



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Λειτουργικός-Κλινικοεργαστηριακός
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας

Σχέσεις δομής-λειτουργίας και εξέλιξης στους
μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2

Μαρία Μπότου

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2016



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η έρευνα αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από ελληνικούς εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) για την χρηματοδότηση της Έρευνας: πρόγραμμα ΘΑΛΗΣ, επένδυση στην γνώση μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Λειτουργικός-Κλινικοεργαστηριακός
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας

Σχέσεις δομής-λειτουργίας και εξέλιξης στους
μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2

Μαρία Μπότου

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2016

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μπότου Μαρίας: 6-12-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 726^α/17-1-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φριλίγγος Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Κούκκου Άννα-Ειρήνη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 6-2-2012

«Σχέσεις δομής –λειτουργίας και εξέλιξης στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 785^α/9-2-2016

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Διαλλινάς Γεώργιος	Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκκου Άννα –Ειρήνη,	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή,	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φλεμετάκης Εμμανουήλ.	Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-5-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



Μαρία Καπιτοπούλου
ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από ελληνικούς εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) για την χρηματοδότηση της Έρευνας: πρόγραμμα ΘΑΛΗΣ, επένδυση στην γνώση μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο για την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του όλα αυτά τα χρόνια που συνεργαστήκαμε αρχικά στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας και στη συνέχεια στην Διδακτορική μου διατριβή. Συναναστρεφόμενη μαζί του όλα αυτά τα χρόνια έμαθα πολλά πράγματα που δεν περιορίζονται αυστηρά στα πλαίσια της επιστημονικής έρευνας.

Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, για την πολύ καλή συνεργασία. Τον κ. Φλεμετάκη ευχαριστώ ιδιαίτερα και για την ευκαιρία που μου έδωσε, παράλληλα με τη Διδακτορική μου διατριβή, να ασχοληθώ την μελέτη μεταφορέων από φυτικούς οργανισμούς δίνοντας μου έτσι την ευκαιρία να γνωρίσω από μια άλλη σκοπιά τον κόσμο των φυτών.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας και των υπόλοιπων ερευνητικών ομάδων που συναναστράφηκα στο χώρο του Πανεπιστημίου, καθώς επίσης και την Δρ. Αικ. Καλλιαμπάκου, από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για την αποτελεσματική συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια της μελέτης των αζωτοδεσμευτικών ριζοβακτηρίων και των φυτικών μεταφορέων. Σημαντική ήταν και η συνεργασία μου με τους Δρ. Γ. Μερμελέκα και Αικ. Γεωργοπούλου που με καθοδήγησαν στα πρώτα ερευνητικά μου βήματα καθώς επίσης και με τον Δρ. Κ. Παπακώστα για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια, ακόμη και όταν συνέχισε για μεταδιδακτορική έρευνα εκτός Ελλάδος.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα Κατερίνα Καρενά-Ευσταθίου για το ενδιαφέρον και την βοήθειά της – η στήριξή της ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειάς μου – και την υποψήφια διδάκτορα Ναταλία Κιτσάτη που μαζί περάσαμε χαρούμενες αλλά και δύσκολες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου αφενός γιατί με έμαθαν να βάζω στόχους και να τους επιτυγχάνω και αφετέρου γιατί χωρίς την υποστήριξή τους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα από όσα έχω πετύχει μέχρι σήμερα.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Ο ρόλος και η σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων.....	23
1.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδίων ή νουκλεοτιδικών βάσεων.....	26
1.2.1 Μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NCS1.....	28
1.2.2 Το δομικό πρότυπο στην οικογένεια NCS1.....	28
1.3 Η οικογένεια NAT/NCS2	30
1.3.1 Το δομικό πρότυπο της οικογένειας NAT/NCS2.....	32
1.4 Βακτηριακοί και ευκαρυωτικοί μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2.....	38
1.4.1 Τα αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια <i>Sinorhizobium meliloti</i> και <i>Mesorhizobium loti</i>	39
1.4.2 Το εντεροβακτήριο <i>Escherichia coli</i> K-12 και οι μεταφορείς πουρινών.....	42
Ο καταβολισμός των πυριμιδινών στην <i>E.coli</i>	43
Ρύθμιση του μεταβολισμού πουρινών στην <i>E.coli</i> από το μεταγραφικό παράγοντα PurR.....	45
1.5 Μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 από θηλαστικά.....	47
1.6 Ο μεταφορέας XanQ της <i>E.coli</i> ως βάση για την μελέτη της οικογένειας NAT/NCS2	49
1.6.1 Ανάλυση κυστεϊνικής σάρωσης	49
1.6.2 Οι σημαντικές για την λειτουργία θέσεις του μεταφορέα XanQ στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος	50
1.7 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	53

Κεφάλαιο 2:Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Όργανα.....	57
2.2 Χημικά αναλώσιμα.....	59
2.3 Διαλύματα.....	61
2.4 Ρυθμιστικά διαλύματα πειραμάτων εξάρτησης από pH.....	62
2.5 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	64
2.6 Τεχνικές ανασυνδιασμένου DNA.....	67
2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	67
2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension).....	69
2.6.3 Κατασκευή ανασυνδιασμένου DNA.....	79
2.6.4 Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων.....	79
2.6.5 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	80
2.7 Επιλογή κατάλληλου στελέχους <i>E.coli</i> για πειράματα ενεργού μεταφοράς....	81

2.8 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς (transport assay) σε βακτηριακά ομόλογα.....	82
2.8.1 Μέτρηση ενεργότητας.....	82
2.8.2 Μέτρηση ενεργότητας σε αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια ελεύθερης καλλιέργειας.....	83
2.8.3 Κινητική ανάλυση.....	83
2.8.4 Μέτρηση ενεργότητας σε εύρος pH.....	84
2.8.5 Πειράματα ανταγωνισμού.....	84
2.8.6 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων.....	85
2.8.7 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων παρουσία υποστρώματος.....	86
2.9 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών.....	87
2.10 Ανάλυση πρωτεϊνών.....	88
2.10.1 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών.....	88
2.10.2 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	88
2.10.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	89
2.11 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας.....	90
2.11.1 Τα κύτταρα HEK293.....	90
2.11.2 Συνθήκες καλλιέργειας και διατήρηση κυτταρικών σειρών.....	90
2.11.3 Μέτρηση κυττάρων.....	90
2.11.4 Το σύστημα των HEK293 για την μελέτη του μεταφορέα rSNBT1.....	91
2.12 Κατασκευή κυτταρικών σειρών HEK293 σταθερής διαμόλυνσης.....	92
2.13 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς υποστρωμάτων σε κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης.....	93
2.14 In silico ανάλυση.....	94

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Συνοπτική παρουσίαση νέων μεταφορέων που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά ή/και μελετήθηκαν διεξοδικότερα.....	97
3.2 Ταυτοποίηση και ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 από το <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021.....	100
3.2.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 από το <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021.....	100
3.2.2 Το <i>S.meliloti</i> χρησιμοποιεί την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου και την προσλαμβάνει μέσω του SmLL9.....	105
3.2.3 Μεταλλαξιγένεση του SmLL9 σε δυνητικά σημαντικές θέσεις για την λειτουργία.....	109
Στόχοι μεταλλαξιγένεσης.....	109
Οι θέσεις E262, D266, D290, Q310 και N311 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες.....	112

3.2.4 Τα μεταλλάγματα A265C, A309C, S417C έχουν υψηλή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM.....	115
3.2.5 Το μετάλλαγμα S93N αναγνωρίζει με πολύ μικρότερη συγγένεια το ουρικό οξύ σε σχέση με τον SmLL9 αγρίου τύπου.....	119
3.2.6 Οι θέσεις γύρω από το κέντρο δέσμησης στον μεταφορέα SmLL9 έχουν παρόμοιο ρόλο με τις αντίστοιχες θέσεις άλλων ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης ή ουρικού οξέος.....	122
3.3 Μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2252 της <i>Escherichia coli</i> K-12.....	126
3.3.1 Ο PurP μεταφέρει αδενίνη και ο YjcD υποξανθίνη/γουανίνη.....	126
3.3.2 Επιλογή στόχων μεταλλαξιγένεσης.....	130
3.3.3 PurP: D267 και E318 είναι αναντικατάστατα ενώ μεταλλάξεις στις θέσεις A91, T271 και D298 τροποποιούν σε μικρό βαθμό την εξειδίκευση.....	134
3.3.4 YjcD: D271, T275, E322 και S323 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες θέσεις.....	138
3.3.5 Τα κατάλοιπα γύρω από την περιοχή δέσμησης του υποστρώματος συντηρούν εξελικτικά παρόμοιο ρόλο στους μεταφορείς της ομάδας COG2252...	143
3.4 Μελέτη βακτηριακών μεταφορέων ουρακίλης.....	145
3.4.1 Διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων ουρακίλης UraA και RutG της <i>Escherichia coli</i> K-12.....	145
3.4.2 Στόχοι μεταλλαξιγένεσης στους μεταφορείς RutG και UraA	148
3.4.3 Η θέση S72/S87 απαιτεί υδρόφιλο αμινοξύ ενώ η H245/H266 είναι αναντικατάστατη	150
3.4.4 Το μετάλλαγμα F73A αναγνωρίζει ισχυρά την θυμίνη.....	152
3.4.5 Μεταλλαξιγένεση των RutG και UraA σε άλλες θέσεις κοντά στο κέντρο δέσμησης	158
3.4.6 Η εξειδίκευση των βακτηριακών μεταφορέων ουρακίλης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την F73.....	164
3.5 Μελέτη του ευκαρυωτικού μεταφορέα rSNBT1.....	166
3.5.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός σε κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης...	166
3.5.2 Μεταλλαξιγένεση στο μεταφορέα rSNBT1.....	168
Στόχοι μεταλλαξιγένεσης.....	168
Μεταλλαξιγένεση του rSNBT1 στις θέσεις H63 (TM1) και T123 (TM3): Το μετάλλαγμα T123A μεταφέρει μόνο ουρακίλη.....	171
Μεταλλαξιγένεση του rSNBT1 στις θέσεις E347, D351 (TM8), S396, E397, N398 (TM10): Οι θέσεις E347 και D351 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες και το E397Q μεταφέρει μόνο πουρίνες.....	173
3.5.3 Συντήρηση του σημαντικού ρόλου των καταλοίπων E347 και D351 του TM8 και συσχέτιση του E397 (TM10) με την εξειδίκευση για πυριμιδίνες.....	175
3.6 Η εξάρτηση της ενεργότητας του μεταφορέα ξανθίνης XanQ από το pH.....	177

Το μοτίβο της έλικας 8 (TM8).....	177
Το D276E έχει μέγιστη ενεργότητα σε όξινα pH.....	178
Το μεταλλάγμα N93S αλλάζει την ενεργότητα του μεταφορέα σε όξινα pH.....	180
Το D276E σε pH 5.2 πλησιάζει το προφίλ εξειδίκευσης που έχει ο XanQ(wt) σε pH 7.5	182

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

4.1 Χαρακτηρισμός νέων ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 με νέες εξειδικεύσεις.....	187
4.1.1 Οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 από την <i>E.coli</i>	187
Ο RutG έχει ευρύτερη εξειδίκευση από τον UraA.....	187
Διαφορετικοί μεταφορείς για αδενίνη και για γουανίνη/υποξανθίνη.....	188
4.1.2 Οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 από το <i>Sinorhizobium meliloti</i>	190
Ο SmLL9 (COG2233) είναι μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος με ευρεία εξειδίκευση που διαφέρει από τους ομόλογους μεταφορείς της <i>E.coli</i>	190
Ο SmVC3 (COG2252) είναι μεταφορέας αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης με ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης από τους ομόλογους μεταφορείς της <i>E.coli</i>	191
Πιθανός φυσιολογικός ρόλος του SmLL9 κατά την συμβίωση.....	192
4.2 Νέες γνώσεις για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στην οικογένεια NAT/NCS2.....	194
4.2.1 Μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της ομάδας COG2233.....	194
Μοριακή βάση της εξειδίκευσης: πολικό κατάλοιπο στη θέση N93 της TM3 επηρεάζει την αναγνώριση ξανθίνης/ουρικού οξέος.....	198
4.2.2 Μεταφορείς ουρακίλης και/ή θυμίνης ή πυριμιδινών/πουρινών της ομάδας COG2233.....	200
Μοριακή βάση της εξειδίκευσης: μικρό υδρόφοβο κατάλοιπο στη θέση F73 της TM3 καταργεί τη διάκριση ως προς την αναγνώριση ουρακίλης/θυμίνης...	200
Θέσεις που διευρύνουν περαιτέρω την εξειδίκευση των μεταφορέων ουρακίλης και/ή θυμίνης: καθοριστική για τη διάκριση μεταξύ πυριμιδινών και πουρινών στο κέντρο δέσμευσης μπορεί να είναι η θέση E397 (TM10)....	203
4.2.3 Μεταφορείς αδενίνης ή υποξανθίνης/γουανίνης της ομάδας COG2252.....	205
Μοριακή βάση της εξειδίκευσης: Η διάκριση της αναγνώρισης αδενίνης και υποξανθίνης/γουανίνης ίσως συνδέεται με θέσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης.....	206
4.2.4 Συνολική εικόνα για τον ρόλο των καταλοίπων του κέντρου δέσμευσης και γύρω από το κέντρο δέσμευσης στην οικογένεια NAT/NCS2.....	208
Ρόλος των Glu-241(TM8), Asp/His-245 (TM8) και Glu/Gln-290 (TM10).....	209

Ρόλος των His-24 (TM1), Asp/Asn/Glu-245 (TM9) και Asn/Glu-290 (TM10).....	211
Ρόλος των Ser/Asn/Thr-72 (TM3), Phe/Ala-73 (TM3) και Gly/Ala/Ser-289 (TM10).....	213
4.3 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας για τους μεταφορείς NAT/NCS2 σε συνάρτηση με τα μοντέλα μηχανισμών εναλλασσόμενης πρόσβασης.....	214
4.4 Συμπεράσματα-Προοπτικές.....	219
Περίληψη.....	221
Summary	223
Βιβλιογραφία.....	225

Συντμήσεις

Å (angstrom): μονάδα μέτρησης μήκους

ATP (adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη

Avidin- HRP: σύζευγμα αβιδίνης - υπεροξειδάσης

C-less (Cys-less): μεταφορέας χωρίς κατάλοιπα κυστεϊνών

BAD (biotin acceptor domain): περιοχή δέσμησης βιοτίνης

BSA (Bovine Serum Albumin): Αλβουμίνη ορού βοός

DMSO (dimethyl sulfoxide): διμεθυλο - σουλφοξειδίο

DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

EDTA (ethylene dinitrotetra-acetic acid): αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ

E.coli: εντεροβακτήριο *Escherichia coli*

EL (extracellular loop): θηλιά σύνδεσης διαμεμβρανικών τμημάτων προς την περιπλασματική πλευρά

HRP-protein A (horseradish peroxidase-protein A): πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με υπεροξειδάση ραπανιού

IL (intracellular loop): θηλιά σύνδεσης διαμεμβρανικών τμημάτων προς την κυτταροπλασματική πλευρά

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside): ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοσίδιο

kDa (kilo Dalton): μονάδα μέτρησης ατομικής μάζας

KPi: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου

LacY- epitope: επίτοπος LacY – αλληλουχία του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της διαπεράσης λακτόζης LacY

lacZ p/o (promoter/operator): υποκινητής/χειριστής του οπερονίου της λακτόζης

LB: θρεπτικό υλικό Luria Bertani ή Luria Broth

Ip (loop): θηλιά σύνδεσης διαμεμβρανικών τμημάτων

NAT (Nucleobase – Ascorbate Transporter): οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού

NCS1 (Nucleobase - Cation Symporter-1): οικογένεια-1 συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – κατιόντων

NCS2 (Nucleobase-Cation Symporter-2): οικογένεια-2 συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – κατιόντων

NEM (*N*-ethylmaleimide): *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο

PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis): ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

PCR (polymerase chain reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

pH: ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων H^+ ενός διαλύματος

PMS (phenazinemethosulphate): μεθοσουλφονικό φαιναζίνιο

PVDF (polyvinylidene difluoride): διφθοριούχο πολύ-βινυλιδένιο

SDS (sodium dodecyl sulphate): θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο

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

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

TM (transmembrane segment): διαμεμβρανικό τμήμα

wt (wild-type): φυσικού τύπου

Αμινοξέα

A ή Ala: αλανίνη

M ή Met: μεθειονίνη

C ή Cys: κυστεΐνη

N ή Asn: ασπαραγίνη

D ή Asp: ασπαρτικό οξύ

P ή Pro: προλίνη

E ή Glu: γλουταμικό οξύ

Q ή Gln: γλουταμίνη

F ή Phe: φαινυλαλανίνη

R ή Arg: αργινίνη

G ή Gly: γλυκίνη

S ή Ser: σερίνη

H ή His: ιστοιδίνη

T ή Thr: θρεονίνη

I ή Ile: ισολευκίνη

V ή Val: βαλίνη

K ή Lys: λυσίνη

W ή Trp: τρυπτοφάνη

L ή Leu: λευκίνη

Y ή Tyr: τυροσίνη

Ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών

A: αδερίνη

C: Κυτοσίνη

G: Γουανίνη

HX: Υποξανθίνη

T: Θυμίνη

U.A.: Ουρικό οξύ

U: Ουρακίλη

X: Ξανθίνη

Pu: Πουρίνη

1-MG: 1-μεθυλογουανίνη

2,6-NP: 2,6-διαμινοπουρίνη

2-mP: 2-μερκαπτοπουρίνη

2-SX: 2-θειοξανθίνη

3-MA: 3-μεθυλοαδερίνη

6-mP: 6-μερκαπτοπουρίνη

6-SG: 6-θειογουανίνη

6-SX: 6-θειοξανθίνη

7-MA: 7-μεθυλοαδερίνη

7-MX: 7-μεθυλοξανθίνη

8azaG: 8-αζαγουανίνη

8azaX: 8-αζαξανθίνη

8BrX: 8-βρωμοξανθίνη

8-MX: 8-μεθυλοξανθίνη

9-MA: 9-μεθελοαδερίνη

Allp: Αλλοπουρινόλη

N⁶-BA: N⁶-βενζοΐλο-αδερίνη

OxP: Οξυπουρινόλη

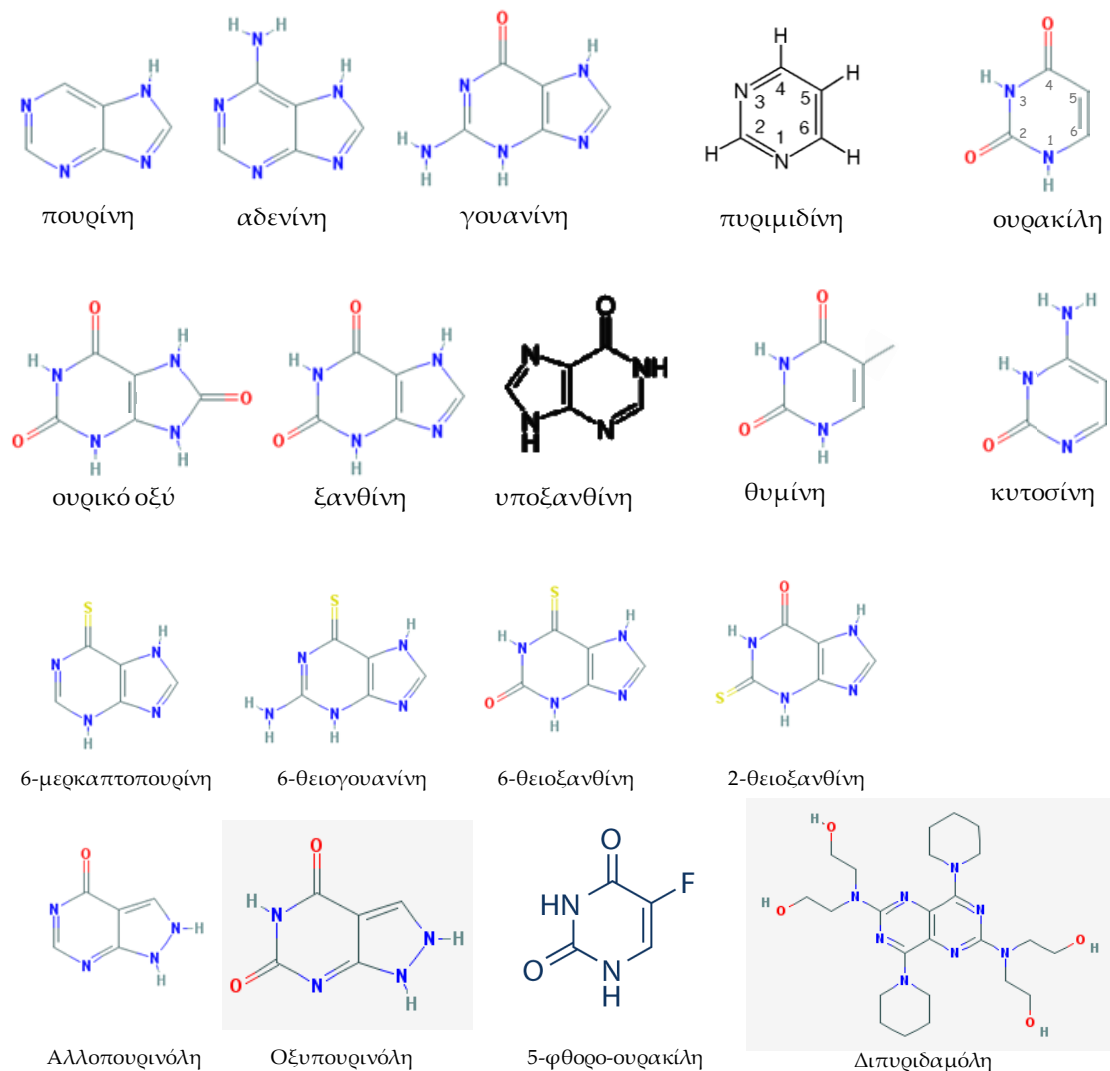
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Ο ρόλος και η σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων

Τα νουκλεοτίδια σχηματίζονται από ένα σάκχαρο (ριβόζη ή δεοξυριβόζη) και μια νουκλεοτιδική βάση καθώς και μία ή περισσότερες ομάδες φωσφορικού και αποτελούν το δομικό στοιχείο των νουκλεϊκών οξέων, δηλαδή του DNA και του RNA. Εκτός αυτού συμμετέχουν σε πολλές άλλες διεργασίες. Από τις νουκλεοτιδικές βάσεις, η αδενίνη εμπεριέχεται στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) το οποίο αποτελεί το ενεργειακό «νόμισμα» των βιολογικών συστημάτων. Αντίστοιχα σημαντικό ρόλο έχει και η τριφωσφορική γουανίνη (GTP) η οποία είναι απαραίτητη στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, στις πορείες μεταγωγής σήματος. Ένας σημαντικός αριθμός βιομορίων, που χρησιμοποιούνται ως συνένζυμα στον μεταβολισμό, όπως τα NAD^+ , NADP^+ , και το συνένζυμο A, περιέχουν ίδιες δομικές μονάδες όπως και το ATP. Παράγωγα νουκλεοτιδίων, συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η UDP-γλυκόζη που χρειάζεται για τον σχηματισμό του γλυκογόνου. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και η κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP) είναι δεύτεροι αγγελιοφόροι που μεταβιβάζουν σήματα τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και μεταξύ διαφορετικών κυττάρων (Berg *et al.*, 2005) και ταυτόχρονα το τελευταίο δρα ως δότης φωσφορικών ομάδων που μεταφέρονται από πρωτεϊνικές κινάσες. Στα βακτήρια, τετραφωσφορικά και πενταφωσφορικά παράγωγα της γουανοσίνης, γνωστά ως (p)ppGpp, λειτουργούν ως στρεσορμόνες (alarmones) σε μηχανισμούς μεταβολικής ρύθμισης και κυτταρικής ομοιοστασίας ως απόκριση σε συνθήκες φυσιολογικού στρες (Haurlyliuk *et al.*, 2014). Στους φυτικούς οργανισμούς εκτός από την σύνθεση του DNA και του RNA η μεταφορά και η αποθήκευση αζώτου με την μορφή ουρεϊδών (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό) εξαρτάται από την βιοσύνθεση και τον καταβολισμό των νουκλεοτιδικών βάσεων (Boland and Schubert, 1983; Tedeger, 2014).

Σημαντικό ρόλο έχουν και οι φυσικές πουρίνες που είναι παράγωγα των νουκλεοτιδικών βάσεων που βρίσκουμε στα νουκλεϊκά οξέα όπως και οι οξειδωμένες μορφές της γουανίνης και της αδενίνης (ξανθίνη και υποξανθίνη) και η πλήρως οξειδωμένη μορφή των πουρινών αυτών (ουρικό οξύ), αλλά και διάφορα άλλα παράγωγα των οξειδωμένων πουρινών. Οι κυτοκινίνες, οι οποίες είναι φυτικές ορμόνες που επάγουν την κυτταρική διαίρεση και την διαφοροποίηση για την ρύθμιση της αύξησης και της οργανογένεσης των φυτών (Mok and Mok, 2001) και η καφεΐνη, ένα αλκαλοειδές της ξανθίνης (1,3,7-τριμεθυλο-ξανθίνη) το οποίο είναι ψυχοενεργό διεγερτικό ναρκωτικό, βρίσκεται στους κόκκους, στα φύλλα, και στους καρπούς ορισμένων φυτών και δρα ως φυσικό φυτοφάρμακο που παραλύει και σκοτώνει ορισμένα έντομα (Sugiyama *et al.*, 2016). Επίσης, η ξανθίνη και η υποξανθίνη μαζί με την αδενίνη και την γουανίνη, μπορούν να αποτελέσουν μοναδική πηγή αζώτου σε αρκετούς

μονοκύτταρους οργανισμούς (Vogels and van der Drift, 1976; Schultz *et al.*, 2001; Pore *et al.*, 2009). Στα θηλαστικά η αδερίνη, η γουανίνη και η υποξανθίνη ανακυκλώνονται για την δημιουργία ATP και GTP και νουκλεϊκών οξέων, ή οξειδώνονται καταβολικά σε ξανθίνη και ουρικό οξύ (Fox and Kelley, 1978). Από αυτά είναι γνωστός ο πολύ σημαντικός ρόλος του ουρικού οξέος στην φυσιολογία του ανθρώπου τόσο για την ομαλή λειτουργία των νεφρών, όσο και για την δράση του ως αντιοξειδωτικό στον ορό του αίματος (de Konning and Diallinas, 2000; Enomoto *et al.*, 2002; Anzai *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.1 Δομές πουρινών και πυριμιδινών. Απεικονίζονται φυσικά και τροποποιημένα ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων.

Συνθετικά ανάλογα πουρινών χρησιμοποιούνται σήμερα ως φάρμακα για την αντιμετώπιση ασθενειών. Παραδείγματα αποτελούν η αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη οι οποίες αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση τελικής σύνθεσης ουρικού οξέος (Spector and Johns, 1970; Pea, 2005; Rajesh *et al.*, 2009). Στηριζόμενοι στον ίδιο μηχανισμό ανάλογα αυτών των φαρμάκων χορηγούνται για την θεραπεία της υπερουριχαιμίας και της ουρικής αρθρίτιδας (Rott and Agutelo, 2003; Bieber and Terkeltaud, 2004; Sclesinger, 2004; Wortmann, 2005). Επίσης είναι ευρέως διαδεδομένη η χρήση των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων acyclovir (9-[(2-υδροξυ-αιθοξυ)μεθυλο]-9H-γουανίνη) (Elion, 1993; Guan *et al.*, 1996; Piret and Boivin, 2011) και ganciclovir (διϋδροξυ-προποξυ-μεθυλο-γουανίνη) (Martin *et al.*, 1983; Matthews and Boehme, 1988) εναντίον των ερπητοϊών γιατί αυτά μπορούν να στοχεύσουν και να αναστείλουν την δράση της ιϊκής DNA πολυμεράσης με συνέπεια να εμποδίζεται η σύνθεση του ιϊκού DNA.

Άλλα ανάλογα πουρινών όπως η 5-φθοροουρακίλη, η 6-μερκαπτοπουρίνη και η 6-θειογουανίνη (Εικόνα 1.1) χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως στον καρκίνο του μαστού, του στομάχου, του εντέρου, του δέρματος αλλά και σε χημειοθεραπείες κατά της λευχαιμίας. Η 5-φθορο-ουρακίλη αναστέλλει την σύνθεση του θυμιδικού, και επομένως εμποδίζει την σύνθεση του DNA στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα (Haydon, 2003; Andre *et al.*, 2004; Grothey and Sargent, 2005). Τέλος έχουν ξεκινήσει κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση παρασίτων με διπυριδαμόλη (César-Razquin *et al.*, 2015) η οποία είναι ειδικός αναστολέας των μεταφορέων της οικογένειας ENT, εμποδίζοντας έτσι την πρόσληψη των απαραίτητων νουκλεοσιδίων από τα παράσιτα που δεν μπορούν να τα συνθέσουν.

1.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοσιδίων ή νουκλεοτιδικών βάσεων

Για να μπορέσουν να προσλάβουν τα απαραίτητα νουκλεοσίδια ή νουκλεοτίδια απαιτούνται ειδικά πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς τους. Τα πρωτεϊνικά αυτά συστήματα είναι διαμεμβρανικοί μεταφορείς οι οποίοι είναι εξειδικευμένοι για την μεταφορά συγκεκριμένων υποστρωμάτων όπως αυτά των Βακτηρίων (Andersen *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2003; Karatza and Frillingos, 2005; Papakostas and Frillingos, 2012; Papakostas *et al.*, 2013), των Μυκήτων (Diallinas *et al.*, 1998; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005, 2006; Kostis *et al.*, 2012; Kryptou *et al.*, 2012, 2014), των Φυτών (Argyrou *et al.*, 2001; Maurino *et al.*, 2006; Mourad *et al.*, 2012), των Μετάζωων (Yao *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2010) και των Πρωτίστων (de Koning *et al.*, 2005; Landfear, 2004, 2009, 2011). Ανάλογα με την εξειδίκευση, τον τρόπο λειτουργίας τους και την φυλογενετική τους εξέλιξη χωρίζονται σε επιμέρους κατηγορίες/οικογένειες.

Πιο συγκεκριμένα για την μεταφορά αυτών των υποστρωμάτων υπάρχουν δύο οικογένειες μεταφορέων νουκλεοσιδίων και τέσσερις οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων. Οι οικογένειες μεταφορέων νουκλεοσιδίων είναι η ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter) και η CNT (Concentrative Nucleoside Transporter). Ομόλογα της οικογένειας ENT έχουν βρεθεί μόνο σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε μύκητες, φυτά, πρωτόζωα, νηματώδεις σκώληκες και θηλαστικά. Έχουν ευρεία εξειδίκευση όπως παραδείγματος χάρη το ανθρώπινο ομόλογο hENT1 το οποίο μεταφέρει πουρινικά και πυριμιδινικά νουκλεοσίδια ενώ βρίσκεται τόσο στην μεμβράνη των κυττάρων όσο και σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια (Engel *et al.*, 2004). Οι μεταφορείς της οικογένειας αυτής κατά βάση δεν απαιτούν ενέργεια (ATP, διαβάθμιση ιόντων) για την μεταφορά του υποστρώματος, εξαίρεση αποτελούν ομόλογα της οικογένειας σε φυτά που χρησιμοποιούν την διαβάθμιση πρωτονίων (Girke *et al.*, 2015), και επιπλέον έχουν βρεθεί ομόλογα που μπορούν να μεταφέρουν και νουκλεοτιδικές βάσεις (Al-Salabi and de Koning, 2005; Natto *et al.*, 2005). Οι μεταφορείς αυτοί μοντελοποιούνται με βάση το δομικό πρότυπο των MFS (N6-C6). Η δεύτερη οικογένεια, η CNT, διαίρεται φυλογενετικά σε τρεις ομάδες. Η μία περιλαμβάνει τους ομόλογους μεταφορείς του μεταφορέα NupC της *Escherichia coli* και του *Bacillus subtilis*, η δεύτερη περιλαμβάνει τους μεταφορείς της οικογένειας που ανήκουν σε θηλαστικά και η τρίτη βακτηριακά ομόλογα άγνωστης λειτουργίας. Τόσο τα βακτηριακά ομόλογα όσο και τα ευκαρυωτικά μπορούν να μεταφέρουν ριβονουκλεοτίδια αλλά και δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα μεν βακτηριακά σε συμμεταφορά με H⁺ ενώ τα ομόλογα των θηλαστικών χρησιμοποιούν Na⁺ (Saier *et al.*, 1999; Patching *et al.*, 2005). Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η κρυσταλλική δομή ενός ομόλογου της οικογένειας από το *Vibrio cholerae* (Johnson *et al.*, 2012). Πρόκειται για ένα ομοτριμερές που σχηματίζει μια ανεστραμμένη τριγωνική λεκάνης ανοιχτή προς την εξωκυττάρια πλευρά. Κάθε μονομερές αποτελείται

από 8 διαμεμβρανικές έλικες (TM1-8). Δύο επανεισέρχονται στην μεμβράνη σχηματίζοντας δομές φουρκέτας (HP1, HP2) με αντίθετη κατεύθυνση και τρεις έλικες είναι παράλληλες με την μεμβράνη (IH1-3) (Johnson *et al.*, 2012).

Οι τέσσερις γνωστές οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων αναφέρονται σε μεταφορείς ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου, δηλαδή χρησιμοποιούν την διαβάθμιση ιόντων H^+ ή Na^+ για την συµμεταφορά ή αντιµεταφορά των υποστρωμάτων διαµέσου της μεµβράνης. Οι δύο από αυτές είναι η UPS/NBUT (**U**reide **P**ermease/**N**ucleobase **U**ptake **T**ransporter) και η PUP/POP (**P**urine **P**ermease/**P**lant **O**rganocation **P**ermease), οµόλογα των οποίων βρίσκονται µόνο σε φυτά και ανήκουν στην υπεροικογένεια μεταφορέων φαρμάκων/µεταβολιτών DMT (**D**rug/**M**etabolite **T**ransporter **S**uperfamily), µε βάση το σύστηµα κατάταξης των μεταφορέων (**T**ransport **C**lassification system, **TC** <http://www.tcdb.org>). Οι περµεάσες της οικογένειας PUP/POP χρησιµοποιούν την διαβάθμιση πρωτονίων και έχουν γενικά ευρεία εξειδίκευση ως προς τα µεταφερόµενα υποστρώµατα. Μπορούν να µεταφέρουν πουρίνες (αδενίνη, υποξανθίνη), πυριµιδίνες (κυτοσίνη) καθώς επίσης µεταβολίτες µε συγγενική δοµή µε τις πουρίνες όπως κυτοκίνες και αλκαλοειδή (καφεΐνη, νικοτίνη). Οι περµεάσες της οικογένειας UPS/NBUT µεταφέρουν ουρεΐδες (αλλαντοΐνη), πουρίνες (ξανθίνη) και πυριµιδίνες (ουρακίλη). Αν και δεν υπάρχει γνωστή κρυσταλλογραφική δοµή για κάποιο οµόλογο PUP/POP ή UPS/NBUT, οι δυο αυτές οικογένειες µοντελοποιούνται µε βάση το δοµικό πρότυπο του µεταφορέα EmrE (Pornillos *et al.*, 2006) που ανήκει στην ίδια υπεροικογένεια (DMT). Μέλη των οικογενειών αυτών έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά κυρίως από το φυτό *Arabidopsis thaliana* το οποίο φέρει 15 οµόλογα της οικογένειας PUP/POP και 5 της UPS/NBUT. Από αυτούς συνολικά έχουν χαρακτηριστεί µόνο επτά μεταφορείς (Girke *et al.*, 2014).

Οι άλλες δύο οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων -µε τις οποίες θα ασχοληθούµε αναλυτικότερα στις επόµενες ενότητες- ανήκουν στην υπεροικογένεια APC (**A**minoacid/**P**olyamine/**O**rganocation **S**uperfamily). Η υπεροικογένεια APC είναι η δεύτερη (µετά την MFS) µεγαλύτερη υπεροικογένεια μεταφορέων και συµπεριλαµβάνει µέχρι στιγµής 11 οικογένειες μεταφορέων (Vastermark *et al.*, 2014; <http://www.tcdb.org/superfamily.php>). Από αυτές οι δύο είναι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων και είναι οι οικογένειες NCS1 (**N**ucleobase - **C**ation **S**ymporter-**1**) και NAT/NCS2 (**N**ucleobase - **C**ation **S**ymporter-**2**) µε την οικογένεια γνωστή ως AzgA-like να αποτελεί επιµέρους κλάδο της οικογένειας NAT/NCS2. Οι δύο αυτές οικογένειες αποτελούν τις βασικές οικογένειες μεταφορέων πουρινών που απαντώνται σε µικροοργανισµούς και, βάσει των φυλογενετικών αναλύσεων (Vastermark *et al.*, 2014; Vastermark and Saeir, 2014; Wong *et al.*, 2012), φαίνεται να έχουν µια µακρινή εξελικτική συγγένεια.

1.2.1 Μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NCS1

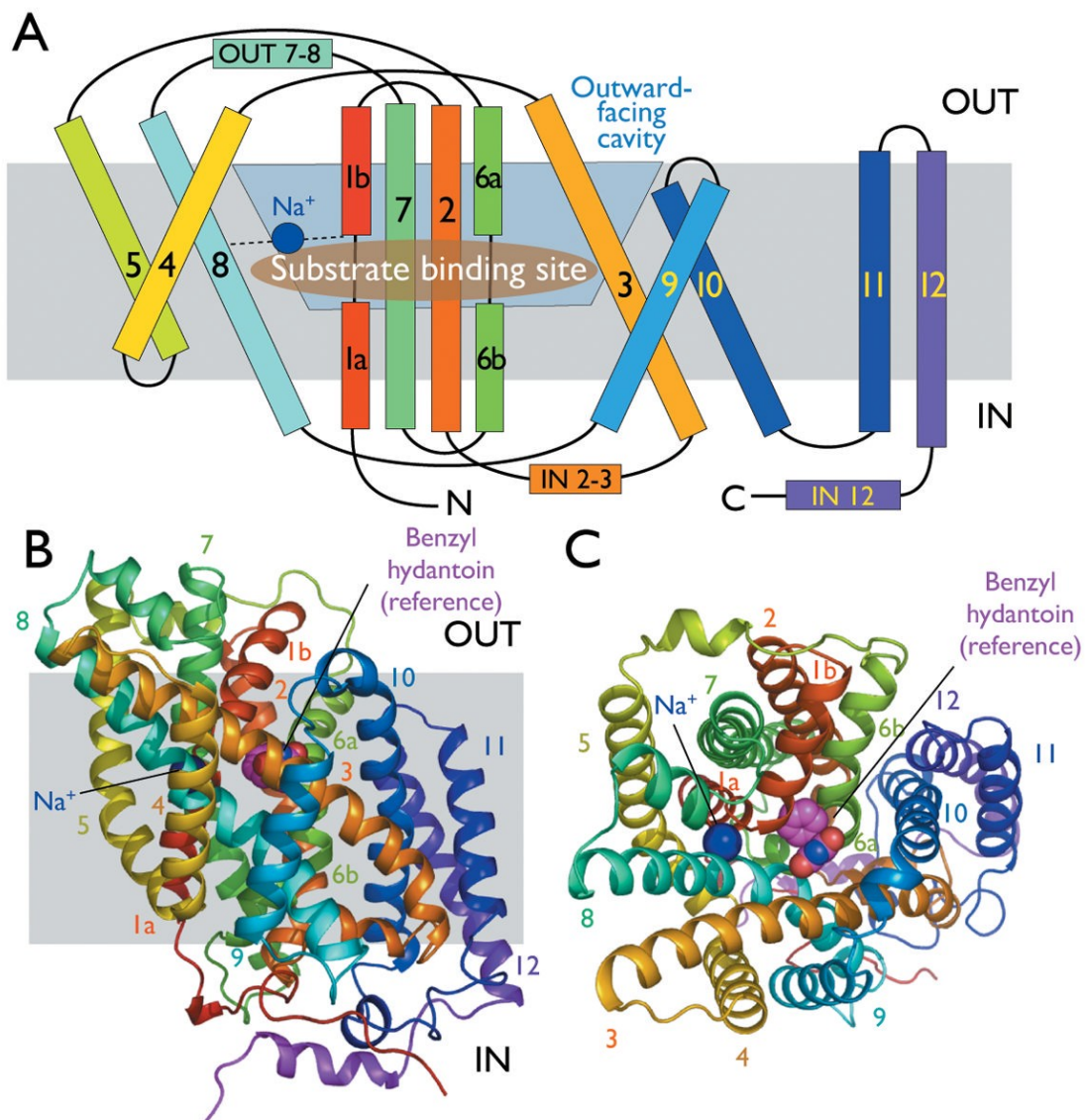
Στους βακτηριακούς οργανισμούς υπάρχουν δύο βασικές ομάδες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων: η οικογένεια-1 συμμεταφορέων κατιόντων-νουκλεοτιδικών βάσεων (Nucleobase-Cation Symporter-1, NCS1) και η οικογένεια-2 συμμεταφορέων κατιόντων-νουκλεοτιδικών βάσεων (Nucleobase – Ascorbate Transporter/Nucleobase-Cation Symporter-2, NAT/NCS2), οι οποίες όπως ήδη αναφέρθηκε ανήκουν στην υπεροικογένεια APC. Ομόλογα της οικογένειας NCS1 βρίσκονται σε Αρχαία, Βακτήρια, Μύκητες, Φυτά και σε λίγα φωτοσυνθετικά Πρώτιστα (de Koning and Diallinas, 2000) και μεταφέρουν πουρίνες και πυριμιδίνες (Frillingos, 2012). Οι μεταφορείς των μυκήτων χωρίζονται φυλογενετικά στους FcyB-like οι οποίοι είναι υψηλής συγγένειας μεταφορείς κυτοσίνης, αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης ή πυριδοξίνης και στους Fur-like οι οποίοι είναι υψηλής συγγένειας μεταφορείς για αλλαντοΐνη, ουρακίλη, ουριδίνη, θειαμίνη, ουρικό οξύ και ξανθίνη (Krygou et al., 2012, 2015). Το δομικό πρότυπο της οικογένειας αυτής προέρχεται από τον μεταφορέα υδαντοΐνης Mhp1 από το *Microbacterium liquefaciens* (Weyand et al., 2008, 2011; Shimamura et al., 2010). Αν και είναι ένα απομακρυσμένο ομόλογο της οικογένειας έχει κρυσταλλωθεί μέχρι στιγμής σε διάφορες διαμορφωτικές θέσεις και έχει αναλυθεί με μοριακή δυναμική (Simmons et al., 2014), προσφέροντας έτσι σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό της μεταφοράς.

1.2.2 Το δομικό πρότυπο στην οικογένεια NCS1

Δομικό πρότυπο για την οικογένεια NCS1 αποτελεί ο μεταφορέας Mhp1 από το *Microbacterium liquefaciens* (Suzuki and Henderson, 2006), που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα ινδολυλ-μεθυλο και βενζυλο-υδαντοΐνη (indolylmethyl- and benzylhydantoins) και έχει κρυσταλλωθεί σε τρεις συνολικά διαφορετικές διαμορφώσεις (Weyand et al., 2008; Weyand et al., 2011; Shimamura et al., 2010). Το ίδιο δομικό – μηχανιστικό πρότυπο για την μεταφορά διαφορετικών υποστρωμάτων ακολουθούν μέλη των οικογενειών NSS (Neurotransmitter Sodium Symporters) (Yamashita et al., 2005; Singh et al., 2008; Forrest et al., 2008), APC (Amino acid/Polyamine/ Organocation, APC) (Gao et al., 2009; Fang et al., 2009; Shaffer et al., 2009) και των οικογενειών SSS (Solute:Sodium Symporters) (Faham et al., 2008), BCCT (Betaine/Choline/Carnitine Transporters, BCCT).

Οι διαφορετικές διαμορφώσεις των μεταφορέων αυτού του τύπου όπως απεικονίζουν οι κρυσταλλικές δομές, μας επιτρέπουν μοντελοποίηση νέων δομικών ομολόγων καθώς και την κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας τους σχετικά με την πρόσδεση και μεταφορά του υποστρώματος (Weyand et al., 2011, Simmons et al., 2014). Ο μεταφορέας αυτός αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες (TMs, Εικόνα 1.2). Τα TM 1-5 και TM 6-10 σχηματίζουν δύο

διασταυρούμενες επαναλήψεις. Οι α -έλικες 1 και 6 είναι ασυνεχείς. Η δομή χωρίζεται σε δύο δομικές περιοχές, μια δέσμη τεσσάρων ελίκων (“four-helix-bundle”) που αποτελείται από τα TM 1, 2, 6, 7 και το μοτίβο σχήματος H (“hash motif”) που αποτελείται από τα TM 3, 4, 8, 9 (Shimamura *et al.*, 2010; Weyand *et al.*, 2008). Η δέσμευση του υποστρώματος γίνεται από κατάλοιπα των TM 1, 3, 6, 8. Οι TM 5 και 10 είναι οι κυρίως υπεύθυνες για τις διαμορφωτικές αλλαγές του μεταφορέα (Shimamura *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.2 Δομική οργάνωση του μεταφορέα Mph1. (Α) Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα (Β) η συνολική δομή του μεταφορέα μέσα στη μεμβράνη και (Γ) άποψη της ίδιας δομής έξω πάνω από την μεμβράνη (από Weyand *et al.*, 2008).

1.3 Η οικογένεια NAT/NCS2

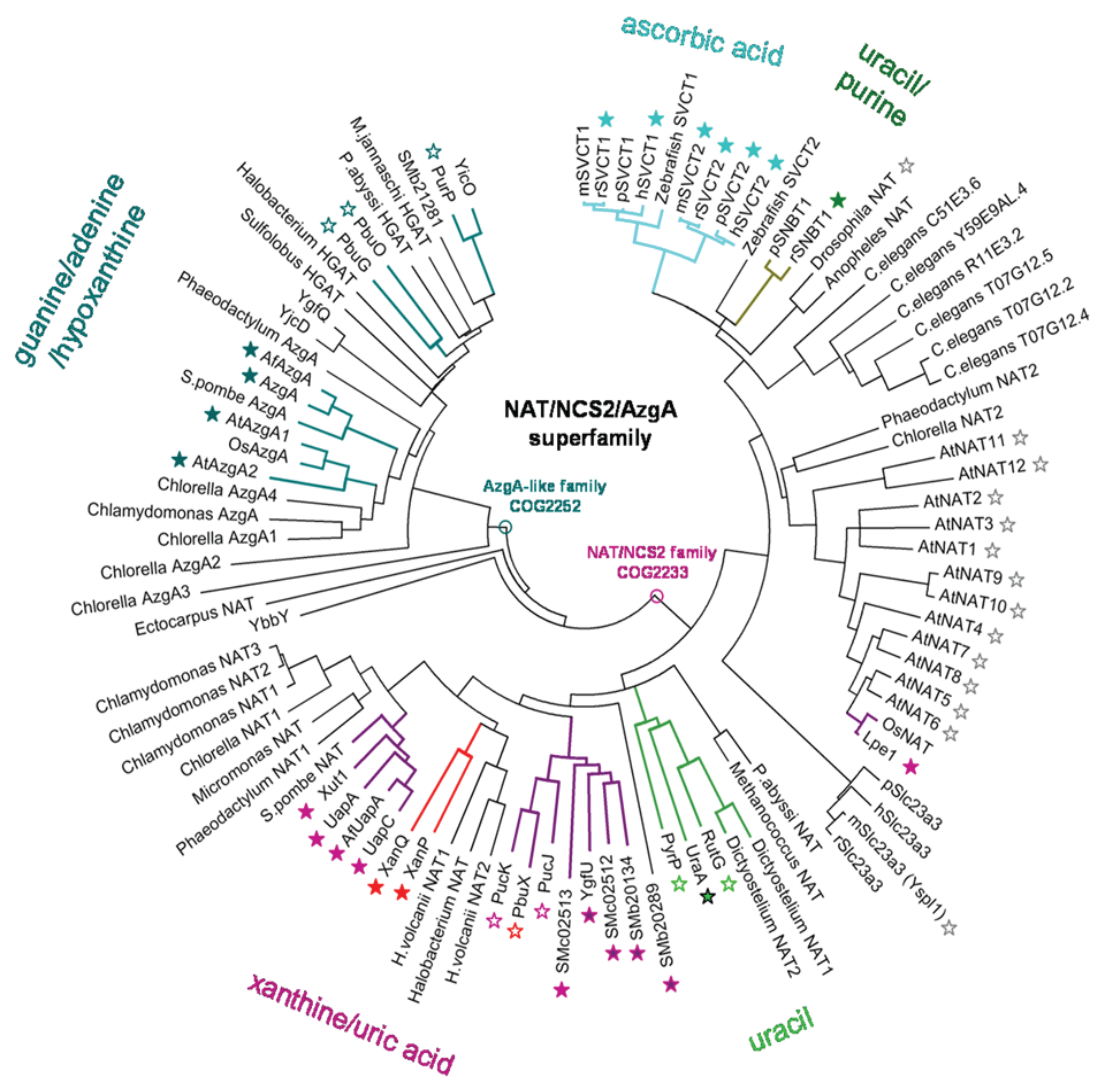
Η οικογένεια NCS2 (Nucleobase-Cation Symporter-2), γνωστή και ως Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) (de Koning and Diallinas, 2000; Gournas *et al.*, 2008) ή NAT/NCS2 (Karatza and Frillingos, 2005; Frillingos 2012), είναι η φυλογενετικά πιο διαδεδομένη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων. Ομόλογά της απαντώνται στις περισσότερες της ομάδες οργανισμών με εξαίρεση λίγες ομάδες, όπως τα παρασιτικά πρωτόζωα και ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Περιλαμβάνει αρκετές χιλιάδες ομόλογων τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερα συντηρημένη την προβλεπόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος αλλά διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς τα μεταφερόμενα υποστρώματα (Frillingos, 2012).

Αποτελείται από δύο μεγάλες ομάδες ομόλογων μεταφορέων (Εικόνα 1.3). Η μία είναι η ομάδα COG2233 (Cluster of Orthologous Genes) μέλη της οποίας έχει βρεθεί ότι μπορούν να μεταφέρουν πουρίνες, πυριμιδίνες ή L-ασκορβικό οξύ. Φυλογενετική ανάλυση των λειτουργικά χαρακτηρισμένων ομόλογων της οικογένειας δείχνει ότι τα μέλη της ομάδας COG2233 σχηματίζουν τρεις επιμέρους κλάδους. Ο ένας περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης ή και ουρικού οξέος, ο δεύτερος περιλαμβάνει βακτηριακά ομόλογα που έχουν βρεθεί ότι μεταφέρουν κυρίως ουρακίλη ή και πουρίνες και ο τρίτος απαρτίζεται από τα ομόλογα σε ζώα και φυτά. Σε αυτόν τον κλάδο εμπίπτουν τα ανθρώπινα ομόλογα της οικογένειας αυτής (hSVCT1 και hSVCT2) οι οποίοι μεταφέρουν ένα αρκετά διαφορετικό υπόστρωμα, το L-ασκορβικό οξύ, και ο ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέας πυριμιδινών και πουρνών rSNBT1.

Παρά της μεγάλης διαφορές των μελών της COG2233 ως προς τα μεταφερόμενα υποστρώματα, έχουν συντηρημένα μοτίβα καθώς επίσης και το μοτίβο «υπογραφή» NAT της οικογένειας (Karena *et al.*, 2015). Λίγα ομόλογα της οικογένειας αυτής έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά και μόνο δύο έχουν μελετηθεί διεξοδικότερα. Πρόκειται για τον μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος UraA από τον *Aspergillus nidulans* (Kosti *et al.*, 2012; Alguel *et al.*, 2016) και το μεταφορέα ξανθίνης XanQ από την *Escherichia coli* K-12 (Karena *et al.*, 2015).

Η δεύτερη ομάδα της οικογένειας NAT/NCS2 είναι η ομάδα COG2252, γνωστή και με την ονομασία AzgA-like από τον πρώτο μεταφορέα της ομάδας αυτής που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά τον AzgA (Cecchetto *et al.*, 2004). Ομόλογα αυτής της ομάδας βρίσκονται μόνο σε βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά και σε κάποια φωτοσυνθετικά πρώτιστα. Μεταφέρουν αδενίνη, γουανίνη ή/και υποξανθίνη. Μέχρι πρόσφατα η ομάδα αυτή ταξινομούταν ως ξεχωριστή οικογένεια. Νεώτερα δεδομένα όμως (όπως ότι μοντελοποιείται με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA που ανήκει στην οικογένεια NAT/NCS2) οδήγησαν στην ένταξη της ομάδας στην οικογένεια NAT/NCS2 (Saier *et al.*, 2014; <http://www.tcdb.org>). Είναι γεγονός, ωστόσο, ότι τα μέλη της ομάδας αυτής δεν

συντηρούν όλα τα μοτίβα της ομάδας με COG2233. Συντηρούν τα μοτίβα στις έλικες TM5, TM8 και TM9 καθώς επίσης ένα συντηρημένο μοτίβο αντίστοιχο του μοτίβου «υπογραφή» NAT με κάποιες διαφοροποιήσεις (Parakostas *et al.*, 2013), όπως θα δούμε και σε επόμενα κεφάλαια.

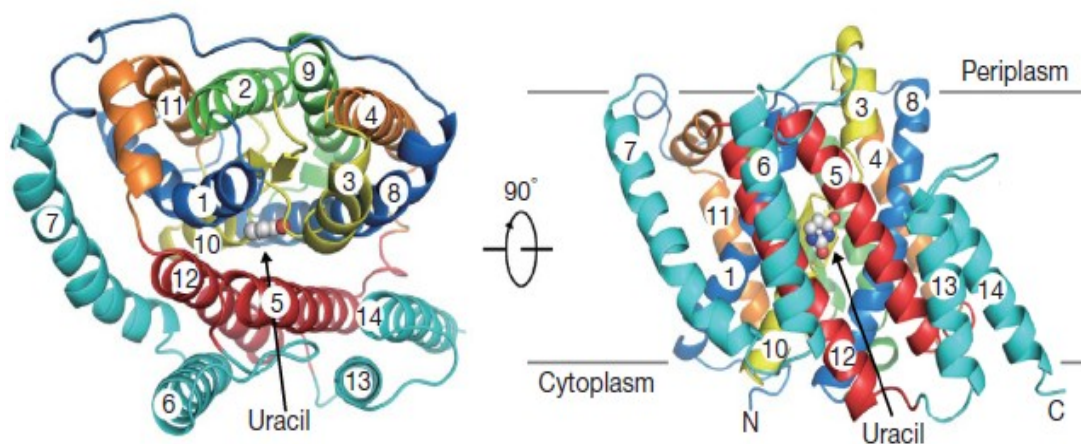


Εικόνα 1.3 Φυλογενετικό δέντρο αντιπροσωπευτικών μελών (χαρκτηρισμένων και μη) της οικογένειας NAT/NCS2 όπου φαίνονται οι δύο διακριτές ομάδες ομολόγων COG2233 και COG2252. Λειτουργικά χαρακτηρισμένα ομόλογα σημειώνονται με χρωματισμένο αστερίσκο κλειστό (δεδομένα από λειτουργικά πειράματα) ή ανοικτό (δεδομένα μόνο από γενετικές αναλύσεις). Με διαφορετικά χρώματα συμβολίζουν οι διαφορετικοί ως προς το βασικό τους υπόστρωμα μεταφορείς: Ξανθίνης/ουρικού οξέος (μωβ), Ξανθίνης (κόκκινο), ουρακίλης (πράσινο), ουρακίλης/πουρινών (SNBT1, σκούρο πράσινο), L-ασκορβικού (SVCT1 ή SVCT2, τρκουάζ) και αδενίνης/ υποξανθίνης/ γουανίνης (σκούρο τρκουάζ). Με γκρι αστερίσκους σημειώνονται ομόλογα της *Drosophila melanogaster* ή *Arabidopsis thaliana*, που έχουν μελετηθεί αλλά δεν έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Mega 4.1 (από Frillings, 2012).

1.3.1 Το δομικό πρότυπο της οικογένειας NAT/NCS2

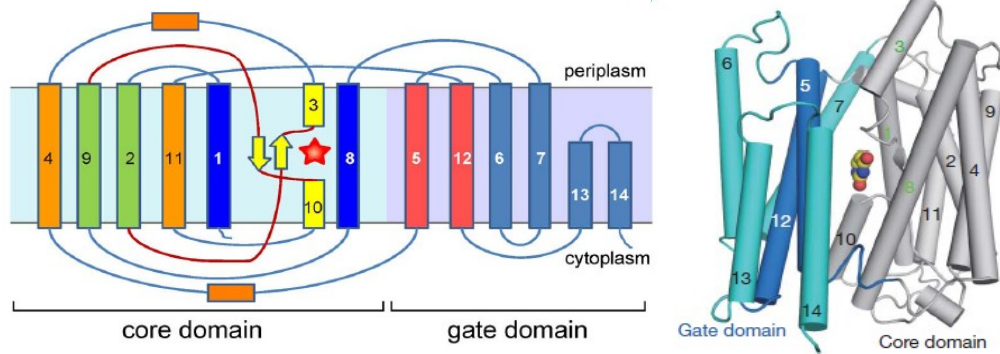
Μέχρι και το 2011 οπότε και δημοσιεύτηκε η πρώτη κρυσταλλική δομή μέλους της οικογένειας NAT/NCS2, δεν υπήρχε κάποιο άλλο δομικό πρότυπο για την οικογένεια αυτή. Με τα μέχρι τότε γνωστά δομικά πρότυπα μεταφορέων δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς οι περμεάσες της οικογένειας NAT/NCS2 δεν μπορούσαν να μοντελοποιηθούν. Η κρυσταλλική δομή ενός μέλους της NAT/NCS2, δηλαδή του μεταφορέα UraA (PDB ID 3QE7), αποτελεί δομικό πρότυπο για τους μεταφορείς της οικογένειας. Η δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E.coli* (Lu *et al.*, 2011) λύθηκε με ευκρίνεια ανάλυσης 2.8 Å και επιτεύχθηκε μετά την σταθεροποίηση της πρωτεΐνης με την δέσμευση του υποστρώματος σε όλη την διάρκεια της κρυστάλλωσης σε συνδυασμό με ένα μόριο β-NG (β-εννεύλογλυκοσιδίου) στο τελευταίο στάδιο του καθαρισμού.

Σύμφωνα με την δομή ο μεταφορέας αποτελείται από δεκατέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα (TM 1-14), τα οποία διακρίνονται σε δύο ανεστραμμένες δομικές επαναλήψεις (TM1-7 και TM8-14) με άξονα συμμετρίας την μεμβράνη αν περιστραφεί η μία προς την άλλη 180° και τα δύο άκρα, αμινοτελικό και καρβοξυτελικό, εντοπίζονται κυτταροπλασματικά (Εικόνα 1.4). Τα TM13 και TM14 δεν διαπερνούν εξ ολοκλήρου τη μεμβράνη, ενώ τα TM3 και TM10 αποτελούνται από μία α-έλικα, μια β-πτυχωτή επιφάνεια και μια περιοχή σχετικά ελεύθερης διαμόρφωσης το καθένα, σχηματίζοντας στο κέντρο δέσμευσης του μεταφορέα ένα ζεύγος από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες (β-strands), οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στη δομική οργάνωση του μορίου και στην αναγνώριση του υποστρώματος. Κάθε β-πτυχωτή επιφάνεια αποτελεί συνέχεια μιας εκτεταμένης «ελεύθερης» περιοχής που καταλήγει στο TM3 ή TM10. Τέτοιες ασυνεχείς έλικες, έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες δομές πρωτεϊνών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου, όπως στους LeuT_{Aa} της οικογένειας NSS (Yamashita *et al.*, 2005), αλλά είναι ιδιαίτερα ασυνήθιστο ένα διαμεμβρανικό τμήμα να αποτελείται κατά το ήμισυ από μη ελικοειδείς περιοχές, ελεύθερης διαμόρφωσης. Επιπλέον η περιοχή του 11-πεπτιδίου, που αντιστοιχεί στο μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NAT/NCS2 αποτελεί στην δομή την 10^η ενσωματωμένη στην μεμβράνη α-έλικα. Η συγκεκριμένη περιοχή έχει μελετηθεί διεξοδικά στους ομόλογους μεταφορείς XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010) και UapA (Diallinas *et al.*, 1998; Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005), αλλά η ακριβής δομή της δεν ήταν δυνατό να περιγραφεί από αλγόριθμους τοπολογίας, οι οποίοι προέβλεπαν εκεί μία κυτταροπλασματική ή επανεισερχόμενη «θηλιά» (βλ. Mermelekas *et al.*, 2010). Πρέπει όμως να τονιστεί ότι πειράματα κυστεϊνικής σάρωσης στην περιοχή καταλοίπων 323-329 της XanQ υποστήριξαν την ύπαρξη α-έλικας, λόγω περιοδικότητας της ευαισθησίας των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης στο αντιδραστήριο NEM (Karatza *et al.*, 2006).



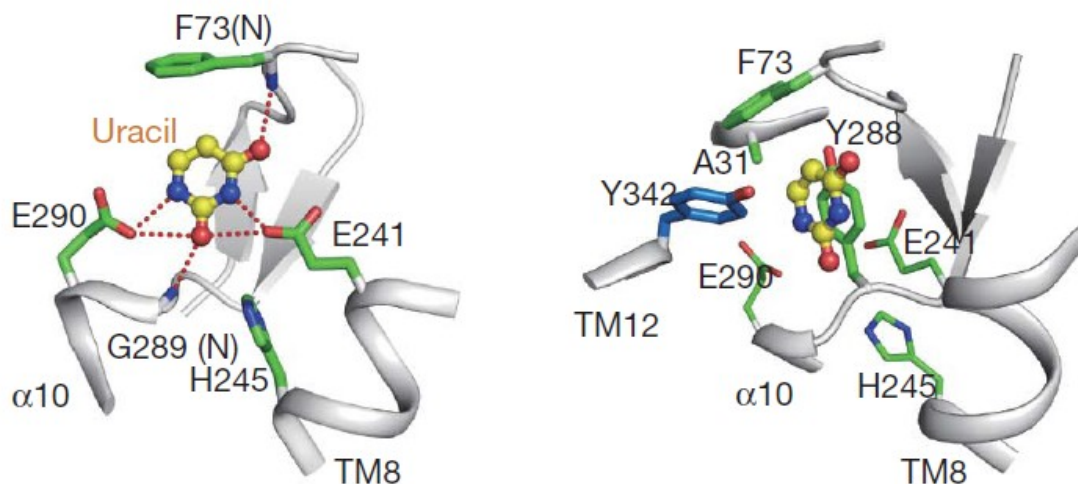
Εικόνα 1.4 Η δομή του μεταφορέα UraA. Οι δύο όψεις (δεξιά) από το περίπλασμα και (αριστερά) περιστρεφμένο κατά 90°, από το πλάι (από Lu *et al.*, 2011).

Τα διαμεμβρανικά τμήματα του UraA οργανώνονται στο χώρο σε δύο μη συνεχόμενες δομικές περιοχές, την δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain) και την δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain). Η δομική περιοχή του «πυρήνα» αποτελείται από τα τμήματα 1 έως 4 (TM1-TM4) και 8 έως 11 (TM8-TM11) και όπως περιγράφεται στην συνέχεια αποτελεί την μοριακή βάση για την δέσμευση του υποστρώματος. Από την άλλη πλευρά η δομική περιοχή της «εισόδου» αποτελείται από τα τμήματα 5 έως 7 (TM5-TM7) και 12 έως 14 (TM12-TM14) και σε αυτή θεωρείται ότι υπάρχει μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων για την ορθή λειτουργία του μηχανισμού συμμεταφοράς ουρακίλης:H⁺. Εκτός από την υδροφοβική διασύνδεση μεταξύ της περιοχής «πυρήνα» και της περιοχής «εισόδου», αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μέσα στην περιοχή του «πυρήνα» στο κέντρο του μορίου, κυρίως μεταξύ των TM3 και TM10 (Tyr-288 με Ser-71) και των β-πτυχωτών τους επιφανειών τους αλλά και μεταξύ αυτών των τμημάτων με άλλα διαμεμβρανικά τμήματα. Αυτές οι εκτενείς αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν στην σωστή αναδίπλωση του μεταφορέα αφού διαμορφώνουν κατάλληλα τα εκτεταμένα «ελεύθερα» τμήματα των TM3 και TM10 και περιφρουρούν τον «πυρήνα» δέσμευσης του υποστρώματος (Lu *et al.*, 2011).



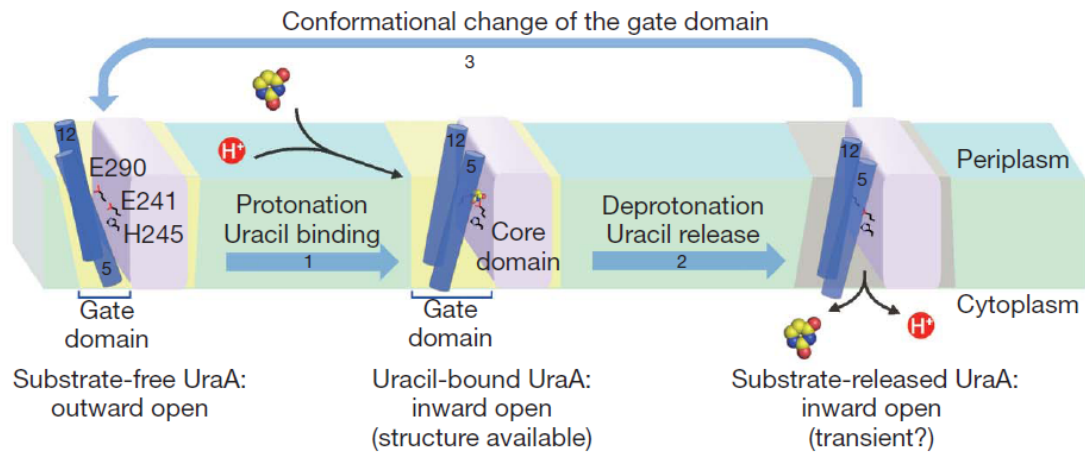
Εικόνα 1.5 Η δομή του μεταφορέα UraA της οικογένειας NAT/NCS2. (Δεξιά) Τοπολογικό διάγραμμα του UraA με τα TM διευθετημένα σε δύο δομικές περιοχές, στην δομική περιοχή «πυρήνα» (κυανού) και στην δομική περιοχή «εισόδου» (μωβ). Με κόκκινο αστέρι συμβολίζεται το υπόστρωμα. (Αριστερά) Δομικό μοντέλο του μεταφορέα που διακρίνονται οι δύο δομικές περιοχές, με γκρι η περιοχή του «πυρήνα» και με μπλε η περιοχή της «εισόδου» (από Lu *et al.*, 2011).

Το υπόστρωμα ουρακίλη εμφανίζεται στην κρυσταλλική δομή του μεταφορέα με τον πυριμινιδικό της δακτύλιο παράλληλο προς τις β-πτυχωτές επιφάνειες, να βρίσκεται σε μία κοιλότητα που περιβάλλεται από αρνητικά ηλεκτροστατικά δυναμικά. Το κέντρο δέσμησης διαμορφώνεται από τα TM1, TM3, TM8, TM10 (περιοχή «πυρήνα») και TM12 (περιοχή «εισόδου») και το υπόστρωμα δεσμεύεται εκεί μέσω: (α) δεσμών υδρογόνου με δύο πολικά διαμεμβρανικά κατάλοιπα γλουταμικού οξέος (Glu-241 και Glu-290 που αντιστοιχούν στα Glu-272 και Gln-324 του μεταφορέα ξανθίνης XanQ), (β) δεσμών υδρογόνου με τα άτομα αζώτου των αμιδίων των καταλοίπων Phe-73 και Gly-289 (Phe-94 του TM3 και Ala-323 του TM10 στην XanQ), (γ) αλληλεπιδράσεων van der Waals ανάμεσα στα κατάλοιπα Ala-31, Phe-73, Tyr-288 και Tyr-342 (Pro-38, Phe-94, Phe-322, Phe-376 στην XanQ) (Εικόνα 1.6). Επιπλέον, περιφερικά το κέντρο δέσμησης σταθεροποιείται μεταξύ άλλων με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στα απόλυτα συντηρημένα στα χαρακτηρισμένα μέλη της NAT/NCS2 κατάλοιπα His-24 και Asn-291. Ταυτόχρονα μια υδροξυλομάδα στο μόριο β-NG σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το άζωτο του ιμιδαζολίου της His-245 και με το οξυγόνο της κετοομάδας στην θέση 2 της ουρακίλης, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί με την ύπαρξη ενός μορίου νερού στην θέση του β-NG στο πραγματικό περιβάλλον του μεταφορέα (Lu *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.6 Προσανατολισμός της ουρακίλης κατά την δέσμευσή της στον μεταφορέα UraA.
 Το υπόστρωμα ουρακίλη (σφαιρίδια κίτρινου χρώματος) προσανατολίζεται κατάλληλα κατά την δέσμευσή του με την βοήθεια πολικών αλληλεπιδράσεων (αριστερά) και δεσμών van der Waals (δεξιά) (από Lu *et al.*, 2011).

Ο μεταφορέας UraA έχει χαρακτηριστεί συµμεταφορέας ουρακίλης:Η⁺ και εποµένως µέσα στα πλαίσια της σωστής λειτουργίας του μεταφορέα είναι και η δέσµευση του Η⁺. Σύμφωνα µε το μοντέλο η μετατόπιση του πρωτονίου βασίζεται σε πρωτονίωση και αποπρωτονίωση καταλοίπων που συµµετέχουν στον µηχανισµό δέσµευσης της ουρακίλης και είναι αναντικατάστατα για την ενεργό µεταφορά του υποστρώµατος (Glu-241, His-245, Glu-290). Ο µηχανισµός που προτείνεται από τους Lu *et al.* (2011) για την µεταφορά της ουρακίλης από τον μεταφορέα UraA είναι ο εξής: αρχικά ο μεταφορέας πριν δεσµευτεί το υπόστρωµα είναι ανοιχτή προς το περίπλασμα και τα δύο κατάλοιπα γλουταµικού οξέος (Glu-241, Glu-290) είναι αποπρωτονιωµένα και αρνητικά φορτισµένα διατηρώντας την κατάλληλη απόσταση µεταξύ των δύο δοµικών περιοχών του «πυρήνα» και της «εισόδου». Με την δέσµευση του υποστρώµατος και του Η⁺, κάποιο από τα παραπάνω δύο κατάλοιπα γλουταµικού οξέος πρωτονιώνεται επάγοντας διαµορφωτικές αλλαγές του μεταφορέα κυρίως στην περιοχή της «εισόδου» έτσι ώστε να ανοίξει προς την αντίθετη πλευρά (κυτταροπλασµατικά). Για την µεταφορά του υποστρώµατος, το πρωτόνιο µεταφέρεται παροδικά στην His-245 (TM8) και στην συνέχεια απελευθερώνεται µαζί µε την ουρακίλη. Η ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα διαµόρφωση του μεταφορέα γρήγορα µεταβάλλεται για να επανέλθει ο μεταφορέας στην αρχική της κατάσταση (ανοιχτή προς το περίπλασμα) (Εικόνα 1.7).



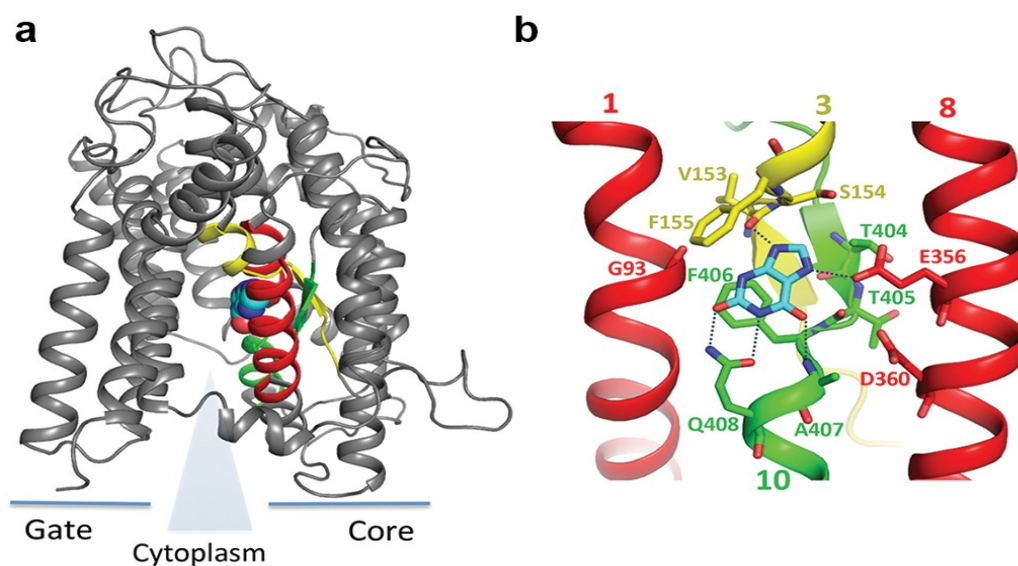
Εικόνα 1.7 Προτεινόμενος μηχανισμός για την μεταφορά της ουρακίλης στον μεταφορέα UraA. Τα κατάλοιπα Glu-241, His-245 και Glu-245 σημειώνονται στο παραπάνω μοντέλο γιατί διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος και στην μεταφορά του πρωτονίου κατά την συμμεταφορά (από Lu *et al.*, 2011).

Όλες οι αλληλεπιδράσεις οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων και συμμετέχουν στην δομή αλλά και λειτουργία του μεταφορέα UraA (Lu *et al.*, 2011) σχετίζονται με την ύπαρξη σημαντικών καταλοίπων σε θέσεις οι οποίες είναι ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των μελών της οικογένειας NAT/NCS2 και αφορούν κυρίως σε δυνητικά φορτισμένα, πολικά και αρωματικά αμινοξέα σε διαμεμβρανικά τμήματα. Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα UraA ουσιαστικά επιβεβαιώνει την θεώρηση των σχέσεων δομής - λειτουργίας των ομολόγων NAT/NCS2 που έχουν μελετηθεί περισσότερο, δηλαδή των XanQ (Frillingos, 2012) και UraA (Kosti *et al.*, 2012), ως προς τον κεντρικό ρόλο σημαντικών καταλοίπων αμινοξέων που φαίνεται να ανήκουν στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος.

Η δομή αυτή του μεταφορέα UraA με τις διαφοροποιήσεις που εμφανίζει σε σχέση με προηγούμενες γνωστές δομές δεν είναι μόνο στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η κρυσταλλική δομή από ένα ομόλογο των SLC26 από τον οργανισμό *D. geothermalis* (SLC26Dg) του οποίου η δομή είναι παρόμοια με αυτή του μεταφορέα UraA (Geertsma *et al.*, 2015). Οι δύο οικογένειες δεν έχουν κάποια σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο ταυτότητας αλληλουχίας αλλά η ανάλυση των αλληλουχιών τους προβλέπει μια απομακρυσμένη δομική συντήρηση (Wong *et al.*, 2012; Västermark and Saier, 2014; Gorbunov *et al.*, 2014). Επίσης, παρόμοια δομή με το μεταφορέα UraA έχει και ο SLC4A1 (band 3) που διευκολύνει την ανταλλαγή ιόντων χλωρίου και διττανθρακικού (Arakawa *et al.*, 2015), η κρυσταλλική δομή του οποίου έχει λυθεί ανοικτή προς την εξωτερική πλευρά. Άρα λοιπόν, φαίνεται ότι η ιδιαίτερη δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA της οικογένειας μεταφορέων πουρινών NAT/NCS2 είναι κοινή και σε άλλες οικογένειες.

Πρόσφατα οι Kalli *et al.* (2015) δημοσίευσαν την ανάλυση του μεταφορέα UraA με μοριακή δυναμική, απουσία υποστρώματος, σε διαφορετικής λιπιδιακής σύστασης μεμβράνες. Βρέθηκε ότι ο μεταφορέας ουρακίλης έχει τρεις θέσεις που μπορεί να συνδεθεί η καρδιολιπίνη. Η πρώτη θέση δημιουργείται από τα κατάλοιπα R4, A5, I6, P13, F176, R177, G178 και από A296 έως V300 (TM1,7 και την ελεύθερης διαμόρφωσης περιοχή μεταξύ των ελίκων 10 και 11). Η δεύτερη θέση δημιουργείται ανάμεσα από τα C61, K62, I107 έως A111 και R265 (TM2, 4, 9) και η τρίτη θέση βρίσκεται στην εξωκυττάρια περιοχή του μεταφορέα γύρω από το κατάλοιπο K321. Αυτή η αλληλεπίδραση του μεταφορέα UraA με την καρδιολιπίνη ενδεχομένως να είναι σημαντική για την είσοδο της πρωτεΐνης στην μεμβράνη και την σωστή διαμόρφωσή της ή/και να χρησιμοποιείται η καρδιολιπίνη ως δότης του πρωτονίου που απαιτείται για την συμμεταφορά της ουρακίλης (Kalli *et al.*, 2015).

Το 2016 δημοσιεύτηκε και η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος UapA από τον *Aspergillus nidulans* (Εικόνα 1.8). Η κρυσταλλική δομή προέρχεται από το μετάλλαγμα UapA-G411V_{Δ1-11}. Η δομή λύθηκε με ευκρίνεια 3.5Å παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνη), είναι ανοικτή προς την κυτταροπλασματική πλευρά και είναι σε συμφωνία με την δομή του UraA. Η διαφορά τους είναι στο γεγονός ότι ο μεν μεταφορέας UraA κρυσταλλώθηκε ως μονομερές ενώ ο UapA είναι διμερές. Ο διμερισμός οφείλεται στην αλληλεπίδραση των δύο δομικών περιοχών της «εισόδου» (gate domain) και δύναται να επηρεάζει σημαντικά την εξειδίκευση (Alguel *et al.*, 2016). Οι δύο δομές από ευκαρυωτικούς μεταφορείς που εμφανίζουν ίδιο πρότυπο δομής με τον UraA είναι διμερή (UapA, SLC4A1).



Εικόνα 1.8 Η κρυσταλλική δομή ενός μονομερούς του μεταφορέα UapA και το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. (a) Η συνολική δομή του μονομερούς που ξεχωρίζουν οι δύο δομικές περιοχές και (b) το υπόστρωμα (ξανθίνη) στο κέντρο δέσμευσης. Παρουσιάζονται και τα κατάλοιπα τα οποία συνδέονται με την ξανθίνη με δεσμούς υδρογόνου με διακεκομμένες γραμμές (από Alguel *et al.*, 2016)

1.4 Βακτηριακοί και ευκαρυωτικοί μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2

Όπως αναφέρθηκε ήδη ομόλογα της οικογένειας μεταφορέων πουρινών NAT/NCS2 απαντώνται σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς αλλά λίγοι έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά μέχρι σήμερα. Εκτενέστερη μελέτη στα πλαίσια των σχέσεων δομής και λειτουργίας έχει γίνει στον μεταφορέα Ξανθίνης XanQ από την *Escherichia coli* (Karena *et al.*, 2015; Frillingos, 2012) και στον μεταφορέα Ξανθίνης και ουρικού οξέος UapA από τον *Aspergillus nidulans* (Amillis *et al.*, 2011; Kostis *et al.*, 2012; Gournas *et al.*, 2008; Diallinas, 2014) καθώς επίσης και σε πιο περιορισμένη έκταση στον μεταφορέα ουρικού οξέος UacT από την *E.coli* (Papakostas and Frillingos, 2012). Οι γνώσεις μας για την εξειδίκευση και την λειτουργία των μεταφορέων αυτής της οικογένειας είναι περιορισμένες καθώς ακόμη και στο πολύ καλά μελετημένο σύστημα της *Escherichia coli* πολλοί πιθανοί μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 δεν έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά.

Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα από τους λειτουργικά χαρακτηρισμένους μεταφορείς προκύπτει ότι η οικογένεια μεταφορέων πουρινών NAT/NCS2 αποτελείται από δύο μεγάλες ομάδες ορθόλογων γονιδίων (Cluster of Orthologous Genes, εφεξής COG). Η πρώτη COG2233 περιλαμβάνει μεταφορείς των ομάδων Ξανθίνης/ουρικού οξέος, ουρακίλης ή/και πουρινών καθώς επίσης μια ομάδα μεταφορέων ζώων και φυτών όπου εντάσσονται και τα ανθρώπινα ομόλογα της οικογένειας hSVCT1 και hSVCT2 που είναι μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος (Daruwala *et al.*, 1999; Tsukaguchi *et al.*, 1999). Η δεύτερη ομάδα της οικογένειας NAT/NCS2 είναι η ομάδα COG2252, παλαιότερα γνωστή ως AzgA-like από τον πρώτο μεταφορέα που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά. Τα ομόλογα αυτής της ομάδας μεταφέρουν αδερίνη, γουανίνη, υποξανθίνη.

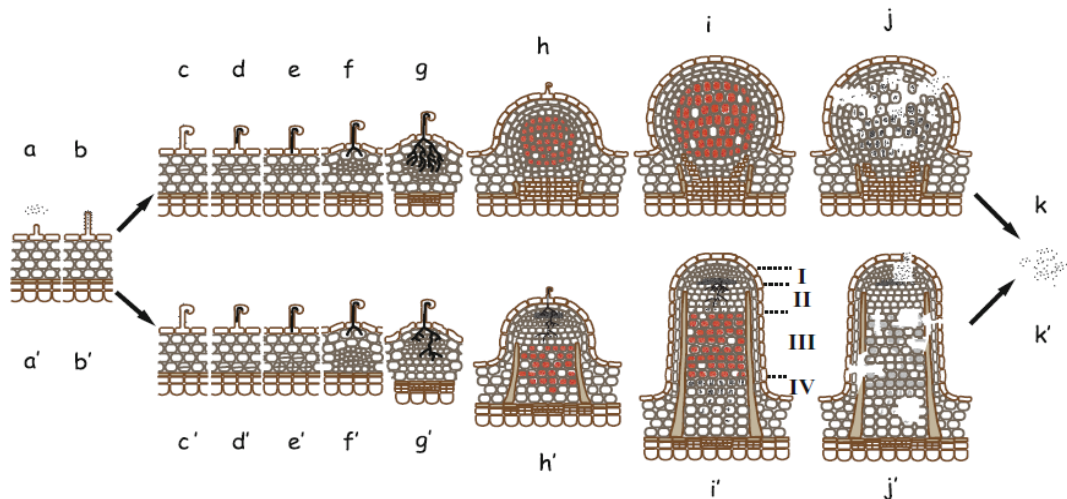
Η μελέτη των μεταφορέων NAT/NCS2 μέχρι σήμερα είναι σποραδική και σε πολλά βιολογικά συστήματα που χρησιμοποιούνται και ως οργανισμοί μοντέλα δεν έχουν μελετηθεί καθόλου ή έχουν χαρακτηριστεί μόνο μερικά ομόλογα (με χαρακτηριστικό παράδειγμα την *E.coli* K-12, καθώς και άλλα πρωτεοβακτήρια, βλ. παρακάτω). Συνεπώς απαιτείται ο λειτουργικός χαρακτηρισμός νέων ομολόγων της οικογένειας, που ανήκουν στις διάφορες υποομάδες της και η ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας τους συγκριτικά με άλλα γνωστά ομόλογα ώστε να κατανοηθούν οι πιθανές διαφορές εξειδίκευσης. Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν ομόλογα τόσο της *E. coli* K-12 όσο και του αζωτοδεσμευτικού ριζοβακτηρίου *Sinorhizobium meliloti* (μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την μελέτη των συστημάτων συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης και ανήκει στα α -πρωτεοβακτήρια) αλλά και έγινε μια πρώτη προσπάθεια μελέτης και του ευκαρυωτικού μεταφορέα του επίμυος rSNBT1.

1.4.1 Τα αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια *Sinorhizobium meliloti* και *Mesorhizobium loti*

Τα αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια είναι μικροοργανισμοί που ενδιααιτούν στο χώμα και όταν βρεθούν στο ίδιο περιβάλλον με ψυχανθή φυτά μπορούν να προσβάλλουν τις ρίζες του φυτού, να εισέλθουν στο φυτικό ιστό και με την εδραίωση της συμβιωτικής σχέσης να σχηματιστούν φυμάτια. Η συμβίωση αυτή είναι αμοιβαία επωφελής σχέση και για τους δύο οργανισμούς και έχει μεγάλη σημασία για την αγροτική οικονομία. Το φυτό παίρνει από το βακτήριο το δεσμευμένο N με μορφή αμμωνίας ή αμινοξέων (Gln, Asn) και το συμβιωτικό βακτήριο προσλαμβάνει απαραίτητους μεταβολίτες, όπως δικαρθοξυλικά οξέα που τροφοδοτούν τον κύκλο του Krebs, από το φυτό (Udvardi and Poole, 2013).

