



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Εξελικτική Ανάλυση των Διαμεμβρανικών Συμμεταφορέων
Νουκλεοτιδικών βάσεων-Κατιόντων της Οικογένειας NAT/NCS2:
Μελέτη του Ρόλου της Ser/Gly-377 στην Εξειδίκευση των
Μεταφορέων Ξανθίνης**

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Εξελικτική Ανάλυση των Διαμεμβρανικών Συμμεταφορέων
Νουκλεοτιδικών βάσεων-Κατιόντων της Οικογένειας NAT/NCS2:
Μελέτη του Ρόλου της Ser/Gly-377 στην Εξειδίκευση των
Μεταφορέων Ξανθίνης**

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2020

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψεις	11
Περίληψη.....	11
Summary	12
Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Πρωτεΐνες Διαμεμβρανικής Μεταφοράς.....	14
1.1.1 Μεταφορείς Νουκλεοτιδικών Βάσεων	16
1.1.2 Η Οικογένεια Μεταφορέων NAT/NCS2	18
1.1.3 Δομικά Πρότυπα Μεταφορέων NAT/NCS2.....	20
1.1.3.1 Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA	21
1.1.3.2 Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού οξέος UarA	23
1.1.4 Σχέσεις Δομής- Λειτουργίας του Μεταφορέα Ξανθίνης XanQ του Εντεροβακτηρίου <i>E.coli</i>	25
1.2 Μέθοδος της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών	29
1.3 Η σημασία της αναζήτησης μεταφορέων πουρινών στα βακτήρια- Το παθογόνο βακτήριο <i>Neisseria meningitidis</i>	34
1.4 ΣΚΟΠΟΣ	38
Κεφάλαιο 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1 Όργανα εργαστηρίου	40
2.2 Χημικά Αναλώσιμα.....	42
2.3 Διαλύματα.....	44
2.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	46
2.5 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	50
2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	50
2.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension) ...	51
2.5.3 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασύνδεση).....	53
2.5.4 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού	54
2.5.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	54
2.6 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων.....	55
2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	56
2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών	57
2.8.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA	57
2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	57

2.8.3	Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	58
2.9	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)	59
2.9.1	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε βακτηριακά ομόλογα.....	59
2.9.2	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση	60
2.9.3	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς παρουσία μη σημασμένων αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων	60
2.10	<i>In silico</i> αναλύσεις.....	61
Κεφάλαιο 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		63
3.1.	Λειτουργικός χαρακτηρισμός του ομόλογου μεταφορέα XanQ του παθογόνου βακτηρίου <i>Neisseria meningitidis</i>	67
3.1.1.	Ο NmXanQ μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη	67
3.1.2	Η ξανθίνη μεταφέρεται λιγότερο αποτελεσματικά από το NmXanQ σε σχέση με τον XanQ.....	69
3.1.3.	Ο NmXanQ έχει ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης από τον XanQ.....	70
3.2	Έλεγχος της σημαντικότητας της θέσης 377 στους μεταφορείς NmXanQ, ApcXanQ και XanQ	73
3.2.1	Στο υπόβαθρο του NmXanQ: η μονή αντικατάσταση δεν οδηγεί σε αλλαγή εξειδίκευσης.....	73
3.2.1.1	Η αντικατάσταση G377S οδηγεί σε μείωση της συγγένειας για την ξανθίνη	76
3.2.1.2	Το μετάλλαγμα NmXanQ/G377S εμφανίζει το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με το μεταφορέα φυσικού τύπου	77
3.2.2	Στο υπόβαθρο του ApcXanQ: η αντικατάσταση G377S δεν οδηγεί σε αλλαγή της εξειδίκευσης.....	79
3.2.2.1	Η αντικατάσταση G377S προκαλεί αύξηση της συγγένειας για την ξανθίνη.....	82
3.2.2.2	Το προφίλ εξειδίκευσης του ApcXanQ/G377S δεν είναι τόσο ευρύ όσο του ApcXanQ.....	83
3.2.3	Στο υπόβαθρο του XanQ: η αλλαγή S377G είναι ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση του μεταφορέα	85
3.2.3.1	Η μονή αλλαγή αυξάνει την αποτελεσματικότητα μεταφοράς ξανθίνης	88
3.2.3.2	Η μεταλλαγή στη θέση 377 διευρύνει το προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα ...	89
3.2.4	Στο υπόβαθρο του ApcXanQ(5M): η επαναφορά του αμινοξέος Gly στη θέση 377 δεν είναι ικανή να οδηγήσει σε διπλή εξειδίκευση	91
3.2.4.1	Ο ApcXanQ(4M) έχει μειωμένη συγγένεια για την ξανθίνη συγκριτικά με τον ApcXanQ(5M)	94
3.2.4.2	Το προφίλ Εξειδίκευσης του ApcXanQ(4M) διαφοροποιείται ελάχιστα από αυτό του ApcXanQ(5M)	95
3.2.5	Στο υπόβαθρο του XanQ(5M): η επαναφορά της Ser στη θέση 377 δεν αλλάζει την εξειδίκευση του μεταφορέα	97

3.2.5.1 Η κινητική ανάλυση υπέδειξε ότι ο XapQ(4M) είναι πιο αποτελεσματικός μεταφορέας ξανθίνης από τον XapQ.....	100
3.2.5.2 Ο XapQ(4M) διαφέρει από τον XapQ(5M) και τον XapQ στην αναγνώριση της 6-θειοξανθίνης	101
Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	121

Συντμήσεις

Å (angstrom): μονάδα μέτρησης μήκους ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$)

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 - σουλφοξείδιο

DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

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

E.coli: *Escherichia coli*

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

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

kDa (kilo Dalton): μονάδα μέτρησης ατομικής μάζας ($1 \text{ Da} = 1.66 \times 10^{-24} \text{ g}$)

KPi: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου

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

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

LB: θρεπτικό υλικό Luria Bertani ή Luria Broth

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

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

PVDF (polyvinylidene difluoride): διφθοριούχο πολυ-βινυλιδένιο

SDS (sodium dodecyl sulphate): θειικό δωδεκυλικό νάτριο

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

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

C ή Cys: κυστεΐνη

D ή Asp: ασπαρτικό οξύ

E ή Glu: γλουταμικό οξύ

F ή Phe: φαινυλαλανίνη

G ή Gly: γλυκίνη

H ή His: ιστιδίνη

I ή Ile: ισολευκίνη

K ή Lys: λυσίνη

L ή Leu: λευκίνη

M ή Met: μεθειονίνη

N ή Asn: ασπαραγίνη

P ή Pro: προλίνη

Q ή Gln: γλουταμίνη

R ή Arg: αργινίνη

S ή Ser: σερίνη

T ή Thr: θρεονίνη

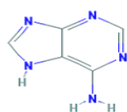
V ή Val: βαλίνη

W ή Trp: τρυπτοφάνη

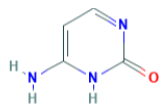
Y ή Tyr: τυροσίνη

Ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών

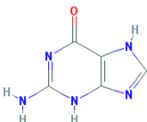
A: αδενίνη



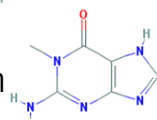
C: Κυτοσίνη



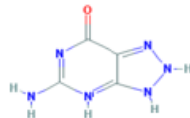
G: Γουανίνη



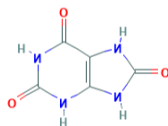
1-MG: 1-μεθυλογουανίνη



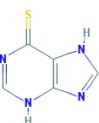
8-AG: 8-αζαγουανίνη



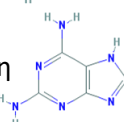
U.A.: Ουρικό οξύ



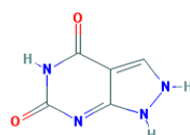
6-MP: 6-μερκαπτοπουρίνη



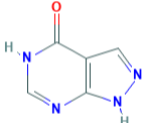
2,6-NP: 2,6-διαμινοπουρίνη



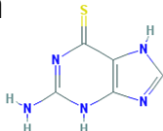
OxP: Οξυπουρινόλη



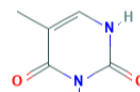
Allp: Αλλοπουρινόλη



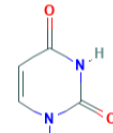
6-SG: 6-θειογουανίνη



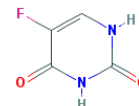
T: θυμίνη



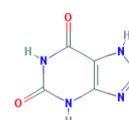
U: Ουρακίλη



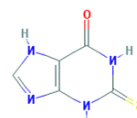
5-FU: 5-φθοροουρακίλη



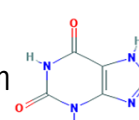
X: Ξανθίνη



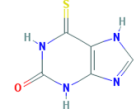
2-SX: 2-θειοξανθίνη



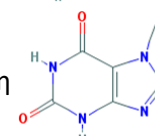
3-MX: 3-μεθυλοξανθίνη



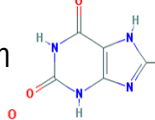
6-SX: 6-θειοξανθίνη



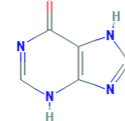
7-MX: 7-μεθυλοξανθίνη



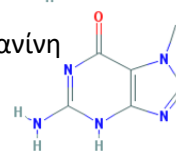
8-MX: 8-μεθυλοξανθίνη



HX: Υποξανθίνη



7-MG: 7-μεθυλογουανίνη



Περίληψη

Περίληψη

Η παρούσα εργασία αναφέρεται στην εξελικτική ανάλυση των διαφορών εξειδίκευσης σε μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2, με τη μέθοδο Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών η οποία εφαρμόζεται για πρώτη φορά σε πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς. Ειδικότερα, ασχοληθήκαμε με τον κλάδο των ορθολόγων του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*, για τον οποίο έχει ήδη ανασυσταθεί στο εργαστήριό μας η προγονική αλληλουχία AncXanQ, και έχει χαρακτηριστεί ως μεταφορέας ξανθίνης-γουανίνης ευρείας εξειδίκευσης. Σε προηγούμενα πειράματα είχαν διερευνηθεί οι διαφορές αμινοξέων που σχετίζονται με τη μετάβαση από τον ευρείας εξειδίκευσης, AncXanQ, στο σημερινό, αυστηρής εξειδίκευσης, μεταφορέα ξανθίνης XanQ και είχαν εντοπιστεί πέντε σημαντικά αμινοξέα (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στη δική μας εργασία (μεταπτυχιακή διατριβή), χαρακτηρίσαμε τον σύγχρονο μεταφορέα διπλής εξειδίκευσης, για ξανθίνη και γουανίνη, NmXanQ, του παθογόνου *Neisseria meningitidis*, ως αντιπροσωπευτικό ενός υποκλάδου μεταφορέων ξανθίνης, που διατηρεί τα πέντε αμινοξέα που είναι σημαντικά για την ευρεία εξειδίκευση του AncXanQ. Βασιζόμενοι, λοιπόν, στη μέθοδο Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών, μπορέσαμε να προβλέψουμε επιτυχώς το λειτουργικό προφίλ εξειδίκευσης ενός σύγχρονου μεταφορέα, εντοπίζοντας μάλιστα πρώτη φορά ενεργότητα μεταφοράς γουανίνης στο συγκεκριμένο κλάδο.

Επίσης, μελετήθηκε η συνεισφορά μίας εκ των πέντε διαφορετικών θέσεων, της Ser/Gly-377 στην εξειδίκευση. Κατασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα αντίστοιχα μεταλλάγματα στη θέση αυτή, σε διαφορετικά μοριακά περιβάλλοντα μεταφορέων ευρείας (NmXanQ/G377S, AncXanQ/G377S) και περιορισμένης εξειδίκευσης (XanQ/S377G). Η παρουσία Gly-377 συνδέεται με την ευρύτερη εξειδίκευση. Η αντικατάστασή της με Ser-377 δεν οδηγεί από μόνη της σε περιορισμό της εξειδίκευσης. Αντίθετα, η αντικατάσταση της Ser-377 με Gly-377 αρκεί για να μετατρέψει τον XanQ σε μεταφορέα ευρύτερης εξειδίκευσης, για ξανθίνη και γουανίνη. Έτσι φαίνεται η συμβολή της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών στον εντοπισμό ενός σημαντικού αμινοξέος για την εξειδίκευση, στη θέση 377, που δεν είχε εντοπιστεί σε προηγούμενες μελέτες.

Summary

The subject of this study is the evolutionary analysis of specificity differences among members of the NAT/NCS2 family of purine transporters, using the strategy of Ancestral Protein Reconstruction, which is applied for the first time to transmembrane transporters. Specifically, we study the xanthine permease cluster, represented by the xanthine-specific permease XanQ of *E. coli*. In previous experiments in the lab, the common ancestor of xanthine-specific homologs, AncXanQ, has been reconstructed, expressed and analyzed in *E. coli* K-12 and found to be a transporter for both xanthine and guanine, with broad specificity for purines. Its broader specificity relative to XanQ has been attributed to five differences in amino acids, peripheral to the substrate binding site (Tatsaki E., unpublished results).

In the current thesis we characterized the *Neisseria meningitidis* ortholog (NmXanQ), which retains the five residues considered to be important for the broad profile of AncXanQ, and proved that it is a xanthine/guanine permease, consistent with the predictions of the Ancestral Reconstruction approach. In addition, this is the first member of this cluster to exhibit broader specificity.

We also studied the specificity role of Ser/Gly-377, one of the five putatively important differences between AncXanQ and XanQ. We constructed and characterized mutants in broad-specificity backgrounds (NmXanQ/G377S, AncXanQ/G377S) and in the xanthine-specific XanQ (XanQ/S377G). Gly-377 is linked with the broader specificity. Replacement of Gly-377 with Ser-377 maintained the ability of AncXanQ and NmXanQ to transport both substrates, but replacement of Ser-377 with Gly-377 was sufficient to change XanQ to a broader purine permease recognizing both xanthine and guanine. Thus, the Ancestral Reconstruction approach allowed us to uncover a specificity role of Ser/Gly-377, which had not been revealed by any of the previous studies.

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πρωτεΐνες Διαμεμβρανικής Μεταφοράς

Σε όλα τα κύτταρα η πλασματική μεμβράνη αποτελεί το φράγμα που διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον, ώστε να καθορίζονται τα φυσικά και χημικά όρια του κυττάρου. Οι κυτταρικές μεμβράνες δεν λειτουργούν αποκλειστικά ως φράγματα, αλλά και ως αγωγοί για την επιλεκτική μεταφορά μορίων και ιόντων από και προς τις δύο πλευρές τους. Οι μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες. Κατά την **απλή διάχυση**, μικρά και μη πολικά μόρια κινούνται ελεύθερα, αμφίδρομα κατά μήκος της μεμβράνης, ακολουθώντας το νόμο της διάχυσης. Η **παθητική μεταφορά** γίνεται μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών, που διευκολύνουν τη μεταφορά συγκεκριμένων μορίων, χωρίς δαπάνη ενέργειας, σύμφωνα με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης. Ιόντα κινούνται καθοδικά μέσω εξειδικευμένων **διαύλων** (channels), που σχηματίζουν πόρους, προσβάσιμους από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, και ρυθμίζουν την είσοδο συγκεκριμένων ιόντων. Μεγαλύτερα μόρια διαπερνούν τη μεμβράνη με τη βοήθεια **μονο-μεταφορέων** (carriers). Οι μονομεταφορείς έχουν κινητική συμπεριφορά, ανάλογη με αυτήν των ενζύμων, καθώς διαθέτουν ενεργό κέντρο, το οποίο είναι προσβάσιμο μόνο από την μία πλευρά της μεμβράνης κάθε φορά, μέσω αλλαγών διαμόρφωσης.

Αντίθετα, με **ενεργό μεταφορά**, ουσίες σημαντικές για το κύτταρο, όπως πηγές άνθρακα ή αζώτου, δομικά συστατικά και άχρηστες ή τοξικές ουσίες μεταφέρονται μέσα ή έξω από το κύτταρο ενάντια στην διαβάθμιση συγκέντρωσής τους. Η ενέργεια για αυτές τις διαδικασίες δίνεται από το ATP, τη διαβάθμιση πρωτονίων (proton motive force, PMF) ή την περίσσεια ιόντων Na^+ εξωκυτταρικά, που διατηρείται από τις αντλίες καλίου/νατρίου. Η ενεργός μεταφορά διακρίνεται σε **πρωτογενή** και **δευτερογενή**, ανάλογα με την ενεργειακή πηγή που χρησιμοποιείται. Στην πρωτογενή ενεργό μεταφορά, η απαιτούμενη για τη μεταφορά ενέργεια προέρχεται από την υδρόλυση του ATP, τη ροή ηλεκτρονίων ή τη φωτεινή ακτινοβολία. Η ενέργεια αυτή καταναλώνεται για τη δημιουργία και τη διατήρηση βαθμίδωσης συγκέντρωσης ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Κατά τη δευτερογενή ενεργό μεταφορά, αυτές οι βαθμιδώσεις συγκέντρωσης ιόντων χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά μορίων μέσω των μεμβρανών. Η μεταφορά ιόντος μπορεί να γίνεται προς την ίδια κατεύθυνση σε σχέση με την μεταφερόμενη ουσία, οπότε οι πρωτεΐνες ονομάζονται **συμμεταφορείς**, ή προς την αντίθετη κατεύθυνση, οπότε ονομάζονται **αντιμεταφορείς**.

Υπάρχει ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας των πρωτεϊνών μεταφοράς (Transport Commission, TC system), που βασίζεται στον τρόπο μεταφοράς και το μηχανισμό ενεργειακής σύζευξης (energy-coupling), την φυλογενετική οικογένεια και ομάδα (cluster) και την εξειδίκευση (Saier *et al.*, 2000). Ως το 2015 πάνω από 10.000 πρωτεΐνες

είχαν ταξινομηθεί σε περισσότερες από 1.000 οικογένειες και 60 υπεροικογένειες μεταφορέων (Saier *et al.*, 2016). Αυτή ταξινόμηση και κατάταξη των επιστημονικών δεδομένων παρέχει πληροφορίες για τη λειτουργία, τη δομή, το μηχανισμό και την εξέλιξη πρωτεϊνών μεταφοράς, ώστε να αξιοποιηθούν και να διευκολύνουν τη μελέτη όλο και περισσότερων μεταφορέων. Άλλωστε, παρά τον κεντρικό ρόλο των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην επιβίωση και εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου, οι διαθέσιμες πληροφορίες είναι περιορισμένες και δεν αντικατοπτρίζουν τη βιολογική σημασία τους (Garib Singh and Schlesinger, 2019; César-Razquin A. *et al.*, 2015).

Οι μονομεταφορείς (carriers) έχουν εξελιχθεί, για να μεταφέρουν συγκεκριμένα μόρια μέσα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η δομή τους δεν σχηματίζει ανοικτό πόρο, αλλά μοιάζει περισσότερο με ένζυμο που εκλεκτικά ανοίγει και μεταφέρει εξειδικευμένες ουσίες, με αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του. Χρησιμοποιούν το μηχανισμό «εναλλασσόμενης πρόσβασης», που εξασφαλίζει ότι το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος είναι προσβάσιμο μόνο από τη μία πλευρά της μεμβράνης κάθε στιγμή, και απαιτούνται πολύπλοκες αλλαγές διαμόρφωσης σε ολόκληρη την πρωτεΐνη, για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος μεταφοράς, οι οποίες διαφέρουν για κάθε οικογένεια μεταφορέων. Η κινητική των μεταφορέων υπακούει στην θεωρία των Michaelis-Menten και χαρακτηρίζεται από την εξειδίκευση προς το υπόστρωμα, τη συγγένεια προς το υπόστρωμα (μια προσέγγιση της οποίας είναι η κινητική σταθερά, K_M) και την μέγιστη ταχύτητα μεταφοράς (το ανώτατο όριο του ρυθμού μεταφοράς ενός υποστρώματος που προσεγγίζεται ασυμπτωτικά σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος, V_{max}).

Αποτελούνται από αρκετά διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), συνήθως 10-14, κυρίως με μη πολικά, υδρόφοβα αμινοξέα, σε δομή α-έλικας και εκεί εντοπίζονται αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα ή δημιουργούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων, που σχετίζονται με τη μεταφορά του υποστρώματος. Τα διαμεμβρανικά τμήματα ενώνονται μεταξύ τους με σχετικά μικρά, υδρόφιλα τμήματα, τους βρόχους (loops) (Diallinas, 2014).

Η βιολογική σημασία των μεταφορέων είναι σαφής, καθώς σχετίζονται με πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, η ομοιόσταση, η απομάκρυνση τοξινών, η σηματοδότηση. Μια από τις σημαντικότερες ομάδες βιομορίων, που αναγνωρίζονται και μετακινούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, είναι οι νουκλεοτιδικές βάσεις, που χρησιμοποιούνται από μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας, αλλά και ανάλογα αυτών έχουν αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση, όπως η οξυπυρινόλη και η 5-φθοροουρακίλη. Για να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα και να αντιμετωπιστούν πιθανές παρενέργειες κατά τη φαρμακευτική χρήση τους, κατά το σχεδιασμό αντιβιοτικών, που βασίζονται σε ανάλογα σε ανάλογα νουκλεοσιδίων, λαμβάνονται υπόψιν δομικές διαφορές των εμπλεκόμενων ενζύμων

μεταξύ των βακτηρίων-στόχων και του ξενιστή, ώστε η δράση τους να περιοριστεί κατά των βακτηρίων, χωρίς να επηρεαστούν κύτταρα του ξενιστή (Sun R. and Wang, 2013).

Η αποτελεσματική δράση των αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων και νουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι η δυνατότητα της ουσίας να φτάσει στο στόχο, η σταθερότητα στον οργανισμό, η διαμεμβρανική μεταφορά, η ενδοκυτταρική ενεργοποίηση (Tsesmetzis *et al.*, 2018). Το Gemcitabine, για παράδειγμα, είναι ένα ανάλογο νουκλεοσιδίου (2',2'-difluorodeoxycytidine), που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος, των πνευμόνων, του μαστού και της ουροδόχου κύστης. Κάποια βακτήρια, που εντοπίζονται στους όγκους, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, μεταβολίζοντάς το προς μια ανενεργή μορφή του (2',2'-difluorodeoxyuridine) (Geller LT. *et al.*, 2017; Muggia F. *et al.*, 2012). Η αύξηση λοιπόν της αποτελεσματικότητας και ειδικότητας τέτοιων φαρμάκων με ταυτόχρονη μείωση ανεπιθύμητων παρενεργειών, απαιτεί καλύτερη κατανόηση της κατανομής, εξειδίκευσης και ρύθμισης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων.

1.1.1 Μεταφορείς Νουκλεοτιδικών Βάσεων

Οι πουρίνες και πυριμιδίνες είναι σημαντικές για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ενδοκυτταρική και διακυτταρική σηματοδότηση και μηχανισμούς άμυνας, ώστε η επιβίωση ενός κυττάρου εξαρτάται σημαντικά από την ικανότητά του να τις μεταφέρει ή/και να τις συνθέτει. Τα κύτταρα τις χρησιμοποιούν για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων, μέσω μονοπατιών περίσωσης (salvage pathways) ή ως πηγή αζώτου και άνθρακα μέσω καταβολισμού. Για το λόγο αυτό, όπως έχει αναφερθεί, ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ως αντιμεταβολίτες και αντικαρκινικά φάρμακα (Sun R. and Wang, 2013).

Όμως το υδρόφιλο προφίλ των πουρινικών και πυριμιδινικών βάσεων και νουκλεοσιδίων εμποδίζει τη διάχυσή τους μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Έτσι, η μεταφορά τους προς το εσωτερικό του κυττάρου εξαρτάται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-μεταφορείς (Frillingos, 2012; Yuasa *et al.*, 2020; Campagnaro and de Koning, 2020; Diallinas, 2014). Τέτοιοι μεταφορείς έχουν βρεθεί στα Αρχαία, τα Βακτήρια, τους Μύκητες, τα Φυτά, τα Πρωτόζωα, τα Μετάζωα και στον Άνθρωπο. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ταξινομούνται σε οικογένειες και όλοι τους είναι ενεργοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου (η λειτουργία τους εξαρτάται από διαβαθμίσεις ιόντων) (Gournas *et al.*, 2008).

Δύο οικογένειες μεταφέρουν νουκλεοσίδια και μέλη τους έχουν εντοπιστεί και σε θηλαστικά. Η οικογένεια **CNT** (Concentrative Nucleoside Transporter family, ή SLC28) περιλαμβάνει μεταφορείς

σε βακτήρια και μύκητες που λειτουργούν με συμμεταφορά H^+ , αλλά στα θηλαστικά, τα μέλη της χαρακτηρίζονται ως συμμεταφορείς Na^+ , ενώ έχουν διαφορές στην εξειδίκευση για νουκλεοσίδια και μεταφέρουν επίσης ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων (Ritzel *et al.*, 2001). Χωρίζεται φυλογενετικά σε τρεις ομάδες, όπου η μία περιλαμβάνει ομόλογους μεταφορείς του μεταφορέα NupC της *E. coli* και του *Bacillus subtilis*, η δεύτερη μεταφορείς της οικογένειας που ανήκουν σε θηλαστικά και η τρίτη βακτηριακά ομόλογα (Saier *et al.*, 1999). Η **ENT** (Equilibrative Nucleoside Transporter family ή SLC29), εντοπίζεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και μεταφέρει νουκλεοτιδικές βάσεις και νουκλεοσίδια με ευρεία εξειδίκευση και ενώ τα περισσότερα μέλη της χρησιμοποιούν διευκολυνόμενη διάχυση ως τρόπο μεταφοράς, κάποια έχουν χαρακτηριστεί ως συμμεταφορείς H^+ (Hyde *et al.*, 2001). Έχει 4 μέλη (ENT1–4), που εντοπίζονται στα περισσότερα θηλαστικά και στον άνθρωπο (Rehan *et al.*, 2019). Ανήκει στην υπεροικογένεια MFS (Major Facilitator Superfamily) και ακολουθεί αυτό το δομικό πρότυπο (N6-C6) (www.tcdb.org).

Από τις οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων, η οικογένεια **UPS/NBUT**, που περιλαμβάνει μεταφορείς ουρεϊδών, ουρακίλης, ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος, και η οικογένεια **PUP/POP**, που περιλαμβάνει μεταφορείς αδενίνης, υποξανθίνης, κυτοσίνης, κυτοκινίνης ή/και αλκαλοειδών, εντοπίζονται μόνο σε φυτά και ανήκουν στην υπεροικογένεια DMT (Drug/Metabolite Transporter Superfamily), με δομικό πρότυπο το μεταφορέα EmrE (Arkin *et al.*, 1996). Η οικογένεια Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων- Κατιόντος 1 (**NCS1**), μέλος της υπεροικογένειας APC (Amino Acid-Polyamine-Organocation), η οποία περιλαμβάνει μεταφορείς κυτοσίνης, υποξανθίνης, αδενίνης ή/και γουανίνης, μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης ή/και ουριδίνης και μεταφορείς αλλαντοΐνης/υδατοΐνης, περιορίζεται σε αρχαία, βακτήρια, μύκητες, φυτά και κάποια φωτοσυνθετικά πρώτιστα και ακολουθεί το δομικό πρότυπο του μεταφορέα υδαντοΐνης Mhp1 (Suzuki and Henderson, 2006). Τέλος, η οικογένεια Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων- Κατιόντος 2 (**NAT/NCS2**), που, επίσης, ανήκει στην υπεροικογένεια APC (Amino Acid-Polyamine-Organocation), περιλαμβάνει μεταφορείς ουρακίλης ή/και πουρινών, ξανθίνης, ουρικού οξέος και L-ασκορβικού οξέος (στα θηλαστικά). Είναι η ευρύτερα διαδεδομένη οικογένεια μεταφορέων πουρινών-πυριμιδινών μεταξύ των οργανισμών, με μέλη από όλες τις κύριες ταξινομικές ομάδες, εκτός από τα πρωτόζωα και το ζυμομύκητα *S.cerevisiae*. Δομικό πρότυπο για την οικογένεια αποτελούν ο μεταφορέας ουρακίλης UraA της *E. coli* K-12 (Yu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2011) και ο μεταφορέας ξανθίνης/ ουρικού του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*, UapA (Alguel *et al.*, 2016).

1.1.2 Η Οικογένεια Μεταφορέων NAT/NCS2

Η οικογένεια Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων- Κατιόντος 2 (Nucleobase Cation Symporter 2, NCS2), γνωστή και ως οικογένεια Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών Βάσεων-Ασκορβικού (Nucleobase-Ascorbate Transporter, NAT), είναι η μεγαλύτερη και ευρύτερη εξελικτικά οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων. Ανήκει στην κατηγορία μεταφορέων που χρησιμοποιούν δευτερογενούς τύπου ενεργό μεταφορά. Πρόκειται για μια συντηρημένη, αλλά με λειτουργική ποικιλομορφία, οικογένεια μεταφορέων και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μελών σχεδόν σε όλα τα είδη οργανισμών.

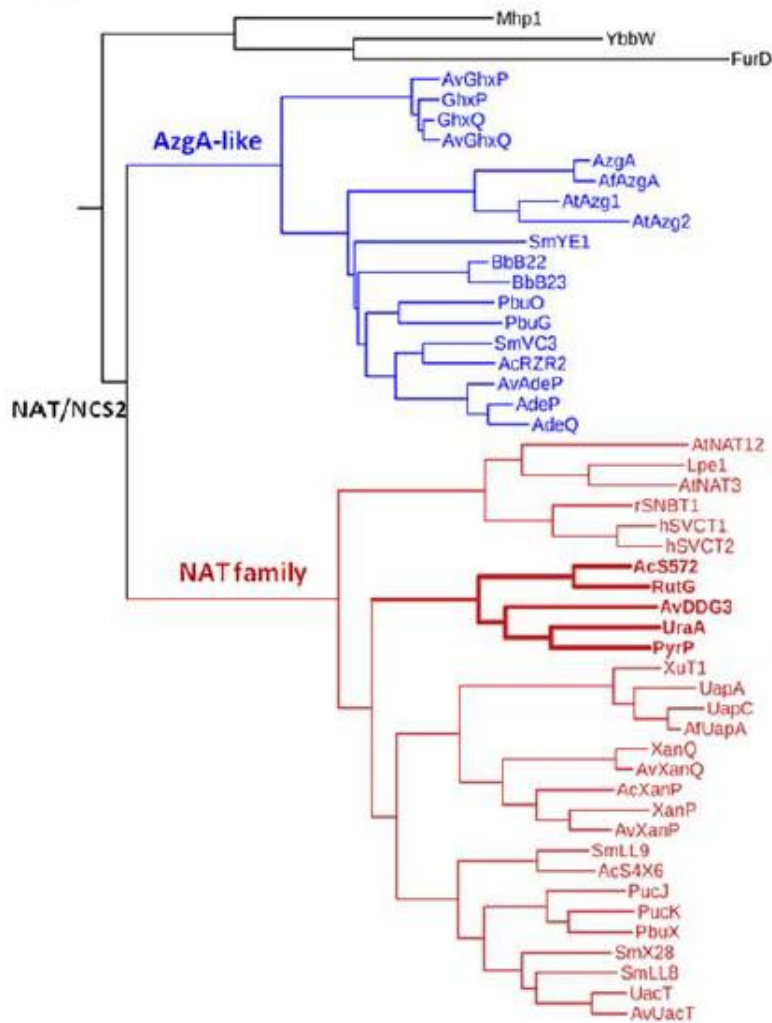
Μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά, ενώ διεξοδικότερα μελετημένα είναι ο μεταφορέας ξανθίνης, XanQ, της *Escherichia coli* (Karatzá and Frillingos, 2005) και ο μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος, UapA, του *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1995) Τέτοιες μελέτες έχουν αποκαλύψει σημαντικές ομοιότητες μεταξύ σημαντικών αμινοξέων των δύο μεταφορέων, ενισχύοντας την άποψη πως σχετικά λίγα κατάλοιπα, σε συντηρημένα μοτίβα (motifs) της οικογένειας, είναι κρίσιμα για τη λειτουργία ή για τις παρατηρούμενες διαφορές εξειδίκευσης (specificity).

Οι περισσότεροι χαρακτηρισμένοι μεταφορείς NAT/NCS2 των θηλαστικών, μέλη της οικογένειας SLC23, αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση L-ασκορβικό οξύ και είναι συμμεταφορείς Na⁺ (Sodium-dependent Vitamin C Transporters SVCT1 και SVCT2) (Yamamoto *et al.*, 2010; Frillingos, 2012). Ο rSNBT1 του επίμοου από τον *Ratus norvegicus* (Yamamoto *et al.*, 2010), ανήκει στην οικογένεια NAT/NCS2, και φαίνεται να μεταφέρει με ευρύτερη εξειδίκευση νουκλεοτιδικές βάσεις. Σε βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 μεταφέρουν πουρίνες ή πυριμιδίνες ως συμμεταφορείς H⁺. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 για την πρόσληψη ουρικού οξέος και/ή ξανθίνης ή ουρακίλης (Karatzá and Frillingos, 2005), ενώ οι μύκητες για την πρόσληψη ουρικού οξέος και ξανθίνης. Οι μεταφορείς NAT/NCS2 έχουν επίσης την ικανότητα να μεσολαβούν και στην πρόσληψη τοξικών αναλόγων πουρινών.

Γενετικές, μοριακές, βιοχημικές και λειτουργικές μελέτες έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό αμινοξέων, που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των NAT/NCS2 και τα περισσότερα βρίσκονται σε πολύ συντηρημένα μοτίβα των διαμεμβρανικών τμημάτων (TM) 1, 8 και 10. Αυτά συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαμεμβρανικών τμημάτων μεταξύ τους, αλλά και με το υπόστρωμα, ώστε να επιτυγχάνεται η μεταφορά του. Ειδικά η συντηρημένη αλληλουχία στο TM10, ³²³(A/G/S)(Q/E/P)NxxxT(R/K/G)³³³ (Georgopoulou *et al.*, 2010; Frillingos, 2012),

αναφέρεται ως μοτίβο-«υπογραφή» της οικογένειας NAT (NAT signature motif), συμμετέχει στην αναγνώριση και μεταφορά υποστρώματος και στον καθορισμό της εξειδίκευσης.

Οι μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2 χωρίζονται σε δύο ομάδες ορθόλογων πρωτεϊνών (Clusters of Orthologous Groups of proteins, COG, βλέπε *Εικόνα 1.1*). Η πρώτη ομάδα (υποοικογένεια) αναφέρεται ως **NAT/COG2233** και περιλαμβάνει περμεάσες σε βακτήρια και μύκητες, που αναγνωρίζουν πουρίνες με κετο-ομάδα στη θέση C2 (2-οχο-purines) (ξανθίνη και ουρικό οξύ), περμεάσες σε βακτήρια, που αναγνωρίζουν πυριμιδίνες (ουρακίλη και/ή θυμίνη), περμεάσες ουρακίλης/πουρινών ευρείας εξειδίκευσης σε φυτά και μετázωα και τους μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος SVCT1, SVCT2 των θηλαστικών. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει περμεάσες βακτηρίων, μυκήτων και φυτών, που αναγνωρίζουν πουρίνες χωρίς κετο-ομάδα στη θέση C2 (υποξανθίνη, γουανίνη αδενίνη) και αναφέρεται ως υποοικογένεια **AzgA-like/COG2252** (Karena *et al.*, 2015; Maria Botou *et al.*, 2018).



Εικόνα 1.1 Φυλογενετικό δέντρο γνωστών μελών της οικογένειας NAT/NCS2. Η υποοικογένεια NAT/COG2233 διαχωρίζεται καθαρά από την AzgA-like/COG2252, αλλά και οι δύο αυτοί κλάδοι ανήκουν στην ίδια ευρύτερη οικογένεια μεταφορέων, καθώς ακολουθούν το ίδιο δομικό πρότυπο (*structural fold*) (Botou *et al.*, 2018)

Η ομάδα NAT/COG2233 χωρίζεται σε τρεις μικρότερους κλάδους, από τους οποίους ο ένας περιλαμβάνει όλους τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος της οικογένειας (Frillingos, 2012). Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 1.1*, ο κλάδος αυτός χωρίζεται σε δύο επιμέρους ομάδες, από τις οποίες η πρώτη περιλαμβάνει βακτηριακά ομόλογα, που έχουν χαρακτηριστεί ως μεταφορείς ουρικού οξέος ή μεταφορείς ουρικού οξέος και ξανθίνης (ομάδα UacT/SmLL9), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης από βακτήρια και μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού οξέος από μύκητες (ομάδα XanQ/UraA). (Karena *et al.*, 2015) Μεγάλη σημασία έχει η παρατήρηση πως οι ομάδες NAT/COG2233 και AzgA-like/COG2252 έχουν στην αμινοξική αλληλουχία τους σημαντικά συντηρημένες περιοχές σε παρόμοιες θέσεις, με διαφορετικά όμως αμινοξέα, όπως έχει προκύψει από τη μελέτη των μεταφορέων της *E.coli* XanQ (Frillingos, 2012), GhxP και AdeP (Papakostas *et al.*, 2013). Άλλα μέλη της ομάδας NAT/COG2233 που έχουν μελετηθεί λειτουργικά και με μεταλλαξιγένεση είναι η περμεάση ξανθίνης XanQ της *E.coli* (Frillingos, 2012), η περμεάση ουρικού οξέος UacT της *E.coli* (Papakostas and Frillingos, 2012), η περμεάση ξανθίνης/ουρικού οξέος SmXUacT (ή SmLL9) από το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti* (Botou *et al.*, 2020), οι περμεάσες ουρακίλης UraA της *E. coli*, AvDDG3 της *Aeromonas veronii* και AcS572 του *Acinetobacter calcoaceticus*, καθώς και η περμεάση ουρακίλης/θυμίνης RutG της *E. coli* (Botou *et al.*, 2018), ο μεταφορέας ξανθίνης/ ουρικού οξέος UraA του *Aspergillus nidulans* (Diallinas, 2016) και άλλοι ομόλογοι συμμεταφορείς H⁺ βακτηρίων και μυκήτων.

Οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2, σύμφωνα με το δομικό πρότυπο της περμεάσης ουρακίλης UraA (Lu, 2011) (Yu, 2017), αποτελούνται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), χωρισμένα σε δύο ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες δομικές περιοχές (inverted repeats, 7+7) και σχηματίζουν στο χώρο τη δομική περιοχή πυρήνα (**core domain**, TMs 1-4 και 8-11), όπου βρίσκονται τα πιο σημαντικά αμινοξέα για το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος, και τη δομική περιοχή εισόδου (**gate domain**, TMs 5-7 και 12-14). Η περιοχή εισόδου συνεισφέρει στην εναλλασσόμενη πρόσβαση, επιτρέποντας αλλαγές διαμόρφωσης.

1.1.3 Δομικά Πρότυπα Μεταφορέων NAT/NCS2

Παρόλο που οι πρωτεΐνες της οικογένειας NAT/NCS2 εμφανίζονται σε όλα τα βιολογικά συστήματα και έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά, λίγες δομικές πληροφορίες ήταν διαθέσιμες μέχρι πρόσφατα. Αυτό συμφωνεί με την περιορισμένη διαθεσιμότητα πληροφοριών γενικότερα για τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, με κύριο εμπόδιο τη δυσκολία απομόνωσης και διατήρησης της δομής και βιολογικής λειτουργίας τους, εκτός της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Δομικά μοντέλα

πρωτεϊνών για τις οποίες είναι διαθέσιμες η κρυσταλλογραφικές δομές χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για την μελέτη μεταφορέων της ίδιας οικογένειας.

