, αρχαία και φυτά. Η οικογένεια περιλαμβάνει συμμεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων:H⁺ από προκαρυωτικούς οργανισμούς, μύκητες και φυτά. Μέλη αυτής της οικογένειας με γνωστή λειτουργία, είναι οι μεταφορείς ουρακίλης Fur4 του εκβλαστητικού σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* και του σχιζοσακχαρομύκητα *S. 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 του ζυμομύκητα *C. albicans* (Goudela *et al.*, 2006), ο μεταφορέας κυτοσίνης CodB της *E. coli* (Danielsen *et al.*, 1992) και ο μεταφορέας αλλαντοΐνης PucI του *B. subtilis* (Schultz *et al.*, 2001). Αλληλουχίες άγνωστης λειτουργίας που έχουν καταταχθεί στην οικογένεια αυτή έχουν εντοπισθεί σε διάφορους οργανισμούς, όπως *S. cerevisiae*, *S. pompe*, *E. coli*, *A. nidulans*, *B. subtilis*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *P. abyssi* και *Aeropyrum pernix* (de Koning and Diallinas, 2000) (www.membranetransport.org). Οι μεταφορείς αυτοί αποτελούνται συνήθως από 10-12 διαμεμβρανικά τμήματα α-ελίκων (Danielsen *et al.*, 1995; De Montigny *et al.*, 1998) και έχει δειχθεί ότι εκτελούν συμμεταφορά του υποστρώματός τους με πρωτόνια (Pinson *et al.*, 1997).

Πρόσφατα έχει αναλυθεί η κρυσταλλική δομή ενός μέλους (Mph1) της οικογένειας από το *Microbacterium liquefaciens* σε ευκρίνεια 2.85 Å (Weyand *et al.*, 2008) (βλέπε παραπάνω, εδάφιο 1.2.1, δομή 6). Πρόκειται για τη μόνη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων για την οποία διαθέτουμε ήδη ένα μοντέλο δομικής οργάνωσης που στηρίζεται σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Από την άλλη πλευρά, όμως, η μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια NCS1 με βιοχημικά και μοριακά γενετικά πειράματα δεν έχει προχωρήσει σε σημαντικό βαθμό (Goudela *et al.*, 2006).

Οικογένεια μεταφορέων εξισορρόπησης συγκεντρώσεων νουκλεοσιδίων (ENT)

Η τέταρτη οικογένεια, γνωστή ως οικογένεια Μεταφορέων Εξισορρόπησης συγκεντρώσεων Νουκλεοσιδίων (Equilibrative Nucleoside Transporters, **ENT**) (TC 2.A.57, <http://www.tcdb.org>) περιλαμβάνει μεταφορείς που μεταφέρουν νουκλεοσίδια και νουκλεοτιδικές βάσεις. Πολύ καλά μελετημένοι είναι οι ENT μεταφορείς στον άνθρωπο, hENT1, hENT2 (Griffiths *et al.*, 1997), hENT3 και hENT4 (Baldwin *et al.*, 2005; Hyde *et al.*, 2001), (Acimovic and Coe, 2002; Kong *et al.*, 2004 ; Engel and Wang, 2005 ; Baldwin *et al.*, 2005, 2006; Chen *et al.*, 2006; Zhou, M., *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008) και οι ομόλογοι τους στον επίμυ rENT1 και rENT2 (Yao *et al.*, 1997). Επίσης, έχουν μελετηθεί και οι ομόλογοι ENT μεταφορείς στον ποντικό, mENT1, mENT2 (Kiss *et al.*, 2000) και mENT3 (Baldwin *et al.*, 2005). Ομόλογά τους υπάρχουν σε μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδεις σκώληκες και θηλαστικά (de Koning and Diallinas, 2000; Hyde *et al.*, 2001; Landfear *et al.*, 2004; de Koning *et al.*, 2005). Πρόκειται για ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς πουρινικών και πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και των κυτταροτοξικών αναλόγων τους που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα. Ο hENT2 μεταφέρει επιπλέον πουρίνες (υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη) και πυριμιδίνες (θυμίνη, ουρακίλη) και αποτελεί τον πρώτο μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων που χαρακτηρίστηκε στα θηλαστικά (Hyde *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2002), ενώ ο hENT3 μεταφέρει αδενίνη (Baldwin *et al.*, 2005). Ιδιαίτερα καλά μελετημένοι είναι και οι μεταφορείς ENT στα παρασιτικά πρωτόζωα και, ιδιαίτερα, στα είδη της *Leishmania*. Στα παρασιτικά πρωτόζωα δεν υπάρχουν μηχανισμοί σύνθεσης πουρινών *de novo* (Arastu-Kapur *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2003). Η εξασφάλιση πουρινών επιτυγχάνεται με πρόσληψή τους μέσω μεταφορέων της οικογένειας ENT (www.bioparadigms.org/slc/intro.asp). Η *Leishmania major* περιέχει 6 μέλη της οικογένειας ENT, εκ των οποίων οι NT1.1, NT1.2 και NT2 μεταφέρουν νουκλεοσίδια

(Vasudevan *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000), οι NT3 και NT4 μεταφέρουν πουρίνες (Sanchez *et al.*, 2004; Ortiz *et al.* 2007, 2009) και ο LmU1 μεταφέρει ουρακίλη (Papageorgiou *et al.*, 2005). Από τους μεταφορείς πουρινών, ο NT3 από την *L. major* μεταφέρει υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη και ξανθίνη, ενώ ο NT4 μεταφέρει μόνο αδενίνη (Sanchez *et al.*, 2004). Μελέτες απολοιφής (knock out) των αντίστοιχων γονιδίων έδειξαν θνησιμότητα των οργανισμών στην περίπτωση απαλοιφής του *NT4*, ενώ, στην περίπτωση απαλοιφής του *NT3*, δεν παρατηρήθηκε καμία επίπτωση στη βιωσιμότητα (Ortiz *et al.*, 2007). Μεταφορείς νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων έχουν ταυτοποιηθεί και στα πρωτόζωα *Trypanosoma brucei* και *Leishmania donovani*. Η *L. donovani* έχει τρεις μεταφορείς ENT (LdNT1.1 και LdNT1.2, μεταφορείς αδενοσίνης και πυριμιδινών και LdNT2, μεταφορέας ινoσίνης και γουανοσίνης) (Vasudevan *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000b; Liu *et al.*, 2006) οι οποίοι έχει δειχθεί ότι λειτουργούν ως συμμεταφορείς χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων (Stein *et al.*, 2003), ενώ, στο *Trypanosoma brucei brucei*, έχουν χαρακτηριστεί οι μεταφορείς τύπου P1 (TbNT2, μεταφορέας αδενοσίνης, ινoσίνης, γουανοσίνης) και τύπου P2 (TbAT1, μεταφορέας αδενοσίνης και αδενίνης) (Sanchez *et al.*, 1999; Maser *et al.*, 1999; Landfear *et al.*, 2004; de Koning *et al.*, 2005) καθώς και ο NBT1 που μεταφέρει νουκλεοτιδικές βάσεις (αδενίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, γουανίνη), νουκλεοσίδια (γουανοσίνη και ινoσίνη) και αλλοπουρινόλη (Burchmore *et al.*, 2003). Μεταφορείς ENT έχουν επίσης εντοπισθεί και στα γονιδιώματα των *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* και *A. thaliana* (Vickers *et al.*, 2000), *Plasmodium falciparum* (PfNT1, μεταφορέας νουκλεοσιδίων/αναλόγων, αδενίνης, υποξανθίνης) (Carter *et al.*, 2000a) και *Toxoplasma gondii* [TgAT, μεταφορέας αδενοσίνης και πιθανός μεταφορέας υποξανθίνης και γουανίνης] (Chiang *et al.*, 1999)]. Η τοπολογία τους χαρακτηρίζεται από την παρουσία 10-11 διαμεμβρανικών α-ελίκων με το N-τελικό τους άκρο να εντοπίζεται κυτταροπλασματικά (Sundaram *et al.*, 2001, Hyde *et al.*, 2001).

Οικογένειες μεταφορέων οργανοκατιόντων & πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων των φυτών

Οι δύο επόμενες οικογένειες απαντώνται μόνο στα Φυτά. Πρόκειται για τις οικογένειες των Διαπερασών Οργανοκατιόντων των Φυτών (Plant Organocation Permease, **POP**) (TC 2.A.7.14, <http://www.tcdb.org>) και των Μεταφορέων Πρόσληψης Νουκλεοτιδικών βάσεων (Nucleobase Uptake Transporters, **NBUT**) (TC 2.A.7.19). Η οικογένεια POP περιλαμβάνει μεταφορείς υποστρωμάτων σχετιζόμενων με πουρίνες. Ο μόνος μεταφορέας της οικογένειας αυτής που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά είναι ο AtPUP1 της *A. thaliana*, εξειδικευμένος

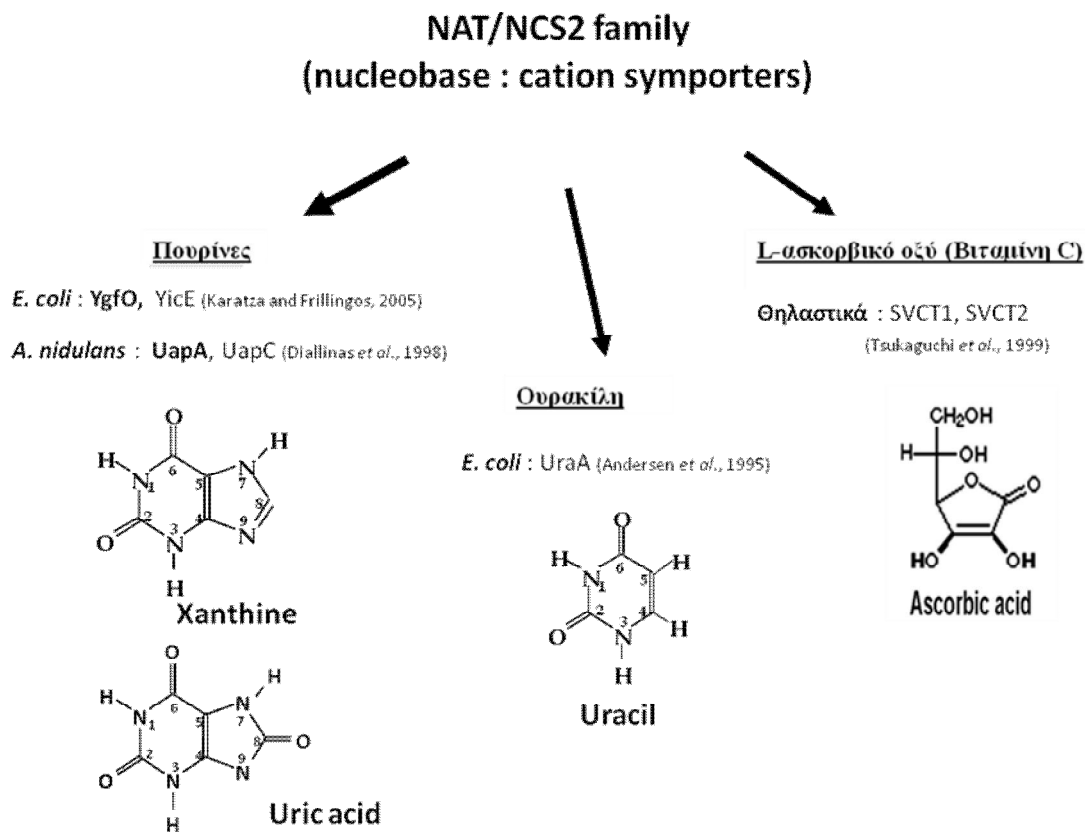
μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων (αδενίνη, κυτοσίνη) ο οποίος εκτελεί συμμεταφορά των υποστρώματων του με πρωτόνια (Gillissen *et al.*, 2000). Ανάλογα πουρινών (π.χ. υποξανθίνη), φυτοορμόνες (π.χ. κυτοκινίνες) και αλκαλοειδή (π.χ. καφεΐνη) αποδείχθηκαν ισχυροί αναστολείς της πρόσληψης αδενίνης και κυτοσίνης από τον μεταφορέα AtPUP1, υποστηρίζοντας ότι μπορεί να είναι υποστρώματα του (Gillissen *et al.*, 2000; Burkle *et al.*, 2003). Η οικογένεια αυτή επίσης περιλαμβάνει 15 παράλογα της *A. thaliana* και αρκετές αλληλουχίες από άλλα φυτά. Η οικογένεια NBUT αποτελείται από μεταφορείς που έχουν ως υποστρώματα ουρεΐδες, κυτοσίνες και άλλα ανάλογα υποστρώματα. Αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας NBUT είναι οι μεταφορείς αλλαντοΐνης AtUPS1 και AtUPS2 της *A. thaliana*. Πρόκειται για τους πρώτους μεταφορείς αλλαντοΐνης που έχουν εντοπιστεί και χαρακτηρισθεί λειτουργικά σε φυτά. Μεταφέρουν επίσης ουρικό οξύ και ξανθίνη (Desimone *et al.*, 2002). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ότι οι μεταφορείς αυτοί βρέθηκε να μεταφέρουν ουρακίλη, καθώς και 5-φθοροουρακίλη, όταν εκφράζονται ετερόλογα σε μύκητες ή ωοκύτταρα *Xenopus* (Schmidt *et al.*, 2004). Οι μεταφορείς AtUPS αποτελούνται από 10 πιθανά διαμεμβρανικά τμήματα με μία εκτενή κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή (Desimone *et al.*, 2002). Ένας ακόμη μεταφορέας της οικογένειας NBUT που παρουσιάζει 75% ταυτότητα καταλοίπων με τον AtUPS1 της *A. thaliana* ταυτοποιήθηκε πρόσφατα στον φασόλιο, *Phaseolus vulgaris*. Πρόκειται για τον μεταφορέα PvUPS1 που έχει ως βασικό υπόστρωμα την αλλαντοΐνη αλλά δεσμεύει και τις οξειδωμένες πουρίνες ουρικό και ξανθίνη (Pelissier *et al.*, 2004).

Τέλος, στα θηλαστικά, υπάρχουν και άλλες διακριτές οικογένειες μεταφορέων, διαφορετικές από όλες τις παραπάνω, όπου περιλαμβάνονται πρωτεΐνες μεταφοράς ουρικού οξέος (Diallinas and Goumas, 2008), όπως είναι ο μεταφορέας URAT1 (ανταλλάκτης ουρικού/ανιόντων) του νεφρικού επιθηλίου (Enomoto *et al.*, 2002), οι μεταφορείς UAT, Oat1, Oat3, MRP2, MRP4 και Oatv1 (Bakhiya *et al.*, 2003; Jutabba *et al.*, 2003; Leal-Pinto *et al.*, 1997; Sekina *et al.*, 1997; Van Aubel *et al.*, 2005) και ο ανταλλάκτης ουρικού/γλυκόζης SLCA9 (ή GLUT9) του νεφρικού επιθηλίου (Caulfield *et al.*, 2008; Zhao and Keating, 2007).

1.3.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 και το μοτίβο «υπογραφή» NAT

Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 είναι η μεγαλύτερη και πιο συντηρημένη οικογένεια νουκλεοτιδικών βάσεων. Περιλαμβάνει περισσότερα από 900 μέλη από όλα σχεδόν

τα είδη οργανισμών όπως Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά και θηλαστικά, εξαιρουμένων μόνο των γονιδιωμάτων ορισμένων ζυμομυκήτων, παρασιτικών πρωτοζώων και ενδοπαρασιτικών βακτηρίων (de Koning and Diallinas, 2000). Τα μέλη της οικογένειας αυτής, που προέρχονται από μικροοργανισμούς ή φυτά, είναι ειδικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρινών ή πυριμιδινών) (de Koning and Diallinas, 2000; Gourmas *et al.*, 2008). Ωστόσο, τα αντίστοιχα μέλη της οικογένειας που προέρχονται από θηλαστικά, είναι ειδικοί μεταφορείς L-ασκορβικού (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Η οικογένεια NAT/NCS2 έχει απομακρυσμένη μόνο συγγένεια με την οικογένεια NCS1 (κεφάλαιο 1.3.2), ένα μέλος της οποίας κρυσταλλώθηκε πρόσφατα (Weyand *et al.*, 2008) (<http://www.tcdb.org/tcdb/>).

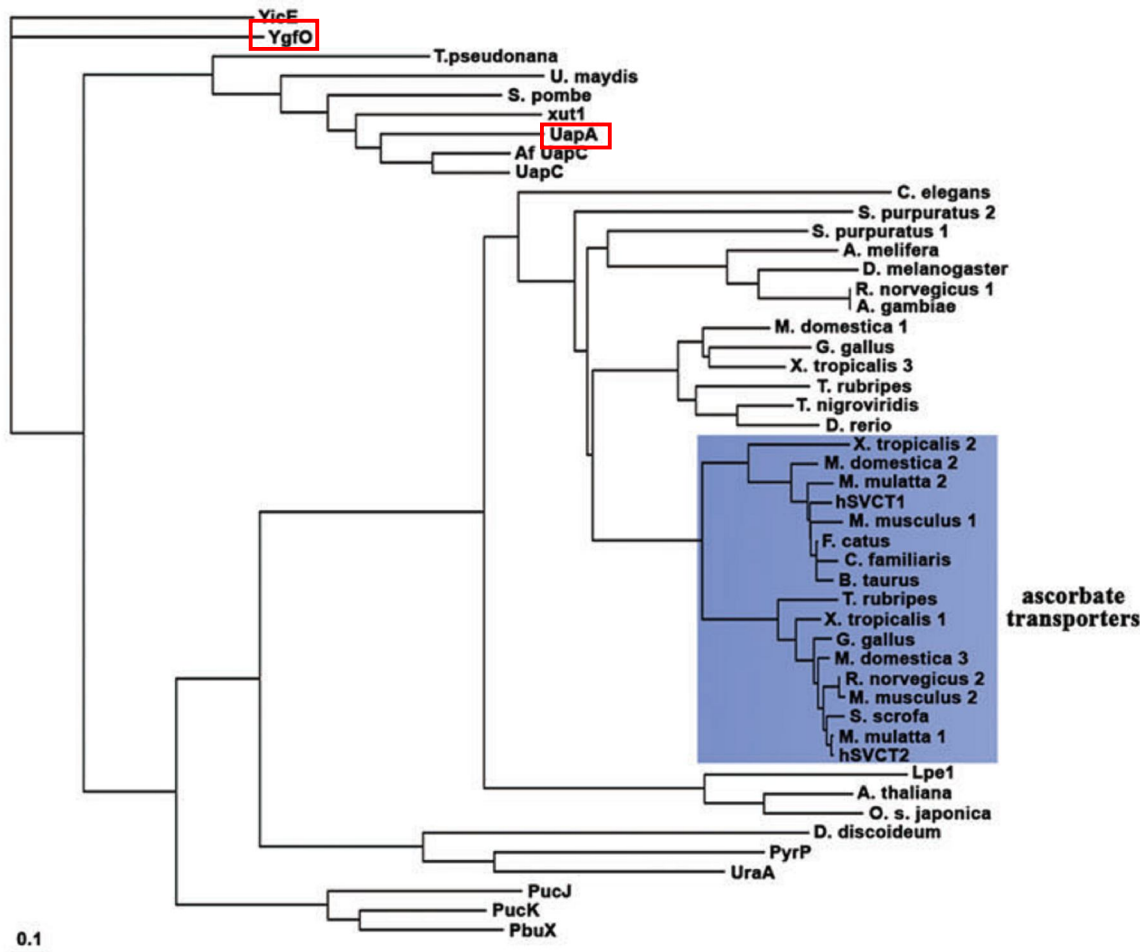


Εικόνα 1.11 Διαχωρισμός της οικογένειας NAT σε τρεις ομάδες ανάλογα με το υπόστρωμα που μεταφέρουν και τα καλύτερα μελετημένα μέλη της κάθε ομάδας. Μεταφορείς οξειδωμένων πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, YgfO και UapA αντίστοιχα), μεταφορείς ουρακίλης (UraA) και μεταφορείς L-ασκορβικού (SVCT1 και SVCT2).

Παρά τον μεγάλο αριθμό μελών που απαρτίζουν την οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2, ελάχιστα μέλη έχουν κλωνοποιηθεί και μελετηθεί σε γενετικό και μοριακό επίπεδο έως σήμερα. Έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά οι μεταφορείς του ασκομύκητα *A. nidulans* UapA (μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης) (Diallinas & Scazzocchio 1989; Gorfinkiel *et al.*, 1993; Diallinas *et al.*, 1995, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001, 2004) και UapC (μεταφορέας πουρινών με ευρύτερη εξειδίκευση) (Diallinas *et al.*, 1995), οι μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* YgfO και YicE (Karatza and Frillingos, 2005), οι οποίοι πρόσφατα μετονομάστηκαν σε XanQ και XanP αντίστοιχα (EcoGene database, www.ecogene.org) [οι τελικές ονομασίες των λειτουργικά χαρακτηριζόμενων πρωτεϊνών της *E. coli* δίνονται σύμφωνα με τη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών (π.χ. XanP = **X**anthine **P**ermease) και την φυλογενετική τους ανάλυση (π.χ. η XanQ = **X**anthine **P**ermease, αποδιδόμενη σε γεγονός οριζόντιας μεταφοράς γονιδίου, διακρίνεται από την XanP, που αποτελεί ορθόλογο μιας σειράς άλλων πιθανών μεταφορέων ξανθίνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων)] (Kenneth E. Rudd, προσωπική επικοινωνία), καθώς και ο μεταφορέας ουρικού οξέος YgfU (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα) οι μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης Lpe1 της *Zea mays* (Argyrou *et al.*, 2001), Xut1 του ζυμομύκητα *C. albicans* (Goudela *et al.*, 2005), AfUapC του παθογόνου ασκομύκητα *A. fumigatus* (Goudela *et al.*, 2006), οι μεταφορείς ξανθίνης PbuX και ουρικού PucJ και PucK του Gram-θετικού βακτηρίου *B. 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* (Turner *et al.*, 1994, Martinussen *et al.*, 2001), και οι μεταφορείς ασκορβικού οξέος SVCT1 και SVCT2 των θηλαστικών (Tsukaguchi *et al.*, 1999).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες μεταφορέων ανάλογα με το υπόστρωμα τους. Μεταφορείς οξειδωμένων πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος), μεταφορείς ουρακίλης και μεταφορείς L-ασκορβικού (βιταμίνης C), που συναντάμε μόνο στα θηλαστικά (**Εικόνα 1.11**). Εκτός από τους μεταφορείς SVCT1 και SVCT2 που λειτουργούν ως συμμεταφορείς ασκορβικού:Na⁺ (Tsukaguchi *et al.*, 1999), οι μόνοι εκτενώς μελετημένοι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT είναι ο UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* (Diallinas *et al.*, 1995, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001, 2004), που λειτουργεί ως συμμεταφορέας ουρικού:H⁺ ή ξανθίνης:H⁺, και ο μεταφορέας YgfO, ειδικός συμμεταφορέας ξανθίνης:H⁺, από το εντεροβακτήριο *E. coli*. Από τα υπόλοιπα μέλη, αρκετές αλληλουχίες πρωτεϊνών που ανήκουν

στην οικογένεια NAT 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. Για παράδειγμα, ο RutG (YcdG) της *E. coli*, πλησιέστερο ομόλογο (παράλογο) του μεταφορέα ουρακίλης UraA (Andersen *et al.*, 1995; Karatza and Frillingos, 2005), έχει προταθεί ως πιθανός μεταφορέας πυριμιδινών βάσει συμμετοχής του γονιδίου *rutG* στο οπερόνιο b1012 γονιδίων *rutA-G* που ενέχονται σε μια εναλλακτική πορεία καταβολισμού ουρακίλης ή θυμίνης (pyrimidine utilization) (Loh *et al.*, 2006). Στα Φυτά, εξάλλου, έχουν αναγνωρισθεί 12 μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 από την *Arabidopsis thaliana* (AtNAT1-12) βάσει λεπτομερούς 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). Τέλος, μεταξύ των ασπονδύλων ζώων, στη *Drosophila melanogaster* υπάρχει ένα μόνο ομόλογο της οικογένειας NAT, το οποίο πιθανόν να λειτουργεί ως μεταφορέας ουρικού (Gourmas and Diallinas, 2008 και Gourmas *et al.*, αδημοσίευτα δεδομένα) καθώς και 5 ομόλογα με πιθανές λειτουργίες μεταφοράς ουρικού στον νηματώδη *C. elegans* (G. Diallinas, προσωπική επικοινωνία).



Εικόνα 1.12 Φυλογενετικό δενδρόγραμμα της οικογένειας NAT/NCS2, που τονίζει τα ευκαρυωτικά ομόλογα (Goumpas *et al.*, 2008). Σε γαλάζιο πλαίσιο φαίνονται οι μεταφορείς ασκορβικού οξέος και σε κόκκινα πλαίσια οι καλύτερα μελετημένοι μεταφορείς όσον αφορά τις σχέσεις δομής λειτουργίας (YgfO, UapA).

Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) δείχνει την ύπαρξη μιας αρχικής τριχοτόμησης, όπου η μια διακλάδωση περιλαμβάνει τους λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς Φυτών και Θηλαστικών, η δεύτερη τους μεταφορείς των Βακτηρίων και του *Aspergillus* και η τρίτη τα ομόλογα των Αρχαίων (**Εικόνα 1.12**) (de Koning and Diallinas, 2000; Goumpas *et al.*, 2008). Τα μικροβιακά μέλη της οικογένειας, από Βακτήρια και από Μύκητες, έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ τους (ταυτότητα καταλοίπων 30-35%) παρά με ομόλογα από Φυτά και από Μετάζωα (ταυτότητα 22-24%). Τα ομόλογα και οι μεταφορείς NAT από Μετάζωα έχουν μεταξύ τους ταυτότητα καταλοίπων 35-40% και 25% σε σχέση με ομόλογα των Φυτών. Με βάση αυτήν την ανάλυση, προτείνεται ότι οι εξειδικευμένοι για τη μεταφορά νουκλεοτιδικών βάσεων μεταφορείς NAT είναι ευρέως διαδεδομένοι από τα Προκάρυα μέχρι

τους Ιχθύες, αλλά απουσιάζουν πιθανόν από πολλά είδη Θηλαστικών και δεν υπάρχουν καθόλου στα Πρωτεύοντα (Goumpas *et al.*, 2008). Από την άλλη πλευρά, μεταφορείς NAT που είναι ειδικοί για μεταφορά L-ασκορβικού οξέος φαίνεται να υπάρχουν στους Ιχθύες, στα Αμφίβια, στα Μαρσιποφόρα και σε άλλα Θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των Πρωτευόντων. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι οι μεταφορείς NAT L-ασκορβικού των Θηλαστικών προέρχονται πιθανόν από την εξέλιξη των μεταφορέων ουρικού οξέος και ξανθίνης των κατώτερων Ευκαρύων, αν και 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, και οι δύο, βασικές αντιοξειδωτικές ουσίες που απαλλάσσουν το πλάσμα του αίματος από δραστικές μορφές (ελεύθερες ρίζες) 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, 2002a, b).

Εν γένει, κοινά χαρακτηριστικά στοιχεία μεταξύ των μελών της οικογένειας NAT και κριτήρια για την κατάταξη μιας άγνωστης πρωτεΐνης στην οικογένεια αυτή θεωρούνται ότι είναι: το μέγεθος να κυμαίνεται από 450-600 αμινοξέα, η τοπολογική διευθέτηση να εμπεριέχει 12-14 διαμεμβρανικά τμήματα α -έλικας (TMSs) συνδεδεμένα μεταξύ τους με μικρές υδρόφιλες περιοχές αλληλουχίας (loops), με το N-τελικό και το C-τελικό άκρο προσανατολισμένα προς το κυτταρόπλασμα, και να απαντώνται δύο τουλάχιστον χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας, τα οποία εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των μεταφορέων NAT, πρώτον, το λεγόμενο μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT (Diallinas *et al.*, 1998) 324 [Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-X-T-[R/K/G] 333 (η αρίθμηση αφορά την αλληλουχία του ομολόγου YgfO, από την *E. coli*), που εντοπίζεται ακριβώς πριν την αρχή του 9ου διαμεμβρανικού τμήματος (Koukaki *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006) και, δεύτερον, ένα μοτίβο Q 30 H 31 (η αρίθμηση αφορά την αλληλουχία του ομολόγου YgfO, της *E. coli*) στο μέσον του 1ου διαμεμβρανικού τμήματος

(Pantazopoulou and Diallinas, 2006; Karena and Frillingos, 2009). Στο επόμενο εδάφιο (1.3.3.1), γίνεται εκτενέστερη ανάλυση της σημασίας του μοτίβου «υπογραφή» 324-333 (NAT signature motif).

Παρά την σπουδαιότητα των μεταφορέων της οικογένειας NAT, οι μελέτες που έχουν γίνει για τις σχέσεις δομής – λειτουργίας αφορούν κατά κύριο λόγο δύο μόνο μέλη (περιγράφονται αναλυτικά στα εδάφια 1.3.3.2 και 1.3.3.3), τον εξειδικευμένο συμμεταφορέα ουρικού/ξανθίνης:H⁺ UapA, από τον ασκομύκητα *A. nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amilis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Diallinas, 2006, 2007; Papageorgiou *et al.*, 2008) και τον εξειδικευμένο συμμεταφορέα ξανθίνης:H⁺ YgfO (ή XanQ), από το εντεροβακτήριο *E. coli* (Karatza and Frillingos, 2005; Goudela *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009). Αν και δεν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο αναλυτικό μοντέλο τριτοταγούς δομής, προσπάθειες κρυστάλλωσης και κρυσταλλογραφικής ανάλυσης τόσο του YgfO (Stroud *et al.*, 2009) (H. Ronald Kaback και Vladimir Mokhonov, UCLA, προσωπική επικοινωνία) 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, που είναι συμμεταφορείς L-ασκορβικού:Na⁺ (Sotiriou *et al.*, 2002; Gogoy *et al.*, 2007; Varma *et al.*, 2008, 2009; Carpile *et al.*, 2009). Συνοπτικά, σημαντικά ερωτήματα που αφορούν την τοπολογία, τριτοταγή δομή, κέντρο δέσμευσης υποστρώματος και μηχανισμό μεταφοράς των υποστρωμάτων των μεταφορέων NAT εξακολουθούν να παραμένουν αναπάντητα, έως σήμερα. Ακολουθεί μια αναλυτική περιγραφή των εως τώρα δεδομένων από τα δύο καλύτερα μελετημένα ομόλογα της οικογένειας NAT (YgfO και UapA).

1.3.3.1 Το μοτίβο «υπογραφή» NAT

Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT/NCS2 (**Εικόνα 1.13**), έδειξε μια 10πεπτιδική αλληλουχία με υψηλό βαθμό συντήρησης, η οποία περιλαμβάνεται σε μια ευρύτερη περιοχή που ανακαλύφθηκε από πειράματα ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών UapA/UapC (Diallinas *et al.*, 1998). Η αλληλουχία αυτή [³²⁴(Q/E/P-N-X/N-G-X-X-X/Q-X-T-(K/R/G)³³³] (αρίθμηση βάσει του μεταφορέα YgfO, όπου X υδρόφοβο αμινοξύ) ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT signature motif) (Diallinas *et al.*, 1998; Amillis *et al.*, 2000). Τα κατάλοιπα N325, G328 και T332 είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλα τα μέλη που έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά καθώς και στην συντριπτική πλειοψηφία όλων των ομολόγων, από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο, που προβλέπονται βάσει της αλληλουχίας (<http://www.membranetransport.org>). Το κατάλοιπο-324 παρουσιάζει υψηλή συντήρηση μεταξύ όλων των μελών, είτε ως γλουταμίνη (Q) στους μεταφορείς ξανθίνης, ουρικού ή ουρικού και ξανθίνης, του *A. nidulans* (UapA, UapC), του *A. nidulans* (AfUapC), της *C. albicans* (Xut1), του *B. subtilis* (PbuX, PucJ) και της *E. coli* (YgfO, YicE), είτε ως γλουταμικό (E) στους μεταφορείς ουρακίλης από βακτήρια (UraA, PyrP) και στον μεταφορέα πουρινών (ουρικού/ξανθίνης) της *Zea mays* (Lpe1), είτε ως προλίνη (P) στους μεταφορείς L-ασκορβικού του ανθρώπου (hSVCT1, hSVCT2). Το κατάλοιπο-333, επίσης, συντηρείται είτε ως λυσίνη (K) ή αργινίνη (R) στους μεταφορείς ακορβικού (hSVCT1, hSVCT2), ουρακίλης (UraA, PyrP), ουρικού (PucJ, YgfU), ή ουρικού και ξανθίνης (UapA, UapC, AfUapC, Xut1, Lpe1) είτε ως γλυκίνη (G) στους μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* (YgfO, YicE) και στον μεταφορέα ξανθίνης του *B. subtilis* (PbuX): βάσει αυτού του μοτίβου συντήρησης, έχει προταθεί συμμετοχή του καταλοίπου G/R/K333 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 YgfO, όπως παρουσιάζεται παρακάτω (εδάφια 1.3.3.2 και 1.3.3.3).

PbuX <i>B. subtilis</i>	293	Q	N	V	G	L	V	Q	L	T	G ³⁰²	(ξανθίνη)
PucK <i>B. subtilis</i>	295	Q	N	V	G	I	V	Q	L	S	K ³⁰⁴	(ουρικό οξύ)
PucJ <i>B. subtilis</i>	298	Q	N	A	G	L	L	Q	L	T	K ³⁰⁷	(ουρικό οξύ)
YgfU <i>E. coli</i>	361	Q	N	V	G	L	V	S	V	T	R ³⁷⁰	(ουρικό οξύ)
YcpX <i>E. coli</i>	310	Q	N	I	G	I	I	S	L	T	K ³¹⁹	(πουρίνες)
YgfO <i>E. coli</i>	324	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³³³	(ξανθίνη)
YicE <i>E. coli</i>	336	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	G ³⁴⁵	(ξανθίνη)
UapC <i>A. nidulans</i>	407	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R ⁴¹⁶	(ουρικό οξύ/ ξανθίνη/πουρίνες)
AfUapC <i>A. fumigatus</i>	406	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K ⁴¹⁵	(ουρικό οξύ/ξανθίνη/οξυπουρινόλη)
Xut1 <i>C. albicans</i>	386	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K ³⁹⁵	(ουρικό οξύ/ξανθίνη)
UapA <i>A. nidulans</i>	408	Q	N	N	G	V	I	S	I	T	R ⁴¹⁷	(ουρικό οξύ/ξανθίνη)
PyrP <i>L. lactis</i>	306	E	N	I	G	V	M	A	I	T	K ³¹⁵	(ουρακίλη)
UraA <i>E. coli</i>	290	E	N	I	G	V	M	A	I	T	R ²⁹⁹	(ουρακίλη)
SVCT1 <i>H. sapiens</i>	388	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K ³⁹⁷	(ασκορβικό οξύ)
SVCT2 <i>H. sapiens</i>	443	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K ⁴⁵²	(ασκορβικό οξύ)
Lpe1 <i>Z. mays</i>	346	E	N	A	G	L	L	A	V	T	R ³⁵⁵	(ουρικό οξύ/ξανθίνη)
MoorT <i>M. Thermoacetica</i>	319	Q	N	I	G	V	I	S	I	T	G ³²⁸	(ξανθίνη/ θερμοφιλο)

Εικόνα 1.13 Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», ³²⁴QNXGXXXXTG³³³, των 17 χαρακτηρισμένων μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2: *E. coli* YgfO (P67444), YicE (P0AGM9) και UraA (P0AGM7), *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140) και PucJ (O32139), *Clostridium perfringens* YcpX (BAB80103), *Lactococcus lactis* PyrP (AAK05701), *Aspergillus nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P487777), *Aspergillus fumigatus* AfUapC (XP748919), *Candida albicans* Xut1 (AAX2221), *Zea mays* Lpe1 (AAB17501), *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (AAH50261) και SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3) και 2 μεταφορέων που μελετώνται αυτή τη στιγμή στο εργαστήριο μας, των YgfU (Q46821) (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και MoorT (Moth_2478) (Mermelekas, Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

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

Ο πολυκυτταρικός ασκομύκητας *A. nidulans* είναι ικανός να προσλαμβάνει πουρίνες και πυριμιδίνες από το περιβάλλον του. Στο σύστημα του *Aspergillus*, οι πουρίνες, σε αντίθεση με τις πυριμιδίνες, μπορούν να καταβολιστούν πλήρως και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικές πηγές αζώτου. Στον μύκητα αυτό, η πρόσληψη των πουρινών πραγματοποιείται από τρεις πρωτεΐνες μεταφορείς: UapA, UapC και AzgA (Scazzocchio, 1994; Diallinas *et al.*, 1995). Ο UapA είναι υψηλής συγγένειας (K_m 7-8 μ M) μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης, καθώς και των αναλόγων τους 2-θειουρικού, 2-θειοξανθίνης, αλλοπουρινόλης και οξυπουρινόλης (Diallinas and Scazzocchio, 1989; Gorfinkiel *et al.*, 1993). Ο UapC είναι ένας ευρύτερης

εξειδίκευσης μεταφορέας πουρινών, υψηλής συγγένειας για ξανθίνη (K_m 5 μ M), χαμηλότερης συγγένειας για ουρικό όξύ (K_m 130 μ M) και πολύ μικρής συγγένειας για άλλες πουρίνες ή ανάλογα πουρινών (Diallinas *et al.*, 1995). Ο AzgA, τέλος, είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης (Cecchetto *et al.*, 2004, Goudela *et al.*, 2006). Οι δύο από αυτές τις πρωτεΐνες (UapA, UapC) ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2, ενώ ο AzgA ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια MFS, οικογένεια AzgA (εδάφιο 1.3.2). Ως προς τις σχέσεις δομής-λειτουργίας τους, έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ο μεταφορέας UapA. Πρόκειται για έναν υψηλής συγγένειας (K_m 7-8 μ M) συμμεταφορέα ουρικού/ξανθίνης: H^+ , αλλά με περιορισμένη ικανότητα πρόσληψης και αναλόγων πουρινών, όπως 2-θειουρικού, 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλοξανθίνης, και των φαρμάκων αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Goudela *et al.*, 2005).

Το γονίδιο *uap* ήταν το πρώτο γονίδιο ενός μεταφορέα της οικογένειας NAT που κλωνοποιήθηκε (Diallinas and Scazzocchio, 1989) και προσδιορίστηκε ως προς την αλληλουχία του (Gorfinkiel *et al.*, 1993). Η πρώτη προσπάθεια για την αναγνώριση σημαντικών περιοχών για τη λειτουργία του μεταφορέα UapA έγινε με πειράματα ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών μεταξύ UapA και του ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέα NAT του *A. nidulans*, UapC, που παρήχθησαν με τυχαϊκό τρόπο, βάσει ενός πρωτοκόλλου λειτουργικής συμπλήρωσης *in vivo* (*in vivo complementation*) (Diallinas *et al.*, 1998). Στη συνέχεια, έγινε εντοπισμός των σημαντικών καταλοίπων σε συνδυασμό με πειράματα μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης και κατασταλικών μεταλλαγών δεύτερης θέσης (*second-site suppressor mutations*) επιλεγμένων μεταλλαγμάτων της UapA (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amilis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008). Τα πειράματα αυτά εντόπισαν μια ευρεία περιοχή 70 περίπου καταλοίπων του UapA που θεωρήθηκε κρίσιμη για την αναγνώριση των διαφορετικών υποστρωμάτων και την εξειδίκευση των μεταφορέων του *Aspergillus* (Diallinas *et al.*, 1998). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του 8ου και 9ου διαμεμβρανικού τμήματος στο τοπολογικό μοντέλο των 12 διαμεμβρανικών τμημάτων. Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση των χημικών πρωτεϊνών, κατασκευάστηκε, με στοχευμένη πλέον μεταλλαξιγένεση, μια ακόμη χημική πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από την πλήρη αλληλουχία του UapA, όπου όμως η περιοχή των 70 καταλοίπων είχε αντικατασταθεί από την αντίστοιχη αλληλουχία του UapC. Η χημική αυτή πρωτεΐνη συμπεριφέρθηκε λειτουργικά όπως ο μεταφορέας UapC, εμφάνισε δηλ. την ευρύτερη

εξειδίκευση ως προς τις πουρίνες που έχει ο μεταφορέας UapC (Diallinas *et al.*, 1998). Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των μελών της οικογένειας NAT/NCS2 (**Εικόνα 1.12**) έδειξε ότι η περιοχή των 70 καταλοίπων περιλαμβάνει μια χαρακτηριστική υποπεριοχή αλληλουχίας, 10 περίπου καταλοίπων, με πολύ υψηλή συντήρηση [⁴⁰⁸(Q/E/P)NXGXXXXT(K/R/G)⁴¹⁷], που ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT (**Εικόνα 1.13**). Μεταγενέστερες μελέτες μεταλλαξιγένεσης ανέδειξαν τη λειτουργική σχέση της περιοχής αυτής με την δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος στον UapA (Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα εξελικτικά συντηρημένα κατάλοιπα της περιοχής του μοτίβου-«υπογραφή» Q408, N409, G411, T416 και R417 (Koukaki *et al.*, 2005). Σε πειράματα ανάπτυξης του ασκομύκητα με μοναδική πηγή αζώτου ουρικό ή ξανθίνη ή και άλλες πουρίνες, οι μεταλλαγές των Q408 ή N409 είχαν τις σοβαρότερες επιπτώσεις, δείχνοντας ότι αυτά τα κατάλοιπα είναι ουσιαστικής σημασίας για τη λειτουργία του UapA. Αντίθετα, μεταλλαγές στα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα του μοτίβου G411 και T416 (G411A, G411P, T416N) βρέθηκε ότι αλλάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα, με τέτοιο τρόπο ώστε, εκτός από ξανθίνη και ουρικό οξύ, να αναγνωρίζει, με μικρότερη συγγένεια, υποξανθίνη και αδενίνη (Koukaki *et al.*, 2005), ενώ η μεταλλαγή R417G οδηγεί σε αδυναμία αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης/ουρικού με υποκαταστάσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της πουρίνης (8-αζαξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη) (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005).

Παράλληλα, τα αποτελέσματα των μελετών οδήγησαν στην πρόταση ότι τα κατάλοιπα Q408 και N409 είναι απαραίτητα για την δέσμευση και την μεταφορά του υποστρώματος, αντίστοιχα. Πειράματα ανταγωνισμού με ανάλογα πουρινών έδειξαν ότι το μετάλλαγμα Q408E μπορεί να εμπλέκεται άμεσα στη δέσμευση υποστρώματος σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το πρωτονιωμένο άζωτο N9-H των πουρινών 7-δεαζαξανθίνης, υποξανθίνης ή γουανίνης (Koukaki *et al.*, 2005) ή με την κετοομάδα C8=O του ουρικού οξέος (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη τυχαίας μεταλλαξιγένεσης έδειξε ότι στην ευρύτερη περιοχή αλληλουχίας μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 8 και 9 (Diallinas *et al.*, 1998) εμπεριέχονται δύο ακόμα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα, Glu356 και Asp388, που είναι ουσιαστικά για τη λειτουργία του μεταφορέα UapA (Papageorgiou *et al.*, 2008).

Εκτός της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», έχουν μελετηθεί και άλλες περιοχές του UapA όπως η περιοχή του δωδέκατου διαμεμβρανικού τμήματος, για την οποία βρέθηκε ότι αντικατάσταση της Phe-528, στο μέσον της διαμεμβρανικής αυτής έλικας, με κάποιο αμινοξύ

μικρού μεγέθους (Ser, Ala) οδηγεί στην αναγνώριση και μεταφορά, με χαμηλή συγγένεια, μιας νέας σειράς πουρινών (όπως υποξανθίνη, γουανίνη), χωρίς όμως να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του UapA για τα φυσιολογικά του υποστρώματα (ουρικό οξύ, ξανθίνη, οξυπουρινόλη) (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η Phe-528 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, *sensu strictu*, τμήμα του ενεργού κέντρου του μορίου (Vlanti *et al.*, 2006). Ακολούθως, βρέθηκε ότι και τα κατάλοιπα T526 και Q113, το πρώτο στο 12ο διαμεμβρανικό τμήμα και το δεύτερο στο συνδετικό τμήμα μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 1 και 2 «χαλαρώνουν» 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). Μελετήθηκε, επίσης, ο ρόλος του μοτίβου Q⁸⁵H⁸⁶ στο μέσον του 1ου διαμεμβρανικού τμήματος του UapA, καθώς και ενός μοτίβου «επανάληψης λευκινών» (leucine zipper) που υπάρχει μόνο στον UapA και όχι σε άλλους μεταφορείς NAT και αποτελείται από τρία κατάλοιπα λευκίνης (L77, L84, L91) που εμπίπτουν διαδοχικά στην μία όψη της προβλεπόμενης διαμεμβρανικής α-έλικας (Pantazopoulou and Diallynas, 2006). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι το μοτίβο επανάληψης λευκινών παίζει ρόλο στην προσαρμογή του διαμεμβρανικού τμήματος 1 με άλλα διαμεμβρανικά τμήματα του UapA για το καταλληλότερο πακετάρισμα της δομής, η συντηρημένη Q85 είναι σημαντική για τη συγγένεια δέσμευσης και την εξειδίκευση του μεταφορέα, ενώ η συντηρημένη H86 παίζει ρόλο στην έκφραση και την ορθή στόχευση του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη και όχι στη λειτουργία του UapA αυτή καθαυτή (Pantazopoulou and Diallynas, 2006).

Πρόσφατα, ο συνδυασμός μελετών στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και κατασταλτικών μεταλλαγών που απομονώθηκαν επιλέγοντας για στελέχη του ασκομύκητα με ικανότητα αύξησης σε αδενίνη, οδήγησε την ερευνητική ομάδα του Γ. Διαλλινά να προτείνει ένα μοντέλο λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των περιοχών του διαμεμβρανικού τμήματος 1, διαμεμβρανικού τμήματος 12 και της ευρύτερης περιοχής του μοτίβου-«υπογραφή» μεταξύ των τμημάτων 8 και 9, 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 UapA (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Μέχρι σήμερα, ο μεταφορέας UapA αποτελεί το εκτενέστερα μελετημένο παράδειγμα ενός *ενκαρνωτικού* μέλους της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού

(NAT/NCS2 family). 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 YgfO (XanQ), ο οποίος παρουσιάζεται στη συνέχεια.

1.3.3.3 Ο μεταφορέας ξανθίνης YgfO του εντεροβακτηρίου *E. coli*

Το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 περιέχει 10 γονίδια που κατατάσσονται στην οικογένεια NAT/NCS2 (www.membranetransport.org), εκ των οποίων 5 διατηρούν καθαρά την αλληλουχία του μοτίβου-«υπογραφή» Q/E-N-X-G-X-X-X-T-G/R/K, ομαδοποιούνται στην υποοικογένεια COG2233 και τα γονιδιακά τους προϊόντα έχουν χαρακτηριστεί, οι YgfO (ή XanQ) και YicE (ή XanP) ως ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης (Karatza and Frillingos, 2005), ο UraA ως μεταφορέας ουρακίλης (Anderesen *et al.*, 1995), ο YgfU (ή PbuX), πρόσφατα, ως μεταφορέας ουρικού (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και ο RutG (ή YcdG), ως χαμηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα), αν και, βάσει φυλογενετικής και γονιδιωματικής ανάλυσης, είχε προταθεί (Luh *et al.*, 2006) ότι μπορεί να λειτουργεί ως πιθανός μεταφορέας πυριμιδινών (θυμίνης ή ουρακίλης). Τα υπόλοιπα 5 NAT γονίδια δεν διατηρούν το χαρακτηριστικό μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας (Karatza and Frillingos, 2005), ομαδοποιούνται σε διακριτή υποοικογένεια (COG2252) και πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα αντίστοιχα γονιδιακά προϊόντα είτε δεν εκφράζονται σε επαρκή επίπεδα στη μεμβράνη (YicO) είτε δεν μπορούν να μεταφέρουν κανένα από τα τρία πιθανότερα υποστρώματα, ουρικό, ξανθίνη ή ουρακίλη (YbbY, YgfQ, YjcD, PurP) (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Σε σχέση με την φυσιολογική σημασία της μεταφοράς των νουκλεοτιδικών αυτών βάσεων στα εντεροβακτήρια, η *E. coli* είναι γνωστό ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει άλλες πουρίνες εκτός από αδερίνη (ή αδενοσίνη) σαν μοναδικές πηγές αζώτου κατά την αερόβιο αύξησή της, αντίθετα με Gram-θετικά βακτήρια όπως ο *Bacillus subtilis* (Schultz *et al.*, 2001), αλλά μπορεί να χρησιμοποιεί υποξανθίνη, γουανίνη (γουανοσίνη), ή ξανθίνη (ξανθοσίνη) ως επικουρικές πηγές αζώτου για την αερόβιο αύξησή της, όταν ως βασική πηγή αζώτου υπάρχει αμμώνιο ή ασπαρτικό (Xi *et al.*, 2000; Karatza and Frillingos, 2005). Η χρήση της ξανθίνης ή υποξανθίνης (όχι, όμως, και του ουρικού) ως επικουρικής πηγής αζώτου κατά την αύξηση της *E. coli* K-12 (Karatza and Frillingos, 2005) μπορεί να οφείλεται είτε σε αναβολισμό τους μέσω της οδού περίσωσης πουρινών (purine

salvage pathway) (Zalkin and Nygaard, 1996) είτε σε μερικό καταβολισμό τους προς αλλαντοΐνη ή αλλαντοϊκό (Xi *et al.*, 2000).

Έως σήμερα, από τα 10 ομόλογα της *E. coli*, οι σχέσεις δομής-λειτουργίας έχουν μελετηθεί εκτενώς με μεταλλαξιγένεση στον μεταφορέα YgfO (Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009). 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 αδενίνης) 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* (Papageorgiou *et al.*, 2008), υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής άλλων μεθοδολογιών, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και βιοφυσικής, κυρίως, που προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στο βακτηριακό σύστημα. Τα μεθοδολογικά πλεονεκτήματα μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

(1) Τα βακτηριακά μέλη της οικογένειας NAT περιέχουν μικρό σχετικά αριθμό καταλοίπων κυστεΐνης (π.χ. 5 στον YgfO και 4 στον YicE, έναντι 18 στον UapA), πράγμα που επιτρέπει ευχερέστερη εφαρμογή των μεθόδων της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) (Frillingos *et al.*, 1998), μετά από κατασκευή λειτουργικών μεταφορέων ελεύθερων κυστεϊνών (Cys-less permeases), όπως έχει γίνει με πολλές άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες αυτού του τύπου (van Iwaarden *et al.*, 1991; Weissborn *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1998; Sahin-Toth *et al.*, 2000; Slotboom *et al.*, 2001; Culham *et al.*, 2003; Tavoulari and Frillingos, 2008). Αντίθετα, για την εφαρμογή των μεθοδολογιών κυστεϊνικής σάρωσης (κεφάλαιο 1.6, παρακάτω) σε ευκαρυωτικούς μεταφορείς που περιέχουν συχνά μεγάλο αριθμό καταλοίπων Cys και, μάλιστα, πολλές φορές με σημαντικούς ρόλους π.χ. μέσω σχηματισμού δι-σουλφιδικών δεσμών που είναι σημαντικοί για την στόχευση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, δομική σταθερότητα ή, ακόμη, και λειτουργικό ολιγομερισμό (Dorn *et al.*, 2009), χρησιμοποιούνται κατ' ανάγκη μεταφορείς που έχουν απαλλαχθεί από ορισμένες μόνο και όχι όλες τις εγγενείς (native) κυστεΐνες (μεταφορείς απεμπλουτισμένοι κυστεϊνών, Cys-depleted) (Huntley *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004), εκτός λίγων εξαιρέσεων, για μεταφορείς με 3-8 εγγενή κατάλοιπα Cys, όπως σε περιπτώσεις μεταφορέων από ζυμομύκητες (Berhe *et al.*, 2001; Hatanaka *et al.*, 2001) ή ασκομύκητες (Unkles *et al.*, 2005; Kafasla *et al.*, 2007). Πλήρως λειτουργικοί μεταφορείς ελεύθεροι κυστεϊνών έχουν ήδη κατασκευασθεί και ελεγχθεί λειτουργικά στο εργαστήριό μας

τόσο για τον μεταφορέα YgfO (XanQ) όσο και για τον YicE (XanP) και ο Cys-less YgfO χρησιμοποιείται για πειράματα μεταλλαξιγένεσης (Karatzá *et al.*, 2006).

(2) Η υπερέκφραση και απομόνωση μεμβρανικών πρωτεϊνών από ένα βακτηριακό σύστημα είναι πιο προσιτή τεχνικά, όπως μαρτυρά και η σχεδόν καθολική επικράτηση βακτηριακών ομολόγων μεταξύ των κρυσταλλικών δομών των μεταφορέων που έχουν λυθεί (κεφάλαιο 1.2). Η δυνατότητα να έχουμε τα αντίστοιχα βακτηριακά ομόλογα των μεταφορέων σε καθαρή μορφή, είτε μετά από ανασύσταση σε πρωτεολιποσωμάτια είτε σε κατάλληλα διαλύματα ήπιων απορρυπαντικών, επιτρέπει την εφαρμογή αναλυτικών βιοφυσικών τεχνικών με σημαντική συνεισφορά στην κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας (Frillingos *et al.*, 1998; Guan and Kaback, 2006), όπως αναφέρθηκε συνοπτικά στην εισαγωγική παράγραφο του κεφαλαίου 1.2.

(3) Υπάρχει επίσης η ευχέρεια μελέτης συγκεκριμένων συνιστωσών του μηχανισμού λειτουργίας τόσο σε πρωτεολιποσωμάτια όσο και σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out membrane vesicles, ή ghost cells) ή σε σφαιροπλάστες (sphaeroplasts), όπου μπορούν να μετρηθούν σταθερές δέσμευσης υποστρωμάτων ή προσδετών υψηλής συγγένειας, ενεργότητες ανταλλαγής (exchange), αντιρροπιστικής ροής (counterflow) ή εκροής (efflux) υποστρώματος καθώς και η επίδραση συνιστωσών της ηλεκτροχημικής διαβάθμισης ιόντων ($\Delta\mu\text{H}$, $\Delta\Psi$), αντισωμάτων, ή ειδικών αναστολέων, και να μετρηθούν καλύτερα οι επιδράσεις υδρόφιλων αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων όπως του MTSES⁻ (βλ. κεφάλαιο 1.6) (Frillingos *et al.*, 1998; Guan and Kaback, 2006; Kaback *et al.*, 2007).

Η συστηματική σημειακή μεταλλαξιγένεση και μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα YgfO, που βρίσκεται σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας, ανέδειξε μερικές σημαντικές περιοχές αλληλουχίας και κατάλοιπα κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία του YgfO (Karatzá *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karna and Frillingos, 2009).

Μια αρχική σειρά μελετών εστιάστηκε στην μεταλλαξιγένεση της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή» NAT, η οποία στον YgfO περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 324-333 (QNNGVIQMTG), και μικρών περιοχών αλληλουχίας ανοδικά (GSLPLTTFA) και καθοδικά (VASRYVG) του μοτίβου αυτού (Karatzá *et al.*, 2006). Η ανάλυση καταρχήν των υψηλά συντηρημένων καταλοίπων του μοτίβου, Q324, N325, G327, T332 και G333, έδωσε αποτελέσματα (Karatzá *et al.*, 2006) που είναι αξιοπρόσεκτα όμοια με την γενική εικόνα των αποτελεσμάτων για τα αντίστοιχα κατάλοιπα του UapA (Koukaki *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα κατάλοιπα Q324 και N325 είναι απολύτως απαραίτητα (αναντικατάστατα) για τη μεταφορά

υποστρώματος (ξανθίνης) και, μάλιστα, η Q324 φαίνεται ότι χρειάζεται για την δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος με υψηλή συγγένεια (high affinity) εφόσον τα μεταλλάγματα Q324E και Q324N έχουν εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια μεταφοράς (15 φορές μεγαλύτερη K_m από τον φυσικού τύπου YgfO) και δεν αναγνωρίζουν κανένα από τα ανάλογα ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκαν ως προσδέτες (ligands) (Karatza *et al.*, 2006). Επίσης, αντικατάσταση των καταλοίπων T332 και G333, ενώ δεν οδηγεί σε απενεργοποίηση, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην εξειδίκευση αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης, π.χ. το μετάλλαγμα G333R «χαλαρώνει» τους περιορισμούς για την αναγνώριση υποκαταστάσεων στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου και επιτρέπει δέσμευση 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης, οι οποίες δεν αναγνωρίζονται από τον φυσικού τύπου μεταφορέα (Karatza *et al.*, 2006; Goudela *et al.*, 2005). Η αντικατάσταση του G327 με Pro, Cys, ή Ala οδηγεί σε αύξηση της V_{max} κατά 2-3 φορές, χωρίς άλλη σημαντική επίπτωση στην κινητική μεταφοράς ξανθίνης ή στην εξειδίκευση αναγνώρισης πουρινών (Karatza *et al.*, 2006). Στη συνέχεια, η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και 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 κυστεϊνής (single-Cys mutant) μετά από τροποποίηση με το NEM, γεγονός που υποδεικνύει συμμετοχή των θέσεων αυτών στον μηχανισμό λειτουργίας: αυτές οι ευαίσθητες-σε-απενεργοποίηση θέσεις εντοπίζονται σε συνεχόμενα κατάλοιπα της αλληλουχίας του μοτίβου-υπογραφή (323-329) και σε μία πλευρά α -έλικας στην αλληλουχία καθοδικά του μοτίβου-υπογραφή (332, 333, 336, 339) (Karatza *et al.*, 2006). Επίσης, βρέθηκαν δύο κατάλοιπα με πιθανώς σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα του μορίου του YgfO στη μεμβράνη, ένα πριν (Pro318) και ένα μετά (Gly340) το μοτίβο-υπογραφή, εφόσον η μεταλλαξιγένεση των καταλοίπων αυτών οδηγούσε συστηματικά σε μεταλλάγματα με μηδενική ή ελάχιστη έκφραση στη μεμβράνη της *E. coli* (Karatza *et al.*, 2006).

Σε νεότερα πειράματα, η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της αλληλουχίας 419-450, όπου εμπεριέχεται το 12ο διαμεμβρανικό τμήμα του YgfO (Papakostas *et al.*, 2008) ανέδειξε το ρόλο δύο ακόμη σημαντικών θέσεων, στο μέσον περίπου της προβλεπόμενης διαμεμβρανικής α -έλικας, που είναι οι Ile432 (Phe528 στον μεταφορέα UapA) και Asn430 (Thr526 στον UapA). Χωρίς να είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία του YgfO, τα δύο αυτά κατάλοιπα φαίνεται να καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την εξειδίκευση και την κινητική του.

Πιο συγκεκριμένα, αντικατάσταση της Ile432 με μικρότερου μεγέθους αμινοξέα, οδήγησε σε μηδενική ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης, ενώ αντικατάσταση με αμινοξέα παρεμφερούς όγκου van der Waals οδήγησε σε μεταλλάγματα υψηλής ενεργότητας, αλλά με σημαντική μείωση στη συγγένεια μεταφοράς υποστρώματος (αυξημένη K_m) και στη συγγένεια αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης (Papakostas *et al.*, 2008). Από την άλλη πλευρά, μεταλλαξιγένεση της Asn-430 έδωσε την διαπεράση N430C, που έχει υψηλή ενεργότητα αλλά είναι πολύ ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από αλκυλίωση με NEM (IC_{50} 10 μ M), ενώ μπορεί να προστατευθεί πλήρως από την απενεργοποίηση με δέσμευση της 2-θειοξανθίνης, ενός υψηλής συγγένειας αναλόγου του υποστρώματος (ξανθίνης) (Papakostas *et al.*, 2008). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η Asn-430 εντοπίζεται πλησίον του κέντρου δέσμευσης και η δέσμευση υποστρώματος ασκεί στερεοχημική παρεμπόδιση στην αλκυλίωση του N430C (steric hindrance), ενώ η Ile-432 έχει έμμεσο ρόλο στο κέντρο δέσμευσης, βελτιστοποιώντας τη συγγένεια δέσμευσης υποστρώματος και αναλόγων του (optimal binding) (Papakostas *et al.*, 2008). Ως προς τον ρόλο της Ile-432, είναι αξιοπρόσεκτο ότι το αντίστοιχο κατάλοιπο του μεταφορέα UapA στον ασκομύκητα *A. nidulans* (Phe-528) μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει παρόμοιο ρόλο, εφόσον φαίνεται να λειτουργεί ως μοριακό «φίλτρο» για την αναγνώριση πουρινών, χωρίς όμως να ανήκει στο ενεργό κέντρο δέσμευσης του UapA (Vlanti *et al.*, 2006) .

Πρόσφατα, τέλος, μια συστηματική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης των πολικών και πιθανά φορτισμένων καταλοίπων αμινοξέων του YgfO που προβλέπεται ότι βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα του μορίου οδήγησε στην αποκάλυψη δύο ακόμα αναντικατάστατων καταλοίπων για τη λειτουργία του μεταφορέα, του Glu-272, στο κυτταροπλασματικό άκρο της 8ης διαμεμβρανικής έλικας, και του Asp-304, που εντοπίζεται 20 κατάλοιπα πριν από την αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή, καθώς και δύο καταλοίπων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση του YgfO, της His-31, στο μέσον της 1ης διαμεμβρανικής έλικας, και της Asn-93, στο μέσον της 3ης διαμεμβρανικής έλικας (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 ενδεικτικά δεδομένα που υπάρχουν για άλλους χαρακτηρισμένους μεταφορείς της οικογένειας αυτής (Pantazopoulou and Diallinas, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Varma *et al.*, 2008).

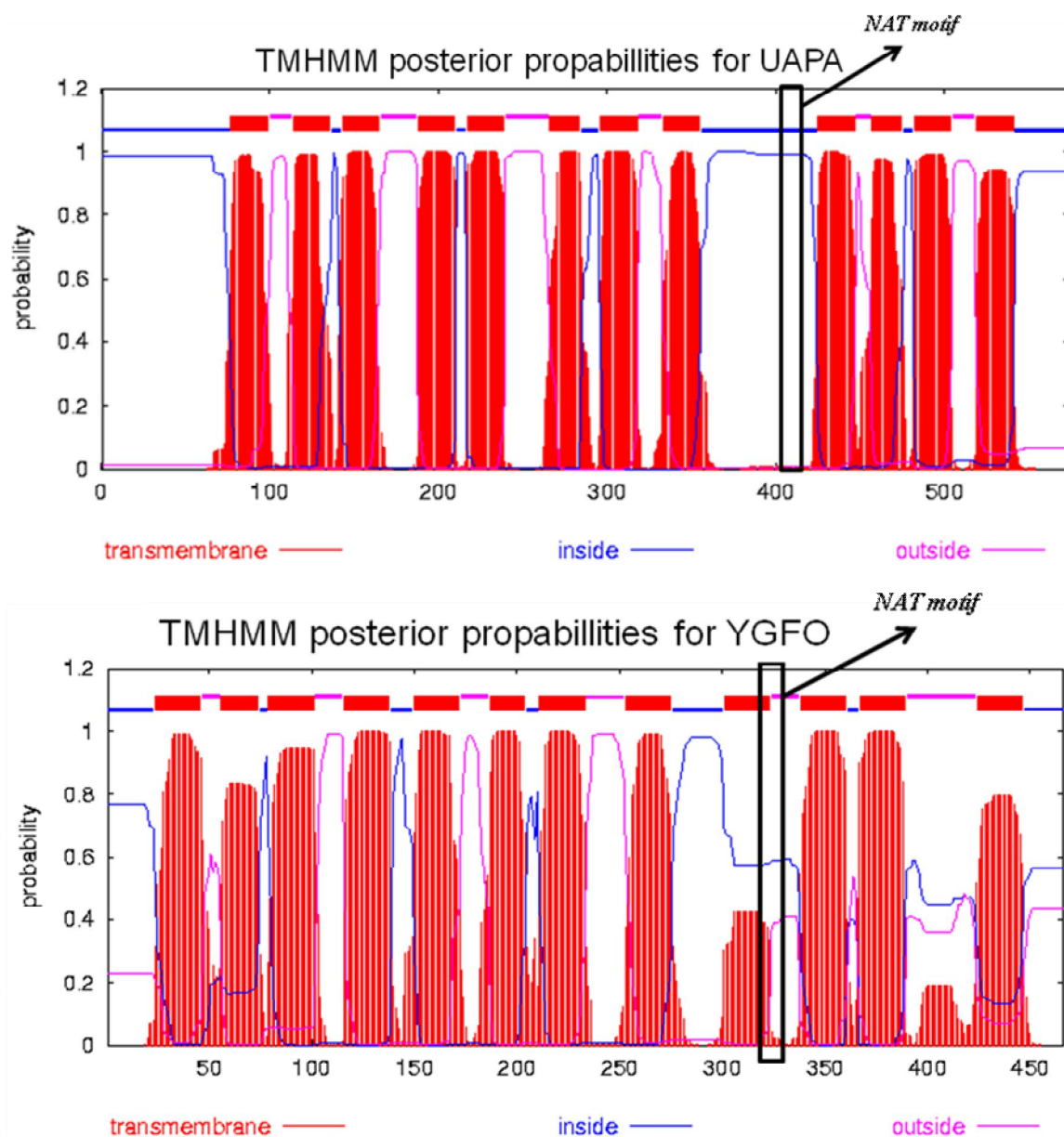
Συνοπτικά, ο μεταφορέας YgfO (XanQ) αποτελεί πλέον παράδειγμα αναλυτικής εξέτασης των σχέσεων δομής-λειτουργίας για ένα βακτηριακό ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2, με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης, και από την παράλληλη σειρά μελετών που γίνεται σε ένα βακτηριακό (YgfO) και σε ένα ευκαρυωτικό (UapA) μέλος της οικογένειας αυτής, προκύπτουν σημαντικά συμπεράσματα για την λειτουργική ομολογία των δύο συστημάτων. Δεδομένου ότι YgfO 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 Goumas, 2008), η συγκριτική ανάλυση των δύο συστημάτων δίνει μια ισχυρή μοριακή βάση για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NAT. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχει ακόμα σαφής εικόνα για την τοπολογική οργάνωση, τη θέση του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος ή τον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων NAT, καθώς δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμα και κρυσταλλογραφικά δεδομένα (Stroud *et al.*, 2009), και πολλά απομένει ακόμη να εξετασθούν για την κατανόηση της λειτουργίας τους, όπως περιγράφεται και στα παρακάτω εδάφια.

1.4 Διαμεμβρανική τοπολογία των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2

Όπως είπαμε, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα ασφαλή πειραματικά δεδομένα για την τοπολογική οργάνωση των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Με βάση αλγόριθμους πρόβλεψης από διάφορα υπολογιστικά προγράμματα (βλ. εδάφιο 1.5.1), η γενικά προβλεπόμενη τοπολογία στα μέλη της οικογένειας NAT θεωρεί την ύπαρξη 12 διαμεμβρανικών τμημάτων α-έλικας (TMs) τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με υδρόφιλα συνδετικά τμήματα με το N-τελικό άκρο και το C-τελικό άκρο να εντοπίζονται κυτταροπλασματικά. Ένα ενδιαφέρον στοιχείο, ωστόσο, είναι ότι το συνδετικό τμήμα μεταξύ 8ης και 9ης διαμεμβρανικής έλικας, το οποίο περιλαμβάνει και το μοτίβο-«υπογραφή» NAT (εδάφιο 1.3.3.1) έχει αμφισβητούμενη τοπολογική διευθέτηση και προβλέπεται από ορισμένα προγράμματα ότι περιέχει και ένα επιπλέον, πιθανώς διαμεμβρανικό, τμήμα, με έντονο αμφιπαθικό χαρακτήρα (**Εικόνα 1.14**). Πειραματικά δεδομένα για την τοπολογία της περιοχής αυτής δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι **(1)** υπάρχει πειραματική επιβεβαίωση για την διευθέτηση του C-τελικού άκρου του YgfO προς το κυτταρόπλασμα, από πειράματα με χίμαιρες GFP (βλ. εδάφιο 1.5.2.1), τόσο από τη δική μας ομάδα (Αποτελέσματα, Κεφάλαιο 3.2, εδάφιο 3.2.2) όσο και, ανεξάρτητα, από την ομάδα του von Heijne, στη Σουηδία, που έκανε μια ολιστική (global) τοπολογική προσέγγιση για την οργάνωση του C-τελικού άκρου όλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών της *E. coli* K-12 και ένας από τους στόχους ήταν να βελτιώσει τις προβλέψεις του αλγορίθμου TMHMM, τον οποίο οι ίδιοι ανέπτυξαν (Granseth *et al.*, 2005). **(2)** Εντελώς πρόσφατα, δημοσιεύθηκε μια τοπολογική μελέτη για τον μεταφορέα hSVCT1 (ομόλογο της οικογένειας NAT από τον άνθρωπο, βλ. εδάφιο 1.3.3 και Εικόνα 1.11), η οποία όμως περιορίζεται σε μικρό μέρος της αλληλουχίας, μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 3 και 6, χρησιμοποιώντας αναλύσεις N-γλυκοζυλίωσης (βλ. εδάφιο 1.5.2.2) και περιοριστική πρωτεόλυση με τρυψίνη, και δεν αναφέρεται καθόλου στο «επίμαχο» θέμα της τοπολογίας της περιοχής του μοτίβου-«υπογραφή» NAT (Velho and Jarvis, 2009).

1.4.1 Το πρόβλημα στις προβλέψεις τοπολογίας των μεταφορέων NAT

Όπως φαίνεται ενδεικτικά στην **Εικόνα 1.14**, η γενική εικόνα από τις προβλέψεις τοπολογίας που δίνουν οι αλγόριθμοι για τους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 έχει δύο χαρακτηριστικά. **(A)** Μέχρι και το 8ο διαμεμβρανικό τμήμα (TM8), όλοι οι αλγόριθμοι συμφωνούν εν γένει τόσο στον αριθμό όσο και στα όρια των προβλεπόμενων TMs και για όλους, τους χαρακτηρισμένους τουλάχιστον, μεταφορείς NAT. **(B)** Μετά το TM8, δηλ. στο C-τελικό τρίτο του μορίου, τόσο οι διαφορετικοί αλγόριθμοι (βλ. Καρενά, 2007) όσο και ο κάθε αλγόριθμος εφαρμοζόμενος σε διαφορετικά ομόλογα μεταφορέων (βλ. Αποτελέσματα, Κεφάλαιο 3.2) δίνει αρκετά διαφορετικές προβλέψεις, κυρίως γιατί υπάρχει αβεβαιότητα στην ανάλυση της εκτενούς συνδετικής περιοχής μεταξύ 8ου και 9ου TM. Αναλύοντας, για παράδειγμα, την τοπολογία των δύο γνωστότερων μεταφορέων NAT, YgfO και UapA, με το πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>), διακρίνουμε αμέσως μια σημαντική διαφορά στην πρόβλεψη τοπολογίας της περιοχής αυτής: για τον UapA, το TMHMM δίνει το μοτίβο-«υπογραφή» ως κυτταροπλασματικό υδρόφιλο τμήμα, ενώ για τον YgfO, το δίνει με μεγαλύτερη πιθανότητα ως περιπλασματικό υδρόφιλο τμήμα και εν μέρει διαμεμβρανικό (**Εικόνα 1.14**). Εκτενέστερη ανάλυση του σημείου αυτού δίνεται στο Κεφάλαιο 3.2 (Αποτελέσματα).



Εικόνα 1.14: Πρόβλεψη διαμεμβρανικής τοπολογίας των μελών της οικογένειας NAT, YgfO και UapA, βάσει του αλγορίθμου TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>). Τα διαγράμματα αποδίδουν την στατιστική πιθανότητα πρόβλεψης διαμεμβρανικού τμήματος (άξονας των y) για κάθε περιοχή αλληλουχίας της υπό μελέτη πρωτεΐνης όπως υποδεικνύεται με τους αντίστοιχους αριθμούς καταλοίπων αμινοξέων (άξονας των x). Η αλληλουχία του μοτίβου «οπογραφή» NAT σημειώνεται με πλαίσιο.

1.5 Στρατηγικές μελέτης της τοπολογίας διαμεμβρανικών μεταφορέων

Η γνώση της δομής των διαμεμβρανικών μεταφορέων αποτελεί βασικό σημείο για την κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας τους. Δυστυχώς όμως, λόγω της δομικής ιδιαιτερότητας που παρουσιάζουν είναι δύσκολο να αναλυθούν σε κρυσταλλογραφικό επίπεδο (Κεφάλαιο 1.2), γι' αυτό και μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστες κρυσταλλικές δομές για διαμεμβρανικούς μεταφορείς, παρά τον εκπληκτικά μεγάλο αριθμό τέτοιων πρωτεϊνών που μελετάται (Abramson and Wright, 2009; Forrest *et al.*, 2008; Kaback *et al.*, 2007; van Geest and Lolkema 2000). Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι, εν μέρει, και η έλλειψη ικανοποιητικών μοντέλων για την τοπολογική οργάνωση των πρωτεϊνών αυτών σε σχέση με το μεμβρανικό τους περιβάλλον και για τα επιμέρους στοιχεία δευτεροταγούς δομής τους. Τόσο τα υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης (εδάφιο 1.5.1) όσο και οι πειραματικές στρατηγικές μελέτης της τοπολογίας (εδάφιο 1.5.2) των πολυτοπικών μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν μπορούν να δώσουν με ακρίβεια ένα μοντέλο τοπολογικής οργάνωσης, παρά μόνο μετά από επίπονες, ενδελεχείς και πολύπλευρες μελέτες, με σύγκλιση δεδομένων από πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα της περμεάσης λακτόζης LacY, όπου ένα ικανοποιητικό μοντέλο τοπολογίας δόθηκε μετά από ανάλυση μιας πολύ μεγάλης σειράς μεταλλαγμάτων και χιμαιρικών κατασκευών, με αρκετές ενδιάμεσες αναθεωρήσεις επί πολλά χρόνια (Kaback *et al.*, 2001) και του μεταφορέα γλουταμικού Glp_B του οποίου η κρυσταλλική δομή διαλεύκανε τον «γρίφο» της τοπολογικής διάταξης του C-τελικού ημίσεος των ομόλογων μεταφορέων γλουταμικού στο ΚΝΣ των θηλαστικών, που δεν είχε λυθεί ούτε από τις υπολογιστικές προβλέψεις ούτε από τις πειραματικές βιοχημικές προσεγγίσεις επί πολλά χρόνια (Yernool *et al.*, 2004).