Η αζωτοδέσμευση, ή αλλιώς καθήλωση του αζώτου, είναι η διαδικασία κατά την οποία το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) μετατρέπεται σε NH_3 μέσω του συμπλέγματος της νιτρογενάσης, η οποία επάγεται στα ριζοβακτήρια μόνο κατά την συμβίωση. Η μετατροπή αυτή του μοριακού αζώτου γίνεται στα κύτταρα του αζωτοδεσμευτικού φυματίου όπου το ριζοβακτήριο συμβιώνει με τη μορφή του βακτηριοειδούς σχηματίζοντας το συμβίωσωμα (βλ. παρακάτω). Η διεργασία είναι ιδιαίτερα ενεργοβόρα προκειμένου να γίνει η διάσπαση του τριπλού δεσμού μεταξύ των δύο ατόμων αζώτου. Το O_2 αναστέλλει την λειτουργία της νιτρογενάσης συνεπώς κατά την συμβίωση το φυτό ρυθμίζει στο ελάχιστο την ποσότητα του οξυγόνου στο συμβίωσωμα προκειμένου το ένζυμο να είναι λειτουργικό. Κάθε είδος αζωτοδεσμευτικού ριζοβακτηρίου μπορεί να συμβιώνει με συγκεκριμένα είδη ψυχανθών φυτών (Madigan *et al.*, 2014). Τα βακτήρια προσβάλλουν τις ρίζες του φυτού και εισέρχονται στο φυτικό ιστό μέσω νηματοειδών απολήξεων. Έπειτα μετά την ανταλλαγή σηματοδοτικών μορίων μεταξύ βακτηρίου και φυτού (Foucher and Kondorosi, 2000) εγκαθιδρύεται η συμβίωση και αρχίζει ο σχηματισμός των φυματίων (Εικόνα 1.9).

Τα φυμάτια είναι δύο τύπων: τα καθορισμένου τύπου και τα μη καθορισμένου τύπου φυμάτια. Στα φυμάτια μη καθορισμένου τύπου διακρίνονται τέσσερις ζώνες. Η πρώτη είναι η μεριστωματική ζώνη (meristem), η δεύτερη είναι η ζώνη μόλυνσης όπου διατηρείται η νηματοειδής απόληξη μέσω τις οποίας εισέρχονται τα βακτήρια στο φυτό. Η τρίτη είναι η ζώνη της αζωτοδέσμευσης. Σε αυτή τα βακτήρια έχουν εγκλωπωθεί από τα φυτικά και έχουν σχηματιστεί τα βακτηριοειδή, προσαρμόζοντας τον κυτταρικό τους κύκλο και τον μεταβολισμό τους στη διεργασία της αζωτοδέσμευσης (Djordjevic, 2004; Udvardi and Poole, 2013). Σε αυτή την κατάσταση μόνο μπορεί να γίνει η αζωτοδέσμευση. Τέλος η τέταρτη ζώνη είναι η ζώνη της υποστρόφης. Τα καθορισμένου τύπου φυμάτια έχουν μία ζώνη, την ζώνη της αζωτοδέσμευσης (Saeki, 2011).



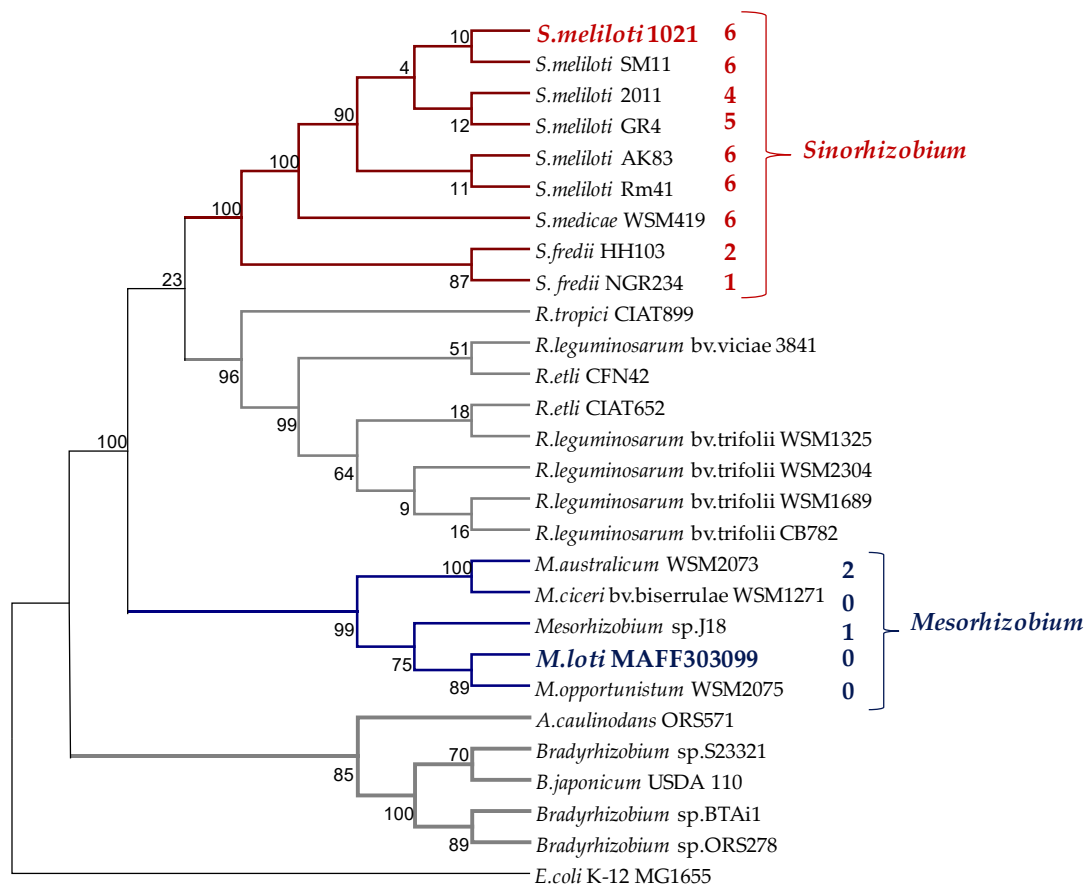
Εικόνα 1.9 Οι δύο τύποι φυματίων. Απεικόνιση των σταδίων μόλυνσης έως και την δομή των ώριμων φυματίων καθορισμένου (επάνω) και μη καθορισμένου τύπου (κάτω) (από Saeki, 2011).

Ανεξάρτητα από τον τύπο του φυματίου, στα φυτικά κύτταρα του φυματίου που έχουν «μολυνθεί» με το ριζοβακτήριο, το ριζοβακτήριο είναι διαφοροποιημένο σε βακτηριοειδές, το οποίο περιβάλλεται από μια εσωτερική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου και λειτουργεί σαν ένα νέο, ημιαυτόνομο οργανίδιο αφιερωμένο στην αζωτοδέσμευση (συμβίωση). Η όλη αναπτυξιακή διεργασία σχηματισμού του φυματίου και η λειτουργία του απαιτεί προσαρμογές του βακτηρίου ως προς τον κυτταρικό κύκλο, τον μεταβολισμό του και την έκφραση συστημάτων διαμεμβρανικής μεταφοράς των απαραίτητων μεταβολιτών που πρέπει να ανταλλάσσονται μεταξύ φυτικών κυττάρων και ριζοβίου για να μπορεί να γίνει αποτελεσματική η αζωτοδέσμευση (Udvardi and Poole, 2013). Εκτός από τα βασικά συστήματα ανταλλαγής μεταβολιτών (αμμωνίας και δικαρβοξυλικών οξέων) που χρειάζονται σε όλους τους τύπους αζωτοδέσμευσης, υπάρχουν αρκετά συστήματα μεταφοράς άλλων μεταβολιτών που μπορεί να χρειάζονται σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με τον τύπο της αζωτοδέσμευσης και δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Ένα παράδειγμα είναι οι βακτηριακοί μεταφορείς διακλαδισμένων αμινοξέων (Pε, Val, Leu) που εκφράζονται σε ορισμένα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια που είναι αυξότροφα στα αμινοξέα αυτά και μπορούν να τα χρησιμοποιούν ως πηγές αζώτου κατά την ανάπτυξη του φυματίου (Prell *et al.*, 2009).

Στο πλαίσιο αυτό, είναι ενδιαφέρον ότι δεν έχουν μελετηθεί καθόλου τα δυνητικά συστήματα μεταφοράς πουρινών-πυριμιδινών των συμβιωτικών ριζοβακτηρίων αν και οι γονιδιωματικές αναλύσεις υποδεικνύουν μεγάλες διαφορές στον αριθμό των γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται με την πρόσληψη και τον μεταβολισμό πουρινών στα βιολογικά αυτά συστήματα. Η φυλογενετική ανάλυση με βάση το 16S RNA, των 27 αζωτοδεσμευτικών ριζοβακτηρίων που το γονιδιώμά τους είχε αλληλουχηθεί πλήρως (Απρίλιος, 2014), προκύπτει ότι

χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες (Εικόνα 1.10). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομάδα των *Sinorhizobium* που φέρει πολλαπλά γονίδια για πιθανούς μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2 και ειδικά το είδος *Sinorhizobium meliloti* (που έχει 4 έως 6 παράλογα της NAT/NCS2 ανά γονιδίωμα) σε αντίθεση με την ομάδα των *Mesorhizobium* όπου τα περισσότερα είδη/στελέχη δεν έχουν κανένα ομόλογο για πιθανό μεταφορέα NAT/NCS2.

Με βάση τα παραπάνω επικεντρωθήκαμε στην μελέτη των *Sinorhizobium meliloti* και *Mesorhizobium loti* διότι αφενός το μεν *Sinorhizobium meliloti* φέρει 6 πιθανούς μεταφορείς αυτής της οικογένειας ενώ το *Mesorhizobium loti* κανένα και αφετέρου διότι τα δύο αυτά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για την μελέτη των συμβιωτικών σχέσεων βακτηριών-φυτών καθώς το *Sinorhizobium meliloti* συμβιώνει στις ρίζες του φυτού *Medicago truncatula* και σχηματίζει μη καθορισμένου τύπου φυμάτια ενώ το *Mesorhizobium loti* στο φυτό *Lotus japonicus* σχηματίζει καθορισμένου τύπου φυμάτια (Saeki, 2011).



Εικόνα 1.10 Φυλογενετικό δέντρο αζωτοδεσμευτικών ριζοβακτηριών. Χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή στοίχιση των 16S ριβοσωμικών ακολουθιών με το πρόγραμμα ClustalW και η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε με βάση τον αλγόριθμο του κοντινότερου γείτονα (neighbor-joining) με το πρόγραμμα MEGA6.06. Δεξιά αναφέρονται οι πιθανοί μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που φέρουν οι οργανισμοί σύμφωνα με την ανάλυση του γονιδιώματός τους.

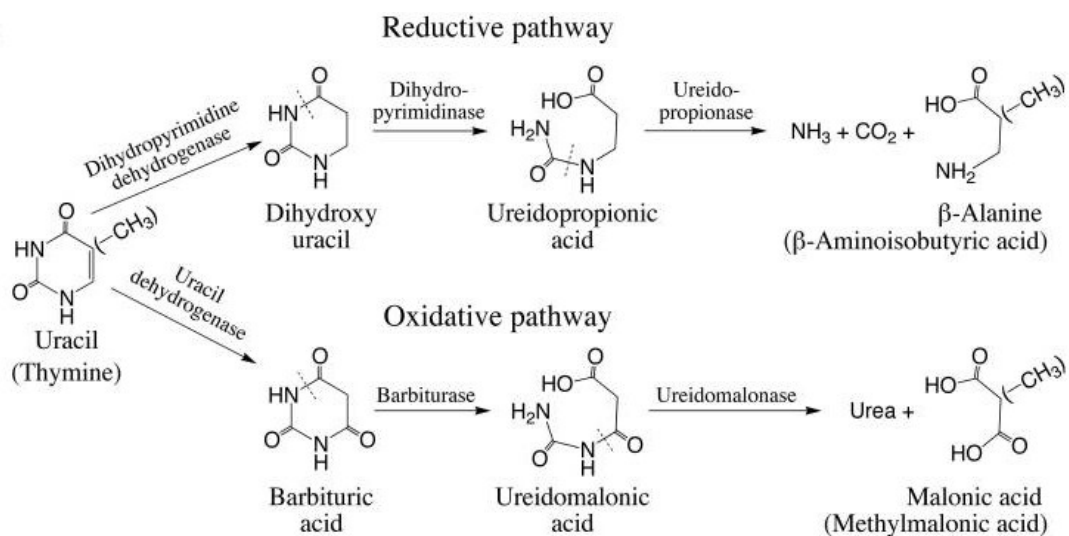
1.4.2 Το εντεροβακτήριο *Escherichia coli* K-12 και οι μεταφορείς πουρινών

Σύμφωνα με την πλήρη αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA του βακτηρίου, η *Escherichia coli* K-12 φαίνεται ότι φέρει 10 ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 που λειτουργούν ή θα μπορούσαν να λειτουργούν ως μεταφορείς πουρινών ή πυριμιδινών, XanQ, XanP, UraA, RutG, UacT, YbbY, PurP, YicO, YjcD, και YgfQ καθώς επίσης και τους AIP (YbbW) και CodB της οικογένειας NCS1, οι οποίοι δεν είναι γνωστής λειτουργίας αλλά έχουν προταθεί ως μεταφορείς αλλαντοΐνης (Cusa *et al.*, 1999) και κυτοσίνης (Danielsen *et al.*, 1992) αντίστοιχα.

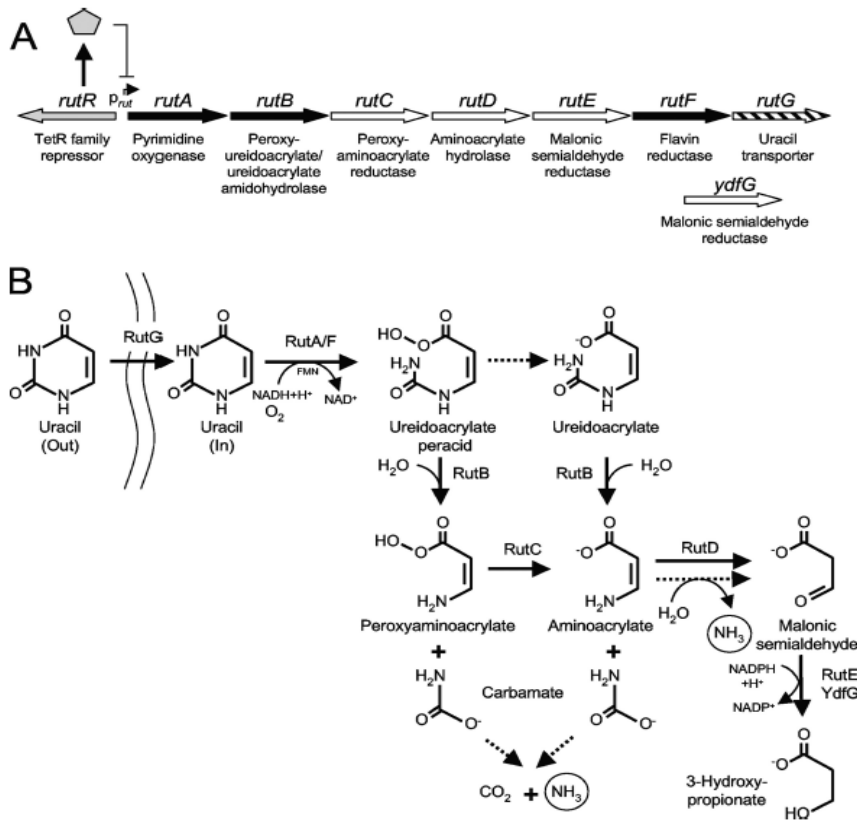
Από τις 10 πιθανά ομόλογα που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 λειτουργικά χαρακτηρισμένες είναι οι XanQ και XanP. Πρόκειται για μεταφορείς ξανθίνης με συγγένεια δέσμευσης (K_m) 4.6 και 2.9 μ M αντίστοιχα (Karatza and Frillingos, 2005). Ο μεταφορέας UacT είναι μεταφορέας ουρικού οξέος με K_m 0.5mM (Papakostas and Frillingos, 2012). Τέλος γνωστής λειτουργίας είναι και ο μεταφορέας UraA η οποία μπορεί να μεταφέρει μόνο ουρακίλη με K_m 0.5 μ M και όπως είδαμε σε προηγούμενο εδάφιο είναι το μόνο βακτηριακό μέλος της οικογένειας NAT/NCS2 που έχει λυθεί η κρυσταλλική του δομή (Lu *et al.*, 2011). Οι τέσσερις αυτοί μεταφορείς μαζί με τον άγνωστης ακόμη λειτουργίας μεταφορέα RutG ανήκουν στον υποκλάδο της οικογένειας NAT/NCS2 με COG2233 που περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος, ουρακίλης/πουρινών και τα ανθρώπινα ομόλογα που μεταφέρουν L-ασκορβικό οξύ. Το ομόλογο RutG ανήκει σε ένα ξεχωριστό οπερόνιο, διαφορετικό από τα γνωστά μεταβολικά οπερόνια για πουρίνες ή πυριμιδίνες που είναι συντηρημένα στα βακτήρια. Στο οπερόνιο αυτό (*rut* operon) περιέχονται γονίδια ενζύμων που φαίνεται να εμπλέκονται στον καταβολισμό πυριμιδινών μέσω ενός ασυνήθιστου μεταβολικού μονοπατιού (Parales and Ingraham 2010). Από την άλλη πλευρά, οι περμεάσες PurP, YjcD, YicO και YgfQ ανήκουν στον δεύτερο υποκλάδο της οικογένειας (COG2252) ο οποίος περιλαμβάνει μεταφορείς αδενίνης, υποξανθίνης ή/και γουανίνης (Cecchetto *et al.*, 2004). Το μόνο γνωστό στοιχείο που υπήρχε για αυτές τις περμεάσες αφορούσε το μεταφορέα PurP για το οποίο είχε προταθεί από πειράματα γενετικής ότι εμπλέκεται στην πρόσληψη της αδενίνης αλλά δεν είχε χαρακτηριστεί λειτουργικά (Burton, 1983; Burton, 1994). Μάλιστα, το γονίδιο του PurP αποτελεί μέρος του ρεγουλονίου (*regulon*) PurR που φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των πουρινών στην *E.coli* (Cho *et al.*, 2011). Στοιχεία που αφορούν τη πιθανή συσχέτιση του PurP και του RutG με τον μεταβολισμό πουρινών και πυριμιδινών, αντίστοιχα, δίνονται αναλυτικά στη συνέχεια.

Ο καταβολισμός των πυριμιδινών στην *E.coli*

Οι πυριμιδίνες καταβολίζονται μέσω δύο βασικών οδών: του αναγωγικού μονοπατιού (reductive pathway) και του οξειδωτικού (oxidative pathway) (Εικόνα 1.11). Στο αναγωγικό μονοπάτι η ουρακίλη (ή η θυμίνη) μετατρέπονται σε διυδροξουρακίλη και τελικό προϊόν του μονοπατιού είναι η παραγωγή β-αλανίνης. Στη περίπτωση του οξειδωτικού μονοπατιού σχηματίζεται βαρβιτουρικό οξύ και το τελικό προϊόν είναι το μηλονικό οξύ (Parales and Ingraham, 2010). Πρόσφατα, όμως, παρατηρήθηκε ότι η *E.coli* μπορεί να χρησιμοποιήσει πυριμιδίνες ως μοναδική πηγή αζώτου για την αερόβια ανάπτυξη της σε θερμοκρασία έως 22°C (Loh *et al.*, 2006). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στον εντοπισμό του οπερονίου *rut* το οποίο περιλαμβάνει ένζυμα που μπορούν να καταβολίσουν την ουρακίλη προς σχηματισμό τελικά 3-υδροξυπροπιονικό. Το μονοπάτι αυτό θεωρείται ως ένας εναλλακτικός μηχανισμός καταβολισμού πυριμιδινών που απαιτεί O₂. Το οπερόνιο φέρει επίσης και ένα γονίδιο πιθανού μεταφορέα ουρακίλης, το *rutG* (Parales and Ingraham, 2010) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.11 Το αναγωγικό (reductive) και το οξειδωτικό (oxidative) μονοπάτι καταβολισμού πυριμιδινών σύμφωνα με τους Loh *et al.*, (2006).

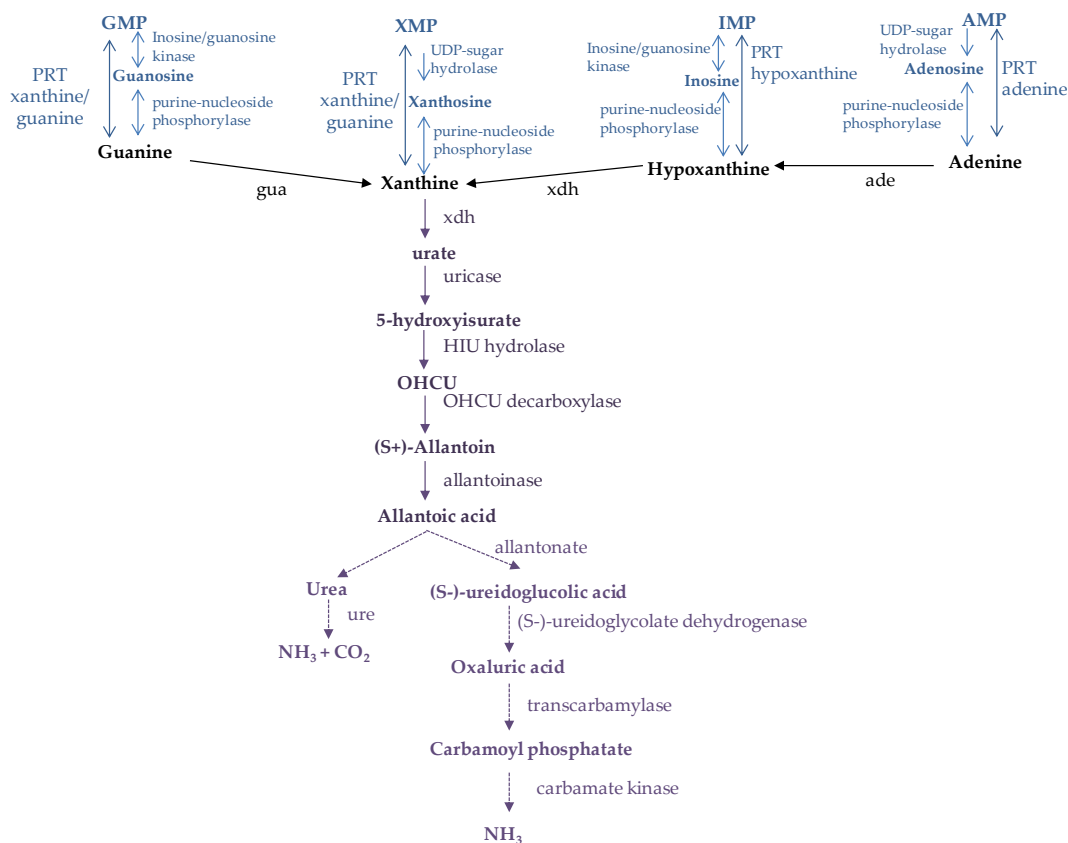


Εικόνα 1.12 Το οπερόνιο *rut* και το προτεινόμενο μεταβολικό μονοπάτι σύμφωνα με τους Parales *et al.* (2010).

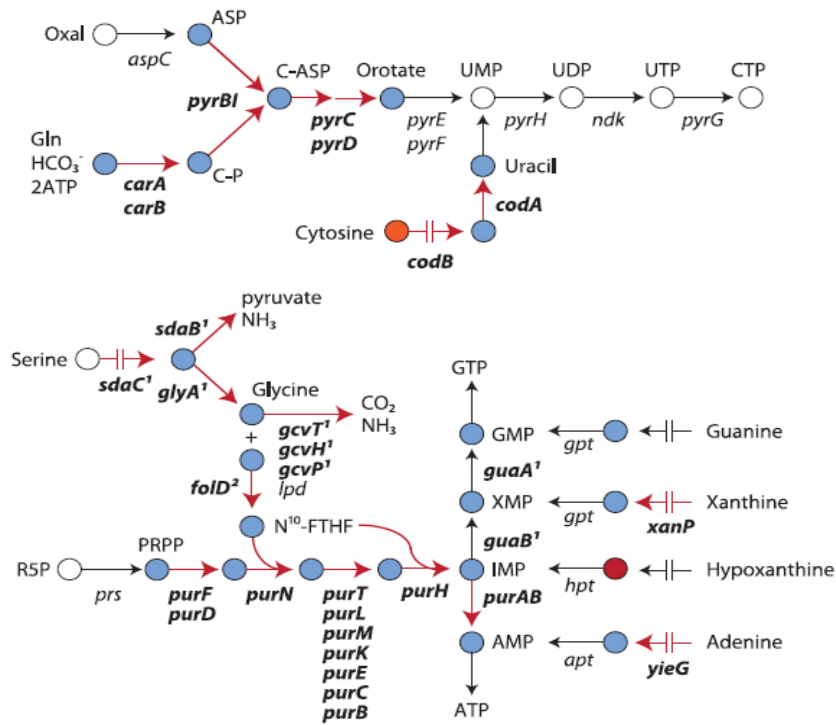
Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι η *E.coli* φέρει άλλο έναν πιθανό μεταφορέα ουρακίλης, τον μεταφορέα UraA (Andersen *et al.*, 1995). Με βάση τα σημερινά δεδομένα γνωρίζουμε ότι ο μεταφορέας UraA ανήκει στην οικογένεια μεταφορέων πουρινών NAT/NCS2, είναι μεταφορέας υψηλής συγγένειας ουρακίλης και είναι ο μόνος μεταφορέας της οικογένειας του οποίου η κρυσταλλική δομή είναι γνωστή (Lu *et al.*, 2011). Το δε γονίδιο που φέρει το οπερόνιο *rut*, το *rutG*, σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση φαίνεται ότι ανήκει και αυτό στην οικογένεια μεταφορέων πουρινών NAT/NCS2. Ειδικότερα βρίσκεται στον ίδιο υποκλάδο της οικογένειας με το UraA και ομολογία μεταξύ τους είναι 36%.

Ρύθμιση του μεταβολισμού πουρινών στην *E.coli* από το μεταγραφικό παράγοντα PurR

Κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού πουρινών (Εικόνα 1.13) και πυριμιδινών έχει το ρεγουλόνιο (regulon) PurR στο εντεροβακτήριο *Escherichia coli*. Έχει βρεθεί ότι κατά την ανάπτυξη της *E.coli* σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο παρουσία αδενίνης ή υποξανθίνης εκφράζεται ο παράγοντας PurR ο οποίος αποτελεί κεντρικό ρυθμιστικό στοιχείο του μεταβολισμού. Η βιοπληροφορική ανάλυση μοτίβων στο σύνολο του γονιδιωματικού DNA του βακτηρίου έδειξε ότι υπάρχουν 35 περιοχές, σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος κυρίως θέσεις αναγνώρισης υποκινητών (promoter), που ο μεταγραφικός παράγοντας PurR μπορεί να συνδεθεί (Cho *et al.*, 2011, Marbach *et al.*, 2012). Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων που καταστέλλονται εμπλέκονται στο μεταβολισμό της σερίνης και κυρίως στον μεταβολισμό των πουρινών και των πυριμιδινών (Εικόνα 1.14). Επίσης μειώνει και τα μεταγραφικά επίπεδα των μεταφορέων XanP (ξανθίνης, NAT/NCS2), PurP (αδενίνης, NAT/NCS2) και CodB (πιθανώς κυτοσίνης, NCS1).



Εικόνα 1.13 Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού (καταβολισμός και αναβολισμός) πουρινών στην *E.coli*. Με μπλε χρώμα τονίζεται το μονοπάτι περίσωσης πουρινών και με μωβ το μονοπάτι του καταβολισμού. (http://www.kegg.jp/keggbin/highlight_pathway?scale=1.0&map=eco00230&keyword=purine%20metabolism)

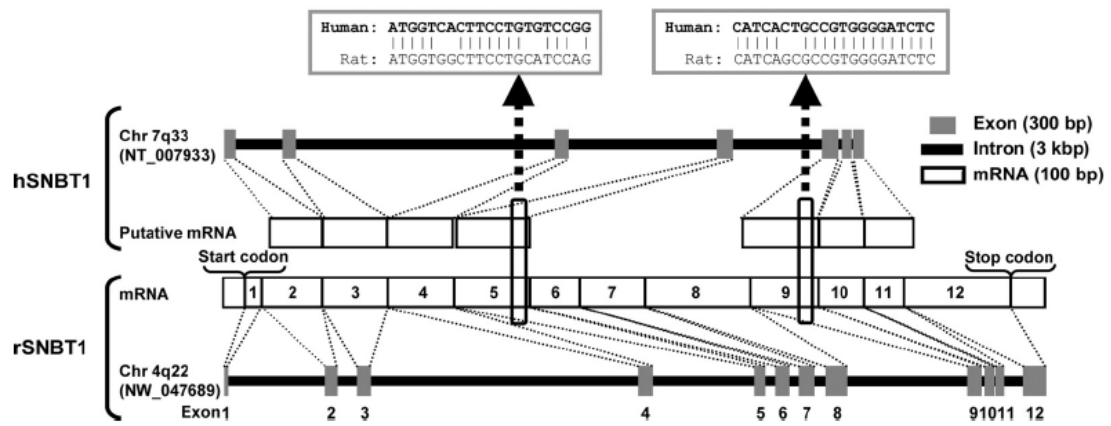


Εικόνα 1.14 Μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από το PurR. Τα γονίδια που ρυθμίζονται από το PurR τονίζονται με έντονη γραφή. Με κόκκινα βέλη επισημαίνονται οι πορείες που καταστέλλονται και με κόκκινα διακεκομμένα βέλη οι μεταφορείς (από Cho *et al.*, 2011).

1.5 Μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 από θηλαστικά

Οι περισσότεροι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που είναι γνωστής λειτουργίας προέρχονται από Βακτήρια, Μύκητες και από Φυτά. Στα θηλαστικά υπάρχουν εν γένει 4 ομόλογα NAT/NCS2 από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά τα δύο ανθρώπινα ομόλογα της οικογένειας (SLC23a1, SLC23a2) ως μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος (hSVCT1 και hSVCT2) (Tsukaguchi *et al.*, 1999), ένα αρκετά διαφορετικό υπόστρωμα από τις πουρίνες. Το τρίτο από αυτά τα ομόλογα (SLC23a3) είναι άγνωστης λειτουργίας (Bürzle *et al.*, 2013). Πριν από μερικά χρόνια, οι Yamamoto *et al.*, (2010) χαρακτήρισαν λειτουργικά το τέταρτο κατά σειρά ομόλογο (SLC23a4) ως τον πρώτο ευκαρυωτικό μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2 από το εντερικό επιθήλιο του επίμυος ο οποίος είναι μεταφορέας πουρινών και πυριμιδινών (rSNBT1).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Yamamoto *et al.*, (2010), ο μεταφορέας rSNBT1 εκφράζεται ειδικά στο εντερικό επιθήλιο του επίμυος. Είναι εξαρτώμενος από το Na⁺ και μεταφέρει με υψηλή συγγένεια δέσμευσης ουρακίλη (K_m 21.2μM) και ξανθίνη (K_m 83.0μM). Επίσης αναγνωρίζει ισχυρά τα φυσικά υποστρώματα θυμίνη (IC₅₀ 12.7μM), γουανίνη (IC₅₀ 80.7μM) και υποξανθίνη (IC₅₀ 17.4μM) αλλά και την 5-φθορο-ουρακίλη. Ο rSNBT1 έχει ταυτότητα 46% και 49% με τα ευκαρυωτικά ομόλογα hSVCT1 και hSVCT2 αντίστοιχα αλλά δεν μεταφέρει L-ασκορβικό οξύ. Το δε ανθρώπινο πιθανό «ορθόλογο» (hSLC23a4) φαίνεται ότι είναι ψευδογονίδιο (Yamamoto *et al.*, 2010) (Εικόνα 1.15). Ο rSNBT1 είναι ο μόνος μέχρι στιγμής μεταφορέας θηλαστικών που έχει μια ιδιαίτερα ευρεία εξειδίκευση καθώς μεταφέρει τόσο πυριμιδίνες όσο και πουρίνες. Η ταυτότητα της αλληλουχίας rSNBT1 με τον μεταφορέα ουρακίλης UraA από την *E.coli* και με τον RutG, τον δεύτερο πιθανό μεταφορέα πυριμιδινών του εντεροβακτηρίου αυτού, είναι περίπου 27%. Τα στοιχεία αυτά καθιστούν τον rSNBT1 ένα χρήσιμο εργαλείο προκειμένου να μελετηθεί τόσο η διεύρυνση της εξειδίκευσης στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 όσο και να συγκριθούν οι βακτηριακοί και ο ευκαρυωτικοί μεταφορείς προκειμένου να βρεθούν τυχόν διαφορές μεταξύ τους στα πλαίσια των σχέσεων δομής-λειτουργίας.



Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση των γονιδίων των hSNBT1 και rSNBT1. Στον hSNBT1 η έλλειψη των 6-8 το καθιστούν ψευδογονίδιο στον άνθρωπο (από Yamamoto *et al.*, 2010).

1.6 Ο μεταφορέας XanQ της *E.coli* ως βάση για την μελέτη της οικογένειας NAT/NCS2

1.6.1 Ανάλυση κυστεϊνικής σάρωσης

Για την συστηματική μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στην οικογένεια NAT/NCS2, χρησιμοποιείται από το εργαστήριό μας η ανάλυση κυστεϊνικής σάρωσης στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ από την *E.coli* K-12. Για να γίνει αυτού του είδους η ανάλυση, οι εγγενείς κυστεΐνες του XanQ αντικαταστάθηκαν (Karatzá *et al.*, 2006) έτσι ώστε να μπορούν να κατασκευαστούν μεταλλάγματα του μεταφορέα μοναδικής κυστεΐνης και να δημιουργηθεί η αντίστοιχη βιβλιοθήκη. Τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης χαρακτηρίζονται λειτουργικά προκειμένου να εντοπιστούν θέσεις που έχουν μικρότερη σημαντικότητα για τον μηχανισμό (ενεργά μεταλλάγματα, δεν έχουν ευαισθησία σε απενεργοποίηση από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια) ή πιθανά μεγάλη σημαντικότητα για τον μηχανισμό (ανενεργά μεταλλάγματα ή μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης υψηλής ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια) τα οποία υποβάλλονται και σε διεξοδικότερη μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο του μεταφορέα αγρίου τύπου. Αυτή η πειραματική αυτή προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη διαμεμβρανικών μεταφορέων (Chen and Rudnick, 2000; Sorgen *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2003; Zomot *et al.*, 2002; Kaback *et al.*, 2007). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η ποικιλία των διαθέσιμων ειδικών για κυστεΐνες αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σήμανση των κυστεϊνών για να μελετηθούν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τους όπως η προσβασιμότητα, η σχετική τους θέση στο κέντρο δέσμευσης, η ευαισθησία τους στις διαμορφωτικές αλλαγές και η εγγύτητά τους με άλλες θέσεις (Frillingos, 2013).

Η ολοκλήρωση της μελέτης ενός μεταφορέα και ο καθορισμός των σημαντικών θέσεων για την λειτουργία του επιτρέπει την γρηγορότερη και στοχευμένη μεταλλαξιγένεση νέων μεταφορέων. Στο εργαστήριό μας εφαρμόστηκε η μεθοδολογία αυτή για τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ από την *E.coli* και έχει βρεθεί το σύνολο των σημαντικών θέσεων (Frillingos 2012; Karena *et al.*, 2015), όπως αναλύεται στην επόμενη ενότητα.

1.6.2 Οι σημαντικές για την λειτουργία θέσεις του μεταφορέα XanQ στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος

Η μεθοδολογία της ανάλυσης κυστεϊνικής σάρωσης που εφαρμόστηκε από το εργαστήριό μας στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ έχει αναδείξει ένα σύνολο σημαντικών θέσεων για την λειτουργία του μεταφορέα (Frillingos, 2012; Karena *et al.*, 2015). Πρόκειται για θέσεις που είναι αναντικατάστατες ή υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς το χαρακτήρα του αμινοξέος που μπορεί να βρίσκεται στην θέση αυτή, θέσεις οι αντικαταστάσεις των οποίων οδηγούν σε αλλαγές εξειδίκευσης ως προς το προφίλ εξειδίκευσης ή και τα μεταφερόμενα υποστρώματα, θέσεις ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια και θέσεις οι αντικαταστάσεις των οποίων οδηγούν σε αλλαγή της συγγένειας δέσμευσης του υποστρώματος (Εικόνα 1.16). Τέτοια κατάλοιπα σημαντικά για την λειτουργία του μεταφορέα έχουν εντοπιστεί και στις δύο δομικές περιοχές [(στην περιοχή «πυρήνα» (core domain) και στην περιοχή «εισόδου» (gate domain)]. Η πλειοψηφία των θέσεων αυτών βρίσκονται στις περιοχές των μοτίβων τα οποία εντοπίστηκαν από την ανάλυση ομολόγων του κλάδου ξανθίνης και ουρικού οξέος και συγκεκριμένα του υποκλάδου που εντάσσονται οι XanQ/UapA. Για την εύρεσή τους επιλέχθηκαν 121 αντιπροσωπευτικά ομόλογα των XanQ και UapA και χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEME. Τα μοτίβα αυτά αποτελούνται από 5-11 αμινοξικά κατάλοιπα και περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία θέση με υψηλή συντήρηση υδρόφιλου χαρακτήρα ή Gly. Συμπεριλήφθηκαν και θέσεις κοντά στα μοτίβα που διατηρούν απόλυτα συντηρημένο υδρόφιλο ή μικρού μεγέθους κατάλοιπο (Karena *et al.*, 2015).

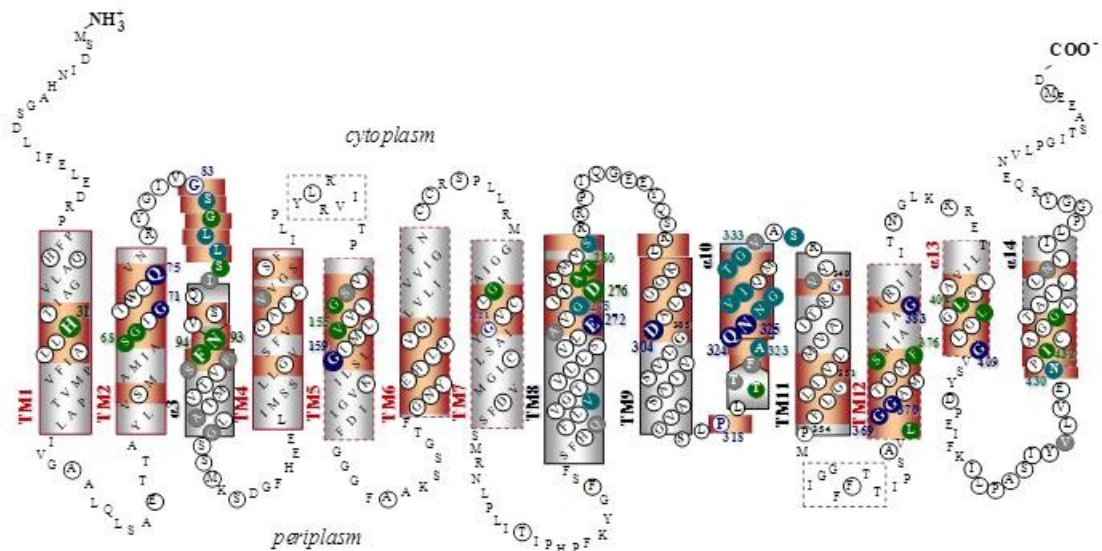
Στις έλικες του μεταφορέα που σχηματίζουν την δομική περιοχή «πυρήνα» (TM1-4 και TM8-11) έχουν βρεθεί τα αναντικατάστατα E272 (TM8) (Mermelekas *et al.*, 2010), D304 (TM9), Q324 και N325 (TM10) (Georgoroulou *et al.*, 2010) και πρόσφατα τα G71 και Q75 (TM2) (Karena *et al.*, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι θέσεις Q75 και D304 είναι αναντικατάστατες αλλά το διπλό μετάλλαγμα Q75N/D304E είναι λειτουργικό και η συγγένεια δέσμευσης του υποστρώματος είναι υψηλή, υποδηλώνοντας ότι οι θέσεις αυτές αλληλεπιδρούν και αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική για την λειτουργία του μεταφορέα (Karena *et al.*, 2015). Η θέση της His-31 (TM1) υπόκειται σε περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή της, καθώς απαιτείται ένα πολικό αμινοξύ προκειμένου να εκφράζεται και να έχει υψηλά επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης ο μεταλλαγμένος δέσμευσης του υποστρώματος (Karena and Frillingos, 2009). Η θέση D276 (TM8) απαιτεί καρβοξυλομάδα για να έχει ο μεταλλαγμένος μεταφορέας μέγιστα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης. Επίσης, το ενεργό μετάλλαγμα D276E διαφέρει σημαντικά από τον μεταφορέα αγρίου τύπου καθώς έχει αποδειχθεί ότι αλλάζει

σημαντικά το προφίλ εξειδίκευσης και πιθανώς το προφίλ ενεργότητας σε όξινα pH (Mermelekas *et al.*, 2010).

Η κατασκευή του μεταφορέα ξανθίνης XanQ ελεύθερου κυστεϊνών (με αντικατάσταση των πέντε εγγενών κυστεϊνών με Ser) έδωσε την δυνατότητα να δημιουργηθεί βιβλιοθήκη μεταλλαγμάτων μονής κυστεϊνης (Karatzas *et al.*, 2006). Η μελέτη τους με αλκυλιωτικά αντιδραστήρια ανέδειξε μια σειρά θέσεων ευαίσθητων σε απενεργοποίηση από το NEM. Στην διαμεμβρανική έλικα 3 (TM3) οι θέσεις Ser-84, Leu-86 και Leu-87 είναι θέσεις ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από το αλκυλιωτικό αντιδραστήριο NEM με το IC₅₀ στην περίπτωση της Leu-86 να είναι στα 25μM ενώ στις άλλες δύο θέσεις είναι υψηλότερο της τάξεως των 110-130μM (Karatzas *et al.*, 2015). Ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από το NEM (IC₅₀ 15μM) είναι και η θέση G275 στην έλικα 8 (TM8) (Mermelekas *et al.*, 2010) καθώς επίσης αντίστοιχα υψηλή ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το αλκυλιωτικό αντιδραστήριο έχουν και οι θέσεις A323, N326, G327, V328, I329, T332 και G333 στην έλικα 10 (TM10) με τιμές IC₅₀ 10-90μM (Georgopoulou *et al.*, 2010). Τέλος η θέση N430 η οποία βρίσκεται στην έλικα 14 (α14), στην περιοχή της «εισόδου» του μεταφορέα, έχει και αυτή υψηλή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM με IC₅₀ 10μM (Parakostas *et al.*, 2008).

Ως προς την εξειδίκευση του μεταφορέα έχουν εντοπιστεί θέσεις που οι αντικαταστάσεις τους έχουν διαφοροποιημένο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου. Η πλέον σημαντική είναι η Asn-93 στην έλικα 3 (TM3) η αντικατάσταση της οποίας από Ala ή Ser αλλάζει και τα μεταφερόμενα υποστρώματα. Τα μεταλλάγματα αναγνωρίζουν ουρικό οξύ, 7- μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη τα οποία ο μεταφορέας αγρίου τύπου δεν τα αναγνωρίζει καθόλου ($K_i > 1\text{mM}$) και επίσης έχει δεχτεί ότι μπορούν να μεταφέρουν σε χαμηλά επίπεδα ουρικό οξύ, μετατρέποντας έτσι την εξειδίκευση του μεταφορέα από αποκλειστικά ξανθίνης σε διπλής εξειδίκευσης ξανθίνης και ουρικού οξέος (Karatzas and Frillingos, 2009).

Τα αποτελέσματα από την εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ και ο εντοπισμός των καταλοίπων που είναι σημαντικά για την λειτουργία του μεταφορέα αυτού, αποτελούν το βασικό εργαλείο προκειμένου να μελετήσουμε την σχέση δομής-λειτουργίας στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που εμφανίζουν νέες εξειδικεύσεις. Η λογική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες περιπτώσεις πολυτοπικών πρωτεϊνών και έχει δεχτεί η χρησιμότητά της για την μελέτη των σχέσεων δομής και λειτουργίας (Frillingos *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 2003; Kaback *et al.*, 2007).



Εικόνα 1.16 Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα ξανθίνης XanQ στο οποίο τονίζονται τα μοτίβα και τα σημαντικά κατάλοιπα. Σε πορτοκαλί φόντο τονίζονται τα συντηρημένα μοτίβα που έχουν εντοπιστεί στον υποκλάδο ξανθίνης/ουρικού οξέος. Τα σημαντικά κατάλοιπα τονίζονται με έντονη γραφή σε μπλε τα αναντικατάστατα, με πράσινο οι θέσεις που υπόκεινται σε περιορισμούς, με γαλάζιο οι θέσεις υψηλής ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το NEM και εκείνα που είναι χαμηλής ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το NEM με γκρι (από Karena *et al.*, 2015).

1.7 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Οι γνώσεις μας γύρω από τους μεταφορείς πουρινών είναι ακόμη και σήμερα περιορισμένες. Ιδιαίτερα, υπάρχουν αρκετά κενά στις γνώσεις μας για το πώς καθορίζονται οι επιμέρους διαφορές εξειδίκευσης ανάμεσα σε ομόλογους μεταφορείς που είναι πολύ συγγενικοί μεταξύ τους ως προς τη δομή και την αλληλουχία. Αυτό ισχύει περισσότερο για την εξελικτικά ευρεία οικογένεια των μεταφορέων πουρινών-πυριμιδινών NAT/NCS2. Με δεδομένο ότι ελάχιστα ομόλογα έχουν αναλυθεί διεξοδικά έως σήμερα (XanQ, UapA, UraA), Απαιτείται ο λειτουργικός χαρακτηρισμός και η περαιτέρω μελέτη ομολόγων της οικογένειας, αντιπροσωπευτικών από όλες τις ομάδες. Προκειμένου έχουμε πιο σαφή εικόνα για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης, στους βακτηριακούς κυρίως μεταφορείς NAT/NCS2, χρησιμοποιείται ως πρότυπο ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ για τον οποίο η ανάλυση με κυστεϊνική σάρωση και η εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση που έχει γίνει από το εργαστήριό μας έχουν αποκαλύψει θέσεις γύρω από το προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος που είναι σημαντικές για την λειτουργία του μεταφορέα.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποσκοπεί στην συστηματική μελέτη των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 προκειμένου:

α) να χαρακτηριστούν νέα ομόλογα της οικογένειας και να βρεθούν μεταφορείς νέων εξειδικεύσεων από όλες τις ομάδες της οικογένειας. Για τον σκοπό αυτό έγινε λειτουργικός χαρακτηρισμός ομολόγων της οικογένειας από το εντεροβακτήριο *Escherichia coli* K-12 και από το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* 1021.

β) να εντοπιστούν θέσεις που καθορίζουν την εξειδίκευση των μεταφορέων στην περιοχή που σχηματίζεται το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Για αυτό επιλέχθηκαν, από όλες τις ομάδες της οικογένειας, νεοχαρακτηρισμένοι μεταφορείς που έχουν νέες και διακριτές εξειδικεύσεις σε σχέση με τους έως τώρα γνωστούς και υποβλήθηκαν σε συγκριτική μεταλλαξιγένεση. Για την ομάδα των COG2252 υποβλήθηκαν σε μεταλλαξιγένεση οι μεταφορείς της *E.coli* K-12 PurP (αδενίνης) και YjcD (γουανίνης/υποξανθίνης). Για την ομάδα COG2233 υποβλήθηκαν σε μεταλλαξιγένεση από τον κλάδο ξανθίνης ή/και ουρικού ο μεταφορέας του *S.meliloti* SmLL9 (ξανθίνης και ουρικού οξέος), ο οποίος συγκρίθηκε με τον συγγενικό του XanQ, και από τον κλάδο ουρακίλης/πουρινών ο μεταφορέας της *E.coli* K-12 RutG (ουρακίλης και θυμίνης), ο οποίος συγκρίθηκε με τον συγγενικό του UraA (ουρακίλης), καθώς και ο ευκαρυωτικός μεταφορέας rSNBT1, ο οποίος είναι ευρύτερης εξειδίκευσης (ουρακίλης, θυμίνης και πουρινών).

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Όργανα

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5415 D

Επωαστικός κλίβανος: Forma Direct Heat CO₂ Incubator, Thermo Scientific

Ηθμοί διήθησης (Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm) για την κατακράτηση του κυτταρικού κλάσματος.

Λάμπα UV (UV transilluminator, Canon, Europe)

Μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri)

Μετρητής pH (πεχάμετρο) (pH Meter, pH 340 Package, 240V) (Beckmann Instruments, UK)

Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut) του Λειτουργικού-Κλινικοεργαστηριακού Τομέα της Ιατρικής Σχολής (εργαστήριο Φαρμακολογίας) ή του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος (εργαστήριο Βιοχημείας)

Σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων (Microliter Syringes), Hamilton (Bonaduz, Switzerland)

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

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

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

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

Συσκευή υπερήχων digital sonifier model 250-D (Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut)

Υδατόλουτρο (ED-5A open Bath Circulator) (Julabo, Germany)

Υπερφυγόκεντρος Beckmann Optima™ Ultracentrifuge (Beckmann Instruments, Palo Alto, California)

Φυγόκεντρικός συμπυκνωτής κενού (SpeedVac concentrator, Savant Instruments, Hicksville, New York)

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

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

Φωτογραφική κάμερα με οθόνη απεικόνισης (DNA Photographic Transilluminator System, TFT LCD color monitor, Canon)

Φωτόμετρο Ultraspec-2001 (Biochrom, Cambridge, England)

Για την επαλήθευση της αλληλουχίας DNA, μετά την μεταλλαξιγένεση, δείγμα DNA στάλθηκε στην εταιρία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο του F. Sanger (ενζυμική αντίδραση πολυμερισμού και τερματισμός με 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια) σε Αυτόματο Αναλυτή Αλληλουχίας (Applied Biosystems).

2.2 Χημικά Αναλώσιμα

Ραδιενεργά σημασμένα υποστρώματα της εταιρείας Moravek Biochemicals (Brea, CA):

[8-³H] ξανθίνη (22.8 Ci/mmol)

[2,8-³H] υποξανθίνη (27.7 Ci/mmol)

[8-³H] γουανίνη (21.2 Ci/mmol)

[5,6-³H] ουρακίλη (40 Ci/mmol)

[2,8-³H] αδενίνη (31.8 Ci/mmol)

[8-¹⁴C] ουρικό οξύ (57.8 Ci/mmol)

[2-¹⁴C] θυμίνη (57 Ci/mmol)

Φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα της εταιρείας Sigma (St. Louis, Missouri):

αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, ουρικό οξύ, ουρακίλη, θυμίνη, κυτοσίνη, αλλοπουρινόλη, πουρίνη, N⁶-βενζόλοαδενίνη, δι-αμινοπουρίνη, 7-μεθυλοαδενίνη, 9-μεθυλοαδενίνη, 3-μεθυλοαδενίνη, 6-θειογουανίνη, 2-μερκαπτοπουρίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, 1-μεθυλογουανίνη, 7-μεθυλογουανίνη, 8-αζαγουανίνη, 8-αζαξανθίνη, 8-βρωμοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, οξυπουρινόλη, 5-φθοροουρακίλη.

Ολιγο-δεοξυριβονουκλεοτίδια:

συντέθηκαν κατά παραγγελία από την εταιρεία BioSpring GmbH (Frankfurt, Germany)

DNA πολυμεράση:

Kapa HiFi DNA polymerase (KapaBiosystems, Boston, United States)

Phusion High Fidelity PCR System (Tools for Molecular Biology-FINNZYMES, Espoo, Finland)

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες της εταιρείας Takara (BIO INC., Japan): BamHI, ApaI, EcoRV, NotI

DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 της εταιρείας Takara (BIO INC., Japan)

Αλκαλική φωσφατάση της εταιρείας Takara (BIO INC., Japan)

Σύζευγμα αβιδίνης - υπεροξειδάσης (avidin-HRP, Amersham Pharmacia BioTech, Uppsala, Sweden)

Σύζευγμα στρεπταβιδίνης - υπεροξειδάσης (streptavidin-HRP, Millipore, California, USA)

GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus, ready to use (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)

Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)

Γενετισίνη: G418 Sulfate AdipoGen, G418 Sulphate Clontech

DMEM Low Glucose w/ stable Glutamine w/ Sodium Pyruvate - 500ml (Biosera)

DMSO Dimethylsulfoxid >99,5%

Αντιδραστήριο για DNA transfection: Xfect™, 100 rxns (Clontech)

Διάλυμα τρυψίνης: Trypsin 0.25 % in PBS w/o Calcium w/o Magnesium 100ml (Biosera)

Διάλυμα Πενικιλίνης – Στρεπτομυκίνης: Penicillin- Streptomycin Solution 100X (Biosera)

Αποστειρωμένα πιάτα κυτταροκαλλιέργειών με 24 θέσεις: Quali - Micro-Plates for Tissue cultures, flat, sterile, with lid, 24 well

Αποστειρωμένα πιάτα κυτταροκαλλιέργειών με 6 θέσεις: Quali - Micro-Plates for Tissue cultures, flat, sterile, with lid, 6 well

Αποστειρωμένα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών: Quali - Petri Dishes for Tissue Culture, gamma-sterilized 20, 55cm³

Μικροσωληνίσκοι κρυοαποθήκευσης: Cryotubes, sterile, polypropylen, internal thread with silicone washer, freestanding 1,2 ml

HEPES για κυτταροκαλλιέργεια: HEPES, cell culture tested (Biosera)

Ορός εμβρύου βοός: Foetal Bovine Serum (South America origin) (Biosera)

Πακέτα υλικών (kits):

πακέτο υλικών καθαρισμού DNA από δείγματα πήγματος αραρόζης NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Macherey-Nagel (Duren, Germany)

πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας NucleoSpin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany)

πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας NucleoBond Xtra Maxi Macherey-Nagel (Duren, Germany)

πακέτο - πρωτόκολλο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL™ Western Blotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

2.3 Διαλύματα

Διάλυμα διαχωρισμού (Separation buffer), pH 8.8: Tris 1.5M, SDS 0.4% (w/v).

Διάλυμα επαναιώρησης (Resuspension buffer): Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 100mM, Na₂EDTA 1mM.

Διάλυμα επαναιώρησης TB, pH 6.7: Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250 mM, αποστείρωση.

Διάλυμα Επιστοιβαξης (Stacking buffer), pH 6.8: Tris 0.5M, SDS 0.4% (w/v)

Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης: Γλυκίνη 0.192 M, Tris, pH 8.3, 0.025 M, SDS 0.1% (w/v)

Διάλυμα Μεταφοράς: Tris-Cl pH 8.3, 25mM, Γλυκίνη 192mM, μεθανόλη 20% (v/v)

Διάλυμα Σακχαρόζης (Sucrose buffer): Tris-HCl 25mM, pH 8, σακχαρόζη 45% (w/v), Na₂EDTA 1mM

Διάλυμα Τερματισμού: KPi (pH 7.5, 0.1M), LiCl 0,1M

Διάλυμα Υπερθειϊκού Αμμωνίου (APS) 10% (w/v)

Διάλυμα Φόρτωσης 4x (Loading buffer): Tris pH 6.8 250mM, SDS 9.2% (w/v), DTT 100mM, Γλυκερόλη 40% (v/v), Μπλε της βρωμοφαινόλης 0.2% (w/v)

Θρεπτικό Υλικό SOB, pH 7.5: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Τρυπτόνη 2%(w/v), NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, αποστείρωση

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth), pH 7.2: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Τρυπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), αποστείρωση

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth) σε άγαρ: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Πεπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), άγαρ 1.5% αποστείρωση

TBST 10X: Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM, NaCl 1.5 M, Triton X-100, 2% (v/v)

Υγρό Σπινθηρισμού (Scintillation fluid): Τολουόλιο 66%(v/v), Triton X-100 33%(v/v), 2,5-διφαινυλο-οξαζόλη (PPO) 4%(w/v), 1,4-δις(5-φαινυλοξαζολο-2-υλο)βενζόλιο (POPOP) 0.04%(w/v).

PBS 1X: 8gr NaCl, 2gr KCl, 14.4gr Na₂HPO₄, 0.24gr KH₂PO₄ σε 1lt dH₂O

2.4 Ρυθμιστικά διαλύματα πειραμάτων εξάρτησης από pH

Για τα πειράματα εξάρτησης από pH 3.8-4.8 χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα οξικών 0.1M τελικού όγκου 10ml που προέκυψαν από ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων οξικού οξέος και οξικού καλίου (Πίνακας 2.1).

Ρυθμιστικά διαλύματα οξικών 0.1M			
pH	CH ₃ COOH(0.2M)	CH ₃ COOK(0.2M)	dH ₂ O
3.8	4.4ml	0.6ml	5ml
4.2	3.675ml	1.325ml	5ml
4.8	2.05ml	2.95ml	5ml

Πίνακας 2.1: Στον πίνακα αυτό δίνεται η αναλογία των όγκων διαλύματος CH₃COOH (0.2M) (5.71 ml και προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 500 ml) και διαλύματος CH₃COOK (0.2M) (49 g στα 500 ml ddH₂O) για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων οξικών (0.1M) με τιμές pH 3.8, 4.2 και 4.8 (Θεοδώρου, 2006/ Καρενά 2007).

Για τιμές pH από 5.2 έως 8.2 χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών 0.1M, τελικού όγκου 10ml που παρασκευάστηκαν με ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων KH₂PO₄ (1 M) και K₂HPO₄ (1 M) όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.2.

Ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών KP _i 0.1M			
pH	KH ₂ PO ₄ (1M)	K ₂ HPO ₄ (1M)	dH ₂ O
5.2	0.980ml	0.02ml	9ml
5.6	0.945ml	0.055ml	9ml
6.0	0.860ml	0.140ml	9ml
6.4	0.750ml	0.250ml	9ml
6.8	0.500ml	0.500ml	9ml
7.3	0.270ml	0.730ml	9ml
7.5	0.200ml	0.800ml	9ml
8.2	0.030ml	0.970ml	9ml

Πίνακας 2.2: Στον πίνακα αυτό δίνεται η αναλογία των όγκων διαλύματος KH₂PO₄ (1M) (68.045 g στα 500 ml ddH₂O) και διαλύματος K₂HPO₄ (1M) (87.09 g στα 500ml ddH₂O) για την παρασκευή οκτώ ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών (0.1M) με τιμές pH 5.2 έως 8.2 (Καρενά 2007).

Τέλος για τιμές pH 8.6 έως 10.0 χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα βορικών 0.1 M, τελικού όγκου 10 ml με την αναλογία διαλύματος καυστικού καλίου (KOH 0.2 M) και διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) και H₃BO₃ (0.2 M) που αναγράφεται στον **Πίνακα 2.3**.

Ρυθμιστικά διαλύματα βορικών 0.1M			
pH	KCl+H ₃ BO ₃ (0.2M)	KOH(0.2M)	dH ₂ O
8.6	5ml	1.5ml	3.5ml
9.0	5ml	2.3ml	2.7ml
9.5	5ml	3.67ml	1.36ml
10.0	4.5ml	5.5ml	-

Πίνακας 2.3: Στον Πίνακα αυτό δίνεται η αναλογία των όγκων διαλύματος KCl + H₃BO₃(0.2M) (KCl 7.456 g και H₃BO₃ 6.185 g σε 500 mL ddH₂O) και διαλύματος KOH (0.2M) (2.24 g KOH σε 200 mL ddH₂O) για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων οξικών (0.1M) με τιμές pH 8.6, 9.0, 9.5 και 10.0 (Θεοδώρου, 2006/ Καρενά 2007)

2.5 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εργαστηριακά στελέχη της *Escherichia coli* K-12:

***E. coli* TOP10F'** (F' {*lacI^q*, *Tn10*(*Tet^R*)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mrcBC*) ϕ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *deoR* *recA1**araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(*Str^R*) *endA1* *nupG*) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα λόγω του μεγάλου βαθμού επιδεκτικότητας (competence efficiency) που διαθέτει.

***E. coli* T184** [*lacI^q* *O⁺* *Z⁻* *Y⁻* (A), *prsL*, *met*, *thr*, *recA*, *hsdM*, *hsdR/F'*, *lacI^q* *O⁺* *Z^{D118}* (Y+ A+)] (Teather *et al.*, 1978): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Το γονιδίωμα του στελέχους T184 δεν περιέχει ενδογενή γονίδια που να επάγονται με IPTG (*lacZ⁻* *Y⁻*). Σε *E. coli* T184 γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ξανθίνης και ουρικού οξέος (Karatzas and Frillingos, 2005).

E. coli* JW3692** (F⁻, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787::*rrnB*-3), λ ⁻, *rph*-1, Δ *purP*745::*kan*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR*514) ***ΔpurP (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* *ΔpurP* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς αδενίνης και υποξανθίνης (Papakostas *et al.*, 2013).

E. coli* JW4025** (F⁻, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787::*rrnB*-3), λ ⁻, *rph*-1, , Δ (*rhaD-rhaB*)568, Δ *yjcDP*758::*kan* *hsdR*514) ***ΔyjcD (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* *ΔyjcD* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς γουανίνης (Papakostas *et al.*, 2013).

E. coli* JW2482** (F⁻, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787::*rrnB*-3), λ ⁻, *rph*-1, , Δ (*rhaD-rhaB*)568, Δ *uraA*745::*kan* *hsdR*514) ***ΔuraA (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* *ΔuraA* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ουρακίλης και θυμίνης (Papakostas *et al.*, 2013).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη ριζοβακτηρίων (*Sinorhizobium meliloti* ή *Mesorhizobium loti*) τα οποία παραχωρήθηκαν από την συνεργαζόμενη ομάδα

του Επίκουρου Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών):

S. meliloti 1021 (<http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/>)

M. loti MAF303099 (<http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/>)

M. loti MAF303099/*SmLL9*: Η μεταφορά του γονιδίου *SmLL9* από το *S. meliloti* 1021 στο *M. loti* έγινε μέσω του πλασμιδίου pJB3Tc19+SMc02513myc (ο πλασμιδιακός φορέας pJB3Tc19 παραχωρήθηκε ευγενώς από τον José I. Jiménez Zurdo, Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Estacion Experimental del Zaidin, CSIC, Granada, Spain). Το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του *M. loti* MAF303099 με ηλεκτροδιάτρηση, σε Gene Pulser II (Bio-Rad).

Τα 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), Sahin-Toth *et al.*, 1995].

pT7-5/*melY*-BAD: ανασυνδιασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*melY*) του μεταφορέα μελιβιόζης *MelY* και, ως C-τελικό άκρο, την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *K. pneumoniae* και το καρβοξυτελικό 12πεπτίδιο της *LacY* (C-τελικός επίτοπος). (Frillingos and Kaback, 2001)

pT7-5/*xanQ*-BAD: ανασυνδιασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του *XanQ* φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο. (Karatza and Frillingos, 2005)

pT7-5/*yjcD*-BAD: ανασυνδιασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*yjcD*) του μεταφορέα γουανίνης *YjcD* φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκαπεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο. (Papakostas *et al.*, 2013)

pT7-5/*purP*-BAD: ανασυνδιασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*purP*) του μεταφορέα αδενίνης *PurP* φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-

πεπτιδίο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο. (Papakostas *et al.*, 2013)

pT7-5/SmLL9-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο του μεταφορέα SmLL9 φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτιδίο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/uraA-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*uraA*) του μεταφορέα UraA φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτιδίο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/rutG-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*rutG*) του μεταφορέα RutG φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτιδίο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/NCS2transporter-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο του μεταφορέα φυσικού τύπου (wt) που μελετάται κάθε φορά, και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτιδίο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pEGFP-N1/rSNBT1: ανασυνδυασμένο pEGFP-N1 που φέρει το cDNA του rSNBT1(wt) (ευγενής παραχώρηση από τον Dr. H. Yuasa, Nagoya City University, Japan) ακολουθούμενο από την αλληλουχία του EGFP. Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη/ καναμυκίνη, επιτρέποντας έτσι την επιλογή των κυττάρων με την χρήση των κατάλληλων αντιβιοτικών.

2.6 Τεχνικές ανασυνδιασμένου DNA

2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 από το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* 1021 χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενός σταδίου με εκμαγείο το ολικό γονιδιωματικό DNA του οργανισμού, το οποίο παραχωρήθηκε από τον Δρ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των έξι αυτών γονιδίων (Q92LL9, Q92LL8, Q92X28, Q92WQ0, Q92YE1, Q92VC3) σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να εισαχθούν περιοριστικές θέσεις των ενζύμων BamHI και ApaI στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων αντίστοιχα και να επιτραπεί στην συνέχεια ένθεση των προϊόντων PCR στην αλληλουχία του πλασμιδίου pT7-5-BAD με αντικατάσταση του θραύσματος BamHI-ApaI στον φορέα. Οι εκκινητές φαίνονται στον πίνακα 2.4. Τα γονίδια των μεταφορέων PurP, YjcD, UraA, RutG είχαν κλωνοποιηθεί και εισαχθεί με την ίδια τεχνική στο φορέα pT7-5 στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του Δρ. Κ. Παπακώστα (Παπακώστας, ΔΔ, 2011). Το γονίδιο του ευκαρυωτικού ομολόγου είχε εισαχθεί στο πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1, με αντικατάσταση του θραύσματος EcoRI-NotI στο φορέα.

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng γονιδιωματικού DNA
- 10 μM από κάθε εκκινητή
- 1x ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει MgCl₂
- 2.5mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
- 1 U/μl DNA πολυμεράση (Phusion ή Kapa HiFi DNA polymerase)

Η PCR εφαρμόστηκε για 30 κύκλους στις εξής συνθήκες:

98 °C για 3min

.....

98 °C για 1 min (Αποδιάταξη δίκλωνου DNA)

*65-68°C για 1:30 min (πρόσδεση εκκινητών)

72 °C για 2 min (επιμήκυνση του DNA)

.....

72 °C για 7min

* Η θερμοκρασία εξαρτάται από το T_m των εκκινητών κάθε φορά.

Πίνακας εκκινητών για κλωνοποίηση γονιδίων από το *Sinorhizobium meliloti*

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητών
pT7-5/SmLL9-BAD	Q92LL9sense: GAGGAGGGATCCTTGGCAAACAGTGCAGAGGAAACCGTATC Q92LL9 antisense: ATTATGGGGCCCTGTGCTTCCGCTGCAAGCACAGGCACTTC
pT7-5/SmLL8-BAD	Q92LL8 sense: GGAGGAGGATCCATGAACGATGTCATCCAGCATACATCCC Q92LL8 antisense: AATACTGGGGCCCTGGCCTTCTGCAAGACGCGCTGCCTC
pT7-5/SmX28-BAD	Q92X28 sense: GGAGGAGGATCCATGAATACGGATTTCGAAGTGCGATGC Q92X28 antisense: TTTTATGGGGCCCCAGGATGTCGCATAGCGCCTTCACCGAG
pT7-5/SmWQ0-BAD	Q92WQ0 sense: GACCATGGATCCATGACCGGGAACAAAATCGATTCTATCGAC Q92WQ0 antisense: CATTATGGGGCCCTCCGGACGAAAAACCGCTGC
pT7-5/SmVC3-BAD	Q92VC3 sense: GAATATGGATCCATGGCCGGGCTCTTGGAGGAGCAACAC Q92VC3 antisense: GAATATGGGGCCCTCGGCGAAGAATGCGAAGCGGAC
pT7-5/SmYE1-BAD	Q92YE1 sense: CAGTCAGGATCCATGAACTATCAGTCGAAAGTCGCG Q92YE1 antisense: CTAATTGGGGCCCTGAACCTGCATCACCAGCATC

Πίνακας 2.4 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες των γονιδίων και οι εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Υπογραμμίζονται οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων BamHI και ApaI, με έντονη γραφή οι σιωπηλές αλλαγές

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

Πρόκειται για ένα πρωτόκολλο PCR δυο σταδίων (ή και περισσότερων, αναλόγως του επιθυμητού προϊόντος). Στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιούνται κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) με σκοπό την δημιουργία δυο επικαλυπτόμενων τμημάτων από το αρχικό γονίδιο στόχο. Για την κατασκευή του γονιδίου με μια μετάλλαξη απαιτούνται ένα ζεύγος εξωτερικών εκκινητών και ένα ζεύγος εσωτερικών, σχεδιασμένων έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή μετάλλαξη. Έπειτα τα δυο τμήματα αυτά χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα στο επόμενο στάδιο, τα επικαλυπτόμενα άκρα τους υβριδοποιούνται και με την χρήση του ίδιου ζεύγους εξωτερικών εκκινητών προκύπτει ολόκληρο το γονίδιο-στόχος με την επιθυμητή μετάλλαξη. Στο τέλος κάθε σταδίου τα προϊόντα καθαρίζονται με την χρήση πήγματος αγαρόζης 1% και ανακτώνται με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).

Ειδικότερα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή αντίστοιχες ποσότητες προϊόντων PCR μετά από καθαρισμό
- 10 μM από κάθε εκκινητή
- 10x ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει MgCl₂
- 2.5mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
- 1 U/μl DNA πολυμεράση (Phyision ή Kapa HiFi DNA polymerase)
- Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη Millipore μέχρι τελικό όγκο 100 μL

Η PCR εφαρμόστηκε για 30 κύκλους ως εξής:

1^ο στάδιο:

98 °C για 3min

.....

98 °C για 1 min (Αποδιάταξη δίκλωνου DNA)

*52-59°C για 1:30 min (πρόσδεση εκκινητών)

72 °C για 2 min (επιμήκυνση του DNA)

.....

72 °C για 7min

* Η θερμοκρασία εξαρτάται από το T_m των εκκινητών κάθε φορά.

2^ο στάδιο:

98 °C για 3min

.....

98 °C για 1 min (Αποδιάταξη δίκλωνου DNA)

59°C για 2 min (πρόσδεση εκκινητών)

72 °C για 2 min (επιμήκυνση του DNA)

.....

72 °C για 7min

Οι εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *lacZ50* sense 5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3' και ο *Yk(pT7-5)-His₁₀* antisense με αλληλουχία 5'-GACGGGGAGTCAGGCAACTATGG-3' για την πλειοψηφία των κατασκευών των βακτηριακών μεταφορέων (*PurP*, *YjcD*, *UraA*, *RutG*, *SmLL9*). Εξαίρεση είναι οι κατασκευές στο *UraA I123A/L136A* και *I132F/G133L/L136F* που σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξωτερικοί εκκινητές ο *UraA* sense: 5'-GAAGATGGATCC/ATG/ACG/CGT/CGT/GCT/ATA/GGG/GTG/AGT/G-3' και *UraA* antisense: 5'-TCGGTAGGGGCC/CTT/GTC/TGT/TAT/ATC/CGC/GTC/TTC/TGC-3'. Για τις μεταλλάξεις στο ευκαρυωτικό ομόλογο *rSNBT1* χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την PCR ο πλασμιαδικός φορέας *pEGFP-N1* στον οποίο είχε ήδη εισαχθεί το γονίδιο του μεταφορέα με αντικατάσταση του θραύσματος *EcoRI-NotI* και με εξωτερικούς εκκινητές τους *rSNBT1* sense: 5'-GCTAGCGATATC/ATG/AAC/TCT/GCA/GTC/TGC/AGC-3' και *rSNBT1* antisense: 5'-ATTGCAGCGCCGC/CAT/CTT/GGT/TTC/TGT/AAC-3'.

Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων αναγράφονται στους πίνακες που ακολουθούν ανά μεταφορέα.

Πίνακας εκκινητών για την μεταλλαξιγένεση στον *PurP*

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/purP-T38A-BAD	5'-GGT/TTT/ACC/GCA/TTC/CTG/ACG/ATG-3'
pT7-5/purP-T38H-BAD	5'-GGT/TTT/ACC/CAC/TTC/CTG/ACG/ATG-3'
pT7-5/purP-A91S-BAD	5'-GCA/CTG/GCA/CCA/TCT/ATG/GGA/CTG/AAT/G-3'
pT7-5/purP-A91G-BAD	5'-GCA/CTG/GCA/CCA/GGT/ATG/GGA/CTG/AAT/G-3'
pT7-5/purP-D276E-BAD	5'-GTC/AAC/TTG/TTT/GAG/TCC/TCC/G-3'

pT7-5/purP- D267A-BAD	5'- GTC/AAC/TTG/TTT/GCA/TCC/TCC/G-3'
pT7-5/purP-D267N -BAD	5'- GTC/AAC/TTG/TTC/AAC/TCC/TCC/G-3'
pT7-5/purP-T271D -BAD	5'- C/TCC/GGT/GAT/CTG/ATT/GGC/GTG/AC-3'
pT7-5/purP-T271A -BAD	5'- G/TTT/GAC/TCC/TCC/GGT/GCA/CTG/ATT/GG-3'
pT7-5/purP-T271S -BAD	5'- C/TCC/GGT/TCT/CTG/ATT/GGC/GTG/AC -3'
pT7-5/purP-T271N -BAD	5'- C/TCC/GGT/AAC/CTG/ATT/GGC/GTG/AC-3'
pT7-5/purP-D298N -BAD	5'- G/GCG/CTG/TAT/GTC/AAC/AGC/ATC/TCT/TC-3'
pT7-5/purP-D298E -BAD	5'- G/GCG/CTG/TAT/GTC/GAG/AGT/ATC/TCT/TC-3'
pT7-5/purP- I317A-BAD	5'- GTT/ACG/GCT/TAT/GCA/GAG/TCC/TC-3'
pT7-5/purP- I317E-BAD	5'- GTT/ACG/GCT/TAT/GAG/GAG/TCC/TC-3'
pT7-5/purP-E318D -BAD	5'-G/GCT/TAT/ATT/GAC/TCC/TCT/TCC/GGC/GTA/TC-3'
pT7-5/purP- E318Q-BAD	5'- G/GCT/TAT/ATT/CAG/TCC/TCT/TCC/GGC/GTA/TC-3'
pT7-5/purP- S319A-BAD	5'-G/GCT/TAT/ATT/GAG/GCA/TCT/TCC/GGC/GTA/TC-3'
pT7-5/purP-S319N -BAD	5'-G/GCT/TAT/ATC/GAG/AAC/TCT/TCC/GGC/GTA/TC-3'

Πίνακας 2.5: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pT7-5/purP-BAD με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας εκκινητών για την μεταλλαξιγένεση στον YjcD

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/yjcD-T35A-BAD	5'-GG/TTA/ACA/GCA/TTC/CTG/GCG/ATG/GTC/TAC/TC-3'
pT7-5/yjcD-T35H-BAD	5'-GG/TTA/ACA/CAC/TTC/CTG/GCG/ATG/GTC/TAC/TC-3'
pT7-5/yjcD-A88G-BAD	5'- CG/ATT/GGT/TGC/TCT/ATC/TCC/CTG/AC-3'
pT7-5/yjcD-A88S-BAD	5'- CG/ATT/GGT/TGT/GGT/ATC/TCC/CTG/AC-3'
pT7-5/yjcD-D271E-BAD	5'- CA/GTA/TTT/GAA/GCC/ACC/GGA/AC-3'
pT7-5/yjcD-D271A-BAD	5'- CA/GTA/TTT/GCA/GCC/ACC/GGA/AC-3'
pT7-5/yjcD-D271N-BAD	5'- CA/GTA/TTT/AAC/GCC/ACC/GGA/AC-3'
pT7-5/yjcD-T275D-BAD	5'- CC/ACC/GGA/GAT/ATC/CGT/GCC-3'
pT7-5/yjcD-T275A-BAD	5'- CC/ACC/GGA/GCA/ATT/CGT/GCC-3'

pT7-5/yjcD-T275S-BAD	5'- CC/ACC/GGA/TCT/ATC/CGT/GCC-3'
pT7-5/yjcD-T275N-BAD	5'- CC/ACC/GGA/AAC/ATC/CGT/GCC-3'
pT7-5/yjcD-D302N-BAD	5'- GCA/CTG/ACC/ACT/AAC/TCC/ATG/AGC/AG-3'
pT7-5/yjcD-D302N-BAD	5'- GCA/CTG/ACC/ACT/GAA/TCC/ATG/AGC/AG -3'
pT7-5/yjcD-I321A-BAD	5'-CA/GCG/GTA/TAT/GCA/GAA/TCT/GCA/GCG/GGT/AC-3'
pT7-5/yjcD-I321E-BAD	5'-CA/GCG/GTA/TAT/GAA/GAG/TCT/GCA/GCG/GGT/AC-3'
pT7-5/yjcD-E322D-BAD	5'- GTA/TAC/ATC/GAC/TCT/GCA/GCG/GGT/AC-3'
pT7-5/yjcD-E322Q-BAD	5'- GTA/TAC/ATC/CAG/TCT/GCA/GCG/GGT/AC-3'
pT7-5/yjcD-S323A-BAD	5'- GTA/TAC/ATC/GAG/GCA/GCA/GCG/GGT/AC -3'
pT7-5/yjcD-S323N-BAD	5'- GTA/TAC/ATC/GAG/AAC/GCA/GCG/GGT/AC-3'

Πίνακας 2.6: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pT7-5/yjcD-BAD με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας εκκινητών για την μεταλλαξιγένεση στον SmLL9

Ανασυνδιασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/SmLL9-H31K-BAD	5'- C/TAT/GGC/CTG/CAG/AAG/GTA/CTG/ACG/ATG/TAT/G-3'
pT7-5/SmLL9-H31L-BAD	5'- C/TAT/GGC/CTG/CAG/CTG/GTA/CTG/ACG/ATG/TAT/G-3'
pT7-5/SmLL9-H31Q-BAD	5'- C/TAT/GGC/CTG/CAG/CAG/GTA/CTG/ACG/ATG/TAT/G-3'
pT7-5/SmLL9-H31N-BAD	5'- C/TAT/GGC/CTG/CAG/AAC/GTA/CTG/ACG/ATG/TAT/G-3'
pT7-5/SmLL9-H31C-BAD	5'- C/TAT/GGC/CTG/CAG/TGT/GTA/CTG/ACG/ATG/TAT/G-3'
pT7-5/SmLL9-S93N-BAD	5'- GTC/CAG/GGC/GTT/AAC/TTT/TCC/G-3'
pT7-5/SmLL9-S93C-BAD	5'- GTC/CAG/GGC/GTT/TGT/TTT/TCC/GGC/GTG-3'
pT7-5/SmLL9-S251V-BAD	5'- GCG/ATC/GCT/GTG/ATG/TTC/ATC/GTC-3'
pT7-5/SmLL9-S251C-	5'- GCG/ATC/GCT/TGT/ATG/TTC/ATC/GTC/ATC/ATG-3'

BAD	
pT7-5/SmLL9-E262D-BAD	5'- GTG/ACG/CT <u>A</u> /GTC/GAT/ACT/TCT/GCG/GAC/ATT/C-3'
pT7-5/SmLL9-E262Q-BAD	5'- GTG/ACG/CT <u>A</u> /GTC/CAA/ACT/TCT/GCG/GAC/ATT/C-3'
pT7-5/SmLL9-E262C-BAD	5'- GTG/ACG/CT <u>A</u> /GTC/TGT/ACT/TCT/GCG/GAC/ATT/C-3'
pT7-5/SmLL9-A265G-BAD	5'- G/ACT/TCG/GGT/GAC/ATT/CTG/G-3'
pT7-5/SmLL9-A265C-BAD	5'- G/ACT/TCG/TGC/GAC/ATT/CTG/G-3'
pT7-5/SmLL9-D266E-BAD	5'- GAG/ACT/TCG/GCT/GAA/ATT/CTG/GCG-3'
pT7-5/SmLL9-D266N-BAD	5'- GAG/ACT/TCG/GCT/AAC/ATT/CTG/GCG-3'
pT7-5/SmLL9-D266V-BAD	5'- G/ACT//TCG/GCT/GTC/ATT/CTT/GCG/GTC-3'
pT7-5/SmLL9-D266M-BAD	5'- GAG/ACT/TCG/GCT/ATG/ATT/CTG/GCG-3'
pT7-5/SmLL9-D266H-BAD	5'- G/ACT//TCG/GCT/CAC/ATT/CTT/GCG/GTC-3'
pT7-5/SmLL9-D266C-BAD	5'- GAG/ACT/TCG/GCT/TGT/ATT/CTG/GCG-3'
pT7-5/SmLL9-V270T-BAD	5'- GAC/ATT/CT <u>A</u> /GCG/ACC/GGC/GAA/ATC-3'
pT7-5/SmLL9-V270C-BAD	5'- GAC/ATT/CT <u>A</u> /GCG/TGT/GGC/GAA/ATC/ATC/GAG-3'
pT7-5/SmLL9-I274S-BAD	5'- GGC/GAA/ATC/TCG/GAG/ACG/AAA/GTG-3'
pT7-5/SmLL9-I274C-BAD	5'- GCG/GAA/ATC/TGT/GAG/ACG/AAA/GTG-3'
pT7-5/SmLL9-D290E-BAD	5'- CTC/AGG/GCC/GAG/ATG/CTG/TC-3'
pT7-5/SmLL9-D290N-BAD	5'- CTC/AGG/GCC/AAC/ATG/CTG/TC-3'
pT7-5/SmLL9-D290C-BAD	5'- CTC/AGG/GCC/TGT/ATG/CTG/TC-3'

BAD	
pT7-5/SmLL9-M291G-BAD	5'- CTC/AGG/GCT/GAT/GGA/TTG/TCG/AG-3'
pT7-5/SmLL9-M291C-BAD	5'- CTC/AGG/GCT/GAT/TGT/TTG/TCG/AGC/C-3'
pT7-5/SmLL9-T304P-BAD	5'- GC/TCC/TTC/CCT/CAA/AGT/GCC/TTT/GC-3'
pT7-5/SmLL9-T304C-BAD	5'-GC/TCC/TTC/TGT/CAA/AGT/GCA/TTT/GCC/CAG/AAT/G-3'
pT7-5/SmLL9-A309S-BAD	5'- CAG/AGC/GCC/TTT/TCT/CAG/AAT/GTC-3'
pT7-5/SmLL9-A309G-BAD	5'- CAG/AGC/GCC/TTT/GGT/CAG/AAT/GTC-3'
pT7-5/SmLL9-A309C-BAD	5'- CAG/AGC/GCC/TTT/TGT/CAG/AAT/GTC-3'
pT7-5/SmLL9-Q310E-BAD	5'- C/TTT/GCC/GAG/AAT/GTC/GGG/C-3'
pT7-5/SmLL9-Q310N-BAD	5'- C/TTT/GCC/AAC/AAT/GTC/GGG/C-3'
pT7-5/SmLL9-Q310C-BAD	5'- C/TTT/GCC/TGT/AAT/GTC/GGG/C-3'
pT7-5/SmLL9-N311E-BAD	5'- C/TTT/GCC/CAG/GAA/GTC/GGG/C-3'
pT7-5/SmLL9-N311Q-BAD	5'- C/TTT/GCC/CAG/CAA/GTC/GGG/C-3'
pT7-5/SmLL9-N311C-BAD	5'- C/TTT/GCC/CAG/TGT/GTC/GGG/C-3'
pT7-5/SmLL9-V312N-BAD	5'- C/TTT/GCC/CAG/AAT/AAC/GGG/CTG/GTG-3'
pT7-5/SmLL9-V312C-BAD	5'- C/TTT/GCC/CAG/AAT/TGT/GGG/CTG/GTG-3'
pT7-5/SmLL9-S417N-BAD	5'- C/TTC/CAT/AAC/GGT/ATC/AGC/TCC/GC-3'
pT7-5/SmLL9-S417C-BAD	5'- G/ACG/ATC/TTC/CAT/TGT/GGT/ATC/AGC/TCC/GC-3'

Πίνακας 2.7: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pT7-5/SmLL9-BAD με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα

γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας εκκινήτων για την μεταλλαξιγένεση στον UraA

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινήτη νοηματικού κλώνου
pT7-5/uraA-S72A-BAD	5'- CTT/GGT/TCC/GCA/TTT/GCC/TTT/ATT/TCA/C-3'
pT7-5/uraA-S72T-BAD	5'- CTT/GGT/TCC/ACC/TTT/GCC/TTT/ATT/TCA/C-3'
pT7-5/uraA-S72V-BAD	5'- CTT/GGT/TCC/GTC/TTT/GCC/TTT/ATT/TCA/C-3'
pT7-5/uraA-F73A-BAD	5'- CTT/GGT/TCC/AGC/GCT/GCC/TTT/ATT/TCA/C-3'
pT7-5/uraA-I132A/L136A-BAD	5'- C/GTT/GCC/GTC/GCT/GGT/ <u>TTA</u> /GAG/GCT/GCA/GGC/GTA/G-3'
pT7-5/uraA-I132F/G133L/L136F-BAD	5'- C/GTT/GCC/GTC/TTC/CTG/CTG/GAG/TTT/GCT/GGC/GTA/G-3'
pT7-5/uraA-H245A-BAD	5'- GAA/CAC/GTA/GGG/GCT/CTG/GTA/GTA/AC-3'
pT7-5/uraA-H245D-BAD	5'- GAA/CAC/GTA/GGG/GAT/CTG/GTA/GTA/AC-3'
pT7-5/uraA-H245V-BAD	5'- GAA/CAC/GTA/GGG/GTT/CTG/GTA/GTA/AC-3'
pT7-5/uraA-V248A-BAD	5'- GG/CAC/CTG/GTA/GCA/ACG/GCT/AAT/ATC-3'
pT7-5/uraA-G289A-BAD	5'- CCA/AAT/ACT/ACT/TAC/GCT/GAA/AAC/ATT/GGC-3'

Πίνακας 2.8: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pT7-5/uraA -BAD με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας εκκινητών για την μεταλλαξιγένεση στον RutG

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/rutG-S87A-BAD	5'- CTC/GGC/TCC/GCA/GCG/GCT/TTT/GTC-3'
pT7-5/rutG-S87T-BAD	5'- CTC/GGC/TCC/ACC/GCG/GCT/TTT/GTC-3'
pT7-5/rutG-S87V-BAD	5'- CTC/GGC/TCC/GTA/GCG/GCT/TTT/GTC-3'
pT7-5/rutG-A88F-BAD	5'- CTC/GGC/TCC/AGC/TTT/GCT/TTT/GTC-3'
pT7-5/rutG-H266A-BAD	5'- CG/GAA/AAC/TTA/GGT/GCT/CTC/AAG/GCA/GTC-3'
pT7-5/rutG-H266D-BAD	5'- CG/GAA/AAC/TTA/GGT/GAT/CTC/AAG/GCA/GTC-3'
pT7-5/rutG-H266V-BAD	5'- CG/GAA/AAC/TTA/GGT/GTT/CTC/AAG/GCA/GTC-3'
pT7-5/rutG-A269V-BAD	5'- CAT/CTC/AAG/GTA/GTC/GCA/GGG/ATG/ACC/G-3'
pT7-5/rutG-A308G-BAD	5'- CC/ACC/TAT/GGT/GAG/AAT/ATC/GGT/GTG-3'

Πίνακας 2.9: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pT7-5/rutG -BAD με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας εκκινητών για την μεταλλαξιγένεση στον rSNBT

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pEGFP-N1/rSNBT1-H63K	5'- GGG/ATC/CAG/AAG/TTC/CTC/ACA/GCC/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-H63L	5'- GGG/ATC/CAG/CTG/TTC/CTC/ACA/GCC/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-H63Q	5'- GGG/ATC/CAG/CAG/TTC/CTC/ACA/GCC/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-H63N	5'- GGG/ATC/CAG/AAC/TTC/CTC/ACA/GCC/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-H63A	5'- GGG/ATC/CAG/GCC/TTC/CTC/ACA/GCC/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-T123A	5'- CTT/CAA/GGA/GGI/GCT/TTC/GCI/TTC/GTG/GCT/CC-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-T123S	5'- CTT/CAA/GGA/GGG/TCC/TTC/GCI/TTC/GTG/GCT/CC-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-T123N	5'- CTT/CAA/GGA/GGG/AAC/TTC/GCI/TTC/GTG/GCT/CC-3'

pEGFP-N1/rSNBT1-E347D	5'- C/TCC/TCC/ATG/GTA/GAC/TCT/GTG/GGT/GAT/TAT/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E347Q	5'- C/TCC/TCC/ATG/GTA/CAG/TCT/GTG/GGT/GAT/TAT/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E347A	5'- C/TCC/TCC/ATG/GTA/GCC/TCT/GTG/GGT/GAT/TAT/C-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-D351E	5'- GTA/GAG/TCT/GTG/GGT/GAG/TAT/CAC/GCC/TGC/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-D351N	5'- GTA/GAG/TCT/GTG/GGT/AAC/TAT/CAC/GCC/TGC/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-D351A	5'- GTA/GAG/TCT/GTT/GGT/GCC/TAT/CAC/GCC/TGC/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E376D	5'- GC/ATT/GGC/ATC/GAT/GGC/CTC/GG-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E376Q	5'- GC/ATT/GGC/ATC/CAG/GGC/CTC/GG-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E376A	5'- GC/ATT/GGC/ATC/GCC/GGC/CTC/GG-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-S396A	5'- C/ACG/TCC/TAC/GCC/GAG/AAC/GTC/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-S396N	5'- C/ACG/TCC/TAC/AAC/GAG/AAC/GTC/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E397Q	5'- G/TCC/TAC/AGC/CAG/AAC/GTC/GGT/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E397D	5'- G/TCC/TAC/AGC/GAC/AAC/GTC/GGT/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-E397A	5'- G/TCC/TAC/AGC/GCC/AAC/GTC/GGT/G-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-N398E	5'- C/TAT/AGC/GAG/GAG/GTC/GGT/GCG/CTG-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-N398Q	5'- C/TAT/AGC/GAG/CAG/GTC/GGT/GCG/CTG-3'
pEGFP-N1/rSNBT1-N398A	C/TAT/AGC/GAG/GCC/GTC/GGT/GCG/CTG-3'

Πίνακας 2.10: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pEGFP-N1/rSNBT1-EGFP με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Πίνακας εκκινητών για την μεταλλαξιγένεση στον XanQ

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην PCR	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/N93S/D276E-BAD	pT7-5/N93S-BAD	D276E: 5'-GAAGCAGT <u>TGGCGAAATCACC</u> GC-3'
pT7-5/A323S/D276E-BAD	pT7-5/A323S-BAD	D276E: 5'-GAAGCAGT <u>TGGCGAAATCACC</u> GC-3'
pT7-5/N93S/A323S/D276E-BAD	pT7-5/N93S/A323S-BAD	D276E: 5'-GAAGCAGT <u>TGGCGAAATCACC</u> GC-3'
pT7-5/N93S/A323S-BAD	pT7-5/A323S-BAD	N93S: 5'-CAG/TCA/GTC/AGC/TTC <u>TCC</u> /TTT/GTT/ACG-3'

Πίνακας 2.11: Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή συνδυαστικών μεταλλάξεων στο μεταφορέα XanQ με την αντίστοιχη αντίδραση PCR, καθώς επίσης και το τελικό προϊόν του ανασυνδιασμού. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων, με έντονη γραφή και υπογράμμιση οι σιωπηλές μεταλλάξεις.