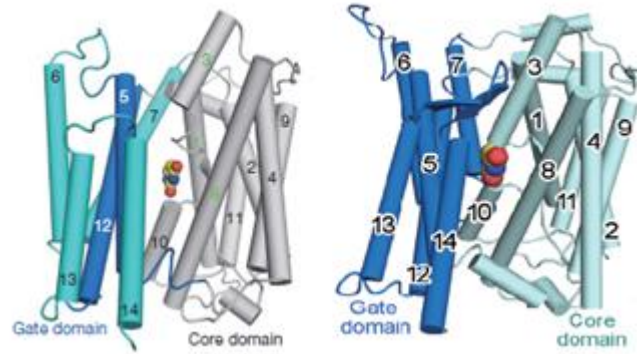
Η μελέτη των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 έχει βασιστεί στην επίλυση της δομής, με υψηλή ευκρίνεια, δύο ομολόγων: της περμεάσης ουρακίλης UraA του βακτηρίου *E.coli* (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) και της περμεάσης ξανθίνης/ ουρικού οξέος UarA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Alguel *et al.*, 2016).

1.1.3.1 Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA

Η πρώτη κρυσταλλική δομή που δημοσιεύθηκε το 2011 (Lu *et al.*, 2011) για το συμμεταφορέα ουρακίλης/H⁺, UraA (PDB ID 3QE7) της *E.coli* σε σύμπλοκο με την ουρακίλη (inward- open, διαμόρφωση ανοικτή προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος), ως μονομερές, με ευκρίνεια 2,8 Å, αποτέλεσε πρότυπο για τη μελέτη άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας NAT/NCS2, αποτελεί επιπλέον δομικό και μηχανιστικό πρότυπο για περισσότερες οικογένειες μεταφορέων. Το 2017 δημοσιεύθηκε η δομή του UraA (PDB ID 5XLS) (Yu *et al.*, 2017), στην κλειστή διαμόρφωση (occluded), σε σύμπλοκο με την ουρακίλη, με ευκρίνεια 2,5 Å, όπου περιγράφεται ως διμερές και θεωρείται ότι οι δύο καταστάσεις (μονομερές και διμερές) βρίσκονται σε ισορροπία. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του UraA έδειξε ότι εκτός από ουρακίλη αναγνωρίζει και την 5-φθοροουρακίλη με υψηλή συγγένεια, αλλά καμία άλλη νουκλεοτιδική βάση δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα (Botou *et al.*, 2018).

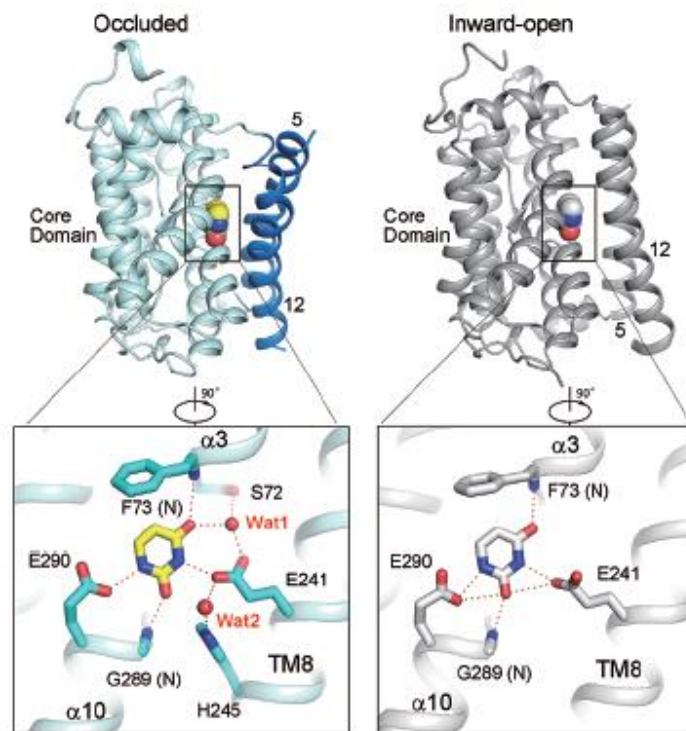
Σύμφωνα με τις πληροφορίες από την κρυσταλλική δομή του UraA σε ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα (inward- open), σε σύμπλοκο με ουρακίλη, ο μεταφορέας αποτελείται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), που οργανώνονται δομικά σε 2 ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες δομικές περιοχές (inverted repeats, TM1-TM7 και TM8- TM14), με άξονα συμμετρίας τη μεμβράνη. Η παρουσία ανεστραμμένων δομικών επαναλήψεων συναντάται συχνά σε πρωτεΐνες μεταφορείς και διαύλους. Ο UraA, όμως, εμφανίζει ένα διαφορετικό τρόπο αναδίπλωσης στη μεμβράνη σε σχέση με τις δομές γνωστών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών: 2 βραχείς αντιπαράλληλοι β- κλώνοι (β- strands) εντοπίζονται στο κέντρο της πρωτεΐνης, μεταξύ των TM3 και TM10, όπου βρίσκεται η ουρακίλη. (Lu, 2011)

Τα 14 διαμεμβρανικά τμήματα οργανώνονται σε 2 δομικές περιοχές: την περιοχή του πυρήνα (TM1-4 και 8- 11) και την περιοχή εισόδου (TM5-7 και TM12-14) (Εικόνα 1.2). Οι αντιπαράλληλοι β-κλώνοι και μη ελικοειδείς περιοχές (TM3 και TM10) που σχηματίζονται, πιθανόν με δεσμούς υδρογόνου, στο εσωτερικό της περιοχής του πυρήνα, προσφέρουν την επιφάνεια πρόσδεσης για το υπόστρωμα και περιορίζουν τις κινήσεις αυτών των διαμεμβρανικών τμημάτων (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.2 Δομή του μεταφορέα *UraA*. Η πρωτεΐνη οργανώνεται στη δομική περιοχή του πυρήνα (γκρι) και στη δομική περιοχή εισόδου (μπλε), που συνδέονται μέσω αλληλεπιδράσεων των πλευρικών ομάδων αμινοξέων- δεξιά σε ανοιχτή προς το εσωτερικό διαμόρφωση (Lu et al., 2011) και αριστερά σε κλειστή διαμόρφωση (Yu et al., 2017)

Η αναγνώριση του υποστρώματος βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε αμινοξέα στην περιοχή του πυρήνα, όπου αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals, που συνεισφέρουν σημαντικά στην πρόσδεση, ενώ ογκώδη αμινοξέα με αρωματικούς δακτυλίους, την απομονώνουν από το εξωτερικό περιβάλλον (Εικόνα 1.3). Άλλα αμινοξέα, στη διεπιφάνεια των περιοχών πυρήνα και εισόδου, υποβάλλονται σε κύκλους πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης και συνεισφέρουν στη δέσμευση και στις αλλαγές διαμόρφωσης, που απαιτούνται για τη μεταφορά του υποστρώματος, κυρίως μέσω της σχετικής κίνησης της περιοχής εισόδου, μετά την πρωτονίωση, γύρω από τη δεσμευμένη ουρακίλη (Lu et al., 2011).



Εικόνα 1.3 Πάνω: Η ουρακίλη (σφαίρες) συνδέεται στην περιοχή του πυρήνα, και στις 2 καταστάσεις (μόνο οι TM5 και 12 της περιοχής εισόδου φαίνονται). Κάτω: Σύγκριση δέσμευσης ουρακίλης στις δύο καταστάσεις με πολικές αλληλεπιδράσεις. Τα μόρια νερού φαίνονται σαν κόκκινες σφαίρες και οι δεσμοί υδρογόνου ως κόκκινες διακεκομμένες γραμμές. (Yu et al., 2017),

Η πιο πρόσφατη κρυσταλλική δομή του UraA σε κλειστή (occluded) διαμόρφωση, σε σύμπλοκο με ουρακίλη (Yu *et al.*, 2017), επιβεβαιώνει σχετική ακαμψία της περιοχής του πυρήνα σε σχέση με την πιο εύκαμπτη περιοχή εισόδου, όπου κυρίως τα TM5 και 12 φαίνεται να μετατοπίζονται στην κλειστή διαμόρφωση, σε σχέση με την inward open, και «ελέγχουν» την πρόσβαση στο κέντρο δέσμησης. Η διαφορετική χημική σύσταση των δύο περιοχών δίνει τη μοριακή βάση της διαφορετικής συμπεριφοράς τους: η περιοχή εισόδου είναι μια στιβάδα διαμεμβρανικών ελίκων, πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα, ενώ η περιοχή του πυρήνα αποτελείται από τρεις στιβάδες διαμεμβρανικών τμημάτων, όπου σχηματίζονται εκτεταμένοι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ πολικών αμινοξέων αλλά και με μόρια νερού. Εδώ, η ουρακίλη παραμένει στην εσοχή της περιοχής του πυρήνα, χωρίς να αλλάζει η αλληλεπίδραση με τα σημαντικά αμινοξέα αυτής. Η παρουσία μορίων νερού διευκολύνει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, αλλά επιπλέον ίσως προσφέρει και ένα μονοπάτι μετακίνησης πρωτονίων (Εικόνα 1.3) (Yu *et al.*, 2017).

Ο σχηματισμός ομοδιμερούς, που φάνηκε στην κρυσταλλική δομή της κλειστής διαμόρφωσης, μέσω αλληλεπίδρασης των περιοχών εισόδου κάθε μονομερούς, περιλαμβάνει πολλά υδρόφοβα αμινοξέα των TM5 και 12 του ενός μονομερούς και του TM13 του δεύτερου, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals και μόνο 1 δεσμό υδρογόνου. Οι δύο καταστάσεις βρίσκονται σε ισορροπία και πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ο διμερισμός πιθανώς να απαιτείται για την μεταφορά του υποστρώματος από τον UraA, ενώ δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν τα δύο μονομερή μεταφέρουν το υπόστρωμα ανεξάρτητα μεταξύ τους ή συνεργάζονται (Yu *et al.*, 2017).

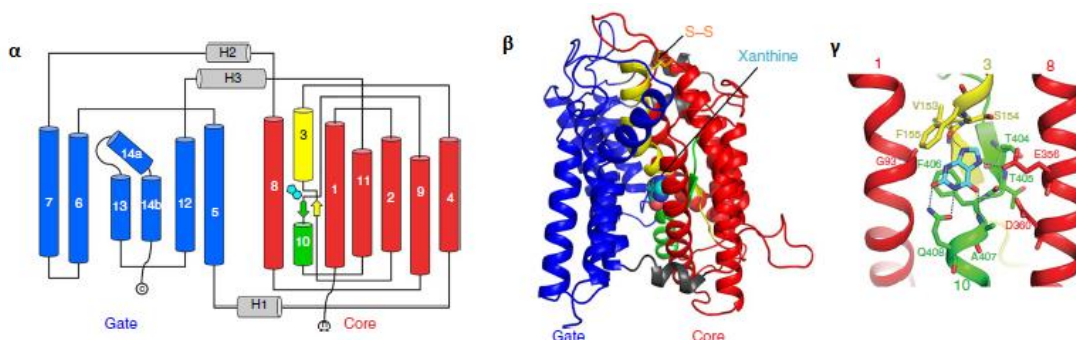
1.1.3.2 Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού οξέος UraA

Ο συμμεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος UraA (PDB ID 5I6C) είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας του μύκητα *Aspergillus nidulans*, ενώ δεν μεταφέρει υποξανθίνη ή αδενίνη. Η δομή του έχει περιγραφεί σε δέσμηση με την ξανθίνη, η οποία δεσμεύεται στην περιοχή του πυρήνα (core domain), σε ανοιχτή προς το εσωτερικό διαμόρφωση (inward-facing). Όπως αποδείχθηκε, μοιάζει με αυτή του μεταφορέα ουρακίλης UraA, που ανήκει στην ίδια οικογένεια, αποτελείται δηλαδή από 2 δομικές περιοχές, την περιοχή πυρήνα και την περιοχή εισόδου. Σχηματίζει διμερές, μέσω αλληλεπιδράσεων αποκλειστικά των περιοχών εισόδου των δύο μονομερών και ο διμερισμός πιστεύεται ότι είναι σημαντικός για την μετακίνησή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά συνεισφέρει και λειτουργικά, στην εξειδίκευση (Alguet *et al.*, 2016).

Από την κρυσταλλική δομή (3,5 Å), φαίνεται ότι ο UraA περιλαμβάνει 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), οργανωμένα σε δύο ανεστραμμένες δομικές επαναλήψεις (inverted repeats, 7+7) που σχηματίζουν στο χώρο την περιοχή πυρήνα (TMs 1-4 και 8-11), και την περιοχή εισόδου (TMs 5-7 και 12-14) (Εικόνα 1.4α), όπως και ο UraA, αλλά ο UraA έχει μακρύτερους βρόχους (loops). Ειδικά,

μάλιστα, στο βρόχο μεταξύ TM3 και TM4 στον UarA σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ 2 κυστεϊνών (Εικόνα 1.4β), σημαντικός για τη σωστή αναδίπλωση (folding) και στόχευση του μεταφορέα στη μεμβράνη (localization) (Alguet *et al.*, 2016), ενώ αυτό το ζεύγος κυστεϊνών δεν εντοπίζεται σε βακτηριακά ομόλογα (Botou *et al.*, 2020).

Από τη διαμόρφωση στην οποία έχει γίνει η κρυστάλλωση (inward-facing open), το διμερές φαίνεται να προκύπτει από την αλληλεπίδραση των διαμεμβρανικών τμημάτων 12, 13 και 14 (περιοχή εισόδου), και ειδικότερα του TM13. Λαμβάνοντας υπόψη τη δομή του διμερούς, φαίνεται ο ρόλος ενός αμινοξέος, Arg481 (TM13), στην εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, όπου αυτό βρίσκεται πολύ κοντά στο κέντρο δέσμευσης ξανθίνης του αντίθετου μονομερούς. Έτσι, από την κρυσταλλική δομή, σε συνδυασμό με ανάλυση μοριακής δυναμικής, προκύπτει ότι το αμινοτελικό άκρο του TM13 του ενός μονομερούς συνεισφέρει στη δημιουργία καναλιού μεταφοράς προς το εσωτερικό (inward-facing) του άλλου μονομερούς (Alguet *et al.*, 2016)



Εικόνα 1.4 α. Τοπολογικό διάγραμμα του UarA (α-έλικες ως κύλινδροι, β-κλώνοι ως βέλη). Το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος μεταξύ των TM3 και 10 φαίνεται από την παρουσία ξανθίνης (γαλάζιο). Η περιοχή εισόδου φαίνεται μπλε και η περιοχή πυρήνα κόκκινη, στην οποία διακρίνονται μη ελικοειδείς περιοχές (κίτρινο) και β-κλώνοι (πράσινο). β. Αναπαράσταση του μονομερούς του UarA, όπου η περιοχή εισόδου είναι μπλε, η περιοχή πυρήνα κόκκινη και οι έλικες που τις ενώνουν, γκρι. Η ξανθίνη (γαλάζιο) και ο δισουλφιδικός δεσμός (πορτοκαλί γραμμές) διακρίνονται, επίσης. γ. Μεγέθυνση του κέντρου δέσμευσης ξανθίνης, όπου διακρίνονται τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δέσμευση και οι πλευρικές και κύριες αλυσίδες των Glu356, Gln408 και Ala407 και οι κύριες των Phe155, Val153 είναι σε απόσταση της τάξεως δεσμού υδρογόνου από την ξανθίνη (Alguet *et al.*, 2016).

Από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής προτείνεται ένα μονοπάτι μεταφοράς από το κέντρο δέσμευσης προς το εσωτερικό του κυττάρου, που υποστηρίζεται περαιτέρω και από τα βιοχημικά δεδομένα (Alguet *et al.*, 2016). Αρχικά, η ξανθίνη συνδέεται ισχυρά με το Gln408, όσο μετακινείται προς την κοιλότητα του κέντρου δέσμευσης. Αλληλεπιδρά με αμινοξέα κοντά στο κέντρο δέσμευσης (Leu459, Val463 και Ser466), ενώ η Arg481, του απέναντι μονομερούς πλησιάζει την κεντρική κοιλότητα δέσμευσης. Έτσι δημιουργείται ένα αποτελεσματικό φράγμα εκλεκτικότητας στην πορεία προς το κυτταρόπλασμα, όπου η ξανθίνη σχηματίζει παροδικά δεσμούς υδρογόνου και π-δεσμούς με την Arg481, πριν περάσει στο εσωτερικό, μετά από αλλαγές διαμόρφωσης της πλευρικής αλυσίδας της Arg481 και αλληλεπίδραση Arg481-Gln408. Παράλληλα μετακινείται

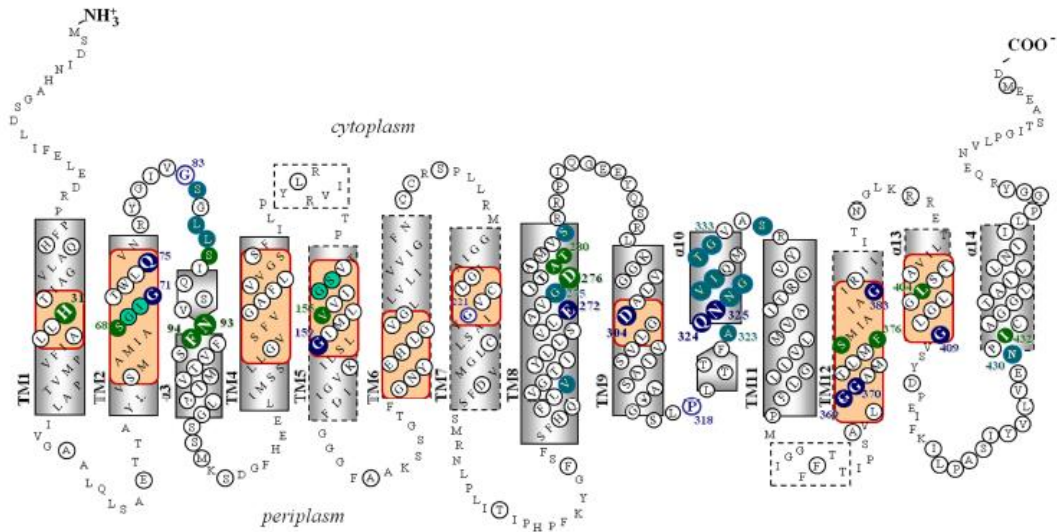
σταδιακά το TM10, ώστε ίσως διευκολύνει την έξοδο του προσδέτη. Ο μεταφορέας φαίνεται να ακολουθεί το μηχανισμό «ανεγκυστήρα» (elevator mechanism), όπου μετακινούνται τα TMs 1, 3, 8, 10 της περιοχής του πυρήνα και το υπόστρωμα μεταφέρεται από την μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη (Alguel *et al.*, 2016), ίσως όμως απαιτείται και η συνεισφορά άλλων αλλαγών διαμόρφωσης, από πληροφορίες που έδωσε η πιο πρόσφατη δομή του διμερούς UraA (Yu *et al.*, 2017).

1.1.4 Σχέσεις Δομής- Λειτουργίας του Μεταφορέα Ξανθίνης XanQ του Εντεροβακτηρίου *E.coli*

Οι σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT/NCS2 έχουν μελετηθεί εκτενώς στον μεταφορέα ξανθίνης της *E. coli*, XanQ και χρησιμοποιείται ως πρότυπο για αντίστοιχες μελέτες και σε άλλα μέλη της οικογένειας. Συγκριτικές δομικές αλλά και λειτουργικές μελέτες σε άλλα μέλη, όπως του UraA και UarA, που έχουν αναφερθεί παραπάνω, έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες και συμπεράσματα για τον τρόπο λειτουργίας των μεταφορέων και την εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα.

Ο μεταφορέας XanQ του βακτηρίου *E. coli* K-12 έχει χαρακτηριστεί ως ειδικός, υψηλής συγγένειας συμμεταφορέας ξανθίνης: H⁺ (Karatza and Frillingos, 2005). Ανήκει στην ομάδα NAT/COG2233 (C1_Xanthine-Uric Acid) (Chalioitis *et al.*, 2018), μαζί με τον ευκαρυωτικό μεταφορέα ξανθίνης/ ουρικού οξέος UarA του μύκητα *A. nidulans* (Alguel *et al.*, 2016), και ακολουθεί επίσης το δομικό πρότυπο του UraA (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017), με δομή 14 διαμεμβρανικών τμημάτων, με το αμινο-τελικό και καρβοξυ-τελικό άκρο προς το κυτταρόπλασμα (Karatza *et al.*, 2006). Στην αλληλουχία εντοπίζεται το χαρακτηριστικό μοτίβο- υπογραφή (NAT signature motif), 11 αμινοξέων, της οικογένειας NAT/NCS2, ³²³(A/G/S)(Q/E/P)NxxxT(R/K/G)³³³ (Georgoroulou *et al.*, 2010).

Η κατασκευή δομικού μοντέλου, στη βάση του οποίου έγινε προσομοίωση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-υποστρώματος, βασίζεται στα δομικά πρότυπα του UarA του μύκητα *A. nidulans* (Alguel *et al.*, 2016) και του UraA (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) (Εικόνα 1.5). Σύμφωνα με αυτό, κάθε μονομερές του XanQ αποτελείται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), οργανωμένα σε 2 δομικές περιοχές (domains), την περιοχή πυρήνα (TM1-4 και 8-11) και την περιοχή εισόδου (TM5-7 και 12-14), ενώ στο βρόχο μεταξύ TM3 και 4 δεν περιέχονται οι 2 κυστεΐνες (και το τμήμα 10 αμινοξέων ανάμεσά τους), που σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό, απαραίτητο για τη σωστή αναδίπλωση του UarA και πιθανώς άλλων ομολόγων σε μύκητες.



Εικόνα 1.5 Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα ξανθίνης ΧανQ. Τα αμινοξέα που έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση είναι κυκλωμένα και όσα έχουν χαρακτηριστεί αναντικατάστατα για τη λειτουργία του ΧανQ είναι αριθμημένα και σε μπλε χρώμα, αυτά που η αντικατάστασή τους οδηγεί σε μη έκφραση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη είναι κυκλωμένα με μπλε και όσα αμινοξέα σχετίζονται με τη λειτουργία, με πράσινους κύκλους (Karena et al., 2015).

Από τη δομική στοίχιση (3D alignment) του μοντέλου του ΧανQ σε σχέση με τις κρυσταλλικές δομές των UapA και UraA φαίνεται μεγάλη ομοιότητα στα σημαντικά αμινοξέα για τη δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος, την εξειδίκευση, την κινητική και τη λειτουργία της πρωτεΐνης και αυτά βρίσκονται κοντά στο υπόστρωμα (4,5Å), στα TMs 1, 3, 8, 10 (Frillingos, 2012; Botou *et al.*, 2020) Σε βακτηριακά ομόλογα η εξειδίκευση δεν επηρεάζεται σημαντικά από αμινοξέα στην περιοχή εισόδου, όπως έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει στον UapA (Karena *et al.*, 2015; Botou *et al.*, 2018). Με πειράματα μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) και στοχευμένης/σημειακής μεταλλαξιγένεσης (site-directed mutagenesis) στο μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας του μεταφορέα ΧανQ, έχουν αναδειχθεί σημαντικά κατάλοιπα, που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αναγνώριση, δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος από την περμεάση (Frillingos, 2012; Karena and Frillingos, 2011; Karena *et al.*, 2015). Πειράματα μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης έχουν γίνει σε αρκετές συνεχόμενες περιοχές του ΧανQ, όπως στην περιοχή του χαρακτηριστικού μοτίβου της οικογένειας (NAT signature motif), του TM10 και σε διαμεμβρανικά τμήματα και βρόχους γύρω από αυτό (Karatzas *et al.*, 2006; Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Με τον ίδιο τρόπο έχουν μελετηθεί το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα (TM14) (Papakostas *et al.*, 2008), το τρίτο διαμεμβρανικό τμήμα (Karena and Frillingos, 2011), συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας σε όλα τα διαμεμβρανικά τμήματα (Karena *et al.*, 2015) και πολικά αμινοξέα σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης (Karena and Frillingos, 2009). Με βάση τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών, έχουν εντοπιστεί σημαντικά αμινοξέα που θεωρούνται είτε αναντικατάστατα, είτε υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς το χαρακτήρα του αμινοξέος ή, ακόμη,

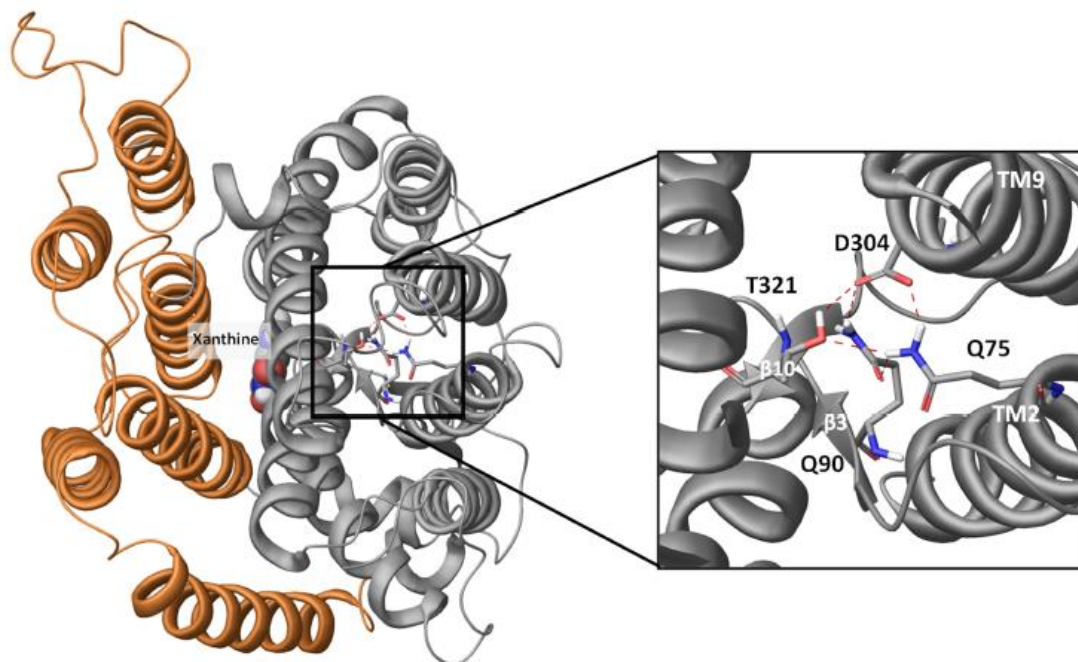
αλλαγή κάποιων από αυτά οδηγεί σε τροποποίηση του προφίλ εξειδίκευσης ή συγγένειας με το υπόστρωμα (Karena *et al.*, 2015).

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μελέτες, αξιοποιώντας και δεδομένα από τα δομικά πρότυπα, καταδεικνύουν σημαντικές θέσεις αμινοξέων στο κέντρο δέσμησης υποστρώματος και περιμετρικά αυτού, όπως τα αναντικατάστατα και πολύ συντηρημένα **Glu-272** (TM8) (Mermelekas *et al.*, 2010), **Gln-324** (TM10) και **Asn-325** (TM10) (Georgoroulou *et al.*, 2010). Το **χαρακτηριστικό μοτίβο NAT**, που αντιστοιχεί σε ένα βραχύ τμήμα α-έλικας στην κυτταροπλασματική πλευρά του TM10, αποδεικνύεται σημαντικό για τη δέσμηση υποστρώματος (Georgoroulou *et al.*, 2010; Karena and Frillingos, 2011), καθώς περιλαμβάνει την Gln-324 που συμμετέχει απευθείας στην πρόσδεση της ξανθίνης αλλά και άλλες σημαντικές θέσεις που διαμορφώνουν το κέντρο δέσμησης (Karena *et al.*, 2015; Botou *et al.*, 2020). Η **His-31** (TM1) είναι συντηρημένο, πολικό κατάλοιπο, που σχηματίζει έναν πολύ σημαντικό δεσμό υδρογόνου περιφερειακά του κέντρου δέσμησης, ώστε η ξανθίνη να μπορεί να προσδεθεί με υψηλή συγγένεια (Karena and Frillingos, 2009). Η **Phe-94** (TM3) και τα λιγότερο συντηρημένα **Asn-93** (TM3) και **Asp-276** (TM8) χαρακτηρίζονται ως σημαντικά για την εξειδίκευση (Karena and Frillingos, 2009). Για την Asn-93, μάλιστα, έχει βρεθεί ότι αντικατάστασή της από Ser ή Ala επιτρέπει στην περμεάση XanQ να αναγνωρίζει και ουρικό οξύ, που δεν αποτελεί φυσικό της υπόστρωμα, αλλά και να έχει ανιχνεύσιμη, αλλά μικρή ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος (Karena and Frillingos, 2011). Η μεταλλαξιγένεση της Thr-100 στην αντίστοιχη θέση του ομόλογου μεταφορέα ουρικού οξέος UacT έδειξε επίσης ότι η αντικατάστασή της σε Ala διευρύνει την εξειδίκευση επιτρέποντας μεταφορά τόσο ουρικού οξέος όσο και ξανθίνης με σημαντική ενεργότητα (Parakostas and Frillingos, 2012), ενώ η εισαγωγή Asn στην αντίστοιχη θέση του μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης SmXUacT, που έχει σερίνη στη θέση αυτή (Ser-93), φαίνεται να περιορίζει την εξειδίκευση μειώνοντας τη συγγένεια για το ουρικό οξύ (Botou *et al.*, 2020).

Αν και η πλειοψηφία των σημαντικών αμινοξέων βρίσκονται στην περιοχή του πυρήνα, που καθορίζει άμεσα τη συγγένεια δέσμησης και εξειδίκευση, η περιοχή εισόδου ίσως «φιλοξενεί» πιο δυναμικά δομικά στοιχεία, τα οποία θα συμμετέχουν στο μηχανισμό εναλλασσόμενης πρόσβασης, ελέγχοντας την πρόσβαση/ απελευθέρωση από το κέντρο δέσμησης (Frillingos, 2012). Ως τέτοια θεωρούνται **5 κατάλοιπα γλυκίνης** (Gly-159, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409) στην περιοχή εισόδου, που σχετίζονται με την ευκινησία της σε σχέση με την περιοχή του πυρήνα, που επιτρέπει την μεταφορά υποστρώματος κατά το μηχανισμό εναλλασσόμενης πρόσβασης (Karena *et al.*, 2015).

Βάσει υπολογισμών IFD (Induced Fit Docking), η ξανθίνη αλληλεπιδρά στο κέντρο δέσμησης με τις πλευρικές αλυσίδες των Gln-324 και Glu-272 και με τα Phe-94 και Ala-323, μέσω δεσμών

υδρογόνου. Η Phe-376 (TM12) εμφανίζει αλληλεπιδράσεις π-π με την ξανθίνη και την αμιδική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του Gln-324, ενώ περαιτέρω σταθεροποίηση οφείλεται σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των Thr-320 (α 10), Glu-272 (TM8), Ser-95 (α 3), Asn-93 (α 3) και την αλληλεπίδραση του Glu-272 με το υπόστρωμα (Εικόνα 1.6) (Karena *et al.*, 2015).



Εικόνα 1.6 Δίκτυο δεσμών υδρογόνου στο XanO, όπου συμμετέχουν τα Gln-75 και Asp-304. Στο τρισδιάστατο (3D) μοντέλο φαίνεται η δεσμευμένη ξανθίνη, μετά από IFD (Induced Fit Molecular Docking simulation). Η περιοχή του πυρήνα αντιστοιχεί στις γκρι περιοχές και η περιοχή εισόδου στις πορτοκαλί. Δεξιά στο πλαίσιο τονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου (κόκκινες διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ των Gln-75 (TM2), Asp-304 (TM9), Thr-321 (β 10) και Gln-90 (β 3) της περιοχής του πυρήνα. (Karena *et al.*, 2015)

Συνολικά, οι ανωτέρω μελέτες έχουν δώσει σημαντικές ενδείξεις για ορισμένες θέσεις αμινοξέων, αλλά δεν έχουν δώσει σαφή εικόνα για τα αμινοξέα που καθορίζουν τους διακριτούς τύπους εξειδίκευσης ή πώς εξελίχθηκαν αυτές οι εξειδικεύσεις. Για να προσεγγιστούν τα ερωτήματα αυτά, είναι αναγκαίο να εισαχθούν νέες μεθοδολογίες. Η ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών, όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα, αποτελεί μία εξελικτική στρατηγική που θεωρείται κατάλληλη για να αποκαλύψει τις καθοριστικές αλλαγές που οδήγησαν στις σημερινές διαφορές εξειδίκευσης.

1.2 Μέθοδος της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών

Ο συνδυασμός εξελικτικής βιολογίας και πειραματικής μοριακής βιολογίας παρέχει ισχυρά συμπεράσματα για τη δυναμική και τους μηχανισμούς της εξέλιξης. Αυτή η προσέγγιση συνδυάζει στατιστική ανάλυση αλληλουχιών γονιδίων με πειράματα που αποκαλύπτουν πώς οι προγονικές μεταλλάξεις έχουν μεταβάλλει βιοχημικές διαδικασίες και έχουν οδηγήσει στην εμφάνιση νέων φαινοτύπων (Dean *et al.*, 2007). Η εξέλιξη των φυλογενετικών και υπολογιστικών τεχνικών και των τεχνικών σύνθεσης DNA έχει επιτρέψει την πειραματική επαλήθευση υποθέσεων μοριακής εξέλιξης, μέσω ανασύστασης προγονικών γονιδίων στο εργαστήριο (Thornton, 2004). Μια φυλογενετική προσέγγιση μοριακής και λειτουργικής σύγκρισης ομόλογων πρωτεϊνών μπορεί να προβλέψει πρωτεϊνικές λειτουργίες και πώς αυτές εξελίχθηκαν.

Στην αλληλουχία μιας πρωτεΐνης, κάποιες περιοχές συμβάλλουν περισσότερο στη λειτουργία της, και συνδέονται με την αναδίπλωση, τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται. Είναι όμως πιθανό μια μετάλλαξη σε λιγότερο κρίσιμο σημείο για τη λειτουργία της ή μια σειρά μεταλλάξεων, να οδηγήσει σε τροποποίηση της, ώστε ακόμη και πρωτεΐνες με μεγάλο βαθμό ομοιότητας αλληλουχιών να μην έχουν απαραίτητα την ίδια λειτουργία (Garcia and Kasar, 2019). Η συγκριτική μελέτη σύγχρονων ομόλογων πρωτεϊνών μπορεί να δώσει πληροφορίες για τις διαφορές στη λειτουργία τους, που αποδίδονται στις διαφορές τους στην αλληλουχία και τη δομή. Αυτή η «οριζόντια» προσέγγιση δεν μπορεί πάντα να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα, γιατί όλες οι διαφορές μεταξύ αλληλουχιών των πρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητα υπεύθυνες για την αλλαγή εξειδίκευσης, ενώ δεν λαμβάνεται υπόψιν η επίσταση (Hochberg and Thornton, 2017).

Μια υποσχόμενη προσέγγιση της μελέτης της εξέλιξης πρωτεϊνών είναι τα πειράματα εξέλιξης *in vitro*, όπου επιτυγχάνεται η ανασύσταση της προγονικής αλληλουχίας μετά από φυλογενετική ανάλυση και αναπαράγεται μέσω γονιδιακής σύνθεσης και έκφρασης η προγονική πρωτεΐνη (Hochberg and Thornton, 2017). Σε αυτή την προγονική πρωτεΐνη, με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση, μελετώνται οι σχέσεις δομής-λειτουργίας, όπως έχουν προκύψει μέσα από την εξελικτική διαδικασία (ιστορικές αλλαγές, σημαντικές για τη σταδιακή εξέλιξη προς νέα εξειδίκευση/ φαινότυπο). Η φυλογένεση αφορά στην εξέλιξη μιας ομάδας οργανισμών γενετικά συνδεδεμένων, τη μελέτη των σχέσεων μεταξύ γονιδίων, πρωτεϊνών, οργάνων, που προέρχονται από κοινό πρόγονο. Κύριοι στόχοι είναι η εύρεση εξελικτικών δεσμών μεταξύ οργανισμών, με την ανάλυση αλλαγών σε διαφορετικούς οργανισμούς κατά την εξέλιξη.

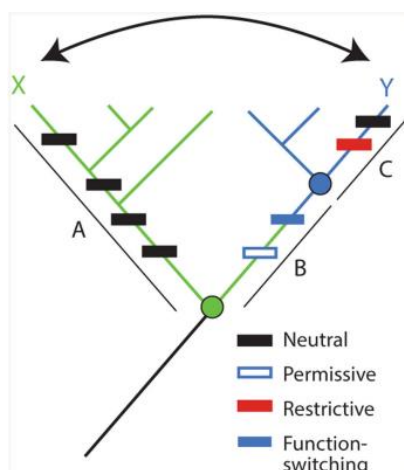
Έτσι, η ανασύσταση προγονικών πρωτεϊνών (Ancestral Protein Resurrection, APR) είναι μια στρατηγική που αποκαλύπτει τους μηχανισμούς και τη δυναμική πρωτεϊνών. Γενικότερα, πολλές

οικογένειες πρωτεϊνών έχουν μελετηθεί ακολουθώντας αυτή την προσέγγιση, όπως πολλά ένζυμα, οι οψίνες και οι υποδοχείς στεροειδών (Harms and Thornton, 2010), αλλά έχει χρησιμοποιηθεί ακόμη και στην κατανόηση του μηχανισμού της ισχυρής εκλεκτικότητας του αντικαρκινικού φαρμάκου Gleevec προς την κινάση τυροσίνης Abl (Hochberg and Thornton, 2017). Ενδεικτικό του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για το νέο πεδίο της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών είναι η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων για τις πρωτεΐνες που έχουν ανασυσταθεί (84 μέχρι σήμερα), ώστε τα δεδομένα να μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω στη μελέτη σύγχρονων πρωτεϊνών (Carletti *et al.*, 2020).

Η ανασύσταση προγονικών πρωτεϊνών επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασης στη λειτουργικότητα των αλλαγών στην αλληλουχία, με την εισαγωγή μεταλλάξεων στην προγονική αλληλουχία, προσομοιώνοντας εξελικτικές πορείες (Harms and Thornton, 2010). Οι προγονικές πρωτεΐνες πιστεύεται πως είχαν ευρύτερη εξειδίκευση από τις σύγχρονες και ότι περιορισμός της οφείλεται κυρίως σε διπλασιασμό γονιδίων, διαχωρισμό και βελτιστοποίηση των λειτουργιών του προγόνου. Πρόσφατες μελέτες ανασύστασης προγονικών γονιδίων, όμως, έδειξαν πως κάποιες σύγχρονες οικογένειες πρωτεϊνών εμφάνισαν νέες εξειδικευμένες λειτουργίες προς ένα υπόστρωμα, που δεν διέθετε η αντίστοιχη προγονική πρωτεΐνη, μέσω σχετικά απλών μηχανισμών και μικρού αριθμού μεταλλάξεων (Siddiq *et al.*, 2017).