Η δομική οργάνωση, πάντως, των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς διέπεται γενικά από κάποιες κοινές αρχές. Στις πολυτοπικές αυτές πρωτεΐνες, τα τμήματα που εντοπίζονται μέσα στη μεμβράνη αποτελούνται κατά κανόνα από διαδοχικές α-έλικες των 20-25 καταλοίπων αμινοξέων, που συνδέονται μεταξύ τους με εξωμεμβρανικά υδρόφιλα συνδετικά τμήματα. Κρυσταλλογραφικές και βιοφυσικές μελέτες δείχνουν ότι οι α-έλικες είναι συχνά αμφιπαθικές και «πακετάρονται» σε σφικτή διευθέτηση μέσα στη μεμβράνη, με την πιο πολική πλευρά της κάθε έλικας να προσανατολίζεται προς το εσωτερικό του μορίου και την λιγότερο πολική προς τα λιπίδια (Petsko and Rees, 1989). Σε μερικές, βέβαια, περιπτώσεις, η οργάνωση

περιπλέκεται με αμφιπαθικά τμήματα ελίκων που δεν διαπερνούν ολόκληρη τη μεμβράνη και με συνδετικά τμήματα που επανεισέρχονται στο επίπεδο της μεμβράνης (reentrant loops): οι ιδιαίτερες αυτές περιοχές τοπολογίας συσχετίζονται συνήθως με κάποιο σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αναγνώρισης και μεταφοράς υποστρώματος, όπως φάνηκε χαρακτηριστικά με τις κρυσταλλικές δομές των ομολόγων των μεταφορέων των νευροδιαβιβαστών γλουταμικού (Yernool *et al.*, 2004) και σεροτονίνης / βιογενών αμινών (Yamashita *et al.*, 2005).

Παρά τις δυσκολίες στην παραγωγή δομών σε υψηλή ευκρίνεια ανάλυσης, βασικά στοιχεία της γενικής δομής μιας πολυτοπικής μεμβρανικής πρωτεΐνης όπως η τοπολογική της οργάνωση, ο αριθμός των διαμεμβρανικών τμημάτων (TMs) και ο προσανατολισμός τους στη μεμβράνη, μπορούν να προβλεφθούν με υπολογιστικά προγράμματα και να εξετασθούν πειραματικά με μια πλειάδα μοριακών-βιοχημικών τεχνικών (von Heijne, 1992). Οι υπολογιστικές στρατηγικές (αλγόριθμοι πρόβλεψης) βασίζονται στο ότι οι περιοχές α-έλικας εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό υδροφοβικότητας ενώ τα συνδετικά τμήματα παρουσιάζουν υδροφιλικότητα και, κατά συνέπεια, αναλύοντας την υδροφοβικότητα της αμινοξικής αλληλουχίας μπορεί να γίνει πρόβλεψη για τον αριθμό των διαμεμβρανικών τμημάτων και του γενικότερου προσανατολισμού του μορίου της πρωτεΐνης (Zampighi *et al.*, 1984; von Heijne 1992; Traxler *et al.*, 1993; Claros and von Heijne, 1994). Έχουν επίσης αναπτυχθεί εναλλακτικές στρατηγικές αναγνώρισης της σχετικής υδροφοβικότητας των διαφορετικών περιοχών του μορίου, όπως, πιο πρόσφατα, αυτή που στηρίζεται στην συχνότητα χρήσης της νουκλεοτιδικής βάσης ουρακίλη (U), η οποία, ως γνωστόν, συσχετίζεται χαρακτηριστικά με τα κωδικόνια των πιο υδρόφοβων αμινοξέων στον γενετικό κώδικα (Prilusky and Bibi, 2009). Οι βιοχημικές τεχνικές, οι οποίες είναι απαραίτητες όχι μόνο για την επαλήθευση ή μη ενός θεωρητικού τοπολογικού μοντέλου αλλά και για την αποκάλυψη πιθανών περιοχών ιδιαίτερης τοπολογίας όπου οι αλγόριθμοι πρόβλεψης συχνά αποτυγχάνουν (π.χ. reentrant loops, βλ. παραπάνω), βασίζονται συνήθως σε τροποποίηση του πρωτεϊνικού μορίου, με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση και κατασκευή χμαιοτικών πρωτεϊνών (van Geest and Lolkema 2000). Παρακάτω, δίνεται μια επισκόπηση των συνηθέστερων θεωρητικών (εδάφιο 1.5.1) και πειραματικών προσεγγίσεων (εδάφιο 1.5.2), που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της διαμεμβρανικής τοπολογίας.

1.5.1 Υπολογιστικά προγράμματα ανάλυσης της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών

Τα τελευταία χρόνια, η πληροφορική έχει προσφέρει σημαντικά στην μελέτη της τοπολογίας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με την ανάπτυξη προγραμμάτων υπολογιστικών αλγορίθμων (Bernsel *et al.*, 2008; Melén *et al.*, 2003). Τα προγράμματα αυτά βασίζονται σε απλές κλίμακες υδροφοβικότητας, με πιο κλασική αυτή των Kyte και Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982), και σε στατιστικά δεδομένα που έχουν προκύψει κυρίως από πολλαπλές στοιχίσεις αλληλουχιών (Persson and Argos, 1997; Nilsson *et al.*, 2000), τα οποία «ερμηνεύονται» με βάση γνωστές πρότυπες δομές ή τοπολογίες μεμβρανικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας σύνθετα μαθηματικά μοντέλα ανάλυσης (Nilsson *et al.*, 2002; Melén *et al.*, 2003). Σε ορισμένες περιπτώσεις, επιχειρήθηκε βελτιστοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης με ενσωμάτωση πειραματικών δεδομένων από σφαιρικές πρωτεωμικές προσεγγίσεις, όπως για την πειραματική ανάλυση του προσανατολισμού των C-τελικών άκρων στο μεμβρανικό πρωτέωμα της *E. coli* (Daley *et al.*, 2005) και του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 2006) (πρόγραμμα TMHMM), ή με συνεισφορά απλών κανόνων τοπολογικής πρόβλεψης, όπως του κανόνα «υπερίσχυσης των θετικών φορτίων στις εσωτερικές περιοχές» (positive-inside rule), που θεωρεί ότι το αλγεβρικό άθροισμα πιθανών φορτίων αμινοξέων στις εσωτερικές συνδετικές περιοχές της μεμβρανικής πρωτεΐνης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από αυτό των πιθανών φορτίων στις εξωτερικές συνδετικές περιοχές, για λόγους δομικής σταθερότητας κατά την είσοδο στη μεμβράνη (von Heijne, 1992; Rapp *et al.*, 2006) (πρόγραμμα TopPred II). Πρόσφατα, εξάλλου, έχουν αναπτυχθεί και άλλες στρατηγικές ανάλυσης της σχετικής υδροφοβικότητας (hydropathy profile), που δεν βασίζονται στις αρχές της βιοφυσικής (Bernsel *et al.*, 2008) αλλά σε γονιδιωματικά κριτήρια, όπως αυτό της συχνότητας χρήσης της βάσης ουρακίλης (U) στην κωδικοποιούσα περιοχή των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Prilusky and Bibi, 2009).

Από τα γνωστά προγράμματα, αυτά που χρησιμοποιήσαμε και εμείς για αρχικές προβλέψεις της τοπολογίας των μεταφορέων NAT σε αυτήν και σε άλλες (Καρενά, 2007) μελέτες, είναι τα εξής: **Tmpred** (Hoffman and Stoffel, 1993) (<http://www.ch.embnet.org/>), **TopPred II** (Claros and von Heijne, 1994), **DAS** (Cserzo *et al.*, 1997) (<http://sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>), **TMAP** (Persson and Argos, 1997), **MEMSAT 2 (PSIPRED)** (Jones *et al.*, 1994; McGuffin *et al.*, 2000), **PRED -TMR2** (Pasquier *et al.* 1998), **SOSUI** (Hirokawa *et al.*, 1998) (<http://bp.nuap.nagiya-u.ac.jp/>), **HMMTOP 2.0** (Tusnady and Simon, 2001)

(www.enzim.hu/hmmtop/), **SPLIT 3.5** (Juretic *et al.*, 1998), **TM Finder** (Deber *et al.*, 2001), **TMHMM 2.0** (Krogh *et al.*, 2001; Möller *et al.*, 2001) (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) (Melén *et al.*, 2003), **HMM-TM** (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/HMM-TM>), **PRED-CLASS** (<http://biol.uoa.gr/PRED-CLASS>) (Bagos *et al.*, 2006).

1.5.2 Πειραματικές προσεγγίσεις μελέτης της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών

Για την επιβεβαίωση, απόρριψη, ή αναθεώρηση ενός προβλεπόμενου (θεωρητικού) μοντέλου διαμεμβρανικής τοπολογίας (1.5.1) θα πρέπει να χαρακτηριστεί πειραματικά η παρουσία όλων των πιθανών διαμεμβρανικών περιοχών, καθώς και τα υδρόφιλα συνδετικά τμήματα που τις συνδέουν. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί μια μεγάλη σειρά πειραματικών προσεγγίσεων. Οι πειραματικές αυτές προσεγγίσεις μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: **(α) Σύντηξης γονιδίων** (gene fusion analysis), όπου ένα γονίδιο αναφοράς, όπως π.χ. αυτό της αλκαλικής φωσφατάσης (PhoA), της β-γαλακτοσιδάσης, της β-λακταμάσης ή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), «επισυνάπτεται» σε μια (προβλεπόμενη ως) υδρόφιλη περιοχή αλληλουχίας της πρωτεΐνης και οι προκύπτουσες χιμαιρικές πρωτεΐνες, που αποτελούνται από μέρος της πρωτεΐνης μελέτης και την πρωτεΐνη αναφοράς ως C-τελικό πρόσθεμα, αναλύονται ως προς τις ιδιότητες του μορίου αναφοράς (π.χ ενζυμική ενεργότητα ή έκφραση συγκεκριμένου επιτόπου): το κατά πόσον το μόριο αναφοράς δίνει ή όχι έκφραση και ενεργότητα εξαρτάται αποκλειστικά από την διευθέτησή του, αν είναι δηλ. προσανατολισμένο προς την εσωτερική ή προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, και αυτό δείχνει αμέσως και τον τοπολογικό προσανατολισμό της θέσης της πρωτεΐνης μελέτης όπου έγινε η γονιδιακή σύντηξη (von Heijne, 2006). **(β) Ελέγχου προσβασιμότητας** (accessibility analysis): στηρίζονται στην αρχή ότι, *in vivo*, η μεμβράνη αποτελεί φραγμό διαπερατότητας για υδρόφιλα μόρια και τα μέρη μιας πρωτεΐνης που εντοπίζονται σε διαφορετικές πλευρές της μεμβράνης (εσωτερική, δηλ. σχετικά αποκλεισμένη από το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον, ή εξωτερική, δηλ. εκτεθειμένη στο εξωτερικό υδατικό περιβάλλον) έχουν διαφορετική προσβασιμότητα σε διάφορους υδρόφιλους παράγοντες. Συνήθως, οι στρατηγικές αυτές συνδυάζονται με σημειακή μεταλλαξιγένεση, κατά την οποία εισάγονται συγκεκριμένες θέσεις-στόχοι, π.χ. θέσεις γλυκοζυλίωσης, κατάλοιπα κυστεΐνης, επίτοποι αντισωμάτων, θέσεις πρωτεόλυσης, σε επιλεγόμενες περιοχές του μορίου, και ελέγχεται η προσβασιμότητα των θέσεων αυτών με κατάλληλα, υδρόφιλα, αντιδραστήρια ή ένζυμα, π.χ. γλυκοσιδάσες, SH-αλκυλιωτικούς παράγοντες, αντισώματα, πρωτεάσες, από την μία ή και την άλλη πλευρά της μεμβράνης (van Geest and Lolkema, 2000).

1.5.2.1 Στρατηγικές σύντηξης γονιδίων (gene fusion analysis)

Η εφαρμογή των στρατηγικών αυτών ξεκίνησε κυρίως με τις πρώτες συστηματικές μελέτες σύντηξης του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης, από το εργαστήριο του Colin Manoil (Calamia and Manoil, 1990). Οι στρατηγικές σύντηξης γονιδίων έχουν εφαρμοσθεί ευρέως για την ανάλυση της διαμεμβρανικής τοπολογίας *βακτηριακών* μεταφορέων, κατά κανόνα σε Gram-αρνητικά βακτήρια και, μάλιστα, έχουν συνδυαστεί και με «ολιστικές» πρωτεωμικές αναλύσεις, υψηλού ρυθμού επεξεργασίας δειγμάτων (high throughput), που δίνουν μια ένδειξη για τον τοπολογικό προσανατολισμό όλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών της *E. coli* (Daley *et al.*, 2005). Παρά το βασικό τους μειονέκτημα, που είναι ότι «αλλοιώνεται» πολύ η δομή της πρωτεΐνης μελέτης, αφού οι γονιδιακές χίμαιρες (gene fusions) που εξετάζονται περιλαμβάνουν μέρος μόνο της αλληλουχίας της μεμβρανικής πρωτεΐνης και φέρουν μεγάλα «ετερόλογα» τμήματα αλληλουχιών από τα γονίδια των ενζύμων αναφοράς, οι στρατηγικές σύντηξης μπορούν να δώσουν γρήγορα μια γενική εικόνα για την τοπολογική διευθέτηση των υδρόφιλων συνδετικών τμημάτων και να επιβεβαιώσουν ή όχι την θεωρητική πρόβλεψη ενός μοντέλου τοπολογίας.

1.5.2.1.1 Συντήξεις με αλκαλική φωσφατάση ή β-λακταμάση αποκαλύπτουν θέσεις εκτεθειμένες προς το περίπλασμα

Το μόριο αναφοράς που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στην τοπολογική ανάλυση προκαρυωτικών πρωτεϊνών μεταφοράς με στρατηγική σύντηξης γονιδίων είναι η αλκαλική φωσφατάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *phoA* της *E. coli*. Η αλκαλική φωσφατάση (PhoA) είναι ένα μεταλλο-ένζυμο που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες (ομοδιμερές), που φέρουν από δύο ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες. Το ένζυμο αποκτά λειτουργικότητα μόνο όταν βρίσκεται στο *περίπλασμα* ως *διμερές* (Akiyama and Ito, 1993; Derman *et al.*, 1993). Στις μελέτες τοπολογίας, εισάγεται η αλκαλική φωσφατάση, χωρίς την σηματοδοτική αλληλουχία της, σε συγκεκριμένη θέση αλληλουχίας του μεταφορέα υπό μελέτη, ώστε να αποτελέσει C-τελικό πρόσθεμα στην χιμαιρική πρωτεΐνη που θα προκύψει. Έτσι, αν το τμήμα της μεμβρανικής πρωτεΐνης όπου εισήχθη η αλκαλική φωσφατάση εντοπίζεται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα, το ένζυμο παραμένει ανενεργό, ενώ, αντίθετα, όταν το τμήμα της πρωτεΐνης μελέτης όπου έγινε η σύντηξη εδράζεται στο *περίπλασμα*, η αλκαλική φωσφατάση ενεργοποιείται. Ο έλεγχος ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης είναι αυτό που δίνει την

πληροφορία για το που εδράζεται το αντίστοιχο τμήμα της πρωτεΐνης μελέτης στην κάθε γονιδιακή χίμαιρα. Η ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί να ελεγχθεί είτε απλά με καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) είτε ποσοτικά, με φασμοτοφωτομετρική ενζυμική ανάλυση (Michaelis *et al.*, 1983). Τοπολογικές αναλύσεις με χρήση αλκαλικής φωσφατάσης έχουν εφαρμοσθεί εδώ και δύο περίπου δεκαετίες, κυρίως σε βακτηριακές πρωτεΐνες-μεταφορείς (Calamia and Manoil 1990; Dergman *et al.*, 1993; Ujwal *et al.*, 1995), αλλά και σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες με ετερόλογη έκφραση σε βακτήρια (Gafvelin and von Heijne, 1994; Lee *et al.*, 1996).

Ένα άλλο ένζυμο που έχει χρησιμοποιηθεί ως μόριο αναφοράς, σε περιορισμένο όμως βαθμό, για αναλύσεις τοπολογίας περιοχών που «βλέπουν» προς το περίπλασμα, είναι η β-λακταμάση. Η λογική που χρησιμοποιείται είναι η ίδια όπως και για την αλκαλική φωσφατάση: χαρακτηριστική ιδιότητα της β-λακταμάσης είναι ότι όταν εκφράζεται στο περίπλασμα αποδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά β-λακτάμης, όπως αμπικιλίνη ή κεφαλοσπορίνη, γιατί μόνο τότε εκφράζεται η ενεργότητα του ενζύμου αυτού, δηλ. ενεργότητα διάσπασης του χαρακτηριστικού δεσμού στον δακτύλιο της β-λακτάμης. Κύτταρα που εκφράζουν χιμαιρικές πρωτεΐνες με την β-λακταμάση «εγκλωβισμένη» στο κυτταρόπλασμα δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεγάλη συγκέντρωση αμπικιλίνης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει σε κύτταρα που εκφράζουν χιμαιρικές πρωτεΐνες με την ενεργότητα β-λακταμάσης να εκφράζεται στο περίπλασμα (Broom-Smith *et al.*, 1986).

1.5.2.1.2 Συντήξεις με β-γαλακτοσιδάση ή GFP αποκαλύπτουν θέσεις προσανατολισμένες προς το κυτταρόπλασμα

Το ένζυμο που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως ως μόριο αναφοράς για την τοπολογική ανάλυση θέσεων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που «βλέπουν» προς το κυτταρόπλασμα είναι η β-γαλακτοσιδάση. Μάλιστα, είναι το πρώτο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε σε στρατηγικές γονιδιακής σύντηξης για τη μελέτη μεμβρανικών μεταφορέων (Shuman, 1980; Griesser *et al.*, 1983). Σε αντίθεση με την αλκαλική φωσφατάση, η β-γαλακτοσιδάση είναι κυτταροπλασματικό ένζυμο και είναι λειτουργική μόνο όταν το τμήμα της μεμβρανικής πρωτεΐνης στο οποίο έχει συντηχθεί εντοπίζεται κυτταροπλασματικά. Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης μπορεί να ανιχνευθεί απλά με ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-

indolyl- β -D-galactoside) (η ενεργότητα του ενζύμου διασπά τον β -γαλακτοσιδικό δεσμό στο υπόστρωμα X-Gal και οδηγεί σε αποχρωματισμό του, οπότε μπλε αποικίες σημαίνουν γαλακτοσιδάση ανενεργή και άσπρες αποικίες γαλακτοσιδάση ενεργή) είτε ποσοτικά, με φασματοφωτομετρία (Froshauer *et al.*, 1988). Στις αρχικές μελέτες τοπολογικής ανάλυσης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς, χρησιμοποιήθηκαν στρατηγικές σύντηξης που συνδύαζαν τη χρήση β -γαλακτοσιδάσης και αλκαλικής φωσφατάσης (Calamia and Manoil, 1990) για την εξέταση τόσο των κυτταροπλασματικών όσο και των περιπλασματικών περιοχών του μορίου.

Μια άλλη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε, πιο πρόσφατα, σαν μόριο αναφοράς σε μελέτες τοπολογικής οργάνωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών με σύντηξη γονιδίων είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Στις αντίστοιχες γονιδιακές χίμαιρες, η GFP αποδίδει σήμα φθορισμού (μέγιστο στα 508 nm) μόνο όταν εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (von Heijne, 1992; Drew *et al.*, 2001, 2002), ενώ, αντίθετα, όταν εντοπίζεται στο περίπλασμα δεν αποδίδει σήμα φθορισμού (Feilmeier *et al.*, 2000). Επομένως, και η πρωτεΐνη αυτή, ως μόριο αναφοράς, μπορεί να εντοπίσει περιοχές ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα που βλέπουν προς το κυτταρόπλασμα. Γονιδιακές χίμαιρες με την GFP ως αντικαταστάτη του C-τελικού άκρου χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα, σε μια σειρά μελετών για τον έλεγχο και/ή βελτιστοποίηση των προβλέψεων του τοπολογικού μοντέλου TMHMM, καταρχήν πιλοτικά, σε 12 συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες της *E. coli* (Drew *et al.*, 2002) και, στη συνέχεια, σε σφαιρικό πρωτεωμικό επίπεδο (Daley *et al.*, 2005; Granseth *et al.*, 2005). Στις μελέτες αυτές, η χρήση της GFP συνδυάστηκε και πάλι με τη χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης, ως δείκτη μεμβρανικών πρωτεϊνών που το C-τελικό τους άκρο εντοπίζεται περιπλασματικά.

1.5.2.1.3 Μια εναλλακτική προσέγγιση: συντήξεις με τον τομέα δέσμευσης βιοτίνης

Μια εναλλακτική προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί σε μεθόδους τοπολογικής ανάλυσης είναι η χρήση του τομέα δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain, BAD) από την αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού (Consler *et al.*, 1993) ως μορίου αναφοράς σε γονιδιακές χίμαιρες. Εφόσον το ένζυμο που καταλύει την βιοτινυλίωση του τομέα αυτού είναι κυτταροπλασματικό (λιγάση της βιοτίνης, biotin ligase), η βιοτινυλίωση *in vivo* (που μπορεί να ανιχνευθεί, στη συνέχεια, με δέσμευση του χιμαιρικού μορίου σε σφαιρίδια αβιδίνης) θα

συμβαίνει μόνο όταν η αλληλουχία του τομέα BAD εισάγεται σε κυτταροπλασματικές περιοχές της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης υπό μελέτη και όχι στην περίπτωση που ο τομέας BAD «βλέπει» προς το περίπλασμα. Η αρχή αυτή εφαρμόστηκε, με περιορισμένη επιτυχία, στην τοπολογική ανάλυση του μεταφορέα λακτόζης LacY, αποκαλύπτοντας δύο κυτταροπλασματικές συνδετικές περιοχές (loops) του μορίου αυτού (Zen *et al.*, 1995).

1.5.2.1.4 Συνδυασμοί δύο γονιδίων αναφοράς

Μεγάλος αριθμός τοπολογικών μοντέλων για μεμονωμένες πρωτεΐνες (μεταφορείς) έχουν ελεγχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό με συνδυασμό μελετών γονιδιακής σύντηξης με αλκαλική φωσφατάση και β-γαλακτοσιδάση (Eitinger and Friedrich, 1994; LeBlanc and Beatty, 1996; Haardt and Bremer, 1996; Jung, 1998; Jung *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1992), ενώ συνδυασμός αλκαλικής φωσφατάσης και GFP έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για ενδεικτική ανάλυση της τοπολογικής πρόβλεψης πολλών πρωτεϊνών ταυτόχρονα, σε ολιστικού τύπου εφαρμογές (high-throughput) (Daley *et al.*, 2005; Rapp *et al.*, 2006, 2007).

1.5.2.1.5 Ολιστικές πρωτεωμικές προσεγγίσεις

Στρατηγικές γονιδιακής σύντηξης, με συνδυασμό GFP και αλκαλικής φωσφατάσης ως μορίων-δεικτών της κυτταροπλασματικής και περιπλασματικής τοπολογίας, αντίστοιχα, του C-τελικού άκρου, εφαρμόστηκαν πρόσφατα σε όλο το μεμβρανικό πρωτέωμα της *E. coli* K-12 (Daley *et al.*, 2005). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών, εκτός του ότι έδωσαν πειραματική μαρτυρία για την τοποθέτηση του C-τελικού άκρου ενός μεγάλου αριθμού πολυτοπικών μεμβρανικών πρωτεϊνών της *E. coli* και βακτηριακών ομολόγων τους (Granseth *et al.*, 2005), έδειξαν και την ύπαρξη διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών, όπως των πρωτεϊνών διπλής τοπολογίας (dual topology) (Rapp *et al.*, 2006) και παρείχαν σημαντικές ενδείξεις για την εξέλιξη των πολυτοπικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω διπλασιασμών και γονιδιακής απόκλισης (Rapp *et al.*, 2007).

1.5.2.2 Στρατηγικές ελέγχου προσβασιμότητας (accessibility analysis)

Οι στρατηγικές προσβασιμότητας εκμεταλλεύονται τις ελάχιστες έως μηδαμινές τιμές συντελεστών διαμερισμού (partition coefficients) υδρόφιλων μορίων στο περιβάλλον της μεμβράνης, ώστε να ελεγχθεί η διευθέτηση των εξωτερικών ή εσωτερικών περιοχών μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης βάσει της προσβασιμότητάς τους σε υδρόφιλα αντιδραστήρια. Κατά κανόνα, αυτές οι στρατηγικές συνδυάζονται με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση, η οποία εισάγει κατάλληλα αμινοξέα ή αλληλουχίες-στόχους, π.χ. σήματα *N*-γλυκοζυλίωσης, κατάλοιπα κυστεΐνης, επιτόπους αντισωμάτων, ή αλληλουχίες αναγνώρισης πρωτεολυτικών ενζύμων, που μπορούν να αναγνωρισθούν από ειδικά υδρόφιλα αντιδραστήρια, π.χ. γλυκοσιδάσες, υδρόφιλα μηλεΐμια, αντισώματα, ή πρωτεολυτικά ένζυμα. Η στρατηγική προσβασιμότητας που έχει εφαρμοσθεί συστηματικότερα στην τοπολογική ανάλυση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς είναι η Ανάλυση Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (Substituted Cysteine Accessibility Method, SCAM) η οποία βασίζεται στη χρήση μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνών και υδρόφιλων MTS-αντιδραστηρίων (Akabas *et al.*, 1992).

1.5.2.2.1 Χαρτογράφηση γλυκοζυλίωσης

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, φαινόμενα *N*-γλυκοζυλίωσης απαντώνται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου το ένζυμο ολιγοσακχαρική τρανσφεράση (OST) προσθέτει ολιγοσακχαρίτες στην αμινομάδα των καταλοίπων ασπαραγίνης (Asn) της συναινετικής αλληλουχίας Asn-X-Thr/Ser (Welply *et al.*, 1983). Η *N*-γλυκοζυλίωση είναι μια κοινή διαδικασία για τις ευκαρυωτικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που συντελείται μόνον εφόσον η συναινετική αλληλουχία-σήμα γλυκοζυλίωσης είναι προσανατολισμένη προς τον αυλό του ΕΔ δηλ. «εξωκυτταρικά». Επομένως, έλεγχος της εξωτερικής ή εσωτερικής εντόπισης μεγάλων υδρόφιλων συνδετικών περιοχών (loops) ευκαρυωτικών μεταφορέων μπορεί να γίνει με εισαγωγή σημάτων *N*-γλυκοζυλίωσης και διαγνωστικό έλεγχο με γλυκοσιδάση. Χαρτογράφηση γλυκοζυλίωσης έχει χρησιμοποιηθεί, μεταξύ άλλων, σε μια ολιστική τοπολογική ανάλυση του προσανατολισμού των C-τελικών άκρων του μεμβρανικού πρωτεώματος του σακχαρομύκητα *C. serevisiae* (Kim *et al.*, 2006) καθώς και σε αρκετές ευκαρυωτικές πρωτεΐνες μεταφοράς, μεταξύ των οποίων, πρόσφατα, στον μεταφορέα hSVCT1 (ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2 από

τον άνθρωπο, βλ. εδάφιο 1.3.3) (Velho and Jarvis, 2009). Η εφαρμογή των αναλύσεων γλυκοζυλίωσης δεν μπορεί να δώσει από μόνη της μια διεξοδική εικόνα της τοπολογίας γιατί περιορίζεται στην ανάλυση ορισμένων μόνο, σχετικά μεγάλων συνδετικών περιοχών. Επίσης, εφαρμόζεται μόνο σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες.

1.5.2.2.2 Επίτοποι αντισωμάτων

Σε ορισμένες πειραματικές διαδικασίες ανάλυσης της τοπολογίας μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται αντιγονικοί επίτοποι που εισάγονται σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση και εξετάζονται ως προς την προσβασιμότητά τους στα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα. Αντιγονικοί επίτοποι που έχουν χρησιμοποιηθεί σε τέτοιες αναλύσεις είναι ο επίτοπος της αιμαγλουτινίνης του ιού της γρίπης (Kast *et al.* 1996), ο επίτοπος FLAG (Lewis *et al.*, 2001) και ο επίτοπος Myc (Chang and Bush, 1997). Ως χαρακτηριστικά παραδείγματα, ο επίτοπος της αιμαγλουτινίνης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της διαμεμβρανικής τοπολογίας της Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης (Canfield *et al.*, 1996), και ο επίτοπος FLAG για την ανάλυση της τοπολογίας της πρωτεΐνης-1, ενός μεταφορέα λιπαρών οξέων (Eckhardt *et al.*, 1999). Η μέθοδος αυτή έχει περιορισμούς, κυρίως λόγω περιπτώσεων μειωμένης αντιδραστικότητας μεταξύ αντιγονικού επιτόπου και αντισώματος, μπορεί ωστόσο να βελτιωθεί με την εισαγωγή πολλαπλών αντιγράφων του επιτόπου στη σειρά (in tandem) μέσα στη μεμβρανική πρωτεΐνη. Το ίδιο ισχύει σε γενικές γραμμές και για την μέθοδο της εισαγωγής αλληλουχιών αναγνώρισης πρωτεασών, όπως του παράγοντα Xa (Sahin-Tóth *et al.*, 1995a), που αναφέρεται στη συνέχεια.

1.5.2.2.3 Περιοριστική πρωτεόλυση

Όπως όλες οι πρωτεΐνες, έτσι και οι μεμβρανικές διαθέτουν εγγενείς θέσεις αναγνώρισης πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως π.χ. τρυψίνης. Πρωτεολυτικά ένζυμα που προστίθενται εξωγενώς δεν μπορούν να διαπεράσουν τη μεμβράνη: επομένως, θέσεις αναγνώρισης που βρίσκονται σε κυτταροπλασματικά τμήματα προστατεύονται από την πρωτεολυτική σχάση, ενώ αυτές που εκτίθενται προς το εξωτερικό του κυττάρου είναι προσβάσιμες. Η απλούστερη εφαρμογή της

αρχής αυτής για τοπολογική ανάλυση θα ήταν η δοκιμασία πρωτεολυτικής διάσπασης με κοινά ένζυμα, π.χ. τρυψίνη, για τα οποία αναμένεται να υπάρχουν εγγενείς θέσεις αναγνώρισης μέσα στην πρωτεΐνη και, στη συνέχεια, ανάλυση της αλληλουχίας των πρωτεολυτικών θραυσμάτων (π.χ. με φασματομετρία μαζών). Ωστόσο, τέτοιου είδους εφαρμογές δίνουν ασαφή αποτελέσματα γιατί προκύπτουν αρκετά πρωτεολυτικά τμήματα λόγω των πολλών θέσεων αναγνώρισης και η ευαισθησία στην πρωτεάση ποικίλλει ανάλογα με την τοπική δομή γύρω από τη θέση αναγνώρισης (Fimmel *et al.*, 1989). Σε μελέτες τοπολογίας, έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως περιοριστική πρωτεόλυση με ειδικές πρωτεάσες (π.χ. θρομβίνη ή παράγοντα Xa), μετά από εισαγωγή με *μεταλλαξιγένεση* των αντίστοιχων θέσεων αναγνώρισης (π.χ. του τετραπεπτιδίου Ile-Glu-Gly-Arg για αναγνώριση από τον παράγοντα Xa) στις υπό εξέταση περιοχές αλληλουχίας. Κοινό πρόβλημα από την εφαρμογή τοπολογικών αναλύσεων με *στοχευμένη* περιοριστική πρωτεόλυση είναι η περίπτωση μειωμένης ευαισθησίας της εισαγόμενης θέσης αναγνώρισης σε πρωτεολυτική διάσπαση, το οποίο μπορεί να αντιμετωπισθεί με εισαγωγή πολλαπλών αντιγράφων της θέσης αναγνώρισης στη σειρά (in tandem) (Sahin-Tóth *et al.*, 1995a). Η μέθοδος της περιοριστικής πρωτεόλυσης εφαρμόζεται συνήθως συμπληρωματικά με άλλες μεθόδους τοπολογικής ανάλυσης (π.χ., Velho and Jarvis, 2009) και σε λίγες περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί πιο συστηματικά και διεξοδικά, όπως στην περίπτωση της βακτηριοδοψίνης (Luecke *et al.*, 1999; Fimmel *et al.*, 1989).

1.5.2.2.4 Ανάλυση Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (SCAM)

Η Μέθοδος ελέγχου Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (Substituted Cysteine Accessibility Method, SCAM) συνδυάζεται άρρηκτα με την Μεταλλαξιγένεση Κυστεϊνικής Στόχευσης ή Κυστεϊνικής Σάρωσης (Cysteine-scanning Mutagenesis). Εισήχθη με συστηματικό τρόπο από την ερευνητική ομάδα του Arthur Karlin το 1990 και συνδέεται αρχικά με τη χρήση των ειδικών υδρόφιλων SH-αντιδραστηρίων MTSES⁻, MTSEA⁺ και MTSET⁺ τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά για την ανάλυση του υδρόφιλου πόρου του διαύλου-υποδοχέα ακετυλοχολίνης AchR (Akabas *et al.*, 1992) και, στη συνέχεια, για την ανάλυση της περμεάσης λακτόζης LacY (Duntzen *et al.*, 1993; Frillingos and Kaback, 1996a; Kwaw *et al.*, 2001). Ως στρατηγική τοπολογικής ανάλυσης, η μέθοδος SCAM έχει εμφανή πλεονεκτήματα, που αφορούν κυρίως τη δυνατότητα εφαρμογής τοπολογικής μελέτης με την ελάχιστη δυνατή

τροποποίηση του εγγενούς μακρομορίου (σημειακή μεταλλαξιγένεση για εισαγωγή μοναδικών καταλοίπων Cys σε συγκεκριμένες θέσεις) και την ευελιξία εφαρμογών καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί συνδυασμοί υδρόφιλων SH-αντιδραστηρίων. Για τους λόγους αυτούς, έχει εξελιχθεί σε μέθοδο επιλογής για την τοπολογική ανάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών, ιδιαίτερα όταν μπορεί να συνδυαστεί με κατασκευή λειτουργικών μακρομορίων χωρίς εγγενείς Cys (Cys-less transporters) και με άλλες αναλύσεις κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning analysis). Πράγματι, έχει εφαρμοσθεί έως σήμερα για την τοπολογική ανάλυση πολλών μεμβρανικών μεταφορέων (ενδεικτικά, Akabas *et al.*, 1992; Yan and Maloney, 1993; Loo and Clarke, 1995; Karlin and Akabas, 1998; van Geest and Lolkema, 2000; Ding and Wilson, 2001; Culham *et al.*, 2003; Cao and Matherly, 2004; Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Nanatani *et al.*, 2009). Στις αρχές της μεθόδου SCAM καθώς και στην μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης θα αναφερθούμε αναλυτικότερα στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο.

1.6 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) και Ανάλυση Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (Substituted Cysteine Accessibility Method, SCAM)

Η ειδική χημική τροποποίηση των σουλφυδρυλικών ομάδων των καταλοίπων κυστεϊνών (Cys) με SH-αντιδραστήρια αποτελεί μια δυναμική τεχνική για δομικές-λειτουργικές αναλύσεις στις μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς, η οποία, εκτός από μελέτες τοπολογίας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου δέσμευσης, την ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος της κάθε θέσης ή περιοχής καταλοίπων με συστοιχία διαφορετικών προσεγγίσεων (π.χ. λειτουργικές δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς, ανοσοαποτύπωση, αυτοραδιογραφία, φθορισμομετρία, ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό, φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR) και των αλλαγών διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση υποστρώματος ή άλλες αλλαγές συνθηκών (pH, ηλεκτροχημικό δυναμικό της μεμβράνης, δέσμευση αντισωμάτων, κλπ.), αλλά και για την εξέταση της σχετικής διευθέτησης ή «πακεταρίσματος» των διαμεμβρανικών ελίκων στην τριτοταγή δομή του μεταφορέα μέσω του ελέγχου της διασύνδεσης (cross linking) ζευγών Cys (Frillingos *et al.*, 1998). Αυτή η συστοιχία εφαρμογών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την στρατηγική της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής στόχευσης ή κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis), η οποία έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία στη μελέτη πολλών πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς. Όπως έχει φανεί καθαρά με το κλασικό παράδειγμα της περμεάσης λακτόζης LacY, η στρατηγική της κυστεϊνικής σάρωσης μπορεί να αποδειχθεί πολύ αποδοτική και να οδηγήσει σε χρήσιμα μοντέλα δομής-λειτουργίας (Frillingos *et al.*, 1998; Kaback *et al.*, 2001), που παραμένουν ικανοποιητικά ακόμη και μετά τις πιο πρόσφατες αναλύσεις των κρυσταλλικών δομών του μορίου (Guan and Kaback, 2006; Kaback *et al.*, 2007).

Η βέλτιστη εφαρμογή της μεθόδου της κυστεϊνικής σάρωσης απαιτεί ως υπόστρωμα τη δημιουργία λειτουργικών μορίων μεταφορέα χωρίς κατάλοιπα κυστεϊνών (μεταφορείς ελεύθεροι κυστεϊνών, Cys-less) (Frillingos *et al.*, 1998). Παρ' όλα αυτά, έχει αναφερθεί εφαρμογή της στρατηγικής κυστεϊνικής σάρωσης και με υπόστρωμα μεταφορείς που έχουν απαλλαχθεί από ορισμένες μόνο, όχι όλες, τις εγγενείς (native) κυστεΐνες (μεταφορείς απεμπλουτισμένοι κυστεϊνών, Cys-depleted), ιδιαίτερα για ευκαρυωτικούς μεταφορείς, που περιέχουν πολλά κατάλοιπα Cys, όπως ο συμμεταφορέας γλυκόζης-νατρίου hSGLT1 (Huntley *et al.*, 2004) και ο

μεταφορέας σεροτονίνης hSERT (Sato *et al.*, 2004). Τα συστήματα αυτά υστερούν, καθώς η ακριβής ερμηνεία των δεδομένων από πειράματα χημικής τροποποίησης των κυστεϊνών δυσχεραίνεται από την παρουσία των εγγενών καταλοίπων Cys. Ωστόσο, η κατασκευή πλήρως λειτουργικών μεταφορέων ελεύθερων κυστεϊνών είναι ευχερέστερη στα προκαρυωτικά βακτηριακά συστήματα, καθώς τα πολλά εγγενή κατάλοιπα Cys των ευκαρυωτικών μεταφορέων έχουν συχνά σημαντικούς ρόλους (Dom *et al.*, 2009) και δεν μπορούν να απαλειφθούν όλα χωρίς σημαντική απώλεια της ενεργότητας (βλ. και εδάφιο 1.3.3.3). Κατ' εξαίρεση, λειτουργικά μεταλλάγματα ελεύθερα κυστεϊνών (Cys-less) έχουν αναφερθεί για έξι ευκαρυωτικούς μεταφορείς, δύο από τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* (Berhe *et al.*, 2001; Hatanaka *et al.*, 2001), δύο από τον πολυκυτταρικό ασκομύκητα *A. nidulans* (Unkles *et al.*, 2005; Kafasla *et al.*, 2007), και δύο μεταφορείς του ανθρώπου με φαρμακολογικό/βιοϊατρικό ενδιαφέρον, την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (MDR1) (Loo and Clarke, 1995) και την πρωτεΐνη της κυστικής ίνωσης (CFTR) (Cui *et al.*, 2006; Loo and Clarke, 2006).

Παράλληλα με την στρατηγική της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης, αναπτύχθηκε και η μέθοδος ανάλυσης προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM), που σχεδιάστηκε και πρωτοεφαρμόστηκε με συστηματικό τρόπο από την ομάδα του Arthur Karlin (Akabas *et al.*, 1992; Karlin and Akabas, 1998; Karlin, 2001) (βλ. και εδάφιο 1.5.2.2.4). Η μέθοδος SCAM συνδέεται με τη χρήση υδρόφιλων SH-αντιδραστηρίων, που δεν διαπερνούν τη μεμβράνη, για την εξέταση όχι μόνο της γενικής τοπολογικής οργάνωσης των μεταφορέων που εξετάζονται (εδάφιο 1.5.2.2.4) αλλά και για την χαρτογράφηση των υδρόφιλων πόρων ή θυλάκων (clefts) μέσα στη μεμβράνη που είναι προσβάσιμοι από το υδρόφιλο περιβάλλον, η οποία άλλωστε ήταν και μία από τις αρχικές της εφαρμογές (Akabas *et al.*, 1992; Ye and Maloney, 1993). Τα υδρόφιλα SH-αντιδραστήρια που πρωτοχρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις SCAM ήταν τα MTSES⁻, MTSEA⁺ και MTSET⁺ (Akabas *et al.*, 1992; Dunten *et al.*, 1993). Πρόκειται για αντιδραστήρια που αλκυλιώνουν τα κατάλοιπα Cys δημιουργώντας μικτά δισουλφίδια μέσω της ομάδας του μεθανοθειοσουλφονικού (MTS) που είναι η ενεργός τους ομάδα (Toronto Research Chemicals; <http://www.trc-canada.com>). Συγχρόνως, φέρουν τις θετικά ή αρνητικά φορτισμένες ομάδες αιθυλοσουλφονικού (ES⁻), αιθυλαμμωνίου (EA⁺) ή αιθυλ-τριμεθυλαμμωνίου (ET⁺) που προσδίδουν τον ισχυρά πολικό, υδρόφιλο χαρακτήρα τους.

1.6.1 Αρχές της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης και της μεθόδου SCAM

Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης βασίζεται στην δημιουργία μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης σε συγκεκριμένες θέσεις του υπό εξέταση μορίου, ειδική χημική τροποποίησή τους με κατάλληλα SH-αντιδραστήρια και έλεγχο τους με βιοχημικές ή βιοφυσικές τεχνικές. Η μεγάλη ανάπτυξη των μεθοδολογιών κυστεϊνικής σάρωσης για εφαρμογές σε πολυτοπικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς στηρίζεται (1) στην διαθεσιμότητα ολοένα και περισσότερων λειτουργικών μεταλλαγμάτων μεταφορέων ελεύθερων κυστεϊνών (Cys-less), (2) στην διαθεσιμότητα μιας πληθώρας εναλλακτικών SH-αντιδραστηρίων που μπορούν να εξυπηρετήσουν πολλές διαφορετικές εφαρμογές, τα οποία διατίθενται ως βασική ομάδα προϊόντων από γνωστές εταιρείες (π.χ. Molecular Probes, Toronto Research Chemicals), (3) στην ανάπτυξη μιας συστοιχίας πολλών διαφορετικών τεχνικών προσεγγίσεων «σημειακής στόχευσης» (site-directed techniques) τα τελευταία χρόνια (Guan and Kaback, 2006), (4) στην μικρή παραγωγή κρυσταλλικών δομών υψηλής ευκρίνειας για διαμεμβρανικούς μεταφορείς, ένα κενό που «συμπληρώθηκε» ουσιαστικά, σε σημαντικό βαθμό, από τις αναλύσεις κυστεϊνικής σάρωσης (Kaback *et al.*, 2001, 2007). Οι αναλύσεις με την στρατηγική αυτή μπορούν να δώσουν πολύ σημαντικά δεδομένα για την δομή, τις σχέσεις δομής-λειτουργίας και την δυναμική των διαμορφώσεων του εξεταζόμενου μεταφορέα (Frillingos *et al.*, 1998; Guan and Kaback, 2006), γι αυτό και υπερτερούν έναντι άλλων προσεγγίσεων συστηματικής μεταλλαξιγένεσης, όπως είναι η μεταλλαξιγένεση σάρωσης αλανινών (Ala-scanning mutagenesis) (Cunningham and Wells, 1989; Morrison and Weiss, 2001).

Στα πλαίσια της στρατηγικής των αναλύσεων κυστεϊνικής σάρωσης, αναπτύχθηκαν τα τελευταία 15-20 χρόνια πολλές διαφορετικές μέθοδοι ανάλυσης που αφορούν στοχευμένες τροποποιήσεις κυστεϊνών για την εξέταση διαφορετικών «πλευρών» των σχέσεων δομής-λειτουργίας των διαμεμβρανικών μεταφορέων. Για παράδειγμα, αναπτύχθηκαν εφαρμογές φθορισμομετρίας σημειακής στόχευσης (site-directed fluorescence spectroscopy) που χρησιμοποιούν το αντιδραστήριο MIANS για εξέταση του μικροπεριβάλλοντος μιας συγκεκριμένης κυστεϊνης μέσα στο μόριο (Wu and Kaback, 1994) ή το μηλεϊμίδιο πυρενίου (pyrene maleimide) για εξέταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ζευγών κυστεϊνών (Jung, K., *et al.*, 1993), εφαρμογές ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) μετά από σημειακή στόχευση με σήματα ιδιοστροφορμής (σπιν) (site-directed spin labeling, SDSL) για την εξέταση της δυναμικής και της τοπικής δευτεροταγούς δομής σε συγκεκριμένες θέσεις κυστεϊνών (Voss

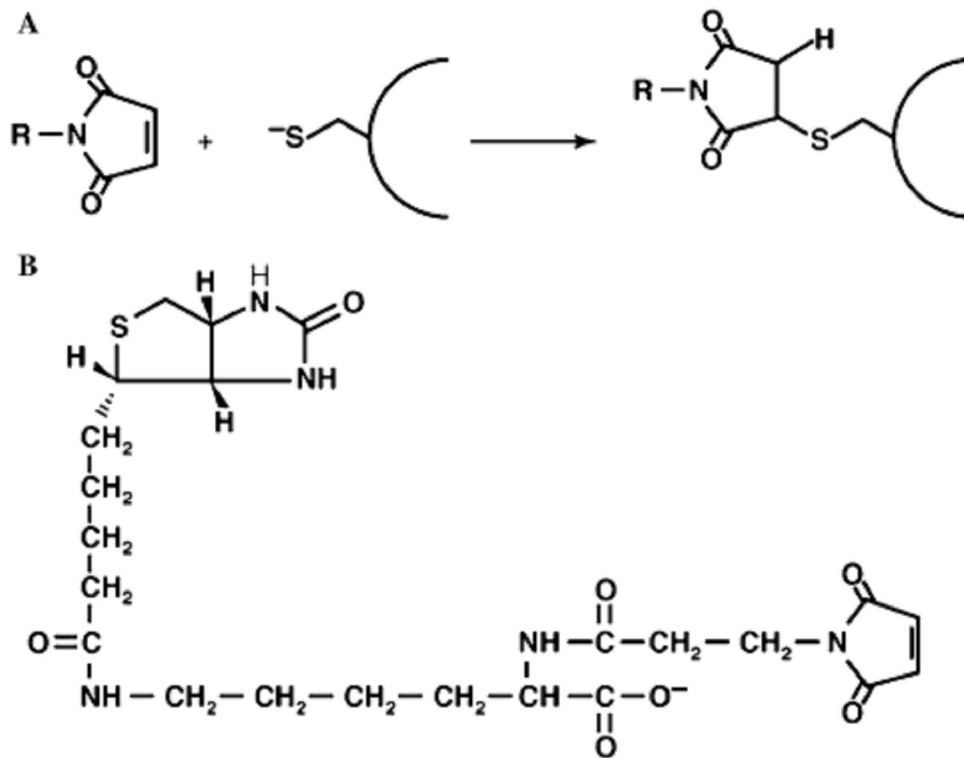
et al., 1996, 1997), απλοποιημένες εφαρμογές χημικής διασύνδεσης κυστεϊνών (site-directed cross linking) για εξέταση του «πακεταρίσματος» των διαμεμβρανικών ελίκων (Wu and Kaback, 1996; Sorgen *et al.*, 2002) και εφαρμογές ραδιενεργού σήμανσης in situ (site-directed labeling) για την εξέταση της διαμόρφωσης και της ανταπόκρισης συγκεκριμένων θέσεων κυστεϊνών στη δέσμευση υποστρώματος (Frillingos and Kaback, 1996a; Guan and Kaback, 2007). Η αρχική, ωστόσο, μεθοδολογία σημειακής στόχευσης που αναπτύχθηκε και η οποία ουσιαστικά «εγκαινίασε» την εισαγωγή των αναλύσεων κυστεϊνικής σάρωσης στις μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι η Μέθοδος ανάλυσης της Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (Substituted Cysteine Accessibility Method, SCAM), για την εξέταση της τοπολογικής οργάνωσης και της τοπογραφίας υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών του μεμβρανικού μορίου, με χρήση ιδιαίτερα πολικών, υδρόφιλων SH-αντιδραστηρίων που δεν διαπερνούν τη μεμβράνη (Akabas *et al.*, 1992) (εδάφιο 1.5.2.2.4). Θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι ο όρος SCAM αφορά τη χρήση σημειακής αλκυλίωσης κυστεϊνών με *υδρόφιλα* και μόνο SH-αντιδραστήρια, όπως τα MTSES⁻, MTSEA⁺ και MTSET⁺ (Akabas *et al.*, 1992; Dunten *et al.*, 1993; Ye and Maloney, 1993), ή συνδυασμό των υδρόφιλων αντιδραστηρίων με άλλα (π.χ. ραδιενεργό [¹⁴C]NEM ή το φθορίζον OGM) που είναι απαραίτητα για την αποκάλυψη του ειδικού αλκυλιωτικού σήματος με ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία, φθορισμομετρία ή ανοσοαποτύπωση. Σε κάθε περίπτωση, στόχος της SCAM είναι η αποκάλυψη της σχετικής *προσβασιμότητας* περιοχών της μεμβρανικής πρωτεΐνης από το υδρόφιλο περιβάλλον. Όπως και οι άλλες αναλύσεις σημειακής στόχευσης, η μέθοδος SCAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ακέραια κύτταρα (Dunten *et al.*, 1993; Loo and Clarke, 1995; van Geest and Lolkema, 2000; Bogdanov *et al.* 2002; Sato *et al.*, 2004), σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού ή ανεστραμμένου προσανατολισμού (Frillingos and Kaback, 1996a; Olami *et al.*, 1997; Lutsenko *et al.*, 1997; Meuller and Rydstrom, 1999; Bogdanov *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2007), σε απομονωμένα οργανίδια από κύτταρα (π.χ. μιτοχόνδρια) (Joseph-Liauzun *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999), ή και σε απομονωμένες πρωτεΐνες αναδιατεταγμένες σε λιποσώματα (Knol *et al.*, 1996; Fu and Maloney, 1998; Wang *et al.*, 2002).

1.6.1.1 Ειδικά –SH-αντιδραστήρια και σήμανση κυστεϊνών

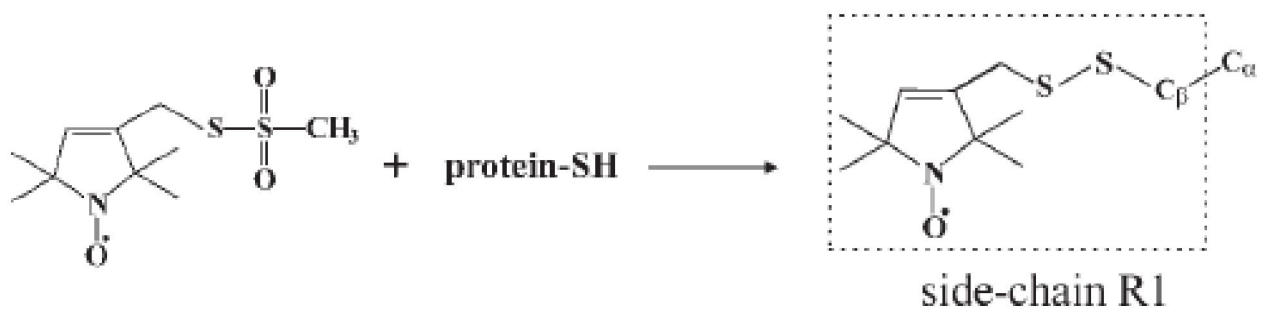
Ξεκινώντας από το *N*-αιθυλομηλεϊμίδιο (NEM), που πρωτοχρησιμοποιήθηκε για την κατανόηση της λειτουργίας της περμεάσης λακτόζης της *E. coli* (Fox, C. and Kennedy, 1965; Kaback, 1983) ή από τα MTS-αντιδραστήρια που πρωτοχρησιμοποιήθηκαν για μελέτες SCAM του διαύλου-υποδοχέα ακετυλοχολίνης (Akabas *et al.*, 1992; Karlin, 2001), έχουμε σήμερα μια ανεξάντλητη σειρά ειδικών SH-αντιδραστήριων για σήμανση κυστεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολύπλευρες μελέτες κυστεϊνικής σάρωσης και σημειακής στόχευσης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τις αναλύσεις σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς ανήκουν κυρίως σε δύο χημικές κατηγορίες, τα μηλεϊμίδια (maleimides) (**Εικόνα 1.15**) και τα αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού (MTS-reagents) (**Εικόνα 1.16**) (Molecular Probes, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>) (Toronto Research Chemicals; <http://www.trc-canada.com>). Τα μηλεϊμίδια αντιδρούν με την ιοντισμένη μορφή της σουλφυδρυλομάδας σχηματίζοντας θειοαιθέρες (Molecular Probes) (Εικόνα 1.15A), ενώ τα MTS-αντιδραστήρια (Toronto Research Chemicals), όπως και τα ιωδοακεταμίδια (Molecular Probes), σχηματίζουν μικτά δισουλφίδια (Εικόνα 1.16).

Μηλεϊμίδια (maleimides)

Είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα SH-αντιδραστήρια. Μία σειρά από μηλεϊμίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για ειδική σήμανση κυστεϊνών σε αναλύσεις σχέσεων δομής-λειτουργίας μεμβρανικών μεταφορέων. Αυτά ποικίλλουν ως προς τον υδρόφιλο/υδρόφοβο χαρακτήρα τους, τον όγκο της χημικής ομάδας, την ευελιξία της αλυσίδας, την ιδιαίτερη σήμανση π.χ. με ραδιενέργεια, φθορισμό, σήματα ιδιοστροφορμής (spin), κλπ. Μηλεϊμίδια έχουν χρησιμοποιηθεί σε φασματοσκοπικές εφαρμογές, όπως φθορισμομετρία σημειακής στόχευσης (site-directed fluorescence spectroscopy) (Wu and Kaback, 1994; Jung, K., *et al.*, 1993) ή ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό (EPR) (site-directed spin labeling, SDSL) (Voss *et al.*, 1996), σε εφαρμογές χημικής διασύνδεσης ζευγών κυστεϊνών (site-directed cross linking) (Wu and Kaback, 1996), ραδιενεργού σήμανσης in situ (site-directed labeling) (Frillingos and Kaback, 1996a), αλλά ακόμη και σε αναλύσεις τοπολογίας με μεθόδους SCAM (Falke *et al.*, 1988; Loo and Clarke, 1995; Valiyaveetil and Fillingame, 1998; Bogdanov *et al.*, 2005; Zhou, Y., *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.15 Μηλειμίδια. **A)** Η αντίδραση αλκυλίωσης ενός μηλειμιδίου **B)** Η δομή του βιοτινυλιωμένου μηλειμιδίου MPB (Bogdanov *et al.*, 2005). Το MPB έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες προσβασιμότητας με αντίχενωση σε ανάλυση Western με αβιδίνη-HRP.



Εικόνα 1.16 MTS-αντιδραστήρια. Η αντίδραση του MTS-SL [που φέρει σήμα ιδιοστροφορμής (spin label, SL) στην ομάδα νιτροξειδίου] με την πρωτεΐνη στόχο. Το MTS-SL χρησιμοποιείται σε αναλύσεις SDSL με EPR.

Για τοπολογικές μελέτες χρησιμοποιούνται μηλεϊμίδια που είναι αφενός ανιχνεύσιμα (π.χ. με κατάλληλο αντίσωμα) και αφετέρου δεν διαπερνούν τη μεμβράνη, ή τουλάχιστον είναι ικανά να τη διαπεράσουν αλλά με πολύ αργό ρυθμό διαμερισμού (partition). Τέτοια μηλεϊμίδια είναι κυρίως ορισμένα μηλεϊμίδια συνδεδεμένα με βιοτίνη, όπως το 3-(N-maleimidylpropionyl) biocytin (MPB ή BM) (**Εικόνα 1.15B**) και το (+)-biotinyl 3-3-maleimidopropionomidyl-3,6-dioxaoctanediamine (MPEOB). Δεν διαπερνούν σε σημαντικό βαθμό τη μεμβράνη και, παράλληλα, είναι εύκολα ανιχνεύσιμα μετά από SDS-PAGE και ανάλυση Western με αβιδίνη-HRP (Loo and Clarke, 1995; Matos *et al.*, 1996). Τα αντιδραστήρια MPB και MPEOB έχουν χρησιμοποιηθεί π.χ. για τη μελέτη του προσανατολισμού της PheP σε συνδυασμό με αλλαγές στη σύσταση των λιπιδίων στη μεμβράνη της *E. coli* (Zhang *et al.*, 2003) ή του γενικού προσανατολισμού των διαμεμβρανικών τμημάτων της περμεάσης λακτόζης (LacY) (Wang *et al.*, 2002). Το MPB είναι πιο υδρόφιλο από το MPEOB και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες τοπολογίας (Loo and Clarke, 1995; Jung *et al.*, 1998; Fann *et al.*, 1998; Gotoh *et al.*, 1999; Grunewald *et al.*, 2002; Cao and Matherly, 2004). Ωστόσο, η χρήση του MPB δεν ήταν συχνά επαρκής από μόνη της για την ανάλυση της τοπολογίας αλλά συνδυάστηκε με τη χρήση άλλων μηλεϊμιδίων, όπως του 4-Acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS ή SM), που είναι αρκετά υδρόφιλο, ογκώδες, και αρνητικά φορτισμένο και δεν φαίνεται να διαπερνά την βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη ή την μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων (van Geest and Lolkema, 2000; Jung *et al.*, 1998; Leng *et al.*, 1999; Fujihiri *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2002).

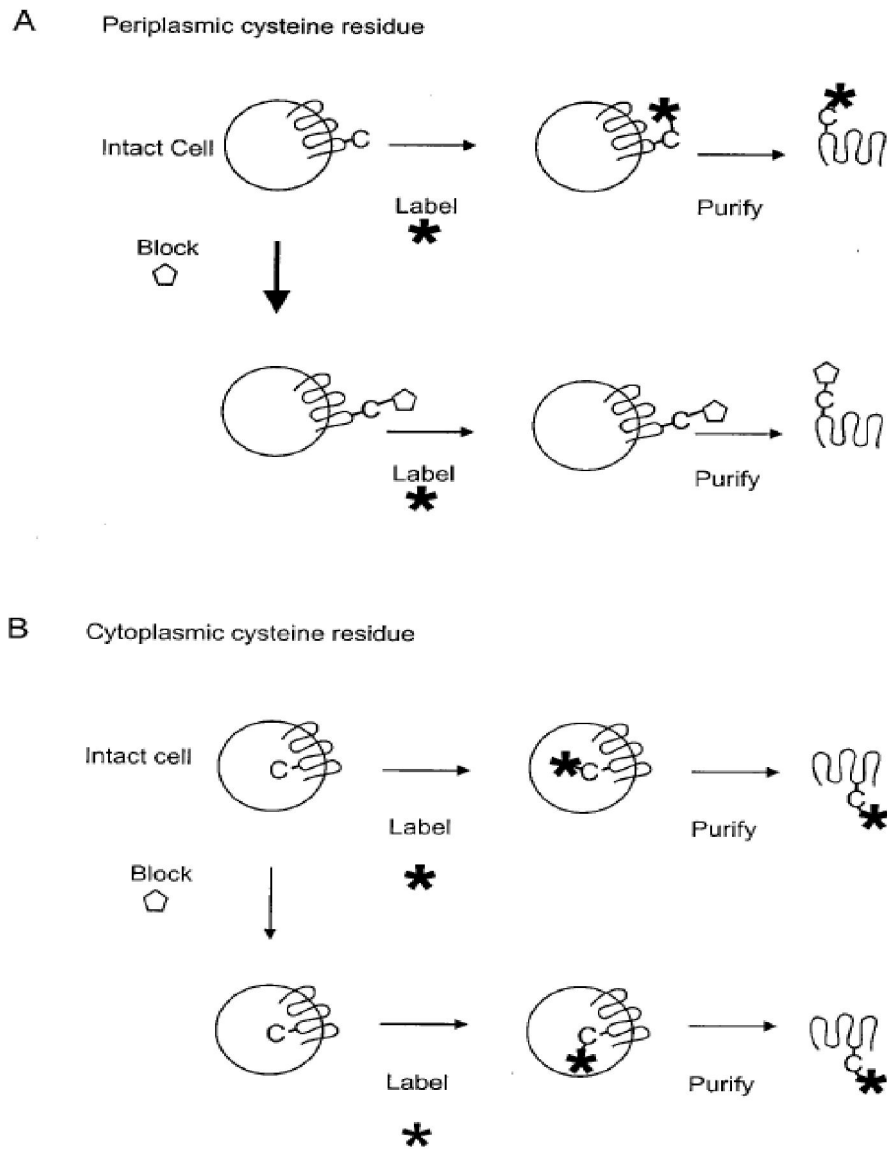
Μια άλλη κατηγορία μηλεϊμιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τοπολογικές μελέτες είναι φθορίζοντα μηλεϊμίδια, όπως το μηλεϊμίδιο φλουορεσεΐνης (FM, fluoresceine maleimide) (Valiyaveetil and Fillingame, 1998; Mueller *et al.*, 1999; Poelarends and Konings, 2002): το πλεονέκτημα του FM είναι ότι εκπέμπει ενέργεια φθορισμού που μπορεί να εντοπιστεί άμεσα μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Έχει δειχθεί ότι κυστεΐνες σε διαμεμβρανικά τμήματα δεν σημαίνονται, ενώ αντίθετα κυστεΐνες σε υδρόφιλα τμήματα των πρωτεϊνών σημαίνονται από το FM (Poelarends and Konings 2002; Valiyaveetil and Fillingame, 1998). Ένα ακόμα φθορίζον ειδικό αντιδραστήριο που έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) είναι το πράσινο μηλεϊμίδιο του Όρεγκον (OGM 488 Oregon Green Maleimide) (Fu and Maloney, 1998; Ye *et al.*, 2001; Culham *et al.*, 2003; Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Nanatani *et al.*, 2009), το οποίο, ωστόσο,

χρησιμοποιείται συνήθως συμπληρωματικά με άλλα SH-αντιδραστήρια (Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Karatza *et al.*, 2006). Επίσης, τελευταία, αναπτύχθηκε ένα νέο πρωτόκολλο SCAM, που χρησιμοποιεί το φθορίζον αντιδραστήριο TMRM, και χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη προσβασιμότητας του κέντρου δέσμευσης της περμεάσης λακτόζης LacY (Zhou, Y., *et al.*, 2008).

Η επιλογή των μηλεϊμιδίων για τοπολογικές αναλύσεις προσβασιμότητας (SCAM) έχει συχνά αμφισβητηθεί, γιατί τα μηλεϊμίδια που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι δυνατόν να διαπερνούν τη μεμβράνη, όταν χρησιμοποιούνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και μεγάλους χρόνους επώασης. Συνήθως, ιδανικότερη επιλογή είναι τα αντιδραστήρια MTSES⁻, MTSEA⁺ και MTSET⁺ που ανήκουν στην ομάδα των MTS-αντιδραστηρίων (βλ. παρακάτω) και δεν διαπερνούν τη μεμβράνη καθόλου, ιδίως το MTSES⁻ (Kwaw *et al.*, 2001). Βασικό μειονέκτημα, όμως, των MTS-αντιδραστηρίων είναι ότι δεν μπορούν να ανιχνευθούν απευθείας, παρά μόνον έμμεσα. Επομένως, και σε αυτές τις περιπτώσεις εφαρμογής της μεθοδολογίας SCAM, για την ανίχνευση του ειδικού SH-σήματος χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά ορισμένα μηλεϊμίδια που είναι εύκολα ανιχνεύσιμα (π.χ. FM, MPB, OGM ή ραδιενεργά σεσημασμένο NEM), μετά από επώαση σε κατάλληλες συνθήκες, π.χ. υψηλή συγκέντρωση αντιδραστηρίου ή αποδιάταξη των μεμβρανικών πρωτεϊνών, ώστε να σημανθούν όλες οι κυστεΐνες που έχουν απομείνει ελεύθερες (δεν έχουν δεσμεύσει το αντιδραστήριο MTS) (Frillingos and Kaback, 1996a; Olami *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1998; van Geest and Lolkema, 2000; Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Guan and Kaback, 2007). Ένα γενικό πρωτόκολλο για τέτοιου είδους μελέτη φαίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 1.17**.

Αν και δεν έχουν άμεσα χρησιμοποιηθεί σε τοπολογικές αναλύσεις, ορισμένα μηλεϊμίδια μπορούν να δώσουν επίσης μια αδρή χαρτογράφηση της σχετικής προσβασιμότητας των κυστεϊνικών καταλοίπων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *N*-αιθυλομηλεϊμίδιο (NEM) που μπορεί να διαπερνά τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα αλλά αντιδρά ταχύτερα με τις κυστεΐνες που είναι εκτεθειμένες σε υδρόφιλο περιβάλλον, ιδιαίτερα αυτές που σκιαγραφούν το κέντρο δέσμευσης και μεταφοράς υποστρώματος (Frillingos *et al.*, 1997a,b; Frillingos and Kaback, 1996a,b, 1997; Nie *et al.*, 2007; Kaback *et al.*, 2007). Η εφαρμογή συστηματικών αναλύσεων ελέγχου της προσβασιμότητας και της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση μεταλλαγμάτων κυστεϊνών από το αντιδραστήριο NEM έχει οδηγήσει σε πολύ σημαντικά αποτελέσματα, τόσο για την περμεάση λακτόζης όπου πρωτοεφαρμόσθηκε (Frillingos *et al.*, 1998; Kaback *et al.*,

2007), όσο και για μια σειρά άλλων μεταφορέων δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς (Tamura *et al.*, 2001; Grunewald *et al.*, 2002; Karatza *et al.*, 2006; Tavoulari and Frillingos, 2008).



Εικόνα 1.17 Σχηματική απεικόνιση πρωτοκόλλου μελέτης προσβασιμότητας κυστεϊνών σε βακτηριακές μεμβρανικές πρωτεΐνες. (A) κυστεΐνη που εδράζεται περιπλασματικά και (B) κυστεΐνη που εδράζεται κυτταροπλασματικά, σε ακέραια κύτταρα. Τα κύτταρα επώάζονται αρχικά με ένα μη ανιχνεύσιμο -SH-ειδικό αντιδραστήριο που δεν διαπερνά τη μεμβράνη, και στη συνέχεια γίνεται επώαση με ένα διαπερατό και ανιχνεύσιμο αντιδραστήριο (van Geest and Lolkema, 2000).

Από τα μηλεϊμίδια που έχουν χρησιμοποιηθεί σε άλλες εφαρμογές, αξίζει να σημειωθεί η χρήση του φθορίζοντος αντιδραστηρίου 2-[(4'-maleimidyl)anilino]naphthalene-6-sulfonic acid (MIANS) για φθορισμομετρική ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος των κυστεϊνών σε παρασκευάσματα απομονωμένων μεμβρανικών μεταφορέων: το MIANS προσδίδει εξωγενώς ένα φθορίζον σήμα στο κατάλοιπο κυστεϊνης που εξετάζεται, το οποίο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις αλλαγές πολικότητας του πρωτεϊνικού μικροπεριβάλλοντος (Molecular Probes), και μπορεί να ανιχνεύσει τόσο την περίπτωση θέσεων καταλοίπων που βρίσκονται στο κέντρο δέσμευσης (Wu and Kaback, 1994) όσο και την περίπτωση σημαντικών αλλαγών διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση υποστρώματος και αντανακλώνται με την μετατόπιση συγκεκριμένων θέσεων προς περισσότερο ή λιγότερο πολικό περιβάλλον (Wu et al., 1994, 1995; Frillingos et al., 1997c). Αν και οι μελέτες αυτές έγιναν σε απομονωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη και, μάλιστα, σε διαλυτή μορφή δηλ. σε αραιό διάλυμα απορρυπαντικού (n-δωδεκυλομαλτοσιδίου, DDM), τα αποτελέσματα ήταν πλήρως συμβατά με την εικόνα των δεδομένων *in vivo* ή *in situ*, δηλ. από τις αναλύσεις του μεμβρανικού μεταφορέα στο φυσικό του περιβάλλον (Wu et al., 1995; Wang et al., 1997; He and Kaback, 1998; Smirnova and Kaback, 2003; Smirnova et al., 2006, 2008).

Αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού (MTS-reagents)

Τα αντιδραστήρια MTS (MTS-reagents) σχεδιάστηκαν και πρωτοχρησιμοποιήθηκαν για μελέτες SCAM διαμεμβρανικών μεταφορέων (εδάφιο 1.5.2.2.4) και, αρχικά, για την χαρτογράφηση του υδρόφιλου πόρου του διαύλου-υποδοχέα ακετυλοχολίνης, AchR (Akabas et al., 1992). Αν και οι πιο γνωστές εφαρμογές τους αφορούν τις τοπολογικές αναλύσεις προσβασιμότητας (SCAM) με τα ισχυρά πολικά και υδρόφιλα sodium 2-**sulfonatoethyl** methanethiosulfonate (MTSES⁻) (Ye and Maloney, 1993; Frillingos and Kaback, 1996a; Kwaw et al., 2001), 2-**aminoethyl** methanethiosulfonate bromide (MTSEA⁺) (Fujinaga et al., 1998; Ding and Wilson, 2001; Dodier et al., 2004; Dodd and Christie 2005) και 2-**trimethylaminoethyl** methanethiosulfonate bromide (MTSET⁺) (Fu and Maloney, 1998; Poelarends et al., 2002; Culham et al., 2003), αλλά και παραλλαγές τους όπως το N-**biotinylaminoethyl** methanethiosulfonate (MTSEA-Biotin) (Jones et al., 1996; Chen et al., 1998; Hu and Kaplan, 2000), υπάρχουν και πολλές άλλες εφαρμογές που χρησιμοποιούν σχετικά υδρόφοβα MTS-αντιδραστήρια για ειδικότερες δομικές αναλύσεις, όπως π.χ. το 1-Οξυλ-2,2,5,5-τετραμεθυλ-πυρολινο-αιθυλο-μεθανοθειοσουλφονικό (MTS-SL) που χρησιμοποιείται σε φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) ως

αντιδραστήριο σημειακής στόχευσης κυστεϊνών που τους προσδίδει σήμα ιδιοστροφορμής (σπιν) (site-directed spin labeling, SDSL) (**Εικόνα 1.16**). Οι εφαρμογές SDSL και EPR με χρήση του αντιδραστήριου MTS-SL (οι οποίες ουσιαστικά μετρούν την σχετική ελευθερία κίνησης του σπιν σε κάθε εξεταζόμενη θέση) έχουν δώσει πολύ σημαντικά στοιχεία για την τοπική δευτεροταγή δομή, την δυναμική διαμορφώσεων και την τοπολογία συγκεκριμένων διαμεμβρανικών περιοχών αλλά ακόμη και για την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών περιοχών του μορίου του εξεταζόμενου μεταφορέα: τέτοιες εφαρμογές έγιναν αρχικά στην περμεάση λακτόζης (Wu *et al.*, 1994; Voss *et al.*, 1995a, 1996, 1997; Wang *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999a,b), αλλά και σε αρκετές άλλες πρωτεΐνες, στη συνέχεια, όπως στην T4 λυσοζύμη (Voss *et al.*, 1995b; Klug *et al.*, 1997), στη ροδοψίνη (Altenbach *et al.*, 1996), στον μεταφορέα προλίνης/Na⁺ (Jung, 1998), ή στην απολιποπρωτεΐνη A (Oda *et al.*, 2003).