2.6.3 Κατασκευή ανασυνδιασμένου DNA

Η κατασκευή ανασυνδιασμένων πλασμιδίων έγινε ως εξής: αρχικά επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης ο πλασμιδιακός φορέας pT7-5/*melY*-BAD (από μεγάλης κλίμακας παρασκευάσμα – maxi prep, 1 μg/μL) και τα προϊόντα της PCR, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων BamHI & ApaI. Έπειτα ακολούθησε αποφωσφορυλίωση του φορέα με αλκαλική φωσφατάση και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1%, καθαρίστηκαν και ανασυνδέθηκαν με την χρήση T4 DNA-λιγάσης. Η αντίδραση με την λιγάση έγινε στους 16 °C, 16 h, σε τελικό όγκο 20 μl και σε αναλογία ένθεσης προς φορέα 3:1. Η ίδια διαδικασία έγινε και στην περίπτωση των μεταλλαγμάτων του rSNBT1 με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-N1. Επώαστηκε μέχρι πλήρους πέψης με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI ενώ με το ένζυμο NotI έγινε μερική πέψη του πλασμιδιακού φορέα (αραίωση ενζύμου 1/15, επώαση για 1 ώρα στους 37°C). Τα αντίστοιχα προϊόντα PCR που έφεραν τα μεταλλαγμένα γονίδια του rSNBT1 επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης με τα ένζυμα EcoRI και NotI.

2.6.4 Δημιουργία επιδεικτικών κυττάρων

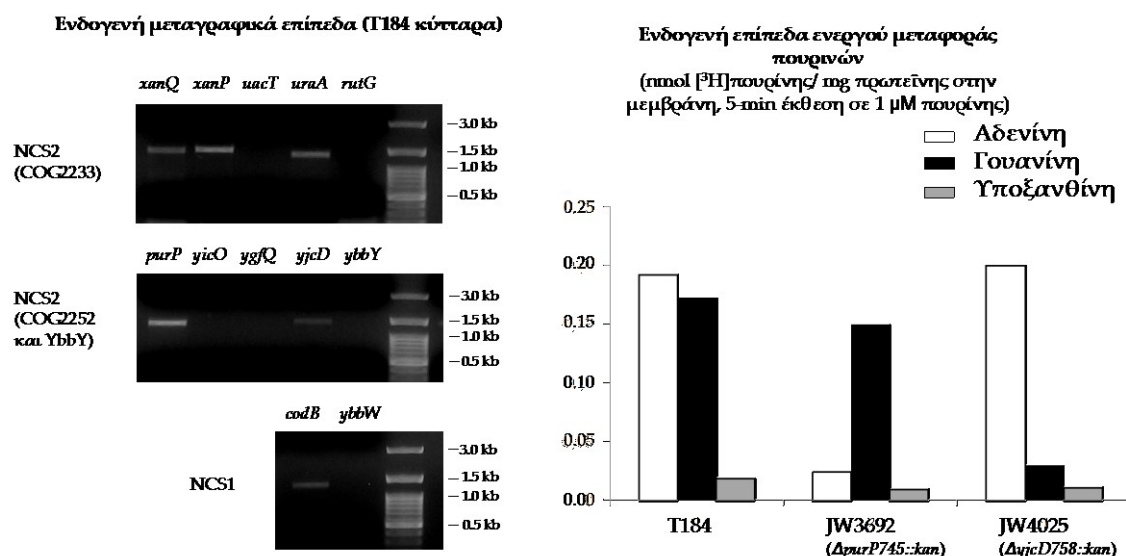
Κύτταρα *E. coli* TOP10F', T184, Δ*purP*, Δ*ycjD* ή Δ*uraA* προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεικτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Συγκεκριμένα, γίνεται πλήρης καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB (10ml) στους 37°C, για 16 h. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα SOB μέχρι τελικού όγκου 250ml. Η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους T184 γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη (0.01 mg/ml) ενώ των Δ*purP*, Δ*ycjD* ή Δ*uraA* με καναμυκίνη 0.05mg/ml. Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση στον επωαστήρα του θερμοού θαλάμου μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει στην τιμή 0.6. Μετά από επώαση στον πάγο για 10 min, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm (10 min, 4°C) και αναδιαλύονται σε 80mL ψυχρού διαλύματος TB. Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας επαναλαμβάνεται με επαναιώρηση σε 20mL ψυχρού TB που περιέχει 7% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα επιδεικτικά πλέον βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

2.6.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA (από ligation product) προστίθεται σε επιλεκτικά TOP10F' και γίνεται επώαση σε πάγο, 5 min. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε προθερμασμένα στους 37 °C τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ που περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/ml) ή καναμυκίνη 0.03mg/ml στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pEGFP-N1. Οι αποικίες επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητά τους σε αμπικιλίνη ή καναμυκίνη και στη συνέχεια πραγματοποιείται απομόνωση του DNA σε μικρή κλίμακα με βάση πρωτόκολλο πακέτου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA. Σε κάθε περίπτωση, γίνεται επιβεβαίωση της αλληλουχίας του DNA ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *Bam*HI και *Apa*I ή *Eco*RI και *Not*I στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pEGFP-N1 σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech). Ακολουθεί εκ νέου μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, *E. coli* T184, Δ*pur*P, Δ*ycj*D ή Δ*ura*A με το επιβεβαιωμένο, πλέον, πλασμιδιακό DNA και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει γλυκερόλη (30%), στους -80 °C.

2.7 Επιλογή κατάλληλου στελέχους *E.coli* για τα πειράματα ενεργού μεταφοράς

Για τον λειτουργικό έλεγχο των μεταφορέων αυτών αρχικά έπρεπε να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα κύτταρα *E.coli*. Τα κύτταρα *E.coli* T184 στις αερόβιες συνθήκες, που γίνεται το πείραμα, έχουν σημαντικά επίπεδα πρόσληψης αδενίνης και γουανίνης (Εικόνα 2.1) γεγονός που μπορεί αποδοθεί στην έκφραση των ενδογενών γονιδίων *purP* και *yjcD* (Εικόνα 2.1). Συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* $\Delta purP$ και *E.coli* $\Delta yjcD$ (Keio collection; Baba *et al.*, 2006) στα οποία έχει γίνει απάλειψη του γονιδίου *purP* και *yjcD* αντίστοιχα. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης στα κύτταρα αυτά έδειξε ότι τα μεν *E.coli* $\Delta purP$ είναι κατάλληλα για την μελέτη της ενεργού μεταφοράς της αδενίνης και της υποξανθίνης ενώ τα κύτταρα *E.coli* $\Delta yjcD$ για την γουανίνη [βλ. Αποτελέσματα, Κεφ. 3.3]. Αντίστοιχα για την μεταφορά ουρακίλης χρησιμοποιούνται τα κύτταρα $\Delta uraA$ (Keio collection; Baba *et al.*, 2006), καθώς στις συνθήκες κυτταρικής αύξησης που χρησιμοποιούνται εκφράζεται το ενδογενές γονίδιο *uraA* (Εικόνα 2.1) και η ενδογενής δραστηριότητα του UraA είναι αυτή που ευθύνεται για τις υψηλές τιμές του δείγματος αρνητικού ελέγχου, αφού τα κύτταρα $\Delta uraA$ έχουν μηδενικά επίπεδα ενδογενούς πρόσληψης ουρακίλης (δεν φαίνεται στην εικόνα) [βλ. Αποτελέσματα, Κεφ. 3.4].



Εικόνα 2.1: Αριστερά είναι τα ενδογενή μεταγραφικά επίπεδα των μεταφορέων πουρινών των οικογενειών NCS1 και NAT/NCS2 της *E.coli* κατά την αερόβια ανάπτυξη. Δεξιά τα ενδογενή επίπεδα ενεργού μεταφοράς πουρινών σε κύτταρα *E.coli* T184, $\Delta purP$ και $\Delta yjcD$.

2.8 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς (transport assay) σε βακτηριακά ομόλογα

Καλλιέργεια *E. coli* (T184, Δ purP, Δ yjcD, Δ uraA) που φέρουν πλασμίδιο με την κατάλληλη μετάλλαξη, σε 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου LB περιέχον αμπικιλίνη 0.1 mg/ml και στρεπτομυκίνη 0.01 mg/ml (T184) ή αμπικιλίνη 0.1mg/ml και καναμυκίνη 0.05mg/ml (Δ purP, Δ yjcD, Δ uraA). Η καλλιέργεια αφήνεται στους 37 °C, υπό ανάδευση για 16 h. Μετά τις 16 h η καλλιέργεια αραιώνεται 1/10 ως εξής: 1 ml από την αρχική καλλιέργεια και 9 ml LB με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά. Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37 °C, υπό ανάδευση για 2 h. Στις 2 h, η καλλιέργεια βρίσκεται στο μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, προστίθεται ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (IPTG) τελικής συγκέντρωσης 0.5mM, με σκοπό την υπερέκφραση των πρωτεϊνών. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για άλλες 2 h και έπειτα ακολουθούν δυο φυγοκεντρήσεις (6000 rpm, 10 min, 4°C) μετά το πέρας των οποίων τα κύτταρα απαναιωρούνται σε 10 ml διαλύματος KPi pH 7.5. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για μια ακόμη φορά στις ίδιες συνθήκες και επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος KPi. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση στα 420 nm δείγματος 10 μl κυτταρικού αναιωρήματος σε 990 μl ddH₂O, έτσι ώστε να εξισορροπηθούν τα κύτταρα σε OD_{420nm}=10 προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KPi (Karatza and Frillingos, 2005). Στην περίπτωση των κυττάρων Δ uraA που φέρουν τις αντίστοιχες περμεάσες των UraA ή RutG το KPi αντικαθίσταται από το ρυθμιστικό διάλυμα MK (5mM MES pH 6.5 και 150mM KCl).

2.8.1 Μέτρηση ενεργότητας

Μετά την εξισορρόπηση ακολουθεί η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένου υπόστρωματος. 50 μl κυττάρων επωάζονται με το ραδιενεργό υπόστρωμα επιθυμητής συγκέντρωσης, για χρόνους 5 sec έως 10 min. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 6 ml διαλύματος τερματισμού και ταχεία διήθηση υπό κενό σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm. Ο ηθμός μεταφέρεται σε κατάλληλα σωληνάκια σπινθηρισμού στα οποία προστίθεται 8ml scintillation fluid. Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται μετά από 24 h σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β. Στις περιπτώσεις όπου το μελετώμενο υπόστρωμα είναι η ουρακίλη χρησιμοποιούνται σε κάθε αντίδραση 50μl κυττάρων στα οποία προστίθεται 20mM γλυκερόλη και ακολουθεί επώαση 3min 25°C. Μετά το πέρας της επώασης προστίθεται το υπόστρωμα για χρόνους 5sec-5min.

2.8.2 Μέτρηση ενεργότητας σε αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια ελεύθερης καλλιέργειας

Κύτταρα *Sinorhizobium meliloti* ή *Mesorhizobium loti* (αγρίου τύπου ή μετασχηματισμένα) καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο του κ. Εμ. Φλεμετάκη (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν με μοναδική πηγή αζώτου αμμωνία ή ξανθίνη και συλλέχθηκαν στο μέσο της λογαριθμικής τους φάσης ανάπτυξης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (6000rpm, 10 min, 4°C) και επαναιωρήθηκαν σε 10ml KPi. Φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες και το ίζημα φυλάχθηκε στους -80°C και στάλθηκε στο εργαστήριό μας σε ξηρό πάγο.

Ακολούθησε, μετά το ξεπάγωμα των κυτταρικών ιζημάτων, άλλη μία πλύση με 10ml KPi και εξισορρόπηση σε $OD_{420}=10$. Μετά την εξισορρόπηση ακολουθεί η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος ξανθίνης. 50 μl κυττάρων επωάζονται με το ραδιενεργό υπόστρωμα επιθυμητής συγκέντρωσης, για χρόνους 0 sec έως 5 min. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 6 ml διαλύματος τερματισμού και ταχεία διήθηση υπό κενό σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm. Ο ηθμός μεταφέρεται σε κατάλληλα σωληνάκια σπινθηρισμού στα οποία προστίθεται 8ml scintillation fluid. Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται μετά από 24 h σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β.

2.8.3 Κινητική ανάλυση

Στη δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [8-³H]ξανθίνης (22.8 Ci/mmol) για κινητική ανάλυση χρησιμοποιείται ραδιενεργό υπόστρωμα, τελικής συγκέντρωσης 0.1-40μM, για χρόνους 10-30 sec. Στην περίπτωση της [2,8-³H]αδενίνης (31.8 Ci/mmol) χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 0.04-40μM για 5-20sec χρόνους, [2,8-³H]υποξανθίνης (27.7 Ci/mmol) συγκεντρώσεις 0.1-40μM για χρόνους 5-20sec, [5,6-³H]ουρακίλης (40 Ci/mmol) συγκεντρώσεις 0.04-10μM για χρόνους 5-10sec μετά από 3min επώαση των κυττάρων με γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 20mM και για [8-¹⁴C]ουρικού οξέος (57.8 Ci/mmol) συγκεντρώσεις 4μM-0.4mM για χρόνους 5-20sec. Η διαδικασία διαφοροποιείται στην περίπτωση της [8-³H]γουανίνης (21.2 Ci/mmol). Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται το ραδιενεργό υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση 0.1μM και μη ραδιενεργά σημασμένη γουανίνη τελικής συγκέντρωσης 0.1-40μM. Σε κάθε περίπτωση για την εξαγωγή των K_m και V_{max} τα δεδομένα αναλύονται με βάση την εξίσωση Michealis-Menten στο πρόγραμμα Prism4.

2.8.4 Μέτρηση ενεργότητας σε εύρος pH

Στην περίπτωση αυτή τα δείγματα αναπτύσσονται για 16h σε 3ml πλήρους θρεπτικού υλικού παρουσία αμπικιλίνης (0.1mg/ml) και στρεπτομυκίνης (0.01mg/ml) υπό ανάδευση στους 37°C και μετά αραιώνονται σε αναλογία 1/10 και αφήνονται να αναπτυχθούν για άλλες 2h στις ίδιες συνθήκες. Στις 2h προστίθεται IPTG (τελικής συγκέντρωσης 0.5mM). Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνονται δυο φορές (6000 rpm, 10 min, 4 °C) μετά το πέρας των οποίων τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου pH (Κεφ.2.3.2). Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για μια ακόμη φορά στις ίδιες συνθήκες και επαναιωρούνται σε 1 ml του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος και εξισορροπούνται έτσι ώστε $OD_{420nm}=10$. Τέλος ακολουθεί η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (22.8 Ci/mmol). 50μl κυττάρων επωάζονται με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελικής συγκέντρωσης 1μM), για χρόνους 10sec έως 30 sec. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 6 ml διαλύματος τερματισμού και ακολουθεί ταχεία διήθηση υπό κενό σε ηθμό διήθησης όπως και στις ανωτέρω περιπτώσεις.

2.8.5 Πειράματα ανταγωνισμού

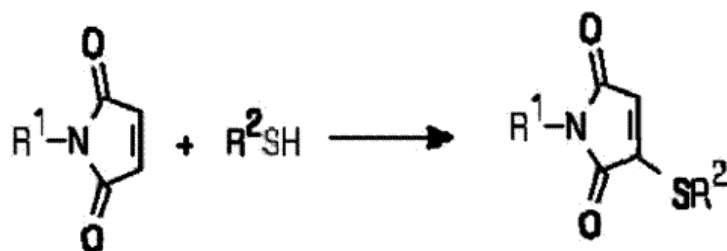
Με την διαδικασία αυτή διερευνάται η πιθανή ανταγωνιστική δράση των μορίων που αναγράφονται σε κάθε περίπτωση. Για pH 5.2 ή 6.0 η διαδικασία ακολουθείται όπως έχει περιγραφεί έως και την εξισορρόπηση και έπειτα οι καλλιέργειες μοιράζονται σε επαρκή αριθμό erpendorf για κάθε κατασκευή. Σε κάθε erpendorf προστίθεται 250 μl καλλιέργειας, ακολουθεί επιτραπέζια φυγοκέντρηση για 2 min και επαναιωρούνται με 1ml κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Νέα επιτραπέζια φυγοκέντρηση για 2min, απομάκρυνση υπερκειμένου και τοποθέτηση δειγμάτων στον πάγο μέχρι την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης. Όταν το πείραμα γίνεται σε pH 7.5, τότε, μετά την εξισορρόπηση, περνάμε απευθείας στην δοκιμασία ενεργού μεταφοράς.

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης (22.8 Ci/mmol) γίνεται ως εξής: 50μl κυττάρων επωάζονται με 5μl πιθανού ανταγωνιστή (τελικής συγκέντρωσης 10μM-1mM) για 5min και στη συνέχεια προστίθεται το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελικής συγκέντρωσης 1μM) και επωάζονται για χρόνους 5 και 10 sec. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 6 ml διαλύματος τερματισμού και ακολουθεί ταχεία διήθηση υπό κενό σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm. Ο ηθμός μεταφέρεται σε κατάλληλα σωληνάκια σπινθηρισμού στα οποία προστίθεται 8ml scintillation fluid. Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται μετά από 24h σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β.

Η [2,8-³H]αδενίνη (31.8 Ci/mmol) χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.1μΜ και οι συγκεντρώσεις των ανταγωνιστών είναι 0.01-600μΜ. Η [2,8-³H]υποξανθίνη (27.7 Ci/mmol) χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1μΜ και οι ανταγωνιστές 1μΜ-1mM. Η [5,6-³H]ουρακίλη (40 Ci/mmol) χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.1μΜ και τελική συγκέντρωση ανταγωνιστών 0.01-600μΜ. Στην τελευταία περίπτωση τα κύτταρα επωάζονται πρώτα για 3min στους 25°C με γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 20mM και έπειτα προστίθεται ο ανταγωνιστής για 2min στους 25°C. Ακολουθεί κανονικά η διαδικασία με την προσθήκη του ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος.

2.8.6 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών SH-αντιδραστηρίων, προηγείται επώαση με το αντιδραστήριο NEM. Για το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM, Εικόνα 2.2) χρησιμοποιείται συγκέντρωση 2 mM (Karatza *et al.*, 2006) και ο χρόνος επώασης είναι 10 min στους 25°C, Τερματισμός των αντιδράσεων γίνεται με διθειοθρεϊτόλη (DTT) (σε μοριακή περίσσεια 10x έναντι του SH-αντιδραστηρίου) και η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς Ξανθίνης γίνεται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994).



Εικόνα 2.2.: Αντίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) με τις SH-ομάδες των κυστεϊνών (από Molecular Probes, www.probes.invitrogen.com)

2.8.7 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων παρουσία υποστρώματος

Μετά την εξισορρόπηση των κυττάρων έτσι ώστε $OD_{420}=10$, 1ml κυττάρων μοιράζονται σε erpendorf. Προστίθεται ξανθίνη τελικής συγκέντρωσης 1mM και αφήνονται στους 25°C για 2min. Ακολουθεί επώαση με κατάλληλης συγκέντρωσης NEM για 10min, 25°C. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη DTT σε περίσσεια 10X σε σχέση με το NEM. Ακολουθούν δύο πλύσεις με 40ml Kpi pH 7.5 και τρεις πλύσεις με 1ml του ίδιου διαλύματος. Στη συνέχεια γίνεται δεύτερη εξισορρόπηση των κυττάρων σε $OD_{420}=10$. Τα erpendorfs κρατούνται στους 4°C μέχρι την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ξανθίνης. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 50μl κυττάρων και [³H]ξανθίνη τελικής συγκέντρωσης 1μM για τους χρόνους που αναγράφονται σε κάθε περίπτωση. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ακολουθείται όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.8.1.

2.9 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Κύτταρα *E. coli* T184, ΔpurP, ΔyjcD ή ΔuraA που φέρουν πλασμίδιο με την κατάλληλη μετάλλαξη, καλλιεργούνται σε 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου LB το οποίο περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/ml) και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/ml) για τα T184 ή αμπικιλίνη (0.1 mg/ml) και καναμυκίνη (0.05 mg/ml) για τις άλλες κυτταρικές σειρές. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, υπό ανάδευση για 16 h. Μετά τις 16 h, η καλλιέργεια αραιώνεται 1/10 ως εξής: 1 ml από την αρχική καλλιέργεια προστίθεται σε 9ml LB που περιέχει αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη (T184) ή αμπικιλίνη και καναμυκίνη (ΔpurP, ΔyjcD ή ΔuraA). Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37 °C, υπό ανάδευση για 2 h. Στις 2 h, χρονικό σημείο όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στο μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, προστίθεται ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (IPTG), σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM: το IPTG επάγει την έκφραση του γονιδίου του μεταφορέα από τον φορέα pT7-5. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για άλλες 2 h.

Επειτα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται (6000 rpm, 10 min, 4 °C) και επαναιωρούνται σε 10 ml διαλύματος επαναιώρησης (resuspension buffer). Ακολουθεί μια ακόμη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος επαναιώρησης με αναστολέα πρωτεασών Pefabloc σε αναλογία 1 ml διαλύματος επαναιώρησης: 1 μl Pefabloc (τελική συγκέντρωση Pefabloc 0.2μM) και τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 2 min σε 13000 rpm και επαναιωρούνται σε 1 ml Sucrose buffer με Pefabloc (στην ίδια αναλογία). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 min.

Εν συνεχεία τα δείγματα επαναφυγοκεντρώνται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 2 min στις 13000 rpm, επαναιωρούνται σε 800 μl dH₂O και επωάζονται για 10 min στον πάγο. Μετά το τέλος της επώασης προστίθεται 10 μl λυσοζύμης (αρχικής συγκέντρωσης 10 mg/ml) και ακολουθεί εκ νέου επώαση για 30 min στον πάγο. Αμέσως μετά ακολουθεί θραύσης των κυττάρων με συσκευή υπερήχων, 2 φορές για κάθε δείγμα για 15 sec σε ένταση 40%. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (2 min, 13000 rpm) ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα άθραυστα κύτταρα. Το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρείται για 30 min στους 4 °C. Το ίζημα επαναιωρείται σε 40 μL ddH₂O (Kaback, 1974; Frillingos *et al.*, 1994). Τέλος, τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C για χρήση έως και 48 ώρες μετά.

2.10 Ανάλυση πρωτεϊνών

2.10.1 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με βάση το πρωτόκολλο BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Το πρωτόκολλο βασίζεται στο συνδυασμό της αναγωγής του Cu^{+2} σε Cu^{+1} σε αλκαλικό περιβάλλον, με την υψηλής ευαισθησίας χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού (Cu^{+1}) (στα 562 nm) χρησιμοποιώντας δις-κιγχοινικό οξύ (bicinchoninic acid). Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης και σύμφωνα με αυτή, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

2.10.2 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ddH₂O έτσι ώστε τα μεμβρανικά δείγματα να εξισορροπηθούν στα 100 μg πρωτεΐνης ανά 50 μL. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer) σε αναλογία 4:1 (δείγμα: διάλυμα φόρτωσης) και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου (12%) -δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE). Χρησιμοποιούνται πήγμα διαχωρισμού 12% και πήγμα επιστοίβαξης 5% σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.12).

Πήγμα	30% ακρυλαμίδιο	10% SDS	10% APS	TEMED	Διάλυμα	dH ₂ O
Διαχωρισμού (60 ml)	25.02ml	0.6ml	0.6ml	0.03ml	Διαχωρισμού 15ml	19.38mL
Επιστοίβαξης (60ml)	9.0ml	0.6ml	0.6ml	0.06ml	Επιστοίβαξης 15ml	34.8ml

Πίνακας 2.12 : Σύσταση των διαλυμάτων για τα πήγματα διαχωρισμού και επιστοίβαξης SDS-PAGE.

2.10.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

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 επώαζεται για 16 h σε διάλυμα TBST-5% αλβουμίνης ορού βοός (BSA) (blocking buffer) για τη δέσμευση των κενών θέσεων. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραίωση 1:50000 σε TBST-5% BSA για 1 h και στη συνέχεια 8 πλύσεις με TBST. Για την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος χρησιμοποιείται η αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL).

2.11 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας.

2.11.1 Τα κύτταρα HEK293

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα HEK293 που παραχωρήθηκαν από την κ. Παπαμαρκάκη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα HEK293 είναι ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού μη καθορισμένης προέλευσης και καλλιεργούνται στο θρεπτικό μέσο DMEM το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη.

2.11.2 Συνθήκες καλλιέργειας και διατήρηση κυτταρικών σειρών

Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στον οποίο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37 °C, επικρατούν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO₂ ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

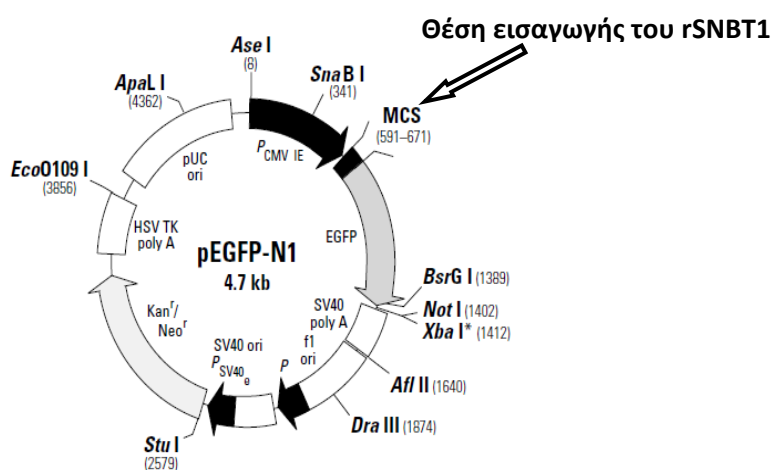
Για την διατήρηση των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιούνται κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους συλλέγονται μετά την θρυψινοποίησή τους και φυγοκεντρώνονται στα 700 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται στο διάλυμα κατάψυξης, το οποίο αποτελείται από 90% εμβρυϊκό ορό βοός (FBS) και 10% διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ένα ml του παραπάνω μίγματος μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάκια κατάψυξης, τα οποία ψύχονται σταδιακά. Αρχικά τοποθετούνται στους 4°C για περίπου 10 λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη -80 °C. Η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με τη μεταφορά του σωληναρίου κατάψυξης στους 37 °C. Το περιεχόμενο του μεταφέρεται σε 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και καλλιεργούνται στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας.

2.11.3 Μέτρηση των κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,25% χρωστικής σε 0,15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιμοτοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονταν φωτεινά και διάφανα ενώ τα νεκρά εμφανίζονταν βαθύ μπλε.

2.11.4 Το σύστημα των HEK293 για την μελέτη του μεταφορέα rSNBT1

Αρχικά για την μελέτη του μεταφορέα rSNBT1 έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ένα ετερόλογο σύστημα στο οποίο ο μεταφορέας θα μπορεί να εκφραστεί και να είναι λειτουργικός στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293, μετασχηματίστηκαν κατάλληλα και δημιουργήθηκε κυτταρική σειρά HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον rSNBT1wt ή μεταλλάγματά του (βλ. Κεφ. 2.12). Τα κύτταρα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες ευκαρυωτικών μεταφορέων (Yamamoto *et al.*, 2010). Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του μεταφορέα και την εισαγωγή του στα κύτταρα HEK293 ήταν ο pEGFP-N1. Η εισαγωγή του γονιδίου γίνεται πριν από το EGFP και ο πλασμιδιακός αυτός φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη/ καναμυκίνη, επιτρέποντας έτσι την επιλογή των κυττάρων με την χρήση των κατάλληλων αντιβιοτικών (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Πλασμιδιακός χάρτης. Χάρτης του pEGFP-N1 που τονίζεται η θέση ένθεσης του μεταφορέα rSNBT1 αγρίου τύπου ή μεταλλάξεών του.

2.12 Κατασκευή κυτταρικών σειρών HEK293 σταθερής διαμόλυνσης

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (2.6.2) που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο rSNBT1 αφού επιβεβαιώθηκε η αλληλουχία τους εισήχθησαν σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* T184 και ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel). Για τον λειτουργικό έλεγχο αυτών των περμεασών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293.

Για τον μετασχηματισμό των κυττάρων αυτών χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο Xfect™ (Clontech) και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή (Xfect™ Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance). Χρησιμοποιούνται πιάτα κυτταροκαλλιέργειας έξι θέσεων. Σε κάθε ένα από αυτά τοποθετούνται 500,000 κύτταρα HEK293 σε 2ml θρεπτικού. Την επόμενη μέρα γίνεται η διαδικασία της επιμόλυνσης ως εξής:

- Αφαιρούνται τα 2ml θρεπτικού υλικού και προστίθεται 1mL νέου θρεπτικού υλικού σε κάθε θέση
- Σε ένα eppendorf προστίθενται 2.5μg πλασμιδιακού DNA, 0.3μL λιπιδίου Xfect και όγκος του διαλύματος της αντίδρασης (Xfect Reaction buffer) μέχρι τελικού όγκου 100μL. Αρχικά προστίθενται το DNA και το διάλυμα της αντίδρασης και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) 5sec. Στη συνέχεια προστίθεται το λιπίδιο, έντονη ανάδευση (vortex) 10sec. Το διάλυμα επωάζεται για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος προστίθεται στάγδην στην αντίστοιχη θέση του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας. Το πιάτο μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο.
- Την επόμενη μέρα αφαιρείται το θρεπτικό με το διάλυμα της επιμόλυνσης και προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού χωρίς την προσθήκη G418 για 24h.
- Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου με 2ml θρεπτικού μέσου στο οποίο έχει προστεθεί 500ng/ml G418. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κάθε δεύτερη μέρα για διάστημα 2 εβδομάδων. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας έχουν παραμείνει μόνο τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει επιτυχώς η διαμόλυνση.

Ο αρχικός αυτός πληθυσμός αναπτύσσεται περαιτέρω σε τρυβλία με την προσθήκη στο θρεπτικό υλικό G418 300ng/ml. Όταν είναι έτοιμα τα κύτταρα θρυψινοποιούνται, το ίζημα επαναιωρείται σε 900μL ορού και 100μL DMSO και τοποθετείται σε μικροσωληνίσκους κρυοαποθήκευσης (cryotubes) στους -80°C.

2.13 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς υποστρώματος σε κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης

Για την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς υποστρώματων χρησιμοποιούνται κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης με τον αντίστοιχο μεταλλαγμένο μεταφορέα του rSNBT1 τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία γενετισίνης (G418) 100ng/ml. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από την θρυψινοποίησή τους, μετρώνται και 120,000 κύτταρα τοποθετούνται σε κάθε θέση πιάτου κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων. Τα κύτταρα βρίσκονται σε θρεπτικό μέσο 0.5 ml με G418 100ng/ml. Τα πιάτα μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο για 2 μέρες.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιείται το διάλυμα μεταφοράς (uptake buffer) το οποίο περιέχει: 140mM NaCl, 5mM KCl, 0.4mM KH₂PO₄, 0.8mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 25mM γλυκόζη και 10mM Hepes pH 7.5. Τα κύτταρα την ημέρα του πειράματος είναι περίπου 200,000/θέση. Σε κάθε περίπτωση στο τέλος του πειράματος τα κύτταρα 2 θέσεων μετρώνται (Κεφάλαιο 2.11.3). Στις θέσεις αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί οι ίδιοι όγκοι διαλυμάτων, όπως περιγράφεται παρακάτω, χωρίς την παρουσία ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος.

Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο. Προστίθεται 1ml θερμού διαλύματος μεταφοράς 37°C και αφού μένει στα κύτταρα για 5 min αφαιρείται. Προστίθεται 250μl θερμού διαλύματος μεταφοράς 37°C το οποίο περιέχει ραδιενεργά σημασμένο υπόστρωμα για 1min. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1ml ψυχρού διαλύματος μεταφοράς 4°C και αφαιρείται όλο το διάλυμα. Στα κύτταρα προστίθεται 400μL διαλύματος λύσης (2N NaOH και 0.5% SDS) και μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάκια σπινθηρισμού στα οποία προστίθεται 8ml scintillation buffer. Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση [5,6-³H] ουρακίλη (40 Ci/mmol) 20nM για 1min, [8-³H] ξανθίνη (22.8 Ci/mmol) 1μM για 1min, [2,8-³H] υποξανθίνη (27.7 Ci/mmol) 1μM για 1min, [8-³H] γουανίνη (21.2 Ci/mmol) 1μM για 1min, [2-¹⁴C] θυμίνη (57 Ci/mmol) 1.5μM για 1min.

2.14 *In silico* ανάλυση

Η ανάλυση των γονιδιωμάτων για την ύπαρξη γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 βασίστηκε στις βάσεις δεδομένων **TransportDB** (<http://www.membranetransport.org>) **TC-DB** (<http://www.tcdb.org>) και **COGs** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), καθώς και στις πλήρεις αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των μικροοργανισμών όπως καταγράφονται στο **Joint Genome Institute** (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>).

Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών των ομόλογων μεταφορέων έγινε με το πρόγραμμα **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) ή **Clustal Omega** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011).

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **MEGA 6-Beta2** (Molecular Evolution Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2013).

Η δομική μοντελοποίηση των μεταφορέων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **SWISS-MODEL** (<http://swissmodel.expasy.org/>).

Η απεικόνιση και η επεξεργασία του δομικού μοντέλου των μεταφορέων έγινε με το πρόγραμμα **PyMOL** (The PyMOL Molecular Graphics System, v.1.5.0.4 Schrodiger, LLC).

Το πρόγραμμα **Prism5** (<http://www.graphpad.com>) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τιμών IC₅₀ για τα πειράματα ανταγωνισμού από ανάλογα πουρινών ή επίδρασης του αντιδραστηρίου NEM στην ενεργότητα.

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταφορέων στην μεμβράνη των κυττάρων από τις εικόνες της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έγιναν με το πρόγραμμα **Quantity One** version 4.6.6 (www.bio-rad.com/softwaredownloads).

Οι αναφορές των δημοσιεύσεων όπως καταγράφονται στην ενότητα της βιβλιογραφίας είναι από τη βάση δεδομένων **Pubmed**. US National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων καθώς και τα κείμενα της εργασίας υλοποιήθηκαν με τα προγράμματα του **Microsoft Office** 2007.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Συνοπτική παρουσίαση νέων μεταφορέων που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά ή/και μελετήθηκαν διεξοδικότερα

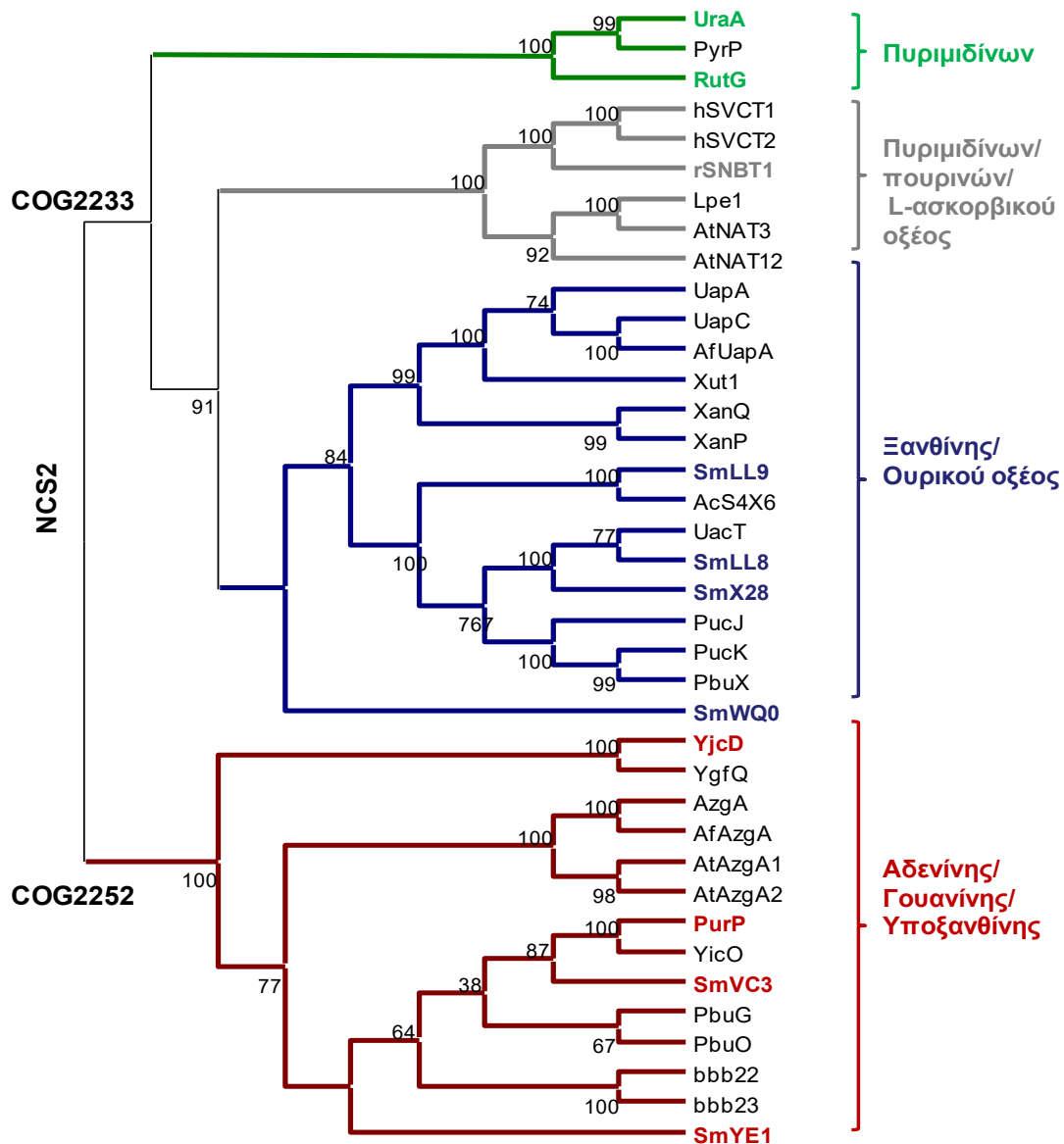
Η εξελικτικά ευρεία οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 (Nucleobase:Cation Symporter-2) περιλαμβάνει μεταφορείς για την αναγνώριση και πρόσληψη από διάφορα κυτταρικά συστήματα πολύ σημαντικών μεταβολιτών, καθώς και κυτταροτοξικών αναλόγων τους. Η πολύ συντηρημένη μοριακή αρχιτεκτονική αυτών των μεταφορέων, όπως φαίνεται από τις πρόσφατες κρυσταλλογραφικές αναλύσεις (Lu *et al.*, 2011, Alquel *et al.*, 2016) και αναλύσεις μοριακής δυναμικής (Kosti *et al.*, 2012; Karena *et al.*, 2015; Kalli *et al.*, 2015), συνδυάζεται με ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών εξειδικεύσεων των μεταφορέων αυτών, τόσο στα βακτήρια όσο και στα ευκάρυα (μύκητες, φυτά, μετάζωα) που έχουν μελετηθεί. Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε την μοριακή βάση αυτών των διαφορών εξειδίκευσης, απαιτείται λεπτομερής λειτουργική ανάλυση και μελέτες μεταλλαξιγένεσης σε συγκεκριμένες ομάδες ομολόγων με παρόμοια εξειδίκευση αλλά διακριτά προφίλ αναγνώρισης υποστρωμάτων, ώστε να συσχετισθούν συγκεκριμένες αντικαταστάσεις αμινοξέων με συγκεκριμένες αλλαγές εξειδίκευσης. Η οικογένεια NAT/NCS2 χωρίζεται σε δύο ομάδες ορθόλογων γονιδίων (Cluster of Orthologous Genes). Η πρώτη COG2233 (NAT/NCS2) αφορά μεταφορείς ξανθίνης, ουρικού οξέος, ουρακίλης και L-ασκορβικού οξέος ενώ η δεύτερη COG2252 (AzgA-like), αφορά μεταφορείς αδενίνης, γουανίνης ή/και υποξανθίνης (Εικόνα 3.1.1).

Αρχικά έγινε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 από το εντεροβακτήριο *Escherichia coli* K-12 και το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* 1021 καθώς επίσης και έγινε μια πρώτη προσπάθεια μελέτης του ευκαρυωτικού ομολόγου της οικογένειας του επίμυος rSNBT1. Πριν την παρούσα εργασία είχαν χαρακτηριστεί λειτουργικά από την *E.coli* K-12 οι XanQ, XanP ως μεταφορείς υψηλής συγγένειας ξανθίνης (Karatza and Frillingos, 2005), ο UacT ως μεταφορέας ουρικού οξέος με χαμηλή συγγένεια (Papakostas and Frillingos, 2012) και ο UraA ως μεταφορέας ουρακίλης (Andersen *et al.*, 1995) του οποίου η δομή λύθηκε πρόσφατα με κρυσταλλογραφία (Lu *et al.*, 2011). Και οι τέσσερις ανήκουν στην ομάδα COG2233. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χαρακτηρίστηκε λειτουργικά από την ίδια ομάδα και ο RutG, ως μεταφορέας ουρακίλης, θυμίνης υψηλής συγγένειας, που μπορεί επίσης να μεταφέρει, με μικρή συγγένεια και απόδοση, ξανθίνη (Κεφ. 3.4) καθώς και οι τέσσερις ομόλογοι μεταφορείς της *E.coli* K-12 από την ομάδα COG2252, ως υψηλής συγγένειας μεταφορείς αδενίνης (PurP, YicO) ή γουανίνης/υποξανθίνης (YjcD, YgfQ) (Κεφ. 3.3). Στην παρούσα διατριβή χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά και οι έξι μεταφορείς από το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* 1021 που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2. Από αυτούς τέσσερις ανήκουν στην ομάδα COG2233 (SmLL9, SmLL8, SmX28, SmWQ0) και χαρακτηρίστηκαν ως

υψηλής συγγένειας μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού (SmLL9) ή ουρικό μόνο (SMX28, SmLL8), και δύο στην ομάδα COG2252 (SmYE1 και SmVC3) και χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής συγγένειας μεταφορείς αδενίνης (SmYE1) ή αδενίνης/γουανίνης/ υποξανθίνης (SMVC3) (Κεφ. 3.2).

Προκειμένου να διερευνηθεί η μοριακή βάση των διαφορών εξειδίκευσης των μεταφορέων της οικογένειας επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη με μεταλλαξιγένεση στην προβλεπόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος μεταφορείς που βρέθηκαν να έχουν νέες ή και διακριτές εξειδικεύσεις σε σχέση με τα έως τώρα γνωστά συγγενικά τους ομόλογα. Πρόκειται και τους PurP (αδενίνης) και YjcD (γουανίνης/υποξανθίνης) της ομάδας COG2252 (Κεφ. 3.3), SmLL9 (ξανθίνης/ουρικού) από τον κλάδο της ομάδας COG2233 που αφορά μεταφορείς πουρινών (Κεφ. 3.2) και RutG (σε σύγκριση με UraA) από τον υποκλάδο της ομάδας COG2233 που αφορά μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης ή/και πουρινών (Κεφ. 3.4). Τέλος στο Κεφάλαιο 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον χαρακτηρισμό και την μεταλλαξιγένεση του ευκαρυωτικού μεταφορέα του επίμυος rSNBT1 που ανήκει και αυτός στον υποκλάδο των μεταφορέων ουρακίλης/πουρινών και παρουσιάζει ευρύτερη εξειδίκευση από τα πλησιέστερα βακτηριακά του ομόλογα (UraA, RutG).

Το τελευταίο μέρος των αποτελεσμάτων (Κεφ. 3.6) αφορά την μελέτη του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E.coli* στο μοτίβο της έλικας 8 (TM8) καθώς επίσης και σε θέσεις γύρω από το κέντρο δέσμευσης προκειμένου να διερευνηθεί η εξάρτηση της ενεργότητας του μεταφορέα από το pH. Η μελέτη αυτή έγινε για να κατανοηθεί περισσότερο ο ρόλος της θέσης Asp-276 (TM8) η οποία δεν εμφανίζει ένα σαφές μοτίβο συντήρησης της πλευρικής ομάδας μεταξύ των ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 και, από την μεταλλαξιγένεση του αντίστοιχου αμινοξέος σε αρκετά ομόλογα (XanQ, UacT, SmLL9, UraA, RutG, rSNBT1, PurP, YjcD), φαίνεται να είναι σημαντική λειτουργικά αλλά με διαφορετικό βαθμό συνεισφοράς (αναντικατάστατη, απαραίτητη καρβοξυλομάδα ή με λιγότερο αυστηρούς περιορισμούς ως προς την δυνατότητα αντικατάστασης της) ανάλογα με την ομάδα των ομολόγων που εξετάζεται.



Εικόνα 3.1.1 Φυλογενετικό δέντρο λειτουργικά χαρακτηρισμένων μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών με το πρόγραμμα ClustalW και η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε με βάση τον αλγόριθμο neighbor-joining με το πρόγραμμα MEGA6.06, δίνονται και οι τιμές bootstrap (500 επαναλήψεις) χωρίς τους μεταφορείς SmWQ0 και SmYE1. Τα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την *E.coli*: UraA (P0AGM7), RutG (P75892), XanQ (P67444), XanP (P0AGM9), UacT (Q46821), YjcD (P0AF52), YgfQ (Q46817), PurP (P31466), YicO (P31440), *Bacillus subtilis*: PyrP (YP_003865951), PucJ (O32139), PucK (O32140), PbuX (P42086), PbuG (O34987), *Sinorhizobium meliloti*: SmLL9 (Q92LL9), SmLL8 (Q92LL8), SmVC3 (Q92VC3), SmYE1 (Q92YE1), SmWQ0 (Q92WQ0), SmX28 (Q92X28), *Acinetobacter calcoaceticus*: AcS4X6 (WP_003654128), *Aspergillus nidulans*: UapA (Q07307), UapC (P48777), AzgA (Q7Z8R3), *Aspergillus fumigatus*: AfUapA (XP748919), AfAzgA (XP_753664.1), *Candida albicans* Xut1 (AA22221.1), *Arabidopsis thaliana* AtAzgA1 (AEE74982) AtAzgA2 (AED95923) AtNAT3 (Q8GZD4) AtNAT12 (Q3E7D0), *Zea mays* Lpe1 (NP_001150400.1) *Homo sapiens* hSVCT1 (Q9UHI7), hSVCT2 (Q9UGH3), *Rattus norvegicus* rSNBT1 (BA166650), *Borrelia burgdorferi* bbb22 (O50993) bbb23 (O50994). Με **έντονη γράφη**: μεταφορείς που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά, **πράσινο**: μεταφορείς ουρακίλης ή/και πουρινών, **γκρι**: πουρινών και πυριμιδίων, **μπλε**: μεταφορείς Ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος και **κόκκινο**: μεταφορείς αδενίνης ή/και υποξανθίνης ή/και γουανίνης που μελετήθηκαν με μεταλλαξιγένεση στην παρούσα εργασία.

3.2 Ταυτοποίηση και ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 από το *Sinorhizobium meliloti* 1021

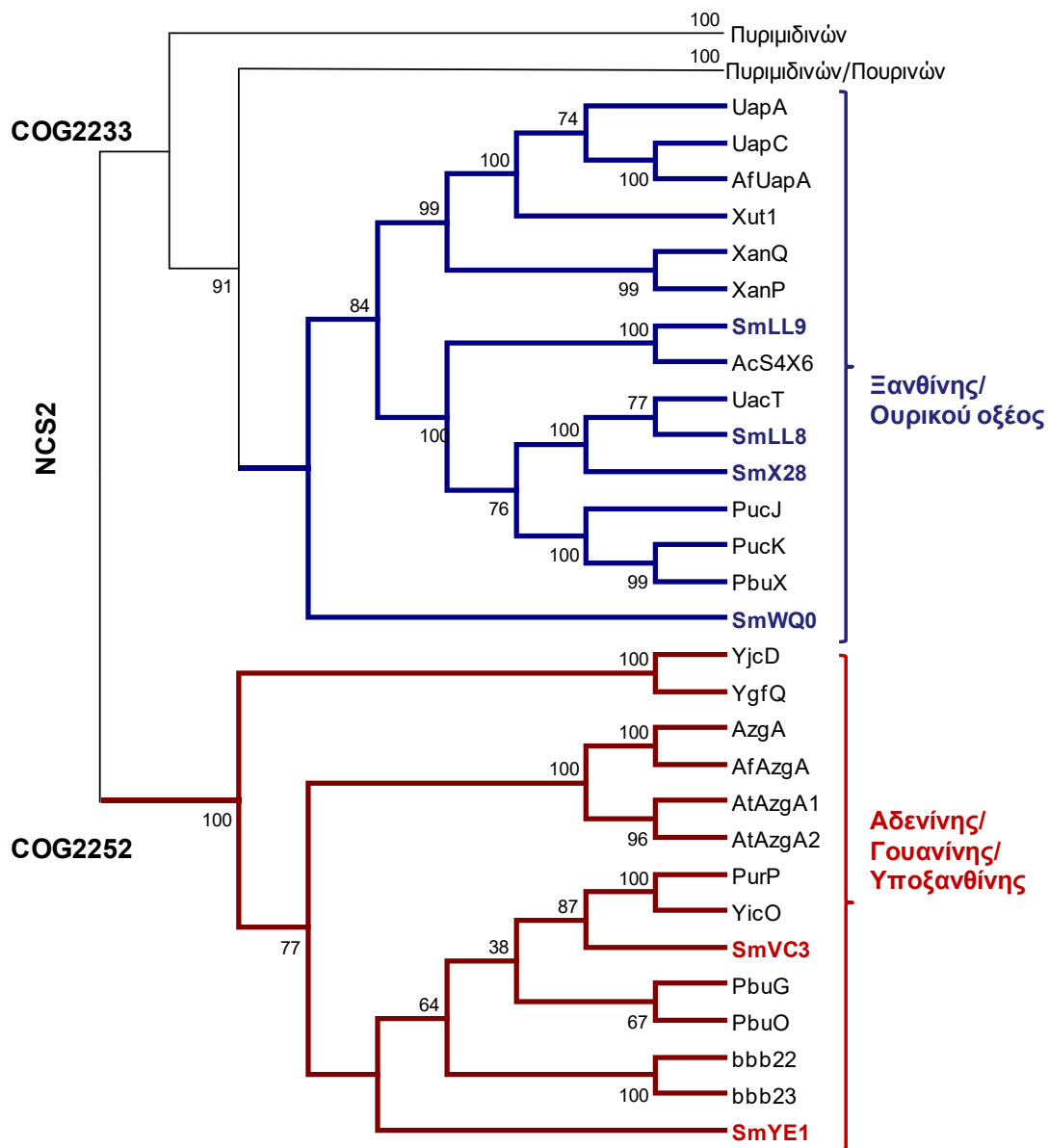
3.2.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 από το *Sinorhizobium meliloti* 1021

Με βάση την πλήρη αλληλούχιση του γενωμικού DNA του οργανισμού *Sinorhizobium meliloti* 1021 προκύπτει ότι το αζωτοδεσμευτικό αυτό ριζοβακτήριο φέρει έξι πιθανούς μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2. Οι τέσσερις από αυτούς φυλογενετικά εντάσσονται στον κλάδο NAT/NCS2 (COG2233) και συγκεκριμένα στον κλάδο που ανήκουν γνωστοί μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος. Οι άλλοι δύο ανήκουν στην ομάδα COG2252 (Εικόνα 3.2.1).

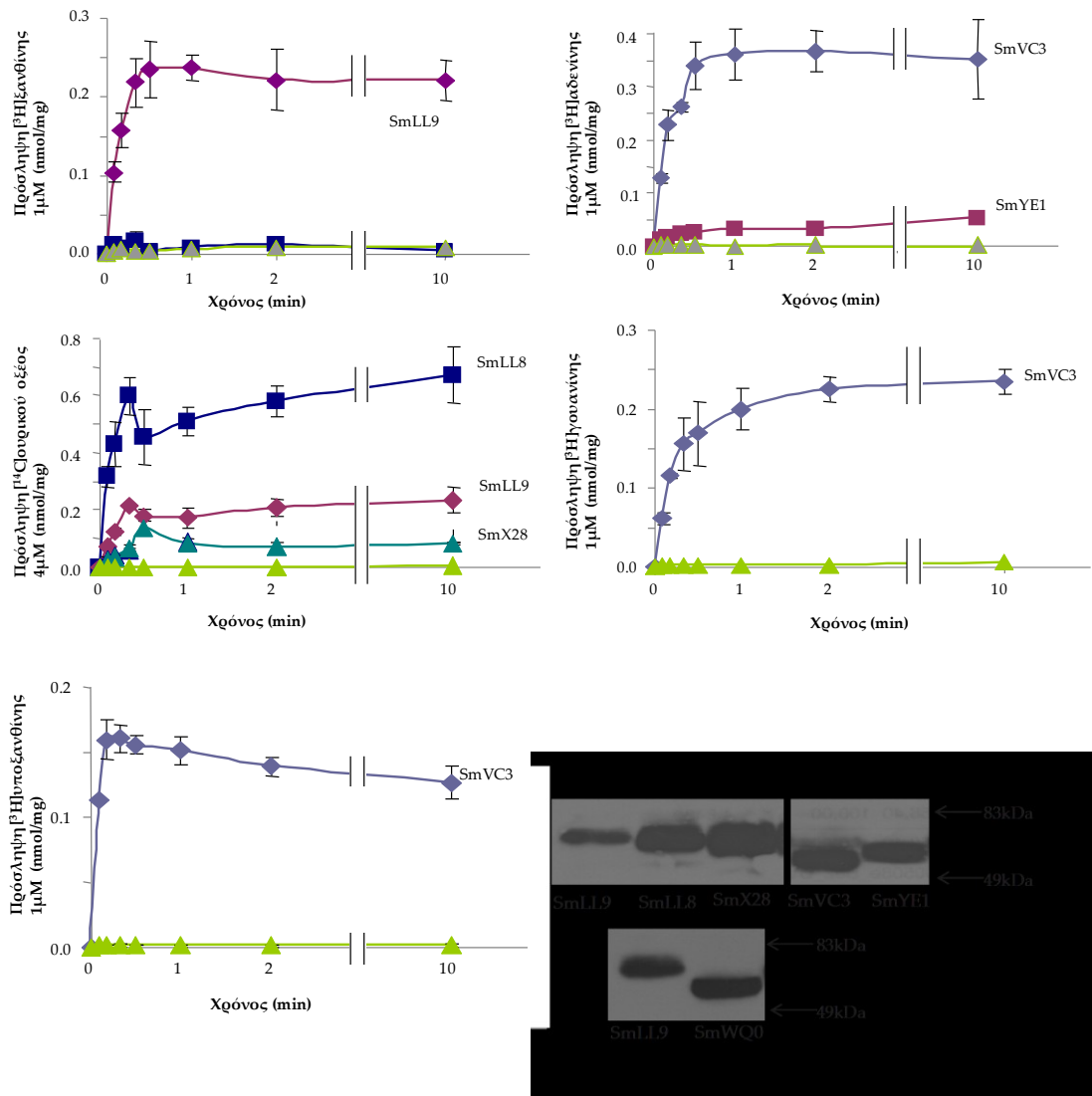
Τα γονίδια των έξι ομόλογα κλωνοποιήθηκαν με PCR και στη συνέχεια έγινε η ένθεσή τους στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/NCS2-ABH. Με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς μετασχηματίστηκαν κατάλληλα κύτταρα *E.coli* K-12 (Κεφ. 2.7). Με Western ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ομολόγων στην μεμβράνη των κυττάρων του ετερόλογου συστήματος της *E.coli* (Εικόνα 3.2.2). Όλοι ανιχνεύονται στην μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα με εξαίρεση τον SmLL9 του οποίου τα επίπεδα χαμηλότερα.

Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς έδειξαν ότι οι SmLL8 και SmX28 είναι μεταφορείς μόνο ουρικού οξέος ενώ ο SmLL9 είναι μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος (Εικόνα 3.2.2). Ο SmWQ0 δεν βρέθηκε να μπορεί να μεταφέρει ξανθίνη ή ουρικό οξύ, τα δύο πιθανά υποστρώματα αυτής της υποομάδας. Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι ο SmLL8 είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ουρικού οξέος με K_m 3.5 μ M ενώ οι άλλοι μεταφορείς ουρικού οξέος είναι χαμηλότερης συγγένειας με τον SmX28 να έχει K_m 21.4 μ M και ο SmLL9 με K_m 27.3 μ M (Πίνακας 3.2.1). Ο SmLL9 είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης με K_m 5.3 μ M.

Σε ότι αφορά τα ομόλογα της ομάδας COG2252 ο μεν SmYE1 είναι μεταφορέας μόνο αδενίνης και έχει υψηλή συγγένεια με το υπόστρωμα K_m 1.6 μ M. Ο SmVC3 είναι μεταφορέας αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης. Μεταφέρει αδενίνη και υποξανθίνη με υψηλή συγγένεια (K_m 2.0 μ M και 8.2 μ M αντίστοιχα) και με χαμηλότερη την γουανίνη με K_m 64.4 μ M (Πίνακας 3.2.1).



Εικόνα 3.2.1 Φυλογενετικό δέντρο λειτουργικά χαρακτηρισμένων μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών με το πρόγραμμα ClustalW και η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε με βάση τον αλγόριθμο neighbor-joining με το πρόγραμμα MEGA6.06, δίνονται και οι τιμές bootstrap (500 επαναλήψεις) χωρίς τους μεταφορείς SmWQ0 και SmYE1. Τα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την *E.coli*: UraA (P0AGM7), RutG (P75892), XanQ (P67444), XanP (P0AGM9), UacT (Q46821), YjcD (P0AF52), YgfQ (Q46817), PurP (P31466), YicO (P31440), *Bacillus subtilis*: PyrP (YP_003865951), PucJ (O32139), PucK (O32140), PbuX (P42086), PbuG (O34987), PbuO (O34978), *Sinorhizobium meliloti*: SmLL9 (Q92LL9), SmLL8 (Q92LL8), SmVC3 (Q92VC3), SmYE1 (Q92YE1), SmWQ0 (Q92WQ0), SmX28 (Q92X28), *Acinetobacter calcoaceticus*: AcS4X6 (WP_003654128), *Aspergillus nidulans*: UapA (Q07307), UapC (P48777), AzgA (Q7Z8R3), *Aspergillus fumigatus*: AfUapA (XP748919), AfAzgA (XP_753664.1), *Candida albicans* Xut1 (AAX22221.1), *Arabidopsis thaliana* AtAzgA1 (AEE74982) AtAzgA2 (AED95923) AtNAT3 (Q8GZD4) AtNAT12 (Q3E7D0), *Zea mays* Lpe1 (NP_001150400.1) *Homo sapiens* hSVCT1 (Q9UHI7), hSVCT2 (Q9UGH3), *Rattus norvegicus* rSNBT1 (BAI66650), *Borrelia burgdorferi* bbb22 (O50993) bbb23 (O50994). Με **έντονη γραφή**: μεταφορείς που χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά, **πράσινο**: μεταφορείς ουρακίλης ή/και πουρινών, **γκρι**: πουρινών ή/και πυριμιδινών, **μπλε**: μεταφορείς Ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος και **κόκκινο**: μεταφορείς αδενίνης ή/και υποξανθίνης ή/και γουανίνης.



Εικόνα 3.2.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός μεταφορέων NAT/NCS2 του *Sinorhizobium meliloti*. Κύτταρα *E.coli* που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] υποξανθίνης (1μM, 25 °C, ΔpurP), [³H] αδενίνης (1μM, 25 °C, ΔpurP), [³H] γουανίνης (1μM, 25 °C, ΔγjcD), [³H]ξανθίνης (1μM, 25 °C, T184) ή [¹⁴C]ουρικού οξέος (1μM, 25 °C, T184). Αφαιρούνται οι τιμές του αντίστοιχου αρνητικού μάρτυρα (με κενό φορέα pT7-5). Η τυπική απόκλιση είναι <10% και προέρχεται από τρία πειράματα. Κάτω δεξιά: κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/NAT/NCS2-BAD αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και έγινε αποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραίωση 1:50000.

Πίνακας κινητικής ανάλυσης των μεταφορέων NAT/NCS2 του *Sinorhizobium meliloti*.

Πρόσληψη [³H]ξανθίνης (T184)

Μεταφορέας	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
SmLL9	5.3±1.5	24.2±2.1	4566

Πρόσληψη [¹⁴C]ουρικού οξέος (T184)

Μεταφορέας	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
SmLL9	27.3±6.9	13.3±0.9	487
SmLL8	3.5±1.3	8.3±0.6	2371
SmX28	21.4±6.8	2.3±0.2	107

Πρόσληψη [³H]αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης ($\Delta\text{purP}/\Delta\text{yjcD}$)

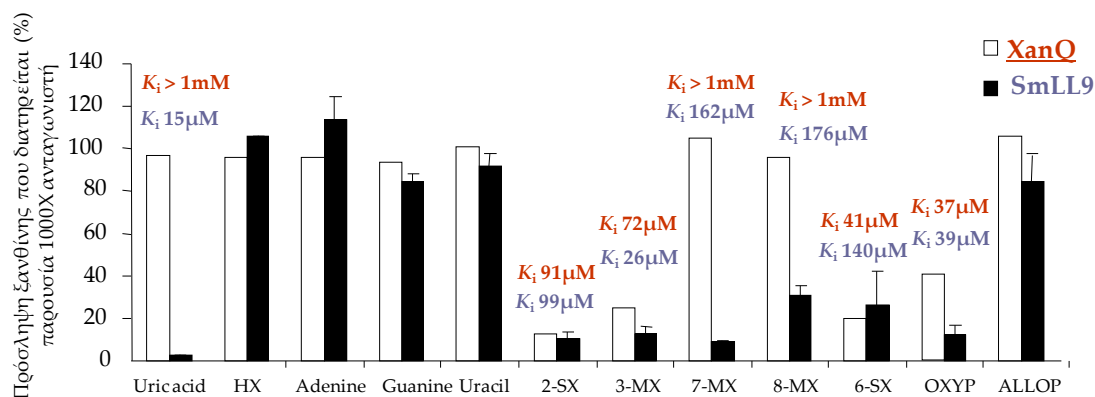
Μεταφορέας	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Υπόστρωμα
SmYE1	1.6±0.4	2.7±0.2	1687	Αδενίνη
SmVC3	2.0±0.3	8.3±0.3	4150	Αδενίνη
SmVC3	64.4±13.1	109.5±14.6	1700	Γουανίνη
SmVC3	8.2±1.9	7.6±0.6	926	Υποξανθίνη

Πίνακας 3.2.1 Κινητική ανάλυση των μεταφορέων NAT/NCS2 του *Sinorhizobium meliloti*. Κύτταρα *E.coli* που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένων πουρινών (0.01–40 μM) ή [³H] γουανίνης (0.1 μM) μετά από επώαση 5min με μη σημασμένη γουανίνη. Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-20 sec. Οι τιμές K_m και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταφορέων NAT/NCS2 του *Sinorhizobium meliloti* αποκάλυψε δύο ιδιαίτερα ενδιαφέροντες μεταφορείς. Ο πρώτος είναι ο SmVC3 που μεταφέρει και τα τρία υποστρώματα της ομάδας COG2252 και είναι ο πρώτος βακτηριακός μεταφορέας που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά ότι μεταφέρει και τις τρεις πουρίνες, αδενίνη, υποξανθίνη και γουανίνη. Μέχρι τώρα ομόλογοι μεταφορείς της ομάδας COG2252 που μπορούν να μεταφέρουν και τα τρία αυτά υποστρώματα προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Cecchetto *et al.*, 2004). Δεύτερον, είναι ο μεταφορέας Ξανθίνης και

ουρικού οξέος SmLL9. Οι μέχρι τώρα γνωστοί βακτηριακοί μεταφορείς αυτής της ομάδας (COG2233) είχαν χαρακτηριστεί σαν μεταφορείς μόνο Ξανθίνης είτε μόνο ουρικού οξέος. Στην *E.coli* K-12 οι αντίστοιχοι μεταφορείς είναι ο XanQ και XanP [Ξανθίνης (Karatzá and Frillingos, 2005)] και ο UacT [ουρικού οξέος (Papakostas and Frillingos, 2012)].

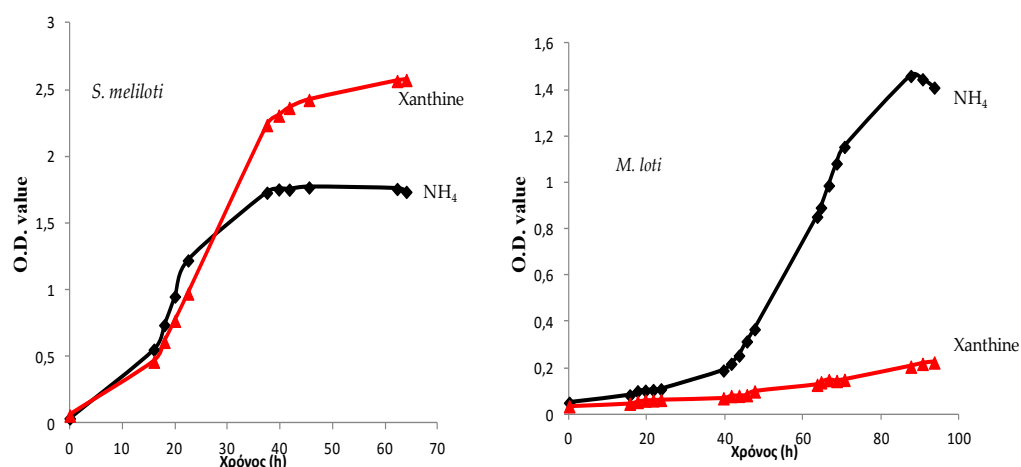
Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε διεξοδικότερα ο μεταφορέας SmLL9. Πειράματα ενεργού μεταφοράς [³H]Ξανθίνης παρουσία πιθανών ανταγωνιστών (Εικόνα 3.3.3) υπέδειξαν ότι ο SmLL9 έχει ευρύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τον μεταφορέα Ξανθίνης XanQ καθώς μπορεί και αναγνωρίζει ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου που ο XanQ δεν αναγνωρίζει (ουρικό οξύ, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη) (Karena *et al.*, 2015).



Εικόνα 3.2.3 Σύγκριση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων XanQ και SmLL9. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-10 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που φέρουν τους μεταφορείς αγρίου τύπου χωρίς την επίδραση των προσδετών με τυπική απόκλιση <20% από τρία πειράματα. Δίνονται οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i) (Παπακώστας, ΔΔ 2011;Karena *et al.*, 2015). Οι συντμήσεις είναι: HX η υποξανθίνη, 2-SX η 2-θειοξανθίνη, 3-MX η 3-μεθυλοξανθίνη, 7-MX η 7-μεθυλοξανθίνη, 8-MX η 8-μεθυλοξανθίνη και 6-SX η 6-θειοξανθίνη.

3.2.2 Το *S.meliloti* χρησιμοποιεί την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου και την προσλαμβάνει μέσω του SmLL9

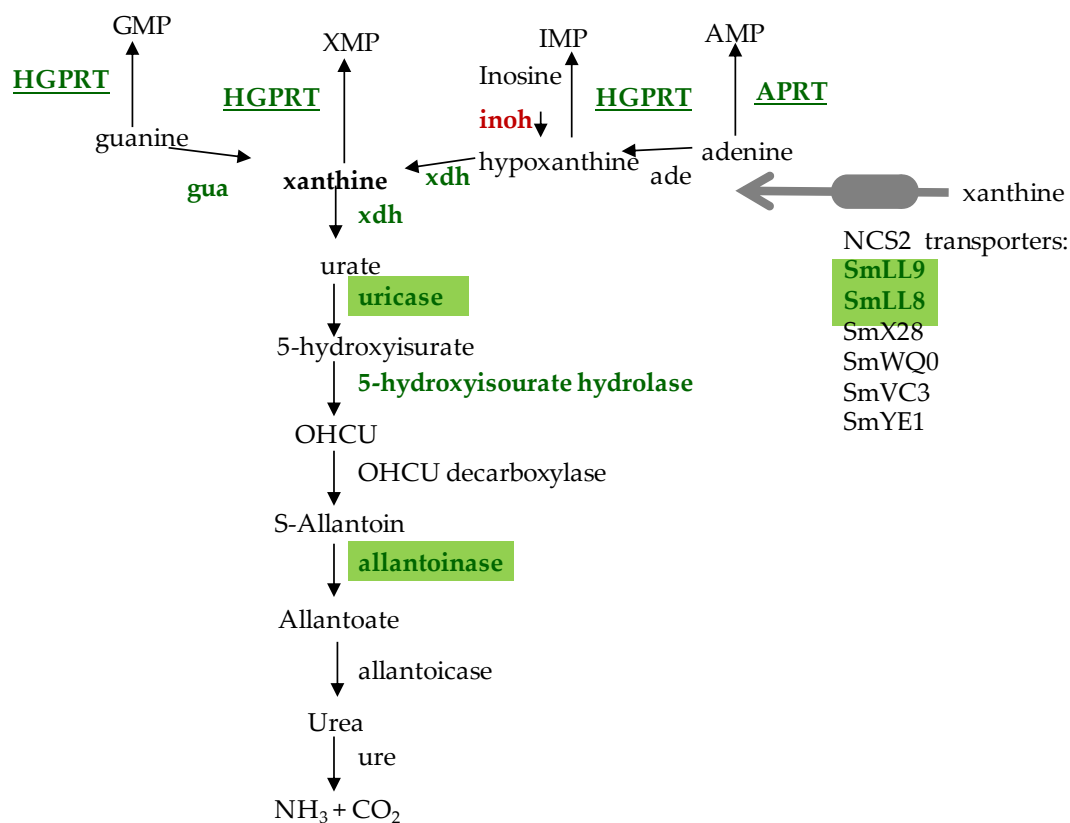
Όπως είναι γνωστό τα αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια μπορούν είτε να αυξάνονται στη φύση ως ελευθεροβιωτικοί οργανισμοί (free-living cells) είτε να συμβιώνουν στις ρίζες των ψυχανθών φυτών σχηματίζοντας φυμάτια. Τα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του Επίκουρου Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) δείχνουν ότι το *Sinorhizobium meliloti* μπορεί να χρησιμοποιήσει την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου ενώ το *Mesorhizobium loti*, που δεν φέρει κανένα πιθανό μεταφορέα πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2, δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου για την αύξησή του. (Εικόνα 3.2.4).



Εικόνα 3.2.4 Ρόλος του μεταφορέα SmLL9 για τη χρησιμοποίηση της ξανθίνης από ελευθεροβιωτικά ριζοβακτήρια. *S.meliloti* 1021 (*S.meliloti*) ή *M.loti* MAF303099 (*M.loti*) αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο RMM που περιείχε ξανθίνη (10mM) ή NH₄Cl (10mM) ως μοναδική πηγή αζώτου, σε 28°C, pH 7.6. Φαίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες αύξησης των *S.meliloti* και *M.loti* όταν χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή αζώτου η ξανθίνη (κόκκινο χρώμα) ή το NH₄Cl (μαύρο χρώμα) (Αποτελέσματα Καλλιαντάκου και Φλεμετάκη).

Σε αυτές τις συνθήκες [που το *Sinorhizobium meliloti* χρησιμοποιεί την ξανθίνη ή NH₄Cl ως μοναδική πηγή αζώτου για την αύξησή του] μετρήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της ξανθίνης καθώς και των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Βρέθηκε ότι αυξάνονται τα μεταγραφικά επίπεδα των μεταφορέων SmLL9 και SmLL8 και των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της ξανθίνης προς αμμωνία και κυρίως της ουρικού και της αλλαντοϊνίας, τόσο σε ελευθεροβιωτικά κύτταρα *S.meliloti* εκθετικής φάσης και στατικής φάσης ανάπτυξης (Εικόνα 3.2.5), σε σχέση με τα κύτταρα *S.meliloti* που έχουν χρησιμοποιήσει το αμμώνιο ως μοναδική πηγή αζώτου για την αύξησή τους. Τόσο στα κύτταρα *S.meliloti* που χρησιμοποιούν NH₄ για την αύξησή τους όσο και σε αυτά που χρησιμοποιούν την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου, τα μεταγραφικά επίπεδα των

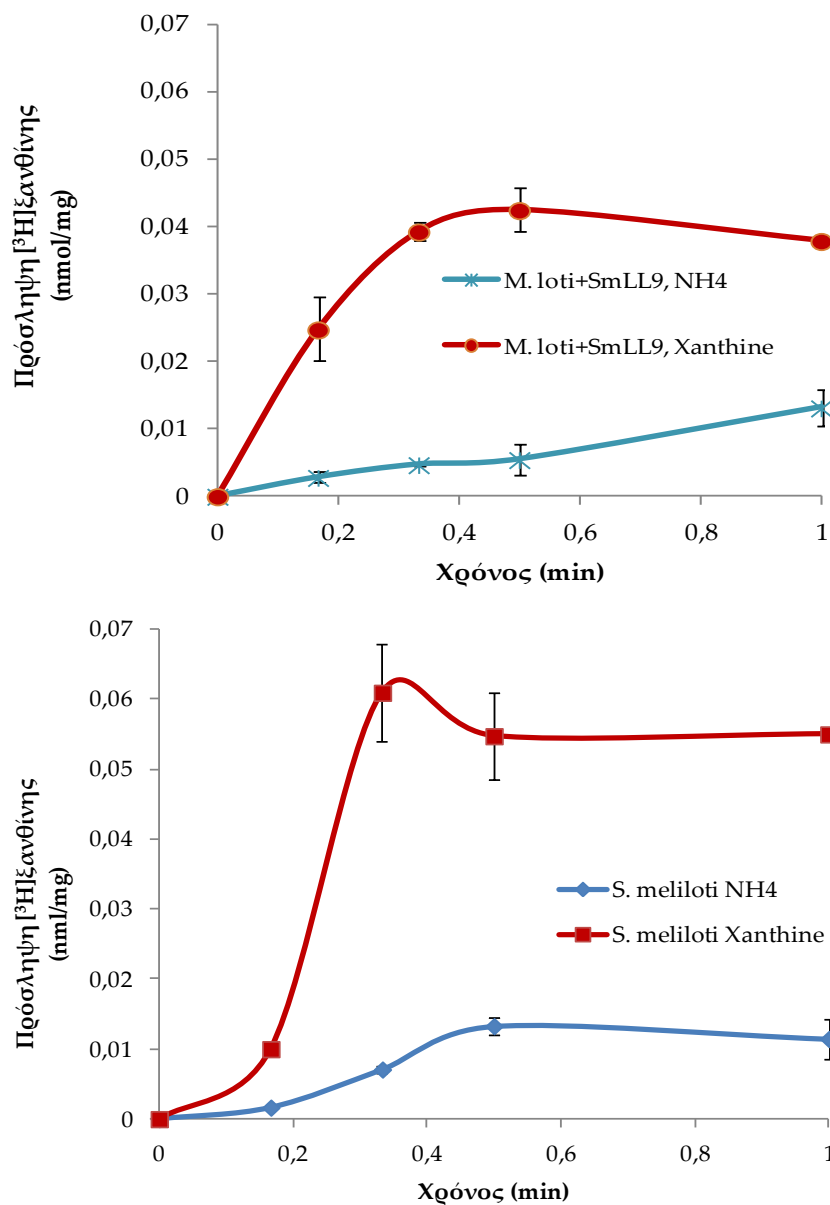
φωσφοριβοτρανσφερασών (HPRT) είναι συνεχώς σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μονοπάτι περίσωσης πουρινών είναι σε κάθε περίπτωση ενεργό (Εικόνα 3.2.5). Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα και την συμβίωση σε φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, μετά την μόλυνση του φυτού *Medicago truncatula* με το *S.meliloti*, ο SmLL9 και τα ένζυμα του καταβολισμού έχουν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα και τα ένζυμα που οδηγούν στο μονοπάτι περίσωσης πουρινών διατηρούν υψηλά μεταγραφικά επίπεδα.



Εικόνα 3.2.5 Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού του μεταβολισμού (καταβολισμός και αναβολισμός) πουρινών. Στην εικόνα εμφανίζονται τα αποτελέσματα από RT-PCR από κύτταρα ελεύθερης καλλιέργειας *Sinorhizobium meliloti* 1021 σε εκθετική φάση. Τονίζονται με πράσινο χρώμα να ένζυμα των οποίων τα μεταγραφικά επίπεδα αυξάνονται και με κόκκινο εκείνα των οποίων τα μεταγραφικά επίπεδα μειώνονται σε σχέση με την ελεύθερη καλλιέργεια του *Sinorhizobium meliloti* παρουσία NH₄Cl ως μοναδική πηγή αζώτου. Με πράσινο και υπογράμμιση είναι τα ένζυμα του αναβολισμού που έχουν παρόμοια επίπεδα. Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα και σε φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών μετά την μόλυνση του φυτού (Αποτελέσματα Καλλιαμπάκου και Φλεμετάκης).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε ότι όντως ο μεταφορέας SmLL9 είναι λειτουργικός *in vivo* χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *Sinorhizobium meliloti* ελεύθερης καλλιέργειας που χρησιμοποιούν την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου προκειμένου να ελεγχθούν ως προς την ενεργό μεταφορά [³H]ξανθίνης. Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (Εικόνα 3.2.6) έδειξαν ότι τα κύτταρα του *Sinorhizobium meliloti* που χρησιμοποίησαν το αμμώνιο ως μοναδική πηγή αζώτου (τα μεταγραφικά επίπεδα του SmLL9 σε αυτή την περίπτωση είναι χαμηλά) δεν μπορούν να μεταφέρουν ξανθίνη ενώ τα κύτταρα *Sinorhizobium meliloti* που χρησιμοποίησαν την ξανθίνη (τα μεταγραφικά επίπεδα του SmLL9 σε αυτή την περίπτωση είναι αυξημένα) μπορούν να μεταφέρουν ξανθίνη. Αντίθετα τα κύτταρα του *Mesorhizobium loti* (που δεν φέρουν κανένα πιθανό μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2) μπορούν να μεταφέρουν ξανθίνη μόνο όταν μετασχηματιστούν με κατάλληλο πλασμίδιο που φέρει το μεταφορέα SmLL9 (Εικόνα 3.2.6).