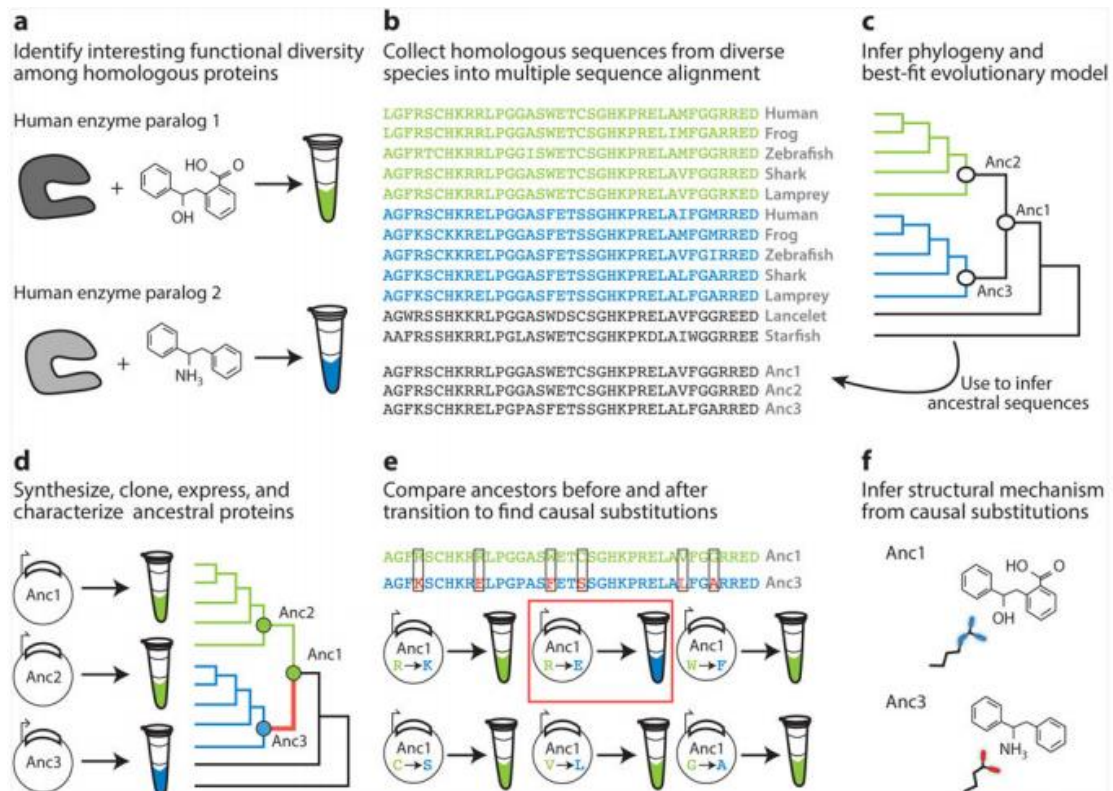
Η φυλογενετική προσέγγιση («κάθετη» ανάλυση, vertical approach) θα μπορούσε να εφαρμοστεί για τη μελέτη λειτουργικής ποικιλομορφίας ανάμεσα σε μέλη μιας οικογένειας πρωτεϊνών, ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα της «οριζόντιας» σύγκρισης πρωτεϊνών, καθώς η συσσώρευση μεταλλάξεων και η επίδραση επίστασης στις σημερινές αλληλουχίες, αυξάνουν την πολυπλοκότητα των συστημάτων προς μελέτη. Η επίσταση, δηλαδή η αλληλεξάρτηση ανάμεσα στις μεταλλάξεις, μπορεί να οδηγήσει μία αλλαγή να έχει διαφορετική επίδραση σε διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών.

Δύο τύποι επιστατικών μεταλλαγών είναι σημαντικοί κατά την εξελικτική πορεία: οι **επιτρεπτικές**, που εισάγουν αμινοξέα που είναι απαραίτητα, ώστε η πρωτεΐνη να σταθεροποιήσει τις επόμενες μεταλλάξεις- κλειδιά για την αλλαγή λειτουργικότητάς της, και οι **περιοριστικές**, που εισάγουν αλλαγές ασύμβατες με τις λειτουργίες άλλων μελών της οικογένειας πρωτεϊνών, όπως να οδηγούν σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις (Harms and Thornton, 2010). Η «κάθετη» ανάλυση εστιάζει σε μεταλλάξεις που συνέβησαν στο χρονικό διάστημα όπου συνέβη η διαφοροποίηση της λειτουργικότητας και αποφεύγεται έτσι η επίδραση της επίστασης από αλλαγές που έγιναν νωρίτερα (ή ταυτοποιούνται οι επιτρεπτικές/περιοριστικές επιστατικές μεταλλάξεις) (Harms and Thornton, 2010). Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ως πιο αποτελεσματική μέθοδος για την αποκάλυψη μεταλλάξεων, που ήταν καθοριστικές για την εξειδίκευση των πρωτεϊνών (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Οριζόντια και κάθετη ανάλυση σχέσεων αλληλουχίας- λειτουργίας. Για τον εντοπισμό διαφορών στην αλληλουχία, που οδηγούν σε διαφοροποίηση στη λειτουργία (πράσινο ή μπλε) μεταξύ των παράλογων πρωτεϊνών X και Y, με οριζόντια σύγκριση (βέλος) θα λαμβάνονταν υπόψιν όλες οι αλλαγές στα κλαδιά A, B, C (ορθογώνια). Επιτρεπτικές μεταλλάξεις μόνες τους δεν επηρεάζουν τη λειτουργία, αλλά αργότερα υποστηρίζουν αλλαγές τροποποίησής της. Έτσι, η απλή αλλαγή αμινοξέων, σημαντικών για τη λειτουργία, μεταξύ των πρωτεϊνών X και Y οδηγεί σε μη λειτουργική πρωτεΐνη, γιατί δεν υπάρχουν οι απαραίτητες επιτρεπτικές μεταλλάξεις. Περιοριστικές μεταλλάξεις στην προγονική πρωτεΐνη επίσης δεν επιτρέπουν τέτοιες αλλαγές στις σύγχρονες X και Y. Με την κάθετη ανάλυση καθορίζεται η λειτουργία της προγονικής πρωτεΐνης (κύκλος) και απομονώνει την τροποποίησή της προς τον κλάδο B, μειώνοντας τις αλλαγές που λαμβάνονται υπόψιν και περιορίζοντας την επίδραση της επίστασης. (Hochberg and Thornton, 2017)

Η ανασύσταση μιας προγονικής πρωτεΐνης ξεκινά με τη διατύπωση της κατάλληλης ερώτησης, που σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να απαντηθεί αν γνωρίζαμε τις λειτουργίες προγονικών γονιδίων, όπως το πώς μια οικογένεια γονιδίων διαφοροποιήθηκε. Η διαδικασία περιλαμβάνει κάποια βασικά βήματα (Εικόνα 1.8), αρχίζοντας από την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου, με στοίχιση των αλληλουχιών σύγχρονων πρωτεϊνών (συνήθως αμινοξικών αλληλουχιών, καθώς περιέχουν λιγότερο «θόρυβο» σε σχέση με το DNA). Προκύπτει, έτσι, η πιθανότερη αλληλουχία DNA της προγονικής πρωτεΐνης και συντίθεται de novo. Τέλος, το προγονικό γονίδιο κλωνοποιείται σε πλασμίδιο, που επιτρέπει έκφραση σε υψηλά επίπεδα και εισάγεται σε κύτταρα καλλιέργειας, όπου μελετάται, απομονώνεται και χαρακτηρίζεται λειτουργικά (Thornton, 2004).



Εικόνα 1.8 Στρατηγική Ανασύστασης Προγονικών Γονιδίων. Το διάγραμμα ροής απεικονίζει τα απαιτούμενα στάδια για την ανασύσταση και χαρακτηρισμό ενός προγονικού γονιδίου. Μια υποθετική οικογένεια ενζύμων χρησιμοποιείται ως παράδειγμα (a) Δύο παράλογα ένζυμα καταλύουν παρόμοιες αντιδράσεις με διαφορετικά υποστρώματα, προς διαφορετικά προϊόντα (χρώματα) (b) Οι αλληλουχίες των 2 ενζύμων (πράσινη και μπλε) στοιχίζονται (aligned) από πολλά είδη οργανισμών, περιλαμβάνοντας και outgroups (μαύρο). (c) Η στοιχισή δίνει το πιο πιθανό εξελικτικό μοντέλο και φυλογενετικό δέντρο. Οι κόμβοι (nodes) αντιστοιχούν στον τελευταίο κοινό πρόγονο κάθε παράλογης ομάδας (Anc2, Anc3) και σε διπλασιασμό γονιδίων πριν την εμφάνιση των 2 ομάδων. (d) Οι αλληλουχίες DNA των προγονικών πρωτεϊνών συντίθενται και κλωνοποιούνται και ακολουθεί έκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός τους, ώστε εντοπίζεται ο κλάδος, όπου εμφανίζεται μια νέα λειτουργία (κόκκινο). (e) Οι μεταλλάξεις, που οδήγησαν στη νέα λειτουργία (μπλε), πρέπει να εντοπίζονται μεταξύ των Anc1 και Anc3 (σημεία σε κουτάκι). Για τον εντοπισμό σημαντικών αντικαταστάσεων, αμινοξέα από την Anc3 (κόκκινα στην μπλε αλληλουχία) εισάγονται στην Anc1 και η πρωτεΐνη που προκύπτει ελέγχεται πειραματικά. Εδώ, η αντικατάσταση αργινίνης από γλουταμικό οξύ (κόκκινο κουτάκι) φέρει την αλλαγή στην εξειδίκευση. (f) Η δομή της προγονικής πρωτεΐνης από μοντέλα ομολογίας χρησιμοποιείται, για να δώσει πληροφορίες για τον τρόπο που η αντικατάσταση οδήγησε σε νέα λειτουργία. Εδώ, το γλουταμικό οξύ της Anc3 δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα στο νέο υπόστρωμα. (Hochberg and Thornton, 2017)

Από το 1990, πρωτεΐνες ευβακτηρίων (eubacteria), αρχαίων, ζώων, φυτών και μυκήτων έχουν μελετηθεί με ανασύσταση προγονικής αλληλουχίας και έπειτα με λειτουργική ανάλυση. Η μέθοδος δίνει πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο η φυσική επιλογή έχει διαμορφώσει τις σημερινές πρωτεΐνες και αναδεικνύει τις εξελικτικές διαδικασίες πίσω από τη σταθερότητα, την εξειδίκευση και τη δομή τους (Gumulya and Gillam, 2017). Ακόμη, συμβάλλει στην κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας των σύγχρονων πρωτεϊνών και εμπλουτίζει τις πληροφορίες για τις σχέσεις-δομής λειτουργίας, που έχουν προκύψει από άλλες μεθόδους. Εκτός από την κατανόηση του ρόλου των καθοριστικών μεταλλαγών, η «αναγέννηση» και μελέτη προγονικών αλληλουχιών έχει επιτρέψει να διερευνηθούν πολλές άλλες πτυχές της εξέλιξης των μακρομορίων και της

δυναμικής τους για ανάπτυξη νέων εξειδικεύσεων, οδηγώντας σε χρήσιμα συμπεράσματα για τη συνολική δυναμική της μοριακής εξέλιξης. Η στρατηγική αυτή έχει εφαρμοσθεί σε αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών, όπως κινάσες (Wilson *et al.*, 2015), αφυδρογονάσες (Thomson *et al.*, 2005), β-λακταμάσες (Risso *et al.*, 2013), ουρικάσες (Kratzer *et al.*, 2014) πρωτεϊνοσυνθετικούς παράγοντες (EF-Tu) (Gaucher *et al.*, 2003), φθορίζουσες πρωτεΐνες GFP-like (Field *et al.*, 2010), υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Ortlund *et al.*, 2007), GPCRs (Kuang *et al.*, 2006), αλλά δεν έχει εφαρμοσθεί έως σήμερα σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς και, ειδικότερα, σε περμεάσες, οι οποίες αποτελούν ένα δυναμικό ερευνητικό πεδίο για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και της μοριακής βάσης των διαφορών εξειδίκευσης.

Η αναγνώριση συγκεκριμένων θέσεων μεταλλαγών που σχετίζονται με την εξέλιξη της εξειδίκευσης των διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών θα συμβάλει στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο προσαρμόζεται το ενεργό κέντρο των σημαντικών αυτών πρωτεϊνών στην αναγνώριση και μεταφορά υποστρωμάτων. Με βάση τα στοιχεία αυτά θα μπορεί να προβλεφθεί πιο εμπειριστατωμένα το λειτουργικό προφίλ εξειδίκευσης νέων μεταφορέων πουρινών από παθογόνα βακτήρια και να αναλυθεί το δομικό πρότυπο των τοξικών αναλόγων που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν για επιλεκτική στόχευση τους.

1.3 Η σημασία της αναζήτησης μεταφορέων πουρινών στα βακτήρια- Το παθογόνο βακτήριο *Neisseria meningitidis*

Το ανθρώπινο μικροβίωμα αποτελείται από 10-100 τρισεκατομμύρια συμβιωτικά κύτταρα μικροοργανισμών, κυρίως βακτήρια, που συμβάλλουν στην εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Αυτοί οι μικροοργανισμοί πλέον θεωρούνται πολύ σημαντικοί για την υγεία του ανθρώπινου σώματος, καθώς η συμβίωση ωφελεί όχι μόνο αυτούς, αλλά και τον ξενιστή τους, σε πολλά επίπεδα. Η διαταραχή της ισορροπίας του ανθρώπινου μικροβιώματος έχει συνδεθεί με ασθένειες του πεπτικού και νευρικού συστήματος, του δέρματος, με παχυσαρκία, διαβήτη αλλά και καρκίνο. Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια καταγραφής και χαρακτηρισμού του ανθρώπινου μικροβιώματος και του συσχετισμού του με την εμφάνιση ασθενειών (The NIH Human Microbiome Project). Ο διαχωρισμός της ωφέλιμης μικροβιακής κοινότητας του ανθρώπινου οργανισμού από παθογόνους εισβολείς είναι απαραίτητος, ώστε αυτή να προστατευθεί από την χρήση αντιβιοτικών και να διατηρηθεί.

Σε ό,τι αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς, η θνησιμότητα από μολυσματικές ασθένειες έχει συνολικά μειωθεί, αλλά τα τελευταία χρόνια η μείωση αυτή συμβαίνει με αργό ρυθμό: από το 1990 (16 εκ. θάνατοι/έτος) ως το 2010 (15 εκ./έτος), το ποσοστό θανάτων μειώνεται κατά 1% ανά έτος. Σε αυτό συμβάλλουν η εμφάνιση της αντίστασης στα αντιβιοτικά και η έλλειψη νέων αντιμικροβιακών ουσιών (Dye, 2014).

Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο η έρευνα να στραφεί σε νέους στόχους για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Οι πρωτεΐνες μεταφοράς παίζουν ζωτικό ρόλο σε όλα τα κύτταρα και αυτό αποδεικνύεται από το ενδιαφέρον σε πολλές βιοϊατρικές και φαρμακολογικές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων είναι ιδανικός στόχος ερευνών για εξειδικευμένες αντιμικροβιακές θεραπείες. Η κατάταξή τους σε οικογένειες, που απαντώνται σε όλα τα είδη των οργανισμών (ανάμεσα σε αυτούς παθογόνα βακτήρια και πρωτόζωα) (Chalioitis *et al.*, 2018), τα σχετικά πρόσφατα κρυσταλλογραφικά δεδομένα και η κατανόηση των λειτουργικών-εξελικτικών τους μηχανισμών, προσφέρουν πληροφορίες που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή αντιμυκητιακών, αντιβακτηριακών και αντικαρκινικών φαρμάκων, ως αναστολείς των μεταφορέων ή ως ανάλογα των φυσιολογικών υποστρωμάτων τους, με τοξική δράση στα κύτταρα-στόχους, καθώς πολλοί μικροοργανισμοί βασίζονται σε αυτούς, ώστε να πάρουν από τον ξενιστή νουκλεοτιδικές βάσεις, απαραίτητες για την επιβίωσή τους.

Η μελέτη των μεταφορέων NAT/NCS2, που είναι η πιο διαδεδομένη οικογένεια ανάμεσα στα είδη οργανισμών, μέχρι σήμερα είναι σποραδική ενώ σε πολλά βιολογικά συστήματα, που

χρησιμοποιούνται και ως οργανισμοί μοντέλα, δεν έχουν μελετηθεί καθόλου ή έχουν χαρακτηριστεί μόνο μερικά ομόλογα. Για παράδειγμα η *E.coli* K-12, φέρει 10 ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2, που είναι μεταφορείς πουρινών ή πυριμιδινών. Οι **XanQ**, **XanP**, μεταφορείς ξανθίνης (Karatzas and Frillingos, 2005), **UraA**, μεταφορέας ουρακίλης (Andersen *et al.* 1995; Botou *et al.*, 2018), **RutG**, μεταφορέας ουρακίλης, θυμίνης και ξανθίνης (Botou *et al.*, 2018), **UacT**, μεταφορέας ουρικού οξέος (Papakostas and Frillingos, 2012), είναι μέλη της ομάδας NAT/COG2233. Οι **AdeP**, **AdeQ**, μεταφορείς αδενίνης (Papakostas *et al.*, 2013), **GhxP**, **GhxQ**, μεταφορείς υποξανθίνης/γουανίνης (Papakostas *et al.*, 2013), ανήκουν στην ομάδα AzgA-like/COG2252, ενώ ο **YbbY**, που έχει βρεθεί πρόσφατα ότι λειτουργεί ως μεταφορέας αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης, αλλά χαμηλής ενεργότητας (Botou and Frillingos, unpublished results), ταξινομείται στην NAT/COG2233 αλλά σε ξεχωριστό κλάδο από αυτούς που περιέχουν τα άλλα γνωστά ομόλογα (Chalioitis *et al.*, 2018). Ακόμη, όλα τα ομόλογα σε θηλαστικά που έχουν εντοπιστεί ανήκουν στην ομάδα NAT/GOG2233, και στον άνθρωπο είναι αποκλειστικά μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος (**hSVTC1**, **hSVTC2**). Γενικά, όμως, οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων δεν έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς στα βακτήρια του ανθρώπινου μικροβιώματος, αλλά ούτε σε παθογόνα είδη βακτηρίων.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, η ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας νέων ομολόγων, σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που έχουμε για ήδη γνωστά ομόλογα, θα οδηγήσουν στην κατανόηση δομικών και μοριακών χαρακτηριστικών, ώστε να εξηγηθούν οι πιθανές διαφορές εξειδίκευσης. Η κατανόηση του μηχανισμού και της εξέλιξης ως προς διαφορετικά υποστρώματα για την οικογένεια NAT/NCS2 παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Εξελικτικά, μεταφορείς της οικογένειας αυτής, παρόλο που έχουν πολύ διαφορετικά υποστρώματα, μοιράζονται πολύ συντηρημένα μοτίβα αλληλουχιών σε λειτουργικά σημαντικές θέσεις και παρουσιάζουν όμοια τοπολογία και προβλεπόμενη τρισδιάστατη δομή. Ακόμη, γνώση του μηχανισμού λειτουργίας των NAT/NCS2 σε μοριακό επίπεδο, θα έδινε σημαντικές πληροφορίες για τον καλύτερο σχεδιασμό φαρμάκων, όπως συζητήθηκε παραπάνω, καθώς τα ομόλογα στον άνθρωπο δεν αναγνωρίζουν αντίστοιχα υποστρώματα (Frillingos, 2012).

Το παθογόνο βακτήριο Neisseria meningitidis

Το γένος αρνητικών κατά Gram βακτηρίων **Neisseria**, ανήκει στα β-πρωτεοβακτήρια και περιλαμβάνει βακτήρια που αποικούν επιφάνειες βλενογόνων και προσβάλλουν πολλά είδη ζώων. Από αυτά, 11 είδη προσβάλλουν τον άνθρωπο, αλλά μόνο 2 είναι παθογόνα, τα *N.meningitidis* και *N.gonorrhoeae*. Ο μηνιγγιτιδόκοκκος (*N.meningitidis*) είναι αρνητικός κατά Gram, αερόβιος διπλόκοκκος και παρουσιάζει 13 ορο-ομάδες από τις οποίες οι A, B, C, Y και W-

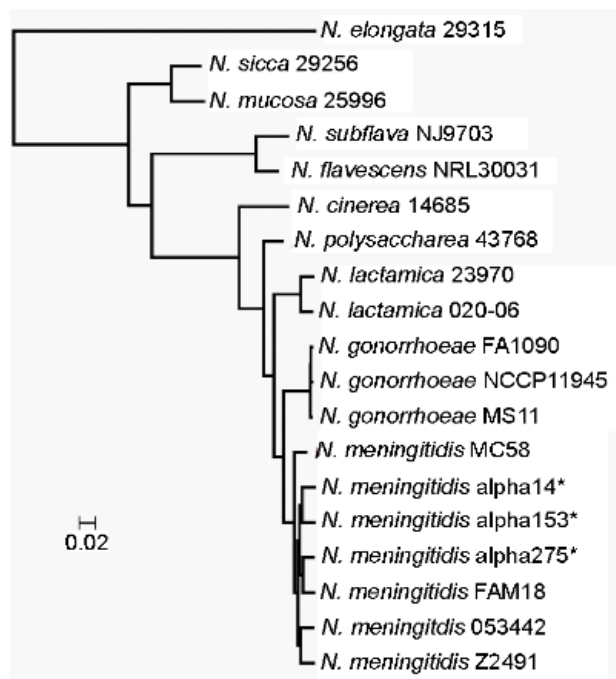
135 είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των περιπτώσεων νόσου. Οι ορο-ομάδες A, B, C προκαλούν το 90% των περιπτώσεων και η ορο-ομάδα C ευθύνεται για αιφνίδιες μορφές μηνιγγιτίδας.

Σε σχέση με το *N. gonorrhoeae*, η μόλυνση από *N. meningitidis* δεν είναι τόσο συχνή, αλλά έχει μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας (low prevalence, high mortality). Η έρευνα που έχει γίνει ως τώρα έχει επικεντρωθεί στα δύο παθογόνα και έχουν ανακαλυφθεί πολλοί παράγοντες μολυσματικότητας (virulence factors), σημαντικοί για την προσβολή ανθρώπων.

Κατά τη μόλυνση, και τα δύο παθογόνα χρησιμοποιούν διάφορους παράγοντες μολυσματικότητας, για να επιβιώσουν στον ξενιστή και να πολλαπλασιαστούν. Δημιουργούν «τριχίδια» (pili) και χρησιμοποιούν κάποιες adhesins και invasins, που ονομάζονται πρωτεΐνες «Opacity» (Opa), για να συνδεθούν στα κύτταρα του ξενιστή. Ένα άλλο μολυσματικό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητα να παίρνουν από τον ξενιστή τα απαραίτητα συστατικά, όπως μέταλλα (σίδηρος, ψευδάργυρος κλπ.), για τον πολλαπλασιασμό τους. Χρησιμοποιούν συστήματα στην εξωτερική τους μεμβράνη, ώστε να εκμεταλλευτούν θρεπτικά συστατικά του ξενιστή, όπως πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα (transferrin, calprotectin), απαραίτητα για την επιβίωσή και ανάπτυξή τους. Έτσι, η κατανόηση της δομής και λειτουργίας τους θα αποτελέσει σημαντικό βήμα προς την εύρεση προληπτικών και θεραπευτικών στρατηγικών. Αν και η έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών είναι σημαντική για να μολύνουν τον άνθρωπο, κανένας άλλος μεμβρανικός μεταφορέας δεν έχει μελετηθεί για τις επιπτώσεις στη μολυσματικότητα του βακτηρίου (Yadav *et al.*, 2020). Αντίσταση στα αντιβιοτικά δεν έχει προκύψει ακόμη για τη *N. meningitidis*, όπως έχει συμβεί για την *N. gonorrhoeae* και η πενικιλίνη-G χρησιμοποιείται ακόμη για τη θεραπεία (Nadel *et al.*, 2016).

Μέχρι τώρα η έρευνα για το μηνιγγιτιδόκοκκο έχει εστιαστεί κυρίως στους παράγοντες μολυσματικότητας, που αλληλεπιδρούν απευθείας με τον ξενιστή, αλλά δεν περιλαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά και το μεταβολισμό του βακτηρίου μέσα στον ξενιστή. Όμως η απόκτηση θρεπτικών συστατικών από τον ανθρώπινο ξενιστή φαίνεται να είναι σημαντική στη μόλυνση από μηνιγγιτιδόκοκκο, γιατί η παροχή κάποιων θρεπτικών συστατικών (όπως του σιδήρου, που έχει μελετηθεί εκτενώς) είναι περιορισμένη στο περιβάλλον των ανθρώπινων κυττάρων (Takahashi *et al.*, 2018).

Από το 2000, μεγάλος αριθμός γονιδιωμάτων *N. meningitidis*, σε σχέση με άλλα μέλη, έχει αλληλουχηθεί με NGS, και έχει προκύψει πληθώρα δεδομένων WGS (whole genome sequence). Το 2017 ήταν διαθέσιμα 13.985 WGS για το μηνιγγιτιδόκοκκο μόνο (Harrison *et al.*, 2017). Τα γονίδια, που απαντώνται σε όλα τα είδη *Neisseria* (core *Neisseria* genome) είναι 896, και κυρίως είναι «housekeeping» γονίδια (Marri *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.9 Φυλογενετικό δέντρο (*Maximum likelihood*), με βάση τις αλληλουχίες DNA των 896 «κύριων» γονιδίων *Neisseria* (*core Neisseria genes*) (Marri et al., 2010)

Γενικότερα, ο εντοπισμός και η μελέτη πρωτεϊνών, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν νέους στόχους φαρμάκων, είναι πολύ σημαντικός, για την αποτελεσματική καταπολέμηση μολύνσεων από παθογόνα βακτήρια. Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων θα μπορούσαν να πληρούν τις προϋποθέσεις και να χρησιμοποιηθούν ως τέτοιοι στόχοι, και πληροφορίες από την έρευνα σε αυτό το πεδίο να αξιοποιηθούν, για να επιταχύνουν τη διαδικασία σχεδιασμού νέων, αλλά και βελτιστοποίηση ήδη υπάρχοντων φαρμακευτικών ενώσεων. Μέχρι σήμερα, κανένα ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2 δεν έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά στο παθογόνο βακτήριο *Neisseria meningitidis*.

1.4 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκτενούς έρευνας που λαμβάνει χώρα στο εργαστήριο μας και η οποία περιλαμβάνει την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης των διαμεμβρανικών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporter/Nucleobase-Cation Symporter-2). Για την πληρέστερη κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων αμινοξέων στην εξέλιξη των εξειδικεύσεων εφαρμόστηκε, πρόσφατα, στο εργαστήριό μας η εξελικτική στρατηγική της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών. Συγκεκριμένα, έχει ανασυσταθεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά ο κοινός πρόγονος μεταφορέων ξανθίνης της οικογένειας NAT/NCS2 (AncXanQ). Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του απέδειξε ότι πρόκειται για μεταφορέα με διπλή εξειδίκευση: μεταφέρει έκτος από ξανθίνη, όπως οι σύγχρονοι μεταφορείς του κλάδου, και γουανίνη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η διαφορά στην εξειδίκευση αποδίδεται σε πέντε διαφορές που εντοπίστηκαν στην αλληλουχία του AncXanQ, σε πέντε θέσεις. Μία αυτές (η θέση 377) όπως υπέδειξε η μοριακή μοντελοποίηση βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο του μορίου. Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε περαιτέρω τη σημασία της θέσης 377 στη διεύρυνση της εξειδίκευσης για γουανίνη.

Πιο συγκεκριμένα στόχοι της παρούσας εργασίας είναι:

1. Η κλωνοποίηση ενός ομόλογου του υπό μελέτη κλάδου μεταφορέων ξανθίνης το οποίο φέρει Gly στη θέση 377 όπως η προγονική αλληλουχία AncXanQ (ομόλογο από το παθογόνο πρωτεοβακτήριο *Neisseria meningitidis*) και λειτουργική του ανάλυση, ώστε να εξεταστεί εάν η παρουσία της Gly-377 συνδέεται επίσης με ευρύτερη εξειδίκευση σε ένα παρεμφερές αλλά διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο.
2. Η κατασκευή και η λειτουργική ανάλυση μονών μεταλλαγμάτων στη θέση 377, στο υπόβαθρο τόσο της προγονικής αλληλουχίας όσο και σε αυτό των σύγχρονων μεταφορέων του κλάδου ξανθίνης, ώστε να εξεταστεί εάν η αντικατάσταση στη θέση 377 μπορεί να προκαλέσει από μόνη της αλλαγή στο φαινότυπο, από ευρείας εξειδίκευσης σε εξειδίκευση ξανθίνης

Κεφάλαιο 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Όργανα εργαστηρίου

Αναδευτήρας ενσωματωμένος σε θερμό θάλαμο Incubator Shaker Series Innova 42

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5415 D

Επιτραπέζιος αναδευτήρας (KS130basic IKA-Werke GMBH&CO.KG, Germany)

Επιτραπέζιος αναδευτήρας κυκλικής κίνησης (Rotator SB2, Stuart, England)

Λάμπα UV (UV transilluminator, Canon, Europe)

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

Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut)

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

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

Χρησιμοποιήθηκε **σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων** (Microliter Syringes), Hamilton (Bonaduz, Switzerland)

Συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Mini Trans-Blot transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Η μεταφορά έγινε σε **μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου** (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri)

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

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

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 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 (32.5 Ci/mmol)

[2,8-³H] αδενίνη (31.8 Ci/mmol)

[8-¹⁴C] ουρικό οξύ (58 Ci/mmol)

Φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών της εταιρείας Sigma Aldrich, (St. Louis, Missouri): αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, ουρικό οξύ, ουρακίλη, θυμίνη, κυτοσίνη, αλλοπουρινόλη, 2,6-διαμινοπουρίνη, 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, 1-μεθυλογουανίνη, 7-μεθυλογουανίνη, 8-αζαγουανίνη, 6-θειοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, οξυπουρινόλη, 5-φθοροουρακίλη

Αντισώματα (antibodies) και συζεύγματα για ανοσοαποτύπωση: σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP, Millipore, California, USA)

Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών (markers):

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

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

Ένζυμα (enzymes)

αλκαλική φωσφατάση alkaline phosphatase (Takara, BIO INC., Japan)

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

περιοριστικές ενδονουκλεάσες Apal, BamHI (Takara, BIO INC., Japan)

DNA λιγάση (συνδετάση) του βακτηριοφάγου T4 T4 DNA ligase (Takara, BIO INC., Japan)

Ολιγο-δεοξυριβονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και συντέθηκαν κατά παραγγελία από την εταιρεία Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany

Οργανικοί διαλύτες

Αιθανόλη (ethanol absolute, Sigma Aldrich)

Βενζόλιο (benzene, Panreac)

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide-DMSO, Fluka)

Μεθανόλη (methanol, Sigma Aldrich)

Πακέτα υλικών (kits)

πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel mimi-prep, (Duren, Germany)

πακέτο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL™ Western Blotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

πακέτο προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης BCA Protein assay reagent kit, Pierce, Thermo Scientific, USA

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

Χημικές ενώσεις

EDTA αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma Aldrich)

Αναγωγικά αντιδραστήρια

Διθειοθρεϊτόλη (DTT, Invitrogen)

Αναστολείς πρωτεασών

4-2-αμινοαιθυλο βενζολ-σουλφονικό φθόριο υδροχλωρίου (AEBSF, pefabloc SC, Fluka)

Τα υπόλοιπα χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαφόρων διαλυμάτων (Ενότητα 2.3) ήταν κατά κύριο λόγο της εταιρείας Sigma.

2.3 Διαλύματα

Διάλυμα Αποκλεισμού (Blocking buffer) 5% BSA σε TBST 1x

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διάλυμα [2,8-³H] Αδενίνης (2,5μM): [2,8-³H] αδενίνης (31.8 Ci/mmol) 10μL, 114μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα [8-³H] Γουανίνης (2,5μM): [8-³H] γουανίνης (21.2 Ci/mmol) 50μL, 44μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

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

Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

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

Μέθοδος: Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διάλυμα [8-³H] Ξανθίνης (25μM): [8-³H] ξανθίνη (22.8 Ci/mmol) 10 μL, 82.4 μL μη-ραδιενεργού ξανθίνης 25 μM, 7.67 μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα [5,6-³H] Ουρακίλης (2.5μM): [5,6-³H] ουρακίλη (32.5 Ci/mmol) 10 μL, 113μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα [8-¹⁴C] Ουρικού οξέος (100μM): [8-¹⁴C] ουρικό οξύ (58 mCi/mmol) 10μL, 237,5 μL ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

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

Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διάλυμα Τερματισμού: KPi 0.1M pH 5.5, LiCl 0,1M pH 5.5

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα Υγρού 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)

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα Υπερθεϊκού Αμμωνίου (APS): APS 10% (w/v)

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Διάλυμα [2,8-³H] Υποξανθίνης (25μM): [2,8-³H] υποξανθίνης (27.7 Ci/mmol) 20 μL, 51.2 μL μη-ραδιενεργού υποξανθίνης 25 μM 28.8μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

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)

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

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

Μέθοδος: Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

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

Μέθοδος: Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων και Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

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

Μέθοδος: Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα Kpi (pH 7.5): KH₂PO₄/ K₂HPO₄ 0.1M

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Ρυθμιστικό διάλυμα MK (pH 6.5) : MES 5 mM, KCl 0.15 M

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

2.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Για την κλωνοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν ως ξενιστές (hosts) τα εξής εργαστηριακά στελέχη της *Escherichia coli* K-12:

- ✓ *E. coli* **TOP10F'** (*F'*{*lacIq*, *Tn10*(*TetR*)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mrcBC*) *φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) 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*+ *O*+ *Z*- *Y*- (*A*), *prsl*, *met*-, *thr*-, *recA*, *hsdM*, *hsdR/F'*, *lacIq* *O*+ *ZD118* (*Y*+ *A*+)] (Teather *et al.*, 1978): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης των περμεασών XanQ, ApcXanQ, NmXanQ και μεταλλαγμάτων τους 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 (Karatza and Frillingos, 2005)
- ✓ *E. coli* **JW3692** (*F*-, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787(*::rrnB*-3), *λ*-, *rph*-1, Δ *dadeP*745::*kan*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR*514) **ΔadeP** (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* *ΔadeP* 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 *ghxPP*758::*kan hsdR*514) **ΔghxP** (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* *ΔghxP* 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 DuraA* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ουρακίλης και θυμίνης (Papakostas *et al.*, 2013; Botou *et al.*, 2018).

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/*xanQ*-BAD** (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του *XanQ* φυσικού τύπου (wt) (UniProt no. P67444), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD, Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*ghxP*-BAD** (Papakostas *et al.*, 2013): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*ghxP*) του μεταφορέα γουανίνης *GhxP* φυσικού τύπου (wt) (UniProt no. P0AF52), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*adeP*-BAD** (Papakostas *et al.*, 2013): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*adeP*) του μεταφορέα αδενίνης *AdeP* φυσικού τύπου (wt) (UniProt no. P0AF52), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*smUacT1*-BAD** (Botou *et al.*, 2020): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο του μεταφορέα *SmUacT1* φυσικού τύπου (wt) (UniProt no. Q92LL8) (Botou *et al.*, 2020), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*smAGHxT*-BAD** (Botou *et al.*, 2020): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο του *SmAGHxT* φυσικού τύπου (wt) (UniProt no. Q92VC3) (Botou *et al.*, 2020), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

- ✓ **pT7-5/*uraA*-BAD** (Botou *et al.*, 2018): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*uraA*) του μεταφορέα UraA φυσικού τύπου (wt) (UniProt no. P0AGM7), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*ancxanQ*-BAD** (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *ancxanQ* υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του lacZ(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*ancxanQ5M*-BAD** (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *ancxanQ* με αλλαγές στις θέσεις 27 (S27G), 116 (A116L), 191 (S191G), 312 (T312S), και 377 (G377S) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του lacZ(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- ✓ **pT7-5/*xanQ5M*-BAD** (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *xanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγές στις θέσεις 27 (G27S), 116 (L116A), 191 (G191S), 312 (S312T), και 377 (S377G) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του lacZ(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumonia* (Consler, 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

Τα **ανασυνδυασμένα πλασμίδια** που κατασκευάστηκαν είναι:

- ✓ **pT7-5/*nmxanQ*-BAD**: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*nmxanQ*) του NmXanQ φυσικού τύπου (wt) της *Neisseria meningitidis* (βλ. παρακάτω) (UniProt no. του ορθολόγου της *N. meningitidis* M0579: A0A0G4BZV9) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του lacZ(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

Το DNA της *Neisseria meningitidis* που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με PCR του γονιδίου *nmxanQ* (βλ. παρακάτω) απομονώθηκε από το στέλεχος *Neisseria meningitidis* 41615 isolate: W-

5295 (<https://pubmlst.org/databases/>) και μας παραχωρήθηκε ευγενώς από το Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Konstantinos Kesanopoulos, National Meningococcal Reference Laboratory, National School of Public Health, Athens, Greece).

2.5 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου που ανήκει στην οικογένεια NAT/NCS2 από το πρωτεοβακτήριο *N. meningitidis*, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενός σταδίου με υπόστρωμα το ολικό γονιδιωματικό DNA του οργανισμού, το οποίο παραχωρήθηκε από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίησή του 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 (Sahin-Tóth *et al.*, 1995) με αντικατάσταση του θραύσματος BamHI-ApaI στον φορέα. Οι εκκινητές περιλαμβάνονται στον Πίνακα 2.1.

Εκκινητής	Αλληλουχία
nm- sense (T_m 75°C)	5'-GCAGGCGGATCCATG/AGC/GGT/CAT/ATG/GGA/AAA/GGG-3'
nm- antisense (T_m 74,7°C)	5'GCTACAGGGCC/C ¹³⁸⁹ TG/TTC/CAA/GTG/GTC/GGT/ATC/AAA/CTT/G-3'

Πίνακας 2.1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του γονιδίου *nmknpQ*. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι αλληλουχίες που εισάγουν τις θέσεις περιορισμού BamHI (GGATCC) και ApaI (GGGCC) στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ 100 ng γονιδιωματικού DNA
- ✓ 10 μM από κάθε εκκινητή
- ✓ 1x ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει MgCl₂
- ✓ 10mM dNTPs mix (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
- ✓ 1 U/μl DNA πολυμεράση (Phusion ή Kapa HiFi DNA polymerase)
- ✓ Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη Millipore μέχρι τελικό όγκο 100μl

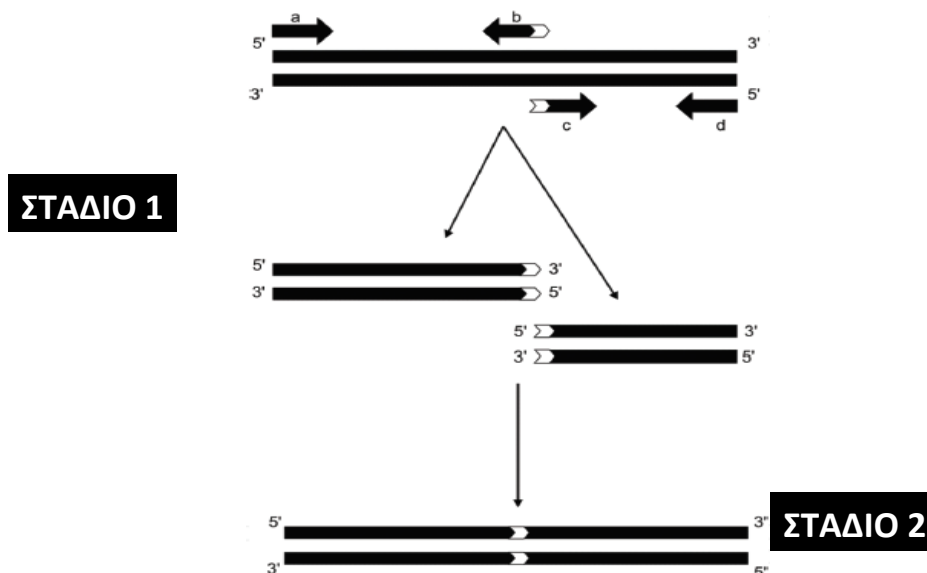
Η PCR εφαρμόστηκε σε 30 κύκλους αλλαγής θερμοκρασιών, ως εξής:

30 κύκλοι	{	98° C για 3 min	αποδιάταξη δίκλωνου DNA πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων επιμήκυνση DNA
		98° C για 1 min	
		68° C για 1 min	
		72° C για 2 min	
	72° C για 7 min		

2.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)

Η PCR δύο ή περισσότερων σταδίων (Ho, 1989) χρησιμοποιεί κατάλληλα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) για να παραγάγει (ενισχύσει) από τα γονίδια-στόχους συγκεκριμένα τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα μεταξύ τους άκρα (στάδιο 1). Τα προϊόντα του σταδίου 1 συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα (template) σε επόμενες αντιδράσεις PCR, όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και, με τη χρήση των ίδιων εξωτερικών ολιγονουκλεοτιδίων όπως στο στάδιο 1, επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από την συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία (contig) όλων των προηγούμενων τμημάτων (στάδιο 2) (Εικόνα 2.1). Εφόσον το πρωτόκολλο το απαιτεί, τα νέα αυτά προϊόντα, του σταδίου 2, μπορούν και πάλι να συνδυασθούν και να υποβληθούν σε νέα αντίδραση PCR (στάδιο 3), και ούτω καθ' εξής (Sahin-Tóth *et al.*, 2000).