1.6.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου SCAM και της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης

Όπως και στις άλλες μεθόδους προσδιορισμού της τοπολογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών, έτσι και στην ανάλυση προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) (εδάφιο 1.5.2.2) υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση της. Η βασικότερη προϋπόθεση είναι ότι πρέπει να είναι διαθέσιμο ένα μετάλλαγμα που δεν περιέχει κυστεΐνες και είναι πλήρως λειτουργικό (Cys-less version), ώστε να είναι εφικτή η κατασκευή μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης. Έχει επίσης αναφερθεί εφαρμογή της μεταλλαξιγένεσης σάρωσης κυστεϊνών και της SCAM με υπόστρωμα μεταφορείς που έχουν απαλλαχθεί από ορισμένες μόνο και όχι όλες τις εγγενείς (native) κυστεΐνες (Cys-depleted versions) ιδιαίτερα για ευκαρυωτικούς μεταφορείς, όπως ο συμμεταφορέας γλυκόζης:νατρίου SGLT1 (Huntley *et al.*, 2004) και ο μεταφορέας σεροτονίνης SERT (Sato *et al.*, 2004). Τα συστήματα όμως αυτά υστερούν, καθώς η ακριβής ερμηνεία των δεδομένων από πειράματα τροποποίησης κυστεϊνών δυσχεραίνεται από την παρουσία των εγγενών κυστεϊνών (εδάφιο 1.6.1). Παράλληλα, υπάρχουν περιορισμοί και στη χρήση των –SH-ειδικών αντιδραστηρίων τα οποία μπορεί να μην σημαίνουν ικανοποιητικά για τους παρακάτω λόγους: (α) λόγω χωροδιαταξικής παρεμπόδισης από τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης, (β) λόγω εσωτερικεύσεως του αντιδραστηρίου στον πυρήνα της πρωτεΐνης, (γ) λόγω της ύπαρξης περιοχών με φορτίο όμοιο με το αντιδραστήριο που οδηγούν σε ηλεκτροστατική άπωση, (δ) λόγω απώλειας ιοντισμού της σουλφυδρυλομάδας (βλ. Εικόνα 1.15A), εξ αιτίας υδρόφοβου μικροπεριβάλλοντος, ή (ε) λόγω αυξημένου pK_a της σουλφυδρυλομάδας, που οδηγεί σε απώλεια του ιοντισμού σε ουδέτερο pH (Εικόνα 1.15A), εξ αιτίας αρνητικά φορτισμών γειτονικών καταλοίπων (Bogdanov *et al.*, 2005).

Παρ' όλα αυτά όμως, τα πλεονεκτήματα της μεθόδου SCAM είναι πολλά και την καθιστούν συχνά την πλέον κατάλληλη για μελέτες τοπολογικής οργάνωσης και σχέσεων δομής λειτουργίας. Συνοπτικά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι : 1) η ανάλυση γίνεται σε ολόκληρη την πρωτεΐνη, 2) η εισαγωγή της μιας κυστεΐνης είναι η μικρότερη δυνατή αλλαγή στο μόριο και εύκολα μπορεί να γίνει αποδεκτή από το μόριο, διατηρώντας την τοπολογία και τη λειτουργικότητά του, 3) η ανάλυση γίνεται με μελέτη προσβασιμότητας από μια ποικιλία ειδικών αντιδραστηρίων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, 4) η ανίχνευση των τροποποιημένων κυστεϊνών είναι απλή, 5) απαιτείται μικρή ποσότητα πρωτεΐνης, 6) δεν απαιτούνται περίπλοκες μέθοδοι απομόνωσης της πρωτεΐνης, 7) η χημική τροποποίηση μπορεί

να γίνει είτε σε ακέραια κύτταρα, είτε σε σφαιροπλάστες, είτε σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού ή ανεστραμμένου προσανατολισμού (Bogdanov *et al.*, 2005).

Γενικότερα, τώρα, τα ίδια βασικά πλεονεκτήματα και περιορισμοί ισχύουν και για την συνολική στρατηγική της κυστεϊνικής σάρωσης, στη μελέτη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς. Η στρατηγική των αναλύσεων κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning analysis) έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δώσει πολύ σημαντικά αποτελέσματα για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας του εξεταζόμενου μεταφορέα, τα οποία αφενός προέρχονται από πολλές διαφορετικές πηγές τεχνικών και μεθόδων ανάλυσης (πολυσυλλεκτικά) και αφετέρου παραμένουν σε ισχύ ακόμη και μετά από τις πιο πρόσφατες κρυσταλλογραφικές αναλύσεις και βοηθούν, σε κάθε περίπτωση, στην ανάπτυξη ουσιαστικότερων μοντέλων για τον μηχανισμό λειτουργίας: αυτό φάνηκε ιδιαίτερα σε δύο περιπτώσεις: στην περμεάση λακτόζης LacY (Frillingos *et al.*, 1998; Guan and Kaback, 2006; Kaback *et al.*, 2007; Smirnova *et al.*, 2008) και στους μεταφορείς νευροδιαβιβαστών όπως τον SERT (Zomot *et al.*, 2007; Forrest *et al.*, 2007, 2008; Tavoulari *et al.*, 2009). Είναι αναμφισβήτητο, επίσης, ότι η ανάλυση κυστεϊνικής σάρωσης υπερτερεί έναντι άλλων προσεγγίσεων συστηματικής μεταλλαξιγένεσης, όπως είναι η μεταλλαξιγένεση σάρωσης αλανινών (Ala-scanning mutagenesis) (Cunningham and Wells, 1989; Morrison and Weiss, 2001), καθώς συνδυάζεται με πολυδύναμες χημικές τροποποιήσεις της εισαγόμενης ομάδας αμινοξέος (Cys) και με μια συστοιχία περαιτέρω αναλύσεων των αρχικών μεταλλαγμάτων, εμβαθύνοντας στη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας για τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Η οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2), παρά την εμφανή σημασία της, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς σε επίπεδο μηχανισμού λειτουργίας και ανάλυσης των δομών των αντίστοιχων μακρομορίων. Κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής, είχε ήδη αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας ένα πρότυπο βακτηριακό σύστημα ανάλυσης των σχέσεων δομής-λειτουργίας της οικογένειας NAT, με βάση την μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα ξανθίνης YgfO (XanQ) (Καρατζά, 2006). Ωστόσο, δεν είχαν ακόμη διερευνηθεί βασικά στοιχεία της δομικής και τοπολογικής οργάνωσης του μεταφορέα YgfO καθώς και του ρόλου της ευρύτερης περιοχής γύρω από την αλληλουχία του μοτίβου-«υπογραφή» της οικογένειας NAT η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στον καθορισμό της εξειδίκευσης του κέντρου δέσμευσης πουρινών (Karatza *et al.*, 2006). Στην παρούσα εργασία, κατά συνέπεια, εστιαστήκαμε σε δύο κεντρικούς στόχους, που είναι:

1. Αρχικός δομικός και τοπολογικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα YgfO (XanQ) :

A. υπερέκφραση και απομόνωση του μεταφορέα YgfO, σε διάλυμα απορρυπαντικού, που θα επέτρεπε αρχικό δομικό χαρακτηρισμό του μορίου σε καθαρή μορφή, μέσω βιοφυσικών μεθόδων (φθορισμομετρίας, κυκλικού διχρωισμού, ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού) καθώς και δοκιμασίες κρυστάλλωσης στα πλαίσια της συνεργασίας μας με την ερευνητική ομάδα του H. R. Kaback (UCLA) (Stroud *et al.*, 2009).

B. γενική τοπολογική ανάλυση του μεταφορέα YgfO με στρατηγικές προσβασιμότητας, και, συγκεκριμένα, με την Μέθοδο ελέγχου Προσβασιμότητας Υποκατεστημένων Κυστεϊνών (SCAM), που βασίστηκε στα μοριακά εργαλεία της Μεταλλαξιγένεσης Κυστεϊνικής Σάρωσης του YgfO που διαθέταμε στο εργαστήριό μας (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008).

2. Ανάλυση του ρόλου της ευρύτερης περιοχής πριν από το μοτίβο-«υπογραφή» NAT :

A. ανάλυση προσβασιμότητας της αλληλουχίας του μοτίβου-«υπογραφή» σε υδρόφιλα αντιδραστήρια και μελέτη της επίδρασης της υποστρώματος (ξανθίνης) για να αποκαλυφθούν πιθανές θέσεις δέσμευσης ή ενεργού ανταπόκρισης στη δέσμευση υποστρώματος.

B. ανάλυση μεταλλαξιγένεσης στην περιοχή της αλληλουχίας πριν από το μοτίβο-«υπογραφή» που περιλαμβάνει όλη την ευρύτερη περιοχή που είχε συσχετισθεί με τον καθορισμό της εξειδίκευσης από τις αρχικές μελέτες στον μεταφορέα UapA (μεταξύ TM8 και TM9) (Diallinas *et al.*, 1998) καθώς και δύο τουλάχιστον επιπλέον σημαντικά κατάλοιπα στον YgfO (τα Glu272 και Asp304), όπως είχαν διαπιστωθεί από άλλη μελέτη του εργαστηρίου μας (Καρενά, 2007).

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),

Φυγόκεντρος Sorval RC-5B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut),

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 θραύσης κυττάρων French Press FA 078 E1-2FA003 του οίκου Polytec, Germany.

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),

Φασματοφωτόμετρο Ultraspec-2001 (Biochrom, Cambridge, England),

Φασματοπολωσίμετρο (Jasco J-815 CD Spectropolarimeter), από τα οριζόντια δίκτυα οργάνων του Πανεπιστημίου Ιωννίνων, του οποίου την εγκατάσταση και ευθύνη λειτουργίας έχει το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας (επιστημονικά υπεύθυνος, Επ. Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου),

Φθορισμόμετρο (Hitachi, τύπου F-2500 Fluorescence Spectrophotometer), του οποίου την εγκατάσταση και ευθύνη λειτουργίας έχει το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας (επιστημονικά υπεύθυνος, Επ. Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου) αλλά ανήκει οργανικά στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωννίνων (I.B.E.I).

Φασματοσκόπιο JEOL X-band, για τα πειράματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR), που έγιναν στο συνεργαζόμενο ερευνητικό εργαστήριο του John C. Voss (Department of Biochemistry and Molecular Medicine, UC Davis, Davis, California)

2.2 Χημικά αναλώσιμα

Κατά την εκπόνηση της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αναλώσιμα:

Η ραδιενεργός [8-³H] ξανθίνη (18 Ci/mmol) ήταν από την εταιρεία Moravek Biochemicals (Brea, California) και οι φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις (αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη, ξανθίνη) από την Sigma (St. Louis, Missouri).

Τα oligo-δεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινήτες (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). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI, *Apa*I, η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4, που χρησιμοποιήθηκε 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).

Αντισώματα (antibodies) : Το αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών (anti-PentaHis-HRP) είναι της εταιρείας Qiagen (West Sussex, UK). Το σύζευγμα πρωτεΐνης A –υπεροξειδάσης ραπανιού [horseradish peroxidase (HRP)-conjugated protein A], που χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα, καθώς και το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης ραπανιού (avidin-HRP) ήταν της εταιρείας Amersham Pharmacia Bio-Tech (Uppsala, Sweden). Το αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (βλ. παρακάτω) ήταν από την Molecular Probes (Eugene, Oregon).

Απορρυπαντικά (detergents) : Για την εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών από μεμβρανικά παρασκευάσματα ή κυστίδια της *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν τα ήπια απορρυπαντικά *n*-δωδεκυλο- β ,D-μαλτοπυρανοσίδιο (DDM), της εταιρείας Sigma (St. Louis, Missouri), ή Fos-choline-14, από την εταιρεία Anatrace Affymetrix (Maumee, Ohio).

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 πήγατος αγαρόζης Nucleospin Extract II Macherey-Nagel (Duren, Germany), Συσκευασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany). (2) Για απομόνωση πρωτεϊνών: Σφαιρίδια δισθενούς νικελίου, Ni-IDA Probond™ Purification, της εταιρείας Invitrogen. (3) 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). Το μεθανο-θειο-σουλφονικό αιθυλσουλφονικό (άλας νατρίου) (MTSES) ήταν από την εταιρεία Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Το πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green 488 Maleimide, OGM) από την εταιρεία Molecular Probes (Eugene, Oregon). Το ειδικό SH-αντιδραστήριο, σεσημασμένο με ελεύθερο spin ηλεκτρονίων για τα πειράματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (MTS-SL, (1-Οξυλ-2,2,5,5-τετραμεθυλ-πυρολινο-αιθυλο-μεθανοθειοσουλφονικό), υπήρχε στο εργαστήριο του Dr. J. C. Voss και το είχαν προμηθευτεί από τον Dr K Hideg (University of Pecs, Hungary).

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 YgfO 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(r_K⁻ m_K⁺) (Stratagene): χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης της διαπεράσης YgfO(wt)-His₁₀ (φυσικού τύπου YgfO), ώστε να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση σε μεγάλη κλίμακα, καθώς επίσης και για τον έλεγχο της έκφρασης της ομόλογης πρωτεΐνης MoorT από το θερμόφιλο βακτήριο *Moorella thermoacetica*.
- *E. coli* **DH5α** (F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 reLA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻) (Gibco-BRL): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BW25113** (Δ (araD-araB) 567, ΔLacZ4787 (rrnB-3), Lambda⁻, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) (Datsenko and Wanner, 2000): το στέλεχος αυτό υπήρχε στο εργαστήριο καθώς είχε χρησιμοποιηθεί για τα πειράματα απαλοιφής των ενδογενών γονιδίων ygfO (*xanQ*) (Καρατζά, 2006). Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BL21 (DE3)** (F⁻ ompT gal dcm Lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [LacI LacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.

- *E. coli* **BL21 (DE3) pLysS** (F^- *ompT* *gal* *dcm* *Lon* *hsdS_B*(r_B^- m_B^-) λ (DE3) pLysS(cm^R) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BL21-CodonPlus-RIPL** (F^- *ompT* *hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*⁺ *Tet^r* *gal* (DE3) *endA* *Hte* [*argU* *prol* *Cam^r*]^{*} [*argU* *ileY* *LeuW* *Strep/Spec^r*]^{**}) (Invitrogen): στέλεχος που έχει αναπτυχθεί για την επαύξηση της πιθανότητας επιτυχίας ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών στην *E. coli* K-12. Μας παραχωρήθηκε από τον Υποψήφιο (τότε) Διδάκτορα Σταμάτιο Λιοκάτη και την Επ. Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου. Στην παρούσα διατριβή, 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/*ygfO*-Cys-less-His₁₀** (Karatza *et al.*, 2006): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*ygfO*) του YgfO με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), υπο τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.
- ✓ **pT7-5/*ygfO*-His₁₀** (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*ygfO*) του YgfO φυσικού τύπου (wt), υπο τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (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/*LacY*-C154G-His₁₀** (Smirnova and Kaback, 2003; Abramson *et al.*, 2003): ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*lacY*) της διαπεράσης λακτόζης (LacY)

της *E. coli* με αλλαγμένη την Cys-154 σε Gly [μετάλλαγμα που είχε χρησιμοποιηθεί για την αρχική κρυστάλλωση της LacY διότι δεσμεύει με υψηλή συγγένεια αλλά χωρίς να μεταφέρει το υπόστρωμα, εμφανίζει σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης και αυξημένη θερμοσταθερότητα (Smirnova and Kaback, 2003)] και με την αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) το C- τελικό άκρο.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν και/ή χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα YgfO ήταν:

- ✓ **pT7-5/ygfO-Cys-less-X#C-His₁₀**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*ygfO*) του YgfO με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), και ένα επιπλέον κατάλοιπο κυστεΐνης (single-Cys mutant, διαπεράση μοναδικής κυστεΐνης) στη θέση # και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) στο C-τελικό άκρο. Τέτοιου τύπου κλασμίδια κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την τοπολογική ανάλυση, για τον καθαρισμό μεγάλης κλίμακας που ακολουθήθηκε από πειράματα SDSL και για τον καθαρισμό μικρής κλίμακας που εφαρμόστηκε στα πειράματα σήμανσης με MTSES τόσο στην ανάλυση του μοτίβου-υπογραφή όσο και στην τοπολογική ανάλυση.
- ✓ **pT7-5/ygfO-Cys-less-X(323-339)C-His₁₀**: πρόκειται για ανασυνδυασμένα pT7-5 που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριό μας (Karatza *et al.*, 2006).
- ✓ **pT7-5/ygfO-Cys-less-X#C-BAD**, ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*ygfO*) του YgfO με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), και ένα επιπλέον κατάλοιπο κυστεΐνης (single-Cys mutant, διαπεράση μοναδικής κυστεΐνης) 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 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *moorT* (MoorT or Moth_2118, *gene ID*: 3833269) , ομολόγου του *ygfO* (*xanQ*), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR ενός σταδίου με υπόστρωμα (εκμαγείο) ολικό γονιδιωματικό DNA του θερμόφιλου Gram-θετικού βακτηρίου *Moorella thermoacetica* (Drake and Daniel, 2004). Το γονιδιωματικό DNA της *M. thermoacetica* μας παραχωρήθηκε ευγενώς από τον Stephen Ragsdale, του Πανεπιστημίου της Nebraska (Lincoln, Nebraska). Οι εκκινητές για την αντίδραση σχεδιάστηκαν ώστε να εισαχθούν οι περιοριστικές θέσεις των *Bam*HI και *Apa*I στο 5' και 3' άκρο του γονιδίου, αντίστοιχα, και να επιτραπεί στη συνέχεια ένθεση (insertion) του προϊόντος 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). Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται πιο κάτω, στον **Πίνακα 2.4**.

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

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τα μεταλλάγματα του YgfO (μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης, μεταλλάγματα μοναδικής τρυπτοφάνης, ή σημειακά μεταλλάγματα σε υπόστρωμα φυσικού τύπου) χρησιμοποιήθηκε η PCR δύο σταδίων (**Εικόνα 2.1**).

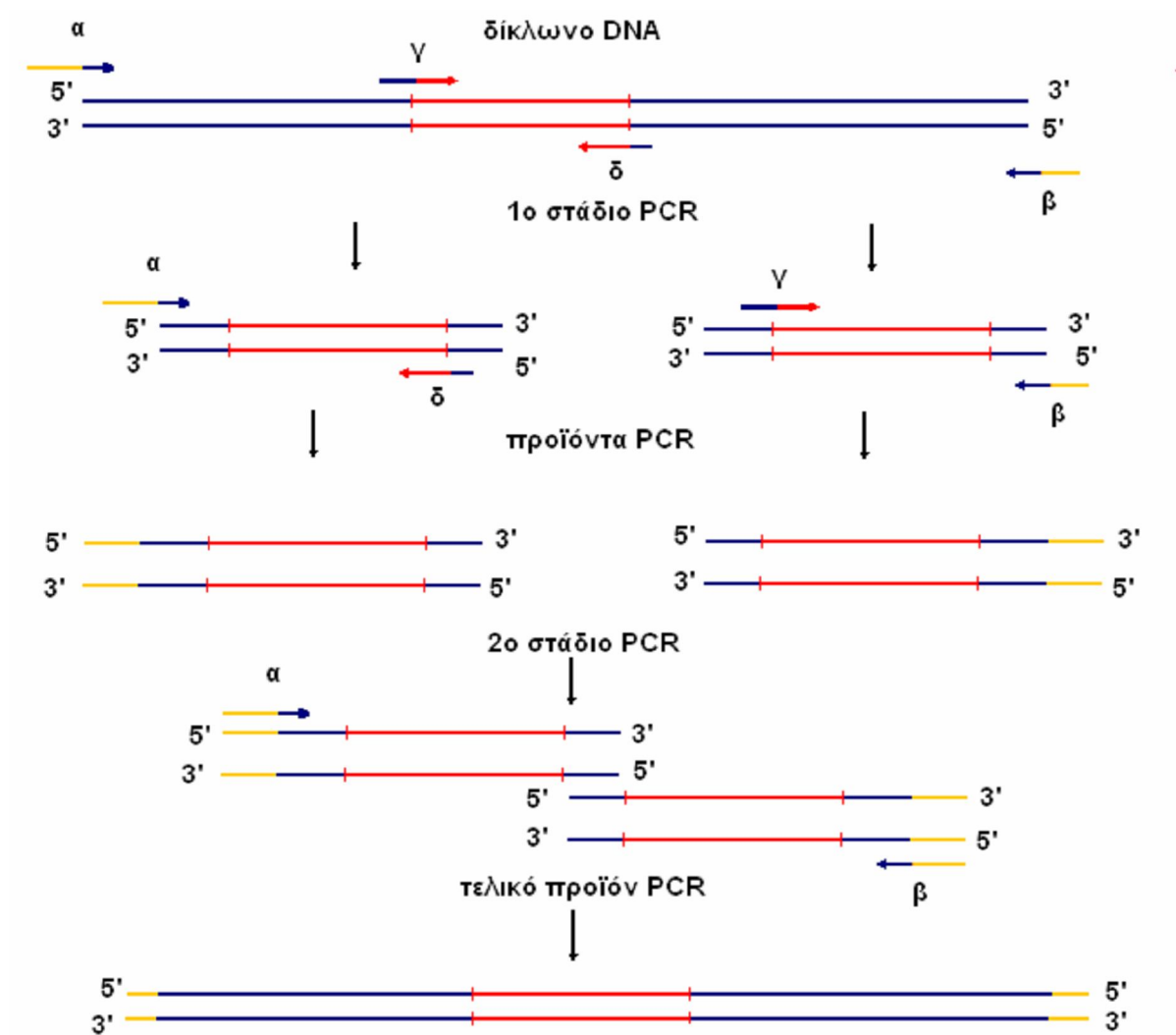
Κατά την PCR δύο σταδίων (Ho *et al.*, 1989, Frillingos *et al.*, 1994, Karatza *et al.*, 2006), χρησιμοποιούνται κατάλληλα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) για να δημιουργηθούν, από τα γονίδια-στόχους, τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (1^ο στάδιο) (Εικόνα 2.1). Τα προϊόντα του 1^{ου} σταδίου συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται στο 2^ο στάδιο ως υποστρώματα (εκμαγεία), όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και, με τη χρήση των ίδιων εξωτερικών ολιγονουκλεοτιδίων, όπως στο 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 συνήθως περιγράφεται ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension) (Ho *et al.*, 1989) αποτελεί μέθοδο εκλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χμιαϊκών 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). 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.
- 10 μM από κάθε εκκινητή
- 5X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Phusion HF polymerase buffer) που περιέχει 7.5 mM MgCl₂.
- 2.5 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
(αποδιάταξη δίκλωνου DNA)	94 °C για 5 min	94 °C για 5 min
(πρόσδεση εκκινητών)	94 °C για 1 min	94 °C για 1 min
(επιμήκυνση του DNA)	50 °C για 1 min	50 °C για 2 min
	72 °C για 1.5 min	72 °C για 2 min
	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 είναι:

LacZ (p/o) sense 5' - ATGATTACGGATTCACTGGCCGTC - 3'

Y_K(pT7-5) – His₁₀ antisense 5' - GACGGGGAGTCAGGCAACTATGG - 3'

Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις PCR φαίνονται στους Πίνακες 2.1-2.3. Οι εκκινητές για μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης σε επιλεγμένες θέσεις του YgfO (single – Cys mutants) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.1**, για την κατασκευή του μεταλλάγματος του YgfO που δεν περιέχει τρυπτοφάνη (Trp-less) καθώς και για τα μεταλλάγματα μοναδικής τρυπτοφάνης (single-Trp mutants), στον **Πίνακα 2.2**, και για σημειακά μεταλλάγματα σε σημαντικές θέσεις αμινοξέων (276-281) ανοδικά του μοτίβου «υπογραφή» NAT, στον **Πίνακα 2.3**. Τέλος, οι εκκινητές PCR για την κλωνοποίηση της ομόλογης περμεάσης MoorT από το θερμοφίλο βακτήριο *M. thermoacetica* (εδάφιο 2.4.1) φαίνονται στον **Πίνακα 2.4**.

Πίνακας 2.1 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του ελεύθερου κυστεΐνών (Cys-less) *ygfO* με εισαγωγή νέων κωδικονίων κυστεΐνης σε επιλεγμένες θέσεις και οι εσωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης S284C, S295C, A366C, R394C, I419C είχαν κατασκευαστεί από τη Σωτηρία Λιμπανοβνού κατά τη διάρκεια της διπλωματικής της εργασίας για το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών (2006). Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων που εισάγουν την αλλαγή στη θέση του αμινοξέος με κυστεΐνη.

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-CGTGGGTTG <u>TGCT</u> TTACAGCTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-A48C- His ₁₀
5'-CAAGTAAAC <u>TGCT</u> ACGGCATCGTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-R78C- His ₁₀
5'-GCAGCATGAAAT <u>TGCG</u> ACGGTTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-S109C- His ₁₀
5'-GCCCTAT <u>TGCC</u> GTCTGTTATTAC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-L142C- His ₁₀
5'-GGAGGATTTGCAT <u>TGCA</u> AAAAGCAGC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-A176C- His ₁₀
5'-CTCTTCTCGTTGTCTT <u>TGCT</u> ACG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-S206C- His ₁₀
5'-CGTTAATC <u>TGC</u> ATCCCGCATC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-T243C- His ₁₀
5'-GCAATGGTT <u>TGTC</u> GTCTCCCATTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-S284C- His ₁₀
5'-GAAGAGTATCAG <u>TGCC</u> GGCTGAAAG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-S295C- His ₁₀
5'- GTTCATTACCAT <u>TGC</u> ACCACGTTTGC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-L319C- His ₁₀

5'-CATTCCTCTTGT <u>TGTT</u> CTGGGAG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-A366C-His ₁₀
5'-CCAACGGTTTAAAG <u>TGCC</u> GTGAAACAC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-R394C-His ₁₀
5'-CGAAATTTTCAAG <u>TGCT</u> TGCCAGCCTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (Cys-less)-I419C-His ₁₀

Πίνακας 2.2 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του φυσικού τύπου *ygfO* με αντικατεστημένο το εγγενές κωδικόνιο τρυπτοφάνης στη θέση 73 (Trp-73) με κωδικόνιο φαινυλαλανίνης (Phe) ή και εισαγωγή νέων καταλοίπων τρυπτοφάνης σε επιλεγμένες θέσεις, και οι εσωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων που εισάγουν την αλλαγή στη θέση του αμινοξέος με φαινυλαλανίνη (W-less) ή με τρυπτοφάνη (single-W *YgfOs*).

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-CAAATACGGCT <u>TGG</u> AGCTTTAGCTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-F252W- His ₁₀
5'-CGATTTATCTT <u>TGG</u> AGCGTGCTGG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-L268W- His ₁₀
5'-GAAAGGCGGTGTT <u>TGG</u> GCAGATG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-L302W- His ₁₀
5'-GTTCATTACCA <u>TGG</u> ACCACGTTTG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-L319W- His ₁₀
5'-CTTCACGT <u>TTGG</u> TTGGTCGAACCATC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-Y338W- His ₁₀
5'-GGCGGCTTT <u>TGG</u> ACAACCATTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-F360W- His ₁₀
5'-CCTCTATTTACTGGC <u>TGG</u> TCGAAAAC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (W-less)-V426W- His ₁₀

Πίνακας 2.3 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του φυσικού τύπου *ygfO* με εισαγωγή νέων κωδικονίων αμινοξέων σε επιλεγμένες θέσεις και οι εσωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. [Τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης που αποκάλυψαν τη σημαντικότητα αυτών των θέσεων είχαν κατασκευαστεί και ελεγχθεί από τον Αλέξανδρο Καλλή κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής του εργασίας για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα (ΠΜΣ) Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (2009).] Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι βάσεις που εισάγουν την αντίστοιχη αλλαγή κωδικονίου.

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-GAAGCAGTTGGC <u>GAA</u> ATCACCGC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-D276E- ABH
5'-GAAGCAGTCGGC <u>AAT</u> ATCACCGC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-D276N- ABH
5'-GCGAT <u>CTT</u> ACCGCTACGGCAATG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-I277L- ABH

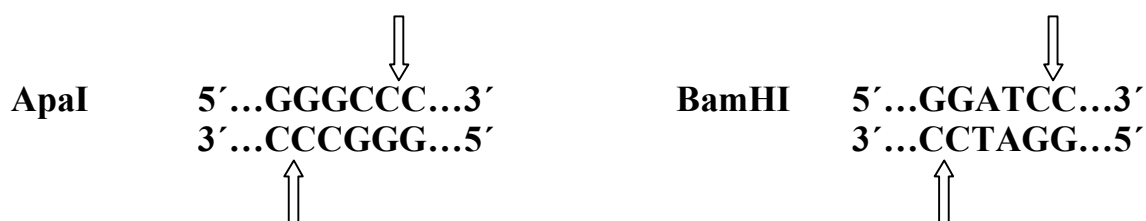
5'-GCGAT <u>GTT</u> ACCGCTACGGCAATG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-I277V- ABH
5'-GATATC <u>GCC</u> <u>ACC</u> <u>GCG</u> <u>ACA</u> ATGGTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-TATA(278-281)ATAT-ABH
5'-GATATC <u>AGC</u> GCCACGGCAATGG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-T278S- ABH
5'-GATATC <u>AAC</u> GCCACGGCAATGG -3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-T278N- ABH
5'-GATATCACCT <u>TCC</u> ACGGCAATG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-A279S- ABH
5'-GATATCACCC <u>GGA</u> ACGGCAATG-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-A279G- ABH
5'-GATATCACTGCC <u>TCG</u> GCAATGGTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-T280S- ABH
5'-GATATCACCGCC <u>AAC</u> GCAATGCTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-T280N- ABH
5'-GATATCACCGCTACG <u>TCA</u> ATGCTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-A281S- ABH
5'-GATATCACCGCTACG <u>GGA</u> ATGCTTTC-3'	pT7-5/ <i>ygfO</i> (wt)-A281G- ABH

Πίνακας 2.4 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία του *moorT* και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του. Υπογραμμισμένες και με έντονα γράμματα φαίνονται οι αλληλουχίες που εισάγουν τις περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα *ApaI* (GGGCC) και *BamHI* (GGATCC).

Προϊόν ανασυνδυασμού DNA που επιδιώχθηκε	Αλληλουχία εκκινητών (primer sequence)
pT7-5/ <i>moorT</i> -BAD ή pT7-5/ <i>moorT</i> -His ₁₀	MoorT sense: 5'-TCGGTT <u>GGATCC</u> ATGTTACCGACCGGAC-3' MoorT antisense: 5'-AGAGGAACCG <u>GGGCC</u> CTTAGTGAAAGAC -3'

2.4.3 Κατασκευή ανασυνδυσμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασυνδυασμός)

Για την κατασκευή των ανασυνδυσμένων πλασμιδίων, επώστηκαν μέχρι πλήρους πέψης ο πλασμιδιακός φορέας pT7-5/*ygfO*-His₁₀ (από μεγάλης κλίμακας παρασκευάσμα maxi – prep, 1 μg/μL) και τα προς ένθεση (insertion) προϊόντα DNA, που είχαν προκύψει από τις αντιδράσεις PCR, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI* (Εικόνα 2.2). Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/*ygfO*-His₁₀ όσο και στα προϊόντα PCR που κατασκευάζονται με εκμαγείο τα pT7-5/*ygfO*-His₁₀ ή pT7-5/*ygfO*-Cysless-His₁₀.



Εικόνα 2.2. Περιοριστικές θέσεις αλληλουχίας για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *ApaI* και *BamHI*.

Στο τέλος της περιοριστικής πέψης έγινε αποφωσφορυλίωση με αλκαλική φωσφατάση στα ελεύθερα 5' άκρα του φορέα (vector), για την αποφυγή ανεπιθύμητης ανασύνδεσης των ανοιχτών άκρων του pT7-5 πριν την αντίδραση με το insert DNA. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης (1%), απομονώθηκαν και ανασυνδέθηκαν με τη χρήση T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση λιγάσης έγινε στους 4 °C, 15 h, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL, με ποσότητες ενθέματος (insert) και φορέα (vector) σε μοριακή αναλογία 3:1.

Στην περίπτωση του MoorT (εδάφιο 3.1.1) ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/*melY*-BAD και ως εκμαγείο στην αντίδραση PCR ολικό γονιδιωματικό DNA από το βακτήριο *M. thermoacetica* (εδάφιο 2.4.1).

Επίσης, για την κατασκευή, έκφραση και χρήση της «περμεάσης» P318G(wt)-GFP σε μικροσκοπία φθορισμού (εδάφιο 3.2), κατασκευάστηκε το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο pT7-5/*ygfO*-P318G-GFP, χωρίς PCR, αλλά με απλή αντικατάσταση περιοριστικών θραυσμάτων *ApaI/BamHI* (cut-and-paste) μεταξύ των πλασμιδίων pT7-5/*ygfO*-GFP (Καρατζά, 2006) και pT7-5/*ygfO*-P318G-BAD (Karatzá *et al.*, 2006).

2.4.4 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (**LB**)

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

SOB

Εκχύλισμα ζύμης	0.5 %
Τρυπτόνη (βακτηριακής προέλευσης)	2%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

TB

Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCL	250 mM

Κύτταρα από όλα τα κυτταρικά στελέχη *E. coli* (κεφάλαιο 2.3) 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 YgfO χρησιμοποιήθηκαν τα *E. coli* T184, ενώ για τα πειράματα έκφρασης και απομόνωσης σε μεγάλη κλίμακα του YgfO και του MoorT (εδάφιο 3.1.1) χρησιμοποιήθηκαν τελικά τα *E. coli* T184 και XL1-blue, αλλά δοκιμάστηκαν και όλα τα άλλα στελέχη που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.3.

Η προετοιμασία των επιδεκτικών κυττάρων έγινε, όπως είπαμε, με το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Συγκεκριμένα, αρχικά γίνεται καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB (10 mL) στους 37 °C για 16 h. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια

αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα SOB μέχρι τελικού όγκου 250 mL. Αν κάποιο κυτταρικό στέλεχος έχει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (π.χ. T184 σε στρεπτομυκίνη) τότε η ανάπτυξη γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής. Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) να φτάσει σε τιμή 0.6. Μετά από επώση για 10 min στον πάγο, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm (4 °C, 10 min) και αναδιαλύονται σε 80 mL ψυχρού διαλύματος TB. Επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα της διαδικασίας με επαναιώρηση σε 20 mL TB που περιέχει 7% (v/v) διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) και τα κύτταρα είναι πλέον επιδεκτικά σε μετασχηματισμό με πλασμίδια ή με προϊόντα της αντίδρασης ανασύνδεσης (ligation products). Τα επαναιωρημένα κύτταρα αποθηκεύονται 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 αμικικιλίνη (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 αμικικιλίνης.

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 επιθυμητής αλληλουχίας ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *Bam*HI και *Apa*I, σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας, από την εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Ακολουθεί εκ νέου μετασχηματισμός κυττάρων, συνήθως *E. coli* T184 (κεφάλαιο 2.5), με το (επιβεβαιωμένο πλέον) πλασμιδιακό DNA και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει 30% γλυκερόλη στους - 80 °C.

2.5 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων

Ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα (10 mL):

(για Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα, ή Απομόνωση *YgfO* σε μικρή κλίμακα)

E. coli T184 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), για 16 h, στους 37 °C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται αραιώση σε LB (1 mL πλήρους καλλιέργειας + 9 mL νέου LB) 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 του *YgfO* ή *MoogT*, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για 2 h ακόμη.

Ανάπτυξη σε μεγάλη κλίμακα (1 L):

(για Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων, ή Απομόνωση *YgfO* σε μεγάλη κλίμακα)

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 αραιώση 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 *YgfO*, 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 KP_i (pH 7.5)

KH_2PO_4 / K_2HPO_4	0.1 M
-----------------------	-------

Διάλυμα τερματισμού (pH 5.5)

KP_i	0.1 M
LiCl	0.1 M

Υγρό σπινθηρισμού

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)

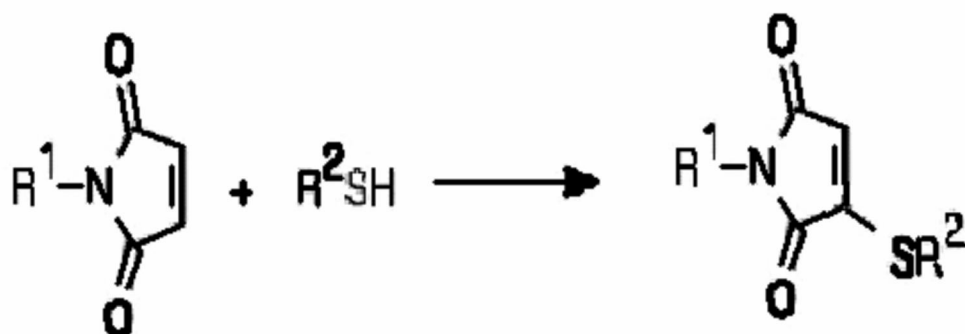
Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με ανάπτυξη των μετασηματισμένων με τα επιθυμητά πλασμίδια κυττάρων *E. coli* T184, σε μικρή κλίμακα (10 mL καλλιέργειας). Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 6000 rpm στους 4 °C για 10 min και επαναωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KP_i , το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται και τελικά τα κύτταρα επαναωρούνται σε 1 mL KP_i . Ακολούθως, γίνεται εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD_{420}) και προστίθεται κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος ώστε η τελική τιμή OD_{420} να είναι 10. Η τιμή αυτή ισοδυναμεί με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL βάσει αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994; Karatza and Frillingos, 2004).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (18 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μM) σε 50 μL κυττάρων (35 μg ολικής πρωτεΐνης), για διάφορους χρόνους (5 sec ως 10 min) (βλ. Karatza and Frillingos 2005). Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με 2x 3 mL διαλύματος τερματισμού, με ταχεία διήθηση υπό κενό (rapid filtration), σε ηθμό διήθησης Watman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm (Frillingos *et al.*, 1994). Μετά τη διήθηση, ο ηθμός μεταφέρεται σε σωληνάρια

σπινθηρισμού (scintillation vials) που περιέχουν 6 mL υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid) και αφήνεται να επωασθεί για 24 h. Τα [^3H] δείγματα μετρώνται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter).

2.6.1.1 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα και επίδραση NEM

Για τα πειράματα επίδρασης *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) (**Εικόνα 2.3**) στην ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης, τα κυτταρικά δείγματα προετοιμάστηκαν όπως και παραπάνω και στη συνέχεια προεπώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις NEM για 10 min στους 25 °C και η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη διθειοθρεϊτόλης (DTT) σε 10πλάσια μοριακή συγκέντρωση έναντι του μηλεϊμιδίου. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης έγινε με την παρουσία μεθοσουλφονικού φαινιζινίου (phenazine methosulfate, PMS 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Konings *et al.*, 1971; Karatza and Frillingos, 2005).



Εικόνα 2.3: Αντίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) με τις SH-ομάδες των κυστεϊνών (από Molecular Probes, www.probes.invitrogen.com)

2.6.1.2 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM παρουσία ή απουσία μη ραδιενεργού υποστρώματος (ξανθίνης)

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με ανάπτυξη των μετασχηματισμένων με τα επιθυμητά πλασμίδια κυττάρων *E. coli* T184, σε μικρή κλίμακα (10 mL καλλιέργειας). Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 6000 rpm στους 4 °C για 10 min και επαναιωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi , το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται και τελικά τα κύτταρα

επαναιωρούνται σε 1 mL KP_i . Ακολούθως γίνεται εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD_{420}) και προστίθεται κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος ώστε η τελική τιμή OD_{420} να είναι 10. Η τιμή αυτή ισοδυναμεί με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL βάσει αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (βλ. ανωτέρω). Στη συνέχεια χωρίζονται 4 δείγματα των 500 μ L κυτταρικού εναιωρήματος: στα δύο από αυτά προστίθεται μη ραδιενεργή ξανθίνη τελικής συγκέντρωσης 1 mM και στα άλλα δύο KOH σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Τα δείγματα προεπάζονται 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 (βλ. Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008). Η αντίδραση του NEM τερματίζεται με την προσθήκη 10πλάσιας μοριακής συγκέντρωσης DTT έναντι του NEM. Στη συνέχεια ακολουθούν δύο φυγοκεντρικές εκπλύσεις με 40 mL διαλύματος KP_i και 3 φυγοκεντρικές εκπλύσεις με 1 mL διαλύματος KP_i . Τέλος, μετά από νέα εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD_{420}), ώστε η τιμή OD_{420} σε όλα τα δείγματα να είναι 10, ακολουθεί δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (1 μ M), παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Konings *et al.*, 1971; Papakostas *et al.*, 2008).

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 YgfO (Karatza 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, κεφάλαιο 2.11), που λαμβάνονται από την κατάψυξη ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), αραιώνεται 10 φορές σε διάλυμα 0.1 M KPi pH 7.5, 10 mM MgSO_4 . Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης (18 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση $1\text{ }\mu\text{M}$) σε $50\text{ }\mu\text{L}$ κυστιδίων για διάφορους χρόνους (5 sec ως 2 min). Η υπόλοιπη διαδικασία είναι όπως στα ακέραια κύτταρα (εδάφιο 2.6.1) 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).

Για τα πειράματα επίδρασης μεθανοθειοσουλφινικο(MTS)-αιθυλσουλφονικού νατρίου (MTSES⁻) στην ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης (εδάφιο 3.3.3), τα δείγματα προεπώστηκαν με 0.2 mM MTSES^- για 10 min στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ και ακολούθησε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης ($1\text{ }\mu\text{M}$) παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM).

2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Διαλύματα

Διάλυμα επαναιώρησης

Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	100 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

Διάλυμα σακχαρόζης

Tris-HCl pH 8	25 mM
Σακχαρόζη	45% (w/v)
Na ₂ EDTA	1 mM

Κλάσματα μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη της *E. coli* παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο συνδυασμού οσμωτικού σοκ, επώασης με EDTA/ λυσοζύμη και κατεργασίας με υπερήχους (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994). Αναλυτικότερα, μετά την ανάπτυξη κυττάρων σε μικρή κλίμακα ακολουθεί συλλογή τους και έκπλυση με 10 mL διαλύματος επαναιώρησης. Μετά από νέα φυγοκέντρηση γίνεται επαναιώρηση σε 1 mL του ίδιου διαλύματος και φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erppendorf (13000 rpm, 5 min) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος σακχαρόζης. Μετά από επώση στον πάγο (0-4 °C) για 20 min, συλλέγεται το κυτταρικό ίζημα, όπως παραπάνω, και ακολουθεί επαναιώρηση σε 0.8 mL ddH₂O και επώαση στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη λυσοζύμης (0.125 mg/mL τελική συγκέντρωση) και επώαση για 30 min στον πάγο (0-4 °C). Ακολούθως, 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) όπου συλλέγεται το ίζημα των μεμβρανών. Το κλάσμα των μεμβρανών επαναδιαλυτοποιείται σε 40 μL ddH₂O και φυλάσσεται στους 4 °C, για περαιτέρω χρήση μέσα στις επόμενες 24 h (ηλεκτροφορητική ανάλυση και ανοσοαποτύπωση ή μελέτη για προσβασιμότητα αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων).

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). Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης και σύμφωνα με αυτή, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

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	0.025 M
Γλυκίνη	0.192 M
SDS	0.1% (w/v)

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

Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS)

APS	10% (w/v)
-----	-----------

Πήκτωμα διαχωρισμού (100 mL)

30% ακρυλαμίδιο	42 mL
Διάλυμα διαχωρισμού	25mL
dH ₂ O	32 mL
10% SDS	1 mL
10% APS	1 mL
TEMED	0.05 mL

Πήκτωμα επιστοιβαξης (30 mL)

30% ακρυλαμίδιο	4.5 mL
Διάλυμα διαχωρισμού	7.5 mL
dH ₂ O	17.4 mL
10% SDS	0.3 mL
10% APS	0.3 mL
TEMED	0.03 mL

Για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθήθηκε η κλασική διαδικασία όπως περιγράφεται από τον Laemmli (1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πήκτώματα 12% (w/v) ως πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) και 3% (w/v) ως πήκτωμα επιστοιβαξης (stacking gel). Πριν από την ηλεκτροφόρηση, προστίθεται στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) από διάλυμα 4x. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Ως δείκτης πρότυπων μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε 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 ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, γίνεται ηλεκτροφορητική μεταφορά των διαχωρισμένων πλέον 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 5 εκπλύσεις με 1X TBST και στη συνέχεια ανίχνευση του σήματος.
- Για τις βιοτινυλιωμένες διαπεράσεις (YgfO-BAD) χρησιμοποιείται σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 σε TBST-5% BSA για 1 h και στη συνέχεια 8 εκπλύσεις με TBST.
- Στην περίπτωση των πειραμάτων ανάλυσης σήμανσης κυστεϊνών *in situ* (κεφάλαιο) γίνεται ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (Anti-OGM) σε αραιώση 1:3000 σε TBST-5% BSA, ακολουθούν 8 εκπλύσεις με TBST και στη συνέχεια προσθήκη δεύτερου αντισώματος, που είναι το σύζευγμα πρωτεΐνης-A-υπεροξειδάσης (HRP-labeled protein A) σε αναλογία 1:50000 για 1 h.

2.8.4 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Επίσης, προσδιορισμός πρωτεΐνης έγινε και με την τεχνική πρωτεϊνικής χρώσης νιτρικού αργύρου μετά από ηλεκτροφόρηση (Silver Staining). Η τεχνική της πρωτεϊνικής χρώσης με διάλυμα νιτρικού αργύρου εμφανίζει υψηλή ευαισθησία ανάλυσης (της τάξης του ενός μg και λιγότερο). Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου επωάζεται σε διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver nitrate, AgNO_3) και, στη συνέχεια, προστίθεται ένας αναγωγικός παράγοντας (π.χ. διθειοθρεϊτόλη, DTT) για να προκαλέσει αναγωγή των δεσμευθέντων ιόντων Ag^+ σε μεταλλικό άργυρο (Ag^0). Ο μεταλλικός άργυρος (Ag) καθιζάνει επί των πρωτεϊνών του πηκτώματος οδηγώντας σε εμφάνιση μελανόχρωων πρωτεϊνικών ζωνών. Αναλυτικά η διαδικασία είναι η εξής:

- το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου επωάζεται σε υδατικό διάλυμα (50% μεθανόλη – 10% οξικό οξύ) σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης επί 1 h.
- Ακολουθούν επαναλαμβανόμενες εκπλύσεις με ddH₂O για 1 h.
- Στη συνέχεια, ακολουθεί ανάδευση σε διάλυμα DTT (5μg/mL) για 1 h.
- Στη συνέχεια, το πήκτωμα επωάζεται σε αμμωνιακό διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃, 0.1% w/v), σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης επί 30 min.
- Μετά την ολοκλήρωση του σταδίου χρώσης, το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα ανάπτυξης που περιέχει (3% w/v Na₂CO₃, 0.0185% v/v HCHO), σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης επί 5-15 min έως ότου εμφανισθούν οι εχρωσμένες ζώνες πρωτεϊνών.
- Η εμφάνιση τερματίζεται με την προσθήκη 5% οξικού οξέος.
- Τέλος το πήκτωμα φυλάσσεται σε ddH₂O.
- Για την καταγραφή της εικόνας της χρώσης, το πήκτωμα περιτυλίγεται σε διαφανή μεμβράνη και σκαννάζεται σε ηλεκτρονικό επεξεργαστή.

2.9 Απεικονιστική ανάλυση του YgfO με μικροσκοπία φθορισμού GFP

Κύτταρα *E. coli* T184 που περιέχουν το πλασμίδιο pT7-5/ygfO-GFP ή pT7-5/ygfO-P31G-GFP, αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37° C, σε πλήρες θρεπτικό μέσο, και έγινε επαγωγή της έκφρασης των περμεασών με 1 mM IPTG για 1.5 h. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συνελέγησαν, έγινε μια έκπλυση με διάλυμα PBS (phosphate buffered saline) και ακολούθησε επώση για 20 min σε καλυπτρίδα με πολυ-L-λυσίνη (PLL). Το σήμα φθορισμού της GFP ανιχνεύθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS-SP confocal scanning microscope).

2.10 Απομόνωση του μεταφορέα YgfO-His₁₀

2.10.1 Σε μικρή κλίμακα (10 mL κυτταρική καλλιέργεια)

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα NaPi pH 7.5,

20% (w/v) n-δωδεκυλο-β, D-μαλτοπυρανοσίδιο (n-dodecyl maltopyranoside DDM),

3 M Ιμιδαζόλιο (imidazole) pH 6.0,

1M MgSO₄,

1.43 M β-μερκαπτοαιθανόλη (β-mercaptoethanol)

1 M NaCl

Στη συγκεκριμένη διατριβή αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση της πρωτεΐνης YgfO, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺. Αναλυτικά το πρωτόκολλο:

- Παρασκευάζεται κλάσμα μεμβρανών (βλ. κεφάλαιο 2.7)
- Στη συνέχεια γίνεται διαλυτοποίηση των μεμβρανών σε διάλυμα που περιέχει 50mM NaPi pH 7.5 και προσθήκη DDM (τελική συγκέντρωση 2% w/v) σε τελικό όγκο 100 μL και ακολουθεί ανάδευση για 30 min στους 4 °C.
- Το μίγμα των διαλυτοποιημένων μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφέρεται σε 50 μL προεξισορροπημένα σφαιρίδια νικελίου (Ni²⁺ IDA Probond) που βρίσκονται σε 300 μL διαλύματος σύνδεσης (50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl) και γίνεται ανάδευση για 1 ώρα στους 4 °C.
- Ακολούθως, απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνονται εκπλύσεις με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου:
 - 1.5 mL (30 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl.
 - 0.2 mL (4 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 100mM imidazole και 150mM NaCl.
 - 0.3 mL (6 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 150mM imidazole και 150mM NaCl

0.2 mL (4 όγκοι στήλης) διαλύματος 50 mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 200mM imidazole και 150mM NaCl.

Συλλέγονται κλάσματα για κάθε δύο όγκους στήλης διαλύματος.

- Τέλος η πρωτεΐνη **εκλύεται** με συνολικά 0.2 mL (4 όγκοι στήλης) διαλύματος έκλυσης (50 mM NaPi pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02% DDM, και **400mM imidazole**).
- Στη συνέχεια 100 μ L από κάθε κλάσμα από τις εκπλύσεις καθώς και από την τελική έκλυση της πρωτεΐνης YgfO, ηλεκτροφορούνται σε 12% SDS-PAGE, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά και ανοσοαποτύπωση και πρωτεϊνική χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver staining).

Η εφαρμογή αυτή συνδυάστηκε κυρίως με την μεθοδολογία ελέγχου προσβασιμότητας κυστεϊνών (κεφάλαιο 2.13) κατά την οποία, ωστόσο, τελική έκλυση γίνεται μετά από σήμανση με OGM, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και δεν χρησιμοποιείται μιδαζόλιο (βλ. εδάφιο 2.13.2).

Σημείωση: Η προ-εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni-IDA γίνεται με δύο διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O και 4 εκπλύσεις με διάλυμα 50mM NaPi pH 7.5, 150mM NaCl και τέλος μια έκπλυση με διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl.

2.10.2 Σε μεγάλη κλίμακα (1L κυτταρική καλλιέργεια)

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα NaPi, pH 7.5

20% (w/v) *n*-δωδεκυλο- β ,D-μαλτοπυρανοσίδιο (*n*-dodecyl maltopyranoside DDM)

3 M μιδαζόλιο (imidazole), pH 6.0

1 M MgSO₄

1.43 M β -μερκαπτοαιθανόλη (β -mercaptoethanol)

1 M NaCl

Στη συγκεκριμένη διατριβή αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση της πρωτεΐνης YgfO και σε μεγάλη κλίμακα, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺. Αναλυτικά, το πρωτόκολλο:

- Γίνεται ανάπτυξη κυττάρων *E. coli*, του στελέχους T184 (ή, εναλλακτικά, του XL1-blue), που εκφράζουν τον φυσικού τύπου YgfO-His₁₀ ή μεταλλάγματα του YgfO που περιέχουν την ουρά των 10 ιστιδινών (His₁₀), σε μεγάλη κλίμακα (1 L) (κεφάλαιο 2.4).

- Στη συνέχεια συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (8500 rpm, 20 min, 4 °C, Beckmann JA-14)
- Κατόπιν γίνονται 2 εκπλύσεις με 500 mL (50 mM NaPi pH 7.5 , 10 mM MgSO₄)
- Για την παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, επαναδιαλυτοποιούμε τα κύτταρα σε διάλυμα 50mM NaPi pH 7.5, 10mM MgSO₄, 0.5mM Refabloc, 30μg/mL Dnase και 10mM β-μερκαπτοαιθανόλη (β-mercaptoethanol) σε τελικό όγκο 15mL.
- Στη συνέχεια γίνεται θραύση των κυττάρων με υψηλή πίεση χρησιμοποιώντας french press (2 φορές 18000 psi).
- Τα κλάσματα μεμβρανών φυγοκεντρούνται (Heraeus 6000rpm, 15min, 4°C).
- Συλλέγεται το υπερκείμενο και γίνεται υπερφυγοκέντρηση (O/N στα 100000xg στους 4°C).
- Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος με διάλυμα NaPi (50mM NaPi pH 7.5) και προσθήκη διαλύματος ουρίας (5M ουρία, 0.5mM refabloc και 10mM β-mercaptoethanol) σε τελικό όγκο 16mL.
- Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση (16 h , στα 100000xg στους 4°C).
- Μετά τη φυγοκέντρηση γίνεται διαλυτοποίηση των μεμβρανών σε διάλυμα που περιέχει 50mM NaPi pH 7.5 και προσθήκη DDM (τελική συγκέντρωση 2% w/v) σε τελικό όγκο 1mL και ακολουθεί ανάδευση για 1 ώρα στους 4°C.
- Στη συνέχεια ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση (45000rpm, 30min, 4°C. Beckman Optima™ ULtracentrifuge)
- Κατόπιν συλλέγεται το υπερκείμενο και προστίθεται μαζί με 1mL εξισορροπημένων beads Ni⁺² και 6 mL διαλύματος σύνδεσης (50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl) και γίνεται ανάδευση για 2 ώρες στους 4°C.
- Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθούν εκπλύσεις με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μιδαζολίου:
30 mL (30 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl.
4 mL (4 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 100mM imidazole και 150mM NaCl.

6 mL (6 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 150mM imidazole και 150mM NaCl

4 mL (4 όγκοι στήλης) διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 200mM imidazole και 150mM NaCl.

Συλλέγονται κλάσματα για κάθε δύο όγκους στήλης διαλύματος.

- Τέλος η πρωτεΐνη **εκλύεται** με συνολικά 8 mL (8 όγκοι στήλης) διαλύματος έκλυσης (50 mM NaPi pH 7.5, 150mM NaCl, 0.02% DDM, και **400mM imidazole**).
- Στη συνέχεια 100 μ L από κάθε κλάσμα από τις εκπλύσεις καθώς και από την τελική έκλυση της πρωτεΐνης YgfO, ηλεκτροφορούνται σε 12% SDS-PAGE, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά και ανοσοαποτύπωση και πρωτεϊνική χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver staining).

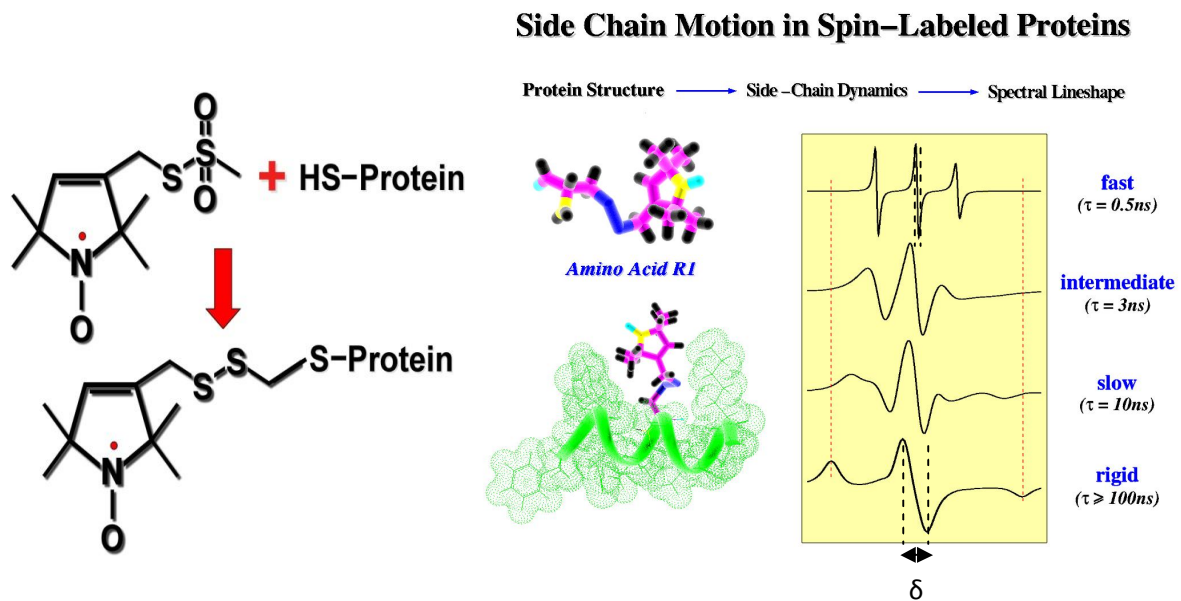
Το δείγμα της καθαρισμένης πρωτεΐνης (8 mL) συμπυκνώνεται σε τελικό όγκο **1 mL** σε μεμβράνη (Sigma, VIVASPIN 20) με cutoff 30 kDa και υφίσταται διαπίδυση σε μεμβράνη SnakeSkin (Pierce) με cutoff 3500 Da, έναντι διαλύματος 50 mM NaPi pH 7.5 που περιέχει 0.01% DDM (συνολικά 1 L): στη συνέχεια γίνεται μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA, χρησιμοποιώντας 10 μ L από το τελικό δείγμα και κατάλληλη ρύθμιση της συγκέντρωσης για τις αναλύσεις δομικού χαρακτηρισμού (κεφάλαιο 2.11).

Σημείωση: Η προ-εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni-IDA γίνεται με δύο διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O και 4 εκπλύσεις με διάλυμα 50mM NaPi pH 7.5, 150mM NaCl και τέλος μια έκπλυση με διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl.

2.11 Τεχνικές δομικού χαρακτηρισμού του YgfO σε διάλυμα απορρυπαντικού (DDM)

2.11.1 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR)

Στη συγκεκριμένη εργασία έγιναν μετρήσεις σε φασματοσκόπιο JEOL X-band (UCDavis). Για τις μετρήσεις σε θερμοκρασία (20-22°C), χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα δείγματα περμεασών μοναδικής κυστεΐνης τα οποία είχαν προεπωαστεί με MTS-SL. Η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού των μεταλλαγμάτων του YgfO ήταν αυτή που περιγράφεται παραπάνω με τη διαφορά ότι, πριν την έκλουση από τη στήλη, έγινε σήμανση με το MTS-SL (0.2 mM), διοχετεύοντας στη στήλη 4 mL διαλύματος 50mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 100mM imidazole, 150mM NaCl, 0.2 mM MTS-SL. Ελήφθησαν φάσματα για 60 sec, σε πεδίο 100 G με ισχύ μικροκυμάτων 2 mW. Εξετάστηκε κυρίως η μορφολογία και η ένταση του σήματος και ο παράγοντας δ , που αποτελεί το πρώτο εμφανές κριτήριο για τον εντοπισμό διαφορών ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα. Το δ , είναι η οριζόντια απόσταση μεταξύ του μέγιστου και του ελάχιστου της κεντρικής κορυφής του φάσματος και είναι αντιστρόφως ανάλογο της κινητικότητας του ελεύθερου spin ηλεκτρονίων (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4. (αριστερά) Χημική δομή και αντίδραση του MTS-SL (1-Οξυλ-2,2,5,5-τετραμεθυλ-πυρολινο-αιθανοθειοσουλφονικού) με την σουλφυδρυλομάδα, (δεξιά) Παραδείγματα διαφορετικών φασμάτων EPR ανάλογα με την κινητικότητα του ελεύθερου spin ηλεκτρονίων (από Hubbell *et al.*, 2000).

2.11.2 Κυκλικός διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)

Η ανάλυση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού έγινε σε όργανο Jasco J-815 CD Spectropolarimeter. Καταγράφηκαν φάσματα απομονωμένης YgfO (1 μ M, σε διάλυμα 50 mM NaPi pH 7.5 με 0.01% DDM) σε θερμοκρασία 20 °C και 10 °C, και σε μήκη κύματος 250-190 nm. Σε ένα τυπικό φάσμα δομής α -έλικας (Compton and Johnson, 1986), η ελλειπτικότητα στα 222 nm, θ_{222} (mdeg), χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της μέσης μοριακής ελλειπτικότητας των καταλοίπων της πρωτεΐνης (mean residue ellipticity), σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο $[\theta_{222}] = \theta_{222} / 10 \ln C_p / 0.1 \text{ cm}$ (το πλάτος της κυψελίδας χαλαζία), $n=466$ (ο αριθμός των καταλοίπων της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του YgfO (Karatza and Frillingos, 2005), C_p η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε M. Τέλος, υπολογίστηκε προσεγγιστικά το % ποσοστό α -έλικας της πρωτεΐνης σύμφωνα με τον τύπο : % alpha-helix = $(-[\theta_{222}] + 3000) / 39000$ (Morrow *et al.*, 2000).

2.11.3 Φθορισμομετρία τρυπτοφάνων

Η φθορισμομετρική ανάλυση έγινε σε φθορισμόμετρο Hitachi τύπου F-2500. Δείγμα απομονωμένης YgfO (1 μ M, σε διάλυμα 50 mM NaPi pH 7.5 με 0.01% DDM) εξετάστηκε ως προς το φάσμα φθορισμού της εγγενούς τρυπτοφάνης στην περιοχή 300-400 nm, μετά από διέγερση στα 295 nm. Οι μετρήσεις έγιναν στους 25 °C, σε κυψελίδα 0.1 x 1cm, (όγκος δείγματος 150 μ L). Χρησιμοποιήθηκε εσωτερική σχισμή των 5 mm (για την διέγερση) και των 10 mm (για την εκπομπή). Η επίδραση υποστρώματος (ξανθίνης) ή άλλων προσδετών (ανάλογα ξανθίνης και ουρικού) ελέγχθηκε μετά από εξισορρόπηση του δείγματος με 1 μ M έως 0.2 mM προσδέτη (ligand). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι μετρήσεις διορθώθηκαν βάσει του αντίστοιχου συντελεστή αραίωσης. Επίσης η προσβασιμότητα της Trp73 (μοναδικής εγγενούς τρυπτοφάνης της YgfO) σε περισσότερο ή λιγότερο υδρόφιλα πολικά αντιδραστήρια (ιωδιούχο κάλιο, ακρυλαμίδιο), τα οποία μπορούν να προκαλέσουν απόσβεση του σήματος, ελέγχθηκε μετά από επώαση του δείγματος με 0.05 M έως 0.5 M αντιδραστηρίου, και προσδιορίστηκε η σταθερά Stern-Volmer (K_{SV}) από τον τύπο: $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, όπου F_0 η αρχική ένταση του σήματος στο βέλτιστο μήκος κύματος, F η ένταση σήματος στο βέλτιστο

μήκος κύματος μετά από την επίδραση του πολικού αντιδραστηρίου (quencher) και [Q], η συγκέντρωση του πολικού αποσβεννύοντος μορίου (Q, quencher) (Wu *et al.*, 1994, 1995; Tyagi *et al.*, 2007).

Σημείωση για τα πειράματα επίδρασης υποστρώματος/προσδετών: Προκαταρκτικά πειράματα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδέτη, 0.5 έως 1 mM, έδειξαν ισχυρή μη-ειδική απόσβεση του σήματος στο φάσμα της τρυπτοφάνης (inner-filter effect), λόγω απορρόφησης ενέργειας στην περιοχή του μήκους κύματος διέγερσης, και δεν χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω. Επίσης, δεν χρησιμοποιήθηκε καθόλου το ουρικό, το οποίο απορροφά βέλτιστα στην περιοχή ακριβώς του μήκους κύματος διέγερσης (292 nm) και εμφανίζει ισχυρό inner-filter effect, ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις, της τάξης των μM.

2.12 Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)

Διαλύματα

1 M KP_i pH 6.6, 1M $MgSO_4$, 0.5 M K_2EDTA pH 7.0, 30% σακχαρόζη, 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 χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία αποτελεί προσαρμογή γνωστών πρωτοκόλλων απομόνωσης κυστιδίων (Kaback, 1971; Frillingos and Kaback, 1996), όπως παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:

- Γίνεται ανάπτυξη κυττάρων *E.coli*, του στελέχους T184, που εκφράζουν τα υπό εξέταση μεταλλάγματα του YgfO, σε μεγάλη κλίμακα (κεφάλαιο 2.4)
- 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 μ g/ 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 μ g/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)
- Επαναίωση 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)

Τα μεμβρανικά κυστίδια RSO χρησιμοποιήθηκαν τόσο σε δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς (εδάφιο 2.6.2) όσο και σε δοκιμασίες προσβασιμότητας κυστεϊνών (εδάφιο 2.13.1)

2.13 Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών (cysteine accessibility assay)

2.13.1 Σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού

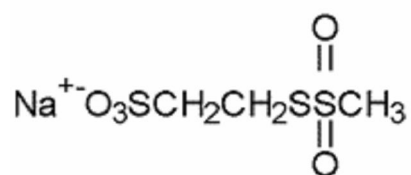
Διαλύματα

1 M KP_i pH 7.5, 1 M $MgSO_4$, 1 M NaP_i pH 7.5, 20% DDM,

Διάλυμα αποδιάταξης (100 mM NaP_i pH 7.5, 6 M Urea, 0.5% SDS)

0.5 M Na_2EDTA , pH 8.0

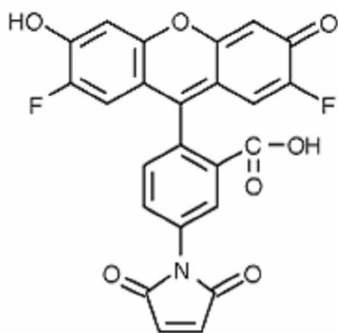
Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται έλεγχος των κυστεϊνών από ειδικά αντιδραστήρια σουλφυδρυλομάδων σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSO). Η μέθοδος αποτελεί προσαρμογή άλλων πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούν φθορίζοντα SH-αντιδραστήρια (Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Nie *et al* 2007) και είναι η πρώτη φορά που εφαρμόζεται σε αυτό το σύστημα στο εργαστήριό μας, αν και είχε εφαρμοσθεί με επιτυχία σε προηγούμενη εργασία, σε ακέραια κύτταρα (Karatzas *et al.*, 2006). Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε κυρίως το ειδικό SH-αντιδραστήριο μεθανοθειοσουλφονικό αιθυλοσουλφονικό ($MTSES^-$) (Εικόνα 2.5), πρόκειται για ένα υδρόφιλο αντιδραστήριο με αρνητικό φορτίο, που δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη του κυττάρου (Akabas *et al.*, 1992) (βλ. και Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.6). Η διαδικασία του πειράματος είναι η εξής:



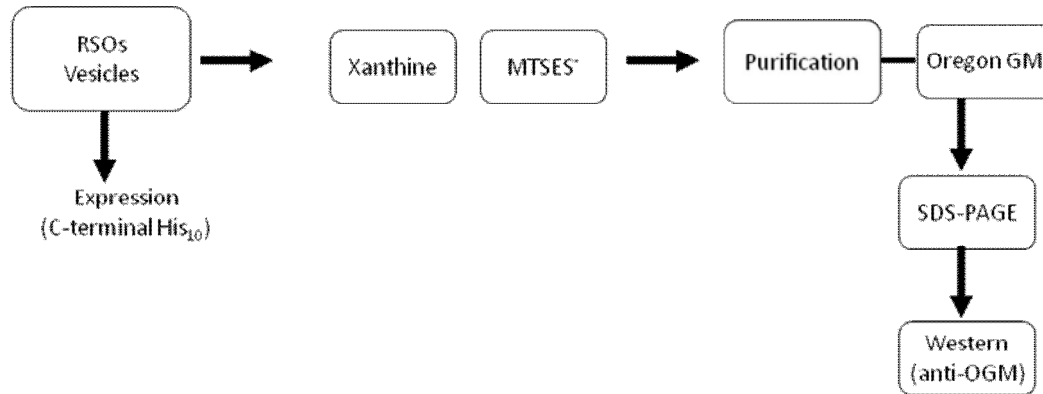
Εικόνα 2.5. MTSES- Sodium(2-sulfonatoethyl)methane thiosulfonate)

Μεμβρανικά κυστίδια RSO (κεφάλαιο 2.12) σε τελική συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 4 mg/mL, επιάζονται παρουσία ή απουσία 50 μM $MTSES^-$, παρουσία ή απουσία υποστρώματος (ξανθίνη 1 mM) για 10 min στους 25 °C, και, κατόπιν, εκπλένονται 2 φορές με 1 mL διαλύματος 0.1 M KP_i pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$ και 1 φορά με 1 mL διαλύματος 100mM NaP_i pH 7.5. Στη

συνέχεια, γίνεται διαλυτοποίηση των κυστιδίων σε 100 μL διαλύματος 100 mM NaPi pH 7.5 που περιέχει 2% w/v n-δωδεκυλο- β -D-μαλτοπυρανοσιδίου (DDM) (Wu *et al.*, 1994, Wu and Kaback, 1994) και ακολουθεί επώαση για 30 min στους 4 $^{\circ}\text{C}$ για την εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών από τη μεμβράνη. Σε κάθε δείγμα μεμβρανικού εκχυλίσματος προστίθενται 300 μL διαλύματος εξισορρόπησης (100mM NaPi pH 7.5, 150 mM NaCl, 30 mM ιμιδαζόλιο, 0,02% DDM) που επιπλέον περιέχει 50 μL προ-εξισορροπημένων σφαιριδίων Ni-IDA (Probond) και το μίγμα αναδεύεται για 1 h στους 4 $^{\circ}\text{C}$. Μετά το πέρας της επώασης γίνεται έκπλυση με 600 μL διαλύματος 100 mM NaPi pH 7.5, 150 mM NaCl, που περιέχει 100 mM ιμιδαζόλιο και 0.02% DDM, και προστίθεται 1 mL διαλύματος αποδιάταξης (διάλυμα ουρίας/SDS) για 10 min υπό ανάδευση. Ακολουθεί επώαση με 100 μL του ίδιου διαλύματος που περιέχει και 0.2 mM OGM (**Εικόνα 2.6**) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Η δράση του OGM τερματίζεται με την προσθήκη 300 μL διαλύματος αποδιάταξης που περιέχει 5 mM β -μερκαπτοαιθανόλη για 3 min. Η έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια Ni-IDA επιτυγχάνεται με την προσθήκη 50 μL διαλύματος φόρτωσης (1X) (βλ. εδάφιο 2.8.2) που περιέχει 0.07 M Na_2EDTA , pH 8.0 και επώαση για 10 min στους 37 $^{\circ}\text{C}$: το στάδιο έκλυσης επαναλαμβάνεται μία φορά και τα δύο εκλούσματα συλλέγονται και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με Anti-OGM και PentaHis-HRP (βλ. κεφάλαιο 2.8). Η διαδικασία φαίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.7**.



Εικόνα 2.6: Η δομή του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (OGM)



Εικόνα 2.7: Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών (cysteine accessibility assay) σε μεμβρανικά κυστίδια

Σημείωση: Η προ-εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni-IDA γίνεται με δύο διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O και 4 εκπλύσεις με διάλυμα 100mM NaPi pH 7.5, 150mM NaCl και τέλος μια έκπλυση με διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) 100mM NaPi pH 7.5, 0.02% DDM, 30mM imidazole και 150mM NaCl.

2.13.2 Σε αέραιο κύτταρα (*in vivo*)

Διαλύματα

150 mM Tris-NaCl, 1 M MgSO₄, pH 7,5, 20% DDM

Διάλυμα αποδιάταξης (150 mM Tris-NaCl pH 7.5, 6 M Urea, 0,5% SDS)

0.5 M Na₂EDTA, pH 8.0

Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιούνται κύτταρα *E. coli* του στελέχους T184, τα οποία αναπτύσσονται σε μικρή κλίμακα (κεφάλαιο 2.4). Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων από 10 mL καλλιέργειας, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-NaCl (βλ. 2.3) και η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων εξισορροπείται σε OD_{420nm} = 10 (βλ. και κεφάλαιο 2.7). Δείγματα (1mL) μεταφέρονται σε μικροσωληνάρια τύπου erpendorf, φυγοκεντρώνται (13000 rpm, 1 min) και το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα Tris-NaCl (1 mL). Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και επαναιώρησης επαναλαμβάνεται 1 φορά, με αναδιάλυση των κυττάρων σε 0.2 mL Tris-NaCl. Ακολουθεί επώαση του κυτταρικού δείγματος (0.2 mL) παρουσία ή απουσία 1 mM NEM (Εικόνα 2.4) ή MTSES⁻ (Εικόνα 2.5), για 10 min, στους 25 °C. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται (13000 rpm, 1 min) και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος Tris-

NaCl. Η ίδια διαδικασία φυγοκέντρησης – επαναιώρησης επαναλαμβάνεται 2 φορές και, έπειτα, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 μL διαλύματος σακχαρόζης που περιέχει λυσοζύμη (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και επωάζονται για 30 min στους 37 °C. Μετά τα πρώτα 15 min της επώασης, προστίθενται στο εναιώρημα 0.6 mL διαλύματος MgSO_4 15 mM. Μετά τις επώσεις, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο (14000 rpm, 5 min, 4 °C), αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μL διαλύματος Tris-NaCl που περιέχει 0.8% (w/v) DDM και επωάζεται υπό ελαφρά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min, για τη λύση των μεμβρανών και εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Wu *et al.*, 1994). Σε κάθε δείγμα μεμβρανικού εκχυλίσματος προστίθενται 300 μL διαλύματος Tris-NaCl, το οποίο περιέχει 30 mM ιμιδαζολίου και 0.08% (w/v) DDM καθώς και 50 μL προ-εξισορροπημένων σφαιριδίων Ni-IDA (Probond) και το μίγμα εκχυλίσματος-σφαιριδίων αναδεύεται επί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πρόσδεση των πρωτεϊνών YgfO-His₁₀, τα σφαιρίδια Ni-IDA εκπλένονται με 1 mL διαλύματος αποδιάταξης (ουρία/SDS), επαναιωρούνται σε 0.1 mL του ίδιου διαλύματος που περιέχει 200 μM OGM (Εικόνα 2.6) και αναδεύονται για άλλα 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον τερματισμό της αντίδρασης και την έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, τα σφαιρίδια Ni-IDA επωάζονται με προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης (300 μL) που περιέχει 5 mM β -μερκαπτοαιθανόλη (3 min) και, στη συνέχεια, με 2x40 μL διαλύματος φόρτωσης (1X Loading buffer) (εδάφιο 2.8.2) που περιέχει 0.07 M Na_2EDTA , pH 8.0, για 10 min, στους 30 °C. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και συλλέγονται προσεκτικά τα υπερκείμενα τα οποία αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (βλ. κεφάλαιο 2.8).