Συνεπώς επιβεβαιώνεται ότι ο SmLL9 είναι λειτουργικός, τουλάχιστον στην περίπτωση των ελευθεροβιωτικών κυττάρων, και ο φυσιολογικός του ρόλος είναι η μεταφορά ξανθίνης, ικανότητα η οποία ενδεχομένως χρησιμοποιείται και κατά την συμβίωση προκειμένου το βακτηριοειδές να προσλαμβάνει πουρίνες για να καλύψει τις ανάγκες του και να ενισχύσει την αζωτοδέσμευση.



Εικόνα 3.2.6 Ενεργότητα [³H]ξανθίνης σε ελευθεροβιωτικά ριζοβακτήρια. Κύτταρα *S. meliloti* 1021 (*S. meliloti*) ή *M. loti* MAF303099/SmLL9 (*M. loti*+SmLL9) που εξέφραζαν τον μεταφορέα SmLL9 μέσω του pJb3Tc19+SMc02513myc (*M. loti*/LL9) αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο RMM που περιείχε ξανθίνη (10mM) ή NH₄Cl (10mM) ως μοναδική πηγή αζώτου, σε 28°C, pH 7.6. Παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονικής προόδου της πρόσληψης [³H]ξανθίνης (0.1μM) από κύτταρα *S. meliloti* και *M. loti*/SmLL9 που έχουν αυξηθεί σε ξανθίνη ή σε NH₄Cl, όπως σημειώνεται ενδεικτικά. Οι δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς έγιναν σε 25°C, pH 7.5, με την μέθοδο της ταχείας διήθησης (βλ. Κεφ. 2.8.2).

3.2.3 Μεταλλαξιγένεση του SmLL9 σε θέσεις αμινοξέων δυνητικά σημαντικές για την λειτουργία

Στόχοι μεταλλαξιγένεσης

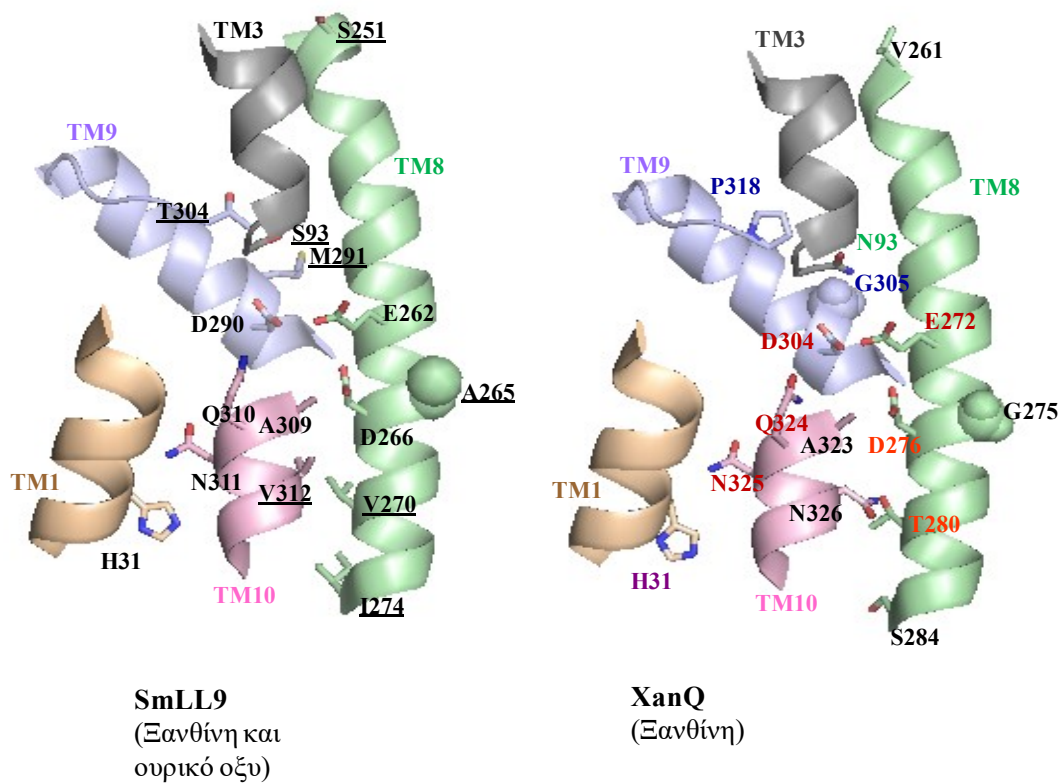
Είδαμε ότι ο μεταφορέας SmLL9 (ξανθίνης και ουρικού) έχει διαφορετική εξειδίκευση από τον συγγενικό του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E.coli* (Εικόνα 3.2.3). Προκειμένου να διερευνηθεί ποιες θέσεις είναι υπεύθυνες για την διαφορά εξειδίκευσης του μεταφορέα SmLL9, ο μεταφορέας αυτός υποβλήθηκε σε μεταλλαξιγένεση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων που υποδείχθηκαν από την στοίχιση της ακολουθίας του με αυτή του XanQ (Εικόνα 3.2.7). Για τον XanQ είναι ήδη γνωστές πολλές θέσεις σημαντικές για την λειτουργία της πρωτεΐνης από την ευρεία μεταλλαξιγένεση που έχει γίνει (Frillingos, 2012; Karena *et al.*, 2015). Ως σημαντικές χαρακτηρίζονται θέσεις που είναι αναντικατάστατες για την λειτουργία του μεταφορέα ή υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς την πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου που μπορεί να βρίσκεται στη θέση αυτή ή είναι θέσεις ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια (NEM) και εντοπίστηκαν τα κατάλοιπα H31, N93, V261, E272, A275, D276, T280, S284, D304, G305, P318, A323, Q324, N325, N326 και N430 (αρίθμηση με βάση τον XanQ).



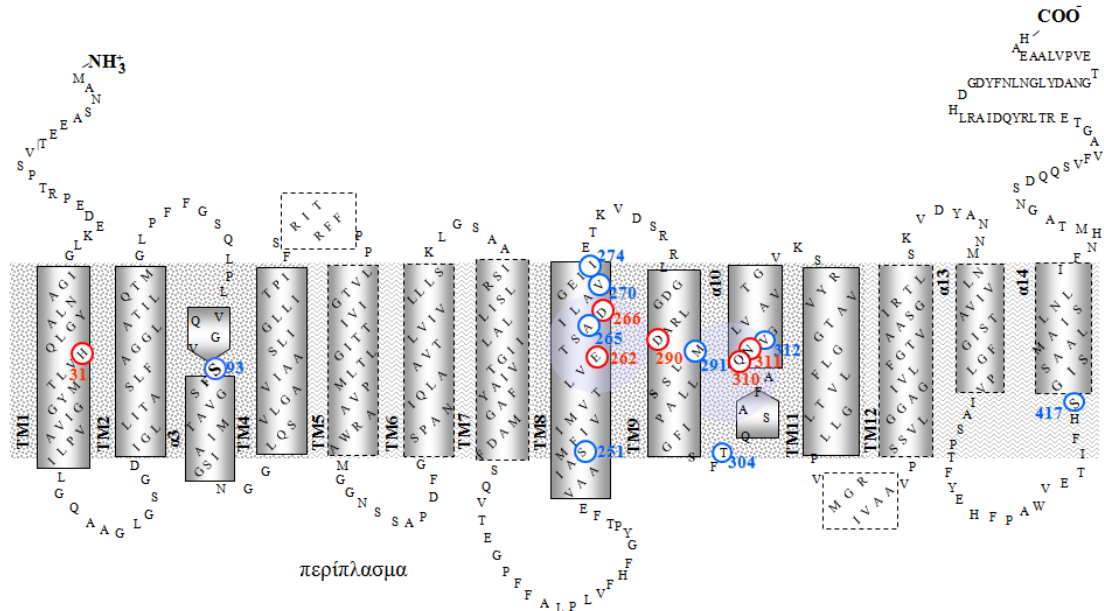
Εικόνα 3.2.7 Στοίχιση των αλληλουχιών των μεταφορέων XanQ και SmLL9. Έγινε πλήρης στοίχισης των αλληλουχιών των XanQ (P67444) και SmLL9 (Q92LL9) με τον αλγόριθμο ClustalW. Με κόκκινο πλαίσιο τονίζονται οι θέσεις που είναι συντηρημένες (δεν αλλάζει το αμινοξύ μεταξύ των δύο μεταφορέων) και με μπλε πλαίσιο θέσεις που συντηρείται διαφορετικό αμινοξύ.

Έχει βρεθεί ότι α) οι θέσεις H31, N93, D276 υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή τους ή/και συνεισφέρουν στην εξειδίκευση του μεταφορέα (Karana and Frillingos, 2009; Mermelekas *et al.*, 2010), β) οι θέσεις E272, D304, Q324 και N325 είναι αναντικατάστατες για την λειτουργία της πρωτεΐνης (Mermelekas *et al.*, 2010; Karatza *et al.*, 2006), γ) θέσεις με μεγάλη ευαισθησία σε απενεργοποίηση από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια είναι οι V261, G275, S284, A323 και N326 (Mermelekas *et al.*, 2010; Georgopoulou *et al.*, 2010) και δ) θέσεις P318 και G305 είναι σημαντικές για την έκφραση ή τη δομική σταθερότητα της πρωτεΐνης στην μεμβράνη (Karatza *et al.*, 2006) (Εικόνα 3.2.8).

Σε 7 από τις παραπάνω θέσεις ο μεταφορέας SmLL9 φέρει το ίδιο κατάλοιπο με τον μεταφορέα XanQ και αυτές είναι οι H31, E262, D266, D290, A309, Q310 και N311, ενώ στις θέσεις S93, S251, A265, V270, I274, M291, T304, V312 και S417 φέρει διαφορετικό κατάλοιπο. (Εικόνα 3.2.7 και 3.2.8). Τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται στις έλικες TM1 (H31), TM3 (S93), TM8 (S251, E262, A265, D266, V270, I274), TM9 (D290, M291), α 10 (A309, Q310, N311, V312) και α 14 (S417). Βρίσκονται δηλαδή στις έλικες που συμμετέχουν στον σχηματισμό του ενεργού κέντρου του μεταφορέα, με εξαίρεση την α 14 (Εικόνα 3.3.5). Στις θέσεις αυτές προχωρήσαμε σε μεταλλαξιγένεση ως εξής: α) στις περιπτώσεις που συντηρείται το ίδιο κατάλοιπο έγιναν συντηρητικές αλλαγές (αντικαθιστώντας με αμινοξέα που δεν αλλάζουν πολύ τον χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας) αλλά και αλλαγές σε αμινοξέα που απαντώνται σε άλλα ομόλογα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2, ενώ β) στις περιπτώσεις που το κατάλοιπο στο μεταφορέα SmLL9 είναι διαφορετικό αλλάξαμε το εγγενές κατάλοιπο με το αμινοξύ που φέρει στη θέση αυτή ο μεταφορέας XanQ.



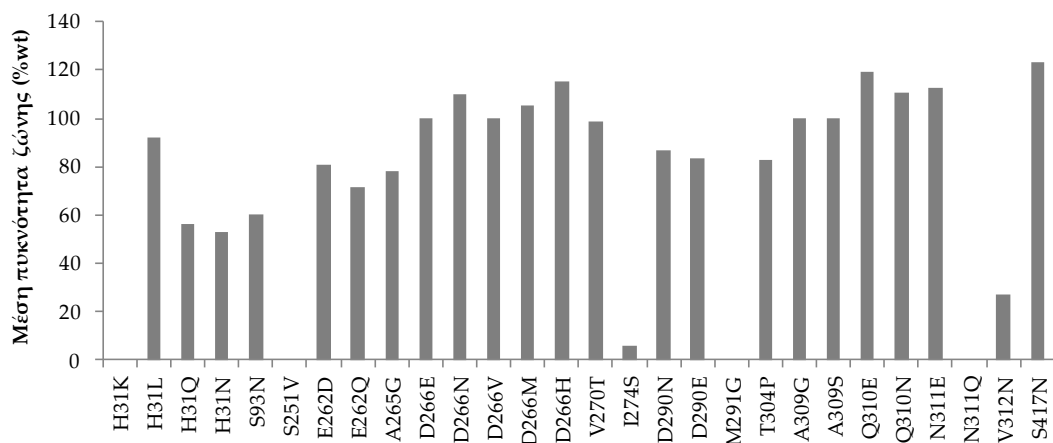
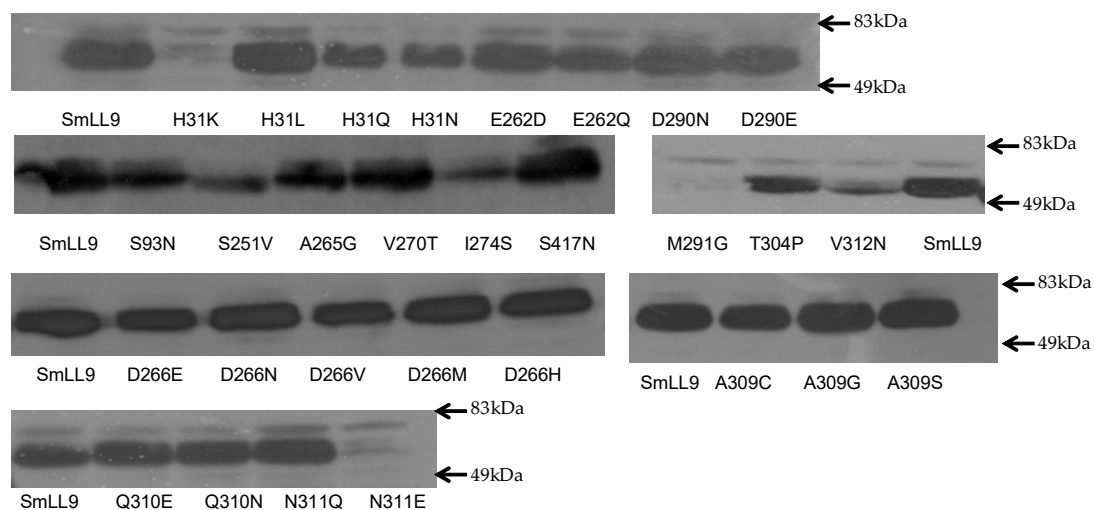
Εικόνα 3.2.8 Σύγκριση των δομικών μοντέλων των μεταφορέων SmLL9 και XanQ στην ευρύτερη περιοχή του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης. Οι αλληλουχίες των μεταφορέων μοντελοποιήθηκαν με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (PDB ID: 3QE7) με την χρήση του SWISSPROT modeling server. Τα δομικά μοντέλα οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα PyMOL και τονίζονται πέντε σημαντικές έλικες που περιλαμβάνουν κατάλοιπα αμινοξέων υπεύθυνα για την δέσμευση του υποστρώματος ή για την σταθεροποίηση της όλης δομής του κέντρου. Πρόκειται για τις TM1 (καφέ), TM3 (γκρι), TM8 (πράσινο), TM9 (μωβ) και TM10 (ροζ). Δεξιά το δομικό μοντέλο του SmLL9 όπου τονίζονται με υπογράμμιση τα κατάλοιπα που διαφέρουν μεταξύ των δύο μεταφορέων. Αριστερά το δομικό μοντέλο του XanQ όπου (βάσει όσων είναι ήδη γνωστά από την μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα αυτού) παρουσιάζονται με κόκκινο αναντικατάστατα κατάλοιπα, πορτοκαλί θέσεις που υπόκεινται σε σημαντικούς στερεοχημικούς περιορισμούς, μωβ κατάλοιπα των οποίων οι αντικαταστάσεις οδηγούν σε μειωμένη συγγένεια δέσμευσης του υποστρώματος, μαύρο ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από NEM και μπλε τα κατάλοιπα που οι αντικαταστάσεις τους οδηγούν σε μειωμένα ή μηδενικά επίπεδα πρωτεΐνης στην μεμβράνη των κυττάρων και πράσινο θέσεις των οποίων οι αντικαταστάσεις αλλάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα.



Εικόνα 3.2.9 Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα SmLL9. Το μοντέλο στηρίζεται στον δομικά ομόλογο μεταφορέα ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011). Τα τμήματα α-έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περίγραμμα αυτά που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου») και της β-πτυχωτής επιφάνειας με πεντάγωνα σχήματα σε μορφή βέλους. Με μπλε κύκλο τονίζονται οι θέσεις που ο μεταφορέας SmLL9 συντηρεί διαφορετικό κατάλοιπο και με κόκινο θέσεις που συντηρεί το ίδιο κατάλοιπο σε σχέση με το μεταφορέα XanQ. Οι θέσεις αυτές αποτελούν και τους στόχους μεταλλαγής στον μεταφορέα SmLL9.

Οι θέσεις E262, D266, D290, Q310 και N311 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες

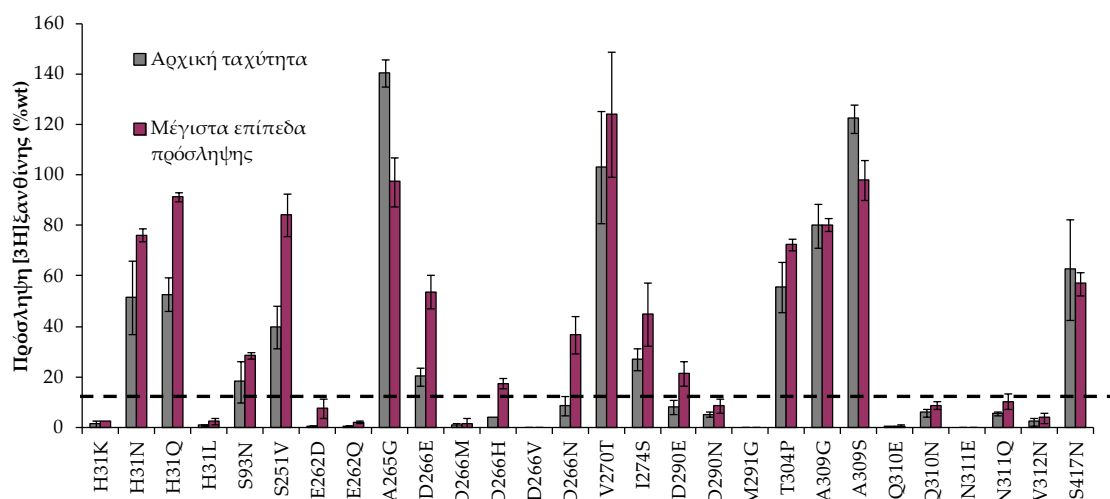
Με βάση το σκεπτικό που αναφέρθηκε παραπάνω, έγιναν οι εξής 28 αντικαταστάσεις στον SmLL9: H31K, H31L, H31Q, H31N, S93N, S252V, E262D, E262Q, A265G, D266E, D266N, D266M, D266V, D266H, V270T, I274S, D290E, D290N, M291G, T304P, A309G, A309S, Q310E, Q310N, N311E, N311Q, V312N και S417N. Αρχικά ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη των κυττάρων *E.coli* T184. Τα μεταλλάγματα H31K, S251V, I274S M291G, N311E και V312N έχουν μηδενικά ή πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη των κυττάρων (0-20% σε σχέση με το μεταφορέα αγρίου τύπου). Όλα τα υπόλοιπα μεταλλάγματα βρίσκονται στα ίδια επίπεδα με τον μεταφορέα αγρίου τύπου SmLL9 (Εικόνα 3.2.10).



Εικόνα 3.2.10 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης μεταλλαγμάτων του μεταφορέα SmLL9 σε δείγματα μεμβρανών της *E.coli*. Επάνω: Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/SmLL9-ABH με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στα αριστερά της εικόνας μετρώνται σε kDa. Κάτω: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως % ποσοστό της έκφρασης της SmLL9-ABH (Quantity One). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των αποτυπωμάτων Western και οι τιμές της ποσοτικοποίησης είναι οι μέσοι όροι από δύο πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <15%.

Στη συνέχεια η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης 1µM (Εικόνα 3.2.11) απέδειξε ότι οι θέσεις E262, D290, Q310 και N311 είναι αναντικατάστατες για την λειτουργία του μεταφορέα (όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις αντίστοιχες θέσεις αμινοξέων στον XanQ). Αν δούμε τις τιμές της αρχικής ταχύτητας, η θέση D266 εμφανίζεται επίσης λειτουργικά αναντικατάστατη καθώς μόνο το μετάλλαγμα D266E έχει αρχική ταχύτητα μεταφοράς του υποστρώματος κοντά στο 20% σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου, ενώ οι αρχικές ταχύτητες των D266M, D266H και D266V είναι μηδενικές και του D266N

είναι στο 5% (Εικόνα 3.2.11). Παρόμοια εικόνα από την μεταλλαξιγένεση είχε βρεθεί και για την αντίστοιχη θέση (D276) του XanQ, αν και εκεί το μετάλλαγμα D276E διατηρεί πολύ υψηλή ενεργότητα (Mermelekas *et al.*, 2010). Η θέση H31 υπόκειται σε περιορισμούς ως προς το ποιο αμινοξύ μπορεί να την αντικαταστήσει καθώς μόνο πολικά και μη φορτισμένα αμινοξέα στη θέση αυτή επιτρέπουν την ενεργότητα του μεταφορέα (H31Q, H31N) ενώ τόσο το H31K (τι οποίο έχει σχεδόν μηδενική έκφραση, Εικόνα 3.2.9) όσο και το H31L είναι ανενεργά. Ακριβώς όμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και από την μεταλλαξιγένεση της αντίστοιχης θέσης (H31) στον XanQ (Karena and Frillingos, 2009). Ως προς τη θέση S93, το μετάλλαγμα S93N εμφανίζει μειωμένη ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης της τάξεως του 20% σε σχέση με το SmLL9(wt). Τα μεταλλάγματα S251V και I274S έχουν ενεργότητα 30-40% της αρχικής ταχύτητας μεταφοράς της πρωτεΐνης αγρίου τύπου ενώ τα υπόλοιπα μεταλλάγματα A265G, V270T, T304P, A309G, A309S, S417N διατηρούν υψηλά επίπεδα αρχικής ταχύτητας μεταφοράς ξανθίνης (πάνω από 60% σε σχέση με τον SmLL9 αγρίου τύπου) (Εικόνα 3.2.11).

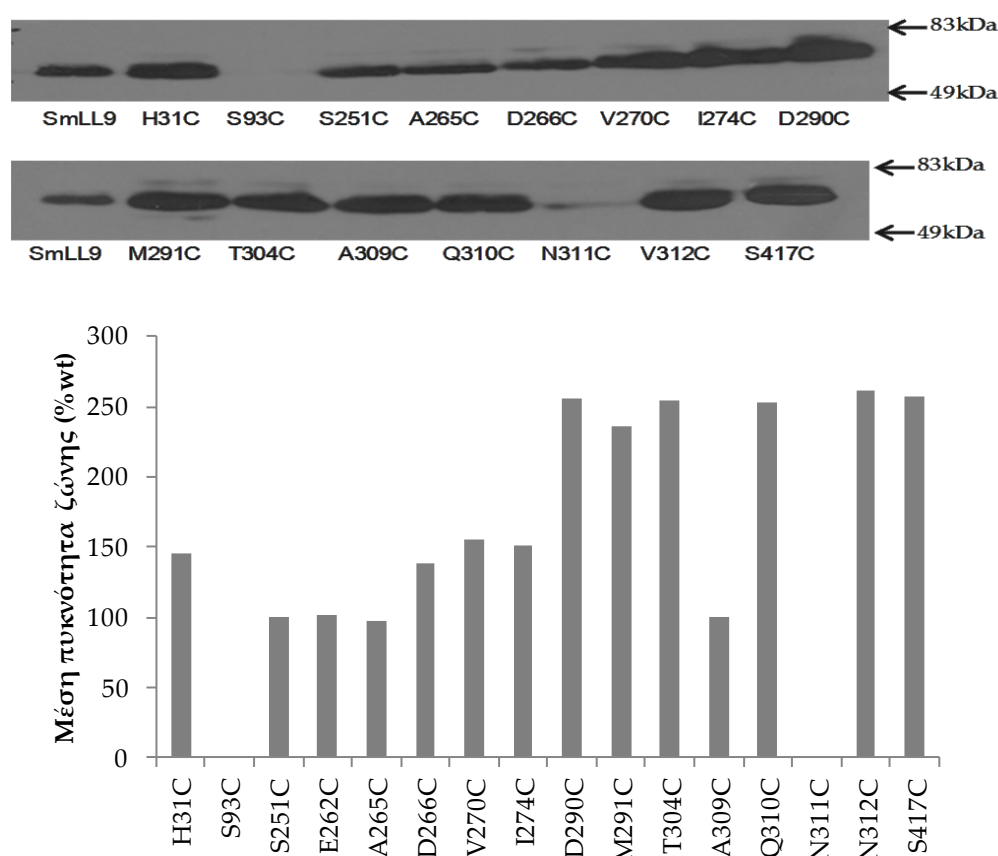


Εικόνα 3.2.11 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης των μεταλλαγμάτων του SmLL9. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (1 μM , 25°C). Φαίνονται τα αποτελέσματα από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 10 έως 30sec) και των μεγίστων επιπέδων πρόσληψης που επιτυγχάνονται (από μετρήσεις σε χρόνους 1 έως 10min). Σε κάθε περίπτωση, αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pI7-5) και παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που εκφράζουν τον SmLL9 αγρίου τύπου. Παρουσιάζονται μέσο όροι των τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

3.2.4 Τα μεταλλάγματα A265C, A309C, S417C έχουν υψηλή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM

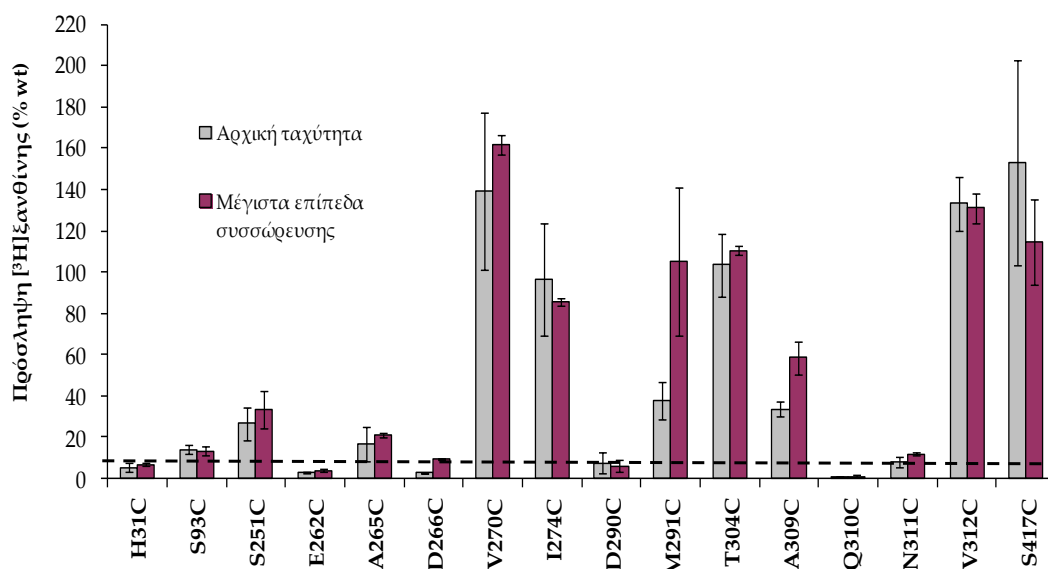
Οι 16 θέσεις του SmLL9 που εξετάστηκαν με μεταλλαξιγένεση με το σκεπτικό που αναφέρθηκε παραπάνω (Κεφ. 3.2.3) αντικαταστάθηκαν επίσης με κυστεΐνη, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι ο μεταφορέας SmLL9(wt) δε φέρει καμία κυστεΐνη δηλ. είναι εγγενώς ελεύθερος κυστεϊνών (Cys-less). Έτσι δημιουργήθηκαν 16 μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης του SmLL9.

Η μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταλλαγμάτων αυτών με ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε ότι τα επίπεδα των μεταλλαγμάτων S93C και N311C είναι μηδενικά ενώ τα υπόλοιπα μεταλλάγματα έχουν υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων σε σχέση με το μεταφορέα SmLL9 (wt) (Εικόνα 3.2.12).



Εικόνα 3.2.12 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα SmLL9. Επάνω: Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/SmLL9-ABH με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000. Κάτω: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως % ποσοστό της έκφρασης της SmLL9-ABH (Quantity One). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των αποτυπωμάτων Western και οι τιμές της ποσοτικοποίησης είναι μέσοι όροι από δύο πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <15%.

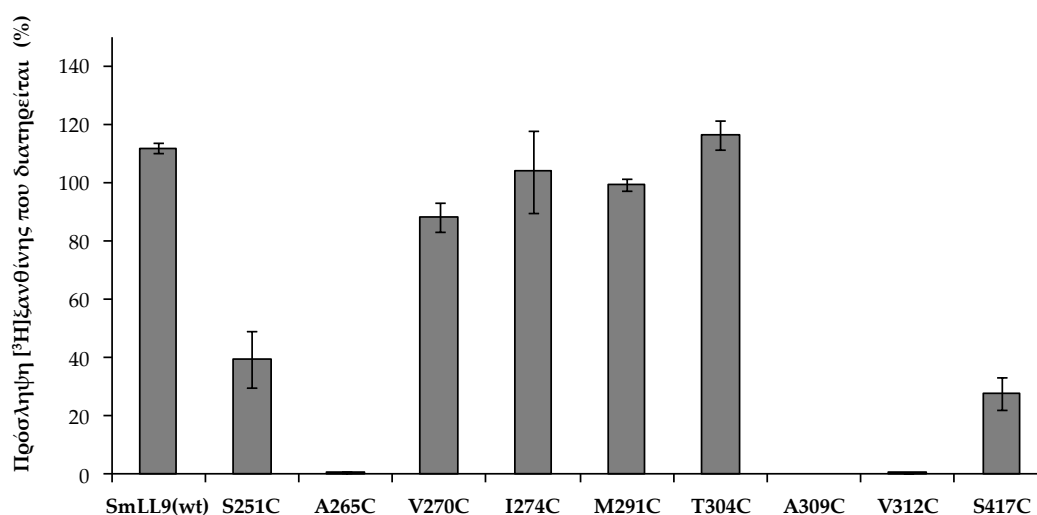
Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς Ξανθίνης έδειξε ότι τα μεταλλάγματα H31C, S93C, E262C, D266C, D290C, Q310C και N311C είναι ανενεργά (αρχική ταχύτητα πρόσληψης υποστρώματος 0-10% σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου). Τα μεταλλάγματα S251C, A265C, M291C και A309C έχουν αρχική ταχύτητα 20-40% σε σχέση με το SmLL9(wt) και τα μεταλλάγματα V270C, I274C, T304C, V312C και S417C έχουν περίπου ίδια ή υψηλότερη αρχική ταχύτητα με τον μεταφορέα αγρίου τύπου (100%-140%)(Εικόνα 3.2.13).



Εικόνα 3.2.13 Ενεργότητες μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης του SmLL9. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (1 μM , 25 $^{\circ}\text{C}$). Φαίνονται τα αποτελέσματα από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 10 έως 30sec) και των μεγίστων επιπέδων πρόσληψης που επιτυγχάνονται (από μετρήσεις σε χρόνους 1 έως 10min). Σε κάθε περίπτωση, αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που εκφράζουν τον SmLL9 αγρίου τύπου. Παρουσιάζονται μέσοι όροι των τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Όσα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης ήταν ενεργά ελέγχθηκαν και ως προς την επίδραση του αλκυλιωτικού αντιδραστήριου NEM (Εικόνα 3.2.14). Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της επώασης με 2mM NEM στην ενεργότητά τους και βρέθηκε ότι τα μεταλλάγματα V270C, I274C, M291C και T304C διατηρούν τα ίδια επίπεδα ενεργότητας παρουσία ή απουσία NEM. Αντίθετα τα μεταλλάγματα A265C, A309C και V312C απενεργοποιούνται πλήρως από το NEM και τα S251C και S417C διατηρούν μόνο το 30-40% της αρχικής τους ταχύτητας μετά την επώαση με το αλκυλιωτικό αντιδραστήριο (Εικόνα 3.2.14). Είναι ενδιαφέρον ότι οι πέντε αντίστοιχες θέσεις μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από το NEM και στον XanQ, ενώ τα αντίστοιχα μεταλλάγματα στις υπόλοιπες τέσσερις θέσεις δεν επηρεάζονται

από το NEM ούτε στον XanQ (Mermelekas *et al.*, 2010; Karatza *et al.*, 2006; Parakostas *et al.*, 2008).

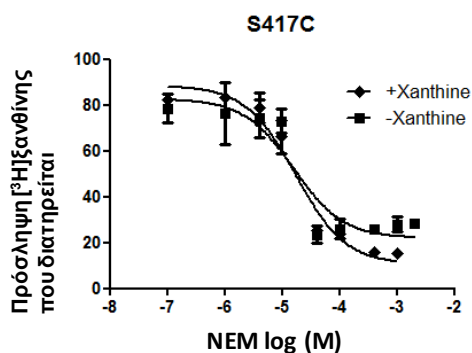
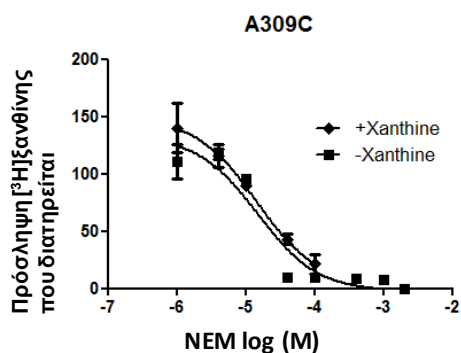
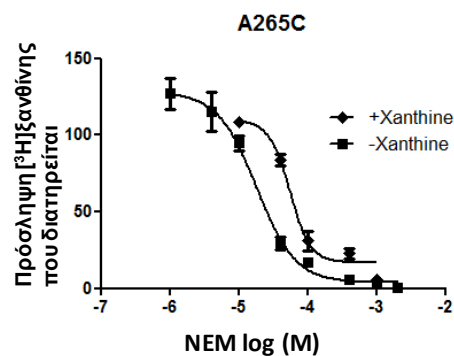


Εικόνα 3.2.14 Ενεργότητα μεταφοράς [³H]ξανθίνης μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης του SmLL9 που απομένει μετά από επώαση με 2mM NEM. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από επώαση με 2mM NEM (10min, 25°C) ή αντίστοιχη επώαση απουσία NEM. Φαίνονται οι μέσοι όροι από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 5 έως 20sec). Σε κάθε περίπτωση, αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν επώαστηκαν με το NEM. Παρουσιάζονται μεσοί όροι των τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η ευαισθησία των μεταλλαγμάτων αυτών στην απενεργοποίηση από το NEM, προχωρήσαμε σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήσαμε ένα εύρος συγκεντρώσεων του αντιδραστηρίου έτσι ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση εκείνη του NEM που μειώνει την ενεργότητα των μεταλλαγμάτων αυτών στο μισό (IC₅₀) και στη συνέχεια για τα μεταλλάγματα τα οποία έχουν υψηλή ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα παρουσία υποστρώματος (ξανθίνη).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μεταλλάγματα S251C και V312C έχουν μικρότερη ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM καθώς το IC₅₀ είναι 81.7 και 136μM αντίστοιχα. Αντίθετα, τα μεταλλάγματα A265C, A309C και S417C εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το αλκυλιωτικό αντιδραστήριο με IC₅₀ περίπου στα 15μM (16.5, 17.6 και 12.8μM, αντίστοιχα). Τα δύο από αυτά, A309C και S417C, διατηρούν την ίδια ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM ακόμη και παρουσία ξανθίνης (1mM). Το A265C, όμως, εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στην αλκυλίωση από το NEM παρουσία του υποστρώματος καθώς το IC₅₀ αυξάνεται 3 φορές (από 16.5μM φτάνει στα 55.8μM παρουσία ξανθίνης) (Εικόνα 3.2.15).

Μετάλλαγμα SmLL9	IC ₅₀ NEM (μM)	IC ₅₀ NEM και ξανθίνη (μM)
S251C	81.7	-
A265C	16.5	55.8
A309C	17.6	14.5
V312C	136.0	-
S417C	12.8	17.6



Εικόνα 3.2.15 Ευαισθησία μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης του SmLL9 σε απενεργοποίηση από το NEM παρουσία και απουσία ξανθίνης. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από επώαση NEM (1μM-1mM, 10min) απουσία (τετράγωνα) ή παρουσία ξανθίνης σε συγκέντρωση 1mM (ρόμβοι). Σε κάθε περίπτωση, από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (που μετριοούνται σε 10-20 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται στο σχήμα για κάθε πειραματικό σημείο προέρχονται από τα διπλά δείγματα κάθε πειράματος. Ο υπολογισμός των IC₅₀ έγινε με το πρόγραμμα Prism6 και οι τιμές που δίνονται στον πίνακα επάνω αριστερά είναι μέσοι όροι από δύο πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <20%.

3.2.5 Το μετάλλαγμα S93N αναγνωρίζει με πολύ μικρότερη συγγένεια το ουρικό οξύ σε σχέση με τον SmLL9 αγρίου τύπου

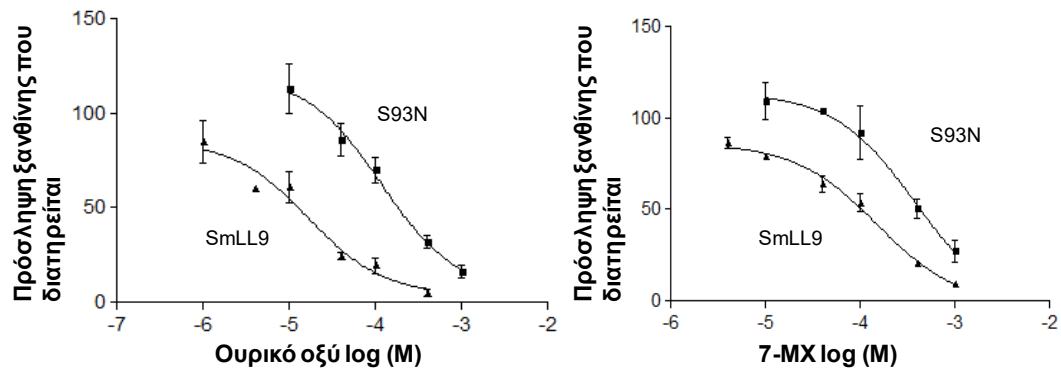
Όσα μεταλλάγματα έχουν αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης πάνω από 10% σε σχέση με αυτήν του SmLL9 υποβλήθηκαν επίσης σε πειράματα ανταγωνισμού από άλλες φυσικές πουρίνες ή συνθετικά ανάλογα πουρινών. Επειδή, όπως αναφέρθηκε (Κεφ. 3.3.1) ο μεταφορέας SmLL9 αναγνωρίζει ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου σε αντίθεση με τον XanQ, επικεντρωθήκαμε κυρίως στη μελέτη του εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιώντας ανάλογα ξανθίνης που διαφέρουν σε αυτές τις θέσεις συγκεκριμένα ουρικό οξύ (8-οξοξανθίνη), 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.2, τα μεταλλάγματα H31N, H31Q και D266E αναγνωρίζουν το ουρικό οξύ με αρκετά μικρότερη συγγένεια (IC_{50} 40-55 μ M) από ό,τι ο SmLL9(wt) (IC_{50} 16.5 μ M) ενώ τα μεταλλάγματα I274C (IC_{50} 6.0 μ M), I274S (IC_{50} 5.2 μ M) και A309C (IC_{50} 5.1 μ M) το αναγνωρίζουν 3 περίπου φορές ισχυρότερα. Κανένα μετάλλαγμα δεν χάνει εντελώς την αναγνώριση του ουρικού οξέος. Ωστόσο, το μετάλλαγμα S93N έχει πολύ μειωμένη ικανότητα αναγνώρισης του ουρικού (IC_{50} 130 μ M) κατά 7.9 φορές μικρότερη σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου (Πίνακας 3.2.2, Εικόνα 3.2.15). Τα υπόλοιπα μεταλλάγματα έχουν παρόμοια συγγένεια για το ουρικό οξύ με τον μεταφορέα αγρίου τύπου. Επίσης, το S93N (Εικόνα 3.2.16) εμφανίζει σημαντικά μειωμένη ικανότητα αναγνώρισης της 7-μεθυλοξανθίνης (IC_{50} 250 μ M) σε σχέση με τον SmLL9(wt) (IC_{50} 183.7 μ M) (Εικόνα 3.2.15), καθώς επίσης και το μετάλλαγμα H31Q (IC_{50} 326 μ M) ενώ τα H31N, A265C, D266E και A309G αναγνωρίζουν την 7-μεθυλοξανθίνη ισχυρότερα (IC_{50} 25-60 μ M). Τα υπόλοιπα μεταλλάγματα δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου. Τέλος ως προς την αναγνώριση της 8-μεθυλοξανθίνης τα μεταλλάγματα S251V και D266E την αναγνωρίζουν ισχυρότερα (IC_{50} 61.9 και 61.5 μ M αντίστοιχα) ενώ τα H31N, H31Q, S93N, V270T, A309C, A309G, V312C και S417C την αναγνωρίζουν με πολύ χαμηλή συγγένεια (IC_{50} 350-800 μ M) σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου SmLL9 (IC_{50} 200 μ M) και προσομοιάζουν περισσότερο με τον XanQ(wt) που δεν αναγνωρίζει την 8-μεθυλοξανθίνη καθόλου ($K_i > 1$ mM) (Πίνακας 3.2.2).

Πίνακας τιμών IC₅₀ των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα SmLL9

Μετάλλαγμα	Ουρικό οξύ	7-μεθυλοξανθίνη	8-μεθυλοξανθίνη
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
SmLL9(wt)	16.5	183.7	200.0
H31N	48.1	<u>57.9</u>	355.7
H31Q	51.4	326	≈800
S93N	129.5	249.5	580
S251C	11.2	113.9	123.1
S251V	8.8	136.0	61.9
A265C	54.8	<u>57.1</u>	217.3
A265G	6.2	103.5	338.2
D266E	39.8	<u>24.3</u>	<u>61.5</u>
V270C	13.3	109.0	110.8
V270T	13.6	174.3	355.3
I274C	<u>6.0</u>	227.6	196.4
I274S	<u>5.2</u>	132.6	186.8
T304C	20.2	117.3	284.2
A309C	<u>5.1</u>	183.7	395.0
A309G	19.4	<u>47.1</u>	453
A309S	8.5	150.8	200.9
V312C	22.6	205.6	751.2
S417C	9.8	126.9	370.6
S417N	16.2	110.8	101.2

Πίνακας 3.2.2 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα SmLL9. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1μM, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1μM-1mM, 5min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-20 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism6. Οι τιμές που δίνονται αντιστοιχούν σε μέσους όρους από δύο ανεξάρτητα πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <20%.



Εικόνα 3.2.16 Ανταγωνισμός πρόσληψης [^3H] ξανθίνης από ουρικό οξύ και 7-μεθυλοξανθίνη στο μετάλλαγμα S93N. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης 1 μM για 10sec μετά από έκθεση σε μη σημασμένο ουρικό οξύ ή 7-μεθυλοξανθίνη (10 μM έως 1mM, 5min). Έγινε προσαρμογή των δεδομένων στις κατάλληλες εξισώσεις με χρήση του προγράμματος Prism6 όπως παρουσιάζονται στα αντίστοιχα γραφήματα. Οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται στα σχήματα για κάθε πειραματικό σημείο προέρχονται από διπλά δείγματα. Οι αντίστοιχες τιμές IC_{50} που προκύπτουν δίνονται στον Πίνακα 3.2.2 και είναι μέσοι όροι από δύο ανεξάρτητα πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <20%.

3.2.6 Οι θέσεις γύρω από το κέντρο δέσμευσης στον μεταφορέα SmLL9 έχουν παρόμοιο ρόλο με τις αντίστοιχες θέσεις άλλων ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης ή ουρικού οξέος

Από τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης στο μεταφορέα SmLL9 προκύπτει ότι σε σχέση με τα αποτελέσματα για τους ομόλογους μεταφορείς (ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος) XanQ, UapA και UacT, που ήταν γνωστά από τη βιβλιογραφία, παρατηρούμε εν γένει συντήρηση του ρόλου των διαφόρων καταλοίπων που μελετήθηκαν αλλά και επιμέρους διαφορές. Η σύγκριση για τις πιο σημαντικές θέσεις παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 3.2.17. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα αμινοξέα στις θέσεις E262, D290, Q310 και N311 είναι αναντικατάστατα στον μεταφορέα SmLL9 όπως και στους μεταφορείς ξανθίνης XanQ (Mermelekas *et al.*, 2010; Karatza *et al.*, 2006), ουρικού οξέος UacT (Papakostas and Frillingos, 2012), ουρικού οξέος και ξανθίνης UapA (Papageorgiou *et al.*, 2008).

Για την θέση H31 (TM1) στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ έχει βρεθεί ότι απαιτείται πολικό αμινοξύ και φαίνεται ότι η θέση αυτή συμμετέχει σε έναν σημαντικό δεσμό υδρογόνου που χρειάζεται για την αναγνώριση του υποστρώματος με υψηλή συγγένεια (Karena and Frillingos, 2009), στον μεταφορέα ουρικού οξέος UacT (H37) είναι αναντικατάστατη (Papakostas and Frillingos, 2012) και στον μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού οξέος UapA (H86) υπόκειται επίσης σε περιορισμούς, οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με τη δομική σταθερότητα του μορίου στη μεμβράνη και την σωστή υποκυτταρική του στόχευση/κατανομή μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες σημαντικές περιοχές του μορίου (Amillis *et al.*, 2011; Papageorgiou *et al.*, 2008; Pantazopoulou and Diallinas, 2006). Στον SmLL9, βρήκαμε και πάλι ότι η θέση αυτή (H31) απαιτείται πολικό αμινοξύ και οι αντικαταστάσεις της His σε Gln ή Asn οδηγούν σε αλλαγή του προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα (ιδίως με την H31Q) περιορίζεται η αναγνώριση ουρικού οξέος, 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης, ανάλογα τα οποία ο μεταφορέας αγρίου τύπου αναγνωρίζει ισχυρά. Όπως μπορούμε να προβλέψουμε σήμερα με βάση τα διαθέσιμα δομικά μοντέλα (Lu *et al.*, 2011; Alquel *et al.*, 2016) φαίνεται ότι η H31 (TM1) σχηματίζει ένα σημαντικό δεσμό υδρογόνου με την N311 (TM10) (N325 στον XanQ) που βρίσκεται δίπλα από το αμινοξύ Q310 που συμμετέχει απευθείας στην πρόσδεση υποστρώματος στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης. Αυτή η δομική οργάνωση εξηγεί σε μεγάλο βαθμό όλες τις προηγούμενες λειτουργικές παρατηρήσεις.

Η θέση D276 (TM8) στον μεταφορέα XanQ απαιτεί καρβοξυλομάδα για να διατηρούνται υψηλά επίπεδα ενεργότητας ενώ ακόμη και το ενεργό μετάλλαγμα D276E διαφέρει σημαντικά στο προφίλ εξειδίκευσης (Mermelekas *et al.*, 2010) αλλά και στο προφίλ της εξάρτησης της ενεργότητας από το pH (όπως αναλύεται στο Κεφ. 3.6 των Αποτελεσμάτων στην παρούσα Διατριβή). Αντίστοιχα, και στον SmLL9 η θέση αυτή (D266) επιτρέπει μόνο καρβοξυλομάδα

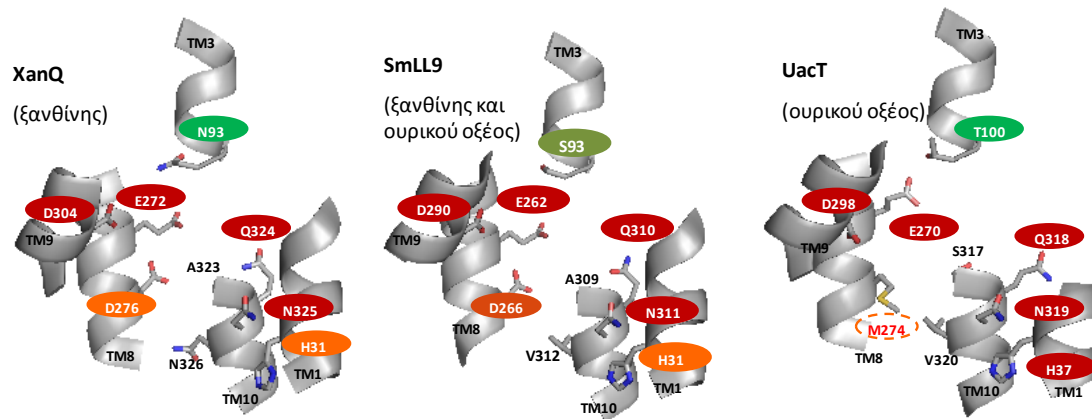
αν και η ενεργότητα που διατηρείται με το μετάλλαγμα D266E είναι μικρή (αρχική ταχύτητα <20%) και η καρβοξυλομάδα του Asp φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σημασία για τον μηχανισμό στον SmLL9. Από την άλλη πλευρά, το Asp δεν συντηρείται μεταξύ άλλων ομολόγων της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος του COG2233 και, ιδιαίτερα, σε μεταφορείς που έχουν εξειδίκευση για το ουρικό οξύ, υπάρχει υδρόφοβο αμινοξύ (M, V). Στον UacT η θέση αυτή (M274) υπόκειται σε περιορισμούς που μπορεί να συνδέονται με την εξασφάλιση της δομικής σταθερότητας του μορίου καθώς η αντικατάσταση M274D οδηγεί σε αδυναμία ανίχνευσης πρωτεϊνικών επιπέδων στην μεμβράνη (Papakostas and Frillingos, 2012). Πιθανόν αυτό να σχετίζεται με μια σημαντική υδρόφοβη αλληλεπίδραση με τη θέση V320 της TM10 (Papakostas and Frillingos, 2012) (βλ. Εικόνα 3.2.17)

Με σημαντική επίπτωση στην εξειδίκευση έχει συσχετισθεί η θέση N93 (TM3) στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ ειδικά όταν αντικαθίσταται με μικρότερο αμινοξύ, καθώς τα μεταλλάγματα N93A και N93S επιτρέπουν αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης που δεν μεταφέρονται από τον αγρίου τύπου XanQ (ιδίως 8-μεθυλοξανθίνη και ουρικό οξύ) και έχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα ενεργότητας μεταφοράς για το ουρικό οξύ (Karena and Frillingos, 2009). Στους ομόλογους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος η θέση αυτή συντηρείται πάντα ως πολικό αμινοξύ αλλά με διαφορετική πλευρική ομάδα (Asn, Thr, Ser) και, μάλιστα, στους μεταφορείς διπλής εξειδίκευσης συντηρείται ως Ser. Η αλλαγή της αντίστοιχης T100 στον μεταφορέα ουρικού οξέος UacT σε Ala (ή Ser) μετατρέπει τον UacT σε διπλής εξειδίκευσης μεταφορέα, ξανθίνης και ουρικού οξέος (Papakostas and Frillingos, 2012). Στους μεταφορείς διπλής εξειδίκευσης (SmLL9, UapA) η αντικατάσταση της Ser δεν αναιρεί την μεταφορά του ενός εκ των δύο υποστρωμάτων αλλά φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την σχετική ικανότητα αναγνώρισης του ενός από τα δύο. Στον SmLL9 το μετάλλαγμα S93N έχει κατά 7.9 φορές μειωμένη την ικανότητα αναγνώρισης του ουρικού οξέος (και κατά 2.9 φορές μειωμένη ικανότητα αναγνώρισης της 8-μεθυλοξανθίνης βλ. Πίνακα 3.2.2) και στον UapA η αλλαγή σε Ala αυξάνει την συγγένεια για την ξανθίνη αλλάζοντας την προτίμηση του διπλής εξειδίκευσης μεταφορέα χωρίς να καταργείται η μεταφορά ενός εκ των δύο υποστρωμάτων (Amillis *et al.*, 2011). Άρα, η θέση αυτή στην TM3 φαίνεται να σχετίζεται, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, με την εξειδίκευση αναγνώρισης υποκαταστάσεων στη θέση 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ξανθίνης.

Τέλος, σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα από την μελέτη του μεταφορέα SmLL9 με κυστεϊνική σάρωση και η επίδραση αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων (NEM) παρουσία ή απουσία υποστρώματος, σε σχέση με τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ που έχει μελετηθεί με αντίστοιχο τρόπο. Όπως είδαμε, οι θέσεις S251, A265, A309, V312 και S417 του μεταφορέα SmLL9 είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από το NEM ($IC_{50} < 150\mu M$) όπως και οι αντίστοιχες θέσεις στον

μεταφορέα ξανθίνης XanQ (Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010; Karatza *et al.*, 2006). Η θέση του SmLL9 A265 (TM8) όταν αντικατασταθεί από Cys έχει υψηλή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM (IC₅₀ 16.5μM) όπως και το αντίστοιχο μετάλλαγμα στον XanQ (G275C με IC₅₀ 14.5μM). Παρουσία όμως ξανθίνης στον XanQ παρατηρείται επιπλέον αύξηση της ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM (το IC₅₀ μειώνεται σε 7.9μM) (Mermelekas *et al.*, 2010) ενώ στην περίπτωση το SmLL9 έχουμε μερική προστασία από το υποστρώμα. Προστασία από το NEM παρουσία υποστρώματος έχει βρεθεί για την θέση N325 του XanQ, γεγονός που είχε υποδείξει ότι η θέση αυτή μπορεί να βρίσκεται στην περιοχή του κέντρου δέσμησης (Georgoroulou *et al.*, 2010), αλλά το αντίστοιχο μετάλλαγμα τόσο στον XanQ όσο και στον SmLL9 έχει μηδενικά επίπεδα ενεργότητας και πειράματα επίδρασης του NEM στην ενεργότητα δεν μπορούν να γίνουν για τη θέση αυτή. Αντίστοιχο φαινόμενο με την θέση G275 στον XanQ έχουμε και στην θέση A323 (Georgoroulou *et al.*, 2010), στην αρχή του μοτίβου «υπογραφή» της οικογένειας. Ωστόσο, στην περίπτωση του SmLL9 η ευαισθησία σε NEM του αντίστοιχου μεταλλάγματος (A309C) (IC₅₀ 17.6μM) δεν αλλάζει παρουσία υποστρώματος (ξανθίνης), αντίθετα με το A323C του XanQ που από IC₅₀ 34μM αλλάζει σε 14μM. Βλέπουμε λοιπόν ότι η ευαισθησία σε NEM των διαφόρων θέσεων του SmLL9 γύρω από το κέντρο δέσμησης είναι παρόμοια με αυτήν των αντίστοιχων του XanQ αλλά η επίδραση του υποστρώματος (ξανθίνη) είναι διαφορετική σε κάθε περίπτωση.

Οι μικρές αυτές λειτουργικές διαφορές των επιμέρους θέσεων γύρω από το προβλεπόμενο κέντρο δέσμησης των μεταφορέων ίσως να είναι η βάση της διαφορετικής εξειδίκευσης που παρουσιάζουν. Ένας ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέας όπως ο SmLL9 χρειάζεται να έχει μια μεγαλύτερη «ευελιξία» στο κέντρο δέσμησης σε σχέση παραδείγματος χάρη με τον μεταφορέα μόνο ξανθίνης XanQ, ο οποίος αναγνωρίζει μόνο ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 2, 3 και 6 ενώ ο μεταφορέας SmLL9 εκτός αυτών αναγνωρίζει και τροποποιημένα ανάλογα στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου (Εικόνα 3.3.3). Αυτή η μεγαλύτερη «ευελιξία» μπορεί να εξασφαλίζεται τόσο με την ύπαρξη μικρότερων πλευρικών ομάδων σε θέσεις-κλειδιά (όπως η Ser-93 του TM3) όσο και με τη διαφορετική ευαισθησία των θέσεων αυτών σε αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο (όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα με το NEM για τις θέσεις Ala-265 του TM8 και Ala-309 του TM10).



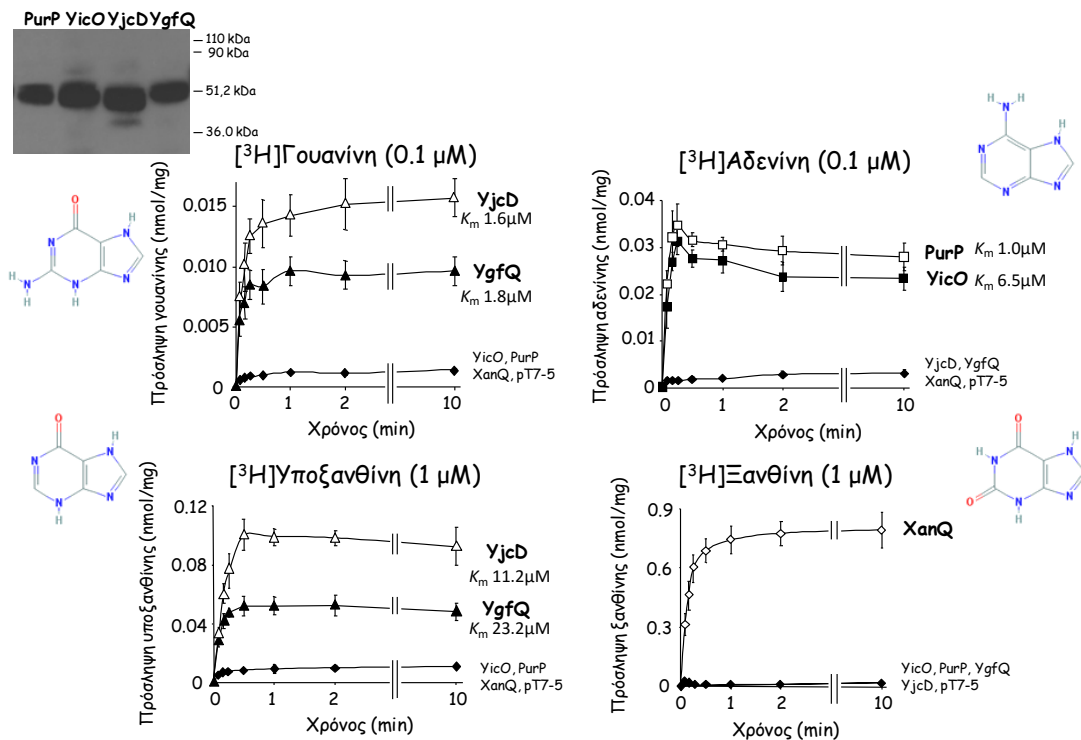
Εικόνα 3.2.17 Σύγκριση των δομικών μοντέλων των μεταφορέων SmLL9, XanQ και UacT στην προβλεπόμενη περιοχή του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος. Οι αλληλουχίες των μεταφορέων μοντελοποιήθηκαν με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA με την χρήση του SWISSPROT modeling server. Τα δομικά μοντέλα οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα PyMOL και τονίζονται πέντε έλικες που περιλαμβάνουν τα κατάλοιπα υπεύθυνα για την δέσμευση του υποστρώματος και οι οποίες βρίσκονται γύρω από το υπόστρωμα σύμφωνα με την δομή του UraA. Πρόκειται για τις TM1, TM3, TM8, TM9 και TM10 (γκρι). Με κόκκινο συμβολίζονται τα αναντικατάστατα κατάλοιπα, με πορτοκαλί οι θέσεις που υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή τους, μαύρο ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από NEM και πράσινο θέσεις οι αντικαταστάσεις των οποίων αλλάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα. Η θέση M274 στον UacT που φαίνεται με πορτοκαλί κύκλο με διακεκομμένη γραμμή πιθανό να σχετίζεται με τη δομική σταθερότητα του μεταφορέα στη μεμβράνη.

3.3 Μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2252 της *Escherichia coli* K-12

3.3.1 Ο PurP μεταφέρει αδενίνη και ο YjcD υποξανθίνη/γουανίνη

Αρχικά τα τέσσερα γονίδια COG2252 της *Escherichia coli* K-12 (*purP*, *yicO*, *yjcD*, *ygfQ*) (βλ. Ενότητα 3.1) κλωνοποιήθηκαν με PCR από το γονιδιωματικό DNA του βακτηρίου και στην συνέχεια ακολούθησε η ένθεσή τους στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5. Το πλασμίδιο αυτό φέρει τον υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ* p/o) μέσω του οποίου γίνεται δυνατή η υπερέκφραση του μεταφορέα με την χρήση του IPTG. Μετά τον μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* [T184 για ξανθίνη, JW3692 ($\Delta purP$) για αδενίνη και υποξανθίνη, JW4025 ($\Delta yjcD$) για γουανίνη, (βλ. Μέθοδοι Κεφ. 2.7)] ακολούθησε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των μεταφορέων αυτών στην μεμβράνη με ανοσοαποτύπωση Western και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς πουρινών. Τόσο ο PurP όσο και οι άλλοι τρεις μεταφορείς YicO, YjcD και YgfQ εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα έκφρασης την μεμβράνη και η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς πουρινών αποκάλυψε ότι ο PurP και ο YicO είναι μεταφορείς αδενίνης με K_m 1.0 μ M και 6.5 μ M, αντίστοιχα, ενώ ο YjcD και ο YgfQ είναι μεταφορείς υποξανθίνης με K_m 11.2 μ M και 23.2 μ M, αντίστοιχα και γουανίνης με K_m 1.6 μ M και 1.8 μ M, αντίστοιχα (Εικόνα 3.3.1).

Η μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων αυτών (Εικόνα 3.3.2) με πειράματα ανταγωνισμού έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταφορέων αδενίνης PurP και YicO έναντι των μεταφορέων υποξανθίνης/γουανίνης YjcD και YgfQ, καθώς το προφίλ εξειδίκευσής τους δεν εμφανίζει επικαλύψεις. Ο PurP αναγνωρίζει ανάλογα αδενίνης τροποποιημένα στις θέσεις 2 και 6 ενώ ο YjcD αναγνωρίζει ανάλογα υποξανθίνης ή γουανίνης τροποποιημένα στις θέσεις 1, 2, 6 και στη θέση 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Παρόμοια εικόνα με τον PurP και YjcD δίνουν ο YicO και ο YgfQ, αντίστοιχα (Papakostas *et al.*, 2013). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι ο μεταφορέας PurP (αλλά και ο YicO) αναγνωρίζει την υποξανθίνη αλλά δεν την μεταφέρει (Papakostas *et al.*, 2013).

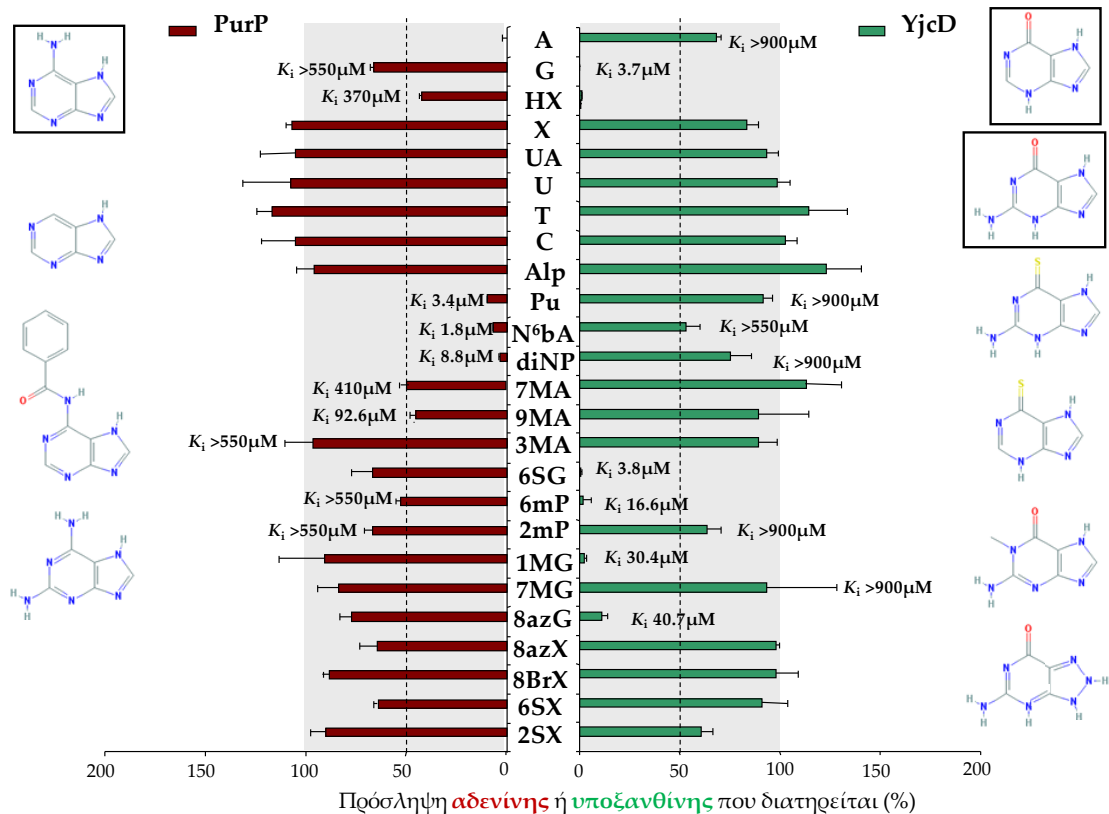


Εικόνα 3.3.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταφορέων PurP, YicO, YgfQ και YjcD της *Escherichia coli* K-12. Η αλληλουχία των αντίστοιχων περμεασών απομονώθηκε από το γονιδίωμα και εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/NCSgene-BAD υπό τον υποκινητή *lacZ* p/o μέσω του οποίου γίνεται υπερέκφραση. (Επάνω) Από κύτταρα *E.coli* JW3692 που φέρουν τα αντίστοιχα πλασμίδια και έχουν επαχθεί για την έκφραση των περμεασών απομονώθηκαν κλάσματα μεμβρανών και 100μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση Western με την χρήση του συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αρραίωση 1:50000. (Κάτω) Με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μετασηματίστηκαν κύτταρα *E.coli* JW3692 (αδενίνη, υποξανθίνη), JW4025 (γουανίνη) ή T184 (ξανθίνη) και χρησιμοποιήθηκαν στα αντίστοιχα πειράματα ενεργού μεταφοράς υποστρωμάτων. Δίνονται και οι τυπικές αποκλίσεις από τουλάχιστον τρία πειράματα. Στην περίπτωση της ξανθίνης χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα θετικού ελέγχου ο XanQ.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταφορέων της *E.coli* K-12 που ανήκουν στην ομάδα COG2252 ανέδειξε δύο ιδιαίτερα σημαντικά στοιχεία σε ό,τι αφορά την μελέτη των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Πρώτον, υπάρχει ένας σαφής διαχωρισμός στην εξειδίκευση των μεταφορέων της *E.coli*, καθώς το εντεροβακτήριο αυτό φέρει δύο μεταφορείς αδενίνης και δύο που μεταφέρουν υποξανθίνη και γουανίνη. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όσοι μεταφορείς της ομάδας αυτής έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά έως σήμερα έχουν ευρύτερη εξειδίκευση (για αδενίνη, γουανίνη και υποξανθίνη) όπως ο AzgA από τον *Aspergillus nidulans* (Cecchetto *et al.*, 2004), τα ομόλογα AtAzg1 και AtAzg2 του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Mansfield *et al.*, 2009) ή ακόμη και βακτηριακά ομόλογα όπως οι δυο μεταφορείς bbb22 και bbb23 από το παθογόνο βακτήριο *Borrelia burgdorferi* (Jain *et al.*, 2015). Δεύτερον, το προφίλ εξειδίκευσης των δυο ζευγών μεταφορέων COG2252 της *E.coli* (PurP/YicO και YjcD/YgfQ) δεν έχει καμία αλληλεπικάλυψη, παρά το γεγονός ότι έχουν υψηλά ποσοστά ταυτότητας μεταξύ τους. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα του λειτουργικού

χαρακτηρισμού οι μεταφορείς COG2252 της *E.coli* K-12 μετονομάστηκαν σε AdeP (PurP), AdeQ (YicO), GhxP (YjcD) και GhxQ (YgfQ) (Papakostas et al., 2013) και με τα ονόματα αυτά αναφέρονται πλέον στις βάσεις δεδομένων (βλ. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>; <http://www.ecogene.org>; <http://ecocyc.org>).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί διεξοδικότερα ποιά αμινοξικά κατάλοιπα είναι υπεύθυνα για αυτές τις σημαντικές διαφορές στην λειτουργία των μεταφορέων της υποομάδας COG2252 της *E.coli* και για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν οι μεταφορείς PurP (αδενίνης) και YjcD (γουανίνης/υποξανθίνης). Οι δυο αυτοί μεταφορείς φαίνεται να είναι οι κύριοι μεταφορείς της *E.coli* για την μεταφορά αδενίνης και γουανίνης, αντίστοιχα, και εκφράζονται στις αερόβιες συνθήκες αύξησης της *E.coli* K-12 όπως έχει φανεί με πειράματα RT-qPCR (Papakostas et al., 2013). Ως επιπρόσθετη υποστήριξη αυτής της πρότασης, η φυσιολογική λειτουργία των δύο αυτών ομολόγων (PurP, YjcD) έχει συσχετισθεί με τον μεταβολισμό των πουρινών σε επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης καθώς συμμετέχουν και τα δύο στο σύνολο των γονιδίων που ελέγχονται ρυθμιστικά από τον μεταγραφικό παράγοντα PurR (PurR regulon) (Cho et al., 2011; Marbach et al., 2012). Επίσης, υπάρχει η γενετική συσχέτιση του PurP με την εξάρτηση της *E. coli* K-12 από αδενίνη ως πηγή αζώτου (Burton, 1994) και ο YjcD έχει πρόσφατα αναδειχθεί, από γενετικές μελέτες, ότι είναι ο βασικός μεταφορέας που επιτρέπει την είσοδο στην *E. coli* μιας σειράς κυτταροτοξικών αναλόγων γουανίνης (μεταξύ των οποίων και η 6-μερκαπτοπουρίνη) (Kozmin et al., 2013).



Εικόνα 3.3.2 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων PurP και YjcD. Κύτταρα *E.coli* ΔpurP που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] αδενίνης 0.1 μM , 25 °C ή υποξανθίνης 1 μM , 25 °C (στην περίπτωση του YjcD) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (0.6mM, 5min για την αδενίνη και 1mM, 5min για την υποξανθίνη). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-15 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔpurP με κενό φορέα pT7-5) και παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες (μέσοι όροι τριών πειραμάτων με S.D. <15%) (Papakostas *et al.*, 2013)

3.3.2 Επιλογή στόχων μεταλλαξιγένεσης

Με βάση την στοίχιση όλων των λειτουργικά χαρακτηρισμένων ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2, τόσο της ομάδας COG2233 όσο και της ομάδας COG2252 (Εικόνα 3.3.3), βρέθηκε ότι στις θέσεις που υπάρχουν σημαντικά κατάλοιπα για την λειτουργία του μεταφορέα XanQ (COG2233), που είναι εξελικτικά συντηρημένα στους μεταφορείς αυτούς και συγκροτούν σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του UraA την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, στην ομάδα COG2252 συντηρούνται στις άλλα αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 3.3.4). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τις θέσεις H31, N93, E272, D276, D304, A323, Q324 και N325 (με βάση την αρίθμηση στον μεταφορέα XanQ) στις οποίες οι μεταφορείς PurP και YjcD (και οι δύο) έχουν Thr, Ala, Asp, Thr, Asp, Ile, Glu και Ser αντίστοιχα. Πειράματα μεταλλαξιγένεσης έχουν υποδείξει ότι τα αντίστοιχα κατάλοιπα στον XanQ είναι αναντικατάστατα για την λειτουργία του μεταφορέα XanQ ή επηρεάζουν το προφίλ εξειδίκευσής του ή/και την συγγένεια δέσμευσης του υποστρώματος (Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Σε αυτές τις θέσεις προχωρήσαμε σε μεταλλαξιγένεση στους μεταφορείς PurP και YjcD κάνοντας συντηρητικές αλλαγές στις θέσεις αυτές ή/και αλλάζοντας το εγγενές αμινοξύ σε αλανίνη (A) ή χαρακτηριστικά αμινοξέα που συντηρούνται στην ομάδα COG2233 (Εικόνα 3.3.4). Με αυτή την λογική έγιναν για το PurP οι κατασκευές T38A και T38H (στην θέση H31), A91G και A91S (N93), D267A, D267E και D267N (E272), T271A, T271D, T271N και T271S (D276), D298E και D298N (D304), I317A και I317E (A323), E318D και E318Q (Q324) S319A και S319N (N325). Αντίστοιχα για το YjcD οι κατασκευές T35A και T35H (στην θέση H31), A88G και A88S (N93), D271A, D271E και D271N (E272), T275A, T275D, T275N και T275S (D276), D302E και D302N (D304), I321A και I321E (A323), E322D και E322Q (Q324) S323A και S323N (N325).

α14

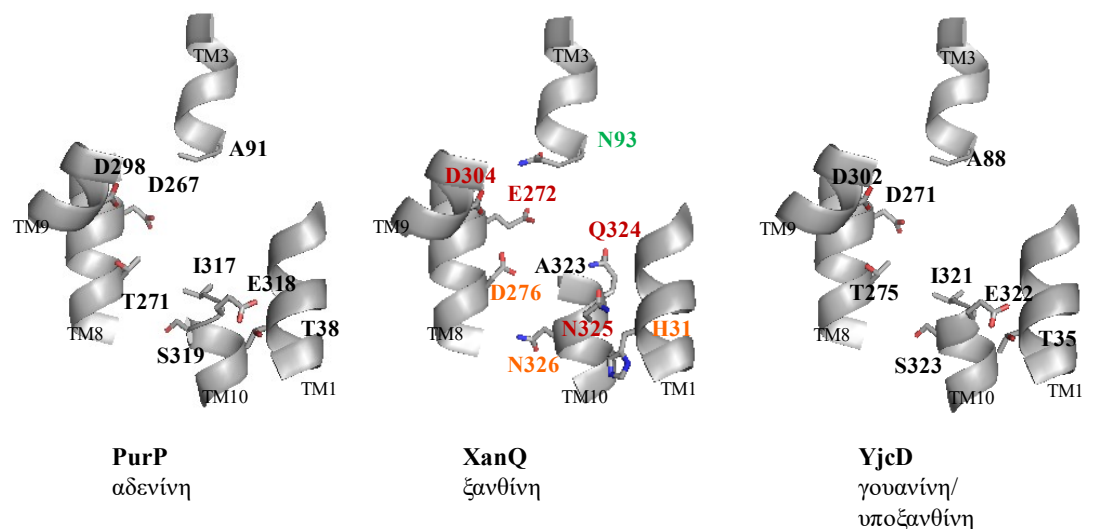
AzgA	//////////////////ADLIALLSYI LING-----GVWIVAKLTGGRI SPFNREEHEP-----WTKIPGGFF-PFWLVRVAVHGKDPVRAEDDANDLS LGVM	554
SmYE1	//////////////////ITLALSIAIAFVMMK LALGVSEVKPVMVFVAVLAAMLVMQ-----VQ-----	466
YjcD	//////////////////IVTSMIMIFATLVIGRLVSGEWKRLNIGTVV IAAALVT--F--YAGG-----WAI-----	449
YgfQ	//////////////////IVTSMIMLFSVTLVGRVFAREWQKLNIGTVI ITAALVA--F--YAGG-----WAI-----	455
SmVC3	//////////////////IANKLAFFSVSVVVKVCTGKWNVIHPATQLVAALFIVRFAP--FAE-----	457
PurP	//////////////////ITETALRFISYCVMKIGTGRRLDLSPCVVI IVALLFILKI VF--IDAH-----	445
YicO	//////////////////ITETALRFMSYCIKMKVCTGRWRDLNLCVVVVAALFALKI IL--VD-----	444
UraA	-----KVNIGAAELKGMALATI VGI GLS LIF--K LIS-----VLRPEEVLDAEDADI TDK-----	429
RutG	-----ALTLGGFT LGG IGTATFGAI LLNALLSRKLV D-----VPPPE-VVHQEP-----	442
SmWQ0	-----PPWSQMILANG LAAGTI TAVIVNAFF QHLPL-----EQFQEKCAAVFRPE-----	449
SmLL9	-----PAWVEPIFHSGLSSAALMAI SLNLIFFNHMTA-----GNSDQSVFVAGTERTLRVQDIARLHDGDYFLNGKLYDANGTEVPVLAEEAH-----	490
UacT	-----PAVLQPLLSHGLMLATLSAVVIVNFFNGYQH-----HADLVKESV-----SRDKLVKRVTRMVLIMRKLKQNEHGE-----	482
SmLL8	-----PHAIHPITESSGLVLAARVAVVIAFFNGLSI-----ERSACVEEA-----RLADGH-----	494
SmX28	-----PEFIDRFPHSGVIVGTFSAVLLNLFNVPF-----REEVQ--PD-----LIGEGAMRHFG-----	463
UapA	-----ENRDLLEGFENAIELVETGFVATFVAMLLNAINMPAEVE-----EIGAVT EMPVSAHD--NRDGEAE-----YQ-SKQA-----	574
UapC	GDNHLEGLLQAVEIWMANGFAVTGFLGLLNLLPEDME-----EDVVEEEDYEATTVGMQGGSE-----PGSSCQNVKA-----	580
XanQ	-----PASIVLVNPIICAGGLTAI LNLN IILPGGYR-----QENVLPGITSAEE--MD-----	466
XanP	-----PEWLNLLSSGIAAGGITAI VLNLIFFPPEKQ-----	463
.		
AzgA	PHGSLSSQDRAGEKLASKEQVTEK	580
SmYE1	-----	
YjcD	-----	
YgfQ	-----	
SmVC3	-----	
PurP	-----	
YicO	-----	
UraA	-----	
RutG	-----	
SmWQ0	-----	
SmLL9	-----	
UacT	-----	
SmLL8	-----	
SmX28	-----	
UapA	-----	
UapC	-----	
XanQ	-----	
XanP	-----	

Εικόνα 3.3.3 Στοιχισή των αλληλουχιών ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2. Οι αλληλουχίες των μελών της οικογένειας NAT/NCS2 στοιχίστηκαν με το πρόγραμμα ClustalW και η δομική στοιχισή έγινε με το HHpred χρησιμοποιώντας ως βάση την δομή του UraA (PDB ID 3QE7). Η δομική στοιχισή των ομολόγων COG2252 δεν διαφέρει σημαντικά από την στοιχισή των αλληλουχιών με το ClustalW με εξαίρεση τα TM10 και α12-α14 του καρβολυτελικού άκρου. Σε αυτές τις περιοχές χρησιμοποιήθηκε η δομική στοιχισή και οι αλλαγές από την αρχική στοιχισή με το ClustalW σημειώνονται με κάθετες γραμμές. Πάνω από την στοιχισή σημειώνονται με κυλίνδρους οι α-έλικες και με βέλη οι β-κλώνοι. Κατάλοιπα τα οποία συντηρούνται απόλυτα (ή με μία εξαίρεση) στους γνωστές λειτουργίας μεταφορείς της ομάδας COG2233 ή COG2252 τονίζονται με κόκκινο. Σε πλαίσια σημειώνονται οι περιοχές των μοτίβων, με κόκκινο για την ομάδα COG2233 (E-value < e⁻³⁹) και με μπλε για την ομάδα COG2252 (E-value < e⁻²⁹), όπως αυτές προέκυψαν από το πρόγραμμα MEME. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν από τα ομόλογα COG2252 ήταν από την *E.coli* K-12 PurP (P31466), YicO (P31440), YjcD (P0AF52), YgfQ (Q46817), *S.meliloti* 1021 SmVC3 (Q92VC3), SmYE1 (Q92YE1) *A.nidulans* AzgA (Q7Z8R3). Για τα ομόλογα COG2233 χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες *E.coli* K-12 XanQ (P67444), XanP (P0AGM9), UacT (Q46821), UraA (P0AGM7), RutG (P75892), *S.meliloti* 1021 SmLL9 (Q92LL9), SmLL8 (Q92LL8), SmX28 (Q92X28), SmWQ0 (Q92WQ0) *A.nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P48777).

	TM1	TM3	TM8	TM9	TM10		
	38	91	267	271	298	317-318-319	
PurP	GFTTFLA	LAPAMG	FDSSTLIGV	LYVDSIS	YIESSSG	445	15%
YicO	GMTTFLA	LAPAMG	FDSSTLIGV	LYVDSVS	YIESTSG	444	15%
YjcD	GLTTFLA	IGCAIS	FDDATGTTIRAV	LTTDSMS	YIIESSAA6	449	19%
YgfQ	GLTTFLA	IGCAIS	FDDATGTTIRAV	LTTDSVS	YIIESSAA6	455	19%
PbuO	GLTTFLS	IAPGMG	FDDTAGTTLVAV	LLADSSA	YVIESSSG	440	19%
PbuO	GLTTTFL	IAPGMG	FDDTTGTMIGV	LLADSTA	FVIESSSG	432	18%
AzgA	GLATFFA	LAPGMG	LDDATGTTLYSM	YMVDAIF	FVIESSGA6	580	14%
AfAzgA	GLATFFA	LAPGMG	LDDTTGTTLYSM	YMVDAIS	FVIESSGA6	591	16%
AtAzgA1	GTAFTFL	LAPGMG	LDDTTGTTLYSM	FMSDASA	FVIESSSTG	579	16%
AtAzgA2	ATAFTFL	LAPGMG	LDDTTGTVLYTM	YLVDAAGS	FVIESSSG	530	15%
YbbY	GFQWFFF	EGPGL	SNTYGAIRGT	FVATGFM	FVSSIGLL	433	18%
UraA	SLQHFLFA	LGSFA	AGHVGHLVVT	MFANGLS	YGENITGVM	429	100%
PyrP	SLQHFLFA	LGSFA	AGHVGHLVVT	IMGDSVA	YGENITGVL	435	43%
Rut6	GVQHAVA	LGSAA	ANLGLHLKAV	FVGDGLA	YANITGVM	442	38%
XanP	ACQHLLA	QGTSSFN	LDTIGDITAT	VLANGLN	FQQNNGVI	463	25%
XanQ	AITHLLA	QSVNFS	LAVGDDITAT	VLADELV	FQQNNGVI	466	24%
UacT	GLQHVLV	MSVTF	ISMGMFLAL	LRVDELG	FQQNNGVL	482	27%
PbuX	GLQHVLV	LGCFTT	VSTGTVYFAL	YRAEGLA	FQQNNGVL	438	25%
PucJ	GLQHVLV	LGCFTT	VSTGTVYFAL	YRAEGLA	FQQNNGVL	449	25%
PucK	GLQHVLV	LGCFTT	VSTGTVYFAL	YRAEGLA	FQQNNGVL	430	28%
SmlL9	GLQHVLV	QGVFS	VTSADILAV	LRADMLL	FQQNNGVL	490	24%
UapA	GLQHVAL	MGVFS	CGCIGDVTAT	VLADELN	FQQNNGVI	574	22%
UapC	GLQHVAL	VGTST	MGSIGDITAT	VLGNGIT	FQQNNGVI	580	23%
AfUapA	GLQHVAL	VGTST	MGSIGDITAT	VLGNGIT	FQQNNGVI	583	24%
Xut1	GFQHVAL	VGTST	MGSIGDVTAT	VLGDELG	FQQNNGVI	591	22%
Lpe1	GFQHVAL	MGGSYT	VSTGTVYFAL	IQWQGVG	SVENAGLL	529	21%
rSNBT1	GLQHVLV	QGGTFA	VSTGTVYHAC	IETELG	YSENVGAL	614	27%
hSVCT1	GLQHVLV	QASFA	ISIGDYYAC	IFTEIC	YSPNITGVL	602	24%
hSVCT2	GLQHVLV	QASFA	ISIGDYYAC	IFVTELS	YSPNITGVL	650	26%

- Aδείνη
- Aδείνη
- Γουανίνη/Υποξανθίνη
- Γουανίνη/Υποξανθίνη
- [Γουανίνη/Υποξανθίνη]
- [Γουανίνη/Υποξανθίνη]
- Aδείνη/Γουανίνη/Υποξανθίνη
- Aδείνη/Γουανίνη/Υποξανθίνη
- Aδείνη/Γουανίνη
- Aδείνη/Γουανίνη
- Άγνωστη λειτουργία
- Ουρακίλη
- [Ουρακίλη]
- Ουρακίλη/Θυμίνη/Ξανθίνη
- Ξανθίνη
- Ξανθίνη
- Ουρικό οξύ
- [Ξανθίνη]
- [Ουρικό οξύ]
- [Ουρικό οξύ]
- Ξανθίνη/Ουρικό οξύ
- Ξανθίνη/Ουρικό οξύ
- Ξανθίνη/Ουρικό οξύ
- Ξανθίνη/Ουρικό οξύ
- Ξανθίνη/Ουρικό οξύ
- Ξανθίνη/Ουρικό οξύ
- Ουρακίλη/Ξανθίνη/Υποξανθίνη/Γουανίνη
- Ασκορβικό οξύ
- Ασκορβικό οξύ

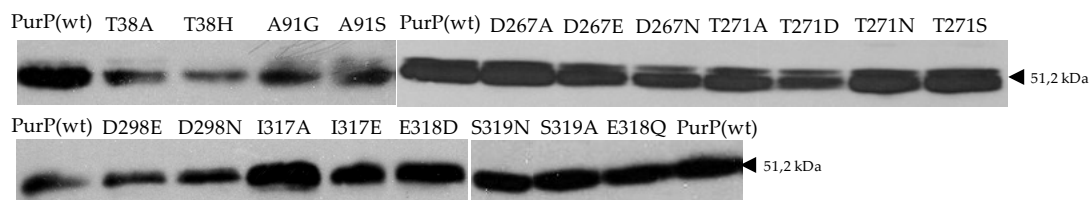
Εικόνα 3.3.4 Συντήρηση θέσεων σημαντικών αμινοξέων της οικογένειας NAT/NCS2. Οι αλληλουχίες των μελών της οικογένειας NAT/NCS2 στοιχήθηκαν με τα προγράμματα ClustalW και HHpred (βλ. Εικόνα 3.3.3) και στην εικόνα δείχνονται τα τμήματα που αναφέρονται στα μοτίβα των ελίκων TM1, TM3, TM8, TM9 και TM10. Στην ομάδα COG2233 σημειώνονται με κόκκινο θέσεις όπου συντηρείται μόνο ένα αμινοξύ (απόλυτα συντηρημένες), με πορτοκαλί θέσεις όπου δεν υπάρχει υψηλού βαθμού συντήρηση της πλευρικής ομάδας αλλά είναι λειτουργικά αναντικατάστατες σε αρκετά ομόλογα (βλ. Κεφ. 3.2) και με μπλε θέσεις όπου επίσης δεν υπάρχει υψηλού βαθμού συντήρηση της πλευρικής ομάδας αλλά σε αρκετά ομόλογα σχετίζονται με την εξειδίκευση (βλ. Κεφ. 3.2). Στην ομάδα COG2252 σημειώνονται οι αντίστοιχες θέσεις με μπλε όταν συντηρείται μόνο ένα αμινοξύ ή με ανοιχτό μπλε σε αντίθετη περίπτωση.