Η ανωτέρω μεθοδολογία, που περιγράφεται συνήθως ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension) (Ho *et al.*, 1989) αποτελεί μέθοδο εκλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χμαιοτικών γονιδίων, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και δημιουργία γονιδίων χωρίς κωδικόνια Cys (C-less) με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση σε πολλές θέσεις (Frillingos *et al.*, 1994; Sahin-Tóth *et al.*, 2000; Karatza *et al.*, 2006). Στο τέλος κάθε σταδίου τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση αгарόζης (1%) και ανακτώνται με τη βοήθεια πακέτου υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).



Εικόνα 2.1 Σχηματικό διάγραμμα της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension). Το DNA και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια απεικονίζονται με γραμμές με κατεύθυνση από το 5' στο 3'. Η θέση εισαγωγής της μετάλλαξης σημειώνεται ως λευκό θέλος και οι εκκινητές σημειώνονται με γράμματα: *a* και *d* είναι οι «εξωτερικοί» εκκινητές, συμπληρωματικοί στα άκρα του DNA, ενώ *b* και *c* είναι οι «εσωτερικοί» εκκινητές, συμπληρωματικοί στην περιοχή εισαγωγής της μετάλλαξης. (Castorena *et al.*, 2016)

Αναλυτικά, σε κάθε στάδιο PCR στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

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

Η PCR εφαρμόστηκε σε 30 κύκλους αλλαγής θερμοκρασιών ως εξής:

1° στάδιο	98° C για 3 min	
30 κύκλοι {	98° C για 1 min	αποδιάταξη δίκλωνου DNA (denaturation)
	55-58° C* για 1 min	πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων (annealing)
	72° C για 1,5 min	επιμήκυνση DNA (extension)
	72° C για 7 min	
2° στάδιο	98° C για 5 min	
30 κύκλοι {	98° C για 1 min	αποδιάταξη δίκλωνου DNA (denaturation)
	55-58° C* για 2 min	πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων (annealing)
	72° C για 2 min	επιμήκυνση DNA (extension)
	72° C για 7 min	

*Υπήρχαν μικρές τροποποιήσεις στη θερμοκρασία πρόσδεσης (annealing) ή χρόνους πρόσδεσης ή επιμήκυνσης (elongation) ανάλογα με την περίπτωση (η θερμοκρασία εξαρτάται από το T_m των εκκινητών κάθε φορά).

Οι δύο εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις κατασκευές στις αντιδράσεις PCR είναι οι *lacZ(p/o)*- sense και *Yk(pT7-5)*- antisense, με τις εξής αλληλουχίες:

lacZ50-sense 5'- GCT/TCC/GGC/TCG/TAT/GTT/GTG/TGG -3'

Yk(pT7-5)- antisense 5'- GAC/GGG/GAG/TCA/GGC/AAC/TAT/GG -3'

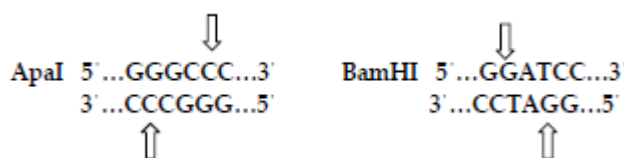
Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις κατασκευές για την εισαγωγή μετάλλαξης, στην αντίστοιχη αντίδραση PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Κατασκευή: Εκκινητής	Αλληλουχία
XanQ/S377G: xqS377G-sense	5'-G/ATG/TTT/ <u>GGT</u> /ATG/ATT/GCG/ATC/GCA/GG-3'
XanQ/S377G: xqS377G-antisense	5'-CC/TGC/GAT/CGC/AAT/CAT/ACC/AAA/CAT/C-3'
AncXanQ/G377S: anxqG377S-sense	5'-G/ATG/TTT/ <u>TCC</u> /ATG/ATT/GCG/ATC/GCA/G-3'
AncXanQ/G377S: anxqG377S-antisense	5'-C/TGC/GAT/CGC/AAT/CAT/GGA/AAA/CAT/C-3'
AncXanQ(4M): xqS377G-sense	5'-G/ATG/TTT/ <u>GGT</u> /ATG/ATT/GCG/ATC/GCA/GG-3'
AncXanQ(4M): xqS377G-antisense	5'-CC/TGC/GAT/CGC/AAT/CAT/ACC/AAA/CAT/C-3'
XanQ(4M): anxqG377S-sense	5'-G/ATG/TTT/ <u>TCC</u> /ATG/ATT/GCG/ATC/GCA/G-3'
XanQ(4M): anxqG377S-antisense	5'-C/TGC/GAT/CGC/AAT/CAT/GGA/AAA/CAT/C-3'
NmXanQ/G377S: -sense	5'-G/ATG/TTC/ <u>TCC</u> /TTG/ATT/GCG/ATT/GC-3'
NmXanQ/G377S: -antisense	5'GC/AAT/CGC/AAT/CAA/GGA/GAA/CAT/C-3'

Πίνακας 2.1 Εσωτερικοί εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή στοχευμένης μονής μετάλλαξης σε κάθε γονίδιο. Με υπογραμμισμένα γράμματα φαίνονται οι βάσεις που εισάγουν την αντίστοιχη αλλαγή κωδικονίου και με έντονα οι σιωπηλές αντικαταστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση παραμέτρων (μήκος, θερμοκρασία T_m , GC%) κατά το σχεδιασμό των εκκινητών.

2.5.3 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασύνδεση)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης ο πλασμιδιακός φορέας pT7-5/melY-BAD (από μεγάλης κλίμακας παρασκευάσμα – maxi prep, 1 μg/μL) και τα προς ένθεση (insertion) προϊόντα DNA, που είχαν προκύψει από τις αντιδράσεις PCR, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI*. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον φορέα pT7-5/melY-BAD όσο και στα PCR προϊόντα που δημιουργούνται, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 2.2* (Karatza *et al.*, 2006; Karatza and Frillingos, 2005).



Εικόνα 2.2. Αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων *ApaI* και *BamHI*.

Στο τέλος της περιοριστικής πέψης, έγινε αποφωσφορυλίωση με αλκαλική φωσφατάση στα ελεύθερα 5' άκρα του φορέα (vector) pT7-5/melY-BAD, προς αποφυγή ανεπιθύμητης ανασύνδεσης των ανοικτών άκρων του pT7-5 πριν την αντίδραση με το insert DNA. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης (1%), καθαρίστηκαν και ανασυνδέθηκαν με χρήση T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση της λιγάσης έγινε στους 16 °C, 15 ώρες, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL, με

ποσότητες ενθέματος (insert) και φορέα (vector) σε μοριακή αναλογία 3:1, όπως υπολογίστηκε για κάθε κατασκευή λαμβάνοντας υπόψιν την ένταση ακτινοβολίας UV, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης.

2.5.4 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού

Κύτταρα *E.coli* TOP10F', T184, *ΔadeP*, *ΔghxP* ή *ΔuraA* προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των (Inoue, 1990). Συγκεκριμένα, γίνεται πλήρης καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB (10 mL) στους 37 °C, για 16 ώρες. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα SOB μέχρι τελικού όγκου 250 mL. Η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους T184 γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL), ενώ των *ΔadeP*, *ΔghxP* ή *ΔuraA* παρουσία καναμυκίνης (0.05mg/ml). Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση στον επωαστήρα του θερμού 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 επαναιωρούνται σε 80 mL ψυχρού διαλύματος TB. Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας επαναλαμβάνεται με επαναίωση σε 20 mL ψυχρού TB που περιέχει 7% (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και τα κύτταρα χαρακτηρίζονται πλέον ως επιδεκτικά, έτοιμα για μετασχηματισμό με τα κατάλληλα πλασμίδια (plasmid DNA prep) ή προϊόντα της αντίδρασης ανασύνδεσης (ligation products). Τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

2.5.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA (από ligation product) προστίθεται σε επιδεκτικά 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). Οι αποικίες επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητά τους σε αμπικιλίνη 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 BamHI και ApaI, σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech). Ακολουθεί εκ νέου μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, *E. coli* T184, *ΔadeP*, *ΔghxP* ή *ΔuraA* με το (επιβεβαιωμένο, πλέον, και καθαρισμένο) πλασμιδιακό DNA και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει γλυκερόλη (30%), στους -80°C.

2.6 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων

Ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα (10 mL): Κύτταρα *E. coli* που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 3 mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL), αν πρόκειται για κύτταρα T184, ή αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) και καναμυκίνη αν πρόκειται για τα *ΔadeP*, *ΔghxP* ή *ΔuraA*, για 16 ώρες, στους 37 °C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται αραιώση σε LB (1 mL πλήρους καλλιέργειας +9 mL νέου LB), πάλι παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, και ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 2 ώρες (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης). Προστίθεται ισοπροπυλο-θειο-β, D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM, για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για δύο ώρες ακόμη. Ακολουθεί η φυγοκεντρική συγκομιδή των κυττάρων (6000 rpm, 10 min, 4 °C).

2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Κλάσματα μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη της *E. coli* παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο συνδυασμού οσμωτικού shock, επώασης με EDTA και λυσοζύμη και θραύσης με υπέρηχους (sonication) (Kaback *et al.*, 1974), (Frillingos *et al.*, 1994). Αναλυτικότερα, η διαδικασία που ακολουθήσαμε είναι:

Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων *E. coli* T184 από 10 mL καλλιέργειας, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (διάλυμα Tris-NaCl-EDTA) και φυγοκεντρώνται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης και φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται μία φορά, με αναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL διαλύματος επαναιώρησης, το οποίο περιέχει και αναστολέα πρωτεασών (Pefabloc) σε αναλογία 1ml διαλύματος επαναιώρησης : 1μl Pefabloc (τελική συγκέντρωση 0.2μM). Το εναιώρημα (1 mL) μεταφέρεται σε μικροσωληνάρια τύπου erpendorf, φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erpendorf (13000 rpm, 5 min) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος σακχαρόζης με Pefabloc (στην ίδια αναλογία).

Το κυτταρικό εναιώρημα αφήνεται να επωασθεί στο διάλυμα σακχαρόζης στους 4°C για 20 min. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται εκ νέου (13000 rpm, 1 min) και το κυτταρικό ίζημα (pellet) επαναιωρείται σε 0.8 mL ddH₂O και αφήνεται για 10 min στους 4°C. Στη συνέχεια, προστίθεται λυσοζύμη (τελική συγκέντρωση 0.125 mg/mL) και το εναιώρημα επώαζεται στους 4°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί αμέσως θραύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων (sonication) (2 ώσεις των 15 sec, σε ένταση 40%, στην συσκευή Branson 250-D) και, μετά από σύντομη φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των άθραυστων κυττάρων και υπολειμμάτων (cell debris) (13000 rpm, 10 min) και τα υπερκείμενα υποβάλλονται σε υπερφυγοκέντρηση (Optima Ultracentrifuge, 90000 rpm, 30 min, 4 °C). Το ίζημα των μεμβρανών διαλυτοποιείται σε 40 μL ddH₂O και τα δείγματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση και περαιτέρω αναλύσεις είτε αμέσως είτε μετά από 12-24 ώρες αφού ενδιάμεσα φυλαχθούν στους 4 °C.

2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.8.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA

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-κιχονινικό οξύ (bicinchoninic acid). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων υπολογίζονται από καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης.

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

Στα μεμβρανικά δείγματα προστίθεται κατάλληλος όγκος διπλά αποσταγμένου νερού μέχρι την ισορρόπηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων 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) (Laemmli *et al.*, 1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πήγμα διαχωρισμού 12% και πήγμα επιστοιίβαξης 5% (Πίνακας 5):

Πήγμα	30% Ακρυλαμίδιο (mL)	10% SDS (mL)	10% APS (mL)	TEMED (mL)	Διάλυμα (mL)	ddH ₂ O (mL)
Πήγμα Διαχωρισμού (100 mL)	42	1	1	0,05	Διαχωρισμού, 25	32
Πήγμα Επιστοιίβαξης (30 mL)	4,5	0,3	0,3	0,03	Επιστοιίβαξης, 7,5	17,4

Πίνακας 2.2 Πρωτόκολλο για την παρασκευή πήγματος διαχωρισμού και πήγματος επιστοιίβαξης [Μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)]

2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρονται με ηλεκτροφορητική μεταφορά (4 ώρες, 400 mA) σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (PVDF), σε διάλυμα μεταφοράς (διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιέχει 20% μεθανόλη). Στη συνέχεια, η μεμβράνη PVDF επωάζεται για τουλάχιστον 16 ώρες σε διάλυμα TBST που περιέχει 5% BSA (blocking buffer). Ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 σε TBST-5%BSA (blocking buffer) για μία ώρα και ακολουθούν οχτώ πλύσεις με TBST 1X πριν την ανίχνευση του σήματος. Για την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος (ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του σήματος) χρησιμοποιείται η αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL).

2.9 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)

2.9.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε βακτηριακά ομόλογα

Καλλιέργεια *E. coli* (T184, ΔadeP, ΔghxP ή ΔuraA) μετασηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύσσονται 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 (ΔadeP, ΔghxP, ΔuraA). 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 επαναιωρούνται σε 10 ml διαλύματος KPi, pH 7.5, 0.1M. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για μια ακόμη φορά στις ίδιες συνθήκες και επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος KPi.

Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών δειγμάτων ισορροπούνται με φωτομέτρηση στα 420 nm (δείγματος 10 μl κυτταρικού εναιωρήματος σε 990 μl ddH₂O,) και προστίθεται κατάλληλος όγκος KPi, pH 7.5 0.1M, έτσι ώστε η τελική τιμή οπτικής πυκνότητας να είναι OD_{420nm} 10, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL, σύμφωνα με αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς (Frillingos et al., 1994). Στην περίπτωση των κυττάρων ΔuraA, το KPi αντικαθίσταται από το ρυθμιστικό διάλυμα MK (5mM MES, pH 6.5 και 150mM KCl).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (21.8 Ci/mmol), [³H] γουανίνης (21.2 Ci/mmol) και [¹⁴C] ουρικού οξέος (58 mCi/mmol), [2,8-³H] αδενίνης (31.8 Ci/mmol), [2,8-³H]υποξανθίνης (27.7 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μM, 0.1 μM, 4μM, 0,1μM και 1μM αντίστοιχα) σε 50 μL κυττάρων, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 10 min) (Karatza P., 2005). Στις περιπτώσεις όπου το μελετώμενο υπόστρωμα είναι η [5,6-³H] ουρακίλη (32.5 Ci/mmol) 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 τελικής συγκέντρωσης 0.1μM για χρόνους 5sec-5min.

Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με 2 x 3 mL διαλύματος τερματισμού με ταχεία διήθηση υπό κενό (rapid filtration), σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων

1.2 μm (Frillingos, 1994). Μετά την επώαση, ο ηθμός μεταφέρεται σε κατάλληλα σωληνάρια σπινθηρισμού (scintillation vials) και επωάζεται με 2 x 4 mL υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid) για 24 ώρες. Τα δείγματα ^3H και ^{14}C μετρούνται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter).

2.9.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση

Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης πρόσληψης [^3H]ξανθίνης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης υποστρώματος μετρήθηκε στα 5 ως 15 sec και οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 2.5 μM έως 1mM (αρχική συγκέντρωση/ διάλυμα εργασίας) για τελική συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος από 0.1 μM έως 40 μM .

Στην περίπτωση της [^3H]γουανίνης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης υποστρώματος μετρήθηκε επίσης στα 5 ως 15 sec, ενώ οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.25 μM έως 1mM (αρχική συγκέντρωση) για τελική συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος από 0,1-40 μM .

Οι σταθερές V_{max} και K_M εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7 (<http://www.graphpad.com>).

2.9.3 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς παρουσία μη σημασμένων αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων

Στα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [^3H]ξανθίνης ή [^3H]γουανίνης από άλλες πουρίνες, πυριμιδίνες ή ανάλογα αυτών, πραγματοποιήθηκε προεπάση των κυττάρων με μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (0.1 μM έως 1 mM) και στην συνέχεια ακολούθησε δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς με [8- ^3H] ξανθίνη (1 μM) ή [^3H]γουανίνη (0.1 μM) αντίστοιχα. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 και 15 sec και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7. Οι τιμές K_i που δίνονται προκύπτουν από την εφαρμογή του τύπου των Cheng and Prusoff (1973) $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_M)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [8- ^3H] ξανθίνης ή [^3H]γουανίνης.

2.10 *In silico* αναλύσεις

Για τη στοίχιση των αλληλουχιών των ομόλογων μεταφορέων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

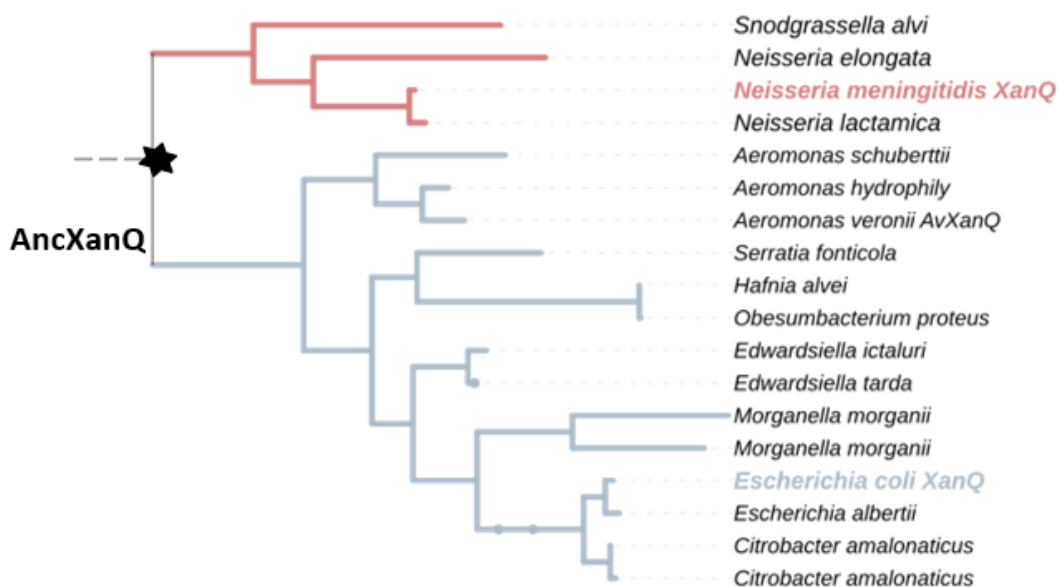
Η δομική μοντελοποίηση του NmXanQ, υλοποιήθηκε με το πρόγραμμα **SWISS-MODEL** (<http://swissmodel.expasy.org/>), ενώ η απεικόνιση και επεξεργασία των μοντέλων με το πρόγραμμα **PyMOL** (The PyMOL Molecular Graphics System, v1.5.0.4 Schrodinger, LLC) ή με το πρόγραμμα **VMD** version 1.9.2. (Humphrey *et al.*, 1996).

Οι σταθερές V_{max} και K_M των πειραμάτων κινητικής ανάλυσης υπολογίζονται από τα διαγράμματα Michaelis- Menten και οι τιμές IC_{50} των πειραμάτων ανταγωνισμού από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη, με τη χρήση του προγράμματος **Prism 7** (<http://www.graphpad.com>).

Κεφάλαιο 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εισαγωγή στο ερευνητικό πλαίσιο της παρούσας εργασίας

Στα πλαίσια της μελέτης του μεταφορέα XanQ, πρόσφατα εφαρμόστηκε η ανασύσταση της προγονικών αλληλουχιών (Ancestral Sequence Resurrection, ASR), για πρώτη φορά στη μελέτη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, με στόχο την πρόβλεψη εξειδίκευσης σύγχρονων πρωτεϊνών (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Μετά από φυλογενετική ανάλυση, προέκυψε η πιθανότερη αλληλουχία αμινοξέων του κοινού προγόνου της υπο-ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης της οικογένειας NAT/NCS2, που αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα XanQ της *E.coli*, ως AncXanQ (Εικόνα 3.1). Ακολούθησε σύνθεση του προγονικού γονιδίου και επιτυχής έκφρασή του σε κύτταρα *E.coli* και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός απέδειξε ότι ο προγονικός μεταφορέας AncXanQ έχει διπλή εξειδίκευση: μεταφέρει, εκτός από την **ξανθίνη**, και **γουανίνη** (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).



Εικόνα 3.1 Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 18 αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών από το φύλο των πρωτεοβακτηρίων που ανήκουν στον κλάδο ξανθίνης της οικογένειας NAT/NCS2 και συγκεκριμένα στον υποκλάδο που αντιπροσωπεύεται από μεταφορέα XanQ της *E.coli*. Ο υποκλάδος αυτός χωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποομάδες, η πρώτη περιλαμβάνει ομόλογα που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια (τάξη *Neisseriales*) στην οποία περιλαμβάνεται και το ομόλογο από τη *Neisseria meningitidis* που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία και η δεύτερη ομόλογα γ-πρωτεοβακτηρίων στην οποία περιλαμβάνεται και ο γνωστός μεταφορέας ξανθίνης XanQ της *E.coli*. Με αστεράκι σημειώνεται ο κοινός πρόγονος του κλάδου των μεταφορέων ξανθίνης, AncXanQ.

Οι δύο πρωτεΐνες, XanQ και AncXanQ, που έχουν 76% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων, δε διαφέρουν στα σημαντικά αμινοξέα στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης. Διαφορές που παρατηρούνται στην εξειδίκευση των δύο πρωτεϊνών αποδίδονται πιθανότατα στα διαφορετικά αμινοξέα που διαθέτουν εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων και εντοπίζονται σε πέντε θέσεις (27, 116, 191, 312, 377), εκτός του κέντρου δέσμευσης (Εικόνα 3.2). Οι μεταφορείς XanQ και

AncXanQ, επιπλέον έχουν υποστεί μεταλλαξιγένεση, ώστε να διερευνηθεί η μοριακή βάση των διαφορών εξειδίκευσης.

	27	116	191	312	377
AncXanQ/ 1-463	SAVTHLL	DA	LGLS	IATA	LMFGMIAI
<i>E. coli</i> XanQ/ 1-466	GAITHLL	EL	LGVG	IASA	LMFSMIAI

Εικόνα 3.2 Με τη μέθοδο της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών, προέκυψε η πιθανότερη αλληλουχία του κοινού προγόνου, AncXanQ, η οποία βρέθηκε να διαφέρει από το σημερινό *E. coli* XanQ. Πέντε αμινοξέα (φαίνονται με μπλε χρώμα), εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων, θεωρούνται τα πιο σημαντικά (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

Για να μελετηθεί η σημασία αυτών των θέσεων ως προς την ενεργότητα, αλλά και την εξειδίκευση του AncXanQ, κατασκευάστηκε και μελετήθηκε λειτουργικά ένα μετάλλαγμα, το οποίο περιλαμβάνει και τις πέντε αλλαγές (S27G / A116L / S191G / T312S / G377S), AncXanQ(5M). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη και μεταφέρει την ξανθίνη, χάνει όμως την ικανότητα μεταφοράς γουανίνης (μηδενικά επίπεδα ενεργότητας). Ακόμη, κατασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά ένα πενταπλό μετάλλαγμα στο υπόβαθρο του XanQ, με τις αντίστοιχες αλλαγές στις πέντε θέσεις (G27S/ L116A/ G191S/ S312T/ S377G), το XanQ(5M). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν πως το μετάλλαγμα XanQ(5M) εκφράζεται επίσης σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη και μεταφέρει την ξανθίνη, όχι όμως τη γουανίνη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην παρούσα εργασία, για περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των συγκεκριμένων πέντε αμινοξέων στην εξειδίκευση της περμεάσης σε ένα διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο, πραγματοποιήθηκε αρχικά ο λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός ομολόγου της οικογένειας NAT/NCS2 από το παθογόνο πρωτεοβακτήριο *Neisseria meningitidis*. Το συγκεκριμένο ομόλογο επιλέχθηκε ως σύγχρονος μεταφορέας, που στις πέντε σημαντικές θέσεις, όπως αυτές προέκυψαν από την ανασύσταση προγονικής αλληλουχίας, μοιράζεται κοινά αμινοξέα με τον προγονικό μεταφορέα, AncXanQ (S27, A116, S191, T312, G377) (Εικόνα 3.3).

	27	116	191	312	377
<i>N. meningitidis</i> XanQ/ 1-466	SAVTHLL	DA	LGLS	IATA	LMFGLIAI
AncXanQ/ 1-463	SAVTHLL	DA	LGLS	IATA	LMFGMIAI
<i>E. coli</i> XanQ/ 1-466	GAITHLL	EL	LGVG	IASA	LMFSMIAI

Εικόνα 3.3 Στοίχιση των αλληλουχιών των μεταφορέων *Neisseria meningitidis* XanQ, AncXanQ και *E. coli* XanQ. Φαίνονται οι ομοιότητες των AncXanQ και NmXanQ μεταξύ τους στα πέντε αμινοξέα στις θέσεις 27(TM1), 116(TM4), 191(TM6), 312(TM9), 377(TM12), αλλά και οι διαφορές των δύο πρωτεϊνών με το σύγχρονο *E. coli* XanQ σε αυτές τις θέσεις. Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

Τα αποτελέσματα του λειτουργικού χαρακτηρισμού του μεταφορέα NmXanQ παρουσιάζονται στην υποενότητα 3.1.

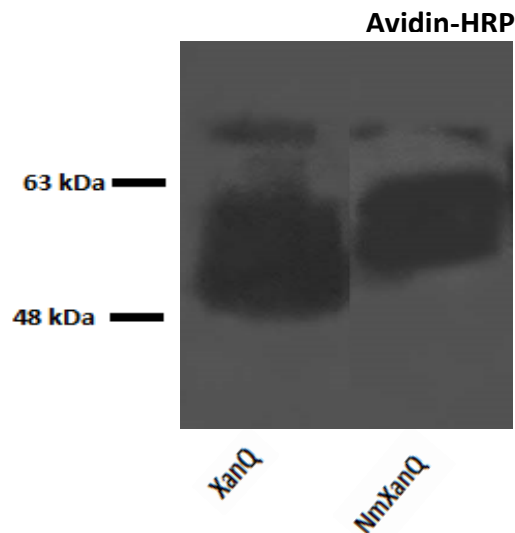
Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης, που έχουν αναφερθεί παραπάνω, αποφασίσαμε να επικεντρωθούμε και να μελετήσουμε περαιτέρω τη συμβολή της θέσης 377 στη διεύρυνση της εξειδίκευσης για τη γουανίνη. Η θέση αυτή, όπως υπέδειξε η μοριακή μοντελοποίηση, βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο του μορίου. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε το μονό μετάλλαγμα G377S στο υπόβαθρο του AncXapQ, του NmXapQ και του XapQ(5M), πολλαπλό μετάλλαγμα του XapQ, καθώς το μονό μετάλλαγμα S377G στο υπόβαθρο του XapQ και του AncXapQ(5M), πολλαπλό μετάλλαγμα του AncXapQ. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των μονών μεταλλαγμάτων περιγράφεται στην ενότητα 3.2.

3.1. Λειτουργικός χαρακτηρισμός του ομόλογου μεταφορέα ΧανQ του παθογόνου βακτηρίου *Neisseria meningitidis*

3.1.1. Ο NmΧανQ μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη

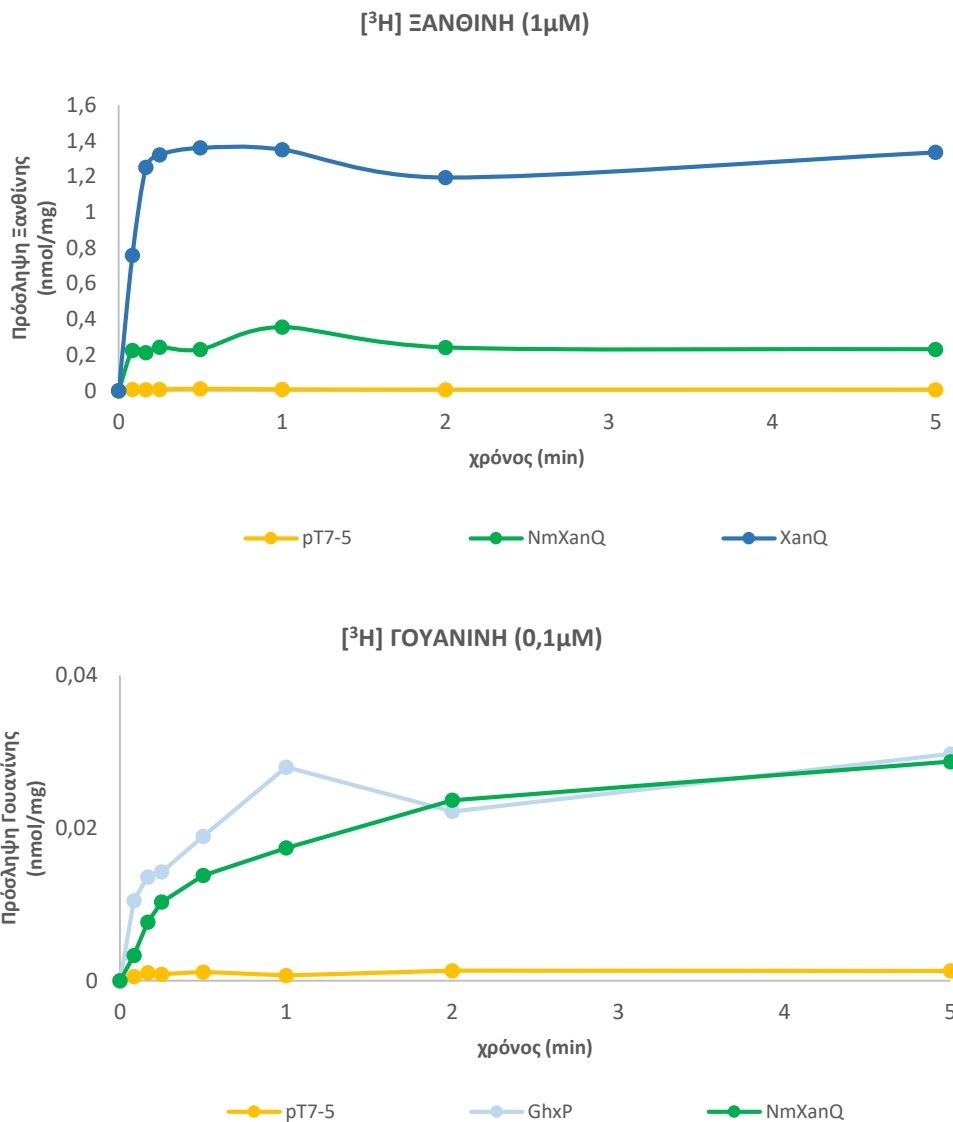
Αρχικά, το ομόλογο γονίδιο *N. meningitidis* (*nmchanQ*) απομονώθηκε από το γονιδίωμα του βακτηρίου της *Neisseria meningitidis* με PCR. Κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pT7-5, που φέρει και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης BAD (Biotin Acceptor Domain), που επιτρέπει αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP (Karatza and Frillingos, 2005) και στη συνέχεια εκφράστηκε ετερόλογα στο σύστημα της *E. coli* K-12.

Ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του NmΧανQ στη μεμβράνη των κυττάρων με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ανιχνεύθηκε σε υψηλά ποσοστά στη μεμβράνη (Εικόνα 3.4).



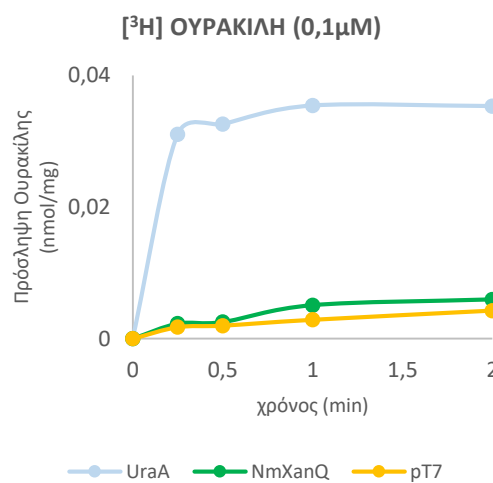
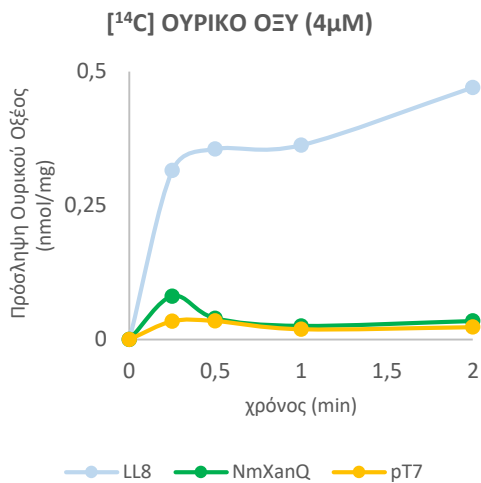
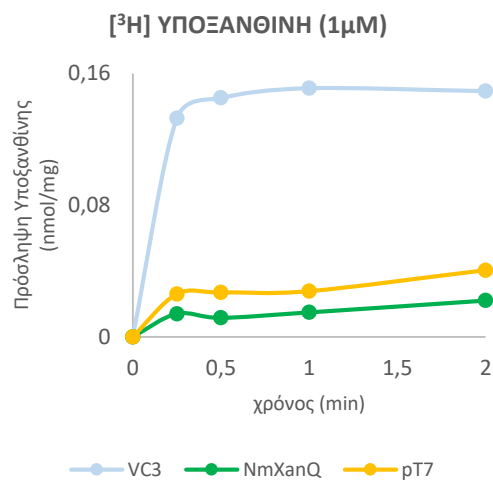
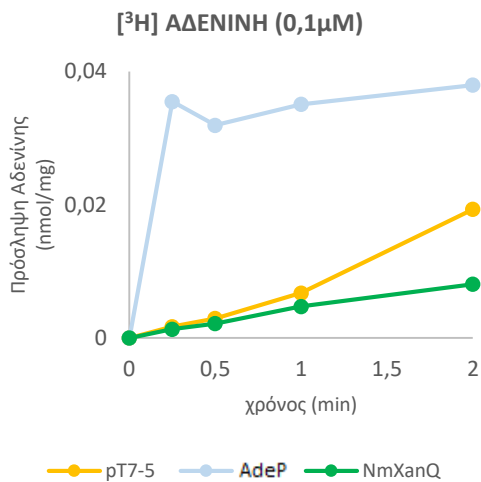
Εικόνα 3.4 Έκφραση του NmΧανQ. Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν το γονίδιο από πλασμίδια pT7-5/*nmchanQ*, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (*avidin-HRP*), σε αραιώση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Ακολούθησαν πειράματα ενεργού μεταφοράς διάφορων υποστρωμάτων, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* (T184 για ξανθίνη και ουρικό οξύ, *DghxP* για γουανίνη, *DadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη και *DuraA* για ουρακίλη). Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι ο μεταφορέας NmΧανQ μεταφέρει **ξανθίνη**, αλλά και **γουανίνη**, όπως ο προγονικός *AncΧανQ*, σε αντίθεση με το σύγχρονο μεταφορέα ΧανQ της *E.coli*, που είναι ειδικός για ξανθίνη (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης [³H] ξανθίνης (1μΜ) και [³H] γουανίνης (0,1μΜ), για τον μεταφορέα NmXanQ της οικογένειας NAT/NCS2. Η αλληλουχία απομονώθηκε από το γονιδίωμα και εισάχθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (T184 και ΔghxP), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή lacZ p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, XanQ και GhxP, αντίστοιχα.

Ακόμη, δε βρέθηκε να μεταφέρει αδενίνη, ουρικό οξύ, ουρακίλη και υποξανθίνη (Εικόνα 3.6), τα οποία επίσης δεν μεταφέρονται από τον XanQ (Karēna *et al.*, 2015) , ούτε από τον AncXanQ (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).



Εικόνα 3.6 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιοενεργά σημασμένης [³H] αδενίνης (0,1μΜ), [³H] υποξανθίνης (1μΜ), [¹⁴C] ουρικού οξέος (4μΜ) και [³H] ουρακίλης (0,1μΜ), για το NmXanQ. Η αλληλουχία απομονώθηκε από το γονιδίωμα και εισάχθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (*ΔadeP* για αδενίνη(0,1μΜ) και υποξανθίνη (1μΜ), T184 για ουρικό οξύ (4μΜ), και *DuraA* για ουρακίλη(0,1μΜ)), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* *p/o* και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς του αντίστοιχου ραδιοενεργά σημασμένου υποστρώματος. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας αδενίνης (*AdeP*), υποξανθίνης (*VC3*), ουρικού οξέος (*LL8*) και ουρακίλης (*UraA*).

3.1.2 Η ξανθίνη μεταφέρεται λιγότερο αποτελεσματικά από το NmXanQ σε σχέση με τον XanQ

Για το μεταφορέα NmXanQ έγινε κινητική ανάλυση μεταφοράς ξανθίνης και γουανίνης, των δύο υποστρωμάτων που μπορεί να μεταφέρει (Πίνακας 3.1). Αυτή έδειξε ότι ο NmXanQ είναι μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας, με K_m $11,8 \pm 3,5$ μ M. Η τιμή αυτή δε διαφέρει σημαντικά από του σύγχρονου μεταφορέα ξανθίνης, XanQ, αλλά και του προγονικού, ApcXanQ, ώστε η συγγένεια υποστρώματος δε φάνηκε να μειώνεται. Παρατηρήθηκε, όμως σημαντική

ελάττωση της τιμής της V_{max} σε σχέση με τον XanQ, ενώ η διαφορά της τιμής σε σχέση με τον AncXanQ ήταν πολύ μικρή.

Επίσης, μεταφέρει γουανίνη, όπως μόνο ο AncXanQ, με K_M $1,56 \pm 0,05$ μM , με μικρότερη συγγένεια (περίπου 7 φορές αύξηση της τιμής K_M). Οι τιμές των V_{max} δεν έδειξαν σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την προγονική πρωτεΐνη, AncXanQ.