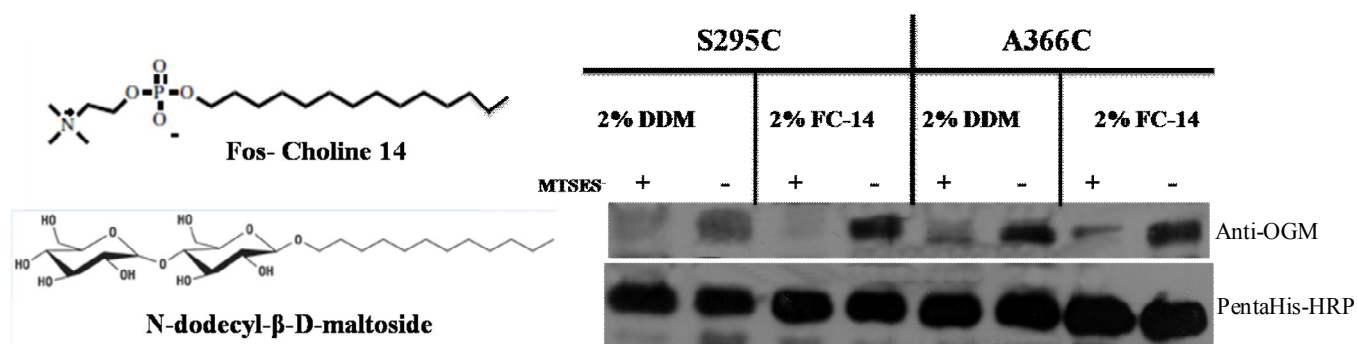
Σημείωση: Η προ-εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni-IDA γίνεται με 2 διαδοχικές πλύσεις σε ddH₂O, 4 εκπλύσεις με διάλυμα Tris-NaCl (βλ. § 2.3) και, τέλος, 1 πλύση σε διάλυμα Tris-NaCl που περιέχει 0.08% DDM και 30 mM ιμιδαζολίου (διάλυμα εξισορρόπησης).

2.13.3 Σε κλάσματα μεμβρανών

Η διαδικασία και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι ίδια όπως στην μεμβρανικά κυστίδια με τη διαφορά ότι οι επώσεις με το αντιδραστήριο MTSES⁻ γίνονται σε κλάσματα μεμβρανών (κεφάλαιο 2.7).

2.13.4 Επιλογή του κατάλληλου απορρυπαντικού εκχύλισης των μεμβρανικών πρωτεϊνών

Σε προκαταρκτικά πειράματα, ελέγξαμε δύο από τα συνηθέστερα ήπια απορρυπαντικά που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία για την διαλυτοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών από βακτηριακές μεμβράνες, *n*-δωδεκυλ- β ,D-μαλτοπυρανοσίδιο (*n*-dodecyl- β ,D-maltopyranoside, DDM) και Fos-Choline 14 (FC-14) (Εικόνα 2.8). Η απόδοση καθαρισμού και επιτυχίας του πειράματος και στις δύο περιπτώσεις ήταν παρόμοια. Επιλέχθηκε, τελικά, το DDM, καθώς αυτό έχει χρησιμοποιηθεί πολύ περισσότερο για δομικές-λειτουργικές μελέτες και στην συντριπτική πλειοψηφία των κρυσταλλογραφικών αναλύσεων μεμβρανικών μεταφορέων (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.2).



Εικόνα 2.8. (αριστερά) Χημικές δομές του DDM και του FC-14. (δεξιά) Μεμβρανικά κυστίδια (RSO) που εκφράζουν τα μεταλλάγματα S295C και A366C του YgfO επώασθησαν με MTSES⁻ (50 μ M, 10 min, 25 °C). Μετά την επώαση, εκχυλίσθηκαν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είτε με DDM (2% w/v) είτε με FC-14 (2% w/v) και οι περιεάσεις απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺, ακολουθώντας κατά βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εδάφιο 2.13.1. Μετά από έκπλυση των μη ειδικών πρωτεϊνών, τα δείγματα επώασθησαν με OGM (0.2 mM), υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS/ουρία), για σήμανση όλων των αδέσμευτων θέσεων Cys, εκλούσθηκαν σε διάλυμα Laemmli και υπεβλήθησαν σε SDS-PAGE (12%) και ανοσοοποτύπωση, τόσο με anti-OGM, που δείχνει την έκταση της σήμανσης των κυστεϊνών [άνω] όσο και με pentaHis, που δείχνει την ολική ποσότητα εκλουόμενης πρωτεΐνης [κάτω].

2.14 *In silico* αναλύσεις

Η αλληλουχία DNA του YgfO και των άλλων ομολόγων του μεταφορέα αυτού στην *E. coli* (Εισαγωγή, εδάφιο 1.3.3.3), καθώς και οι αντίστοιχες αλληλουχίες αμινοξέων, εξήχθησαν από βάσεις δεδομένων που καταγράφουν την πλήρη αλληλουχία γονιδιώματος της *E. coli* K-12, σύμφωνα με τις νεότερες διαθέσιμες ενημερώσεις (The EcoGene database of *E. coli* sequence and function, www.ecogene.org). Ελήφθησαν επίσης υπόψη οι νεότερες ονοματολογίες των πρωτεϊνών NAT της *E. coli*, XanQ για τον YgfO (Karatza and Frillingos, 2005), XanP για τον YicE (Karatza and Frillingos, 2005) και PbuX για τον YgfU (Papakostas and Frillingos, υπό συγγραφή), όπως προτάθηκαν στην ηλεκτρονική τράπεζα EcoGene βάσει της λειτουργικής-φυλογενετικής ανάλυσης (προσωπική επικοινωνία με τον Kenneth Rudd, University of Maimi, Florida).

Για την προσέγγιση του τοπολογικού μοντέλου της πρωτεΐνης έγινε καταρχήν εξέταση θεωρητικών προβλέψεων με όλους τους διαθέσιμους αλγόριθμους (βλ. Εισαγωγή, εδάφιο 1.5.1). Ιδιαίτερα, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) (Granseth *et al.*, 2005) (βλ. και παρακάτω, στα Αποτελέσματα, εδάφιο 3.2.1).

Η ανάλυση στοίχισης των κωδικοποιουσών αλληλουχιών των μεταφορέων NAT/NCS2 πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Η ανάλυση των γονιδιωμάτων για την ύπαρξη ομολόγων που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 και η κατάταξη των γονιδίων σε λειτουργικές ομάδες ορθολόγων βασίζεται στις βάσεις δεδομένων TransportDB (<http://www.membranetransport.org>) (Ren *et al.*, 2004), TC-DB (<http://www.tcdb.org>) και COGs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>). Επίσης, ενσωματώθηκαν αναλύσεις από τις πλήρεις αλληλουχίες γονιδιωμάτων μικροοργανισμών που έχουν κατατεθεί τα τελευταία χρόνια από το Joint Genome Institute (Walnut Creek, California) (Markowitz *et al.*, 2008) (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και αρχικός χαρακτηρισμός του YgfO σε διάλυμα απορρυπαντικού

Σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα απομόνωσης σε μικρή και μεγάλη κλίμακα για τον μεταφορέα YgfO-His₁₀ ή ομόλογά του μέσω εκχύλισης από τη μεμβράνη με DDM (*n*-δωδεκυλο-β, D-μαλτοπυρανοσίδιο) και χρωματογραφίας συγγένειας Ni²⁺ ή Co²⁺. Για την εφαρμογή τέτοιων πρωτοκόλλων απομόνωσης, οι μεταφορείς συνδέθηκαν με μια C-τελική αλληλουχία 10 συνεχόμενων κωδικονίων ιστιδινών (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) και ελέγχθηκε καταρχήν αν μπορούν να υπερεκφραστούν σε ικανοποιητικά επίπεδα στη μεμβράνη της *E. coli*, εξετάζοντας μια σειρά διαφορετικών στελεχών και συνθηκών ανάπτυξης. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, χαρακτηρίστηκε λειτουργικά, για πρώτη φορά, και ένα θερμόφιλο ομόλογο του YgfO (εδάφιο 3.1.1). Ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης και απόδοσης καθαρισμού σε διαλυτή μορφή (αραιό διάλυμα DDM) επιτεύχθηκαν για τον μεταφορέα YgfO-His₁₀, ο οποίος στη συνέχεια χαρακτηρίστηκε δομικά με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (που έδειξε ότι έχει σε υψηλό ποσοστό δομή α-έλικας) (εδάφιο 3.1.2), φθορισμομετρία τρυπτοφανών (που έδειξε ότι αναγνωρίζει ειδικά ως υπόστρωμα την ξανθίνη) (εδάφιο 3.1.3) και φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων κυστεϊνών, που έδειξε ότι διατηρεί αναμενόμενα στοιχεία τοπικής δομικής οργάνωσης στην περιοχή του μοτίβου-«υπογραφή» NAT (εδάφιο 3.1.4).

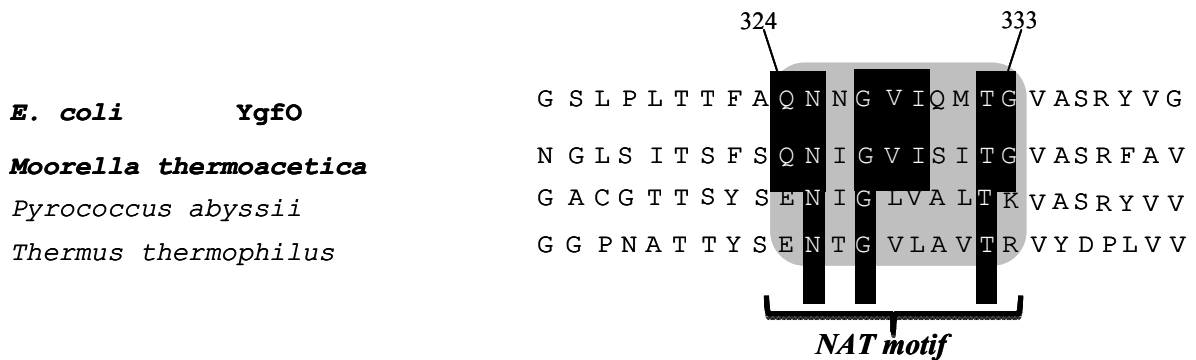
3.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός του μεταφορέα YgfO

3.1.1.1 Επιλογή μεταφορέα NAT για δοκιμές υπερέκφρασης-απομόνωσης

Ο μεταφορέας YgfO (XanQ) υπερεκφράσθηκε σε μια σειρά στελεχών της *E. coli* K-12, μέσω έκφρασης του γονιδίου *ygfO* εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ* p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του IPTG, χρησιμοποιώντας το μέσου αριθμού αντιγράφων πλασμίδιο (medium copy number) pT7-5 (Sahin-Toth *et al.*, 1995b). Για τον έλεγχο της εξωχρωμοσωμικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τόσο ο επίτοπος του τομέα δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain) από την αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού της *K. pneumoniae* (Conslor *et al.*, 1993) όσο και η ουρά των 10 ιστιδινών (His10 tag) (Smirnova and Kaback, 2003). Αν και βρέθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις C-τελικών σημάτων η έκφραση του YgfO ήταν ικανοποιητική σε πολλά στελέχη (βλ. παρακάτω, Εικόνα 3.6), θέλαμε να εξετάσουμε και άλλες πιθανές πηγές ομόλογων μεταφορέων NAT, οι οποίες πιθανόν να ήταν καλύτερες όχι μόνο ως προς τα επίπεδα έκφρασης που θα μπορούσαμε να έχουμε αλλά και ως προς την σταθερότητα του μορίου κατά την επακόλουθη προσπάθεια απομόνωσής του από τη μεμβράνη. Για τον σκοπό αυτό, εφόσον στην κρυσταλλογραφία ιοντο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών μεταφοράς έχουν πολύ συχνά χρησιμοποιηθεί ομόλογες πρωτεΐνες από θερμόφιλα βακτήρια (π.χ. *Thermus*) ή αρχαία (π.χ. *Pyrococcus*) λόγω της αυξημένης τους δομικής σταθερότητας σε μέσες συνθήκες (Yernool *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005; Weyand *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2006, 2007, 2008), στραφήκαμε κυρίως στην εξέταση πιθανών ομόλογων του YgfO από θερμόφιλους μικροοργανισμούς.

Με *in silico* ανάλυση όλων των ομόλογων της οικογένειας NAT που είναι συγγενή προς τον YgfO της *E. coli*, είδαμε ότι το συγγενέστερο πιθανό θερμόφιλο ομόλογο είναι αυτό του γονιδίου Moth_2118 ή *MoorT* (gene ID: 3833269), από το θερμόφιλο Gram-θετικό βακτήριο *Moorella thermoacetica*, ένα αναερόβιο ακετογόνο βακτήριο της κλάσης *Clostridia* που διαβιώνει βέλτιστα σε 58-60 °C και pH 6.0 (Drake and Daniel, 2004). Η προβλεπόμενη πρωτεΐνη MoorT (όπως την ονομάσαμε) έχει μια θεωρητική τοπολογία των 12 διαμεμβρανικών τμημάτων (12 TMs) και αλληλουχία 438 καταλοίπων αμινοξέων, με 32% ταυτότητα καταλοίπων (52% ομοιότητα) προς τον YgfO, και διατηρεί ακριβώς την αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή NAT ³¹⁹**QNIGVISITG**³²⁸ με τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα στις θέσεις Gln-324/319 (χαρακτηριστικό για τους μεταφορείς πουρινών) και Gly-333/328 (χαρακτηριστικό για τους

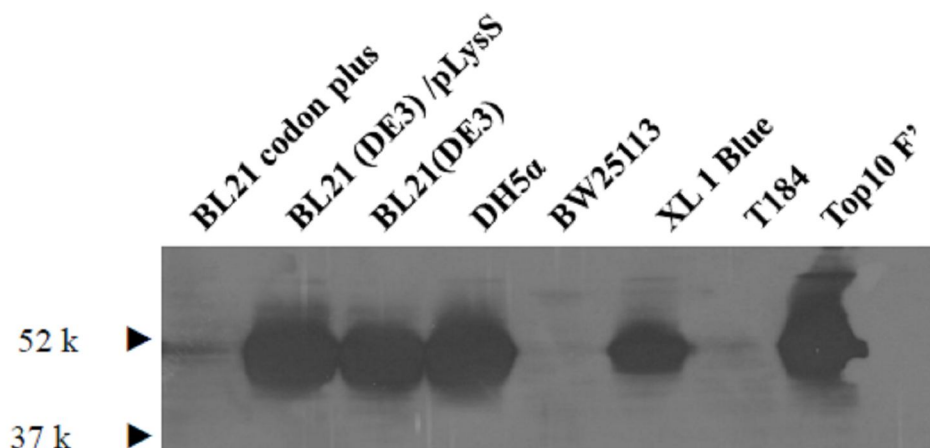
ειδικούς μεταφορείς ξανθίνης) (Karatza *et al.*, 2006; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Αντίθετα, τα άλλα χαρακτηριστικά συγγενέστερα ομόλογα από θερμόφιλα βακτήρια (*Thermus thermophilus*) ή αρχαία (*Pyrococcus abyssi*, *P. horikoshii* και *P. furiosus*) έχουν μικρότερη ομοιότητα (κάτω του 30% ταυτότητα καταλοίπων) και διαφοροποιούνται στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή γιατί δεν διατηρούν το πρώτο και το τελευταίο κατάλοιπο, Gln-324 και Gly-333, αλλά έχουν αλληλουχία **EN(I/T)G(L/V)(V/L)A(L/V)T(R/K)** [όπου έχουν Glu αντί Gln, στη θέση 324, κατάλοιπο που συνήθως απαντάται στους μεταφορείς ουρακίλης (εδάφιο 1.3.3) και Arg ή Lys στη θέση 333, κατάλοιπα που δεν απαντώνται στους ειδικούς μεταφορείς ξανθίνης, όπως YgfO ή YicE, αλλά θα μπορούσαν να απαντώνται σε μεταφορείς ευρύτερης εξειδίκευσης όπως αυτοί των ασκομυκήτων (Goudela *et al.*, 2005; Pantazopoulou and Diallinas, 2007)]. Μια στοίχιση των πιο συγγενικών αλληλουχιών των θερμόφιλων ομολόγων με τον YgfO στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή φαίνεται στην **Εικόνα 3.1**.



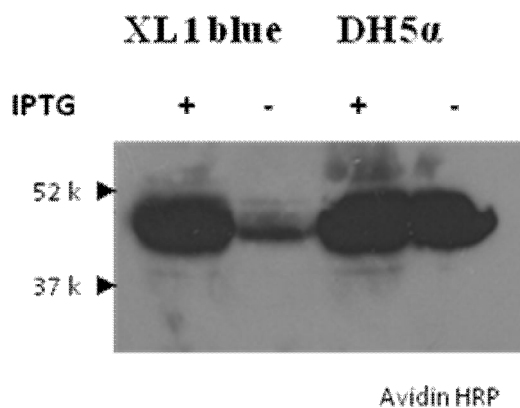
Εικόνα 3.1 Σύγκριση της αλληλουχίας των συγγενέστερων προς τον YgfO ομολόγων NAT, από θερμόφιλα βακτήρια ή αρχαία, στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή της οικογένειας. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

Το γονίδιο *MoorT* κινητοποιήθηκε με PCR από το γονιδίωμα της *M. thermoacetica* και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιακό φορέα pT7-5, χρησιμοποιώντας αρχικά τον C-τελικό επίτοπο της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης (BAD domain) και, μετά από δεύτερη υποκλωνοποίηση, την ουρά των 10 ιστιδινών (His₁₀). Μετά από επαλήθευση της πλήρους κωδικοποιούσας αλληλουχίας, έγινε εισαγωγή του πλασμιδίου pT7-5/*moorT* – BAD σε μια εκτενή σειρά στελεχών *E. coli* K-12 που έχουμε στο εργαστήριο (εδάφιο 2.1) και ακολούθησε έλεγχος της ετερόλογης έκφρασης της πρωτεΐνης MoorT σε παρασκευάσματα μεμβρανικών κλασμάτων *E.*

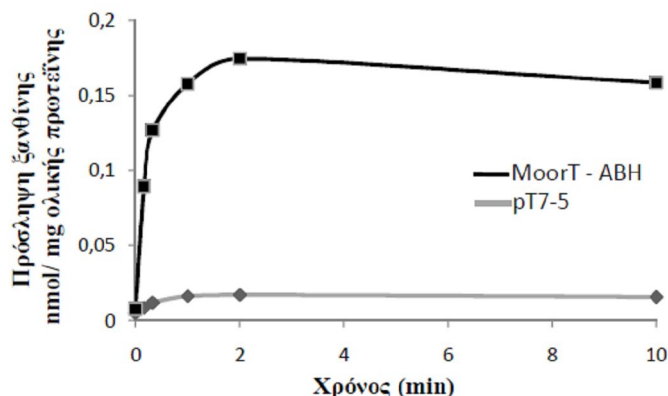
coli. Παρατηρούμε ότι ο MooG-BAD εκφράζεται πολύ ικανοποιητικά στην μεμβράνη, στα στελέχη *E. coli* DH5α, Top10F', XL1 blue, BL21(DE3) ή BL21(DE3)/pLysS αλλά όχι στα BW25113, BL21-codon plus και T184 (Εικόνα 3.2). Από την ανάλυση, ωστόσο, του ελέγχου της έκφρασης του MooG σε σχέση με την επαγωγή από IPTG, είδαμε ότι μόνον στα κύτταρα *E. coli* XL1 blue υπάρχει σχετικά καλός έλεγχος της έκφρασης (tight control), ενώ σε άλλα στελέχη, όπως π.χ. στα DH5α, η έκφραση είναι σε υψηλά επίπεδα ακόμη και χωρίς την επαγωγή από IPTG (Εικόνα 3.3). Ο αυστηρός έλεγχος της έκφρασης θα ήταν σημαντικός, παρά το ότι μπορεί να συνεπάγεται σχετικά μειωμένα επίπεδα (Εικόνα 3.2), για να αποφύγουμε φαινόμενα τοξικότητας από συνεχή υπερέκφραση της β-λακταμάσης (Sahin-Toth *et al.*, 1995b) ή σχηματισμό δυσδιάλυτων συσσωματωμάτων. Επίσης, στις συνθήκες αυτές, μπορέσαμε να ελέγξουμε λειτουργικά το γονιδιακό προϊόν (MooG) για το αν έχει ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού ή άλλων πιθανών υποστρωμάτων των μεταφορέων NAT, έχοντας το κατάλληλο αρνητικό control (pT7-5, που δεν έχει επαχθεί από IPTG). Έγιναν δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς για [8-³H]ξανθίνη (1 μM) σε θερμοκρασίες 25 °C, 37 °C, 45 °C και 55 °C, και pH 5.5, 6.0, 6.6, 6.8, 7.2 και 7.5, στα κύτταρα XL1-blue/MooG-BAD και φάνηκε ότι ο MooG μεταφέρει ξανθίνη με ενεργό μεταφορά, με σημαντικό ρυθμό και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης στους 37 °C, pH 6.8 (και pH 6.6), ενώ δεν μεταφέρει σε σημαντικά επίπεδα [¹⁴C]ουρικό, υπό τις ίδιες συνθήκες (Εικόνα 3.4). Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο εσωτερικός όγκος των κυττάρων της *E. coli* είναι περίπου 5.8 μL/mg ολικής πρωτεΐνης (Sahin-Toth *et al.*, 1995b), μπορεί να υπολογιστεί ότι η πρόσληψη ξανθίνης (1 μM) από τον MooG φτάνει σε συσσώρευση συγκέντρωσης 20 φορές μεγαλύτερης στον εσωτερικό του κυττάρου σε σχέση με το εξωτερικό (20-fold concentration gradient), μια απόδοση ενεργού μεταφοράς παρόμοια με αυτήν του μεταφορέα YicE (XanP) (Karatza and Frillingos, 2005). Από την άλλη πλευρά, δεν ανιχνεύθηκε σημαντική ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης σε pH 7.2-7.5 και 25 °C, όπου η ενεργότητα του YgfO-BAD (θετικό control) είναι πολύ υψηλή (Καρενά, 2007), αλλά ούτε και σε χαμηλότερα pH (6.0) ή υψηλότερες θερμοκρασίες (45 °C και 55 °C), όπως θα περιμέναμε με βάση τις συνθήκες ανάπτυξης της *M. thermoacetica* (Drake and Daniel, 2004). Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης ή σε αποσταθεροποίηση της μεμβράνης της *E. coli* στις υψηλότερες θερμοκρασίες.



Εικόνα 3.2 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των επιπέδων έκφρασης του MoorT-BAD σε διάφορα στελέχη του εντεροβακτηρίου *E. coli*. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση της υπό μελέτη περμεάσης από πλασμίδια pT7-5/*MoorT-BAD*. Τα δείγματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με αβιδίνη (Avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

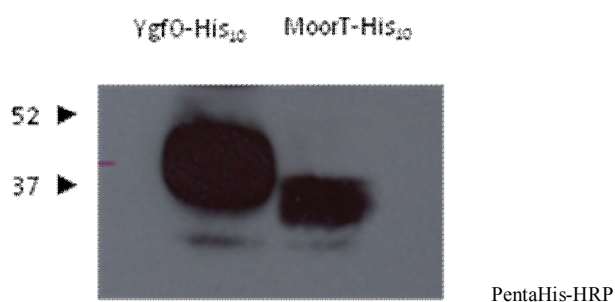


Εικόνα 3.3 Έλεγχος της ετερόλογης έκφρασης του MoorT – BAD σε κύτταρα *E. coli* XL1 blue και DH5α, μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM, 2 h) (+) ή χωρίς επαγωγή (αντίστοιχη καλλιέργεια χωρίς IPTG) (-). Μετά τη συλλογή των κυττάρων, παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών και δείγματα που περιείχαν 100 µg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%). Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη PVDF και αποτύπωση με αβιδίνη (Avidin-HRP), όπως προηγουμένως. Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.4 *E. coli* XL1-blue που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση του MoorT-BAD από πλασμίδιο pT7-5/MoorT-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM), σε 37 °C, pH 6.8. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα XL1-blue μετασηματισμένα pT7-5 ή με pT7-5/MoorT-BAD χωρίς επαγωγή από IPTG.

Τέλος, επειδή τα πρωτόκολλα απομόνωσης είχαν σχεδιασθεί με βάση την χρήση της C-τελικής αλληλουχίας των 10 ιστιδινών και τη χρωματογραφία συγγένειας νικελίου ή κοβαλτίου (Smirnova and Kaback, 2003), μεταφέραμε το γονίδιο *MoorT* στο υπόστρωμα του ανασυνδυασμένου φορέα pT7-5 με τον επίτοπο His₁₀ και εκφράσαμε τον μεταφορέα MoorT-His₁₀ στα κύτταρα XL1-blue για να συγκρίνουμε τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη μεταξύ MoorT-His₁₀ και YgfO-His₁₀ (**Εικόνα 3.5**). Είδαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του MoorT-His₁₀ είναι πολύ χαμηλά σε σχέση με αυτά που επιτυγχάνονται για τον YgfO-His₁₀.

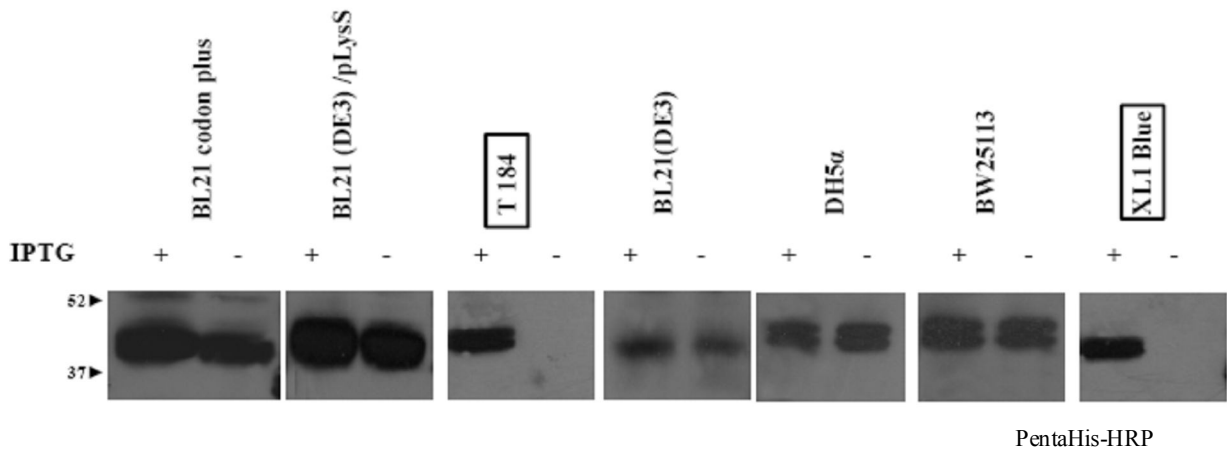


Εικόνα 3.5 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του YgfO-His₁₀ και του MoorT-His₁₀, σε κύτταρα του στελέχους XL1-blue. Μετά από ανάπτυξη και επαγωγή των κυττάρων με IPTG, παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών και δείγματα που περιείχαν 100 μg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%). Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος έναντι των ιστιδινών (PentaHis-HRP). Τα μοριακά βάρη που φαίνονται στην αριστερή πλευρά (σε kDa) προέρχονται από τον δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories).

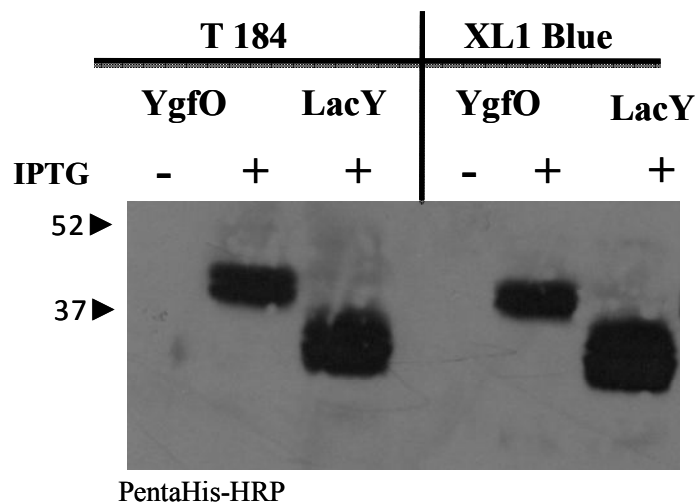
Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, δηλ. τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης για τον MooG-T-His₁₀ (Εικόνα 3.5), την έλλειψη αυστηρού ελέγχου για επαγωγή από IPTG (Εικόνα 3.3) και την μη ανίχνευση ενεργότητας του MooG-T-BAD σε θερμοκρασίες 45 °C και άνω, στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli* (Εικόνα 3.4), θεωρήσαμε ότι ο μεταφορέας MooG-T δεν ήταν η καλύτερη επιλογή για συνέχιση των πειραμάτων υπερέκφρασης-καθαρισμού ενός μεταφορέα NAT και εστιαστήκαμε περισσότερο στην προσπάθεια υπερέκφρασης-απομόνωσης του μεταφορέα YgfO-His₁₀ της *E. coli*.

3.1.1.2 Επιλογή στελέχους *E. coli* για την υπερέκφραση του YgfO-His₁₀

Ο μεταφορέας YgfO(wt)-His₁₀ της *E. coli*, ο οποίος είναι λειτουργικά ισοδύναμος με τον φυσικού τύπου YgfO χωρίς το C-τελικό σήμα εντοπισμού/απομόνωσης (Karatza and Frillingos, 2005), υπερεκφράσθηκε εξωχρωμοσωμικά σε μια σειρά στελεχών της *E. coli* K-12, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ* p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του IPTG. Τα επίπεδα έκφρασης του YgfO(wt)-His₁₀ στη μεμβράνη είναι πολύ υψηλά σε όλα τα κυτταρικά στελέχη που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.6), αλλά αυστηρός έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *ygfO* πριν και μετά από προσθήκη IPTG (0.5 mM) επιτυγχάνεται μόνον στα κύτταρα *E. coli* XL1-blue και T184. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης του YgfO(wt)-His₁₀ που επιτυγχάνονται στα XL1-blue και T184 είναι συγκρίσιμα με αυτά της LacY(C154G)-His₁₀, του μορίου που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την κρυστάλλωση της περμεάσης λακτόζης (Abramson *et al.*, 2003) (ανενεργού μεταλλάγματος της LacY που όμως μπορεί να δεσμεύει υπόστρωμα με υψηλή συγγένεια και έχει αυξημένη έκφραση στη μεμβράνη, δομική σταθερότητα μετά από απομόνωση και θερμοσταθερότητα) (Smimova and Kaback, 2003; Abramson *et al.*, 2003) (Εικόνα 3.7). Για τους λόγους αυτούς, συνεχίσαμε την προσπάθεια υπερέκφρασης-καθαρισμού της YgfO-His₁₀ στα κύτταρα αυτά (κυρίως T184, αλλά στη συνέχεια και XL1-blue).



Εικόνα 3.6 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του μεταφορέα YgfO(wt)–His₁₀, σε διάφορα στελέχη *E. coli*, μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM, 2 h) (+) ή χωρίς επαγωγή (αντίστοιχη καλλιέργεια χωρίς IPTG) (-). Παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών και δείγματα που περιείχαν 100 µg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%). Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος έναντι των ιστιδινών (PentaHis-HRP). Τα μοριακά βάρη που φαίνονται στην αριστερή πλευρά των ηλεκτροφορημάτων (σε kDa) προέρχονται από τον δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories).

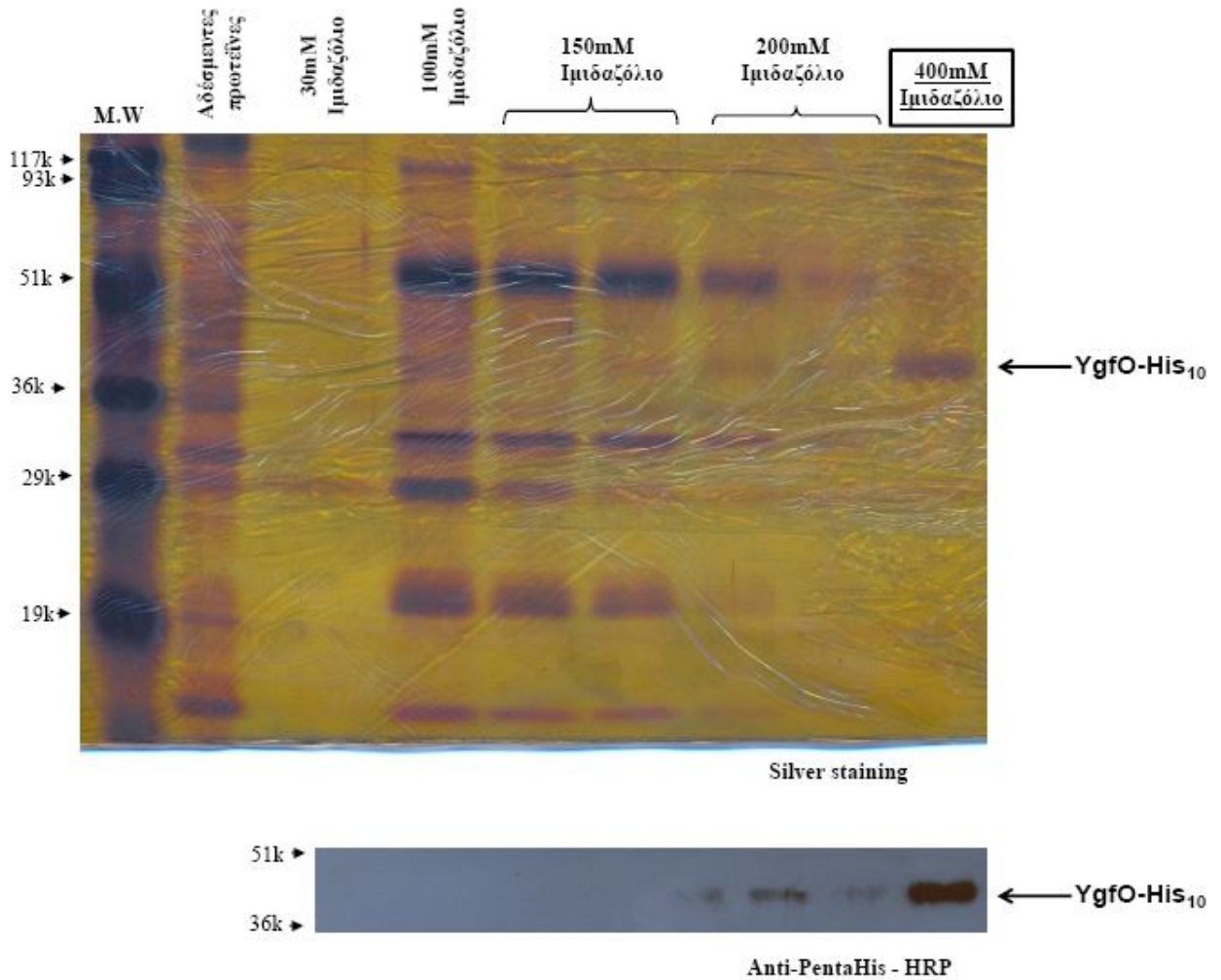


Εικόνα 3.7 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του μεταφορέα YgfO(wt)–His₁₀, σε *E. coli* T184 και XL1-blue, μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM, 2 h) (+) ή χωρίς επαγωγή (αντίστοιχη καλλιέργεια χωρίς IPTG) (-), και σύγκριση με τα επίπεδα που λαμβάνονται για τον LacY(C154G)–His₁₀, υπό τις ίδιες συνθήκες (διαδρομές, LacY, μετά από επαγωγή με IPTG, 0.5 mM, 2 h). Παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών και δείγματα που περιείχαν 100 µg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%). Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος έναντι των ιστιδινών (PentaHis-HRP). Τα μοριακά βάρη που φαίνονται στην αριστερή πλευρά του ηλεκτροφορήματος (σε kDa) προέρχονται από τον δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories).

3.1.1.3 Προσδιορισμός κατάλληλων συνθηκών για την απομόνωση του YgfO–His₁₀

Απομόνωση σε μικρή κλίμακα (10 mL καλλιέργεια)

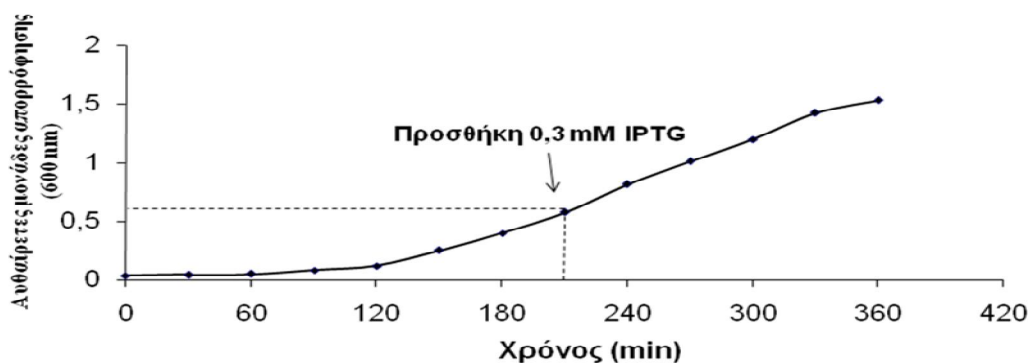
Για την απομόνωση του YgfO–His₁₀, έγιναν αρχικά προκαταρκτικά πειράματα σε μικρή κλίμακα, από 10 mL καλλιέργειας *E. coli* T184 μετασχηματισμένων με pT7-5/ygfO(wt)–His₁₀, και ελέγχθηκαν δύο διαφορετικά ήπια απορρυπαντικά (DDM, FC-14) (βλ. εδάφιο 2.13.4, στις Μεθόδους), και διαφορετικά πρωτόκολλα έκπλυσης και έκλουσης ως προς την συγκέντρωση ιμιδαζολίου, για την χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου που χρησιμοποιήθηκε (immobilized Ni²⁺ affinity chromatography). Μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM), παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών και έγινε εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με την προσθήκη 2% (w/v) *n*-δωδεκυλ-β,D-μαλτοπυρανοσιδίου (DDM) (Seelert *et al.*, 2000; Tlapak-Simmons *et al.*, 1999; Wu and Kaback, 1994; Smirnova and Kaback, 2003) ή Fos-Choline 14 (FC-14) (Lewinson *et al.*, 2008; Zeisig *et al.*, 2003), των δύο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων ήπιων απορρυπαντικών για την διαλυτοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς από βακτηριακές μεμβράνες. Καθώς η απόδοση καθαρισμού και στις δύο περιπτώσεις ήταν παρόμοια (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.13.4, Εικόνα 2.8), επιλέξαμε να συνεχίσουμε με το DDM, που έχει χρησιμοποιηθεί πολύ περισσότερο για δομικές-λειτουργικές μελέτες μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς μετά από υπερέκφραση στην *E. coli* και για κρυσταλλογραφικές αναλύσεις (Abramson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Yemool *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005; Weyand *et al.*, 2008; Faham *et al.*, 2008; Sennhauser *et al.*, 2009). Μετά την εκχύλιση των μεμβρανικών κλασμάτων πρωτεϊνών, ακολούθησε χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (Probond Ni-IDA). Μετά από δοκιμές διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου για τα διαλύματα έκπλυσης και έκλουσης, καταλήξαμε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εδάφιο 2.10.1 (Υλικά και Μέθοδοι), κατά το οποίο, μετά την επώαση των σφαιριδίων με το δείγμα, γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με διαλύματα σταδιακά αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου (30, 100, 150 και 200 mM) και τελική έκλυση με 400 mM ιμιδαζολίου. Αν και υπάρχει μικρή απώλεια ειδικής πρωτεΐνης (YgfO–His₁₀) στην έκπλυση με τα 200 mM ιμιδαζολίου, το στάδιο αυτό ήταν απαραίτητο για την εξασφάλιση μεγαλύτερης καθαρότητας του δείγματος μετά την τελική έκλυση στα 400 mM (**Εικόνα 3.8**).



Εικόνα 3.8 Απομόνωση της YgfO(wt)-His₁₀ σε μικρή κλίμακα. Παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών από 10 mL καλλιέργειας *E. coli* T184, μετασηματισμένων με pT7-5/ygfO(wt)-His₁₀, μετά από ανάπτυξη σε μέση λογαριθμική φάση και επαγωγή με IPTG (0.5 mM), για 2 h. Ακολούθησε διαλυτοποίηση των μεμβρανών σε διάλυμα DDM 2% (w/v) και χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (Ni-IDA, Probond), χρησιμοποιώντας 50 μL σφαιρίδια Ni-IDA, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.10.1 (Υλικά και Μέθοδοι). Δείγματα των 100 μL από κάθε κλάσμα (όγκου 0.1 mL, για όλα τα κλάσματα έκπλυσης ή έκλουσης) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%), ακολουθούμενη από χρώση νιτρικού αργύρου (άνω) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα pentaHis-HRP (κάτω). Τα κλάσματα που αναλύθηκαν είναι: πρώτο (από δύο συνολικά) κλάσμα έκπλυσης με 100 mM, πρώτο και δεύτερο κλάσματα έκπλυσης (από τρία συνολικά) με 150 mM, πρώτο και δεύτερο κλάσματα έκπλυσης (όλα) με 200 mM, κλάσμα έκλουσης (400 mM). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

Απομόνωση σε μεγάλη κλίμακα (1 L καλλιέργεια)

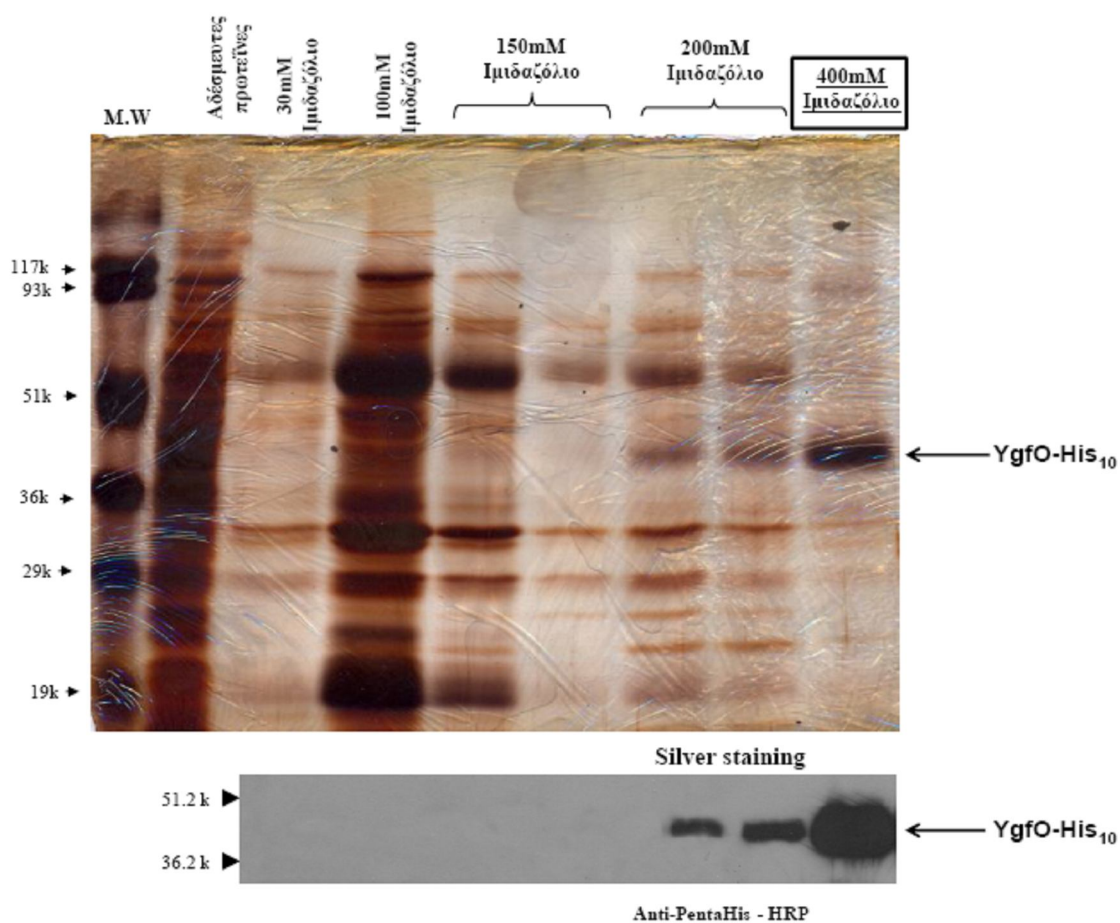
Για την απομόνωση του YgfO–His₁₀ σε μεγάλη κλίμακα, από 1 L καλλιέργειας *E. coli* T184 ή XL1-blue μετασχηματισμένων με pT7-5/ygfO(wt)–His₁₀, ακολουθήθηκαν οι γενικές γραμμές του πρωτοκόλλου εκχύλισης από τη μεμβράνη (χρήση DDM), καθαρισμού και χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου (σταδιακές εκπλύσεις με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου έως 200 mM και τελική έκλυση του YgfO με 400 mM) που είχαν καθιερωθεί από την απομόνωση μικρής κλίμακας (10 mL). Επίσης, έγιναν αρχικές μετρήσεις παρακολούθησης της ανάπτυξης των κυττάρων από την καλλιέργεια 1 L για να καθορισθούν οι καταλληλότερες συνθήκες υπερέκφρασης στη μεγάλη κλίμακα και καθιερώθηκε μια προεργασία ανάπτυξης των κυττάρων σε μέση λογαριθμική φάση (**Εικόνα 3.9**) και επαγωγής με IPTG, 0.3 mM, για 2.5 h, 37 °C, πριν τη συλλογή των κυττάρων που εκφράζουν τον YgfO–His₁₀.



Εικόνα 3.9 Κύτταρα *E. coli* T184, μετασχηματισμένα με pT7-5/ygfO(wt)–His₁₀ αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο LB (1 L) υπό αερόβιες συνθήκες, 37 °C, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους, και η ανάπτυξή τους ελέγχθηκε με τακτική δειγματοληψία και μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD₆₀₀) ανά 30 min από παράλληλη καλλιέργεια (1 mL δειγμάτων). Παρουσιάζεται επίσης ο χρόνος κατά τον οποίο προστέθηκε IPTG (0.3 mM), για την επαγωγή της έκφρασης του YgfO. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στο τέλος των παρουσιαζόμενων μετρήσεων (χρονικό σημείο 360) και υπεβλήθησαν σε θραύση με French Press και υπερφυγοκέντρωση για την παρασκευή μεμβρανών κ.ο.κ.

Τα αποτελέσματα της απομόνωσης του YgfO(wt)–His₁₀ μετά από καλλιέργεια και επαγωγή κυττάρων T184 (1 L), εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών και εφαρμογή της χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου (Probond Ni-IDA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εδάφιο 2.10.2 (Υλικά και Μέθοδοι), παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.10**. Παρατηρούμε και πάλι ότι υπάρχει μικρή απώλεια ειδικής πρωτεΐνης (YgfO–His₁₀) στην έκλυση με τα 200 mM ιμιδαζολίου, αλλά σημαντική καθαρότητα του δείγματος στο έκλουσμα

των 400 mM. Το τελικό έκλουσμα (2-8 mL) συμπυκνώνεται με φυγοκέντρηση σε Vivaspin 20 (cutoff 30 kDa) έως τελικού όγκου 1 mL και στη συνέχεια υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι 1 L διαλύματος 50 mM NaP_i, pH 7.5, 0.008% DDM, για την απομάκρυνση της περίσσειας ιμιδαζολίου. Μετά από τη συμπύκνωση και διαπίδυση, μετρήθηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης και βρέθηκε ότι τελικά απομονώνονται ~0.7 mg YgfO(wt)-His₁₀ ανά L καλλιέργειας με εκτιμώμενη σχετική καθαρότητα ~90%.

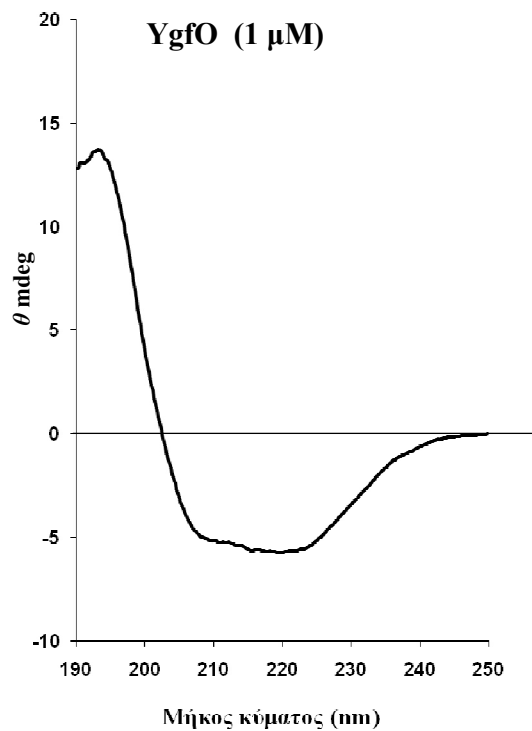


Εικόνα 3.10 Απομόνωση της YgfO(wt)-His₁₀. Παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών από 1 L καλλιέργειας *E. coli* T184, μετασηματισμένων με pT7-5/ygfO(wt)-His₁₀, μετά από ανάπτυξη σε μέση λογαριθμική φάση και επαγωγή με IPTG (0.3 mM), για 2.5 h, μετά από θραύση με πίεση σε French Press και υπερφυγοκέντρηση (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.10.2). Ακολούθησε διαλυτοποίηση των μεμβρανών σε διάλυμα DDM 2% (w/v) και χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (Ni-IDA, Probond), χρησιμοποιώντας 1 mL σφαιρίδια Ni-IDA, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.10.2 (Υλικά και Μέθοδοι). Δείγματα των 100 μL από κάθε κλάσμα (όγκου 2 mL, για όλα τα κλάσματα έκπλυσης ή έκλουσης) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%), ακολουθούμενη από χρώση νιτρικού αργύρου (άνω) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα pentaHis-HRP (κάτω). Τα κλάσματα που αναλύθηκαν είναι: πρώτο (από δύο συνολικά) κλάσμα έκπλυσης με 100 mM, πρώτο και δεύτερο κλάσματα έκπλυσης (από τρία συνολικά) με 150 mM, πρώτο και δεύτερο κλάσματα έκπλυσης (όλα) με 200 mM, κλάσμα έκλουσης (400 mM). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

3.1.2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού: ο YgfO-His₁₀ έχει υψηλό ποσοστό α-έλικας

Η ικανοποιητική απόδοση αλλά και καθαρότητα του δείγματος YgfO(wt)-His₁₀ μετά από καθαρισμό σε μεγάλη κλίμακα έδωσε τη δυνατότητα να γίνουν πειράματα με βιοφυσικές μεθόδους με σκοπό την πρωταρχική δομική ανάλυση του μεταφορέα. Καταρχήν, θελήσαμε να ελέγξουμε αν η απομονωμένη πρωτεΐνη YgfO-His₁₀ διατηρεί τη δομή της στο διάλυμα απορρυπαντικού (DDM) στο οποίο βρίσκεται διαλυτοποιημένη (0.008% DDM). Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (circular dichroism, CD) μπορεί να μας δώσει μια ένδειξη για την ποιότητα του δείγματος από τον τύπο του φάσματος καθώς για τον μεταφορέα YgfO, όπως και για τους περισσότερους διαμεμβρανικούς μεταφορείς αυτού του τύπου, αναμένεται ένα υψηλό ποσοστό α-έλικας. Η ανάλυση CD (Jasco J-815 CD Spectropolarimeter) έδειξε πράγματι ένα χαρακτηριστικό φάσμα α-έλικας για τον απομονωμένο YgfO-His₁₀ (1 μM) σε θερμοκρασία 20°C και στα μήκη κύματος 250-190 nm (**Εικόνα 3.11**). Όταν προσπαθήσαμε να υπολογίσουμε προσεγγιστικά το ποσοστό α-έλικας της πρωτεΐνης σύμφωνα με τον εμπειρικό τύπο (Mogrow *et al.*, 2000) $[\% \alpha\text{-έλικας}] = (-[\theta_{222}] + 3000) / 39000$, όπου $[\theta_{222}] = \theta_{222}/10 \ln C_p / 0.1$ και θ_{222} η ελλειπτικότητα στα 222 nm (σε mdeg) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.11.2), βρήκαμε ένα ποσοστό α-έλικας περίπου 41%. Αυτό το φάσμα α-έλικας επιβεβαιώνει τις *in silico* προβλέψεις για τη δευτεροταγή δομή του YgfO (όπου 60% και άνω από τα συνολικά 466 κατάλοιπα, προβλέπονται να εντοπίζονται μέσα σε διαμεμβρανικές έλικες), και είναι αναμενόμενο για τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς από τις αναλύσεις CD (Foster *et al.*, 1983, Fu and Maloney, 1997, Xie *et al.*, 2004, Moncoq *et al.*, 2007), κρυσταλλογραφίας (Abramson *et al.*, 2003, Yernool and Boudker, 2004, Singh *et al.*, 2005), αλλά και βιοχημικές/βιοφυσικές τεχνικές σημειακής στόχευσης (Voss *et al.*, 1996; Sorgen *et al.*, 2002; Guan and Kaback, 2006). Ωστόσο, το σχετικά χαμηλό συνολικό ποσοστό α-έλικας (41%) δεν αναμένεται για πρωτονιο-εξαρτώμενους μεταφορείς με συμπαγή δομή α-ελίκων χωρίς μεγάλες συνδετικές περιοχές ή επανεισερχόμενες συνδετικές θηλειές (reentrant loops), όπως π.χ. η περμεάση λακτόζης LacY (Abramson *et al.*, 2003): αυτοί δίνουν πολύ πιο υψηλά ποσοστά α-έλικας σε φασματοσκοπία CD, π.χ. η περμεάση LacY δίνει 85% (Foster *et al.*, 1983). Αν και μπορεί να οφείλεται σε τεχνικούς λόγους (κυρίως, ότι η μέτρηση της τελικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης δεν έχει γίνει με μεθόδους υψηλής ανάλυσης όπως π.χ. με φασματομετρία μαζών και αλληλούχιση), αυτή η παρατήρηση μπορεί να σημαίνει ότι μεγάλο μέρος της δομής του μεταφορέα YgfO δεν συγκροτείται από διαμεμβρανικές α-έλικες αλλά έχει εκτεταμένες περιοχές πιο ελεύθερης διαμόρφωσης, με

μεγαλύτερες σχετικά υδρόφιλες συνδετικές περιοχές, μικρότερα αμφιπαθικά τμήματα έλικας που δεν διασχίζουν ολόκληρη τη μεμβράνη αλλά διακόπτονται από επανεισερχόμενες συνδετικές θηλειές (reentrant loops) κλπ.



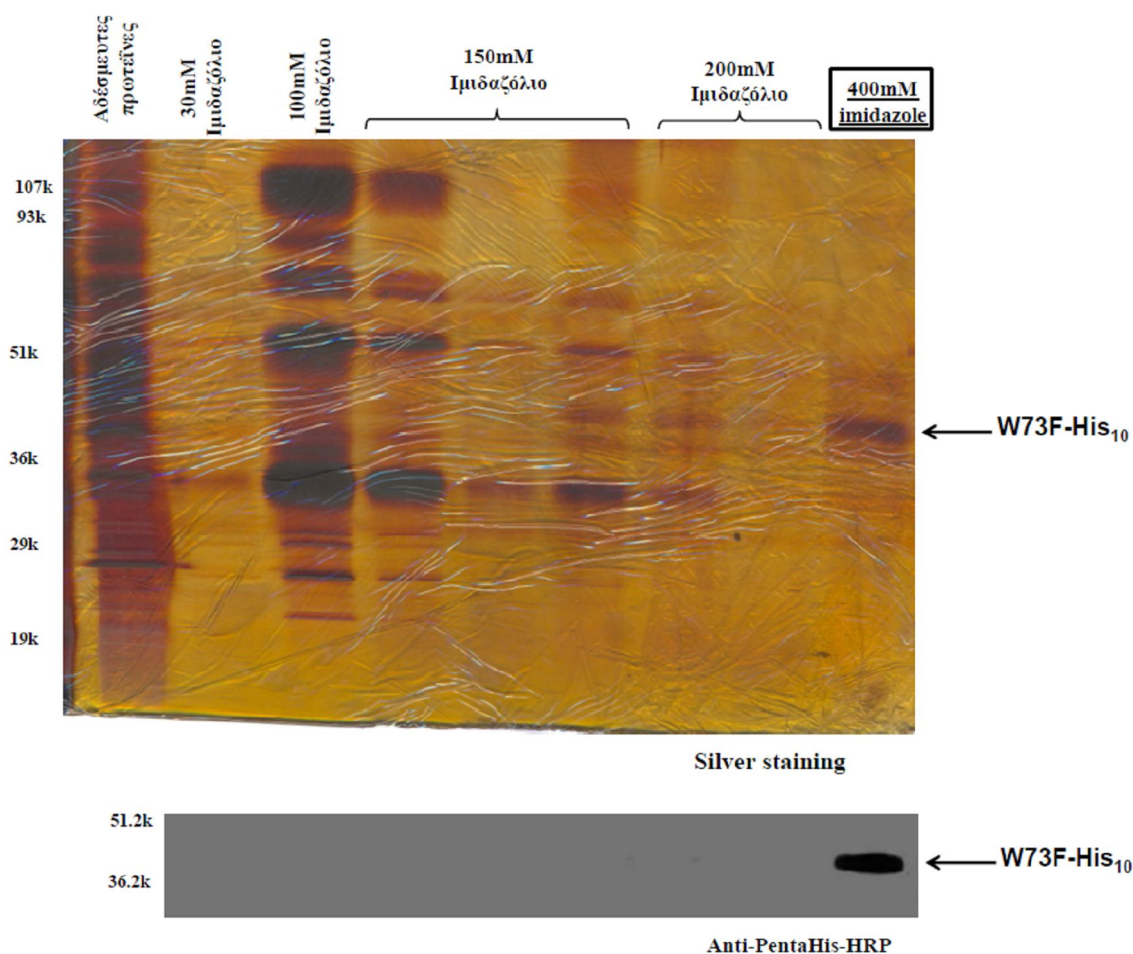
Εικόνα 3.11 Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απομονωμένου YgfO(wt)-His₁₀ (1 μM) σε διάλυμα 50 mM NaP_i, pH 7.5, 0.008% DDM, σε 20 °C. Οι ελάχιστες (έως αμελητέες) τιμές ελλειπτικότητας που μετρήθηκαν στην περιοχή 250-190 nm για το αρνητικό control (διάλυμα 50 mM NaP_i, pH 7.5, 0.008% DDM, χωρίς πρωτεΐνη) αφαιρέθηκαν από τις μετρήσεις του δείγματος για την διόρθωση του φάσματος.

3.1.3 Φθορισμομετρία τρυπτοφανών: ο YgfO αναγνωρίζει ειδικά ξανθίνη

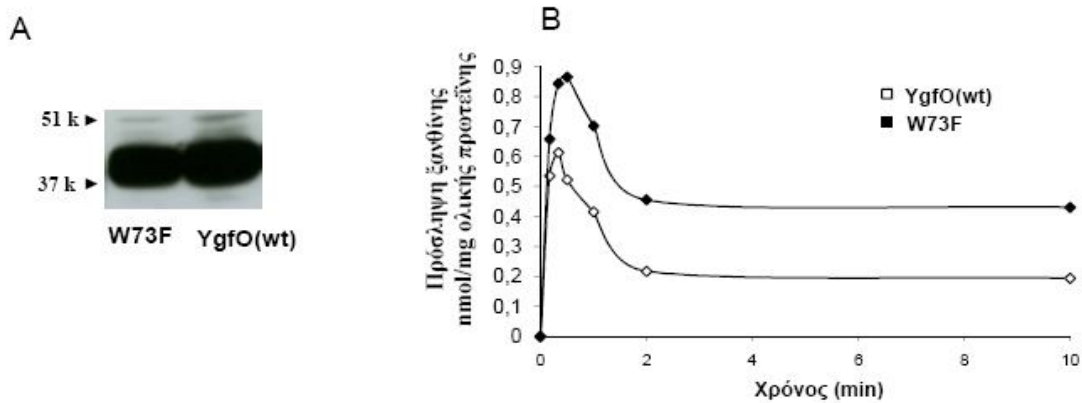
Ο ενδογενής φθορισμός που προέρχεται από τα εγγενή κατάλοιπα τρυπτοφάνης (Trp) έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας στις πρωτεΐνες μεταφορείς (Weitzmann *et al.*, 1995; Smirnova *et al.*, 2006; Tyagi *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007). Οι τρυπτοφάνες είναι αμινοξέα που με διέγερση σε κατάλληλο μήκος κύματος (295 nm), εκπέμπουν σήμα φθορισμού στην περιοχή 300-400 nm, με μέγιστο σε μήκος κύματος μικρότερο του 350 nm ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται (όσο πιο υδρόφοβο, τόσο μικρότερο το μήκος κύματος του μεγίστου σε σχέση με την ελεύθερη τρυπτοφάνη, <350 nm). Το YgfO περιέχει ένα μοναδικό κατάλοιπο τρυπτοφάνης στη θέση 73 (Trp-73) στο κυτταροπλασματικό άκρο της διαμεμβρανικής έλικας TM2, και, επομένως, το μικροπεριβάλλον της θέσης Trp-73 και η πιθανή επίδραση υποστρώματος μπορεί να μελετηθεί κατευθείαν στην απομονωμένη φυσικού τύπου YgfO(wt) [=single-Trp73]. Για να εξετάσουμε την ειδικότητα του σήματος της τρυπτοφάνης, κατασκευάσαμε, και απομονώσαμε επίσης μια περμεάση YgfO απαλλαγμένη της εγγενούς τρυπτοφάνης, δηλ. το μετάλλαγμα YgfO(W73F) όπου το κατάλοιπο Trp-73 έχει αντικατασταθεί από Phe. Αυτή η περμεάση (Trp-less YgfO) ήταν πλήρως λειτουργική (**Εικόνα 3.12**) και μετά από μεταφορά στο υπόστρωμα της ουράς των 10 ιστιδινών [YgfO(W73F)-His₁₀] και απομόνωση στις συνθήκες που είχαν εφαρμοσθεί και για την φυσικού τύπου YgfO(wt)-His₁₀ (εδάφιο 3.1.1.3) (**Εικόνα 3.13**), χρησίμευσε ως αρνητικός μάρτυρας στα πειράματα φθορισμομετρίας. Εξάλλου, η ελεύθερη τρυπτοφάνων περμεάση (Trp-less YgfO) χρησιμοποιήθηκε ανεξάρτητα ως υπόστρωμα για να κατασκευασθούν μεταλλάγματα μοναδικής τρυπτοφάνης (single-Trp mutants) για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του YgfO (βλ. παρακάτω, εδάφιο 3.4.1).

3.1.3.1 Φθορισμομετρία τρυπτοφανών –YgfO(wt) (single-W73) και YgfO(W-less) (W73F)

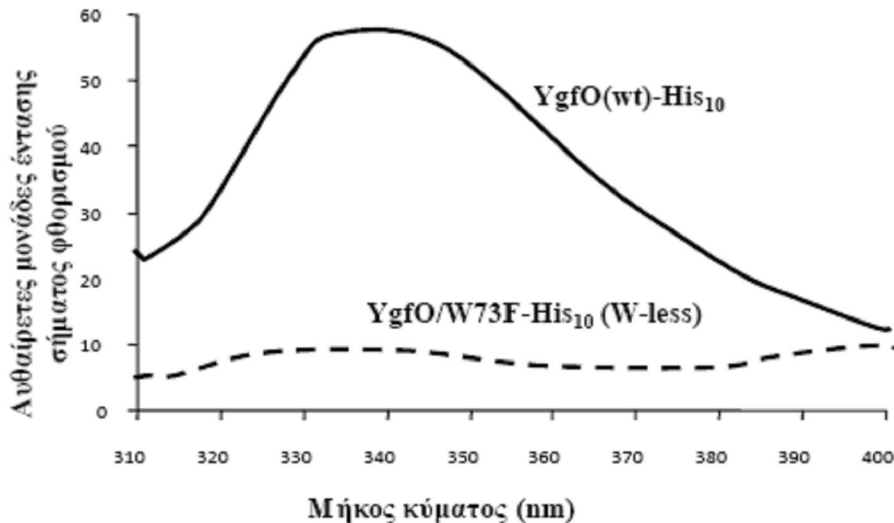
Η φθορισμομετρική ανάλυση (Hitachi F-2500) δείχνει ότι η απομονωμένη YgfO(wt) (single-W73) εκπέμπει ειδικό σήμα φθορισμού τρυπτοφάνης με μέγιστο στα 334 nm, ενώ, σε ίδια μοριακή συγκέντρωση, η απομονωμένη YgfO(W-less) (W73F) δεν εκπέμπει καθόλου σήμα φθορισμού στην περιοχή 310-400 nm μετά από διέγερση στα 295 nm (**Εικόνα 3.14**).



Εικόνα 3.13. Απομόνωση της YgfO(W73F)-His₁₀. Παρασκευάστηκαν κλάσματα μεμβρανών από 1 L καλλιέργειας *E. coli* T184, μετασηματισμένων με pT7-5/ygfO(W73F)-His₁₀, μετά από ανάπτυξη σε μέση λογαριθμική φάση και επαγωγή με IPTG (0.3 mM), για 2.5 h, μετά από θραύση με πίεση σε French Press και υπερφυγοκέντρωση (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.10.2). Ακολούθησε διαλυτοποίηση των μεμβρανών σε διάλυμα DDM 2% (w/v) και χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (Ni-IDA, Probond), χρησιμοποιώντας 1 mL σφαιρίδια Ni-IDA, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.10.2 (Υλικά και Μέθοδοι). Δείγματα των 100 μL από κάθε κλάσμα (όγκου 2 mL, για τα κλάσματα έκπλυσης ή έκλουσης) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%), ακολουθούμενη από χρώση νιτρικού αργύρου (άνω) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα pentaHis-HRP (κάτω). Τα κλάσματα που αναλύθηκαν είναι: πρώτο (από δύο συνολικά) κλάσμα έκπλυσης με 100 mM, πρώτο, δεύτερο και τρίτο κλάσματα έκπλυσης (όλα) με 150 mM, πρώτο και δεύτερο κλάσματα έκπλυσης (όλα) με 200 mM, κλάσμα έκλουσης (400 mM). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.12 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (A) και ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (B) της περιμεάσης YgfO(W73F) σε σύγκριση με την φυσικού τύπου YgfO(wt). (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περιμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(wt)-His₁₀ και pT7-5/ygfO(W73F)-His₁₀. Τα δείγματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περιμεασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(wt)-His₁₀ και pT7-5/ygfO(W73F)-His₁₀ υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Οι τιμές που προέκυψαν από μετρήσεις του αρνητικού μάρτυρα, δηλ. από T184 που ήταν μετασχηματισμένα με pT7-5 χωρίς τα γονίδια των περιμεασών, αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση (τιμές αρνητικού μάρτυρα 0.05 nmol mg⁻¹ min⁻¹ για 10-20 sec, και 0.01 nmol mg⁻¹ για 1-10 min)

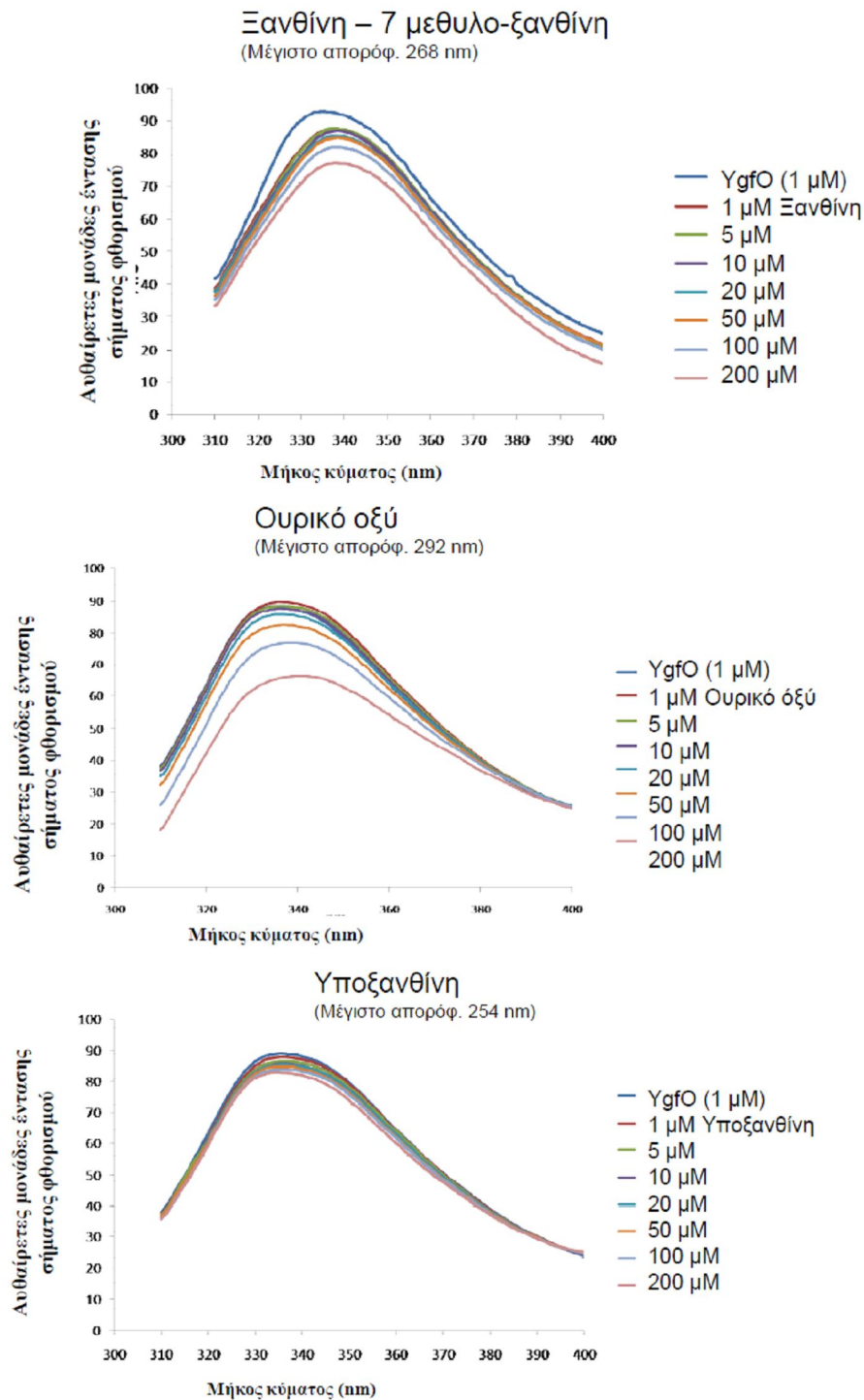


Εικόνα 3.14. Φάσμα εκπομπής φθορισμού της απομονωμένης περιμεάσης φυσικού τύπου YgfO(wt)-His₁₀ (1 μM) και της ελεύθερης τρυπτοφάνης περιμεάσης YgfO(W73F)-His₁₀ (1 μM), σε διάλυμα 50mM NaP_i (pH 7.5), 0.008% DDM, μετά από διέγερση στα 295 nm (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.11.3). Με μαύρη συμπαγή γραμμή απεικονίζεται το φάσμα για τη διαπεράση YgfO(wt) και με διακεκομμένη γραμμή το φάσμα για τη YgfO(W73F).