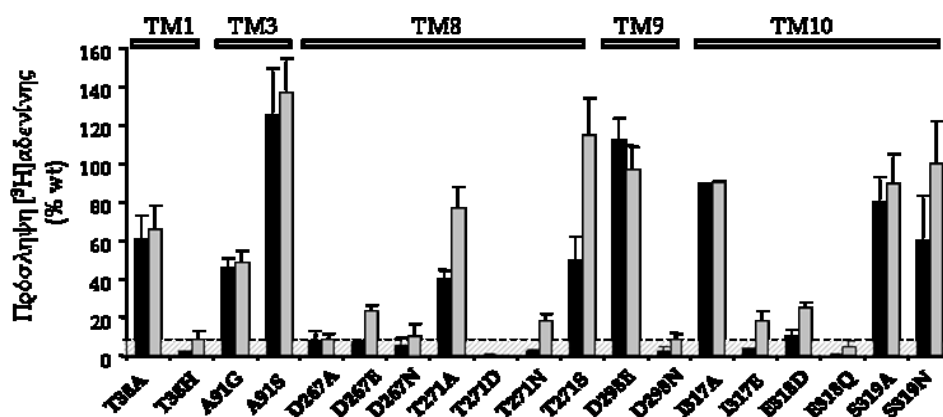
Εικόνα 3.3.5 Δομικά μοντέλα των μεταφορέων PurP, YjcD και XanQ στην περιοχή του κέντρου δέσμησης και τα κατάλοιπα αμινοξέων που αποτέλεσαν στόχους μεταλλαγμένης. Οι αλληλουχίες των μεταφορέων μοντελοποιήθηκαν με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (PDB 3QE7) με την χρήση του SWISSPROT modeling server. Τα δομικά μοντέλα οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα PyMOL και τονίζονται πέντε έλικες που περιλαμβάνουν τα σημαντικά αμινοξέα που εξετάστηκαν με μεταλλαξιγένεση στους PurP και YjcD και σχηματίζουν την περιοχή γύρω από το κέντρο δέσμησης σύμφωνα με την δομή του UraA. Πρόκειται για τις TM1, TM3, TM8, TM9 και TM10 (γκρι). Τα σημαντικά κατάλοιπα του μεταφορέα XanQ επισημαίνονται με κόκκινο (όσα είναι αναντικατάστατα), με πορτοκαλί (όσα υπόκεινται σε περιορισμούς στα αμινοξέα που μπορούν να τα αντικαταστήσουν), με πράσινο το N93 (που σχετίζεται με την εξειδίκευση).

3.3.3 PurP: D267 και E318 είναι αναντικατάστατα ενώ μεταλλάξεις στις θέσεις A91, T271 και D298 τροποποιούν σε μικρό βαθμό την εξειδίκευση

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα PurP στην μεμβράνη του βακτηρίου *E.coli* ανιχνεύονται σε παρόμοια επίπεδα με αυτά του μεταφορέα αγρίου τύπου, με εξαίρεση τα μεταλλάγματα T38A, T38H, A91G και A91S των οποίων τα επίπεδα είναι σε ποσοστό 40-70% σε σχέση με το PurP(wt) (Εικόνα 3.3.6). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς αδενίνης (Εικόνα 3.3.6) έδειξε ότι: i) οι θέσεις D267 και E318 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες, ii) μεταλλάγματα στις θέσεις A91 και S319 διατηρούν υψηλή ενεργότητα, iii) οι θέσεις T38, D298 και I317 υπόκειται σε περιορισμούς ως προς το αμινοξύ που μπορεί να αντικαταστήσει τα εγγενή αμινοξέα προκειμένου το μετάλλαγμα να διατηρεί σημαντικά επίπεδα ενεργότητας (στην T38 χρειάζεται σχετικά μικρή ομάδα, στο D298 καρβοξυλομάδα, και στην I317 υδροφοβή ομάδα) και iv) η θέση T271 μπορεί να αντικατασταθεί με αμινοξύ με μικρή πλευρική ομάδα (με Ala ή Ser) (Εικόνα 3.3.7).



Εικόνα 3.3.6 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης μεταλλαγμάτων του μεταφορέα PurP. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* ΔpurP (JW3692) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/purP(wt)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και έγινε αποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000.



Εικόνα 3.3.7 Ενεργότητες μεταφοράς αδενίνης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα PurP. Κύτταρα *E.coli* ΔpurP (JW3692) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/purP(wt)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL), υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ αδενίνης (0.1µM), στους 25°C. Η τιμή του αρνητικού μάρτυρα αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Στο γράφημα εμφανίζονται με μαύρες μπάρες οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης αδενίνης (από μετρήσεις σε 5-10sec) και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης (από μετρήσεις σε 1-5min). Οι τιμές εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά επί των αντίστοιχων τιμών του PurP(wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα.

Όσα μεταλλάγματα είχαν ενεργότητα πάνω από 10% σε σχέση με το PurP αγρίου τύπου μελετήθηκαν περαιτέρω με πειράματα κινητικής και ανταγωνισμού. Η κινητική ανάλυση των μεταλλαγμάτων αυτών (Πίνακας 3.3.1) έδειξε ότι μόνο τρία από αυτά επηρεάζουν την συγγένεια (K_m) του μεταφορέα για τη μεταφορά της αδενίνης. Συγκεκριμένα, τα μεταλλάγματα T271S και D298E εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια (K_m 4.2 μ M και 3.2 μ M αντίστοιχα) ενώ το I317A έχει μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με το μεταφορέα αγρίου τύπου (K_m 0.3 μ M). Επίσης, τα A91S, D298E και S319A έχουν 3-6 φορές αυξημένη V_{max} .

Πίνακας κινητικής ανάλυσης για την πρόσληψη [³H]αδενίνης (Δ purP)

Μεταφορέας	K_m (μ M)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m
PurP(wt)	1.0±0.2	1.7±0.1	1700
T38A	1.4±0.2	2.0±0.1	1429
A91G	1.1±0.2	1.4±0.1	1273
A91S	1.4±0.3	11.8±0.8	8357
T271A	1.6±0.8	1.9±0.3	1187
T271S	4.2±0.6	3.7±0.2	881
D298E	3.2±0.8	6.4±0.6	2000
I317A	0.3±0.1	2.0±0.3	6667
S319A	0.9±0.4	5.8±0.8	6445
S319N	0.9±0.3	3.7±0.3	4111

Πίνακας 3.3.1 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα PurP. Κύτταρα *E.coli* Δ purP (JW3692) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] αδενίνης (0.1–40 μ M). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-20 sec. Οι τιμές K_m και V_{max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.

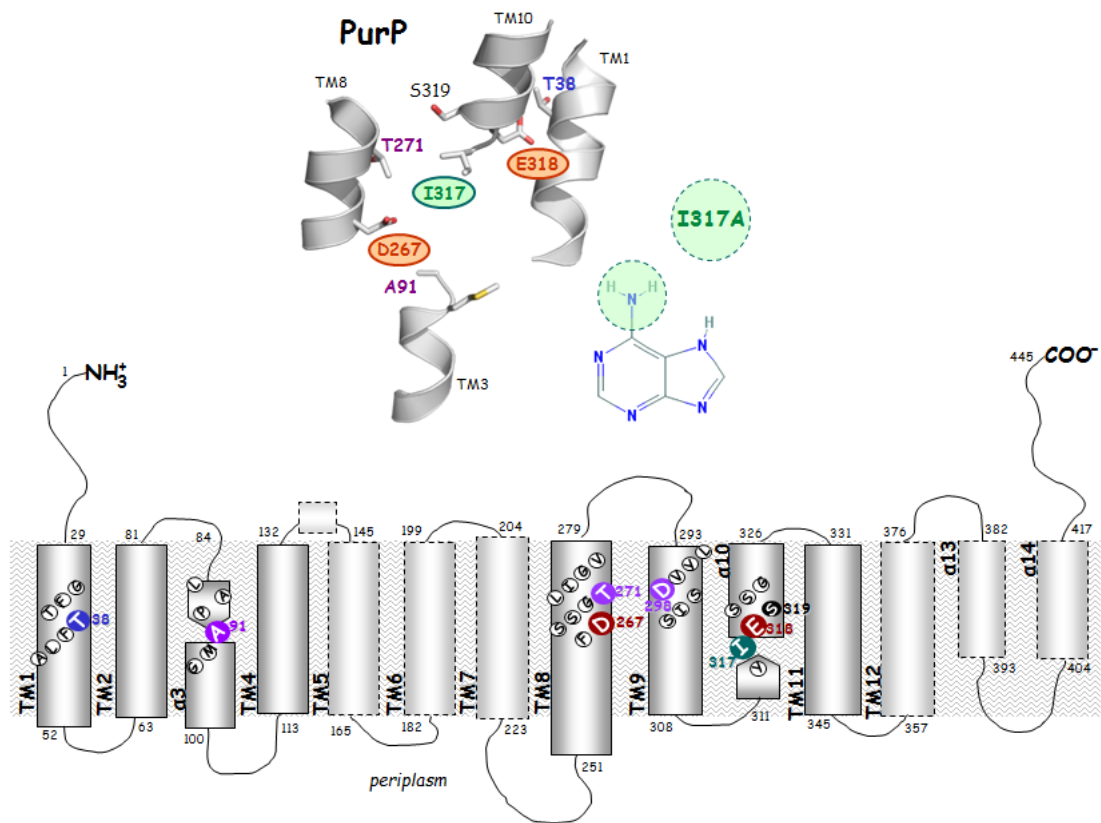
Από τα πειράματα ανταγωνισμού (Πίνακας 3.2.2) φαίνεται ότι τα περισσότερα μεταλλάγματα T38A, A91S, T271A, T271S και D298E εμφανίζουν διαφοροποιημένο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου κυρίως σε ότι αφορά την αναγνώριση των αναλόγων **πουρίνη** (35 φορές μειωμένη συγγένεια με το D298E, 28 φορές με τα T271A και T271S, 10 φορές με τα A91S, I317A και S317N, 6 φορές με το T38A) **2,6-δι-αμινοπουρίνη** (12 φορές μειωμένη συγγένεια με το A91S, 8 φορές με το T271S, 3 έως 5 φορές με τα D298E, S319A και S319N). Κανένα, όμως, από τα μεταλλάγματα δεν αναγνωρίζει κάποιο διαφορετικό ανάλογο αδενίνης ή υπόστρωμα σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου.

Πίνακας τιμών K_i των μεταλλαγμάτων του PurP

Μεταφορέας	G	HX	3-MA	7-MA	9-MA	N ⁶ -BA	Purine	2,6NP	2-mP	6-mP
PurP(wt)	>550	370	>50	410	96.2	1.8	3.4	8.8	>550	>550
T38A	>560	420	>560	>560	88.4	1.9	20.1	15.3	>560	>560
A91G	>550	505	>550	238	120.0	1.7	7.3	12.2	>550	>550
A91S	>560	382	>560	493	373.2	5.6	36.4	110.8	>560	>560
T271A	>570	517	>570	264	102.3	7.4	94.3	5.6	>570	>570
T271S	>590	585	>590	>590	488.7	3.4	98.0	65.1	>590	>590
D298E	>580	504	>580	>580	186.4	7.3	124.7	45.9	>580	>580
I317A	>450	375	>450	124	121.0	1.6	30.8	13.9	>450	>450
S319A	>540	414	>540	>540	169.5	2.5	6.8	36.2	>540	>540
S319N	>540	450	>540	415	63.2	1.6	32.7	24.9	>540	>540

Πίνακας 3.3.2 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα PurP. Κύτταρα *E.coli* ΔpurP (JW3692) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφορέας [³H] αδερίνης (0.1μM, 25 °C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-0.6mM, 5min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-10 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔpurP με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism6 και οι τυπικές αποκλίσεις (των τιμών από τρεις μετρήσεις) είναι <20%. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973). Οι συντμήσεις είναι: G γουανίνη, HX υποξανθίνη, 3-MA 3-μεθυλοαδερίνη, 7-MA 7-μεθυλοαδερίνη, 9-MA 9-μεθυλοαδερίνη, N⁶-BA N⁶-βενζοϋλο-αδερίνη, 2,6-NP 2,6-διαμινοπουρίνη, 2-mP 2-μερκαπτοπουρίνη και 6-mP 6-μερκαπτοπουρίνη.

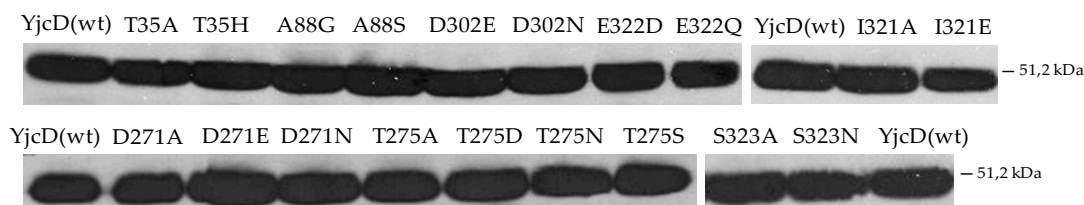
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα αδερίνης PurP έδειξαν ότι οι καρβοξυλομάδες στις θέσεις D267 και E318 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες, συγκεκριμένες αντικαταστάσεις στις θέσεις A91 (A91S), T271 (T271S) και D298 (D298E) μειώνουν την συγγένεια αναγνώρισης για όλα τα ανάλογα αδερίνης που μελετήθηκαν (7-MA, 9-MA, N⁶-BA, πουρίνη, 2,6NP) και για την αδερίνη (Πίνακας 3.3.1), ενώ η αντικατάσταση I317A τροποποιεί σε μικρό βαθμό το προφίλ εξειδίκευσης (ενισχύοντας την αναγνώριση για την αμινομάδα στη θέση C8 της πουρίνης) ενώ η θέση T38 (σχετικά μικρή ομάδα), όπως και οι θέσεις T271 (μικρή πλευρική ομάδα), D298 (καρβοξυλομάδα) και I317 (υδροφοβή ομάδα), υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς το αμινοξύ που μπορεί να αντικαταστήσει τα εγγενή αμινοξέα (Εικόνα 3.3.8). Με βάση τα μεταλλάγματα που δοκιμάστηκαν στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης δεν βρέθηκε κάποια θέση που να διευρύνει την εξειδίκευση. Ενδεχομένως να βρίσκονται περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης.



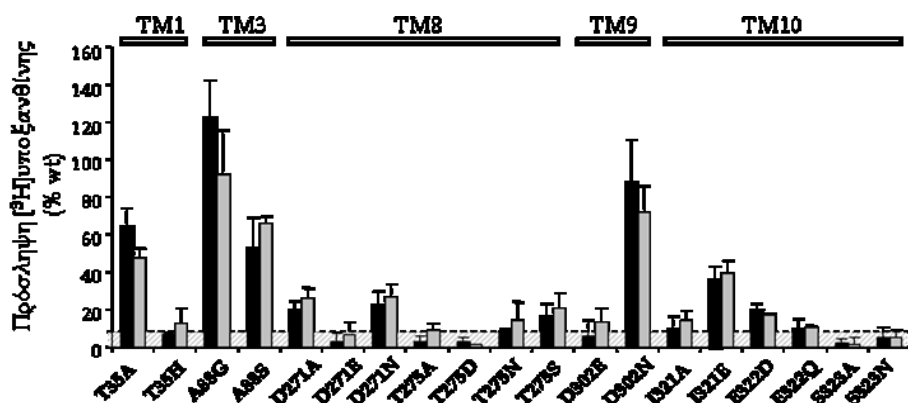
Εικόνα 3.3.8 Τοπολογικό και δομικό μοντέλο του μεταφορέα PurP. Αριστερά το δομικό μοντέλο του μεταφορέα με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (PDB 3QE7) και δεξιά το τοπολογικό μοντέλο. Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι θέσεις που βρέθηκαν λειτουργικά αναντικατάστατες (D267, E318), με πράσινο η θέση I317 που συνδέεται με την εξειδίκευση (το μετάλλαγμα I317A δείχνει μειωμένη αναγνώριση πουρίνης αλλά όχι 2,6-διαμινοπουρίνης, ενώ αυξάνει τη συγγένεια για την αδείνη) και με μωβ οι θέσεις όπου συγκεκριμένες αλλαγές μειώνουν την συγγένεια του μεταφορέα για την αδείνη και όλα τα ανάλογα αδείνης που μελετήθηκαν (A91S, T271S, D298E) (Πίνακες 3.3.1 και 3.3.2).

3.3.4 YjcD: D271, T275, E322 και S323 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες θέσεις

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα όλων των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα YjcD στην μεμβράνη του βακτηρίου *E.coli* είναι σε παρόμοια επίπεδα με αυτά του μεταφορέα αγρίου τύπου (Εικόνα 3.3.8) αλλά η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]υποξανθίνης ανέδειξε σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της ενεργότητας τους (Εικόνα 3.3.9). Συγκεκριμένα, i) στη θέση T35 φαίνεται να υπάρχουν στερεοχημικοί περιορισμοί αφού το T35H είναι ανενεργό και μόνο το μετάλλαγμα σε Ala μπορεί να μεταφέρει υποξανθίνη σε σημαντικά επίπεδα, ii) στη θέση A88 και τα δύο μεταλλάγματα διατηρούν υψηλή ενεργότητα (A88G, A88S), iii) οι θέσεις D271, T275, E322 και S323 είναι λειτουργικά πολύ σημαντικές (πρακτικά αναντικατάστατες) αφού τα περισσότερα μεταλλάγματα στις θέσεις αυτές είναι ανενεργά και πολύ μικρή ενεργότητα (κάτω του 20%) διατηρούν μόνο τα D271A, D271N, T275S και E322D, και iv) στις θέσεις D302 και I321 ενεργότητα εμφανίζουν μόνο τα μεταλλάγματα D302N και I321E, αντίστοιχα, ενώ οι συντηρητικές αντικαταστάσεις D302E και I321A οδηγούν σε απενεργοποίηση, υποδηλώνοντας στερεοχημικούς περιορισμούς στις επιτρεπτές αλλαγές.



Εικόνα 3.3.9 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης μεταλλαγμάτων του μεταφορέα YjcD. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* ΔpurP (JW3692) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/yjcD(wt)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και έγινε αποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αρραίωση 1:50000.



Εικόνα 3.3.10 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς αδενίνης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα YjcD. Κύτταρα *E. coli* ΔruirP που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/YjcD(wt)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL), υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] υποξανθίνης (1μM), στους 25°C. Η τιμή του αρνητικού μάρτυρα αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Στο γράφημα εμφανίζονται με μαύρες μπάρες οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης αδενίνης (από μετρήσεις σε 5-10sec) και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης αδενίνης (από μετρήσεις σε 1-5Min). Οι τιμές εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά επί των αντίστοιχων τιμών του YjcD(wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα.

Η μελέτη των μεταλλαγμάτων του YjcD συνεχίστηκε με κινητική ανάλυση και πειράματα ανταγωνισμού σε αυτά που είχαν ενεργότητα πάνω από 20% (βλ. Εικόνα 3.310). Στην κινητική ανάλυση, τα μεταλλάγματα T35A και I321E εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη συγγένεια για την υποξανθίνη, με K_m 30.3μM και 53.5μM αντίστοιχα, (3 και 5 φορές μεγαλύτερη της K_m αγρίου τύπου), ενώ το A88G έχει βελτιωμένη συγγένεια για την υποξανθίνη (K_m 4.2μM) σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου YjcD. Σε ό,τι αφορά την συγγένεια των μεταλλαγμάτων με το άλλο υπόστρωμα του μεταφορέα, την γουανίνη, τρία μεταλλάγματα (T35A, A88G, A88S) εμφανίζουν συγγένεια δέσμευσης 4-5 φορές μικρότερη από αυτή του μεταφορέα αγρίου τύπου (Πίνακας 3.3.3)

Πίνακας κινητικής ανάλυσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα YjcD.

Πρόσληψη [³H]υποξανθίνης (ΔrurP)

Μεταφορέας	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
YjcD(wt)	11.2±0.4	2.7±0.1	241
<u>T35A</u>	<u>30.3±4.4</u>	3.0±0.2	99
<u>A88G</u>	<u>4.2±1.5</u>	4.5±0.5	1071
A88S	18.4±3.6	2.8±0.2	152
D302N	12.4±2.3	4.0±0.3	322
<u>I321E</u>	<u>53.5±8.1</u>	10.0±0.9	190

Πρόσληψη [³H]γουανίνης (ΔγjcD)

Μεταφορέας	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
YjcD(wt)	1.6±0.2	4.0±0.3	2500
<u>T35A</u>	<u>42.3±6.7</u>	20.9±0.9	494
<u>A88G</u>	<u>50.1±12.0</u>	72.5±10.6	1447
<u>A88S</u>	<u>48.2±4.0</u>	30.3±1.5	629

Πίνακας 3.3.3 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα YjcD. Κύτταρα *E.coli* που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] υποξανθίνης (0.1–40 μM) (κύτταρα JW3692 [ΔrurP]) ή [³H] γουανίνης (κύτταρα JW4025 [ΔγjcD]) (0.1 μM) μετά από έκθεση 5min με μη σημασμένη γουανίνη (0.1–40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5–20 sec. Οι τιμές K_m και V_{\max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.

Η διαφοροποίηση αυτή των τριών μεταλλαγμάτων που αναφέρθηκαν (T35A, A88G, A88S) φαίνεται και στα πειράματα ανταγωνισμού έναντι της πρόσληψης [³H]υποξανθίνης (Πίνακας 3.3.4), καθώς η σταθερά αναστολής (K_i) της γουανίνης και στις τρεις περιπτώσεις αυξάνεται σημαντικά. Εκτός από την γουανίνη, τα T35A, A88G, A88S καθώς και το I321E, παύουν να αναγνωρίζουν το ίδιο ισχυρά με τον μεταφορέα αγρίου τύπου το ανάλογο 1-μεθυλογουανίνη (4 με 8 φορές αυξημένη K_i), ενώ το μετάλλαγμα I321E έχει σημαντικά μειωμένη συγγένεια και για τα ανάλογα 8-αζαγουανίνη (3 φορές αυξημένη K_i) και 6-μερκαπτοπουρίνη (2.5 φορές αυξημένη K_i), αν και φαίνεται να αναγνωρίζει την γουανίνη με καλύτερη συγγένεια (3.5 φορές μειωμένη K_i). Από την άλλη πλευρά, η μειωμένη αναγνώριση γουανίνης που έχει το μετάλλαγμα A88G συνδυάζεται με αυξημένη αναγνώριση τόσο για την υποξανθίνη (Πίνακας 3.3.3) όσο και για

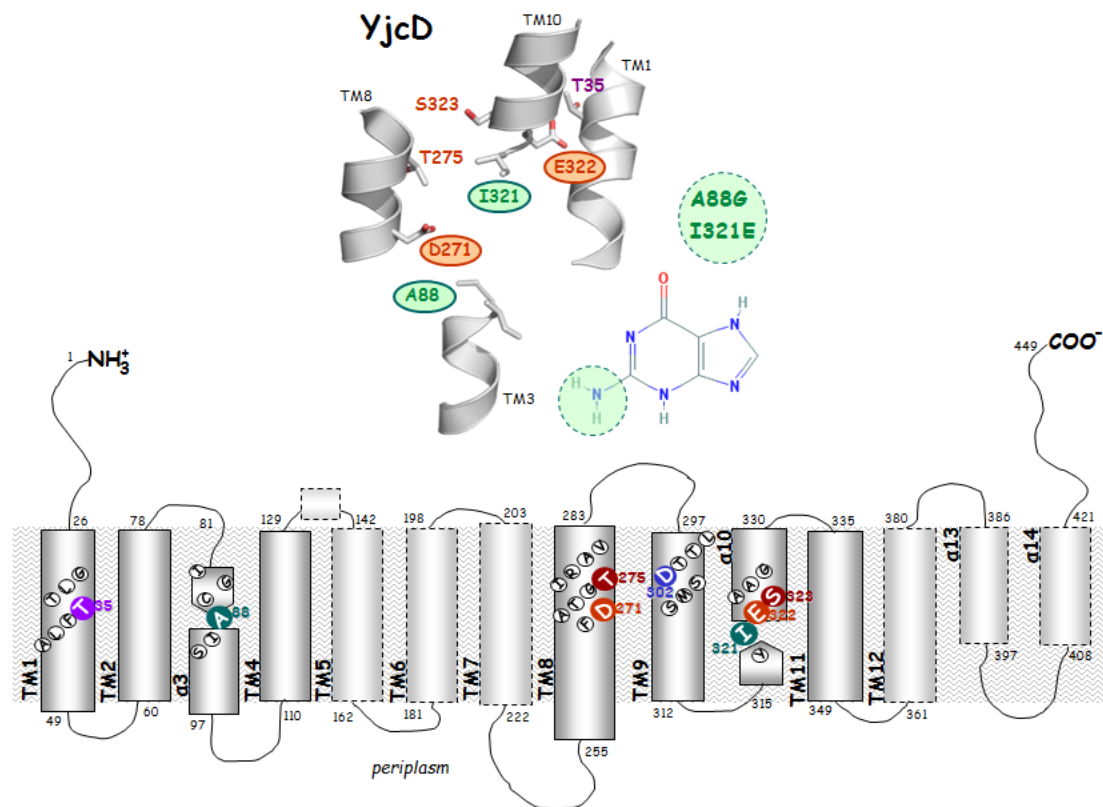
την 6-μερκαπτοπουρίνη. Αντίθετα με τα παραπάνω, το μετάλλαγμα D302N δεν διαφοροποιείται σημαντικά από τον YjcD(wt). Τέλος, όπως και στην περίπτωση των μεταλλαγμάτων του PurP, κανένα από τα μεταλλάγματα που εξετάστηκαν δεν μπορούν να αναγνωρίσουν κάποιο ανάλογο πουρίνης που δεν μπορεί να αναγνωρίσει και ο μεταφορέας αγρίου τύπου (Πίνακας 3.3.4).

Πίνακας τιμών K_i των μεταλλαγμάτων του YjcD

Μεταφορέας	G	A	1-MG	6-SG	7-MG	8azaG	Purine	2,6-NP	2-mP	6mP
YjcD(wt)	3.7	>900	30.4	3.8	>900	40.7	>900	>900	>900	16.6
T35A	10.1	>970	112.7	9.2	>970	96.1	>970	>970	>970	8.5
A88G	21.3	>810	114.2	2.3	>810	38.5	>810	>810	>810	4.6
A88S	46.4	>950	251.8	3.6	>950	89.7	>950	>950	>950	9.7
D302N	6.7	>920	45.5	6.2	>920	56.4	>920	>920	>920	11.2
I321E	1.1	>980	150.4	4.9	>980	125.2	>980	>980	>980	39.6

Πίνακας 3.3.4 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα YjcD. Κύτταρα *E.coli* ΔpurP (JW3692) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]υποξανθίνης (1μM, 25 °C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (1μM-1mM, 5min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-10 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔpurP με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism6 και οι τυπικές αποκλίσεις είναι <20%. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973). Οι συντμήσεις είναι: G γουανίνη, A αδενίνη, 1-MG 1-μεθυλογουανίνη, 6-SG 6-θειογουανίνη, 7-MG 7-μεθυλογουανίνη, 8azaG 8-αζαγουανίνη, 2,6-NP 2,6-διαμινοπουρίνη, 2-mP 2-μερκαπτοπουρίνη και 6-mP 6-μερκαπτοπουρίνη.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα γουανίνης/υποξανθίνης YjcD έδειξαν ότι οι θέσεις D271, T275, E322 και S323 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες ή τα μεταλλάγματά τους δίνουν μεταφορείς με πολύ μικρή ενεργότητα (D271A, D271N, T275S και E322D: ενεργότητα κάτω του 20%), συγκεκριμένες αντικαταστάσεις στις θέσεις A88 και I321 οδηγούν σε τροποποίηση του προφίλ εξειδίκευσης (το A88G έχει αυξημένη συγγένεια για υποξανθίνη και 6-MP και μειωμένη για γουανίνη, ενώ το I321E αυξημένη για γουανίνη και μειωμένη για υποξανθίνη και 6-MP), η αντικατάσταση T35A στη θέση T35 οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια και για τα δύο φυσικά υποστρώματα (Πίνακας 3.3.3), ενώ η θέση D302 (παρόμοια πλευρική ομάδα), όπως και οι T35 (σχετικά μικρή ομάδα) και I321 (πλευρική ομάδα παρόμοιου όγκου), υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς το αμινοξύ που μπορεί να αντικαταστήσει τα εγγενή αμινοξέα (Εικόνα 3.3.11). Με βάση τα μεταλλάγματα που δοκιμάστηκαν στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης δεν βρέθηκε κάποια θέση που να διευρύνει ή να περιορίζει την εξειδίκευση του YjcD, ενδεχομένως να βρίσκονται περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης.



Εικόνα 3.3.11 Τοπολογικό και δομικό μοντέλο του μεταφορέα YjcD. Επάνω το δομικό μοντέλο του μεταφορέα με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (PDB 3QE7) και κάτω το τοπολογικό μοντέλο. Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι θέσεις που βρέθηκαν λειτουργικά αναντικατάστατες ή ότι δεν μπορούν να αντικατασταθούν με διατήρηση ενεργότητας πάνω από 20% (D271, T275, E322, S323), με πράσινο οι θέσεις A88 και I321 που συνδέεται με την εξειδίκευση (το μετάλλαγμα A88G εμφανίζει αυξημένη αναγνώριση υποξανθίνης και 6-MP και μειωμένη για γουανίνη, ενώ το I321E, αντίστροφα, αυξημένη συγγένεια για την γουανίνη και μειωμένη για την υποξανθίνη και την 6-MP) και με μωβ η θέση T35 όπου η αντικατάσταση σε Ala (T35A) μειώνει τη συγγένεια τόσο για την υποξανθίνη όσο και για τη γουανίνη (Πίνακες 3.3.3 και 3.3.4).

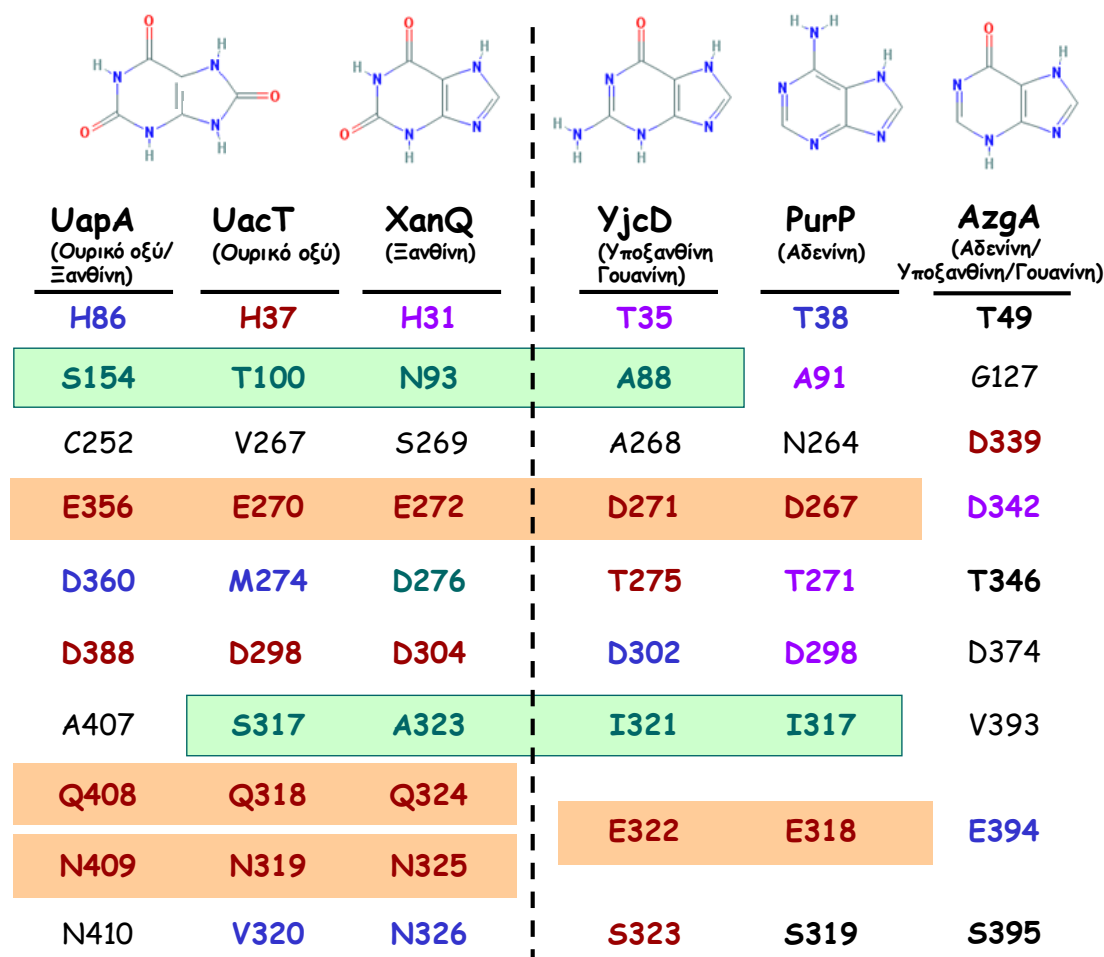
3.3.5 Τα κατάλοιπα γύρω από την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος συντηρούν εξελικτικά παρόμοιο ρόλο στους μεταφορείς της ομάδας COG2252

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν με μεταλλαξιγένεση οι δύο μεταφορείς της *E.coli* που ανήκουν στην ομάδα COG2252, οι PurP (αδενίνης) και YjcD (γουανίνης/υποξανθίνης). Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης στην περιοχή γύρω από το προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης έχει δείξει βασικές ομοιότητες σε ό,τι αφορά κατάλοιπα που είναι αναντικατάστατα για την λειτουργία τόσο στην ομάδα COG2252 όσο και στην ομάδα COG2233 αλλά και επιμέρους διαφορές κυρίως σε ό,τι αφορά την συσχέτιση θέσεων στην περιοχή αυτή με την εξειδίκευση των μεταφορέων.

Συνοπτικά ο ρόλος των θέσεων γύρω από το κέντρο δέσμευσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3.12. Οι θέσεις D267/271 (TM8) και E318/322 (TM10) (PurP/YjcD) είναι αναντικατάστατες για την λειτουργία όπως και στους μεταφορείς της ομάδας COG2233 (Karena and Frillingos, 2009; Mermelekas *et al.*, 2010; Papakostas and Frillingos, 2012; Amillis *et al.*, 2011; Kosti *et al.*, 2012). Το Asp-298/302 υπόκειται σε περιορισμούς στους PurP και YjcD αλλά στους μεταφορείς COG2233 είναι αναντικατάστατο (Georgopoulou *et al.*, 2010; Papakostas and Frillingos, 2012) (βλ. και Κεφ. 3.2). Από την ομάδα COG2252 έχει μελετηθεί και ο μεταφορέας AzgA από τον *A.nidulans* ο οποίος έχει ευρύτερη εξειδίκευση και μεταφέρει και τα τρία υποστρώματα (Cecchetto *et al.*, 2004) και η μελέτη του με μεταλλαξιγένεση έδειξε κάποιες διαφοροποιήσεις σε σχέση με τους ομόλογους βακτηριακούς. Το αντίστοιχο Asp στην TM8 (D342) υπόκειται σε περιορισμούς καθώς η αντικατάστασή του με Glu δίνει ένα μετάλλαγμα με χαμηλή ενεργότητα και σημαντικά μειωμένη συγγένεια για αδενίνη και γουανίνη ενώ αναντικατάστατο για την λειτουργία του μεταφορέα είναι το D339 στην ίδια έλικα (Krypotou *et al.*, 2012). Τέλος, το δεύτερο αναντικατάστατο κατάλοιπο, το E322/318 στους YjcD, PurP, αντίστοιχα, στην περίπτωση του AzgA δεν είναι αναντικατάστατο καθώς το μετάλλαγμα E394D διατηρεί ενεργότητα της τάξεως του 50% σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου για την υποξανθίνη και έχει μειωμένη συγγένεια για την αδενίνη (Krypotou *et al.*, 2012). Σε περιορισμούς υπόκειται και η Thr-38/35 (TM1) στους PurP και YjcD όπως και η αντίστοιχη His των μεταφορέων της ομάδας COG2233 (Karena and Frillingos, 2009; Amillis *et al.*, 2011). Στον AzgA η αντικατάσταση της Thr δεν επιφέρει κάποια σημαντική αλλαγή στην λειτουργία (Krypotou *et al.*, 2014). Τέλος σημαντική επίπτωση στην εξειδίκευση έχει η αντικατάσταση της Ile-321/317, χωρίς να αλλάζουν τα μεταφερόμενα υποστρώματα.

Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης σε θέσεις γύρω από το κέντρο δέσμευσης τόσο των βακτηριακών PurP και YjcD όσο και του AzgA δεν έδειξαν θέσεις οι οποίες να μπορούν είτε να περιορίσουν τα μεταφερόμενα

υποστρώματα στον AzgA είτε να διευρύνουν ή να αλλάξουν τα μεταφερόμενα υποστρώματα στους PurP και YjcD (Papakostas *et al.*, 2013; Kryporou *et al.*, 2014). Ενδεχομένως θέσεις σημαντικές για την εξειδίκευση να βρίσκονται κυρίως περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης του υποστρώματος και με έμμεσο τρόπο, π.χ. περιορίζοντας ή διευρύνοντας την δίοδο από την οποία εισέρχονται τα υποστρώματα, να καθορίζουν την εξειδίκευση των μεταφορέων (βλ. Συζήτηση).



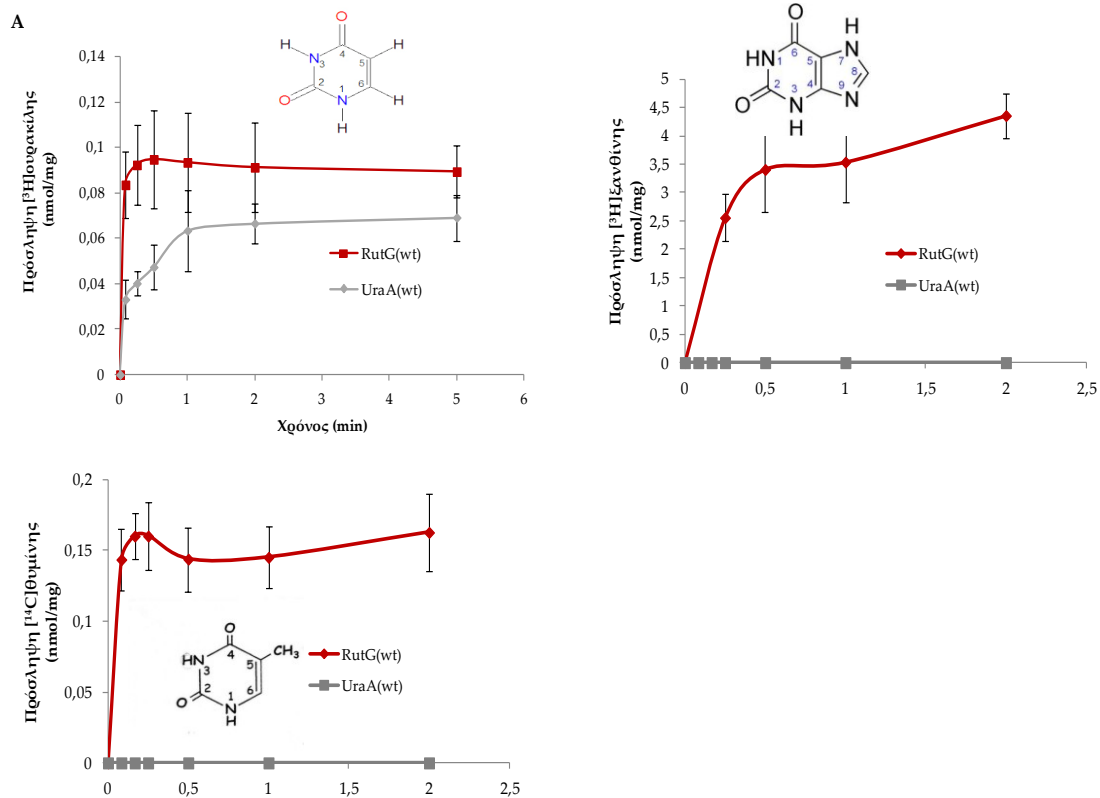
Εικόνα 3.3.12 Σύνοψη των σημαντικών καταλοίπων γύρω από το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Από την ομάδα Ξανθίνης/ουρικού οξέος (COG2233) παρουσιάζονται οι μεταφορείς UapA (*A. nidulans*), UacT και XanQ (*E.coli*) και από την ομάδα αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης (COG2252) οι μεταφορείς YjcD και PurP (*E.coli*) και AzgA (*A. nidulans*). Με κόκκινο συμβολίζονται οι αναντικατάστατες θέσεις, με μωβ οι θέσεις των οποίων οι αντικαταστάσεις οδηγούν σε μειωμένη συγγένεια για το υπόστρωμα, πράσινο οι θέσεις των οποίων οι αντικαταστάσεις οδηγούν αλλαγή εξειδίκευσης, μπλε οι θέσεις που υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή τους, μαύρο με έντονη γραφή θέσεις που η μεταλλαξιγένεση δεν έδωσε στοιχεία για κάποιον σημαντικό ρόλο μαύρο κανονική γραφή θέσεις που δεν έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση.

3.4 Μελέτη βακτηριακών μεταφορέων ουρακίλης

3.4.1 Διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων ουρακίλης UraA και RutG της *Escherichia coli* K-12

Το γονιδίωμα της *E.coli* K-12 φέρει δύο μεταφορείς ουρακίλης. Ο πρώτος είναι ο μεταφορέας UraA ο οποίος είναι ο μοναδικός βακτηριακός μεταφορέας της οικογένειας αυτής για τον οποίο υπάρχει διαθέσιμη κρυσταλλική δομή (Lu *et al.*, 2011) και ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι μεταφέρει ειδικά ουρακίλη με υψηλή συγγένεια (Botou *et al.*, 2015). Η K_m του UraA για την ουρακίλη στο πειραματικό μας σύστημα είναι 1.4 μ M (Εικόνα 3.4.1). Ο δεύτερος είναι ο μεταφορέας RutG ο οποίος χαρακτηρίστηκε πρόσφατα (Botou *et al.*, 2015) και η ανάλυσή του ολοκληρώνεται με την παρούσα διατριβή. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του RutG αποκάλυψε ότι έχει ευρύτερη εξειδίκευση από τον μεταφορέα UraA καθώς μεταφέρει εκτός της ουρακίλης (K_m 2.0 μ M) και θυμίνη (K_m 1.6 μ M) και, με πολύ μικρότερη συγγένεια, ξανθίνη (K_m 65.5 μ M) (Εικόνα 3.4.1). Η διαφορά με τη θυμίνη (5-μεθυλο-ουρακίλη) είναι εντυπωσιακή, αφού ο UraA δεν τη μεταφέρει καθόλου ενώ ο RutG τη μεταφέρει με πολύ υψηλή συγγένεια, παρόμοια με αυτήν που έχουν για την ουρακίλη τόσο ο UraA όσο και ο RutG.

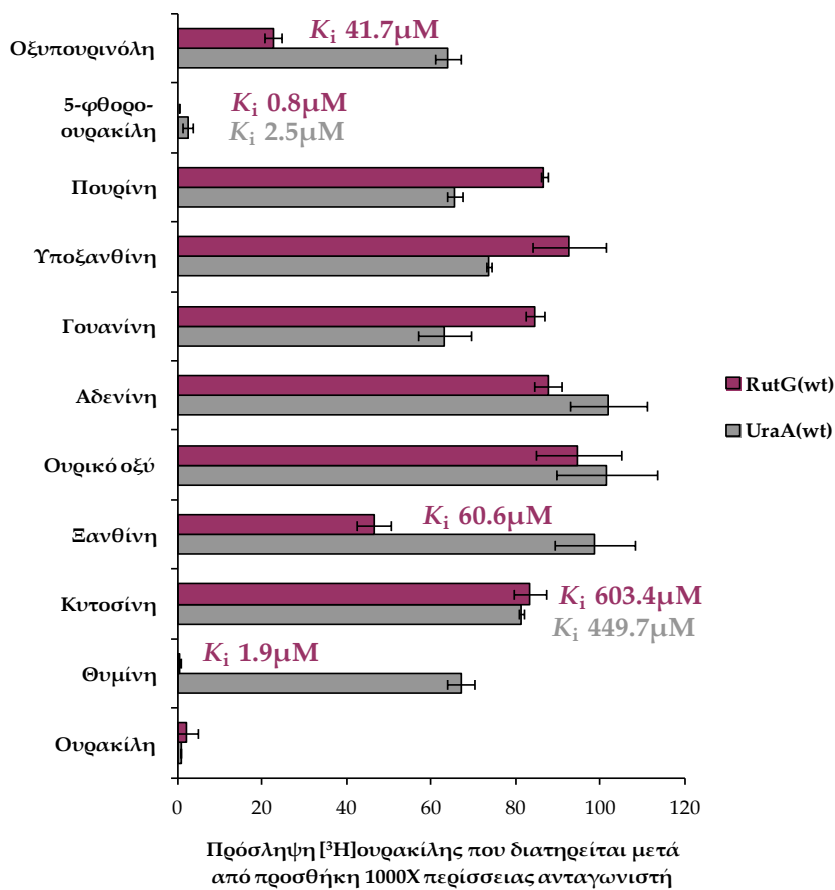
Αντίστοιχες διαφορές εμφανίζουν και στο προφίλ εξειδίκευσης (όπως προκύπτει από πειράματα ανταγωνισμού έναντι της πρόσληψης ραδιενεργού ουρακίλης, Εικόνα 3.4.2) καθώς ο RutG αναγνωρίζει ισχυρά θυμίνη (K_i 1.9 μ M) και, σε μικρότερο βαθμό, οξυπουρινόλη και ξανθίνη (K_i 41.7 μ M και 60.6 μ M, αντίστοιχα) ενώ ο UraA δεν αναγνωρίζει καθόλου αυτές τις νουκλεοτιδικές βάσεις. Αντίθετα και οι δύο μεταφορείς αναγνωρίζουν ισχυρά την 5-φθορο-ουρακίλη (K_i 0.8 μ M ο RutG και 2.5 μ M ο UraA) ενώ επίσης έχουν παρόμοια αλλά πολύ χαμηλή συγγένεια αναγνώρισης για την κυτοσίνη (K_i 603.4 μ M ο RutG και 449.7 μ M ο UraA) (Εικόνα 3.4.2). Αυτές οι διακριτές διαφορές στα μεταφερόμενα υποστρώματα και στο προφίλ εξειδίκευσης δεν εμφανίζονται με αντίστοιχα έντονο τρόπο και στην αλληλουχία των δυο αυτών μεταφορέων καθώς η ταυτότητά τους είναι 36%.



B Κινητική ανάλυση

Περιομέωση	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol}/\text{mg min}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{mg min}$)	Υπόστρωμα
UraA(wt)	1.4 \pm 0.4	4.0 \pm 0.3	2857	Ουρακίλη
RutG(wt)	2.0 \pm 0.6	18.3 \pm 1.9	9150	Ουρακίλη
RutG(wt)	65.5 \pm 8.5	6.4 \pm 0.5	98	Ξανθίνη
RutG(wt)	1.6 \pm 0.3	11.7 \pm 0.4	7312	Θυμίνη

Εικόνα 3.4.1 A. Ενεργότητες μεταφοράς ουρακίλης, θυμίνης και ξανθίνης των μεταφορέων UraA και RutG. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (100 μM , 25°C) ή κύτταρα *E.coli* JW2482 (ΔuraA) για την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1 μM [³H]ουρακίλης και 2 μM [¹⁴C]θυμίνης. Αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Δίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες από τουλάχιστον τρία πειράματα. **B. Κινητική ανάλυση** της ενεργότητας των μεταφορέων UraA και RutG. Κύτταρα *E.coli* JW2482 (ΔuraA) ή T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιοεργά σημασμένων υποστρωμάτων ουρακίλης (0.04 μM -40 μM) και θυμίνης (1-40 μM) ή ξανθίνης (1 μM -40 μM), αντίστοιχα. Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5sec (διπλές μετρήσεις σε κάθε πείραμα). Οι τιμές K_m και V_{max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.

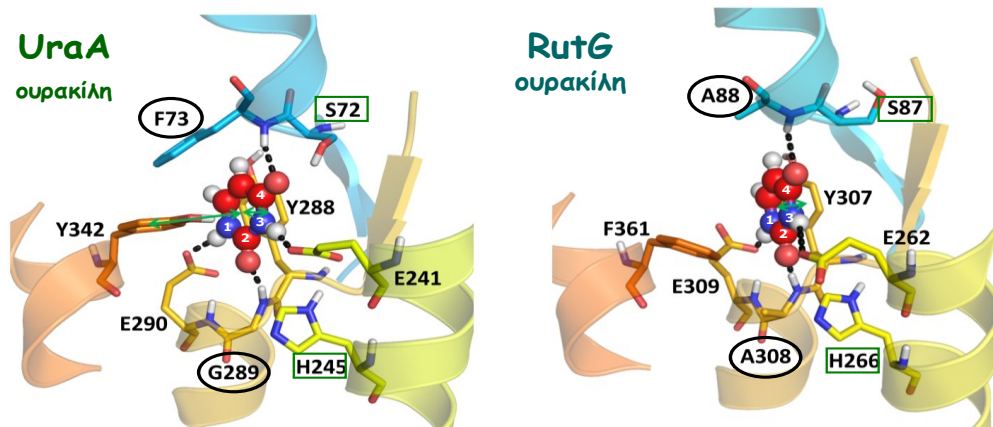


Εικόνα 3.4.2 Σύγκριση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων UraA και RutG. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (0.1μM, 25°C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1mM, 2min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔuraA με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που φέρουν τους μεταφορείς αγρίου τύπου χωρίς την επίδραση των ανταγωνιστών. Οι τιμές IC₅₀ εξαγονται με την βοήθεια του προγράμματος Prism6 και οι τυπικές αποκλίσεις είναι <20 %. Δίνονται οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i), όπως προκύπτουν από την αναγωγή με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

3.4.2 Στόχοι μεταλλαξιγένεσης στους μεταφορείς RutG και UraA

Προκειμένου να επιλεγούν στόχοι μεταλλαξιγένεσης για να βρεθούν οι θέσεις που καθορίζουν τη χαρακτηριστική διαφορά εξειδίκευσης μεταξύ των μεταφορέων UraA (ουρακίλης) και RutG (ουρακίλης, θυμίνης και, σε μικρότερο βαθμό, ξανθίνης) επικεντρωθήκαμε σε θέσεις στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (Lu *et al.*, 2011) και εντοπίσαμε κατάλοιπα που είτε συντηρούνται στους δύο μεταφορείς είτε διαφέρουν σε θέσεις που γνωρίζουμε από την μελέτη του μεταφορέα ξανθίνης XanQ ότι επηρεάζουν την εξειδίκευση των μεταφορέων της ομάδας αυτής (COG2233).

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε για την εξειδίκευση των μεταφορέων με βάση τον XanQ οι θέσεις S72/87 (TM3) και H245/266 (TM8) είναι οι αντίστοιχες N93 και D276 του XanQ και έχει φανεί ότι αλλάζουν δραστικά την εξειδίκευση όταν μεταλλαχθούν σε Ser (ή Ala) και Glu, αντίστοιχα (Karena and Frillingos, 2009; Mermelekas *et al.*, 2010). Σε αυτές τις δύο θέσεις (όπου οι μεταφορείς UraA και RutG φέρουν το ίδιο κατάλοιπο) προχωρήσαμε σε μεταλλαξιγένεση σε αλανίνη και σε υδρόφιλη ή υδρόφοβη πλευρική ομάδα παρόμοιου όγκου, αλλάζοντας το εγγενές αμινοξύ Ser-72 (ή Ser-87) με Ala, Val ή Thr και το εγγενές αμινοξύ His-245 (ή His-266) με Ala, Asp ή Val. Από τα αμινοξέα που συμμετέχουν άμεσα στην πρόσδεση του υποστρώματος (ουρακίλης) με δεσμούς υδρογόνου (Lu *et al.*, 2011), οι δύο μεταφορείς, UraA και RutG, φέρουν διαφορετικό κατάλοιπο στις θέσεις G289/A308 (TM10) και F73/A88 (TM3) (Εικόνα 3.4.3). Η πρώτη (G289/A308) είναι η αντίστοιχη θέση A323 στον XanQ και είναι το πρώτο κατάλοιπο του μοτίβου υπογραφή της οικογένειας NAT/NCS2 για το οποίο έχει δεχτεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα (Georgoroulou *et al.*, 2010). Και τα δύο αυτά κατάλοιπα φαίνεται να αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα (ουρακίλη) μέσω δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται με τα αμιδικά άζωτα του πολυπεπτιδικού σκελετού σε αυτές τις θέσεις (Εικόνα 3.4.3, βλ. και Lu *et al.*, 2011). Η διαφορά στα δύο αυτά κατάλοιπα θα μπορούσε να είναι σημαντική για την εξειδίκευση των μεταφορέων. Έτσι δημιουργήθηκαν δύο μεταλλάγματα όπου το εγγενές αμινοξύ του ενός μεταφορέα αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ που φέρει ο άλλος. Η δεύτερη σημαντική διαφορά είναι στην θέση F73/A88. Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της θέσης αυτής αντικαταστάθηκε το εγγενές αμινοξύ στον κάθε μεταφορέα με το αμινοξύ του άλλου. Τέλος για τις θέσεις F73/A88 και G289/A308 δημιουργήθηκαν και τα αντίστοιχα διπλά μεταλλάγματα (στον UraA F73A/G289A και στον RutG A88F/A308G).

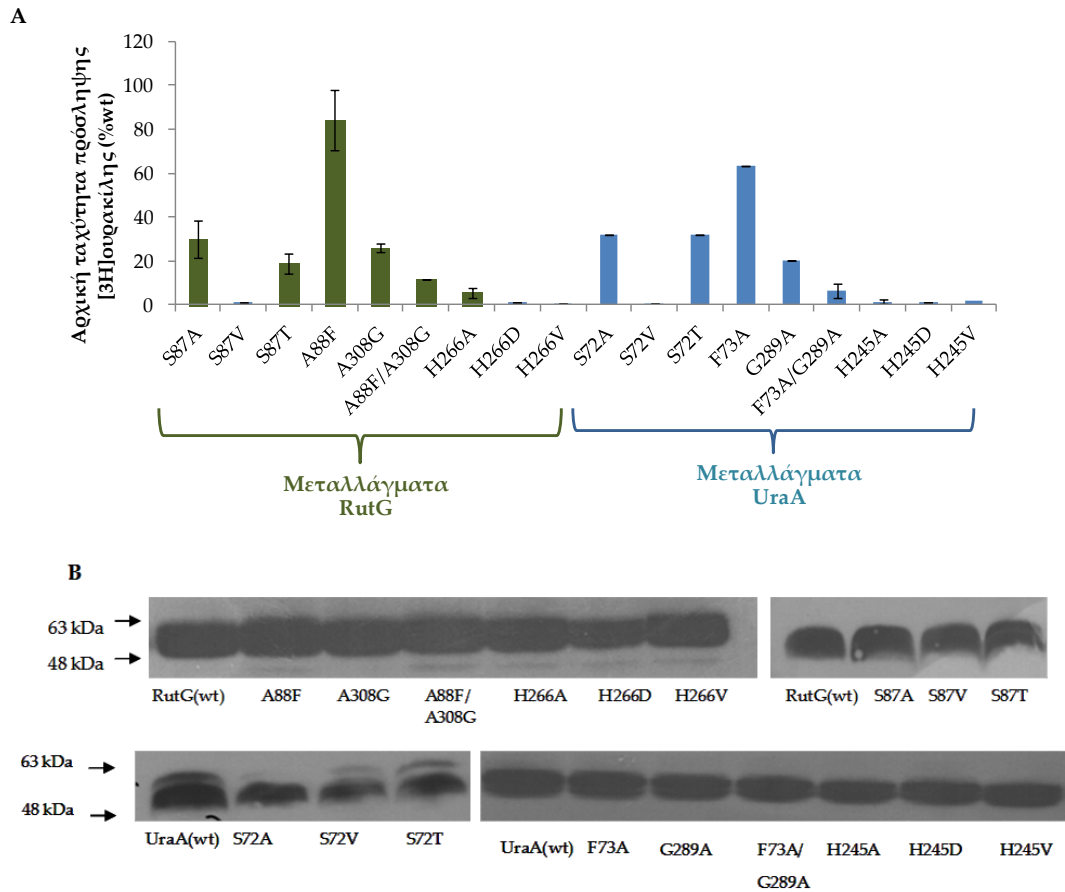


Εικόνα 3.4.3 Στόχοι μεταλλαγμένης στους μεταφορείς UraA και RutG. Οι στόχοι τονίζονται με κύκλους ή ορθογώνια πλαίσια πάνω στις εικόνες της δομής του κέντρου δέσμευσης. Η δομική ανάλυση έγινε από την συνεργαζόμενη ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Φαρμακευτικής Σχολής Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών), με μοριακή μοντελοποίηση, θεωρητική συναρμογή του υποστρώματος (ουρακίλης) στο κέντρο δέσμευσης (induced-fit docking) και μελέτη μοριακής δυναμικής (Evangelidis & Mikros, unpublished).

3.4.3 Η θέση S72/S87 απαιτεί υδρόφιλο ή μικρό αμινοξύ ενώ η H245/H266 είναι αναντικατάστατη.

Όλα τα μεταλλάγματα των δύο μεταφορέων εισήχθησαν σε κύτταρα *E.coli* ΔuraA. Με ανοσοαποτύπωση Western βρέθηκε ότι σε κάθε περίπτωση τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταλλαγμένων μεταφορέων στην μεμβράνη των κυττάρων είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα επίπεδα των μεταφορέων αγρίου τύπου UraA και RutG (Εικόνα 3.4.4).

Ο λειτουργικός έλεγχος των μεταλλαγμάτων με την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (0.1μM) έδειξε ότι τα μεταλλάγματα S72V και S87V είναι ανενεργά καθώς επίσης και όλα τα μεταλλάγματα στις θέσεις H245 και H266 στους μεταφορείς UraA και RutG αντίστοιχα αφού οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ουρακίλης των μεταλλαγμάτων δεν ξεπερνούν το 10% σε σχέση με τους μεταφορείς αγρίου τύπου (Εικόνα 3.4.4). Τα υπόλοιπα μεταλλάγματα είναι ενεργά αλλά με σχετικά χαμηλά επίπεδα ενεργότητας, με εξαίρεση τα RutG(A88G) και UraA(F73A) που έχουν ενεργότητα 80% και 60% σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου, αντίστοιχα. Στο μεταφορέα RutG χαμηλά επίπεδα μεταφοράς ουρακίλης εμφανίζουν τα μεταλλάγματα S87A και S87T (έως 30% της αρχικής ταχύτητας του μεταφορέα αγρίου τύπου). Στην περίπτωση του UraA, χαμηλά επίπεδα πρόσληψης ουρακίλης έχουν τα μεταλλάγματα S72A, S72T, G289A, F73A/G289A (10-30% της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης ουρακίλης σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου) (Εικόνα 3.4.4).

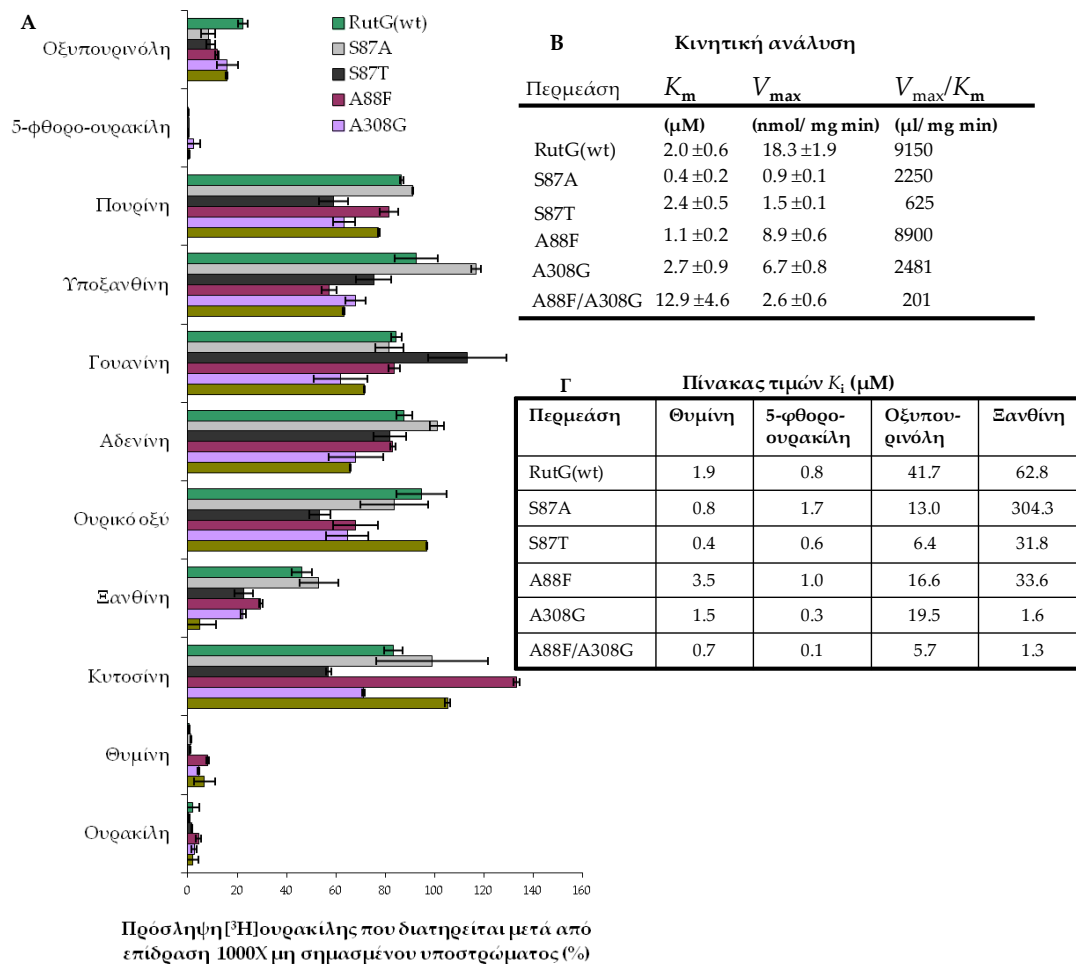


Εικόνα 3.4.4 Α. Ενεργότητες μεταφοράς ουρακίλης των μεταλλαγμάτων των μεταφορέων UraA και RutG. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1μM [³H]ουρακίλης για χρόνους 5sec-5min. (βλ.Κεφ.2.8.1) Αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης των μεταλλαγμάτων όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τους χρόνους 5-15sec, με τις τυπικές αποκλίσεις από τουλάχιστον τρία πειράματα. **Β. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των μεταλλαγμάτων των μεταφορέων UraA και RutG.** Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/rutG-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000.

3.4.4 Το μετάλλαγμα F73A του UraA αναγνωρίζει ισχυρά την θυμίνη.

Εκτός από τα μεταλλάγματα S87V, H266(A/D/V), S72V, H245(A/D/V) που έχουν μηδενικά επίπεδα πρόσληψης ουρακίλης, όλα τα υπόλοιπα μεταλλάγματα των μεταφορέων UraA και RutG μελετήθηκαν περαιτέρω με πειράματα ανταγωνισμού και έγινε η κινητική ανάλυση τους.

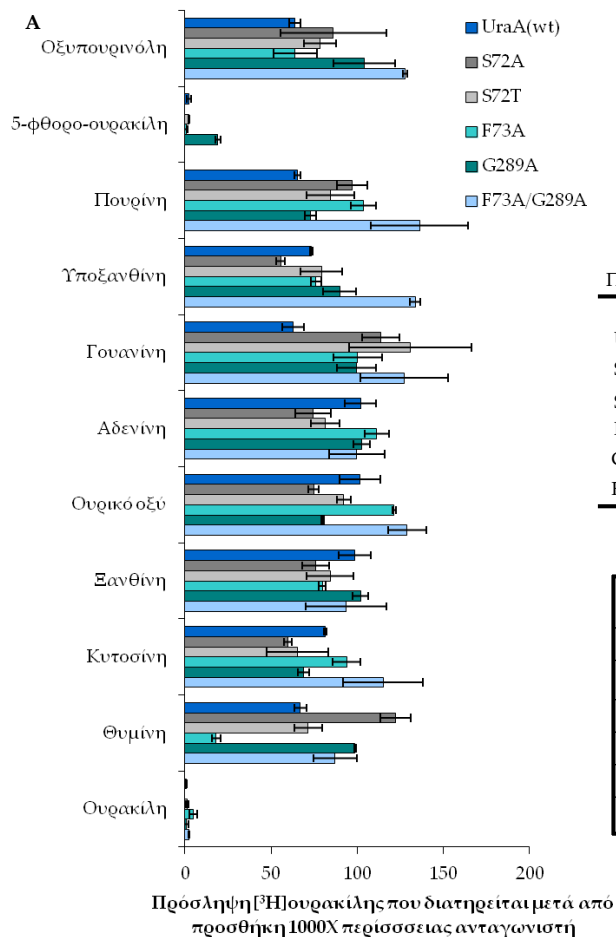
Κανένα από τα ενεργά μεταλλάγματα του RutG (S87A, S87T, A88F, A308G, A88F/A308G) δεν μπορεί να αναγνωρίσει πουρίνη, υποξανθίνη, γουανίνη, αδενίνη ή ουρικό οξύ, όπως συμβαίνει και με τον μεταφορέα αγρίου τύπου. Σε ό,τι αφορά τα υποστρώματα που αναγνωρίζονται και από το RutG(wt) (οξυπουρινόλη, θυμίνη, ξανθίνη, 5-φθορο-ουρακίλη) σημαντικότερες διαφορές εντοπίστηκαν στα μεταλλάγματα S87A καθώς και στο διπλό μετάλλαγμα A88F/A308G. Το S87A αναγνωρίζει ισχυρότερα από τον μεταφορέα αγρίου τύπου θυμίνη και οξυπουρινόλη (K_i 0.8 μ M και 13.0 μ M έναντι 1.9 μ M και 41.7 μ M του μεταφορέα αγρίου τύπου, αντίστοιχα) αλλά έχει μειωμένη συγγένεια για την 5-φθορο-ουρακίλη [K_i 1.7 μ M έναντι 0.8 μ M το RutG(wt)] και κυρίως για την ξανθίνη (K_i 60.6 μ M ο μεταφορέας αγρίου τύπου και 304.3 μ M το S87A). Το A88F/A308G αναγνωρίζει ισχυρότερα από τον μεταφορέα αγρίου τύπου και τα τέσσερα αυτά ανάλογα (οξυπουρινόλη, θυμίνη, ξανθίνη, 5-φθορο-ουρακίλη με K_i 0.1-5.7 μ M) ενώ τα αντίστοιχα μονά μεταλλάγματα (A88F και A308G) αναγνωρίζουν ισχυρότερα ξανθίνη [K_i 33.8 μ M το A88F, 1.6 μ M το A308G έναντι 60.6 μ M το RutG(wt)] και οξυπουρινόλη [K_i 16.6 μ M το A88F, 19.5 μ M το A308G έναντι 41.7 μ M το RutG(wt)]. Η κινητική ανάλυση των μεταλλαγμάτων έδειξε ότι η συγγένεια της ουρακίλης είναι σημαντικά μειωμένη στην περίπτωση του A88F/A308G (K_m 12.9 μ M) ενώ τα μεταλλάγματα S87A και A88F έχουν αυξημένη συγγένεια για την ουρακίλη (0.4 και 1.0 μ M αντίστοιχα) (Εικόνα 3.4.5).



Εικόνα 3.4.5 Σύγκριση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα RutG.

A. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ουρακίλης (0.1 μM , 25°C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1mM, 2min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔuraA με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που φέρουν τις αντίστοιχες κατασκευές χωρίς την επίδραση των προσδετών, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα B. Κινητική ανάλυση. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ουρακίλης (0.04 μM -40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5sec, από διπλά δείγματα σε κάθε πείραμα. Οι τιμές K_m και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα. Γ. Ανάλυση ανταγωνισμού της πρόσληψης [^3H]ουρακίλης (0.1 μM) από τα μη ραδιοσημασμένα ανάλογα που φαίνονται, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.01-600 μM . Οι τιμές IC_{50} εξάγονται με την βοήθεια του προγράμματος Prism6 (S.D. <20%) και δίνονται οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i), όπως προκύπτουν από την αναγωγή με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = \text{IC}_{50}/(1+L/K_m)$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Στην περίπτωση των αντίστοιχων μεταλλάγματων του UraA τα S72A, S72T, G289A, F73A/G289A αναγνωρίζουν μόνο υποστρώματα ή προσδέτες που αναγνωρίζει και ο μεταφορέας αγρίου τύπου (ουρακίλη, 5-FU). Το μετάλλαγμα G289A αναγνωρίζει την 5-FU με σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου [K_i 18.1 μ M έναντι 2.5 μ M του UraA(wt)] ενώ το S87T αναγνωρίζει την 5-FU 6 φορές ισχυρότερα [K_i 0.4 μ M] (Εικόνα 3.4.6). Μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το μετάλλαγμα F73A το οποίο, εκτός της 5-FU [που την αναγνωρίζει με την ίδια συγγένεια όπως και ο UraA(wt)], αναγνωρίζει και θυμίνη, ένα υπόστρωμα που αναγνωρίζεται (και μεταφέρεται) μόνο από τον μεταφορέα RutG. Το F73A αναγνωρίζει θυμίνη ισχυρά με K_i 9.5 μ M (ο UraA(wt) δεν αναγνωρίζει θυμίνη) και είναι το μοναδικό μετάλλαγμα που διαφοροποιείται τόσο σημαντικά από το προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα αγρίου τύπου. Το F73A μπορεί και μεταφέρει θυμίνη σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 3.4.7). Η κινητική ανάλυση των ενεργών μεταλλαγμάτων του UraA έδειξε ότι τα μεταλλάγματα F73A και G289A έχουν μειωμένη συγγένεια (αυξημένη K_m) για την ουρακίλη (K_m 4.0 μ M και 4.1 μ M, αντίστοιχα, ενώ ο UraA(wt) έχει K_m για την ουρακίλη 1.4 μ M) και το φαινόμενο αυτό γίνεται ιδιαίτερα έντονο στο διπλό μετάλλαγμα F73A/G289A που έχει πολύ μειωμένη συγγένεια ουρακίλης (περίπου 26 φορές) σε σχέση με τον UraA(wt) (K_m 36.8 μ M) (Εικόνα 3.4.6), πράγμα, βέβαια, που συμφωνεί και με την πολύ μικρή του ενεργότητα στη δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1 μ M ουρακίλης (Εικόνα 3.4.4).



B Κινητική ανάλυση

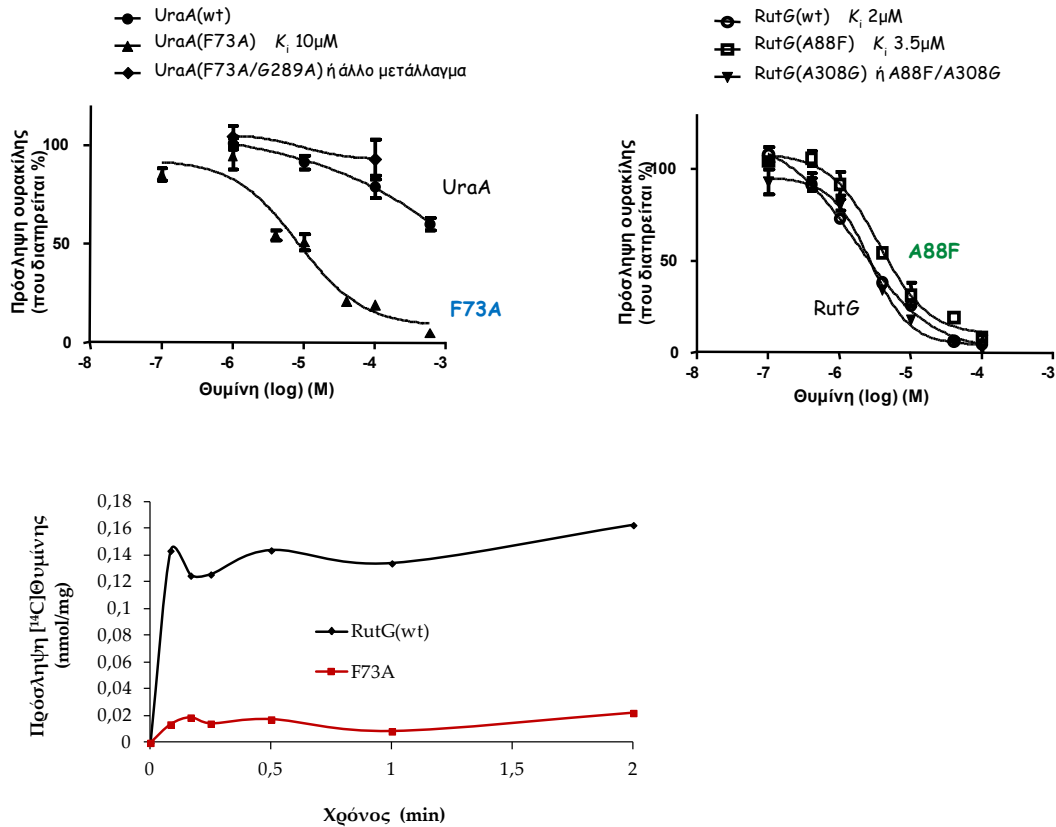
Περγμείωση	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol}/\text{mg min}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{mg min}$)
UraA(wt)	1.4 ± 0.4	4.0 ± 0.3	2857
S72A	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1076
S72T	2.6 ± 0.5	2.8 ± 0.2	1077
F73A	4.0 ± 1.3	3.3 ± 0.5	825
G289A	4.1 ± 1.1	1.7 ± 0.2	414
F73A/G289A	36.8 ± 15.9	3.8 ± 1.3	103

Γ Πίνακας τιμών K_i (μM)

Περγμείωση	Θυμίνη	5-φθορο-ουρακίλη
UraA(wt)	ND	2.5
S72A	ND	4.1
S72T	ND	0.4
F73A	9.8	2.7
G289A	ND	18.1
F73A/G289A	ND	6.3

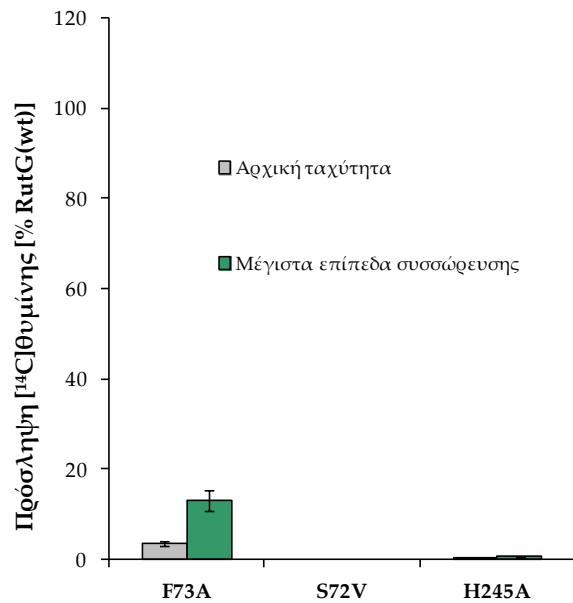
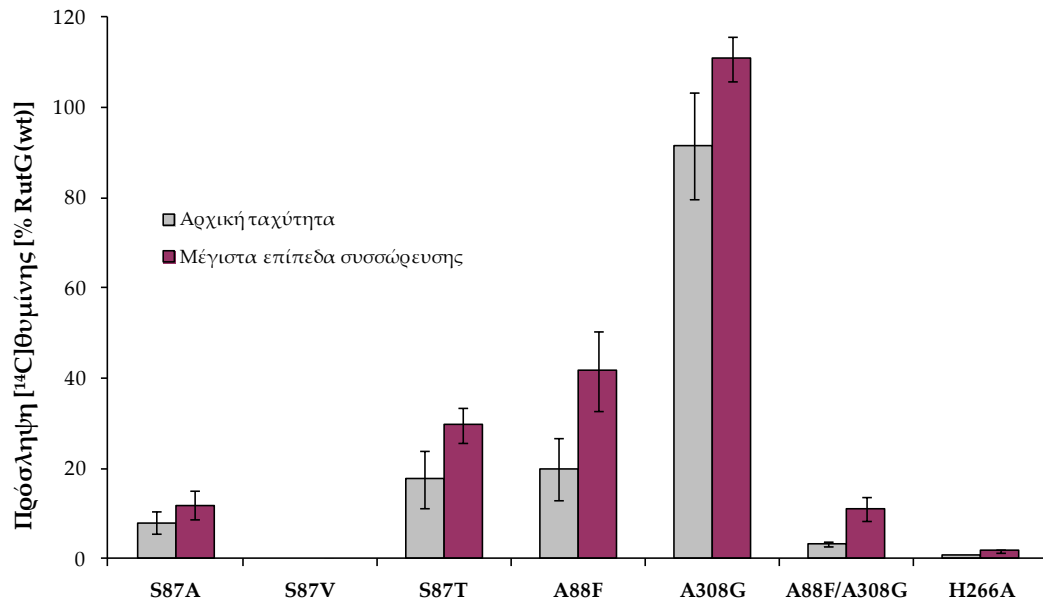
Εικόνα 3.4.6 Σύγκριση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων του μεταφορέα UraA.

A. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (0.1 μM , 25°C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1mM, 2min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔuraA με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που φέρουν τις αντίστοιχες κατασκευές χωρίς την επίδραση των προσδετών, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. **B.** Κινητική ανάλυση. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (0.04 μM -40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5sec, από διπλά δείγματα σε κάθε πείραμα. Οι τιμές K_m και V_{max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο ανεξάρτητα πειράματα. **Γ.** Ανάλυση ανταγωνισμού τη πρόσληψης [³H]ουρακίλης (0.1 μM) από τα μη ραδιοσημασμένα ανάλογα που φαίνονται, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.01-600 μM . Οι τιμές IC_{50} εξαγονται με την βοήθεια του προγράμματος Prism6 (S.D. <20%) και δίνονται οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i), όπως προκύπτουν από την αναγωγή με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973).



Εικόνα 3.4.7 Ιδιότητες των μεταλλαγμάτων στη θέση F73/A88 (TM3) του UraA και του RutG ως προς την αναγνώριση της θυμίνης. (Διαγράμματα στο πάνω μέρος) Ανταγωνισμός πρόσληψης [³H]ουρακίλης από θυμίνη. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης 0.1μM για 5sec (διπλά δείγματα κάθε πειράματος) μετά από έκθεση σε μη σημασμένη θυμίνη (0.0-600μM, 2min). Οι τιμές IC₅₀ εξαγονται με την βοήθεια του προγράμματος Prism6 και παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αντιπροσωπευτικά γραφήματα από δύο πειράματα. Οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) των τιμών IC₅₀ είναι <20%. οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i), όπως προκύπτουν από την αναγωγή με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973). (Διάγραμμα στο κάτω μέρος) **Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς θυμίνης.** Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 2μM [¹⁴C]θυμίνης για χρόνους 5sec-5min. (βλ.Κεφ.2.8.1) Έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5), οι οποίες σε κάθε περίπτωση ήταν <20% των αντίστοιχων τιμών του F73A, οι καμπύλες είναι αντιπροσωπευτικές από τρία πειράματα.

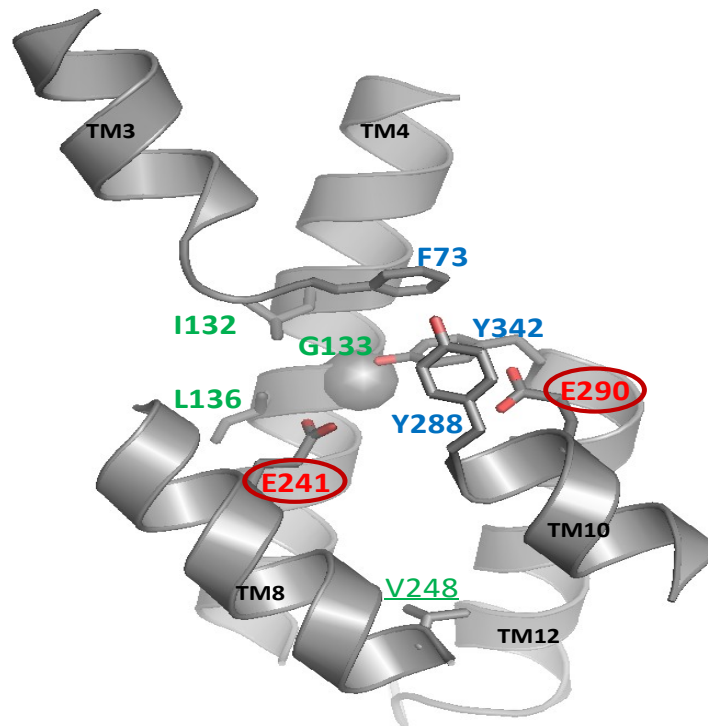
Τέλος πειράματα ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]θυμίνης (2μM) (Εικόνα 3.4.8) έδειξαν ότι τα μεταλλάγματα του RutG που είναι ανενεργά ως προς την ουρακίλη δεν μεταφέρουν ούτε θυμίνη (S87V, H266A). Τα μεταλλάγματα S87A, S87T, A88F/A308G έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα αρχικής ταχύτητας πρόσληψης θυμίνης που δεν ξεπερνά το 20% και τα A88F και A308G εμφανίζουν λίγο υψηλότερα επίπεδα της τάξεως του 20-30% σε σχέση με το μεταφορέα RutG(wt). (Εικόνα 3.4.8)



Εικόνα 3.4.8 Ενεργότητες μεταφοράς θυμίνης από μεταλλάγματα του RutG και του UraA. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 2μM [¹⁴C]θυμίνης για χρόνους 5sec-5min. (βλ.Κεφ.2.8.1). Οι αρχικές ταχύτητες μετρούνται σε χρόνους 5sec και τα μέγιστα επίπεδα σε χρόνους 1-5min. Αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών του θετικού μάρτυρα [RutG(wt) και UraA(wt), αντίστοιχα,] με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.