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [^3H] Ξανθίνης

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
XanQ	$4,1 \pm 0,5$	$7,2 \pm 1,1$	1756
AncXanQ	$6,5 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,06$	353
NmXanQ	$11,8 \pm 3,5$	$2,5 \pm 0,2$	211

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [^3H] Γουανίνης

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
AncXanQ	$0,21 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$	1238
NmXanQ	$1,56 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,1$	109

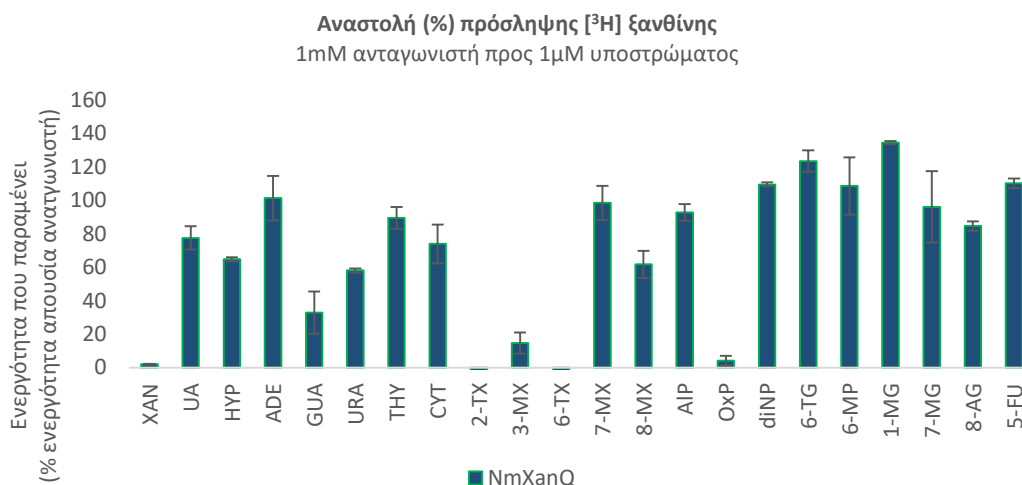
Πίνακας 3.1 Οι τιμές K_M και V_{max} του μεταφορέα NmXanQ, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των XanQ και AncXanQ. Κύτταρα *E. coli* T184 και ΔghxP, που έχουν το μεταφορέα, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης ($0,1-40\mu\text{M}$) και [^3H] γουανίνης ($0,01-40\mu\text{M}$). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και ΔghxP μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

3.1.3. Ο NmXanQ έχει ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης από τον XanQ

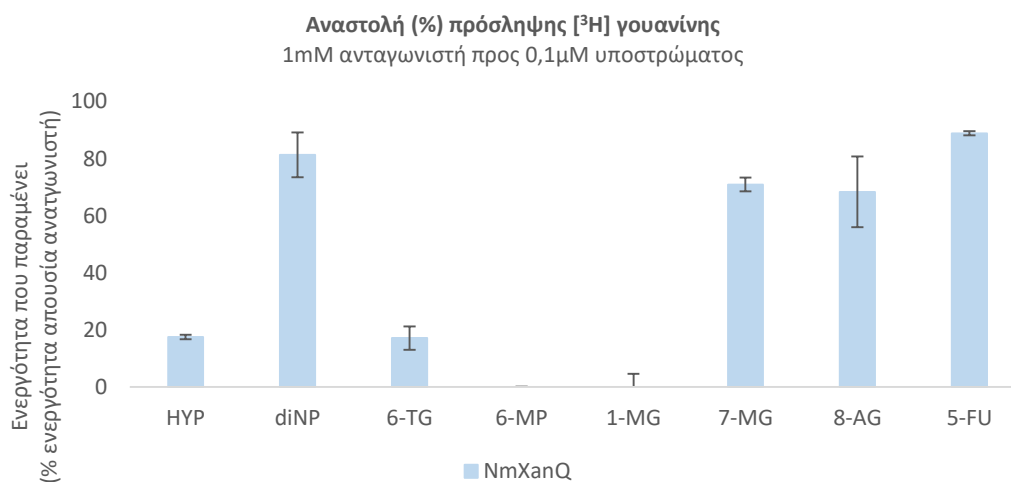
Για την καλύτερη κατανόηση της σημασίας των πέντε αμινοξικών αλλαγών στη διπλή εξειδίκευση προς ξανθίνη και γουανίνη, που παρουσίασε ο μεταφορέας NmXanQ, έγιναν πειράματα πρόσληψης [^3H]ξανθίνης και [^3H]γουανίνης, σε συγκέντρωση $1\mu\text{M}$ και $0,1\mu\text{M}$, αντίστοιχα, παρουσία μοριακής περίσσειας άλλων προσδετών (1mM), μοριακών αναλόγων των επιβεβαιωμένων υποστρωμάτων (Εικόνες 3.7 και 3.8).

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζονται είναι γουανίνη, 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη, ενώ κανένα ανάλογο γουανίνης δεν μπορούσε να αναστείλει την πρόσληψη ξανθίνης (Εικόνα 3.7). Από τα ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζονταν από το NmXanQ, όλα αναγνωρίζονται και από τον AncXanQ, το οποίο επιπλέον αναγνωρίζει και τις 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο XanQ δεν αναγνωρίζει τη γουανίνη, αναγνωρίζει όμως τα υπόλοιπα ανάλογα: 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη (Karena *et al.*, 2015).

Από τα ανάλογα γουανίνης αναγνωρίζονταν και ανέστειλαν την πρόσληψη γουανίνης, η 1-μεθυλογουανίνη, 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη και υποξανθίνη (Εικόνα 3.8). Η προγονική περμεάση ApcXanQ αναγνωρίζει και τους τέσσερις προσδέτες, ενώ επιπλέον αναγνωρίζει αδενίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη, 7-μεθυλογουανίνη, 8-αζαγουανίνη και 5-φθόρουρακίλη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).



Εικόνα 3.7 Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα NmXanQ, παρουσία ξανθίνης. Κύτταρα *E.coli* T184, που εκφράζουν το NmXanQ, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες, δομικά ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.



Εικόνα 3.8 Προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ, παρουσία γουανίνης. Κύτταρα *E.coli* ΔghxP, που εκφράζουν το NmXanQ, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0,1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες, δομικά ανάλογα γουανίνης (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔghxP με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.

Έτσι, η σύγχρονη περμεάση NmXanQ φάνηκε να έχει ευρύτερη εξειδίκευση από τον επίσης σύγχρονο μεταφορέα XanQ, αλλά αναγνώριζε λιγότερα ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης από την προγονική πρωτεΐνη AncXanQ.

Στη συνέχεια, για τα δομικά ανάλογα που αναγνωρίζονται, πραγματοποιήθηκαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων, 0,1 μM ως 1mM, και υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής, K_i , για την πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2).

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [^3H] Ξανθίνης									
	GUA	2SX	3MX	6SX	OXYF	7MX	8MX		
XanQ	nd	91	72	41	37	nd	nd		
AncXanQ	85,8	122,2	100,3	26,1	9,3	234,3	7,1		
NmXanQ	15	76,2	4,3	41,3	2,7	nd	nd		
K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [^3H] Γουανίνης									
	HYP	1MG	6SG	6MP	diNP	ADE	7MG	8AG	5FU
AncXanQ	5	2,2	2,8	2,3	88,2	77,8	258,8	40,2	217
NmXanQ	40,6	11,1	6,4	5,7	nd	nd	nd	nd	nd

Πίνακας 3.2 Οι τιμές των σταθερών αναστολής (K_i), για τα δομικά ανάλογα που οδηγούν σε αναστολή πρόσληψης των γνωστών υποστρωμάτων, ξανθίνης και γουανίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 και *ΔghxP*, που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *nmxanQ*, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM) και [^3H] γουανίνης (0,1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0,1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (15 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και *ΔghxP* με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC_{50} προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50} / (1 + (L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2, σχεδόν όλα τα ανάλογα ξανθίνης έδειξαν πως αναγνωρίζονται καλύτερα από το NmXanQ σε σύγκριση με τους XanQ και AncXanQ. Η γουανίνη αναγνωρίζεται και αναστέλλει την πρόσληψη ξανθίνης πιο αποτελεσματικά για το NmXanQ, σε σχέση με τον AncXanQ. Η 3-μεθυλοξανθίνη και η οξυπουρινόλη, εμφανίζουν τις μεγαλύτερες διαφορές στις τιμές των K_i (4,3μM και 2,7μM).

Η πρόσληψη γουανίνης στο NmXanQ, φαίνεται να μην αναστέλλεται από την υποξανθίνη τόσο ισχυρά, σε σχέση με τον AncXanQ, αφού το K_i είναι οκτώ φορές υψηλότερο (40,6μM), ενώ για τα υπόλοιπα ανάλογα γουανίνης δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην ικανότητα αναστολής πρόσληψης γουανίνης.

3.2 Έλεγχος της σημαντικότητας της θέσης 377 στους μεταφορείς NmXanQ, AncXanQ και XanQ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επιλέχθηκε η θέση 377 για περαιτέρω μελέτη της επίδρασής της στη διεύρυνση της εξειδίκευσης προς τη γουανίνη. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν λειτουργικά 5 μονά μεταλλάγματα στη θέση 377, σε διαφορετικά μοριακά υπόβαθρα.

3.2.1 Στο υπόβαθρο του NmXanQ: η μονή αντικατάσταση δεν οδηγεί σε αλλαγή εξειδίκευσης

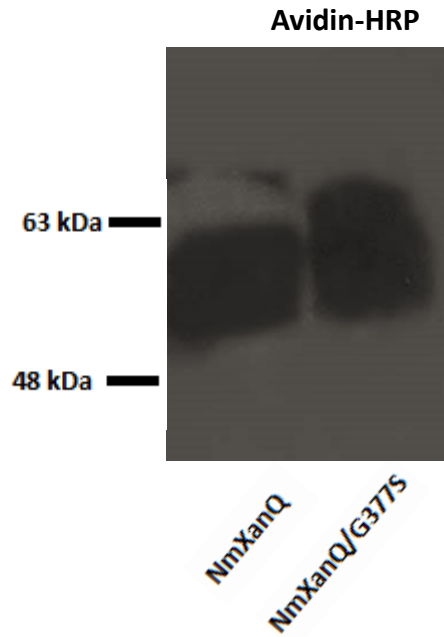
Με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στη θέση 377 του NmXanQ προέκυψε το NmXanQ/G377S, το οποίο έτσι φέρει τα τέσσερα από τα πέντε αμινοξέα του προγόνου, AncXanQ. Η γλυκίνη, που φέρει ο NmXanQ κανονικά, έχει αντικατασταθεί στο NmXanQ/G377S, από σερίνη, η οποία βρίσκεται στην ίδια θέση στην αλληλουχία του XanQ (Εικόνα 3.9).

	27	116	191	312	377
NmXanQ	SAYTHLL	DAMI	LGLS	IATA	LMFGLIA
NmXanQ/G377S	SAYTHLL	DAMI	LGLS	IATA	LMFSLIA
AncXanQ	SAYTHLL	DAMI	LGLS	IATA	LMFGMIA

Εικόνα 3.9 Αμινοξέα στις 5 θέσεις, όπως προκύπτουν μετά από στοχευμένη μεταλλαξιγένεση με PCR στο NmXanQ, όπου θα μελετηθεί η επίδραση του αμινοξέος στη θέση 377 στην αναγνώριση υποστρώματος και στην εξειδίκευση του μεταφορέα. Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

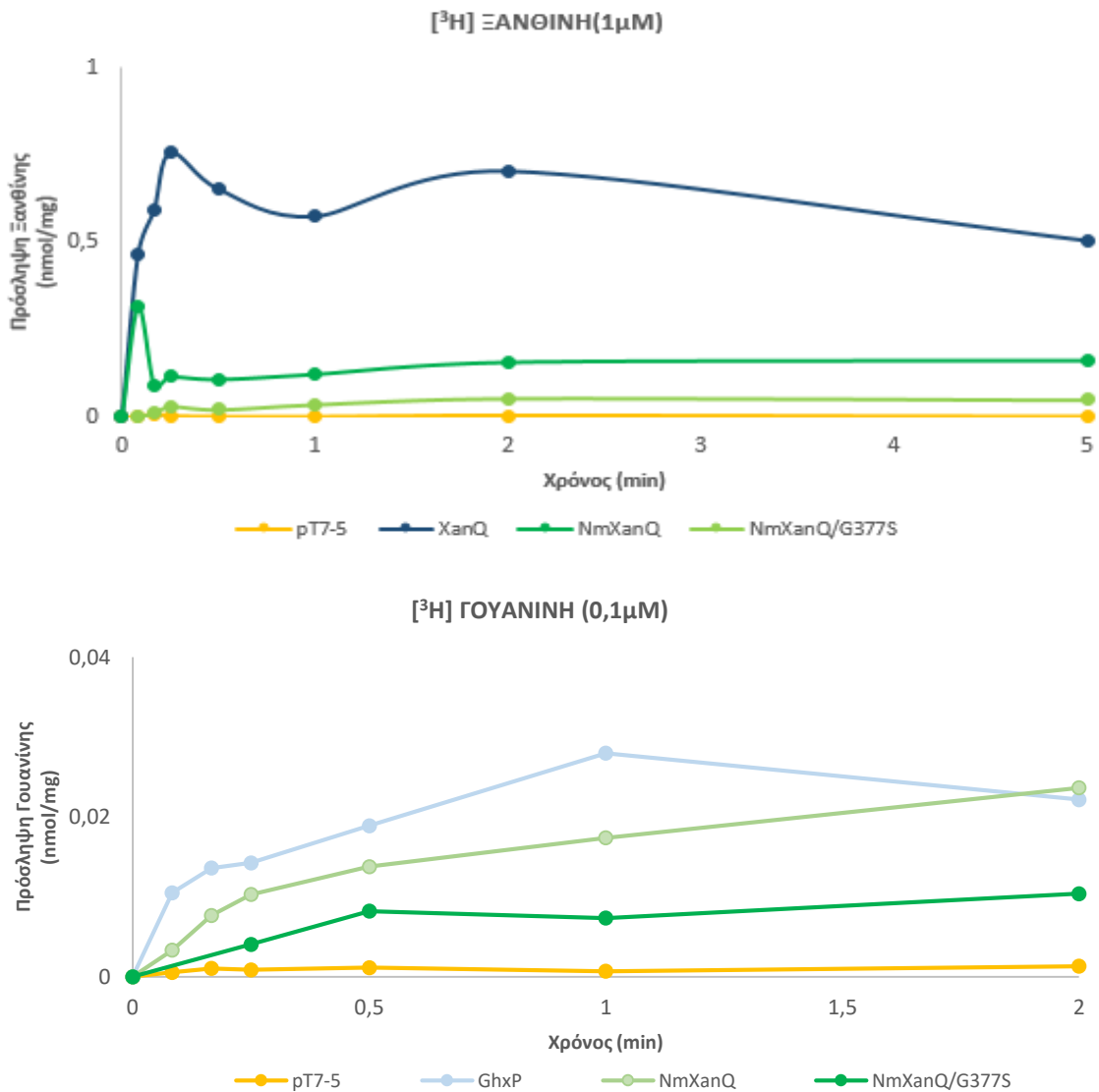
Εισήχθησαν οι επιθυμητές μεταλλάξεις με PCR, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (βλ. 2.5.2) και ως υπόστρωμα το γονίδιο *nmXanQ*, από το οποίο προέκυψε το *nmXanQG377S*, με την αλλαγή του αντίστοιχου ενός αμινοξέος στη θέση 377. Ακολούθησε η ένθεσή τους σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Το πλασμίδιο αυτό φέρει τον υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ* p/o) μέσω του οποίου γίνεται δυνατή η υπερέκφραση του μεταφορέα με την χρήση IPTG, μετά από μετασηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* T184.

Ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κατασκευής στη μεμβράνη των κυττάρων, με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη (Εικόνα 3.10).



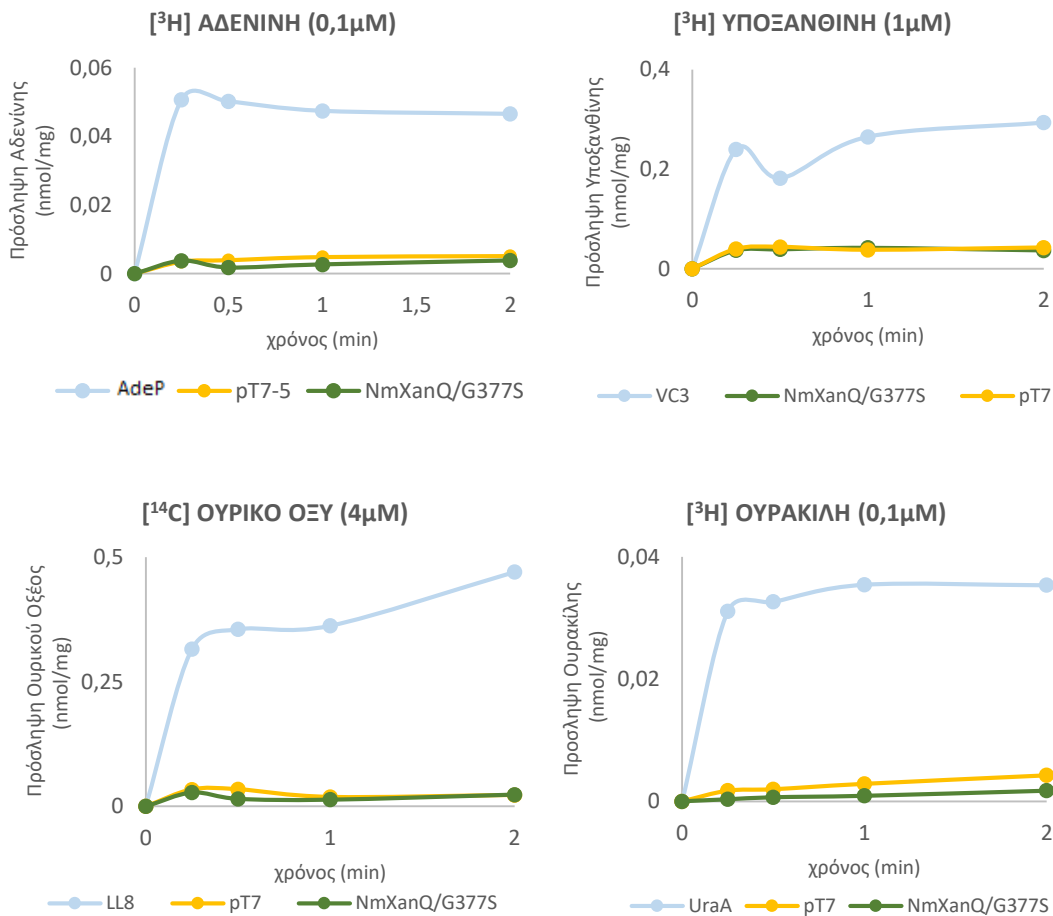
Εικόνα 3.10 Έκφραση του NmXanQ/G377S. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την κατασκευή από πλασμίδιο pT7-5/nmXanQG377S, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραίωση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Πειράματα ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης και [³H]γουανίνης, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* (T184 για ξανθίνη και Δ*ghxP* για γουανίνη), έδειξαν ότι η μονή μετάλλαξη δεν μπορεί να οδηγήσει από μόνη της σε περιορισμό της εξειδίκευσης, έτσι ο NmXanQ/G377S μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη, όπως ο NmXanQ φυσικού τύπου (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μΜ) και [³H] γουανίνης (0,1μΜ), για το NmXanQ/G377. Το γονίδιο, μετά την εισαγωγή της μετάλλαξης, εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* K-12 (T184 και ΔghxP), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή lacZ p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς ραδιοενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, XanQ και GhxP, αντίστοιχα.

Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς για εναλλακτικά υποστρώματα, ραδιοενεργά σημασμένα, όπως ουρικό οξύ (σε κύτταρα *E.coli* T184), αδενίνη και υποξανθίνη (*E.coli* ΔadeP) και ουρακίλη (*E.coli* ΔuraA), έδειξαν ότι δεν κανένα από αυτά δεν μεταφέρονταν (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένων πιθανών υποστρωμάτων, [³H] αδενίνης (0,1μΜ), [³H] υποξανθίνης (1μΜ), [¹⁴C] ουρικού οξέος (4μΜ) και [³H] ουρακίλης (0,1μΜ), για το NmXanQ/G3775. Μετά την εισαγωγή μετάλλαξης, το γονίδιο εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (*ΔadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη T184 για ουρικό οξύ, και *ΔuraA* για ουρακίλη), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς του αντίστοιχου ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας αδενίνης (*AdeP*), υποξανθίνης (*VC3*), ουρικού οξέος (*LL8*) και ουρακίλης (*UraA*).

3.2.1.1 Η αντικατάσταση G377S οδηγεί σε μείωση της συγγένειας για την ξανθίνη

Ακολούθησε κινητική ανάλυση της μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης. Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι η μονή αλλαγή οδήγησε σε μείωση της συγγένειας για ξανθίνη σχεδόν τρεις φορές στο NmXanQ/G377S, συγκριτικά με του NmXanQ φυσικού τύπου. Όσον αφορά στην ταχύτητα, δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή και η τιμή της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) υπολογίστηκε $3,8 \pm 0,4 \text{ nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Πίνακας 3.3).

Επίσης, το μετάλλαγμα NmXanQ/G377S έδειξε να έχει μικρότερη συγγένεια με γουανίνη, σε σχέση με το NmXanQ, καθώς η σταθερά K_M $4,7 \pm 0,34 \mu\text{M}$ είναι τριπλάσια από αυτή του NmXanQ, ενώ τη μεταφέρει με μεγαλύτερη ταχύτητα, V_{max} $0,32 \pm 0,06 \text{ nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Πίνακας 3.3).

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [^3H] Ξανθίνης

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
NmXanQ	$11,8 \pm 3,5$	$2,5 \pm 0,2$	211
NmXanQ/G377S	$4,5 \pm 1,5$	$3,8 \pm 0,4$	844

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [^3H] Γουανίνης

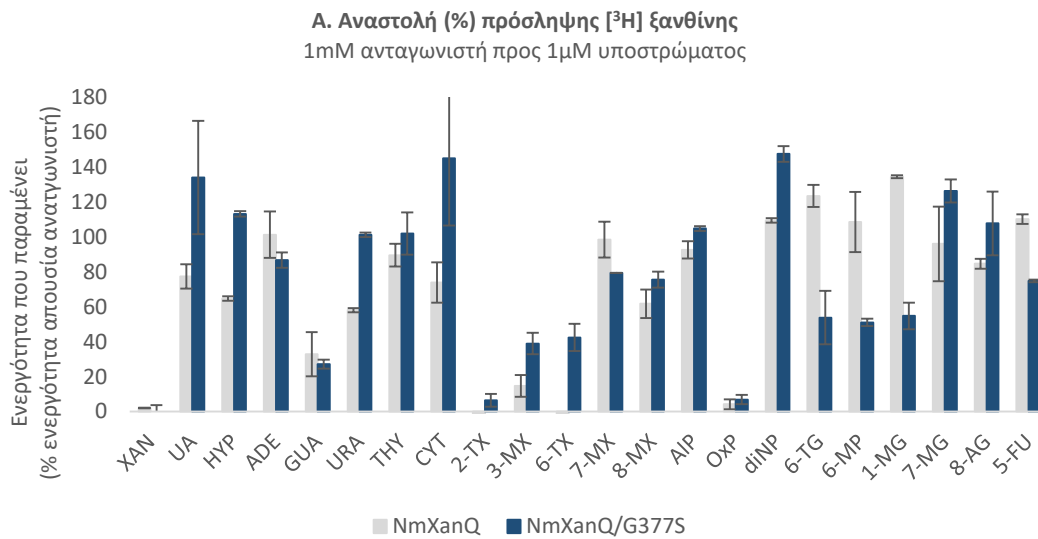
	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
NmXanQ	$1,56 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,1$	108
NmXanQ/G377S	$4,7 \pm 0,34$	$0,32 \pm 0,05$	68

Πίνακας 3.3 Τιμές K_M και V_{max} για το NmXanQ/G377S. Κύτταρα *E.coli* T184 και ΔghxP, που έχουν τον κάθε μεταφορέα, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης ($0,1\text{--}40\mu\text{M}$) και [^3H] γουανίνης ($0,01\text{--}40\mu\text{M}$). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και ΔghxP μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

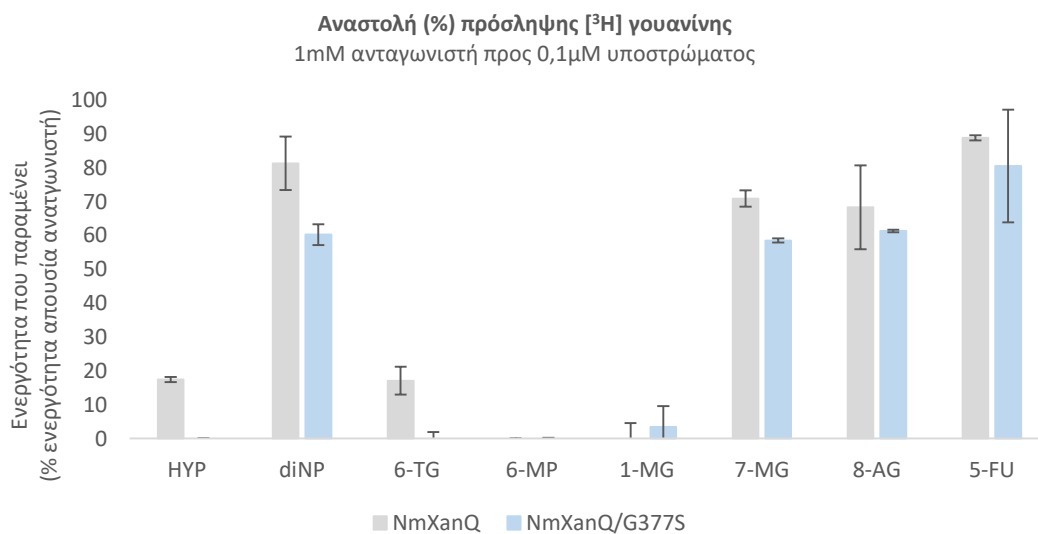
3.2.1.2 Το μετάλλαγμα NmXanQ/G377S εμφανίζει το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με το μεταφορέα φυσικού τύπου

Η επίδραση της μονής αντικατάστασης αμινοξέος στην εξειδίκευση μελετήθηκε περαιτέρω, για να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχει στην αναγνώριση υποστρώματος. Για το λόγο αυτό έγιναν πειράματα πρόσληψης [^3H]ξανθίνης και [^3H]γουανίνης, σε συγκέντρωση $1\mu\text{M}$ και $0,1\mu\text{M}$, αντίστοιχα, παρουσία μοριακής περίσσειας άλλων προσδετών (1mM), μοριακών αναλόγων των επιβεβαιωμένων υποστρωμάτων (Εικόνες 3.13 και 3.14).

Από τα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται ότι το προφίλ εξειδίκευσής παραμένει ίδιο, αφού το NmXanQ, συμφωνεί απόλυτα με το NmXanQ/G377S, όσον αφορά στα ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζει και κανένα ανάλογο γουανίνης δεν έδειξε να αναστέλλει (λιγότερο από 50%) την πρόσληψη ξανθίνης (Εικόνα 3.13). Επίσης, τα ανάλογα γουανίνης που αναστέλλουν την πρόσληψη γουανίνης είναι ίδια και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.13 Προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ/G377S. Κύτταρα *E.coli* T184, που εκφράζουν το NmXanQ/G377S, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες, δομικά ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.



Εικόνα 3.14 Προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ/G377S. Κύτταρα *E.coli* ΔghxP, που εκφράζουν το NmXanQ/G377S, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0,1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες, δομικά ανάλογα γουανίνης(1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔghxP με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής, K_i , για την πρόσληψη ραδιοενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.4), με δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς, παρουσία των αναλόγων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, από 0,1 μM ως 1mM.

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Ξανθίνης

	GUA	2SX	3MX	6SX	OXYF	7MX	8MX
NmXanQ	15	76,2	4,3	41,3	2,7	nd	nd
NmXanQ/G377S	7	75	52,5	33	24,4	nd	nd

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Γουανίνης

	HYP	1MG	6SG	6MP	diNP	ADE	7MG	8AG	5FU
NmXanQ	40,6	11,1	6,4	5,7	nd	nd	nd	nd	nd
NmXanQ/G377S	22,7	14,5	5,9	28,3	nd	nd	nd	nd	nd

Πίνακας 3.4 Τιμές K_i για την αναστολή πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης από το μεταφορέα NmXanQ/G377S. Κύτταρα *E.coli* T184 και ΔghxP, που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο nmxanQ, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0,1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (15 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και ΔghxP με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff K_i = IC₅₀/(1+(L/K_M)) (Cheng and Prusoff, 1973).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4, παρόλο που οι ενώσεις που αναγνωρίζονται είναι ίδιες, για κάποιες από αυτές οι σταθερές αναστολής (K_i) διαφέρουν σημαντικά. Η σταθερά αναστολής πρόσληψης ξανθίνης της 3-μεθυλοξανθίνη (52,5μM) και της οξυπουρινόλης (24,4μM) αυξάνονται σημαντικά για το NmXanQ/G377S, ώστε δεν αναγνωρίζονται τόσο καλά στο μετάλλαγμα σε σχέση με το NmXanQ φυσικού τύπου. Η γουανίνη, 2-θειοξανθίνη και 6-θειοξανθίνη δεν έδειξαν μεγάλη διαφορά στην ικανότητα αναστολής πρόσληψης ξανθίνης, σε σύγκριση με το NmXanQ. Όσον αφορά στην αναστολή πρόσληψης γουανίνης, από δομικά ανάλογα γουανίνης, μόνο η υποξανθίνη φαίνεται να αναγνωρίζεται καλύτερα, για την οποία το K_i σχεδόν υποδιπλασιάστηκε (22,7μM), στο NmXanQ/G377S σε σύγκριση με το NmXanQ.

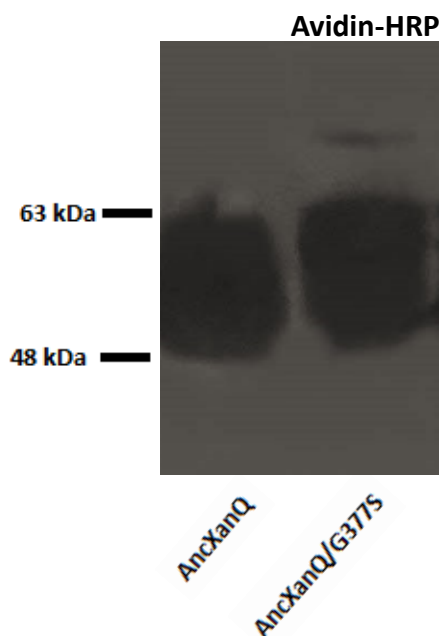
3.2.2 Στο υπόβαθρο του AncXanQ: η αντικατάσταση G377S δεν οδηγεί σε αλλαγή της εξειδίκευσης

Σε επόμενο στάδιο επιλέχθηκε να μελετηθεί η επίδραση της θέσης 377 στην εξειδίκευση στο προγονικό περιβάλλον του AncXanQ, με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση, όπου η γλυκίνη στον AncXanQ κανονικά, έχει αντικατασταθεί στον AncXanQ/G377S από σερίνη, η οποία βρίσκεται στην ίδια θέση στην αλληλουχία του XanQ.

Αφού έγινε η επιθυμητή μετάλλαξη με PCR, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (βλ. 2.5.2) και ως υπόστρωμα το γονίδιο *ancXanQ* για να προκύψει το *ancXanQG377S*, ακολούθησε ένθεσή σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD, με υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (lacZ p/o)

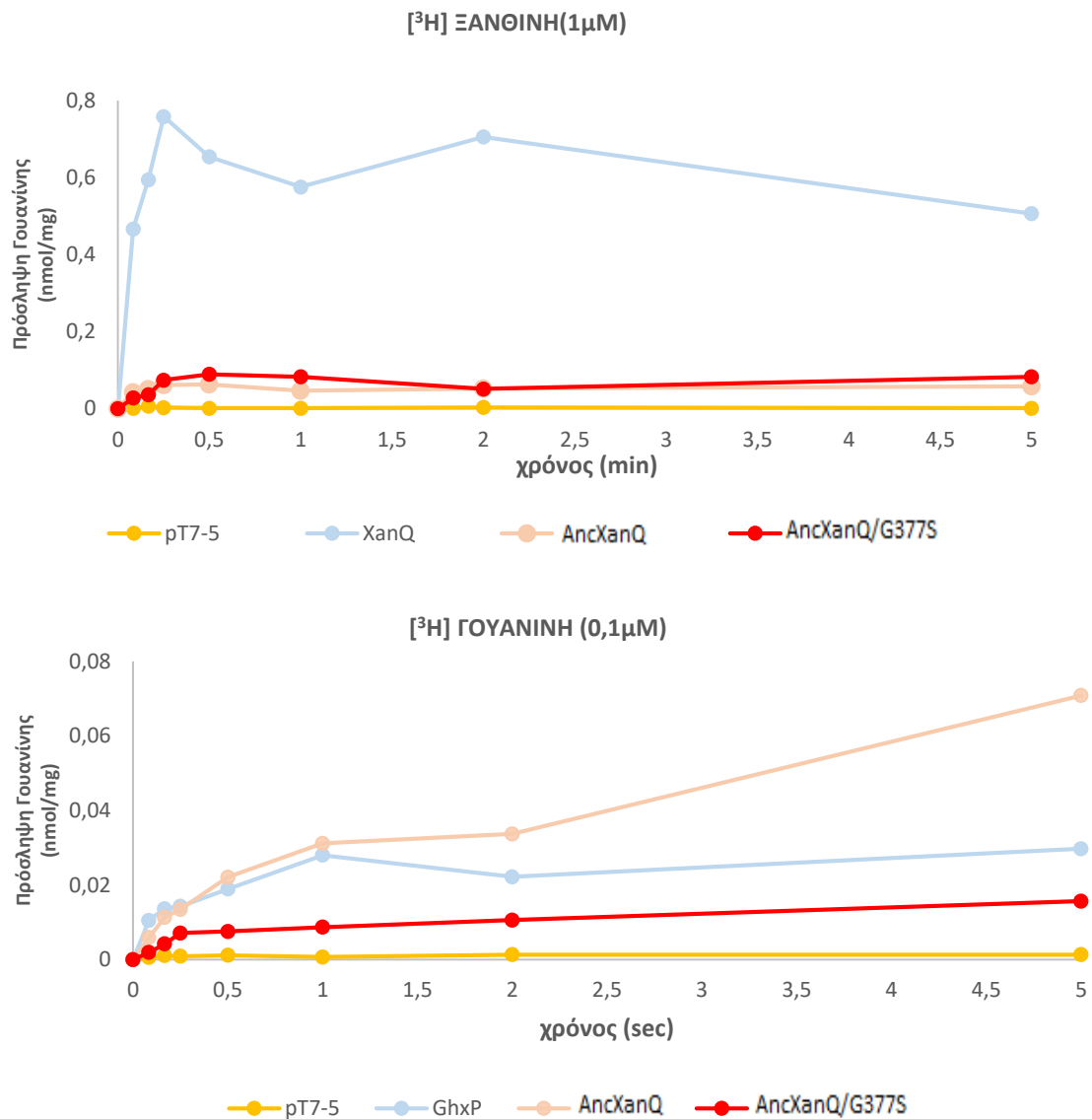
για υπερέκφραση του μεταφορέα με την χρήση IPTG, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E. coli* T184.

Ελέγχθηκε η έκφραση στη μεμβράνη, όπου ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.15*.



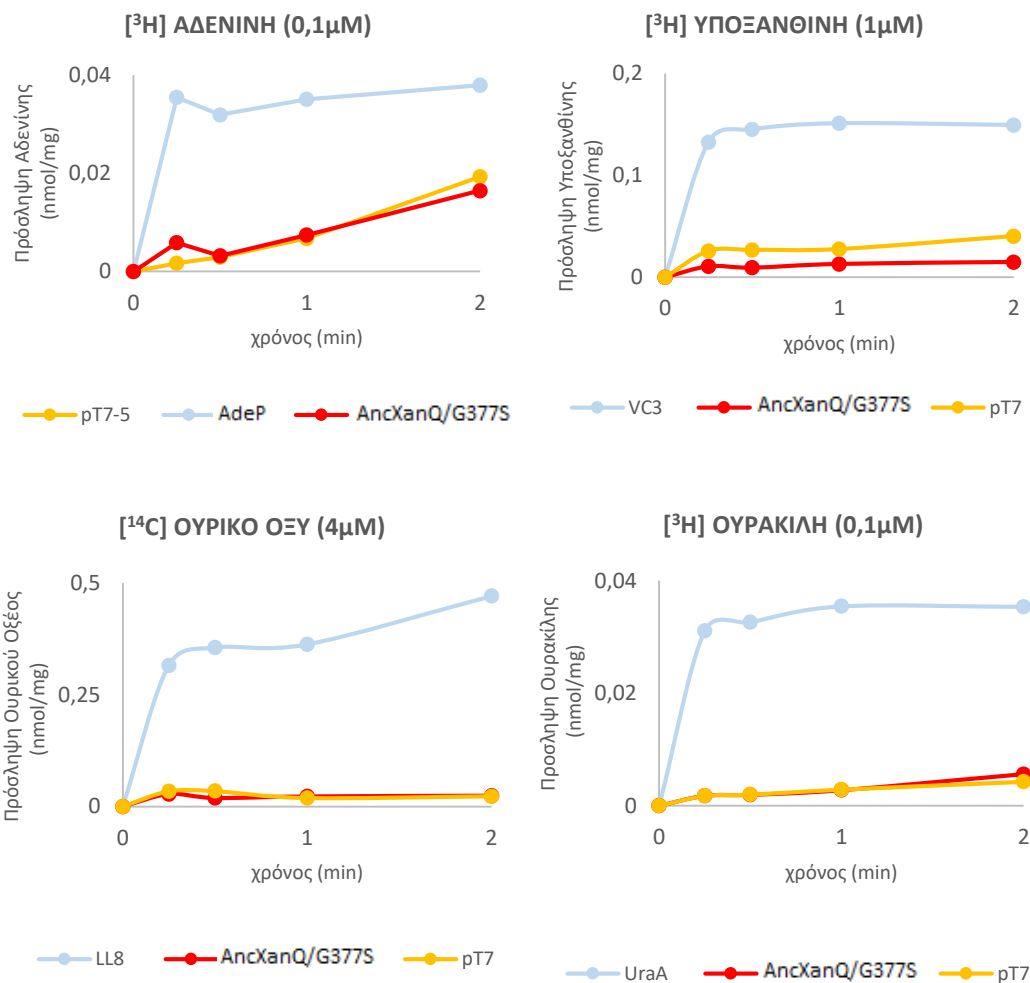
Εικόνα 3.15 Έκφραση του AncXanQ/G377S. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την κατασκευή από πλασμίδια pT7-5/ancxanQG377S, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραίωση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Πειράματα ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης και [³H]γουανίνης, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E. coli* (T184 για ξανθίνη και *ΔghxP* για γουανίνη), έδειξαν ότι η μονή μετάλλαξη δεν μπορεί να οδηγήσει από μόνη της σε τροποποίηση της εξειδίκευσης, έτσι ο AncXanQ/G377S συνεχίζει να μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη, όπως ο AncXanQ (*Εικόνα 3.16*).