3.1.3.2. Επίδραση υποστρωμάτων στον φυσικού τύπου YgfO (single-W73)

Ένα πρόβλημα που προκύπτει από την εφαρμογή της φθορισμομετρίας τρυπτοφανών στον μεταφορέα YgfO είναι ότι οι ειδικοί προσδέτες του YgfO (πουρίνες) απορροφούν ισχυρά στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για τη διέγερση της τρυπτοφάνης (295 nm) και τα φάσματα επηρεάζονται από μη ειδική απόσβεση του σήματος (inner filter effect) (Smirnova *et al.*, 2006). Για να αντιμετωπίσουμε το ζήτημα αυτό, αποφύγαμε να χρησιμοποιήσουμε προσδέτες/υποστρώματα με μέγιστο απορρόφησης κοντά στα 295 nm (ιδίως το ουρικό, που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 292 nm), αλλά χρησιμοποιήσαμε το ζεύγος ξανθίνη (που είναι υπόστρωμα του YgfO) και 7-μεθυλοξανθίνη (που δεν αναγνωρίζεται από τον YgfO): και οι δύο αυτές ενώσεις απορροφούν με μέγιστο στα 268 nm, και δεν εμφανίζουν έντονη μη ειδική απόσβεση του σήματος από το φάσμα της τρυπτοφάνης, όταν χρησιμοποιηθούν σε συγκέντρωση έως 0.2 mM [συγκέντρωση YgfO(wt), 1 μM], σε αντίθεση με το ουρικό, που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί (Εικόνα 3.14). Ως αρνητικό control, θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί και η υποξανθίνη (μέγιστο απορρόφησης 254 nm), η οποία έχει ακόμη μικρότερη επίδραση στο σήμα της τρυπτοφάνης (Εικόνα 3.14), αλλά προτιμήθηκε η 7-μεθυλοξανθίνη που εμφανίζει όμοιο πρότυπο επίπτωσης στο φάσμα με την ξανθίνη (Εικόνα 3.14) και είναι γνωστό από τις βιοχημικές μελέτες (Karatza *et al.*, 2006; Karatza and Frillingos, 2005; Goudela *et al.*, 2005) ότι δεν αναγνωρίζεται καθόλου ως προσδέτης από τον YgfO ή άλλους συγγενείς μεταφορείς NAT.

Εφόσον το αποτέλεσμα που παίρνουμε όταν χρησιμοποιούμε την ξανθίνη και την 7-μεθυλοξανθίνη για απευθείας ανάλυση της επίπτωσης στο φάσμα τρυπτοφανών (Εικόνα 3.14) φαίνεται να είναι συνισταμένη τόσο του μη ειδικού (inner-filter effect) όσο και ενός πιθανού ειδικού σήματος (Smirnova *et al.*, 2006), δεν είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί η άμεση αυτή ανάλυση για την μελέτη των αλλαγών διαμόρφωσης που επηρεάζουν το περιβάλλον του καταλοίπου Trp-73 στο μόριο του YgfO(wt). Θα μπορούσε όμως να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση απόσβεσης του σήματος φθορισμού από μη ειδικά πολικά αντιδραστήρια (polar quenchers) (Wu *et al.*, 1994, 1995; Tyagi *et al.*, 2007), σε συνδυασμό με προεπώαση με το υπόστρωμα (ξανθίνη) και άλλους πιθανούς προσδέτες του YgfO(wt), όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

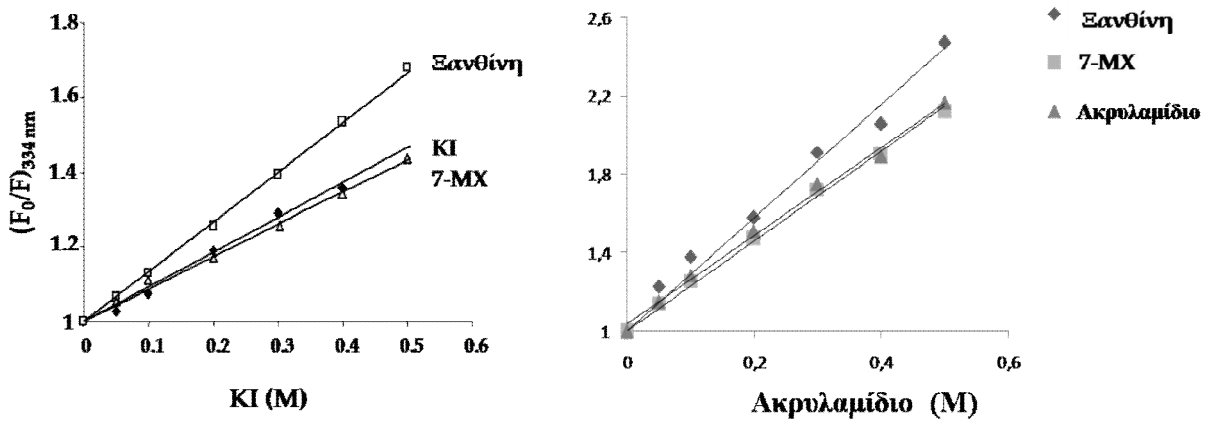


Εικόνα 3.15. Φάσματα εκπομπής φθορισμού της απομονωμένης περμεάσης φυσικού τύπου YgfO(wt)-His₁₀ (1 μM), σε διάλυμα 50mM NaP_i (pH 7.5), 0.008% DDM, μετά από εξισορρόπηση του δείγματος με 1 μM έως 0.2 mM Ξανθίνης, 7-μεθυλοξανθίνης, ουρικού, ή υποξανθίνης, όπως φαίνεται στα σχήματα, και διέγερση στα 295 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι μετρήσεις διορθώθηκαν βάσει του αντίστοιχου συντελεστή αραιώσης (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.11.3)

3.1.3.3. Επίδραση υποστρωμάτων και πολικών αντιδραστηρίων στον φυσικού τύπου YgfO

Η προσβασιμότητα της Tgr-73 σε περισσότερο ή λιγότερο υδρόφιλα πολικά αντιδραστήρια (ιωδιούχο κάλιο, ακρυλαμίδιο), τα οποία μπορούν να προκαλέσουν μη ειδική απόσβεση του σήματος της τρυπτοφάνης (Tyagi *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007), ελέγχθηκε μετά από επώαση της απομονωμένης YgfO(wt)-His₁₀ (1 μM) με 0.05 M έως 0.5 M αντιδραστηρίου, παρουσία και απουσία ξανθίνης (0.2 mM) ή 7-μεθυλοξανθίνης (0.2 mM) (Εικόνα 3.16). Από τις αναλύσεις αυτές, προσδιορίστηκε η σταθερά Stern-Volmer (K_{SV}), σε κάθε περίπτωση, από τον τύπο: $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, όπου F_0 η αρχική ένταση του σήματος στο βέλτιστο μήκος κύματος (334 nm) (Εικόνα 3.14 και 3.15), F η ένταση σήματος στο βέλτιστο μήκος κύματος μετά από την επίδραση του πολικού αντιδραστηρίου (quencher) και $[Q]$, η συγκέντρωση του πολικού αποσβεννύοντος μορίου (Q, quencher) (Wu *et al.*, 1995). Και στις δύο περιπτώσεις, ιωδιούχου καλίου και ακρυλαμιδίου, είναι εμφανές ότι η απόσβεση του φθορισμού από τα πολικά αντιδραστήρια γίνεται εντονότερη παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνης) ενώ δεν επηρεάζεται παρουσία της 7-μεθυλοξανθίνης (control). Το αποτέλεσμα δείχνει ότι, παρουσία ξανθίνης, η Tgr-73 προσεγγίζει σε ένα πολικότερο περιβάλλον, ανταποκρινόμενη στην αλλαγή διαμόρφωσης που επάγει το υπόστρωμα. Επίσης, δείχνει ότι η απομονωμένη YgfO(wt) αναγνωρίζει ειδικά την ξανθίνη και, από τους σχετικούς συντελεστές απόσβεσης K_{SV} με τα δύο πολικά αντιδραστήρια, επαληθεύει ότι η Tgr-73 βρίσκεται καταρχήν σε ένα πιο υδρόφοβο περιβάλλον (συμφωνώντας και με το μέγιστο του φάσματος στο μήκος κύματος 334 nm) που είναι περισσότερο προσβάσιμο από το λιγότερο πολικό αντιδραστήριο (ακρυλαμίδιο) και λιγότερο από το ιωδιούχο κάλιο (Εικόνα 3.16). Οι αντίστοιχες τιμές K_{SV} είναι

K_{SV} (KI)	0.8932	($R^2 = 0.9982$)
K_{SV} (KI) παρουσία ξανθίνης	1.2851	($R^2 = 0.9910$)
K_{SV} (ακρυλαμίδιο)	2.1783	($R^2 = 0.9936$)
K_{SV} (ακρυλαμίδιο) παρουσία ξανθίνης	2.7946	($R^2 = 0.9818$)



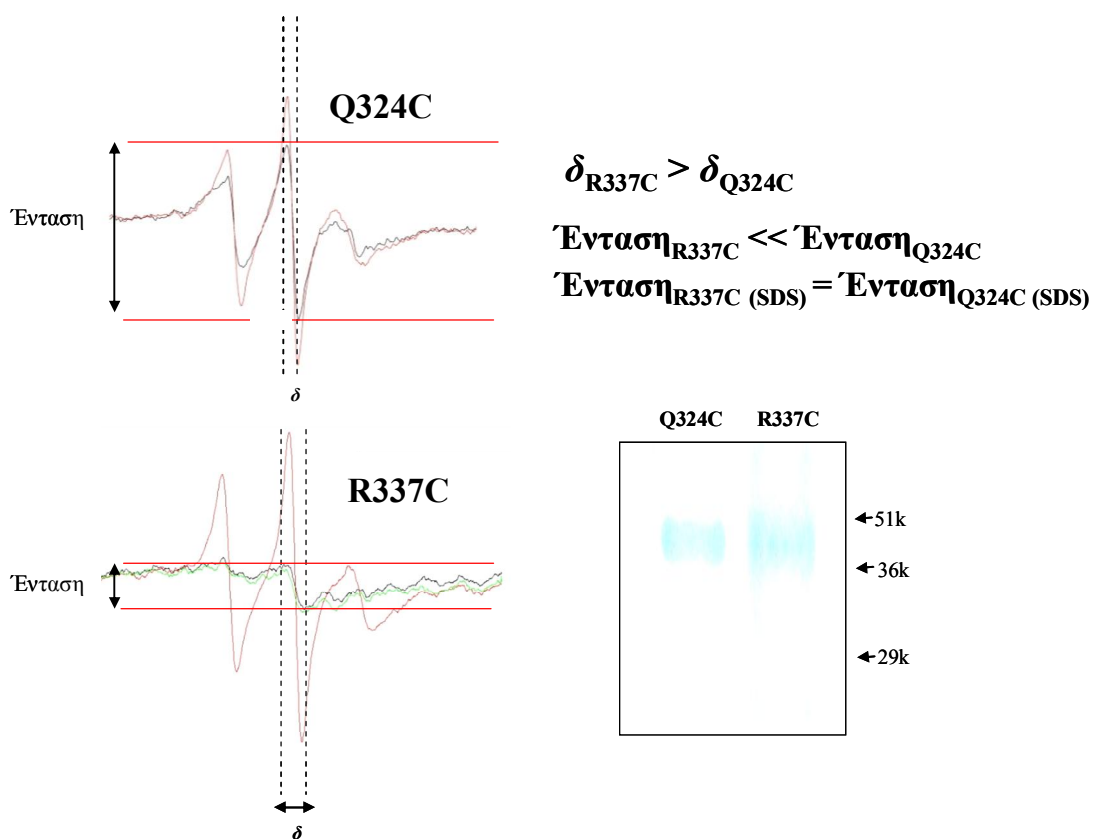
Εικόνα 3.16: Απόσβεση του σήματος της τρυπτοφάνης που δίνει η YgfO(wt)-His₁₀ (1 μ M), σε διάλυμα 50mM NaP_i (pH 7.5), 0.008% DDM, από το ιωδιούχο κάλιο (KI) (αριστερά) και από το ακρυλαμίδιο (δεξιά), απουσία ή παρουσία ξανθίνης (0.2 mM) ή 7-μεθυλοξανθίνης (0.2 mM). Φάσματα εκπομπής (310-400 nm) λήφθηκαν μετά από εξισορρόπηση του δείγματος με τις αντίστοιχες πουρίνες και αντιδραστήρια απόσβεσης και φθορισμομετρική διέγερση στα 295 nm, και καταγράφηκαν οι εντάσεις του σήματος φθορισμού στο βέλτιστο μήκος κύματος (334 nm). Για τον υπολογισμό των συντελεστών K_{SV} , τα δεδομένα που δείχνουν τα διαγράμματα προσαρμόστηκαν στη γραμμική εξίσωση $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$, όπου F_0 η αρχική μέγιστη ένταση σήματος (334 nm), F η ένταση του σήματος (334 nm) μετά την προσθήκη αντίστοιχης συγκέντρωσης πολικού μορίου, K_{SV} η σταθερά Stern-Volmer και $[Q]$ η μοριακή συγκέντρωση του πολικού μορίου (M).

3.1.4 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός: ο YgfO-His₁₀ διατηρεί χαρακτηριστικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής στο μοτίβο-υπογραφή NAT

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) σε συνδυασμό με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης και σήμανση των καταλοίπων Cys με SH-ειδικό σήμα ιδιοστροφορμής (ελεύθερο σπιν ηλεκτρονίων), όπως με το αντιδραστήριο MTS-SL (εδάφιο 1.6.1.1) (site-directed spin labeling, SDSL), έχει δώσει σημαντικά στοιχεία για την τοπική δευτεροταγή δομή, προσβασιμότητα σε πολικά αντιδραστήρια, επίδραση υποστρωμάτων και άλλες παραμέτρους της δομής και δυναμικής των διαμορφώσεων μιας σειράς διαμεμβρανικών μεταφορέων (Wu *et al.*, 1994; Voss *et al.*, 1996, 1997; Jung, 1998; Wang *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999a,b; Oda *et al.*, 2003; Hubbell *et al.*, 2000). Οι εφαρμογές SDSL και EPR μετρούν ουσιαστικά την σχετική ελευθερία κίνησης του σπιν σε κάθε εξεταζόμενη θέση υποκατεστημένης Cys και οι διαφορές ή αλλαγές κινητικότητας του spin label παρέχουν πληροφορίες (α) για την ύπαρξη α-έλικας, β-πτυχωτών επιφανειών ή άλλων στοιχείων δευτεροταγούς δομής, (β) για την δυναμική κίνησης συγκεκριμένων περιοχών, (γ) για αλλαγές στη δευτεροταγή δομή παρουσία υποστρώματος, πολικών αντιδραστηρίων, κ.ο.κ.. Βασικά πλεονεκτήματα της SDSL είναι ότι αρκεί μικρή ποσότητα πρωτεΐνης (50-100 pmol) και δεν υπάρχει όριο στο μέγεθος της πρωτεΐνης υπό εξέταση (Hubbell *et al.*, 2000).

Εφόσον η φασματοσκοπία EPR μπορεί να εφαρμοσθεί με επιτυχία σε απομονωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες σε διαλυτή μορφή (αραιό διάλυμα DDM), θελήσαμε να εξετάσουμε ορισμένα μεταλλάγματα κυστεϊνών του YgfO, για να ανιχνεύσουμε κατά πόσον ο YgfO διατηρεί, σε απομονωμένη μορφή, βασικά στοιχεία της τοπολογίας ή δευτεροταγούς δομής του: ιδιαίτερα, μας ενδιέφερε η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή NAT, για την οποία *in silico* προβλέψεις και δεδομένα μας από τις αναλύσεις κυστεϊνικής σάρωσης (Karatza *et al.*, 2006; Koukaki *et al.*, 2005) υποδεικνύουν ότι σχηματίζονται δύο διακριτές δομικές περιοχές, μια πιο ελεύθερη, πιθανόν β-στροφής στην αρχή του μοτίβου (323-329) και μια διαμόρφωση α-έλικας (329-339) (Karatza *et al.*, 2006). Για τον σκοπό αυτό, υπερεκφράσαμε και απομονώσαμε ενδεικτικά μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή και, συγκεκριμένα, τα Q324C (που εμπίπτει στην ανοικτή, πιο ελεύθερη διαμόρφωση στροφής) και R337C (που εμπίπτει στην δομή α-έλικας) και, μετά από σήμανση με το αντιδραστήριο MTS-SL εξετάσαμε την συμπεριφορά τους σε EPR (φασματοσκόπιο JEOL X-band). Τα πειράματα αυτά έγιναν στο εξειδικευμένο συνεργαζόμενο εργαστήριο του Dr. John C. Voss (University of

California at Davis, Medical School, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Davis CA, USA). Χαρακτηριστικά φάσματα EPR των απομονωμένων και σεσημασμένων (spin-labeled) YgfO(Q324C)-MTS-SL και YgfO(R337C)-MTS-SL φαίνονται στην **Εικόνα 3.17**. Από την συγκριτική μέτρηση των τιμών δ (οριζόντια απόσταση μεταξύ μέγιστου και ελάχιστου της έντασης της κεντρικής κορυφής του φάσματος, αντιστρόφως ανάλογη της κινητικότητας του spin label) καθώς και της έντασης (κατακόρυφη απόσταση μεταξύ μέγιστου και ελάχιστου της κεντρικής κορυφής) προκύπτουν σαφείς διαφορές μεταξύ των φασμάτων που μπορούν να αποδοθούν στο ότι το spin στη θέση Q324C είναι πιο ευέλικτο γιατί βρίσκεται πιθανόν σε πιο ελεύθερη διαμόρφωση (στροφή) ενώ το spin στη θέση R337C έχει περιορισμένη κινητικότητα για βρίσκεται πιθανόν σε δομικά πιο συμπαγή περιοχή (α -έλικα). Η περιορισμένη κινητικότητα του spin label της θέσης 337 απελευθερώνεται μετά από αποδιάταξη της δομής σε SDS, γιατί πιθανόν χαλαρώνει η δομή του μορίου, αν και μια εναλλακτική εξήγηση θα ήταν ότι διασπάται κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών μορίων (που μπορεί να οφείλεται σε σχηματισμό ομοδιμερών και γειτονικών ζευγών spin labels). Σε κάθε περίπτωση, η έντονη διαφορά στα φάσματα των δύο μεταλλαγμάτων είναι συμβατή με την ερμηνεία των δύο διακριτών στοιχείων δομικής διαμόρφωσης στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή NAT και υποδηλώνει, παράλληλα, ότι η απομονωμένη πρωτεΐνη YgfO-His₁₀ διατηρεί στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της.



Εικόνα 3.17 Φάσματα EPR για τα μεταλλάγματα YgfO(Q324C)-His₁₀ και YgfO(R337C)-His₁₀ καθώς και SDS-PAGE μετά από χρώση με Coomassie blue όπου φαίνεται η καθαρότητα των δειγμάτων. Η ανάλυση έγινε σε 6 μL κλάσματος απομονωμένης πρωτεΐνης τελικής συγκέντρωσης 1 μM που είχε σημειωθεί με 0.2 mM MTS-SL κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας νικελίου. Η μαύρη γραμμή φάσματος απεικονίζει το φάσμα του δείγματος, ενώ με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται το φάσμα αποδιατεταγμένου δείγματος με 2% SDS [στην περίπτωση του R337C, με πράσινη γραμμή απεικονίζεται το φάσμα παρουσία 1 mM ξανθίνης]. Ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές είναι η παράμετρος δ και ανάμεσα στις κόκκινες ευθείες η μέγιστη ένταση του φάσματος των δειγμάτων.

3.2 Τοπολογική οργάνωση του μεταφορέα YgfO

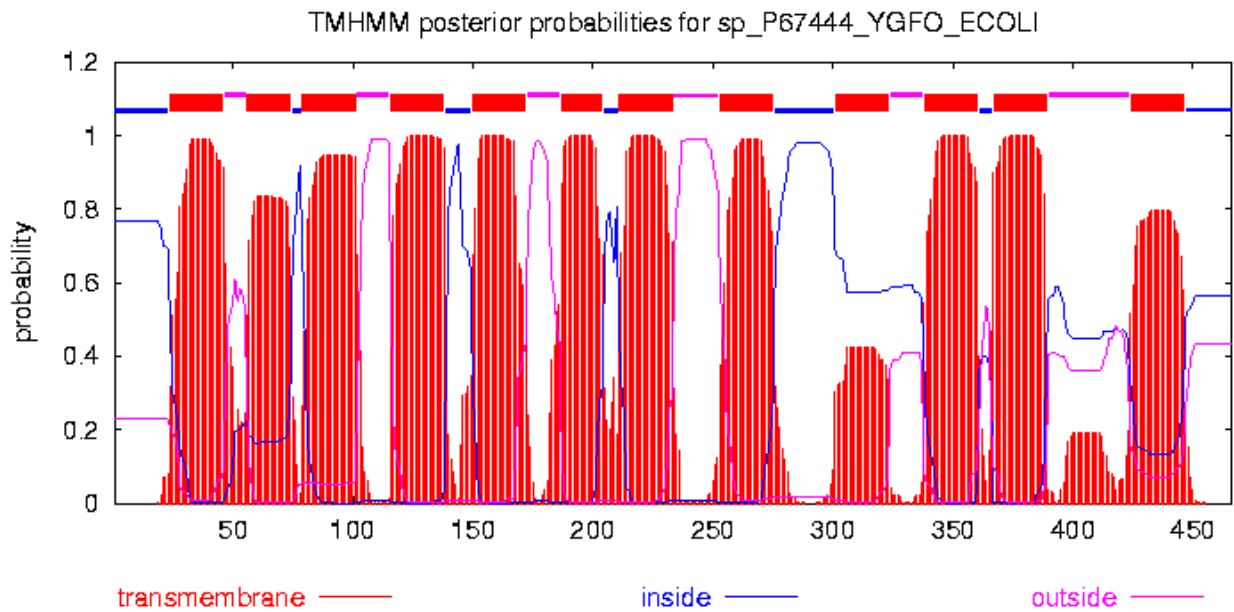
Η τοπολογική οργάνωση μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα αποτελεί πληροφορία μείζονος σημασίας για την περαιτέρω μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας της. Για την οικογένεια των μεταφορέων NAT, ειδικότερα, ένα από τα κεντρικά ερευνητικά προβλήματα αναφέρεται στην τοπολογική τους οργάνωση, δηλ. κατά πόσον οι πολυτοπικές αυτές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν 11, 12, 13, ή 14 διαμεμβρανικά τμήματα (de Koning and Diallinas, 2000) και ποιος είναι ο προσανατολισμός των τμημάτων αυτών σε σχέση με το επίπεδο της μεμβράνης. Αν και σήμερα όλοι οι αλγόριθμοι πρόβλεψης από διάφορα υπολογιστικά προγράμματα συγκλίνουν στην θεωρία ότι τα μέλη της οικογένειας NAT περιέχουν 12 διαμεμβρανικά τμήματα α -έλικας (TMs), με κυτταροπλασματικά N-τελικά και C-τελικά άκρα, (Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.4), υπάρχει έντονη ασάφεια στις προβλέψεις μετά το πιθανό διαμεμβρανικό τμήμα 8 (TM8), οι οποίες διαφοροποιούνται δραματικά ανάλογα με το *in silico* πρόγραμμα που χρησιμοποιείται (Καρενά, 2007), αλλά και ανάλογα με το ομόλογο που εξετάζεται (βλ. και εδάφιο 3.2.1). Ένα επιπλέον πρόβλημα, άλλωστε, είναι ότι η τοπολογία πιθανόν να εμφανίζει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, διότι, όπως έχει φανεί πρόσφατα από τις κρυσταλλικές δομές άλλων μεταφορέων, όπως του GlT_{Ph} (Yemool *et al.*, 2004) και του LeuT_{Aa} (Yamashita *et al.*, 2005), μπορεί να υπάρχουν μικρά αμφιπαθικά τμήματα που δεν διατρέχουν ολόκληρη τη μεμβράνη ή και υδρόφιλα συνδετικά τμήματα που επανεισέρχονται στο μεμβρανικό περιβάλλον και παίζουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό (reentrant loops). Θα πρέπει, επομένως, να είναι κατανοητό ότι οι διαθέσιμες βιοχημικές πειραματικές προσεγγίσεις μπορούν να δώσουν μια προκαταρκτική μόνο εικόνα της τοπολογικής οργάνωσης, η οποία, συχνά, δεν αρκεί, αλλά απαιτεί αναλυτικά δομικά δεδομένα για να διαλευκανθεί πλήρως.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, μελετήσαμε την προσβασιμότητα των καταλοίπων στις κορυφαίες θέσεις όλων των συνδετικών τμημάτων του YgfO μεταξύ των προβλεπόμενων διαμεμβρανικών τμημάτων α -έλικας. Για τον σκοπό αυτόν, εφαρμόσαμε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και έλεγχο προσβασιμότητας των υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM, substituted-cysteine accessibility method) από το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁺, που έχει δειχθεί πειραματικά ότι δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη (Kwaw *et al.*, 2001).

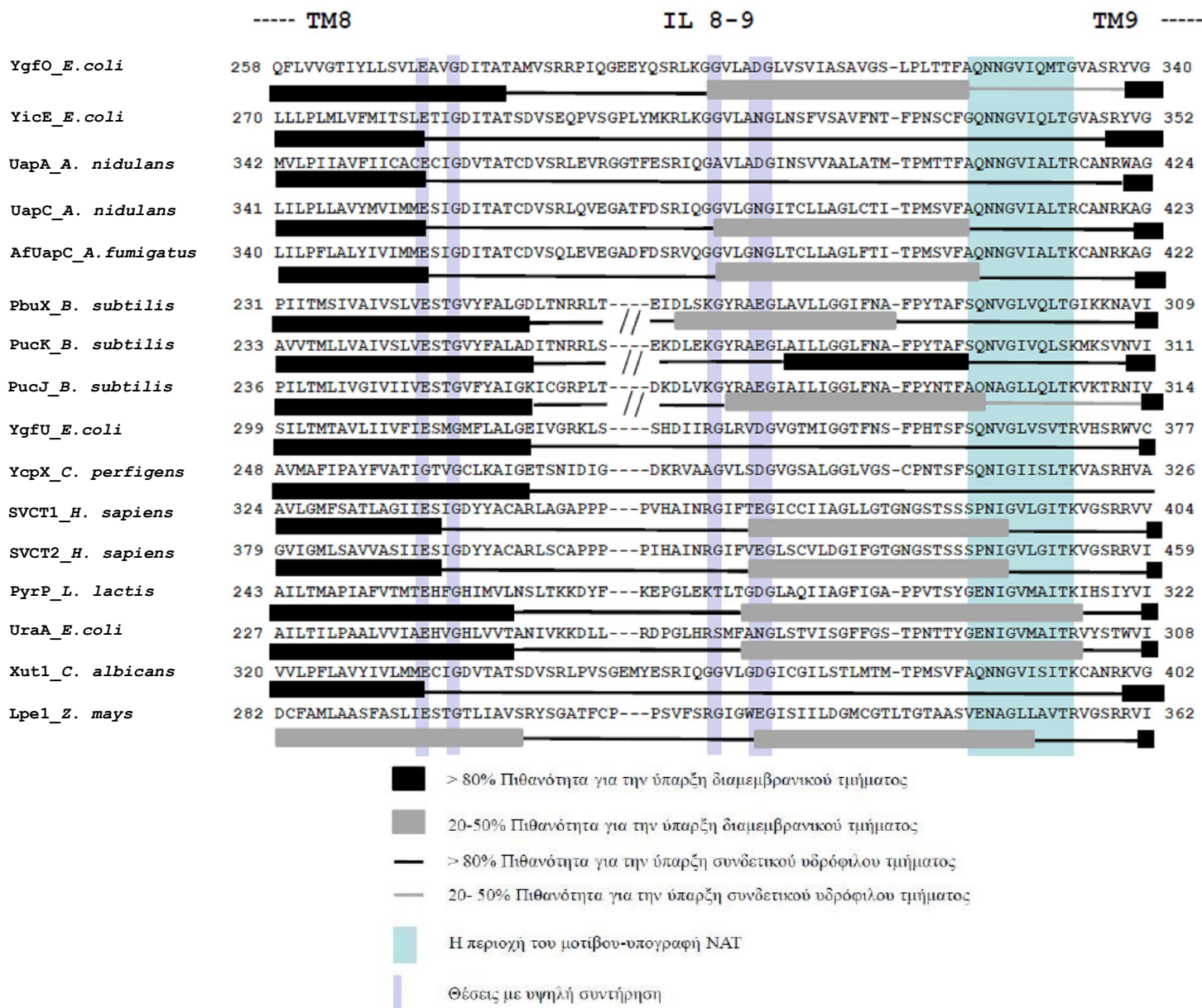
3.2.1 Μοντέλο τοπολογίας του YgfO βάσει θεωρητικών αλγορίθμων πρόβλεψης

Με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) έγινε μια αρχική μελέτη για την ανάλυση της γενικής τοπολογικής οργάνωσης του μεταφορέα YgfO. Η προβλεπόμενη εναλλαγή διαμεμβρανικών και υδρόφιλων συνδετικών τμημάτων του YgfO φαίνεται στην **Εικόνα 3.18**. Ο αλγόριθμος TMHMM (Εισαγωγή, εδάφιο 1.5.1) προβλέπει 12 διαμεμβρανικά τμήματα. Μέχρι το διαμεμβρανικό τμήμα 8, προβλέπεται σαφής εναλλαγή διαμεμβρανικών τμημάτων και υδρόφιλων συνδετικών τμημάτων με πιθανότητες ανω του 90%. Ακολουθεί μια περιοχή, μεταξύ των πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων 8 και 9, όπου η πρόβλεψη παρουσιάζει ασάφεια, δίνοντας περίπου ίδιες πιθανότητες (40-60%) για ύπαρξη διαμεμβρανικού τμήματος ή υδρόφιλης ενδοκυτταρικής περιοχής (αλληλουχία 300-325) ή για ύπαρξη εξωκυτταρικής ή ενδοκυτταρικής υδρόφιλης περιοχής (αλληλουχία 325-340). Επίσης, παρόμοια ασάφεια υπάρχει για την περιοχή της πιθανής διαμεμβρανικής έλικας 11 (αλληλουχία 400-425), όπου το πρόγραμμα δεν διακρίνει μεταξύ διαμεμβρανικού, εξωκυτταρικού ή ενδοκυτταρικού τμήματος, καθώς, επίσης, και για το C-τελικό άκρο, όπου δίνεται η ίδια σχεδόν πιθανότητα να βρίσκεται εντός ή εκτός του κυττάρου. Παρά ταύτα, υπάρχουν σήμερα αδιαμφισβήτητα πειραματικά δεδομένα ότι το C-τελικό άκρο του YgfO είναι διευθετημένο προς το κυτταρόπλασμα (βλ. πιο κάτω, εδάφιο 3.2.2).

Συνοπτικά, είναι εμφανές ότι υπάρχει πρόβλημα στην τοπολογική πρόβλεψη αμέσως μετά την πιθανή διαμεμβρανική έλικα 8. Για να εξετάσουμε κατά πόσον το πρόβλημα αυτό ισχύει γενικότερα για τους μεταφορείς NAT, αναλύσαμε με το ίδιο πρόγραμμα, TMHMM, όλα τα λειτουργικώς χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας NAT (Εικόνες 3.19 και 3.20). Παρατηρούμε ότι, ενώ σε περιοχές του N-τελικού ημίσεος των αντίστοιχων αλληλουχιών οι προβλέψεις δεν εμφανίζουν ουσιαστική απόκλιση (**Εικόνα 3.19**), στην περιοχή μεταξύ των πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων 8 και 9 οι προβλέψεις εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση ανάλογα με το ομόλογο που εξετάζεται, δίνοντας την περιοχή αμέσως πριν από την αλληλουχία-υπογραφή NAT (κατάλοιπα 323-333 του YgfO) είτε ως διαμεμβρανικό είτε ως υδρόφιλο συνδετικό τμήμα, με διαφορετικά ποσοστά πιθανοτήτων (**Εικόνα 3.20**).



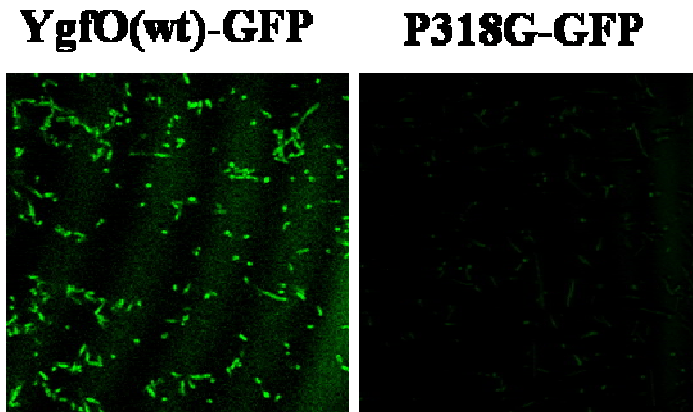
Εικόνα 3.18 Πρόβλεψη τοπολογίας του YgfO βάσει του αλγορίθμου TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>). Το διάγραμμα αποδίδει την στατιστική πιθανότητα πρόβλεψης διαμεμβρανικού τμήματος (άξονας των y) για κάθε περιοχή αλληλουχίας που υποδεικνύεται με τους αντίστοιχους αριθμούς καταλοίπων αμινοξέων (άξονας των x).



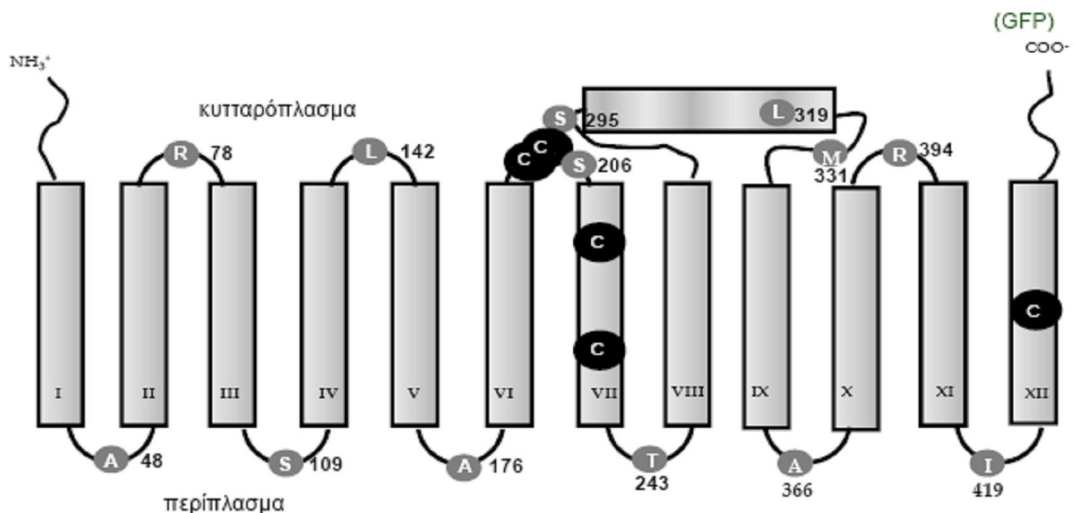
Εικόνα 3.20 Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 8 και 9, των 16 χαρακτηρισμένων NAT/NCS2 μεταφορέων, συμπεριλαμβανομένων των *E. coli* YgfO (P67444), YicE (P0AGM9), and UraA (P0AGM7), *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140), and PucJ (O32139), *Clostridium perfringens* YcpX (BAB80103), *Lactococcus lactis* PyrP (AAK05701), *A. nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P48777), *Aspergillus fumigatus* AfUapC XP748919), *Candida albicans* Xut1 (AAX2221), *Zea mays* Lpe1 (AAB17501), *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (AAH50261) και SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3) και ενός μεταφορέα που μελετάται αυτή τη στιγμή στο εργαστήριο μας, YgfU (Q46821) από την *E. coli*. Η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

3.2.2 Το C-τελικό άκρο του YgfO είναι προσανατολισμένο προς το κυτταρόπλασμα

Ο προσανατολισμός του C-τελικού άκρου του YgfO είχε ουσιαστικά προσδιοριστεί από τους Granseth *et al.*, 2005, στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης για την διευκρίνιση της τοπολογίας για όλες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες της *E. coli*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας γονιδιακή σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο C-τελικό άκρο, αναλύθηκαν περίπου 50000 μεμβρανικές πρωτεΐνες (Daley *et al.*, 2005; Granseth *et al.*, 2005). Η βάση για αυτήν την προσέγγιση είναι ότι η GFP έχει την ορθή διαμόρφωση, και κατ' επέκταση αποδίδει σήμα φθορισμού, μόνο όταν εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα της *E. coli* (Drew *et al.*, 2002). Η πρωτεΐνη YgfO ήταν ανάμεσα στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της *E. coli* που βρέθηκε ότι εκφράζονται στη μεμβράνη και δίνουν έντονο σήμα με την GFP, αλλά όχι με την αλκαλική φωσφατάση (που χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί ένας πιθανός αντίστροφος προσανατολισμός, προς το περίπλασμα, βλ. Εισαγωγή, εδάφιο 1.5.2.1), και επομένως το C-τελικό άκρο της θα πρέπει να εντοπίζεται κυτταροπλασματικά (Granseth *et al.*, 2005). Ανεξάρτητα, στα πλαίσια των αρχικών αναλύσεων μεταλλαξιγένεσης του YgfO (Karatzá and Frillingos, 2005), είχαμε και στο εργαστήριό μας κατασκευάσει την περμεάση YgfO(wt)-GFP, η οποία εδείχθη ότι εκφράζεται στη μεμβράνη και είναι πλήρως λειτουργική. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας το ήδη υπάρχον κατασκεύασμα της φυσικού τύπου YgfO με GFP (Καρατζά, 2006) και μια περμεάση με GFP για το μετάλλαγμα P318G, που έχει δειχθεί ότι δεν εκφράζεται στη μεμβράνη (Karatzá *et al.*, 2006), ελέγξαμε τις δύο αυτές περμεάσες με μικροσκοπία φθορισμού. Αν και ο φθορισμός με GFP στα βακτηριακά κύτταρα είναι δύσκολο να διακριθεί σε σχέση με τη μεμβράνη, όπως φαίνεται και από άλλες μελέτες (Nagamori *et al.*, 2003), μπορούμε να διακρίνουμε τη διαφορά ανάμεσα στις δύο κατασκευές, του φυσικού τύπου YgfO και του μεταλλάγματος P318G. Βλέπουμε, λοιπόν, ισχυρό σήμα φθορισμού στη φυσικού τύπου YgfO-GFP, και σχεδόν μηδενικό για το ανενεργό μετάλλαγμα YgfO-P318G-GFP που δεν εκφράζεται στη μεμβράνη (**Εικόνα 3.21**). Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα δεδομένα, επιβεβαιώνει ότι το C-τελικό άκρο του YgfO εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Ο συνδυασμός των αλγορίθμων πρόβλεψης (εδάφιο 3.2.1) και του πειραματικού δεδομένου για τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του C-άκρου (εδάφιο 3.2.2) μας οδηγεί στο αρχικό τοπολογικό μοντέλο της **Εικόνας 3.22**.



Εικόνα 3.21 Συνεστιακή μικροσκοπία ανίχνευσης φθορισμού GFP. Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pT7-5/*ygfO*-GFP ή το pT7-5/*ygfO*-P318G-GFP, αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C και έγινε επαγωγή της έκφρασης των περμεασών με 1 mM IPTG για 1.5 h. Τα κύτταρα συνελήγησαν με φυγοκέντρηση, εκπλύθηκαν μία φορά με διάλυμα PBS, επώασησαν με πολυ-L-λυσίνη (20 min) και το σήμα φθορισμού της GFP ανιχνεύθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS-SP confocal scanning microscope).



Εικόνα 3.22 Πιθανό τοπολογικό μοντέλο για τον YgfO με βάση τον θεωρητικό αλγόριθμο πρόβλεψης TMHMM, την συγκριτική ανάλυση των προβλέψεων για όλους τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς NAT (βλ. Εικόνα 3.20) και την διευθέτηση του C-τελικού άκρου προς το κυτταρόπλασμα (βλ. Εικόνα 3.21). Παρουσιάζονται τα 12 προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα, οι θέσεις των εγγενών καταλοίπων Cys που έχουν αντικατασταθεί με Ser στην Cys-less YgfO, καθώς και οι θέσεις για τις οποίες κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης για να μελετηθεί πειραματικά η τοπολογία, στην παρούσα διατριβή, με τη μέθοδο SCAM (εδάφιο 3.2.3).

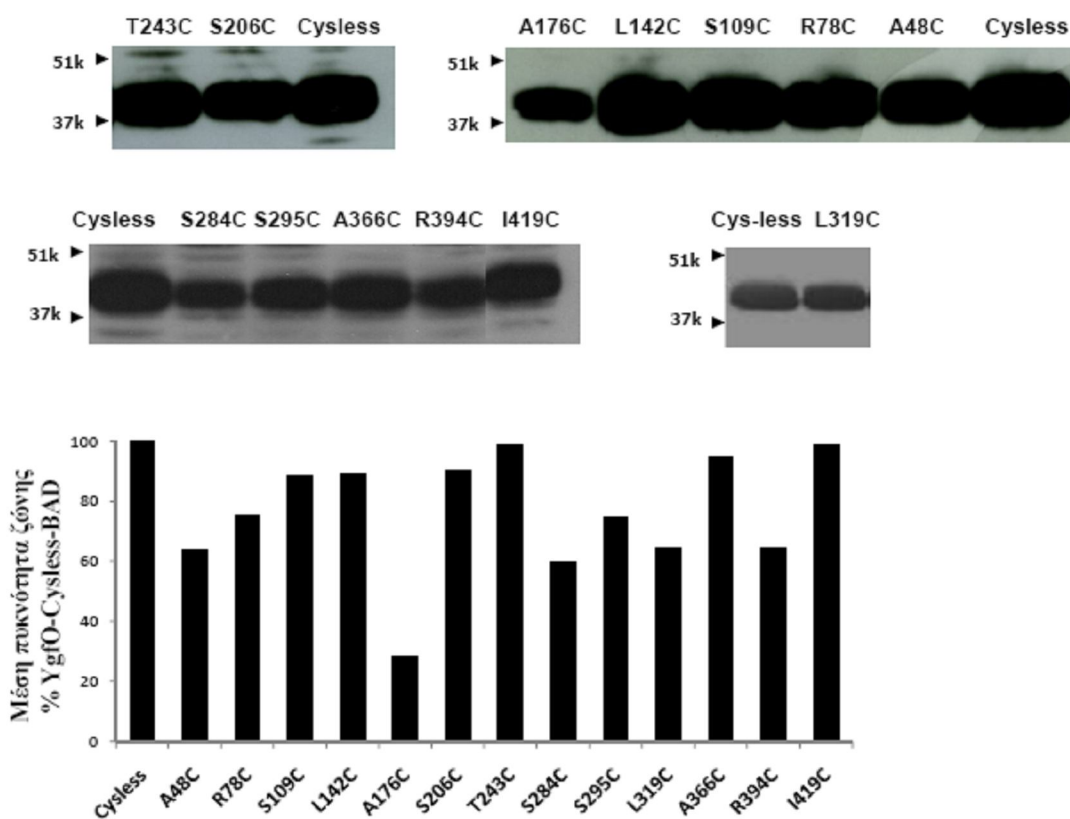
3.2.3 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης σε κορυφαίες θέσεις των υδρόφιλων συνδεδετικών τμημάτων

Για την εξέταση της τοπολογικής οργάνωσης του YgfO χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική της κυστεϊνικής σάρωσης. Για τον σκοπό αυτόν, κατασκευάστηκαν και εξετάστηκαν μια σειρά από μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης σε κορυφαίες θέσεις των υδρόφιλων συνδεδετικών τμημάτων, όπως προβλέπονται θεωρητικά (**Εικόνα 3.22**). Τα μεταλλάγματα αυτά εκφράστηκαν στη μεμβράνη κυττάρων *E. coli* και μεταφέρθηκαν σε μεμβρανικά κυστίδια (right-side-out membrane vesicles), για να μελετηθεί η προσβασιμότητα των αντίστοιχων θέσεων από το υδρόφιλο (εξωκυτταρικό) περιβάλλον, από το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻.

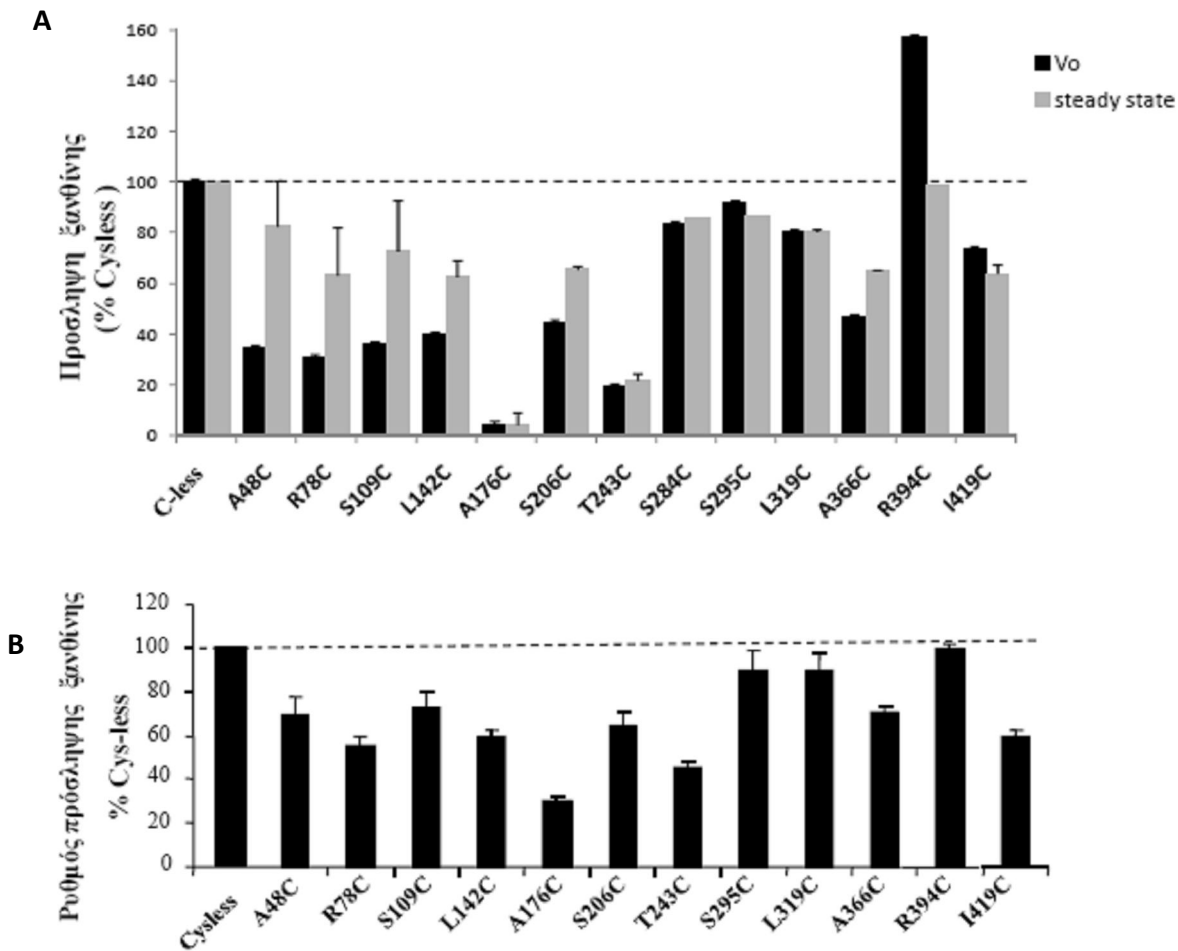
3.2.3.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ελεύθερη κυστεϊνών περμεάση (Cys-less YgfO) (Karatza *et al.*, 2006), κατασκευάστηκαν 13 μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης (single-Cys mutants): A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S284C, S295C, L319C, A366C, R394C, και I419C. Στην Εικόνα 3.22 φαίνονται οι θέσεις τους στο μοντέλο του YgfO. Στο C-τελικό άκρο των μεταλλαγμάτων αυτών εισήχθη η αλληλουχία 10 ιστιδινών (His₁₀ tag) που χρησιμοποιείται για χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺ και έλεγχο της έκφρασής τους με ανοσοαποτύπωση (βλ. εδάφιο 2.13). Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας τους (MWG Biotech), τα μεταλλάγματα αυτά εκφράστηκαν μέσω IPTG-επαγόμενων, πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* T184 και ελέγχθησαν καταρχήν τα επίπεδα έκφρασης (**Εικόνα 3.23**) και ενεργότητάς τους (**Εικόνα 3.24A**). Παρατηρούμε ότι όλες οι αντίστοιχες περμεάσες μοναδικής κυστεϊνης εμφανίζουν ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3.23) και ενεργότητας πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) (Εικόνα 3.24A). Η ενεργότητα των περμεασών ελέγχθηκε και μετά από παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων που εκφράζουν τις περμεάσες αυτές και βρέθηκε ότι οι σχετικές τιμές ενεργότητας παραμένουν όμοιες, και είναι πολύ υψηλές σε σχέση με την Cys-less YgfO περμεάση (**Εικόνα 3.24B**). Επειδή θέλαμε να αποφύγουμε θέσεις κυστεϊνών όπου η ενεργότητα επηρεάζεται από αλκυλίωση με το ειδικό SH-αντιδραστήριο NEM (*N*-αιθυλμηλεϊμίδιο) και οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για τη λειτουργία και προσβάσιμες στο υδρόφιλο περιβάλλον λόγω συμμετοχής στο ενεργό κέντρο του μορίου (βλ. Kaback *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2001; Karatza *et al.*, 2006; Tavoulari and Frillingos, 2009), ελέγξαμε στη

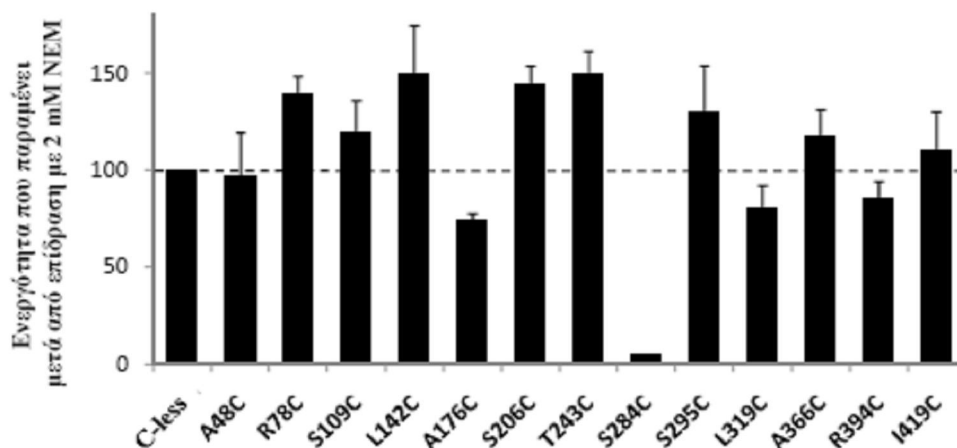
συνέχεια την επίδραση του NEM στην ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (**Εικόνα 3.25**). Παρατηρήσαμε ότι η περμεάση S284C είναι πολύ ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από το NEM (Εικόνα 3.25) και, για τον λόγο αυτό, αποκλείστηκε από την περαιτέρω τοπολογική μελέτη. Χρησιμοποιήθηκε, όμως, για την μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας στην ευρύτερη περιοχή ανοδικά του μοτίβου-υπογραφή NAT (βλ. πιο κάτω, κεφάλαιο 3.4). Όλες οι υπόλοιπες περμεάσες μοναδικής κυστεΐνης βρέθηκε ότι δεν αναστέλλονται ή ενεργοποιούνται σε σημαντικό βαθμό από το NEM (Εικόνα 3.25) και, επομένως, χρησιμοποιήθηκαν στην τοπολογική ανάλυση με την μέθοδο SCAM (εδάφιο 3.2.4, στη συνέχεια)..



Εικόνα 3.23 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των μεταλλαγμάτων A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S284C, S295C, L319C, A366C, R394C και I419C του YgfO. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με pT7-5/ygfO(Cys-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-His₁₀ που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών. Τα δείγματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι των ιστιδινών (PentaHis-HRP) σε αραιώση 1:5000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στο αριστερό μέρος των ηλεκτροφορημάτων σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων και ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης έγινε με το πρόγραμμα Quantity-one (BioRad).



Εικόνα 3.24 Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης για τα μεταλλάγματα A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S284C, S295C, L319C, A366C, R394C και I419C του YgfO, σε άθικτα κύτταρα *in vivo* (A) και σε μεμβρανικά κυστίδια RSO (B). (A) Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(Cys-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-His₁₀ συνελέγησαν με φυγοκέντρωση, 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. Η αρχική ταχύτητα (V_o) μετρήθηκε σε 10, 20 και 30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) μετρήθηκαν σε 1-10 min. (B) *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(Cys-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-His₁₀ συνελέγησαν με φυγοκέντρωση, και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού (RSO) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.12). Τα κυστίδια αραιώθηκαν σε συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 1 mg/mL και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.2). Μετρήθηκε ο ρυθμός πρόσληψης ξανθίνης σε χρόνους 5-10 sec. Σε όλες τις περιπτώσεις, φαίνονται και οι τιμές τυπικής απόκλισης (S.D.) από 3 πειράματα.

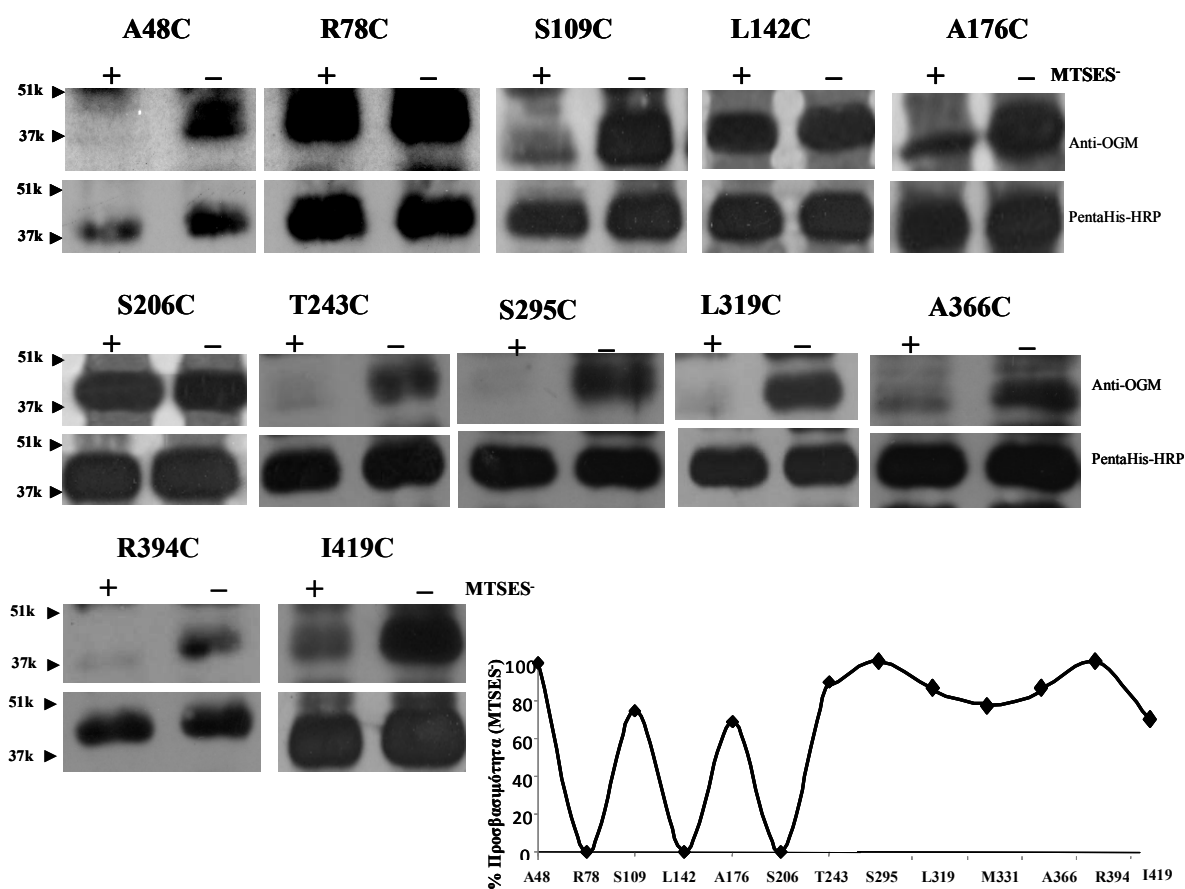


Εικόνα 3.25 Επίδραση του αντιδραστηρίου NEM στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S284C, S295C, L319C, A366C, R394C και I419C του YgfO. *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμασών από pT7-5/ygfO(Cys-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-His₁₀ υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), μετά από προεπάωση με NEM (2 mM, 10 min, 25 °C) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.1.1). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης, όπως μετρήθηκαν σε 5 – 10 sec, ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία NEM για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.), από 3 πειράματα.

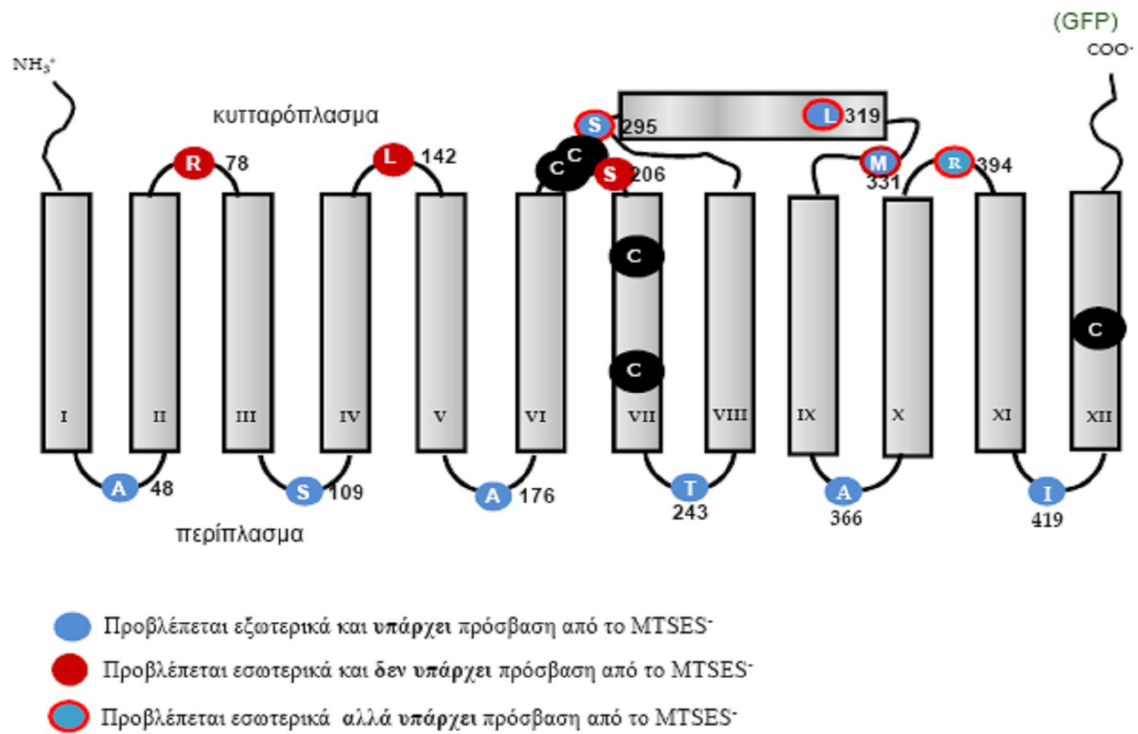
3.2.4 Ανάλυση προσβασιμότητας του YgfO σε υδρόφιλα αντιδραστήρια: τα διαμεμβρανικά τμήματα 8-12 δεν εμφανίζουν σαφή τοπολογική διευθέτηση

Στη συνέχεια, στο σύστημα των μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού (RSO membrane vesicles), έγιναν πειράματα αλκυλίωσης με το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻, για τον έλεγχο της προσβασιμότητας των υποκατεστημένων θέσεων κυστεϊνών (single-Cys mutants) από το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Από την **Εικόνα 3.26** παρατηρούμε ότι, μέχρι την έλικα 8 (T243), υπάρχει σαφής εναλλαγή της προσβασιμότητας, γεγονός που συμφωνεί με την προβλεπόμενη εναλλαγή των διαμεμβρανικών τμημάτων. Στην C-τελική πλευρά (TMs 8-12), όμως, ενώ ως προσβάσιμες προβλέπονται μόνο οι θέσεις A366 και I419 (Εικόνα 3.22), τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι όλες οι εξεταζόμενες θέσεις της ευρύτερης αυτής περιοχής (S295, L319, A366, R394, I419) εμφανίζουν προσβασιμότητα στο MTSES⁻ από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται σε δεδομένα που δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε αυτή τη στιγμή, όπως πιθανόν στην ύπαρξη αμφιπαθικών περιοχών που δεν είναι διαμεμβρανικές, δηλ.δεν διατρέχουν ολόκληρη τη μεμβράνη, και/ή επανεισερχόμενων

συνδετικών τμημάτων (reentrant loops), τα οποία διαμορφώνουν διαφορετικά την τοπολογία του μεταφορέα YgfO στο C-τελικό τμήμα. Το γεγονός, πάντως, ότι η θέση I419 είναι προσβάσιμη από την πλευρά του περιπλάσματος (Εικόνα 3.26) δείχνει ότι το C-τελικό διαμεμβρανικό τμήμα (κατάλοιπα 420-445) (Parakostas *et al.*, 2008) θα πρέπει να καταλήγει σε κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο, επιβεβαιώνοντας τις μελέτες με τις GFP-χίμαιρες (εδάφιο 3.2.2). Μια σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων προσβασιμότητας από το MTSES⁻ σε σχέση με το τοπολογικό μοντέλο του YgfO φαίνεται στην **Εικόνα 3.27**.



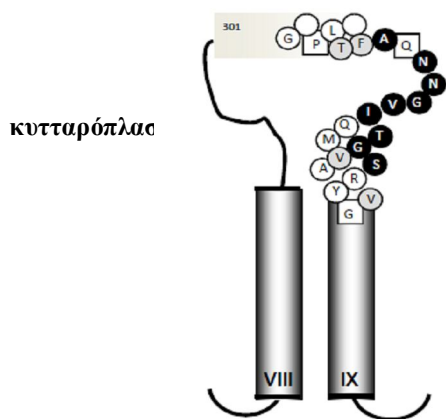
Εικόνα 3.26 Ανάλυση προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) για τα μεταλλάγματα A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S295C, L319C, A366C, R394C, και I419C του YgfO(C-less)-His₁₀. Μεμβρανικά κυστίδια RSO που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες επώασθηκαν με MTSES⁻ (50 μM, 10 min, 25 °C), όπως περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους. Μετά την επώαση, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν με DDM, 2% (w/v) και οι YgfOs απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺-IDA, αποδιατάχθηκαν σε διάλυμα SDS/ουρίας, και οι υπολειπόμενες ελεύθερες Cys σημάθηκαν με OGM (0.2 mM). Ακολούθησε SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση (α) αντισώματος έναντι του OGM, για τον έλεγχο του ποσοστού σήμανσης [άνω] και (β) αντισώματος pentaHis για τον έλεγχο της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης που εκλούεται από τη στήλη [κάτω]. Ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων και ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων προσβασιμότητας έγινε με το πρόγραμμα Quantity-one (BioRad).



Εικόνα 3.27 Τοπολογικό μοντέλο του YgfO, σε σχέση με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ανάλυσης προσβασιμότητας των μεταλλαγμάτων (A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S295C, L319C, M331C, A366C, R394C, I419C). Συμπεριλαμβάνεται και το M331C, το οποίο είχε επίσης επιλεγεί αρχικά (βλ. Karatza *et al.*, 2006), και για το οποίο τα αποτελέσματα φαίνονται στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο γιατί περιλαμβάνεται στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (εδάφιο 3.3.2).

3.3 Ανάλυση προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών του μοτίβου «υπογραφή» της οικογένειας NAT (αλληλουχία 323-333)

Η ακολουθία των αμινοξέων 315-340 περιέχει το μοτίβο-υπογραφή NAT $^{324}\text{QNXGXXXXTG}^{333}$ που έχει υποδειχθεί ότι περιλαμβάνει σημαντικούς καθοριστές για τον μηχανισμό λειτουργίας του YgfO (Karatza *et al.*, 2006), καθώς και μια αλληλουχία που υιοθετεί πιθανότατα δομή α-έλικας (329-339), με μια όψη αυτής να περιέχει κατάλοιπα σημαντικά για τον καθορισμό της εξειδίκευσης (Karatza *et al.*, 2006, Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή). Χρησιμοποιώντας μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης που υπήρχαν ήδη διαθέσιμα στο εργαστήριο (Καρατζά, 2006), μελετήθηκε ο ρόλος των καταλοίπων αμινοξέων του μοτίβου-υπογραφή σε σχέση (α) με το υδρόφιλο ή υδρόφοβο μικροπεριβάλλον τους, (β) την τοπολογική οργάνωση του YgfO και (γ) την επίδραση της δέσμευσης υποστρώματος (ξανθίνης). Η πιθανή τοπολογική οργάνωση της περιοχής αυτής, με βάση τους αλγόριθμους πρόβλεψης (εδάφιο 3.2.1), φαίνεται στην **Εικόνα 3.28**, όπου το μοτίβο NAT τοποθετείται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Η συναινετική αλληλουχία (consensus) του μοτίβου NAT βάσει της στοίχισης των αλληλουχιών όλων των λειτουργικά χαρακτηρισμένων μεταφορέων NAT/NCS2 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.29**. Στην περιηματική εργασία μας, χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο ανάλυσης προσβασιμότητας SCAM, με το υδρόφιλο ειδικό -SH αντιδραστήριο MTSES⁻, όπως και για την ανάλυση της γενικής τοπολογίας του YgfO, καθώς επίσης και δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς ξανθίνης παρουσία ή απουσία MTSES⁻. Όλα τα πειράματα του κεφαλαίου 3.3 έγιναν σε μεμβρανικά κυστίδια (RSO), σύστημα που επιτρέπει άμεση πρόσβαση του υδρόφιλου MTSES⁻ στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χρήση μικρών συγκεντρώσεων, 50-200 μM.



Εικόνα 3.28 Πιθανό τοπολογικό μοντέλο για την περιοχή ανάμεσα στις διαμεμβρανικές έλικες TM8 και TM9 του YgfO, όπως προκύπτει από τον αλγόριθμο πρόβλεψης TMHMM για την γενικότερη τοπολογία του YgfO και των μεταφορέων NAT/NCS2 (βλ. και Εικόνα 3.22 ή 3.27)

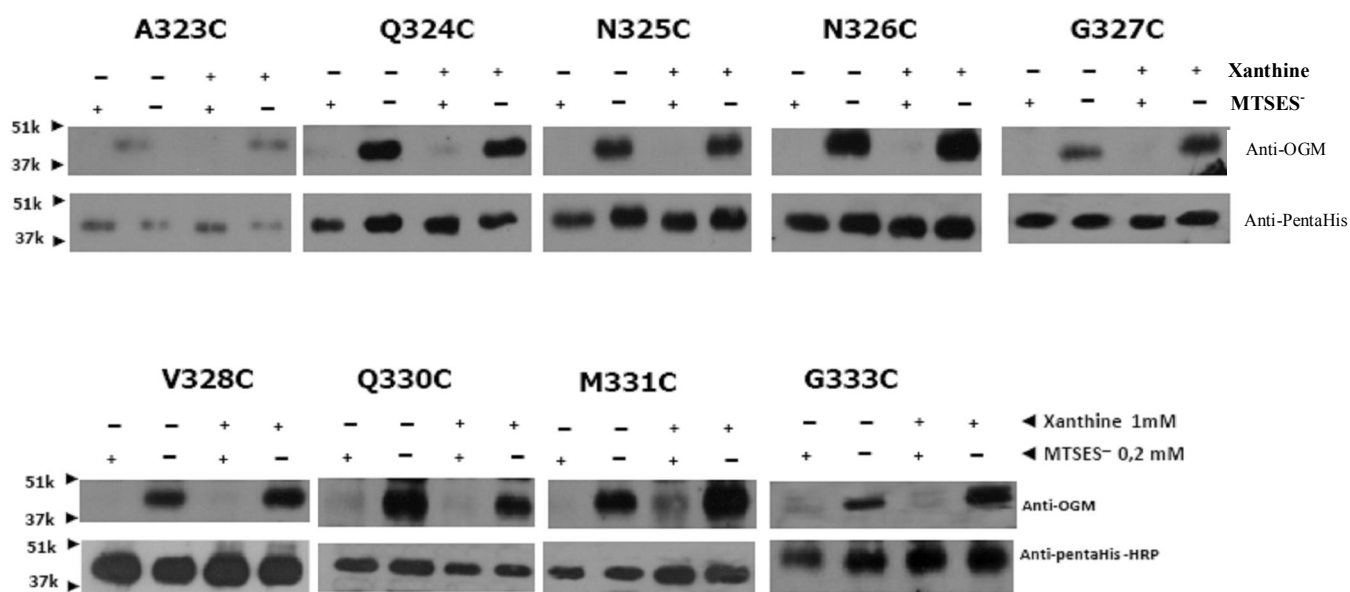
περίπλασμα

PbuX <i>B. subtilis</i>	292S	Q	N	V	G	L	V	Q	L	T	G ³⁰² (ξανθίνη)
PucK <i>B. subtilis</i>	294S	Q	N	V	G	I	V	Q	L	S	K ³⁰⁴ (ουρικό)
PucJ <i>B. subtilis</i>	297A	Q	N	A	G	L	L	Q	L	T	K ³⁰⁷ (ουρικό)
YgfU <i>E. coli</i>	360S	Q	N	V	G	L	V	S	V	T	R ³⁷⁰ (ουρικό)
YcpX <i>E. coli</i>	309S	Q	N	I	G	I	I	S	L	T	K ³¹⁹ (πουρίνες)
YgfO <i>E. coli</i>	323A	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G ³³³ (ξανθίνη)
YicE <i>E. coli</i>	335G	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	G ³⁴⁵ (ξανθίνη)
UapC <i>A. nidulans</i>	406A	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R ⁴¹⁶ (ουρικό/ξανθίνη/πουρίνες)
AfUapC <i>A. fumigatus</i>	405A	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K ⁴¹⁵ (ουρικό/ξανθίνη/οξυπουρινόλη)
Xut1 <i>C. albicans</i>	385A	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K ³⁹⁵ (ουρικό/ξανθίνη)
UapA <i>A. nidulans</i>	407A	Q	N	N	G	V	I	S	I	T	R ⁴¹⁷ (ουρικό/ξανθίνη)
PyrP <i>L. lactis</i>	305G	E	N	I	G	V	M	A	I	T	K ³¹⁵ (ουρακίλη)
UraA <i>E. coli</i>	289G	E	N	I	G	V	M	A	I	T	R ²⁹⁹ (ουρακίλη)
SVCT1 <i>H. sapiens</i>	387S	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K ³⁹⁷ (ασκορβικό)
SVCT2 <i>H. sapiens</i>	442S	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K ⁴⁵² (ασκορβικό)
Lpel <i>Z. mays</i>	345V	E	N	A	G	L	L	A	V	T	R ³⁵⁵ (ουρικό οξύ/ξανθίνη)
MoorT <i>M. thermoacetica</i>	318S	Q	N	I	G	V	I	S	I	T	G ³²⁸ (ξανθίνη/θερμόφιλο)

Εικόνα 3.29 Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου NAT³²³AQNXXGXXXXTG³³³, 17 χαρακτηρισμένων NAT/NCS2 μεταφορέων συμπεριλαμβανομένων των, *E. coli* YgfO (P67444), YicE (P0AGM9), και UraA (P0AGM7), *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140), και PucJ (O32139), *Clostridium perfringens* YcpX (BAB80103), *Lactococcus lactis* PyrP (AAK05701), *A. nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P487777), *Aspergillus fumigatus* AfUapC XP748919), *Candida albicans* Xut1 (AAX2221), *Zea mays* Lpel (AAB17501), *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (AAH50261) και SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3) και 2 μεταφορέων που μελετώνται αυτή τη στιγμή στο εργαστήριό μας, YgfU (Q46821) από την *E. coli* και MoorT (Moth_2478) από το θερμόφιλο Gram+ βακτήριο *Moorella thermoacetica*. Η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

3.3.1 Η περιοχή του μοτίβου υπογραφή είναι προσβάσιμη από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον

Τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης (single-Cys mutants) της αλληλουχίας του μοτίβου-υπογραφή A323C, Q324C, N325C, N326C, G327C, V328C, I329C, Q330C, M331C, T332C, και G333C (Καρατζά, 2006), μετά από την μεταφορά τους σε κατασκευές με την αλληλουχία 10 ιστιδινών στο C-τελικό άκρο (His₁₀ tag) (Γεωργοπούλου, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία Ειδίκευσης, 2005), εκφράστηκαν μέσω IPTG-επαγόμενων, πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* T184 και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού (RSO) που εκφράζουν τις περμεάσες αυτές. Ακολούθησαν πειράματα αλκυλίωσης με το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻, για τον έλεγχο της προσβασιμότητας των υποκατεστημένων θέσεων κυστεϊνών (SCAM analysis, εδάφιο 1.6) από το εξωκυτταρικό (περιπλασματικό) περιβάλλον. Χρησιμοποιώντας αρχικά 0.2 mM MTSES⁻, μια συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές παρόμοιες αναλύσεις προσβασιμότητας άλλων διαμεμβρανικών μεταφορέων (π.χ. Dunten *et al.*, 1993; Frillingos and Kaback, 1996a; Olami *et al.*, 1997), παρατηρούμε ότι όλες οι περμεάσες αντιδρούν πλήρως με το MTSES⁻ (**Εικόνα 3.30**), με εξαίρεση τις I329C-His₁₀ και T332C-His₁₀ που έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης και δεν μπορέσαμε να τις εξετάσουμε [τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτών των δύο μεταλλαγμάτων είχαν διαπιστωθεί και από αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης σε ολόκληρα κύτταρα (Γεωργοπούλου, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία Ειδίκευσης, 2005)]. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας μια μικρότερη συγκέντρωση MTSES⁻ (50 μM), είδαμε ότι όλες οι περμεάσες που εξετάστηκαν εξακολουθούν να είναι προσβάσιμες και αντιδρούν σε υψηλό βαθμό με το MTSES⁻, αλλά εμφανίζονται διαφορές στην προσβασιμότητα, με τις A323C, G327C, Q330C και G333C να αντιδρούν σχεδόν πλήρως και τις Q324C, N325C, N326C, V328C και M331C να αντιδρούν σε μικρότερο βαθμό (**Εικόνα 3.31**). Την μικρότερη προσβασιμότητα-αντιδραστικότητα με το MTSES⁻ εμφανίζει η N326C (30%) και, κατά δεύτερο λόγο, οι N325C και Q324C (60-65%), μεταλλάγματα που έχει δειχθεί, ωστόσο, ότι είναι ανενεργά (Karatza *et al.*, 2006) και θα μπορούσε να έχουν λίγο διαφορετική διαμόρφωση στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή.

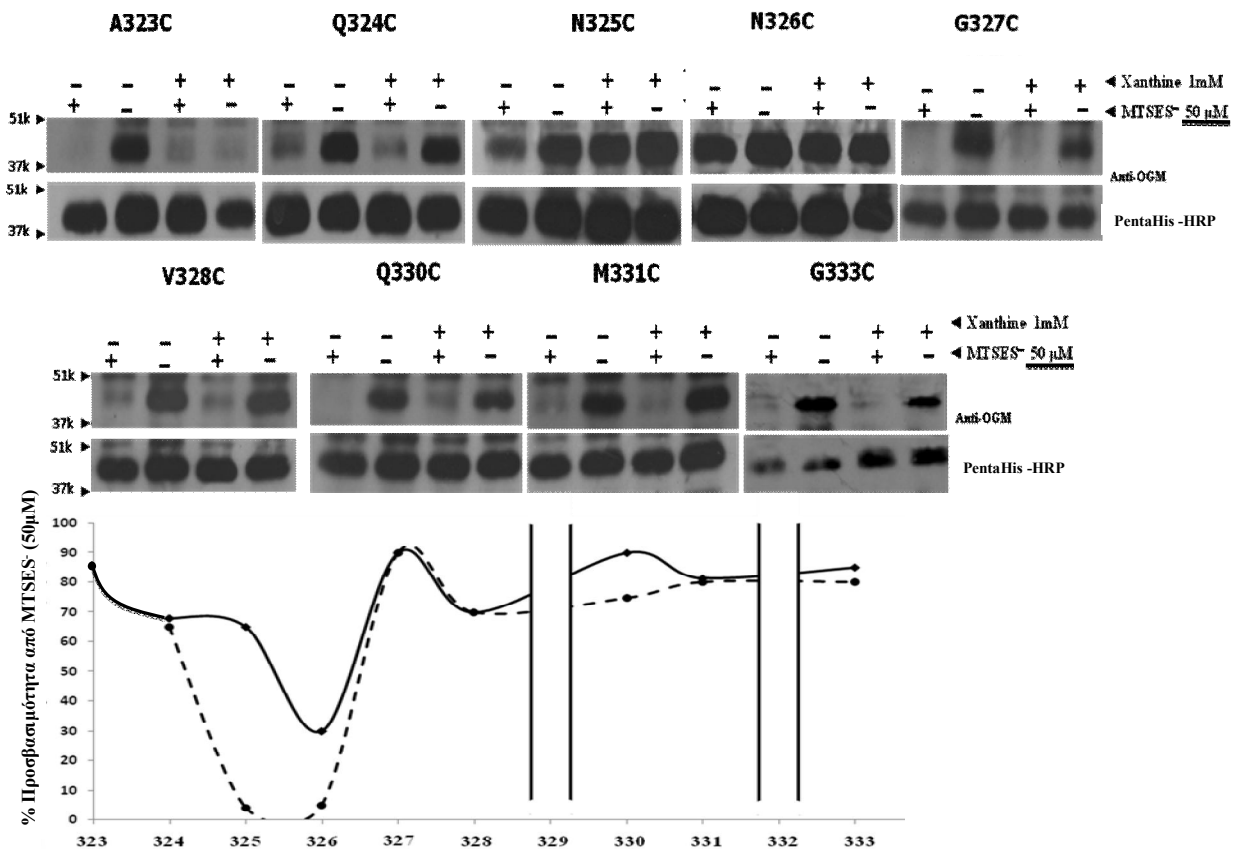


Εικόνα 3.30 Ανάλυση προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) για τα μεταλλάγματα A323C, Q324C, N325C, N326C, G327C, V328C, Q330C, M331C και G333C του YgfO(C-less)-His₁₀. Μεμβρανικά κυστίδια RSO που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες επώασθησαν με MTSES⁻ (0.2 mM, 10 min, 25 °C), όπως περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους. Μετά την επώαση, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εκχυλίσθηκαν με DDM, 2% (w/v) και οι YgfOs απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺, αποδιατάχθηκαν σε διάλυμα SDS/ουρίας, και οι υπολειπόμενες ελεύθερες Cys σημάνθηκαν με OGM (0.2 mM). Ακολούθησε SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση (α) αντισώματος έναντι του OGM, για τον έλεγχο του ποσοστού σήμανσης [άνω] και (β) αντισώματος pentaHis για τον έλεγχο της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης που εκλύεται από τη στήλη [κάτω]. Στα αριστερά, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

3.3.2 Η N325C προστατεύεται από το MTSES⁻ παρουσία υποστρώματος (ξανθίνης)

Παράλληλα, έγιναν μελέτες αλκυλίωσης από το MTSES⁻ παρουσία ή απουσία υποστρώματος (1 mM ξανθίνη). Σε συγκέντρωση 0.2 mM MTSES⁻, η προσβασιμότητα δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία υποστρώματος, για οποιαδήποτε περμεάση (Εικόνα 3.30). Σε συγκέντρωση 50 μM MTSES⁻, η παρουσία υποστρώματος μειώνει δραστικά την προσβασιμότητα της N325C από 65% σε 5%, και, σε μικρό βαθμό, την προσβασιμότητα της N326C, από 30% σε 5%, ενώ η προσβασιμότητα των υπόλοιπων περμεασών δεν επηρεάζεται (Εικόνα 3.31). Η παρατήρηση ότι η N325C προστατεύεται πλήρως από την πρόσβαση σε MTSES⁻ (50 μM) παρουσία υποστρώματος συμφωνεί και με άλλα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας (Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή) που δείχνουν ότι η ίδια θέση προστατεύεται επίσης από την πρόσβαση στο *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM). Από την άλλη πλευρά,

το μετάλλαγμα Q324C είναι γνωστό ότι δεν δεσμεύει ξανθίνη ή ανάλογα ξανθίνης με υψηλή συγγένεια (Karatza *et al.*, 2006), άρα δεν περιμένουμε να ανταποκρίνεται σε αλλαγή διαμόρφωσης παρουσία υποστρώματος και αυτό, πράγματι, δείχνουν και τα πειράματα με το MTSES⁻ (Εικόνα 3.31).



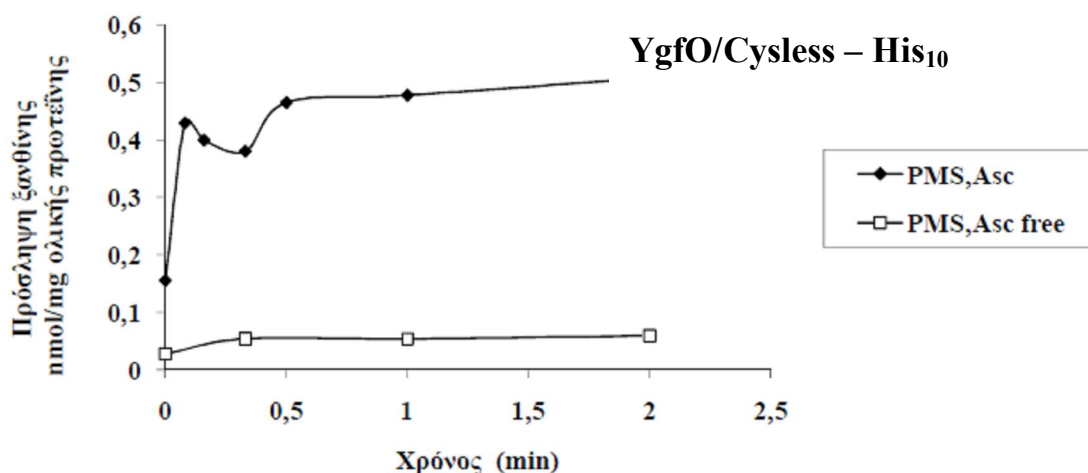
Εικόνα 3.31 Ανάλυση προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) για τα μετάλλαγμα A323C, Q324C, N325C, N326C, G327C, V328C, Q330C, M331C και G333C του YgfO(C-less)-His₁₀. Μembranικά κυστίδια RSO που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες επώασθησαν με MTSES⁻ (50 μM, 10 min, 25 °C), όπως περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους. Μετά την επώαση, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν με DDM, 2% (w/v) και οι YgfOs απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺, αποδιατάχθηκαν σε διάλυμα SDS/ουρίας, και οι υπολειπόμενες ελεύθερες Cys σημάνθηκαν με OGM (0.2 mM). Ακολούθησε SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση (α) αντισώματος έναντι του OGM, για τον έλεγχο του ποσοστού σήμανσης [άνω] και (β) αντισώματος pentaHis για τον έλεγχο της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης που εκλύεται από τη στήλη [κάτω]. Στα αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Ποσοτική ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων έγινε με το πρόγραμμα Quantity-one (BioRad). Η συνεχής γραμμή στο διάγραμμα δείχνει την προσβασιμότητα (% μείωση του σήματος OGM) απουσία ξανθίνης και η διακεκομμένη την προσβασιμότητα παρουσία ξανθίνης (1 mM).

3.3.3 Η ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το MTSES⁻ υπενθυμίζει την περιοδικότητα ευαισθησίας στο N-αιθυλμυλεϊμίδιο

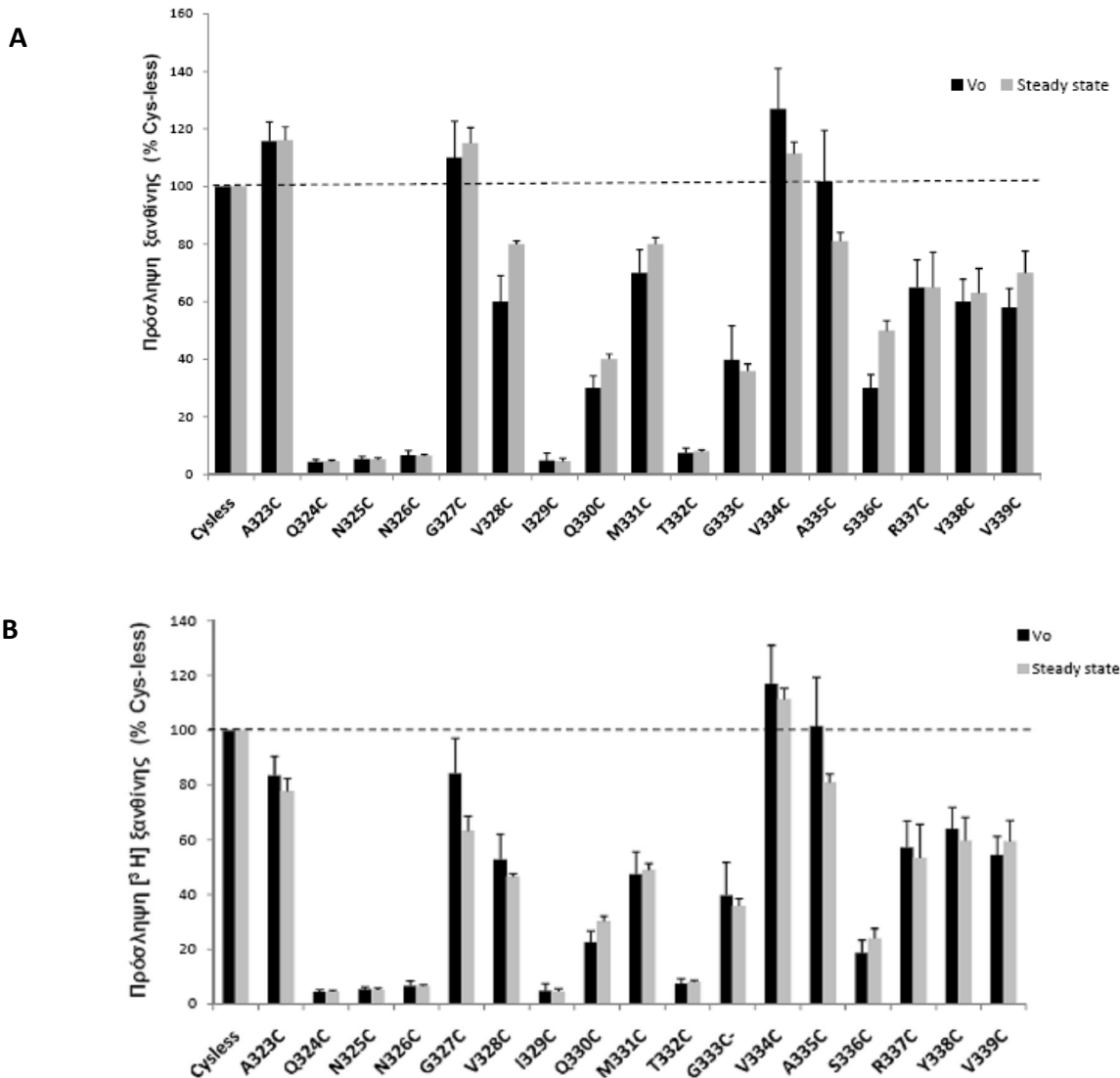
Τα μεταλλάγματα A323C, Q324C, N325C, N326C, G327C, V328C, I329C, Q330C, M331C, T332C, και G333C, V334C, A335C, S336C, R337C, Y338C και V339C (-His₁₀) ελέγχθηκαν επίσης ως προς την επίδραση του αντιδραστηρίου MTSES⁻ στην ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSO membrane vesicles) (Εικόνες 3.32-3.35). Τα πειράματα αυτά έγιναν στις ίδιες συνθήκες όπου βρέθηκε υψηλή προσβασιμότητα των μεταλλαγμάτων του μοτίβου από το MTSES⁻ (50 μM και 0.2 mM) (Εικόνες 3.30 και 3.31). Κατά την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς στα κυστίδια RSO (Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.2), τα πειράματα γίνονται παρουσία του ζεύγους PMS/ασκορβικού (τεχνητός δότης ηλεκτρονίων) για την ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας που είναι απαραίτητη για να λειτουργήσει ο H⁺-εξαρτώμενος μεταφορέας YgfO (**Εικόνα 3.32**). Η ενεργότητα των μεταλλαγμάτων της περιοχής 323-339 που εξετάστηκαν ακολουθεί την ίδια γενική εικόνα τόσο σε άθικτα κύτταρα (**Εικόνα 3.33A**) όσο και σε κυστίδια RSO (**Εικόνα 3.33B**). Μάλιστα, επιβεβαιώνεται ότι τα μεταλλάγματα Q324C-His₁₀, N325C-His₁₀, N326C-His₁₀, I329C-His₁₀, T332C-His₁₀, και S336C-His₁₀ έχουν ελάχιστη έως μηδενική ενεργότητα, όπως αναμένεται από άλλες μελέτες (Γεωργοπούλου, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία Ειδικευσης, 2005). Τα τρία πρώτα από αυτά τα μεταλλάγματα, Q324C-His₁₀, N325C-His₁₀, και N326C-His₁₀, έχουν πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης (πρβλ. Εικόνα 3.31) αλλά είναι ανενεργά λόγω λειτουργικών προβλημάτων (Karatza *et al.*, 2006), ενώ τα άλλα τρία, I329C-His₁₀, T332C-His₁₀, και S336C-His₁₀, εμφανίζουν πολύ μειωμένα επίπεδα έκφρασης, όπως είδαμε (εδάφιο 3.3.1).

Πειράματα επίδρασης του MTSES⁻ στην ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης από τα ενεργά μεταλλάγματα έγιναν σε δύο συνθήκες, με 50 μM MTSES⁻ (**Εικόνα 3.34**) και με 0.2 mM MTSES⁻ (**Εικόνα 3.35**). Με 50 μM MTSES⁻, ανιχνεύθηκε μια μικρή αναστολή ενεργότητας κατά 30-40% για τα A323C, G327C, V328C, V334C και V339C, και αμελητέα επίπτωση για τα Q330C, M331C, G333C, A335C, R337C και Y338C (**Εικόνα 3.34**). Με 0.2 mM MTSES⁻, ανιχνεύθηκαν πιο σημαντικές επιπτώσεις, αναστολή ενεργότητας κατά 50-90% για τα A323C, G327C, V328C και V334C, αναστολή κατά 30-40% για τα G333C και V339C, και αμελητέα επίπτωση (διατήρηση ενεργότητας 90-110%) για τα Q330C, M331C, A335C, R337C και Y338C (**Εικόνα 3.35**). Σε παράλληλα πειράματα (control), φάνηκε ότι άλλα μεταλλάγματα του YgfO

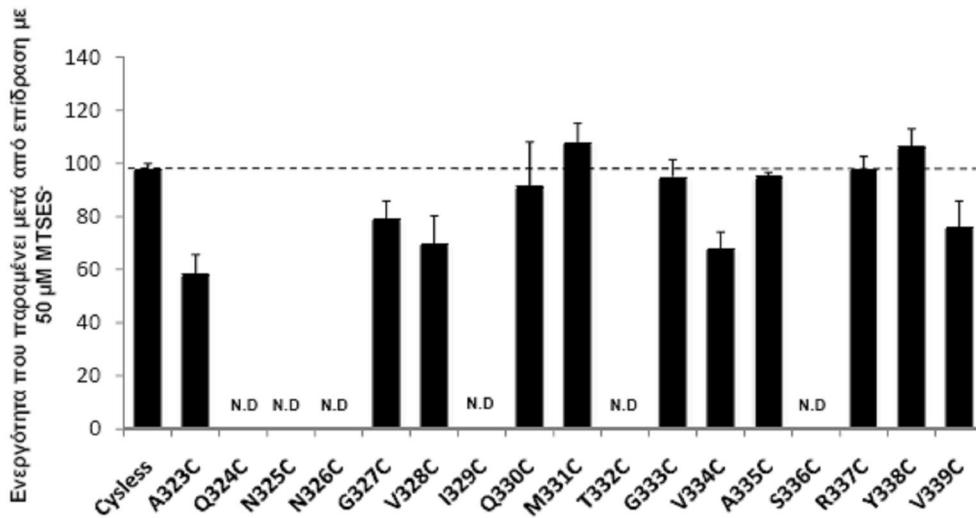
που είναι προσβάσιμα (I419C) ή όχι (R78C) σε 50 μM MTSES^- (πρβλ. Εικόνα 3.26, εδάφιο 3.2.4), δεν επηρεάζονται καθόλου ως προς την ενεργότητα από το αντιδραστήριο MTSES^- ενώ η φυσικού τύπου YgfO (wild-type), που περιέχει 5 κατάλοιπα Cys (Karatza and Frillingos, 2005) αναστέλλεται μόνο κατά 35-40%, στις ίδιες συνθήκες (Εικόνα 3.35). Συνολικά, η εικόνα της αναστολής ενεργότητας δείχνει ότι η ευαισθησία των μεταλλάγματος του μοτίβου-υπογραφή σε απενεργοποίηση από MTSES^- συμβαδίζει με την περιοδικότητα της ευαισθησίας τους στο *N*-αιθυλμλεϊμίδιο (NEM) (Karatza *et al.*, 2006), και οι ίδιες θέσεις που είναι ευαίσθητες σε NEM είναι ευαίσθητες και στο MTSES^- . Διακρίνονται και πάλι οι δύο περιοχές με διαφορετική ευαισθησία που παρατηρήθηκαν και για το NEM (Karatza *et al.*, 2006), η αλληλουχία 323-328 όπου όλα τα ενεργά μεταλλάγματα αναστέλλονται από MTSES^- και η αλληλουχία 329-339 όπου η ευαισθησία σε απενεργοποίηση ακολουθεί μια περιοδικότητα α-έλικας (Εικόνα 3.35).



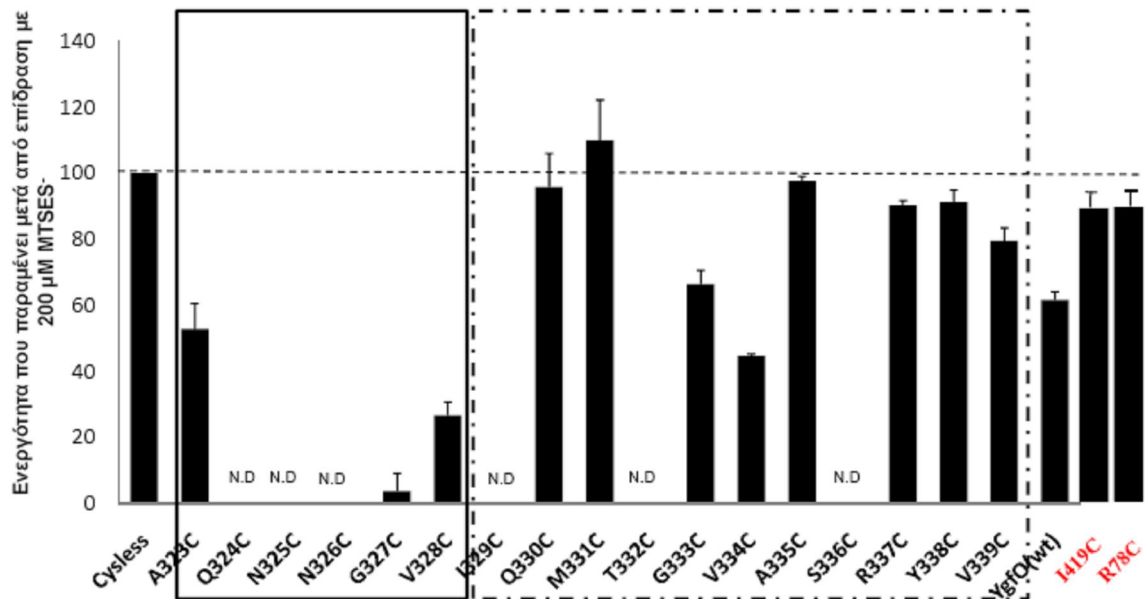
Εικόνα 3.32 Καμπύλη χρονικής προόδου για την δοκιμασία πρόσληψης $[8-^3\text{H}]$ ξανθίνης (1 μM) σε μεμβρανικά κυστίδια RSO που εκφράζουν την περμεάση YgfO(Cys-less)-His₁₀. Η δοκιμασία γίνεται σε κυστίδια (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης, 1 mg/mL) που ενεργοποιούνται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (κλειστά σύμβολα) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.2) ενώ οι τιμές για τον αρνητικό μάρτυρα (κυστίδια που δεν έχουν ενεργοποιηθεί δηλ. χωρίς PMS/ασκορβικό) αφαιρούνται από τις τελικές μετρήσεις, σε κάθε περίπτωση (ανοικτά σύμβολα). Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης μετράται στα 5-10 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης στα 1-2 min.



Εικόνα 3.33 Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης για τα μεταλλάγματα A323C, Q324C, N325C, N326C, G327C, V328C, I329C, Q330C, M331C, T332C, G333C, V334C, A335C, S336C, R337C, Y338C, V339C του YgfO-His₁₀, σε άθικτα κύτταρα *in vivo* (A) και σε μεμβρανικά κυστίδια RSO (B). (A) Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(Cys-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-His₁₀ συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [8-³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα (V₀) μετρήθηκε σε 10-30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 1-10 min. (B) *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(Cys-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-His₁₀ συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού (RSO) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.12). Τα κυστίδια αραιώθηκαν σε συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 1 mg/mL και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [8-³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.2). Μετρήθηκε ο ρυθμός πρόσληψης ξανθίνης σε χρόνους 5-10 sec (V₀) και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε 1-2 min (steady state). Σε όλες τις περιπτώσεις, φαίνονται και οι τιμές τυπικής απόκλισης (S.D.) από 3 πειράματα.



Εικόνα 3.34 Επίδραση MTSES⁻ (50 μM) στην ενεργότητα μεταφοράς [³H]ξανθίνης για τα μεταλλάγματα A323C, G327C, V328C, Q330C, M331C, G333C, V334C, A335C, R337C, Y338C και V339C του YgfO(C-less)-His₁₀. Τα πειράματα έγιναν σε μεμβρανικά κυστίδια RSO που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Εικόνα 3.33B και στις Μεθόδους (εδάφιο 2.6.2). Για τα Q324C, N325C, N326C, I329C, T332C και S336C δεν έγινε προσδιορισμός (N.D.), λόγω των ελάχιστων τιμών αρχικής ταχύτητας (πρβλ. Εικόνα 3.33B).



Εικόνα 3.35 Επίδραση MTSES⁻ (0.2 mM) στην ενεργότητα μεταφοράς [³H]ξανθίνης για τα μεταλλάγματα A323C, G327C, V328C, Q330C, M331C, G333C, V334C, A335C, R337C, Y338C και V339C του YgfO(C-less)-His₁₀ καθώς και για την YgfO(wt)-His₁₀ και για τα μεταλλάγματα I419C-His₁₀ και R78C-His₁₀, που χρησιμοποιήθηκαν ως control. Τα πειράματα έγιναν σε μεμβρανικά κυστίδια RSO που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Εικόνα 3.33B και στις Μεθόδους (εδάφιο 2.6.2). Για τα Q324C, N325C, N326C, I329C, T332C και S336C δεν έγινε προσδιορισμός (N.D.), λόγω των ελάχιστων τιμών αρχικής ταχύτητας (Εικόνα 3.33B).

3.4 Σχέσεις δομής-λειτουργίας της περιοχής ανοδικά του μοτίβου-υπογραφή NAT (αλληλουχία 266-314)

Πρόσφατα δεδομένα στο εργαστήριό μας έχουν υποδείξει τη σημασία που μπορεί να έχει η αμφισβητούμενης τοπολογίας περιοχή πριν το μοτίβο-υπογραφή (εδάφιο 3.2.1), η οποία περιέχει θέσεις υψηλής συντήρησης μεταξύ των χαρακτηρισμένων ομολόγων NAT (Εικόνα 3.36) καθώς και δύο κατάλοιπα που είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία (Glu-272, Asp-304) (Karena and Frillingos, 2009). Εξάλλου, από τα αρχικά πειράματα χημικών πρωτεϊνών UapA/UapC στον ασκομύκητα *A. nidulans*, που κατέληξαν στον εστιασμό της έρευνας στο μοτίβο-υπογραφή (Diallinas *et al.*, 1998), φαίνεται πιθανό ότι όλη αυτή η περιοχή μεταξύ των TM8 και TM9 εμπλέκεται στον καθορισμό της εξειδίκευσης και λειτουργίας του κέντρου δέσμευσης στους μεταφορείς NAT/NCS2. Η αντίστοιχη περιοχή αλληλουχίας του YgfO (266-314) υποβλήθηκε σε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και σημειακής στόχευσης, για να εξετασθεί αναλυτικότερα ο ρόλος της και να αποκαλυφθούν πιθανόν νέα στοιχεία που θα αναδείκνυαν περαιτέρω και τον ρόλο του μοτίβου-υπογραφή NAT στον μεταφορέα YgfO.

PbuX_ <i>B. subtilis</i>	235	A-IVSLVESTGVYFALGDLTNRRLT----EIDLKGYRAEGLAVLLGGIF	283
PucK_ <i>B. subtilis</i>	237	A-IVSLVESTGVYFALADITNRRLS----EKDLEKGYRAEGLAILLGGLF	285
PucJ_ <i>B. subtilis</i>	240	G-IVIIIVESTGVFYAIGKICGRPLT----DKDLVKGYRAEGIAAILIGGLF	288
YgfU_ <i>E. coli</i>	303	L-IIVFIESMGMFLALGEIVGRKLS----SHDIIRGLRVDGVGTMIGGTF	351
YcpX_ <i>C. perfringens</i>	252	Y-FVATIGTVGCLKAIGETSNIDIG----DKRVAAGVLSGVDGVSALGGLV	300
YgfO_ <i>E. coli</i>	266	Y-LLSVLEAVGDITATAMVSRRPVQGGVYQSRKGGVLAAGLVSVIASAV	314
YicE_ <i>E. coli</i>	278	F-MITSLETIGDITATSDVSEQPVSGPLYMKRLKGGVLANGLNSFVSAVF	326
UapC_ <i>A. nidulans</i>	349	FTFVDLFDITIGDITATCDVSRVQVEGATFDSRVQGGVLDGNGITCLLAGLC	397
AfUapC_ <i>A. fumigatus</i>	348	Y-IVIMMESIGDITATCDVSRVQVEGADFDSDRVQGGVLDGNGITCLLAGLF	396
Xut1_ <i>C. albicans</i>	350	F-IICACECIGDVTATCDVSRVLEVRGGTFESRIQGGAVLADGINSVVAALA	398
UapA_ <i>A. nidulans</i>	328	Y-IVLMMECIGDVTATSDVSRVLPVSGEMYESRIQGGVLDGDCIGILSTLM	376
PyrP_ <i>L. lactis</i>	248	A-FVTMTEHFGHIMVLSLTKKDYFK---EPGLEKTLTGDGLAQIAGFI	296
UraA_ <i>E. coli</i>	232	A-LVVIAEHVGHVLTANIVKKDLLR---DPGLHRSMFANGLSTVIVSGFF	280
SVCT1_ <i>H. sapiens</i>	330	T-LAGIIESIGDYACARLAGAPPPP---VHAINRGIFTEGICCIAGLL	378
SVCT2_ <i>H. sapiens</i>	385	V-VASIIIESIGDYACARLSCAPPPP---IHAINRGIFVEGLSCVLDGIF	433
Lpel_ <i>Z. mays</i>	288	S-FASLIESTGTLIAVSRYSGATFCP---PSVFSRGIGWEGISIIIDGMC	336
MoorT_ <i>M. thermoacetica</i>	261	Y-MVIMMESIGTLIGVSSKANLLDENG-NLPRAGKALISDAVGTTLGAIL	309

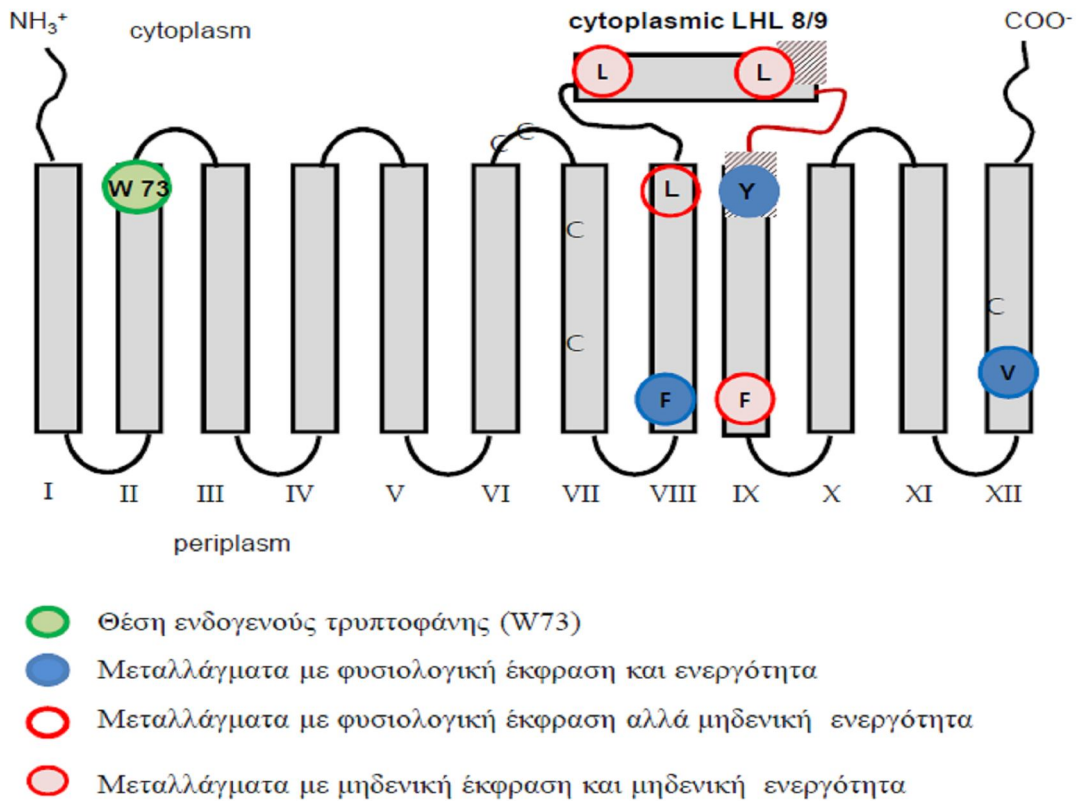
Εικόνα 3.36. Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής Y266-V314 (YgfO), που βρίσκεται πριν το μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NAT, μεταξύ των 17 χαρακτηρισμένων NAT/NCS2 μεταφορέων, *E. coli* YgfO (P67444), YicE (P0AGM9), and UraA (P0AGM7), *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140), and PucJ (O32139), *Clostridium perfringens* YcpX (BAB80103), *Lactococcus lactis* PyrP (AAK05701), *A. nidulans* UapA (Q07307) and UapC (P487777), *Aspergillus fumigatus* AfUapC XP748919), *Candida albicans* Xut1 (AAX2221), *Zea mays* Lpel (AAB17501), *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (AAH50261) and SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3) και 2 μεταφορέων που μελετώνται αυτή τη στιγμή στο εργαστήριό μας *E. coli* YgfU (Q46821) και *Moorella thermoacetica* MoorT (Moth_2478). Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

3.4.1 Μεταλλαξιγένεση τρυπτοφάνων - Ενδείξεις για την δομική-λειτουργική ιδιαιτερότητα της περιοχής ανοδικά του μοτίβου-υπογραφή (Y266-F322)

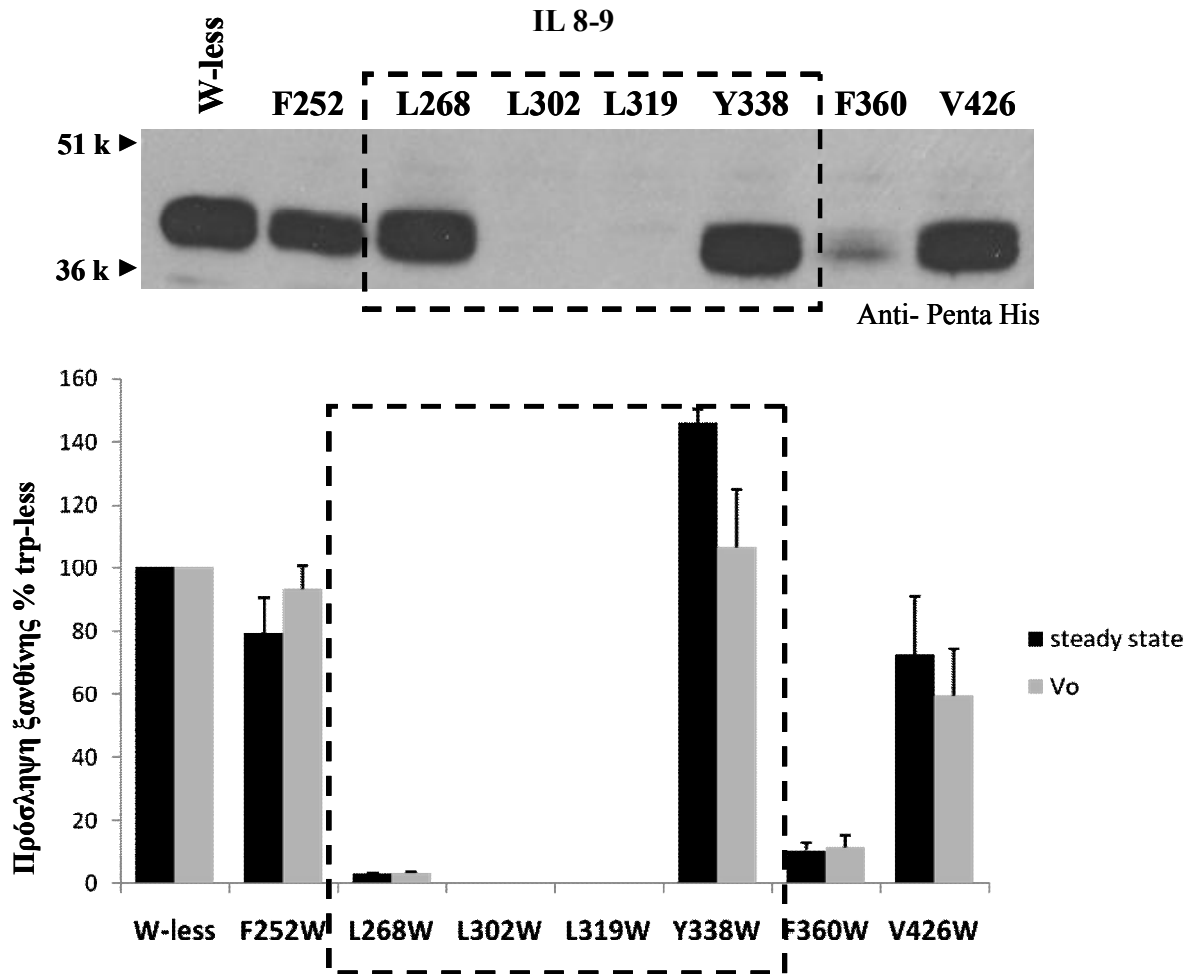
Με υπόστρωμα την λειτουργική περμεάση YgfO(W37F) που δεν περιέχει εγγενή κατάλοιπα τρυπτοφάνης (εδάφιο 3.1.3) (Trp-less YgfO), προχωρήσαμε σε σημειακή μεταλλαξιγένεση των θέσεων Phe-252, Leu-268, Leu-302, Leu-319, Tyr-338, Phe-360 και Val-426, στο C-τελικό τμήμα του μορίου, εισάγοντας νέα κατάλοιπα Trp στις θέσεις αυτές (single-Trp mutants). Οι θέσεις-στόχοι αυτής της εργασίας μεταλλαξιγένεσης βρίσκονται στα προβλεπόμενα όρια μεταξύ υδρόφιλων περιοχών του μορίου και των διαμεμβρανικών τμημάτων TM8 (Phe-252, Leu-268), TM9a [το αμφιλεγόμενης τοπολογίας τμήμα αμφιπαθικής έλικας μεταξύ TM8 και TM9] (Leu-302, Leu-319), TM9 (Tyr-338, Phe-360), TM12 (Val-426) (**Εικόνα 3.37**). Επιλέχθηκαν τέτοιες θέσεις, προς τα όρια μεταξύ διαμεμβρανικού και υδρόφιλου τμήματος, γιατί εκεί η τρυπτοφάνη, λόγω του υδρόφοβου και αμφίφιλου χαρακτήρα της, μπορεί να σταθεροποιείται χωρίς σημαντικά δομικά προβλήματα (Tyagi *et al.*, 2007) ενώ είναι δυνατόν επίσης, σε τέτοιες θέσεις, να υπάρχουν εντονότερα φαινόμενα αλλαγών διαμόρφωσης κατά τον μηχανισμό λειτουργίας (Forrest *et al.*, 2008; Kaback *et al.*, 2007), τα οποία θα μπορούσαν να ανιχνευτούν με εφαρμογή άλλων αναλύσεων στο μέλλον, όπως π.χ. με φθορισμομετρία (εδάφιο 3.1). Τα εγγενή κατάλοιπα που επιλέχθηκαν να αντικατασταθούν ήταν κατά το δυνατόν συγγενέστερα προς την Trp σε όγκο και υδροφοβικότητα (Phe, Leu, Tyr, ή Val), ενώ οι γειτονικές περιοχές της αλληλουχίας αυτών των καταλοίπων ήταν ήδη υπό μελέτη στο εργαστήριο με άλλες στρατηγικές μεταλλαξιγένεσης και είχαμε ήδη κάποια αρχικά στοιχεία για τη σημασία τους, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών του μοτίβου-υπογραφή (Karatza *et al.*, 2006) και του TM12 (Papakostas *et al.*, 2008). Όπως περιγράφεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης των 7 αυτών μεταλλαγμάτων μοναδικής τρυπτοφάνης δείχνουν ότι αντικαταστάσεις στην περιοχή της αμφιλεγόμενης έλικας TM9a (LHL8/9 στην Εικόνα 3.37) οδηγούν σε απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη (L302W, L319W), ενώ η αντικατάσταση της Leu-268 στον κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8 οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση (L268W) παρά το ότι η περμεάση αυτή εκφράζεται κανονικά (**Εικόνα 3.37**).

3.4.1.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμάτων μοναδικής τρυπτοφάνης

Τα μεταλλάγματα μοναδικής τρυπτοφάνης YgfO(W73F/F252W)-His₁₀, YgfO(W73F/L268W)-His₁₀, YgfO(W73F/L302W)-His₁₀, YgfO(W73F/L319W)-His₁₀, YgfO(W73F/Y338W)-His₁₀, YgfO(W73F/F360W)-His₁₀ και YgfO(W73F/V426W)-His₁₀ εκφράσθηκαν σε κύτταρα *E. coli* T184 μέσω IPTG-επαγόμενων πλασμιδιακών φορέων pT7-5 και ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης τους στη μεμβράνη και η ενεργότητα πρόσληψης [8-³H]ξανθίνης (**Εικόνα 3.38**). Παρατηρούμε ότι τα μεταλλάγματα YgfO(W73F/F252W)-His₁₀, YgfO(W73F/Y338W)-His₁₀ και YgfO(W73F/V426W)-His₁₀ εκφράζονται στη μεμβράνη της *E. coli* σε υψηλά επίπεδα, συγκρίσιμα με αυτά της ελεύθερης τρυπτοφανών περμεάσης YgfO(W73F)-His₁₀, και έχουν πολύ υψηλές τιμές ενεργότητας (αρχικές ταχύτητες, μεταξύ 70-140% σε σχέση με την W-less YgfO). Αντίθετα, τα μεταλλάγματα YgfO(W73F/L302W)-His₁₀ και YgfO(W73F/L319W)-His₁₀ δεν εκφράζονται καθόλου στη μεμβράνη και, λογικά, δεν εμφανίζουν καμιά ενεργότητα (Εικόνα 3.38), ενώ και το μετάλλαγμα YgfO(W73F/F360W)-His₁₀ έχει οριακά επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας (5-10%). Τέλος, το μετάλλαγμα YgfO(W73F/L268W)-His₁₀ εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη, όμοια με αυτά της W-less YgfO, αλλά έχει σχεδόν μηδενική ενεργότητα (1-2%). Βλέπουμε, λοιπόν, ότι οι αντικαταστάσεις με τρυπτοφάνη στην περιοχή της αμφιπαθούς έλικας TM9a (LHL8/9 στην Εικόνα 3.37) οδηγούν σε δομική αποσταθεροποίηση, πράγμα που μπορεί να σχετίζεται βέβαια και με την ανεπαρκή πρόβλεψη της τοπολογίας από τους αλγόριθμους στην περιοχή αυτή (εδάφιο 3.2.1) αλλά, κυρίως, ότι η αντικατάσταση της Leu-268, στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8, οδηγεί σε απενεργοποίηση, παρά το ότι δεν επηρεάζεται η έκφραση, γεγονός που μπορεί να δείχνει κάποιο σημαντικό λειτουργικό ρόλο στην θέση αυτή (**Εικόνα 3.37**).



Εικόνα 3.37 Τοπολογικό μοντέλο του YgfO, σε σχέση με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μεταλλαγμάτων μοναδικής τρυπτοφάνης (single-Trp mutants) (F252W, L268W, L302W, L319W, Y338W, F360W, V426W) και την θέση της μοναδικής εγγενούς τρυπτοφάνης του YgfO (Trp-73). Τα αποτελέσματα περιγράφονται στο εδάφιο 3.4.1.



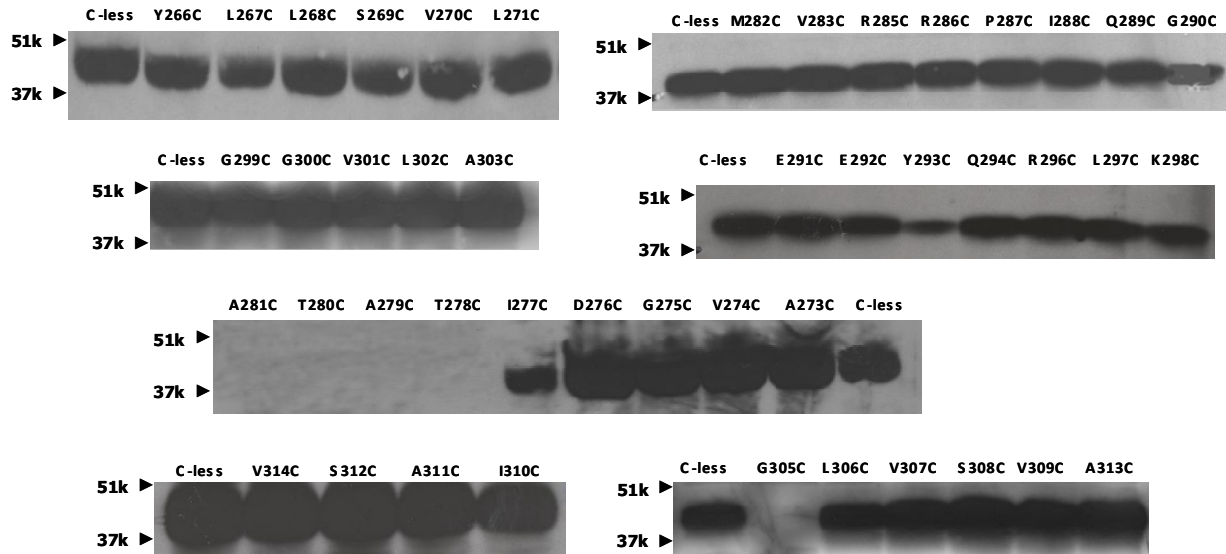
Εικόνα 3.38 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης και ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης για τα μεταλλάγματα F252W, L268W, L302W, L319W, Y338W, F360W και V426W του YgfO(W-less)-His₁₀. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(W-less)-His₁₀ ή pT7-5/ygfO(single-W)-His₁₀ συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Κλάσματα μεμβρανών που παρασκευάστηκαν από τα κύτταρα αυτά (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι των ιστιδινών (PentaHis-HRP) σε αραιώση 1:5000, και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημιοφωταύγεια (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 [8-³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα (V₀) μετρήθηκε σε 10-30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 1-10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) (αρχική ταχύτητα, 0.021±0.006 nmol mg⁻¹ min⁻¹) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της YgfO(W-less)-His₁₀ (αρχική ταχύτητα, 0.86±0.07 nmol mg⁻¹ min⁻¹) με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.4.2 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στην περιοχή Y266-V314

Με βάση τις παραπάνω σημαντικές ενδείξεις για την δομική-λειτουργική ιδιαιτερότητα της ευρύτερης περιοχής μεταξύ TM8 και TM9 (Εικόνα 3.37), θελήσαμε να εξετάσουμε πιο συστηματικά όλα τα κατάλοιπα της περιοχής αυτής με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης. Εστιασθήκαμε στην περιοχή της αλληλουχίας 266-314 μεταξύ του C-τελικού άκρου της TM8 και του C-τελικού άκρου της αμφιλεγόμενης έλικας TM9a (LHL8/9) (Εικόνα 3.37), εφόσον είχαν ήδη εξετασθεί σε προηγούμενες μελέτες (Karatza *et al.*, 2006) τα κατάλοιπα της περιοχής 315-340 που περιέχει το μοτίβο-υπογραφή. Τα αρχικά πειράματα μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνών (Εικόνες 3.39 και 3.40) έγιναν από τον Αλέξανδρο Καλλή, στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής του εργασίας Ειδίκευσης (ΜΔΕ) (2009) και έδειξαν καταρχήν ότι τα σημαντικά κατάλοιπα συγκεντρώνονται σε δύο υποπεριοχές αλληλουχίας, την ²⁷²**EAVGDITATAMVS**²⁸⁴ και την ²⁹⁶**RLKGGVLADG**³⁰⁵. Στη συνέχεια, επικεντρωθήκαμε στην πρώτη υποπεριοχή ²⁷²**EAVGDITATAMVS**²⁸⁴ που περιλαμβάνει το άκρο της διαμεμβρανικής έλικας TM8 και την αμέσως επόμενη αλληλουχία με την οποία ξεκινά το υδρόφιλο τμήμα πριν την αμφιπαθική έλικα TM9a (LHL8/9). Έγινε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση, στην αλληλουχία αυτή, με αντικαταστάσεις σε δομικώς συγγενέστερα αμινοξέα για τις θέσεις Asp276, Ile277, Thr278, Ala279, Thr280, και Ala281, και ανάλυση της λειτουργικής επίδρασης του ειδικού SH-αντιδραστηρίου NEM καθώς και του υποστρώματος (ξανθίνης) στις θέσεις Ala-273 (A273C), Gly-275 (G275C), και Ser-284 (S284C). Συνοπτικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καρβοξυλομάδα της Asp-276 είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία του YgfO και η Gly-275 (G275C) είναι πολύ ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από αλκυλίωση με το NEM και η ευασθησία της αυξάνεται παρουσία υποστρώματος. Και τα δύο αυτά κατάλοιπα βρίσκονται προς την ίδια πλευρά α-έλικας του TM8 με το Glu-272, που είναι συντηρημένο και λειτουργικά αναντικατάστατο (Karena and Frillingos, 2009) και με την Leu-268, που είναι ευαίσθητη σε απενεργοποίηση με αντικατάσταση σε τρυπτοφάνη (εδάφιο 3.4.1). Επίσης, αμέσως μετά το πιθανό άκρο της έλικας TM8, η αλληλουχία Thr-Ala-Thr-Ala (278-281) σχηματίζει μια σειρά πλευρικών ομάδων όπου η εισαγωγή ομάδας μεγαλύτερου όγκου ή διαφορετικής γεωμετρίας καταστρέφει την ενεργότητα ή και την έκφραση στη μεμβράνη, γιατί πιθανόν παρεμποδίζεται κάποια σημαντική στερεοχημική αλληλεπίδραση.

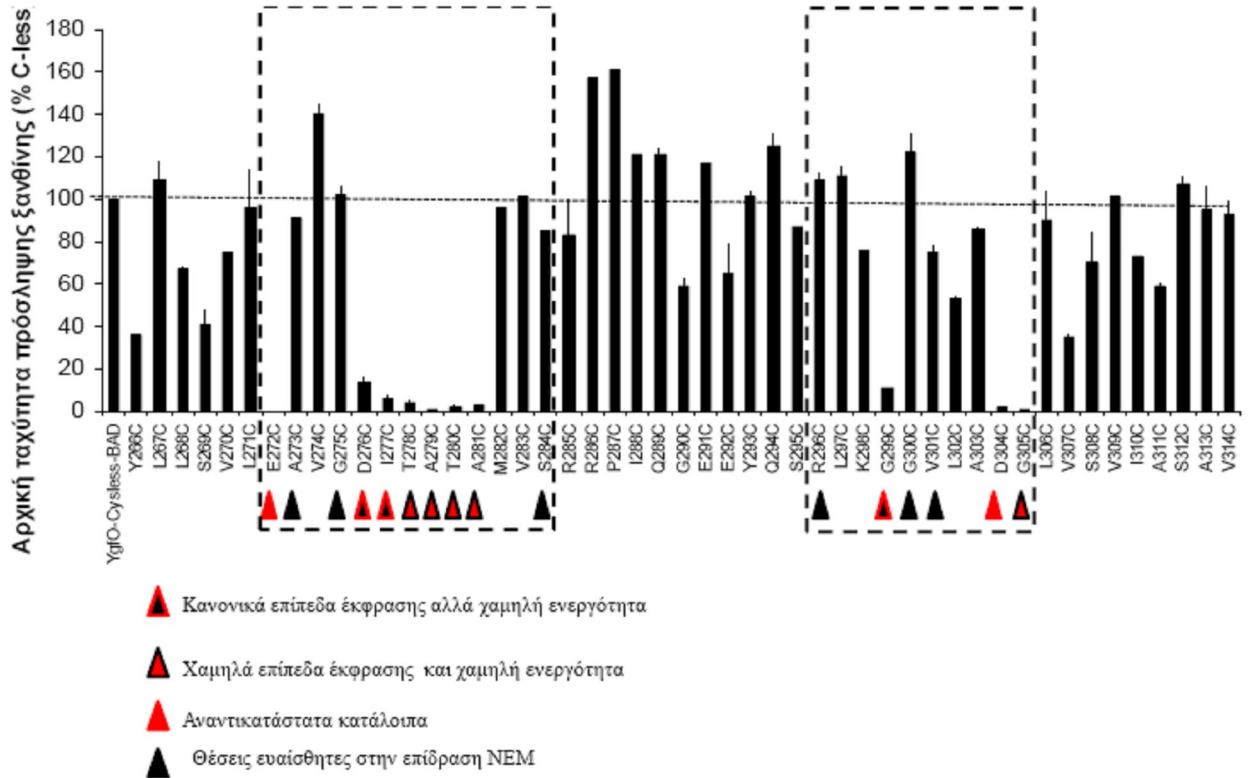
3.4.2.1 Γενική εικόνα από την ανάλυση των μεταλλάξεων μοναδικής κυστεΐνης

Τα περισσότερα από τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης, στην περιοχή των θέσεων καταλοίπων 266-314, εκφράζονται στη μεμβράνη της *E. coli* σε υψηλά επίπεδα, αλλά υπάρχουν 5 μεταλλάγματα που δεν εκφράζονται καθόλου (T278C, A279C, T280C, A281C, G305C) και 1 που εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (I277C) (**Εικόνα 3.39**). Εκτός από τα 5 μεταλλάγματα που δεν εκφράζονται, υπάρχουν 5 ακόμη μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης που εμφανίζουν ελάχιστα έως μηδενικά επίπεδα ενεργότητας (κάτω του 10% σε σχέση με την C-less YgfO), τα D276C, I277C, G299C και δύο (E272C, D304C) που έχει δειχθεί ότι αντιστοιχούν σε αναντικατάστατα κατάλοιπα (Glu-272, Asp-304) (Karena and Frillingos, 2009) (**Εικόνα 3.40**). Από τα λειτουργικά μεταλλάγματα, ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM παρουσιάζουν κυρίως 3, τα A273C, G275C και S284C, που διατηρούν μόνο 1-10% της ενεργότητας μετά από επώαση με 2 mM NEM, και, κατά δεύτερο λόγο, τα R296C, G300C και V301C, που διατηρούν 30-40% της ενεργότητας μετά από επώαση με 2 mM NEM (**Εικόνα 3.41**). Παρατηρούμε ότι όλα τα σημαντικά κατάλοιπα συγκεντρώνονται σε δύο υποπεριοχές αλληλουχίας (**Εικόνα 3.40**), την ²⁷²**EAVGDITATAMVS**²⁸⁴ και την ²⁹⁶**RLKGGVLADG**³⁰⁵ [με έντονα στοιχεία: θέσεις όπου το μετάλλαγμα μοναδικής Cys έχει μηδενική ενεργότητα, μεταξύ των οποίων είναι και οι αναντικατάστατες E272 και D304, με υπογράμμιση: θέσεις όπου το μετάλλαγμα είναι ευαίσθητο σε απενεργοποίηση από το NEM, με έντονα πλάγια στοιχεία και υπογράμμιση: θέσεις όπου το μετάλλαγμα μοναδικής Cys δεν εκφράζεται καθόλου στη μεμβράνη]. Η πρώτη από τις δύο υποπεριοχές, ²⁷²**EAVGDITATAMVS**²⁸⁴, που βρίσκεται στο πιθανό κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8 και στο αμέσως επόμενο τμήμα αλληλουχίας, περιέχει σαφώς τις πιο ενδιαφέρουσες θέσεις καταλοίπων, δηλ. το αναντικατάστατο και απόλυτα συντηρημένο (**Εικόνα 3.36**) Glu-272, την επίσης απόλυτα συντηρημένη Gly-275, όπου εμφανίζεται η μεγαλύτερη ευαισθησία στο NEM, το Asp-276, και τη σειρά των 4 καταλοίπων ²⁷⁸TATA²⁸¹ όπου είχαμε πλήρη απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη για τα αντίστοιχα μεταλλάγματα κυστεϊνών (**Εικόνα 3.40**). Η δεύτερη υποπεριοχή, ²⁹⁶**RLKGGVLADG**³⁰⁵, περιέχει θέσεις μικρότερης ευαισθησίας στο NEM, τις Gly-299 και Gly-305 για τις οποίες βρέθηκε στη συνέχεια ότι μπορούν να αντικατασταθούν με πλήρη διατήρηση της ενεργότητας και/ή έκφρασης στη μεμβράνη (Καλλής Αλ., αδημοσίευτα αποτελέσματα), ενώ το αναντικατάστατο Asp-304 είχε μελετηθεί ήδη (Karena and Frillingos, 2009).



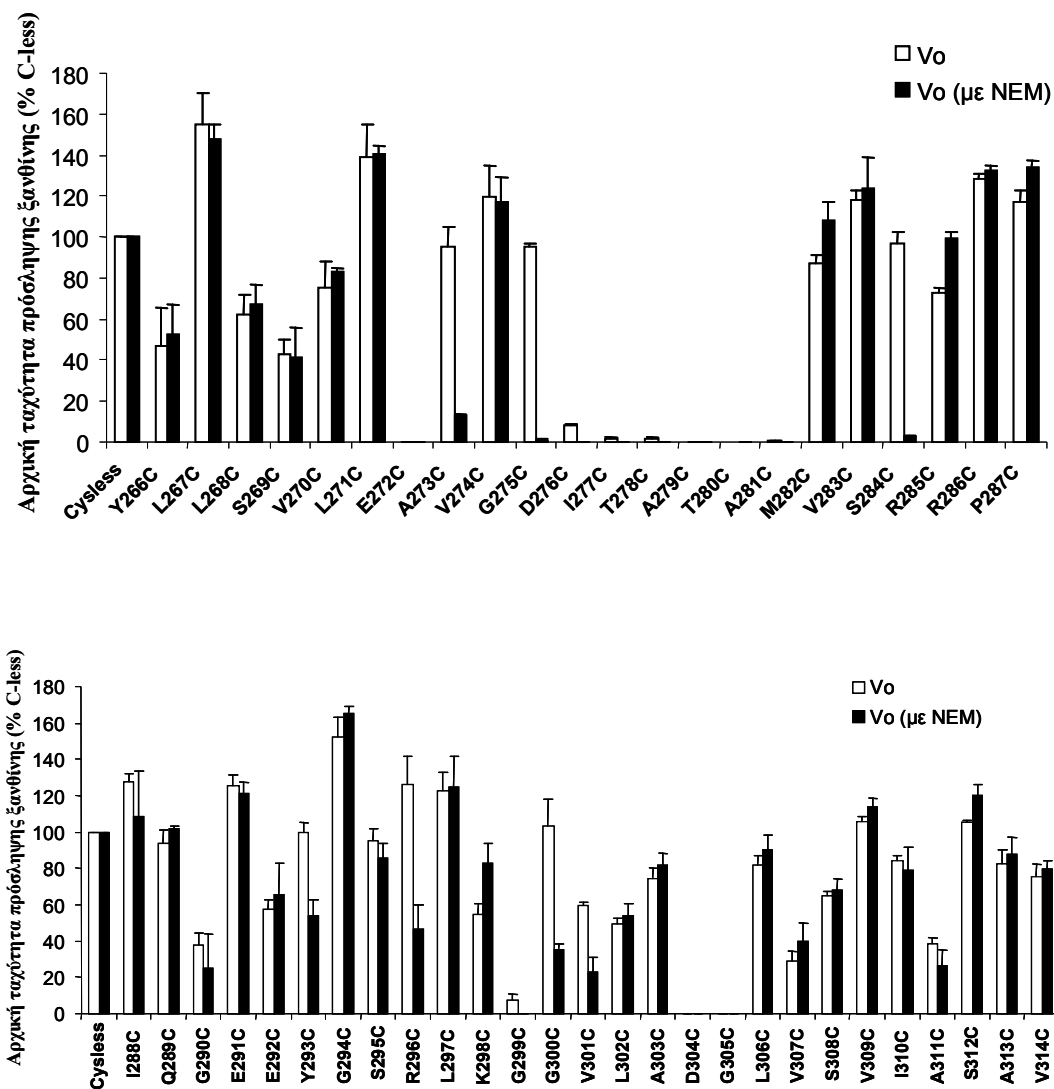
Εικόνα 3.39 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης στις θέσεις 266-314 του YgfO(C-less)-BAD. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(C-less)-BAD ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-BAD συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Κλάσματα μεμβρανών που παρασκευάστηκαν από τα κύτταρα αυτά (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 των ηλεκτροφορημάτων σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

[Τα πειράματα αυτά έγιναν αρχικά από τον Αλέξανδρο Καλλή, υπό την εργαστηριακή επίβλεψη της Αικατερίνης Γεωργοπούλου (ΜΔΕ, 2009). Τα επίπεδα έκφρασης για τα μεταλλάγματα της περιοχής 276-281 επιβεβαιώθηκαν ανεξάρτητα από τον Γ. Μερμελέκα]



Εικόνα 3.40 Επίπεδα ενεργότητας των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης στις θέσεις 266-314 του YgfO(C-less)-BAD. *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμασών από πλασμίδια pT7-5/ygfO(C-less)-BAD ή pT7-5/ygfO(single-Cys)-BAD υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 $^{\circ}\text{C}$, όπως περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης μετράται σε 10-30 sec. Φαίνονται επίσης ο δύο υποπεριοχές αλληλουχίας όπου συγκεντρώνονται τα πιο σημαντικά κατάλοιπα και οι ιδιότητες των μεταλλαγμάτων στις θέσεις αυτές, όπως περιγράφεται στο κείμενο.

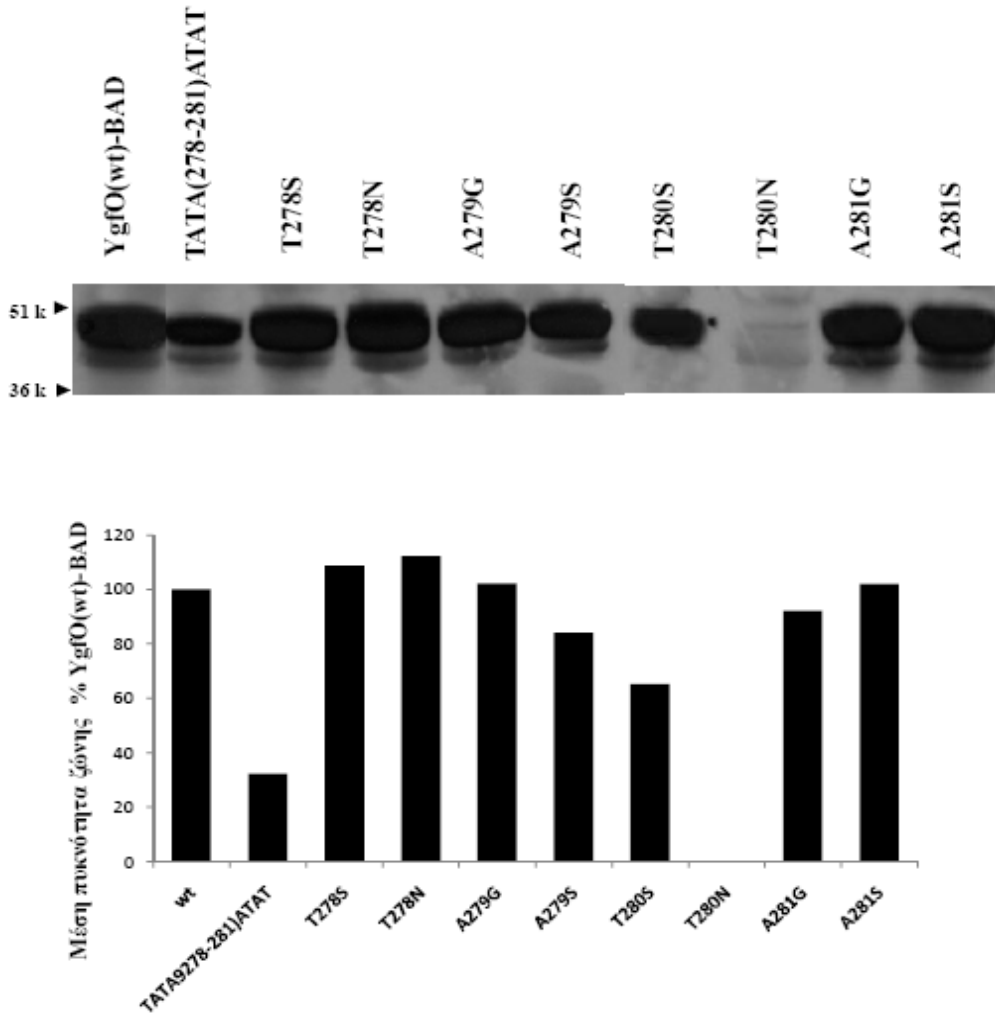
[Τα πειράματα αυτά έγιναν αρχικά από τον Αλέξανδρο Καλλή, υπό την εργαστηριακή επίβλεψη της Αικατερίνης Γεωργοπούλου (ΜΔΕ, 2009), με εξαίρεση τα μεταλλάγματα S284C και S296C που είχαν εξετασθεί αρχικά από την Σωτηρία Λιμπανοβνού (πτυχιακή διπλωματική εργασία, 2006) και τα μεταλλάγματα E272C και D304C που εξετάστηκαν από την Αικατερίνη Καρενά (Καρενά, 2005). Οι ενεργότητες πρόσληψης ξανθίνης για τα μεταλλάγματα της περιοχής 273-284 καθώς και τα αρχικά δεδομένα για την λειτουργική επίδραση του NEM επιβεβαιώθηκαν ανεξάρτητα από τον Γ. Μερμελέκα]



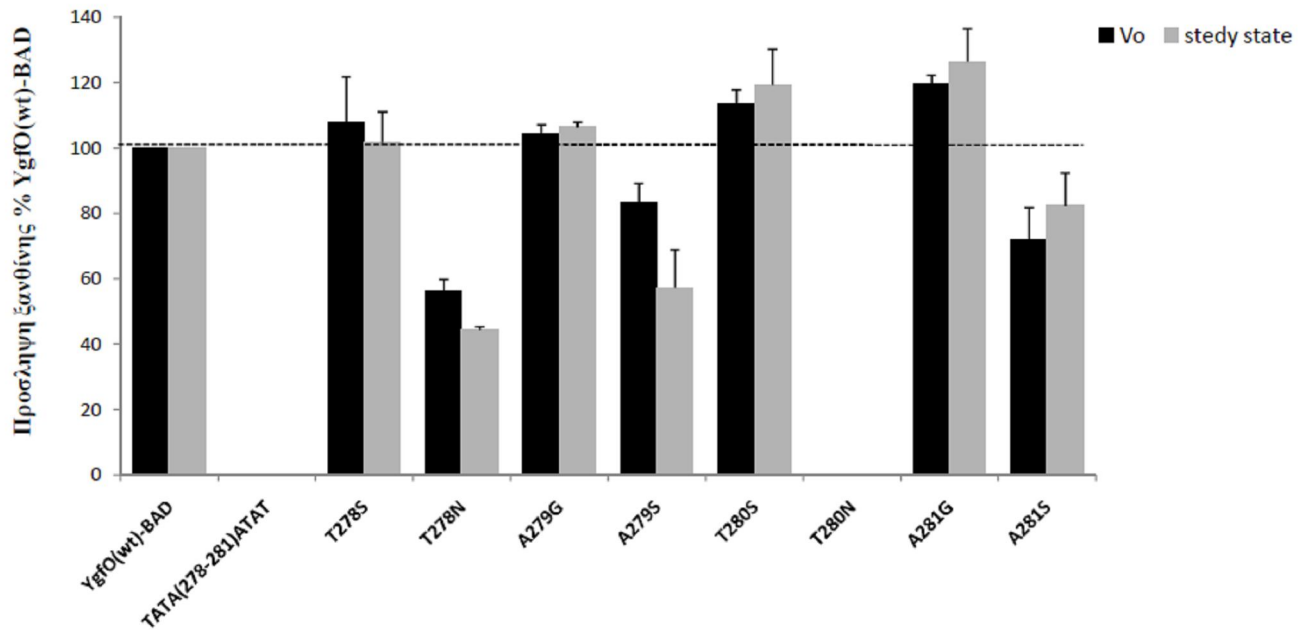
Εικόνα 3.41 Επίδραση του *N*-αιθυλμλεϊμιδίου (NEM) (2 mM) στις ενεργότητες των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης στις θέσεις 266-314 του YgfO(C-less)-BAD. Φαίνονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης [³H]ξανθίνης (V_0) από κύτταρα T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες, πριν και μετά την επώαση με NEM, για την περιοχή καταλοίπων 266-287 (άνω) και 288-314 (κάτω) (ίδιες συνθήκες, όπως και στην Εικόνα 3.40).

3.4.2.2 Εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση στην περιοχή 278-281 (Thr-Ala-Thr-Ala)

Οι θέσεις όπου η αρχική μεταλλαξιγένεση ανέδειξε μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης με μηδενική έκφραση (Thr-278, Ala-279, Thr-280, Ala-281) υπεβλήθησαν σε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης, αντικαθιστώντας με όσο το δυνατόν συγγενέστερα αμινοξέα (Ser ή Asn αντί Thr, Gly ή Ser αντί Ala) στο υπόστρωμα της φυσικού τύπου περμεάσης YgfO. Επίσης, σε ένα τετραπλό μετάλλαγμα, διατηρήθηκαν τα αμινοξέα της αλληλουχίας 278-281 αλλά ανταλλάχθηκε η σειρά τους (Ala-Thr-Ala-Thr). Τα 9 αυτά μεταλλάγματα του YgfO ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση στη μεμβράνη (**Εικόνα 3.42**) και την ενεργότητά τους (**Εικόνα 3.43**). Βρέθηκε ότι τα μεταλλάγματα A279G(wt) και A281G(wt) έχουν έκφραση και ενεργότητα παρόμοια με αυτή του wild-type, ενώ τα A279S(wt) και A281S(wt) έχουν 100% έκφραση στη μεμβράνη και μειωμένη αλλά υψηλή ενεργότητα (50-80% σε σχέση με το wild-type) (Εικόνα 3.43). Τα μεταλλάγματα T278S(wt) και T280S(wt) έχουν επίσης πλήρη έκφραση και ενεργότητα, στα επίπεδα του wild-type, ενώ το T278N(wt) έχει κανονική έκφραση και 50% ενεργότητα, και το T280N(wt) έχει μηδενική σχεδόν έκφραση και ενεργότητα (Εικόνες 3.42 και 3.43). Από την άλλη πλευρά, όταν διατηρήσαμε τα 4 κατάλοιπα αλλάζοντας απλώς τη σειρά τους (Ala-Thr-Ala-Thr), το τετραπλό μετάλλαγμα [TATA(278-281)ATAT] διατηρεί υψηλά επίπεδα έκφρασης (30% σε σχέση με τον wild-type) αλλά έχει μηδενική ενεργότητα (Εικόνες 3.42 και 3.43).



Εικόνα 3.42 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των μεταλλαγμάτων T278S, T278N, A279G, A279S, T280S, T280N, A281G, A281S και TATA(278-281)ATAT του YgfO(wt)-BAD. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από *E. coli* T184 μετασηματισμένα με pT7-5/ygfO(wt)-BAD και με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις καταλοίπων, που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών. Τα 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). Στα αριστερά, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων και ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης έγινε με το πρόγραμμα Quantity-one (BioRad).



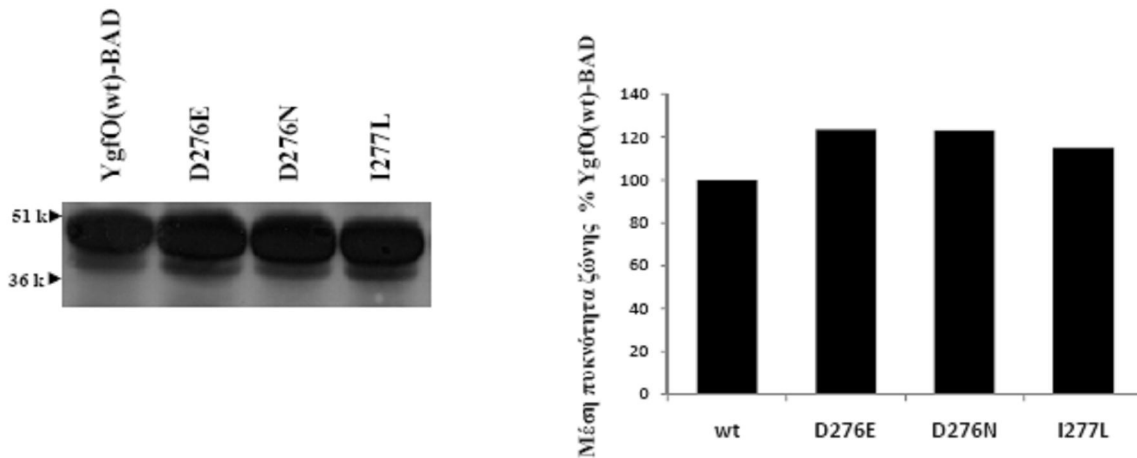
Εικόνα 3.43 Επίπεδα ενεργότητας των μεταλλαγμάτων T278S, T278N, A279G, A279S, T280S, T280N, A281G, A281S και TATA(278-281)ATAT του YgfO(wt)-BAD. Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με pT7-5/ygfO(wt)-BAD και με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις καταλοίπων, που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών, υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα (V_o) μετρήθηκε σε 10-30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 1-10 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 εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της YgfO(wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.

3.4.2.3 Μεταλλαξιγένεση των Asp-276 και Ile-277

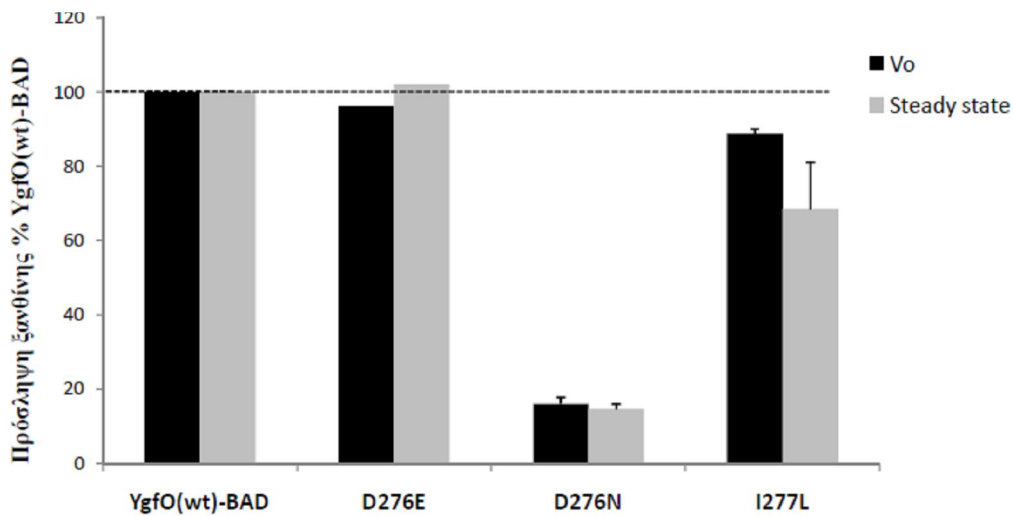
Οι θέσεις όπου η αρχική μεταλλαξιγένεση ανέδειξε μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης με ελάχιστη ενεργότητα παρά το ότι υπήρχε έκφραση στη μεμβράνη (Asp-276, Ile-277) υπεβλήθησαν σε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης, αντικαθιστώντας με όσο το δυνατόν συγγενέστερα αμινοξέα (Glu ή Asn αντί Asp, Leu αντί Ile) στο υπόστρωμα της φυσικού τύπου περμεάσης YgfO. Τα 3 αυτά μεταλλάγματα του YgfO ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση στη μεμβράνη (**Εικόνα 3.44**) και την ενεργότητά τους (**Εικόνα 3.45**). Βρέθηκε ότι και τα 3 μεταλλάγματα εκφράζονται κανονικά στη μεμβράνη, σε επίπεδα του wild-type (Εικόνα 3.44), το μετάλλαγμα I279L(wt) έχει πολύ υψηλή ενεργότητα (70-85%), το D276E(wt) έχει 100% ενεργότητα, ενώ το D276N(wt) έχει πολύ μικρή ενεργότητα, γύρω στο 10% του wild-type (Εικόνα 3.45).

3.4.2.4 Ανάλυση της επίδρασης του NEM στα μεταλλάγματα A273C, G275C και S284C

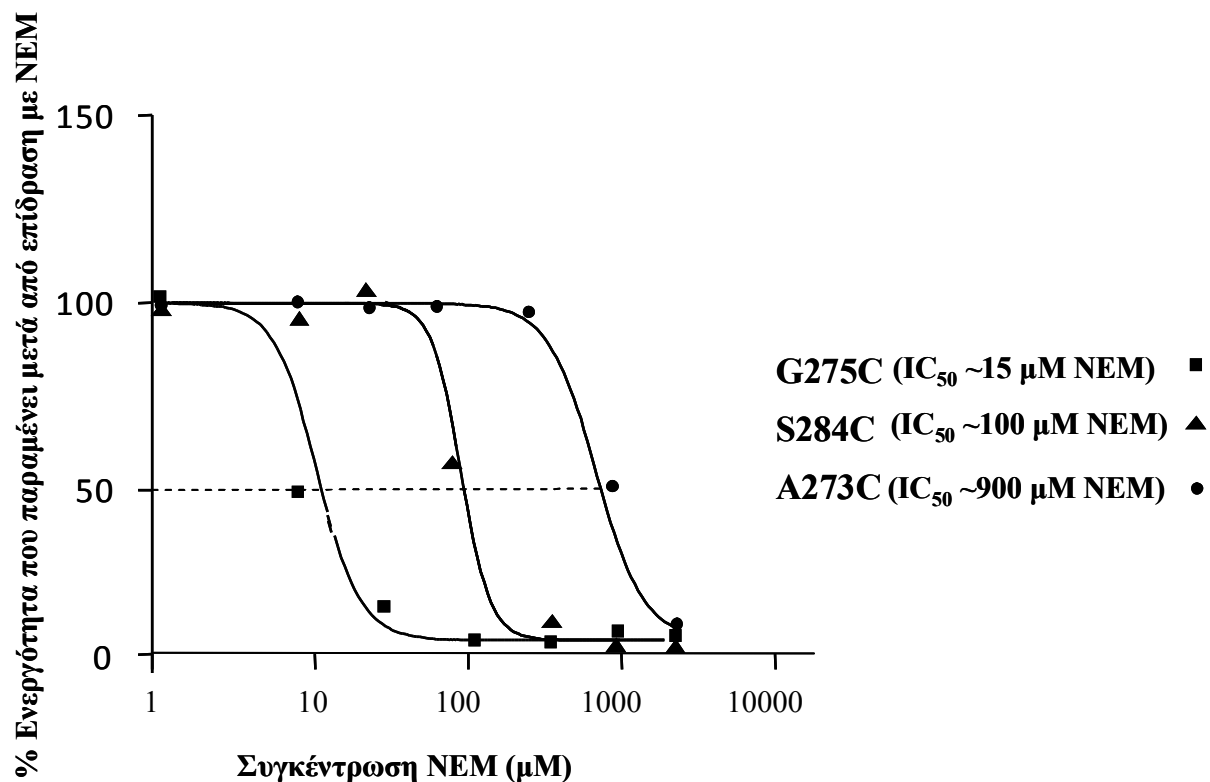
Τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης στις θέσεις όπου βρέθηκε έντονη ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM (Ala-273, Gly-275, Ser-284) αναλύθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων NEM (1 μ M έως 2 mM) για να προσδιορισθεί η συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της ενεργότητας (IC_{50}). Από αυτά τα πειράματα βρέθηκε ότι η G275C έχει IC_{50} για αναστολή από το NEM στα 15 μ M, η S284C έχει IC_{50} (NEM) 100 μ M, και η A273C έχει IC_{50} (NEM) 0.9 mM (**Εικόνα 3.46**). Οι δύο περμεάσες που επηρεάζονται σε πιο μεγάλο βαθμό (G275C και S284C) εξετάστηκαν στη συνέχεια για την επίδραση που μπορεί να είχε η παρουσία υποστρώματος (ξανθίνης) στην απενεργοποίηση από το NEM (**Εικόνα 3.47**). Για τα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις NEM πλησίον του IC_{50} σε κάθε περίπτωση, δηλ. 20 μ M για την G275C, και 100 μ M για την S284C. Βρέθηκε ότι η παρουσία ξανθίνης (1 mM) αυξάνει την ευαισθησία της G275C σε απενεργοποίηση από το NEM (από μείωση ενεργότητας κατά 50% σε μείωση ενεργότητας κατά 75%), ενώ δεν επηρεάζει την S284C (Εικόνα 3.47). Η αύξηση της ευαισθησίας της G275C σημαίνει πιθανόν ότι η αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης (λόγω της πρόσδεσης της ξανθίνης) διευκολύνει την πρόσβαση του NEM στη συγκεκριμένη θέση ή την μετατοπίζει σε περιβάλλον όπου ο μηχανισμός λειτουργίας παρεμποδίζεται πιο έντονα.



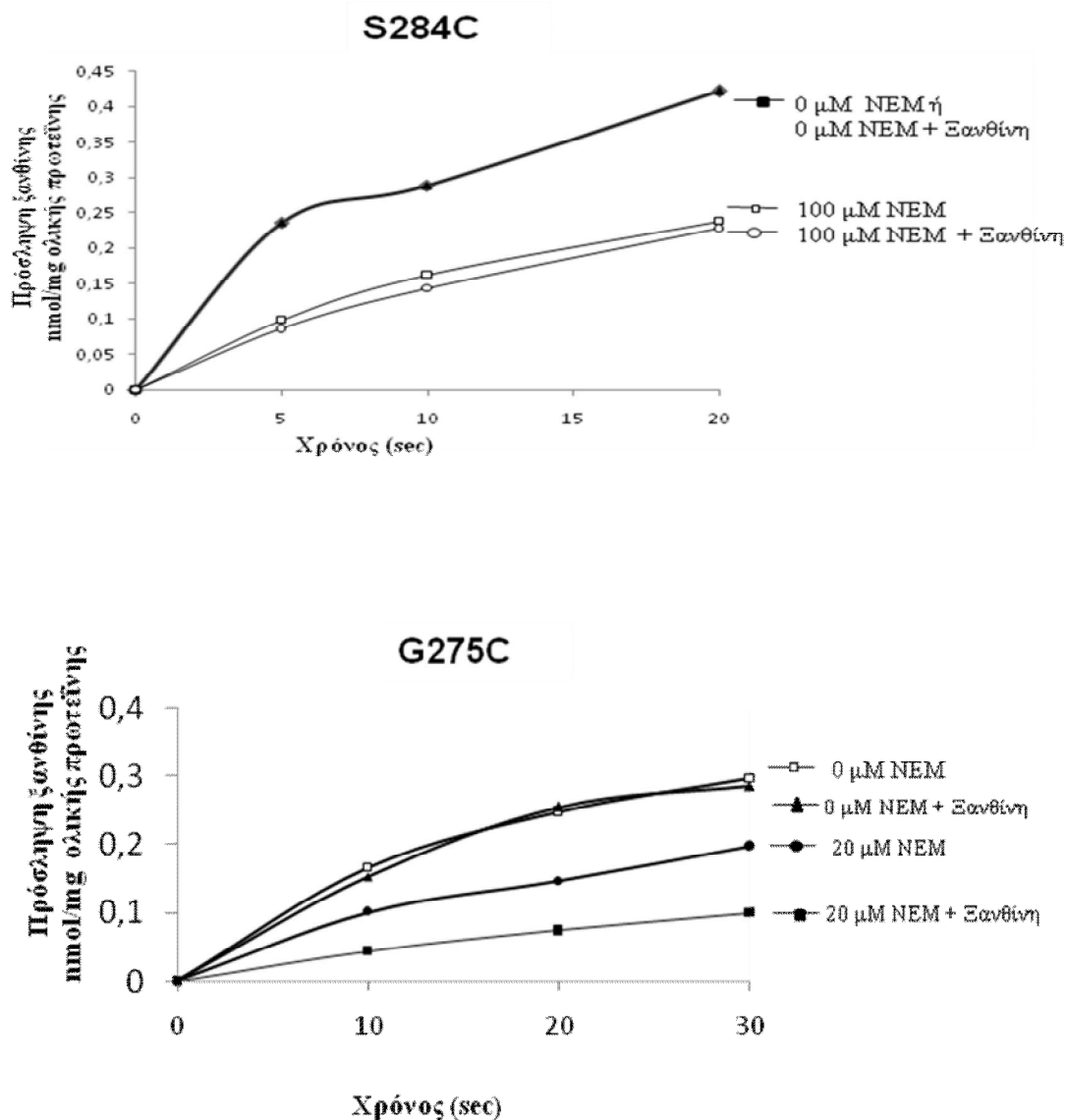
Εικόνα 3.44 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των μεταλλαγμάτων D276E, D276N, και I277L του YgfO(wt)-BAD. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από *E. coli* T184 μετασηματισμένα με pT7-5/ygfO(wt)-BAD και με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις καταλοίπων, που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών. Τα δείγματα μεμβρανών (100 µg πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP), σε αρραίωση 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). Ποσοτική ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων έγινε με το πρόγραμμα Quantity-one (BioRad).



Εικόνα 3.45 Επίπεδα ενεργότητας των μεταλλαγμάτων D276E, D276N, και I277L του YgfO(wt)-BAD. Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με pT7-5/ygfO(wt)-BAD και με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις καταλοίπων, που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των περμεασών, υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 µM), στους 25 °C. Η αρχική ταχύτητα (V_0) μετρήθηκε σε 10-30 sec και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 1-10 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 εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της YgfO(wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα.



Εικόνα 3.46 Επίδραση του NEM στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων A273C, G275C και S284C του YgfO(C-less)-BAD. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα αντίστοιχα μεταλλάγματα (βλ. και Εικόνες 3.41 και 3.42) υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM), μετά από προεπάωση με 1 μM – 2 mM NEM, όπως φαίνεται στο διάγραμμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.1). Μετρήθηκαν οι αρχικές ταχύτητες σε χρόνους 5-20 sec και οι τιμές προσαρμόστηκαν στις κατάλληλες εξισώσεις για να υπολογισθούν οι συγκεντρώσεις NEM που προκαλούν 50% αναστολή ενεργότητας (IC₅₀), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *Prism4*.



Εικόνα 3.47 Επίδραση υποστρώματος (ξανθίνη) στην αναστολή της ενεργότητας από το NEM των μεταλλάξεων G275C και S284C του YgfO(C-less)-BAD. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα αντίστοιχα μεταλλάγματα (βλ. και Εικόνες 3.41 και 3.42) υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM), μετά από προεπάση με 20 μM NEM (G275C) ή 100 μM NEM (S284C), παρουσία ή απουσία ξανθίνης (1 mM), και έκπλυση της περίσσειας υποστρώματος και αντιδραστηρίων, με φυγοκέντρηση, μετά τον τερματισμό της αντίδρασης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, εδάφιο 2.6.1). Παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονικής προόδου της πρόσληψης [³H]ξανθίνης για τις αντίστοιχες συνθήκες προεπάσης που φαίνονται στα δεξιά των διαγραμμάτων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Γενική τοπολογική οργάνωση του μεταφορέα YgfO (XanQ)

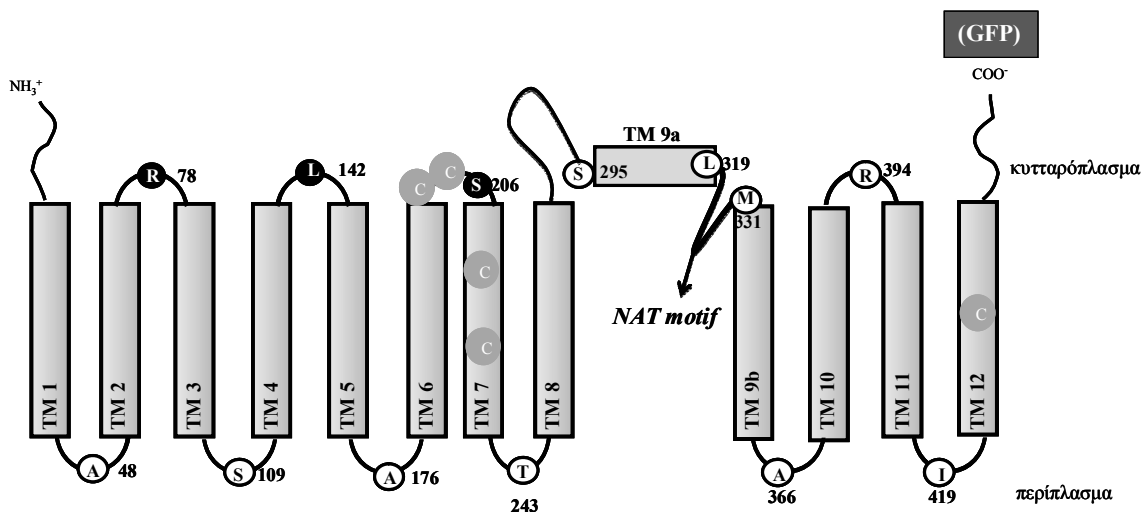
Πολλές πειραματικές αναλύσεις της τοπολογίας των διαμεμβρανικών μεταφορέων έχουν στηριχθεί σε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης σε κορυφαίες θέσεις των υδρόφιλων συνδετικών τμημάτων (loops) και έλεγχο της προσβασιμότητας των κυστεϊνών που εισάγονται σε υδρόφιλα αντιδραστήρια που δεν διαπερνούν τη μεμβράνη (substituted cysteine accessibility method, SCAM). Τα αποτελέσματα από τέτοιες μελέτες συνήθως δίνουν μια γενική εικόνα του κατά πόσον ένα μοντέλο θεωρητικής πρόβλεψης για τη σειρά των συνδετικών τμημάτων που βρίσκονται εναλλάξ από την μία και από την άλλη πλευρά της μεμβράνης επαληθεύεται ή όχι, καθώς και για το αν επαληθεύεται η πρόβλεψη για τον συνολικό αριθμό διαμεμβρανικών τμημάτων π.χ. αν είναι 10 ή 11, 12 ή 13 (Yan and Maloney, 1993; Loo and Clarke, 1995; Jung *et al.*, 1998; van Geest and Lolkema, 2000; Ding and Wilson, 2001; Culham *et al.*, 2003; Cao and Matherly, 2004; Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Nanatani *et al.*, 2009). Ωστόσο, η πειραματική αυτή επαλήθευση έχει συχνά δυσκολίες, κυρίως γιατί η πρόσβαση και αντιδραστικότητα του υδρόφιλου SH-αντιδραστηρίου μπορεί να επηρεάζεται ισχυρά από την τοπική δευτεροταγή δομή, π.χ. σε εκτενείς υδρόφιλες συνδετικές περιοχές, ή από περιοχές με ιδιαίτερη τοπολογική διευθέτηση, όπως αλληλουχίες στην περιοχή του ενεργού κέντρου (το ενεργό κέντρο έχει πρόσβαση στο υπόστρωμα μέσω μιας κεντρικής υδρόφιλης κοιλότητας που σχηματίζεται μέσα στη μεμβράνη).

Στο εργαστήριό μας, έχοντας στα χέρια μας τα κατάλληλα μοριακά εργαλεία από την μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στον μεταφορέα YgfO (Καρατζά, 2006), επιχειρήσαμε καταρχήν να εφαρμόσουμε την ανάλυση SCAM για να εξετάσουμε τη γενική τοπολογική οργάνωση του μεταφορέα αυτού: πρόκειται για την πρώτη μελέτη ενός μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2 σε αυτό το επίπεδο, που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς οι αλγόριθμοι πρόβλεψης τοπολογίας στην περιοχή κυρίως του μοτίβου-υπογραφή NAT (Karatzas *et al.*, 2006; Koukaki *et al.*, 2005) δίνουν αντικρουόμενες προβλέψεις. Τα πειράματα SCAM έγιναν με το ειδικό υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻, που θεωρείται από τα πιο ενδεδειγμένα αφού έχει δειχθεί με πειράματα σε σφαιροπλάστες (Kwaw *et al.*, 2001) και σε κυστίδια (Kaback *et al.*, 2007), ότι δεν διαπερνά τη βακτηριακή μεμβράνη. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η εναλλαγή προσβασιμότητας των συνδετικών περιοχών μεταξύ των πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων (TM) 1 έως 8 ακολουθεί την πρόβλεψη που δίνουν σε γενικές γραμμές όλοι οι διαθέσιμοι αλγόριθμοι, και κυρίως ο TMHMM που χρησιμοποιήθηκε για ένα πρώτο μοντέλο

αναφοράς (Εικόνα 4.1). Ωστόσο, στην C-τελική περιοχή, δηλ. από το TM8 έως και το TM12, όλες οι θέσεις που ελέγχθηκαν εμφανίζονται προσβάσιμες από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον, αντίθετα με τα αναμενόμενα. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται σε δεδομένα που δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε αυτή τη στιγμή, όπως πιθανόν στην ύπαρξη αμφιπαθικών περιοχών που δεν είναι διαμεμβρανικές, δηλ. δεν διατρέχουν ολόκληρη τη μεμβράνη, και/ή επανεισερχόμενων συνδετικών τμημάτων (reentrant loops), τα οποία διαμορφώνουν διαφορετικά την τοπολογία του μεταφορέα YgfO στο C-τελικό τμήμα. Η πιθανότητα ύπαρξης πολλών συνδετικών περιοχών που δεν είναι σε διαμόρφωση α-έλικας ενισχύεται από τα ευρήματά μας στα φάσματα CD του απομονωμένου YgfO (εδάφιο 3.1.2) που δείχνουν σχετικά χαμηλό συνολικό ποσοστό α-έλικας (41%) ενώ το τρέχον μοντέλο τοπολογίας (Εικόνα 4.1) προβλέπει άνω του 60% των περιοχών αλληλουχίας ως διαμεμβρανικές α-έλικες. Άλλοι πρωτονιο-εξαρτώμενοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς που έχουν μια πιο συμπαγή δομή α-ελίκων χωρίς μεγάλες συνδετικές περιοχές ή reentrant loops, όπως η περμεάση λακτόζης LacY (Abramson *et al.*, 2003) δίνουν πολύ πιο υψηλά ποσοστά α-έλικας σε φασματοσκοπία CD, π.χ. η περμεάση LacY δίνει 85% (Foster *et al.*, 1983). Άλλωστε, μία σημαντική περιοχή του YgfO, αμέσως πριν από το ένατο πιθανά διαμεμβρανικό τμήμα (TM9b), που αντιστοιχεί στην συντηρημένη αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή NAT (κατάλοιπα 323-333), έχει πράγματι υποθεθεί ότι αποτελεί επανεισερχόμενη θηλειά (reentrant loop) (Papageorgiou *et al.*, 2008; Karatza *et al.*, 2006) και φαίνεται να εμπλέκεται ενεργά στον μηχανισμό της δέσμευσης και μεταφοράς υποστρώματος και στον καθορισμό της εξειδίκευσης τόσο στον YgfO (Karatza *et al.*, 2006) όσο και στον ομόλογο μεταφορέα UapA του *Aspergillus nidulans* (Koukaki *et al.*, 2005).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε πιο αναλυτικά την προσβασιμότητα των θέσεων κυστεϊνών στα μεταλλάγματα του μοτίβου-υπογραφή NAT, που είναι και η πιο ενδιαφέρουσα, λόγω των παραπάνω στοιχείων, και είδαμε ότι, πράγματι, πολλά κατάλοιπα της αλληλουχίας αυτής είναι προσβάσιμα από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον. Σε συνδυασμό με τα δεδομένα μας για την επίδραση υποστρώματος και την λειτουργική επίπτωση της αλκυλίωσης των κυστεϊνών στα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης, καθώς και από την εκτενή μεταλλαξιγένεση της όλης περιοχής μεταξύ των πιθανών TM8 και TM9a-b, καταλήγουμε πράγματι σε ένα πιο λεπτομερές, αναθεωρημένο μοντέλο που θεωρεί ότι το μοτίβο-υπογραφή στον YgfO σχηματίζει πράγματι μια επανεισερχόμενη θηλειά μεταξύ δύο αμφιπαθικών ελίκων (TM9a και TM9b) (Εικόνα 4.3, παρακάτω).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, εφόσον επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες ότι η τοπολογία του YgfO στο C-τελικό τρίτο του μορίου (TM8-12) δεν είναι σαφής αλλά περιέχει εκτεταμένες περιοχές με σχετικά υδρόφιλα συνδετικά τμήματα και διακοπτόμενες περιοχές αμιφιπαθικών α-ελίκων, τότε ο μεταφορέας YgfO, και όλη η οικογένεια των ομολόγων του (NAT/NCS2 family) θα πρέπει να καταταχθεί στην ομάδα των διαμεμβρανικών μεταφορέων με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, για τους οποίους σαφής συνολική εικόνα της τοπολογικής οργάνωσης και της δευτεροταγούς δομής δεν δόθηκε παρά μόνον μετά τις αναλύσεις των κρυσταλλικών δομών σε υψηλή ευκρίνεια ανάλυσης (εδάφιο 1.2). Χαρακτηριστικές τέτοιες περιπτώσεις περίπλοκης τοπολογίας διαμεμβρανικών μεταφορέων είναι του LeuT_{Aa}, ομολόγου της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών:Na⁺ από το θερμοφιλο βακτήριο *Aquifex aeolicus* (Yamashita *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007, 2008) και του Glt_{Ph}, ομολόγου των μεταφορέων γλουταμικού του ΚΝΣ (EAAT1-5) από το υπερθερμοφιλο αρχαίο *Pyrococcus horikoshii* (Yernool *et al.*, 2004). Από τα παραπάνω, είναι σαφές ότι για την διαλεύκανση της τοπολογίας του YgfO και των ομολόγων του θα απαιτηθούν και άλλες βιοχημικές μελέτες, όπως μελέτες SCAM σε κυστίδια ανεστραμμένου προσανατολισμού (inside-out membrane vesicles) ή μελέτες με στρατηγικές γονιδιακής σύντηξης με αλκαλική φωσφατάση και β-γαλακτοσιδάση (εδάφιο 1.5), ενώ καταλυτική θα είναι η συνεισφορά από την πιθανή επιτυχία κρυσταλλογραφικής ανάλυσης του απομονωμένου YgfO, που βρίσκεται σε εξέλιξη στο συνεργαζόμενο εργαστήριο του H. Ronald Kaback (UCLA) (Stroud *et al.*, 2009).



Εικόνα 4.1. Γενικό τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα YgfO (XanQ). Κατάλοιπα προσβάσιμα από το περίπλασμα φαίνονται σε κύκλους με λευκό φόντο και τα μη προσβάσιμα σε κύκλους με σκούρο φόντο.

4.2 Τοπολογική-λειτουργική οργάνωση του μοτίβου-υπογραφή

Η υψηλά συντηρημένη αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή της οικογένειας NAT βρίσκεται μεταξύ των TM9a (αμφιπαθική περιοχή αμφιλεγόμενης τοπολογίας στον YgfO) και TM9b (ένατο διαμεμβρανικό τμήμα α-έλικας κατά το πρόγραμμα TMHMM και τους περισσότερους αλγορίθμους πρόβλεψης για όλους τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς NAT) (Εικόνα 4.1). Η 10πεπτιδική αυτή περιοχή αυτή αλληλουχίας φαίνεται να σχηματίζει μια ανοιχτή διαμόρφωση, πιθανόν β-στροφή, από *in silico* αναλύσεις (Koukaki *et al.*, 2005), ενώ, από πειράματα μεταλλαξιγένεσης στον YgfO (Karatzas *et al.*, 2006), φαίνεται ότι το C-τελικό άκρο αυτής της αλληλουχίας-μοτίβου αποτελεί και την αρχή μιας αμοφοπαθικής α-έλικας, πιθανότατα της TM9b (Εικόνα 4.1), η μία όψη της οποίας είναι πολύ σημαντική στον μηχανισμό αναγνώρισης πουρινών (Karatzas *et al.*, 2006; Karena and Frillingos, 2009). Η αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή είχε αρχικά συνδεθεί με τον καθορισμό της εξειδίκευσης μεταφοράς πουρινών από πειράματα ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών μεταξύ UapA και UapC στον ασκομύκητα *A. nidulans* (εδάφιο 1.3.3), τα οποία έδειξαν ότι εμπλέκεται η συνολική συνδετική περιοχή μεταξύ των πιθανών διαμεμβρανικών ελίκων TM8 και TM9 (TM9b, στην Εικόνα 4.1), μέσα στην οποία εντοπίστηκε η πολύ υψηλά συντηρημένη περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (Diallinas *et al.*, 1998). Στη συνέχεια, μεταλλαξιγένεση των πιο συντηρημένων καταλοίπων του μοτίβου έδειξε ότι τουλάχιστον ένα (Gln-408/Gln-324) θα πρέπει να εμπλέκεται, άμεσα ή έμμεσα, με το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος, τόσο στον UapA (Koukaki *et al.*, 2005) όσο και στον YgfO (Karatzas *et al.*, 2006), ενώ δύο άλλα (Thr-416/Thr-332 και Arg-417/Gly-333) είναι σημαντικοί καθοριστές της εξειδίκευσης. Η προτεινόμενη συναινετική αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή είναι η ⁴⁰⁸(Q/E/P)NXGXXXXT(K/R/G)⁴¹⁷ (αρίθμηση σύμφωνα με τον UapA) (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001) ενώ, από τα πειράματα στον YgfO που δείχνουν τη σημασία ενός ακόμη σημαντικού καταλοίπου, στο N-τελικό άκρο αυτής της αλληλουχίας [Ala-323; Karatzas *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα], έχει προταθεί επέκταση της συναινετικής αλληλουχίας του μοτίβου σε ³²³(AG//S)(Q/E/P)NXGXXXXT(G/R/K)³³³ (αρίθμηση σύμφωνα με τον YgfO) (Karena and Frillingos, 2009). Στην παρούσα διατριβή, εξετάσαμε την προσβασιμότητα και λειτουργική ευαισθησία της περιοχής των 11 αυτών καταλοίπων του YgfO (Ala-323 έως Gly-333) στο υδρόφιλο SH-αντιδραστήριο MTSES⁻, χρησιμοποιώντας τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης που ήδη υπήρχαν στο εργαστήριο (Καρατζά, 2005, Γεωργοπούλου Αικ., διπλωματική πτυχιακή

εργασία-2005). Αν και, όπως προκύπτει από το πρόγραμμα TMHMM και άλλους αλγόριθμους, το μοτίβο-υπογραφή των περισσότερων χαρακτηρισμένων μεταφορέων NAT τοποθετείται τοπολογικά σε ενδοκυτταρική συνδετική περιοχή (Εικόνα 4.1), θέλαμε να εξετάσουμε κατά πόσον τα σημαντικά κατάλοιπα του μοτίβου μπορούν να προσεγγιστούν με αντιδραστήρια από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον, πράγμα που θα σήμαινε ότι το τοπολογικό μοντέλο θα πρέπει να αναθεωρηθεί ριζικά στην περιοχή αυτή.

Το μοτίβο-υπογραφή είναι προσβάσιμο από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον

Από τα πειράματα ανάλυσης SCAM σε μεμβρανικά κυστίδια, φαίνεται ότι τα περισσότερα αν όχι όλα τα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή είναι προσβάσιμα στο MTSES⁻ από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Συγχρόνως, ακόμη και θέσεις καταλοίπων που δεν είχαν δείξει να επηρεάζονται λειτουργικά από το NEM, όπως τα Gln-330 και Met-331 (Karatza *et al.*, 2006), εμφανίζουν πολύ μεγάλη προσβασιμότητα και αντιδραστικότητα με το MTSES⁻. Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι σχετικά μικρότερο βαθμό προσβασιμότητας εμφανίζουν τα μεταλλάγματα N325C και N326C, τα οποία έχουν δείξει ότι είναι πολύ ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το NEM (Karatza *et al.*, 2006). Αυτές οι παρατηρήσεις, που ενισχύονται ακόμη περισσότερο από την ανάλυση της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το MTSES⁻ (βλ. παρακάτω), δείχνουν ότι ο βαθμός αλκυλίωσης από τα SH-αντιδραστήρια δεν ακολουθεί τον βαθμό ευαισθησίας των θέσεων αυτών σε λειτουργική απενεργοποίηση: όπως έχει τονισθεί και στην περίπτωση του NEM (Karatza *et al.*, 2006), αυτό το γεγονός αναδεικνύει περισσότερο την λειτουργική σημασία των θέσεων κυστεϊνών που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση ακόμα και με μικρή σχετικά έκταση αλκυλίωσής τους από τα SH-αντιδραστήρια (βλ. παρακάτω). Συνολικά, πάντως, η ανάλυση προσβασιμότητας δείχνει καταρχήν ότι το μοτίβο-υπογραφή είναι προσβάσιμο από το περίπλασμα, δηλ. την αντίθετη πλευρά από αυτήν όπου τοποθετείται τοπολογικά, υποδεικνύοντας ότι η τοπολογία στην περιοχή αυτή θα πρέπει να είναι διαφορετική.

Η απενεργοποίηση από το MTSES⁻ υπενθυμίζει την περιοδικότητα ευαισθησίας στο NEM

Εφόσον τα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή είναι προσβάσιμα από το MTSES⁻ θελήσαμε να εξετάσουμε αν αυτή η τροποποίηση των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης του

μοτίβου μπορεί να επηρεάζει και την ενεργότητά τους, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες (50 μM και 0.2 mM MTSES⁻) και το ίδιο σύστημα ανάλυσης (των μεμβρανικών κυστιδίων RSO). Είδαμε, πράγματι, ότι τα μεταλλάγματα A323C, G327C, V328C και G333C είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το MTSES⁻ ενώ τα Q330C και M331C δεν αναστέλλονται καθόλου, σε συνθήκες όπου η προσβασιμότητα στο αντιδραστήριο αυτό είναι πλήρης (0.2 mM). Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί γενικά με τα δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις ευαισθησίας σε αλκυλίωση με το NEM, που είχαν γίνει σε ακέραια κύτταρα *in vivo* (Karatza *et al.*, 2006), κατά τις οποίες και πάλι όλα τα μεταλλάγματα της περιοχής αυτής είναι προσβάσιμα αλλά μόνον τα A323C, G327C, V328C, I329C, T332C και G333C αναστέλλονται σε σημαντικό βαθμό, υπό τις ίδιες συνθήκες. Φαίνεται, επίσης, καθαρά ότι η περιοδικότητα στην απενεργοποίηση από το MTSES⁻ είναι όμοια με αυτήν της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το NEM (Karatza *et al.*, 2006) και επιβεβαιώνεται και εδώ ότι υπάρχουν δύο διακριτές περιοχές, μία στην αρχή του μοτίβου με όλα ουσιαστικά τα κατάλοιπα να είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση (αλληλουχία 323-329) και μία, στη συνέχεια, όπου η ευαισθησία σε απενεργοποίηση εμφανίζει περιοδικότητα α-έλικας (αλληλουχία 329-339). Οι ενδείξεις από την εφαρμογή της φασματοσκοπίας EPR με SDSL στα απομονωμένα μεταλλάγματα Q324C και R337C (εδάφιο 3.1.4) είναι επίσης συμβατές με αυτήν την υπόθεση, αφού το Q324C δείχνει μεγάλη κινητικότητα του σπιν στη θέση Cys-324, όπως περιμένουμε από μια περιοχή πιο ελεύθερης διαμόρφωσης και το R337C δείχνει μικρή κινητικότητα του σπιν, όπως περιμένουμε από μια περισσότερο δομημένη περιοχή, της α-έλικας (Hubbell *et al.*, 2000).

Συνδυαστικά, το εύρημα ότι όλα τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης του μοτίβου, τόσο αυτά που αναστέλλονται όσο και αυτά που δεν αναστέλλονται από τα SH-αντιδραστήρια (NEM και MTSES⁻), είναι προσβάσιμα, δείχνει ότι η επιλεκτική ευαισθησία ορισμένων θέσεων σε απενεργοποίηση οφείλεται σε εμπλοκή του SH-αντιδραστηρίου με παρεμπόδιση του μηχανισμού της μεταφοράς ξανθίνης. Η πιο απλή ερμηνεία είναι ότι αυτά τα κατάλοιπα έχουν συμμετοχή στις αλλαγές διαμόρφωσης του μορίου που συμβαίνουν κατά τη μεταφορά υποστρώματος και η ομοιοπολική σύνδεση του ειδικού -SH αντιδραστηρίου (NEM ή MTSES⁻) στις θέσεις αυτές εμποδίζει στερεοχημικά τις αλληλεπιδράσεις που είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση του κύκλου λειτουργίας. Κατάλοιπα που είναι ευαίσθητα στην αναστολή από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια, έχειδειχθεί, σε άλλους μεταφορείς, ότι συνήθως βρίσκονται σε πλευρές διαμεμβρανικών ελίκων ή άλλες αλληλουχίες που εμπλέκονται με τις αλλαγές

διαμόρφωσης και συνδιαμορφώνουν το μονοπάτι μεταφοράς του υποστρώματος, όπως στην περίπτωση της περμεάσης λακτόζης LacY (Frillingos *et al.*, 1998; Kaback *et al.*, 2007) ή της ομόλογης περμεάσης μελιβιόζης MelY (Tavoulari and Frillingos, 2008) και του αντιμεταφορέα τετρακυκλίνης: H^+ TetA (Tamura *et al.*, 2001). Κατ' αναλογία, στην περίπτωση του μεταφορέα YgfO, μπορεί να προταθεί ότι μέρος του μονοπατιού δέσμευσης-μεταφοράς ξανθίνης διαμορφώνεται από κατάλοιπα ευαίσθητα σε αλκυλίωση που ανήκουν στην περιοχή των θέσεων του μοτίβου και στην μια πλευρά της αμφιπαθικής έλικας TM9b.

Η δέσμευση υποστρώματος (ξανθίνης) προστατεύει τη θέση N325 από αλκυλίωση

Παράλληλα, έγινε σύγκριση της προσβασιμότητας των καταλοίπων του μοτίβου προς το αντιδραστήριο MTSES⁻ απουσία και παρουσία κορεσμού του κέντρου δέσμευσης με υπόστρωμα (ξανθίνη, 1 mM). Αν και βρέθηκε ότι στις περισσότερες θέσεις καταλοίπων του μοτίβου η επίδραση του υποστρώματος είναι μικρή, δηλ. δεν εμφανίζεται σημαντική διαφορά στη προσβασιμότητα, η δέσμευση υποστρώματος φαίνεται να προστατεύει πλήρως την θέση N325C από αλκυλίωση με MTSES⁻ (εδάφιο 3.3): αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι η Asn-325 βρίσκεται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης και το υπόστρωμα παρεμποδίζει στερεοχημικά δηλ. αποκλείει την πρόσβαση του αντιδραστηρίου, είτε ότι η δέσμευση υποστρώματος προκαλεί μετατόπιση της Cys-325 (N325C) προς λιγότερο υδρόφιλο περιβάλλον δηλ. επηρεάζει έμμεσα την διαμόρφωση της περιοχής αυτής με αποτέλεσμα να «κρύβεται» από το αντιδραστήριο η θέση Asn-325. Από τις δύο ερμηνείες, η πρώτη φαίνεται επικρατέστερη, για τους εξής λόγους: **(α)** το γειτονικό κατάλοιπο Gln-324 έχειδειχθεί ότι είναι πολύ σημαντικό (αναντικατάστατο) για να μπορεί να δεσμεύεται η ξανθίνη ή οποιοδήποτε από τα ανάλογά της με υψηλή συγγένεια (Karatza *et al.*, 2006), ενώ το αντίστοιχο κατάλοιπο στον UapA (Gln408) έχει προταθεί ότι συμμετέχει απευθείας σε δέσμευση με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της πουρίνης (Koukaki *et al.*, 2005), **(β)** το ίδιο το Asn-325 είναι αναντικατάστατο για τον μηχανισμό λειτουργίας, αν και δεν είχε έως τώρα προταθεί με ποιο τρόπο (Karatza *et al.*, 2006): πρόσφατα, ανεξάρτητα πειράματα ανάλυσης σήμανσης σε κυστίδια, στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η δέσμευση υποστρώματος προστατεύει επίσης το N325C από αλκυλίωση με NEM, δηλ. με ένα διαφορετικό SH-αντιδραστήριο (Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή), **(γ)** συγκεκριμένα κατάλοιπα στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή επηρεάζουν με συγκεκριμένο τρόπο, όταν αντικατασταθούν, το προφίλ

εξειδίκευσης, ιδιαίτερα αυτά που αποτελούν την NEM-ευαίσθητη όψη της έλικας TM9b, Thr-332, Gly-333 (Karatza et al., 2006), Ser-336 και Val-339 (Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή), (δ) σε θέσεις γειτονικές του Asn-325 και γενικότερα σε άλλες θέσεις του μοτίβου εμφανίζονται πολύ μικρές μεταβολές στην προσβασιμότητα παρουσία υποστρώματος, είτε στο MTSES⁻ (παρούσα διατριβή) είτε στο NEM (Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή), αντίθετα με ό,τι θα περίμενε κανείς για μια περιοχή με έντονες αλλαγές διαμόρφωσης κατά τον μηχανισμό λειτουργίας: τέτοιες περιοχές βρίσκονται συνήθως μακρύτερα και όχι στην άμεση γειτονία του κέντρου δέσμευσης, όπως έχουν δείξει οι μελέτες σε άλλους μεταφορείς (Kaback *et al.*, 2007).

Από τις άλλες θέσεις καταλοίπων που εξετάστηκαν, σε περιορισμένο βαθμό φαίνεται επίσης να προστατεύεται η Cys-326 (N326C), ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες θέσεις έχουν σχεδόν 100% προσβασιμότητα, στις συνθήκες που εφαρμόσαμε, και δεν θα μπορούσαν να φανούν πιθανές περιπτώσεις *αύξησης* της προσβασιμότητας παρουσία του υποστρώματος (Ala-323, Gly-327, Gln-330). Μία από αυτές τις θέσεις (A323C) έχει δειχθεί από μελέτες με το NEM ότι αυξάνει την ευαισθησία της σε *απενεργοποίηση* παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνη), δηλ. πιθανόν να μετατοπίζεται σε περιβάλλον που μπορεί να αντιδρά ταχύτερα ή να παρεμποδίζει σε μεγαλύτερο βαθμό τον μηχανισμό λειτουργίας λόγω προσέγγισης με άλλες ενεργές περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου (Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή). Τέτοιες μικρές αλλά σημαντικές *αυξήσεις* στην ευαισθησία αναστολής (IC₅₀ από 34 σε 14 μM, στην περίπτωση του A323C) έχουν καταγραφεί και σε άλλους μεταφορείς για θέσεις καταλοίπων που βρίσκονται πολύ κοντά στη θέση δέσμευσης υποστρώματος αλλά, πιθανόν, προσανατολισμένα με διαφορετικό τρόπο ώστε να μην εμποδίζεται στεροχημικά η σύνδεση με το SH-αντιδραστήριο (Frillingos and Kaback, 1997; Tamura *et al.*, 2001; Kaback *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2009).

Συνοπτικά, τα ευρήματα για το μοτίβο-υπογραφή του μεταφορέα YgfO ότι, αφενός, είναι προσβάσιμο από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον αν και προβλέπεται να εντοπίζεται προς την κυτταροπλασματική πλευρά, αφετέρου, περιλαμβάνει θέσεις καταλοίπων ευαίσθητες σε απενεργοποίηση και με τα δύο αντιδραστήρια που έχουν εξετασθεί (MTSES⁻, NEM) και μία τουλάχιστον θέση (Asn-325) που μπορεί να προστατεύεται πλήρως από αλκυλίωση παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνη), συγκλίνουν προς το συμπέρασμα ότι όλη αυτή η περιοχή εντοπίζεται πιθανόν στην υδρόφιλη κοιλότητα του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος (βλ. και Εικόνα 4.3). Το παραπάνω ενισχύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι η προσβασιμότητα των περισσότερων καταλοίπων παραμένει σε υψηλά επίπεδα ανεξάρτητα από την παρουσία του

υποστρώματος. Αυτό συμβαίνει, λόγω του ότι η αλλαγή διαμόρφωσης που υφίσταται η περιοχή αυτή είναι η ελάχιστη δυνατή κατά τη δέσμευση του υποστρώματος (ξανθίνη) με αποτέλεσμα να μην αλλάζει το μικροπεριβάλλον των καταλοίπων που την απαρτίζουν, φαινόμενο που είναι κοινά αποδεκτό και έχει παρατηρηθεί και σε άλλους μεταφορείς όπως ο hSERT (Forrest *et al.*, 2008) και η LacY (Kaback *et al.*, 2007). Ένα τέτοιο συμπέρασμα έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα μέχρι τώρα δεδομένα για το μοτίβο-υπογραφή, που υποστηρίζουν τον καθοριστικό ρόλο του στη δέσμευση, αναγνώριση και μεταφορά υποστρώματος από τον YgfO (Karatza *et al.*, 2006; Karena and Frillingos, 2009; Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή) καθώς και από τον ομόλογο μεταφορέα από τον ασκομύκητα *A. nidulans*, UapA (Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Gournas *et al.*, 2008).

4.3 Ρόλος της περιοχής ανοδικά του μοτίβου (μεταξύ TM8 και TM9a-b)

Η αρχική συσχέτιση της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή NAT με τον καθορισμό της εξειδίκευσης των μεταφορέων NAT/NCS2 είχε προέλθει από πειράματα ανάλυσης χιμαιρικών πρωτεϊνών του ασκομύκητα *A. nidulans*, που έδειξαν ότι εμπλέκεται η συνολική συνδετική περιοχή μεταξύ των πιθανών διαμεμβρανικών ελίκων TM8 και TM9 (TM9b, στην Εικόνα 4.1) και όχι μόνο η συντηρημένη περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (Diallinas *et al.*, 1998). Η συνολική αυτή περιοχή αλληλουχίας, στον μεταφορέα YgfO (κατάλοιπα 266-340), περιλαμβάνει το κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8, μια εκτενή υδρόφιλη συνδετική περιοχή που διακόπτεται από μια αμφιπαθική α-έλικα η οποία προβλέπεται ως διαμεμβρανική από ορισμένα μοντέλα τοπολογίας και ονομάστηκε TM9a (Karena and Frillingos, 2009), μια περιοχή πιθανής στροφής που αντιστοιχεί στην αρχή του μοτίβου-υπογραφή (323-329) και μια περιοχή α-έλικας (329-339) με την οποία αρχίζει το επόμενο πιθανό διαμεμβρανικό τμήμα, που ονομάστηκε TM9b (Karena and Frillingos, 2009) (Εικόνα 4.1). Θεωρήσαμε ότι η εξέταση του ρόλου της ευρύτερης αυτής περιοχής, με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και σημειακή μεταλλαξιγένεση, θα έδινε σημαντικά επιπλέον στοιχεία για την ανάδειξη της σημασίας του μοτίβου-υπογραφή NAT στον μεταφορέα YgfO και, βάσει των αρχικών πειραμάτων με τις χίμαιρες UapA/UapC (Diallinas *et al.*, 1998), θα αποκάλυπτε πιθανές νέες θέσεις καταλοίπων με ειδική σημασία στον καθορισμό της εξειδίκευσης. Εξάλλου, νεώτερα αποτελέσματα από ανεξάρτητες μελέτες του εργαστηρίου μας είχαν δείξει ότι η ίδια ευρύτερη περιοχή περιέχει και δύο ακόμη αναντικατάστατα κατάλοιπα, τα Glu-272 και Asp-304 (Karena and Frillingos, 2009), τα οποία μάλιστα βρίσκονται σε θέσεις απόλυτης ή πολύ υψηλής συντήρησης μεταξύ των μεταφορέων NAT (εδάφιο 3.4) ενώ ένας πολύ σημαντικός ρόλος στην πρόσληψη υποστρώματος (ουρικού οξέος και ξανθίνης) φαίνεται να διατηρείται και στα αντίστοιχα κατάλοιπα του μεταφορέα UapA, Glu-356 και Asp-388 (Papageorgiou *et al.*, 2008).

Από την προηγούμενη μελέτη του μοτίβου NAT (Karatza *et al.*, 2006), είχαν ήδη εξετασθεί με μεταλλαξιγένεση όλα τα κατάλοιπα της περιοχής 315-340. Για την παρούσα μελέτη, τα αρχικά πειράματα μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης έγιναν στην περιοχή της αλληλουχίας 266-314, από τον Αλέξανδρο Καλλή, στο εργαστήριό μας, στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής του εργασίας Ειδίκευσης (ΜΔΕ) (2009). Τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα έδειξαν ότι η ευρύτερη περιοχή πριν το μοτίβο περιλαμβάνει δύο κυρίως σημαντικές υποπεριοχές, όπου συγκεντρώνονται τα σημαντικά κατάλοιπα. Η μία από αυτές

(περιοχή I) είναι της αλληλουχίας ²⁷²**EAVGDITATAMVS**²⁸⁴ και η δεύτερη (περιοχή II) της αλληλουχίας ²⁹⁶**RLKGGVLADG**³⁰⁵. [με έντονα στοιχεία: θέσεις όπου το μετάλλαγμα μοναδικής Cys έχει μηδενική ενεργότητα, μεταξύ των οποίων είναι και οι αναντικατάστατες E272 και D304, με υπογράμμιση: θέσεις όπου το μετάλλαγμα είναι ευαίσθητο σε απενεργοποίηση από το NEM, με έντονα πλάγια στοιχεία και υπογράμμιση: θέσεις όπου το μετάλλαγμα μοναδικής Cys δεν εκφράζεται καθόλου στη μεμβράνη]. Περαιτέρω αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης στην περιοχή II έδειξαν ότι αφενός η Gly-305 επηρεάζει κυρίως την έκφραση ή δομική σταθερότητα του μορίου στη μεμβράνη, αλλά δεν είναι αναντικατάστατη (Καλλής Αλ., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και, αφετέρου, τα μεταλλάγματα των θέσεων Arg-296, Gly-300 και Val-301 έχουν σχετικά χαμηλά επίπεδα ευαισθησίας στο NEM, σε σύγκριση με τα σημαντικά μεταλλάγματα του μοτίβου-υπογραφή (Karatza *et al.*, 2006) ή της έλικας TM12 (N430C) (Parakostas *et al.*, 2008) (Mermelekas *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στη συνέχεια, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, εστιαστήκαμε περισσότερο σε περαιτέρω αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης και ανάλυση της επίδρασης αλκυλίωσης με NEM στην περιοχή I (272-284) που περιλαμβάνει το άκρο της διαμεμβρανικής έλικας TM8 και την αμέσως επόμενη αλληλουχία με την οποία ξεκινά το υδρόφιλο συνδετικό τμήμα πριν το TM9a (Εικόνα 4.1).

Σημαντικά κατάλοιπα στη μία πλευρά α-έλικας του TM8: Asp-276 και Gly-275

Η αλληλουχία της περιοχής καταλοίπων 272-284, αν και δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερα υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των μεταφορέων NAT/NCS2, εμφανίζει απόλυτη συντήρηση πλευρικής ομάδας στις θέσεις Glu-272 (αναντικατάστατο κατάλοιπο στον YgfO και στον UapA) (Karena and Frillingos, 2009) και Gly-275 (που βρίσκεται μία περίπου στροφή α-έλικας μετά το Glu-272, εφόσον θεωρηθεί η συνέχιση της έλικας TM8) (Εικόνα 4.2). Επίσης, αν θεωρήσουμε μόνο τους καλά χαρακτηρισμένους μεταφορείς πουρινών, μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* (YgfO, YicE) και μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης του *A. nidulans* (UapA, UapC, AfUapC, Xut1), οι μεταφορείς αυτοί διατηρούν σχεδόν απόλυτα και την αλληλουχία 276-280, ²⁷⁶**DXTATX**²⁸¹ (Εικόνα 4.2), υποδηλώνοντας ότι αυτά τα κατάλοιπα ίσως να σχετίζονται, έμμεσα ή άμεσα, με την εξειδίκευση, στον μηχανισμό αναγνώρισης πουρινών. Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης και/ή ανάλυσης της αναστολής με NEM για τις θέσεις 273, 275, 276, 277 και 284 (εδάφιο 3.4) μας δείχνουν ότι δύο κατάλοιπα θα πρέπει να είναι πιο σημαντικά: η Gly-275, της οποίας το μετάλλαγμα G275C είναι ενεργό αλλά πολύ ευαίσθητο σε απενεργοποίηση από το

NEM, σε επίπεδα ευαισθησίας που έχουν καταγραφεί και για μεταλλάγματα του μοτίβου (Εικόνα 4.3) (IC_{50} 15 μ M), και το Asp-276, του οποίου η αντικατάσταση με Asn ή Cys οδηγεί σε ανενεργά ή σχεδόν ανενεργά μεταλλάγματα, ενώ μόνο η διατήρηση της καρβοξυλικής ομάδας στη θέση αυτή (D276E) οδηγεί σε διατήρηση πλήρους ενεργότητας. Και τα δύο αυτά κατάλοιπα, μαζί με το επίσης ευαίσθητο σε NEM, Ala-273 και το αναντικατάστατο Glu-272 «βλέπουν» στην ίδια πλευρά α -έλικας του TM8 (Εικόνα 4.2), υποδεικνύοντας ότι το πιθανά διαμεμβρανικό τμήμα TM8 θα πρέπει να επεκταθεί τουλάχιστον κατά μία στροφή α -έλικας από την C-τελική (κυτταροπλασματική) πλευρά του σε σχέση με το προηγούμενο μοντέλο που στηρίζεται μόνο σε αλγόριθμους πρόβλεψης για την περιοχή αυτή (Karena and Frillingos, 2009).

Σε σχέση με τον πιθανό ρόλο του Asp-276, φαίνεται ότι αρκεί να διατηρείται μια καρβοξυλική ομάδα με αρνητικό φορτίο στη θέση αυτή, έστω και με μεγαλύτερο μέγεθος πλευρικής ομάδας (D276E), για να έχουμε πλήρη ενεργότητα του μεταφορέα YgfO. Η παρατήρηση ότι ακόμη και η παρόμοιος όγκου και πολικότητας ασπαραγίνη δίνει ένα μετάλλαγμα με ελάχιστη ενεργότητα στη θέση αυτή (D276N) δείχνει ότι η καρβοξυλική ομάδα στη θέση 276 είναι απαραίτητη για τη λειτουργία. Η καρβοξυλομάδα-276 θα μπορούσε να συμμετέχει στην πρωτονίωση-αποπρωτονίωση του μεταφορέα κατά τον μηχανισμό της συμμεταφοράς H^+ :ξανθίνης, ένα ενδεχόμενο που μπορεί να εξετασθεί περαιτέρω με πειράματα των επιμέρους αντιδράσεων ανταλλαγής ξανθίνης (exchange) και εκροής ξανθίνης (efflux) σε μεμβρανικά κυστίδια (Kaback, 1983; Franko and Brooker, 1994; Frillingos *et al.*, 1998). Επίσης, θα μπορούσε να συμμετέχει σε μια απαραίτητη δομική-λειτουργική αλληλεπίδραση με κάποιο άλλο κατάλοιπο του μεταφορέα αντίθετου φορτίου (Lys, Arg) (γέφυρα άλατος) (Jung *et al.*, 1993; Sorgen *et al.*, 2002; Abramson *et al.*, 2003), ένα ενδεχόμενο που μπορεί να εξετασθεί με μελέτη κατάλληλων διπλών μεταλλαγμάτων σε συνδυασμό με αντικαταστάσεις σε θέσεις Lys ή Arg που βρίσκονται προς την κυτταροπλασματική πλευρά των άλλων διαμεμβρανικών ελίκων (Karena and Frillingos, 2009). Αυτά τα πειράματα για την ανάλυση του ρόλου του Asp-276 είναι σε εξέλιξη στο εργαστήριο.

Σε σχέση με την Gly-275, η απενεργοποίηση που παρατηρήθηκε με αλκυλίωση από NEM στη θέση αυτή (G275C) είναι πολύ πιο έντονη από τις περιπτώσεις των S284C και A273C (1 και 2 τάξεις μεγέθους μικρότερο IC_{50} , αντίστοιχα) και, επιπλέον, γίνεται ακόμη εντονότερη παρουσία υποστρώματος (ξανθίνη). Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η Cys-275 (G275C) βρίσκεται σε ένα περιβάλλον που είναι πολύ ευαίσθητο σε λειτουργική απενεργοποίηση και,

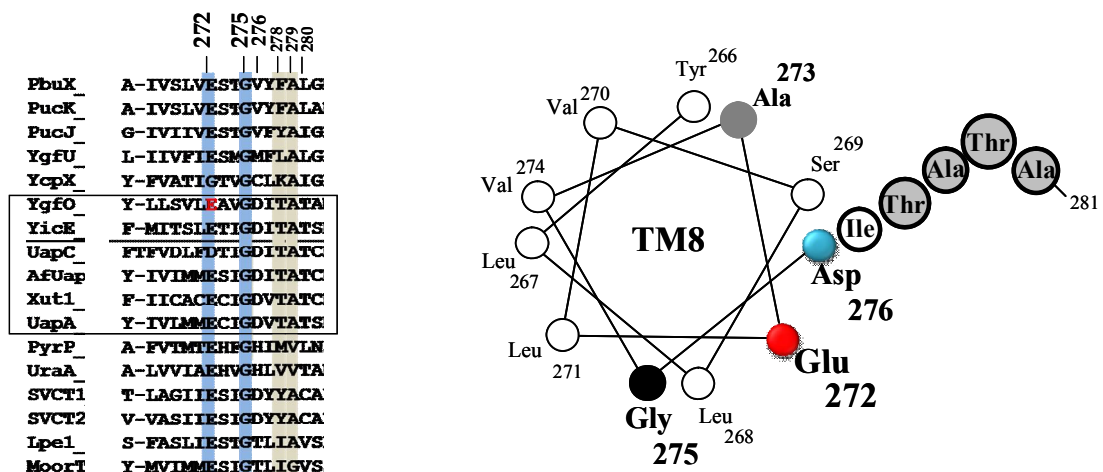
μάλιστα, η ευαισθησία αυξάνεται με τη δέσμευση του υποστρώματος, αντανακλώντας κατά πάσα πιθανότητα μια σημαντική αλλαγή διαμόρφωσης κατά τον μηχανισμό λειτουργίας: η θέση-275 μετατοπίζεται σε περιβάλλον που μπορεί να αντιδρά ταχύτερα ή να παρεμποδίζει σε μεγαλύτερο βαθμό τον μηχανισμό λειτουργίας λόγω προσέγγισης με άλλες ενεργές περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει για την θέση Ala-323 (A323C) (βλ. ανωτέρω) (Georgoroulou *et al.*, υπό συγγραφή) και για την Asp-304 (D304C) (Karena *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα), δύο θέσεις καταλοίπων που επίσης βρίσκονται στην ευρύτερη αυτή περιοχή και πιθανόν να προσεγγίζουν περισσότερο μεταξύ τους στην πραγματική τριτοταγή δομή του μορίου (Εικόνα 4.3).

Σημαντικά κατάλοιπα για την έκφραση-ενεργότητα του YgfO στην αλληλουχία ²⁷⁸TATA²⁸¹

Αμέσως μετά το σημαντικό κατάλοιπο Asp-276 και την Ile-277 (η οποία δεν εξετάστηκε πολύ αναλυτικά, αλλά βρέθηκε ότι η I277C οδηγεί σε σημαντική μείωση της έκφρασης και απώλεια ενεργότητας, ενώ η I277L έχει έκφραση και ενεργότητα όπως η φυσικού τύπου YgfO), υπάρχει μια αλληλουχία 4 καταλοίπων (Thr-Ala-Thr-Ala) στην οποία όλα τα μεταλλάγματα κυστεϊνών (T278C, A279C, T280C, A281C) βρέθηκε ότι δεν εκφράζονται καθόλου στη μεμβράνη. Η αλληλουχία αυτή δεν εμφανίζει γενική συντήρηση στα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2, εμφανίζει όμως απόλυτη σχεδόν συντήρηση στους μεταφορείς ξανθίνης ή ουρικού/ξανθίνης που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα, από την *E. coli* και τον *A. nidulans* (Εικόνα 4.2). Αντικαθιστώντας τα κατάλοιπα Ala (279 και 281) και Thr (278 και 280) με τα περισσότερο συγγενικά αμινοξέα Gly ή Ser (για την Ala), και Ser ή Asn (για την Thr), παρατηρήσαμε ότι η αντικατάσταση των αλανινών με γλυκίνη οδηγεί σε πλήρη έκφραση και ενεργότητα (A279G, A281G), η αντικατάσταση των αλανινών με σερίνη οδηγεί σε πλήρη έκφραση και μειωμένη αλλά σημαντικά υψηλή ενεργότητα (50-80%) (A279S, A281S), η αντικατάσταση των θρεονινών με σερίνη οδηγεί επίσης σε υψηλή έκφραση και πλήρη ενεργότητα (T278S, T280S) και η αντικατάσταση των θρεονινών με ασπαραγίνη οδηγεί σε μερική απώλεια ενεργότητας (50%) (T278N) ή πλήρη σχεδόν απώλεια έκφρασης και ενεργότητας (T280N). Από την άλλη πλευρά, όταν διατηρήσαμε τα 4 κατάλοιπα αλλάζοντας απλώς τη σειρά τους (Ala-Thr-Ala-Thr), είδαμε ότι το τετραπλό αυτό μετάλλαγμα [TATA(278-281)ATAT] διατηρεί υψηλά επίπεδα έκφρασης (30% σε σχέση με τον YgfO φυσικού τύπου) αλλά έχει μηδενική ενεργότητα. Συνολικά, φαίνεται ότι οι πλευρικές ομάδες στην αλληλουχία

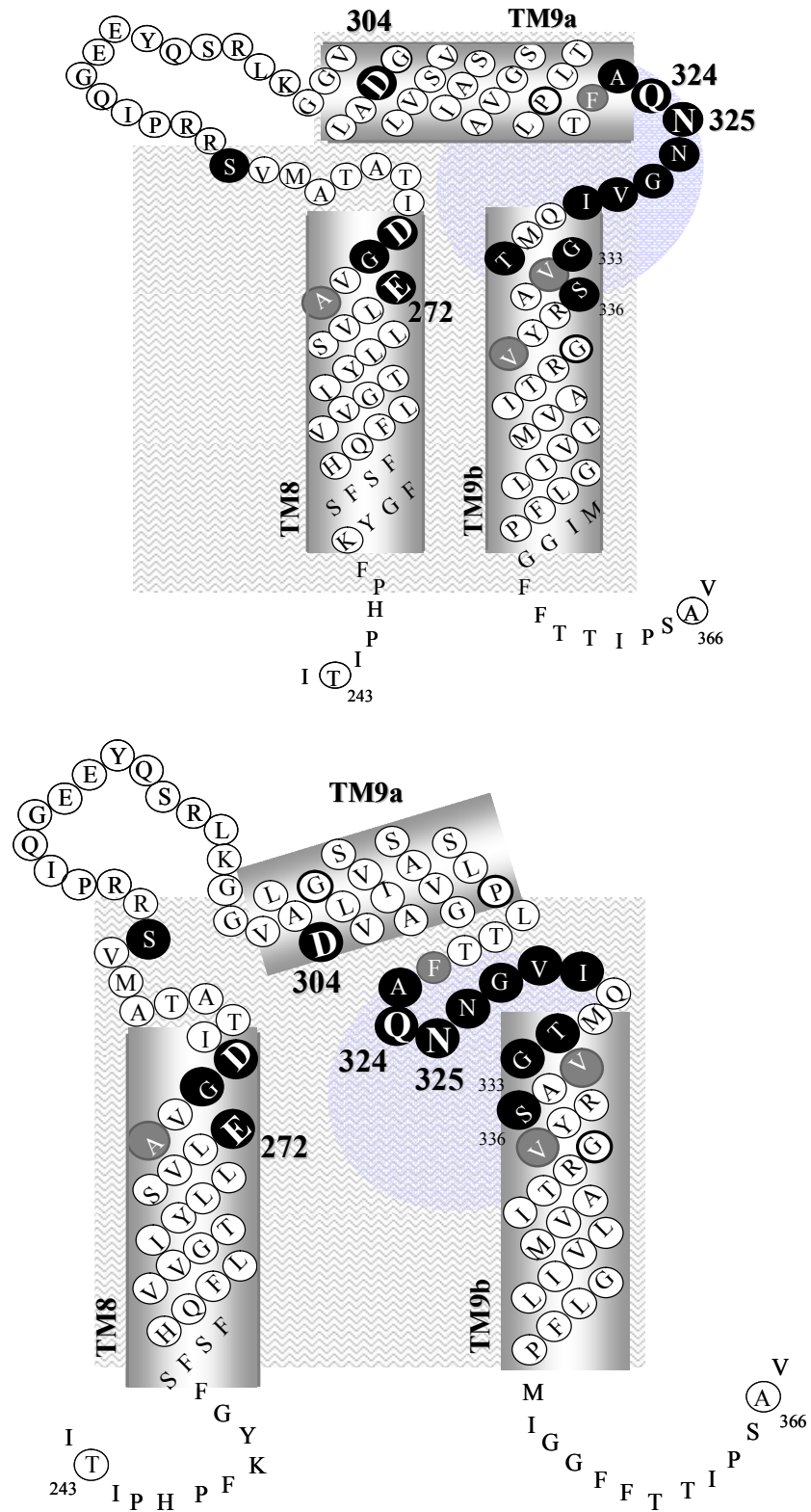
των καταλοίπων 278-281 (Thr-Ala-Thr-Ala) δημιουργούν μια επιφάνεια που είναι σημαντική για την έκφραση καταρχήν, αλλά και για την ενεργότητα του μεταφορέα: ιδιαίτερα, βλέπουμε ότι (α) μείωση του όγκου της πλευρικής ομάδας σε οποιοδήποτε από τα κατάλοιπα αυτά (Gly αντί Ala και Ser αντί Thr) δεν επηρεάζει καθόλου την έκφραση ή την ενεργότητα, (β) έστω και μικρή αύξηση του όγκου ή αλλοίωση της γεωμετρίας των πλευρικών ομάδων (Ser αντί Ala και Asn αντί Thr) είτε μειώνει την ενεργότητα μέχρι 50% (A279S, A281S, T278N) είτε απενεργοποιεί πλήρως μαζί με απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη (T280N), (γ) μεγαλύτερη διαφοροποίηση με εισαγωγή πλευρικής ομάδας ακόμη μεγαλύτερου όγκου και διαφορετικού πολικού χαρακτήρα (Cys) απενεργοποιεί πλήρως και καταστρέφει την έκφραση στη μεμβράνη, σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ ακόμη και αλλαγή στη σειρά των καταλοίπων (τετραπλό μετάλλαγμα) οδηγεί σε απενεργοποίηση με σημαντική απώλεια επιπέδων έκφρασης, γιατί πιθανόν εισάγεται μεγαλύτερος όγκος πλευρικής ομάδας (Thr) στις θέσεις των Ala-279 και Ala-281.

Συμπερασματικά, τα κατάλοιπα Ala και Thr στην αλληλουχία 278-281 φαίνεται να είναι σημαντικά για κάποια αλληλεπίδραση μέσα στο πρωτεϊνικό μόριο που παρεμποδίζεται χωροδιαταξικά όταν εισάγονται στις θέσεις αυτές μεγάλες πλευρικές ομάδες ή ομάδες με διαφορετική γεωμετρία, με συνέπεια να παρατηρούνται τα φαινόμενα της απενεργοποίησης και δομικής αποσταθεροποίησης του YgfO (απώλειας της έκφρασης). Πιο σημαντικό κατάλοιπο από την άποψη αυτή φαίνεται να είναι η Thr-280 (Εικόνα 4.3). Κατάλοιπα Ala και Thr είναι, γενικότερα, πολύ σημαντικά για τις αλληλεπιδράσεις και το «πακετάρισμα» των διαμεμβρανικών ελίκων στις μεμβρανικές πρωτεΐνες (Eilers *et al.*, 2000).



Εικόνα 4.2. Στοιχισή αλληλουχιών NAT/NCS2 και διάγραμμα προβολής α-έλικας του TM8 (266-281)

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων μας για την γενική τοπολογική οργάνωση του YgfO, την τοπολογική-λειτουργική οργάνωση του μοτίβου-υπογραφή και τον ρόλο των καταλοίπων στο τέλος της διαμεμβρανικής έλικας TM8 και στην ευρύτερη περιοχή μεταξύ TM8, TM9a και TM9b, προκύπτει μια πιθανή αναθεώρηση του αρχικού μοντέλου τοπολογίας στην περιοχή αυτή του YgfO (**Εικόνα 4.3**). Στο αναθεωρημένο μοντέλο, τα NEM/MTSES⁻-ευαίσθητα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή (323-329) σχηματίζουν μια επανεισερχόμενη θηλειά (reentrant loop) που «βλέπει» προς την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα του μορίου και έχει πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος (ξανθίνης). Όλες οι θέσεις των καταλοίπων που είναι ευαίσθητα στο NEM καθώς και τα 4 αναντικατάστατα E272, D304, Q324 και N325 (τονίζονται με σκούρο φόντο στο σχήμα) έχουν προσέγγιση σε αυτήν την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα. Στις κορυφαίες θέσεις της επανεισερχόμενης θηλειάς τοποθετούνται τα αναντικατάστατα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325, που έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στο κέντρο δέσμευσης (Karatzas *et al.*, 2006; Georgoroulou, Mermelekas, *et al.*, υπό συγγραφή, και η δική μας μελέτη). 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.*, υπό συγγραφή) σχηματίζει μια συνέχεια του κέντρου δέσμευσης-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 κατάλοιπα με σημαντικό ρόλο στη λειτουργία ή και στη δομική οργάνωση-σταθερότητα του μορίου στη μεμβράνη, που μπορεί να συμμετέχουν έμμεσα στο σχηματισμό μέρους του ενεργού κέντρου του YgfO. Στην Εικόνα 4.3, τα αναντικατάστατα κατάλοιπα παρουσιάζονται με πιο μεγάλα γράμματα σε σκούρο φόντο και αρίθμηση, τα NEM-ευαίσθητα κατάλοιπα φαίνονται σε σκούρο φόντο (τα πιο ευαίσθητα, IC₅₀<100 μM) ή γκριζο φόντο (τα λιγότερο ευαίσθητα, IC₅₀ 200-900 μM), ενώ όλα τα κατάλοιπα του YgfO που έχουν ελεγχθεί με μεταλλαξιγένεση φαίνονται μέσα σε κύκλους (Μερμελέκας Γ., Γεωργοπούλου Αικ., Καλλής Αλ., Βλαντός Β., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η περιοχή του γαλάζιου κύκλου δείχνει κατάλοιπα που είναι προσβάσιμα στο MTSES⁻ (εδάφιο 3.3.1), πιθανότατα μέσω προσέγγισης από την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα του κέντρου δέσμευσης.



Εικόνα 4.3. Αρχικό (πάνω) και αναθεωρημένο (κάτω) μοντέλο για την τοπολογία της περιοχής των TM8, TM9a-b και του μοτίβου-υπογραφή στον μεταφορέα YgfO (XanQ).

4.4 Ένα θερμόφιλο λειτουργικό ομόλογο του μεταφορέα YgfO

Στα πλαίσια των προσπαθειών μας για την υπερέκφραση και απομόνωση ομολόγων του μεταφορέα YgfO από θερμόφιλους μικροοργανισμούς, με απώτερο στόχο τη χρησιμοποίησή τους σε δοκιμές κρυσταλλογραφίας (Yamashita *et al.*, 2005; Yernool *et al.*, 2004; Smirnova and Kaback., 2003), κλωνοποιήσαμε και χαρακτηρίσαμε λειτουργικά με έκφραση στην *E. coli* K-12 (XL1 blue) ένα ομόλογο από το θερμόφιλο Gram-θετικό βακτήριο *Moorella thermoacetica*, ένα αναερόβιο ακετογόνο βακτήριο της κλάσης *Clostridia* που διαβιώνει βέλτιστα σε 58-60 °C και pH 6.0 (Drake and Daniel, 2004). Το λειτουργικό αυτό ομόλογο (MoorT) είναι το συγγενέστερο προς τον YgfO ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2 από έναν θερμόφιλο μικροοργανισμό (32% ταυτότητα καταλοίπων) και το μόνο που διατηρεί ακριβώς την αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή NAT ³¹⁹QNIGVISITG³²⁸ με τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα στις θέσεις Gln-324/319 (χαρακτηριστικό για τους μεταφορείς πουρινών) και Gly-333/328 (χαρακτηριστικό για τους ειδικούς μεταφορείς ξανθίνης) (Karatza *et al.*, 2006; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Η ετερόλογη έκφραση του MoorT σε XL1-blue και ορισμένα άλλα στελέχη της *E. coli* έδειξε ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, όταν χρησιμοποιήθηκε ο C-τελικός επίτοπος του τομέα δέσμευσης βιοτίνης (MoorT-BAD) αλλά χαμηλά επίπεδα έκφρασης όταν χρησιμοποιήθηκε η ουρά των 10 ιστιδινών (MoorT-His₁₀). Αν και δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για προσπάθεια απομόνωσης (λόγω της χαμηλής έκφρασης του MoorT-His₁₀), η λειτουργική ανάλυση του εκφραζόμενου MoorT-BAD έδειξε ότι μεταφέρει ξανθίνη με ενεργό μεταφορά, με σημαντική ικανότητα πρόσληψης στους 37 °C, pH 6.8, ενώ δεν μεταφέρει ουρικό, υπό τις ίδιες συνθήκες. Μπορεί να υπολογιστεί ότι η πρόσληψη ξανθίνης (1 μM) από τον MoorT φτάνει σε συσσώρευση συγκέντρωσης 20 φορές μεγαλύτερης στον εσωτερικό του κυττάρου σε σχέση με το εξωτερικό (20-fold concentration gradient), μια απόδοση ενεργού μεταφοράς παρόμοια με αυτήν του μεταφορέα YicE (XanP) (Karatza and Frillingos, 2005). Το γεγονός ότι δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε καλύτερα επίπεδα ενεργότητας σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (45 °C) ή μικρότερα pH (6.0) που δοκιμάστηκαν μπορεί να οφείλεται στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης ή σε τεχνικές δυσκολίες στο *in vivo* σύστημα της *E. coli* που θα μπορούσαν να ξεπεραστούν με χρησιμοποίηση μεμβρανικών κυστιδίων. Σε κάθε περίπτωση, πειράματα για τον αναλυτικότερο λειτουργικό χαρακτηρισμό του MoorT είναι σε εξέλιξη στο εργαστήριο (Παπακώστας Κ., Μερμελέκας Γ., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Συνοπτικά, το MoorT είναι το πρώτο ομόλογο της οικογένειας NAT από έναν θερμοφίλο μικροοργανισμό που χαρακτηρίζεται λειτουργικά. Ένα άλλο ομόλογο του YgfO, από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus* (YgfO_{Th}), χρησιμοποιήθηκε τελικά από την συνεργαζόμενη ομάδα του H. Ronald Kaback (UCLA) για υπερέκφραση και απομόνωση σε ικανοποιητικά επίπεδα, από την *E. coli*, και δοκιμές κρυσταλλογραφίας (Stroud *et al.*, 2009). Το ομόλογο αυτό, ωστόσο, δεν διατηρεί τόσο υψηλή συντήρηση αλληλουχίας σε σχέση με τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς *πουρινών* της οικογένειας NAT (Karena and Frillingos, 2009), ιδιαίτερα στην αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή, **ENTGVLAV**TR****, [όπου έχει Glu αντί Gln, στη θέση 324, κατάλοιπο που συνήθως απαντάται στους μεταφορείς ουρακίλης (εδάφιο 1.3.3)], και δεν έχει μελετηθεί έως τώρα ως προς την πιθανή λειτουργία του (Vladimir Mokhonov, and H. R. Kaback, προσωπική επικοινωνία).

4.5 Η απομόνωση του YgfO σε καθαρή μορφή ως έναυσμα για περαιτέρω μελέτες

Η έλλειψη αναλυτικών δομών για την οικογένεια NAT/NCS2, ήταν ένα κίνητρο για να ασχοληθούμε με την απομόνωση και καθαρισμό του YgfO σε διαλυτή «λειτουργική» μορφή, δηλ. σε αραιό διάλυμα ήπιων απορρυπαντικών που έχει δείχθει ότι δεν καταστρέφουν τη δομή ή το «πακετάρισμα» των αμφιπαθικών ελίκων του μεταφορέα, και κυρίως το n-δωδεκυλο-β,D-μαλτοπυρανοσίδιο (DDM) που έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε όλες σχεδόν τις κρυσταλλογραφικές αναλύσεις ιοντο-εξαρτώμενων διαμεμβρανικών μεταφορέων από βακτήρια (Abramson *et al.*, 2003; Smirnova and Kaback, 2003; Huang *et al.*, 2003; Yemool *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2006; Weyand *et al.*, 2008; Faham *et al.*, 2008; Sennhauser *et al.*, 2009) (εδάφιο 1.2). Η μελέτη αυτή οδήγησε στην απομόνωση και έναν αρχικό δομικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης YgfO σε διάλυμα DDM (0.008% w/v), που έδειξε ότι η απομονωμένη πρωτεΐνη διατηρεί υψηλό ποσοστό περιοχών α-έλικας (φασματοσκοπία CD) και μπορεί να αναγνωρίζει ειδικά το υπόστρωμά της (ξανθίνη) αλλά όχι ένα ανάλογο ξανθίνης που δεν δεσμεύεται (Goudela *et al.*, 2005) (7-μεθυλοξανθίνη) (φθορισμομετρία τρυπτοφανών), ενώ φαίνεται να διατηρεί και επιμέρους στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή NAT (φασματοσκοπία EPR και SDSL).

Η διαθεσιμότητα ενός ικανοποιητικού πρωτοκόλλου απομόνωσης μας δίνει τη δυνατότητα να σκεφτούμε περαιτέρω προοπτικές στη μελέτη του YgfO (XanQ), ενός μεταφορέα-προτύπου για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια των μεταφορέων NAT/NCS2. Οι κατευθύνσεις που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν περισσότερο άμεσα είναι τρεις:

(1) Μεταλλαξιγένεση σάρωσης τρυπτοφανών (Trp-scanning mutagenesis). Βάσει του ότι η περμεάση YgfO έχει ένα μόνο εγγενές κατάλοιπο τρυπτοφάνης (Trp-73) και ότι αντικατάσταση του καταλοίπου αυτού με φαινυλαλανίνη (W73F) οδηγεί σε έναν πλήρως λειτουργικό μεταφορέα που μπορεί να απομονωθεί και να χρησιμοποιηθεί ως control σε πειράματα φθορισμομετρίας (Trp-less permease), έχουμε ήδη ξεκινήσει πειράματα μεταλλαξιγένεσης για κατασκευή μεταλλαγμάτων μοναδικής τρυπτοφάνης (βλ. εδάφιο 3.4.1), διαλέγοντας θέσεις-στόχους προς τα όρια μεταξύ διαμεμβρανικών ελίκων και υδρόφιλων συνδετικών περιοχών όπου, αφενός, η τρυπτοφάνη αναμένεται να μπορεί να σταθεροποιείται χωρίς σημαντικά δομικά

προβλήματα και, αφετέρου, αναμένεται να αποκαλυφθούν πιθανές έντονες αλλαγές διαμόρφωσης κατά τον μηχανισμό λειτουργίας [(της εναλλασσόμενης πρόσβασης του ενεργού κέντρου από τη μία και την άλλη πλευρά της μεμβράνης, κατά την οποία οι σημαντικές πρωτεϊνικές περιοχές στα όρια διαμεμβρανικών ελίκων-υδρόφιλων θηλειών είναι και αυτές που αλλάζουν διαμόρφωση περισσότερο (Forrest *et al.*, 2008; Kaback *et al.*, 2007)]. Παρόμοιες μελέτες με φθορισμομετρική ανάλυση μεταλλαγμάτων τρυπτοφάνης έχουν γίνει σε αρκετές περιπτώσεις διαμεμβρανικών μεταφορέων όπως, πολύ πρόσφατα, με τον συµμεταφορέα γλυκόζης:νατρίου SGLT1 για τον οποίο αποκαλύφθηκε και μέρος του ενεργού κέντρου του μεταφορέα από τις αναλύσεις αυτές (Tyagi *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007). Ένα βασικό πρόβλημα που προκύπτει από την εφαρμογή της φθορισμομετρίας τρυπτοφάνων στους μεταφορείς NAT που έχουν ως υποστρώματα πουρίνες είναι ότι πολλές πουρίνες απορροφούν ισχυρά στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για την φθορισμομετρική διέγερση της τρυπτοφάνης (συνήθως 295 nm) και τα φάσματα που προκύπτουν επηρεάζονται από μη ειδική απόσβεση του σήματος (inner filter effect). Για να αντιμετωπίσουμε το ζήτημα αυτό (εδάφιο 3.1.3), μετά από σειρά προκαταρκτικών δοκιμών, αποφύγαμε να χρησιμοποιήσουμε προσδέτες με μέγιστο απορρόφησης κοντά στα 295 nm (όπως, το ουρικό, που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 292 nm), αλλά χρησιμοποιήσαμε το ζεύγος ξανθίνη (που είναι υπόστρωμα του YgfO και πολλών ακόμη από τα χαρακτηρισμένα ομόλογα NAT/NCS2) και 7-μεθυλοξανθίνη (που δεν αναγνωρίζεται από τον YgfO, ούτε από τους μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης των ασκομυκήτων): και οι δύο αυτές ενώσεις απορροφούν με μέγιστο στα 268 nm, και δεν μειώνουν την ενέργεια απορρόφησης/διέγερσης της τρυπτοφάνης στα 295 nm. Η χρησιμοποίηση ξανθίνης/7-μεθυλοξανθίνης (0.2 mM) σε συνδυασμό με δοκιμασίες απόσβεσης από πολικά αντιδραστήρια (KI, ακρυλαμίδιο) καθιερώνει ένα σύστημα ανάλυσης που, όπως δείξαμε (εδάφιο 3.1.3), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση σημαντικών αλλαγών διαμόρφωσης που επηρεάζουν το περιβάλλον ενός καταλοίπου τρυπτοφάνης στο μόριο του YgfO.

(2) Site-directed spin labeling (SDSL) και φασματοσκοπία EPR. Σε συνεργασία με το εργαστήριο του J. C. Voss (UCDavis), σχεδιάζουμε να συνεχίσουμε τα πειράματα φασματοσκοπικής ανάλυσης μεταλλαγμάτων κυστεϊνών μετά από απομόνωση και σήμανση με σήματα ιδιοτροφορμής (site-directed spin labeling) (εδάφιο 3.1.4), τα οποία μπορούν να μας δώσουν πληρέστερη εικόνα για την τοπική δευτεροταγή δομή, προσβασιμότητα σε πολικά αντιδραστήρια, επίδραση υποστρωμάτων και άλλες παραμέτρους της δομής και δυναμικής των

διαμορφώσεων σε σημαντικές περιοχές του μορίου του YgfO, όπως στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (βλ. εισαγωγή, εδάφιο 1.6.1). Επίσης, στα πλαίσια μιας άλλης κατεύθυνσης του εργαστηρίου μας που είναι προς την ανάλυση αλληλεπιδράσεων ζευγών κυστεϊνών για την εξέταση της διευθέτησης των διαμεμβρανικών ελίκων στην τριτοταγή δομή (Καρενά Αικ., υπό μελέτη), μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την φασματοσκοπία EPR για μεταλλάγματα ζευγών κυστεϊνών (double-Cys mutants): από την ανάλυση της σχετικής κινητικότητας των σημάτων ιδιοστροφορμής μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την δομική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο διαφορετικών θέσεων αλληλουχίας του μορίου και να ληφθούν αποτελέσματα για τις σχετικές αποστάσεις των δύο περιοχών, παρουσία ή απουσία υποστρώματος κ.ο.κ. Παρόμοιες αναλύσεις με SDSL και EPR έχουν γίνει με επιτυχία στο παρελθόν για αρκετούς διαμεμβρανικούς μεταφορείς (Voss *et al.*, 1995a,b, 1996; Jung, 1998; Wang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1999a,b; Oda *et al.*, 2003; Hubbell *et al.*, 2000).

(3) Κρυσταλλογραφία. Στο συνεργαζόμενο εργαστήριο του H. R. Kaback (UCLA), έχει προχωρήσει η απομόνωση, σε πολύ μεγάλη κλίμακα (10-20 L καλλιέργειας) και απόδοση (2-4 mg/L), του YgfO καθώς και του ομόλογου YgfO_{Tth} από το θερμοφίλο *T. thermophilus* (εδάφιο 4.4), και η προετοιμασία κρυστάλλων του YgfO, παρουσία ξανθίνης (Stroud *et al.*, 2009). Η πιθανή επιτυχία κρυσταλλογραφικής ανάλυσης του μεταφορέα YgfO (XanQ) ή ενός από τα άλλα ομόλογά του που μελετώνται, όπως το YgfU (PbuX) (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα), θα μας δώσει μια πολύ σαφέστερη εικόνα του κέντρου δέσμευσης και της τριτοταγούς δομής και θα μας βοηθήσει στην καλύτερη ερμηνεία των έως τώρα δεδομένων αλλά και στον ορθολογικότερο σχεδιασμό των νέων πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης, για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας-εξειδίκευσης των μεταφορέων NAT.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ NAT ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ

ΜΕΡΜΕΛΕΚΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ

Πρόσφατα, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά από την ερευνητική μας ομάδα ο μεταφορέας YgfO του εντεροβακτηρίου *E. coli* K-12, μέλος της οικογένειας NAT/NCS2, ο οποίος εδείχθη ότι λειτουργεί ως ειδικός, υψηλής συγγένειας συμμεταφορέας ξανθίνης: H⁺. Με την εισαγωγή κατάλληλων αλληλουχιών-επιτόπων στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης [περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD), αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων His (His₁₀)] και εφαρμογή των μεθοδολογιών της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) αναπτύχθηκε ένα πρότυπο βακτηριακό σύστημα μελέτης των σχέσεων δομής-λειτουργίας για τους μεταφορείς NAT, με βάση το μόριο του YgfO (Καρατζά Π.). Παρά τα σημαντικά ευρήματα, παραμένουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα για την τοπολογία, για το ενεργό κέντρο του μορίου, για άλλες σημαντικές περιοχές καθώς και τον μηχανισμό λειτουργίας του YgfO. Επίσης, δεν υπάρχουν έως τώρα δεδομένα δομικών κρυσταλλογραφικών αναλύσεων για καμιά πρωτεΐνη της οικογένειας NAT. Με βάση τα παραπάνω, στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης και αρχικού δομικού χαρακτηρισμού του YgfO, η εξέταση της γενικής τοπολογικής του οργάνωσης με εργαστηριακές μεθόδους και μια εμβάθυνση στο ρόλο του μοτίβου-υπογραφή NAT, ³²⁴QNXGXXXXTG³³³, που είχε δειχθεί από προηγούμενες μελέτες μεταλλαξιγένεσης ότι περιλαμβάνει σημαντικούς καθοριστές για τον μηχανισμό λειτουργίας του YgfO.

Αναπτύχθηκε καταρχήν ένα πρωτόκολλο για την υπερέκφραση και καθαρισμό του YgfO σε μεγάλη κλίμακα σε διάλυμα απορρυπαντικού (*n*-δωδεκυλο-β, D-μαλτοπυρανοσιδίου, DDM), με τελική απόδοση απομονωμένης πρωτεΐνης ~0.7 mg/L καλλιέργειας. Η μελέτη αυτή οδήγησε στην απομόνωση και έναν αρχικό δομικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης YgfO σε διάλυμα DDM (0.008% w/v), που έδειξε ότι η απομονωμένη πρωτεΐνη διατηρεί υψηλό ποσοστό περιοχών α-έλικας (φασματοσκοπία CD) και μπορεί να αναγνωρίζει ειδικά το υπόστρωμά της (ξανθίνη) αλλά

όχι ένα ανάλογο ξανθίνης που δεν δεσμεύεται (7-μεθυλοξανθίνη) (φθορισμομετρία τρυπτοφανών), ενώ φαίνεται να διατηρεί και επιμέρους στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή NAT (φασματοσκοπία EPR και SDSL). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η απομονωμένη πρωτεΐνη διατηρεί λειτουργικά και δομικά στοιχεία της και ότι το πρωτόκολλο απομόνωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για περαιτέρω δομικές μελέτες. Εξάλλου, στα πλαίσια των προσπαθειών μας για την υπερέκφραση και απομόνωση ομολόγων μεταφορέων από θερμοφίλους μικροοργανισμούς, ως εναλλακτικών επιλογών, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά ένα συγγενές ομόλογο του μεταφορέα YgfO από το θερμοφίλο Gram-θετικό βακτήριο *Moorella thermoacetica*, το οποίο εδείχθη ότι λειτουργεί ως μεταφορέας ξανθίνης στους 37 °C, pH 6.6-6.8, στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης της *E. coli*.

Η γενική τοπολογική οργάνωση του YgfO αναλύθηκε με την μέθοδο ελέγχου προσβασιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM). Κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης στις κορυφαίες θέσεις των υδρόφιλων συνδετικών τμημάτων (A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S295C, L319C, A366C, R394C, I419C) και ελέγχθηκε η προσβασιμότητά τους από το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻, που δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, σε μεμβρανικά κυστίδια (right-side out membrane vesicles). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μέχρι την διαμεμβρανική έλικα TM8 υπάρχει σαφής εναλλαγή προσβασιμότητας, που συμφωνεί με τα προβλεπόμενα τοπολογικά μοντέλα από τους αλγορίθμους πρόβλεψης. Στην C-τελική πλευρά, όμως, (TMs 8-12), ενώ ως προσβάσιμες προβλέπονται μόνον οι θέσεις A366 και I419, όλες οι εξεταζόμενες θέσεις της ευρύτερης περιοχής (S295, L319, A366, R394, I419) βρέθηκε ότι εμφανίζουν προσβασιμότητα στο MTSES⁻ από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στην ύπαρξη αμφιπαθικών περιοχών που δεν είναι διαμεμβρανικές, δηλ. δεν διατρέχουν ολόκληρη τη μεμβράνη, και/ή επανεισερχόμενων συνδετικών τμημάτων (reentrant loops), τα οποία διαμορφώνουν διαφορετικά την τοπολογία του μεταφορέα YgfO στο C-τελικό τμήμα. Πάντως, χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία γονιδιακής σύντηξης με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), επαληθεύτηκε ότι το C-τελικό άκρο του YgfO είναι προσανατολισμένο προς το κυτταρόπλασμα, ένα δεδομένο που συμφωνεί με προηγούμενες αναλύσεις πρωτεωμικής από το εργαστήριο του Gunnar von Heijne (Stockholm).

Χρησιμοποιώντας μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης (single-Cys YgfO mutants) που υπήρχαν διαθέσιμα στο εργαστήριο (Καρατζά Π., Γεωργοπούλου Αικ.), μελετήθηκε ο ρόλος των καταλοίπων της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή NAT σε σχέση (α) με το υδρόφιλο ή υδρόφοβο μικροπεριβάλλον τους, (β) την τοπολογική οργάνωση του πρωτεϊνικού μορίου και (γ) τη δέσμευση υποστρώματος (ξανθίνης). Για να προσδιοριστεί η φύση του μικροπεριβάλλοντος του μοτίβου-υπογραφή (υδρόφιλο ή υδρόφοβο) με βιοχημικές μεθόδους, χρησιμοποιήθηκε το υδρόφιλο ειδικό -SH αντιδραστήριο MTSES⁻. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή είναι προσβάσιμη από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον, παρά το ότι προβλέπεται να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι μελέτες παρουσία υποστρώματος αποκάλυψαν ότι η θέση Asn-325 προστατεύεται πλήρως από αλκυλίωση, κατά τη δέσμευση υποστρώματος (ξανθίνης). Παράλληλα, έγιναν πειράματα ελέγχου της ευαισθησίας των μεταλλαγμάτων του μοτίβου-υπογραφή σε απενεργοποίηση από το MTSES⁻, και βρέθηκε ότι η ενεργότητα των A323C, G327C, V328C, G333C και V334C αναστέλλεται κατά 50-90% παρουσία MTSES⁻ σε μεμβρανικά κυστίδια, υπενθυμίζοντας την περιοδικότητα της ευαισθησίας της περιοχής καταλοίπων 323-339 στο *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM). Τα αποτελέσματα για την προσβασιμότητα του μοτίβου-υπογραφή από το υδρόφιλο περιβάλλον και για την προστασία του Asn-325 παρουσία υποστρώματος, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η περιοχή αυτή αποτελεί μέρος του υδρόφιλου ενεργού κέντρου του YgfO.

Πρόσφατα δεδομένα στο εργαστήριό μας έχουν υποδείξει τη σημασία που μπορεί να έχει για τον μηχανισμό του YgfO η ευρύτερη περιοχή πριν το μοτίβο-υπογραφή, μεταξύ TM8 και TM9, που περιέχει θέσεις υψηλής συντήρησης μεταξύ των χαρακτηρισμένων ομολόγων μεταφορέων NAT καθώς και δύο αναντικατάστατα κατάλοιπα (Glu-272, Asp-304) (Καρενά Αικ.). Η αντίστοιχη περιοχή αλληλουχίας (των καταλοίπων 266-314) υποβλήθηκε σε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης σε επιλεγμένες θέσεις, και αποκαλύφθηκε ότι τα σημαντικά κατάλοιπα συγκεντρώνονται σε δύο κυρίως υποπεριοχές: ²⁹⁶RLKGGVLADG³⁰⁵ και ²⁷²EAVGDITATAMVS²⁸⁴. Αναλυτική μελέτη των σημαντικών θέσεων της υποπεριοχής 272-284 με μεταλλαξιγένεση και ανάλυση της λειτουργικής επίδρασης του NEM στα μεταλλάγματα κυστεϊνών έδειξε ότι, εκτός από το αναντικατάστατο Glu-272, η αλληλουχία αυτή περιέχει την θέση Gly-275 (G275C), η οποία είναι ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από NEM και ανταποκρίνεται στην αλλαγή διαμόρφωσης

που επάγει το υπόστρωμα (ξανθίνη) με αύξηση της ευαισθησίας της, την Asp-276, όπου φαίνεται να είναι λειτουργικά απαραίτητη η ύπαρξη μιας καρβοξυλομάδας (-COO⁻/COOH), και τη σειρά των καταλοίπων ²⁷⁸TATA²⁸¹, όπου εμφανίζονται στερεοχημικοί περιορισμοί στην δυνατότητα αντικατάστασης με άλλες πλευρικές ομάδες, επηρεάζοντας την ενεργότητα αλλά και την έκφραση-δομική σταθερότητα του YgfO στη μεμβράνη, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες περιοχές του μορίου του μεταφορέα.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων μας για την γενική τοπολογική οργάνωση του YgfO, την τοπολογική-λειτουργική οργάνωση του μοτίβου-υπογραφή και τον ρόλο των καταλοίπων στο τέλος της διαμεμβρανικής έλικας TM8 και στην ευρύτερη περιοχή μεταξύ TM8 και TM9, προκύπτει μια πιθανή αναθεώρηση του αρχικού μοντέλου τοπολογίας στην περιοχή αυτή του YgfO. Κατά το αναθεωρημένο μοντέλο, το μοτίβο-υπογραφή (323-333) λειτουργεί ως μια επανεισερχόμενη θηλειά (reentrant loop) που «βλέπει» προς την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα του μορίου και έχει πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος (ξανθίνης), ενώ η μία όψη α-έλικας στο κυτταροπλασματικό άκρο του αμφιπαθικού τμήματος TM8 και η αμέσως επόμενη αλληλουχία (272-281) περιέχουν κατάλοιπα με σημαντικό ρόλο στη λειτουργία ή και στη δομική οργάνωση-σταθερότητα του μορίου στη μεμβράνη, και μπορεί να συμμετέχουν έμμεσα στο σχηματισμό μέρους του ενεργού κέντρου του YgfO.

SUMMARY

OVEREXPRESSION, PURIFICATION AND STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF NAT TRANSPORTERS IN A MODEL BACTERIAL SYSTEM

DOCTORATE THESIS

MERMELEKAS GEORGIOS

Our lab has recently cloned and functionally characterized YgfO, a specific, high-affinity xanthine:H⁺ symporter from *Escherichia coli* K-12, a member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT/NCS2) family. With introduction of appropriate epitope tags at the C terminus (biotin-acceptor domain or His₁₀-tail) and application of the Cys-scanning mutagenesis technology, a model bacterial system was developed for the study of structure-function relationships of the NAT transporters, based on the YgfO permease (Karatzas P.). Despite considerable progress, today, important aspects of the topology, active site mapping and the mechanism of YgfO remain unanswered and there are no high-resolution structures available for any member of this family. The aims of this thesis was to develop a protocol for the overexpression, purification and a first structural characterization of YgfO, with biophysical methods, to apply a first experimental study of the topology of YgfO with substituted-cysteine accessibility method (SCAM), and to further study the role of the NAT signature motif, ³²⁴QNXGXXXXTG³³³, which had been indicated to contain important determinants for the mechanism.

We developed a protocol for the large-scale overexpression and purification of YgfO in detergent solution (n-dodecyl- β ,D-maltoside, DDM) with a yield of 0.7 mg of purified protein per L of cell culture. It was found that the purified YgfO retains a high alpha-helical content (with circular dichroism spectroscopy), recognizes specifically the substrate (xanthine) but not 7-methylxanthine which is not a ligand for YgfO (with tryptophan fluorescence spectroscopy) and retains local secondary structure elements at the NAT motif region (with site-directed spin labeling of mutants Q324C and R337C and EPR spectroscopy). While searching for other

homologs to be used as alternative sources for purification, from thermophilic microorganisms, we cloned and characterized functionally a close YgfO homolog from the Gram-positive thermophilic bacterium *Moorella thermoacetica*, which was found to transport xanthine at 37 °C, pH 6.6-6.8, in the heterologous expression system of *E. coli*.

We analyzed general features of the topology of YgfO with substituted-cysteine accessibility method (SCAM) which is based on the Cys-scanning technology. We engineered single-Cys mutants at the tips of the predicted hydrophilic loops (A48C, R78C, S109C, L142C, A176C, S206C, T243C, S295C, L319C, A366C, R394C, I419C) and assayed for their reactivity with the hydrophilic, membrane-impermeable reagent MTSES⁻, in right-side out membrane vesicles (RSOs). Our data show that there is a clear alternation of solvent accessibility for the region between transmembrane helices (TMs) 1 and 8, as expected from the in silico prediction algorithms, while, at the C-terminal third of the molecule (TMs 9-12), all the single-Cys residue positions were found to be accessible, contrary to the predictions of the models. This discrepancy is possibly due to the presence of amphipathic helical segments that cross the membrane only partially and/or reentrant loops, giving a perturbed topology at the C-terminal part of the molecule. Using gene fusion with the green fluorescent protein (GFP), we confirmed that the C-tail of YgfO is cytoplasmic, consistent with previous proteomic analyses from the group of Dr. Gunnar von Heijne (Stockholm).

Using single-Cys YgfO mutants that already existed in the lab (Karatza P., Georgopoulou E.), we further examined the role of the NAT motif residues with respect to (a) their hydrophilic or hydrophobic environment, (b) their topological organization and (c) the effect of substrate binding. We used SCAM method and functional assay together with the membrane-impermeable MTSES⁻. We showed that all the motif region is accessible to solvent (MTSES⁻) from the extracellular hydrophilic environment and that Asn-325 is fully protected from alkylation with MTSES⁻ in the presence of substrate (xanthine). In addition, the xanthine uptake activity of mutants A323C, G327C, V328C, G333C and V334C is strongly inhibited by MTSES⁻ and the pattern of functional inhibition is reminiscent of that of the sensitivity to *N*-ethylmaleimide (NEM). Our results propose that the NAT-motif sequence region form part of the hydrophilic active site of the YgfO transporter.

Recent evidence from our lab has shown that the whole region between TM8 and TM9, upstream the NAT motif, might also include important determinants for the mechanism, since it

contains highly conserved residues and two functionally irreplaceable residues, Glu-272 and Asp-304 (Karena E.). We analyzed the whole sequence region (residues 266-314) with Cys-scanning and site-directed mutagenesis and found that the important residue positions cluster in two smaller regions, ²⁹⁶RLKGGVLADG³⁰⁵ and ²⁷²EAVGDITATAMVS²⁸⁴. Mutation and sulfhydryl-alkylation analysis of the sequence 272-284 revealed that, apart from the irreplaceable Glu-272, this sequence contains Gly-275 (G275C), which is highly sensitive to inactivation by NEM (IC₅₀ 15 μM) and responds to the substrate-induced conformation change by increasing its NEM-sensitivity, Asp-276, where a carboxylic group is required for function (-COO⁻/COOH), and the sequence ²⁷⁸TATA²⁸¹, where there are steric limitations to replacement with amino acids of larger volume or different geometry, affecting activity and the structural integrity of the membrane protein, possibly due to important interactions with other protein regions.

Collectively, our results on the topology and function of the NAT motif and the preceding sequence region between TM8 and TM9 suggest that the initial topology model in this region should be revised. According to our revised model, the NAT-signature motif of YgfO (323-333) functions as a reentrant loop which faces the internal hydrophilic cavity and has access to the xanthine binding site, while one alpha-helical face of the cytoplasmic end of TM8 and the sequence downstream (272-281) contain important residues for the structural organization of the protein which might contribute to the active site indirectly.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Abramson, J. and E. Wright (2009). "Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats." *Curr Opin Struct Biol* **19**, in press.
2. 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.
3. 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.
4. Acimovic, Y. and I. R. Coe (2002). "Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes." *Mol Biol Evol* **19**: 2199-2210.
5. Akabas, M. H., D. A. Stauffer, M. Xu and A. Karlin (1992). "Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants." *Science* **258**: 307-310.
6. Akiyama, Y. and K. Ito (1993). "Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **268**: 8146-8150.
7. Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter (2000). "Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell". Garland Publishing, Inc, New York and London
8. Altaner, C. (2008). "Prodrug cancer gene therapy." *Cancer Lett* **270**: 191-201.
9. Altenbach, C., K. Yang, D. L. Farrens, Z. T. Farahbakhsh, H. G. Khorana and W. L. Hubbell (1996). "Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F loop region of rhodopsin: a site-directed spin-labeling study." *Biochemistry* **35**: 12470-12478.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Arastu-Kapur, S., E. Ford, B. Ullman and N. S. Carter (2003). "Functional analysis of an inosine-guanosine transporter from *Leishmania donovani*. The role of conserved residues, aspartate 389 and arginine 393." *J Biol Chem* **278**: 33327-33333.
16. 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.

17. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997). "Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance." *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**: 4155-4160.
18. Bagos, P. G., T. D. Liakopoulos and S. J. Hamodrakas (2006). "Algorithms for incorporating prior topological information in HMMs: application to transmembrane proteins." *BMC Bioinformatics* **7**: 189.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Barabote, R. D. and M. H. Saier, Jr. (2005). "Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system." *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 608-634.
23. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2005) *Biochemistry*, 5th edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco
24. Berhe, A., R. Zvyagilskaya, J. O. Lagerstedt, J. R. Pratt and B. L. Persson (2001). "Properties of the cysteine-less Pho84 phosphate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 837-842.
25. Bernsel, A., H. Viklund, J. Falk, E. Lindahl, G. von Heijne and A. Elofsson (2008). "Prediction of membrane-protein topology from first principles." *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 7177-7181.
26. 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.
27. Bogdanov, M., W. Zhang, J. Xie and W. Dowhan (2005). "Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM(TM)): application to lipid-specific membrane protein topogenesis." *Methods* **36**: 148-171.
28. Bogdanov, M., P. N. Heacock and W. Dowhan (2002). "A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition." *EMBO J* **21**: 2107-2116.
29. 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.
30. Busch, W. and M. H. Saier, Jr. (2002). "The transporter classification (TC) system, 2002." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 287-337.
31. Calamia, J. and C. Manoil (1990). "Lac permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion." *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4937-4941.
32. Camacho, A. and L. Massieu (2006). "Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death." *Arch Med Res* **37**: 11-18.

33. Canfield, V. A., L. Norbeck and R. Levenson (1996). "Localization of cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase by epitope tag insertion." *Biochemistry* **35**: 14165-14172.
34. Cao, W. and L. H. Matherly (2004). "Analysis of the membrane topology for transmembrane domains 7-12 of the human reduced folate carrier by scanning cysteine accessibility methods." *Biochem J* **378**: 201-206.
35. Carpile, 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.
36. Carter, N. S., C. Ben Mamoun, W. Liu, E. O. Silva, S. M. Landfear, D. E. Goldberg and B. Ullman (2000a). "Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* **275**: 10683-10691.
37. Carter, N. S., M. E. Drew, M. Sanchez, G. Vasudevan, S. M. Landfear and B. Ullman (2000b). "Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant." *J Biol Chem* **275**: 20935-20941.
38. 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.
39. 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.
40. Chang, A. B., R. Lin, W. Keith Studley, C. V. Tran and M. H. Saier, Jr. (2004). "Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins." *Mol Membr Biol* **21**: 171-181.
41. Chang, H. C. and D. R. Bush (1997). "Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of amino acid transporters." *J Biol Chem* **272**: 30552-30557.
42. Chen, K. L., M. X. Xu, G. Y. Li, H. Liang, Z. L. Xia, X. Liu, J. S. Zhang, A. M. Zhang and D. W. Wang (2006). "Identification of AtENT3 as the main transporter for uridine uptake in *Arabidopsis* roots." *Cell Res* **16**: 377-388.
43. 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.
44. Claros, M. G. and G. von Heijne (1994). "TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions." *Comput Appl Biosci* **10**: 685-686.
45. 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.
46. Compton, L.A. and C.W. Johnson (1986). "Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication." *Anal. Biochem.* **155**: 155-167.
 47. Consler, T. G., B. L. Persson, H. Jung, K. H. Zen, K. Jung, G. G. Privé, G. E. Verner and H. R. Kaback (1993). "Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6934-6938.
 48. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson (1997). "Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method." *Protein Eng* **10**: 673-676.
 49. Culham, D. E., A. Hillar, J. Henderson, A. Ly, Y. I. Vernikovska, K. I. Racher, J. M. Boggs and J. M. Wood (2003). "Creation of a fully functional cysteine-less variant of osmosensor and proton-osmoprotectant symporter ProP from *Escherichia coli* and its application to assess the transporter's membrane orientation." *Biochemistry* **42**: 11815-11823.
 50. Cui, L., L. Aleksandrov, Y. X. Hu, M. Gentzsch, J. H. Chen, J. R. Riordan and A. A. Aleksandrov (2006). "The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator phenylalanine 508 side chain in ion channel gating." *J. Physiol.* **572**: 347-358.
 51. Cunningham, B. C. and J. A. Wells (1989). "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis." *Science* **244**: 1081-1085.
 52. Daley, D. O., M. Rapp, E. Granseth, K. Melen, D. Drew and G. von Heijne (2005). "Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome." *Science* **308**: 1321-1323.
 53. Danielsen, S., D. Boyd and J. Neuhard (1995). "Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* cytosine permease." *Microbiology* **141**: 2905-2913.
 54. 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.
 55. Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640-6645.
 56. de Koning, H. and G. Diallinas (2000). "Nucleobase transporters." *Mol Membr Biol* **17**: 75-94.
 57. 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.
 58. de Montigny, J., M. L. Straub, R. Wagner, M. L. Bach and M. R. Chevallier (1998). "The uracil permease of *Schizosaccharomyces pombe*: a representative of a family of 10 transmembrane helix transporter proteins of yeasts." *Yeast* **14**: 1051-1059.
 59. Deber, C. M., C. Wang, L. P. Liu, A. S. Prior, S. Agrawal, B. L. Muskat and A. J. Cuticchia (2001). "TM Finder: a prediction program for transmembrane protein segments using a combination of hydrophobicity and nonpolar phase helicity scales." *Protein Sci* **10**: 212-219.

60. Derman, A. I., W. A. Prinz, D. Belin and J. Beckwith (1993). "Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*." *Science* **262**: 1744-1747.
61. 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.
62. 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**.
63. 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.
64. 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.
65. Dodd, J. R. and D. L. Christie (2005). "Substituted cysteine accessibility of the third transmembrane domain of the creatine transporter: defining a transport pathway." *J Biol Chem* **280**: 32649-32654.
66. Dodier, Y., U. Banderali, H. Klein, O. Topalak, O. Dafi, M. Simoes, G. Bernatchez, R. Sauve and L. Parent (2004). "Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis." *J Biol Chem* **279**: 6853-6862.
67. Dorn, M., M. Weiwand, F. Markwardt, L. Laug, R. Rudolph, M. Brandsch and E. Bosse-Donecke (2009). "Identification of a disulfide bridge essential for transport function of the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1." *J Biol Chem* **284**, in press.
68. 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.
69. Drake, H. L. and S. L. Daniel (2004). "Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*." *Res Microbiol* **155**: 422-436.
70. Drew, D., D. Sjostrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier and G. von Heijne (2002). "Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis." *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2690-2695.
71. Drew, D. E., G. von Heijne, P. Nordlund and J. W. de Gier (2001). "Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **507**: 220-224.
72. Dunten, R. L., M. Sahin-Toth and H. R. Kaback (1993). "Role of the charge pair aspartic acid-237-lysine-358 in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **32**: 3139-3145.
73. Eckhardt, M., B. Gotza and R. Gerardy-Schahn (1999). "Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter." *J Biol Chem* **274**: 8779-8787.

74. Eilers, M., S. C. Shekar, T. Shieh, S. O. Smith and P. J. Fleming (2000). "Internal packing of helical membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5796-5801.
75. Eitinger, T. and B. Friedrich (1994). "A topological model for the high-affinity nickel transporter of *Alcaligenes eutrophus*." *Mol Microbiol* **12**: 1025-1032.
76. Elion, G. B. (1993). "Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity." *J Med Virol Suppl* **1**: 2-6.
77. Engel, K. and J. Wang (2005). "Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter." *Mol Pharmacol* **68**: 1397-1407.
78. 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.
79. 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.
80. Falke, J. J., A. F. Dernburg, D. A. Sternberg, N. Zalkin, D. L. Milligan and D. E. Koshland, Jr. (1988). "Structure of a bacterial sensory receptor. A site-directed sulfhydryl study." *J Biol Chem* **263**: 14850-14858.
81. Feilmeier, B. J., G. Iseminger, D. Schroeder, H. Webber and G. J. Phillips (2000). "Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **182**: 4068-4076.
82. 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.
83. Fimmel, S., T. Choli, N. A. Dencher, G. Buldt and B. Wittmann-Liebold (1989). "Topography of surface-exposed amino acids in the membrane protein bacteriorhodopsin determined by proteolysis and micro-sequencing." *Biochim Biophys Acta* **978**: 231-240.
84. 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.
85. 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.
86. Foster, D. L., M. Boublik and H. R. Kaback (1983). "Structure of the lac carrier protein of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **258**: 31-34.
87. Fox, C. F. and E. P. Kennedy (1965). "Specific labeling and partial purification of the M protein, a component of the beta-galactoside transport system of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA* **54**: 891-899.
88. Fox, I. H. and W. N. Kelley (1978). "The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells." *Annu Rev Biochem* **47**: 655-686.
89. 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.

90. Freeman, C. D., D. P. Nicolau, P. P. Belliveau and C. H. Nightingale (1993). "Lomefloxacin clinical pharmacokinetics." *Clin Pharmacokinet* **25**: 6-19.
91. 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.
92. Frillingos, S. and H. R. Kaback (1997). "The role of helix VIII in the lactose permease of *Escherichia coli*: II. Site-directed alkylation." *Protein Sci* **6**: 438-443.
93. Frillingos, S. and H. R. Kaback (1996a). "Probing the conformation of the lactose permease of *Escherichia coli* by in situ site-directed sulfhydryl modification." *Biochemistry* **35**: 3950-3956.
94. Frillingos, S. and H. R. Kaback (1996b). "Cysteine-scanning mutagenesis of helix VI and the flanking hydrophilic domains on the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **35**: 5333-5338.
95. 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.
96. Frillingos, S., J. Sun, A. Gonzalez and H. R. Kaback (1997a). "Cysteine-scanning mutagenesis of helix II and flanking hydrophilic domains in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **36**: 269-273.
97. Frillingos, S., M. L. Ujwal, J. Sun and H. R. Kaback (1997b). "The role of helix VIII in the lactose permease of *Escherichia coli*: I. Cys-scanning mutagenesis." *Protein Sci* **6**: 431-437.
98. Frillingos, S., J. Wu, P. Venkatesan and H. R. Kaback (1997c). "Binding of ligand or monoclonal antibody 4B1 induces discrete structural changes in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **36**: 6408-6414.
99. Froshauer, S., G. N. Green, D. Boyd, K. McGovern and J. Beckwith (1988). "Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **200**: 501-511.
100. Fu, D. and P. C. Maloney (1998). "Structure-function relationships in OxIT, the oxalate/formate transporter of *Oxalobacter formigenes*. Topological features of transmembrane helix 11 as visualized by site-directed fluorescent labeling." *J Biol Chem* **273**: 17962-17967.
101. Gafvelin, G. and G. von Heijne (1994). "Topological "frustration" in multispinning *E. coli* inner membrane proteins." *Cell* **77**: 401-412.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. Godoy A., V. Ormazabal, G. Moraga-Cid, F. A. Zúñiga, P. Sotomayor, V. Barra, O. Vasquez, V. Montecinos, L. Mardones, C. Guzmán, M. Villagrán, L. G. Aguayo, S. A. Oñate, A. M. Reyes, J. G. Cárcamo, C. I. Rivas and J. C. Vera (2007). "Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the

- ascorbic acid transporter SCVT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations." *J Biol Chem* **282**: 615-624.
106. Gorfinkiel, L., G. Diallinas and C. Scazzocchio (1993). "Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*." *J Biol Chem* **268**: 23376-23381.
 107. Gotoh, N., T. Kusumi, H. Tsujimoto, T. Wada and T. Nishino (1999). "Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*." *FEBS Lett* **458**: 32-36.
 108. 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.
 109. 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.
 110. 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.
 111. 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.
 112. Granseth, E., D. O. Daley, M. Rapp, K. Melen and G. von Heijne (2005). "Experimentally constrained topology models for 51,208 bacterial inner membrane proteins." *J Mol Biol* **352**: 489-494.
 113. 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.
 114. 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.
 115. 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.
 116. Grunewald, M., D. Menaker and B. I. Kanner (2002). "Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1." *J Biol Chem* **277**: 26074-26080.
 117. Guan, L. and H. R. Kaback (2007). "Site-directed alkylation of cysteine to test solvent accessibility of membrane proteins." *Nature Protocols* **2**: 2012-2017.
 118. Guan, L. and H. R. Kaback (2006). "Lessons from lactose permease." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 67-91.
 119. 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.

120. 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.
121. Haardt, M. and E. Bremer (1996). "Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **178**: 5370-5381.
122. 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.
123. Hatanaka, T., Y. Kihira, Y. Shinohara, E. Majima and H. Terada (2001). "Characterization of loops of the yeast mitochondrial ATP/ADP carrier facing the cytosol by site-directed mutagenesis." *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 936-942.
124. He, M. M. and H. R. Kaback (1998). "In vitro folding of a membrane protein: effect of denaturation and renaturation on substrate binding by the lactose permease of *Escherichia coli*." *Mol Membr Biol* **15**: 15-20.
125. Hediger, M. A. (2002a). "Kidney function: gateway to a long life?" *Nature* **417**: 393-395.
126. Hediger, M. A. (2002b). "New view at C." *Nature Med* **8**: 445-446.
127. Hirokawa, T., S. Boon-Chieng and S. Mitaku (1998). "SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins." *Bioinformatics* **14**: 378-379.
128. 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.
129. Hubbell, W. L., D. S. Cafiso and C. Altenbach (2000). "Identifying conformational changes with site-directed spin labeling." *Nature Struct Biol* **7**: 735-739.
130. 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.
131. Huntley, S. A., D. Krofchick and M. Silverman (2004). "Position 170 of rabbit Na⁺/glucose cotransporter (rSGLT1) lies in the Na⁺ pathway; modulation of polarity/charge at this position regulates charge transfer and carrier turnover." *Biophys J* **87**: 295-310.
132. 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.
133. 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.
134. Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**: 23-28.
135. 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.

136. Joh, N. H., A. Min, S. Faham, J. P. Whitelegge, D. Yang, V. L. Woods and J. U. Bowie (2008). "Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins." *Nature* **453**: 1266-1270.
137. 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.
138. Jones, D. T., W. R. Taylor and J. M. Thornton (1994). "A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology." *Biochemistry* **33**: 3038-3049.
139. 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.
140. Joseph-Liauzun, E., P. Delmas, D. Shire and P. Ferrara (1998). "Topological analysis of the peripheral benzodiazepine receptor in yeast mitochondrial membranes supports a five-transmembrane structure." *J Biol Chem* **273**: 2146-2152.
141. 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.
142. Jung, H. (1998). "Topology and function of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na⁺/solute cotransporter family." *Biochim Biophys Acta* **1365**: 60-64.
143. Jung, H., R. Rubenhagen, S. Tebbe, K. Leifker, N. Tholema, M. Quick and R. Schmid (1998). "Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **273**: 26400-26407.
144. Jung, H., K. Jung and H. R. Kaback (1994). "A conformational change in the lactose permease of *Escherichia coli* is induced by ligand binding or membrane potential." *Protein Sci* **3**: 1052-1057.
145. Jung, K., H. Jung, J. Wu, G. G. Privé and H. R. Kaback (1993). "Use of site-directed fluorescence labeling to study proximity relationships in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **32**: 12273-12278.
146. Juretic, D., D. Zucic, B. Lucic and N. Trinajstic (1998). "Preference functions for prediction of membrane-buried helices in integral membrane proteins." *Comput Chem* **22**: 279-294.
147. Kaback, H. R. (1983). "Proton electrochemical gradients and active transport: the saga of lac permease." *Ann NY Acad Sci* **456**: 291-304.
148. Kaback, H. R. (1974). "Transport studies in bacterial membrane vesicles." *Science* **186**: 882-892.
149. Kaback, H. R. (1971). "Bacterial membranes." *Methods Enzymol* **22**: 99-120.
150. Kaback, H. R., R. Dunten, S. Frillingos, P. Venkatesan, I. Kwaw, W. Zhang and N. Ermolova (2007). "Site-directed alkylation and the alternating access model for LacY." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 491-494.
151. Kaback, H. R., M. Sahin-Toth and A. B. Weinglass (2001). "The kamikaze approach to membrane transport." *Nature Rev Mol Cell Biol* **2**: 610-620.
152. Kafasla, P., D. Bouzarelou, S. Frillingos and V. Sophianopoulou (2007). "The proline permease of *Aspergillus nidulans*: functional replacement of the native cysteine residues and properties of a cystein-less transporter." *Fungal Genet Biol* **44**: 615-626.

153. 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.
154. 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.
155. 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.
156. Karlin, A. (2001). "SCAM feels the pinch." *J Gen Physiol* **117**: 235-238.
157. Karlin, A. and M. H. Akabas (1998). "Substituted-cysteine accessibility method." *Methods Enzymol* **293**: 123-145.
158. Kast, C., V. Canfield, R. Levenson and P. Gros (1996). "Transmembrane organization of mouse P-glycoprotein determined by epitope insertion and immunofluorescence." *J Biol Chem* **271**: 9240-9248.
159. 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.
160. Kavanaugh, M. P. (2004) "Accessing a transporter structure". *Nature* **431** 752-753.
161. Kim, H., K. Melén, M. Osterberg and G. von Heijne (2006). "A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome." *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11142-11147.
162. 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.
163. Klug, C. S., W. Su and J. B. Feix (1997). "Mapping of the residues involved in a proposed beta-strand located in the ferric enterobactin receptor FepA using site-directed spin-labeling." *Biochemistry* **36**: 13027-13033.
164. Knol, J., L. Veenhoff, W. J. Liang, P. J. Henderson, G. Leblanc and B. Poolman (1996). "Unidirectional reconstitution into detergent-destabilized liposomes of the purified lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*." *J Biol Chem* **271**: 15358-15366.
165. Kong, W., K. Engel and J. Wang (2004). "Mammalian nucleoside transporters." *Curr Drug Metab* **5**: 63-84.
166. Konings, W. N., E. M. Jr., Barnes, and H. R. Kaback (1971). Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. 2. The coupling of reduced phenazine methosulfate to the concentrative uptake of beta-galactosides and amino acids. *J. Biol. Chem.* **246**: 5857-5861.
167. 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.

168. Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne and E. L. Sonnhammer (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." *J Mol Biol* **305**: 567-580.
169. Kumar, A., N. K. Tyagi and R. K. Kinne (2007). "Ligand-mediated conformational changes and positioning of tryptophans in reconstituted human sodium/D-glucose cotransporter1 (hSGLT1) probed by tryptophan fluorescence." *Biophys Chem* **127**: 69-77.
170. Kwaw, I., K. C. Zen, Y. Hu and H. R. Kaback (2001). "Site-directed sulfhydryl labeling of the lactose permease of *Escherichia coli*: helices IV and V that contain the major determinants for substrate binding." *Biochemistry* **40**: 10491-10499.
171. Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J Mol Biol* **157**: 105-132.
172. 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.
173. Landolt-Marticorena, C. and R. A. Reithmeier (1994). "Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins." *Biochem J* **302**: 253-260.
174. Latif, S., N. Aslam, F. Bashir and R. Ahmed (2008). "Unusual oropharyngeal foreign body." *J Coll Physicians Surg Pak* **18**: 719-720.
175. LeBlanc, H. N. and J. T. Beatty (1996). "Topological analysis of the *Rhodobacter capsulatus* PucC protein and effects of C-terminal deletions on light-harvesting complex II." *J Bacteriol* **178**: 4801-4806.
176. Lee, C. S., M. C. Southey, K. Waters, G. Kannourakis, T. Georgiou, J. E. Armes, C. W. Chow and D. J. Venter (1996). "EWS/FLI-1 fusion transcript detection and MIC2 immunohistochemical staining in the diagnosis of Ewing's sarcoma." *Pediatr Pathol Lab Med* **16**: 379-392.
177. 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.
178. Lewinson, O., A. T. Lee and D. C. Rees (2008). "The funnel approach to the precrystallization production of membrane proteins." *J Mol Biol* **377**: 62-73.
179. Lewis, S. E., L. L. Listenberger, D. S. Ory and J. E. Schaffer (2001). "Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1." *J Biol Chem* **276**: 37042-37050.
180. 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.
181. 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
182. 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.
183. 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.

184. Loo, T. W. and D. M. Clarke (2006). "Using a cysteine-less mutant to provide insight into the structure and mechanism of CFTR." *J Physiol* **572**: 312-312.
185. Loo, T. W. and D. M. Clarke (1995). "Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein." *J Biol Chem* **270**: 843-848.
186. Loo, D. D., B. A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla and E. M. Wright (2005). "Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter." *J Gen Physiol* **125**: 13-36.
187. Luecke, H., B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler and J. K. Lanyi (1999). "Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution." *J Mol Biol* **291**: 899-911.
188. Lutsenko, S., S. Daoud and J. H. Kaplan (1997). "Identification of two conformationally sensitive cysteine residues at the extracellular surface of the Na,K-ATPase alpha-subunit." *J Biol Chem* **272**: 5249-5255.
189. Mansfield, T. A., N. P. Schultes and G. S. Mourad (2009). "AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*." *FEBS Lett* **583**: 481-486.
190. 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.
191. 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.
192. Martinussen, J., J. Schallert, B. Andersen and K. Hammer (2001). "The pyrimidine operon pyrRBP-carA from *Lactococcus lactis*." *J Bacteriol* **183**: 2785-2794.
193. Maser, P., C. Sutterlin, A. Kralli and R. Kaminsky (1999). "A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance." *Science* **285**: 242-244.
194. Matos, M., M. C. Fann, R. T. Yan and P. C. Maloney (1996). "Enzymatic and biochemical probes of residues external to the translocation pathway of UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **271**: 18571-18575.
195. Matthews, T. and R. Boehme (1988). "Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir." *Rev Infect Dis* **10** Suppl 3: S490-494.
196. 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.
197. Mazer, M. J., F. E. Carroll and T. H. Falke (1988). "Practical aspects of gated magnetic resonance imaging of the pulmonary artery." *J Thorac Imaging* **3**: 73-84.
198. McGuffin, L. J., K. Bryson and D. T. Jones (2000). "The PSIPRED protein structure prediction server." *Bioinformatics* **16**: 404-405.
199. 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.
200. Melén, K., A. Krogh and G. von Heijne (2003). "Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms." *J Mol Biol* **327**: 735-744.

201. 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.
202. Mueller, J. and J. Rydstrom (1999). "The membrane topology of proton-pumping *Escherichia coli* transhydrogenase determined by cysteine labeling." *J Biol Chem* **274**: 19072-19080.
203. 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.
204. Moller, S., M. D. Croning and R. Apweiler (2001). "Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions." *Bioinformatics* **17**: 646-653.
205. Moncoq, K., C. A. Trieber and H. S. Young (2007). "The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump." *J Biol Chem* **282**: 9748-9757.
206. Morrison, K. L. and G. A. Weiss (2001). "Combinatorial alanine-scanning." *Curr Opin Chem Biol* **5**: 302-307.
207. Morrow, J. A., M. L. Segall, S. Lund-Katz, M. C. Phillips, M. Knapp, B. Rupp and K. H. Weisgraber (2000). "Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain." *Biochemistry* **39**: 11657-11666.
208. 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.
209. Murakami, S. and A. Yamaguchi (2003). "Multidrug-exporting secondary transporters." *Curr Opin Struct Biol* **13**: 443-452.
210. 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.
211. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." *Nature* **419**: 587-593.
212. Nagamori, S., J. L. Vazquez-Ibar, A. B. Weinglass and H. R. Kaback (2003). "In vitro synthesis of lactose permease to probe the mechanism of membrane insertion and folding." *J Biol Chem* **278**: 14820-14826.
213. Nanatani, K., P. C. Maloney and K. Abe (2009). "Structural and functional importance of transmembrane domain 3 (TM3) in the aspartate:alanine antiporter AspT: topology and function of the residues of TM3 and oligomerization of AspT." *J Bacteriol* **191**: 2122-2132.
214. 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.
215. 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.
216. Nie, Y., Y. Zhou and H. R. Kaback (2009). "Clogging the periplasmic pathway in LacY." *Biochemistry* **48**: 738-743.
217. Nikaido, H. (2000). "How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells?" *Trends Microbiol* **8**: 481-483.

218. Nilsson, J., B. Persson and G. von Heijne (2002). "Prediction of partial membrane protein topologies using a consensus approach." *Protein Sci* **11**: 2974-2980.
219. Nilsson, J., B. Persson and G. von Heijne (2000). "Consensus predictions of membrane protein topology." *FEBS Lett* **486**: 267-269.
220. 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.
221. Nyysönen, 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.
222. Oda, M. N., T. M. Forte, R. O. Ryan and J. C. Voss (2003). "The C-terminal domain of apolipoprotein A-1 contains a lipid-sensitive conformational trigger." *Nature Struct Biol* **10**: 455-460.
223. Olami, Y., A. Rimon, Y. Gerchman, A. Rothman and E. Padan (1997). "Histidine 225, a residue of the NhaA-Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* is exposed and faces the cell exterior." *J Biol Chem* **272**: 1761-1768.
224. Olesen, C., M. Picard, A. M. Winther, C. Gyrop, J. P. Morth, C. Oxvig, J. V. Moller and P. Nissen (2007). "The structural basis of calcium transport by the calcium pump." *Nature* **450**: 1036-1042.
225. 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.
226. 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.
227. Paluszynski, J. P., R. Klassen, M. Rohe and F. Meinhardt (2006). "Various cytosine/adenine permease homologues are involved in the toxicity of 5-fluorocytosine in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **23**: 707-715.
228. Pantazopoulou, A. and G. Diallinas (2007). "Fungal nucleobase transporters." *FEMS Microbiol Rev* **31**: 657-675.
229. 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.
230. Papageorgiou, I., C. Gournas, A. Vlanti, 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.
231. 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.
232. Papakostas, K., E. Georgopoulou and S. Frillingos (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.
233. Pea, F. (2005). "Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions." *Contrib Nephrol* **147**: 35-46.

234. 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.
235. 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.
236. Persson, B. and P. Argos (1997). "Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments." *J Protein Chem* **16**: 453-457.
237. Petsko, G. A. and A. R. Rees (1989). "Second structure determinations." *Protein Eng* **3**: 67.
238. Pinson, B., C. Napias, J. Chevallier, P. J. Van den Broek and D. Brethes (1997). "Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cytosine transporter using energizable plasma membrane vesicles." *J Biol Chem* **272**: 28918-28924.
239. Poelarends, G. J. and W. N. Konings (2002). "The transmembrane domains of the ABC multidrug transporter LmrA form a cytoplasmic exposed, aqueous chamber within the membrane." *J Biol Chem* **277**: 42891-42898.
240. Poolman, B., E. R. Geerstma, and D. J. Slotboom (2007). "Biochemistry: a missing link in protein evolution". *Science* **315**: 1229-1231.
241. Prilusky, J. and E. Bibi (2009). "Studying membrane proteins through the eyes of the genetic code revealed a strong uracil bias in their coding mRNAs." *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 6662-6666.
242. Rapp, M., S. Seppala, E. Granseth and G. von Heijne (2007). "Emulating membrane protein evolution by rational design." *Science* **315**: 1282-1284.
243. Rapp, M., E. Granseth, S. Seppala and G. von Heijne (2006). "Identification and evolution of dual-topology membrane proteins." *Nature Struct Mol Biol* **13**: 112-116.
244. Raunser, S., M. Appel, C. Ganea, U. Geldmacher-Kaufner, K. Fendler and W. Kuhlbrandt (2006). "Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshii*." *Biochemistry* **45**: 12796-12805.
245. 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.
246. Ressler, S., A. C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vonrhein, V. Ott and C. Ziegler (2009). "Molecular basis of transport and regulation in the Na⁽⁺⁾/betaine symporter BetP." *Nature* **458**: 47-52.
247. 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.
248. Rott, K. T. and C. A. Agudelo (2003). "Gout." *JAMA* **289**: 2857-2860.
249. Rudnick, G. (2006). "What is an antidepressant binding site doing in a bacterial transporter?". *ACS Chem Biol*. **2**, 606-609.
250. 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.
251. Sahin-Tóth, M., S. Frillingos, M. C. Lawrence and H. R. Kaback (2000). "The sucrose permease of *Escherichia coli*: Functional significance of cysteine residues and properties of a Cys-less transporter." *Biochemistry* **39**: 6164-6169.

252. Sahin-Tóth, M., R. L. Dunten and H. R. Kaback (1995a). "Design of a membrane protein for site-specific proteolysis: properties of engineered factor Xa protease sites in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **34**: 1107-1112.
253. Sahin-Tóth, M., S. Frillingos, J. W. Lengeler and H. R. Kaback (1995b). "Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12." *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 1116-1123.
254. Sahin-Tóth, M., B. Persson, J. Schwieger, P. Cohan and H. R. Kaback (1994). "Cysteine scanning mutagenesis of the N-terminal 32 amino acid residues in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Protein Sci* **3**: 240-247.
255. Saier, M. H., Jr., C. V. Tran and R. D. Barabote (2006). "TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information." *Nucleic Acids Res* **34**: D181-186.
256. 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.
257. Saier, M. H., Jr. (2000). "Families of transmembrane sugar transport proteins." *Mol Microbiol* **35**: 699-710.
258. Sanchez, M. A., S. Drutman, M. van Ampting, K. Matthews and S. M. Landfear (2004a). "A novel purine nucleoside transporter whose expression is up-regulated in the short stumpy form of the *Trypanosoma brucei* life cycle." *Mol Biochem Parasitol* **136**: 265-272.
259. Sanchez, M. A., R. Tryon, S. Pierce, G. Vasudevan and S. M. Landfear (2004b). "Functional expression and characterization of a purine nucleobase transporter gene from *Leishmania major*." *Mol Membr Biol* **21**: 11-18.
260. Sanchez, M. A., B. Ullman, S. M. Landfear and N. S. Carter (1999). "Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **274**: 30244-30249.
261. 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.
262. Sato, K., K. Fukushi, H. Shinotoh, S. Nagatsuka, N. Tanaka, A. Aotsuka, T. Ota, T. Shiraishi, S. Tanada, M. Iyo and T. Irie (2004). "Evaluation of simplified kinetic analyses for measurement of brain acetylcholinesterase activity using N-[¹¹C]Methylpiperidin-4-yl propionate and positron emission tomography." *J Cereb Blood Flow Metab* **24**: 600-611.
263. Sato, Y., Y. W. Zhang, A. Androutsellis-Theotokis and G. Rudnick (2004). "Analysis of transmembrane domain 2 of rat serotonin transporter by cysteine scanning mutagenesis." *J Biol Chem* **279**: 22926-22933.
264. Savini, I., A. Rossi, C. Pierro, L. Avigliano and M. V. Catani (2008). "SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake." *Amino Acids* **34**: 347-355.
265. Scazzocchio, C. (1994). "The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation." *Prog Ind Microbiol* **29**: 221-257.

266. Schlesinger, N. (2004). "Clues to pathogenesis of fibromyalgia in patients with sickle cell disease." *J Rheumatol* **31**: 598-600.
267. Schroers, A., R. Kramer and H. Wohlrab (1997). "The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine." *J Biol Chem* **272**: 10558-10564.
268. 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.
269. Sennhauser, G., M. A. Bukowska, C. Briand and M. G. Grutter (2009). "Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Mol Biol* **389**: 134-145.
270. Seok, Y. J., M. Sondej, P. Badawi, M. S. Lewis, M. C. Briggs, H. Jaffe and A. Peterkofsky (1997). "High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr." *J Biol Chem* **272**: 26511-26521.
271. Seelert, H., A. Poetsch, N. A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg and D. J. Muller (2000). "Structural biology: proton-powered turbine of a plant motor." *Nature* **405**: 418-419.
272. Sevanian, A., K. J. Davies and P. Hochstein (1991). "Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid." *Am J Clin Nutr* **54**: 1129S-1134S.
273. Shi, L., M. Quick, Y. Zhao, H. Weinstein and J. A. Javitch (2008). "The mechanism of a neurotransmitter:sodium symporter--inward release of Na⁺ and substrate is triggered by substrate in a second binding site." *Mol Cell* **30**: 667-677.
274. 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.
275. Shuman, H. A. (1980). "The use of gene fusions of study of bacterial transport proteins." *J Membr Biol* **61**: 1-11.
276. Singh, S. K. (2008). "LeuT: a prokaryotic stepping stone on the way to a eukaryotic neurotransmitter structure." *Channels (Austin)* **2**: 380-389.
277. 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.
278. Singh, S. K., A. Yamashita and E. Gouaux (2007). "Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters." *Nature* **448**: 952-956.
279. Slotboom, D. J., W. N. Konings and J. S. Lolkema (2001). "Cysteine scanning mutagenesis reveals a highly amphipathic, pore-lining membrane-spanning helix in the glutamate transporter GltT." *J Biol Chem* **276**: 10775-10781.
280. 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.
281. 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.
282. Smirnova, I. N., V. Kasho and H. R. Kaback (2008). "Protonation and sugar binding to LacY." *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 8896-8901.
283. Smirnova, I. N., V. N. Kasho and H. R. Kaback (2006). "Direct sugar binding to LacY measured by resonance energy transfer." *Biochemistry* **45**: 15279-15287.

284. Sondej, M., A. B. Weinglass, A. Peterkofsky and H. R. Kaback (2002). "Binding of enzyme IIAGlc, a component of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system, to the *Escherichia coli* lactose permease." *Biochemistry* **41**: 5556-5565.
285. Sondej, M., J. Sun, Y. J. Seok, H. R. Kaback and A. Peterkofsky (1999). "Deduction of consensus binding sequences on proteins that bind IIAGlc of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by cysteine scanning mutagenesis of *Escherichia coli* lactose permease." *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3525-3530.
286. Song, D., J. W. Dolan, Y. L. Yuan and S. Fields (1991). "Pheromone-dependent phosphorylation of the yeast STE12 protein correlates with transcriptional activation." *Genes Dev* **5**: 741-750.
287. Sorgen, P. L., Y. Hu, L. Guan, H. R. Kaback and M. E. Girvin (2002). "An approach to membrane protein structure without crystals." *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 14037-14040.
288. Sotiriou, S., S. Gispert, J. Cheng, Y. Wang, A. Chen, S. Hoogstraten-Miller, G. F. Miller, O. Kwon, M. Levine, S. H. Guttentag and R. L. Nussbaum (2002). "Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival." *Nature Med* **8**: 514-517.
289. 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.
290. Stein, A., G. Vaseduvan, N. S. Carter, B. Ullman, S. M. Landfear and M. P. Kavanaugh (2003). "Equilibrative nucleoside transporter family members from *Leishmania donovani* are electrogenic proton symporters." *J Biol Chem* **278**: 35127-35134.
291. 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.
292. Stuer-Lauridsen, B. and P. Nygaard (1998). "Purine salvage in two halophilic archaea: characterization of salvage pathways and isolation of mutants resistant to purine analogs." *J Bacteriol* **180**: 457-463.
293. Sun, J., J. Voss, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1999). "Proximity between periplasmic loops in the lactose permease of *Escherichia coli* as determined by site-directed spin labeling." *Biochemistry* **38**: 3100-3105.
294. Tamura, N., S. Konishi, S. Iwaki, T. Kimura-Someya, S. Nada and A. Yamaguchi (2001). "Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter." *J Biol Chem* **276**: 20330-20339.
295. Tavoulari, S. and S. Frillingos (2008). "Substrate selectivity of the melibiose permease (MelY) from *Enterobacter cloacae*." *J Mol Biol* **76**: 681-693
296. 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.

297. 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.
298. Terkeltaub, R. A. (2003). "Questions & answers. What's the difference between gout and pseudogout?" *Health News* **9**: 16.
299. Thanassi, D. G., L. W. Cheng and H. Nikaido (1997). "Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **179**: 2512-2518.
300. Tlapak-Simmons, V. L., B. A. Baggenstoss, T. Clyne and P. H. Weigel (1999). "Purification and lipid dependence of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*." *J Biol Chem* **274**: 4246-4253.
301. Traxler, B., D. Boyd and J. Beckwith (1993). "The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins." *J Membr Biol* **132**: 1-11.
302. 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.
303. Turner, R. J., Y. Lu and R. L. Switzer (1994). "Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (pyr) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism." *J Bacteriol* **176**: 3708-3722.
304. Tusnady, G. E. and I. Simon (2001). "The HMMTOP transmembrane topology prediction server." *Bioinformatics* **17**: 849-850.
305. Tyagi, N. K., A. Kumar, P. Goyal, D. Pandey, W. Siess and R. K. Kinne (2007). "D-Glucose-recognition and phlorizin-binding sites in human sodium/D-glucose cotransporter 1 (hSGLT1): a tryptophan scanning study." *Biochemistry* **46**: 13616-13628.
306. Ujwal, M. L., H. Jung, E. Bibi, C. Manoil, C. Altenbach, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1995). "Membrane topology of helices VII and XI in the lactose permease of *Escherichia coli* studied by lacY-phoA fusion analysis and site-directed spectroscopy." *Biochemistry* **34**: 14909-14917.
307. Unkles, S. E., D. A. Rouch, Y. Wang, M. Y. Siddiqi, M. Okamoto, R. M. Stephenson, J. R. Kinghorn and A. D. Glass (2005). "Determination of the essentiality of the eight cysteine residues of the NrtA protein for high-affinity nitrate transport and the generation of a functional cysteine-less transporter." *Biochemistry* **44**: 5471-5477.
308. Valiyaveetil, F. I. and R. H. Fillingame (1998). "Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase." *J Biol Chem* **273**: 16241-16247.
309. 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
310. 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.
311. Vangelatos, I., D. Vlachakis, V. Sophianopoulou, and G. Diallinas (2009). "Modeling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters". *Mol Membr Biol*, in press.
312. Varma, S., K. Sobey, C. Campbell and S.-M. Kuo (2009). "Hierarchical contribution of N- and C-terminal sequences to the differential localization of homologous

- sodium-dependent vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells." *Biochemistry* **47**, in press.
313. 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.
 314. Vasudevan, G., N. S. Carter, M. E. Drew, S. M. Beverley, M. A. Sanchez, A. Seyfang, B. Ullman and S. M. Landfear (1998). "Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9873-9878.
 315. Velho, A. M., and S. M. Jarvis (2009). "Topological studies of hSVCT1, the human sodium-dependent vitamin C transporter and the influence of *N*-glycosylation on its intracellular targeting." *Exp Cell Res* **315**: 2312-2321.
 316. 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.
 317. Viitanen, P. V., H. K. Sarkar, D. Menick, W. R. Trumble, E. Padan, W. McComas, M. Poonian and H. R. Kaback (1985). "Site-directed mutagenesis of the lacY gene of *Escherichia coli*." *Ann NY Acad Sci* **456**: 307-308.
 318. 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.
 319. Vogels, G. D. and C. Van der Drift (1976). "Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms." *Bacteriol Rev* **40**: 403-468.
 320. von Heijne, G. (2006). "Membrane-protein topology." *Nature Rev Mol Cell Biol* **7**: 909-918.
 321. Voss, J., W. L. Hubbell, J. Hernandez-Borrell and H. R. Kaback (1997). "Site-directed spin-labeling of transmembrane domain VII and the 4B1 antibody epitope in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **36**: 15055-15061.
 322. Voss, J., M. M. He, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1996). "Site-directed spin labeling demonstrates that transmembrane domain XII in the lactose permease of *Escherichia coli* is an alpha helix." *Biochemistry* **35**: 12915-12918.
 323. Voss, J., W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1995a). "Distance determination in proteins using designed metal ion binding sites and site-directed spin labeling: application to the lactose permease of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12300-12303.
 324. Voss, J., L. Salwinski, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1995b). "A method for distance determination in proteins using a designed metal ion binding site and site-directed spin labeling: evaluation with T4 lysozyme." *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12295-12299.
 325. Wang, Q. and H. R. Kaback (1999). "Location of helix III in the lactose permease of *Escherichia coli* as determined by site-directed thiol cross-linking." *Biochemistry* **38**: 16777-16782.
 326. Wang, Q., J. Voss, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1998). "Proximity of helices VIII (Ala273) and IX (Met299) in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **37**: 4910-4915.

327. Wang, Q., K. Matsushita, B. de Foresta, M. le Maire and H. R. Kaback (1997). "Ligand-induced movement of helix X in the lactose permease from *Escherichia coli*: a fluorescence quenching study." *Biochemistry* **36**: 14120-14127.
328. Wang, X., M. Bogdanov and W. Dowhan (2002). "Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition." *EMBO J* **21**: 5673-5681.
329. 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.
330. Weissborn, A. C., M. C. Botfield, M. Kuroda, T. Tsuchiya and T. H. Wilson (1997). "The construction of a cysteine-less melibiose carrier from *E. coli*." *Biochim Biophys Acta* **1329**: 237-244.
331. Weitzman, C., T. G. Consler and H. R. Kaback (1995). "Fluorescence of native single-Trp mutants in the lactose permease from *Escherichia coli*: structural properties and evidence for a substrate-induced conformational change." *Protein Sci* **4**: 2310-2318.
332. Welply, J. K., P. Shenbagamurthi, W. J. Lennarz and F. Naider (1983). "Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides." *J Biol Chem* **258**: 11856-11863.
333. 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.
334. Wortmann, R. L. (2005). "Recent advances in the management of gout and hyperuricemia." *Curr Opin Rheumatol* **17**: 319-324.
335. Wright, E. M., B. A. Hirayama and D. F. Loo (2007). "Active sugar transport in health and disease." *J Intern Med* **261**: 32-43.
336. Wu, J. and H. R. Kaback (1996). "A general method for determining helix packing in membrane proteins in situ: helices I and II are close to helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14498-14502.
337. Wu, J. and H. R. Kaback (1994). "Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 2. Site-directed fluorescence studies." *Biochemistry* **33**: 12166-12171.
338. Wu, J., S. Frillingos and H. R. Kaback (1995). "Dynamics of lactose permease of *Escherichia coli* determined by site-directed chemical labeling and fluorescence spectroscopy." *Biochemistry* **34**: 8257-8263.
339. Wu, J., S. Frillingos, J. Voss and H. R. Kaback (1994). "Ligand-induced conformational changes in the lactose permease of *Escherichia coli*: evidence for two binding sites." *Protein Sci* **3**: 2294-2301.
340. Wu, J., L. S. Tisa and B. P. Rosen (1992). "Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase." *J Biol Chem* **267**: 12570-12576.
341. 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.

342. Yagur-Kroll, S. and O. Amster-Choder (2005). "Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* beta-glucoside transporter BglF." *J Biol Chem* **280**: 19306-19318.
343. 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.
344. Yan, R. T. and P. C. Maloney (1993). "Identification of a residue in the translocation pathway of a membrane carrier." *Cell* **75**: 37-44.
345. Yao, S. Y., A. M. Ng, M. F. Vickers, M. Sundaram, C. E. Cass, S. A. Baldwin and J. D. Young (2002). "Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation." *J Biol Chem* **277**: 24938-24948.
346. 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.
347. 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.
348. Yernool, D., O. Boudker, Y. Jin and E. Gouaux (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." *Nature* **431**: 811-818.
349. 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.
350. Young, J. D., S. Y. Yao, L. Sun, C. E. Cass and S. A. Baldwin (2008). "Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins." *Xenobiotica* **38**: 995-1021.
351. Zalkin, H. and P. Nygaard (1996). "Biosynthesis of purine nucleosides", pp 561-579. In F. C. Neidhardt *et al.* (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, American Society for Microbiology, Washington, DC.
352. Zampighi, G., J. Kyte and W. Freytag (1984). "Structural organization of (Na⁺ + K⁺)-ATPase in purified membranes." *J Cell Biol* **98**: 1851-1864.
353. Zeisig, R., A. Röss, I. Fichtner and W. Walther (2003). "Lipoplexes with alkylphospholipid as new helper lipid for efficient in vitro and in vivo gene transfer in tumor therapy." *Cancer Gene Ther* **10**: 302-311.
354. Zen, K. H., T. G. Consler and H. R. Kaback (1995). "Insertion of the polytopic membrane protein lactose permease occurs by multiple mechanisms." *Biochemistry* **34**: 3430-3437.
355. 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.
356. Zhang, W., M. Bogdanov, J. Pi, A. J. Pittard and W. Dowhan (2003). "Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition." *J Biol Chem* **278**: 50128-50135.

357. Zhao, F. Q. and A. F. Keating (2007). "Functional properties and genomics of glucose transporters." *Curr Genomics* **8**: 113-128.
358. Zhao, M., K. C. Zen, J. Hernandez-Borrell, C. Altenbach, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1999a). "Nitroxide scanning electron paramagnetic resonance of helices IV and V and the intervening loop in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **38**: 15970-15977.
359. Zhao, M., K. C. Zen, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1999b). "Proximity between Glu126 and Arg144 in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **38**: 7407-7412.
360. Zhou, M., L. Xia, K. Engel and J. Wang (2007). "Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family." *J Biol Chem* **282**: 3188-3195.
361. 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.
362. 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*, in press.
363. 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.
364. 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.
365. 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
366. 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