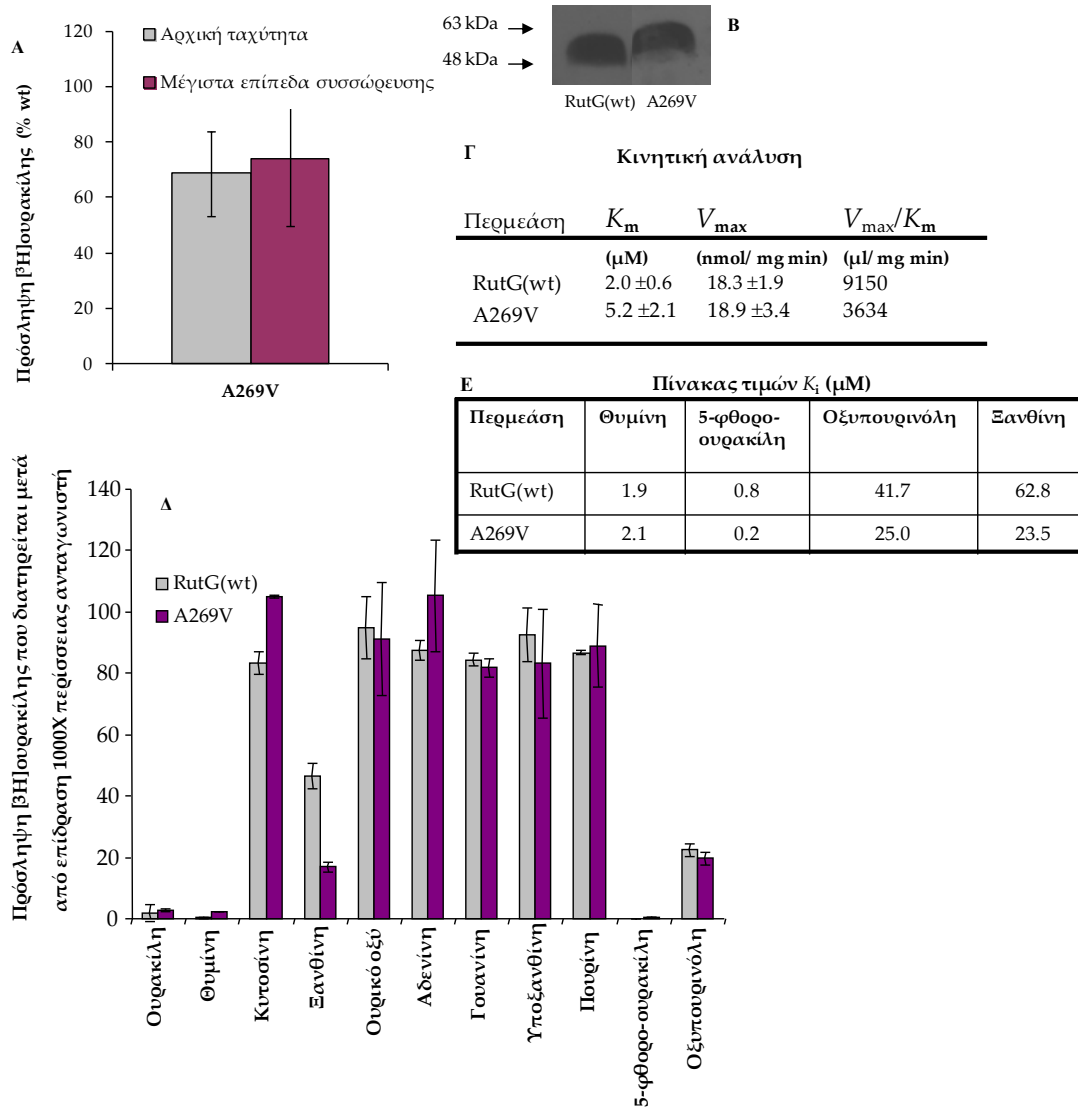
3.4.5 Μεταλλαξιγένεση των RutG και UraA σε άλλες θέσεις κοντά στο κέντρο δέσμευσης

Με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) καθώς και την δομική στοίχισή του με τον μεταφορέα RutG, εντοπίστηκαν και άλλες θέσεις καταλοίπων, στην περιφέρεια του κέντρου δέσμευσης, τα οποία φαίνεται να συνεισφέρουν σε αλληλεπιδράσεις, κυρίως υδρόφοβες, που σταθεροποιούν τα μη ελικοειδή τμήματα των TM3 και TM10 στη δομική περιοχή «πυρήνα» καθώς και την μεσεπιφάνεια μεταξύ των δομικών περιοχών «πυρήνα» και «εισόδου» (Lu *et al.*, 2011) και θα μπορούσε να παίζουν ρόλο στον μηχανισμό μεταφοράς της ουρακίλης (Evangelidis and Mikros, unpublished results). Από αυτές, ξεχωρίζει η θέση V248/A269 (TM8, από την κυτταροπλασματική πλευρά του κέντρου δέσμευσης) όπου ο UraA έχει Val και ο RutG Ala [θέση που πιθανόν αλληλεπιδρά με υδρόφοβα αμινοξέα του TM10], καθώς και οι συντηρημένες θέσεις Ile-132 και Leu-136 (TM4) που αλληλεπιδρούν με άλλα υδρόφοβα αμινοξέα από την περιπλασματική πλευρά των TM3 και TM10 (βλ. Εικόνα 3.4.9). Στον XanQ (Frillingos, 2012; Karena *et al.*, 2015) οι αντίστοιχες θέσεις του TM4 δεν έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση ενώ η αντίστοιχη θέση του TM8, A279, έχει φανεί ότι υπόκειται σε στερεοχημικούς περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή της και μπορεί να αντικατασταθεί με διατήρηση υψηλής ενεργότητας μόνο από αμινοξέα μικρού όγκου (Gly ή Ser) ενώ η αντικατάσταση με μεγαλύτερες πλευρικές ομάδες (Cys, Val, Asn, Thr) οδηγεί σε απενεργοποίηση (ή ενεργότητα <15% για το A279T) ή μηδενικά πρωτεϊνικά επίπεδα στη μεμβράνη (Mermelekas *et al.*, 2010). Για να εξετασθεί ο ρόλος των παραπάνω θέσεων στον UraA και/ή RutG, κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν λειτουργικά τα μεταλλάγματα A269V του RutG και V248A, I132A/L136A και I132F/G133L/L136F του UraA.



Εικόνα 3.4.9 Το κέντρο δέσμευσης του UraA. Το δομικό μοντέλο του μεταφορέα UraA με βάση την κρυσταλλική του δομή (PDB 3QE7) οπτικοποιήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL. Απεικονίζονται τμήματα των ελίκων TM3, TM4, TM8, TM10 και TM12. Τα δύο κατάλοιπα γλουταμικού (E241, E290) που συνδέονται άμεσα με το υπόστρωμα με δεσμούς υδρογόνου είναι με κόκκινο χρώμα και τα αρωματικά κατάλοιπα (F73, Y288, Y342) που συμμετέχουν με αλληλεπιδράσεις van der Waals και αλληλεπιδράσεις στοιβάγματος (stacking) είναι με μπλε χρώμα, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011). Με πράσινο τονίζονται τα κατάλοιπα που αποτέλεσαν στόχους μεταλλαξιογένεσης και με πράσινο και υπογράμμιση η θέση που διαφέρει μεταξύ UraA και RutG στην TM8.

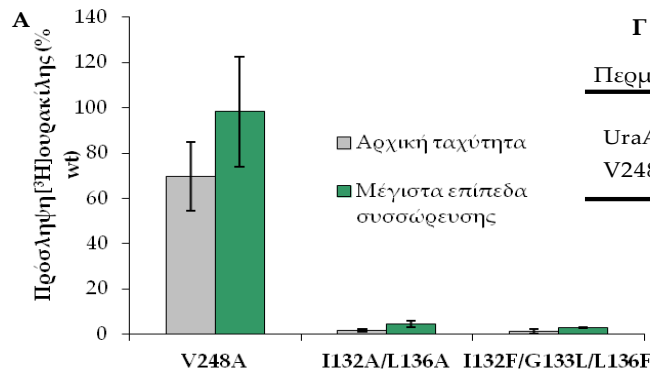
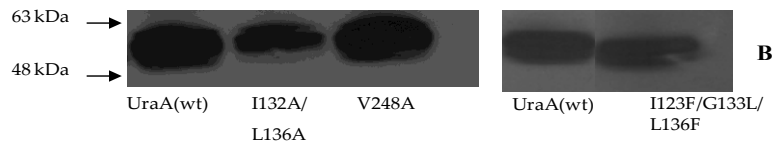
Όλα τα μεταλλάγματα ελέγχθηκαν αρχικά με ανοσοαποτύπωση Western και βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα στην μεμβράνη των κυττάρων είναι σε παρόμοια επίπεδα με τα αντίστοιχα των μεταφορέων αγρίου τύπου (Εικόνες 3.4.10 και 3.4.11). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ουρακίλης έδειξε ότι μόνο τα μεταλλάγματα A269V (RutG) και V248A (UraA) είναι σε θέση να μεταφέρουν το υπόστρωμα με αρχική ταχύτητα της τάξεως του 60% σε σχέση με τους αντίστοιχους μεταφορείς αγρίου τύπου, ενώ τα μεταλλάγματα I132A/L136A και I132F/G133L/L136F (UraA) έχουν μηδενικά επίπεδα πρόσληψης ουρακίλης (Εικόνα 3.4.10 και 3.4.11). Ως προς την ικανότητα των μεταλλαγμάτων αυτών να μεταφέρουν θυμίνη, το A269V (RutG) μεταφέρει θυμίνη σε υψηλά επίπεδα, όπως αναμένεται, και μάλιστα υψηλότερα (160%) του RutG(wt), ενώ τα μεταλλάγματα του UraA V248A, I132A/L136A και I132F/G133L/L136F δεν μεταφέρουν ούτε θυμίνη (Εικόνα 3.4.12).



Εικόνα 3.4.10 Λειτουργική ανάλυση του μεταλλάγματος A269V (RutG) ως προς την μεταφορά ουρακίλης. **A.** Ενεργότητα μεταφοράς ουρακίλης, Κύτταρα *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμιδιακούς φορείς pT7-5/RutG(wt)-BAD (θετικός μάρτυρας), pT7-5/RutG(A269V)-BAD ή pT7-5/-BAD (αρνητικός μάρτυρας) υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1 μM [^3H]ουρακίλης για χρόνους 5sec-5min. (βλ. Κεφ.2.8.1) Από τα δεδομένα έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Δίνονται μέσοι όροι των τελικών τιμών (% του RutG(wt)) και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα. **B.** Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -περοξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000. **Γ. Κινητική ανάλυση.** Κύτταρα *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιοενεργά σημασμένων υποστρωμάτων [^3H]ουρακίλης (0.04 μM -40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5sec. Οι τιμές K_m και V_{max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6. Οι τιμές δίνονται με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο ανεξάρτητα πειράματα. **Δ. Ανταγωνισμός από μη ραδιοσημασμένα ανάλογα.** Κύτταρα *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ουρακίλης (0.1 μM , 25°C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσοδότες (0.1mM, 2min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔuraA με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν εκτεθεί σε δυνητικούς προσοδότες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. **Ε. Οι τιμές IC_{50}** εξαγονται με την βοήθεια του προγράμματος Prism6 (S.D. <20%) και δίνονται οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i), όπως προκύπτει από την αναγωγή με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = \text{IC}_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

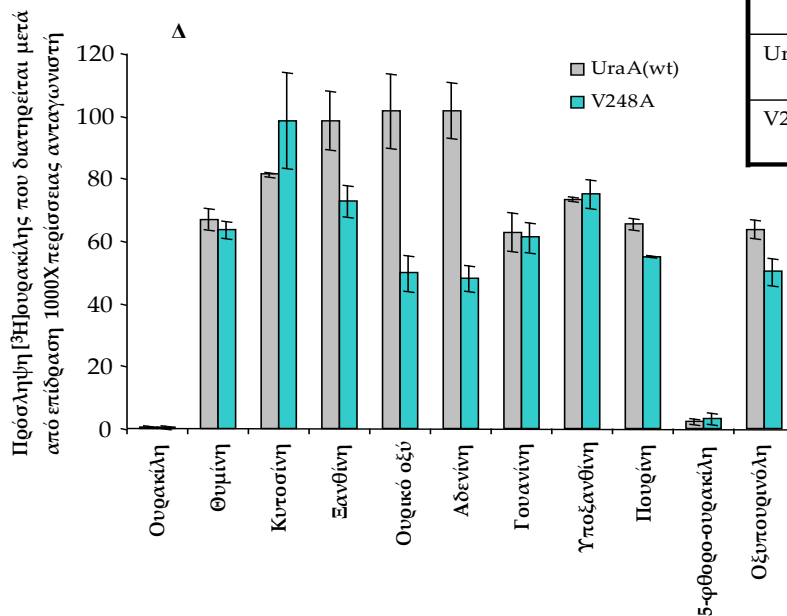
Πειράματα ανταγωνισμού και κινητική ανάλυση των ενεργών μεταλλαγμάτων V248A (UraA) και A269V (RutG) δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά στο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με τους μεταφορείς αγρίου τύπου (Εικόνες 3.4.10 και 3.4.11). Παρόλα αυτά, διαφαίνεται μια τάση για διεύρυνση της εξειδίκευσης με το μετάλλαγμα A269V του RutG και, περισσότερο, με το V248A του UraA. Το A269V έχει μειωμένη κινητική συγγένεια για τη μεταφορά ουρακίλης σε σχέση με τον RutG(wt) (K_m 5.2 μ M και 2.0 μ M, αντίστοιχα) αναγνωρίζει όμως 5-FU, ξανθίνη και οξυπουρινόλη με μεγαλύτερη συγγένεια (K_i 0.2 μ M, 23.5 μ M και 25.0 μ M έναντι 0.8 μ M, 62.8 μ M, 41.7 μ M, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.4.10). Το V248A έχει παρόμοια κινητική συγγένεια για την ουρακίλη με τον UraA(wt) (K_m 2.1 μ M και 1.4 μ M, αντίστοιχα) και αναγνωρίζει την 5-FU με μικρότερη συγγένεια [K_i 10.8 μ M έναντι 2.5 μ M του UraA(wt)], αλλά φαίνεται να αναγνωρίζει σε μικρό βαθμό (50% αναστολή με ανταγωνισμό σε περίσσεια 1000x) ορισμένα νέα υποστρώματα (όπως ουρικό οξύ και αδερίνη) (Εικόνα 3.4.11).

Συνοπτικά, φαίνεται ότι τα ογκώδη υδρόφοβα αμινοξέα I132 και L136 του TM4 έχουν κάποιο σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό καθώς τόσο η μείωση του όγκου των πλευρικών ομάδων (I132A/L136A) όσο και η επιπλέον προσθήκη όγκου αλλά με συμπαγέστερη δομή (Phe) στην υδρόφοβη πλευρική ομάδα (I132F/G133L/ L136F) οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση (Εικόνες 3.4.11 και 3.4.12). Ο ρόλος αυτός θα μπορούσε να αποδοθεί σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με κομβικά κατάλοιπα των TM3 και TM10. Για παράδειγμα, η I132 βρίσκεται κοντά στην F73 που συμμετέχει στο κέντρο δέσμευσης της ουρακίλης (Εικόνα 3.4.9) και είδαμε από τα προηγούμενα ότι είναι σημαντική για την εξειδίκευση (βλ. Εικόνα 3.4.7). Από την άλλη πλευρά, ο ρόλος της V248 (UraA) ή A269 (RutG) στο TM8 είναι λιγότερο έντονος, σε αντίθεση με την περίπτωση του XanQ (Mermelekas *et al.*, 2010; Frillingos, 2012) όπου φαίνεται ότι η αύξηση του όγκου της υδρόφοβης πλευρικής ομάδας (Ala) στη θέση αυτή καταστρέφει την ενεργότητα. Ωστόσο, η μείωση του όγκου της Val στη θέση V248 του UraA (αλλαγή σε Ala) φαίνεται να επιτρέπει αναγνώριση και άλλων υποστρωμάτων ή προσδετών εκτός από τα κανονικά (ουρακίλη, 5-FU), πράγμα που υποδηλώνει ότι μπορεί να συμμετέχει σε ένα φίλτρο επιλογής αναλόγων που αποτρέπει την πρόσβαση μη κανονικών υποστρωμάτων στο κέντρο δέσμευσης. Αυτό το σημείο, ωστόσο, θα πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο.



Γ Κινητική ανάλυση

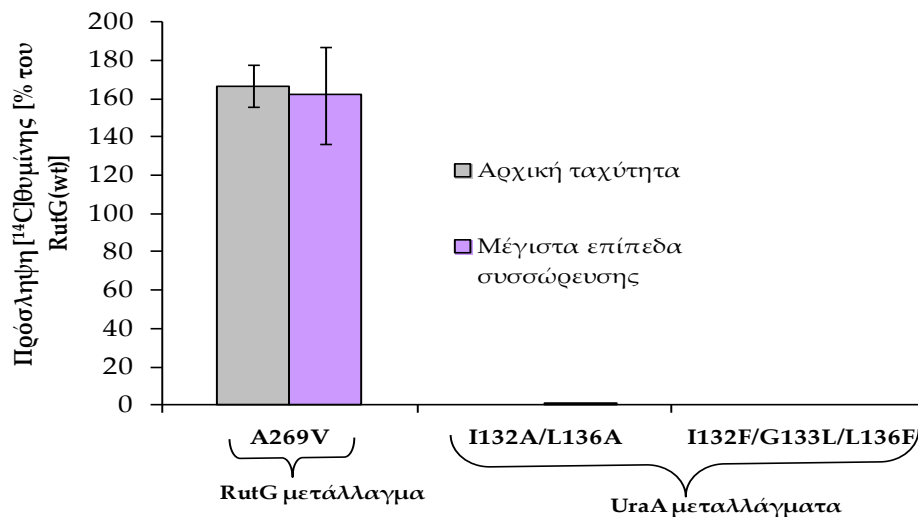
Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} (nmol/ mg min)	V_{max}/K_m (μl/ mg min)
UraA(wt)	1.4 ± 0.4	4.1 ± 0.3	9150
V248A	2.1 ± 0.2	1.3 ± 0.1	619



Ε Πίνακας τιμών K_i (μM)

Περμεάση	5-φθορο-ουρακίλη
UraA(wt)	2.5
V248A	10.8

Εικόνα 3.4.11 Λειτουργική ανάλυση των V248A, I132A/L136A, I132F/G133L/L136F (UraA) ως προς την μεταφορά ουρακίλης. Α. Ενεργότητα μεταφοράς ουρακίλης. Κύτταρα *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμιδιακούς φορείς pT7-5/UraA(wt)-BAD (θετικός μάρτυρας), pT7-5/UraA(mutant)-BAD ή pT7-5/-BAD (αρνητικός μάρτυρας) υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1μM [³H]ουρακίλης για χρόνους 5sec-5min. (βλ. Κεφ.2.8.1) Αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Δίνονται οι μέσοι όροι των τελικών τιμών που υπολογίζονται [% του UraA(wt)] και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα. **Β. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης.** Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000. **Γ. Κινητική ανάλυση.** Κύτταρα *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (0.04μM-40μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5sec. Οι τιμές K_m και V_{max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6. Οι τιμές δίνονται με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο ανεξάρτητα πειράματα. **Δ. Ανταγωνισμός από μη ραδιοσημασμένα ανάλογα.** Κύτταρα *E. coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (0.1μM, 25°C) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1mM, 2min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔuraA με κενό φορέα pT7-5) και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν εκτεθεί σε δυνητικούς προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. **Ε. Οι τιμές IC_{50}** εξαγονται με την βοήθεια του προγράμματος Prism6 (S.D. <20%) και δίνονται οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i), όπως προκύπτει από την αναγωγή με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973).



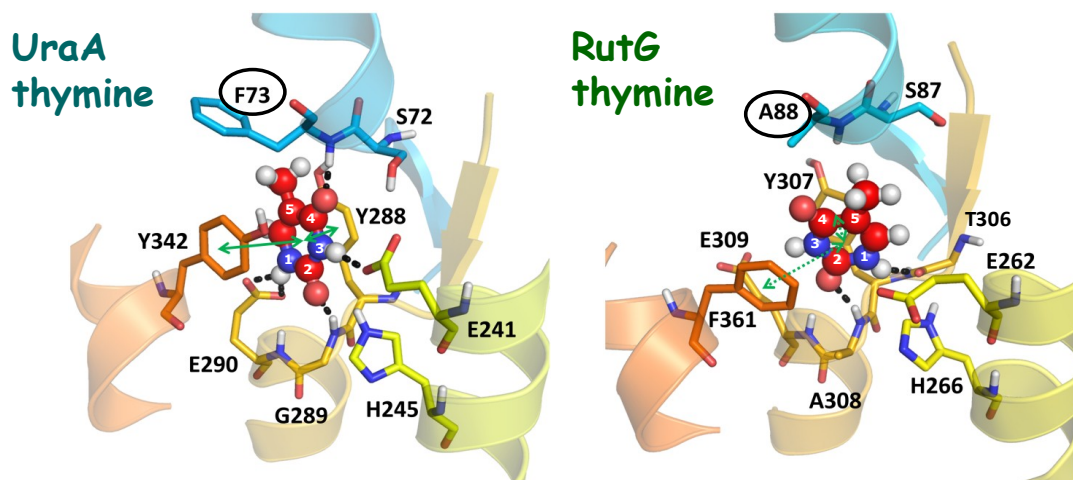
Εικόνα 3.4.12 Λειτουργική ανάλυση των A269V (RutG), V248A, I132A/L136A, I132F/G133L/L136F (UraA) ως προς την μεταφορά θυμίνης. Κύτταρα *E.coli* ΔuraA (JW2482) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμιδιακούς φορείς pT7-5/RutG-BAD ή pT7-5/UraA-BAD με τις μεταλλάξεις που φαίνονται υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 2μM [¹⁴C]θυμίνης για χρόνους 5sec-5min. (βλ. Κεφ.2.8.1) Αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Δίνονται μέσοι όροι των τελικών τιμών που υπολογίζονται [% του RutG(wt)] με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

3.4.6 Η εξειδίκευση των βακτηριακών μεταφορέων ουρακίλης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την F73

Με βάση τα αποτελέσματα από την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στους μεταφορείς UraA και RutG της *E.coli* προκύπτει ότι η θέση H245/H266 στην έλικα 8 (TM8) (Εικόνα 3.4.13) είναι αναντικατάστατη και στους δύο μεταφορείς. Στη θέση αυτή δεν υπάρχει μεγάλη συντήρηση της πλευρικής ομάδας που συναντάται στους διάφορους μεταφορείς NAT/NCS2, αν και συχνά απαντάται δυνητικά ιονιζόμενο αμινοξύ, His ή Asp (βλ. κεφάλαιο 3.6). Ωστόσο, η αντίστοιχη θέση σε άλλους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 έχει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ (D276) απαιτείται καρβοξυλομάδα προκειμένου ο μεταφορέας να έχει υψηλά επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης (Mermelekas *et al.*, 2010), στον μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος SmLL9 η αντίστοιχη καρβοξυλομάδα (D266) είναι ουσιαστικά αναντικατάστατη (Κεφ. 3.2), όπως επίσης και στον μεταφορέα υποξανθίνης/γουανίνης YjcD (T275) (Κεφ. 3.3). Η θέση αυτή βρίσκεται στην έλικα 8 (TM8) μία στροφή α -έλικας μετά το E242 (UraA) το οποίο είναι απόλυτα συντηρημένο και αναντικατάστατο για την λειτουργία πολλών ομόλογων μεταφορέων που έχουν μελετηθεί, όπως σε όλους τους μελετημένους μεταφορείς ουρικού και/ή ξανθίνης της COG2233 (βλ. Κεφ. 3.2) και μεταφορείς αδενίνης, υποξανθίνης και/ή γουανίνης της COG2252 (Κεφ. 3.3), και φαίνεται να συμμετέχει άμεσα στην πρόσδεση του υποστρώματος (Εικόνα 3.4.13). Τα δύο αυτά κατάλοιπα του TM8 έχει προταθεί ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην δέσμευση του υποστρώματος όσο και στην συμμεταφορά του H⁺, με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) και την μελέτη μοριακής δυναμικής του UapA (Kosti *et al.*, 2012).

Το σημαντικότερο, ίσως, εύρημα είναι ότι η αντικατάσταση της Phe στη θέση F73 (TM3) του UraA με Ala αλλάζει δραστικά την εξειδίκευση οδηγώντας σε ισχυρή αναγνώριση θυμίνης και ικανότητα μεταφοράς της θυμίνης σε χαμηλά επίπεδα (η θυμίνη δεν αναγνωρίζεται από τον μεταφορέα αγρίου τύπου). Αντίστροφη επίδραση στον μεταφορέα RutG με την αλλαγή της A88 σε Phe (δηλαδή εξάλειψη της ικανότητας μεταφοράς θυμίνης) δεν παρατηρείται. Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) η F73 συμβάλλει άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος (ουρακίλης) μέσω δεσμού υδρογόνου από το αμιδικό άζωτο του πεπτιδικού σκελετού στη θέση αυτή και αλληλεπίδρασης του αρωματικού δακτυλίου της πλευρικής της ομάδας με την πυριμιδίνη. Η μελέτη μοριακής δυναμικής στον μεταφορέα UraA (ερευνητική ομάδα κ. Μικρού, Φαρμακευτική ΕΚΠΑ) έδειξε ότι η F73 σταθεροποιεί την ουρακίλη στο κέντρο δέσμευσης ενώ με υπόστρωμα την θυμίνη ο αρωματικός δακτύλιος της φαινυλαλανίνης στρέφεται έξω από το κέντρο δέσμευσης. Όταν αντικατασταθεί από Ala, ένα πολύ μικρότερο αμινοξύ, τότε η ουρακίλη μπορεί να συγκρατηθεί στο κέντρο δέσμευσης με διαφορετικές, πιο χαλαρές

αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 3.4.13). Ο μηχανισμός αυτός δίνει μια πιθανή εξήγηση για το πώς το F73A μπορεί να αναγνωρίζει την θυμίνη ισχυρά.



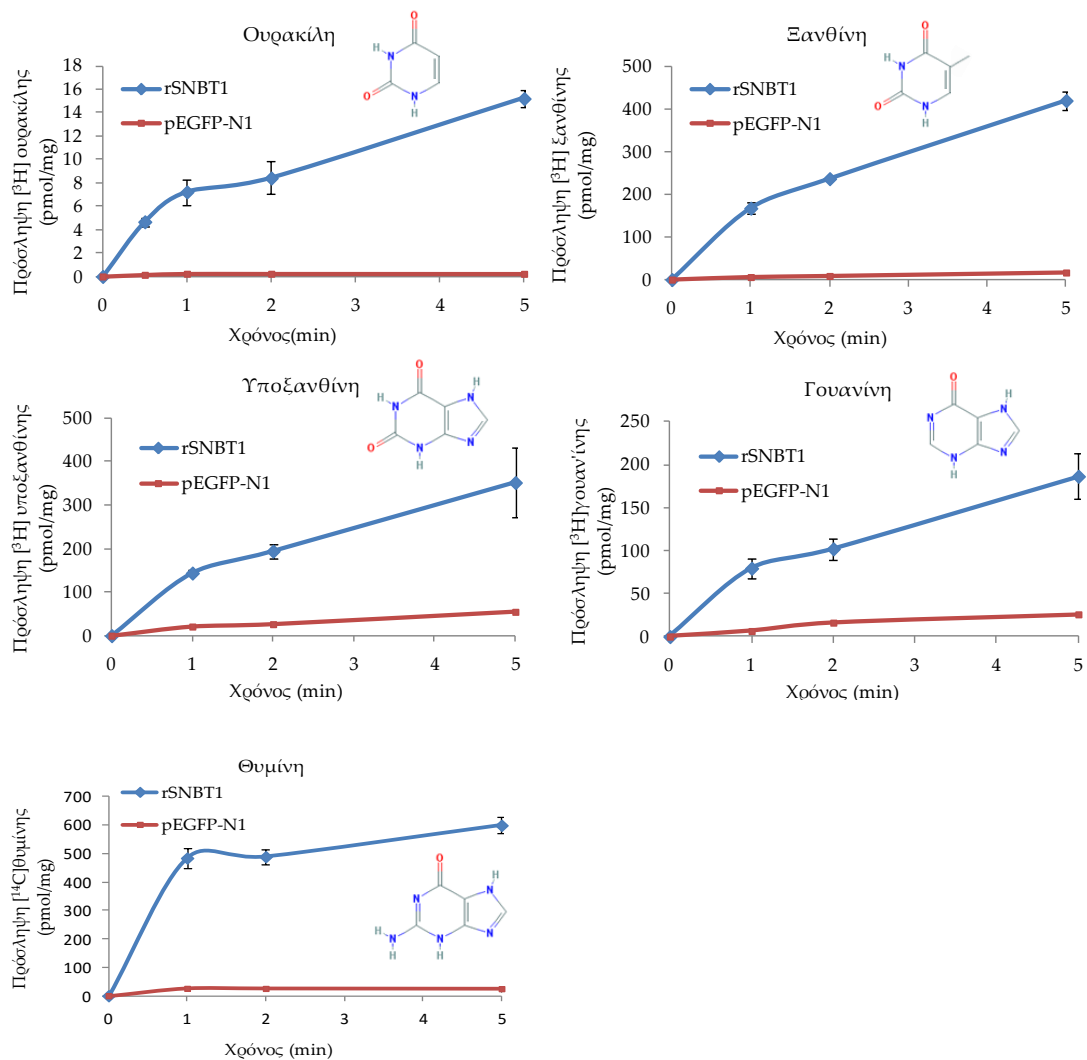
Εικόνα 3.4.13 Προσομοίωση δέσμευσης της θυμίνης από τους μεταφορείς UraA και RutG. Εικόνες προσομοίωσης της πρόσδεσης της θυμίνης σε UraA και RutG, από αναλύσεις induced-fit docking με βάση το δομικό πρότυπο UraA 3QE7. Η RutG προσδένει την θυμίνη με διαφορετικές αλληλεπιδράσεις από ό,τι η UraA, όπου συμμετέχουν κυρίως δεσμοί υδρογόνου με θέσεις του πεπτιδικού σκελετού των Ala-308 και Thr-306 και π-stacking με τις Tyr-307 και Phe-361, ενώ δεν συμμετέχουν οι πλευρικές ομάδες των Glu-309 και Glu-362 (αντίθετα με τις αντίστοιχες Glu-241 και Glu-290 της UraA). Οι α -έλικες φαίνονται με γαλάζιο (α 3), χρυσοπράσινο (TM8), μπλε (α 10) ή καφέ (TM12). Η δομική ανάλυση έγινε από την συνεργαζόμενη ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Φαρμακευτικής Σχολής Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών), με μοριακή μοντελοποίηση, θεωρητική συναρμογή του υποστρώματος (ουρακίλης) στο κέντρο δέσμευσης (induced-fit docking) και μελέτη μοριακής δυναμικής (Evangelidis & Mikros, unpublished).

3.5 Μελέτη του ευκαρυωτικού μεταφορέα rSNBT1

3.5.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός σε κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης

Ο μεταφορέας rSNBT1 είχε χαρακτηριστεί από τους Yamamoto et al., (2010), οι οποίοι είχαν αποδείξει ότι μεταφέρει [³H]ουρακίλη και [³H]ξανθίνη με σχετικά υψηλή συγγένεια και ότι αναγνωρίζει αρκετές ακόμη πουρίνες (γουανίνη, υποξανθίνη, οξυπουρινόλη) ή πυριμιδίνες (θυμίνη, 5-FU) σε πειράματα ανταγωνισμού. Λόγω της ευρείας αυτής εξειδίκευσης και της σημαντικής δομικής συγγένειας που έχει ο rSNBT1 με τους πιο εξειδικευμένους μεταφορείς πυριμιδινών που μελετήσαμε στην προηγούμενη ενότητα από την *Escherichia coli* K-12 (ταυτότητα καταλοίπων 26.7% με τον UraA και 27.1% με τον RutG), ασχοληθήκαμε πιο συστηματικά με τον rSNBT1 με στόχο να προσπαθήσουμε να κατανοήσουμε αυτή την ευρύτερη εξειδίκευση που παρουσιάζει. Καταρχήν εξετάσαμε το λειτουργικό προφίλ στο δικό μας πειραματικό σύστημα που αναπτύξαμε για την μελέτη του, χρησιμοποιώντας τα ίδια κύτταρα όπως οι Yamamoto et al.,(2010) (HEK293) αλλά σε πειράματα σταθερής διαμόλυνσης (βλ. Μέθοδοι, Κεφ. 2.11-2.13) και εξετάσαμε ως προς την δυνατότητα μεταφοράς όλων των πιθανών νουκλεοτιδικών βάσεων.

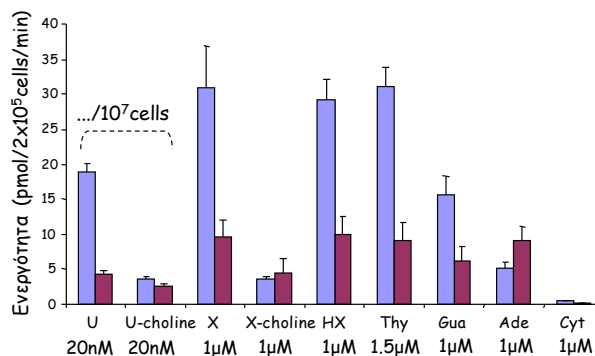
Μετά την ένθεση του cDNA του rSNBT1(wt) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1 ακολούθησε η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293 προκειμένου να κατασκευαστεί η κυτταρική σειρά που θα εκφράζει σταθερά τον μεταφορέα (βλ. Κεφ.2.12). Για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του μεταφορέα τα κύτταρα σταθερής διαμόλυνσης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς υποστρωμάτων και βρέθηκε ότι ο μεταφορέας rSNBT1 εκτός από τον ουρακίλη και ξανθίνη (Yamamoto et al., 2010) μεταφέρει επίσης θυμίνη, υποξανθίνη και γουανίνη με υψηλή συγγένεια (Εικόνα 3.5.1). Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι η συγγένεια της ουρακίλης είναι K_m 10.2 μ M, για την θυμίνη είναι K_m 5.7 μ M, για την ξανθίνη K_m 27.5 μ M, για την υποξανθίνη K_m 6.0 μ M και για την γουανίνη η συγγένεια είναι K_m 22.9 μ M (Εικόνα 3.5.2). Επίσης, βρέθηκε ότι ο rSNBT1 δεν μπορεί να μεταφέρει αδενίνη ή κυτοσίνη, ενώ επιβεβαιώθηκε ότι η ενεργότητα μεταφοράς ουρακίλης ή ξανθίνης που διαθέτει εξαρτάται από τα ιόντα Na⁺ (αν το NaCl στο ρυθμιστικό διάλυμα αντικατασταθεί από χλωριούχο χολίνη, η ενεργότητα χάνεται) (Εικόνα 3.5.2) και από τα ανάλογα πουρινών-πυριμιδινών αναγνωρίζει τόσο 5-FU όσο και οξυπουρινόλη, με υψηλή συγγένεια, σε πειράματα ανταγωνισμού (K_i 7 μ M και 20.9 μ M, αντίστοιχα) (Botou et al., 2015).



Εικόνα 3.5.1 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του rSNBT1 σε HEK293 σταθερής διαμόλυνσης. Κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης που εκφράζουν σταθερά τον μεταφορέα rSNBT1 μετά από διαμόλυνση με pEGFP-N1/rsnbt1 καθώς και τα κύτταρα του αρνητικού μάρτυρα που έχουν διαμολυνθεί μόνο με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1 υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης 20nM, [³H]ξανθίνη 1μM, [³H]υποξανθίνη 1μM, [³H]γουανίνη 1μM και [¹⁴C]θυμίνη 3.5μM για 1-5min. Οι πειραματικές λεπτομέρειες δίνονται στα Κεφ. 2-11-2.13 (Μέθοδοι). Οι κυμάνσεις σε κάθε περίπτωση είναι τιμές τυπικής αποκλίσεις (S.D.) από τριπλά δείγματα σε κάθε πείραμα.

	K_M (μM)	V_{\max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	<i>Yamamoto et al. (2010)</i>	
[³ H]Ura	10.2	160.4	21.2	34.8
[¹⁴ C]Thy	5.7	19.7		
[³ H]Xan	27.5	25.5	83.0	13.4
[³ H]HX	6.0	60.5		
[³ H]Gua	22.9	36.2		

HEK293; pEGFP-N1 (stable express.) HEK293; pCI-neo (transient express.)



Εικόνα 3.5.2 (Δεξιά) Κινητική ανάλυση rSNBT1. Για την κινητική ανάλυση έγινε μέτρηση της αρχικής ταχύτητας σε χρόνο 1min και με συγκεντρώσεις ουρακίλης 0.1-40 μM , θυμίνης 1-30 μM , ξανθίνης 0.1-40 μM , υποξανθίνης 0.1-40 μM και γουανίνης 0.1-40 μM , σε κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης (βλ. Εικόνα 3.5.1). Οι τιμές K_M και V_{\max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism6*, με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <20%. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αυτά των *Yamamoto et al.*, (2010). (Αριστερά) **Επίπεδα ενεργότητας του rSNBT1 με σημασμένα φυσικά υποστρώματα.** Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης [βλ. Κεφ. 2.11-2.13 (Μέθοδοι)] σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (20nM), [³H]ουρακίλης (1 μM), [³H]υποξανθίνη (1 μM), [¹⁴C]θυμίνη (1.5 μM), [³H]γουανίνη (1 μM), [³H]αδενίνη (1 μM) και [³H]κυτοσίνη (1 μM). Η χολίνη αντικαθιστά το NaCl στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά την δοκιμασία ενεργού μεταφοράς προκειμένου να μελετηθεί η εξάρτηση της ενεργότητας του μεταφορέα από το Na⁺.

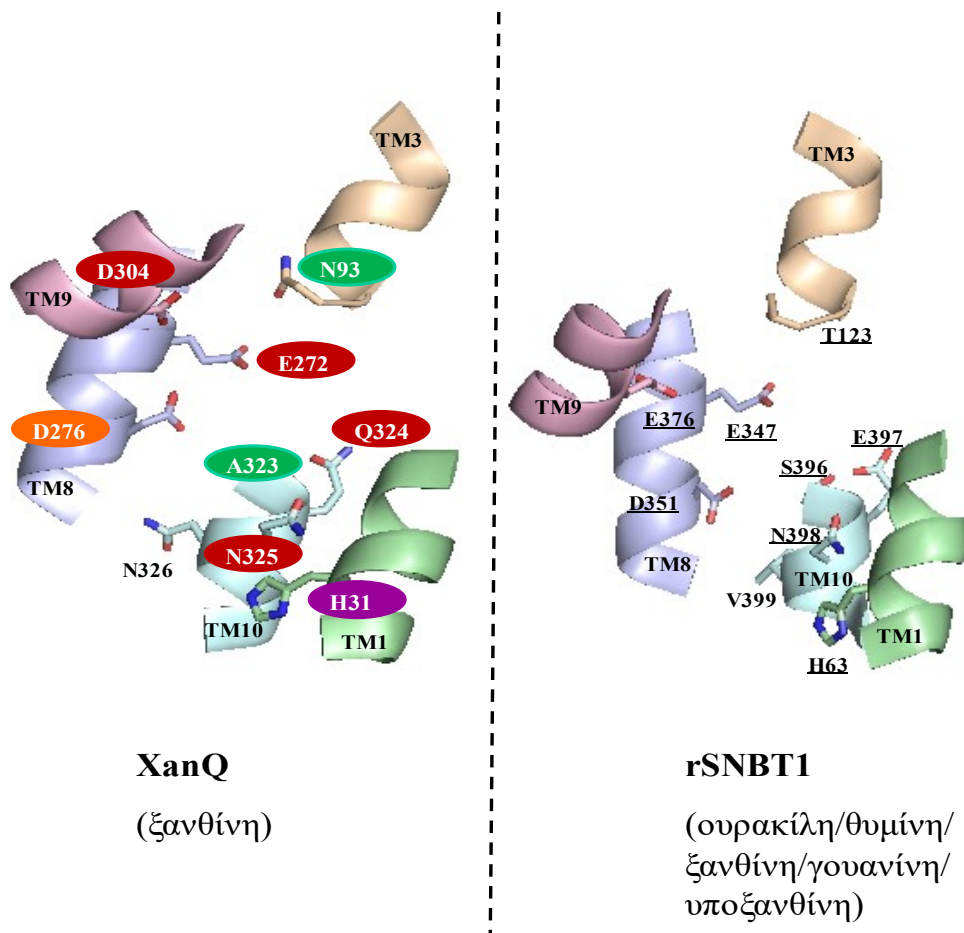
3.5.2 Μεταλλαξιγένεση στον μεταφορέα rSNBT1

Στόχοι μεταλλαξιγένεσης

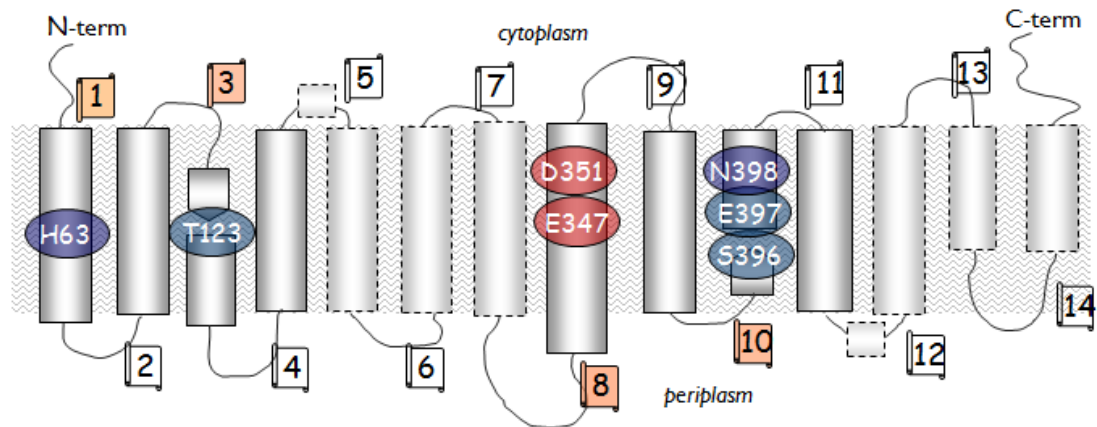
Ο μεταφορέας rSNBT1 παρουσιάζει ευρεία εξειδίκευση -μεταφέρει ουρακίλη, ξανθίνη, υποξανθίνη γουανίνη και θυμίνη σε σχέση με τους ομόλογους βακτηριακούς μεταφορείς ουρακίλης που έχουν πιο στενή εξειδίκευση (ο UraA μεταφέρει μόνο ουρακίλη και ο RutG μεταφέρει ουρακίλη, θυμίνη και, σε μικρό βαθμό, ξανθίνη), παρά την σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας που έχουν με τον rSNBT1 (βλ. στην αρχή του Κεφ. 3.5). Η διαφορά αυτή αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία προκειμένου να διερευνηθεί ποιά αμινοξικά κατάλοιπα είναι υπεύθυνα. Έτσι επιλέχθηκαν ως στόχοι μεταλλαξιγένεσης οι θέσεις εκείνες που βρίσκονται στην περιοχή δέσμευσης του μεταφορέα και για τις οποίες πειραματικά αποτελέσματα από τους βακτηριακούς μεταφορείς ουρακίλης (UraA, RutG) αλλά και τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ έχουν δείξει ότι είναι αναντικατάστατες ή έχουν περιορισμούς ως προς το αμινοξύ που μπορεί να τις αντικαταστήσει ή/ και πρόκειται για θέσεις όπου αντικαταστάσεις της πλευρικής ομάδας επηρεάζουν το προφίλ εξειδίκευσης των αντίστοιχων περμεασών (Εικόνα 3.5.3).

Με βάση αυτά επιλέχθηκαν ως στόχοι μεταλλαξιγένεσης οι θέσεις H63 (TM1), T123 (TM3), E347 και D351 (TM8), E376 (TM9), S396, E397 και N398 (TM10)

(Εικόνα 3.5.3). Στις θέσεις αυτές το εγγενές αμινοξύ αντικαταστάθηκε με Ala ή με συντηρητικές αλλαγές ως προς τον πλευρική ομάδα ή με αμινοξέα που συναντώνται στην αντίστοιχη θέση σε άλλους ομόλογους μεταφορείς NAT/NCS2.. Συγκεκριμένα, η H63 αντικαταστάθηκε από Ala, Lys, Leu, Gln ή Asn, η T123 από Ala, Ser ή Asn, η E347 από Ala, Asp ή Gln, η D351 από Ala, Glu ή Asn, η E376 από Ala, Asp ή Gln, η S396 από Ala ή Asn, η E397 από Ala, Asp ή Gln και τέλος η N398 αντικαταστάθηκε από Ala, Glu ή Gln.



Εικόνα 3.5.3 Δομικά μοντέλα των μεταφορέων XanQ και rSNBT1 και τα κατάλοιπα αμινοξέων που αποτέλεσαν στόχους μεταλλαξιγένεσης στον rSNBT1. Οι αλληλουχίες των μεταφορέων μοντελοποιήθηκαν με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (PDB ID 3QE7) με την χρήση του SWISSPROT modeling server. Τα δομικά μοντέλα οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα PyMOL και τονίζονται πέντε έλικες που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα που εξετάστηκαν με μεταλλαξιγένεση στον rSNBT1 και σχηματίζουν την περιοχή γύρω από το κέντρο δέσμευσης σύμφωνα με την δομή του UraA. Πρόκειται για τις TM1 (πράσινο), TM3 (καφέ), TM8 (μωβ), TM9 (κόκκινο) και TM10 (κυανό). Σημαντικά κατάλοιπα του μεταφορέα XanQ επισημαίνονται με κόκκινο (αναντικατάστατα για τη λειτουργία), πορτοκαλί (το D276, όπου πρέπει να υπάρξει καρβοξυλομάδα για υψηλή ενεργότητα), μωβ (το H31 όπου χρειάζεται πολική ομάδα για να μπορεί να αναγνωρίζεται τι υπόστρωμα με υψηλή συγγένεια) και πράσινο (τα N93 και A323 που συνδέονται σε σημαντικό βαθμό με τον καθορισμό εξειδίκευσης). Τα αντίστοιχα κατάλοιπα του μεταφορέα rSNBT1 τα οποία αποτέλεσαν στόχους μεταλλαξιγένεσης τονίζονται με υπογράμμιση.

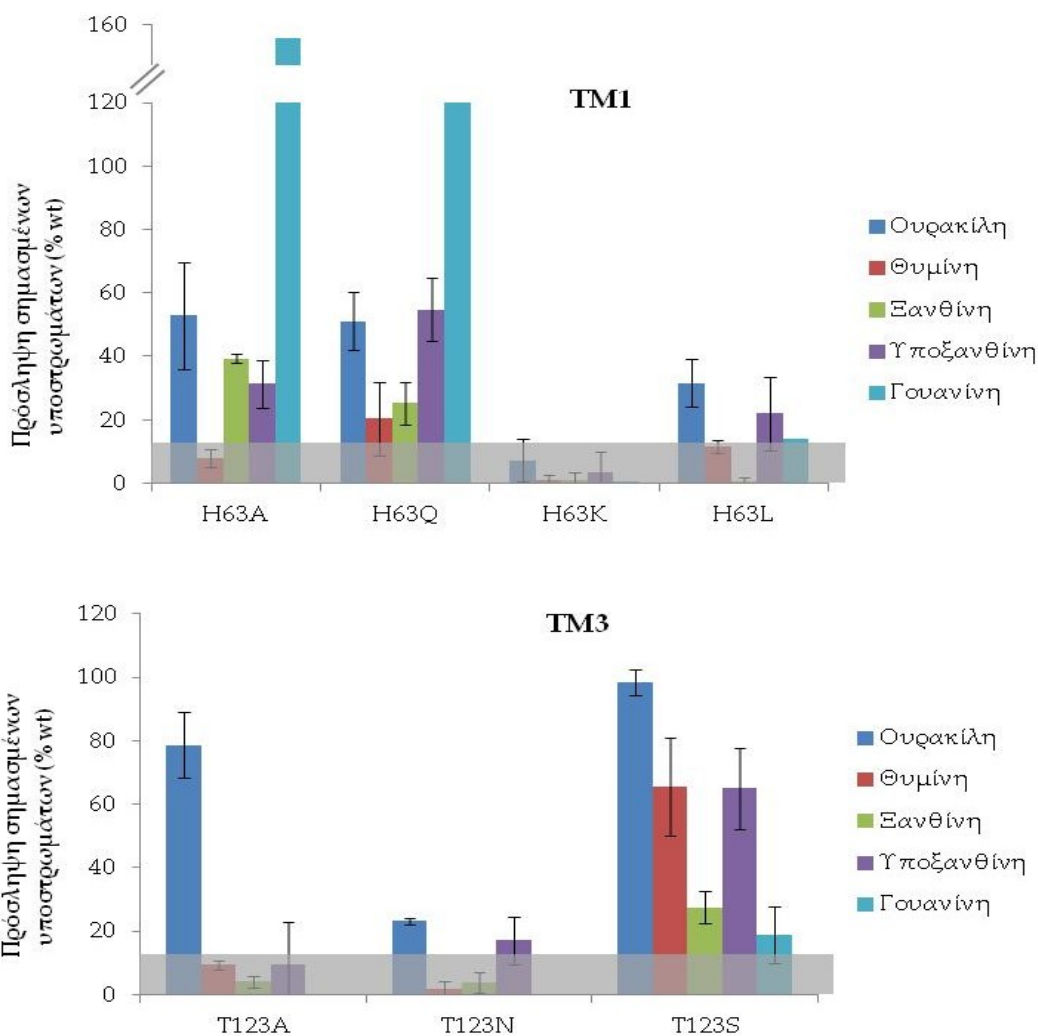


Εικόνα 3.5.4 Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα rSNBT1 όπου τονίζονται οι διαμεμβρανικές α-έλικες (ορθογώνια) και οι θέσεις-στόχοι της μεταλλαξιγένεσης [σε κόκκινο κύκλο τα E347 και D351 της TM8 που βρέθηκαν ότι είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία βλ. παρακάτω, Εικόνα 2.5.5]. Οι έλικες που απαρτίζουν τη δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain) της πρωτεΐνης παρουσιάζονται ως ορθογώνια με συμπαγή γραμμική ενώ με διακεκομμένη είναι οι έλικες που σχηματίζουν τη δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain).

Μεταλλαξιγένεση του rSNBT1 στις θέσεις H63 (TM1) και T123 (TM3): Το μετάλλαγμα T123A μεταφέρει μόνο ουρακίλη

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ενεργού μεταφοράς των πέντε πιθανών υποστρωμάτων (ουρακίλη, θυμίνη, ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη) για τα υπό μελέτη μεταλλάγματα του rSNBT1 (Εικόνα 3.5.5) υποδεικνύουν ότι ο ρόλος της συντηρημένης His στην έλικα TM1 (H63) είναι παρόμοιος με αυτόν που φαίνεται να έχει σε αρκετούς άλλους ομόλογους μεταφορείς (XanQ, βλ. Karena and Frillingos, 2009; SmLL9, βλ. Κεφ. 3.2.3 και 3.2.6 της παρούσας Διατριβής, hSVCT1/2, βλ. Rivas *et al.*, 2008; Varma *et al.*, 2008), αφού υψηλά επίπεδα ενεργότητας διατηρούνται κυρίως με πολικό αμινοξύ (Gln) ή μικρού μεγέθους (Ala), ενώ η αντικατάσταση με την θετικά φορτισμένη Lys οδηγεί σε πλήρη απώλεια της ενεργότητας και με την υδρόφοβη Leu σε χαμηλή ενεργότητα για όλα τα υποστρώματα. Επίσης, οι αντικαταστάσεις της T123 (TM3) υποδεικνύουν ότι η αντικατάσταση με Ala οδηγεί σε αλλαγή της εξειδίκευσης (έναν μεταφορέα T123A που μεταφέρει ουσιαστικά μόνο ουρακίλη), η αντικατάσταση με Asn (T123N) οδηγεί σε ανιχνεύσιμη, αλλά πολύ χαμηλή ενεργότητα, μόνο για ουρακίλη και υποξανθίνη, ενώ η αντικατάσταση με την μικρότερη Ser (T123S) επιτρέπει σημαντική ενεργότητα για όλα τα υποστρώματα (Εικόνα 3.5.5).

Συγκεκριμένα, όταν η θέση H63 (TM1) αντικατασταθεί από Gln ή Ala τότε οι μεταλλαγμένες περμεάσες μεταφέρουν ουρακίλη, ξανθίνη και υποξανθίνη [40-50% του rSNBT1(wt)], γουανίνη [>100% του rSNBT1(wt)] και, σε μικρότερο βαθμό, θυμίνη (10-20%), ενώ όταν αντικατασταθεί με Lys ο μεταλλαγμένος μεταφορέας δεν μπορεί να μεταφέρει κανένα από τα πέντε υποστρώματα. Τέλος, στην περίπτωση της αντικατάστασης με Leu διατηρείται μια μικρή ικανότητα μεταφοράς ουρακίλης (30% του αγρίου τύπου), υποξανθίνης (25%), γουανίνης (20%), θυμίνης (15%) αλλά όχι και ξανθίνης. Από τις αντικαταστάσεις της T123 (TM3), το μετάλλαγμα T123A μεταφέρει μόνο ουρακίλη σε υψηλά επίπεδα (80% σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου) ενώ η ικανότητά του στην πρόσληψη των υπολοίπων υποστρωμάτων είναι ελάχιστη ή αμελητέα, κάτω του 10% σε σχέση με το rSNBT1(wt). Το μετάλλαγμα T123S έχει υψηλή ενεργότητα με ουρακίλη, θυμίνη και υποξανθίνη (πάνω από 65% του αγίου τύπου) και σχετικά μικρή (15-20%) με ξανθίνη και γουανίνη, ενώ το T123N έχει ανιχνεύσιμη ενεργότητα μόνο με την ουρακίλη και την υποξανθίνη (περίπου στο 20%). Βλέπουμε δηλαδή ότι όλες οι αντικαταστάσεις της T123 διατηρούν σημαντική ενεργότητα για την ουρακίλη, αλλά η αντικατάσταση της πολικής ομάδας με Ala ή με πολική ομάδα μεγαλύτερου μεγέθους και διαφορετικής γεωμετρίας (Asn) αλλάζει σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό την εξειδίκευση.



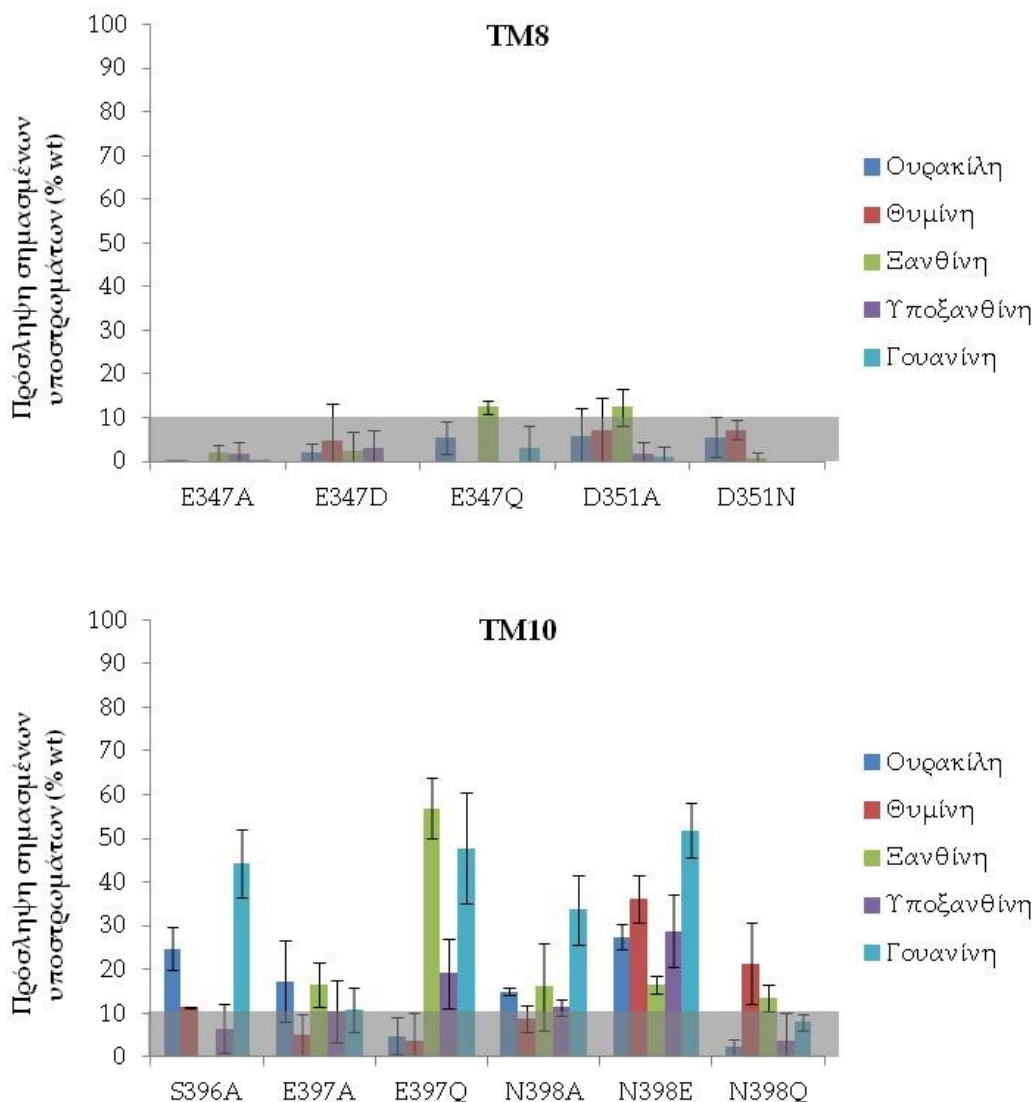
Εικόνα 3.5.5 Λειτουργικό προφίλ ενεργότητας των μεταλλαγμάτων του rSNBT1. Κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης που εκφράζουν σταθερά τα μεταλλάγματα του μεταφορέα rSNBT1 μετά από διαμόλυνση με τον φορέα PEGFP-N1/rsnbt1 (με τις αναφερόμενες αντικαταστάσεις) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (20nM), [³H] Ξανθίνη (1μM), [³H]υποξανθίνη (1μM), [³H]γουανίνη (1μM) και [¹⁴C]θυμίνη (1.5μM) για 1min και μετρήθηκαν οι τιμές αρχικής ταχύτητας (προβλ. και Εικόνα 3.5.1). Μετά την αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα, οι τιμές εκφράστηκαν ως ποσοστό % του μεταφορέα αγρίου τύπου. Οι τυπικές αποκλίσεις σε κάθε περίπτωση είναι από τετραπλά δείγματα σε κάθε πείραμα. Οι υπόλοιπες πειραματικές λεπτομέρειες δίνονται στα Κεφ. 2.11-2.13 (Μέθοδοι).

Μεταλλαξιγένεση του rSNBT1 στις θέσεις E347, D351 (TM8), S396, E397 και N398 (TM10): Οι E347 και D351 είναι λειτουργικά αναντικατάστατες ενώ το μετάλλαγμα E397Q μεταφέρει μόνο πουρίνες

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ενεργού μεταφοράς των πέντε πιθανών υποστρωμάτων (ουρακίλη, θυμίνη, ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη) για τα υπό μελέτη μεταλλάγματα του rSNBT1 που αφορούν τις θέσεις στις TM8 και TM10 (Εικόνα 3.5.6) υποδεικνύουν ότι τόσο το E347 όσο και το D352 στην έλικα TM8 είναι αναντικατάστατα για την λειτουργία (οι αλλαγές με Ala ή με τα πιο συγγενικά αμινοξέα όπως Asp, Gln, Asn, οδηγούν σε μηδενική ενεργότητα με οποιοδήποτε υπόστρωμα) ενώ από τα κατάλοιπα του TM10 που εξετάστηκαν εμφανίζονται περιορισμοί στις αντικαταστάσεις αλλά κανένα δεν είναι αναντικατάστατο για την λειτουργία: συγκεκριμένα, στη θέση S396 η αλλαγή της Ser με Ala οδηγεί σε σημαντική ενεργότητα μόνο για ουρακίλη και γουανίνη, στη θέση E397 η E397A δίνει ελάχιστα ή μηδενικά επίπεδα για όλα τα υποστρώματα αλλά η E397Q οδηγεί σε ένα μετάλλαγμα που δεν μεταφέρει πυριμιδίνες αλλά μόνο πουρίνες (ξανθίνη, υποξανθίνη και γουανίνη), και στη θέση N398 το N398E εμφανίζει σημαντικά επίπεδα ενεργότητας με όλα τα υποστρώματα, ενώ τα N398A και N398Q έχουν από πολύ μικρή έως μηδενική ενεργότητα για τα περισσότερα υποστρώματα εκτός από τη γουανίνη (το N398A) και τη θυμίνη (το N398Q).

Αναλυτικότερα, στην έλικα 8 (TM8) η θέση E347 είναι λειτουργικά αναντικατάστατη αφού δεν μπορεί να μεταφερθεί κανένα υπόστρωμα σε επίπεδα άνω του 10% από κανένα από τα τρία μεταλλάγματα που εξετάστηκαν (E347A, E347D, E347Q). Η θέση D351 (TM8) παρουσιάζει την ίδια εικόνα με την E347, δηλαδή κανένα υπόστρωμα δεν μεταφέρεται σε επίπεδα άνω του 10% σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά τα δύο μεταλλάγματα (σε Ala και Asn) που έχουν μελετηθεί. (Εικόνα 3.5.6). Στο TM10 το μετάλλαγμα S396A δεν μεταφέρει θυμίνη, ξανθίνη και υποξανθίνη ενώ μεταφέρει σε χαμηλά επίπεδα ουρακίλη και γουανίνη (25% και 40% σε σχέση με το μεταφορέα αγρίου τύπου, αντίστοιχα). Στην θέση E397, το E397A έχει ελάχιστη ενεργότητα για όλα τα υποστρώματα [0-15% σε σχέση με το rSNBT1(wt)] ενώ το E397Q μεταφέρει μόνο πουρίνες, κυρίως ξανθίνη και γουανίνη [50% σε σχέση με το rSNBT1(wt)]. Τέλος στην θέση N398, το N398A μπορεί να μεταφέρει κυρίως γουανίνη αλλά σε χαμηλά επίπεδα [35% σε σχέση με το rSNBT1(wt)] ενώ οι ενεργότητες με τα άλλα υποστρώματα είναι σε επίπεδα κάτω του 10%, το N398Q έχει πολύ μικρή ή μηδενική ενεργότητα με όλα τα υποστρώματα, 20% με την θυμίνη και κάτω του 12% με τα υπόλοιπα, και τέλος το N398E έχει σημαντική ενεργότητα με όλα τα υποστρώματα, που κυμαίνεται για την ξανθίνη σε επίπεδα 15-20% σε σχέση με το rSNBT1(wt) και για τα

υπόλοιπα υποστρώματα σε υψηλότερα επίπεδα, 30-50% σε σχέση με το rSNBT1(wt) (Εικόνα 3.5.6).



Εικόνα 3.5.6 Λειτουργικό προφίλ ενεργότητας των μεταλλαγμάτων του rSNBT1. Κύτταρα HEK293 σταθερής διαμόλυνσης που εκφράζουν σταθερά τα μεταλλάγματα του μεταφορέα rSNBT1 μετά από διαμόλυνση με τον φορέα pEGFP-N1/rsnbt1 (με τις αναφερόμενες αντικαταστάσεις) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ουρακίλης (20nM), [³H]ξανθίνη (1μM), [³H]υποξανθίνη (1μM), [³H]γουανίνη (1μM) και [¹⁴C]θυμίνη (1.5μM) για 1min και μετρήθηκαν οι τιμές αρχικής ταχύτητας (πρβλ. και Εικόνα 3.5.1). Μετά την αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα, οι τιμές εκφράστηκαν ως ποσοστό % του μεταφορέα αγρίου τύπου. Οι τυπικές αποκλίσεις σε κάθε περίπτωση είναι από τετραπλά δείγματα σε κάθε πείραμα. Οι υπόλοιπες πειραματικές λεπτομέρειες δίνονται στα Κεφ. 2.11-2.13 (Μέθοδοι).

3.5.3 Συντήρηση του σημαντικού ρόλου των καταλοίπων E347 και D351 του TM8 και συσχέτιση του E397 (TM10) με την εξειδίκευση για πυριμιδίνες

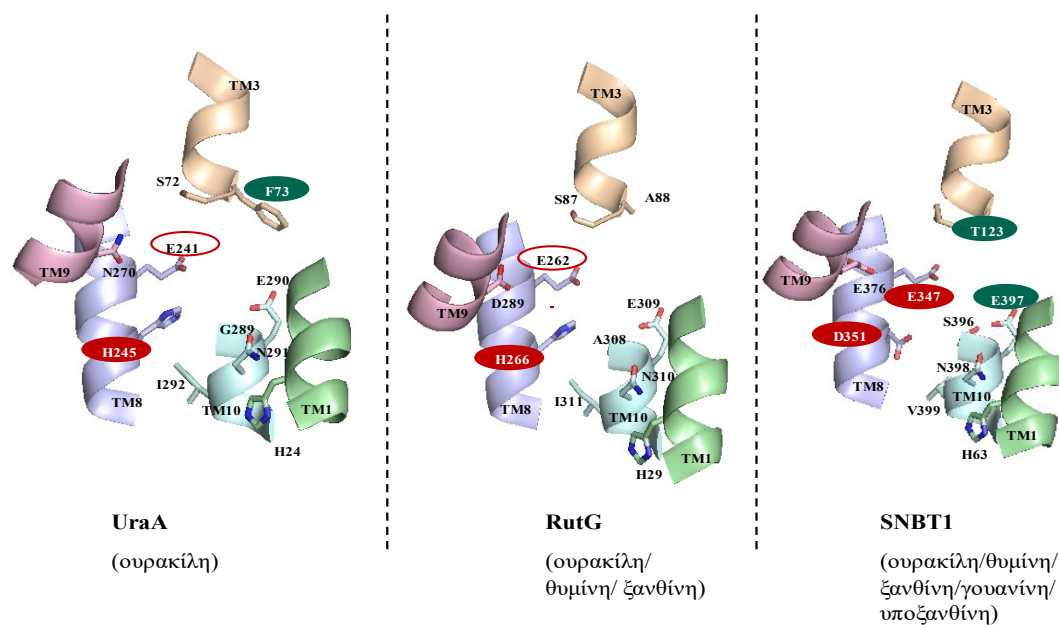
Συνοπτικά, από τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης του rSNBT1 φαίνεται ότι (α) οι θέσεις E347 και D351 της έλικας TM8 είναι αναντικατάστατες για την λειτουργία του μεταφορέα, (β) οι θέσεις E397 και N398 του TM10 είναι σημαντικές αλλά όχι αναντικατάστατες και, μάλιστα, η αντικατάσταση του E397 σε Gln (Q) σχετίζεται με την εξειδίκευση, αφού οδηγεί σε ένα μετάλλαγμα ειδικό για πουρίνες (ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη), (γ) οι αντικαταστάσεις με Ala των T123 (TM3) ή S396 (TM10) επηρεάζουν το προφίλ εξειδίκευσης, οδηγώντας σε μεταλλάγματα που έχουν σημαντική ενεργότητα μόνο για ουρακίλη (T123A) ή για ουρακίλη και γουανίνη (S396A), και (δ) οι αντικαταστάσεις της H63 (TM1) δίνουν σημαντικά υψηλή ενεργότητα μόνο αν διατηρείται πολικό και αφόρτιστο αμινοξύ (H63Q) ή μικρού μεγέθους (H63A).

Αν συγκριθούν με τους βακτηριακούς ομόλογους μεταφορείς ουρακίλης (UraA) και ουρακίλης/θυμίνης (RutG), τα δεδομένα για τον rSNBT1 υποδεικνύουν σημαντικές λειτουργικές ομοιότητες σε αντίστοιχες θέσεις της περιοχής του κέντρου δέσμευσης και ορισμένες θέσεις αμινοξέων που μπορεί να σχετίζονται με την ευρύτερη εξειδίκευση του rSNBT1 (Εικόνα 3.5.6).

Ο αναντικατάστατος ρόλος των E347 και D351 (TM8) μπορεί να σχετίζεται με την άμεση συμμετοχή του E347 στη δέσμευση του υποστρώματος (όπως και των αντίστοιχων E241 του UraA και E262 του RutG) καθώς και την ανάγκη πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης τόσο του E347 όσο και του D351 κατά τον μηχανισμό συμμεταφοράς, όπως έχει προταθεί για τον UraA (Lu *et al.*, 2011). Παρόμοια σημαντικός ρόλος έχει βρεθεί για τις αντίστοιχες θέσεις του TM8 και στους άλλους ομόλογους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που έχουν μελετηθεί, όπως στους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της ομάδας COG2233 (βλ. Κεφ. 3.2) και στους μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2252 (βλ. Κεφ. 3.3). Ειδικά η θέση του E347 φαίνεται να είναι αναντικατάστατη ως καρβοξυλομάδα σε όλους τους μεταφορείς NAT/NCS2 που έχουν μελετηθεί, ενώ και η D351 φαίνεται να είναι είτε αναντικατάστατη ως ασπαρτικό ή ιστιδίνη (τόσο στους μεταφορείς πυριμιδινών, βλ. Εικόνα 3.5.7, όσο και στους μεταφορείς PurP και YjcD, Κεφ. 3.3) είτε πολύ σημαντική ως καρβοξυλομάδα που μπορεί να σχετίζεται με την εξειδίκευση ή και με την εξάρτηση από το pH σε μεταφορείς ξανθίνης της ομάδας COG2233 (βλ. Κεφ. 3.2, και, παρακάτω, Κεφ. 3.6).

Σε σχέση με την E397 του TM10, μία θέση που σύμφωνα με τα δομικά μοντέλα συμμετέχει άμεσα στη δέσμευση υποστρώματος στους μεταφορείς NAT/NCS2 και είναι ιδιαίτερα συντηρημένη ως Glu (στους μεταφορείς πυριμιδινών) ή ως Gln (στους μεταφορείς πουρινών) της ομάδας COG2233, είναι ενδιαφέρον ότι η αντικατάσταση της καρβοξυλομάδας E397 με καρβονυλομάδα (E397Q) οδηγεί σε έναν μεταλλαγμένο μεταφορέα που δεν έχει ικανότητα

μεταφοράς πυριμιδινών (ουρακίλη, θυμίνη) παρά μόνο πουρινών (ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η παρουσία γλουταμίνης στη θέση E397 περιορίζει την εξειδίκευση του rSNBT1 ώστε να αναγνωρίζονται ειδικά και μόνο οι 6-οξυ-πουρίνες (ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη) και αυτό μπορεί να σχετίζεται με το ότι, με βάση τις αναλύσεις μοριακής δυναμικής των UraA (Kosti *et al.*, 2012) και XanQ (Karena *et al.*, 2015), η Gln συμμετέχει στην πρόσδεση της 6-οξυ-πουρίνης μέσω «διοδοντωτών» δεσμών υδρογόνου της καρβονυλομάδας με τις NH και C=O στις θέσεις N1 και C6, ή N1 και C2. Ο rSNBT1(wt) έχει μία πιο εύκαμπτη πλευρική αλυσίδα και καρβοξυλομάδα στην αντίστοιχη θέση (Glu-397) που δημιουργεί διαφορετικού τύπου, χαλαρότερες αλληλεπιδράσεις τόσο με τις 6-οξυ-πουρίνες (Kosti *et al.*, 2012) όσο και με τις 4-οξυ-πυριμιδίνες (ουρακίλη, θυμίνη) εξασφαλίζοντας ευρύτερη εξειδίκευση, ενώ οι αντίστοιχες E290 και E309 των UraA και RutG έχουν εξειδίκευση για την αναγνώριση πυριμιδινών, όπως υποδηλώνεται από τη δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) (βλ. Κεφ. 3.4). Η θέση αυτή έχει δειχθεί και στον μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος UraA ότι σχετίζεται με την εξειδίκευση. Το μετάλλαγμα Q408E έχει υψηλή συγγένεια για την υποξανθίνη (K_i 71μM ενώ ο μεταφορέας αγρίου τύπου δεν την αναγνωρίζει καθόλου) αλλά δεν μπορεί να την μεταφέρει (Parageorgiou *et al.*, 2008).



Εικόνα 3.5.7 Σύγκριση των μεταφορέων UraA, RutG, rSNBT1 στην περιοχή του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης υποστρώματων. Οι αλληλουχίες των μεταφορέων μοντελοποιήθηκαν με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (PDB ID 3QE7) με την χρήση του SWISSPROT modeling server. Τα δομικά μοντέλα οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα PyMOL και τονίζονται πέντε έλικες που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα που εξετάστηκαν με μεταλλαξιγένεση στον rSNBT1 και σχηματίζουν την περιοχή γύρω από το κέντρο δέσμευσης σύμφωνα με την δομή του UraA. Πρόκειται για τις TM1 (πράσινο), TM3 (καφέ), TM8 (μωβ), TM9 (κόκκινο) και TM10 (κίτρινο). Από τα κατάλοιπα, τονίζονται με κόκκινο φόντο όσα βρέθηκαν αναντικατάστατα για τη λειτουργία από τη μεταλλαξιγένεση των UraA, RutG και rSNBT1, με πράσινο όσα βρέθηκαν ότι σχετίζονται με τον καθορισμό της εξειδίκευσης, και σε κόκκινο κύκλο τα δύο κατάλοιπα γλουταμικών (Glu) των UraA και RutG που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση του υποστρώματος (ουρακίλης) με βάση τα δομικά μοντέλα, αλλά δεν υποβλήθηκαν σε αναλυτική μεταλλαξιγένεση στην παρούσα Διατριβή.

3.6 Η εξάρτηση της ενεργότητας του μεταφορέα ξανθίνης XanQ από το pH

Το μοτίβο της έλικας 8 (TM8)

Στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που ανήκουν στην ομάδα COG2233 στην έλικα 8 (TM8) συντηρείται το μοτίβο ²⁷²EXXGX²⁷⁶ (η αρίθμηση αφορά τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ) (Mermelekas *et al.*, 2010). Το μοτίβο αυτό υπάρχει και στην άλλη ομάδα της οικογένειας (COG2252) με δυο διαφορές: το απόλυτα συντηρημένο Glu είναι Asp στην ομάδα αυτή και το τελευταίο κατάλοιπο του μοτίβου συντηρείται ως Thr στην ομάδα COG2252 ενώ στην COG2233 δεν υπάρχει μια σαφής συντήρηση ως προς το κατάλοιπο που βρίσκεται σε αυτή τη θέση (Εικόνα 3.6.1).

	TM8		
	267	271	
PurP	F D S S G T L I G V	Aδενίνη	COG2252
YicO	F D S T G T L I G V	Aδενίνη	
YjcD	F D A T G T I R A V	Γουανίνη/Υποξανθίνη	
YgfQ	F D A T G T I R A V	Γουανίνη/Υποξανθίνη	
PbuG	F D T A G T L V A V	[Γουανίνη/Υποξανθίνη]	
PbuO	F D T T G T M I G V	[Γουανίνη/Υποξανθίνη]	
AzgA	L D A T G T L Y S M	Aδενίνη/Γουανίνη/Υποξανθίνη	
AfAzgA	L D T T G T L Y S M	Aδενίνη/Γουανίνη/Υποξανθίνη	
AtAzgA1	L D T T G T L Y S M	Aδενίνη/Γουανίνη	
AtAzgA2	L G T T G V L Y T M	Aδενίνη/Γουανίνη	
YbbY	S N T Y G A I R G T	Άγνωστη λειτουργία	COG2233
UraA	A E H V G H L V V T	Ουρακίλη	
PyrP	S E H I G H Q M V L	[Ουρακίλη]	
RutG	A E N L G H L K A V	Ουρακίλη/Θυμίνη/Ξανθίνη	
XanP	L E T I G D I T A T	Ξανθίνη	
XanQ	L E A V G D I T A T	Ξανθίνη	
UacT	I E S M G M F L A L	Ουρικό οξύ	
PbuX	V E S T G V Y F A L	[Ξανθίνη]	
PucJ	V E S T G V F Y A I	[Ουρικό οξύ]	
PucK	V E S T G V Y F A L	[Ουρικό οξύ]	
SmLL9	V E T S A D I L A V	Ξανθίνη/Ουρικό οξύ	
UapA	C E C I G D V T A T	Ξανθίνη/Ουρικό οξύ	
UapC	M E S I G D I T A T	Ξανθίνη/Ουρικό οξύ	
AfUapA	M E S I G D I T A T	Ξανθίνη/Ουρικό οξύ	
Xut1	M E C I G D V T A T	Ξανθίνη/Ουρικό οξύ	
Lpe1	V E S T G A F I A V	Ξανθίνη/Ουρικό οξύ	
rSNBT1	V E S V G D Y H A C	Ουρακίλη/Θυμίνη/Ξανθίνη/Υποξανθίνη/Γουανίνη	
hSVCT1	I E S I G D Y Y A C	Ασκορβικό οξύ	
hSVCT2	I E S I G D Y Y A C	Ασκορβικό οξύ	
	272	276	

Εικόνα 3.6.1 Στοιχισμός αλληλουχιών γνωστής λειτουργίας μεταφορέων στην περιοχή του μοτίβου της έλικας 8 (TM8) της οικογένειας NAT/NCS2 που ανήκουν είτε στην ομάδα COG2233 είτε στην ομάδα COG2252. Με μπλε εμφανίζεται η συντήρηση των δύο θέσεων στους μεταφορείς με COG2252 και με κόκκινο το απόλυτα συντηρημένο E272 και με πορτοκαλί το D276 στους μεταφορείς COG2233. Η αρίθμηση των θέσεων που φαίνεται είναι με βάση την αλληλουχία του PurP (για την COG2252, με μπλε) ή του XanQ (για την COG2233, με κόκκινο).

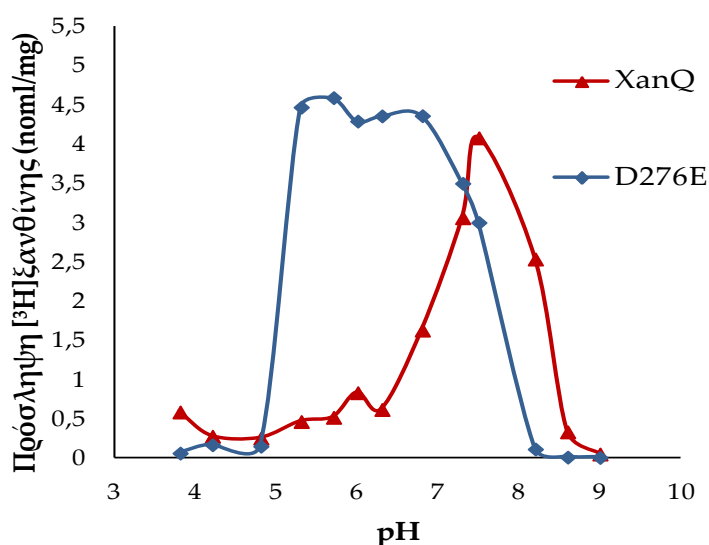
Με βάση την εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση στο μεταφορέα ξανθίνης XanQ από την *E.coli* γνωρίζουμε ότι η θέση E272 είναι αναντικατάστατη για την λειτουργία του μεταφορέα (Karena and Frillingos, 2009). Η θέση αυτή είναι αναντικατάστατη για την λειτουργία και άλλων ομολόγων της ομάδας COG2233 όπως του μεταφορέα SmLL9 (E262, βλ. Κεφ. 3.3.2) αλλά και του UarA (Parageorgiou *et al.*, 2008) καθώς επίσης και στην ομάδα COG2252 (D267 στο PurP, D271 στο YjcD, βλ. Κεφ. 3.2). Με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) και τις μελέτες μοντελοποίησης, η καρβοξυλομάδα αυτή αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα με δεσμούς υδρογόνου.

Η τελευταία θέση του μοτίβου της έλικας 8 παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς το D276 στον μεταφορέα XanQ απαιτεί την ύπαρξη καρβοξυλομάδας στην θέση αυτή προκειμένου να επιτρέπεται η μεταφορά του υποστρώματος σε υψηλά επίπεδα (Mermelekas *et al.*, 2010) και σε όλη την ομάδα των μεταφορέων ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος δεν υπάρχει μια σαφής συντήρηση στην θέση αυτή. Η αντίστοιχη θέση στον μεταφορέα SmLL9 (D266) είναι λειτουργικά αναντικατάστατη (Κεφ. 3.3.2) και στους μεταφορείς της ομάδας COG2252 συντηρείται ως Thr και παίζει σημαντικό ρόλο για την λειτουργία τους αφού στην περίπτωση του PurP η θέση T271 επηρεάζει την εξειδίκευση και στο YjcD η T275 είναι λειτουργικά αναντικατάστατη (βλ. Κεφ. 3.3). Η αντίστοιχη θέση αμινοξέος στον UraA (His-245) είναι επίσης αναντικατάστατη για τη λειτουργία (Κεφ. 3.4.3) και έχει υποτεθεί ότι μπορεί να συμμετέχει με καθοριστικό τρόπο στην συμμεταφορά του πρωτονίου με το υπόστρωμα (Lu *et al.*, 2011).

Το D276E έχει μέγιστη ενεργότητα σε όξινα pH

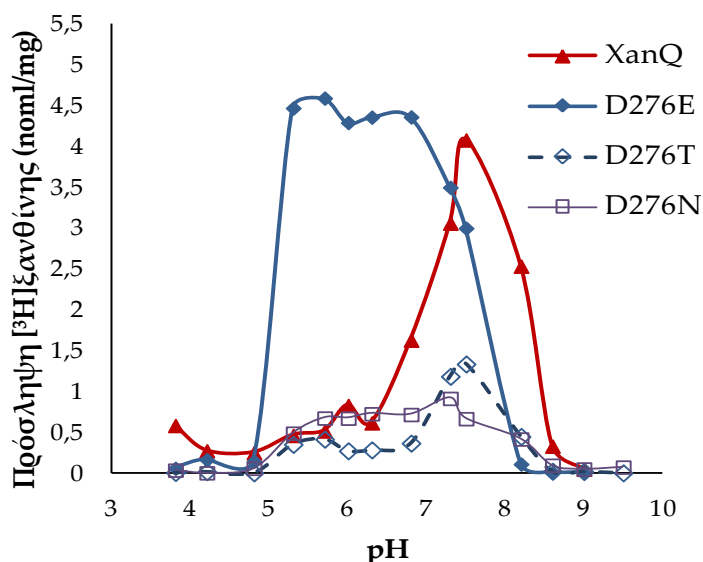
Στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ και ειδικότερα με το μετάλλαγμα D276E παρατηρήθηκε ότι το D276E εμφανίζει μέγιστα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης σε όξινα pH (5.2-6.8), τα οποία μειώνονται και φτάνουν σε μηδενικές τιμές σε pH 8, σε αντίθεση με τον μεταφορέα XanQ(wt) που έχει μέγιστα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης σε ουδέτερο pH (7.5) που μειώνονται σχετικά απότομα σε χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH, με συνέπεια η ενεργότητα να ελαχιστοποιείται όταν το pH φθάσει στο 6.2 ή στο 8.5 (Εικόνα 3.6.2). Οι διαφορές αυτές σχετίζονται με δύο φαινόμενα. Το πρώτο αφορά την μετατόπιση της καμπύλης της ενεργότητας του μεταλλάγματος σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου στην περιοχή των pH 7 με 8.5, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.6.2. Αυτή η μετατόπιση θα μπορούσε να οφείλεται σε μείωση του pKa μιας καρβοξυλομάδας (ή άλλης πλευρικής ομάδας αμινοξέος) κατά περίπου 0.5 μονάδες pH (από 8.2 σε 7.7, αν λάβουμε υπόψη τις προσεγγιστικές τιμές pH που αντιστοιχούν στο 50% της μέγιστης

ενεργότητας). Μια τέτοια αλλαγή θα οδηγούσε για παράδειγμα μια, σημαντική για την λειτουργία του μεταφορέα, καρβοξυλομάδα να είναι συνεχώς αρνητικά φορτισμένη σε βασικά pH (από 8 και πάνω) και να μην μπορεί να συμμετέχει στο μηχανισμό με κύκλους πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης. Και οι δύο σημαντικές θέσεις της TM8 (E272, D276) θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη συμμεταφορά του πρωτονίου σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό του UraA (Lu *et al.*, 2011), συνεπώς κάποια από τις δύο μπορεί να έχει διαφορετικό pKa στην περίπτωση του μεταλλάγματος. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο φαινόμενο που παρατηρείται είναι ότι σε όξινα pH από 5.2 έως 6.8 ο μεταλλαγμένος μεταφορέας έχει σταθερά πολύ υψηλές τιμές ενεργότητας (ενώ ο XanQ αγρίου τύπου έχει ελάχιστες τιμές σε pH κάτω του 6.2). Αυτό υποδεικνύει ότι ο D276E σε pH 5.2 – 6.2 μπορεί να μην εξαρτάται πια από την διαβάθμιση πρωτονίων δηλ. η μεταφορά υποστρώματος να γίνεται ανεξάρτητα, χωρίς την συμμεταφορά H⁺.