Εικόνα 3.16 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μΜ) και [³H] γουανίνης (0,1μΜ), για τον AncXanQ/G377S. Το γονίδιο, μετά την εισαγωγή της μετάλλαξης, εισάγεται σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* K-12 (T184 και GhxP), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, XanQ και GhxP, αντίστοιχα.

Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς για εναλλακτικά υποστρώματα, ραδιενεργά σημασμένα, όπως ουρικό οξύ (σε κύτταρα *E.coli* T184), αδενίνη και υποξανθίνη (*E.coli* ΔadeP) και ουρακίλη (*E.coli* ΔuraA), έδειξαν ότι δεν κανένα από αυτά δεν μεταφέρεται (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.17 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης [³H] αδενίνης (0,1μΜ), [³H] υποξανθίνης (1μΜ), [¹⁴C] ουρικού οξέος (4μΜ) και [³H] ουρακίλης (0,1μΜ), για τον AncXanQ/G377S. Μετά την εισαγωγή μετάλλαξης, το γονίδιο εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (*ΔadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη T184 για ουρικό οξύ, και *DuraA* για ουρακίλη), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* r/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς του αντίστοιχου ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας αδενίνης (*AdeP*), υποξανθίνης (*VC3*), ουρικού οξέος (*LL8*) και ουρακίλης (*UraA*).

3.2.2.1 Η αντικατάσταση G377S προκαλεί αύξηση της συγγένειας για την ξανθίνη

Ακολούθησε κινητική ανάλυση για τη μεταφορά ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, που έδειξε ότι αναγνωρίζει την ξανθίνη με υψηλή συγγένεια. Συγκεκριμένα, η μονή αλλαγή οδήγησε σχεδόν σε υποδιπλασιασμό της σταθεράς συγγένειας με ξανθίνη, σε σχέση με τον AncXanQ, με K_M $3,4 \pm 0,7$ μΜ. Δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή της ταχύτητας μετά την εισαγωγή της μονής μετάλλαξης (Πίνακας 3.5)

Ο AncXanQ/G377S μεταφέρει γουανίνη, με μικρότερη συγγένεια ($K_M 0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$), σε σχέση με τον AncXanQ, ενώ η μέγιστη ταχύτητα $V_{max} 0,2 \pm 0,06 \text{ nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ πρακτικά δε μεταβλήθηκε (Πίνακας 3.5).

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [^3H] Ξανθίνης

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
AncXanQ	$6,5 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,06$	354
AncXanQ/G377S	$3,4 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,2$	735

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [^3H] Γουανίνης

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
AncXanQ	$0,21 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$	1238
AncXanQ/G377S	$0,7 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,06$	285

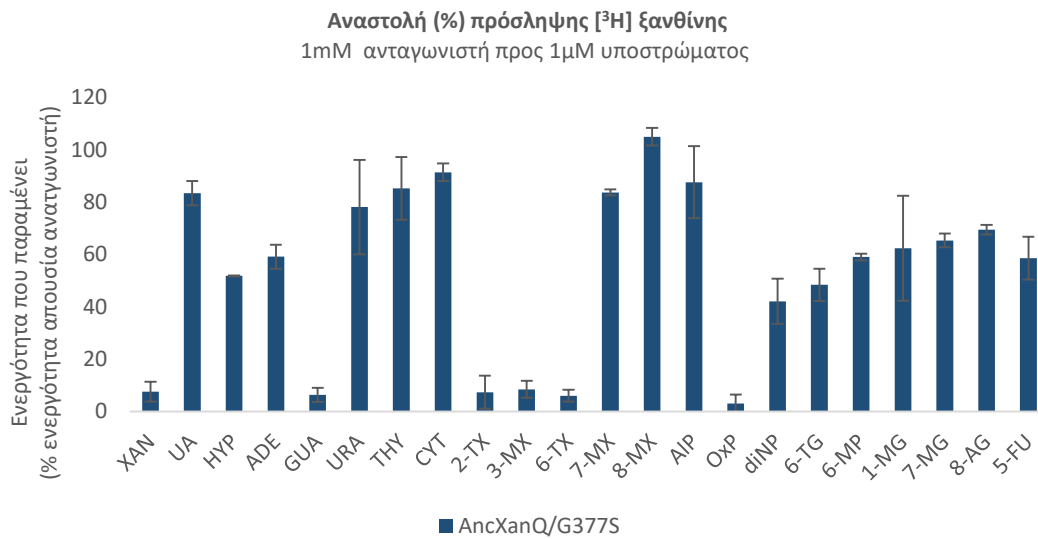
Πίνακας 3.5 Τιμές K_M και V_{max} για τον AncXanQ/G377S, από την κινητική ανάλυση πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 και *ΔghxP*, που έχουν το μεταφορέα, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης ($0,1-40\mu\text{M}$) και [^3H] γουανίνης ($0,01-40\mu\text{M}$). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και *ΔghxP* μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

3.2.2.2 Το προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ/G377S δεν είναι τόσο ευρύ όσο του AncXanQ

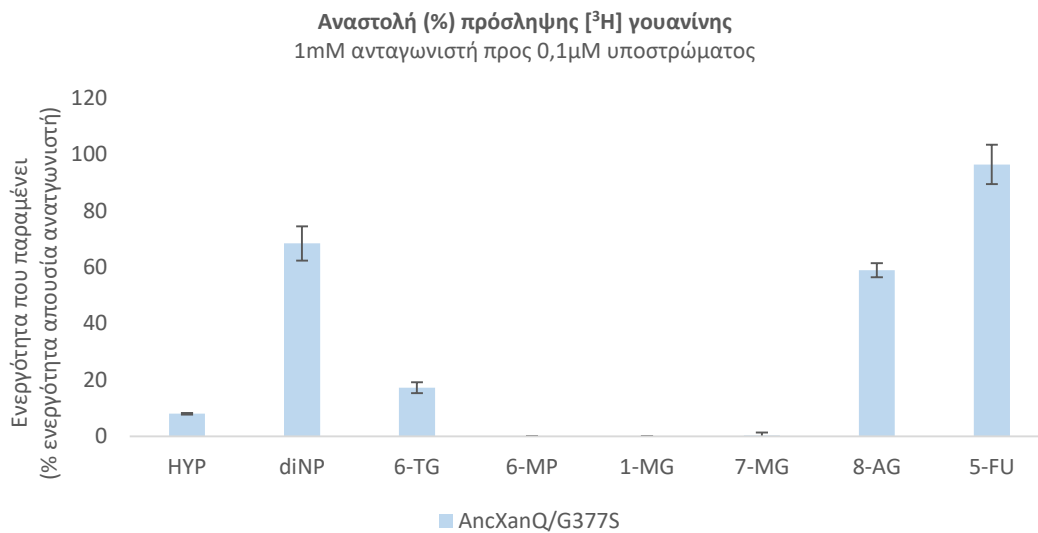
Η επίδραση της μονής αντικατάστασης αμινοξέος στην εξειδίκευση μελετήθηκε περαιτέρω, για να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχει στην αναγνώριση υποστρώματος. Για το λόγο αυτό έγιναν πειράματα πρόσληψης [^3H]ξανθίνης και [^3H]γουανίνης, σε συγκέντρωση $1\mu\text{M}$ και $0,1\mu\text{M}$, αντίστοιχα, παρουσία μοριακής περίσσειας προσδετών (1mM), μοριακών αναλόγων των επιβεβαιωμένων υποστρωμάτων (Εικόνες 3.18 και 3.19).

Από τα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται ότι το προφίλ εξειδίκευσής είναι παρόμοιο. Αναστολή πρόσληψης ξανθίνης επιτεύχθηκε παρουσία γουανίνης, 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλοξανθίνης, 6-θειοξανθίνης και οξυπουρινόλης. Οι διαφορές εξειδίκευσης με το γονίδιο χωρίς τη μετάλλαξη, είναι λίγες, καθώς ο AncXanQ, που εμφανίζει την ευρύτερη εξειδίκευση, αναγνωρίζει επιπλέον την 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη, ενώ κανένα ανάλογο γουανίνης δεν αναστέλλει την πρόσληψη ξανθίνης.

Από τα ανάλογα γουανίνης που εξετάζονται, πέντε είναι αυτά που αναγνωρίζονται από τον AncXanQ/G377S: η υποξανθίνη, 1-μεθυλογουανίνη, 6-θειοξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη και 7-μεθυλογουανίνη, ενώ και σε αυτή την περίπτωση ο AncXanQ έχει ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης (Εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.18 Προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ/G377S. Κύτταρα *E.coli* T184, που εκφράζουν τον AncXanQ/G377S, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες, δομικά ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.



Εικόνα 3.19 Προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ/G377S. Κύτταρα *E.coli* DhxP, που εκφράζουν τον AncXanQ/G377S, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0,1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες, δομικά ανάλογα γουανίνης(1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (DhxP με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες

Από πειράματα ανταγωνισμού, που ακολούθησαν, παρουσία μη σημασμένων αναλόγων ξανθίνης και γουανίνης που αναγνωρίζονται σε εύρος σε συγκεντρώσεων, με τον τρόπο που έχει περιγραφεί παραπάνω, προέκυψαν οι σταθερές αναστολής (K_i) για κάθε ουσία, όπως φαίνονται παρακάτω στον Πίνακα 3.6.

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Ξανθίνης

	GUA	2SX	3MX	6SX	OXY	7MX	8MX
AncXanQ	85,5	122,2	100,3	26,1	9,3	234,3	7,1
AncXanQ/G377S	1,7	38	46,8	34,6	4,2	nd	nd

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Γουανίνης

	HYP	1MG	6SG	6MP	diNP	ADE	7MG	8AG	5FU
AncXanQ	5	2,2	2,8	2,3	88,2	77,8	258,8	40,2	217
AncXanQ/G377S	8,9	11,3	3,4	4	nd	nd	1,4	nd	nd

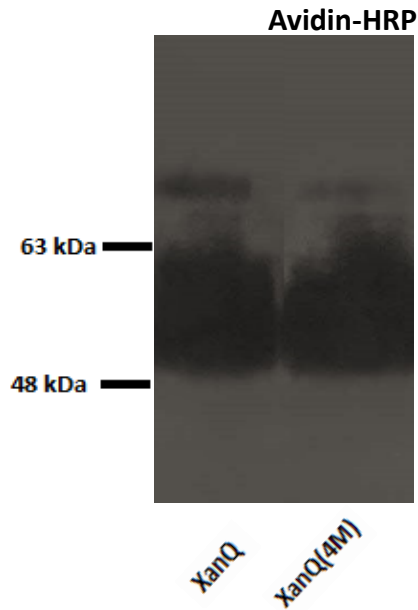
Πίνακας 3.6 Τιμές K_i για τις ενώσεις που αναστέλλουν την πρόσληψη ξανθίνης και γουανίνης από το μεταφορέα **AncXanQ/G377S**. Κύτταρα *E.coli* T184 και ΔghxP, που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *ancXanQ/G377S*, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0,1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0,1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (15 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και ΔghxP με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.6, τα τέσσερα ανάλογα (γουανίνη, 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη και οξυπουρινόλη), εκτός από την 6-θειοξανθίνη, φαίνεται να μπορούν να ανταγωνιστούν την πρόσληψη ξανθίνης πολύ καλύτερα στον AncXanQ/G377S. Ειδικά στην περίπτωση της γουανίνης, που μεταφέρεται και από τα δύο, η διαφορά είναι σημαντική. Αν και τα ανάλογα που αναστέλλουν την πρόσληψη γουανίνης στον AncXanQ/G377S είναι λιγότερα, αυτά φαίνεται να μην έχουν σημαντικές διαφορές στις τιμές K_i, σε σχέση με τον AncXanQ, με εξαίρεση την 7-μεθυλογουανίνη, για την οποία το μετάλλαγμα AncXanQ/G377S έχει σημαντικά αυξημένη συγγένεια.

3.2.3 Στο υπόβαθρο του XanQ: η αλλαγή S377G είναι ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση του μεταφορέα

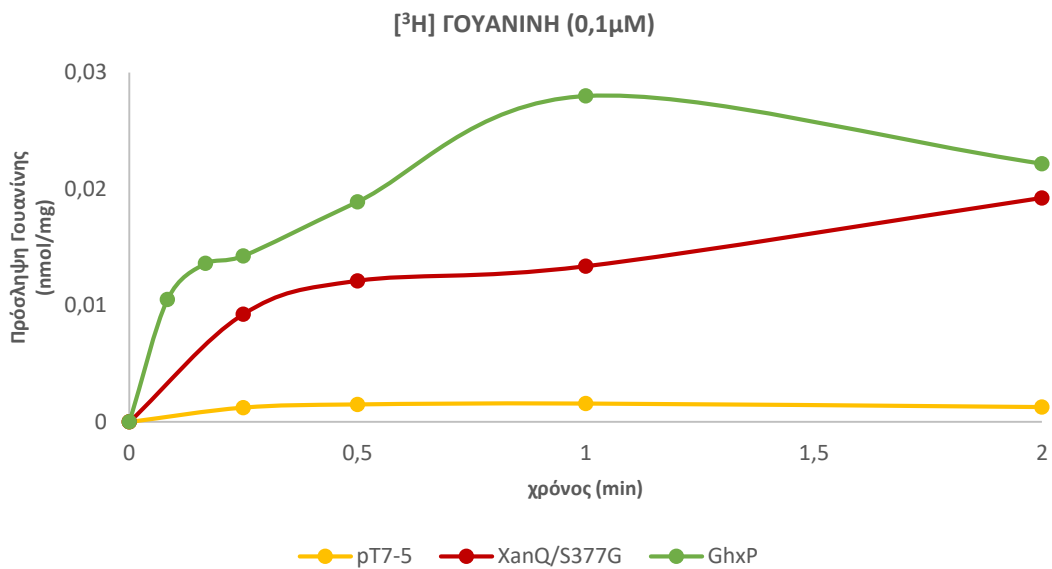
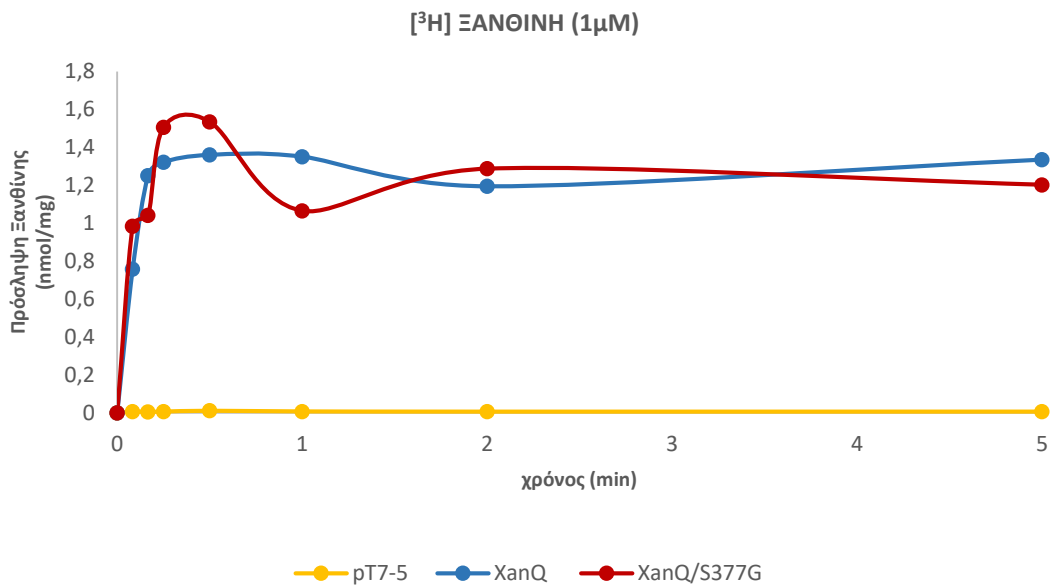
Με στοχευμένη μεταλλαξινέωση στη θέση 377 του XanQ προέκυψε ο XanQ/S377G, το οποίο φέρει μόνο ένα από τα πέντε αμινοξέα του προγόνου, AncXanQ, γλυκίνη στη θέση σερίνης.

Με PCR, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (βλ. 2.5.2) και ως υποστρώματα το γονίδιο XanQ, ώστε να προκύψει το xanQS377G, έγινε η αντικατάσταση του αντίστοιχου κωδικονίου στη θέση 377. Ακολούθησε η ένθεσή τους σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD, όπου υπό τον έλεγχο του υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ p/o*), γίνεται υπερέκφραση της πρωτεΐνης με την χρήση IPTG, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* T184. Με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.20*.



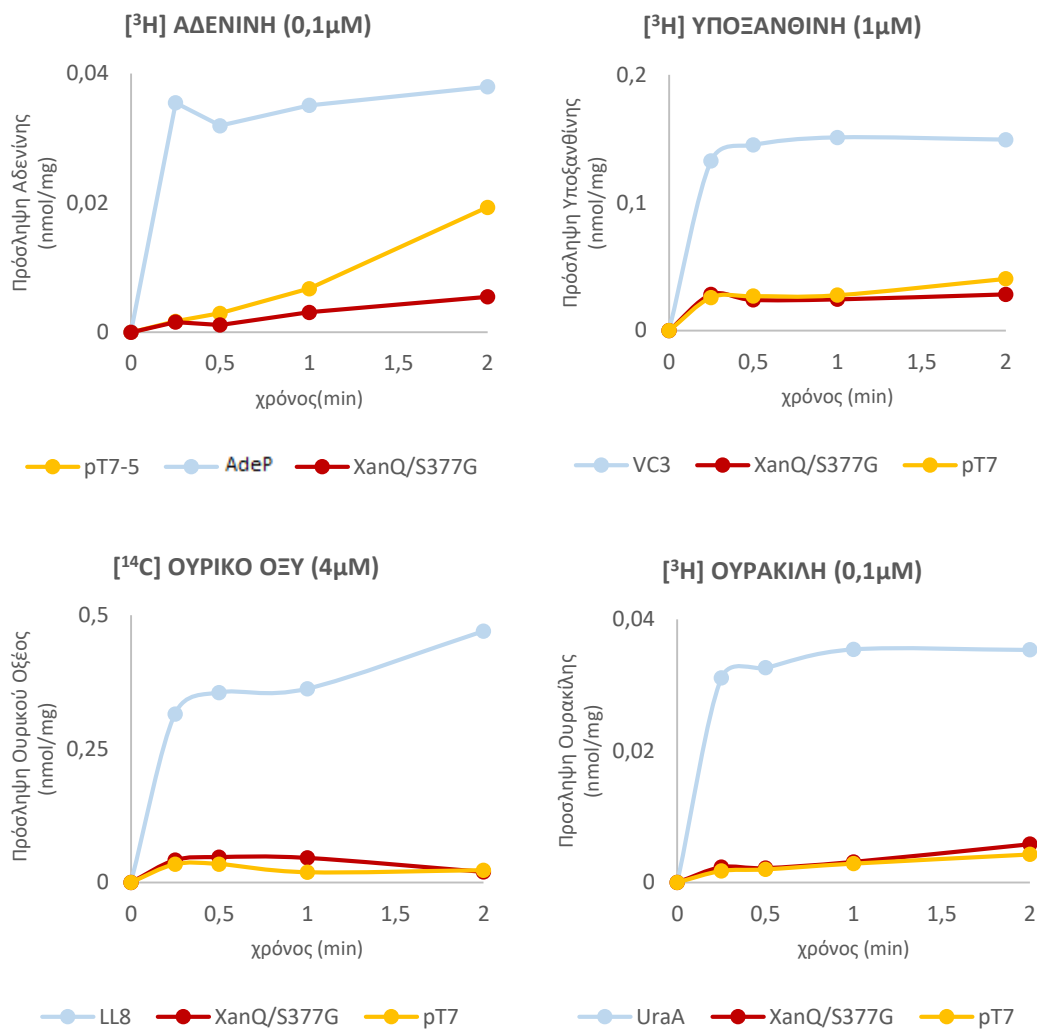
Εικόνα 3.20 Έκφραση του XanQ/S377G. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184, που εκφράζουν την κατασκευή από πλασμίδιο pT7-5/xanQS377G, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αρραίωση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Ακολούθησαν πειράματα ενεργού μεταφοράς διάφορων υποστρωμάτων, μετά από μετασηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* (T184 για ξανθίνη και ουρικό οξύ, *ΔghxP* για γουανίνη, *ΔadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη και *DuraA* για ουρακίλη). Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι η μονή μετάλλαξη αρκούσε για να μεταβληθεί η εξειδίκευση, έτσι ώστε ο XanQ/S377G αναγνώριζε εκτός από ξανθίνη και γουανίνη, όπως ο AncXanQ (Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.21 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μΜ) και [³H] γουανίνης (0,1μΜ), για τον XanQ/S377. Το γονίδιο, μετά την εισαγωγή της μετάλλαξης, εισάγεται σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασηματισμό κυττάρων *E. coli* K-12 (T184 και ΔghxP), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, XanQ και GhxP, αντίστοιχα.

Τέλος, δε μετέφερε τα υπόλοιπα υποστρώματα: αδενίνη, υποξανθίνη, ουρικό οξύ και ουρακίλη (Εικόνα 3.22), όπως οι XanQ και AncXanQ.



Εικόνα 3.22 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιοενεργά σημασμένης [³H] αδενίνης (0,1μΜ), [³H] υποξανθίνης (1μΜ), [¹⁴C] ουρικού οξέος (4μΜ) και [³H] ουρακίλης (0,1μΜ), για τον XanQ/S377G. Μετά την εισαγωγή μετάλλαξης, το γονίδιο εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (*ΔadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη T184 για ουρικό οξύ, και *ΔuraA* για ουρακίλη), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* p/ο και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς του αντίστοιχου ραδιοενεργά σημασμένου υποστρώματος. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας αδενίνης (*AdeP*), υποξανθίνης (*VC3*), ουρικού οξέος (*LL8*) και ουρακίλης (*UraA*).

3.2.3.1 Η μονή αλλαγή αυξάνει την αποτελεσματικότητα μεταφοράς ξανθίνης

Ακολούθησε κινητική ανάλυση για τη μεταφορά ξανθίνης και γουανίνης, που μεταφέρονται (Πίνακας 3.7), η οποία έδειξε ότι είναι μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας, με K_m $3,3 \pm 1,3$ μ M, χωρίς να διαφέρει σημαντικά από τον XanQ φυσικού τύπου. Όσον αφορά στην ταχύτητα, φάνηκε μικρή αύξηση της τιμής της V_{max} σε σχέση με τον XanQ. Επίσης, μεταφέρει γουανίνη, με K_m $3,8 \pm 2,1$ μ M, συγγένεια που πλησιάζει και αυτή για την ξανθίνη, αλλά η τιμή της V_{max} είναι σημαντικά μικρότερη.

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [³H] Ξανθίνης

	K_M (μM)	V_{max} (nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_M (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
ΧανQ	4,1 ± 0,5	7,2 ± 1,1	1.756
ΧανQ/S377G	3,3 ± 1,3	11,6 ± 1,3	3.515

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [³H] Γουανίνης

	K_M (μM)	V_{max} (nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_M (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
ΧανQ/S377G	3,8 ± 2,1	0,5 ± 0,2	131

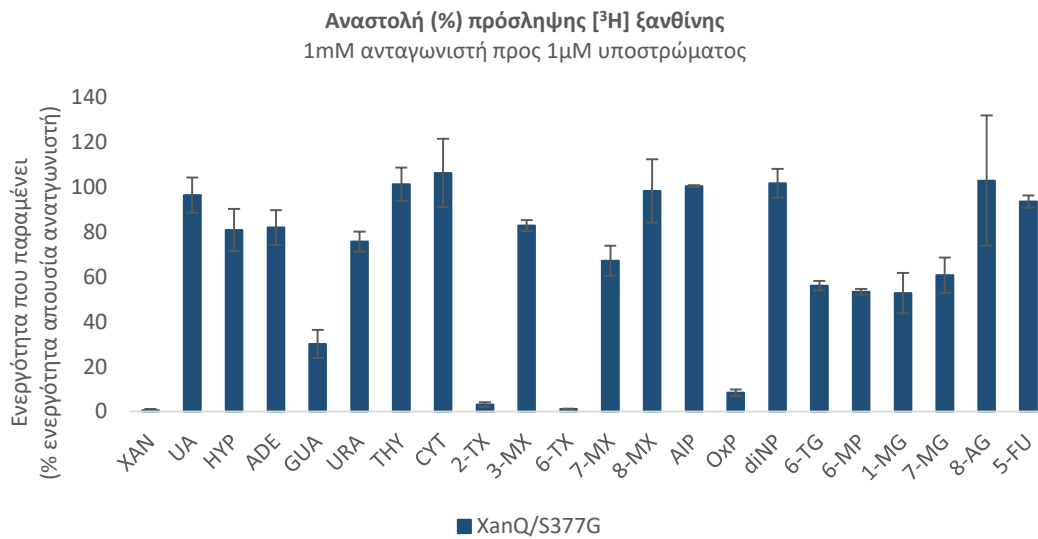
Πίνακας 3.7 Τιμές K_M και V_{max} του ΧανQ/S377G. Κύτταρα *E.coli* T184 και ΔghxP, που έχουν τον κάθε μεταφορέα, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (0,1–40μM) και [³H] γουανίνης (0,01–40μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5 και 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και ΔghxP μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

3.2.3.2 Η μεταλλαγή στη θέση 377 διευρύνει το προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα

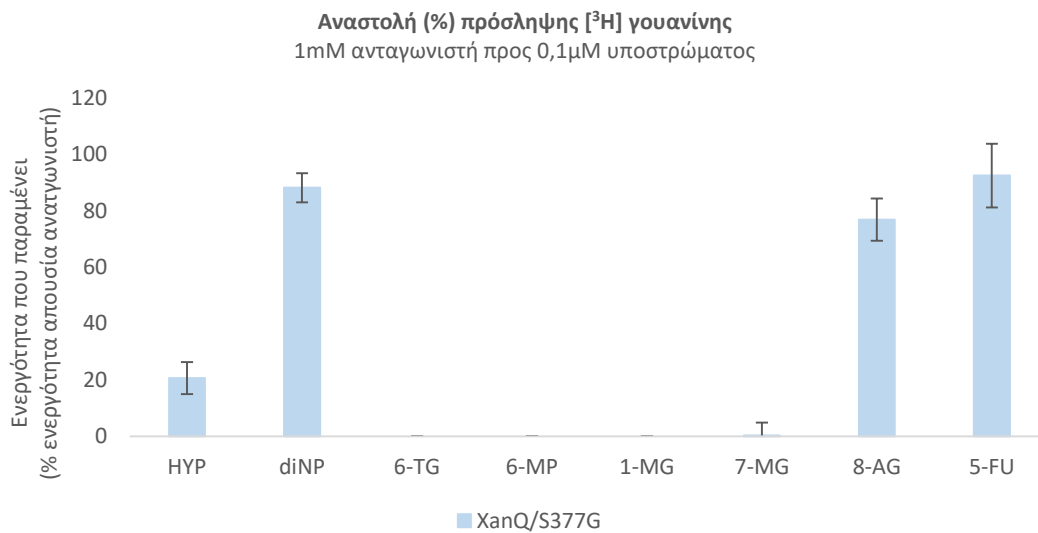
Για την καλύτερη κατανόηση της σημασίας της αντικατάστασης ενός αμινοξέος στη διπλή εξειδίκευση προς ξανθίνη και γουανίνη του ΧανQ/S377G, έγιναν πειράματα πρόσληψης [³H]ξανθίνης και [³H]γουανίνης, σε συγκέντρωση 1μM και 0,1 μM, αντίστοιχα, παρουσία μοριακής περίσσειας μοριακών αναλόγων των επιβεβαιωμένων υποστρωμάτων (1mM) (Εικόνες 3.23 και 3.24).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζονται από τον ΧανQ/S377G είναι η γουανίνη, 2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη, ενώ κανένα ανάλογο γουανίνης δεν μπορούσε να αναστείλει την πρόσληψη ξανθίνης (Εικόνα 3.23). Σε σχέση με το προφίλ εξειδίκευσης του ΧανQ, αυτό αναγνωρίζει επιπλέον την 3-μεθυλοξανθίνη, αλλά όχι τη γουανίνη (Karena *et al.*, 2015).

Από τα ανάλογα γουανίνης, αναγνωρίζονταν από τον ΧανQ/S377G και ανέστειλαν την πρόσληψη γουανίνης η 1-μεθυλογουανίνη, 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, 7-μεθυλογουανίνη και υποξανθίνη (Εικόνα 3.24). Έτσι, η μονή αλλαγή στον ΧανQ/S377G φάνηκε να οδηγεί στην διεύρυνση της εξειδίκευσης, προς την κατεύθυνση του προγονικού μεταφορέα, ApcΧανQ, αφού δεν μεταφέρει απλά τη γουανίνη, αλλά αναγνωρίζει και κάποια δομικά ανάλογά της.



Εικόνα 3.23 Προφίλ εξειδίκευσης του XanQ/S377G. Κύτταρα *E.coli* T184, που εκφράζουν την κατασκευή XanQ/S377G, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.



Εικόνα 3.24 Προφίλ εξειδίκευσης του XanQ/S377G. Κύτταρα *E.coli* ΔghxP, που εκφράζουν τον XanQ/S377G, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0,1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (ΔghxP με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.

Στη συνέχεια, για τα ανάλογα που αναγνωρίζονται πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση και υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής, K_i , για την πρόσληψη ραδιοενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.8).

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Ξανθίνης

	GUA	2-TX	3-MX	6-TX	OXYP
XanQ	nd	91	72	41	37
XanQ/S377G	4	88,6	nd	2,9	3

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Γουανίνης

	HYP	1-MG	6-SG	6-MP	7-MG
XanQ/S377G	17,5	6	4,1	13,8	3,7

Πίνακας 3.8 Τιμές K_i αναστολής πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης από τον XanQ/S377G. Κύτταρα *E.coli* T184 και ΔghxP, που έχουν μετασηματιστεί με την κατασκευή, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0,1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (5και 15sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 και ΔghxP με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Από τις τιμές των K_i (Πίνακας 3.8), φαίνονται διαφορές στην ικανότητα κάποιων μοριακών αναλόγων των υποστρωμάτων (ξανθίνης και γουανίνης) να αναστείλουν την πρόσληψη αυτών. Η κυριότερη διαφορά στο K_i παρατηρείται στην 6-θειοξανθίνη (K_i 2,9μM) και την οξυπουρινόλη (K_i 3μM), όπου φαίνεται να τις αναγνωρίζει εξαιρετικά καλά, καλύτερα από τον XanQ. Επίσης, τα K_i των πέντε προσδετών, που ανταγωνίζονται την πρόσληψη γουανίνης, δείχνουν πως και αυτοί αναγνωρίζονται πολύ καλά.

3.2.4 Στο υπόβαθρο του AncXanQ(5M): η επαναφορά του αμινοξέος Gly στη θέση 377 δεν είναι ικανή να οδηγήσει σε διπλή εξειδίκευση

Στο γονίδιο ancxanQ(5M) που φέρει τις 5 μεταλλάξεις και δεν μεταφέρει γουανίνη, έγινε επαναφορά του ενός αμινοξέος (θέση 377) σε αυτό που φέρει κανονικά ο AncXanQ. Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση που έχουν οι 4 μόνο αλλαγές, δηλαδή με διατήρηση του αμινοξέος στην θέση 377. Στον προγονικό AncXanQ με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση, προέκυψε ο AncXanQ(4M), από τον AncXanQ(5M), όπου η σερίνη, που έφερε, αντικαθίσταται από γλυκίνη (Εικόνα 3.25).

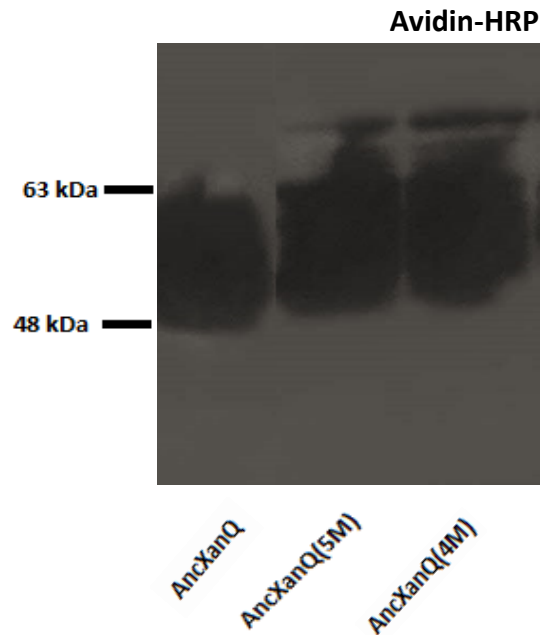
	27	116	191	312	377
AncXanQ	SAYTHLL	DAMIS	LGLSL	IATATL	LMFGMIA
AncXanQ(5M)	GAYTHLL	DLMIS	LGLGL	IASAL	LMFSMIA
AncXanQ(4M)	GAYTHLL	DLMIS	LGLGL	IASAL	LMFGMIA

Εικόνα 3.25 Αμινοξέα στις πέντε θέσεις που φέρουν οι αντίστοιχες κατασκευές, μετά από στοχευμένη μεταλλαξιγένεση με PCR, στις οποίες θα μελετηθεί η επίδραση των 4 θέσεων στην αναγνώριση υποστρώματος και στην εξειδίκευση του μεταφορέα. Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

Γίνεται επαναφορά του αμινοξέος στη θέση 377 με PCR, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (βλ. 2.5.2) και ως υπόστρωμα το γονίδιο ancxanQ για να προκύψει το ancxanQ(4M) και

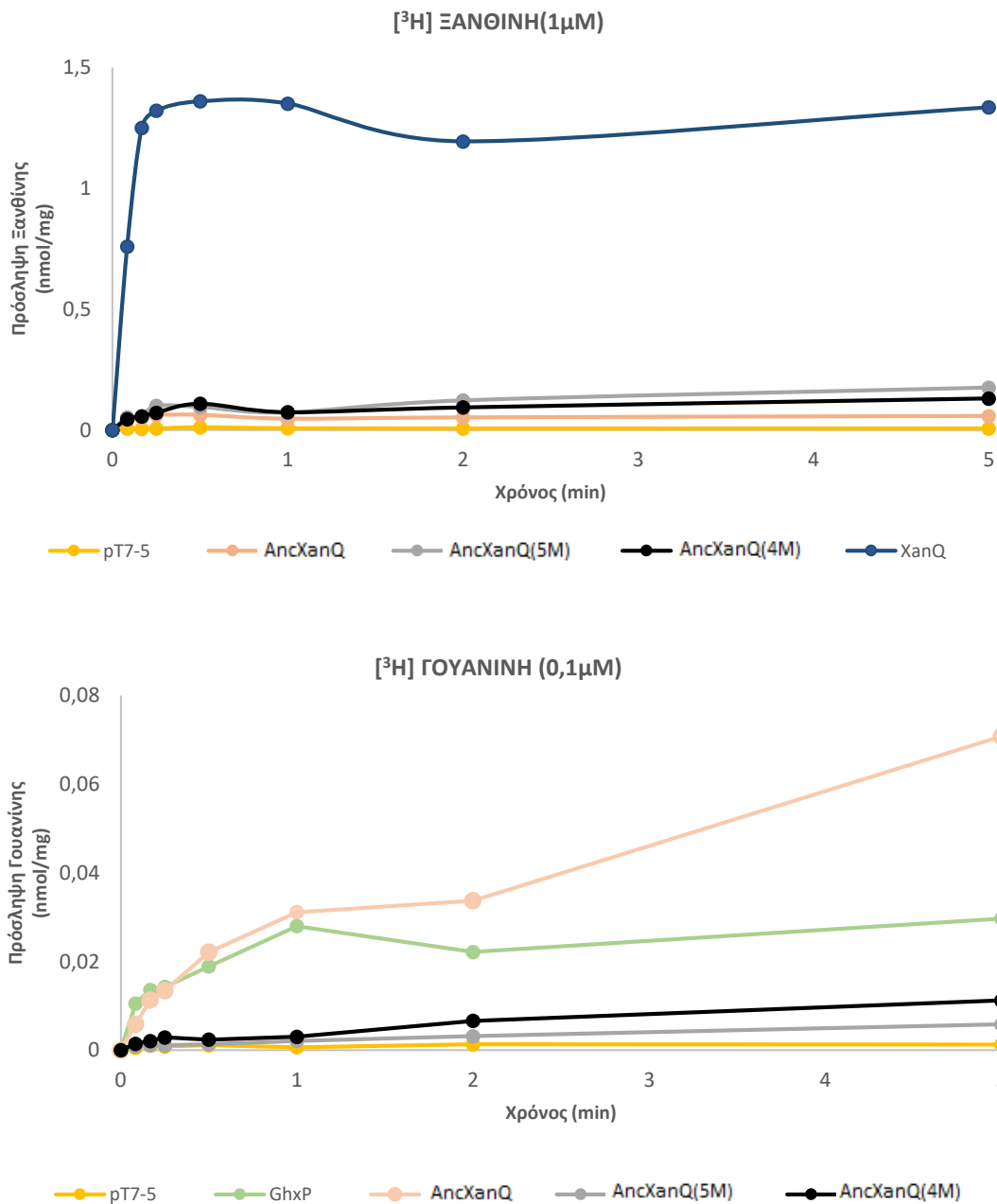
εισάγεται σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD, που φέρει τον υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (lacZ p/o), μέσω του οποίου γίνεται δυνατή η υπερέκφραση του μεταφορέα με την χρήση IPTG, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* T184.

Ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη (Εικόνα 3.26).



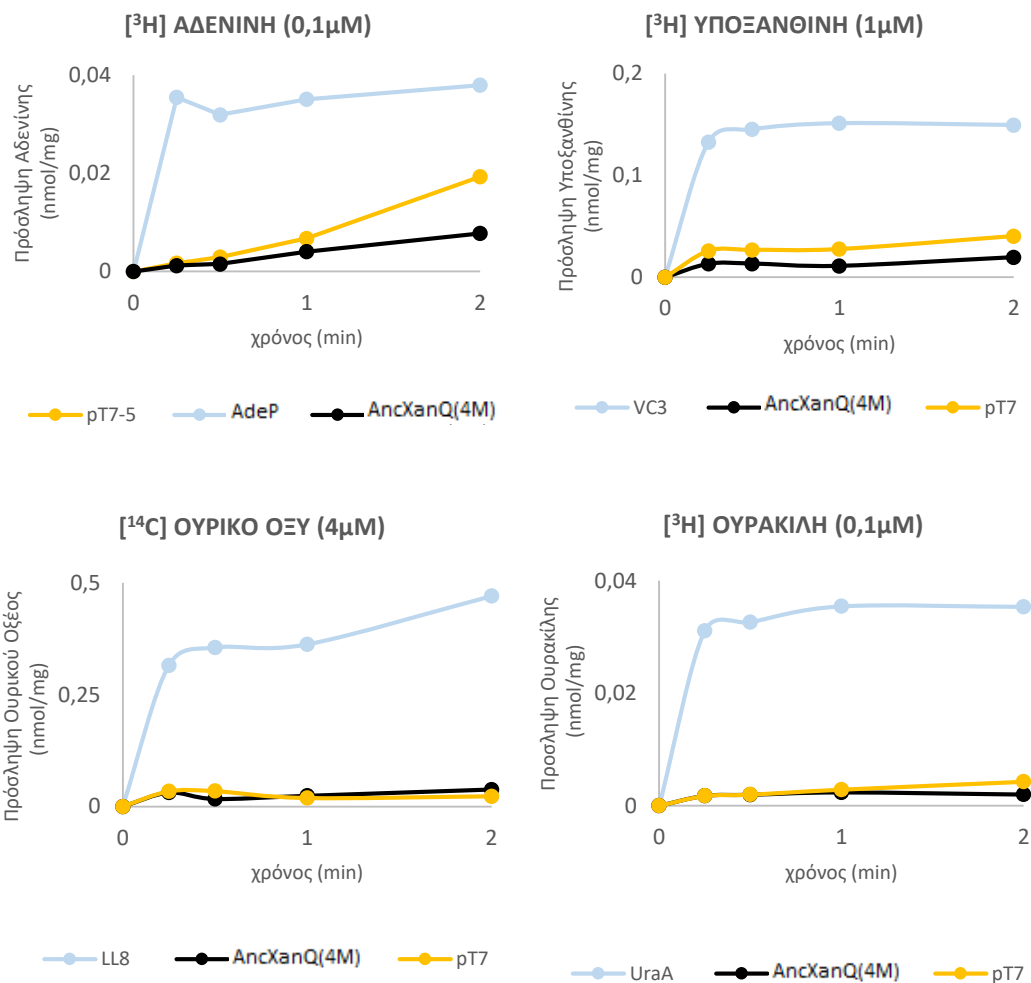
Εικόνα 3.26 Έκφραση του ApcXanQ(4M). Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την κατασκευή από πλασμίδια pT7-5/apcXanQ(4M), αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Πειράματα ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης και [³H]γουανίνης, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E.coli* (T184 για ξανθίνη και *ΔghxP* για γουανίνη), έδειξαν ότι ο ApcXanQ(4M), μεταφέρει μόνο την ξανθίνη (Εικόνα 3.27).