Εικόνα 3.6.2 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης σε εύρος τιμών pH. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από τα πλασμίδια pT7-5/XanQ(wt)-BAD ή τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης 1μM στους 25°C για χρόνους 10-20sec σε εύρος τιμών pH. Η τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E.coli* T184 που φέρουν το πλασμίδιο pT7-5-BAD) αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Δίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες από δύο πειράματα, οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) είναι <10%.

Τα ίδια φαινόμενα δεν παρατηρούνται με άλλα μεταλλάγματα του D276. Όταν το Asp-276 αντικαταστάθηκε από Thr, το μετάλλαγμα ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με τον μεταφορέα αγρίου τύπου, ενεργότητα από pH 6.2 έως 8.5 και μέγιστα επίπεδα σε pH 7.5 και, όταν αντικαταστάθηκε από Asn, το D276N διατηρεί τα πολύ χαμηλά επίπεδα ενεργότητας που έχει σε pH 7.5 σε όλο το εύρος των τιμών του pH που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.6.3). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η σημαντική καρβοξυλομάδα της οποίας το pKa φαίνεται να αλλάζει στο μετάλλαγμα D276E δεν είναι το D276 αλλά ίσως το E272.

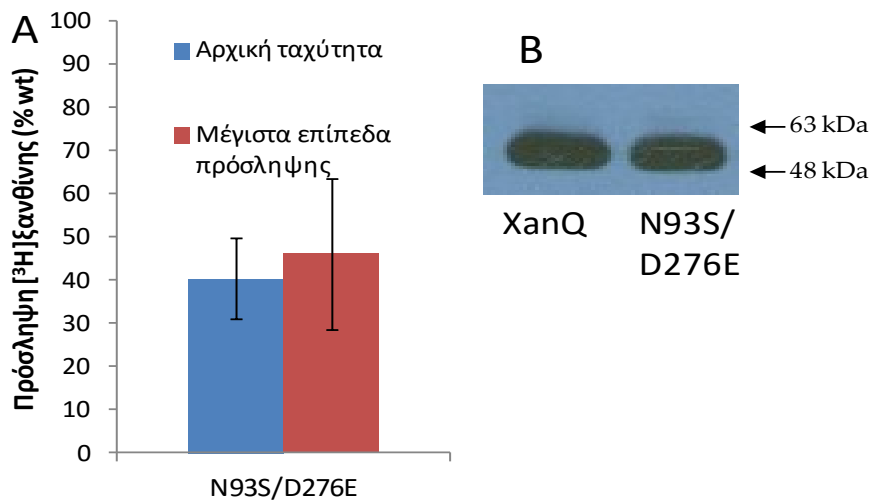


Εικόνα 3.6.3 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης σε εύρος τιμών pH. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από τα πλασμίδια pT7-5/XanQ(wt)-BAD ή τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης 1μM στους 25°C για χρόνους 10-20sec σε εύρος τιμών pH. Η τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E.coli* T184 που φέρουν το πλασμίδιο pT7-5-BAD) αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Δίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες από δύο πειράματα, οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) είναι <10%.

Το μετάλλαγμα N93S αλλάζει την ενεργότητα του μεταφορέα σε όξινα pH

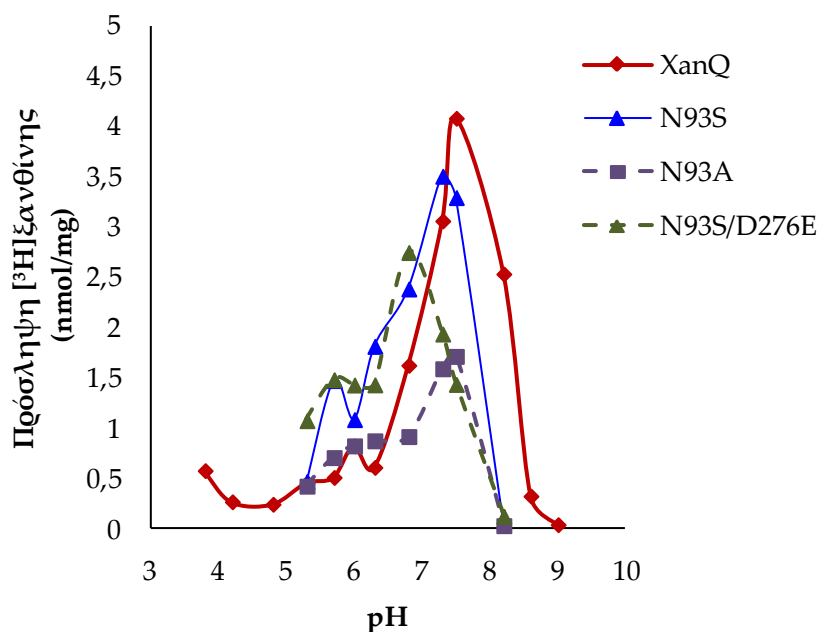
Εκτός των θέσεων E272 και D276 (TM8), κοντά στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος υπάρχει και η Asn-93 από την έλικα 3 (TM3). Η θέση αυτή βρίσκεται κοντά στην θέση E272 και συμμετέχει και αυτή στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιεί το υπόστρωμα στο κέντρο δέσμευσης, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.6.4 (Karena *et al.*, 2015). Για τη θέση αυτή έχει παρατηρηθεί ότι αντικατάστασή της με Ala ή Ser επηρεάζει σημαντικά την εξειδίκευση και επιτρέπει την αναγνώριση του ουρικού οξέος (που δεν είναι φυσιολογικά υποστρώματα) από τον τροποποιημένο μεταφορέα Ξανθίνης XanQ (Karena and Frillingos, 2009). Συνεπώς μια πιθανή διατάραξη αυτού του δικτύου δεσμών υδρογόνου από αντικατάσταση της N93 θα μπορούσε επίσης να επηρεάζει το προφίλ ενεργότητας του μεταλλαγμένου μεταφορέα.

Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλάγματα N93A και N93S για τα οποία είχε βρεθεί ότι αλλάζουν σημαντικά την εξειδίκευση του μεταφορέα (Karena and Frillingos, 2009). Επιπλέον κατασκευάστηκε και το διπλό μετάλλαγμα N93S/D276E, το οποίο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων και διατηρεί αρχική ταχύτητα πρόσληψης Ξανθίνης 40% (Εικόνα 3.6.4).



Εικόνα 3.6.4 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς Ξανθίνης. Κύτταρα *E.coli T184* που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 1μM [³H]ξανθίνης για χρόνους 5sec-10min. Αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5) και οι τυπικές αποκλίσεις υπολογίζονται από τρία πειράματα. **B. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης** Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E coli T184* που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/XanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αρραίωση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στα αριστερά της εικόνας μετρώνται σε kDa.

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς Ξανθίνης σε εύρος pH 4.0-10.0 έδειξε ότι τόσο το μετάλλαγμα N93S όσο και το N93A δεν διατηρούν υψηλά επίπεδα ενεργότητας σε όξινα pH όπως το D276E αλλά και τα δύο αυτά μεταλλάγματα μετατοπίζουν την καμπύλη της ενεργότητας προς όξινα pH σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου XanQ. Αντίστοιχα αποτελέσματα έδειξε και το διπλό μετάλλαγμα N93S/D276E (Εικόνα 3.6.5). Και αυτό μετατοπίζει το προφίλ της ενεργότητας προς όξινα pH αν και δεν εμφανίζει το δεύτερο φαινόμενο το μονού μεταλλάγματος D276E το οποίο διατηρεί υψηλά επίπεδα ενεργότητας σε όξινα pH. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την υπόθεση ότι η καρβοξυλομάδα του E272 είναι αυτή που πιθανώς επηρεάζεται στα μεταλλάγματα, αλλάζοντας το pKa της στην περιοχή pH 7 με 8.5, σε κάθε περίπτωση απαιτούνται επιπλέον πειράματα (βλ. Κεφ.4.2.1).



Εικόνα 3.6.5 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης σε εύρος τιμών pH. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από τα πλασμίδια pT7-5/XanQ(wt)-BAD ή τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης 1μM στους 25°C για χρόνους 10-20sec σε εύρος τιμών pH. Η τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E.coli* T184 που φέρουν το πλασμίδιο pT7-5-BAD) αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Δίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες από δύο πειράματα, οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) είναι <10%.

Το D276 σε pH 5.2 πλησιάζει το προφίλ εξειδίκευσης που έχει ο XanQ (wt) σε pH 7.5

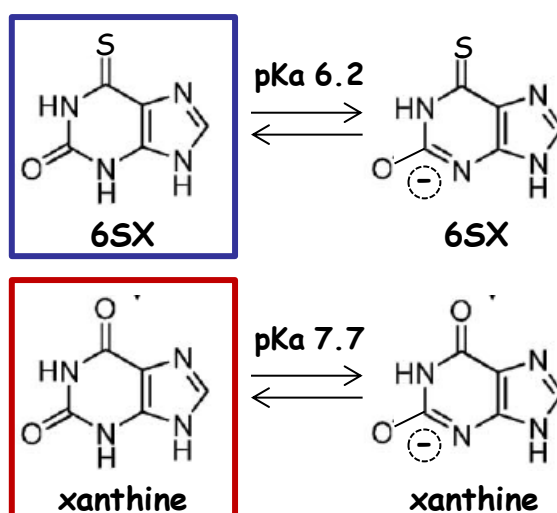
Το μετάλλαγμα D276E διαφοροποιείται από τον μεταφορέα αγρίου τύπου και στο προφίλ εξειδίκευσης (Πίνακας 3.6.1). Σε pH 7.5 (Mermelekas *et al.*, 2010) αναγνωρίζει ισχυρά την 8-μεθυλοξανθίνη (K_i 90.7μM), ένα ανάλογο Ξανθίνης το οποίο δεν αναγνωρίζει καθόλου ο XanQ(wt) (K_i >1mM). Η ισχυρή αυτή αναγνώριση της 8-μεθυλοξανθίνης από το μετάλλαγμα μειώνεται σημαντικά σε όξινα pH και σε pH 5.2 η σταθερά αναστολής (K_i) είναι περίπου 450μM. Αντίθετα η 6-θειοξανθίνη αναγνωρίζεται ισχυρά από τον XanQ(wt) σε pH 7.5 (K_i 41μM) ενώ το D276E δεν την αναγνωρίζει καθόλου σε pH 7.5, την αναγνωρίζει με μέτρια συγγένεια σε pH 6.0 και με πολύ υψηλή συγγένεια σε pH 5.2 (K_i 3.6μM). Στις διαφορές της εξειδίκευσης που παρουσιάζει το μετάλλαγμα D276E στα διάφορα pH ενδεχομένως να συμβάλλει και η κατάσταση ιονισμού του υποστρώματος. Η Ξανθίνη (φυσικό υπόστρωμα του μεταφορέα) έχει pKa 7.7 σε υδατικό διάλυμα (Kulikowska *et al.*, 2004). Μέσα στην περιοχή του κέντρου δέσμησης δεν μπορούμε να γνωρίζουμε σε ποια κατάσταση βρίσκεται (ιονισμένη ή μη) ούτε εάν ο μεταφορέας μπορεί να αναγνωρίσει και να μεταφέρει τη μία ή και τις δύο μορφές. Η πιθανή κατάσταση ιονισμού του υποστρώματος όμως φαίνεται να σχετίζεται ως ένα βαθμό με το προφίλ εξειδίκευσης. Συγκεκριμένα, αν πάρουμε υπόψη μας το pKa 7.7, η Ξανθίνη σε pH

άνω του 8.5, όπου ο μεταφορέας δε λειτουργεί (Εικόνες 3.6.2-3.6.5), θα βρίσκεται κυρίως σε μορφή ανιόντος (Εικόνα 3.6.6). Το ανάλογο 6-θειοξανθίνη έχει pKa 6.2 (Kulikowska *et al.*, 2004), δηλ. στο pH 5.2 όπου αναγνωρίζεται από το μετάλλαγμα D276E είναι πιθανό να βρίσκεται κυρίως σε ουδέτερη μορφή ενώ σε pH 7.5 όπου δεν αναγνωρίζεται από τον D276E είναι σε μορφή ανιόντος (Εικόνα 3.6.6). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι ο XanQ ή το μετάλλαγμα D276E πιθανό να αναγνωρίζουν κυρίως την ουδέτερη (μη ιονισμένη) μορφή του.

Πίνακας σταθερών αναστολής (K_i) (μM)

	XanQ pH 7.5	D276E pH 7.5	D276E pH 6.0	D276E pH 5.2
2-SX	91	ND	474.3	168.3
6-SX	41	ND	284.9	3.6
7-MX	>1000	ND	331.4	390.0
8-MX	>1000	90.7	385.8	451.7

Πίνακας 3.6.1 Προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος D276E. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] Ξανθίνης (1 μM , 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1 μM -1mM, 10min). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-10 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism4 και οι τυπικές αποκλίσεις είναι <20%. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = \text{IC}_{50}/(1+(L/K_m))$ (Cheng and Prusoff, 1973).



Εικόνα 3.6.6 Ουδέτερη και ιονισμένη κατάσταση της Ξανθίνης και της 6-θειοξανθίνης. Με πλαίσια τονίζεται η μη ιονισμένη κατάσταση του υποστρώματος/προσδέτη, η οποία πιθανό να είναι αυτή που αναγνωρίζεται από τον μεταφορέα. Οι τιμές pKa που αναφέρονται προέρχονται από Kulikowska *et al.*, 2004.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

4.1 Χαρακτηρισμός νέων ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 με νέες εξειδικεύσεις

4.1.1 Οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 από την *E.coli*

Με την παρούσα διατριβή συμπληρώνεται η εικόνα της λειτουργίας των μεταφορέων πουρινών και/ή πυριμιδινών της οικογένειας NAT/NCS2 της *Escherichia coli* K-12. Το εντεροβακτήριο αυτό φέρει δέκα πιθανούς μεταφορείς που εντάσσονται στην οικογένεια NAT/NCS2 και δύο στην οικογένεια NCS1. Στην NCS1 ανήκουν οι AHP και CodB των οποίων η λειτουργία δεν είναι γνωστή αλλά έχουν προταθεί ως μεταφορείς αλλαντοΐνης (Cusa *et al.*, 1999) και κυτοσίνης (Danielsen *et al.*, 1992) αντίστοιχα, με βάση γενετικές μελέτες. Από τα ομόλογα της NAT/NCS2 ήταν γνωστοί λειτουργικά 4 μεταφορείς (XanQ, XanP, UacT, UraA) και στην παρούσα Διατριβή αναλύθηκαν λειτουργικά άλλοι 5 (RutG, PurP, YicO, YjcD, YgfQ), οι οποίοι βρέθηκε ότι εμφανίζουν νέα προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με τα συγγενικά τους ομόλογα που ήταν γνωστά έως σήμερα. Τέλος, στην ομάδα των NAT/NCS2 ανήκει και το ομόλογο YbbY (βλ. Εικόνα 1.4), το οποίο εκφράσθηκε στη μεμβράνη της *E. coli* K-12 αλλά δεν βρέθηκε να μεταφέρει καμία φυσική πουρίνη ή πυριμιδίνη (Papakostas *et al.*, 2013). Το γονίδιο του YbbY βρίσκεται σε ένα σύνθετο οπερόνιο που περιέχει γονίδια ενζύμων καταβολισμού ουρεϊδών και ρυθμίζεται κατασταλτικά από την αλλαντοΐνη (καθώς και ουρακίλη/θυμίνη) και επαγωγικά από το γλυοξυλικό (Hasegawa *et al.*, 2008), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο YbbY θα μπορούσε να μεταφέρει άλλα υποστρώματα όπως αλλαντοΐνη ή γλυοξυλικό.

Ο RutG έχει ευρύτερη εξειδίκευση από τον UraA

Από την οικογένεια μεταφορέων πουρινών NAT/NCS2 είχαν χαρακτηριστεί λειτουργικά μόνο τέσσερις εξ αυτών. Πρόκειται για τους μεταφορείς ξανθίνης XanQ και XanP (Karatza and Frillingos, 2005), τον μεταφορέα ουρικού οξέος UacT (Papakostas and Frillingos, 2012) και τέλος γνωστής λειτουργίας είναι και ο μεταφορέας ουρακίλης UraA ο οποίος έχει μελετηθεί και με κρυσταλλογραφία (Lu *et al.*, 2011). Και οι τέσσερις αυτοί μεταφορείς ανήκουν στην ομάδα COG2233. Το πέμπτο ομόλογο της ομάδας COG2233 αντιστοιχεί στον δυνητικό μεταφορέα RutG, που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά στην παρούσα μελέτη. Ο RutG είναι πολύ συγγενικός με τον μεταφορέα ουρακίλης UraA (38% ταυτότητα στην αλληλουχία) αλλά, με βάση την λεπτομερή και συγκριτική λειτουργική ανάλυση την οποία διενεργήσαμε, φαίνεται να έχει ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης. Ο RutG είχε ήδη υποδειχθεί ότι μπορεί να λειτουργεί ως μεταφορέας πυριμιδινών λόγω της συμμετοχής του γονιδίου *rutG* σε ένα οπερόνιο που συνδέεται με ένα ασυνήθιστο μονοπάτι καταβολισμού πυριμιδινών (pyrimidine utilization operon ή

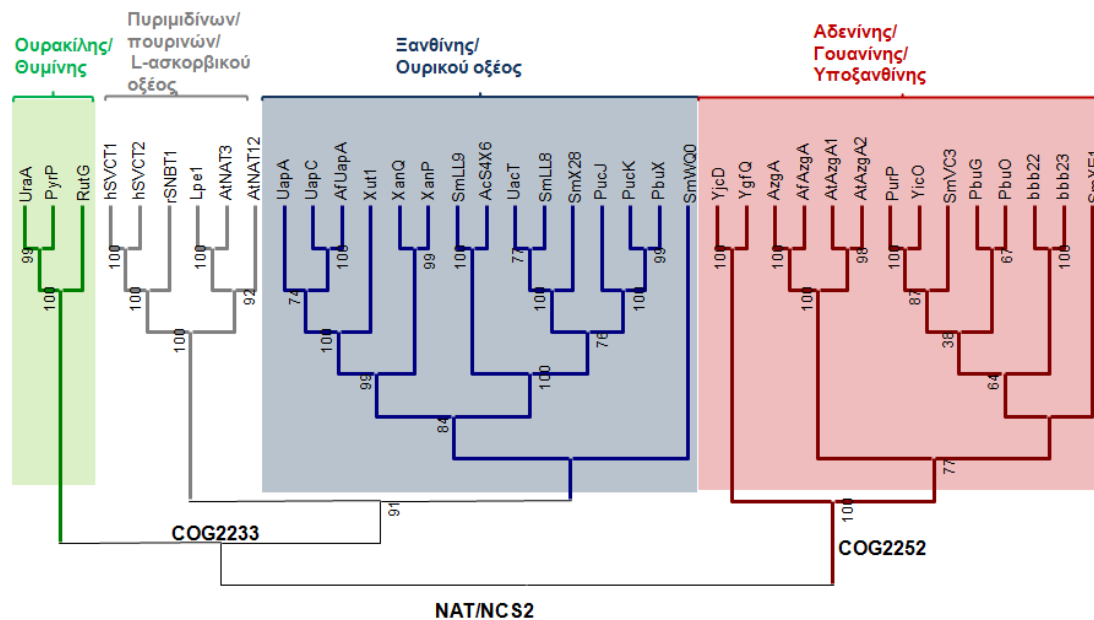
rut operon) (βλ. Κεφ. 1.4.2) (Parales and Ingram, 2010) και απαντάται σποραδικά, σε εντεροβακτήρια [σποραδική κατανομή εμφανίζεται και ανάμεσα σε διαφορετικά στελέχη της *E. coli*, μερικά από τα οποία έχουν πιθανά ομόλογα ψευδογονίδια με εσωτερικές ελλείψεις ή εκτεταμένες αλλαγές κωδικονίων σε σχέση με το λειτουργικό γονίδιο *rutG* (Lazou and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα)]. Αν και είχε υποτεθεί αρχικά ότι λειτουργεί σαν ένας δεύτερος μεταφορέας ουρακίλης, λόγω της ομοιότητάς του με τον UraA (Loh *et al.*, 2006), από τη μελέτη μας αποδείχθηκε ότι ο RutG έχει ευρύτερη εξειδίκευση, δηλαδή είναι μεταφορέας ουρακίλης και θυμίνης, κυρίως, ενώ μεταφέρει με σχετικά χαμηλή συγγένεια και ξανθίνη.

Διαφορετικοί μεταφορείς για αδενίνη και για γουανίνη/υποξανθίνη

Στην ομάδα COG2252 της οικογένειας NAT/NCS2 ανήκουν τέσσερα ομόλογα από το γονιδίωμα της *E. coli* K-12, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως μεταφορείς αδενίνης PurP και YicO και μεταφορείς γουανίνης/υποξανθίνης YjcD και YgfQ (Papakostas *et al.*, 2013). Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με άλλες μελέτες που είχαν υποδείξει ότι ο PurP συνδέεται με την εξάρτηση της *E. coli* από την αδενίνη ως πηγή αζώτου (Burton, 1994) και ότι ο YjcD συνδέεται με την ευαισθησία σε ορισμένα κυτταροτοξικά ανάλογα της γουανίνης (Kozmin *et al.*, 2013). Οι έως τώρα γνωστές λειτουργίες μεταφορείς που ανήκουν στην ομάδα COG2252, κυρίως από μύκητες (Cecchetto *et al.*, 2004) και φυτά (Mansfield *et al.*, 2009), είχαν ευρεία εξειδίκευση, και για τις τρεις πουρίνες (αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη). Το ίδιο ισχύει και για τον μεταφορέα SmVC3 από το ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* που αναλύθηκε στην παρούσα Διατριβή (Κεφ. 3.2). Ωστόσο, για πρώτη φορά, στην παρούσα Διατριβή, βρέθηκαν και μεταφορείς COG2252 που είναι εξειδικευμένοι στην μεταφορά είτε αδενίνης είτε γουανίνης (και υποξανθίνης). Στην *E. coli* K-12, ο PurP (και το παράλογο YicO) μεταφέρει μόνο αδενίνη ενώ ο YjcD (και το παράλογο YgfQ) μόνο γουανίνη και υποξανθίνη και, αντίστοιχα, εμπίπτουν σε δύο σαφώς διακριτά προφίλ εξειδίκευσης που δεν έχουν σχεδόν καμία επικάλυψη ως προς τα ανάλογα που μπορούν να αναγνωρίσουν (Εικόνα 3.3.2) (βλ. και Papakostas *et al.*, 2013). Παρά τις ξεκάθαρες διαφορές στην εξειδίκευση, ο PurP και ο YjcD έχουν σημαντικό ποσοστό ταυτότητας στις αλληλουχίες τους (34%). Μάλιστα, τα λειτουργικά δεδομένα (Papakostas *et al.*, 2013) και δεδομένα από αναλύσεις μεταγραφικής ρύθμισης (Cho *et al.*, 2011; Marbach *et al.*, 2012) και κυτταροτοξικότητας (Kozmin *et al.*, 2013) υποδηλώνουν ότι ο PurP και ο YjcD είναι οι κύριοι μεταφορείς αδενίνης και γουανίνης, αντίστοιχα, που λειτουργούν στην *E. coli*. Η σημασία της ύπαρξης διαφορετικών μεταφορέων για αδενίνη και για γουανίνη στο ίδιο γονιδίωμα

μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικές ανάγκες χρησιμοποίησης των πουρινών αυτών και διαφορετικούς τρόπους ρύθμισης. Είναι ενδιαφέρον ότι, από νεώτερα αποτελέσματα στο εργαστήριό μας έχουν βρεθεί μεταφορείς COG2252 και από άλλα πρωτεοβακτήρια που είναι εξειδικευμένοι είτε μόνο για αδενίνη (Κεφ. 3.2) είτε μόνο για γουανίνη (Lazou and Frillingos, unpublished).

Οι φυλογενετικές σχέσεις των νέων μεταφορέων που αναλύθηκαν στην παρούσα Διατριβή και των ομόλογων μεταφορέων πουρινών/πυριμιδινών που ήταν γνωστοί από προηγούμενες μελέτες φαίνονται στην Εικόνα 4.1.



Εικόνα 4.1 Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας NAT/NCS2. Στην ομάδα COG2233 τονίζονται με πράσινο χρώμα οι μεταφορείς πυριμιδινών και με πορτοκαλί οι μεταφορείς 2-οξυπουρινών (Ξανθίνης/ουρικού οξέος). Με μωβ τονίζονται οι μεταφορείς αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης (COG2252). Χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών με το πρόγραμμα ClustalW και η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε με βάση τον αλγόριθμο neighbor-joining με το πρόγραμμα MEGA6.06. Τα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την *E.coli*: UraA (P0AGM7), RutG (P75892), XanQ (P67444), XanP (P0AGM9), UacT (Q46821), YjcD (P0AF52), YgfQ (Q46817), PurP (P31466), YicO (P31440), *Bacillus subtilis*: PyrP (YP_003865951), PucJ (O32139), PucK (O32140), PbuX (P42086), PbuG (O34987), *Sinorhizobium meliloti*: SmlL9 (Q92LL9), SmlL8 (Q92LL8), SmVC3 (Q92VC3), SmYE1 (Q92YE1), SmWQ0 (Q92WQ0), SmX28 (Q92X28), *Acinetobacter calcoaceticus*: AcS4X6 (WP_003654128), *Aspergillus nidulans*: UapA (Q07307), UapC (P48777), AzgA (Q7Z8R3), *Aspergillus fumigatus*: AfUapA (XP748919), AfAzgA (XP_753664.1), *Candida albicans* Xut1 (AAX22221.1), *Arabidopsis thaliana* AtAzgA1 (AEE74982) AtAzgA2 (AED95923) AtNAT3 (Q8GZD4) AtNAT12 (Q3E7D0), *Zea mays* Lpe1 (NP_001150400.1) *Homo sapiens* hSVCT1 (Q9UHI7), hSVCT2 (Q9UGH3), *Rattus norvegicus* rSNBT1 (BAI66650).

4.1.2 Οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 από το *Sinorhizobium meliloti*

Το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti* 1021 χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλο για την μελέτη των συμβιωτικών σχέσεων βακτηρίων-φυτών και για τον σχηματισμό φυματίων μη καθορισμένου τύπου κατά την συμβιωτική αζωτοδέσμευση (βλ. Κεφ.1.4.1). Στην ανάπτυξη του συμβιωτικού φυματίου παίζουν σημαντικό ρόλο τα συστήματα διαμεμβρανικής μεταφοράς των απαραίτητων μεταβολιτών που πρέπει να ανταλλάσσονται μεταξύ φυτικών κυττάρων και ριζοβίου για να μπορεί να γίνεται αποδοτική αζωτοδέσμευση (Udvardi and Poole, 2013). Από τα συστήματα αυτά, λίγα έχουν μελετηθεί διεξοδικά έως σήμερα. Έκτος από τα βασικά συστήματα μεταφοράς που χρειάζονται σε όλους τους τύπους αζωτοδέσμευσης (μεταφορά μηλικού από το φυτό για την τροφοδοσία του κύκλου του Krebs και μεταφορά αμμωνίας που προκύπτει από την αζωτοδέσμευση στο βακτηριοειδές), υπάρχουν αρκετά δυνητικά συστήματα μεταφοράς άλλων μεταβολιτών που μπορεί να χρειάζονται σε διαφορετικό βαθμό σε διαφορετικούς τύπους αζωτοδέσμευσης και δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Παράδειγμα είναι βακτηριακοί μεταφορείς αμινοξέων με διακλαδισμένη αλειφατική πλευρική αλυσίδα (Ile, Val, Leu) που εκφράζονται σε ορισμένα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια που εμφανίζουν αυξοτροφία στα αμινοξέα αυτά και πιθανόν να τα χρησιμοποιούν ως πηγές αζώτου κατά την ανάπτυξη των συμβιωτικών φυματίων (Prell *et al.*, 2009). Άλλο παράδειγμα θα μπορούσε να είναι οι βακτηριακοί μεταφορείς πουρινών του *S.meliloti*, και ιδίως ο μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού SmLL9 (Κεφ. 3.2), όπως συζητείται παρακάτω. Η κατανόηση της λειτουργίας και του φυσιολογικού ρόλου τέτοιων συστημάτων μεταφοράς θα μπορούσε να επιτρέψει βιοτεχνολογικές εφαρμογές για βελτίωση της απόδοσης με τον τύπο συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης που χρησιμοποιείται.

Ο SmLL9 (COG2233) είναι μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος με ευρεία εξειδίκευση που διαφέρει από τους ομόλογους μεταφορείς της *E.coli*

Όπως είδαμε το *S. meliloti* φέρει τέσσερεις πιθανούς μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού (COG2233) και δύο πιθανούς μεταφορείς αδενίνης/γουανίνης ή/και υποξανθίνης (COG2252). Βρέθηκε ότι οι μεταφορείς SmLL8 και SmX28 (COG2233) ανήκουν φυλογενετικά στον ίδιο κλάδο με το UacT της *E.coli* (Εικόνα 4.1) και είναι μεταφορείς μόνο ουρικού οξέος όπως και ο UacT (Papakostas and Frillingos, 2012). Στον ίδιο κλάδο ανήκει και ο SmWQ0. Η λειτουργία του όμως παραμένει άγνωστη καθώς δεν μεταφέρει ουρικό οξύ ή ξανθίνη (Κεφ. 3.2). Στον ίδιο κλάδο της ομάδας COG2233 ανήκει και ο μεταφορέας SmLL9 (Εικόνα 4.1) ο οποίος βρέθηκε ότι έχει διπλή εξειδίκευση καθώς μεταφέρει ξανθίνη και ουρικό οξύ. Το λειτουργικό προφίλ του SmLL9 (βλ. Εικόνα 3.2.3) δείχνει ότι διαφέρει τόσο από

τον UacT (μεταφορέα μόνο ουρικού οξέος, σχετικά χαμηλής συγγένειας) όσο και από τον XapQ (μεταφορέα μόνο ξανθίνης, που δεν αναγνωρίζει ουρικό οξύ ή άλλα ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 7 και/ή 8 της ιμιδαζολικής πλευράς του δακτυλίου) που υπάρχουν στην *E.coli* (Frillingos, 2013; Karatza and Frillingos, 2005). Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε λειτουργικά και ένας άλλος βακτηριακός μεταφορέας αυτής της ομάδας από το σύμπλεγμα *Acinetobacter calcoaceticus/ baumannii* (AcS4X6, Εικόνα 4.1) ο οποίος είναι και αυτός διπλής εξειδίκευσης, για ουρικό οξύ και ξανθίνη, αλλά έχει πιο περιορισμένη εξειδίκευση από τον SmLL9 γιατί δεν αναγνωρίζει σε σημαντικό βαθμό ανάλογα ξανθίνη τροποποιημένα στην πυριμιδινική πλευρά του δακτυλίου καθώς και την 7-μεθυλοξανθίνη (Λάζου και Φριλίγγος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο μεταφορέας SmLL9 είναι ίδιος με τον μεταφορέα XapQ σε ποσοστό 28% και με τον UacT 37%, ενώ με τον AcS4X6 του *A.calcoaceticus/ baumannii* έχει ακόμη μεγαλύτερη ταυτότητα (63%). Τα ποσοστά ταυτότητας αυτά είναι υψηλά και σε συνδυασμό με το ευρύ προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα SmLL9 τον καθιστούν σημαντικό εργαλείο για την εύρεση καθοριστών εξειδίκευσης στους μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2.

Ο SmVC3 (COG2252) είναι μεταφορέας αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης με ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης από τους ομόλογους μεταφορείς της *E.coli*

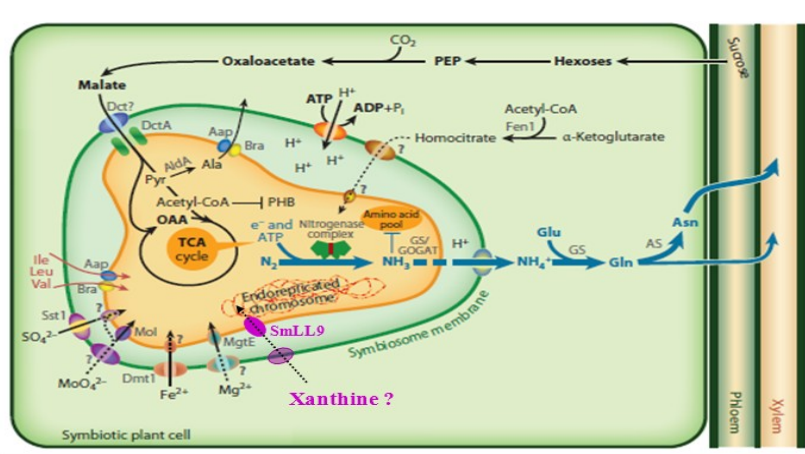
Από τα ομόλογα που ανήκουν στην ομάδα των AzgA-like (COG2252) βρέθηκε ότι ο μεταφορέας SmYE1 είναι μεταφορέας μόνο αδενίνης ενώ ο SmVC3 μεταφέρει και τα τρία γνωστά υποστρώματα της ομάδας αυτής: αδενίνη, γουανίνη και υποξανθίνη. Ο SmVC3, αν και βακτηριακός μεταφορέας, παρουσιάζει μια ευρύτερη εξειδίκευση μεταφέροντας και τα τρία υποστρώματα όπως οι ομόλογοι μεταφορείς μυκήτων και φυτών (Cecchetto *et al.*, 2004; Mansfield *et al.*, 2009) και όχι όπως συμβαίνει στην *E.coli* όπου όπως είδαμε υπάρχει σαφής διαχωρισμός της εξειδίκευσης των μεταφορέων αυτής της ομάδας (Papakostas *et al.*, 2013). Πρόσφατα, αναφέρθηκαν παρόμοιας ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς COG2252 και στην σπειροχαίτη *Borrelia burgdorferi*, αν και οι αναλύσεις αυτές στηρίζονταν κυρίως σε στελέχη με απαλείψεις των αντίστοιχων γενετικών τόπων (bbb22, bbb23) και των λοιμώξεων που προκαλούν τα στελέχη αυτά σε ποντικούς (Jain *et al.*, 2015). Ακόμη σημαντικότερο είναι ότι ο SmVC3 εμφανίζει πολύ υψηλή συντήρηση αλληλουχίας σε σχέση με τον ειδικό για αδενίνη μεταφορέα PurP (53% ταυτότητα), παρατήρηση που μπορεί να μας οδηγήσει στο μέλλον σε αναζήτηση της μοριακής βάσης αυτής της πολύ χαρακτηριστικής διαφοράς εξειδίκευσης. Στο πλαίσιο αυτό, το λειτουργικό προφίλ του μεταφορέα SmVC3 εξετάστηκε αναλυτικότερα και βρέθηκε ότι μπορεί να αναγνωρίσει ισχυρά ένα ευρύ φάσμα κυτταροτοξικών αναλόγων πουρινών, όπως ορισμένα

ανάλογα τόσο αδενίνης όσο και γουανίνης που αναγνωρίζονται με υψηλή συγγένεια είτε από τον PufP (6-διαμινοπουρίνη) είτε από τον YjcD (6-MP, 6-SG) (Γιαλελής και Φριλίγγος, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Πιθανός φυσιολογικός ρόλος του SmLL9 κατά την συμβίωση

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα από την μελέτη των μεταφορέων πουρινών του *Sinorhizobium meliloti* αφορά τον πιθανό φυσιολογικό ρόλο των μεταφορέων πουρινών κατά την συμβίωση στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια των ριζών του *Medicago truncatula*, όπως αναδείχθηκε από τη συνεργασία μας με την ερευνητική ομάδα του Επίκουρου Καθηγητή Ε. Φλεμετάκη (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Η αποτελεσματικότητα της αζωτοδέσμευσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, από τους οποίους ορισμένοι διαφέρουν αρκετά μεταξύ διαφορετικών τύπων συμβίωσης ριζοβίων-ψυχανθών. Τον πιο κεντρικό ρόλο έχουν οι φυτικοί και βακτηριακοί μεταφορείς στη μεμβράνη του συμβιοσώματος και του ριζοβίου, αντίστοιχα, οι οποίοι επιτρέπουν την ανταλλαγή ουσιωδών μεταβολιτών που είναι απαραίτητοι για την ολοκλήρωση του μεταβολισμού στο συμβιωτικό φυμάτιο. Από αυτούς, λίγοι σχετικά έχουν κατανοηθεί ως προς την λειτουργία τους (Clarke *et al.*, 2014) ενώ από μελέτες λειτουργικής γονιδιωματικής φαίνεται ότι διαφορετικές ομάδες ριζοβακτηρίων και ψυχανθών-ξενιστών μπορεί να χρησιμοποιούν μεταφορείς διαφορετικών μεταβολιτών και διαφορετικές μεταβολικές πορείες κατά την ανάπτυξη του συμβιοσώματος (Trepollilli *et al.*, 2012). Τα αποτελέσματα από τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των μεταφορέων πουρινών του *S.meliloti* που παρουσιάζονται στην παρούσα Διατριβή αξιολογήθηκαν περαιτέρω μέσω της συνεργασίας μας με το εργαστήριο του Ε. Φλεμετάκη, όπου μελετήθηκε η μεταγραφική έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων καθώς και των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των πουρινών του *S.meliloti* τόσο σε επίπεδο ελεύθερης καλλιέργειας κυττάρων του *S.meliloti* όσο και κατά την συμβίωση. Από τις παράλληλες αυτές μελέτες, είδαμε ότι, τόσο σε κύτταρα ελεύθερης καλλιέργειας που αναπτύχθηκαν με μοναδική πηγή αζώτου την ξανθίνη όσο και κατά την συμβίωση στις ρίζες του ψυχανθούς *M.truncatula*, τα μεταγραφικά επίπεδα του μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος SmLL9 είναι αυξημένα και ταυτόχρονα αυξάνονται και τα μεταγραφικά επίπεδα ενζύμων του καταβολισμού πουρινών προς παραγωγή NH₃ (βλ. Κεφ. 3.2, Εικόνα 3.2.5). Το *S.meliloti* δεν φέρει κάποιον άλλον μεταφορέα αυτής της οικογένειας που να μπορεί να μεταφέρει ξανθίνη. Στην περίπτωση των κυττάρων ελεύθερης καλλιέργειας δείξαμε ότι σε αυτές τις συνθήκες η ξανθίνη μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα σε υψηλά επίπεδα, ενώ το ίδιο συμβαίνει με κύτταρα του *Mesorhizobium loti* (που στερείται των αντίστοιχων γονιδίων για μεταφορείς πουρινών και κανονικά δεν αυξάνεται σε ξανθίνη) που έχουν

τροποποιηθεί ώστε να εκφράζουν το γονίδιο για τον SmLL9 (Εικόνα 3.2.6). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι και κατά την συμβίωση στα φυμάτια ο μεταφορέας SmLL9 είναι από την πλευρά του βακτηρίου ο υπεύθυνος για την μεταφορά στο βακτηριοειδές της Ξανθίνης. Για να φτάσει όμως έξω από την μεμβράνη του βακτηριοειδούς η Ξανθίνη, θα πρέπει να υπάρχει και ένας φυτικής προέλευσης μεταφορέας Ξανθίνης που να την μεταφέρει διαμέσου της μεμβράνης του συμβιοσώματος (Εικόνα 4.2). Αυτός ο φυτικός μεταφορέας Ξανθίνης μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστος. Στο γονιδίωμα του φυτού υπάρχουν 41 πιθανοί μεταφορείς από τις οικογένειες ENT, NCS1 NAT/NCS2, PUP/POP και UPS/NBUT (οι οικογένειες αυτές αναφέρονται στην Εισαγωγή, Κεφ. 1.2). Κατά την συμβίωση τα μεταγραφικά επίπεδα του Mtr2g015470 της οικογένειας PUP/POP αυξάνονται, υποδεικνύοντας ότι αυτός θα μπορούσε να είναι ο φυτικός μεταφορέας της Ξανθίνης (Ε. Φλεμετάκης, προφορική επικοινωνία). Επιπλέον η αποτελεσματική πρόσληψη Ξανθίνης από το βακτηριοειδές φαίνεται ότι έχει αντίκτυπο και στην ανάπτυξη του φυτού. Πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *S.meliloti* αγρίου τύπου και κύτταρα *S.meliloti* στα οποία είχε γίνει αποσιώπηση (knockout) του γονιδίου του SmLL9 και με τα οποία μολύνθηκαν φυτά *M.truncatula*, έδειξαν ότι η πρόσληψη Ξανθίνης μέσω του SmLL9 συντελεί σημαντικά στην ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες έλλειψης προσφοράς πηγών αζώτου (Καλλιαμπάκου και Φλεμετάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας και του φυσιολογικού ρόλου τέτοιων συστημάτων διαμεμβρανικής μεταφοράς θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε εφαρμογές για την βελτίωση της αποδοτικότητας της αζωτοδέσμευσης. Μια τέτοια εφαρμογή θα μπορούσε να είναι ο μετασχηματισμός άλλων ριζοβακτηρίων που δεν φέρουν κάποιο μεταφορέα Ξανθίνης ώστε να ενισχυθεί η αζωτοδέσμευση και σε άλλους τύπους συμβίωσης βακτηρίων-φυτών.



Εικόνα 4.2 Σχηματική απεικόνιση του βακτηριοειδούς μέσα στο φυτικό κύτταρο στο στάδιο του ώριμου φυματίου. Η εικόνα προέρχεται από την δημοσίευση των Udvardi and Poole (2013) και τροποποιήθηκε με βάση τα αποτελέσματά μας για την μεταφορά της Ξανθίνης.

4.2 Νέες γνώσεις για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στην οικογένεια NAT/NCS2

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων της συγκριτικής μεταλλαξιγένεσης των ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 που παρουσιάζονται στην παρούσα Διατριβή, προκύπτουν συμπεράσματα για τις θέσεις αμινοξέων που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία ή συνεισφέρουν καθοριστικά στην εξειδίκευση και ανήκουν στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης ή στην περιφέρεια του κέντρου δέσμευσης.

Από τη συνολική εικόνα που προκύπτει, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο ομάδες σημαντικών καταλοίπων γύρω από το προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Η μια ομάδα σημαντικών καταλοίπων αφορά θέσεις που είναι αναντικατάστατες ή υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή τους και ο ρόλος τους αυτός συντηρείται με μικρές παραλλαγές στα περισσότερα ομόλογα της οικογένειας ανεξάρτητα από την επιμέρους εξειδίκευσή τους. Η δεύτερη ομάδα σημαντικών καταλοίπων αφορά ορισμένες θέσεις που φαίνεται να καθορίζουν τις διαφορετικές εξειδικεύσεις των μεταφορέων της οικογένειας και φαίνεται να είναι διαφορετικές ανάλογα με τον επιμέρους κλάδο ομολόγων της οικογένειας, όπως αναλύεται παρακάτω.

4.2.1 Μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της ομάδας COG2233

Οι μελέτες μεταλλαξιγένεσης στην παρούσα Διατριβή περιορίστηκαν κυρίως στην περιοχή του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης των εξεταζόμενων νέων μεταφορέων και, συγκεκριμένα, σε θέσεις των TM3, TM8 και TM10 που συμμετέχουν άμεσα στην πρόσδεση του υποστρώματος με βάση την δομική ανάλυση του UraA (Lu *et al.*, 2011) και του UapA (Alguel *et al.*, 2016; Kostı *et al.*, 2012) και την ανάλυση μοριακής προσομοίωσης του XanQ (Karena *et al.*, 2015), αλλά και σε θέσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης στα TM1, TM3, TM9 και TM10 οι οποίες φαίνεται να συνεισφέρουν στη δομική-λειτουργική οργάνωση του κέντρου δέσμευσης με έμμεσο τρόπο. Η συντήρηση των πλευρικών ομάδων στις θέσεις αυτές στους λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που είτε μελετήθηκαν στην παρούσα Διατριβή είτε ήταν γνωστοί από προηγούμενες μελέτες φαίνεται στην Εικόνα 4.3, ενώ στην Εικόνα 4.4 συνοψίζονται τα βασικά στοιχεία για τον ρόλο των αντίστοιχων αμινοξέων στους διάφορους μεταφορείς όπως προκύπτει από τις μελέτες μεταλλαξιγένεσης.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης της παρούσας Διατριβής και προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου μας για την ομάδα βακτηριακών ομολόγων που περιλαμβάνουν τους μεταφορείς ξανθίνης ή/και

ουρικού οξέος XanQ, UacT και SmLL9 (Κεφ. 3.2), αναδεικνύονται κυρίως οι ρόλοι σημαντικών καταλοίπων του κέντρου δέσμησης, και οι ρόλοι αυτοί φαίνεται να διατηρούνται σχεδόν σε όλους τους μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2233.

Τα αναντικατάστατα και συντηρημένα Glu-272 (αρίθμηση σύμφωνα με τον XanQ) (TM8) και Gln-324 (TM10) προβλέπεται να αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα μέσω δεσμών υδρογόνου (Alguet *et al.*, 2016; Karena *et al.*, 2015). Αυτά τα δύο κατάλοιπα αμινοξέων έχουν βρεθεί ότι είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία, τόσο στον SmLL9 (Κεφ. 3.2), όσο και στους άλλους βακτηριακούς μεταφορείς που μελετήθηκαν [XanQ (Karena and Frillingos, 2009), και UacT (Papakostas and Frillingos, 2012)], αλλά και στον UapA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Papageorgiou *et al.*, 2008) που επίσης ανήκει στον ίδιο φυλογενετικό κλάδο (Εικόνα 4.1).

Άλλα σημαντικά κατάλοιπα αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα έμμεσα ή μέσω δεσμών από την κυρίως αλυσίδα του πολυπεπτιδίου φαίνεται να συνδέονται σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό με την εξειδίκευση. Τέτοια κατάλοιπα είναι το πολικό Asn/Thr/Ser-93 (TM3) που είναι καθοριστικό για τη διάκριση ξανθίνης και ουρικού οξέος (8-οξο-ξανθίνης) τόσο στον SmLL9 (Κεφ. 3.2) όσο και στα άλλα βακτηριακά ομόλογα αυτής της ομάδας (XanQ, UacT) (Karena and Frillingos, 2011; Papakostas and Frillingos, 2012) και τα Asp/Met-276 (TM8) και Ala/Ser-323 (TM10) που επίσης συμβάλλουν στη διάκριση αυτή, αλλά σε μικρότερο βαθμό και ανάλογα με το ομόλογο. Μοριακή προσομοίωση της πρόσδεσης της ξανθίνης στο κέντρο δέσμησης του XanQ (Karena *et al.*, 2015) υποδεικνύει ότι η Asn-93, κυρίως, αλλά και το Asp-276, συμμετέχουν σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση του Glu-272 με την ιμιδαζολική πλευρά της ξανθίνης στο κέντρο δέσμησης (Εικόνα 4.5). Η συμμετοχή της θέσης Asn/Thr/Ser-93 (TM3) στον καθορισμό της εξειδίκευσης θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις αλλαγές που συμβαίνουν σε αυτό το δίκτυο δεσμών υδρογόνου όταν εισαχθούν οι ανάλογες αντικαταστάσεις (βλ. στη συνέχεια), καθώς και από τα μοτίβα συντήρησης της πλευρικής ομάδας της θέσης αυτής στους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος (Εικόνα 4.3).

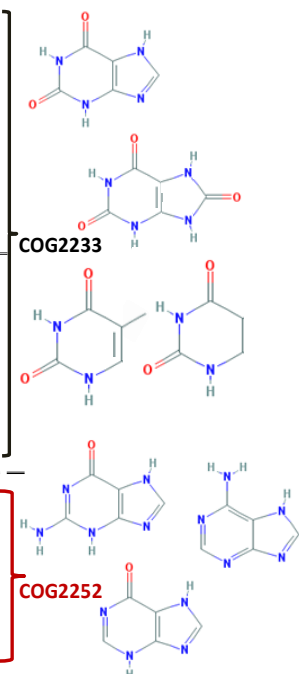
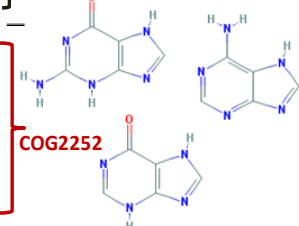
	TM1	TM3		TM8	TM9		TM10			
XanQ	31	93	94	272	276	304	323	324	325	326
XanQ	His	Asn	Phe	Glu	Asp	Asp	Ala	Gln	Asn	Asn
XanP	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Asn	Gly	Gln	Asn	Asn
UapA	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Asp	Ala	Gln	Asn	Asn
UapC	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Asn
AfUapC	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Asn
Xut1	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Asp	Ala	Gln	Asn	Asn
SmLL9	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Asp	Ala	Gln	Asn	Val
UacT	His	Thr	Phe	Glu	Met	Asp	Ser	Gln	Asn	Val
PbuX	His	Thr	Phe	Glu	Val	Glu	Ser	Gln	Asn	Val
PucJ	His	Ser	Phe	Glu	Val	Glu	Ala	Gln	Asn	Ala
PucK	His	Thr	Phe	Glu	Val	Glu	Ser	Gln	Asn	Val
UraA	His	Ser	Phe	Glu	His	Asn	Gly	Glu	Asn	Ile
RutG	His	Ser	Ala	Glu	His	Asp	Ala	Glu	Asn	Ile
PyrP	His	Ser	Phe	Glu	His	Asp	Gly	Glu	Asn	Ile
AtNAT3	His	Ser	Phe	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Asn	Val
AtNAT12	His	Ser	Phe	Glu	Ser	Glu	Val	Glu	Asn	Val
ZmLpe1	His	Ser	Phe	Glu	Thr	Gln	Thr	Glu	Asn	Ala
rSNBT1	His	Thr	Phe	Glu	Asp	Glu	Val	Glu	Asn	Val
hSVCT2	His	Ala	Phe	Glu	Asp	Glu	Ser	Glu	Asn	Ile
hSVCT1	His	Ala	Phe	Glu	Asp	Glu	Ser	Pro	Asn	Ile
PurP	Thr	Ala	Met	Asp	Thr	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile
YicO	Thr	Ala	Met	Asp	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Ser
YjcD	Thr	Ala	Ile	Asp	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Ser
YgfQ	Thr	Ala	Ile	Asp	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Ser
PbuG	Thr	Gly	Met	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	Ser	Ser
PbuO	Thr	Gly	Met	Asp	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Ser
AzgA	Thr	Gly	Met	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	Ser	Ser
AfAzgA	Thr	Gly	Met	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	Ser	Ser
AtAzgA1	Thr	Gly	Met	Asp	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Ser
AtAzgA2	Thr	Gly	Met	Val	Val	Asp	Val	Glu	Ser	Ser

COG2233
 •Ξανθίνη/ουρικό οξύ
 •Ουρακίλη/θυμίνη/
 πουρίνες

COG2233
 •L-ασκορβικό οξύ

COG2252
 •Αδενίνη/γουανίνη/
 υποξανθίνη

Εικόνα 4.3 Η συντήρηση των καταλοίπων γύρω από το κέντρο δέσμευσης στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι γνωστές λειτουργίας μεταφορείς της οικογένειας και οι σημαντικές θέσεις των ελίκων TM1, TM3, TM8, TM9 και TM10. Σε κόκκινο πλαίσιο είναι οι θέσεις που συντηρούν Asp ή Glu, με μωβ πλαίσιο His, με πράσινο θέσεις που συντηρούνται αρωματικά κατάλοιπα, με μπλε πολικά, με καφέ μικρά και με κίτρινο υδρόφοβα κατάλοιπα. Η αρίθμηση των θέσεων των καταλοίπων είναι σύμφωνα με τον XanQ. Οι αριθμοί πρόσβασης (accession numbers) για τα ομόλογα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι πειραματικές λεπτομέρειες της στοίχισης των αλληλουχιών είναι όπως αναφέρονται στην Εικόνα 4.1.

	TM1	TM3	TM8	TM9	TM10	
UapA (Ουρικό οξύ/ Ξανθίνη)	His	Ser	Glu Asp	Asp	Ala Gln Asn Asn	 <p>COG2233</p> <p>COG2252</p>
SmLL9 (Ξανθίνη/ Ουρικό οξύ)	His	Ser	Glu Asp	Asp	Ala Gln Asn Val	
UacT (Ουρικό οξύ)	His	Thr	Glu Met	Asp	Ser Gln Asn Val	
XanQ (Ξανθίνη)	His	Asn	Glu Asp	Asp	Ala Gln Asn Asn	
RutG (Ουρακίλη/ Θυμίνη/Ξανθίνη)	His	Ser Ala	Glu His	Asp	Ala Glu Asn Ile	
UraA (Ουρακίλη)	His	Ser Phe	Glu His	Asn	Gly Glu Asn Ile	
rSNBT1 (πυριμιδίνες/ πουρίνες)	His	Thr	Glu Asp	Glu	Ser Glu Asn Val	
PurP (Αδερίνη)	Thr	Ala Met	Asp Thr	Asp	Ile Glu Ser	 <p>COG2252</p>
YjcD (Υποξανθίνη Γουανίνη)	Thr	Ala Met	Asp Thr	Asp	Ile Glu Ser	
AzgA (Αδερίνη/ Υποξανθίνη/ Γουανίνη)	Thr	Gly Met	Asp Thr	Asp	Val Glu Ser	

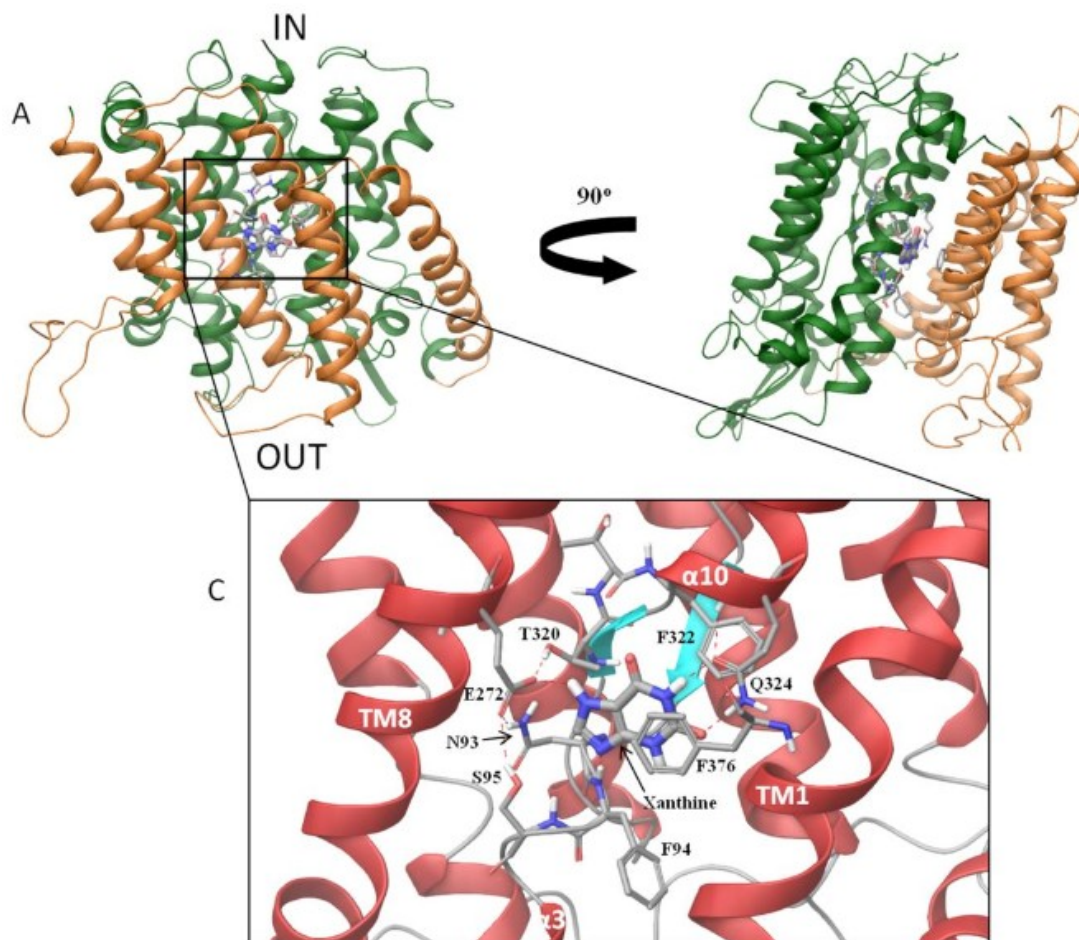
Εικόνα 4.4 Ο ρόλος σημαντικών καταλοίπων γύρω από το κέντρο δέσμευσης στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι γνωστές λειτουργίες μεταφορείς της οικογένειας (που έχουν αναλυθεί σε σημαντικό βαθμό με μεταλλαξιγένεση) και οι σημαντικές θέσεις των ελίκων TM1, TM3, TM8, TM9 και TM10. Στις περιπτώσεις που υπάρχουν δεδομένα από μεταλλαξιγένεση παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα αναντικατάστατα, με πορτοκαλί όσα υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή τους, και με πράσινο θέσεις των οποίων οι αντικαταστάσεις οδηγούν σε αλλαγή εξειδίκευσης. Η αρίθμηση των θέσεων των αντίστοιχων καταλοίπων, καθώς και οι αριθμοί πρόσβασης (accession numbers) των ομολόγων είναι όπως στην Εικόνα 4.3. Στα δεξιά φαίνεται το κέντρο δέσμευσης από την κρυσταλλική δομή του UraA (από Lu *et al.*, 2011), όπου φαίνονται οι θέσεις των Phe (TM3), Glu (TM8), His (TM8), Gly (TM10) και Glu (TM10).

Μοριακή βάση της εξειδίκευσης: πολικό κατάλοιπο στη θέση N93 της TM3 επηρεάζει την αναγνώριση ξανθίνης/ουρικού οξέος

Στους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της ομάδας COG2233 η εξειδίκευση φαίνεται να καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το αμινοξύ στη θέση Asn/Thr/Ser-93 του TM3 (για παράδειγμα, N93 στον XanQ, S93 στον SmLL9, βλ. Εικόνα 4.3). Στον UacT αλλαγή της Thr-100 σε Ala αλλάζει τον μεταφορέα από ουρικού οξέος σε διπλής εξειδίκευσης. Αντικατάσταση με Ser, επίσης, επιτρέπει την μεταφορά ξανθίνης καλύτερα από το ουρικό οξύ που είναι το φυσικό υπόστρωμα (Papakostas and Frillingos, 2012). Στον μεταφορέα μόνο ξανθίνης XanQ (N93) τα μεταλλάγματα N93A και N93S μεταφέρουν τόσο ξανθίνη όσο και ουρικό οξύ, αν και το ουρικό οξύ μεταφέρεται με πολύ μικρή ενεργότητα (Karena and Frillingos, 2009). Στον μεταφορέα διπλής εξειδίκευσης ξανθίνης και ουρικού οξέος UapA (Ser-154) η αλλαγή της Ser με Ala αυξάνει την συγγένεια για την ξανθίνη αλλάζοντας την προτίμηση του διπλής εξειδίκευσης μεταφορέα χωρίς να καταργείται η μεταφορά ενός εκ των δύο υποστρωμάτων (Amillis *et al.*, 2011). Στον μεταφορέα διπλής εξειδίκευσης SmLL9, η αλλαγή της Ser-93 σε Asn μειώνει σημαντικά την αναγνώριση του ουρικού οξέος αλλά δεν την καταργεί (παρούσα Διατριβή, Κεφ. 3.2). Άρα λοιπόν η θέση αυτή, η οποία δεν είναι αυστηρά συντηρημένη στους μεταφορείς της οικογένειας, φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο για το αν ο μεταφορέας θα μεταφέρει ξανθίνη, ουρικό οξύ ή και τα δύο. Οι γνωστοί διπλής εξειδίκευσης μεταφορείς συντηρούν Ser στη θέση αυτή και σε αυτούς τους μεταφορείς (SmLL9, UapA) η αντικατάστασή της δεν αλλάζει το εύρος των μεταφερομένων υποστρωμάτων. Στους μεταφορείς μόνο ξανθίνης (XanQ) ή μόνο ουρικού οξέος (UacT) η αντικατάσταση αυτής της θέσης με Ser ή Ala τους μετατρέπει σε διπλής εξειδίκευσης, ξανθίνης και ουρικού οξέος.

Βάσει της δομικής μοντελοποίησης, η πλευρική ομάδα του καταλοίπου που βρίσκεται σε αυτή τη θέση επηρεάζει ίσως έμμεσα την εξειδίκευση του μεταφορέα, περιορίζοντας τον χώρο στο κέντρο δέσμησης (όπως φαίνεται ιδιαίτερα με την Asn, στον XanQ) ή αφήνοντας περισσότερο χώρο (σε μεταλλάγματα με Ser ή Ala) και επιτρέποντας πιο ευέλικτες αλληλεπιδράσεις με διάφορες υποκαταστάσεις στη θέση C8 (Εικόνα 4.5). Συγκεκριμένα, το πολικό κατάλοιπο του TM3 έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει καταλυτικά τον τρόπο αναγνώρισης του υποστρώματος αφού στις περιπτώσεις με Asn στη θέση αυτή μπορεί να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το Glu του TM8 που συμμετέχει άμεσα στη δέσμηση του υποστρώματος. Τόσο στην UacT (Thr) όσο και στα διπλής εξειδίκευσης ομόλογα (Xut1, UapA, UapC, AfUapA, SmLL9) (ως Ser), η Thr ή Ser που καταλαμβάνει τη θέση της Asn-93 απομακρύνεται από το αντίστοιχο Glu-272 (TM8). Αντίθετα, στην XanQ, το ζεύγος Asn-93/Glu-272 είναι αρκετά κοντά ώστε να μπορεί να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου, ο οποίος φαίνεται ακόμη

καλύτερα με αναλύσεις μοριακής δυναμικής του μεταφορέα XanQ κατά την αλληλεπίδρασή της με την Ξανθίνη (Karena *et al.*, 2015).



Εικόνα 4.5 Το δίκτυο δεσμών υδρογόνου στο κέντρο δέσμευσης του μεταφορέα XanQ. (Επάνω) Συνολική εικόνα του μεταφορέα με το υπόστρωμα (Ξανθίνη) σύμφωνα με την μελέτη μοριακής δυναμικής (που έγινε από τη συνεργαζόμενη ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Ε. Μικρού, ΕΚΠΑ). Με πράσινο είναι οι έλικες της δομικής περιοχής «πυρήνα» (core domain) και με πορτοκαλί οι έλικες της δομικής περιοχής «εισόδου» (gate domain). (Κάτω) Η δέσμευση της Ξανθίνης στο κέντρο δέσμευσης. Με κόκκινο οι έλικες της περιοχής «πυρήνα» και με μπλε οι δύο β-κλώνοι (από τη δημοσίευση Karena *et al.*, 2015).

4.2.2. Μεταφορείς ουρακίλης και/ή θυμίνης ή πυριμιδινών/πουρινών της ομάδας COG2233

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης για την ομάδα ομολόγων που περιλαμβάνουν τους μεταφορείς ουρακίλης UraA και ουρακίλης/θυμίνης RutG της *E. coli* (Κεφ. 3.4) και τον μεταφορέα ουρακίλης/θυμίνης/6-οξυ-πουρινών rSNBT1 του επίμυος (Κεφ. 3.5) έδειξαν ότι διατηρείται ένας πολύ σημαντικός (λειτουργικά αναντικατάστατος) ρόλος για τις θέσεις Glu-241 (αρίθμηση σύμφωνα με τον UraA) και His/Asp-245 (TM8) αλλά και για το Glu-290 (TM10), το οποίο είναι αναντικατάστατο ως προς την ενεργότητα μεταφοράς πυριμιδινών και η αντικατάστασή του με Gln (αμινοξύ που συντηρείται στις αντίστοιχες περμεάσες ξανθίνης/ουρικού) στον ευρείας εξειδίκευσης rSNBT1 περιορίζει την εξειδίκευση στην αναγνώριση και μεταφορά πουρινών (ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη). Παράλληλα, φαίνεται ένας σημαντικός ρόλος της Phe/Ala-73 (TM3) στον καθορισμό της διεύθυνσης ή περιορισμού της εξειδίκευσης έναντι ουρακίλης και/ή θυμίνης (5-μεθυλο-ουρακίλης), ιδιαίτερα μεταξύ UraA και RutG, καθώς και της Ser/Thr-72 (TM3) για την ευρύτερη εξειδίκευση (δυνατότητα μεταφοράς πουρινών) του rSNBT1 και (λιγότερο) του RutG, ενώ σχετικά περιορισμένη συμβολή έχει η Gly/Ala/Ser-289 (TM10). Παρατηρούμε ότι από τα ανωτέρω αμινοξέα της περιοχής του κέντρου δέσμησης κρίσιμο ρόλο (όπως και σε όλες τις ομόλογες περμεάσες της ομάδας COG2233) έχουν οι πλευρικές ομάδες του TM8 (Glu-241, His/Asp-245) και η Glu/Gln-290 (TM10) που εμπλέκεται άμεσα στη δέσμηση υποστρώματος όπως και η Glu-241 (Lu *et al.*, 2011), καθώς και η Ser/Thr-72 (TM3), η οποία συσχετίζεται με την εξειδίκευση όπως και στην ομάδα των περμεασών ξανθίνης/ουρικού (βλ. 4.2.1), ενώ αναδεικνύεται μία νέα θέση κομβικής σημασίας για την επιλογή αναγνώρισης πυριμιδινών (ουρακίλης και/ή θυμίνης), η Phe/Ala-73 (TM3) (Εικόνα 4.6).

Μοριακή βάση της εξειδίκευσης: μικρό υδρόφοβο κατάλοιπο στη θέση F73 της TM3 καταργεί τη διάκριση ως προς την αναγνώριση ουρακίλης/θυμίνης

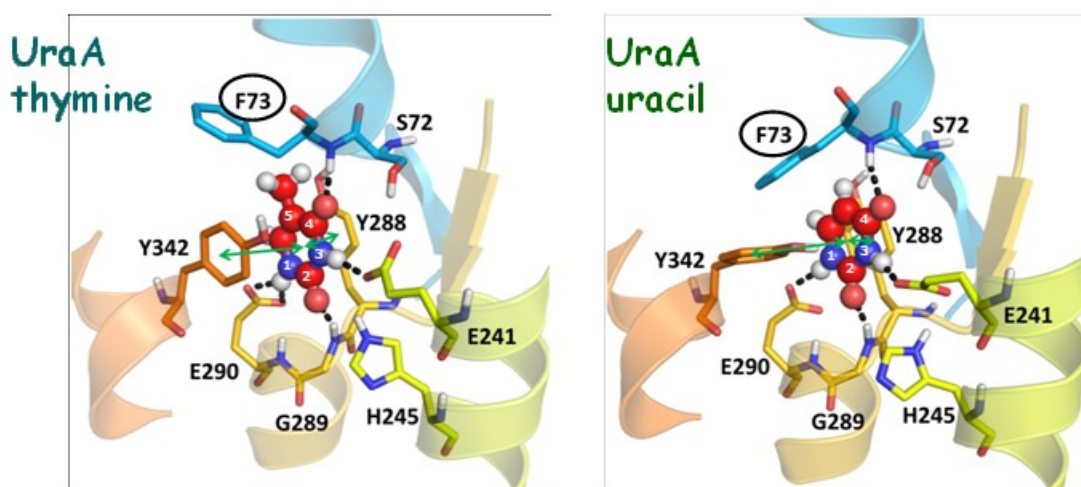
Οι μεταφορείς RutG και UraA, αν και έχουν πολύ όμοια αλληλουχία (38% ταυτότητα), εμφανίζουν μια καθαρή διαφορά εξειδίκευσης, ιδιαίτερα ως προς το ότι ο RutG είναι μεταφορέας υψηλής συγγένειας (K_m της τάξης των 1.5-2.0 μ M) τόσο για την ουρακίλη όσο και για την θυμίνη (5-μεθυλο-ουρακίλη) ενώ ο UraA μόνο για την ουρακίλη. Η ευρύτερη αυτή εξειδίκευση του RutG (η οποία επεκτείνεται και στην αναγνώριση, με μικρότερη όμως συγγένεια, της ξανθίνης και της οξυπουρινόλης) μπορεί να συνδέεται με τις σχετικά λίγες διαφορές αλληλουχίας που έχει από τον UraA σε δυνητικά σημαντικές θέσεις και, ιδιαίτερα, στην περιοχή του κέντρου δέσμησης υποστρώματος (Κεφ. 3.4). Μια

εντυπωσιακή παρατήρηση είναι ότι από τα αμινοξέα που ανήκουν στο κέντρο δέσμευσης και ενέχονται σε άμεσες επαφές με την ουρακίλη στην κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) ο RutG διαφέρει ειδικά σε δύο θέσεις, οι οποίες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το υπόστρωμα (ουρακίλη) μέσω των αμιδικών ατόμων N του πεπτιδικού σκελετού (βλ. Κεφ. 3.4, Εικόνα 3.4.3). Πρόκειται για τις Phe-73 (Ala-88 στον RutG) (TM3) και Gly-289 (Ala-308 στον RutG) (TM10). Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης (Κεφ. 3.4) έδειξαν ότι η θέση F73 της TM3 είναι ο πιο σημαντικός καθοριστής της αυστηρής εξειδίκευσης του UraA για τη ουρακίλη, αφού όταν η Phe-73 αντικατασταθεί από Ala τότε το μέταλλαγμα μπορεί να μεταφέρει ουρακίλη αλλά επίσης αναγνωρίζει ισχυρά (K_i 10 μ M) και την θυμίνη. Ο μεταφορέας UraA αγρίου τύπου δεν αναγνωρίζει την θυμίνη καθόλου σε αντίθεση με τον μεταφορέα RutG που την αναγνωρίζει ισχυρά. Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) η Phe-73 (TM3) συμβάλλει άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος (ουρακίλης) μέσω δεσμού υδρογόνου από το αμιδικό άζωτο του πεπτιδικού σκελετού στη θέση αυτή και αλληλεπίδρασης του αρωματικού δακτυλίου της πλευρικής της ομάδας με την πυριμιδίνη ενώ συνεισφέρει επίσης μέσω δεσμών van der Waals μαζί με τις θέσεις Ala-31 (TM1), Tyr-288 (TM10), Tyr-342 (TM12).

Μελέτη μοριακής δυναμικής στον μεταφορέα UraA (από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Ε. Μικρού, Εικόνα 4.6) έδειξε ότι η F73 σταθεροποιεί την ουρακίλη στο κέντρο δέσμευσης ενώ με υπόστρωμα την θυμίνη ο αρωματικός δακτύλιος της φαινυλαλανίνης μετατοπίζεται και προσανατολίζεται ώστε να στρέφεται έξω από το κέντρο δέσμευσης, μια κατάσταση που δεν ευνοείται ενεργειακά (Εικόνα 4.6). Όταν αντικατασταθεί από Ala, ένα πολύ μικρότερο αμινοξύ, τότε η ουρακίλη μπορεί να συγκρατηθεί στο κέντρο δέσμευσης με διαφορετικές, πιο χαλαρές αλληλεπιδράσεις, ενώ δημιουργείται περισσότερος χώρος προς το κέντρο δέσμευσης και έτσι μπορεί να συγκρατηθεί και η θυμίνη στο ενεργό κέντρο, χωρίς να εμποδίζεται στερεοχημικά η διευθέτηση της 5-μεθυλομάδας (βλ. και Κεφ. 3.4, Εικόνα 3.4.13). Ο μηχανισμός αυτός δίνει μια πιθανή εξήγηση για το πώς το μέταλλαγμα F73A μπορεί να αναγνωρίζει την θυμίνη με υψηλή συγγένεια (K_i 10 μ M), αν και η ικανότητα ενεργού μεταφοράς θυμίνης του μεταλλάγματος αυτού είναι περιορισμένη (βλ. Εικόνα 3.4.7). Είναι πιθανό ότι επιπλέον αλλαγή/ές απαιτούνται στη βάση του μεταλλάγματος F73A προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατάλληλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων για να επιτραπεί αποτελεσματικότερη μεταφορά θυμίνης. Είναι ενδιαφέρον, ωστόσο, ότι η συνδυαστική αλλαγή F73A/G289A δεν ευνοεί την αναγνώριση της θυμίνης και φαίνεται ότι η Ala στη θέση της Gly-289 θέτει περιορισμούς στο χώρο που αναιρούν την αποτελεσματική διευθέτηση της θυμίνης στο κέντρο δέσμευσης του F73A (βλ. Εικόνα 3.4.7).

Η Phe διατηρείται σχεδόν καθολικά στη θέση F73 (TM3) στις περμεάσεις της οικογένειας NAT/NCS2 (ομάδα COG2233) (βλ. Εικόνα 4.3) και η Ala απαντάται

μόνο σποραδικά (κυρίως σε βακτηριακούς δυνητικούς μεταφορείς πυριμιδινών). Με βάση τα αποτελέσματά μας, η παρουσία της Ala θα μπορούσε να συσχετίζεται με ευρύτερη εξειδίκευση, για την αναγνώριση και μεταφορά όχι μόνο ουρακίλης αλλά και θυμίνης ή, σε μικρότερο βαθμό, και ξανθίνης ή άλλων πουρινών (βλ. Κεφ. 3.4). Η αντίστροφη αντικατάσταση, της A88 του RutG με Phe, δεν οδηγεί αντίστοιχα σε περιορισμό της εξειδίκευσης του RutG (Εικόνα 3.4.7) και αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι ο RutG μπορεί να χρησιμοποιεί γενικά πιο χαλαρές αλληλεπιδράσεις για την πρόσδεση της ουρακίλης και της θυμίνης στο ενεργό της κέντρο, οι οποίες μπορούν να αναπληρωθούν πιο εύκολα από ό,τι στον UraA (βλ. και Εικόνα 3.4.13). Τέλος, η αλλαγή της αντίστοιχης φαινυλομάδας (F94) έχει επίσης συσχετισθεί με μια (μικρής έκτασης) επίδραση στην εξειδίκευση και στον μεταφορέα XanQ (Karena and Frillingos, 2011).



Εικόνα 4.6 Προσανατολισμός της θέσης της Phe-73 παρουσία θυμίνης ή ουρακίλης στο ενεργό κέντρο του μεταφορέα UraA. Η ανάλυση βασίστηκε στην κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011) και σε μελέτη προσαρμογής υποστρωμάτων και προσομοίωσης με μοριακή δυναμική που έγινε από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Ε. Μικρού (Τμ. Φαρμακευτικής Χημείας, Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ) (Evangelidis and Mikros, unpublished).

Θέσεις που διευρύνουν περαιτέρω την εξειδίκευση των μεταφορέων ουρακίλης και/ή θυμίνης: καθοριστική για τη διάκριση μεταξύ πυριμιδινών και πουρινών στο κέντρο δέσμευσης μπορεί να είναι η θέση E397 (TM10)

Πώς όμως μπορεί να διευρυνθεί περαιτέρω η εξειδίκευση των μεταφορέων αυτού του υποκλάδου της ομάδας COG2233 έτσι ώστε εκτός από ουρακίλη/θυμίνη να μπορούν να μεταφέρουν και πουρίνες;

Από τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα ευρείας εξειδίκευσης rSNBT1 προκύπτει ότι καθοριστικό ρόλο στο άνοιγμα αυτό της εξειδίκευσης μπορεί να έχει η θέση E397 που βρίσκεται στο TM10 και ανήκει στο μοτίβο υπογραφή της οικογένειας. Στην θέση αυτή είδαμε ότι οι μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού οξέος συντηρούν Gln ενώ οι μεταφορείς UraA και RutG (ουρακίλης ή/και θυμίνης) έχουν Glu (Εικόνα 4.3). Το μετάλλαγμα του rSNBT1 E397Q μπορεί να μεταφέρει μόνο τις πουρίνες (ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανίνη) και όχι πυριμιδίνες (ουρακίλη, θυμίνη) (Κεφ. 3.5, Εικόνα 3.5.5). Η πρώτη αυτή ένδειξη που έχουμε από την μελέτη του rSNBT1 ενισχύεται και από την μελέτη της κρυσταλλικής δομής του UraA και τη λειτουργική ανάλυση μεταλλαγμάτων του UraA και τη μελέτη μοριακής προσομοίωσης τόσο στον UraA όσο και στον RutG που φανερώνει την άμεση σύνδεση του γλουταμικού στη θέση αυτή με τη δέσμευση του πυριμιδινικού υποστρώματος (ουρακίλης ή θυμίνης) (Κεφ. 3.4). Στον rSNBT1 η αντικατάσταση του E397 από Ala είχαμε ουσιαστικά πλήρη απενεργοποίηση (Εικόνα 3.5.5). Παρόμοια, όταν το αντίστοιχο E290 αντικαταστάθηκε από Ala ο μεταλλαγμένος μεταφορέας δεν ήταν σε θέση να δεσμεύσει ουρακίλη (Lu *et al.*, 2011). Αυτές οι λειτουργικές παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τον βασικό ρόλο της θέσης E397 στην πρόσδεση και μεταφορά πυριμιδινών.

Για να εξηγηθεί η αλλαγή εξειδίκευσης που συμβαίνει με την αντικατάσταση E397Q στον rSNBT1 μπορούμε να αναφερθούμε σε μελέτες μοριακής δυναμικής και προσομοίωσης της πρόσδεσης της ξανθίνης και της οξυπουρινόλης (induced-fit docking) που έχουν γίνει τόσο στον XanQ (Karena *et al.*, 2015) όσο και στον UapA (Kosti *et al.*, 2012) αλλά και στην πρόσφατη κρυσταλλογραφική δομική ανάλυση του UapA (Alquel *et al.*, 2016). Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι η Gln στη θέση E397 (TM10) συμμετέχει στην πρόσδεση της 6-οξυ-πουρίνης μέσω «διοδοντωτών» (bidentate) δεσμών υδρογόνου της καρβονυλομάδας με τις NH και C=O στις N1 και C6, αντίστοιχα, ή N1 και C2, αντίστοιχα, της ξανθίνης/οξυπουρινόλης. Επομένως, αν και δεν έχουν γίνει τέτοιες αναλύσεις μοριακής δυναμικής στον rSNBT1, μπορεί να υποθεθεί ότι η αντικατάσταση του E397 (TM10) με Glu αναγκάζει την 6-οξυ-πουρίνη (π.χ. ξανθίνη) να προσδεθεί με διαφορετικό τρόπο από ό,τι στον μεταφορέα αγρίου τύπου σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου και με τις δύο ομάδες, C=O και NH, της Gln-397. Μια τέτοια διαμόρφωση ίσως δεν ευνοείται στην περίπτωση που το

E397Q αλληλεπιδρά με την ουρακίλη (ή άλλη πυριμιδίνη) οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση του κέντρου δέσμευσης. Αντίθετα, ο rSNBT1(wt) έχει μία πιο εύκαμπτη πλευρική αλυσίδα και καρβοξυλομάδα στην αντίστοιχη θέση (Glu-397) και μπορεί να δημιουργεί διαφορετικού τύπου, χαλαρότερες αλληλεπιδράσεις τόσο με τις 6-οξυ-πουρίνες (Kosti *et al.*, 2012) όσο και με τις 4-οξυ-πυριμιδίνες (ουρακίλη, θυμίνη) ώστε να «δέχεται» και τις πυριμιδίνες, διασφαλίζοντας την ευρύτερη εξειδίκευση.

Μία άλλη θέση που φαίνεται να σχετίζεται με την ευρύτερη εξειδίκευση του rSNBT1 είναι η Thr-123 (TM3), η αντικατάσταση της οποίας με Ala οδηγεί σε περιορισμό της εξειδίκευσης και επιλεκτικότητας μόνο για ουρακίλη (Εικόνα 3.5.4). Στη θέση αυτή οι μεταφορείς της ομάδας COG2233 συντηρούν γενικά πολικές ομάδες αμινοξέων, που ποικίλουν σε μέγεθος και γεωμετρία (Ser, Thr, Asn) και, τουλάχιστον στις περμεάσες 2-οξυ-πουρινών, έχουν συσχετισθεί με τη διάκριση μεταξύ ουρικού οξέος (8-οξυ-ξανθίνη) και ξανθίνης (βλ. Κεφ. 4.2.1), ενώ σε μία τουλάχιστον περίπτωση (στον ευρείας εξειδίκευσης AtNAT12 από το φυτό *Arabidopsis thaliana*; Niopek-Witz *et al.*, 2014), η αντίστοιχη Ser φαίνεται να είναι απόλυτα απαραίτητη για τη λειτουργία. Είναι ενδιαφέρον ότι μία αντίστοιχη, μικρή τάση περιορισμού της εξειδίκευσης (μειωμένη συγγένεια για ξανθίνη χωρίς επίδραση στη συγγένεια ή στην ενεργότητα μεταφοράς για ουρακίλη ή θυμίνη) εντοπίζεται και με το ομόλογο μετάλλαγμα RutG(S87A) (Εικόνα 3.4.5). Τα φαινόμενα αυτά μπορεί να σχετίζονται με τις παρατηρήσεις από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ότι πολικό αμινοξύ σε αυτή τη θέση του TM3 μπορεί να συμμετέχει σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου περιμετρικά του κέντρου δέσμευσης που εμπλέκουν και τη θέση Glu-241/262/347 (TM8) και σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (Karena *et al.*, 2015), όπως προτάθηκε και για την ομάδα των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού που περιλαμβάνει τους XanQ και SmLL9 (βλ. Εικόνα 4.5).

4.2.3 Μεταφορείς αδενίνης ή υποξανθίνης/γουανίνης της ομάδας COG2252

Οι μεταφορείς PurP και YjcD είναι αντιπροσωπευτικοί των παραλόγων της ομάδας COG2252 (AzcA-like) της *E.coli* K-12 που εμφανίζουν χαρακτηριστική διάκριση επιλογής υποστρωμάτων (και αναλόγων τους) μεταξύ αδενίνης (PurP) και γουανίνης/υποξανθίνης (YjcD), διάκριση η οποία δεν απαντάται στα ευκαρυωτικά ομόλογα της ομάδας αυτής (βλ. Krypotou *et al.*, 2014). Τόσο τα ευκαρυωτικά ομόλογα (φυτών, μυκήτων) όσο και το ομόλογο SmVC3 του ριζόβιου *S.meliloti* που χαρακτηρίσαμε στην παρούσα Διατριβή (Κεφ. 3.2) έχουν ευρεία εξειδίκευση και αναγνωρίζουν ως υποστρώματα και τις τρεις πουρίνες (αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη). Το γεγονός ότι ο SmVC3, ιδιαίτερα, εμφανίζει πολύ υψηλή συντήρηση αλληλουχίας σε σχέση με τους πιο εξειδικευμένους μεταφορείς (π.χ. 53% ταυτότητα αλληλουχίας με το PurP) δίνει το έναυσμα για περαιτέρω στοχευμένες μελέτες μεταλλαξιγένεσης για την κατανόηση της μοριακής βάσης αυτών των διαφορών (Yaelis, Botou and Frillingos, unpublished).

Από τα πειράματα μεταλλαξιγένεσης που έγιναν στους μεταφορείς PurP και YjcD στην παρούσα Διατριβή (Κεφ. 3.3), προκύπτει ότι αντικαταστάσεις σε κομβικής σημασίας θέσεις στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης δεν προκαλούν έντονες αλλαγές στο προφίλ εξειδίκευσης και δεν οδηγούν σε εμφάνιση νέων εξειδικεύσεων, είτε στον PurP είτε στον YjcD. Ανεξάρτητα από αυτό, είναι ενδιαφέρον ότι, στις αντικαταστάσεις που αφορούν θέσεις του κέντρου δέσμευσης, ο λειτουργικός ρόλος των καταλοίπων που βρέθηκαν να είναι σημαντικά στους μεταφορείς της ομάδας COG2252 διατηρείται σε μεγάλο βαθμό (αν και η πλευρική ομάδα διαφέρει) σε τοπολογικά αντίστοιχα κατάλοιπα στους μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2233 (βλ. Εικόνα 3.3.11). Χαρακτηριστικά, στις θέσεις Asp-267/271/Glu-270/272 (TM8) και Glu-318/322/Gln-318/324 (TM10) που πιθανόν εμπλέκονται με τη δέσμευση υποστρώματος συντηρούνται αμινοξέα με λειτουργικά αναντικατάστατο ρόλο τόσο στους PurP/YjcD όσο και στους UacT/XanQ (και SmLL9). Επίσης, σημαντική σε όλους τους ομόλογους μεταφορείς πουρινών είναι η Thr-271/275/Asp-276 (TM8), είτε αναντικατάστατη είτε με αυστηρούς περιορισμούς στις αντικαταστάσεις, μία θέση που μπορεί να έχει σημασία στον μηχανισμό της συμμεταφοράς πρωτονίου και υποστρώματος (βλ. Κεφ. 3.6 και στη συνέχεια, 4.2.4). Τοπολογικά αντίστοιχες είναι και οι δύο θέσεις που φαίνεται να συνδέονται με την εξειδίκευση, Ala-88/Thr-100/Asn-93 (και Ser-93 στην SmLL9) (TM3) και Ile-317/321/Ser-317/Ala-323 (TM10), αν και οι αλλαγές στα αμινοξέα αυτά δεν μπορούν να οδηγούν σε δραματικές αλλαγές εξειδίκευσης με την έννοια ότι δεν αναγνωρίζονται με υψηλή συγγένεια ή απόδοση νέα υποστρώματα/προσδέτες (Κεφ. 3.3, Εικόνες 3.3.7 και 3.3.10).