Εικόνα 3.27 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μΜ) και [³H] γουανίνης (0,1μΜ), για τον AncXanQ(4M). Το γονίδιο, μετά την εισαγωγή της μετάλλαξης, εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Ακολουθεί ο μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* K-12 (T184 και ΔghxP), υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ* p/o και τέλος η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, XanQ και GhxP, αντίστοιχα.

Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς για εναλλακτικά υποστρώματα, ραδιενεργά σημασμένα, όπως ουρικό οξύ (σε κύτταρα *E.coli* T184), αδενίνη και υποξανθίνη (*E.coli* AdeP) και ουρακίλη (*E.coli* DuraA), έδειξαν ότι δεν κανένα δεν μεταφέρονταν (Εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.28 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης [³H] αδενίνης (0,1μΜ), [³H] υποξανθίνης (1μΜ), [¹⁴C] ουρικού οξέος (4μΜ) και [³H] ουρακίλης (0,1μΜ). Η αλληλουχία απομονώθηκε από το γονιδίωμα και εισάχθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (*ΔadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη T184 για ουρικό οξύ, και *UraA* για ουρακίλη), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή *lacZ p/o* και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς του αντίστοιχου ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας αδενίνης (*AdeP*), υποξανθίνης (*VC3*), ουρικού οξέος (*LL8*) και ουρακίλης (*UraA*).

3.2.4.1 Ο AncXanQ(4M) έχει μειωμένη συγγένεια για την ξανθίνη συγκριτικά με τον AncXanQ(5M)

Ακολούθησε κινητική ανάλυση για τη μεταφορά ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης. Φαίνεται ότι ο AncXanQ(4M) είναι μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας, αλλά χωρίς την αλλαγή στη θέση 377, μειώνεται η συγγένεια με ξανθίνη σε σχέση με του AncXanQ(5M), με K_M 9,6 ± 0,8μΜ, σχεδόν υποδιπλάσιο. Όσον αφορά στην ταχύτητα, δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή, μετά την επαναφορά του ενός αμινοξέος (Πίνακας 3.10).

Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [³H] Ξανθίνης

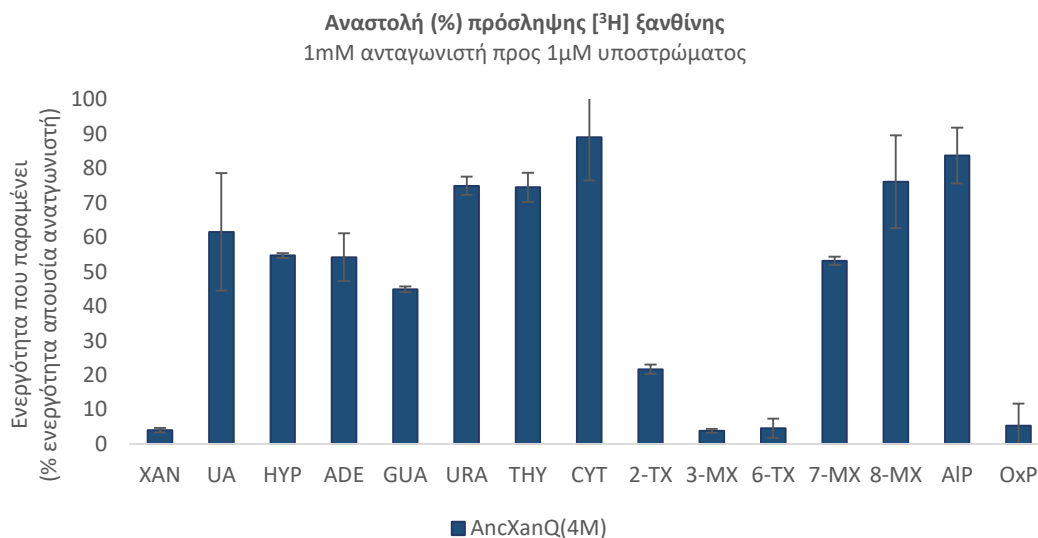
	K_M (μM)	V_{max} (nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_M (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
AncXanQ	6,5 ± 0,5	2,3 ± 0,06	354
AncXanQ(5M)	4,4 ± 0,8	3,9 ± 0,2	886
AncXanQ(4M)	9,6 ± 0,8	4,9 ± 0,2	510

Πίνακας 3.9 Τιμές K_M και V_{max} για τον AncXanQ(4M). Κύτταρα *E.coli* T184 που έχουν τον μεταφορέα, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (0,1–40μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

3.2.4.2 Το προφίλ Εξειδίκευσης του AncXanQ(4M) διαφοροποιείται ελάχιστα από αυτό του AncXanQ(5M)

Η επίδραση της μονής αντικατάστασης στον AncXanQ(5M) στην εξειδίκευση μελετήθηκε περαιτέρω, για να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζει την αναγνώριση υποστρώματος. Για το λόγο αυτό έγιναν πειράματα πρόσληψης [³H]ξανθίνης, σε συγκέντρωση 1μM, παρουσία μοριακής περίσσειας άλλων προσδετών (1mM), δομικών αναλόγων του επιβεβαιωμένου υποστρώματος.

Από τα παρακάτω διαγράμματα, όπου αναστολή πρόσληψης ξανθίνης επιτεύχθηκε παρουσία 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλοξανθίνης, 6-θειοξανθίνης και οξυπουρινόλης, προκύπτει το προφίλ εξειδίκευσης. Η διαφορά με τον AncXanQ(5M) εντοπίζεται στο ότι αναγνωρίζει επιπρόσθετα την 7-μεθυλοξανθίνη, ενώ ο AncXanQ, που εμφανίζει και την πιο ευρεία εξειδίκευση, αναγνωρίζει επιπλέον την 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη (Εικόνα 3.29).



Εικόνα 3.29 Προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος AncXanQ(4M). Κύτταρα *E.coli* T184, που έχουν μετασηματιστεί με την κατασκευή, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (5και 15sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50} / (1 + (L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Για τα ανάλογα που αναγνωρίζονται, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση και υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής, K_i, για την πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.10).

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] Ξανθίνης

	GUA	2-TX	3-MX	6-TX	OXP	7-MX	8-MX
AncXanQ	85,8	122,2	100,3	26,1	9,3	234,3	7,1
AncXanQ(5M)	nd	79,8	61,2	46,4	113,6	113,6	nd
AncXanQ(4M)	nd	30,3	17,4	2,8	2,7	nd	nd

Πίνακας 3.10 Τιμές K_i κατά την αναστολή πρόσληψης ξανθίνης από τον AncXanQ(4M). Κύτταρα *E.coli* T184, που έχουν μετασηματιστεί με την κατασκευή, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (5και 15sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50} / (1 + (L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Από τον Πίνακα 3.10, φαίνεται πως ο AncXanQ(4M), που διαθέτει γλυκίνη στη θέση 377 (G377), όπως ο AncXanQ, αναγνωρίζει λιγότερα ανάλογα ξανθίνης από τον AncXanQ(5M), αν και τα αναγνωρίζει καλύτερα. Ειδικά για τις 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη, η αύξηση της συγγένειας είναι πολύ σημαντική (K_i 2,8 και 2,7μM, αντίστοιχα).

3.2.5 Στο υπόβαθρο του XanQ(5M): η επαναφορά της Ser στη θέση 377 δεν αλλάζει την εξειδίκευση του μεταφορέα

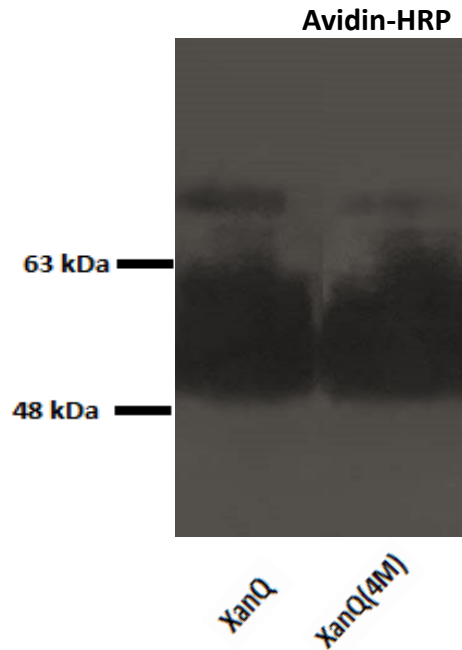
Στον XanQ(5M), ο οποίος έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά και μεταφέρει μόνο ξανθίνη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα), έγινε επαναφορά του ενός αμινοξέος της θέσης 377, σε αυτό που διαθέτει η σύγχρονη πρωτεΐνη, ώστε προκύπτει ουσιαστικά η περμεάση με τέσσερα από τα πέντε αμινοξέα της προγονικής (S27, A116, S191, T312, S377) και θα αναφέρεται ως XanQ(4M).

	27	116	191	312	377
XanQ	GAITHLL	ELIMSSI	GVGLL	IASAV	LMFSMIA
XanQ(5M)	SAITHLL	EAIMSSI	GVSLI	IATAV	LMFGMIA
XanQ(4M)	SAITHLL	EAIMSSI	GVSLI	IATAV	LMFSMIA

Εικόνα 3.30 Οι διαφορές στις 5 θέσεις αμινοξέων μεταξύ των τριών κατασκευών. Ο XanQ(5M) έχει τα αμινοξέα που έχει και ο AncXanQ, στις αντίστοιχες θέσεις, ενώ στον XanQ(4M) η Gly377 έχει αντικατασταθεί από σερίνη, που βρίσκεται στον XanQ. Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

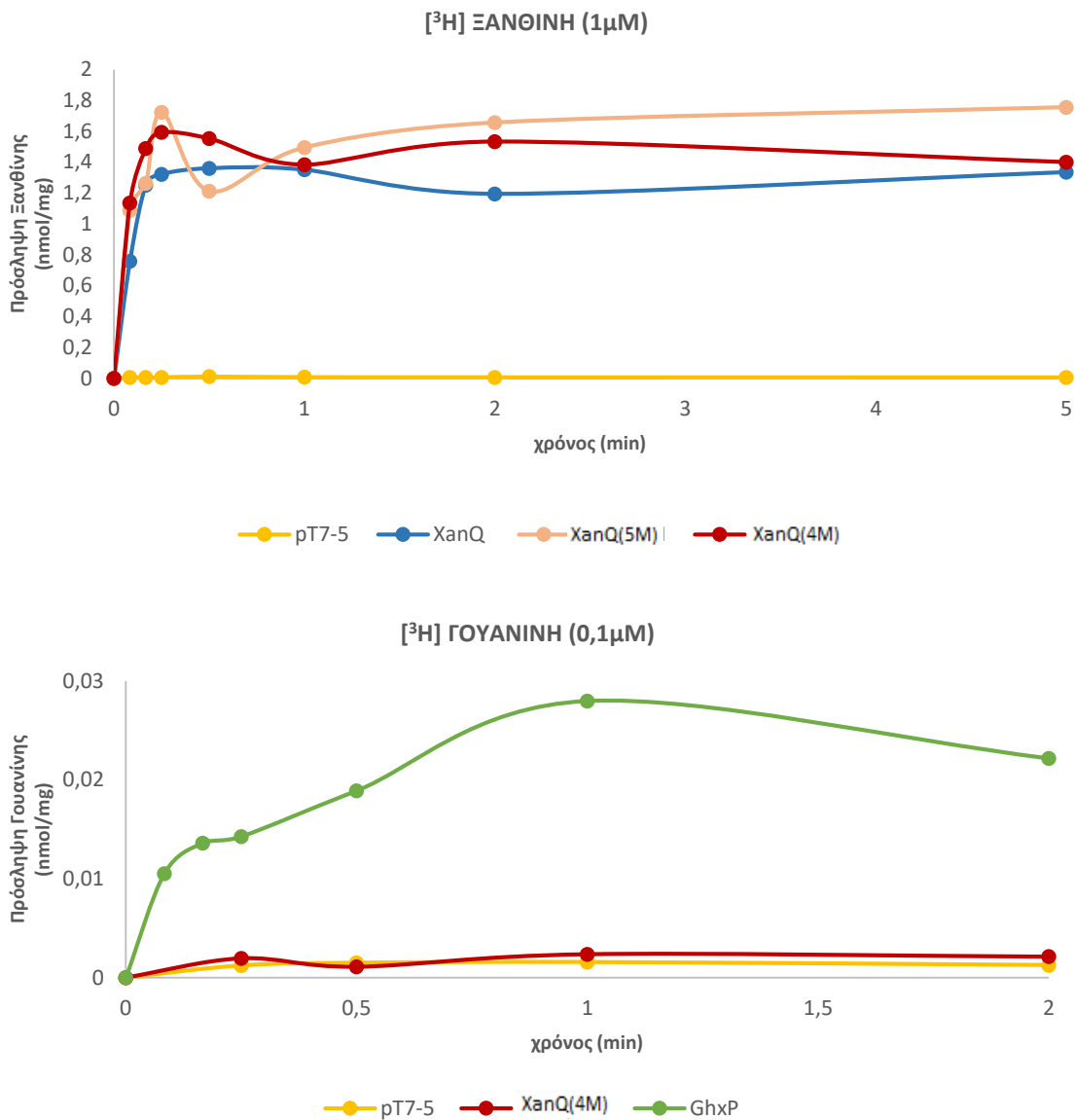
Μετά την επαναφορά της σερίνης στη θέση 377, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (βλ. 2.5.2) και ως υποστρώματα το γονίδιο *xanQ(5M)*, από το οποίο προέκυψε το *xanQ(4M)*, ακολούθησε η ένθεσή τους σε πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Υπό τον έλεγχο του υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (lacZ p/o), γίνεται υπερέκφραση του μεταφορέα με την χρήση IPTG, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E. coli* T184.

Ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα στην κυτταρική μεμβράνη, με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 3.31*.



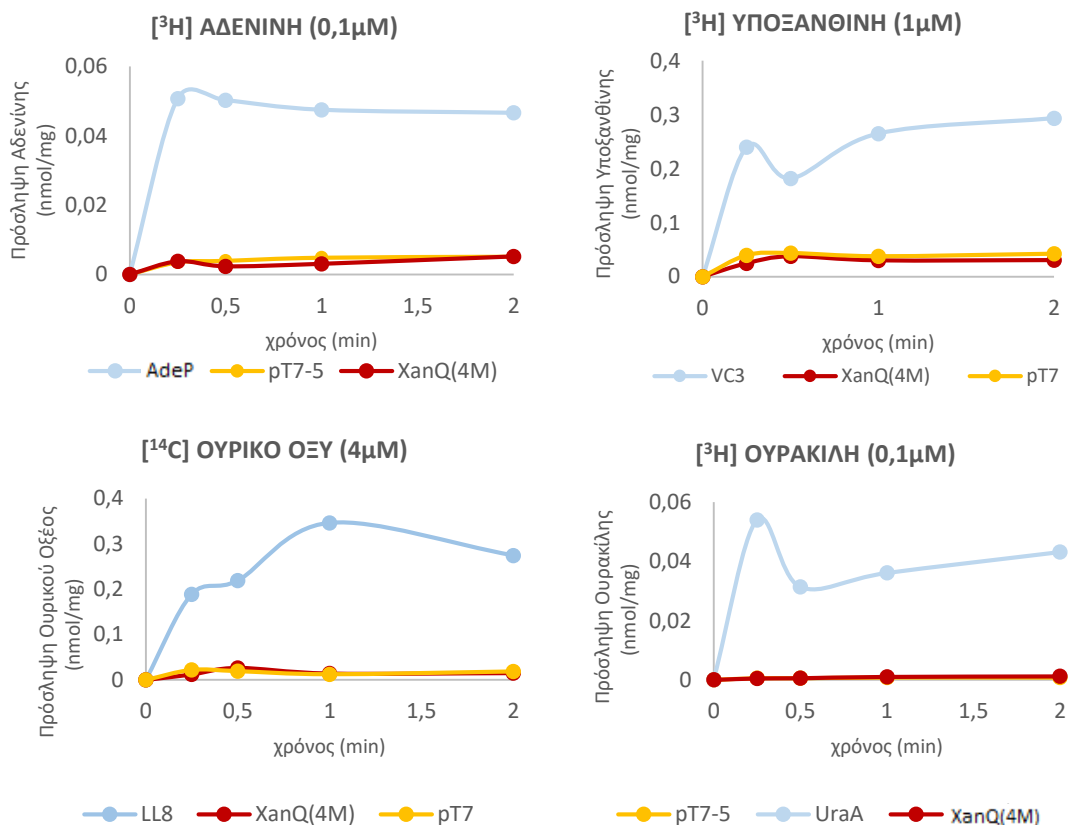
Εικόνα 3.31 Έκφραση του *XanQ(4M)*. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την κατασκευή από πλασμίδιο *pT7-5/xanQ(4M)*, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (*avidin-HRP*), σε αρραίωση 1:50000. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Πειράματα ενεργού μεταφοράς διάφορων υποστρωμάτων, μετά από μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων *E. coli* (T184 για ξανθίνη και ουρικό οξύ, *DghxP* για γουανίνη, *ΔadeP* για αδενίνη και υποξανθίνη και *ΔuraA* για ουρακίλη) έδειξαν ότι οι τέσσερις αλλαγές (S27, A116, S191 και T312) που παραμένουν στον *XanQ(4M)*, ενώ στη θέση 377 υπάρχει σερίνη, όπως στον *XanQ* φυσικού τύπου, δεν μπορούσαν να οδηγήσουν σε διπλή εξειδίκευση (Εικόνα 3.32).



Εικόνα 3.32 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μΜ) και [³H] γουανίνης (0,1μΜ), για τον XanQ(4M). Τα γονίδια, μετά την εισαγωγή της μετάλλαξης, εισάχθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* K-12 (T184 και ΔghxP), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή lacZ p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς ραδιοενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, XanQ και GhxP, αντίστοιχα.

Ακόμη, δε μετέφερε τα υπόλοιπα υποστρώματα: αδενίνη, υποξανθίνη, ουρικό οξύ και ουρακίλη (Εικόνα 3.33).



Εικόνα 3.33 Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης [³H] αδενίνης (0,1μΜ), [³H] υποξανθίνης (1μΜ), [¹⁴C] ουρικού οξέος (4μΜ) και [³H] ουρακίλης (0,1μΜ). Μετά την εισαγωγή μετάλλαξης, τα γονίδια εισάχθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD. Μετά από μετασηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* K-12 (ΔadeP για αδενίνη και υποξανθίνη T184 για ουρικό οξύ, και ΔuraA για ουρακίλη), γίνεται υπερέκφραση υπό τον εκκινητή lacZ p/o και ακολουθεί η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς του αντίστοιχου ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός μεταφορέας αδενίνης (AdeP), υποξανθίνης (VC3), ουρικού οξέος (LL8) και ουρακίλης (UraA).

3.2.5.1 Η κινητική ανάλυση υπέδειξε ότι ο XanQ(4M) είναι πιο αποτελεσματικός μεταφορέας ξανθίνης από τον XanQ

Η κινητική ανάλυση για τη μεταφορά ξανθίνης έδειξε ότι ο XanQ(4M) είναι μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας, με K_M $6,0 \pm 1,8$ μΜ, αλλά χαμηλότερης από τον XanQ φυσικού τύπου. Όσον αφορά στην ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης για τον XanQ(4M), η τιμή ήταν περίπου 13 φορές μεγαλύτερη ($93,8 \pm 9,3$ nmolmin⁻¹mg⁻¹) σε σχέση με του XanQ και περίπου διπλάσια από του XanQ(5M).

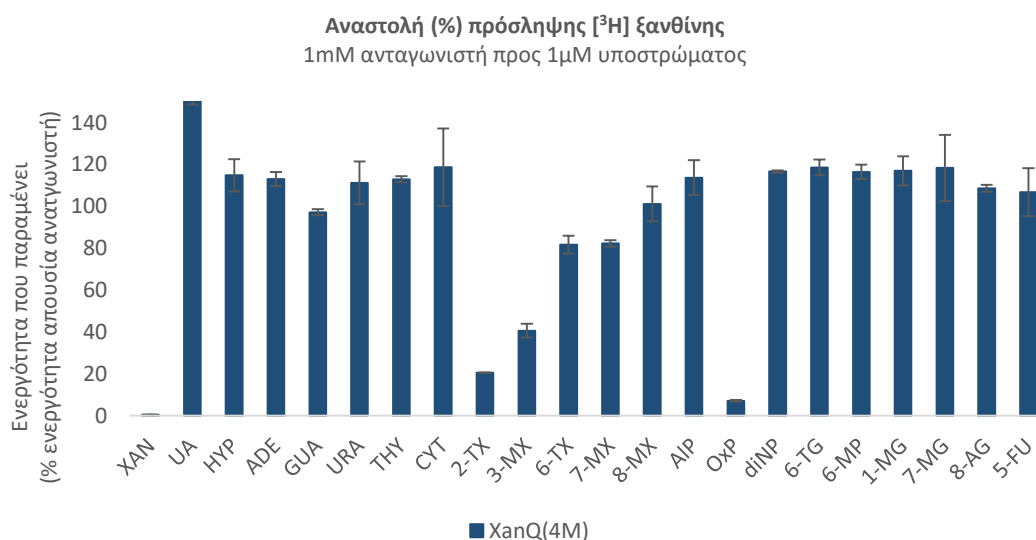
Κινητική Ανάλυση Μεταφοράς [³H] Ξανθίνης

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
XanQ	$4,1 \pm 0,5$	$7,2 \pm 1,1$	1.756
XanQ(5M)	$3,5 \pm 0,8$	$46,7 \pm 3$	13.342
XanQ(4M)	$6,0 \pm 1,8$	$93,8 \pm 9,3$	15.633

Πίνακας 3.11 Τιμές K_M και V_{max} του XanQ(4M). Κύτταρα *E.coli* T184 που έχουν τον μεταφορέα, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (0,1–40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

3.2.5.2 Ο XanQ(4M) διαφέρει από τον XanQ(5M) και τον XanQ στην αναγνώριση της 6-θειοξανθίνης

Για την καλύτερη κατανόηση της σημασίας της αντικατάστασης ενός αμινοξέος στη διατήρηση της εξειδίκευσης του τετραπλού μεταλλάγματος XanQ(4M), έγιναν πειράματα πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) στον XanQ(4M), παρουσία μοριακής περίσσειας μοριακών αναλόγων της ξανθίνης (1mM). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο XanQ (4M) αναγνώριζε την 2-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη, και επιπλέον την 3-μεθυλοξανθίνη, αλλά όχι τη γουανίνη και την 6-θειοξανθίνη (Εικόνα 3.34). Σε σχέση με το προφίλ εξειδίκευσης του XanQ, αυτό αναγνωρίζει τα τέσσερα από τα ανάλογα: 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη και οξυπουρινόλη, αλλά όχι τη γουανίνη (Karena *et al.*, 2015).



Εικόνα 3.34 Προφίλ εξειδίκευσης του XanQ(4M). Κύτταρα *E.coli* T184, που εκφράζουν τον XanQ(4M), υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM). Οι αρχικές ταχύτητες (15 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες.

Στη συνέχεια, για τα ανάλογα που αναγνωρίζονται, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση και υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής, K_i , για την πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης, όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.12.

K_i (μM) για την αναστολή πρόσληψης [^3H] Ξανθίνης

	GUA	2-TX	3-MX	6-TX	OXYP
XanQ	nd	91	72	41	37
XanQ(5M)	nd	57,2	72,5	35,4	25
XanQ(4M)	nd	95,4	31,4	nd	56,7

Πίνακας 3.12 Τιμές K_i κατά την αναστολή πρόσληψης ξανθίνης από τον XanQ(4M). Κύτταρα *E.coli* T184, που έχουν μετασηματιστεί με την κατασκευή, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1 μM -1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες (5και 15sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC_{50} προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το K_i υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

Από τις τιμές των K_i (Πίνακας 3.12), φαίνονται διαφορές στην ικανότητα κάποιων μοριακών αναλόγων ξανθίνης να αναστείλουν την πρόσληψή της. Η κυριότερη διαφορά παρατηρείται στην 6-θειοξανθίνη, που δεν αναγνωρίζεται τόσο καλά από τον XanQ(4M), ενώ η 3-μέθυλοξανθίνη φαίνεται να αναγνωρίζεται καλύτερα, σε σύγκριση με τον XanQ και τον XanQ(5M).

Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η περμεάση XanQ ανήκει στην εξελικτικά ευρεία οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 (Nucleobase: Cation Symporter-2), που περιλαμβάνει μεταφορείς για την αναγνώριση και πρόσληψη πολύ σημαντικών μεταβολιτών, καθώς και κυτταροτοξικών αναλόγων τους. Τα περισσότερα μέλη της που έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά είναι μεταφορείς ξανθίνης/ ουρικού και ανήκουν σε φυλογενετικά ξεχωριστό κλάδο (cluster) της οικογένειας. Η πολύ συντηρημένη μοριακή αρχιτεκτονική αυτών των μεταφορέων, όπως φαίνεται από κρυσταλλογραφικές αναλύσεις (Alguel *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) και αναλύσεις μοριακής δυναμικής (Karena *et al.*, 2015; Kostı *et al.*, 2012) συνδυάζεται με ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών εξειδικεύσεων των μεταφορέων αυτών, τόσο στα βακτήρια όσο και στα ευκάρια (μύκητες, φυτά, μετάζωα), που έχουν μελετηθεί.

Στο εργαστήριό μας τα τελευταία χρόνια μελετώνται διεξοδικά οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων σε βακτήρια. Έχει προηγηθεί ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του XanQ στην *E.coli* K-12 που είναι ένας ειδικός μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας (Karatzı and Frillingos, 2005). Ο XanQ ανήκει στον κλάδο NAT/COG2233, όπου ανήκουν και άλλες περμεάσες, που επίσης αναγνωρίζουν 2-οξυ-πουρίνες (ξανθίνη, ουρικό οξύ), ενώ σε διαφορετικό κλάδο (AzgA-like/COG2252) ανήκουν περμεάσες, που αναγνωρίζουν πουρίνες, χωρίς κετο-ομάδα στη θέση C2 (γουανίνη, υποξανθίνη, αδείνη).

Μετά από εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση (Karena *et al.*, 2015), έχουν εντοπιστεί σημαντικά αμινοξέα στο κέντρο δέσμευσης, αλλά και περιμετρικά αυτού, τα οποία επηρεάζουν την ικανότητα μεταφοράς και το προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα XanQ. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν είχαν εντοπιστεί θέσεις στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, καθοριστικές για την εξειδίκευση της περμεάσης, όπου η αλλαγή αμινοξέων θα οδηγούσε σε τροποποίησή της. Λίγες μεταλλάξεις, εκτός του κέντρου δέσμευσης, επιτρέπουν την αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης, διαφορετικών από αυτά που αναγνωρίζει ο XanQ φυσικού τύπου, αλλά δεν προσδέονται ισχυρά. Συνολικά, καμία αλλαγή αμινοξέος σε οποιαδήποτε θέση στην αλληλουχία της σύγχρονης πρωτεΐνης δεν οδήγησε σε τροποποίηση της εξειδίκευσης, προς την αναγνώριση και μεταφορά γουανίνης. Έτσι, ο XanQ μεταφέρει ξανθίνη και αναγνωρίζει μια σειρά αναλόγων ξανθίνης (2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη), ενώ δεν μεταφέρει, ούτε αναγνωρίζει τη γουανίνη (Karena *et al.*, 2015).

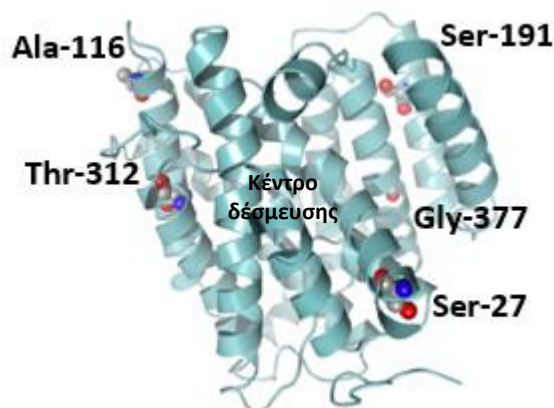
Πρόσφατα, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά μία εξελικτική στρατηγική, η μέθοδος της Ανασύστασης Προγονικών Πρωτεϊνών (Thornton 2010), στη μελέτη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η ανασύσταση της προγονικής πρωτεΐνης, AncXanQ, κοινού προγόνου της υπο-ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης NAT/NCS2, που αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα XanQ της *E.coli*, και έπειτα ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της, έδωσαν πολύ

σημαντικές νέες πληροφορίες. Αρχικά, η προγονική πρωτεΐνη εμφανίζει διπλή εξειδίκευση, αναγνωρίζει και μεταφέρει τόσο ξανθίνη όσο και γουανίνη. Κανένα από τα σύγχρονα ομόλογα βακτηριακών μεταφορέων ξανθίνης της ομάδας ξανθίνης/ ουρικού (XanQ/ UapA) του κλάδου NAT/COG2233, που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, δεν έχει δείξει αντίστοιχη ικανότητα αναγνώρισης, ούτε μεταφοράς γουανίνης. Αντίθετα, οι χαρακτηρισμένοι βακτηριακοί μεταφορείς γουανίνης ανήκουν στον κλάδο AzgA-like/COG2252 και παρόλη την δομική ομοιότητα της ξανθίνης με τη γουανίνη, δεν έχει χαρακτηριστεί άλλος σύγχρονος βακτηριακός μεταφορέας, που να έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί και τις δύο ενώσεις ως υποστρώματα. Η μετάλλαξη S68T στον *E.coli* XanQ, οδηγεί σε μετάλλαγμα, όπου ενώ δεν επηρεάζεται η συγγένεια με την ξανθίνη σε σχέση με το XanQ φυσικού τύπου, αναγνωρίζει οριακά γουανίνη, αλλά η γουανίνη δεν μεταφέρεται από το μετάλλαγμα αυτό (Karena *et al.*, 2015).

Μέχρι σήμερα, μελέτες με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση σε άλλα βακτηριακά ομόλογα του κλάδου δεν είχαν οδηγήσει σε σημαντική τροποποίηση της εξειδίκευσης. Όσον αφορά στα ευκαρυωτικά ομόλογα, ο μεταφορέας UapC του μύκητα *Aspergillus nidulans* είναι ευρείας εξειδίκευσης μεταφορέας ουρικού οξέος/ ξανθίνης. Ακόμη, ο UapA είναι υψηλής εξειδίκευσης μεταφορέας ουρικού οξέος-ξανθίνης του *A. nidulans*, για τον οποίο έχουν αναφερθεί μεταλλάγματα, όπως στη θέση Q408, όπου η αντικατάσταση της γλουταμίνης από γλουταμικό οξύ (Q408E), οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια για ξανθίνη και ουρικό οξύ, αλλά και το μετάλλαγμα αναγνωρίζει επιπλέον τη γουανίνη και την υποξανθίνη (Koukaki *et al.*, 2005), ενώ ίδια επίδραση έχουν και οι συνδυαστικές αλλαγές Q408E/T526M και Q408E/T526L (Papageorgiou *et al.*, 2008). Το Q408 βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης και θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με άλλα στοιχεία, εκτός αυτού, τα οποία δρουν ως «φίλτρα», που ελέγχουν την είσοδο προσδετών και επηρεάζουν την πρόσβαση υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης και άρα την εξειδίκευση (Diallinas, 2014). Άλλα μεταλλάγματα, με μονή εισαγωγή μετάλλαξης ή συνδυασμό μεταλλάξεων, στις θέσεις V463I (Kosti *et al.*, 2010), R481G/T526M (Kosti *et al.*, 2010), E356D/T526 (Papageorgiou *et al.*, 2008), και διπλά μεταλλάγματα στη θέση F528 (Q113L/F528S, F406Y/F528S, A441V/F528S, V463I/F528S, A469E/F528S, R481G/F528S, R481L/F528S, R481Q/F528S) (Kosti *et al.*, 2010, Alguet *et al.*, 2016), έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν γουανίνη και υποξανθίνη και άλλα ανάλογα (ουρακίλη ή αδενίνη, κατά περίπτωση). Δεν έχει αναφερθεί, όμως, η ικανότητα μεταφοράς γουανίνης από κανένα μετάλλαγμα μέχρι σήμερα.

Επίσης, από τη σύγκριση της αλληλουχίας του AncXanQ με τον σύγχρονο XanQ, εντοπίστηκαν πέντε θέσεις (27, 116, 191, 312, 377) με διαφορετικά αμινοξέα, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν καθοριστικές για την αλλαγή εξειδίκευσης. Από αυτές καμία δεν βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης, αλλά όλες είναι περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης του υποστρώματος. Ο εντοπισμός των

πέντε αυτών διαφορετικών αμινοξέων αποτέλεσε έναυσμα για τη μελέτη και το λειτουργικό χαρακτηρισμό του **NmXanQ**, ομόλογου της οικογένειας NAT/NCS2 από το παθογόνο πρωτεοβακτήριο *Neisseria meningitidis*, αντιπροσωπευτικό ενός υπο-κλάδου, που στις πέντε σημαντικές θέσεις, όπως αυτές προέκυψαν από την ανασύσταση προγονικής αλληλουχίας, έχει ίδια αμινοξέα με τον κοινό προγονικό μεταφορέα, ApcXanQ (S27, A116, S191, T312, G377), όπως φαίνεται στο δομικό μοντέλο του NmXanQ παρακάτω (Εικόνα 4.1). Αποδείχθηκε ότι μεταφέρει **ξανθίνη**, αλλά με σχετικά μικρή ταχύτητα (όχι όσο αποτελεσματικά όσο ο XanQ της *E.coli*), αλλά μπορεί επιπλέον να μεταφέρει και τη **γουανίνη**, η οποία δεν μεταφέρεται ούτε αναγνωρίζεται ως προσδέτης από τον *E.coli* XanQ (Εικόνα 3.5). Μελετήθηκε στη συνέχεια το προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ, και βρέθηκε ότι ενώ αναγνωρίζει τη γουανίνη επιπλέον, δε διαφέρει από το XanQ στα ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζει (2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη). Αναγνωρίζει επίσης γουανίνη και ανάλογα γουανίνης, τα οποία, όμως είναι λιγότερα σε σύγκριση με αυτά που αναγνωρίζει ο ApcXanQ (υποξανθίνη, 1-μεθυλογουανίνη, 6-θειογουανίνη και 6-μερκαπτοπουρίνη) και αναγνωρίζονται όλα με χαμηλότερη συγγένεια σε σχέση με τον ApcXanQ (Εικόνες 3.7 και 3.8 και Πίνακας 3.2). Έτσι, η συνδυαστική παρουσία των πέντε αμινοξέων, που συντηρούνται και στον ApcXanQ, σε ένα σύγχρονο μοριακό υπόβαθρο, του NmXanQ, δείχνει να μπορεί να υποστηρίξει τη διεύρυνση εξειδίκευσης, προς την κατεύθυνση της ευρύτερης εξειδίκευσης της προγονικής πρωτεΐνης.



Εικόνα4.1 Δομικό μοντέλο του μεταφορέα NmXanQ. Σημειώνονται οι θέσεις των πέντε αμινοξέων, που αντιστοιχούν με αυτά του προγονικού ApcXanQ. Το μοντέλο προκύπτει από τη δομική μοντελοποίηση του NmXanQ, με βάση το πρότυπο της κρυσταλλικής δομής του ομόλογου του UraA (PDB ID 5XLS) (Yu et al., 2017), στην κλειστή διαμόρφωση (occluded) με το SWISS-MODEL και η απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα PyMol.

Οι μεταφορείς XanQ και ApcXanQ και NmXanQ μελετήθηκαν στη συνέχεια με μεταλλαξιγένεση, ώστε να διερευνηθεί η μοριακή βάση των διαφορών εξειδίκευσης. Επιλέχθηκε να μελετηθεί συγκεκριμένα η επίδραση μίας εκ των πέντε θέσεων της θέσης 377 (TM12), στην ενεργότητα και την εξειδίκευση. Η θέση 377 (βλ. Εικόνα 4.1) δεν βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης και δεν είχε

παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες να επηρεάζει την εξειδίκευση του XanQ. Σημαντική όμως έχει χαρακτηριστεί η Phe376, που αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα και την πλευρική αλυσίδα του Glu324, ενώ το σύστημα αυτό σταθεροποιείται περαιτέρω με ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου που περιλαμβάνει και άλλα αμινοξέα (Thr-320 (α 10), Glu-272 (TM8), Ser-95 (α 3)) (Karena et al., 2015). Επίσης, ως υδρόφοβο και ογκώδες κατάλοιπο της δομικής περιοχής εισόδου (gate domain), και συγκεκριμένα στη διεπιφάνεια μεταξύ αυτής και της δομικής περιοχής πυρήνα (core domain), η Phe376 υφίσταται σημαντικούς περιορισμούς στις επιτρεπόμενες αλλαγές αμινοξέος (στερεοχημική παρεμπόδιση), όπως έχει προκύψει από πειράματα μεταλλαξιγένεσης του XanQ (Karena et al., 2015). Έτσι, θεωρήθηκε πως μια αλλαγή στη θέση 377, και συγκεκριμένα η εισαγωγή σερίνης, που φέρει πλευρική ομάδα, σε αντίθεση με τη γλυκίνη που υπάρχει στη θέση αυτή στον AncXanQ και στον NmXanQ, ή η αντίστροφη αλλαγή στον XanQ, θα μπορούσε να επηρεάζει την εξειδίκευση, για το λόγο αυτό και μελετήθηκε πρώτα.

Η αλλαγή στη θέση 377, όπου η γλυκίνη αντικαθίσταται από σερίνη, στους δύο μεταφορείς που έχουν διπλή εξειδίκευση, AncXanQ και NmXanQ, οδηγεί σε δύο μεταλλάγματα με επίσης διπλή εξειδίκευση. Οι μεταλλαγμένες μορφές των **NmXanQ/G377S** και **AncXanQ/G377S** εξακολουθούν να αναγνωρίζουν ξανθίνη και γουανίνη (Εικόνες 3.11 και 3.16). Αυξάνεται και για τα δύο μεταλλάγματα η συγγένεια για ξανθίνη και μειώνεται για τη γουανίνη, με μικρή διαφορά στην ταχύτητα μεταφοράς, σε σχέση με τους αντίστοιχους μεταφορείς φυσικού τύπου (Πίνακες 3.3 και 3.5). Με άλλα λόγια, υπάρχει μια τροποποίηση προς την κατεύθυνση της καλύτερης αναγνώρισης ξανθίνης σε σχέση με τη γουανίνη, αλλά αυτή είναι πολύ μικρή.

Ως προς το προφίλ εξειδίκευσης, ο AncXanQ/G377S, αναγνωρίζει λιγότερα δομικά ανάλογα ξανθίνης (γουανίνη, 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, οξυπουρινόλη), αλλά με μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με τον AncXanQ (Πίνακας 3.6). Όσον αφορά στα ανάλογα γουανίνης που ανέστειλαν την πρόσληψη γουανίνης, αυτά είναι λιγότερα για τον AncXanQ/G377S αλλά για την 7-μεθυλογουανίνη παρατηρείται πολύ μεγάλη αύξηση της συγγένειας (Πίνακας 3.4). Το μετάλλαγμα NmXanQ/G377S αναγνωρίζει τους ίδιους προσδέτες με τον φυσικού τύπου NmXanQ στα πειράματα ανταγωνισμού έναντι πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης (Εικόνες 3.13 και 3.14). Παρατηρήθηκαν όμως διαφορές στη συγγένεια, κυρίως για την 3-μεθυλοξανθίνη και την οξυπουρινόλη, όπου η αντικατάσταση G377S μειώνει 10-12 φορές την συγγένεια, βάσει των πειραμάτων αναστολής της πρόσληψης ξανθίνης, και για την 6-μερκαπτοπουρίνη, βάσει των πειραμάτων αναστολής της πρόσληψης γουανίνης (Πίνακας 3.4).

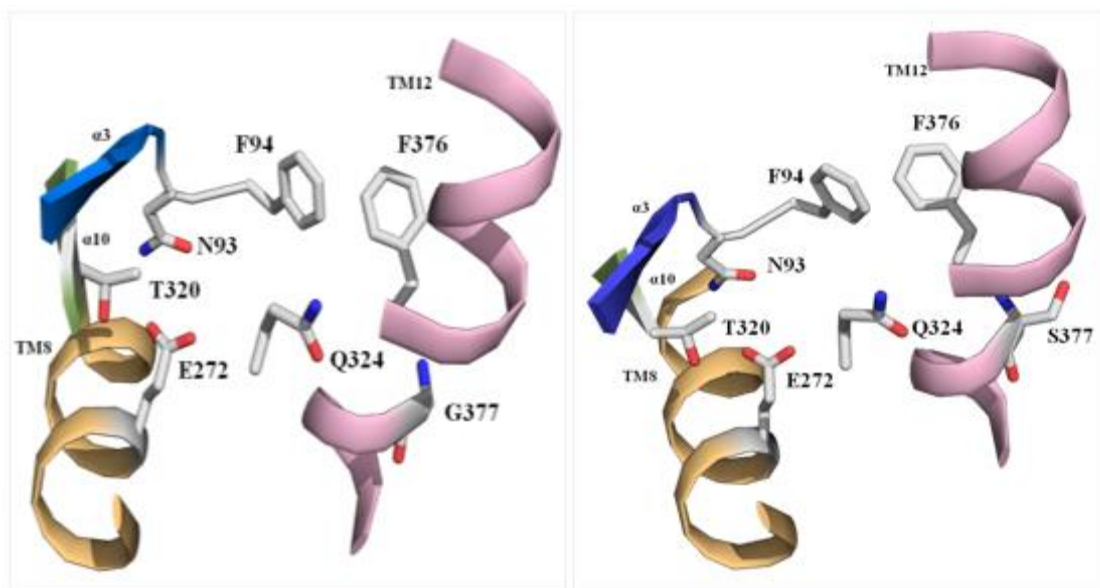
Το μετάλλαγμα **XanQ/S377G**, όπου η σερίνη αντικαθίσταται από γλυκίνη, την οποία φέρει ο AncXanQ στην ίδια θέση, μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη (Εικόνα 3.21), αλλά η ταχύτητα μεταφοράς της γουανίνης ήταν πολύ χαμηλή (Πίνακας 3.7). Επιπλέον, ο μεταλλαγμένος

μεταφορέας XanQ/S377G δεν αναγνωρίζει 3-μεθυλοξανθίνη η οποία αποτελεί προσδέτη για τον XanQ, αλλά αναγνωρίζεται (και μεταφέρεται) η γουανίνη, ενώ 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη αναγνωρίζονται με υψηλότερη συγγένεια (Πίνακας 3.8). Από τα ανάλογα γουανίνης, ανέστειλαν την πρόσληψη γουανίνης η υποξανθίνη, η 1-μεθυλογουανίνη, η 6-θειογουανίνη, η 6-μερκαπτοπουρίνη και η 7-μεθυλογουανίνη, με σχετικά υψηλή συγγένεια (Πίνακας 3.8).

Σε σχέση με την μελέτη της επίδρασης της θέσης 377, σε συνδυασμό με τα αμινοξέα στις υπόλοιπες τέσσερις θέσεις που προέκυψαν από την ανασύσταση του AncXanQ, κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν λειτουργικά τα **XanQ(4M)** και **AncXanQ(4M)**, με βάση τα μεταλλάγματα, XanQ(5M) και AncXanQ(5M), που έχουν ήδη μελετηθεί (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Όσον αφορά στο μετάλλαγμα AncXanQ(4M), ο λειτουργικός του χαρακτηρισμός έδειξε ότι δε μεταφέρει γουανίνη (Εικόνα 3.27), ενώ αναγνώριζε την ξανθίνη με μικρότερη συγγένεια, αλλά τη μετέφερε με μεγαλύτερη ταχύτητα (περίπου διπλάσια) από το AncXanQ (Πίνακας 3.9). Αναγνώριζε τέσσερα ανάλογα ξανθίνης (2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη), όπως το XanQ, και δεν αναγνώριζε κανένα από τα επιπλέον ανάλογα που αναστέλλουν την πρόσληψη ξανθίνης στο AncXanQ (γουανίνη, 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη) (Εικόνα 3.29).

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του XanQ (4M) έδειξε ότι δεν μεταφέρει γουανίνη (Εικόνα 3.32), και η συγγένεια για την ξανθίνη μειώνεται σε σχέση με τον φυσικού τύπου XanQ. Η ταχύτητα αυξάνεται σημαντικά (περίπου 13 φορές αύξηση της V_{max}), ώστε φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικός μεταφορέας από το XanQ (Πίνακας 3.11). Σε σχέση με το προφίλ εξειδίκευσης, αναγνωρίζει την οξυπουρινόλη και την 3-μεθυλοξανθίνη, την τελευταία καλύτερα από το XanQ (Πίνακας 3.12).

Από τις πληροφορίες που έδωσε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των παραπάνω κατασκευών, η διεύρυνση της εξειδίκευσης, που παρατηρείται στο XanQ/S377G, με την αντικατάσταση από γλυκίνη, που δεν διαθέτει πλευρική ομάδα, ίσως εξηγείται από την απουσία στερεοχημικής παρεμπόδισης (steric hindrance) στην πλευρική ομάδα της Phe376. Η παρουσία της γλυκίνης, δηλαδή, ίσως επιτρέπει μεγαλύτερη ευελιξία στην κίνηση του TM12, το οποίο συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων, που παρατηρούνται κατά τη δέσμευση υποστρώματος (Εικόνα 4.2). Κάτι τέτοιο απομένει να διερευνηθεί και με αναλύσεις μοριακής δυναμικής οι οποίες είναι σε εξέλιξη (σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα Ε. Μικρού στο Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ). Η σημασία της παρατήρησης αυτής είναι μεγάλη, καθώς δεν είχε εντοπιστεί, σε προηγούμενες εκτεταμένες μελέτες σε ολόκληρη την αλληλουχία της πρωτεΐνης, καμία αντικατάσταση αμινοξέος που να οδηγεί σε μεταφορά εναλλακτικού υποστρώματος πέρα από ξανθίνη.



Εικόνα 4.2 Διαφορετικά αμινοξέα στη θέση 377 ανάμεσα στο NmXanQ (Gly377), αριστερά, και E. coli XanQ (Ser377), δεξιά. Η ξανθίνη αλληλεπιδρά στο κέντρο δέσμευσης με τα Gln-324, Glu-272, Phe-94 και Ala-323, ενώ η Phe-376 (TM12) εμφανίζει αλληλεπιδράσεις π-π με την ξανθίνη και την αμιδική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του Gln-324 (Karena *et al.*, 2015). Το μοντέλο προκύπτει από τη δομική μοντελοποίηση του NmXanQ και του XanQ, αντίστοιχα, με βάση το πρότυπο της κρυσταλλικής δομής του ομολόγου του UarA (PDB ID 516C) (Alguet *et al.*, 2016), με το SWISS-MODEL και η απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα PyMol.

Σε προηγούμενη ανάλυση μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Karena *et al.*, 2015), το μετάλλαγμα XanQ/S377C είχε αυξημένη ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης σε σχέση με τον φυσικού τύπου XanQ και εμφάνιζε σημαντική απενεργοποίηση (αναστολή ενεργότητας κατά 35%) παρουσία N-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM). Περαιτέρω μεταλλαξιγένεση σε αυτή τη θέση έδειξε ότι η αντικατάσταση της σερίνης από αλανίνη οδηγεί σε έναν μεταφορέα υψηλής ενεργότητας XanQ/S377A, ο οποίος μάλιστα είχε σχεδόν ίδια συγγένεια για την ξανθίνη με τον φυσικού τύπου XanQ και όχι σημαντική διαφορά στο προφίλ εξειδίκευσης, ως προς τα ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζει. Ακόμη, κατασκευάστηκε το μετάλλαγμα XanQ/S377T και ήταν ανενεργό (Karena *et al.*, 2015).

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, αξιοποιήθηκαν πληροφορίες που προέκυψαν από τη σύγκριση της προγονικής πρωτεΐνης με αυτές που διαθέτουμε για σημερινούς χαρακτηρισμένους μεταφορείς (δομικές και λειτουργικές), και εντοπίστηκαν θέσεις αμινοξέων που συμβάλλουν στον καθορισμό της εξειδίκευσης και δεν είχαν αποκαλυφθεί στις προηγούμενες μελέτες. Είναι σημαντικό, λοιπόν, να αναφερθεί πως η ανάδειξη της σημασίας της θέσης 377 και συγκεκριμένα της αντικατάστασης από γλυκίνη, στην αναγνώριση και μεταφορά του υποστρώματος, που οδηγεί, μάλιστα, σε τροποποίηση εξειδίκευσης, προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου Ανασύστασης Προγονικών Πρωτεϊνών (APR), μετά τον εντοπισμό των διαφορών στην αμινοξική αλληλουχία του σύγχρονου εξειδικευμένου για ξανθίνη μεταφορέα, XanQ, και του ευρύτερης εξειδίκευσης

προγονικού, AncXanQ. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη συνεισφορά της μεθόδου Ανασύστασης Προγονικών Πρωτεϊνών για πιο στοχευμένη και πιο αποτελεσματική έρευνα, με νέα προοπτική, στο πεδίο της μελέτης πρωτεϊνών.

Η διεξοδική ανάλυση της επίδρασης της θέσης 377 στην εξειδίκευση, δίνει περισσότερες πληροφορίες για το μηχανισμό αναγνώρισης υποστρώματος. Παρατηρήσαμε ότι σε υπόβαθρο ευρείας εξειδίκευσης, όπως των AncXanQ και NmXanQ, η αλλαγή G377S, δεν επέφερε περιορισμό εξειδίκευσης, και τα δύο μεταλλάγματα, AncXanQ/G377S και NmXanQ/G377S, αναγνωρίζουν ξανθίνη και γουανίνη. Άρα, ίσως η μια αλλαγή (G377S) σε υπόβαθρο ευρείας εξειδίκευσης δεν μπορεί από μόνη της να την περιορίσει. Ακόμη, στο XanQ(4M) (S27, A116, S191, T312), οι υπόλοιπες 4 θέσεις, ενώ παραμένει η Ser377, δεν αρκούν για να οδηγήσουν σε διεύρυνση εξειδίκευσης σε σύγχρονη πρωτεΐνη, που μεταφέρει μόνο ξανθίνη. Το ίδιο συμβαίνει, όμως, και όταν στο XanQ, οι 5 θέσεις έχουν αμινοξέα του AncXanQ: το XanQ(5M) (S27, A116, S191, T312, G377) δεν μεταφέρει τη γουανίνη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στο XanQ, που έχει μοναδικό υπόστρωμα την ξανθίνη (περιορισμένη εξειδίκευση), η αντικατάσταση S377G, από μόνη της οδήγησε σε τροποποίηση της εξειδίκευσης και το XanQ/S377G αναγνώριζε ξανθίνη και γουανίνη (ευρεία εξειδίκευση). Συνεπώς, σε περιβάλλον περιορισμένης εξειδίκευσης, μπορεί η μοναδική αλλαγή, με γλυκίνη στη θέση 377, να οδηγήσει σε διεύρυσή της. Όμως, στο AncXanQ(4M) η επαναφορά της γλυκίνης στη θέση 377, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα αμινοξέα αντιστοιχούν σε αυτά του XanQ(wt), ώστε έχει στις σημαντικές θέσεις τα ίδια αμινοξέα με το XanQ/S377G, δεν επαναφέρει τη διπλή εξειδίκευση. Επίσης, στο AncXanQ, η παρουσία στις πέντε θέσεις αμινοξέων του σύγχρονου XanQ, στο AncXanQ(5M), οδήγησε σε περιορισμό της εξειδίκευσης και αναγνωρίζει μόνο την ξανθίνη (Τατσάκη Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Συνολικά, ίσως απαιτούνται και άλλες αλλαγές, που σε συνδυασμό με αυτές τις 5 βασικές θα προσφέρουν τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις και αλλαγές διαμόρφωσης (φαινόμενο της επίστασης), ώστε να αλλάξει ο τρόπος αναγνώρισης και μεταφοράς υποστρώματος. Η θέση 377 αποδεικνύεται σημαντική στον καθορισμό της εξειδίκευσης, αλλά σε κάθε περίπτωση, το αποτέλεσμα εξαρτάται και επηρεάζεται και από το μοριακό υπόβαθρο.

Αξιολογώντας συνολικά τα παραπάνω αποτελέσματα, πρώτη φορά προκύπτει η χρήση της εξελικτικής μεθόδου Ανασύστασης Προγονικών Πρωτεϊνών (APR), ως μέσο για την πρόβλεψη της εξειδίκευσης μιας σύγχρονης πρωτεΐνης, που δεν είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί λειτουργικά. Ο NmXanQ, έχει διπλή εξειδίκευση, όπως η προγονική πρωτεΐνη και το προφίλ εξειδίκευσής του είναι πιο διευρυμένο, σε ότι αφορά στα δομικά ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης που αναγνωρίζει, σε σχέση με τον σύγχρονο XanQ, αλλά πιο περιορισμένο από του AncXanQ. Ο λειτουργικός του

χαρακτηρισμός, μάλιστα, απέδειξε πως υπάρχει βακτηριακό ομόλογο στον υποκλάδο ξανθίνης/ουρικού οξέος (XanQ/UapA cluster) της ομάδας NAT/COG2233, που εμφανίζει για πρώτη φορά ενεργότητα μεταφοράς γουανίνης.

Η στρατηγική αυτή θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την πρόβλεψη και κατανόηση του μηχανισμού εξειδίκευσης πρωτεϊνών, που θα μπορούσαν να είναι στόχοι αντιβακτηριακών φαρμάκων, για τον πιο αποτελεσματικό σχεδιασμό και δράση αυτών, όπως αποδεικνύεται εδώ στην περίπτωση του σύγχρονου μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2, του παθογόνου βακτηρίου *Neisseria meningitidis*.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Alguel, Y., Amillis, S., Leung, J. et al. (2016). Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat Commun*, Τόμ. 7, 11336.

Amanda K.Garcia, Betül Kaçar. (2019). How to resurrect ancestral proteins as proxies for ancient biogeochemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, Τόμ. 140, 20, σσ. 260-269.

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*. Τόμ. 313, 4, σσ. 765-774

Arkin, I. T., Russ, W. P., Lebendiker, M., & Schuldiner, S. (1996). Determining the Secondary Structure and Orientation of EmrE, a Multi-Drug Transporter, Indicates a Transmembrane Four-Helix Bundle. *Biochemistry*, Τόμ. 35, 22, σσ. 7233-7238.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, Τόμ. 2, σ. 2006.0008.

Botou M., P. Lazou, K. Papakostas, G. Lambrinidis, T. Evangelidis, E. Mikros, S. Frillingos. (2018). Insight on specificity of uracil permeases of the NAT/NCS2 family from analysis of the transporter encoded in the pyrimidine utilization operon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, Τόμ. 108, 2, σσ. 204-219.

Botou M., Yalelis V., Lazou P., Zantza I., Papakostas K., Charalambous V., Mikros E., Fletmetakis E., Frillingos S. (2020). Specificity profile of NAT/NCS2 purine transporters in *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti*. *Molecular Microbiology*. Τόμ. 114, 1, σσ. 151-171.

Campagnaro, G. & De Koning, H. (2020). Purine and pyrimidine transporters of pathogenic protozoa— conduits for therapeutic agents. *Med Res Rev*, 40(5), σσ. 1679-1714.

Carletti, M. S., Monzon, A. M., Garcia-Rios, E., Benitez, G., Hirsh, L., Fornasari, M. S., & Parisi, G. (2020). Revenant: a database of resurrected proteins. *Database: the journal of biological databases and curation*, baaa031

Carrasco, N. Herzlinger, D. Mitchell, R. DeChiara, S. Danho, W. Gabriel, T. F. Kaback, H. R. (1984). Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Τόμ. 81, 15, σσ. 4672-6.

Castorena, Fabiola & Peñuelas-Urquides, Katia & Bermúdez de León, Mario. (2016). Site-Directed Mutagenesis by Polymerase Chain Reaction. *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. 10.5772/66429.

César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, et al. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell*, Τόμ. 162, 3, σσ. 478-487.

Chaliotis, A., Vlastaridis, P., Ntountoumi, C., Botou, M., Yalelis, V., Lazou, P., Tatsaki, E., Mossialos, D., Frillingos, S., & Amoutzias, G. D. (2018). NAT/NCS2-hound: a webserver for the detection and

evolutionary classification of prokaryotic and eukaryotic nucleobase-cation symporters of the NAT/NCS2 family. *Giga Science*, Τόμ. 7, 12.

Consler, T. G., Persson, B. L., Jung, H., Zen, K. H., Jung, K., Privé, G. G., Verner, G. E., & Kaback, H. R. (1993). Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Τόμ. 90, 15, σσ. 6934-6938.

Consler, T. G., Tsolas, O., Kaback, H. R. (1991). Role of proline residues in the structure and function of a membrane transport protein. *Biochemistry*, Τόμ. 30, 5, σσ. 1291-8.

de Koning H, Diallinas G. (2000). Nucleobase transporters (review). *Mol Membr Biol*, Τόμ. 17, 2, σσ. 75-94.

Dean A.M., Thornton J.W. (2007). Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis. *Nat Rev Genet.*, Τόμ. 8, 9, σσ. 675-688.

Diallinas G., Gorfinkiel L., Herbert N. Arst Jr., Cecchetto G. and Scazzocchio C. (1995). Genetic and Molecular Characterization of a Gene Encoding a Wide Specificity Purine Permease of *Aspergillus nidulans* Reveals a Novel Family of Transporters Conserved in Prokaryotes and Eukaryotes. *J. Biol. Chem*, 270.

Diallinas G. (2014). Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Frontiers in Pharmacology*, Τόμ. 5, 207.

Diallinas, G. (2016). Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure. *Trends Genet.*, Τόμ. 32, 9, σσ. 576-590.

Dye, C. (2014). After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, Τόμ. 369, 1645.

Enkavi G, Li J, Mahinthichaichan P, et al. (2013). Simulation Studies of the Mechanism of Membrane Transporters. *Methods Mol Biol*, Τόμ. 924, σσ. 361-405.

Field F. Steven and Matz V. (2010). Mikhail Retracing Evolution of Red Fluorescence in GFP-Like Proteins from *Faviina* Corals. *Mol. Biol. Evol.* 27(2):225–233.

Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Persson, B., Kaback, H. R. (1994). Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Τόμ. 33, 26, σσ. 8074-81.

Frillingos, S. (2012). Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Τόμ. 3, 3, σσ. 250-272.

Furukawa, J., Inoue, K., Maeda, J. et al. (2015). Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals. *Sci Rep*, Τόμ. 5.

Garibsingh RA, Schlessinger A. (2019). Advances and Challenges in Rational Drug Design for SLCs. *Trends in Pharmacological Sciences*, Τόμ. 40, 10, σσ. 790-800.

- Gaucher E. A., Thomson, J. M., Burgan M. F., and Benner S. A. (2003). Inferring the palaeoenvironment of ancient bacteria on the basis of resurrected proteins. *Nature* 425: 285–288.
- Geller, L. T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O. H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z. A., Shee, K., Thaiss, C. A., Reuben, A., Livny, J., Avraham, R., Frederick, D. T., Ligorio, M., Chatman, K., Johnston, S. E., Mosher, C. M., Brandis, A., ... Straussman, R. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6356), 1156–1160.
- Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E., & Frillingos, S. (2010). Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the YgfO xanthine permease: ASN-325 binds and ALA-323 senses substrate. *The Journal of biological chemistry*, Τόμ. 285, 25, σσ. 19422-19433.
- Gumulya Y, Gillam EM. (2017). Exploring the past and the future of protein evolution with ancestral sequence reconstruction: the ‘retro’ approach to protein engineering. *Biochemical Journal*, Τόμ. 474, σσ. 1-19.
- Gournas C., Papageorgiou I., Diallinas G. (2008). The nucleobase–ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure–function relationships and physiological role. *Mol. BioSyst.*, 4, σσ. 404-416.
- Harms, M. J., & Thornton, J. W. (2010). Analyzing Protein Structure and Function Using Ancestral Gene Reconstruction. *Curr Opin Struct Biol.*, Τόμ. 20, 3, σσ. 360-366.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, Τόμ. 77, 1, σσ. 51-9.
- Hochberg GKA, Thornton J.W. (2017). Reconstructing Ancient Proteins to Understand the Causes of Structure and Function. *Annu Rev Biophys.*, Τόμ. 22, 46, σσ. 247-269.
- Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. (2001). The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol.*, 18(1):53-63
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, Τόμ. 96, 1, σσ. 23-8.
- Kaback, H. R., Reeves, J. P., Short, S. A., Lombardi, F. J. (1974). Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. 18. The mechanism of action of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone. *Arch Biochem Biophys.*, Τόμ. 160, 1, σσ. 215-22.
- Karatza P., Frillingos S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol.* (2005), Τόμ. 22, 3, σσ. 251-61.
- Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E., Frillingos, S. (2006). Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix. *J Biol Chem.*, Τόμ. 281, 52, σσ. 39881-90.
- Karena E., Tatsaki E., Lambrinidis G., Mikros E., & Frillingos S. (2015). Analysis of conserved NCS2 motifs in the *Escherichia coli* xanthine permease XanQ. *Mol Microbiol.*, Τόμ. 98, 3, σσ. 502-517.

- 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. *The Journal of biological chemistry*, Τόμ. 284, 36, σσ. 24257-68.
- Karena, E., & Frillingos, S. (2011). The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, Τόμ. 286, 45, σσ. 39595–39605.
- Kosti, V., Papageorgiou, I., & Diallynas, 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. *Journal of molecular biology*, Τομ. 397, 5, σσ. 1132-43.
- Kourkoulou A., Alexandros A. Pittis and George Diallynas. (2018). Evolution of substrate specificity in the Nucleobase- Ascorbate Transporter (NAT) protein family. *Microbial Cell*, Τόμ. 5, 6, σσ. 280-292.
- Koukaki M, Vlanti A, Goudela S, et al. (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J Mol Biol.*, Τομ. 350, 3, σσ. 499-513.
- Kratzer, J. T., Lanaspá, M. A., Murphy, M. N., Cicerchi, C., Graves, C. L., Tipton, P. A., Ortlund, E. A., Johnson, R. J., & Gaucher, E. A. (2014). Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), 3763–3768.
- Kuang D., Yao Y., MacLean D., Wang M., Hampson D. R. and Chang B. S. W. (2006). Ancestral reconstruction of the ligand-binding pocket of Family C G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14050-14055.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Τόμ. 227, 5259, σσ. 680-5.
- Lu, F., Li, S., Jiang, Y. et al. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, 472, σσ. 243-246.
- Lucy R. Forrest, Reinhard Krämer, Christine Ziegler. (2011). The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Τόμ. 1807, 2, σσ. 167-181.
- Marri PR, Paniscus M, Weyand NJ, Rendón MA, Calton CM, Hernández DR, et al. (2010). Genome Sequencing Reveals Widespread Virulence Gene Exchange among Human *Neisseria* Species. *PLoS ONE*, Τόμ. 5, 7, σ. e11835.
- Mermelekas, G., Georgopoulou, E., Kallis, A., Botou, M., Vlantos, V., & Frillingos, S. (2010). Cysteine-scanning analysis of helices TM8, TM9a, and TM9b and intervening loops in the YgfO xanthine permease: a carboxyl group is essential at ASP-276. *The Journal of biological chemistry*, Τόμ. 285, 45, σσ. 35011-35020.
- Muggia F, Diaz I, Peters GJ. (2012). Nucleoside and nucleobase analogs in cancer treatment: not only sapacitabine, but also gemcitabine. *Expert Opin Investig Drugs*, Τόμ. 21, 4, σσ. 403-408.
- Nadel, S. (2016). Treatment of Meningococcal Disease. *Adolesc Health*, Τόμ. 59, σσ. 21-28.

- Harrison, O. B., Schoen, C., Retchless, A. C., Wang, X., Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. (2017). *Neisseria* genomis: current status and future perspectives. *Pathogens and Disease*, 75(6):ftx060.
- Olga Boudker, Grégory Verdon. (2010). Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci.*, Τόμ. 31, 9, σσ. 418-426.
- Ortlund A. Eric, Bridgham T. Jamie, Redinbo R. Matthew, Thornton W. Joseph. (2007). Crystal Structure of an Ancient Protein: Evolution by Conformational Epistasis. *Science*, 317: 1544-1548.
- 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. *Journal of molecular biology*, Τομ. 382, 5, σσ. 1121–1135.
- Papakostas K., Frillingos S. (2012). Substrate Selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, Τόμ. 287, 19, σσ. 15684-95.
- 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.*, Τόμ. 288, 52, σσ. 36827-40.
- Ralph J. Hyde, Carol E. Cass, James D. Young & James D. Stephen A. Baldwin. (2001). The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Molecular Membrane Biology*, Τόμ. 18, 1, σσ. 53-63.
- Rehan S, Shahid S, Salminen TA, Jaakola VP, Paavilainen VO. (2019). Current Progress on Equilibrative Nucleoside Transporter Function and Inhibitor Design. *SLAS Discov.*, Τόμ. 24, 10, σσ. 953-968.
- Risso, V. A., Gavira, J. A., Mejia-Carmona, D. F., Gaucher, E. A., & Sanchez-Ruiz, J. M. (2013). Hyperstability and substrate promiscuity in laboratory resurrections of Precambrian β -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), 2899–2902.
- Ritzel, M.W.L., A.M.L. Ng, S.Y.M. Yao, K. Graham, S.K. Loewen, K.M. Smith, R.G. Ritzel, D.A. Mowles, P. Carpenter, X.Z. Chen, E. Karpinski, R.J. Hyde, S.A. Baldwin, C.E. Cass, and J.D. Young. (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J. Biol. Chem.*, Τόμ. 276, σσ. 2914-2927.
- Sahin-Tóth, M., Dunten, R. L., & Kaback, H. R. (1995). Design of a membrane protein for site-specific proteolysis: properties of engineered factor Xa protease sites in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Τόμ. 34, 4, σσ. 1107-1112.
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lawrence, M. C., Kaback, H. R. (2000). The sucrose permease of *Escherichia coli*: functional significance of cysteine residues and properties of a cysteine-less transporter. *Biochemistry*, Τόμ. 39, 20, σσ. 6164-9.
- Saier MH Jr, Reddy VS, Tsu BV, Ahmed MS, Li C, Moreno-Hagelsieb G. (2016). The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Research*, Τόμ. 44, Database issue.
- Saier MH Jr. (2000). A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Τόμ. 64, 2, σσ. 354-411.

- Saier, M.H., Jr., B.H. Eng, S. Fard, J. Garg, D.A. Haggerty, W.J. Hutchinson, D.L. Jack, E.C. Lai, H.J. Liu, D.P. Nusinew, A.M. Omar, S.S. Pao, I.T. Paulsen, J.A. Quan, M. Sliwinski, T.-T. Tseng, S. Wachi, and G.B. Young. (1999). Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta*, Τόμ. 1422, σσ. 1-56.
- Suzuki, S. & Henderson, P. (2006). The Hydantoin Transport Protein from *Microbacterium liquefaciens*. *Journal of Bacteriology*, Τόμ. 188, 9, σσ. 3329-3336.
- Siddiq MA, Hochberg GK, Thornton JW. (2017). Evolution of protein specificity: insights from ancestral protein reconstruction. *Current Opinion in Structural Biology*, Τόμ. 47, σσ. 113-122.
- Sun R, Wang L. (2013). Inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* growth by FDA-approved anticancer and antiviral nucleoside and nucleobase analogs. *BMC Microbiol.*, Τόμ. 13, 184.
- Takahashi, H., Watanabe, H., Kim, K. S., Yokoyama, S., & Yanagisawa, T. (2018). The Meningococcal Cysteine Transport System Plays a Crucial Role in *Neisseria meningitidis* Survival in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *mBio.*, Τόμ. 9, 6.
- Teather, R. M. Müller-Hill, B. Abrutsch, U. Aichele, G. Overath, P. (1978). Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Mol Gen Genet.*, Τόμ. 159, 3, σσ. 239-48.
- Thomson J. Michael, Gaucher A. Eric, Burgan F. Michelle, De Kee W. Danny, Li Tang, Aris P. John, and Benner A. Steven (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet.* 37(6): 630–635.
- Thornton J.W. (2004). Resurrecting Ancient Genes: Experimental Analysis of Extinct Molecules. *Nature Reviews Genetics*, Τόμ. 5, σσ. 366-375.
- Tsesmetzis, N. Paulin, C.B.J. Rudd, S.G. Herold, N. (2018). Nucleobase and Nucleoside Analogues: Resistance and Re-Sensitisation at the Level of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Metabolism. *Cancers*, Τόμ. 10, 240.
- Valdez-Taubas, J., Harispe, L., Scazzocchio, C., Gorfinkiel, L., & Rosa, A. L. (2004). Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, Τομ. 41, 1, σσ. 42–51.
- Wilson C., Agafonov R. V., Hoemberger M., Kutter S., Zorba A., Halpin J., Buosi V., Otten R., Waterman D., Theobald D. L. and Kern D. (2015). Using ancient protein kinases to unravel a modern cancer drug's mechanism. *Science* 20; 347 (6224): 882-886.
- Yadav, R., Noinaj, N., Ostan, N., Moraes, T., Stoudenmire, J., Maurakis, S., & Cornelissen, C. N. (2020). Structural Basis for Evasion of Nutritional Immunity by the Pathogenic *Neisseriae*. *Frontiers in microbiology*, Τόμ. 10, 2981.
- Yamamoto S, Inoue K, Murata T, et al. (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.*, Τόμ. 285, 9, σσ. 6522-6531.
- Yu, X., Yang, G., Yan, C. et al. (2017). Dimeric structure of the uracil: proton symporter UraA provides mechanistic insights into the SLC4/23/26 transporters. *Cell Res.*, 27, σσ. 1020-1033.

Yuasa H, Yasujima T, Inoue K. (2020). Current Understanding of the Intestinal Absorption of Nucleobases and Analogs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Τόμ. 43, 9, σσ. 1293-1300.

www.tcdb.org. Transporter Classification Database. tcdb.org. [Ηλεκτρονικό] Saier Lab Bioinformatics Group. <http://www.tcdb.org/search/result.php?tc=2.A.57>.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αλληλουχία του μεταφορέα XanQ του βακτηρίου

Neisseria meningitidis

NmXanQ

ATG	AGC	GGT	CAT	ATG	GGA	AAA	GGG	GCG	GAT	GCG	CCT	GAT	TTG	GTG	TAC	48
M	S	G	H	M	G	K	G	A	D	A	P	D	L	V	Y	16
GGT	TTG	GAG	GAT	AGG	CCG	CCG	TTC	GGT	AAT	GCG	CTG	TTG	AGC	GCG	GTT	96
G	L	E	D	R	P	P	F	G	N	A	L	L	S	A	V	32
ACC	CAT	CTT	TTG	GCG	ATT	TTC	GTG	CCG	ATG	ATT	ACG	CCC	GCG	CTG	ATT	144
T	H	L	L	A	I	F	V	P	M	I	T	P	A	L	I	48
GTG	GGC	GGC	GCG	CTG	GAA	CTG	CCG	GTG	GAG	ATG	ACG	GCG	TAT	CTC	GTG	192
V	G	G	A	L	E	L	P	V	E	M	T	A	Y	L	V	64
TCG	ATG	GCG	ATG	GTT	GCG	TCG	GGT	GTC	GGC	ACT	TAT	TTG	CAG	GTC	AAC	240
S	M	A	M	V	A	S	G	V	G	T	Y	L	Q	V	N	80
CGC	TTC	GGG	CCG	GTC	GGT	TCG	GGG	ATG	CTG	TCT	ATC	CAG	TCG	GTG	AAT	288
R	F	G	P	V	G	S	G	M	L	S	I	Q	S	V	N	96
TTC	TCG	TTC	GTT	ACC	GTC	ATG	ATT	GCG	CTG	GGC	GCG	GGG	ATG	AAA	GAG	336
F	S	F	V	T	V	M	I	A	L	G	A	G	M	K	E	112
GGC	GGT	TTG	ACT	AAG	GAT	GCG	ATG	ATT	TCG	ACG	CTC	TTG	GGC	GTA	TCG	384
G	G	L	T	K	D	A	M	I	S	T	L	L	G	V	S	128
TTT	GTC	GGC	GCG	TTT	TTG	GTG	TGT	TTC	TCG	GCG	TGG	CTT	CTG	CCG	TAT	432
F	V	G	A	F	L	V	C	F	S	A	W	L	L	P	Y	144
TTG	AAA	AAA	GTG	ATT	ACG	CCG	ACG	GTC	AGC	GGT	GTG	GTG	GTG	ATG	CTG	480
L	K	K	V	I	T	P	T	V	S	G	V	V	V	M	L	160
ATC	GGC	TTG	AGT	TTG	GTA	CAC	GTC	GGT	ATT	ACC	GAT	TTC	GGC	GGC	GGC	528
I	G	L	S	L	V	H	V	G	I	T	D	F	G	G	G	176
TTC	GGC	GCA	AAG	GCG	GAC	GGC	ACG	TTC	GGC	TCG	ATG	GAA	AAC	TTG	GGG	576
F	G	A	K	A	D	G	T	F	G	S	M	E	N	L	G	192
CTG	TCA	TCG	CTG	GTG	CTG	CTG	ATT	GTG	CTG	GTG	TTC	AAC	TGC	ATG	AAA	624
L	S	S	L	V	L	L	I	V	L	V	F	N	C	M	K	208
AAC	CCG	CTG	CTG	CGG	ATG	AGC	GGC	ATT	GCG	GTC	GGT	CTG	ATT	GCC	GGC	672
N	P	L	L	R	M	S	G	I	A	V	G	L	I	A	G	224
TAT	ATC	GTC	GCG	CTG	TTT	TTG	GGC	AAG	GTG	GAT	TTT	TCG	GCA	CTG	CAA	720
Y	I	V	A	L	F	L	G	K	V	D	F	S	A	L	Q	240
AAC	CTG	CCG	CTG	GTT	ACG	CTG	CCC	GTA	CCG	TTT	AAA	TAT	GGT	TTT	GCT	768
N	L	P	L	V	T	L	P	V	P	F	K	Y	G	F	A	256
TTT	GAC	TGG	CAC	GCA	TTT	ATT	GTG	GCG	GGT	GCG	ATT	TTC	CTG	TTG	AGC	816
F	D	W	H	A	F	I	V	A	G	A	I	F	L	L	S	272
GTG	TTT	GAG	GCG	GTC	GGC	GAT	TTG	ACC	GCA	ACG	GCA	ATG	GTG	TCC	GAT	864
V	F	E	A	V	G	D	L	T	A	T	A	M	V	S	D	288
CAG	CCG	ATT	GAA	GGC	GAG	GAA	TAC	ACC	AAA	GCG	CTG	CGC	GGC	GGC	GTG	912
Q	P	I	E	G	E	E	Y	T	K	R	L	R	G	G	V	304
TTG	GCA	GAC	GGC	TTG	GTG	TCG	GTG	ATT	GCG	ACG	GCT	TTG	GGT	TCG	CTG	960
L	A	D	G	L	V	S	V	I	A	T	A	L	G	S	L	320
CCG	CTG	ACA	ACG	TTT	GCG	CAA	AAC	AAC	GGC	GTG	ATT	CAG	ATG	ACC	GGC	1008
P	L	T	T	F	A	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	336
GTG	GCT	TCG	CGC	CAT	GTG	GGC	AAA	TAT	ATT	GCC	GTG	ATT	TTG	GTG	CTG	1056
V	A	S	R	H	V	G	K	Y	I	A	V	I	L	V	L	352
TTG	GGT	CTG	TTC	CCC	GTT	GTC	GGA	CGC	GCG	TTT	ACG	ACG	ATT	CCG	AGT	1104
L	G	L	F	P	V	V	G	R	A	F	T	T	I	P	S	368
CCG	GTT	TTA	GGC	GGC	GCG	ATG	GTT	TTG	ATG	TTC	GGC	TTG	ATT	GCG	ATT	1152
P	V	L	G	G	A	M	V	L	M	F	G	L	I	A	I	384
GCG	GGT	GTG	CGG	ATT	TTG	GTC	AGC	CAC	GGC	ATC	CGC	AGG	CGC	GAG	GCG	1200
A	G	V	R	I	L	V	S	H	G	I	R	R	R	E	A	400
GTG	ATT	GCG	GCG	ACT	TCG	GTC	GGC	TTG	GGC	TTG	GGC	GTG	GCG	TTT	GAG	1248

V	I	A	A	T	S	V	G	L	G	L	G	V	A	F	E	416
CCG	GAA	GTG	TTT	AAA	AAC	CTG	CCT	GTC	TTG	TTC	CAA	AAC	TCT	ATT	TCC	1296
P	E	V	F	K	N	L	P	V	L	F	Q	N	S	I	S	432
GCC	GGC	GGC	ATT	ACG	GCA	GTC	TTG	CTG	AAT	TTG	GTC	TTG	CCC	GAA	GAT	1344
A	G	G	I	T	A	V	L	L	N	L	V	L	P	E	D	448
AAA	ACC	GAG	GCG	GCG	GTC	AAG	TTT	GAT	ACC	GAC	CAC	TTG	GAA	CAC	TGA	1389
K	T	E	A	A	V	K	F	D	T	D	H	L	E	H		463