Μοριακή βάση της εξειδίκευσης: Η διάκριση της αναγνώρισης αδενίνης και υποξανθίνης/γουανίνης ίσως συνδέεται με θέσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμησης

Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης στα διάφορα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 μας υπέδειξαν σημαντικά στοιχεία για αντικαταστάσεις που επηρεάζουν την εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση πουρινών και/ή πυριμιδινών. Στην περιοχή κοντά στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμησης βρέθηκαν καθοριστές της εξειδίκευσης στις ομάδες των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος (Κεφ. 3.2) και ουρακίλης/θυμίνης (Κεφ. 3.4) της ομάδας COG2233. Για την ομάδα COG2252 (μεταφορείς αδενίνης, γουανίνης ή/και υποξανθίνης) όμως δεν βρέθηκαν θέσεις που να σχετίζονται με την διεύρυνση ή τον περιορισμό του εύρους των υποστρωμάτων στην περιοχή του πιθανού κέντρου δέσμησης (Κεφ. 3.3). Στην πραγματικότητα, αυτό ήταν ως ένα βαθμό αναμενόμενο γιατί οι μεταφορείς της ομάδας COG2252 δεν διαφέρουν σχεδόν καθόλου στα αμινοξέα του πιθανού κέντρου δέσμησης που είναι σημαντικά για τον μηχανισμό (Papakostas *et al.*, 2013) (βλ. και Εικόνα 4.3). Ενδεχομένως θέσεις με σημαντική επίπτωση στον καθορισμό της εξειδίκευσης να βρίσκονται περιφερειακά, πιο απομακρυσμένα από το κέντρο δέσμησης των υποστρωμάτων. Προς αυτή την κατεύθυνση βρίσκεται μια νέα μελέτη μεταλλαξιγένεσης από το εργαστήριό μας. Στόχοι της μεταλλαξιγένεσης είναι θέσεις περιμετρικά του κέντρου δέσμησης, οι οποίες βρίσκονται στα συντηρημένα μοτίβα (Papakostas *et al.*, 2013; Karena *et al.*, 2015) και διαφέρουν μεταξύ PurP και YjcD. Μέχρι στιγμής στον μεταφορέα PurP έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένα μεταλλάγματα περιμετρικά του κέντρου δέσμησης στα TM3 και TM8 έχουν μικρότερη συγγένεια για τα κανονικά υποστρώματα ή προσδέτες του PurP (αδενίνη, 2,6-δι-αμινοπουρίνη, N⁶-βενζοϋλοαδενίνη) και ανιχνεύσιμη ή σημαντική συγγένεια για υποστρώματα ή προσδέτες που αναγνωρίζει κανονικά ο YjcD ή άλλα ομόλογα (υποξανθίνη 6-MP, 6-SG), ενώ άλλα μεταλλάγματα στο TM10, φαίνεται να αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια και τις δύο ομάδες υποστρωμάτων ή προσδετών, προσομοιάζοντας κατά πολύ την λειτουργική εικόνα των ευρύτερης εξειδίκευσης ομολόγων που μεταφέρουν και τις τρεις πουρίνες, αδενίνη/γουανίνη/υποξανθίνη. Αυτά τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι αντικαταστάσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμησης ή και σε πιο απομακρυσμένες θέσεις μπορεί να έχουν πολύ σημαντική επίπτωση στο προφίλ εξειδίκευσης, επιτρέποντας μάλιστα την αναγνώριση νέων αναλόγων πουρινών που δεν αναγνωρίζονται καθόλου από τον μεταφορέα αγρίου τύπου (Yalelis and Frillingos, unpublished). Τέτοιες αλλαγές φαίνεται να οφείλονται σε θέσεις διακριτές από το κέντρο δέσμησης οι οποίες λειτουργούν ως φίλτρα διαλογής που αποτρέπουν την είσοδο ή έξοδο των μη κανονικών υποστρωμάτων, όπως

έχει προταθεί για τις ομόλογες περμεάσες πουρινών του *Aspergillus nidulans* UapA (Diallinas, 2014; Kosti *et al.*, 2012) και AzgA (Krypotou *et al.*, 2014).

4.2.4. Συνολική εικόνα για τον ρόλο των καταλοίπων του κέντρου δέσμησης και γύρω από το κέντρο δέσμησης στην οικογένεια NAT/NCS2

Συμπερασματικά, από το σύνολο των πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης για τους μεταφορείς πουρινών και/ή πυριμιδινών της οικογένειας NAT/NCS2 (βλ. Εικόνα 4.4) φαίνεται ότι:

- (1) Στην ομάδα καταλοίπων που έχουν αναντικατάστατο ή πολύ σημαντικό ρόλο για τη λειτουργία (ο οποίος, μάλιστα, συντηρείται σε όλα τα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 που μελετήσαμε, ανεξάρτητα από την εξειδίκευση) ανήκουν τα
 - (1.1) Glu/Asp-241 (αρίθμηση σύμφωνα με τον UraA) (TM8) και Gln/Glu-290 (TM10), που συμμετέχουν στην πρόσδεση του υποστρώματος μέσω δεσμών υδρογόνου των πλευρικών τους ομάδων και είναι αναντικατάστατα (εκτός από την περίπτωση του Glu του TM10 στον rSNBT1, όπου είναι αναντικατάστατο για τη μεταφορά μόνο των πυριμιδινών),
 - (1.2) το Asp/His/Thr-245 (TM8), που δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα αλλά ίσως επηρεάζει την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση του Glu/Asp-241 (TM8) επιδρώντας έμμεσα στον μηχανισμό δέσμησης και/ή συμμεταφοράς του πρωτονίου (βλ. Κεφ. 3.6), και
 - (1.3) τα His/Thr-24 (TM1) (αναντικατάστατο σαν πολικό αμινοξύ), Asn/Glu-291 (TM10) (αναντικατάστατο στους μεταφορείς πουρινών ή απαραίτητο σαν πολικό αμινοξύ παρόμοιου όγκου στον ευρύτερης εξειδίκευσης rSNBT1) και Asp/Asn/Glu-270 (TM9) (αναντικατάστατο στους μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2233 ή απαραίτητο σαν πολικό αμινοξύ παρόμοιου όγκου ή σαν καρβοξυλομάδα στους μεταφορείς της ομάδας COG2252) που συμμετέχουν σε περιφερειακά δίκτυα δεσμών υδρογόνου που φαίνεται να χρειάζονται για την σταθεροποίηση της δομής του κέντρου δέσμησης
- (2) Στην ομάδα καταλοίπων που συνδέονται με τον καθορισμό της εξειδίκευσης (και διαφέρουν ανάλογα με τον επιμέρους κλάδο ομολόγων που μελετήσαμε) ανήκουν τα
 - (2.1) Ser/Thr/Asn-72 (TM3) (αρίθμηση σύμφωνα με τον UraA) που είναι σημαντικό για τη διάκριση μεταξύ ουρικού οξέος και ξανθίνης (στη θέση C8 του ιμιδαζολικού τμήματος του δακτυλίου) για τον υποκλάδο των μεταφορέων πουρινών της ομάδας COG2233 (βλ. 4.2.1),
 - (2.2) Phe/Ala-73 (TM3) που είναι σημαντικό για την διάκριση μεταξύ θυμίνης και ουρακίλης (στη θέση C5 του πυριμιδινικού δακτυλίου) στους βακτηριακούς μεταφορείς πυριμιδινών της ομάδας COG2252 (βλ. 4.2.2),
 - (2.3) Gln/Glu-290 (TM10) που μπορεί να είναι σημαντικό για τη διάκριση ή όχι μεταξύ πυριμιδινών και πουρινών ειδικά στους ομόλογους μεταφορείς ουρακίλης ευρύτερης εξειδίκευσης (βλ. 4.2.2),
 - (2.4) ενώ σε μικρό βαθμό μπορεί να συνεισφέρει και η Gly/Ala/Ser-289 (TM10).

Ρόλος των Glu-241 (TM8), Asp/His-245 (TM8) και Gln/Glu-290 (TM10)

Από τη δομική ανάλυση του UraA (Lu *et al.*, 2011) έχει προταθεί ότι το Glu-241 (TM8) και το Glu-290 (TM10) συνδέονται άμεσα με το υπόστρωμα και μαζί με την His-245 (TM8) συμμετέχουν μέσω κύκλων πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης στην συμμεταφορά της ουρακίλης και του H⁺.

Το E241 του TM8 συντηρείται ως Glu σε όλη την ομάδα COG2233 της οικογένειας NAT/NCS2 και ως Asp στους μεταφορείς COG2252 (Εικόνα 4.3). Σε όσους μεταφορείς έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα η καρβοξυλομάδα αυτή έχει βρεθεί αναντικατάστατη για την λειτουργία [XanQ (Karena and Frillingos, 2009), UacT (Papakostas and Frillingos, 2012), SmLL9 (Κεφ. 3.2 της παρούσας Διατριβής), PurP/YjcD (Κεφ. 3.3 της παρούσας Διατριβής), UraA/RutG (Κεφ. 3.4 της παρούσας Διατριβής), rSNBT1 (Κεφ. 3.5 της παρούσας Διατριβής), UapA (Papageorgiou *et al.*, 2008), AzgA (Krypotou *et al.*, 2014)].

Το δεύτερο κατάλοιπο που συνδέεται άμεσα με το υπόστρωμα, το E290 στο TM10, συντηρείται ως Glu σε μεταφορείς πυριμιδινών ή ευρύτερης εξειδίκευσης (πυριμιδινών και πουρινών) ενώ στους μεταφορείς 2-οξυ-πουρινών (ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος) συντηρείται Gln. Δεν είναι αυστηρά αναντικατάστατη, όπως το E241, καθώς στον ευρείας εξειδίκευσης μεταφορέα rSNBT1 σχετίζεται με την διάκριση ή μη διάκριση της αναγνώρισης μεταξύ πουρινών και πυριμιδινών (βλ. 4.2.3). Σε όλους τους άλλους μεταφορείς που εξετάστηκαν (μεταφορείς 2-οξυ-πουρινών της ομάδας COG2233), όπως XanQ (Georgopoulou *et al.*, 2010), UapA (Papageorgiou *et al.*, 2008), UacT (Papakostas and Frillingos, 2012), SmLL9 (παρούσα Διατριβή, Κεφ. 3.2), έχει βρεθεί ότι είναι αναντικατάστατο ως Gln (Q).

Η τρίτη θέση που φαίνεται να εμπλέκεται στον μηχανισμό της συμμεταφοράς (Lu *et al.*, 2011) είναι επίσης από την διαμεμβρανική έλικα 8 (TM8) και είναι η His-245 (στον UraA). Ο βαθμός της σημαντικότητας του ρόλου της καθώς επίσης και το πρότυπο συντήρησής της διαφέρει ανάμεσα στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 (Εικόνα 4.3). Στους Na⁺ εξαρτώμενους μεταφορείς ευκαρυωτικών οργανισμών και στους H⁺ μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού οξέος συντηρείται ως Asp και υπόκειται σε αυστηρούς περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή του όπως στην περίπτωση του XanQ όπου απαιτείται καρβοξυλομάδα (Mermelekas *et al.*, 2010) ή είναι λειτουργικά αναντικατάστατο, όπως στην περίπτωση του SmLL9 (παρούσα Διατριβή, Κεφ. 3.2) και στην περίπτωση του rSNBT1 (Κεφ. 3.5). Στους βακτηριακούς μεταφορείς πυριμιδινών (όπως ο UraA και ο RutG) συντηρείται ως His και είναι επίσης αναντικατάστατο (παρούσα Διατριβή, Κεφ. 3.4). Στους μεταφορείς κυρίως ουρικού οξέος συντηρείται υδρόφοβο αμινοξύ (Val ή Met) (Εικόνα 4.3) και στην περίπτωση του UacT η Met φαίνεται να υπόκειται σε περιορισμούς αντικατάστασης που σχετίζονται με τη δομική σταθερότητα του κέντρου δέσμευσης, αλλά δεν έχει μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση διεξοδικά (Papakostas and Frillingos, 2012). Τέλος

αναντικατάστατο ή με περιορισμούς στην αντικατάσταση είναι και στους μεταφορείς PurP και YjcD όπου συντηρείται ως Thr (παρούσα Διατριβή, Κεφ. 3.2).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η θέση αυτή (Asp/His/Thr/Val/Met-245) της TM8 έχει πάντα κάποιο σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό και η αντικατάστασή της οδηγεί σε σοβαρές λειτουργικές επιπτώσεις, αν και μπορεί να διαφέρουν από ομόλογο σε ομόλογο. Όπως είδαμε στο κεφάλαιο 3.6 της παρούσας Διατριβής, η αντίστοιχη Asp-276 του μεταφορέα Ξανθίνης XanQ έχει έναν επιπλέον ιδιαίτερο ρόλο που σχετίζεται με την εξάρτηση της ενεργότητας από το pH. Το προφίλ του pH που έχει το μετάλλαγμα D276E διαφέρει καθαρά από τον XanQ(wt) σε δύο σημεία (Εικόνα 3.6.2). Το πρώτο είναι μετατόπιση της καμπύλης της ενεργότητας του μεταλλάγματος σε σχέση με τον μεταφορέα αγρίου τύπου σε pH 7 με 8.5, που υποδηλώνει ότι το pKa μιας σημαντικής καρβοξυλομάδας (πιθανόν της E272 στο TM8) μειώνεται από περίπου 8.2 σε περίπου 7.7. Όπως αναλύεται στο Κεφ. 3.6, μια τέτοια αλλαγή μπορεί να οδηγεί την καρβοξυλομάδα του E272 να είναι συνεχώς αρνητικά φορτισμένη σε βασικά pH (πάνω από 8) και να μην μπορεί να συμμετέχει στο μηχανισμό με κύκλους πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης, με συνέπεια την απενεργοποίηση. Στο μετάλλαγμα D276E η καρβοξυλομάδα (Glu) της θέσης 276 απομακρύνεται από το E272 (Frillingos, 2012; Karena and Frillingos, 2011) και αυτό πιθανώς προκαλεί την εν λόγω μεταβολή του pKa του E272. Και οι δύο καρβοξυλομάδες (E272, D276) συμμετέχουν στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται στο κέντρο δέσμωσης μαζί με την N93 (TM3) που επίσης βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το E272 (βλ. Εικόνα 4.5) (Karena *et al.*, 2015). Έτσι εξηγείται ότι ανάλογη μεταβολή του pKa του E272 μπορεί να προκύψει τόσο από την αλλαγή D276E όσο και από αλλαγές στη θέση N93 (όπως στα μεταλλάγματα N93S και N93S/D276E) οι οποίες επίσης οδηγούν σε παρόμοια φαινόμενα στο προφίλ εξάρτησης από το pH (Εικόνα 3.6.5). Η δεύτερη διαφορά που παρατηρείται είναι ότι ο μεταλλαγμένος μεταφορέας D276E παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα σε όξινα pH (5.2 έως 6.2) όπου ο μεταφορέας αγρίου τύπου είναι ανενεργός, υποδεικνύοντας ότι στις συνθήκες αυτές η μεταφορά Ξανθίνης στο D276E μπορεί να γίνεται ανεξάρτητα από την διαβάθμιση πρωτονίων δηλ. χωρίς την συμμεταφορά H⁺. Μάλιστα, το προφίλ εξειδίκευσης του D276E που είναι αρκετά διαφορετικό από το XanQ(wt) σε pH 7.5 (Mermelekas *et al.*, 2010) αλλάζει σε όξινα pH και τείνει να είναι παρόμοιο με του μεταφορέα αγρίου τύπου σε pH 5.2 (Πίνακας 3.6.1). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να σχετίζονται εν μέρει και με την κατάσταση (ιονισμένη ή ουδέτερη) στην οποία μπορεί να βρίσκεται το ίδιο το υπόστρωμα (Ξανθίνη ή ανάλογα Ξανθίνης) μέσα στο κέντρο δέσμωσης, αφού οι πουρίνες αυτές έχουν θεωρητικά προβλεπόμενα pKa κοντά στο ουδέτερο pH (Εικόνα 3.6.6). Τα παραπάνω φαινόμενα που παρατηρούνται με το μετάλλαγμα D276E του XanQ δεν έχουν ανιχνευθεί σε άλλα ομόλογα, κυρίως λόγω των διαφορών στην ενεργότητα των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων [για παράδειγμα, στον μεταφορέα SmLL9 δεν μπορεί να ανιχνευθεί τέτοιο φαινόμενο

γιατί το αντίστοιχο μετάλλαγμα D266E είναι ανενεργό σε όλο το εύρος των pH που μελετάται (Κεφ. 3.2)]. Σε κάθε περίπτωση, περαιτέρω μελέτη απαιτείται για να κατανοηθεί καλύτερα η μοριακή βάση αυτών των φαινομένων με τη μεταλλαγή D276E στον XanQ, αν για παράδειγμα σχετίζονται με αδυναμία δέσμησης της ξανθίνης στο ενεργό κέντρο σε $\text{pH} > 8$ ή με απεξάρτηση της ενεργότητας από τη συμμεταφορά πρωτονίων (uncoupling) σε $\text{pH} < 6$.

Ρόλος των His-24 (TM1), Asp/Asn/Glu-245 (TM9), και Asn/Glu-290 (TM10)

Αυτές είναι τρεις θέσεις καταλοίπων που εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης στην οικογένεια NAT/NCS2 (Εικόνα 4.3) και βρέθηκε να έχουν πολύ σημαντικό ρόλο, ιδιαίτερα στους μεταφορείς πουρινών της ομάδας COG2233 (Κεφ. 3.2). Τα αμινοξέα στις θέσεις αυτές προσανατολίζονται περιφερειακά του κέντρου δέσμησης και συμμετέχουν σε δίκτυα δεσμών υδρογόνου που είναι καθοριστικά για τη σταθερότητα τη δομικής περιοχής «πυρήνα» και τη διατήρηση της λειτουργίας του κέντρου δέσμησης. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το δομικό πρότυπο του UraA (Lu *et al.*, 2011) και την ανάλυση του XanQ (Karena *et al.*, 2015), τα αμινοξέα His-31 (αντιστοιχεί στη θέση His/Thr-24 του TM1) και Asn-325 (αντιστοιχεί στη θέση Asn/Glu-291 του TM10) συνδέονται μεταξύ τους με δεσμό υδρογόνου που χρειάζεται στον XanQ για την πρόσδεση και μεταφορά της ξανθίνης με υψηλή συγγένεια (Karena and Frillingos, 2009; Frillingos, 2012) ενώ το Asp-304 (αντιστοιχεί στη θέση Asp/Asn/Glu-245, TM9) αλληλεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου τόσο με το Gln-75 (TM2) όσο και με πολικές πλευρικές ομάδες των β-κλώνων $\beta 3$ και $\beta 10$ (Εικόνα 4.5) και η αντικατάστασή του (όπως και του Q75) οδηγεί σε απενεργοποίηση, ενώ το διπλό μετάλλαγμα Q75N/D304E είναι ενεργό (Karena *et al.*, 2015).

Από τις παραπάνω θέσεις, η His/Thr-24 (TM1) εμφανίζεται απόλυτα συντηρημένη ως ιστιδίνη στους μεταφορείς της ομάδας COG2233 και ως Thr στην ομάδα COG2252 (Εικόνα 4.3). Η μεταλλαξιγένεση της His (COG2233) στη θέση αυτή έχει υποδείξει ότι απαιτείται πολικό (και μη φορτισμένο) αμινοξύ για να διατηρείται υψηλή ενεργότητα και υψηλή συγγένεια υποστρώματος, τόσο σε μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού [όπως τον XanQ (Karena and Frillingos, 2009) και τον SmLL9 (παρούσα Διατριβή) ενώ στον UacT είναι αναντικατάστατη (Papakostas and Frillingos, 2012)] (βλ. Κεφ. 3.2.6) όσο και σε μεταφορείς του L-ασκορβικού hSVCT1 και 2 (Rivas *et al.*, 2008; Varma *et al.*, 2008), ενώ παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και στην περίπτωση του rSNBT1 (Κεφ. 3.5). Η απαίτηση για πολικό αμινοξύ στη θέση αυτή μπορεί να εξηγηθεί με βάση τον δεσμό υδρογόνου με τη θέση Asn/Glu-291 (TM10) που αναφέραμε παραπάνω, ο οποίος φαίνεται να χρειάζεται για να σταθεροποιεί τα $\alpha 10$ και TM1 στην περιφέρεια του κέντρου δέσμησης. Πιθανόν αντίστοιχος μπορεί να είναι και ο ρόλος της Thr η οποία συντηρείται στους μεταφορείς της ομάδας COG2252 αντί της His στη θέση

His/Thr-24 (TM1), η οποία υπόκειται επίσης σε περιορισμούς αντικαταστάσεων στους βακτηριακούς μεταφορείς YjcD και PurP (παρούσα Διατριβή, Κεφ. 3.3) και, μάλιστα, η αντικατάστασή της με His οδηγεί σε απενεργοποίηση (Εικόνες 3.3.6 και 3.3.7), ενώ διατηρεί χαμηλή σχετικά ενεργότητα αν αντικατασταθεί με μια μικρή πλευρική ομάδα (Ala).

Οι δύο άλλες σημαντικές θέσεις που συμμετέχουν σε δίκτυα δεσμών υδρογόνου περιφερειακά του κέντρου δέσμησης είναι οι Asp/Asn/Glu-245 (TM9) και Asn/Glu-291 (TM10), που είναι ιδιαίτερα συντηρημένες και έχουν λειτουργικά αναντικατάστατο ρόλο κυρίως στους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της ομάδας COG2233 (Εικόνες 4.3 και 4.4). Εκτός της Asn-325 (αντίστοιχη στην Asn/Glu-291) η οποία αλληλεπιδρά κυρίως με την His-31 (TM1) (αντίστοιχη της θέσης His/Thr-24), όπως εκτέθηκε παραπάνω, η Asp-304 (TM9) (αντίστοιχη της θέσης Asp/Asn/Glu-245) συμμετέχει σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου που περιλαμβάνει και αμινοξέα των β-κλώνων β3 και β10 που αποτελούν ένα βασικό αρχιτεκτονικό στοιχείο της δομής (Karena *et al.*, 2015). Στον XanQ, η κεντρική σημασία που έχει τόσο το Asp-304 (TM9) όσο και το Gln-75 (TM2) στο δίκτυο αυτό αποδείχθηκε διεξοδικά με μεταλλαξιγένεση (Karena *et al.*, 2015). Διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη καρβοξυλομάδας στη θέση 304 είναι απαραίτητη, αλλά όχι ικανή από μόνη της προκειμένου να σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης D304-Q75 το όλο δίκτυο δεσμών υδρογόνου στο κέντρο της δομικής περιοχής «πυρήνα» καθώς η Asp-304 (ή Glu-304 στο μετάλλαγμα Q75N/D304E) χρειάζεται για την ενεργότητα αλλά η αλλαγή της θέσης της καρβοξυλομάδας σε σχέση με το Q75 (όπως συμβαίνει στο μετάλλαγμα D304E ή όλα τα μεταλλάγματα όπου αλλάζει το Q75) οδηγεί σε απενεργοποίηση (Karena *et al.*, 2015). Ενδεχομένως αυτό να ισχύει και στις περιπτώσεις άλλων μεταφορέων της ομάδας ξανθίνης/ουρικού οξέος όπως του SmLL9 (Κεφ. 3.2) και του UacT (Papakostas and Frillingos, 2012) όπου το αντίστοιχο Asp του TM9 είναι αναντικατάστατο. Αν και τα αντίστοιχα κατάλοιπα, Asp/Asn/Glu-245 (TM9) και Asn/Glu-291 (TM10), εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης σε όλα τα ομόλογα NAT/NCS2, ιδιαίτερα στον κλάδο COG2233, και τοπολογικά παρόμοια δίκτυα δεσμών υδρογόνου έχουν αναγνωριστεί τόσο στην UraA όσο και σε άλλα ομόλογα με πειράματα μοριακής δυναμικής (Lu *et al.*, 2011; Kosti *et al.*, 2012; Karena *et al.*, 2015), ο ρόλος των αντίστοιχων καταλοίπων είτε δεν έχει αναλυθεί με μεταλλαξιγένεση (όπως για το αντίστοιχο του Asp-304, Asp/Asn/Glu, στους μεταφορείς πυριμιδινών) είτε δεν είναι τόσο καθοριστικός, όπως για τα αντίστοιχα της Asn-325 στον rSNBT1 (Κεφ. 3.5) ή για τα αντίστοιχα του Asp-304 σε μεταφορείς πουρινών του κλάδου COG2252 (Κεφ. 3.3), όπου η συμμετοχή των αμινοξέων αυτών σε ανάλογα δίκτυα δεσμών υδρογόνου μπορεί να υποκατασταθεί από άλλα πολικά αμινοξέα [ενδεικτικά, τα μεταλλάγματα D398E του rSNBT1, D298E του PurP και D302N του YjcD είναι ενεργά].

Ρόλος των Ser/Asn/Thr-72 (TM3), Phe/Ala-73 (TM3), και Gly/Ala/Ser-289 (TM10)

Όπως αναφέρθηκε στα 4.2.1 και 4.2.2, οι θέσεις αμινοξέων των TM3 ή TM10 που είτε μπορεί να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα μέσω δεσμών υδρογόνου από τα αμιδικά άζωτα της κύριας πεπτιδικής αλυσίδας είτε να συμβάλλουν σε δίκτυα δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση του Glu-272 (TM8) με το υπόστρωμα (βλ. Εικόνα 4.5) φαίνεται να συσχετίζονται με τον καθορισμό της εξειδίκευσης, με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό σε διακριτές ομάδες ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 και ιδιαίτερα στην ομάδα COG2233. Οι θέσεις αυτές είναι: Ser/Thr/Asn-93 (TM3) (αρίθμηση σύμφωνα με τον XanQ, Ala/Gly στην COG2252), Ser/Ala/Gly-323 (TM10) (αρίθμηση σύμφωνα με την XanQ, Ile/Val στην COG2252) και Phe/Ala-73 (αρίθμηση σύμφωνα με την UraA, Met/Ile στην COG2252) (TM3). Πιο χαρακτηριστική επίπτωση στο προφίλ εξειδίκευσης βρέθηκε με τις αντικαταστάσεις της Ser/Thr/Asn-93 (TM3) για τους βακτηριακούς μεταφορείς ουρικού οξέος και/ή ξανθίνης (βλ. 4.2.1, Εικόνα 4.5) και με τις αντικαταστάσεις της Phe/Ala-73 (TM3) για τους βακτηριακούς μεταφορείς ουρακίλης και/ή θυμίνης (βλ. 4.2.2, Εικόνα 4.6). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλλαγές στις ανωτέρω θέσεις αμινοξέων των TM3 και TM10 δεν οδηγούν γενικά σε δραματικές αλλαγές εξειδίκευσης με την έννοια ότι δεν αναγνωρίζονται και μεταφέρονται με υψηλή συγγένεια ή απόδοση νέα υποστρώματα/προσδέτες. Αν και δεν έχουν εξετασθεί συστηματικά, παρά μόνο στην περίπτωση του XanQ (Karena *et al.*, 2015), εντονότερες αλλαγές και αναγνώριση νέων αναλόγων που δεν αναγνωρίζονται καθόλου από τον μεταφορέα αγρίου τύπου θα μπορούσαν να προκύψουν με αντικαταστάσεις σε θέσεις διακριτές από το κέντρο δέσμευσης οι οποίες μπορεί να λειτουργούν ως φίλτρα διαλογής των υποστρωμάτων, όπως έχει προταθεί για τα ομόλογα UapA και AzgA του *Aspergillus nidulans* (Diallinas, 2014). Αντίστοιχες ενδείξεις δεν έχουν αναφερθεί έως τώρα για τα βακτηριακά ομόλογα, με πιθανή εξαίρεση ορισμένα μεταλλάγματα στο TM5 που φαίνεται να διευρύνουν την εξειδίκευση του PurP (Yalelis and Frillingos, unpublished) (βλ. 4.2.3).

4.3 Αξιολόγηση των δεδομένων μας για τους μεταφορείς NAT/NCS2 σε συνάρτηση με τα μοντέλα μηχανισμών εναλλασσόμενης πρόσβασης

Όπως γίνεται φανερό από την παραπάνω συζήτηση, η παρούσα Διατριβή εστιάστηκε κυρίως στην περιοχή του κέντρου δέσμησης σε αντιπροσωπευτικά ομόλογα από τους επιμέρους κλάδους της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2. Η μελέτη οδήγησε στην αναγνώριση καταλοίπων αμινοξέων που έχουν βασικό ρόλο για την αλληλεπίδραση του κέντρου δέσμησης με το υπόστρωμα σε όλα τα ομόλογα και αμινοξέων που συμβάλλουν στον καθορισμό της εξειδίκευσης και διαφέρουν ανάλογα με τον κλάδο ομολόγων. Σε μερικά ομόλογα, κυρίως στο SmLL9 (του κλάδου των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος) και στο UraA (του κλάδου των μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης), η ανάλυση μεταλλαξιγένεσης που έγινε επεκτάθηκε και σε ορισμένες θέσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμησης που θα μπορούσαν να μας δώσουν περισσότερα στοιχεία για τον μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται η εναλλασσόμενη πρόσβαση (alternating access) και για άλλες θέσεις που ρυθμίζουν την πρόσβαση των υποστρωμάτων προς και από το ενεργό κέντρο (gating).

Για τον τρόπο που μπορεί να συμβαίνει η εναλλαγή διαμορφώσεων που επιτρέπει εναλλασσόμενη πρόσβαση του ενεργού κέντρου στους διαμεμβρανικούς μεταφορείς έχουν προταθεί τρεις βασικοί μηχανισμοί, όπου πάντοτε κεντρικό ρόλο έχουν οι κινήσεις ανάμεσα σε δύο κύριες δομικές περιοχές στις οποίες οργανώνονται τα διαμεμβρανικά τμήματα (two-domain mechanisms) (Drew and Boudker, 2016). Ο **μηχανισμός «διακόπτη»** (rocker switch), με χαρακτηριστικό παράδειγμα την υπεροικογένεια MFS που περιλαμβάνει όχι μόνο μεταφορείς που λειτουργούν με συμμεταφορά ιόντων αλλά και μεταφορείς διευκολυνόμενης διάχυσης (Yan, 2015), θεωρεί έντονες αλλαγές διαμόρφωσης που επάγονται από πρόσδεση υποστρώματος στην μεσεπιφάνεια μεταξύ δύο σχετικά συμμετρικών δομικών περιοχών (domains ή bundles) σε συνδυασμό με τοπικές αναδιατάξεις απλών δομικών στοιχείων που ελέγχουν την έξοδο ή είσοδο προς το κέντρο δέσμησης από την εσωτερική ή την εξωτερική πλευρά (gating). Ο **μηχανισμός «αιώρησης»** (rocking bundle), όπως στο παράδειγμα του LeuT και άλλων ομολόγων στην υπεροικογένεια APC, θεωρεί ότι βασικό ρόλο έχει η κίνηση της μίας από τις δύο δομικές περιοχές γύρω από την άλλη με την οποία εξασφαλίζεται η εναλλασσόμενη πρόσβαση του κέντρου δέσμησης, με αλλαγές διαμόρφωσης που είναι λιγότερο εκτενείς από ό,τι στον μηχανισμό «διακόπτη». Το μοντέλο αυτό σχετίζεται με πιο σύνθετα στοιχεία ελέγχου της πρόσβασης (gating) και πιθανόν πιο αυστηρούς περιορισμούς στην σύζευξη της μεταφοράς υποστρώματος και ιόντος (ion coupling). Τέλος, αρκετοί μεταφορείς φαίνεται να εμπίπτουν σε ένα τρίτο μοντέλο μηχανισμού, του **«ανελκυστήρα»** (elevator), με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους τον GltPh και τον NhaA, στο οποίο η μία από τις δύο δομικές περιοχές (core domain ή transport domain) ολισθαίνει πάνω στην

άλλη (scaffold domain) οδηγώντας ουσιαστικά το υπόστρωμα έως τη θέση του κέντρου δέσμησης στη μεσεπιφάνεια των δύο domains και η σύζευξη με την διαμεμβρανική μετακίνηση γίνεται με το κλείσιμο των αντίστοιχων σημείων ελέγχου (gates) που πιθανόν αίρουν τους στερεοχημικούς περιορισμούς και επιτρέπουν στο υπόστρωμα να κινηθεί, με σχεδόν στοχαστικό τρόπο, προς την απέναντι πλευρά (Drew and Boudker, 2016). Σε όλες τις περιπτώσεις όπου προτείνεται ο μηχανισμός «ανελκυστήρα» οι μεταφορείς σχηματίζουν διμερή ή ολιγομερή μέσω αλληλεπίδρασης των δομικών περιοχών scaffold.

Η αρχική δομική ανάλυση του UraA (Lu *et al.*, 2011) είχε υποδείξει ότι τα βακτηριακά, τουλάχιστον, μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 λειτουργούν με τον μηχανισμό «αιώρησης» (rocking bundle) όπου η δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain) δημιουργεί ουσιαστικά την εναλλασσόμενη πρόσβαση του κέντρου δέσμησης κινούμενη γύρω από την δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain). Τα νεώτερα δεδομένα, όμως, από τη δεύτερη κρυσταλλική δομή της οικογένειας για τον μεταφορέα UapA (Alguel *et al.*, 2016) αλλά και τις άλλες κρυσταλλικές δομές, των δομικά συγγενικών ομολόγων SLC4A1 (Arakawa *et al.*, 2015) και SLC26Dg (Geertsma *et al.*, 2015), υποδηλώνουν ότι οι NAT/NCS2 μπορεί να λειτουργούν ως διμερή, όπου οι περιοχές gate domain από τις δύο υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους μένοντας σχετικά σταθερές και η μεταφορά επιτυγχάνεται με την κίνηση των περιοχών core domain. Επειδή η περιοχή core domain περιέχει όλα τα βασικά δομικά στοιχεία του κέντρου δέσμησης (Alguel *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2011) και έτσι φαίνεται να υπάρχει μεγάλη ασυμμετρία σε σχέση με την περιοχή gate domain, ο μηχανισμός, ιδιαίτερα για τα ευκαρυωτικά ομόλογα, θα μπορούσε ουσιαστικά να είναι αυτός του «ανελκυστήρα» (elevator mechanism), όπως προτάθηκε από τους Alguel *et al.* (2016). Μάλιστα, με βάση το δομικό πρότυπο του UapA, αρκετές θέσεις μεταλλαγών σε απόσταση από το κέντρο δέσμησης οι οποίες είχε βρεθεί ότι επιτρέπουν την αναγνώριση και μεταφορά μη φυσιολογικών υποστρωμάτων (υποξανθίνη, αδενίνη) για τον UapA (Diallinas, 2014; Kosti *et al.*, 2010, 2012; Parageorgiou *et al.*, 2008) βρίσκονται μεταξύ των περιοχών core domain και gate domain και ίσως να εντοπίζονται σε θέσεις ελέγχου που λειτουργούν ως φίλτρα διαλογής (selectivity gates). Μικρές αλλαγές στην πλευρική ομάδα σε αυτές τις θέσεις μπορεί να αλλάζουν τις σχετικές θέσεις ανάμεσα στις δύο δομικές περιοχές και να δίνουν το έναυσμα για επιπρόσθετες αλλαγές διαμόρφωσης που καταλήγουν σε επιλεκτική μεταφορά ανάλογα με το υπόστρωμα.

Από τα λειτουργικά μας δεδομένα για τους βακτηριακούς μεταφορείς του κλάδου των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος που ανήκουν στην ίδια ομάδα ομολόγων όπως και ο UapA, βλέπουμε ότι τόσο ο SmLL9 όσο και ο XanQ (Κεφ. 3.2.6) εμφανίζουν συντηρημένα λειτουργικά μοτίβα στο ρόλο αρκετών καταλοίπων αμινοξέων όχι μόνο στο κέντρο δέσμησης αλλά και γενικότερα. Η ανάλυση κυστεϊνικής σάρωσης που έγινε στον SmLL9 στην παρούσα Διατριβή (Κεφ. 3.2.4) αλλά και στον XanQ διεξοδικότερα (Georgopoulou *et al.*, 2010; Karena

et al., 2015) υποδεικνύει ότι υψηλή ευαισθησία σε αλκυλίωση (NEM) εμφανίζουν οι ίδιες ακριβώς θέσεις, αλλά παρουσία υποστρώματος η ευαισθησία των θέσεων αυτών δεν αλλάζει δραστικά, υποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές διαμόρφωσης κατά τον μηχανισμό δεν είναι τόσο έντονες όσο θα περίμενε κανείς αν ίσχυε, για παράδειγμα, το μοντέλο rocker switch (Yan, 2015; Kaback *et al.*, 2007). Από την άλλη πλευρά, η παρατήρησή μας ότι μία μικρή αλλαγή στην πλευρική ομάδα του D276, τουλάχιστον στην περίπτωση του XapQ, οδηγεί σε αποσύζευξη της μεταφοράς πρωτονίου ή έντονη μεταβολή του pKa (Κεφ. 3.6) υποδηλώνει ότι ίσως δεν υπάρχουν τόσο αυστηροί περιορισμοί ως προς την σύζευξη της μεταφοράς υποστρώματος και ιόντος (ion coupling). Προηγούμενες, επίσης, παρατηρήσεις από μελέτες σταυρωτής σύνδεσης κυστεϊνών (Καρενά, ΔΔ, 2014) και διερεύνησης της ενεργότητας χημικών πρωτεϊνών όπου η τελική διαμεμβρανική έλικα του XapQ έχει αντικατασταθεί από ομόλογες αλληλουχίες (Γεωργοπούλου, ΔΔ, 2011) είχαν υποδείξει ότι οι έλικες TM8 (core domain) και TM14 (gate domain) κατά τον μηχανισμό της συμμεταφοράς θα πρέπει να έρχονται πολύ κοντά προκειμένου να γίνεται αποτελεσματικά η μεταφορά του υποστρώματος. Ειδικότερα μάλιστα, βρέθηκε σημαντική αναστολή της ενεργότητας μεταλλαγμάτων διπλών Cys μεταξύ θέσεων του TM14 (N430, E429) και του TM8 (H257) από ιόντα δισθενούς καδμίου (Καρενά, ΔΔ, 2014), παρόλο που οι θέσεις αυτές απέχουν κατά πολύ (περίπου 20 Å) στην τριτοταγή δομή του μονομερούς στη διαμόρφωση (inward open) που εμφανίζουν οι πρότυπες κρυσταλλικές δομές (Alguel *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2011). Μία πιθανή εξήγηση θα ήταν ότι η XapQ λειτουργεί ως διμερές, όπως προτάθηκε για τον UapA (Alguel *et al.*, 2016), και οι αντίστοιχες θέσεις στο TM14 του ενός μονομερούς έρχονται πολύ πιο κοντά στο χώρο με αυτές του TM8 από το άλλο μονομερές, κάτι που θα πρέπει βέβαια να διερευνηθεί με αναλύσεις μοριακής δυναμικής. Συνολικά, οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι ο XapQ και, πιθανότατα επίσης, ο SmLL9, ακολουθούν έναν μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που προτάθηκε για τον UapA, δηλ. σύμφωνα με το μοντέλο του «ανελικστήρα» (elevator mechanism).

Ως προς τους πιθανούς καθοριστές της εξειδίκευσης, εστιαστήκαμε κυρίως στην περιοχή του κέντρου δέσμησης συγκρίνοντας τον SmLL9 κυρίως με τον XapQ (Κεφ. 3.2.6), και βρήκαμε ότι μικρές λειτουργικές διαφορές των επιμέρους θέσεων γύρω από το προβλεπόμενο κέντρο δέσμησης των μεταφορέων ίσως να είναι η βάση της διαφορετικής εξειδίκευσης που παρουσιάζουν. Συγκεκριμένα, θεωρήσαμε ότι ο ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέας SmLL9 χρειάζεται να έχει μια μεγαλύτερη «ευελιξία» στο κέντρο δέσμησης σε σχέση με τον εξειδικευμένο μεταφορέα ξανθίνης XapQ, και αυτή η «ευελιξία» μπορεί να εξασφαλίζεται τόσο με την ύπαρξη μικρότερων πλευρικών ομάδων σε θέσεις-κλειδιά (όπως η Ser-93) όσο και με τη διαφορετική ευαισθησία τέτοιων θέσεων σε αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο (όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα με το NEM για τις θέσεις Ala-265 και Ala-309). Ωστόσο, θα

μπορούσαν να συνεισφέρουν και θέσεις εκτός του κέντρου δέσμευσης που συμμετέχουν σε φίλτρα διαλογής (selectivity gates) όπως έχει προταθεί στον UapA (Diallinas, 2014), αλλά και στον AzgA (Kryptou *et al.*, 2014). Με τα έως τώρα δεδομένα από την ανάλυση των βακτηριακών ομολόγων δεν μπορεί να υποστηριχθεί με σαφήνεια η ύπαρξη τέτοιων φίλτρων διαλογής. Στον XanQ, πάντως, που έχει μελετηθεί διεξοδικότερα, έχουν βρεθεί μεταλλαγές εκτός του κέντρου δέσμευσης, στα TM2 (S68T, G69A, I70C) και TM5 (S151C, G152A), που δεν επηρεάζουν την κινητική του κανονικού υποστρώματος (ξανθίνης) ούτε την αναγνώριση των αναλόγων που αναγνωρίζονται και από τον XanQ(wt) αλλά επιτρέπουν την αναγνώριση, με χαμηλή συγγένεια, νέων αναλόγων, όπως της 8-μεθυλοξανθίνης, και μία μικρή ικανότητα μεταφοράς για τη γουανίνη στην περίπτωση του S68T (Karena *et al.*, 2015). Οι αντίστοιχες θέσεις δεν έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση στον SmLL9 (Κεφ. 3.2.3) ή σε άλλα βακτηριακά ομόλογα, και θα ήταν ένα ενδιαφέρον νέο πεδίο μελέτης.

Από τις άλλες ομάδες ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 που εξετάσαμε, δεν έγινε εκτενής μεταλλαξιγένεση όπως στην περίπτωση των SmLL9/XanQ. Για τον UraA, ωστόσο, βρέθηκε μία θέση προς την κυτταροπλασματική πλευρά του κέντρου δέσμευσης, που ενδεχομένως να συμμετέχει σε επιλογή αναλόγων και έλεγχο της πρόσβασης μη κανονικών υποστρωμάτων στο κέντρο δέσμευσης. Πρόκειται για τη θέση V248 (Κεφ. 3.4.5), όπου το μετάλλαγμα V248A φαίνεται να αναγνωρίζει, με χαμηλή συγγένεια, μη τυπικά υποστρώματα (ουρικό οξύ, αδενίνη) χωρίς να επηρεάζεται η κινητική του ικανότητα για το φυσιολογικό υπόστρωμα (ουρακίλη) ή το ανάλογο 5-FU. Η αντίστοιχη θέση στον XanQ (A269) έχει φανεί ότι υπόκειται σε αυστηρούς στερεοχημικούς περιορισμούς ως προς την αντικατάστασή της και μπορεί να αντικατασταθεί με διατήρηση υψηλής ενεργότητας μόνο από αμινοξέα μικρού όγκου (Gly ή Ser) ενώ η αντικατάσταση με μεγαλύτερες πλευρικές ομάδες (Cys, Val, Asn, Thr) οδηγεί σε απενεργοποίηση ή μηδενικά πρωτεϊνικά επίπεδα στη μεμβράνη (Mermelekas *et al.*, 2010). Η θέση αυτή είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί περαιτέρω ως προς το προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων τόσο στον UraA (και στον RutG) όσο και στον XanQ.

Τέλος, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφ. 4.2.3 της Συζήτησης, οι μεταφορείς της ομάδας COG2252 της *E. coli* K-12 δεν εξετάστηκαν καθόλου σε θέσεις εκτός του κέντρου δέσμευσης σε αυτήν την Διατριβή. Ωστόσο, προς την κατεύθυνση αυτή βρίσκεται πλέον μία νέα μελέτη μεταλλαξιγένεσης από το εργαστήριό μας που στοχεύει σε θέσεις περιμετρικά του κέντρου δέσμευσης, που διαφέρουν μεταξύ PurP και YjcD (Yalelis and Frillingos, unpublished). Από τη μελέτη αυτή, έχουν ήδη βρεθεί συγκεκριμένες θέσεις διακριτές από το κέντρο δέσμευσης όπου τα εξεταζόμενα μεταλλάγματα αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια και τις δύο ομάδες υποστρωμάτων ή προσδετών, τόσο ανάλογα αδενίνης (χαρακτηριστικά του PurP) όσο και ανάλογα γουανίνης/υποξανθίνης (χαρακτηριστικά του YjcD), προσομοιάζοντας κατά πολύ την λειτουργική εικόνα των ευρύτερης εξειδίκευσης

ομολόγων COG2252 από μύκητες/φυτά (Cecchetto *et al.*, 2004; Mansfield *et al.*, 2009) και από το *S. meliloti* (SmVC3, Κεφ. 3.2.1). Τα δεδομένα είναι πολύ πιο σαφή με τον μεταφορέα αδενίνης PurP για τον οποίο φαίνεται ότι η εξειδίκευσή του μπορεί να διευρυνθεί με αντικαταστάσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης ή και σε πιο απομακρυσμένες θέσεις, επιτρέποντας την αναγνώριση νέων αναλόγων πουρινών που δεν αναγνωρίζονται καθόλου από τον μεταφορέα αγρίου τύπου (Yalelis and Frillingos, unpublished). Οι μελέτες αυτές, που είναι σε εξέλιξη, είναι πιθανό να αναδείξουν θέσεις διακριτές από το κέντρο δέσμευσης που λειτουργούν ως φίλτρα διαλογής (selectivity gates) και στην περίπτωση του μεταφορέα PurP ή άλλων βακτηριακών ομολόγων της ομάδας COG2252.

4.4 Συμπεράσματα-Προοπτικές

Από την παρούσα Διδακτορική Διατριβή προκύπτουν δυο ενδιαφέροντα πεδία περαιτέρω μελέτης. Το ένα αφορά τον φυσιολογικό ρόλο των μεταφορέων πουρινών στις συμβιωτικές σχέσεις βακτηρίων-φυτών και τα πιθανά βιοτεχνολογικά οφέλη και το δεύτερο αφορά την πληρέστερη κατανόηση των σχέσεων δομής και λειτουργίας στην οικογένεια NAT/NCS2.

Στην εργασία που έγινε σε συνεργασία μεταξύ των ερευνητικών ομάδων Ε. Φλεμετάκη και Ε. Φριλίγγου, αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι σημαντικό ρόλο σε ορισμένους τύπους συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης παίζουν οι μεταφορείς πουρινών, ιδιαίτερα μάλιστα ο μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος SmLL9 του *Shinorhizobium meliloti*, ο οποίος στη συνέχεια βρέθηκε ότι συντελεί σημαντικά στην ανάπτυξη των φυτών *Medicago truncatula* σε συνθήκες έλλειψης προσφοράς πηγών αζώτου (Kalliampakou and Fliemetakis, unpublished results). Η κατανόηση της λειτουργίας και του φυσιολογικού ρόλου τέτοιων συστημάτων διαμεμβρανικής μεταφοράς θα μπορούσε να επιτρέψει βιοτεχνολογικές εφαρμογές για την βελτίωση της αποδοτικότητας της αζωτοδέσμευσης ανάλογα με τον επιμέρους τύπο συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης που χρησιμοποιείται. Με βάση τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης μπορεί να προταθεί ότι η αξιοποίηση της ξανθίνης ως πηγής αζώτου είναι κρίσιμης σημασίας για προσαρμογές ριζοβακτηρίων του γένους *Shinorhizobium* που σχετίζονται με ορισμένους τύπους αζωτοδεσμευτικής συμβίωσης.

Η χαρτογράφηση του ρόλου των καταλοίπων του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης των μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2 έδωσε σημαντικές πληροφορίες για το ποιά κατάλοιπα και πώς μπορούν να επηρεάσουν την εξειδίκευση των μεταφορέων αυτών. Προκειμένου να έχουμε την πλήρη εικόνα θα πρέπει να μελετηθεί και η περιοχή περιμετρικά του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης έτσι ώστε να βρεθούν καθοριστές της εξειδίκευσης, όπως ήδη γίνεται στην περίπτωση των PurP και YjcD (COG2252) (Yalelis and Frillingos, unpublished results). Αντίστοιχη μελέτη θα μπορούσε να γίνει και στα άλλα ζεύγη πολύ συγγενικών ομολόγων που έχουν όμως διακριτές εξειδικεύσεις έτσι ώστε να μπορέσουμε να εξηγήσουμε τις διαφορετικές εξειδικεύσεις των ομολόγων, δίνοντας μια πειραματική βάση που θα μπορούσε να επιτρέψει στο μέλλον να σχεδιαστούν νέα ειδικά φάρμακα (κυτταροτοξικά ανάλογα πουρινών/πυριμιδινών με στοχευμένη δράση σε μεταφορείς συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών).

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στην εξελικτικά ευρεία οικογένεια των διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών/πυριμιδινών της οικογένειας NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporters/ Nucleobase-Cation Symporter-2). Πρόκειται για μια οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και κατιόντων που απαρτίζεται από δύο μεγάλες διακριτές ομάδες ομολόγων, την COG2233 και την COG2252 (ή AzgA-like), και περιλαμβάνει ένα μεγάλο φάσμα εξειδικεύσεων. Όλες οι επιμέρους ομάδες ομολόγων της μοντελοποιούνται με βάση την κρυσταλλική δομή του UraA εμφανίζοντας μεγάλη εξελικτική συντήρηση. Μέχρι σήμερα λίγοι μεταφορείς αυτής της οικογένειας έχουν χαρακτηρησθεί λειτουργικά και ακόμη λιγότεροι έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση προκειμένου να βρεθούν πιθανοί καθοριστές της εξειδίκευσής τους. Με βάση τα παραπάνω, στόχοι της παρούσας Διατριβής ήταν η εύρεση νέων ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 με διαφορετικές εξειδικεύσεις και η συγκριτική τους ανάλυση σε σχέση με ήδη γνωστά συγγενικά ομόλογα ώστε να εντοπισθούν οι κυριότεροι καθοριστές εξειδίκευσης μεταξύ ομολόγων της ίδιας ομάδας και στο σύνολο της οικογένειας.

Η λειτουργική διερεύνηση για νέους ομόλογους μεταφορείς επικεντρώθηκε κυρίως σε βακτηριακά ομόλογα από μικροοργανισμούς-πρότυπα (*Escherichia coli* K-12, *Sinorhizobium meliloti*). Τα ομόλογα NAT/NCS2 που μελετήθηκαν είναι τα RutG (COG2233) και PurP, YicO, YjcD και YgfQ (COG2252) από την *Escherichia coli* και SmLL9, SmLL8, SmX28 (COG2233), SmVC3 και SmYE1 (COG2252) από το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti*. Ιδιαίτερα για το *S.meliloti* παρουσιάζονται δεδομένα που συνεισφέρουν στην κατανόηση του πιθανού φυσιολογικού ρόλου ενός από τα ομόλογα που μελετήθηκαν (SmLL9) στην συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Για τον μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος SmLL9 βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη της ξανθίνης σε εργαστηριακές καλλιέργειες κυττάρων του *S.meliloti* που αυξάνονται με ξανθίνη ως πηγή αζώτου, μια παρατήρηση που υποδεικνύει ότι μπορεί να έχει ανάλογο σημαντικό ρόλο και στα συμβιωτικά φυμάτια που σχηματίζει ο *S.meliloti* στις ρίζες των ψυχανθών.

Για την μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης χρησιμοποιήθηκαν στον κλάδο ξανθίνης/ουρικού οξέος ο SmLL9 [διπλής εξειδίκευσης ξανθίνης (K_m 5.3 μ M) ουρικού οξέος (K_m 27.3 μ M)] σε σχέση με τον μεταφορέα μόνο ξανθίνης XanQ, στον κλάδο των πυριμιδινών οι μεταφορείς UraA (μόνο ουρακίλης, K_m 1.4 μ M), RutG [μεταφορέας ουρακίλης (K_m 2.0 μ M) και θυμίνης (K_m 1.6 μ M) και, σε μικρό βαθμό, ξανθίνης (K_m 63 μ M)], και ο ευρείας εξειδίκευσης ευκαρυωτικός μεταφορέας rSNBT1 (που μεταφέρει ουρακίλη, θυμίνη, ξανθίνη, υποξανθίνη και γουανίνη με K_m 10.2 μ M, 5.7 μ M, 27.5 μ M, 6.0 μ M

και 22.9μM, αντίστοιχα). Τέλος στην ομάδα COG2252 μελετήθηκαν με μεταλλαξιγένεση οι μεταφορείς PurP (αδενίνης, K_m 1.0μM) και ο YjcD (γουανίνης και υποξανθίνης K_m 1.6μM και 11.2μM αντίστοιχα) από την *E.coli*. Σε όλες τις περιπτώσεις μελετήθηκε με μεταλλαξιγένεση η περιοχή του προβλεπόμενου κέντρου δέσμησης.

Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης σε όλους τους μεταφορείς έδειξαν ότι δύο θέσεις, E241 (TM8) και E290 (TM10) (αρίθμηση σύμφωνα με τον UraA) που συμμετέχουν άμεσα στην πρόσδεση του υποστρώματος (ουρακίλης) με δεσμούς υδρογόνου, είναι αναντικατάστατα σε όλη την οικογένεια NAT/NCS2. Πολύ σημαντικό ρόλο έχει η Asp/His-245 (TM8) για την οποία στους μεταφορείς ξανθίνης ή ξανθίνης/ουρικού όπου συντηρείται ως Asp (D276 στον XanQ, απαραίτητη η καρβοξυλομάδα για υψηλή ενεργότητα) παρουσιάσθηκαν ενδείξεις (από την ανάλυση της εξάρτησης της ενεργότητας από το pH) ότι ίσως επηρεάζει την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας E241 (TM8) (E272 στον XanQ) επιδρώντας έμμεσα στη δέσμηση και/ή συμμεταφορά του πρωτονίου με το υπόστρωμα.

Σε ό,τι αφορά την εξειδίκευση βρέθηκε ότι στον κλάδο ξανθίνης/ουρικού σημαντικό ρόλο στην διάκριση ξανθίνης και ουρικού οξέος έχει η θέση Ser/Thr/Asn-93 του TM3, η οποία συμμετέχει σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου που περιλαμβάνει και τη θέση E262/272 (TM8) που αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα στην ιμιδαζολική πλευρά και αλλαγές στη θέση του TM3 επηρεάζουν καταλυτικά αυτήν την αλληλεπίδραση. Στους μεταφορείς πυριμιδινών καθοριστική για την ευρύτερη εξειδίκευση του RutG μπορεί να είναι η Phe-73/Ala-88 αφού το μετάλλαγμα του UraA F73A (TM3) βρέθηκε ότι αναγνωρίζει ισχυρά θυμίνη με K_i 10μM (ο UraA αγρίου τύπου δεν αναγνωρίζει καθόλου θυμίνη) και την μεταφέρει σε μικρό αλλά σημαντικό βαθμό χωρίς όμως να χάνει την ικανότητα αναγνώρισης και μεταφοράς ουρακίλης. Πιθανώς η φαινυλαλανίνη στη θέση F73 εμποδίζει την κατάλληλη διεύθυνση της θυμίνης στο κέντρο δέσμησης λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης με την μεθυλομάδα στη θέση C5 του πυριμιδινικού δακτυλίου. Από την μεταλλαξιγένεση του rSNBT1, τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι καθοριστική για τη διάκριση ή μη μεταξύ πυριμιδινών και πουρινών στο κέντρο δέσμησης μπορεί να είναι η θέση E397 (TM10) αφού το μετάλλαγμα E397Q διατηρεί την ικανότητα μεταφοράς μόνο των πουρινών. Στην ομάδα COG2252 δεν βρέθηκε κάποια θέση στην περιοχή δέσμησης του υποστρώματος που να σχετίζεται με την εξειδίκευση.

Από τα αποτελέσματά μας προκύπτουν σημαντικά στοιχεία για την πληρέστερη κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια NAT/NCS2 και για την ερμηνεία των διαφορών εξειδίκευσης. Επίσης, η εργασία για τους μεταφορείς πουρινών του *S.meliloti* αποτελεί μια αρχική πειραματική βάση για να αναλυθεί περαιτέρω ο φυσιολογικός τους ρόλος στις συμβιωτικές σχέσεις βακτηρίων-φυτών.

Summary

The objective of this work was to study the structure-function and specificity relationships in the evolutionarily wide family of transmembrane purine/pyrimidine transporters known as NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporters/Nucleobase-Cation Symporter-2). NAT/NCS2 is a family of nucleobase/cation symporters and its homologs fall in two separate clusters, COG2233 and COG2252 (also known as AzgA-like), and has a broad range of substrates even though all homologs can be modeled on the x-ray structure of the uracil permease UraA exhibiting high evolutionary conservation. Thus far, very few members of this family have been characterized functionally in detail, and even fewer have been studied further with site-directed mutagenesis and other biochemical/genetic approaches to analyze their specificity determinants. Based on the above, the aim of the present work was to find new NAT/NCS2 homologs with different specificities and analytically compare them with mutagenesis with already known related homologs to reveal the major specificity determinants in each cluster of the family or in general.

The search for new homologous transporters was focused on bacterial homologs from model microorganisms (*Escherichia coli* K-12, *Sinorhizobium meliloti*). The new NAT/NCS2 homologs analyzed for their functional profile in the current thesis include RutG (COG2233) and PurP, YicO, YjcD and YgfQ (COG2252) from *Escherichia coli* and SmLL9, SmLL8, SmX28 (COG2233), SmVC3 and SmYE1 (COG2252) from the nitrogen-fixing rhizobium *Sinorhizobium meliloti*. On *S. meliloti* additional findings are presented which contribute to the understanding of the potential physiological role of one of the transporters studied (SmLL9) in symbiotic nitrogen fixation. It was also found that the xanthine and uric acid transporter SmLL9 is responsible for the xanthine uptake in laboratory cultures of *S. meliloti* growth on xanthine as a sole nitrogen source, indicating that a similar important role may be present in the symbiotic nodules formed by *S. meliloti* in legume roots.

To study structure-function and specificity relationships in NAT/NCS2 family we used the xanthine and uric acid transporter SmLL9 (K_m 5.3 μ M and 27.3 μ M, respectively) in pair with the known xanthine transporter XanQ for the xanthine and uric acid clade; RutG [uracil (K_m 2.0 μ M) and thymine (K_m 1.6 μ M) and, to a limited extent, xanthine (K_m 63 μ M)], UraA (uracil-specific, K_m 1.4 μ M) and the broader-specificity rSNBT1 (which transports uracil, thymine, xanthine, hypoxanthine and guanine with K_m 10.2 μ M, 5.7 μ M, 27.5 μ M, 6.0 μ M and 22.9 μ M, respectively), for the pyrimidine transporters clade of COG2233 and PurP and YjcD for the COG2252 cluster. The mutagenesis studies were focused on amino acid residues at the presumed binding-site region and its periphery.

We found that residues E241 (TM8) and E290 (TM10) are irreplaceable for function of the NAT/NCS2 transporters, probably because they are involved directly to the binding of substrate (uracil) through hydrogen bonds. A very important role is

probably played by Asp/His-245 (TM8). This position of TM8 has been studied more extensively in the xanthine and xanthine/uric acid transporters of COG2233 which retain an Asp at this position (D276 in XanQ, very important as a carboxyl group for retention of high-level activity). Based on the analysis of the pH profiles of XanQ and relevant mutant, it may be proposed that this Asp residue affects the protonation-deprotonation of the substrate-binding E241 (TM8) (E272 in XanQ) and, thus, indirectly affects the substrate binding and/or the proton symport mechanism.

The site Ser/Thr/Asn-93 at TM3 appears to be important for the distinction between uric acid and xanthine substrates in the group of purine transporters of COG2233. A small size of the polar group (Ser) leads to recognition of both purines while a larger group (Asn, Thr) limits the specificity. A possible explanation is that this polar group participates in a hydrogen bond network involving also the substrate-binding E262/272 (TM8) and the amino acid changes at this position of TM3 affect the binding interaction of E262/272. Of the pyrimidine transporters, the Phe-73/Ala-88 is decisive for the broader specificity of RutG, since the UraA mutant F73A was found to recognize with high affinity thymine (K_i 10 μ M) (wild-type UraA does not recognize thymine at all) and even transport thymine to a limited extent, without losing the ability for binding and transport of uracil. A possible explanation for this difference is that the phenyl group of F73 does not allow the appropriate orientation of thymine in the binding site due to steric hindrance from the methyl group at C5 of the pyrimidine ring and when F73 is changed to Ala these constraints are abolished. From the mutagenesis of rSNBT1, the results indicated that key for the distinction between pyrimidines and purines could be the polar group at E397 (TM10), based on the finding that the rSNBT1 mutant E397Q retains the ability to transport only the purine substrates. Of the purine transporters of cluster COG2252, we did not find any specificity determinants at the presumed binding-site region.

The results of this PhD thesis offer important experimental evidence for the understanding of structure-function relationships in the NAT/NCS2 family of transporters and the interpretation of substrate specificity differences. In addition, the results on the purine transporters of *S.meliloti* offer a basis for understanding the physiological role of purine transporters in plant-bacterial symbioses and putative applications for improvement of crops in certain types of symbiotic nitrogen fixation.

Βιβλιογραφία

Alguel Y, Amillis S, Leung J, Lambrinidis G, Capaldi S, Scull NJ, Craven G, Iwata S, Armstrong A, Mikros E, George Diallinas G, Cameron AD, Byrne B (2016) Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat. Commun.* 7:11336 doi: 10.1038/ncomms11336.

Al-Salabi MI, de Koning HP. (2005) Purine nucleobase transport in amastigotes of *Leishmania mexicana*: involvement in allopurinol uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3682-9

Amillis S, Kosti V, Panatazopoulou A, Mikros E, Diallinas G. (2011) Mutational analysis and modelling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J. Mol. Biol.* 411(3), 567-580

Amillis S, Koukaki M, Diallinas G. (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

Andersen PS, Frees D, Fast R, Mygind B. (1995) Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of uraA mutants and cloning of the gene. *J. Bacteriol.* 177, 2008-2013

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. (2004) Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 350 (23), 2343-2351

Anzai N, Jutabha P, Amonpatumrat-Takahashi S, Sakurai H (2012) Recent advances in renal urate transport: characterization of candidate transporters indicated by genome-wide association studies. *Clin Exp Nephrol.* 16(1):89-95. doi: 10.1007/s10157-011-0532-z

Arakawa T, Kobayashi-Yurugi T, Alguel Y, Iwanari H, Hatae H, Iwata M, Abe Y, Hino T, Ikeda-Suno C, Kuma H, Kang D, Murata T, Hamakubo T, Cameron AD, Kobayashi T, Hamasaki N, Iwata S. (2015) Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science* 350, 680-4

Argyrou E, Sophianopoulou V, Schultes N, Diallinas G. (2001) Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell.* 13 (4), 953-964

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: ‘ collection. *Mol Syst Biol.* 2, 1-11

Berg, MJ, Tymoczko LJ, Stryer L. (2005) *Biochemistry*, 5th edition, W.H Freeman and Company, San Francisco

Bieber JD, Terkeltaub RA. (2004) Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum.* 50(8), 2400-2414

Boland MJ, Schubert KR. (1983) Purine biosynthesis and catabolism in soybean root nodules: incorporation of ¹⁴C from ¹⁴CO₂ into xanthine. *Arch Biochem Biophysics* 213(2), 486-491

Botou M, Papakostas K, Evangelidis T, Mikros E, Frillingos S, (2015) ‘Structure-function analysis of the different selectivity preferences of pyrimidine and/or purine transporters in the Nucleobase:Cation Symporter-2 (NAT/NCS2) family’, 40th FEBS Congress-The Biochemical Basis of the Life, Berlin, Germany, 4-9-July, 2015. *FEBS J.* 282(S1), 11

Bürzle M, Suzuki Y, Ackermann D, Miyazaki H, Maeda N, Clumenson B, Burrier R, Hediger MA (2013) The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 436-454

Burton K. (1983). Transport of nucleic acid bases into *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3505-3513.

- Burton K. (1994). Adenine transport in *Escherichia coli*. *Proc. Biol. Sci.* **255**, 153-157
- Carrasco, N., Herzlinger, D., Mitchell R. DeChiara S., Danho, W., Gabriel, T.F., and Kaback, H.R. (1984) Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4672-4676
- Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004). The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*: characterisation of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* **279**, 3132-3141
- César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, Reithmeier RA, Hepworth D, Hediger MA, Edwards AM, Superti-Furga G. (2015) A call for systematic research on solute carriers. *Cell.* **162**, 478-87
- Chen JG and Rubnick G.(2000) Permeation and gating residues in serotonin transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**(3),1044-9.
- Cheng Y, Prusoff WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* **22**(23), 3099-3108
- Cho BK, Federowicz SA, Embree M, Park YS, Kim D, Palsson BO.(2011) The PurR regulon in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Nucleic Acids Research* **39** (15), 6456–6464
- Clarke VC, Loughlin PC, Day DA and Smith PM. (2014) Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Front Plant Sci.* **15**;5:699. doi: 10.3389/fpls.2014.00699. eCollection 2014.
- Consler TG, Tsolas O, Kaback HR (1991) Role of proline residues in the structure and function of a membrane transport protein. *Biochemistry* **30**(5), 1291–1298
- Cusa E, Obradors N, Baldomà L, Badià J and Aguilar J. (1999) Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**(24), 7479-7484
- Danielsen S, Kilstrup M, Barilla K, Jochimsen B and Neuhard J. (1992) Characterization of the *Escherichia coli* codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol Microbiol.* **6**(10):1335-44.
- Daruwala R, Song J, Koh WS, Rumsey SC, Levine M (1999) Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett.* **460**(3):480-4.
- de Koning H, Diallinas G. (2000) Nucleobase transporters. *Mol. Membr. Biol.*, **17**, 75-94
- de Koning HP, Bridges DJ and Burchmore RJ. (2005) Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 987-1020
- Diallinas G, Valdez J, Sophianopoulou V, Rosa A, Scazzocchio C. (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
- Diallinas G. (2014) Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front. Pharmacol.* **5**, 207. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00207>
- Djordjevic M (2004) Sinorhizobium meliloti metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. *Proteomics* **4**, 1859-1872
- Drew D. and Boudker O. (2016) Shared molecular mechanisms of membrane transporters. *Annu. Rev. Biochem. in press* doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014520
- Élion GB. (1993) Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol. Suppl* **1**, 2-6
- Engel K, Zhou M, Wang J. (2004) Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain *J. Biol. Chem.* **279**: 50042-50049

Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417** (6887), 447- 452

Faham S, Watanabe A, Besserer GM, Cascio D, Specht A, Hirayama BA, Wright EM, Abramson J. (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* **321**, 810-814

Fang, Y, Jayaram H, Shane T, Kolmakova-Partensky L, Wu F, Williams C, Xiong Y, Miller C. (2009) Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature* **460**, 1040-1043

Forrest LR, Zhang YW, Jacobs MT, Gesmonde J, Xie L, Honig BH, Rudnick G. (2008) Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 10338-10343

Foucher F and Kondorosi E (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago Plant Molecular Biology **43**, 773-386

Fox IH, Kelley WN. (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* **47**, 655-86

Frillingos S, Sahin-Tóth M, Wu J, Kaback HR. (1998) Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure-function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J.* **12**: 1281-1299

Frillingos S, Sahin-Tóth M, Persson B, Kaback HR. (1994) Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 8074-8081

Frillingos S. (2012) Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol.* **3**(3), 250-272

Frillingos S. (2013) Using Cys-Scanning Analysis Data in the Study of Membrane Transport Proteins in *Genetic Manipulation of DNA and protein, Examples from current research* (ed. D. Figurski) Intech, pp 333-360

Frillingos, S., and Kaback, H. R. (2001) Altering sugar transport specificity of a bacterial oligosaccharide -H⁺ symporter (OHS) by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **268**, 223-226

Gao X, Lu F, Zhou L, Dang S, Sun L, Li X, Wang J, Shi Y. (2009) Structure and Mechanism of an Amino Acid Antiporter. *Science* **324**, 1565-1568

Geertsma ER, Yung-Ning Chang, Shaik FR, Neldner Y, Pardon E, Steyaert J, Dutzler R. (2015) Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family *Nat Struct Mol Biol.* **10**, 803-8

Georgopoulou E, Mermelekas G, Karena E, Frillingos S. (2010) Purine Substrate Recognition by the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in the YgfO Xanthine Permease. *J Biol Chem* **285**, 19422-19433

Girke C, Arutyunova E, Syed M, Traub M, Mohlmann T, Lemieux MJ (2015). High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7 (ENT7) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta.* 1850(9):1921-9

Girke C, Daumann M, Niopek-Witz S, Möhlmann T. (2014) Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Front Plant Sci.* **5**, 443.

Gorbunov D, Sturlese M, Nies F, Kluge M, Bellanda M, Battistutta R, Oliver D. (2014) Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters. *Nat. Commun.* **5**, 3622.

Goudela S, Karatza P, Koukaki M, Frillingos S, Diallinas G. (2005) Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT family. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 263-275

- Goudela S, Tsilivi H, Diallinas G. (2006) Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Mol Membr Biol.* 23(4), 291-303
- Gournas C, Papageoriou I, Diallinas G. (2008) The Nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.* 4(5), 404-16
- Grothey A, Sargent D. (2005) Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *J Clin Oncol.* 23(36), 9441-9442
- Guan M, Zhang RD, Wu B, Henderson EE. (1996) Infection of primary CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by Epstein-Barr virus enhances human immunodeficiency virus expression. *J Virol.* 70(10), 7341-7346
- Hasegawa A, Ogasawara H, Kori A, Teramoto J and Ishihama A. (2008) The transcription regulator AllR senses both allantoin and glyoxylate and controls a set of genes for degradation and reutilization of purines. *Microbiology* 154, 3366-3378
- Hauryliuk V, Atkinson GM, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K (2015) Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol.* 13(5): 298–309. doi:10.1038/nrmicro3448.
- Haydon A. (2003) Adjuvant chemotherapy in colon cancer: what is the evidence? *Intern Med J.* 33(3), 119-124
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96 (1), 23-28
- Jain S, Showman AC, and Jewett MW (2015) Molecular dissection of a *Borrelia burgdorferi* in vivo essential purine transport system. *Infect. Immun.* 83, 2224-2233.
- Johansen LE, Nygaard P, Lassen C, Agersø Y, Saxild HH. (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(17), 5200-5209.
- Johnson ZL, Cheong CG and Lee SY (2012) Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4Å. *Nature* 483(7390), 489–493. doi:10.1038/nature10882
- Kaback HR, Dunten R, Frillingos S, Venkatesan P, Kawn I, Zhang W, Ermolova N. (2007) Site-directed alkylation and the alternative access model for LacY. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 491-494
- Kalli AC, Samson MSP, Reithmeier RAF (2015) Molecular Dynamics Simulations of the Bacterial UraA H⁺-Uracil Symporter in Lipid Bilayers Reveal a Closed State and a Selective Interaction with Cardiolipin. *PLoS Comput Biol* 11(3): e1004123
- Karatzá P, Frillingos S. (2005) Cloning and functional characterization of 2 bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* 22, 251-261
- Karatzá P, Panos P, Georgopoulou E, Frillingos S. (2006) Cysteine-scanning analysis of the Nucleobase-Ascorbate transporter signature motif YgfO permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 281, 39881-39890
- Karena E, and Frillingos S (2011) The Role of Transmembrane Segment TM3 in the Xanthine Permease XanQ of *Escherichia coli* *J Biol Chem.* 286 (45), 39595–39605
- Karena E, Frillingos S. (2009) Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. *J Biol Chem.* 284(36), 24257-24268
- Karena E, Tatsaki E, Lambrinidis G, Mikros E and Frillingos S. (2015) Analysis of conserved NAT/NCS2 motifs in the *Escherichia coli* xanthine permease XanQ *Mol. Microbiology* 98 (3), 501-517
- Kato R, Maeda T, Akaike T, Tamai I. (2006) Characterization of novel Na⁺-dependent nucleobase transport systems at the blood-testis barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290(5), 968-975

Konings WN, Barnes EM Jr, Kaback HR. (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**(19), 5857-5861

Kosti V, Lambrinidis G, Myriantopoulos V, Diallinas G, Mikros E. (2012) Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. *PLoS One.* **7**(7), 41939-41945

Kosti V, Papageorgiou I, Diallinas G. (2010) Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol. Biol.* **397**(5), 1132-1143

Koukaki M, Vlantı A, Goudela S, Pantazopoulou A, Gioule H, Tournaviti S, Diallinas G. (2005) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **350**, 499-513

Kozmin SG, Stepchenkova NI, Chow SC and Schaaper RM. (2013) A critical role of the putative NAT/NCS2 nucleobase permease YjcD in the activation of cytotoxic and mutagenic purine analogs in *Escherichia coli*. *mBIO* 4 e00661-13

Kryptou E, Diallinas G. (2014) Transport assays in filamentous fungi: kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* **63**, 1-8

Kryptou E, Evangelidis T, Bobonis J, Pittis AA, Gabaldón T, Scazzocchio C, Mikros E and Diallinas G. (2015) Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Mol. Microbiology* **96** (5), 927,950

Kryptou E, Kosti V, Amillis S, Myriantopoulos V, Mikros E, Diallinas G. (2012) Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 transporter *J Biol Chem.* **287**(44), 36792-36803

Kryptou E, Lambrinidis G, Evangelidis T, Mikros E, Diallinas G. (2014) Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Mol Microbiol.* **93**(1), 129-135

Kulikowska E, Kierdaszuk B, Shugar D (2004) Xanthine, xanthosine and its nucleotides: solution structures of neutral and ionic forms and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *Acta Biochim Pol.* **51**(2), 493,531

Landfear SM, Ullman B, Carter NS and Sanchez MA. (2004) Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* **3**, 245-254.

Landfear SM. (2009) Transporters for Drug Delivery and as Drug Targets in Parasitic Protozoa. *Clin Pharmacol Ther* **87**, 122-125.

Landfear SM. (2011) Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryot Cell.* **10**(4), 483-493

Loh KD, Gyaneshwar P, Markenscoff Papadimitriou E, Fong R, Kim KS, Parales R, Zhou Z, Inwood W, Kustu S. (2006) A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism. *Proc Natl Acad Sci* **103**(13):5114-9

Lu F, Li S, Jiang Y, Jiang J, Fan H, Lu G, Deng D, Dang S, Zhang X, Wang J, Yan N. (2011) Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature* **472** (7342), 243-246

Madigan MT, Martinko JM, Bender K, Buckley D, Stahl D. (2014) Brock Biology of Microorganisms, 14th Edition. Pearson Education, Inc.

Mansfield TA, Schultes NP, Mourad GS (2009) AtAzc1 and AtAzc2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis. *FEBS Lett.* **583** (2), 481-6

Marbach, D, Costello, J. C., Kuffner, R., Vega, N. M., Prill, R. J., Camacho, D. M., Allison, K. R., DREAM5 Consortium, Kellis, M., Collins, J. J., and Stolovitzky, G. (2012) Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nature Methods* **9**, 796-804

- Martin JC, Dvorak CA, Smee DF, Matthews TR, Verheyden JP. (1983) 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent. *J Med Chem.* **26**(5), 759-761
- Matthews T, Boehme R. (1988) Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis. Suppl 3*, S490-494
- Maurino VG, Grube E, Zielinski J, Schild A, Fischer K, Flügge UI (2006) Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **47**(10):1381-1393
- Mermelekas G, Georgopoulou E, Kallis A, Botou M, Vlantos V and Frillingos S. (2010) Cysteine-scanning analysis of helices TM8, TM9a and TH9b and intervening loops in the YgfO xanthine permease: a carboxyl group is essential at Asp-276. *J.Biol. Chem.* **285** (45), 35011-20
- Mok WS David and Mok C Machteld (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118
- Mourad GS, Tippmann-Crosby J, Hunt KA, Gicheru Y, Bade K, Mansfield TA, Schultes NP. (2012) Genetic and molecular characterization reveals a unique nucleobase cation symporter 1 in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **586** (9), 1370-1378
- Natto MJ, Wallace LJ, Candlish D, Al-Salabi MI, Coutts SE, de Koning HP. (2005) *Trypanosoma brucei*: expression of multiple purine transporters prevents the development of allopurinol resistance. *Exp. Parasitol.* **109**(2):80-6
- Niopek-Witz S, Deppe J, Lemieux MJ and Möhlmann T. (2014) Biochemical characterization and structure-function relationship of two plant NAT/NCS2 proteins, the nucleobase transporters NAT3 and NAT12 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 3025-3035.
- Pantazopoulou A, Diallinas G (2006) The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol Membr Biol.* **23**(4), 337-48.
- Papageorgiou, I, Gournas C, Vlanti A, Amillis S, Pantazopoulou A, Diallinas G. (2008) Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol* **382**, 1121-1135
- Papakostas K, Botou M, Frillingos S. (2013) Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* **288**(52), 36827-36840.
- Papakostas K, Frillingos S. (2012) Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **287** (19), 15684-15695.
- Papakostas K, Georgopoulou E, Frillingos S. (2008) Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. *J Biol Chem.* **283**(20), 13666-13678
- Parales RE, Ingraham JL. (2010) The surprising Rut pathway: an unexpected way to derive nitrogen from pyrimidines. *J Bacteriol.* **192**(16):4086-8
- Patching SG, Baldwin SA, Baldwin AD, Young JD, Gallagher MP, Henderson PJ, Herbert RB (2005) The nucleoside transport proteins, NupC, NupG, from *Escherichia coli*: specific structural motifs necessary for the binding and ligands. *Org Biomol Chem* **3**: 462-470
- Pea F. (2005) Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions *Contrib Nephrol.* **147**, 35-46
- Piret J, Boivin G. (2011) Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(2), 459-472
- Pope SD, Chen LL, Steward V (2009) Purine Utilization by *Klebsiella oxytoca* M5a1: Genes for Ring-Oxidizing and -Opening Enzymes. *Journal of Bacteriology*, **191** (3), 1006-1017

- Pornillos O, Chen YJ, Chen AP, Chang G. (2006) X-ray structure of the EmrE multidrug transporter in complex with a substrate. *Science* **310**(5756), 1950-1953
- Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnewell S, Bongaerts RJ, and Poole PS. (2009). Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**:12477–82
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Patel V, Haskó G, Szabó C, Mabley JG, Liaudet L, Pacher P. (2009) Xanthine oxidase inhibitor allopurinol attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med.* **13**(8B), 2330-2341
- Rivas, C. I., Zuniga, F. A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., and Vera, J. C. (2008) Vitamin C transporters. *J Physiol Biochem* **64**, 357-375.
- Rott KT, Agudelo CA. Gout (2003) *JAMA* **289**(21), 2857-2860
- Saeir MH, Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, Jack DL, Lai EC, Liu HJ, Nusinew DP, Omar AM, Pao SS, Paulsen IT, Quan JA, Sliwinski M, Tseng TT, Watchi S, Young GB. (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 1-56
- Saeki K. (2011) Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:1327–1339
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lengeler, J. W., and Kaback, H. R. (1995) Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **208**, 1116-1123
- Saier MH, Reddy VS, Tamang DG, Vastermark A. (2014) The transporter classification database. *Nucl. Acids Res.*, **42**(1):D251-8
- Schlesinger N. (2004) Management of acute and chronic gouty arthritis: present state-of-the-art. *Drugs.* **64**(21), 2399-2416
- Schultz AC, Nygaard P, Saxild HH. (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**(11), 3293-3302
- Shaffer PL, Goehring A, Shankaranarayanan A, Gouaux E. (2009) Structure and Mechanism of a Na⁺-Independent Amino Acid Transporter. *Science* **325**, 1010-1014
- Shimamura T, Weyand S, Beckstein O, Rutherford NG, Hadden JM, Sharples D, Sansom MSP, Iwata S, Henderson PJF, Cameron AD. (2010) Molecular Basis of Alternating Access Membrane Transport by the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1. *Science* **328**, 470-473
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson J and Higgins DG. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* **7**:539 doi: 10.1038/msb.2011.75
- Simmons K, Jackson SM, Brueckner F, Patching SG, Beckstein O, Ivanova E, Geng T, Weyand S, Drew D, Lanigan J, Sharples DJ, Sansom MSP, Iwata S, Fishwick CWG, Johnson P, Cameron AD, Hedreson P JF (2014) Molecular mechanism of ligand recognition by membrane transporter protein, Mph1. *EMBO journal* **33**, 1831-1844
- Singh SK, Piscitelli CL, Yamashita A, Gouaux E. (2008) A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation. *Science* **322**, 1655-1661
- Sorgen PL, Hu Y, Guan L, Kaback HR and Girvin ME. An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**; **99**: 14037-14040.
- Spector T, Johns DG. (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**(4), 583-589

Sugiyama A, Sano CM, Yazaki K, Sano H (2016) Caffeine fostering of mycoparasitic fungi against phytopathogens, *Plant Signaling & Behavior*, 11:1, e1113362, DOI: 10.1080/15592324.2015.1113362

Suzuki S, Henderson P. (2006) The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *J Bacteriol* **188** (9), 3329-3336

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729

Tamura N, Konishi S, Yamaguchi A. (2003) Mechanisms of drug/H⁺ antiport: complete cysteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach. *Curr Opin Chem Biol* 7: 570-579

Teather, R. M., Muller-Hill, B., Abrutsch, U., Aichele, G., and Overath, P. (1978) Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Mol. Gen. Genet* **159**, 239-248

Tedeger M (2014) Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, No. 7, 1865–1878

Trepolilli JJ, Hood GA, and Poole PS. (2012). What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.* 60, 325–389.

Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, and Hediger MA (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 399: 70-75

Udvardi M and Poole PS. (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 781–805.

Varma, S., Campbell C. E., and Kuo, S. M. (2008) Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters. *Biochemistry* 47, 2952-2960

Västermark A, Saier MH Jr. (2014) Evolutionary relationship between 5+5 and 7+7 inverted repeat folds within the amino acid-polyamine-organocation superfamily. *Proteins* **82**, 336–346

Vastermark A, Wollwage S, Houle ME, Rio R, Saier MH Jr. (2014) Expansion of the APC superfamily of secondary carriers. *Proteins* 82(10), 2797-811, doi: 10.1002/prot.24643.

Vogels GD, Van der Drift C. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev* **40**(2), 403-468

Weyand S, Shimamura T, Beckstein O, Sansom MS, Iwata S, Henderson PJ, Cameron AD. (2011) The alternating access mechanism of transport as observed in the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *J Synchrotron Radiat.* **1**, 20-3

Weyand, S, Shimamura T, Yajima S, Suzuki S, Mirza O, Krusong K, Carpenter EP, Rutherford NG, Hadden JM, O'Reilly J, Ma P, Saidijam M, Patching SG, Hope RJ, Norbertczak HT, Roach PC, Iwata S, Henderson P, Cameron AD. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science* **322**, 709-713.

Wong FH, Chen JS, Reddy V, Day JL, Shlykov MA, Wakabayashi ST, Saier MH Jr. (2012) The amino acid-polyamine-organocation superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 105–113

Wortmann RL. (2005) Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol.* **17**(3), 319-24

Xi H, Schneider BL, Reitzer L. (2000) Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *J. Bacteriol.* **182**, 5332-5341

Yamamoto S, Inoue K, Murata T, Kamigaso S, Yasujima T, Maeda JY, Yoshida Y, Ohta KY, Yuasa H. (2010) Identification and Functional Characterization of the First Nucleobase Transporter in Mammals: Implication in the Species Difference in the Intestinal Absorption Mechanism of Nucleobases and their Analogs Between Higher Primates and other Mammals. *J Biol Chem* **285**, 6522-6531

Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y and Gouaux E (2005) Crystal structure of a bacterial homolog of Na⁺/Cl⁻—dependent neurotransmitter transporter. *Nature* **437** (7056), 215-23

Yan N. (2015). Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annu. Rev. Biophys.* **44**, 257-83

Yao SY, Ng AM, Muzyka WR, Griffiths M, Cass CE, Baldwin SA and Young JD(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.

Zomot E, Zhou Y, Kanner BI (2002) Proximity of transmembrane domains 1 and 3 of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 inferred from paired cysteine mutagenesis. *J Biol Chem*, **280** (27), 25512-25516

Γεωργοπούλου, Α. (2011) Χαρτογράφηση του κέντρου δέσμησης και μεταφοράς πουρινών των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT). Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θεοδώρου, Ι. Α. (2006) Μελέτες επί του μηχανισμού δράσης κυστεϊνοπρωτεϊνών. Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Καρενά, Α. (2014) Δομική και λειτουργική οργάνωση των διαμεμβρανικών ελίκων στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

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

Παπακώστας, Κ. (2011) Διερεύνηση του μηχανισμού πρόσληψης πουρινών στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων- ασκορβικού (NAT). Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων