



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Διερεύνηση της εξέλιξης των εξειδικεύσεων των  
διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών**

**Γιαλελής Βασίλειος**  
MD, BSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**











**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Διερεύνηση της εξέλιξης των εξειδικεύσεων των  
διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών**

**Γιαλελής Βασίλειος**  
MD, BSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Γιαλελή Βασιλείου: 4-9-2013

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 757<sup>α</sup>/19-12-2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

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

Μέλη

Διαλλινάς Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Παπαλουκάς Κωνσταντίνος Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-1-2014

«Διερεύνηση των εξειδικεύσεων των διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** 910<sup>α</sup>/21-1-2020

Διαλλινάς Γεώργιος	Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαλουκάς Κωνσταντίνος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Fachelmayer Frank	Ερευνητής Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (IBE-ITE)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-10-2020

Ιωάννινα 30-10-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



*"Anything found to be true of E. coli, must also be true of elephants"*  
*- Jacques Monod*





## Πρόλογος - ευχαριστίες

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων την περίοδο 2014-2020. Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο για την επιστημονική καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να κυνηγήσω τα όνειρά μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία την ερευνητική του ομάδα και ειδικότερα τους Κώστα Παπακώστα, Μαρία Μπότου, Παναγιώτα Λάζου και Κορίνα Τατσάκη. Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την αμέριστη στήριξη που δείχνουν στις σπουδές μου και την Κατερίνα Γαλανοπούλου που είναι συνοδοιπόρος μου όλα αυτά τα χρόνια.



## Περιεχόμενα

---

1. Εισαγωγή.....	5
1.1. Βιολογικός ρόλος και είδη των πρωτεϊνών μεταφορέων .....	5
1.1.1. Εξέλιξη και σημασία της ενεργητικής μεταφοράς δευτερογενούς τύπου .....	6
1.1.2. Οι ενεργητικοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου συνδέονται με διάφορους τρόπους με τον μεταβολισμό των υποστρωμάτων τους.....	7
1.2. Σύγχρονα προβλήματα στην μελέτη των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου – το παράδειγμα της SLC οικογένειας .....	9
1.2.1. Κοινά χαρακτηριστικά στους ενεργητικούς μεταφορείς δευτερογενούς τύπου.....	12
1.2.2. Προσεγγίσεις στην μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων .....	15
1.3. Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και νουκλεοσιδίων .....	16
1.3.1. Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ως στόχοι νέων φαρμάκων .....	19
1.3.2. Ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων με κυτταροτοξική δράση.....	20
1.4. Η οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 .....	21
1.4.1. Η οικογένεια μεταφορέων πουρινών AzgA-like αποτελεί υποσύνολο της NAT/NCS2 .....	22
1.4.2. Διάκριση των εξειδικεύσεων εντός της AzgA-like .....	24
1.4.3. Προκλήσεις στην μελέτη της AzgA-like.....	25
1.5. Σκοπός της διατριβής .....	26
2. Υλικά και μέθοδοι .....	27
2.1. Πλασμιδιακοί φορείς και τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA .....	27
2.2. Στελέχη της <i>E. coli</i> και συντήρησή τους.....	30
2.3. Συνθήκες αύξησης και θρεπτικά υποστρώματα της <i>E. coli</i> .....	30
2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών σε πλασμίδια βακτηρίων <i>E. coli</i> (competent cells) .....	32
2.5. Απομόνωση ολικών μεμβρανικών πρωτεϊνών από την <i>E. coli</i> και ανάλυση κατά Western. .....	33
2.6. Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών στην <i>E. coli</i> .....	35
2.7. <i>In silico</i> ανάλυση.....	36
2.8. Επιλογή γονιδιωμάτων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων ομόλογων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων .....	37
3. Αποτελέσματα.....	39
3.1. Εντόπιση ξεχωριστών φυλογενετικών κλάδων βακτηριακών ομολόγων AzgA-like με διακριτή εξειδίκευση.....	39
3.1.1. Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών των κλάδων μεταφορέων αδενίνης AdeP/Q και γουανίνης/υποξανθίνης GhxP/Q .....	40
3.1.2. Εύρεση μοτίβων αλληλουχίας στους μεταφορείς AdeP και GhxP που σχετίζονται με την διάκριση των εξειδικεύσεων για αδενίνη ή γουανίνη/υποξανθίνη .....	42
3.1.3. Επιλογή στόχων μεταλλαξιγένεσης των AdeP και GhxP.....	44
3.2. Μεταλλαξιγένεση του AdeP σε θέσεις που διαφέρουν στον GhxP .....	46
3.2.1. Τα μεταλλάγματα N49V, G93S και N95T εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για υποστρώματα του AdeP και αυξημένη για υποστρώματα του GhxP.....	48

3.2.2. Τα I45S, M92I και S268A αποτελούν μεταλλάγματα χαμηλής συγγένειας για πουρινικά ανάλογα.....	48
3.2.3. Τα μεταλλάγματα R145A A315V, S320A, S321A, S324A και V325A διευρύνουν το προφίλ εξειδίκευσης του AdeP προς την αναγνώριση υποξανθίνης.....	48
3.2.4. Το μετάλλαγμα R145A έχει δραστικότητα ενεργητικής μεταφοράς υποξανθίνης .....	49
3.3. Μεταλλαξιγένεση του GhxP σε θέσεις που διαφέρουν στον AdeP .....	54
3.4. Διερεύνηση του προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα αδενίνης/υποξανθίνης/γουανίνης Q92VC3 και σύγκριση με τα προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων AdeP, GhxP και των μεταλλαγμάτων τους.....	58
3.5. Έλεγχος αναλόγων αδενίνης/γουανίνης σε πειράματα κυτταροτοξικότητας <i>in vivo</i> .....	62
4. Συζήτηση.....	65
4.1. Η εξειδίκευση του AdeP ρυθμίζεται από θέσεις περιφερικά του κέντρου δέσμευσης .....	65
4.1.1. Αντικαταστάσεις στην κυτταροπλασματική πλευρά του AdeP επιτρέπουν την αναγνώριση και μεταφορά υποξανθίνης .....	66
4.1.2. Οι αντικαταστάσεις των Asn49, Gly93 και Asn95 του AdeP προσομοιάζουν το προφίλ εξειδίκευσης του GhxP .....	68
4.1.3. Η Ser268 πιθανά εμπλέκεται στην σταθερότητα του core domain.....	69
4.2. Οι αντικαταστάσεις περιφερικά του κέντρου δέσμευσης στον GhxP δεν τροποποιούν την εξειδίκευση.....	70
4.3. Πιθανές υποδείξεις για την μοριακή βάση της διάκρισης εξειδίκευσης αδενίνης-γουανίνης θα μπορούσαν να προκύψουν από τον χαρακτηρισμό του μεταφορέα Q92VC3 .....	72
4.3. Τα γ-Πρωτεοβακτήρια του μικροβιώματος του λεπτού εντέρου συντηρούν AzgA-like ομόλογα διαφορετικών εξειδικεύσεων για τις πουρίνες αδενίνη-γουανίνη .....	73
4.4. Προοπτική των αποτελεσμάτων.....	76
5. Συμπληρωματική ενότητα.....	79
6. Περίληψη διατριβής.....	89
7. PhD summary.....	93
8. Βιβλιογραφία.....	97

### 1.1. Βιολογικός ρόλος και είδη των πρωτεϊνών μεταφορέων

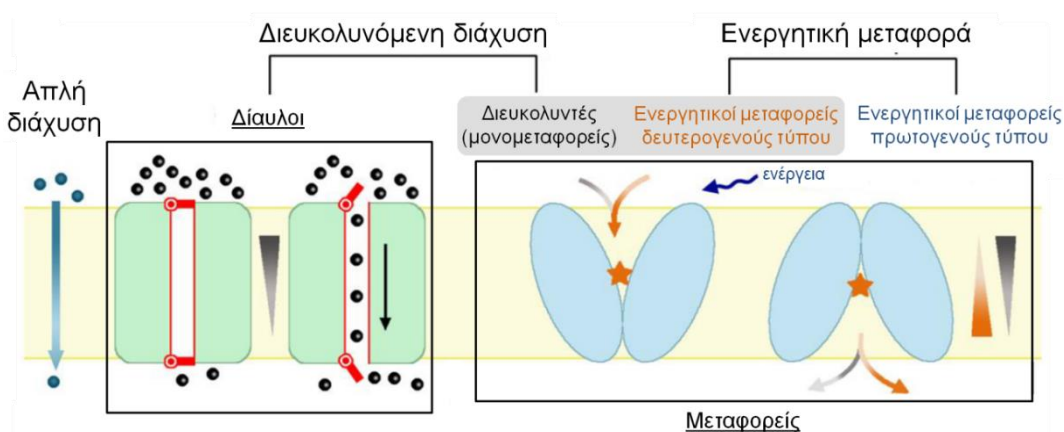
Τα κύτταρα χρησιμοποιούν λιπιδικές μεμβράνες και πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς για να ελέγχουν την ανταλλαγή ουσιών με το περιβάλλον τους. Το λιπιδιακό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης εμποδίζει την διείσδυση ή την διαρροή ουσιών προς ή από το κυτταρόπλασμα, ενώ προστατεύει το κύτταρο από μεταβαλλόμενες ή βλαβερές περιβαλλοντικές συνθήκες και από την επίθεση ιών ή κυττάρων<sup>1,2</sup>. Από πολλές απόψεις, η ακεραιότητα των μεμβρανών αποτελεί κρίσιμο στοιχείο για την κυτταρική ακεραιότητα και την διατήρηση ή μετάδοση γενετικών πληροφοριών<sup>3</sup>.

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εισάγουν και εξάγουν το μεγαλύτερο μέρος των ζωτικής σημασίας χημικών ουσιών αλλά και πολλά φάρμακα<sup>4-6</sup>. Επομένως, ο έλεγχος της μεταφοράς μικρομορίων διαμέσου μεμβρανών είναι απαραίτητος για την εσωτερική φυσιολογία των κυττάρων, αλλά αποτελεί και φύλακα της διασύνδεσης με το εξωκυτταρικό περιβάλλον<sup>7</sup>. Περισσότερα από 800 γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα πιστεύεται ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς<sup>8</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν βασικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, την ομοιόσταση, τον μεταβολισμό ή την μεταγωγή σήματος και χωρίζονται σε διαύλους και μεταφορείς. Οι πρωτεΐνες διάυλοι (channels) μεσολαβούν στην διάχυση ουσιών βάσει της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσής τους χωρίς να καταναλώνουν ενέργεια<sup>9</sup> και ελέγχονται από μοριακά “φίλτρα” και όχι από την εναλλαγή πρωτεϊνικών διαμορφώσεων όπως οι μεταφορείς<sup>10,11</sup>.

Οι μεταφορείς (carriers/transporters) είναι ικανοί να καταλύουν με ειδικό τρόπο την διαμεμβρανική μετατόπιση των υποστρωμάτων τους αντίθετα προς την βαθμίδωση συγκέντρωσης. Για να διατηρούνται οι νόμοι της θερμοδυναμικής κατά την μεταφορά, οι μεταφορείς εκμεταλλεύονται μορφές ενέργειας. Ανάλογα με την πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν, μπορούν να ταξινομηθούν σε μεταφορείς ενεργητικής μεταφοράς πρωτογενούς τύπου, οι οποίοι τροφοδοτούνται από φωτόνια ή ενέργεια που απελευθερώνεται από χημικές αντιδράσεις (π.χ. υδρόλυση του ATP)<sup>12</sup>, μεταφορείς ενεργητικής μεταφοράς δευτερογενούς τύπου, οι οποίοι εκμεταλλεύονται ηλεκτροχημικά δυναμικά συμμεταφερόμενων ιόντων ή διαλυτών ουσιών (π.χ. διαμεμβρανική βαθμίδωση H<sup>+</sup> ή Na<sup>+</sup>) και διευκολυντές (facilitators) που καταλύουν την διάχυση υποστρωμάτων προς την κατεύθυνση της ηλεκτροχημικής τους βαθμίδωσης<sup>13</sup>.

Η ενεργητική μεταφορά δευτερογενούς τύπου αποτελεί κατά βάση τρόπο μεταφοράς χαμηλής ενεργειακής απαίτησης (δεν απαιτεί άμεση πηγή χημικής ενέργειας όπως το ATP). Οι ενεργητικοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου, μπορεί να είναι συμμεταφορείς (symporters) και να μεταφέρουν το υπόστρωμα και τα ιόντα στην ίδια κατεύθυνση ή αντιμεταφορείς (antiporters) και να μεταφέρουν το υπόστρωμα και τα ιόντα σε αντίθετη

κατεύθυνση. Οι διευκολυντές εμφανίζουν κοινά δομικά-λειτουργικά χαρακτηριστικά με μεταφορείς δευτερογενούς τύπου, ενώ κατατάσσονται σε γονιδιακές οικογένειες που περιλαμβάνουν και μεταφορείς δευτερογενούς τύπου. Οι διευκολυντές ονομάζονται επίσης και μονομεταφορείς (uniporters) καθώς δεν απαιτούν συμμεταφερόμενο μέσο για την μεταφορά<sup>14</sup>. Οι ενεργητικοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου (καθώς και οι περισσότεροι, αλλά όχι όλοι οι πρωτογενούς τύπου) έχουν μια κύρια θέση πρόσδεσης/αλληλεπίδρασης με τα υποστρώματα (binding site) ελεύθερη προς την μία ή την άλλη πλευρά της μεμβράνης, αλλά ποτέ ανοικτή και προς τις δύο πλευρές. Η δέσμευση των υποστρωμάτων προκαλεί μεταβολή της διαμόρφωσης η οποία εκθέτει τη θέση πρόσδεσης στην αντίθετη πλευρά της μεμβράνης, όπου θα απελευθερωθούν τελικά τα υποστρώματα (μοντέλο εναλλασσόμενης πρόσβασης-alternating access)<sup>15-17</sup> (βλέπε **Εικόνα 1.1**).



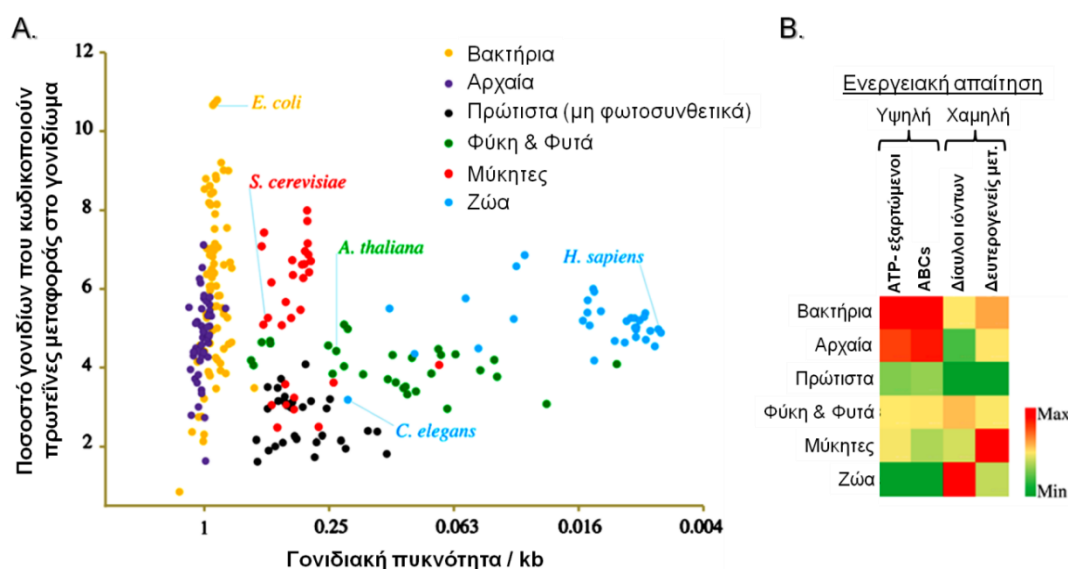
**Εικόνα 1.1:** Σύνοψη των τρόπων διαμεμβρανικής μεταφοράς<sup>18</sup>. Οι διάυλοι λειτουργούν με άνοιγμα και κλείσιμο μοριακών πυλών εισόδου-εξόδου (gating), ενώ οι μεταφορείς λειτουργούν με εναλλαγή πρωτεϊνικών διαμορφώσεων του ενεργού τους κέντρου.

### 1.1.1. Εξέλιξη και σημασία της ενεργητικής μεταφοράς δευτερογενούς τύπου

Τα κύτταρα κινητοποιούν σημαντικά αποθέματα ενέργειας για να τροφοδοτήσουν το σύνολο των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς τους (transportome). Αυτό υποδεικνύεται από το γεγονός ότι το μεταβολικό κόστος για την ενεργότητα τέτοιων πρωτεϊνών στους οργανισμούς, υπολογίζεται ότι φτάνει το  $\approx 60\%$  του συνολικού ATP<sup>19,20</sup>. Έτσι, είναι λογικό να θεωρούμε ότι η βελτίωση της ενεργειακής απόδοσης των πρωτεϊνών μεταφοράς συνέβαλε στην καλύτερη προσαρμοστικότητα κατά την πορεία της εξέλιξης.

Στην πρόσφατη βιοπληροφορική ανάλυση των Darbani και συνεργατών<sup>21</sup>, η οποία ανέλυσε το σύνολο των μεταφορέων (transportome) από αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα όλων των βασικών ταξινομικών ομάδων οργανισμών, βρέθηκε ότι συντηρούνται διάυλοι ιόντων και ενεργητικοί μεταφορείς (δευτερογενούς και πρωτογενούς τύπου) καθολικά στους οργανισμούς, υποδεικνύοντας την εξελικτικά πρώιμη εμφάνιση τους. Ειδικότερα, οι

εξαρτώμενοι από ATP μεταφορείς (ATP-Binding Cassette, ABC μεταφορείς και αντλίες ATP) εμφανίζονται με μικρότερη συχνότητα (σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των γονιδίων ανά γονιδίωμα) στους ευκαρυωτικούς από ότι στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Επιπρόσθετα, στις εξελικτικά υψηλότερες βαθμίδες επικρατούν μεταφορείς χαμηλών ενεργειακών απαιτήσεων (ενεργητικοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου και διάλυλοι) (βλέπε **Εικόνα 1.2**), ενώ επίσης παρατηρείται η τάση συντήρησης των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου στον ζυμομύκητα σε σχέση με προκαρυώτες<sup>22</sup>.



**Εικόνα 1.2: Κατανομή των βασικών τύπων διαμεμβρανικής μεταφοράς στους οργανισμούς<sup>21</sup>.** Α) Σχέση των πρωτεϊνών μεταφοράς με την γονιδιακή πυκνότητα (λόγος του αριθμού γονιδίων κάθε οργανισμού προς το συνολικό DNA του). Το σύνολο των πρωτεϊνών μεταφοράς κάθε οργανισμού διαφέρει σε μέγεθος ανάμεσα στα μεγάλα Βασίλεια αλλά και μεταξύ ειδών. Β) Χρωματικός χάρτης του αριθμού πρωτεϊνών των διαφορετικών τύπων μεταφοράς στις κύριες ομάδες οργανισμών. Ο αριθμός μελών κάθε τύπου αποτελεί ποσοστό του αριθμού γονιδίων κάθε γονιδιώματος και τα χρώματα δεν είναι συγκρίσιμα μεταξύ των διαφορετικών τύπων. Οι ενεργητικοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου απαντώνται με υψηλότερα ποσοστά σε Μύκητες και Βακτήρια.

### 1.1.2. Οι ενεργητικοί μεταφορείς δευτερογενούς τύπου συνδέονται με διάφορους τρόπους με τον μεταβολισμό των υποστρωμάτων τους

Ο ρόλος των μεταφορέων δεν περιορίζεται απλά στην μετατόπιση των υποστρωμάτων τους διαμέσου της λιπιδικής διπλοστιβάδας, αλλά περιλαμβάνει και τη συμμετοχή στη ρύθμιση του μεταβολισμού αυτών των υποστρωμάτων<sup>23-25</sup>. Τα μεταβολικά μονοπάτια οργανώνονται συχνά σε μεταβολικά συγκροτήματα-μεταβολόνια (metabolons). Τα μεταβολόνια αποτελούν παροδικά σύμπλοκα ενζύμων που καταλύουν διαδοχικές μεταβολικές αντιδράσεις, μέσω των οποίων επιτρέπεται η σταδιακή διοχέτευση ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων από το ένα ενεργό κέντρο απευθείας στο

επόμενο<sup>26,27</sup>. Αυτή η διαδοχική διοχέτευση των υποστρωμάτων (substrate channeling) εμποδίζει την απελευθέρωση πολύτιμων και συχνά ασταθών ή τοξικών ενδιάμεσων προϊόντων, αυξάνει την μεταβολική απόδοση και επιτρέπει τον έλεγχο της ροής τους, όχι μόνο από την ρύθμιση μεμονωμένων ενζύμων αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών. Τα μεταβολόνια περιλαμβάνουν διαλυτές πρωτεΐνες κατά βάση, αλλά και η πλασματική μεμβράνη έχει ρόλο στην οργάνωση τους μέσω της σύνδεσης συγκεκριμένων μεταφορέων με κυτταροπλασματικά ένζυμα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας οργάνωσης υπάρχει στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (βλέπε **Εικόνα 1.3/A**), ενώ μεταβολόνια μπορεί να δημιουργούνται και στην μεμβράνη βακτηρίων<sup>25,28</sup>.

Τα βακτηριακά γονίδια μεταφορέων υπόκεινται σε συντονισμένη ρύθμιση με τα γονίδια των ενζύμων του μεταβολισμού των υποστρωμάτων τους, μέσω της σύνδεσής τους στα ίδια οπερόνια (operons) ή συμμετοχής τους στα ίδια ρεγουλόνια (regulons). Ένα κλασικό παράδειγμα τέτοιας ρύθμισης αποτελεί το οπερόνιο της λακτόζης στην *Escherichia coli*<sup>29</sup>, όπου η πρωτεΐνη-μεταφορέας (LacY) και το ένζυμο που εμπλέκεται στον μεταβολισμό του μεταφερόμενου υποστρώματος (LacZ), κωδικοποιούνται παράλληλα. Παραδείγματα σύνδεσης μεταφοράς-μεταβολισμού εντοπίζονται και σε σύνολα οπερονίων που υπόκεινται σε συντονισμένη ρύθμιση (regulons), όπως στον μεταβολισμό των νουκλεοτιδικών βάσεων<sup>30,31</sup> όπου κεντρικό ρόλο κατέχει το ρεγουλόνιο PurR<sup>32,33</sup> (βλέπε **Εικόνα 1.3/B**). Ο μηχανισμός ρύθμισης από τον PurR μπορεί να εμφανίζει παραλλαγές στους βακτηριακούς οργανισμούς<sup>34</sup>, αλλά στην *E. coli* αποτελεί μεταγραφικό καταστολέα πολλών ενζύμων από διαφορετικά οπερόνια, που οδηγεί σε ελάττωση της *de novo* σύνθεσης νουκλεοτιδίων παρουσία νουκλεοτιδικών βάσεων εισαγόμενων από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Ειδικότερα για την ρύθμιση των πουρινών, ο PurR καταστέλλει παρουσία αδενίνης<sup>32,35</sup> ένζυμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης πουρινών αλλά και τα γονίδια για τους μεταφορείς πουρινών AdeP και XanP<sup>32</sup>.

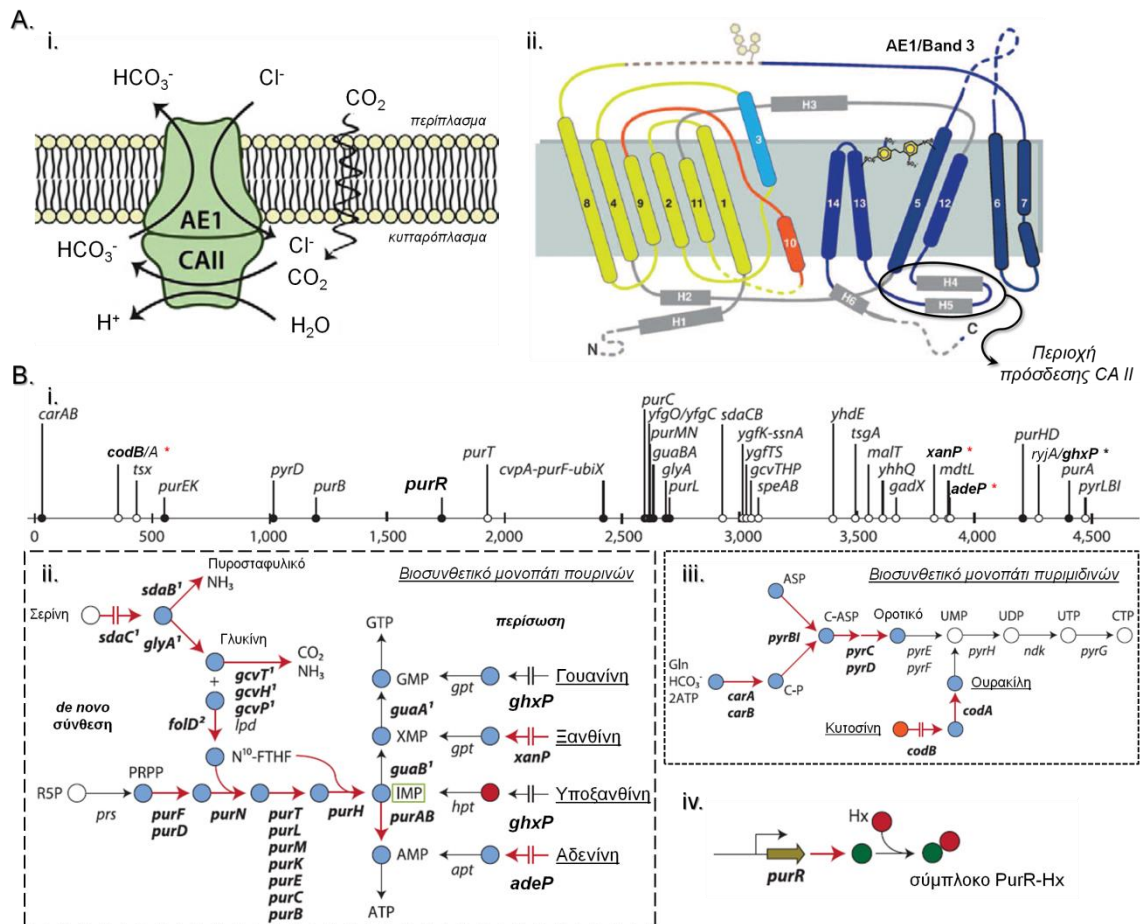
Εκτός της διαδεδομένης συμμετοχής των πρωτεϊνικών παραγόντων στην γενετική ρύθμιση, είναι γνωστό ότι και το RNA μπορεί να έχει ενεργητικό ρόλο σε αυτήν<sup>36,37</sup>. Οι ριβοδιακόπτες (riboswitches) είναι τμήματα mRNA που δεσμεύουν ειδικά μεταβολίτες και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων συναφών μεταβολικών μονοπατιών<sup>38,39</sup>. Ειδικότερα για τους μεταφορείς, έχουν απομονωθεί ομάδες βακτηριακών ριβοδιακοπών που όταν συνδεθούν με τα εισαγόμενα υποστρώματα μεταφορέων βαρέων μετάλλων ρυθμίζουν την έκφρασή τους<sup>40</sup>. Επιπρόσθετα, στον *Bacillus subtilis* απομονώθηκε ριβοδιακόπτης ειδικός για την γουανίνη<sup>41,42</sup>, ο οποίος ελέγχει το οπερόνιο του ενζύμου φωσφοριβοσυλτρανσφεράση της ξανθίνης και του αντίστοιχου μεταφορέα ξανθίνης<sup>43</sup>.



## 1.2. Σύγχρονα προβλήματα στην μελέτη των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου – το παράδειγμα της SLC οικογένειας

Την μεγαλύτερη ομάδα μεταφορέων και δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών στο ανθρώπινο γονιδίωμα μετά τους GPCRs (υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες)<sup>44</sup>, αποτελεί η οικογένεια SLC (SoLute Carrier). Τα μέλη της SLC είναι μεταφορείς διαφόρων διαλυτών ουσιών (κυτταρικά συστατικά, τοξίνες ή φάρμακα) και σε αυτήν περιλαμβάνονται διευκολυντές και δευτερογενούς τύπου ενεργητικοί μεταφορείς (συμμεταφορείς και αντιμεταφορείς), τόσο της πλασματικής μεμβράνης όσο και οργανιδίων. Η SLC περιλαμβάνει 456 μέλη σε 52 υποοικογένειες μέχρι σήμερα<sup>8,45</sup>, τα οποία μπορούν να ομαδοποιηθούν περαιτέρω φυλογενετικά<sup>46</sup>. Πολλοί μεταφορείς της SLC (SLCs) αποτελούν στόχους φαρμάκων ή μεσολαβούν στην απορρόφηση και διάθεση φαρμάκων όπως οι μεταφορείς σεροτονίνης SERT και ντοπαμίνης DAT, που αμφότεροι αποτελούν στόχους αντικαταθλιπτικών φαρμάκων<sup>6,47</sup>.

Χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα την ανάλυση στην οικογένεια SLC από τους César-Razquin και συνεργάτες<sup>47</sup>, υποστηρίζεται έντονα η ανάγκη να εστιαστεί περισσότερο η έρευνα στην μελέτη της ενεργητικής μεταφοράς δευτερογενούς τύπου. Αν και ως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί ως στόχοι γνωστών ή υπό ανάπτυξη φαρμάκων 26 μέλη της SLCs<sup>6,48</sup> και έχει βρεθεί ότι  $\approx 190$  μεταλλάξεις σε SLCs σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο<sup>49,50</sup>, υπάρχει ιδιαίτερο έλλειμμα δημοσιεύσεων για την οικογένεια (βλέπε **Εικόνα 1.4**). Μάλιστα, σε ορισμένους από τους πιο μελετημένους SLCs όπως οι μεταφορείς Band 3 (SLC4A1) και GLUT1 (SLC2A1), η έρευνα φαίνεται να εστιάστηκε κυρίως λόγω της άφθονης έκφρασης και της εύκολης απομόνωσής τους από συγκεκριμένους τύπους κυττάρων<sup>47</sup>.

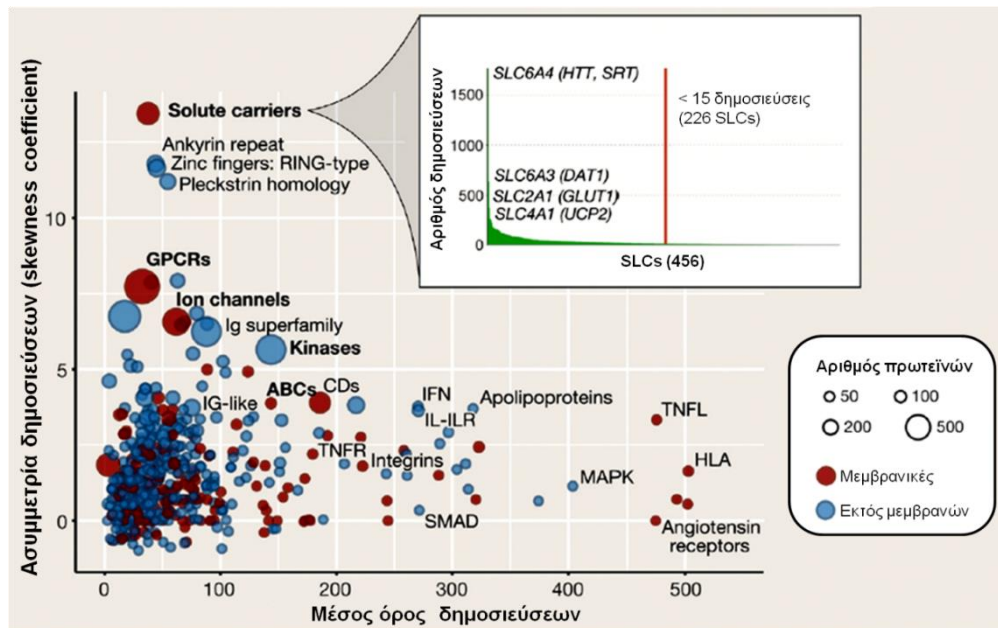


**Εικόνα 1.3: Παραδείγματα της σχέσης μεταφορέων με τον μεταβολισμό των υποστρωμάτων τους.** Α) Το μεταβολόγιο της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων<sup>25</sup>. i) Η καρβονική ανυδράση II (CAII) συνδέεται στον αντιμεταφορέα  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  Band 3 (ανταλλάκτης ανιόντων 1, AE1)<sup>51</sup>. Σε ιστούς όπως ο μυϊκός, το  $\text{CO}_2$  που διαχέεται από την μεμβράνη μετατρέπεται από την κυτταροπλασματική καρβονική ανυδράση (CAII) σε  $\text{HCO}_3^-$  και  $\text{H}^+$ . Το  $\text{HCO}_3^-$  διοχετεύεται αμέσως στον AE1 για να εξαχθεί από την μεμβράνη με την ανταλλαγή  $\text{Cl}^-$ , δημιουργώντας ένα μεταβολόγιο της μεμβράνης ειδικό για τα διττανθρακικά<sup>52-54</sup>, ενώ το  $\text{H}^+$  ρυθμίζεται από την αιμοσφαιρίνη οδηγώντας σε μειωμένη συγγένεια για το οξυγόνο (Bohr effect). Για την ανταλλαγή των αερίων στους πνεύμονες το σύστημα αντιστρέφεται και τα διττανθρακικά που αντιμεταφέρονται από τον AE1 για το γλώριο, διοχετεύονται στην CAII που καταναλώνοντας ένα πρωτόνιο παράγει νερό και διοξείδιο που απελευθερώνεται από το κύτταρο. ii) Τοπολογικό διάγραμμα της κρυσταλλογραφικά γνωστής δομής του Band 3<sup>55</sup> όπου σημειώνεται η περιοχή σύνδεσης της CAII προς το καρβοξυτελικό άκρο του μεταφορέα<sup>56</sup>. Β) Το ρεγουλόγιο PurR της *E. coli*<sup>32</sup>. i) Θέσεις σύνδεσης του PurR στο γονιδίωμα (με αστερίσκους δείχνονται γονίδια μεταφορέων). ii & iii) Τα μονοπάτια βιοσύνθεσης πουρινών και πυριμιδινών με τα γονίδια που ελέγχονται από τον PurR (έντονη γραφή). Σημειώνεται η δυνατότητα του IMP που να μετατρέπεται αμφίδρομα σε AMP ή GMP και τα γονίδια μεταφορέων πουρινών της *E. coli* υπάγονται στο ρεγουλόγιο. Με κόκκινο δείχνονται τα στάδια που καταστέλλονται από τον PurR και με διακοπτόμενη γραμμή η μεσολάβηση μεταφορέα. iv) Ο σχηματισμός του συμπλόκου του PurR με την υποξανθίνη απαιτείται για την ρύθμιση<sup>57,58</sup>.

Το κενό γνώσεων που υπάρχει στην οικογένεια SLC οφείλεται σε αρκετούς λόγους<sup>47</sup>. Αρχικά, ο ορισμός της υπεροικογένειας SLC και η ενιαία ονομασία της υιοθετήθηκαν σχετικά πρόσφατα<sup>8</sup>, οπότε πιθανόν στο παρελθόν να είχαν αγνοηθεί κοινές αρχές και κοινά χαρακτηριστικά τους. Στην έρευνα των SLCs έχουν παρουσιαστεί πολλαπλά τεχνικά προβλήματα που σχετίζονται με την φύση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (υδρόφοβη φύση, μεγάλο μέγεθος και διαμεμβρανική τοπολογία) και το χαμηλό επίπεδο έκφρασης, δυσχεραίνοντας την απομόνωση τους. Βάσει αυτού, η ανάλυση της δομής τους με κρυσταλλογραφία αποτελεί μεγάλη πρόκληση και μέχρι σήμερα έχουν αναλυθεί λίγες ανθρώπινων δομές SLCs<sup>55,59-64</sup>. Ένα ακόμα πρόβλημα έγκειται στην ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων μόνο για ορισμένους SLCs ( $n \approx 45$ )<sup>65</sup>, γεγονός που δυσχεραίνει την συστηματική μελέτη τους.

Η δημιουργία κυτταρικών συστημάτων ειδικών για την μελέτη των SLCs αποτελεί μεγάλη πρόκληση. Η υπερέκφραση των SLCs αναμένεται να οδηγεί σε τοξικότητα, ενώ στην μελέτη της λειτουργίας τους αναμένεται να υπάρχουν επικαλύψεις με ενδογενείς μεταφορείς. Ακόμα και αν δημιουργηθεί κατάλληλο γονιδιακό υπόβαθρο, η ταυτοποίηση των υποστρωμάτων των SLCs δεν είναι εύκολη στα φυσικά τους κυτταρικά συστήματα καθώς οι δοκιμασίες προσδιορισμού της ενεργότητας (transport assays) δεν είναι τεχνικά εύκολες σε αυτά (δυσκολία χειρισμού και απομόνωσης κυττάρων για μέτρηση των προσλαμβανόμενων υποστρωμάτων). Τέλος, η χρήση λιπιδικών κυστιδίων και ωοκυττάρων βατράχου μπορεί να αποτελούν χρήσιμα συστήματα για την μελέτη της λειτουργίας τους, αλλά δεν επιτρέπουν την διερεύνηση των περίπλοκων μεταβολικών μηχανισμών στους οποίους μπορεί να εμπλέκονται οι μεταφορείς στα φυσικά τους κύτταρα (π.χ. στον μεταβολισμό των υποστρωμάτων τους).

Ενώ βρισκόμαστε στην εποχή μετά την χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις για τον σημαντικό ρόλο των SLCs, η έρευνα δεν επικεντρώνεται στην συστηματική ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας τους<sup>47</sup>. Ο προβληματισμός αυτός είναι γενικότερος και αφορά τις περισσότερες οικογένειες μεταφορέων, όπου παρά την βιολογική τους σημασία, η έρευνα δεν έχει στραφεί στην διεξοδική μελέτη τους. Επιπλέον, δεν γίνεται συστηματική προσπάθεια ορθολογικής σχεδίασης και εξέτασης φαρμάκων, βασισμένη στην συγκριτική μελέτη και κατανόηση της σχέσης δομής-λειτουργίας των μεταφορέων τους<sup>10,66</sup>.



**Εικόνα 1.4:** Η SLC αποτελεί την δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ακόμα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς<sup>47</sup>. i) Ασυμμετρία δημοσιεύσεων σε σχέση με τον αριθμό τους ανά ομάδα γονιδίων. Πολύ θετικές τιμές υποδεικνύουν μια ανομοιογενή κατανομή όπου σε λίγα γονίδια αντιστοιχούν περισσότερες δημοσιεύσεις από τα υπόλοιπα της ομάδας τους. Το μέγεθος των σημείων αντιπροσωπεύει τον συνολικό αριθμό μελών κάθε ομάδας και με κόκκινο δείχνονται οι ομάδες που τουλάχιστον το 80% των μελών τους κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες. ii) (ένθετο διάγραμμα) Ο αριθμός δημοσιεύσεων για κάθε SLC γονίδιο απεικονίζεται με φθίνουσα σειρά και σημειώνονται οι τέσσερις SLCs με τις περισσότερες δημοσιεύσεις<sup>47</sup>. Η κόκκινη κάθετη γραμμή δείχνει το όριο των 15 δημοσιεύσεων.

### 1.2.1. Κοινά χαρακτηριστικά στους ενεργητικούς μεταφορείς δευτερογενούς τύπου

Η ενεργητική μεταφορά δευτερογενούς τύπου εμφανίζει πολυπλοκότητα. Η ύπαρξη ενός κέντρου δέσμευσης όπου συνδέεται ειδικά το υπόστρωμα αλλά και το συµμεταφερόµενο ιόν, καθιστά την μεταφορά δευτερογενούς τύπου άρρηκτα συνδεδεμένη με την έννοια της εξειδίκευσης. Θα περίμενε κανείς ότι για την πληθώρα διαφορετικών υποστρωμάτων απαιτείται ένας ανάλογα μεγάλος αριθμός μεταφορέων διακριτής δομής και ειδικών χαρακτηριστικών για την μεταφορά τους. Ωστόσο, μεταφορείς που εµπίπτουν σε εξελικτικά ή λειτουργικά απομακρυσμένες οικογένειες και διαφέρουν ως προς την επιλογή υποστρωμάτων ή την πρωτοταγή δομή τους, μοιράζονται σημαντικές δομικές ομοιότητες<sup>67</sup>.

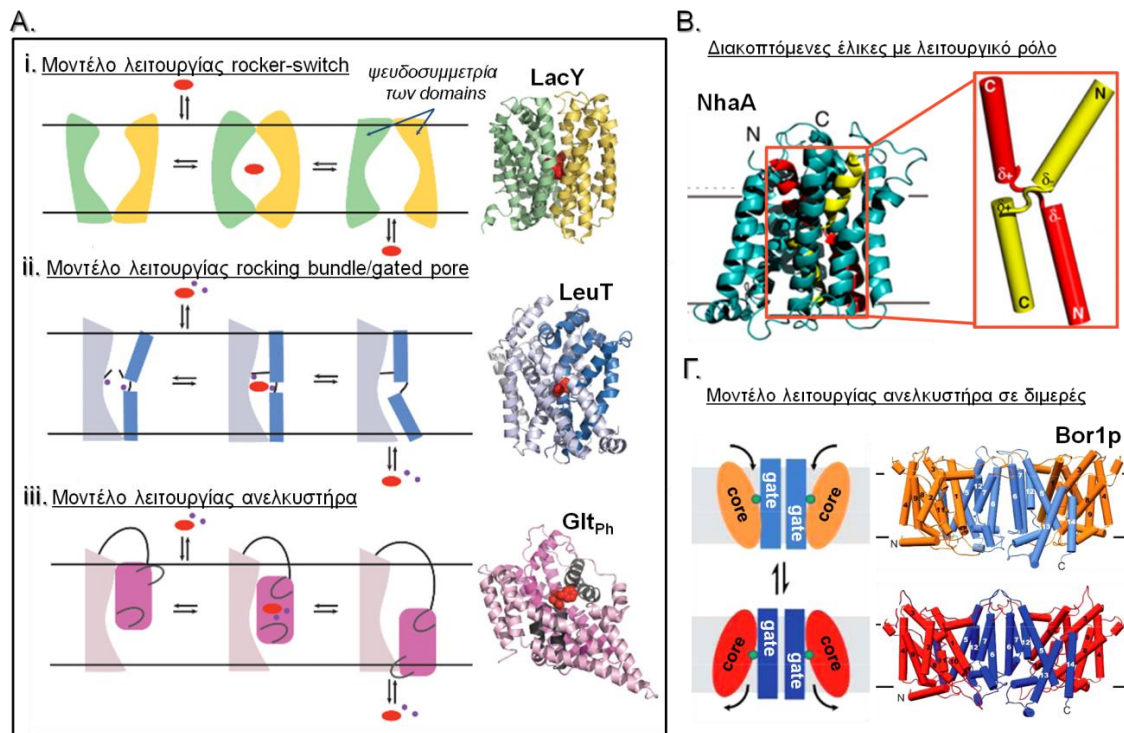
Ένα κοινό χαρακτηριστικό των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου αποτελεί η ύπαρξη δομικών επαναλήψεων. Κάθε δομική επανάληψη περιλαμβάνει μια ομάδα α-ελικοειδών διαµεµβρανικών τµηµάτων (TransMembrane segments-TMs), η οποία επαναλαμβάνεται δύο ή τρεις φορές στην τρισδιάστατη δομή<sup>67</sup>. Οι δομικές επαναλήψεις µπορεί να έχουν προέλθει από διπλασιασμούς µικρότερων γονιδίων στην διάρκεια της εξέλιξης<sup>68-70</sup> και δημιουργούν μια χαρακτηριστική ψευδοσυµμετρία (pseudosymmetry) µεταξύ δύο πρωτεϊνικών δομικών περιοχών (domains)<sup>17,67</sup>. Η πλειοψηφία των κρυσταλλογραφικά γνωστών δομών εµπίπτει σε δύο τύπους πτύχωσης: τον τύπο 6+6 της

οικογένειας MFS (Major Facilitator Superfamily) που περιλαμβάνει τον μεταφορέα LacY<sup>71-73</sup> και τον τύπο 5+5 του μεταφορέα LeuT<sup>13,17,74,75</sup>. Αρκετοί μεταφορείς που εμπίπτουν στον τύπο 5+5 περιλαμβάνουν επιπρόσθετα και δύο ή τέσσερις επιπλέον α-έλικες με συνολικό αριθμό 12 ή 14 TMs<sup>76</sup>. Μια παραλλαγή του τύπου 5+5 αποτελεί ο 7+7 και μάλιστα οι δύο τύποι αντιπροσωπεύονται από δύο διακριτές οικογένειες μεταφορέων της APC (Amino acid-Polyamine-OrganoCation) υπεροικογένειας<sup>76,77</sup>.

Ο μηχανισμός μεταφοράς στους ενεργητικούς μεταφορείς δευτερογενούς τύπου βασίζεται στην συμμετρία που δημιουργούν οι δομικές επαναλήψεις για να επιτυγχάνεται η εναλλασσόμενη πρόσβαση<sup>13,67</sup>. Το υπόστρωμα μπορεί να μετακινείται προς την αντίθετη πλευρά της μεμβράνης, μέσω μιας υδατικής κοιλοότητας που σχηματίζεται μεταξύ των δύο domains και είναι προσβάσιμη μόνο από την μία πλευρά της μεμβράνης κάθε φορά. Οι “πύλες” που φράσσουν την είσοδο και την έξοδο του υποστρώματος δεν ανοίγουν ταυτόχρονα, αλλά ανοίγουν και κλείνουν σταδιακά για να επιτρέψουν στο υπόστρωμα να κινηθεί<sup>10</sup>. Μία ενδιαμέση πρωτεϊνική διαμόρφωση συμβαίνει όταν και οι δύο πύλες είναι κλειστές και απομονώνεται η θέση δέσμευσης (occluded state). Για τον μηχανισμό μεταφοράς έχουν προταθεί τρία βασικά μοντέλα: ο μηχανισμός διακόπτη (rocker-switch), ο μηχανισμός ελεγχόμενης εισόδου (rocking bundle ή gated-pore) και ο μηχανισμός ανελκυστήρα (elevator) (βλέπε **Εικόνα 1.5/A**).

Η πλειοψηφία των μεταφορέων που εμπίπτουν στον μηχανισμό ανελκυστήρα απομονώθηκαν κρυσταλλογραφικά ως ολιγομερή, εμφανίζοντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ domains (domains διμερισμού, μοριακά φίλτρα επιλογής που σχηματίζονται με συμμετοχή των domains διμερισμού και των domains που περιέχουν το κέντρο δέσμευσης)<sup>78-82</sup>. Σε αυτά τα ολιγομερή, μόνο τα domain που δεσμεύουν το μεταφερόμενο υπόστρωμα είναι ελεύθερα να κινηθούν ολισθαίνοντας διαμέσου της μεμβράνης, ενώ η υπόλοιπη δομή παραμένει ακίνητη συμμετέχοντας στην δημιουργία και σταθερότητα των ολιγομερών<sup>83</sup>. Οι βιοφυσικές ιδιότητες της μεμβράνης, όπως οι πλευρικές και εγκάρσιες πιέσεις που προκαλούνται από την καμπυλότητα της μεμβράνης και την συσσώρευση λιπιδίων, επηρεάζουν άμεσα την αναδίπλωση, την δομή και την λειτουργία των μεταφορέων<sup>84,85</sup>. Επιπρόσθετα, ειδικές ή μη αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και λιπιδίων μπορούν να επηρεάσουν την διαμόρφωση, την σταθερότητα αλλά και τον ολιγομερισμό ενός μεταφορέα<sup>86-89</sup>.

Για να συνδυάσουν την μεταφορά υποστρώματος/ιόντος και να αποτραπεί η διαρροή τους από το κέντρο δέσμευσης, οι μεταφορείς πρέπει να εναλλάσσουν διαμορφώσεις μόνο όταν οι διαλυτές ουσίες είναι δεσμευμένες ή το κέντρο δέσμευσης ελεύθερο. Δεν είναι τυχαίο ότι στην σύνδεση του ιόντος κατά την δευτερογενή ενεργητική μεταφορά, μεσολαβούν κυρίως TMs που διακόπτονται από περιοχές ελεύθερης διαμόρφωσης (unwound regions) ή άλλες ειδικές δομές (π.χ. β-πτυχές) που βοηθούν στην πρόσδεση των υποστρωμάτων<sup>17,90</sup> (βλέπε **Εικόνα 1.5/B**). Το είδος των συνδεδεμένων ιόντων μπορεί να ποικίλει σε ομόλογους μεταφορείς<sup>91</sup> και το κέντρο δέσμευσης εμφανίζει σχετική ευελιξία που επιτρέπει να συνδέονται εκτός των βασικών υποστρωμάτων και ανταγωνιστές παρόμοιας χημικής δομής ή με ογκώδεις υποκαταστάσεις (π.χ. αρωματικός δακτύλιος)<sup>92</sup>.



**Εικόνα 1.5: Δομικά χαρακτηριστικά των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου.** **A)** Πρότυπα μηχανισμού μεταφοράς με εναλλασσόμενη πρόσβαση<sup>93</sup>. i & ii) Στους μηχανισμούς rocker-switch<sup>94</sup> και rocking bundle<sup>95</sup>, η πρωτεΐνη υφίσταται ουσιαστικές μεταβολές της διαμόρφωσης της, ενώ το υπόστρωμα παραμένει περίπου στην ίδια θέση (στο μέσο της μεμβράνης) μέχρι να διαχυθεί εκτός της θέσης δέσμευσης προς το κυτταρόπλασμα<sup>96</sup>. Το υπόστρωμα δεσμεύεται μεταξύ των δύο domains, προωθώντας την αναδιάταξη της πρωτεΐνης γύρω από το κέντρο δέσμευσης (binding site). Κατά τον μηχανισμό rocker-switch, δύο δομικά παρόμοια domains μετακινούνται για να γίνει η πρόσβαση ενώ κατά τον μηχανισμό rocking bundle, δύο δομικά διακριτές περιοχές (πύλες) αναδιατάσσονται (bundle domain) έναντι μιας περισσότερο σταθερής περιοχής για να δημιουργηθεί πρόσβαση. Στον μηχανισμό rocking bundle, οι πύλες είναι περισσότερο οργανωμένες από εκείνες του rocker switch, και για αυτόν τον λόγο ο μηχανισμός rocking bundle αναφέρεται επίσης ως μηχανισμός ελεγχόμενου πόρου (gated pore). Αυτοί οι δύο μηχανισμοί έχουν περιγραφεί και ως μηχανισμοί μετακινούμενου φραγμού (moving barrier)<sup>97</sup>. Παραδείγματα των μηχανισμών moving barrier αποτελούν ο μεταφορέας LacY (PDB: 4OAA)<sup>98</sup> για τον rocker-switch και ο μεταφορέας LeuT (PDB: 4FXZ)<sup>99</sup> για τον rocking bundle και οι δομές τους δείχνονται δεξιά σε διαμόρφωση ανοιχτή προς το περίπλασμα και με δεσμευμένο υπόστρωμα. iii) Στον μηχανισμό ανελκυστήρα<sup>83,100</sup>, το υπόστρωμα δεν παραμένει στην ίδια θέση κατά την διάρκεια του κύκλου μεταφοράς και συνδέεται σε ένα domain που μετακινείται σαν έμβολο διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης για να απελευθερώσει το υπόστρωμα στο κυτταρόπλασμα<sup>96</sup>. Όμοια με έναν ανελκυστήρα, αυτό το domain ολισθαίνει διαμέσου της μεμβράνης αλλά η συνολική διαμόρφωση της περιοχής δεν αλλάζει κατά την κίνηση (μοιάζει με ένα άκαμπτο σώμα). Όπως και στον μηχανισμό rocking bundle ή gated-pore, ο μηχανισμός ανελκυστήρα περιλαμβάνει δύο πύλες οι οποίες εναλλάσσονται σε κάθε πλευρά της μεμβράνης την πρόσβαση στην θέση δέσμευσης του υποστρώματος<sup>10</sup>. Μάλιστα υπάρχει ένα domain σαν ικρίωμα ώστε να μπορεί να μετακινηθεί η άκαμπτη περιοχή μεταφοράς. Ο μηχανισμός ανελκυστήρα θεωρείται μηχανισμός κινούμενου φορέα (moving-carrier)<sup>67,79</sup>. Παράδειγμα του μηχανισμού ανελκυστήρα είναι ο μεταφορέας Glt<sub>Ph</sub> του οποίου η δομή δείχνεται σε διαμόρφωση ανοιχτή προς το περίπλασμα και με δεσμευμένο υπόστρωμα (PDB: 2NWW)<sup>101</sup>. **B)** Ασυνεχείς α-έλικες της περιοχής δέσμευσης των υποστρωμάτων<sup>90</sup> στην δομή του αντιμεταφορέα Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NhaA (PDB: 1ZCD)<sup>102</sup> (μοτίβο LeuT, transmembrane-spanning). **Γ)** Αναπαράσταση της εναλλαγής διαμόρφωσης με το μοντέλο ανελκυστήρα σε διμερές του μεταφορέα Bor1p (PDB: 5SV9)<sup>103</sup>. Φαίνεται η μετακίνηση του core domain επί του στατικού gate domain για την επίτευξη της μεταφοράς.



### 1.2.2. Προσεγγίσεις στην μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής μακρομορίων παρουσιάζει πολλές τεχνικές προκλήσεις<sup>104</sup>. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ επιτρέπει τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής δομής με υψηλή ευκρίνεια, αλλά είναι λίγες οι γνωστές δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όπου επιτυγχάνεται ανάλυση ατομικής ευκρίνειας (0.5-1.5Å)<sup>105</sup>. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ εξακολουθεί να είναι αποτελεσματική μέθοδος, αλλά η πρόοδος στην βιοχημεία των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την εξέλιξη της Cryo-EM (Cryo-electron microscopy), έχουν οδηγήσει σε εκθετική αύξηση των αναλυμένων δομών υψηλής ευκρίνειας<sup>106</sup>. Επιπλέον, για την ανάλυση της δομής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχουν επιστρατευτεί νέες τεχνικές<sup>107</sup> όπως η χρήση αντισωμάτων μονού domain (single-domain antibodies ή nanobodies)<sup>108,109</sup> και η κρυσταλλογραφία σε λιπιδιακό περιβάλλον με nanodiscs<sup>110</sup>.

Για να αντισταθμίσουμε έως ένα βαθμό την έλλειψη γνωστών δομών στους ενεργητικούς μεταφορείς δευτερογενούς τύπου, εκμεταλλευόμαστε τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά τους για να ομαδοποιήσουμε ομόλογους μεταφορείς σε δομικά πρότυπα από δεδομένα κρυσταλλογραφίας<sup>111</sup>. Αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στην μελέτη μεταφορέων για τους οποίους η παραγωγή επαρκών ποσοτήτων δομικά άρτιων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι τεχνικά δύσκολη. Με βάση ένα δομικό πρότυπο, οι μεταφορείς μπορούν να ελέγχονται *in silico* για την αναγνώριση γνωστών ή νέων αναλόγων, τα οποία μπορούν να εξεταστούν χρησιμοποιώντας χημικές βιβλιοθήκες<sup>112</sup>.

Ακόμα και όταν υπάρχει δομικό πρότυπο, ένα σημαντικό ζήτημα είναι η ύπαρξη εναλλακτικών διαμορφώσεων της δομής<sup>11,113</sup>. Συνήθως οι κρυσταλλογραφικά γνωστές δομές αντιστοιχούν σε μία ή σπάνια περισσότερες των δύο διαμορφώσεις από το σύνολο διαμορφώσεων του κύκλου μεταφοράς<sup>114</sup>. Ωστόσο, με την ανάλυση περισσότερων διαμορφώσεων ενός μεταφορέα<sup>114</sup>, την ανάλυση δεδομένων γνωστών δομών σε διαφορετικές διαμορφώσεις από ομόλογους μεταφορείς<sup>13,17</sup>, αλλά και την συνεχώς αυξανόμενη υπολογιστική ισχύ, μπορεί να πραγματοποιηθεί η προσομοίωση ολόκληρου του κύκλου μεταφοράς<sup>105,115</sup>. Σε αυτές τις προσομοιώσεις της δομής, μπορούν να συμπεριληφθούν μικρά μόρια, είτε πρόκειται για υποστρώματα, ανταγωνιστές ή άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες, ενώ μπορεί να λαμβάνεται υπόψη πως επηρεάζει η λιπιδιακή σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης την λειτουργία του μεταφορέα<sup>84,115-117</sup>.

Στην περίπτωση μη ύπαρξης δομικού προτύπου, οι *in silico* μοντελοποιήσεις θα πρέπει να βασίζονται σε βιοφυσικά και βιοχημικά πειραματικά δεδομένα υψηλής αξιοπιστίας<sup>115</sup>. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός μεταφορέα επιτυγχάνεται συνδυάζοντας την υψηλή αποτελεσματικότητα και ευκολία της αλληλούχισης του γονιδιώματος, με την ανάπτυξη ειδικών προσεγγίσεων αντίστροφης γενετικής (κατανόηση της λειτουργίας ενός γονιδίου μέσω ανάλυσης των φαινοτυπικών επιδράσεων από συγκεκριμένες γονιδιακές τροποποιήσεις)<sup>10</sup>. Σε αυτή την προσπάθεια και ειδικά για την εκτέλεση περίπλοκων γενετικών προσεγγίσεων και αυστηρών βιοχημικών τεχνικών, η χρήση πρότυπων μικροοργανισμών αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στην πειραματική μεθοδολογία.

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα στην μελέτη της λειτουργίας/εξειδίκευσης ενός μεταφορέα, αποτελεί η ύπαρξη διαφορετικών μεταφορέων με επικαλυπτόμενες εξειδικεύσεις. Έτσι, είναι πρακτικά αδύνατο να χαρακτηριστεί λειτουργικά με βασικές βιοχημικές αναλύσεις ένας μεταφορέας, εφόσον εκφράζονται παράλληλα άλλοι μεταφορείς παρόμοιας λειτουργίας. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί μόνο μελετώντας έναν μεταφορέα σε γενετικό υπόβαθρο που στερείται μεταφορέων με επικαλυπτόμενη λειτουργία/εξειδίκευση. Ένα τέτοιο γενετικό υπόβαθρο πρέπει να συνδυάζει πολλαπλά γονίδια απώλειας λειτουργίας (knockout strains) και μπορεί εύκολα να κατασκευαστεί και να ελεγχθεί πειραματικά σε πρότυπους μικροοργανισμούς όπως η *E. coli*, ο *Aspergillus nidulans* ή ο *Saccharomyces cerevisiae*.

Για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό μεταφορέων, χρησιμοποιούνται γενετικές και βιοχημικές προσεγγίσεις σε συνδυασμό με απλές δοκιμασίες πρόσληψης ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων, σε βακτηριακά ή άλλα κύτταρα που επιτρέπουν πειραματικούς χειρισμούς (μύκητες, πρωτόζωα, ερυθρά αιμοσφαίρια, ωκύτταρα ή ειδικές καλλιέργειες κυτταρικών σειρών θηλαστικών). Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται στην μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, στηρίζονται κυρίως σε συστηματική μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης (site-directed techniques), αλλά και αποδοτικότερες προσεγγίσεις όπως η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis)<sup>118</sup>. Από την μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης μπορούν να εντοπιστούν θέσεις της αλληλουχίας σημαντικές για την λειτουργία<sup>66</sup> και να υποδειχθεί η δομική οργάνωση διαμεμβρανικών τμημάτων<sup>119</sup> ή ο μηχανισμός εναλλαγής διαμορφώσεων κατά τη δέσμευση του υποστρώματος<sup>72</sup>.

Η πρόβλεψη της λειτουργίας/εξειδίκευσης ενός μεταφορέα με βάση την πρωτοταγή (ή την δευτεροταγή) δομή δεν είναι εύκολη υπόθεση. Δεν είναι απαραίτητο ότι συγγενικοί μεταφορείς με υψηλή ομολογία θα αναγνωρίζουν ή/και μεταφέρουν τα ίδια υποστρώματα, ενώ αντίθετα έχει δείχθει ότι φυλογενετικά απομακρυσμένοι μεταφορείς μπορεί να εμφανίζουν επικαλυπτόμενα προφίλ εξειδίκευσης<sup>120-122</sup>. Κλασσικές μελέτες στην Lac περμεάση (LacY) έχουν δείξει ότι συγγενικοί μεταφορείς με χαρακτηριστική ομοιότητα στην διευθέτηση των αμινοξέων του κέντρου δέσμευσης εμφανίζουν ανέλπιστα σημαντικές διαφορές στην προτίμηση των υποστρωμάτων τους<sup>123</sup>. Εφόσον η πρόβλεψη της λειτουργίας/εξειδίκευσης δεν είναι πάντα αξιόπιστη, η γνώση των σχέσεων δομής-λειτουργίας αποκτάται κυρίως από μελέτες μεταλλαξιγένεσης και βιοχημικές αναλύσεις σε πρότυπους μικροοργανισμούς, αλλά και από κρυσταλλογραφικά γνωστές δομές ή *in silico* δομικές αναλύσεις (π.χ. homology modeling, molecular dynamics).

### 1.3. Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και νουκλεοσιδίων

Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων που είναι υπεύθυνοι για την κυτταρική πρόσληψη πουρινών, πυριμιδινών και αναλόγων τους, εμπίπτουν σε τέσσερις ξεχωριστές οικογένειες ομόλογων<sup>66</sup>. Τα μέλη τους κατατάσσονται ως ενεργητικοί



μεταφορείς δευτερογενούς τύπου και τα λειτουργικά γνωστά μέλη τους είναι συμμεταφορείς H<sup>+</sup> ή Na<sup>+</sup> της πλασματικής μεμβράνης μικροβιακών, φυτικών ή ζωικών κυττάρων.

Οι δύο από αυτές τις οικογένειες, η οικογένεια ουρεΐδων, ουρακίλης, ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος UPS/NBUT και η οικογένεια αδενίνης, υποξανθίνης, κυτοσίνης, κυτοκινίνης και/ή αλκαλοειδών PUP/POP, είναι ειδικές για το φυτικό βασίλειο<sup>124</sup> και ταξινομήθηκαν στην υπεροικογένεια DMT (Drug/Metabolite Transporters) με δομικό πρωτότυπο αυτό του μεταφορέα EmrE<sup>125</sup>. Οι άλλες δύο οικογένειες εντάσσονται στην υπεροικογένεια APC<sup>126,127</sup>. Η τρίτη οικογένεια είναι η NCS1 (Nucleobase Cation Symporter 1) και περιλαμβάνει μεταφορείς κυτοσίνης, υποξανθίνης, αδενίνης και/ή γουανίνης, μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης και/ή ουριδίνης και μεταφορείς αλλαντοΐνης/υδαντοΐνης, οι οποίοι βρίσκονται σε αρχαία, βακτήρια, μύκητες, φυτά και ορισμένα φωτοσυνθετικά πρώτιστα<sup>66,121</sup>. Η τελευταία οικογένεια είναι η NAT/NCS2 (Nucleobase Ascorbate Transporter/Nucleobase Cation Symporter 2) των μεταφορέων ουρακίλης και/ή ξανθίνης, ουρικού οξέος και των μεταφορέων L-ασκορβικού οξέος που εμφανίζονται σε όλες τις μεγάλες ταξινομικές ομάδες οργανισμών εκτός των πρωτοζώων. Η NAT/NCS2 περιλαμβάνει ως υποομάδα, την οικογένεια AzgA-like των μεταφορέων αδενίνης, υποξανθίνης και/ή γουανίνης που περιορίζεται σε αρχαία, βακτήρια, μύκητες, φυτά και λίγα φωτοσυνθετικά πρώτιστα<sup>66,120,128</sup> (βλέπε **Εικόνα 1.6**).

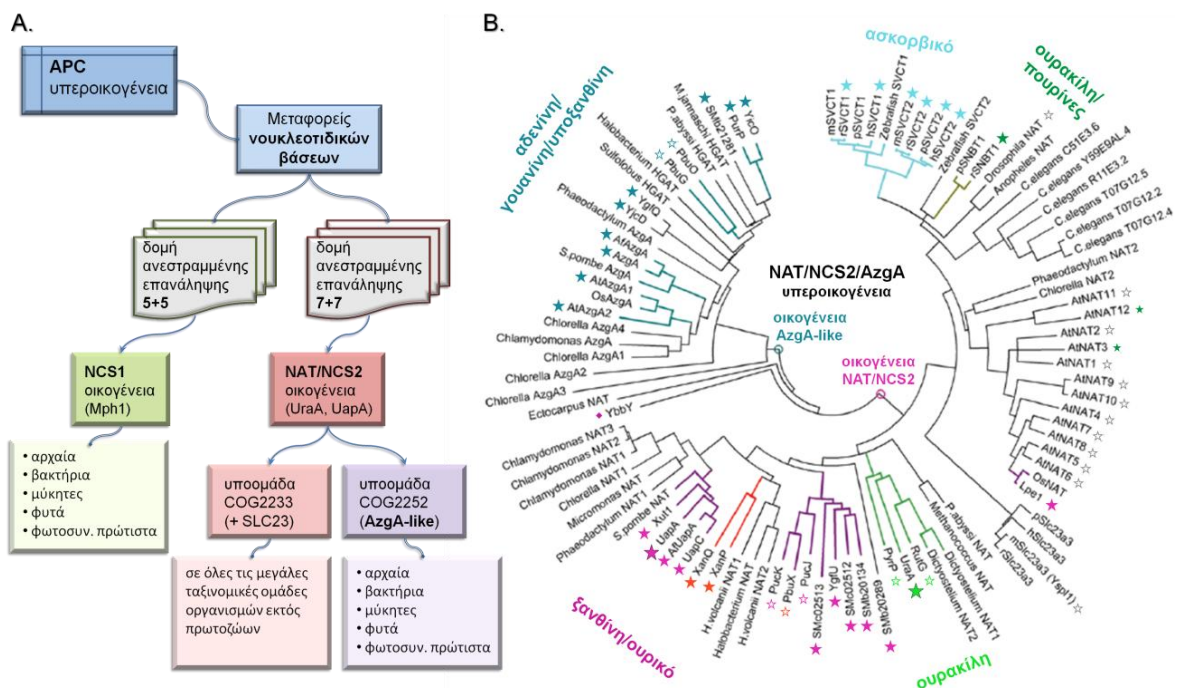
Η οικογένεια NCS1 περιλαμβάνει μεταφορείς ειδικούς για την πρόσληψη πουρινών, πυριμιδινών, βιταμινών και συναφών τους μεταβολιτών<sup>129</sup>. Αρκετά μέλη της οικογένειας που ανήκουν σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά, αλλά δεν έχει προχωρήσει σε σημαντικό βαθμό η μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των προκαρυωτικών οργανισμών<sup>130-132</sup> της οικογένειας. Η λειτουργία/εξειδίκευση των βακτηριακών ομολόγων της NCS1 δεν μπορεί να προβλεφθεί με συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών και απλή φυλογενετική ανάλυση<sup>25,131</sup> (βλέπε Εικόνα 5.1 συμπληρωματικής ενότητας). Το μοναδικό μέλος της οικογένειας NCS1 με κρυσταλλογραφικά γνωστή δομή αποτελεί ο μεταφορέας Mph1 του *M. liquefaciens*<sup>74,133</sup> και περιλαμβάνει 12 TMs σε πρότυπο 5+5 ανεστραμμένων α-ελίκων<sup>74,133-135</sup>.

Από τις τέσσερις οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων, μόνο η οικογένεια NAT/NCS2 περιέχει ομόλογα σε θηλαστικά και άλλα ζώα, αλλά ακόμα και σε αυτήν, τα ανθρώπινα ομόλογα δεν αναγνωρίζουν νουκλεοτιδικές βάσεις ή κυτταροτοξικά ανάλογά τους<sup>136</sup>. Επιπρόσθετα, οι μεταφορείς του ανθρώπου που εμπλέκονται στην πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων τους εμπίπτουν σε διαφορετικά δομικά πρότυπα και ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες όπως οι ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter) και CNT (Concentrative Nucleoside Transporter) που μεταφέρουν ανάλογα νουκλεοσιδίων<sup>136-140</sup>.

Ομόλογα της οικογένειας ENT έχουν βρεθεί μόνο σε μύκητες, φυτά, πρωτόζωα, νηματώδεις σκώληκες και θηλαστικά (ευκαρυωτικούς οργανισμούς) και εμφανίζουν ευρεία εξειδίκευση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μεταφορέας hENT1 του ανθρώπου, ο οποίος μεταφέρει πουρινικά και πυριμιδινικά νουκλεοσίδια και βρίσκεται

τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια<sup>141</sup>. Επιπρόσθετα έχουν βρεθεί ομόλογα που μεταφέρουν και νουκλεοτιδικές βάσεις<sup>142,143</sup>. Οι μεταφορείς της ENT είναι κατά βάση διευκολυντές, αλλά κύρια εξαίρεση αποτελούν οι δευτερογενείς ενεργητικοί μεταφορείς των φυτών<sup>144</sup>. Οι μεταφορείς της ENT υιοθετούν το δομικό πρότυπο της MFS 6+6 και πρόσφατα παρουσιάστηκε για πρώτη φορά υψηλής ευκρίνειας δομή ενός ομολόγου από αυτήν την οικογένεια (hENT1)<sup>145</sup>.

Η CNT διαιρείται φυλογενετικά σε τρεις ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα ομόλογα του μεταφορέα NupC της *E. coli* και του *B. subtilis*, η δεύτερη περιλαμβάνει μεταφορείς που ανήκουν σε θηλαστικά και η τρίτη ορισμένα βακτηριακά ομόλογα άγνωστης λειτουργίας. Τόσο τα βακτηριακά ομόλογα όσο και τα ευκαρυωτικά, μπορούν να μεταφέρουν νουκλεοσίδια, αλλά τα βακτηριακά συμμεταφέρουν H<sup>+</sup> ενώ τα ομόλογα των θηλαστικών Na<sup>+</sup><sup>146,147</sup>. Επίσης έχει αναλυθεί η δομή ενός ομολόγου της οικογένειας από το *Vibrio cholerae*<sup>148</sup> και πιο πρόσφατα, του hCNT3 από τον άνθρωπο<sup>62</sup>.



**Εικόνα 1.6: Ταξινόμηση των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων της APC υπεροικογένειας. Α)** Οι μεταφορείς χωρίζονται δομικά (7+7 ή 5+5 δέσμες ΤΜs) και φυλογενετικά στις οικογένειες NAT/NCS2 και NCS1. Η οικογένεια NAT/NCS2 περιλαμβάνει μεταφορείς ουρακίλης, ξανθίνης ή/και ουρικού και ασκορβικού οξέος, ενώ εμφανίζει χαμηλή ομολογία με τους μεταφορείς αδενίνης ή/και γουανίνης/υποξανθίνης της οικογένειας AzgA-like. Ενδεικτικά για τις οικογένειες, αναφέρονται οι κρυσταλλογραφικά γνωστοί μεταφορείς UraA, UapA, Mph1 και οι ομάδες οργανισμών που συντηρούν ομόλογα τους. **Β)** Φυλογενετικό δέντρο των γνωστών μελών της NAT/NCS2 και της σχέσης της με την AzgA-like<sup>66</sup> (τροποποίηση βάσει νεότερων δεδομένων<sup>149,150</sup>). Στο δέντρο περιλαμβάνονται οι λειτουργικά γνωστοί μεταφορείς και μη χαρακτηρισμένα ομόλογα οργανισμών αναφοράς από μεγάλες ταξινομικές βαθμίδες. Οι λειτουργικά γνωστοί μεταφορείς σημαίνονται με αστερίσκους που είναι είτε πλήρεις (πληροφορίες για την λειτουργία τους από δοκιμασίες πρόσληψης ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων) είτε κενό χρώματος (πληροφορίες από μεθόδους γενετικής ή γονιδιωματικής). Τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού (μωβ), ξανθίνης (πορτοκαλί), ουρακίλης (πράσινο), ουρακίλης/πουρινών (σκούρο πράσινο), L-ασκορβικού (γαλάζιο) και αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης της AzgA-like (πετρόλ). Με γκρι κενούς αστερίσκους δείχνονται τα ομόλογα που έχουν μελετηθεί αλλά η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη.

### 1.3.1. Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ως στόχοι νέων φαρμάκων

Οι νουκλεοτιδικές βάσεις (πουρίνες και πυριμιδίνες) συνδέουν άμεσα τις τελεστικές (μεταβολισμός, σηματοδότηση, ομοιόσταση) με τις πληροφοριακές λειτουργίες του κυττάρου (αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση). Αποτελούν μονάδες πληροφορίας για τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες του γονιδιώματος αλλά και δομική βάση για κομβικής σημασίας βιομόρια (ATP/ADP/AMP, GTP/GDP, NADH), ενώ είναι απαραίτητες πηγές αζώτου ή νουκλεοτιδίων σε παρασιτικούς μικροοργανισμούς που δεν μπορούν να τις συνθέσουν<sup>151-153</sup>.

Η σύνθεση των νουκλεοτιδίων γίνεται μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών, αυτό της *de novo* σύνθεσης και αυτό του μονοπατιού περίσωσης (salvage pathway). Στην *de novo* σύνθεση τα νουκλεοτίδια σχηματίζονται από βασικά μοριακά υλικά όπως αμινοξέα, ενώσεις ενός ατόμου άνθρακα και ριβόζη, ενώ στο μονοπάτι περίσωσης χρησιμοποιούνται νουκλεοτιδικές βάσεις (ιδίως πουρίνες) που παράγονται από την αποικοδόμηση νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων<sup>154,155</sup>. Το μονοπάτι περίσωσης πλεονεκτεί στην εξοικονόμηση ενέργειας και υλικών για την παραγωγή των νουκλεοτιδίων και απαντάται φυσιολογικά σε πολλούς τύπους κυττάρων. Με αυτό το μονοπάτι μπορούν να περισωθούν εκτός από τις ενδοκυττάριας νουκλεοτιδικές βάσεις και οι εξωκυττάριας βάσεις από διατροφικές πηγές<sup>156</sup>.

Επειδή οι νουκλεοτιδικές βάσεις είναι υδρόφιλες, δεν μπορούν να διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες με απλή διάχυση. Για αυτόν τον λόγο, στο μονοπάτι περίσωσης περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες μεταφοράς τους διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Αν και η ύπαρξη μεταφορέων ειδικών για νουκλεοτιδικές βάσεις έχει βρεθεί ήδη σε μια ποικιλία κυττάρων και ιστών,<sup>66,120,129</sup> οι μοριακοί μηχανισμοί που τις διέπουν παραμένει να αποσαφηνιστούν. Αυτοί οι μεταφορείς είναι πολλά υποσχόμενοι φαρμακολογικοί στόχοι για την προώθηση ειδικών νουκλεοτιδικών αναλόγων, όπως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα<sup>157</sup>. Επιπρόσθετα, τέτοιοι μεταφορείς θα μπορούσαν να είναι στόχοι βακτηριοτοξικών ή αντιμυκητιασικών φαρμάκων, καθώς είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν εν γένει διαφορετικά δομικά πρότυπα μεταφορέων για την πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων από ότι τα κύτταρα του ανθρώπου ή άλλων θηλαστικών<sup>136,152,158</sup>. Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποτελέσουν την βάση για τον επιλεκτικό σχεδιασμό νέων φαρμάκων, που εξασφαλίζουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα στα κύτταρα-στόχους και λιγότερες παρενέργειες σε ιστούς του ξενιστή<sup>152,159,160</sup>.

Οι μικροβιακοί μεταφορείς μπορεί να αξιοποιηθούν ως δίοδοι φαρμάκων και να στοχευθούν όταν η λειτουργία τους αποδειχθεί ουσιώδης για την επιβίωση ή την λοιμογονικότητα των παθογόνων που τους εκφράζουν<sup>152</sup>. Μια τέτοια περίπτωση αναφέρεται στην *Borrelia burgdorferi*, το παθογόνο μικρόβιο της νόσου του Lyme<sup>161</sup>. Η βορρέλια μεταδίδεται στον άνθρωπο από το τσίμπημα ορισμένων ειδών κρότωνα του γένους *Ixodes*. Η λοίμωξη δύναται να εξαλειφθεί με την χορήγηση αντιβιοτικών σε αρχόμενο στάδιο της νόσου, αλλά ορισμένα άτομα δεν ανταποκρίνονται στην

ενδεικνύομενη θεραπεία. Μια εναλλακτική αλλά ειδική φαρμακολογική προσέγγιση θα μπορούσε να αναπτυχθεί με βάση το γεγονός ότι η *B. burgdorferi* στερείται των ενζύμων που απαιτούνται για την *de novo* σύνθεση πουρινών, συνεπώς ο κύκλος ζωής και η λοιμογόνος δράση της εξαρτάται από την λειτουργία δύο μεταφορέων πουρινών της οικογένειας AzgA-like, τους BBB22 και BBB23. Αυτό υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι το στέλεχος *B. burgdorferi* Δbbb22-23 δεν ήταν μολυσματικό σε ποντίκια<sup>151,161</sup>. Έτσι, οποιαδήποτε ένωση αναστέλλει με ειδικό τρόπο τους μεταφορείς BBB22/23 θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμεύσει και ως ειδικό φάρμακο για την θεραπεία της νόσου του Lyme. Εφόσον οι μεταφορείς BBB22/23 δεν έχουν ομόλογα στον άνθρωπο, είναι πιθανό ότι τα υποθετικά φάρμακα δεν θα συνδέονται με ανεπιθύμητες ενέργειες.

### 1.3.2. Ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων με κυτταροτοξική δράση

Τα χημικά ανάλογα πουρινών-πυριμιδινών μπορούν να αντικαταστήσουν πρόδρομα μόρια σημαντικών μεταβολιτών ή να ενσωματωθούν στο DNA οδηγώντας σε ισχυρή τοξικότητα ή μεταλλαξιγένεση. Τέτοια ανάλογα (5-FU, 6-TG, 6-MP, AZA, AZT, ACV) έχουν διερευνηθεί εδώ και δεκαετίες ως πιθανά αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα<sup>162,163</sup>. Ωστόσο, η ειδικότητά τους ανάλογα με το κύτταρο-στόχο δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ακόμη και σήμερα, καθώς πολλοί από τους μεταφορείς που εμπλέκονται στην πρόσληψή τους, ιδιαίτερα από μικροοργανισμούς, δεν είναι γνωστοί ή δεν έχουν αναλυθεί ως προς τις σχέσεις δομής-λειτουργίας τους.

Πολλά ανάλογα πουρινών σχετίζονται από την βιβλιογραφία με βακτηριοτοξικές ιδιότητες. Θειούχα ανάλογα όπως η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) και η 6-θειογουανίνη (6-SG) είναι γνωστά κυτταροτοξικά φάρμακα<sup>164</sup>, τα οποία ανταγωνίζονται τον μεταβολισμό της υποξανθίνης και της γουανίνης αναστέλλοντας πρωτίστως τον σχηματισμό ινσινικού οξέος (IMP). Οι αμινοπουρίνες 2-αμινοπουρίνη (2-AP) και 2,6-διαμινοπουρίνη (2,6-AP) αποτελούν κλασσικούς αντιμεταβολίτες, δηλαδή φάρμακα που είναι χημικά όμοια με φυσικούς μεταβολίτες αλλά διαφέρουν αρκετά ώστε να παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές μεταβολικές οδούς, εμφανίζοντας βακτηριοστατική δράση<sup>165</sup>. Η 2-AP ως ανάλογο αδενίνης, δημιουργεί στο DNA ζεύγη με την θυμίνη αλλά μπορεί επίσης να συνδεθεί και με κυτοσίνη ως ανάλογο γουανίνης<sup>166</sup>, ενώ η 2,6-AP μπορεί σχηματίσει ζεύγη με θυμίνη (ή ουρακίλη) και η πρόσθετη αμινομάδα επιτρέπει τον σχηματισμό τριών (αντί δύο) δεσμών υδρογόνου<sup>167</sup>. Άλλοι αντιμεταβολίτες είναι η 6-χλωροπουρίνη (6-CLP) που πιθανά λειτουργεί όπως η 6-MP<sup>168</sup>, η 8-αζαγουανίνη (8-AZA) που παρεμβαίνει στην τροποποίηση του tRNA ανταγωνιζόμενη την γουανίνη για την ενσωμάτωση της<sup>169</sup> και η ισογουανίνη (iso-G) της οποίας η ενσωμάτωση στο DNA οδηγεί σε μεταλλάξεις σε βακτηριακά και ευκαρυωτικά κύτταρα<sup>170</sup>.

Οι φθοροπυριμιδίνες έχουν περιγραφεί ήδη από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα ως αντικαρκινικοί παράγοντες που παρουσίαζαν επίσης εξαιρετική ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη και βιωσιμότητα διάφορων μικροοργανισμών<sup>171</sup>. Το ανάλογο 5-φθοροουρακίλη (5-FU) και τα παράγωγά του, επιδεικνύουν κλινική αποτελεσματικότητα σε πολλά είδη καρκίνων<sup>172</sup>. Η 5-FU όμως εμφανίζει και ισχυρή βακτηριοτοξικότητα<sup>92,173-178</sup> και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και σε προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας<sup>179</sup>. Η πρώτη μελέτη αντιμικροβιακής τοξικότητας της 5-FU διενεργήθηκε στην *E. coli* και διαπίστωσε ότι η κύρια ανασταλτική της δράση προκύπτει από την παρεμπόδιση της μετατροπής του dUMP σε dTMP από το ένζυμο θυμιδυλική συνθάση (TS)<sup>180</sup>. Η διακοπή της σύνθεσης DNA που προκύπτει από την ένδεια dTMP θεωρείται ότι οδηγεί στο φαινόμενο “thymineless death”<sup>174,181</sup>. Σε αντίθεση με την 5-FU και τις φθοριομένες πυριμιδίνες, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η πιθανή βακτηριοτοξική δράση φθοριομένων πουρινικών αναλόγων. Ωστόσο, έχουν απομονωθεί ανθεκτικά μεταλλάγματα του *B. subtilis* σε φθοροπουρίνες. Ειδικότερα, ορισμένα μεταλλάγματα μειωμένης ενεργότητας για την φωσφοριβοζυλοτρανσφεράση της αδενίνης είναι ανθεκτικά στην δράση της 2-φθοροαδενίνης (2-FA) και παράλληλα εμφανίζουν μειωμένη πρόσληψη αδενίνης<sup>182</sup>.

#### 1.4. Η οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2

Οι πρωτεΐνες της NAT/NCS2 είναι συμμεταφορείς κατιόντων H<sup>+</sup> ή Na<sup>+</sup> ειδικοί για πουρίνες, πυριμιδίνες, ανάλογα πουρινών με χρήση στην φαρμακολογική πρακτική, αλλά και ασκορβικό οξύ<sup>183-185</sup>. Η NAT/NCS2 χωρίζεται φυλογενετικά σε δύο υποσύνολα (COG, Cluster of Orthologous Genes)<sup>128</sup>. Στο πρώτο, COG2233 ή NAT, περιλαμβάνονται μεταφορείς βακτηρίων και μυκήτων ειδικοί για πουρίνες (ξανθίνη, ουρικό οξύ), μεταφορείς βακτηρίων ειδικοί για πυριμιδίνες (ουρακίλη, θυμίνη), μεταφορείς από φυτά και θηλαστικά (εκτός του ανθρώπου) με ευρεία εξειδίκευση για ουρακίλη/πουρίνες, και οι μεταφορείς L-ασκορβικού SVCT1 και SVCT2 (συμμεταφορείς Na<sup>+</sup>/βιταμίνης C, μέλη της οικογένειας SoLute Carrier/SLC23)<sup>158</sup>. Ειδικότερα, τα βακτηριακά ομόλογα διακρίνονται φυλογενετικά σε τρεις κλάδους, που περιέχουν ο πρώτος μεταφορείς ουρακίλης ή ουρακίλης/θυμίνης, ο δεύτερος μεταφορείς ξανθίνης, ουρικού οξέος ή ξανθίνης/ουρικού οξέος και ο τρίτος ομόλογα όπως ο μεταφορέας YbbY της *E. coli* που φαίνεται να είναι γενικός μεταφορέας πουρινών, ευρείας εξειδίκευσης<sup>128</sup> (βλέπε Εικόνα 5.2 συμπληρωματικής ενότητας). Το δεύτερο φυλογενετικό υποσύνολο COG2252 αφορά την λιγότερο μελετημένη οικογένεια μεταφορέων αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης AzgA-like<sup>186</sup>.

Πληροφορίες για την δομή και τον μηχανισμό μεταφοράς των ομολόγων της NAT/NCS2 παρέχονται από τις κρυσταλλογραφικά γνωστές δομές του μεταφορέα ουρακίλης UraA<sup>77,187</sup> της *E. coli* και του μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού UapA<sup>188</sup> του *A.*

*nidulans*. Επιπρόσθετα, εκτενείς μελέτες μεταλλαξιγένεσης στον UapA<sup>11</sup> και στους μεταφορείς ξανθίνης XanQ<sup>66,179</sup>, ουρικού UacT<sup>189</sup> ή ουρακίλης/θυμίνης RutG<sup>149</sup> της *E. coli*, έχουν υποδείξει συντηρημένες θέσεις της αλληλουχίας των NAT/NCS2 ομολόγων, σημαντικές για την λειτουργία και την δέσμευση των υποστρωμάτων. Τέτοια θέση είναι η Gln408 του UapA<sup>190</sup> και η αντίστοιχη Gln324 του XanQ,<sup>179,191,192</sup> Gln318 του UacT<sup>189</sup>, Glu290 του UraA<sup>77</sup> που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του υποστρώματος, και όπως φαίνεται από την κρυσταλλογραφία του UapA (PDB: 5I6C) και του UraA (PDB: 3QE7 & 5XLS), η μεν Gln408 συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με την ξανθίνη<sup>188</sup>, η δε Glu290 συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με την ουρακίλη<sup>77,193</sup>.

Το δομικό πρότυπο της NAT/COG2233 αποτελείται από 14 TMs που χωρίζονται σε δύο δέσμες ανεστραμμένης επανάληψης 7+7 και διατάσσονται χωροδιατακτικά σε δύο domains, το core (TMs 1-4 και 8-11) και το gate (TMs 5-7 και 12-14)<sup>77,188</sup>. Δύο βραχείς αντιπαράλληλοι β-κλώνοι διακόπτουν την συνέχεια της α-ελικοειδούς δομής των TMs 3 και 10 (βλέπε **Εικόνα 1.7/A**). Οι μεταφορείς της NAT/NCS2 πιθανώς λειτουργούν ως ομοδιμερή και χρησιμοποιούν τον μηχανισμό τύπου ανελκυστήρα για την επίτευξη εναλλασόμενης πρόσβασης<sup>187,188</sup>, ενώ στον UapA έχει αποδείχθηκε ότι σημαντικός είναι και ρόλος ειδικών μεμβρανικών λιπιδίων για την σταθερότητα και την λειτουργία του διμερούς<sup>194,195</sup>. Το core domain περιέχει τις θέσεις/ρυθμιστές της δέσμευσης του υποστρώματος και είναι αυτό που καθοδηγεί την μετακίνηση του υποστρώματος κατά τον μηχανισμό του ανελκυστήρα, ενώ το gate domain παραμένει σχετικά ακίνητο μεσολαβώντας στον σχηματισμό ομοδιμερούς, παρέχοντας όμως και σημαντικά στοιχεία ελέγχου/πύλες για την μετακίνηση των υποστρωμάτων (rocking-bundle bending, ιδίως μέσω των ευέλικτων TM 5 και 12)<sup>187,188</sup> (βλέπε Εικόνα 1.7/B).

#### **1.4.1. Η οικογένεια μεταφορέων πουρινών AzgA-like αποτελεί υποσύνολο της NAT/NCS2**

Η οικογένεια AzgA-like ορίστηκε ιστορικά από τον ομώνυμο συμμεταφορέα H<sup>+</sup>/αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης AzgA του ασκομύκητα *A. nidulans*<sup>186</sup>. Ο AzgA είναι το ιδρυτικό μέλος μιας λειτουργικά και φυλογενετικά διακριτής οικογένειας μεταφορέων οι οποίοι, ενώ υπάρχουν σε μύκητες, αρχαία, βακτήρια και φυτά, δεν υπάρχουν στα μετάζωα. Τα μέλη της δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς έως σήμερα, αλλά σχετίζονται με την μεταφορά αδενίνης ή/και γουανίνης και υποξανθίνης<sup>66</sup>.

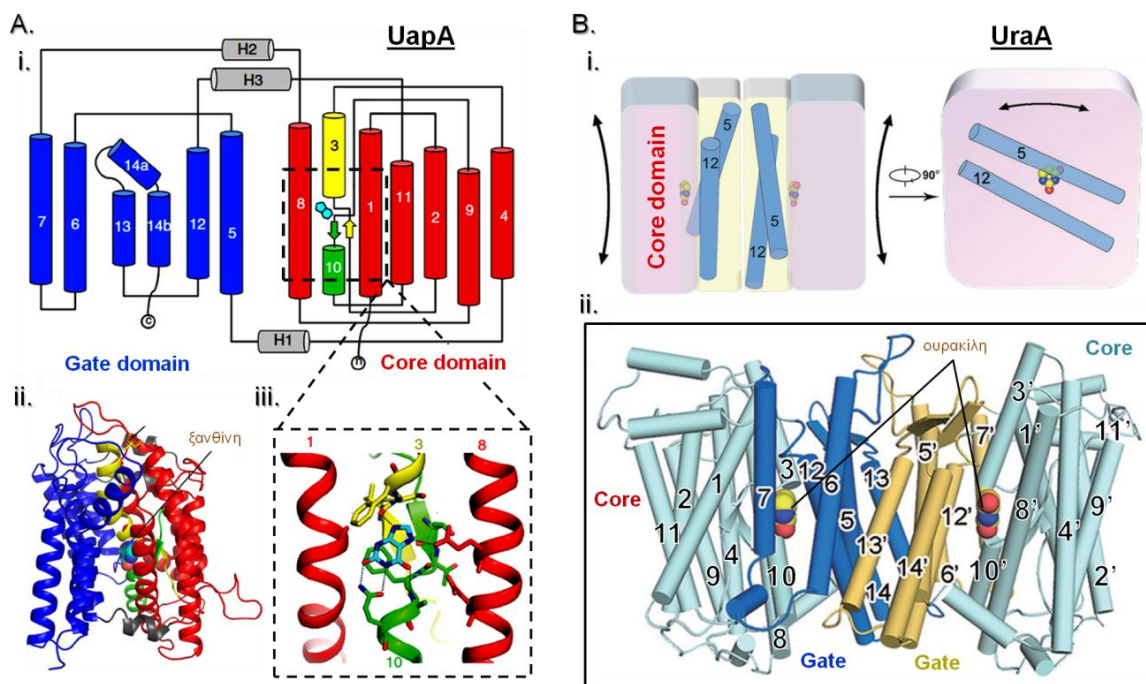
Τα AzgA-like ομόλογα παρουσιάζουν χαμηλή συνολική ταυτότητα αλληλουχίας με τα μέλη άλλων συγγενικών οικογενειών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων<sup>196</sup>, αλλά κατατάσσονται φυλογενετικά στην οικογένεια NAT/NCS2 (υποσύνολο COG2252). Επιπλέον, οι μεταφορείς της AzgA-like δεν εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας των οικογενειών NAT/NCS2<sup>197</sup> ή NCS1<sup>130</sup> που συμμετέχουν στην

δέσμευση και μεταφορά των υποστρωμάτων. Έως σήμερα δεν έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία κάποια δομή μέλους της AzgA-like, αλλά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η οικογένεια σχετίζεται και δομικά με την NAT/NCS2 και τα μέλη της μπορούν να μοντελοποιηθούν χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την δομή του UraA<sup>196,198</sup>.

Εκτός του μεταφορέα AzgA, έχουν μελετηθεί και οι μεταφορείς AdeP και GhxP της *E. coli*, που είναι οι κύριοι μεταφορείς της *E. coli* K-12 για την μεταφορά αδενίνης και γουανίνης/υποξανθίνης αντίστοιχα<sup>196</sup>. Η φυσιολογική λειτουργία των δύο ομολόγων έχει συσχετισθεί με τον μεταβολισμό των πουρινών σε επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης, καθώς συμμετέχουν στο σύνολο γονιδίων που ελέγχονται ρυθμιστικά από τον μεταγραφικό παράγοντα PurR (PurR regulon)<sup>32,33</sup>. Επιπρόσθετα, ο AdeP (PurP) είναι υπεύθυνος για την μεταφορά αδενίνης από γενετικές μελέτες στην *E. coli* K-12 και ταυτίζεται με αυτόν που είχε υποτεθεί ως απαραίτητος για την πρόσληψη αδενίνης σε αερόβιες συνθήκες,<sup>199</sup> ενώ από πιο πρόσφατες γενετικές μελέτες έχει δείχθει ότι ο GhxP είναι ο βασικός μεταφορέας μιας σειράς κυτταροτοξικών αναλόγων γουανίνης/υποξανθίνης<sup>165</sup>.

Οι μεταφορείς AdeP και GhxP υποβλήθηκαν σε συστηματική μεταλλαξιγένεση εξαιρετικά συντηρημένων θέσεων στα TMs 1, 3, 8, 9 και 10<sup>196</sup>, οι οποίες είχαν μελετηθεί και σε NAT/NCS2 ομόλογα<sup>66,149,179,189</sup>. Από την ανάλυση της μεταλλαξιγένεσης βρέθηκαν αναντικατάστατες θέσεις για την λειτουργία των AdeP και GhxP, οι οποίες στους ομόλογους μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού οξέος (XanQ και UacT) της *E. coli* καταλαμβάνονται από παρόμοιου ρόλου αμινοξέα και προβλέπεται να είναι εντός ή σε γειτνίαση με το κέντρο δέσμευσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι απόλυτα συντηρημένες εντός της AzgA-like και αναντικατάστατες για την λειτουργία Glu318 και Glu322 των AdeP και GhxP αντίστοιχα, οποίες πιθανόν αντιστοιχούν στην Gln324 του XanQ<sup>66,196</sup>. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τον ισχυρισμό ότι τα φυλογενετικά απομακρυσμένα μέλη των AzgA-like και NAT/NCS2, χρησιμοποιούν τοπολογικά όμοιες θέσεις ρυθμιστές που καθορίζουν την λειτουργία και τα διακριτά προφίλ εξειδίκευσης για τις πουρίνες<sup>196</sup>.





**Εικόνα 1.7: Τα δομικά πρότυπα της NAT/NCS2. Α)** Η δομή ενός μονομερούς του UapA (διμερές PDB: 5I6C)<sup>188</sup>. Οι  $\alpha$ -έλικες απεικονίζονται ως κύλινδροι και οι  $\beta$ -κλώνοι ως βέλη. i) Τοπολογικό διάγραμμα της δομής 7+7 του μεταφορέα, που διατάσσεται στο gate domain των TMs 5, 6, 7, 12, 13 και 14 (μπλε) και το core domain των TMs 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 και 11 (κόκκινο). Οι έλικες με τους βραχείς  $\beta$ -κλώνους (unwound region) των TMs 3 και 10 απεικονίζονται με κίτρινο και πράσινο αντίστοιχα. ii) Η τρισδιάστατη δομή του μεταφορέα με δεσμευμένο υπόστρωμά (ξανθίνη). iii) Το ενεργό κέντρο του μεταφορέα συνίσταται από τα TMs 1, 3, 8 και 10 του core domain. **Β)** Πιθανό μοντέλο λειτουργίας του UraA<sup>193</sup> i) Ο διμερισμός ίσως απαιτείται για την επίτευξη των λειτουργικών διαμορφώσεων του gate domain (δείχνονται μόνο τα TM 5 και 12), και ως εκ τούτου είναι πιθανώς απαραίτητος για να γίνει η μεταφορά. Η εναλλασσόμενη πρόσβαση σε κάθε μονομέρες του UraA, επιτυγχάνεται με συνδυασμό κινήσεων πολλαπλών τρόπων και των δύο domains, core και gate. ii) Δείχνονται σε αποφραγμένη διαμόρφωση δύο μονομερή του μεταφορέα που σχηματίζουν ένα ομοδιμερές του UraA από την μεσολάβηση των gate domains τους (μπλε και κίτρινο). Τα μονομερή βρίσκονται στην ενδιάμεση αποφραγμένη διαμόρφωση με τα μόρια ουρακίλης δεσμευμένα σε κάθε core domain (γαλάζιο).

#### 1.4.2. Διάκριση των εξειδικεύσεων εντός της AzgA-like

Από το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 κωδικοποιούνται δύο ομόλογα ζεύγη μεταφορέων διακριτής εξειδίκευσης (δύο ζεύγη παραλόγων), με υψηλή συγγένεια είτε για την αδενίνη είτε για τις γουανίνη/υποξανθίνη και συγκεκριμένα των μεταφορέων AdeP και AdeQ για την αδενίνη και των μεταφορέων GhxP και GhxQ για γουανίνη/υποξανθίνη<sup>196</sup>. Οι τέσσερις μεταφορείς εμφανίζουν υψηλή συγγένεια μεταξύ τους με την συνολική ταυτότητα αλληλουχίας να κυμαίνεται από  $\approx 81\%$  (μεταξύ GhxP και GhxQ) έως  $\approx 34\%$  (μεταξύ GhxP και AdeP) (βλέπε Πίνακα 5.1 συμπληρωματικής ενότητας).



Στην εργασία των Parakostas και συνεργατών<sup>196</sup>, χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά και οι τέσσερις AzgA-like μεταφορείς της *E. coli* και εντοπίστηκαν με μεταλλαξιγένεση τα απαραίτητα αμινοξέα για την λειτουργία των AdeP και GhxP. Η κινητική ανάλυση των τεσσάρων μεταφορέων αποκάλυψε και διαφορές στην συγγένεια και την εξειδίκευση μεταξύ των δύο ομολόγων του κάθε ζεύγους. Ο AdeQ εμφανίζει 5-10 φορές χαμηλότερη συγγένεια για την αδερίνη αλλά και για οποιοδήποτε ανάλογο υψηλής συγγένειας του AdeP. Ο GhxQ εμφανίζει 2-4 φορές χαμηλότερη συγγένεια για την υποξανθίνη και την πλειονότητα των αναλόγων υψηλής συγγένειας του GhxP, αλλά όχι για την γουανίνη και την 6-θειογουανίνη τα οποία αναγνωρίζονται με την ίδια συγγένεια και από τους δύο μεταφορείς.

Όσον αφορά την διάκριση των λειτουργιών μεταξύ των GhxP/Q και AdeP/Q, τα δύο ζεύγη μεταφορέων διαφέρουν όχι μόνο στα βασικά υποστρώματά τους, αλλά δεν παρουσιάζουν επικαλύψεις στα ευρύτερα προφίλ εξειδίκευσής τους<sup>196</sup>. Από τα πουρινικά ανάλογα που ελέγχθηκαν, οι AdeP/Q αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια μόνο ανάλογα αδερίνης τροποποιημένα στις θέσεις 2 ή 6 του πουρινικού δακτυλίου (πουρίνη και 2,6-διαμινοπουρίνη), ενώ οι GhxP/Q αναγνωρίζουν ευρύτερο φάσμα αναλόγων, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων στις θέσεις 1, 2 και 6 (1-μεθυλογουανίνη, 6-θειογουανίνη και 6-μερκαπτοπουρίνη) αλλά και στο ιμιδαζολικό τμήμα (8-αζαγουανίνη). Κανένα από τα ανάλογα που δοκιμάστηκαν δεν είναι υπόστρωμα υψηλής συγγένειας παράλληλα και για τα δύο ζεύγη μεταφορέων.

#### 1.4.3. Προκλήσεις στην μελέτη της AzgA-like

Ο διαχωρισμός εξειδίκευσης που εμφανίζουν τα AzgA-like ομόλογα της *E. coli* διατηρείται και σε στενά συγγενικά βακτήρια όπως η *Aeromonas veronii* (Λάζου & Φριλίγγος, αδημοσίευτα δεδομένα), αλλά δεν εμφανίζεται σε άλλα AzgA-like ομόλογα όπως του ριζοβίου *Sinorhizobium meliloti*<sup>200</sup>, του μύκητα *A. nidulans*<sup>186</sup>, του φυτού *Arapidopsis thaliana*<sup>201</sup> και της σπειροχαίτης *B. burgdorferi*<sup>151,161</sup>, που κωδικοποιούν μεταφορείς ευρύτερης εξειδίκευσης για την μεταφορά αδερίνης/γουανίνης/υποξανθίνης. Με βάση την εντυπωσιακά υψηλή ταυτότητα αλληλουχίας των δύο ζευγών μεταφορέων, η οποία συντηρείται και σε θέσεις σημαντικές για την λειτουργία τους, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί η σχέση δομής-λειτουργίας αυτού του χαρακτηριστικού διαχωρισμού εξειδίκευσης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι μεταφορείς της AzgA-like εμφανίζουν χαμηλή ταυτότητα αλληλουχίας (<18%) με τα μέλη άλλων οικογενειών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων ή άλλων οικογενειών με παρόμοια λειτουργία<sup>121</sup> και δεν διατηρούν σημαντικά μοτίβα αλληλουχίας της NAT/NCS2<sup>197</sup> ή της NCS1<sup>130</sup>. Αν και από προκαταρκτικές αναλύσεις οι μεταφορείς της AzgA-like διακρίνονται φυλογενετικά από τις

NCS2 και NCS1<sup>66,121,196</sup>, δεν έχει γίνει ακόμα προσπάθεια συστηματικής φυλογενετικής ανάλυσης στην ομάδα AzgA-like. Έως σήμερα, η AzgA-like δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και λίγα μόνο μέλη της έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά<sup>186,196</sup>. Υπάρχει λοιπόν ανάγκη συστηματικής φυλογενετικής ανάλυσης της ομάδας και αντιστοίχισης “ορφανών” κλάδων με ομόλογα γνωστής λειτουργίας, ιδίως για τους βακτηριακούς μεταφορείς που εμφανίζουν χαρακτηριστική διάκριση στην εξειδίκευσή τους.

Σχετικά πρόσφατα,<sup>165,196</sup> οι βακτηριακοί μεταφορείς της AzgA-like συσχετίστηκαν με την αναγνώριση κλασικών φαρμάκων όπως η 6-θειογουανίνη και 6-μερκαπτοπουρίνη<sup>162,163</sup>. Τα παραπάνω πουρινικά ανάλογα αναγνωρίζονται από τον GhxP με υψηλή συγγένεια<sup>196</sup>, ενώ πειράματα ανάπτυξης της *E. coli* έδειξαν ότι η βακτηριοτοξική δράση τους απαιτεί την παρουσία GhxP<sup>165</sup>. Επιπρόσθετα, τόσο ο GhxP όσο και ο AdeP σχετίζονται με την αναγνώριση κλασικών αντιμεταβολιτών όπως η 2-αμινοπουρίνη και η 2,6-αμινοπουρίνη<sup>165,196</sup>. Το πλεονέκτημα της συσχέτισης των μεταφορέων της AzgA-like με κυτταροτοξικά ανάλογα μπορεί να αποτελέσει βάση για τον επιλεκτικό σχεδιασμό φαρμάκων με λιγότερες παρενέργειες σε ιστούς του ξενιστή, καθώς οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν εν γένει διαφορετικές πρωτεΐνες μεταφοράς για την πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων τους από ό,τι τα κύτταρα των θηλαστικών<sup>202</sup>. Πράγματι, τέτοιες στοχευμένες εφαρμογές έχουν διερευνηθεί σε σημαντικό βαθμό για ενδοκυτταρικά παρασιτικά πρωτόζωα<sup>152,202,203</sup> αλλά όχι για παθογόνα βακτήρια ή μύκητες<sup>10</sup>.

## 1.5. Σκοπός της διατριβής

Οι αρχικές μελέτες για την κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας στους AdeP και GhxP είχαν εστιασθεί στην ανάλυση του λειτουργικού ρόλου σημαντικών καταλοίπων του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης πουρινών, χωρίς να έχουν αποκαλύψει θέσεις αμινοξέων που να συμβάλλουν στην διάκριση της εξειδίκευσης τους (αδενίνη ή υποξανθίνη/γουανίνη)<sup>196</sup>. Μελετώντας συγκριτικά τους AdeP και GhxP σε περιοχές εκτός του κέντρου δέσμευσης, αλλά και συγκρίνοντας τα προφίλ εξειδίκευσής τους με ομόλογους μεταφορείς όπως ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος μεταφορέα ευρύτερης εξειδίκευσης Q92VC3 του *S. meliloti*,<sup>200</sup> αναμένεται να συσχετιστούν θέσεις της αλληλουχίας τους με την αναγνώριση συγκεκριμένων ομάδων πουρινικών αναλόγων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να διερευνήσουμε την μοριακή βάση της διαφοράς εξειδίκευσης με συστηματικό τρόπο, να καταλήξουμε σε συμπεράσματα για το ποιες δομικές διαφορές αμινοξέων συνδέονται με τον καθορισμό της εξειδίκευσης και ποια ανάλογα πουρινών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να στοχεύσουν ειδικά τον AdeP ή τον GhxP σε μελέτες κυτταροτοξικότητας. Συνδυάζοντας τις λειτουργικές με φυλογενετικές αναλύσεις, θα εξετάσουμε σε ποιες ταξινομικές ομάδες των Βακτηρίων εμφανίζονται μεταφορείς AzgA-like με διακριτή εξειδίκευση για αδενίνη (AdeP) ή υποξανθίνη/γουανίνη (GhxP).

### 2.1. Πλασμιδιακοί φορείς και τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Όλα τα πλασμίδια αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , διαλυμένα σε Tris/HCl (Elution buffer, Macherey-Nagel) εντός αποστειρωμένων μικροσωληνίσκων τύπου eppendorf των 1.5ml. Για τα πειράματα της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πλασμίδια:

**pT7-5.** Φορέας κλωνοποίησης των υπό μελέτη γονιδίων με στόχο την υπερέκφραση τους μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ p/o*). Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (polylinker ή MCS). Πρόκειται για πλασμίδιο μετρίου αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο (medium copy number)<sup>204</sup>.

**pT7-5/*purP*-BAD.** Ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *purP* (P31466), του μεταφορέα αδενίνης AdeP, και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain - BAD) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae*<sup>205</sup>, ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA)<sup>206</sup> στο C-τελικό του άκρο<sup>196</sup>.

**pT7-5/*ghcD*-BAD.** Ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *ghcD* (P0AF52) του μεταφορέα γουανίνης GhxP, και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *K. pneumoniae*, ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο<sup>196</sup>.

**pT7-5/*SmVC3*-BAD.** Ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (Q92VC3) του μεταφορέα αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης SmVC3, και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *K. pneumoniae*, ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο<sup>200</sup>.

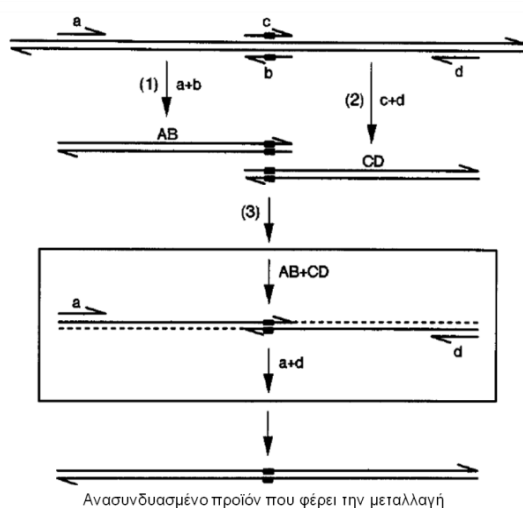
**pT7-5/*xanQ*-BAD.** Ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *xanQ* (P67444) του μεταφορέα ξανθίνης XanQ, και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *K. pneumoniae*, ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο<sup>207</sup>.

**pT7-5/*uraA*-BAD.** Ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *uraA* (P0AGM7) του μεταφορέα UraA, και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *K. pneumoniae*, ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο<sup>149</sup>.

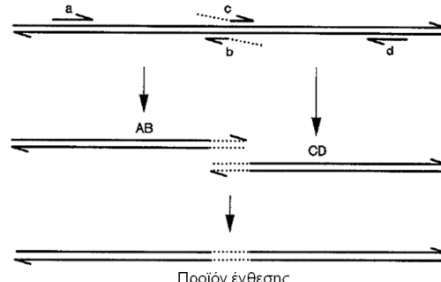
Στην κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τα μεταλλάγματα του AdeP, GhxP και XanQ εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (βλέπε **Εικόνα 2.1**) χρησιμοποιώντας κατάλληλη πολυμεράση με ικανότητα εξωνουκλέασης (Kapa HiFi DNA polymerase, KapaBiosystems). Στην PCR δύο σταδίων<sup>208</sup>, χρησιμοποιούνται συμπληρωματικοί εκκινητές (primers) μαζί με κατάλληλους εκκινητές εξωτερικά του γονιδίου, ώστε να δημιουργηθούν από τα γονίδια-στόχοι τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (1<sup>ο</sup> στάδιο). Τα προϊόντα του 1<sup>ου</sup> σταδίου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν, και χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στο 2<sup>ο</sup> στάδιο, όπου με την χρήση των ίδιων εξωτερικών εκκινητών του 1<sup>ου</sup> σταδίου, αυτά επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από την συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία όλων των προηγούμενων τμημάτων (2<sup>ο</sup> στάδιο). Η παραπάνω μεθοδολογία, περιγράφεται και ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension)<sup>208</sup>.

Οι πλασμιδιακοί φορείς (NucleoSpin Plasmid kit, Macherey-Nagel) και τα προς ένθεση DNA επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και ApaI (Takara, BIO INC) τα οποία δημιουργούν κατάλληλα άκρα για την ένθεση του μεταλλαγμένου γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα (pT7-5), αναγνωρίζοντας μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον πλασμιδιακό φορέα όσο και στα ενθέματα. Στον πλασμιδιακό φορέα έγιναν περιοριστικές πέψεις με τα ίδια ένζυμα και αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων με αλκαλική φωσφατάση (Takara, BIO INC), για την αποφυγή ανεπιθύμητης ανασύνδεσης των ανοιχτών άκρων του φορέα πριν την αντίδραση με το ένθεμα. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης (1%), απομονώθηκαν (Gel and PCR Clean-up kit, Macherey-Nagel) και ανασυνδέθηκαν με την χρήση T4 DNA λιγάσης (Takara, BIO INC). Η αντίδραση λιγάσης έγινε στους 16°C για 1h, σε τελικό όγκο αντίδρασης 10μL, με μοριακή αναλογία ποσοτήτων ενθέματος και φορέα 3:1.

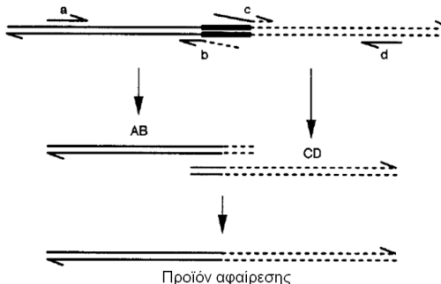
### I. Σημειακή μεταλλαξιγένεση με overlap extension



### II. Μεταλλαξιγένεση ένθεσης



### III. Μεταλλαξιγένεση αφαίρεσης



**Εικόνα 2.1: Σχηματικό διάγραμμα της μεταλλαξιγένεσης με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση (overlap extension)<sup>208</sup>.** Το δίκλωνο DNA και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (primers) απεικονίζονται ως γραμμές με βέλη που δείχνουν τον προσανατολισμό 5'-προς-3'. I) Η θέση της σημειακής μεταλλαξιγένεσης ή της αφαίρεσης (III) υποδεικνύεται με ένα μαύρο ορθογώνιο. Οι εκκινητές συμβολίζονται με μικρά γράμματα και τα αντίστοιχα προϊόντα PCR που προκύπτουν από αυτούς με ζεύγη κεφαλαίων (1 & 2). Εντός του πλαισίου δείχνεται το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (3), όπου τα νεοσύστατα τμήματα ανασυνδυάζονται επικαλυπτόμενα και επεκτείνονται (διακεκομμένη γραμμή) προς το 3' άκρο για να σχηματιστεί το τελικό προϊόν. II) Στην ένθεση η εισαγόμενη αλληλουχία στους εκκινητές b & c, απεικονίζεται με την στικτά διακεκομμένη γραμμή. Τα 5' και 3' άκρα των εκκινητών είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία στόχο εκατέρωθεν της ένθεσης. III) Στην διαγραφή, οι γραμμές (συνεχής και διακεκομμένη) των εκκινητών b & c υποδηλώνουν την συμπληρωματική αλληλουχία με την μητρική εκατέρωθεν του σημείου διαγραφής. Τα προϊόντα AB και CD που παράγονται χρησιμοποιώντας αυτούς τους εκκινητές αλληλεπικαλύπτονται στο σημείο της διαγραφής.

Πίνακας 2.1: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μεταλλαγμάτων

Εξωτερικός εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή
<b>lacZ50</b>	5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3'
<b>γk(pT7-5)</b>	5'-GACGGGGAGTCAGGCAACTATGG-3'
<u>Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο</u>	<u>Αλληλουχία εκκινητή (ενός εκ των δύο συμπληρωματικών)</u>
<b>pT7-5/adeP_T41A-BAD</b>	5'-CCACCTTCCTGGCGATGGTTTAC-3'
<b>pT7-5/adeP_I45S-BAD</b>	5'-CGATGGTTTACAGCGTTTTTGTAAACC-3'
<b>pT7-5/adeP_N49V-BAD</b>	5'-CGTTTTTGTGTGCCGCAAAATCTTGG-3'
<b>pT7-5/adeP_M92I-BAD</b>	5'-GCACCCGCTATITGGCCTGAATGC-3'
<b>pT7-5/adeP_G93S-BAD</b>	5'-CACCCGCTATGAGCCTGAATGC-3'
<b>pT7-5/adeP_M92I/G93S-BAD</b>	5'-CACCCGCTATCTCCCTGAATGCG-3'
<b>pT7-5/adeP_N95T-BAD</b>	5'-CTATGGGCCTGACTGCGTCTTC-3'
<b>pT7-5/adeP_F98T-BAD</b>	5'-TGCGTTCACCGCTTTTGTGCGTTG-3'
<b>pT7-5/adeP_R145A-BAD</b>	5'-CGGTGAGTCTGGCTGTGGG-3'
<b>pT7-5/adeP_R145A/V146H-BAD</b>	5'-GTGAGTCTGGCTCACGGTATTACCAG-3'
<b>pT7-5/adeP_T149G-BAD</b>	5'-GGGTATTGGTAGCGGTATCGGTCTG-3'
<b>pT7-5/adeP_M159I-BAD</b>	5'-CATTGGCATGATCGGGCTGAAAAAC-3'
<b>pT7-5/adeP_N163G-BAD</b>	5'-GGGCTGAAAGGCGCAGGTGTG-3'
<b>pT7-5/adeP_S210T/T214I-BAD</b>	5'-GTGCTGGTTACTATCGTTGTGATTACGCTGCTG-3'
<b>pT7-5/adeP_N264A-BAD</b>	5'-CATGTTGGTCCCTTGTGTTGACTCC-3'
<b>pT7-5/adeP_V263T-BAD</b>	5'-CTCTTTCATGTTGACCAACTTGTGAC-3'
<b>pT7-5/adeP_S268A-BAD</b>	5'-CTTGTGTTGACCGCTCCGGTACGC-3'
<b>pT7-5/adeP_I273R-BAD</b>	5'-GGTACGCTGCGTGGCGTGAC-3'
<b>pT7-5/adeP_T276A-BAD</b>	5'-CTGATTGGCGTGGCCGATAAAGCAG-3'
<b>pT7-5/adeP_D277G-BAD</b>	5'-GGCGTGACCGGTAAAGCAGGTC-3'
<b>pT7-5/adeP_A315V-BAD</b>	5'-CCGTTACGGTGTATATTGAGTCCTC-3'
<b>pT7-5/adeP_S312P/A315V-BAD</b>	5'-CGGTACTTCTCCCGTTACGGTTTATATTGAG-3'
<b>pT7-5/adeP_S320A-BAD</b>	5'-GCTTATATTGAGTCCGCTCCGGCGTATC-3'
<b>pT7-5/adeP_S321A-BAD</b>	5'-GAGTCCTCTGCCGGCGTATCG-3'
<b>pT7-5/adeP_S320A/S321A-BAD</b>	5'-GCTTATATTGAATCCGCTGCCGGCGTATC-3'
<b>pT7-5/adeP_V323T-BAD</b>	5'-CCTCTTCCGGCACCTCGGTTGG-3'
<b>pT7-5/adeP_S324A-BAD</b>	5'-CTCTTCCGGCGTAGCGGTTGGC-3'
<b>pT7-5/adeP_V325A-BAD</b>	5'-GCGTATCGGCAGGCGGTCTGAC-3'
<b>pT7-5/adeP_V367L-BAD</b>	5'-CTGATTTACGTTGGCCTGCTGATGACTTCC-3'
<b>pT7-5/ghxP_V46N-BAD</b>	5'-CGGTCATCGTCAATCCAGGTATG-3'
<b>pT7-5/ghxP_C87P-BAD</b>	5'-GCGATTGGTCCGGCCATCTCCC-3'
<b>pT7-5/ghxP_S90G-BAD</b>	5'-GCGCCATCGGCCTGACAGC-3'
<b>pT7-5/ghxP_I89M/S90G-BAD</b>	5'-GTTGCGCCATGGGCCTGACAG-3'
<b>pT7-5/ghxP_T92N-BAD</b>	5'-CATCTCCCTGAATGCGTTTACCGC-3'
<b>pT7-5/ghxP_A142R-BAD</b>	5'-CTCACGGTGTGCGTCACGGCAC-3'
<b>pT7-5/ghxP_A142R/H143V-BAD</b>	5'-GTGTGCGTTCGGTACTGGGATTGG-3'
<b>pT7-5/ghxP_G146T-BAD</b>	5'-CACGGCACGACGATTGGTATCG-3'
<b>pT7-5/ghxP_G160N-BAD</b>	5'-GCCGCTAACAAATGTCGGTCTGG-3'
<b>pT7-5/ghxP_T209S/I213T-BAD</b>	5'-CATTCTGCTGAGCATTATTGGTACCTCAATTGTC-3'
<b>pT7-5/ghxP_A272S-BAD</b>	5'-GCAGTATTCGACAGCACCAGAAC-3'
<b>pT7-5/ghxP_V319A-BAD</b>	5'-CCGGCAGCGGCATACATCGAG-3'
<b>pT7-5/ghxP_P316S/V319A-BAD</b>	5'-GTGCGGCTTCGACAGCAGCTTACATCGAG-3'
<b>pT7-5/ghxP_A324S/A325S-BAD</b>	5'-GTATACATCGAGTCTTCAATCGGGTACG-3'
<b>pT7-5/ghxP_A329V-BAD</b>	5'-GGTACGGCAGTTGGTGGTAAAACC-3'
<b>pT7-5/ghxP_L371V-BAD</b>	5'-GTACGTTGGCGTGTGCTGATGCTGAG-3'
<b>pT7-5/adeP::Q318-BAD</b>	5'-GTTACGGCTTATATTACAGGAGTCTCTTCC-3'
<b>pT7-5/ghxP::Q322-BAD</b>	5'-CAGCGGTATACATCCAAAGAGTCTGCGG-3'
<b>pT7-5/xanQ_ΔQ324-BAD</b>	5'-CATTAACCAGTTTGGC AATAATGGGGTTATTACAG-3'

\* υπογραμμίζονται οι βάσεις που εισάγουν την αντίστοιχη αλλαγή κωδικονίου

## 2.2. Στελέχη της *E. coli* και συντήρησή τους

Όλα τα εργαστηριακά στελέχη αποθηκεύονται στους -80°C παρουσία γλυκερόλης 1:1 v/v εντός αποστειρωμένων μικροσωληνίσκων κρυοαποθήκευσης (cryotubes) των 2ml. Για τα πειράματα διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω εργαστηριακά στελέχη *E. coli* K-12:

**TOP10F'** (F'[lacIq, Tn10(TetR)] ΔmcrA (mrr-hsdRMS-mrcBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG) (Invitrogen). Χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα λόγω του μεγάλου βαθμού επιδεκτικότητας (competence efficiency) που διαθέτει.

**JW3692** (F, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ', rph-1, ΔpurP745::kan (ενδογενής ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη), Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) ΔpurP (Keio collection<sup>209</sup>). Χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, lacZ(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* ΔpurP γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργητικής μεταφοράς αδενίνης και υποξανθίνης<sup>196</sup>.

**JW4025** (F, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ', rph-1, ΔyjeDP758::kan (ενδογενής ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη), Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) ΔyjeD (Keio collection). 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* ΔyjeD γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργητικής μεταφοράς γουανίνης<sup>196</sup>.

**JW2482** (F, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ', rph-1, ΔuraA745::kan (ενδογενής ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη), Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) ΔuraA (Keio collection). Χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, lacZ(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* ΔuraA γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργητικής μεταφοράς ουρακίλης και θυμίνης<sup>149</sup>.

**T184** (lacI<sup>+</sup> O<sup>+</sup> Z<sup>-</sup> Y<sup>-</sup> (A), prsL, met<sup>-</sup>, thr<sup>-</sup>, recA, hsdM, hsdR/F', lacIq O<sup>+</sup> ZD118 (Y<sup>+</sup> A<sup>+</sup>)) (ενδογενής ανθεκτικότητα σε στρεπτομυκίνη)<sup>210</sup>. Χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, lacZ(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Το γονιδίωμα του στελέχους T184 δεν περιέχει ενδογενή γονίδια που να επάγονται με IPTG (lacZ- Y<sup>-</sup>). Σε *E. coli* T184 γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργητικής μεταφοράς ξανθίνης και ουρικού οξέος<sup>207</sup>.

## 2.3. Συνθήκες αύξησης και θρεπτικά υποστρώματα της *E. coli*

Ως πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το LB (Lysogeny Broth, Luria-Bertani) και για ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα το VBE (Vogel-Bonner). Το LB αποστειρώνεται με υγρή θερμότητα μετά την παρασκευή του. Για το VBE, αρχικά παρασκευάζεται ένα διάλυμα αλάτων VBE 50x το οποίο αποστειρώνεται με φιλτράρισμα και αποθηκεύεται στους 4°C. Το VBE παρασκευάζεται με την προσθήκη του διαλύματος αλάτων (VBE 50x) και γλυκερόλης (2% v/v) ως πηγή άνθρακα σε αποσταγμένο νερό και αποστειρώνεται με υγρή θερμότητα (βλέπε Πίνακα 2.2).

Σε όλες της πειραματικές τεχνικές που περιελάμβαναν το βακτήριο *E. coli*, υγρές προκαλλιέργειες πλήρους θρεπτικού μέσου με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά, εμβολιάστηκαν με τα κατάλληλα στελέχη και αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και ανάδευση στις

220rpm για 16h στους 37°C. Τα αντιβιοτικά προστίθενται από την αρχή της αύξησης σε συγκεντρώσεις 0.1mg/mL για την αμπικιλίνη, 0.05mg/mL για την καναμυκίνη και 0.01mg/mL για την στρεπτομυκίνη.

Για τα πειράματα απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών και πρόσληψης ραδιοσημασμένων ισοτόπων, 1mL προκαλλιέργειας (μετά το πέρας 16h επώασης) αραιώθηκε σε 9mL (1:10) φρέσκου πλήρους υγρού θρεπτικού μέσου με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά και αναπτύχθηκε υπό αερόβιες συνθήκες και ανάδευση στις 220rpm για ακόμα 4h στους 37°C. Στο ενδιάμεσο του χρόνου επώασης (2h) η καλλιέργεια βρίσκεται στο μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και προστέθηκε ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (IPTG) τελικής συγκέντρωσης 1mM, με σκοπό την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αναφοράς, που βρίσκονται υπό την ρύθμιση του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης εντός κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα (βλέπε §2.1). Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε για άλλες 2h και έπειτα η ανάπτυξη σταμάτησε (4h επώασης) με ψύξη της στους 0°C και ακολουθήθηκε η εκάστοτε πειραματική διεργασία όπως αναφέρεται παρακάτω.

Για τα πειράματα ανάπτυξης παρουσία τοξικών αναλόγων, 5mL προκαλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν μετά το πέρας των 16h επώασης και τα κύτταρα *E. coli* επαναιωρήθηκαν σε 1mL υγρού VBE. Στην συνέχεια έγινε φωτομέτρηση δείγματος κυτταρικού εναιωρήματος (αραιώνονται 10μl σε 990μl αποσταγμένο νερό) στα 420nm, έτσι ώστε να εξισορροπηθούν τα κύτταρα προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος VBE. Μετά την εξισορρόπηση τα κύτταρα αραιώθηκαν με διάλυμα VBE 1‰ (1:10<sup>-3</sup>) (αρχική αραιώση/Dilution1) (βλέπε **Εικόνα 2.2**).

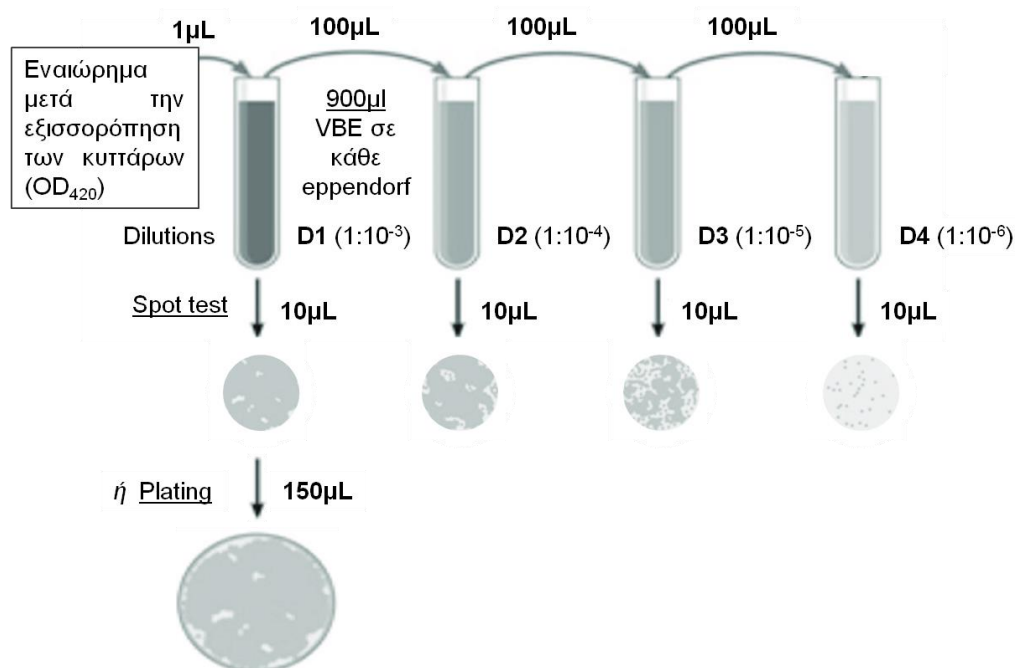
Για την μέθοδο παρατήρησης ζωνών αναστολής (Kirby-Bauer), εμβόλια 150μL κυττάρων της παραπάνω αραιώσης (1:10<sup>-3</sup>) (βλέπε Εικόνα 2.2) απλώθηκαν ομοιόμορφα στην επιφάνεια στερεού VBE με τα κατάλληλα αντιβιοτικά εντός τρυβλίων petri. Τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν και τοποθετήθηκαν στο κέντρο φίλτρα τύπου whatman διαμέτρου 5mm εμποτισμένα με τα προς μελέτη τοξικά ανάλογα διαλυμένα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε εύρος ποσοτήτων 1μg-100μg. Στην περίπτωση ελέγχου της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας από την υπερέκφραση πλασμιδίου pT7-5, προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM. Οι στερεές καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 24h στους 30°C.

Για την μέθοδο ελέγχου σταγόνων (spot test ή drop test), το εναίωμα κυττάρων *E. coli* σε διάλυμα VBE αρχικής αραιώσης 1‰ (1:10<sup>-3</sup>) και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 έως την αραιώση 1:10<sup>-6</sup> (βλέπε Εικόνα 2.2). Από την διαδικασία προκύπτουν οι τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων D1/1:10<sup>-3</sup>, D2/1:10<sup>-4</sup>, D3/1:10<sup>-5</sup>, και D4/1:10<sup>-6</sup>. Εμβόλια 10μL από τις παραπάνω διαδοχικές κυτταρικές αραιώσεις αφέθηκαν να πέσουν σαν σταγόνες στην επιφάνεια στερεού VBE που περιέχει τα προς μελέτη τοξικά ανάλογα διαλυμένα σε συγκεντρώσεις 1-10μM, IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM (C<sub>final</sub>) και τα κατάλληλα αντιβιοτικά εντός των τρυβλίων petri εφόσον χρειάζεται. Τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν οι στερεές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 24h στους 30°C.

Πίνακας 2.2: Διαλύματα θρεπτικών υποστρωμάτων

<b>LB</b>		<b>Διάλυμα VBE 50x</b>		<b>VBE</b>	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα
NaCl	1% w/v	MgSO <sub>4</sub>	1% w/v	Γλυκερόλη	2% v/v
Τρυπτόνη	1% w/v	Κιτρικό οξύ	10% w/v	VBE 50x	2% v/v
Εκχύλισμα ζύμης	0.5% w/v	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50% w/v	+/- IPTG	1mM C <sub>final</sub>
+/- Άγαρ	1.5% w/v	NaNH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	17.5% w/v	+/- Άγαρ	1.5% w/v

\*αραίωση σε αποσταγμένο νερό g/ml w/v



**Εικόνα 2.2:** Σχηματικό διάγραμμα της μεθόδου που σχεδιάστηκε για την προετοιμασία δειγμάτων για τα πειράματα ανάπτυξης παρουσία τοξικών αναλόγων. Μετά την εξισορρόπηση ( $OD_{420}$ ) τα κύτταρα αραιώθηκαν σε VBE 1% ( $1:10^{-3}$ ) (αρχική αραιώση/Dilution1) και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 έως την αραιώση  $1:10^{-6}$ . Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων D1/ $1:10^{-3}$ , D2/ $1:10^{-4}$ , D3/ $1:10^{-5}$ , και D4/ $1:10^{-6}$ . Για την μέθοδο Kirby-Bauer, εμβόλια 150μL κυττάρων *E. coli* της αραιώσεως D1/ $1:10^{-3}$  απλώθηκαν ομοιόμορφα στην επιφάνεια στερεού VBE. Για την μέθοδο spot test, εμβόλια 10μL ξεχωριστά από κάθε κυτταρική αραιώση D1/ $1:10^{-3}$ , D2/ $1:10^{-4}$ , D3/ $1:10^{-5}$ , και D4/ $1:10^{-6}$ , αφήθηκαν να πέσουν σε σταγόνες στην επιφάνεια στερεού VBE.

#### 2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών σε πλασμίδια βακτηρίων *E. coli* (competent cells)

Για την προετοιμασία βακτηρίων *E. coli* ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού, παρασκευάστηκαν υγρές προκαλλιέργειες εμβολιασμένες με τα κατάλληλα στελέχη (βλέπε §2.3). Στην συνέχεια, 10mL προκαλλιέργειας αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 250mL (1/25) θρεπτικού υλικού SOB (Super Optimal Broth)<sup>211</sup> παρουσία αντιβιοτικού αν ήταν απαραίτητη. Ακολούθησε ανάπτυξη υπό αερόβιες συνθήκες και ανάδευση στις 220rpm στους 37°C ώσπου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να είναι  $\approx 0.6$ .



Στην συνέχεια τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 10min στον πάγο, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6000rpm, 5min, 4°C) και αραιώθηκαν σε ψυχρό διάλυμα TB<sup>212</sup>. Ακολούθως, το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε πάλι σε πάγο για 10min, φυγοκεντρήθηκε ξανά και επαναιωρήθηκε εκ νέου σε διάλυμα TB 7% v/v DMSO. Τα επιδεκτικά πλέον κύτταρα μετασχηματίστηκαν<sup>212</sup> ή αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Πίνακας 2.3: Διαλύματα για το μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

<b>SOB</b>		<b>Διάλυμα TB</b>	
<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Ποσότητα</b>	<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Ποσότητα</b>
NaCl	1% w/v	PIPES buffer	0.35% w/v
KCl	0.02% w/v	MnCl <sub>2</sub>	0.9% w/v
MgCl <sub>2</sub>	0.2% w/v	CaCl <sub>2</sub>	0.5% w/v
MgSO <sub>4</sub>	0.25% w/v	KCl	1.85% w/v
Τρυπτόνη	2% w/v		
Εκχύλισμα ζύμης	0.5% w/v		
+/- Άγαρ	1.5% w/v		

\*αραίωση σε αποσταγμένο νερό g/ml w/v

Κατεψυγμένα επιδεκτικά κύτταρα από τους -80°C αφέθηκαν να επανέλθουν αργά στον πάγο (0-4°C) και στην συνέχεια προστέθηκε πλασμιδιακό DNA σε αυτά και επώαστηκαν για 5min στον πάγο. Τέλος, τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB/άγαρ με το αντιβιοτικό επιλογής (για την σειρά πλασμιδίων pT7-5 προστίθεται αμπικιλίνη 0.1mg/mL). Μονές αποικίες από την στερεή καλλιέργεια επιλέχθηκαν μετά από 16h επώασης στους 37°C.

## **2.5. Απομόνωση ολικών μεμβρανικών πρωτεϊνών από την *E. coli* και ανάλυση κατά Western**

Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από την *E. coli*, βακτηριακά κύτταρα που έφεραν το κατάλληλο πλασμίδιο συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6000rpm, 5min, 4°C) μετά την ανάπτυξη και επαγωγή τους με IPTG (βλέπε §2.3). Επαναιωρήθηκαν σε 10mL διαλύματος επαναιώρησης (οσμωτικό σοκ), υποβλήθηκαν εκ νέου σε φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε 1mL του ίδιου διαλύματος μαζί με αναστολέα πρωτεασών (Pefabloc SC, Sigma-Aldrich). Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (13000rpm, 5min) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1mL διαλύματος σακχαρόζης με αναστολέα πρωτεασών. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στους 4°C για 20min, το κυτταρικό ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκε σε 800μL αποσταγμένου νερού και επανατοποθετήθηκε στους 4°C για 10min.

Στο διάλυμα προστέθηκε λυσοζύμη και τοποθετήθηκε στους 4°C για 30min (επώαση με EDTA/λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 0.125mg/mL)<sup>213</sup>. Το κυτταρόλυμα ομογενοποιήθηκε με υπερήχους (sonic-lysis). Μετά από φυγοκέντρηση (13000rpm, 5min) για την απομάκρυνση των άθραυστων κυττάρων (cell debris), έγινε υπερφυγοκέντρηση (90000rpm, 20min, 4°C), συλλογή του ιζήματος των μεμβρανών και επαναδιαλυτοποίηση σε 40μL αποσταγμένου νερού. Στο κλάσμα των μεμβρανών έγινε ηλεκτροφορητική ανάλυση και ανοσοαποτύπωση.

Πίνακας 2.4: Διαλύματα απομόνωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών

Διάλυμα επαναιώρησης (pH 8)		Διάλυμα σακχαρόζης (pH 8)	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris-HCl	0.8% w/v	Tris-HCl pH 8	0.4% w/v
NaCl	0.6% w/v	Σακχαρόζη	45% w/v
Na <sub>2</sub> EDTA	0.04% w/v	Na <sub>2</sub> EDTA	0.04% w/v

\*αραίωση σε αποσταγμένο νερό g/ml w/v

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με βάση το πρωτόκολλο BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης και σύμφωνα με αυτή, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης των δειγμάτων. Πριν την ηλεκτροφόρηση και για εξισορόπηση των δειγμάτων προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα αποσταγμένου νερού έτσι ώστε τα δείγματα να ισοποσοτικοποιηθούν στα 100μg πρωτεΐνης για ηλεκτροφόρηση.

Στην συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer) σε αναλογία 4:1 (δείγμα:διάλυμα φόρτωσης) και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE)<sup>214</sup>. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα ακρυλαμιδίου (30% Acrylamide/Bis 37.5:1, Biorad) 12% v/v ως πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) και 5% v/v ως πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel). Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε δείκτης πρότυπων μοριακών βαρών (prestained SDS-PAGE standards/low range, Bio-Rad Laboratories).

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά των διαχωρισμένων πλέον πρωτεϊνών<sup>215</sup> σε μεμβράνη πολυβινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride - PVDF, Pall Corporation) παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς για 4h στα 400mA. Ακολούθως, η μεμβράνη επώαστηκε για 16h στους 4°C σε διάλυμα TBST/5% w/v BSA (blocking buffer) για την δέσμευση των κενών θέσεων. Ως αντίσωμα σε όλες της ανοσοαποτυπώσεις χρησιμοποιήθηκε το σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραίωση 1:50000 σε TBST/5% w/v BSA για 1h και μετά η μεμβράνη ξεπλύθηκε με TBST. Για την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced ChemiLuminescence-ECL) το ανοσοαποτύπωμα εμφανίστηκε σε φωτογραφικό φιλμ.

Πίνακας 2.5: Διαλύματα ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς διαχωρισμένων πρωτεϊνών

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (pH 8)		Διάλυμα μεταφοράς (pH 8)		Διάλυμα TBST (pH 7)	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris-base	0.3% w/v	Tris-HCl 1M	2.5% v/v	Tris-HCl 1M	1% v/v
Γλυκίνη	1.5% w/v	Γλυκίνη	1.5% w/v	NaCl	0.9% w/v
SDS	0.1% w/v	Μεθανόλη	20% v/v	Triton-X	0.2% v/v

\*αραίωση σε αποσταγμένο νερό g/ml w/v

## 2.6. Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών στην *E. coli*

Για τα πειράματα πρόσληψης ραδιοϊσοτόπων από την *E. coli*, βακτηριακά κύτταρα που έφεραν το κατάλληλο πλασμίδιο συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6000rpm, 5min, 4°C) μετά την ανάπτυξη και επαγωγή τους με IPTG (βλέπε §2.3). Επαναιωρήθηκαν σε 10mL διαλύματος KPi και έγινε εκ νέου φυγοκέντρηση και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 10mL του ίδιου διαλύματος δύο φορές (2 πλύσεις των κυττάρων). Στην συνέχεια τα κυτταρικό εναιώρημα φωτομετρήθηκε στα 420nm, δείγματος κυτταρικού εναιωρήματος (10μl εναιωρήματος σε 990μl αποσταγμένο νερό), έτσι ώστε να εξισορροπηθούν τα κύτταρα προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KPi<sup>207</sup>. Μετά την εξισορρόπηση τα κύτταρα παρέμειναν διαλυμένα σε διάλυμα KPi στον πάγο και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία. Τα ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την διατριβή ήταν η [2,8-<sup>3</sup>H]-αδενίνη (31.8Ci/mmol), η [2,8-<sup>3</sup>H]-υποξανθίνη (27.7Ci/mmol), η [8-<sup>3</sup>H]-γουανίνη (21.2Ci/mmol) και η [8-<sup>3</sup>H]-ξανθίνη (18Ci/mmol).

Για τις μετρήσεις ενεργότητας ενός μεταφορέα, 50μl κυττάρων επώαστηκαν με το ραδιενεργό υπόστρωμα επιθυμητής συγκέντρωσης, για χρόνους 5sec έως 10min. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 6ml διαλύματος τερματισμού και ταχεία διήθηση υπό κενό, σε ηθμό διήθησης με φίλτρα τύπου whatman (GF/C25mm-circle) διαμέτρου πόρων 1.2μm. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στο φίλτρο και αυτό μεταφέρθηκε σε κατάλληλα σωληνάρια σπινθηρισμού με 8ml διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid). Η μέτρηση των δειγμάτων έγινε μετά από 12h με μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β.

Για τα πειράματα κινητικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργό υπόστρωμα σε εύρος τελικών συγκεντρώσεων και μετρήθηκε η μεταφορά σε συγκεκριμένους χρόνους. Στην περίπτωση της [<sup>3</sup>H]αδενίνης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0.04-40μM για χρόνους 5 ή 10sec, της [<sup>3</sup>H]υποξανθίνης συγκεντρώσεις 0.1-100μM για χρόνους 15 ή 20sec και της [<sup>3</sup>H]γουανίνης συγκεντρώσεις 0.1-100μM για χρόνους 5 ή 10sec. Η αντίδραση τερματίστηκε και τα δείγματα μετρήθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. Σε κάθε περίπτωση, για την εξαγωγή των  $K_M$  και  $V_{max}$  τα δεδομένα αναλύθηκαν με βάση την εξίσωση Michaelis-Menten.

Με τα πειράματα ανταγωνισμού διερευνήθηκε η πιθανή ανταγωνιστική δράση αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων έναντι του ραδιενεργού υποστρώματος. Η δοκιμασία ενεργητικής μεταφοράς έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω με την διαφορά ότι τα 50μl

κυττάρων αρχικά επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με 5μl του πιθανού ανταγωνιστή (τελικής συγκέντρωσης 0.1μM-1mM) για 5min και στην συνέχεια προστέθηκε το ραδιενεργό υπόστρωμα. Η πορεία που ακολουθείται για τα πειράματα πρόσληψης ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων παρουσία ανταγωνιστή είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Οι τιμές  $K_i$  που εξάγονται, προκύπτουν από την εφαρμογή της εξίσωσης Cheng-Prusoff.

Οι ανταγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν από την διάλυση σκόνης του ανταγωνιστή σε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 10mM παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων KOH (10mM-60mM) και για τα πειράματα της διατριβής έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις του αρχικού διαλύματος (από 10mM σε 0.1μM-1mM). Εξαιρέσεις αποτελούν τα ανάλογα αδενίνης N6-(διμεθυλαμινο)αιθυλοαδενίνη, N6-(4-μεθυλοπιπεραζίνιο)αδενίνη, N6-(μορφολίνο)αδενίνη, N6-βενζυλαδενίνη (σύνθεση και παραχώρηση από το συνεργαζόμενο εργαστήριο της Ν. Πουλή, Τμ. Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) και N6-βενζοϋλαδενίνη, που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Στην περίπτωση της N6-βενζοϋλαδενίνης διαπιστώθηκε ότι σε υδατικά διαλύματα είναι πιθανό να υπόκειται σε υδρόλυση ο αμιδικός δεσμός που δημιουργείται μεταξύ της βενζοϋλομάδας του και του μορίου της αδενίνης, με αποτέλεσμα η μετρούμενη αναγνώριση να μην αφορά την N6-βενζοϋλαδενίνη αλλά την προκύπτουσα αδενίνη (βασικό υπόστρωμα των μεταφορέων AdeP και Q92VC3).

Πίνακας 2.6: Διαλύματα για τα πειράματα πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών στην *E. coli*

Διάλυμα KPi		Διάλυμα τερματισμού		Διάλυμα σπινθηρισμού	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Ποσότητα
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M	2% v/v	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M	5% v/v	Τολουόλιο	66% v/v
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	8% v/v	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	0.5% v/v	Triton-X	33% v/v
		LiCl 1M	10% v/v	PPO	4% w/v
				POPOP	0.04% w/v

\*αραίωση σε αποσταγμένο νερό g/ml w/v

## 2.7. *In silico* ανάλυση

Η ανάλυση των γονιδιωμάτων για την ύπαρξη γονιδίων που ανήκουν στις οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδίων NAT/NCS2 και NCS1, βασίστηκε στις βάσεις δεδομένων TCDB (Transporter Classification DataBase)<sup>126</sup> και COGs (phylogenetic classification of proteins encoded in complete genomes)<sup>216,217</sup>, καθώς και στις πλήρεις αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των μικροοργανισμών που καταγράφονται στο JGI (Joint Genome Institute)<sup>218,219</sup> μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας IMG/M (Integrated Microbial Genomes and Microbiomes)<sup>220</sup>. Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών έγινε διαδικτυακά με το πρόγραμμα BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool-protein)<sup>221</sup> του NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Η στοίχιση των αλληλουχιών των ομόλογων μεταφορέων έγινε με το πρόγραμμα Clustal Omega<sup>222</sup>. Για την εύρεση και ανάλυση μοτίβων αμινοξικής αλληλουχίας στις πρωτεΐνες μεταφορείς, χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή έκδοση του προγράμματος MEME (Multiple Em for Motif Elicitation)<sup>223</sup>. Αναζητήθηκαν μοτίβα μήκους 20-25 αμινοξέων. Το πρόγραμμα αντιστοιχεί κάθε μοτίβο με μια τιμή E-value που δείχνει την στατιστική σημαντικότητα του. Το MEME συνήθως βρίσκει πρώτα τα στατιστικά σημαντικότερα (χαμηλό E-value) μοτίβα. Τα μοτίβα με πολύ χαμηλές τιμές είναι απίθανο να είναι τυχαίες ακολουθίες χωρίς εξελικτική συντήρηση ενώ είναι ασυνήθιστο να εξετάζεται ένα μοτίβο με E-value >0.05. Η επεξεργασία και οπτικοποίηση των αλληλουχιών των μοτίβων έγινε με το πρόγραμμα Jalview<sup>224</sup>.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA6 (Molecular Evolution Genetics Analysis)<sup>225</sup>. Για την παρουσίαση, τον σχολιασμό και την διαχείριση των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή έκδοση του προγράμματος iTOL (Interactive Tree Of Life)<sup>226</sup>.

Η δομική μοντελοποίηση των μεταφορέων πραγματοποιήθηκε με το διαδικτυακό πρόγραμμα SWISS-MODEL<sup>227</sup>. Η απεικόνιση και η επεξεργασία των δομικών μοντέλων έγινε με τα προγράμματα PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC) και Protter<sup>228</sup>.

Για τον υπολογισμό των τιμών IC<sub>50</sub> από τα πειράματα ανταγωνισμού με ανάλογα πουρινών και των σταθερών V<sub>max</sub>/K<sub>M</sub> και K<sub>i</sub>, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Prism 5.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

## **2.8. Επιλογή γονιδιωμάτων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων ομόλογων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων**

Για την φυλογενετική ανάλυση της διατριβής, επιλέχθηκαν ολοκληρωμένα γονιδιώματα (finished status) καταχωρημένα στην βάση δεδομένων IMG/M του JGI, από ταξινομημένους βακτηριακούς οργανισμούς (classified organisms). Επιλέγοντας ένα γονιδίωμα ανά είδος και δίνοντας προτεραιότητα σε είδη και κατ' επέκταση σε στελέχη αναφοράς (reference species), συγκεντρώθηκαν 1384 γονιδιώματα βακτηρίων. Στο δείγμα αυτό αναζητήθηκαν ομόλογες αλληλουχίες όλων των γνωστών μελών των οικογενειών NCS1 και NAT/NSC2 της *E. coli* (CodB, AllP, UacT, XanQ, XanP, YbbY, AdeP, AdeQ, GhxP και GhxQ) με το πρόγραμμα BLASTp (E-value=1e-5). Από τις αλληλουχίες που συγκεντρώθηκαν, αφαιρέθηκαν οι επαναλαμβανόμενες (redundant) και οι τυχόν ελλειμματικές αλληλουχίες/θραύσματα. Λόγω του ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των αλληλουχιών προερχόταν από Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes και Ακτινοβακτήρια, η περαιτέρω ανάλυση αφορά αλληλουχίες που απομονώθηκαν από αυτά τα τρία μεγάλα Φύλα.

Το σύνολο των ομόλογων αλληλουχιών που συγκεντρώθηκαν (433 NCS1 και 3456 NCS2 αλληλουχίες) χρησιμοποιήθηκε στην *in silico* ανάλυση, αλλά για την δημιουργία

των φυλογενετικών δέντρων το δείγμα περιορίστηκε εκ νέου επιλέγοντας τις ομόλογες αλληλουχίες ενός γονιδιώματος ανά γένος και δίνοντας προτεραιότητα στα είδη με τα περισσότερα ομόλογα. Έτσι προέκυψε ένα δείγμα 587 γονιδιωμάτων (269 Πρωτεοβακτήρια, 101 Firmicutes, 82 Ακτινοβακτήρια, κ.α.). Οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν και κατασκευάστηκαν πιλοτικά δέντρα με την μέθοδο Neighbor Joining (NJ trees), με σκοπό τον σταδιακό διαχωρισμό των αλληλουχιών στις αντίστοιχες οικογένειες. Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου NJ είναι η ταχύτητα εξαγωγής φυλογενετικών δέντρων μεγάλου αριθμού αλληλουχιών και η στατιστική υπολογιστική ανάλυση του bootstrapping, που με άλλα μέσα ανάλυσης, όπως το Maximum Parsimony ή το Maximum Likelihood, θα ήταν υπολογιστικά απαγορευτική η ενσωμάτωση της. Από τις αλληλουχίες που συγκεντρώθηκαν, αφαιρέθηκαν οι επαναλαμβανόμενες και οι τυχόν ελλειμματικές αλληλουχίες. Ως αποτέλεσμα απομονώθηκαν από τα τρία κύρια βακτηριακά φύλα (Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes και Ακτινοβακτήρια, τα οποία περιλαμβάνουν αθροιστικά πάνω από 80% των γνωστών βακτηριακών γονιδιωμάτων), 301 NCS1 αλληλουχίες και από την NAT/NCS2, 566 αλληλουχίες για την ομάδα COG2233 και 409 για την ομάδα COG2252. Για κάθε ομάδα κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα.

Για την εύρεση ομόλογων μεταφορέων νουκλεοβάσεων στα γένη *Escherichia/Shigella* και *Bacillus*, συγκεντρώθηκαν αλληλουχίες ομολόγων που εμπίπτουν στις οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NCS1 και NAT/NCS2 από το JGI/IMG. Για εμπλουτισμό των αλληλουχιών του γένους *Escherichia* προστέθηκαν στην ανάλυση και γονιδιώματα από το κοντινό φυλογενετικά γένος *Shigella*. Έτσι συγκεντρώθηκαν 51 γονιδιώματα στελεχών αναφοράς του γένους *Bacillus*, 9 γονιδιώματα στελεχών αναφοράς του γένους *Escherichia* και 7 γονιδιώματα του γένους *Shigella*.

Για το γένος *Escherichia* απομονώθηκαν αλληλουχίες από 1 στέλεχος του *E. fergusonii*, 2 στελέχη του *E. albertii* και 6 στελέχη του *E. coli* με μη παθογόνους αντιπροσώπους από όλες τις φυλογενετικές ομάδες του είδους (A, B1, B2, D) και 2 παθογόνα στελέχη, ένα εντεροαιμορραγικό (EnteroHemorrhagic Escherichia coli-EHEC) και ένα ουροπαθογονικό (UroPathogenic Escherichia coli-UPEC). Από το γένος *Shigella* απομονώθηκαν αλληλουχίες από 2 στελέχη του *S. boydii*, 2 στελέχη του *S. flexneri*, 2 στελέχη του *S. sonnei* και 1 από το *S. dysenteriae*. Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη και βάση των καταχωρημένων γονιδιωμάτων στο JGI (35 είδη), απομονώθηκαν έως και 2 γονιδιώματα από κάθε είδος. Μόνη εξαίρεση αποτελεί ο οργανισμός πρότυπο *B. subtilis* όπου χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση γονιδιώματα από 3 στελέχη του είδους. Προτεραιότητα στην επιλογή είχαν και πάλι γονιδιώματα στελεχών αναφοράς<sup>229</sup>. Όπως παραπάνω, αναζητήθηκαν ομόλογες αλληλουχίες όλων των γνωστών μελών των οικογενειών NCS1 και NAT/NSC2 της *E. coli* με το πρόγραμμα BLASTp (E-value=1e-5). Από τις αλληλουχίες που συγκεντρώθηκαν, αφαιρέθηκαν οι επαναλαμβανόμενες και οι τυχόν ελλειμματικές αλληλουχίες και κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με την μέθοδο NJ.

#### 3.1. Εντόπιση ξεχωριστών φυλογενετικών κλάδων βακτηριακών ομολόγων AzgA-like με διακριτή εξειδίκευση

Οι AzgA-like μεταφορείς εμφανίζονται καθολικά στα μελετημένα γένη *Escherichia/Shigella* και *Bacillus*. Ειδικότερα, τα γονίδια των μεταφορέων AdeP και GhxP συντηρούνται σε όλα τα είδη των γενών *Escherichia* και *Shigella*, ενώ το γονίδιο του ομολόγου μεταφορέα γουανίνης-υποξανθίνης PbuG συντηρείται σε όλα τα είδη του γένους *Bacillus* (βλέπε Εικόνες 5.3, 5.4 & 5.5 συμπληρωματικής ενότητας). Το ίδιο ισχύει και για τα γονίδια των μεταφορέων UraA, XanP και PyrP της NAT/NCS2, ενώ τα αντίστοιχα παράλογα γονίδια AdeQ, GhxQ, PbuO (AzgA-like), RutG, XanQ, UacT, PucI, PucJ, PucK, PbuX (NAT/NCS2) καθώς και τα μέλη της δομικά και εξελικτικά διακριτής οικογένειας NCS1, εμφανίζουν σποραδική κατανομή στα τρία γένη (βλέπε Εικόνες 5.3, 5.4 & 5.5 συμπληρωματικής ενότητας).

Στην κατεύθυνση της φυλογενετικής ανάλυσης στην AzgA-like για το σύνολο των Βακτηρίων, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα από ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα 279 γονιδιωμάτων (ένα ανά γένος από την βάση δεδομένων του JGI/IMG) από τα τρία κύρια βακτηριακά φύλα (Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes (Bacilli/Clostridia), Ακτινοβακτήρια) (βλέπε §2.8 υλικά και μέθοδοι). Οι αλληλουχίες της AzgA-like/COG2252 που συγκεντρώθηκαν περιλαμβάνουν 409 ομόλογα και σχηματίζουν ένα σχετικά ομοιογενές σύνολο.

Στο φυλογενετικό δέντρο των 409 βακτηριακών ομολόγων, δύο κύριοι κλάδοι διαχωρίζονται με σαφήνεια και αφορούν αφενός τα ομόλογα των μεταφορέων αδεΐνης AdeP/Q (41 ομόλογα) και αφετέρου τα ομόλογα των μεταφορέων γουανίνης/υποξανθίνης GhxP/Q (52 ομόλογα). Και οι δύο αυτοί κλάδοι είναι μονοφυλετικοί περιλαμβάνοντας γ-Πρωτεοβακτήρια από τρεις κύριες κλάσεις: Enterobacterales, Pasteurellales και Aeromonadales. Μόνο στην περίπτωση του κλάδου GhxP/Q περιλαμβάνονται και ορισμένα β-Πρωτεοβακτήρια που ανήκουν στην κλάση Burkholderiales (οικογένεια Burkholderiaceae). (βλέπε **Εικόνα 3.1** και Εικόνα 5.6 συμπληρωματικής ενότητας).

Όλα τα υπόλοιπα ομόλογα κατατάσσονται σε έναν τρίτο ευρύτερο κλάδο και ομαδοποιούνται κατά βάση ανάλογα με την ταξινομική τους προέλευση (αν προέρχονται από Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes, ή Ακτινοβακτήρια), χωρίς να μπορούν να εξαχθούν πιθανές συσχετίσεις κάποιων επιμέρους ομάδων με λειτουργικώς γνωστά ομόλογα (βλέπε Εικόνα 3.1 και Εικόνα 5.6 συμπληρωματικής ενότητας). Σε αυτόν τον τρίτο κλάδο εμφανίζονται ομόλογα από γονιδιώματα οικογενειών γ-Πρωτεοβακτηρίων που δεν κατατάσσονται στους κλάδους AdeP/Q και GhxP/Q (Pseudomonadales, Oceanospirillales, Alteromonadales, Vibrionales, Legionellales, κ.α.), καθώς και ένα μικρότερο υποσύνολο



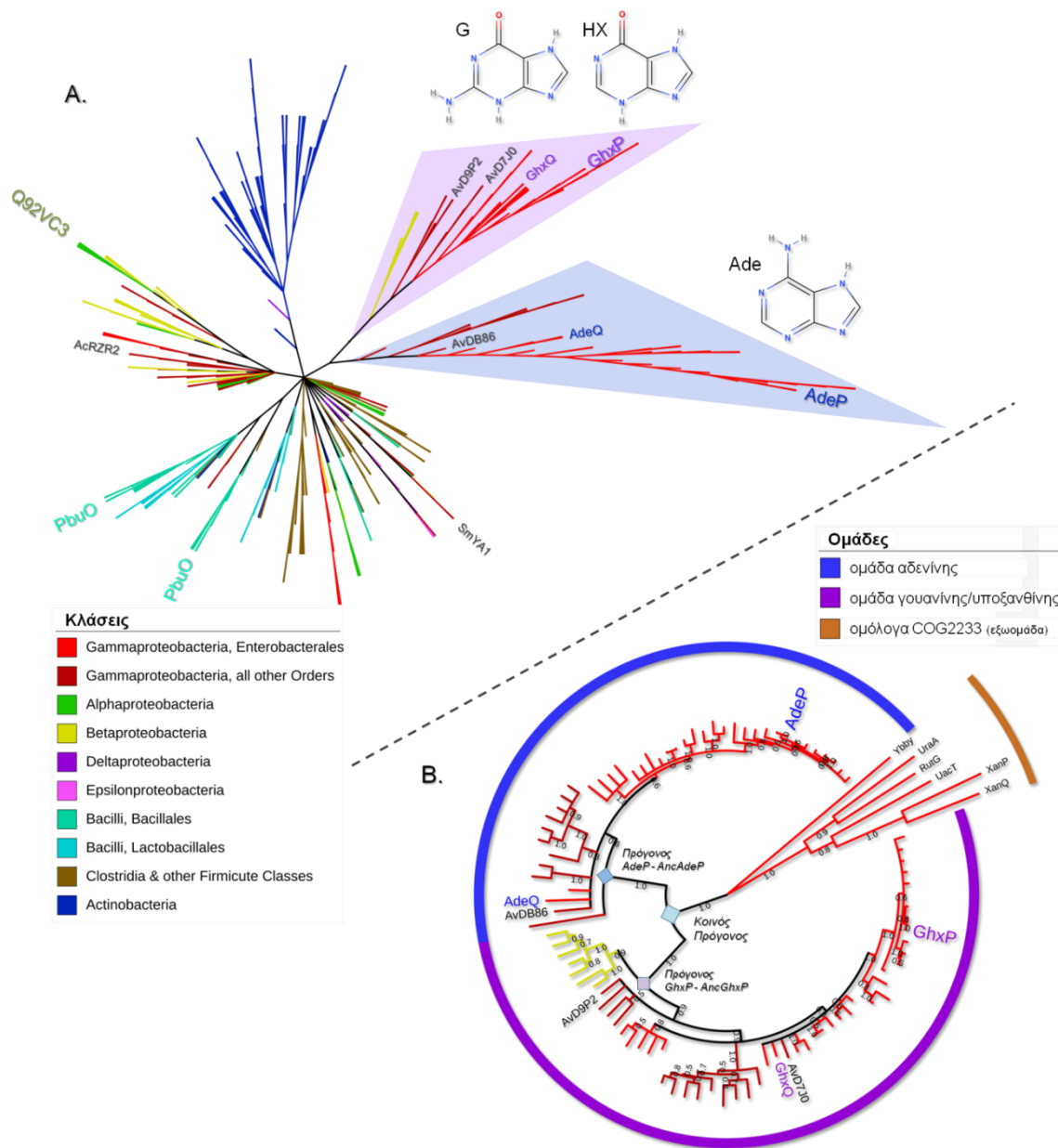
ομολόγων από β- και α-Πρωτεοβακτήρια (συμπεριλαμβανομένου του Q92VC3 του γένους *Sinorhizobium*) ή φυτοπαθογόνα γ-Πρωτεοβακτήρια της οικογένειας Xanthomonadales. Τα ομόλογα PbuG/PbuO του *Bacillus* σχηματίζουν αδρά έναν υποκλάδο μαζί με ομόλογα από λακτοβάκιλλους (Lactobacillales) ενώ όλα τα ομόλογα Ακτινοβακτηρίων δημιουργούν ένα ξεχωριστό μονοφυλετικό υποκλάδο (βλέπε Εικόνα 5.6 συμπληρωματικής ενότητας).

### **3.1.1. Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών των κλάδων μεταφορέων αδερίνης AdeP/Q και γουανίνης/υποξανθίνης GhxP/Q**

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα μοριακής εξελικτικής γενετικής ανάλυσης MEGA7 επιχειρήθηκε η ανασύνθεση πιθανών προγονικών αλληλουχιών<sup>230</sup> για τους δυο καλά διαχωρισμένους κλάδους AdeP/Q και GhxP/Q. Δεν κατέστη δυνατή η πρόβλεψη με σημαντική πιθανότητα της κοινής προγονικής αλληλουχίας των κλάδων (γεγονός που τονίζει τις διαφορές των δύο ομάδων αλληλουχιών και πιθανώς υποδηλώνει έναν πολύ παλιό εξελικτικό διαχωρισμό των δύο κλάδων), αλλά προβλέφθηκαν με αξιοπιστία οι προγονικές αλληλουχίες AncAdeP και AncGhxP για κάθε κλάδο ξεχωριστά (βλέπε αλληλουχίες κοινών προγόνων συμπληρωματικής ενότητας).

Και για τους δύο προγόνους, οι θέσεις με συνολική πιθανότητα  $P_m > 0.9$  ξεπερνούν το 75% του συνόλου της αλληλουχίας που προβλέφθηκε, υποδεικνύοντας την ισχυρή ομολογία που εμφανίζεται εντός του κάθε κλάδου. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι AncAdeP και AncGhxP εμφανίζουν συνολική ταυτότητα αλληλουχίας  $\approx 52\%$ , που είναι υψηλότερη από αυτή που εμφανίζουν μεταξύ τους οι AdeP και GhxP της *E. coli* με  $\approx 35\%$  (βλέπε Πίνακα 5.1 συμπληρωματικής ενότητας). Αυτή η διαφορά κρίνεται αναμενόμενη λόγω της συσσώρευσης πολλαπλών ουδέτερων μεταλλαγών κατά την εξέλιξη, που οδηγούν σε μεγαλύτερη απόκλιση των αλληλουχιών των εξελικτικά όψιμων πρωτεϊνών, σε σχέση με την απόκλιση που υπήρχε ανάμεσα στις προγονικές τους<sup>231</sup>. Λόγω της υψηλής συντήρησης της αλληλουχίας σε περιοχές που περιέχουν τα αμινοξέα του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης, οι διαφορές ανάμεσα στις προγονικές αλληλουχίες AncAdeP και AncGhxP ήταν χρήσιμες σαν μια επιπλέον ένδειξη των θέσεων αμινοξέων που μπορεί να σχετίζονται με τις διαφορές εξειδίκευσης.



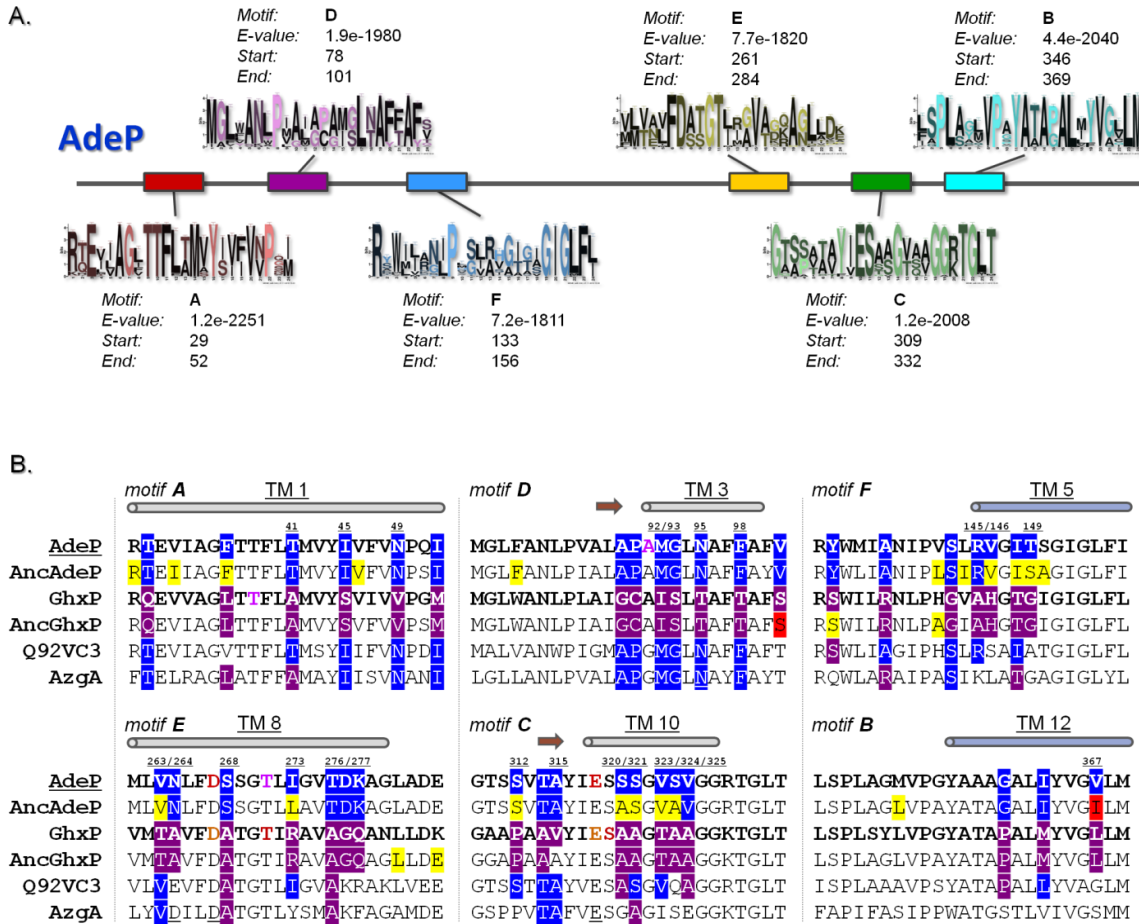


**Εικόνα 3.1: Φυλογενετικά δέντρα μελών της AzgA-like/COG2252 από Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes και Ακτινοβακτήρια.** Οι κλάδοι χρωματίζονται βάση της κλάσης που ανήκουν και επισημαίνονται οι γνωστοί μεταφορείς. Διακλαδώσεις με bootstrap value <50% δεν εμφανίζονται. **A)** Δέντρο χωρίς ρίζα και τυχαίου μήκους κλάδων με την μέθοδο Neighbor Joining για τα 409 βακτηριακά ομόλογα (επιπρόσθετα βλέπε Εικόνα 5.6 συμπληρωματικής ενότητας). Δείχνονται οι καλά διαχωρισμένοι κλάδοι μεταφορέων AdeP/Q και GhxP/Q με τα βασικά υποστρώματά τους (γουανίνη, G; υποξανθίνη, HX; αδενίνη, Ade). **B)** Φυλόγραμμα των κλάδων AdeP/Q και GhxP/Q με την μέθοδο Maximum Likelihood, όπου έχει προστεθεί εξωομάδα με τα γνωστά ομόλογα NCS2/COG2233 της *E. coli* για τον εντοπισμό της ρίζας κοινού προγόνου. Δείχνονται με ρόμβους οι κόμβοι όπου έγινε ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών του κοινού προγόνου και των AncAdeP και AncGhxP.

### 3.1.2. Εύρεση μοτίβων αλληλουχίας στους μεταφορείς AdeP και GhxP που σχετίζονται με την διάκριση των εξειδικεύσεων για αδενίνη ή γουανίνη/υποξανθίνη

Για όλα τα ομόλογα Πρωτεοβακτηρίων της AzgA-like/COG2252 (166 ομόλογα) αναζητήθηκαν και εντοπίστηκαν μέσω του προγράμματος MEME<sup>223</sup> χαρακτηριστικές περιοχές/μοτίβα αλληλουχίας που εμφανίζουν ισχυρή συντήρηση (βλέπε §2.7 υλικών και μεθόδων και **Εικόνα 3.2/A**). Οι συντηρημένες περιοχές αλληλουχίας εμπίπτουν στα διαμεμβρανικά τμήματα (TM) 1, 3, 8, 10 (core domain), 5 και 12 (gate domain) και (όπως ήδη γνωρίζουμε από πειραματικά δεδομένα) περιέχουν αμινοξέα σημαντικά για την λειτουργία των AdeP, GhxP, ή άλλων ομολόγων τους<sup>66,77,196,198</sup>. Σχεδόν όλα τα αμινοξέα που συμμετέχουν στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης εμφανίζονται σε απόλυτα συντηρημένες θέσεις μοτίβων σε όλα τα ομόλογα των κλάδων AdeP/AdeQ και GhxP/GhxQ.

Οι περιοχές της αλληλουχίας κάθε κοινού προγόνου όπου εμπίπτουν τα παραπάνω μοτίβα εμφανίζουν μεγάλη αξιοπιστία ( $P_m > 0,9$ ) και υποδεικνύουν καθολική συντήρηση των αμινοξέων σε κάθε μία από τις αντίστοιχες θέσεις εντός του κάθε κλάδου. Σε μερικές από αυτές τις θέσεις των μοτίβων συντηρούνται αμινοξέα με πλευρικές ομάδες διαφορετικού χαρακτήρα ανάμεσα στις δύο προγονικές αλληλουχίες (AncAdeP και AncGhxP) (βλέπε **Εικόνα 3.2/B**). Χαρακτηριστικά, οι θέσεις αμινοξέων που διαφέρουν είναι κυρίως περιφερειακά του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης του υποστρώματος. Από την στοίχιση των μοτίβων αλληλουχίας μεταξύ των κλάδων διαχωρισμένων κλάδων AdeP/Q και GhxP/Q, του κλάδου πρωτεοβακτηρίων που περιλαμβάνει τον Q92VC3, του κλάδου βάκιλλων/λακτοβάκιλλων PbuG/O και του κλάδου των Ακτινοβακτηρίων, μόνο ο κλάδος GhxP/Q φαίνεται να διαφέρει σημαντικά συντηρώντας διαφορετικού χαρακτήρα αμινοξέα σε πολλαπλές θέσεις ιδίως στα μοτίβα A/TM 1, D/TM 3 και F/TM 5 (βλέπε **Εικόνα 5.7** συμπληρωματικής ενότητας).



**Εικόνα 3.2: Μοτίβα ισχυρής συντήρησης των ομολόγων Πρωτεοβακτηρίων της AzgA-like/COG2252 που βρέθηκαν μέσω του προγράμματος MEME. A)** Τοπολογικό διάγραμμα της αλληλουχίας του AdeP όπου εντοπίζονται τα 6 μοτίβα, τα οποία ταξινομούνται αλφαβητικά (Α έως F) κατά φθίνουσα τιμή E-value και απεικονίζονται ως λογότυπα συντήρησης αλληλουχίας. Επιπρόσθετα αναφέρονται οι περιοχές της αλληλουχίας του AdeP που εντοπίζονται τα μοτίβα (start/end). **B)** Στοίχιση των μοτίβων αλληλουχίας των AdeP/AncAdeP, GhxP/AncGhxP και των μεταφορέων Q92VC3 του *S. meliloti* και AzgA του *A. nidulans*. Δείχνεται αδρά η τοπολογία τους σε σχέση με τα TM 1, 3, 8, 10 (core domain/γκρι κύλινδροι), 5 και 12 (gate domain/μπλε κύλινδροι) και τα β-πτυχωτά φύλλα (βέλη) του ενεργού κέντρου. Τα αμινοξέα του AdeP που διαφέρουν από τον GhxP αριθμούνται και σημαίνονται με μπλε φόντο, αυτά που συντηρούνται στον GhxP και διαφέρουν από τον AdeP σημαίνονται με μωβ και επιπρόσθετα για τις αλληλουχίες των AncAdeP και AncGhxP σημαίνονται με κίτρινο οι θέσεις με  $P_m < 0.9$  και με κόκκινο οι θέσεις με  $P_m < 0.5$  (βλέπε αλληλουχίες πιθανών προγόνων συμπληρωματικής ενότητας). Στις αλληλουχίες των AdeP και GhxP δείχνονται με κόκκινη γραμματοσειρά οι αναντικατάστατες θέσεις (AdeP\_D267/E318, GhxP\_T275/S323), με πορτοκαλί οι ουσιαστικά αναντικατάστατες θέσεις με αντικαταστάσεις που οδηγούν σε απενεργοποίηση ή πολύ χαμηλή ενεργότητα (GhxP\_D271/E322) και με ροζ οι θέσεις με αντικαταστάσεις που οδηγούν σε μείωση της συγγένειας για βασικά υποστρώματά (AdeP\_A91/T271, GhxP\_T35)<sup>196</sup>. Στην αλληλουχία του AzgA υπογραμμίζονται οι αναντικατάστατες για την λειτουργία θέσεις Asn131, Asp339, Asp342 και Glu394, οι οποίες προτάθηκε ότι εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην δέσμευση του υποστρώματος<sup>198</sup>.

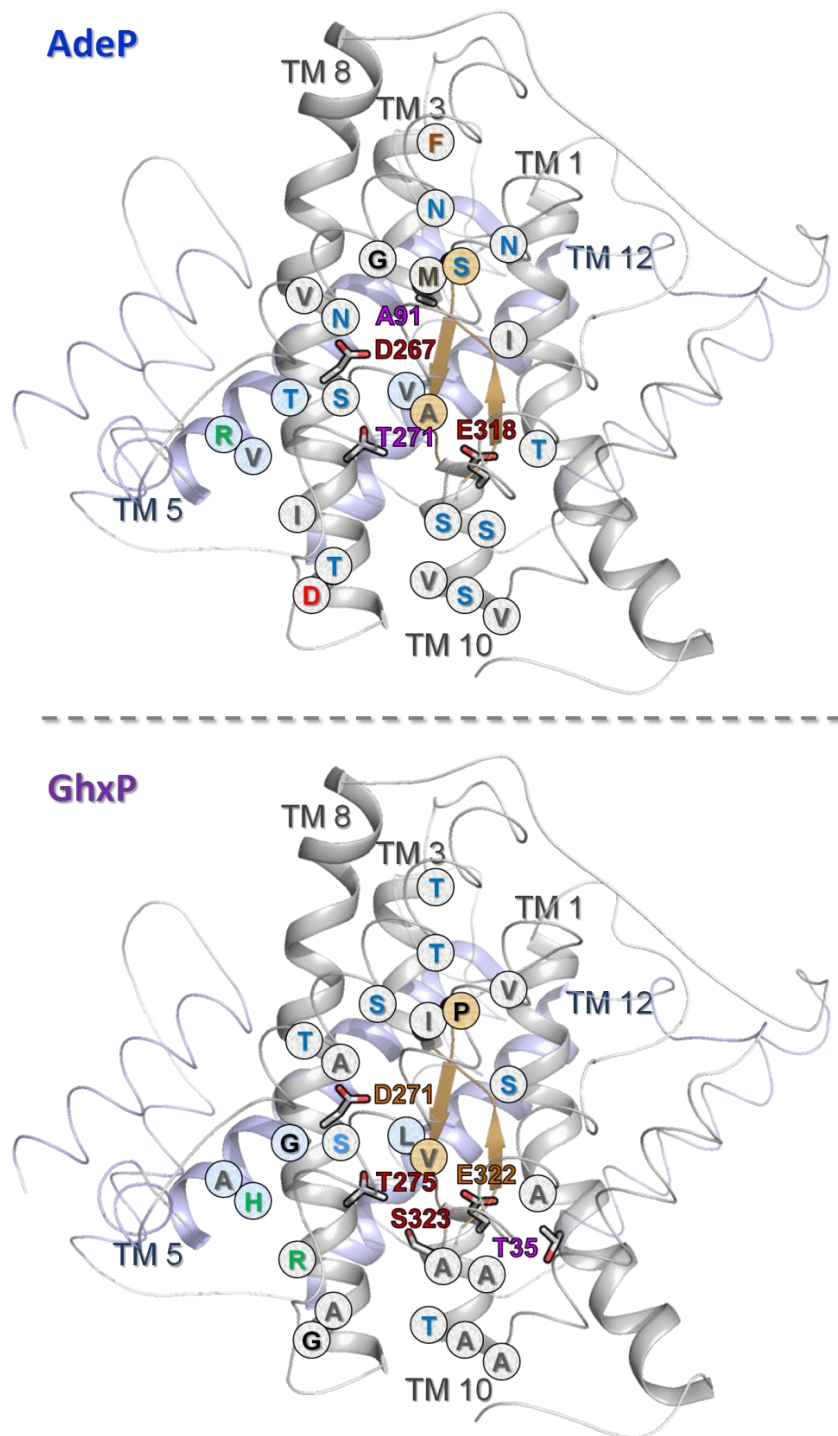
### 3.1.3. Επιλογή στόχων μεταλλαξιγένεσης των AdeP και GhxP

Εστίασαμε την προσοχή μας στους φυλογενετικά συντηρημένους μεταφορείς πουρινών της *E. coli* AdeP και GhxP και ειδικότερα στις θέσεις εντός των μοτίβων αλληλουχίας που διαφέρουν μεταξύ τους (κατά βάση συντηρούνται διαφορετικού χαρακτήρα αμινοξέα). Οι περισσότερες από τις θέσεις αυτές διατηρούν την ίδια διαφορά αμινοξέων και μεταξύ ApcAdeP και ApcGhxP, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανάλυσή μας έχει μια ευρύτερη σημασία για την ανάλυση των διαφορών εξειδίκευσης μεταξύ του συνόλου των ομολόγων των κλάδων AdeP/Q και GhxP/Q (βλέπε Εικόνα 3.2/B).

Αρχικά, έγινε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση όλων των θέσεων αμινοξέων στον μεταφορέα αδενίνης AdeP, ο οποίος έχει μόνο ένα υψηλής-συγγένειας υπόστρωμα (αδενίνη), αντικαθιστώντας το κάθε αμινοξύ με το αντίστοιχο που υπάρχει στην ίδια θέση στον GhxP (βλέπε **Εικόνα 3.3**). Για τις περιπτώσεις διαφορών σε διαδοχικές/διπλάνες θέσεις, κατασκευάστηκαν τα μονά αλλά και τα διπλά μεταλλάγματα τους. Στην συνέχεια, οι θέσεις αμινοξέων των οποίων τα μεταλλάγματα εμφάνισαν σημαντικές λειτουργικές επιπτώσεις στον AdeP αντικαταστάθηκαν και στον GhxP (με την αντίστροφη αλλαγή σε κάθε περίπτωση) ώστε να ελεγχθεί εάν έχουν παρόμοια λειτουργική επίδραση και στον GhxP.

Στην μελέτη μεταλλαξιγένεσης των AdeP και GhxP εντάχθηκαν και κάποιες επιλεγμένες για την τοπολογία τους θέσεις εκτός του σχεδιασμού των συντηρημένων μοτίβων αλληλουχίας και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα μεταλλάγματα. Οι θέσεις Met159 και η Asn163 του AdeP στο ευέλικτο TM 5 προβλέπεται από την δομή να πλαισιώνουν το κέντρο δέσμευσης ενώ στις αντίστοιχες θέσεις στον GhxP συντηρούνται τα μη πολικά αμινοξέα Ile157 και Gly160. Οι θέσεις του AdeP Ser210 και Thr214 (GhxP Thr209S και Ile213) στο TM 7 στοιχίζονται με τις θέσεις του μυκητιακού ομολόγου UapA Gly301 (στον XanQ Gly217) και Gly305 (μοτίβο GxxxG), οι οποίες φαίνεται ότι σχετίζονται με την ορθή αναδίπλωση και σταθερότητα των NCS2 ομολόγων<sup>179,232</sup>. Τα παραπάνω μεταλλάγματα είχαν ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης και δεν εμφάνισαν αποκλίσεις από τα προφίλ εξειδίκευσης των αντίστοιχων φυσικών τύπων AdeP ή GhxP (βλέπε Εικόνα 3.4 και Πίνακες 5.2 & 5.3 συμπληρωματικής ενότητας).

Επιπρόσθετα, κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα ένθεσης AdeP::Q318 και GhxP::Q321 και το μετάλλαγμα ΔQ324 στον XanQ. Με αυτό τον τρόπο επιχειρήθηκε να διερευνηθεί η μοριακή βάση της διαφοράς εξειδίκευσης μεταξύ των μεταφορέων αδενίνης/γουανίνης ή υποξανθίνης (πουρίνες χωρίς κετοομάδα στην θέση 2) AdeP ή GhxP, και του ομολόγου μεταφορέα XanQ που ανήκει στους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού (πουρίνες με κετοομάδα στην θέση 2). Η απαραίτητη για την δέσμευση της ξανθίνης Gln324 του XanQ στοιχίζεται με τις αναντικατάστατες για την λειτουργία Glu318 και Glu322 των AdeP και GhxP αντίστοιχα. Τα παραπάνω μεταλλάγματα είχαν ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης (βλέπε Εικόνα 5.9 συμπληρωματικής ενότητας), αλλά δεν εμφάνισαν μετρήσιμη ενεργότητα για καμία νουκλεοτιδική βάση, μεταξύ των οποίων και για κανένα από τα βασικά υποστρώματα του AdeP (αδενίνη), του GhxP (γουανίνη, υποξανθίνη) ή του XanQ (ξανθίνη), και δεν ήταν εφικτή η περαιτέρω μελέτη τους πειραματικά.



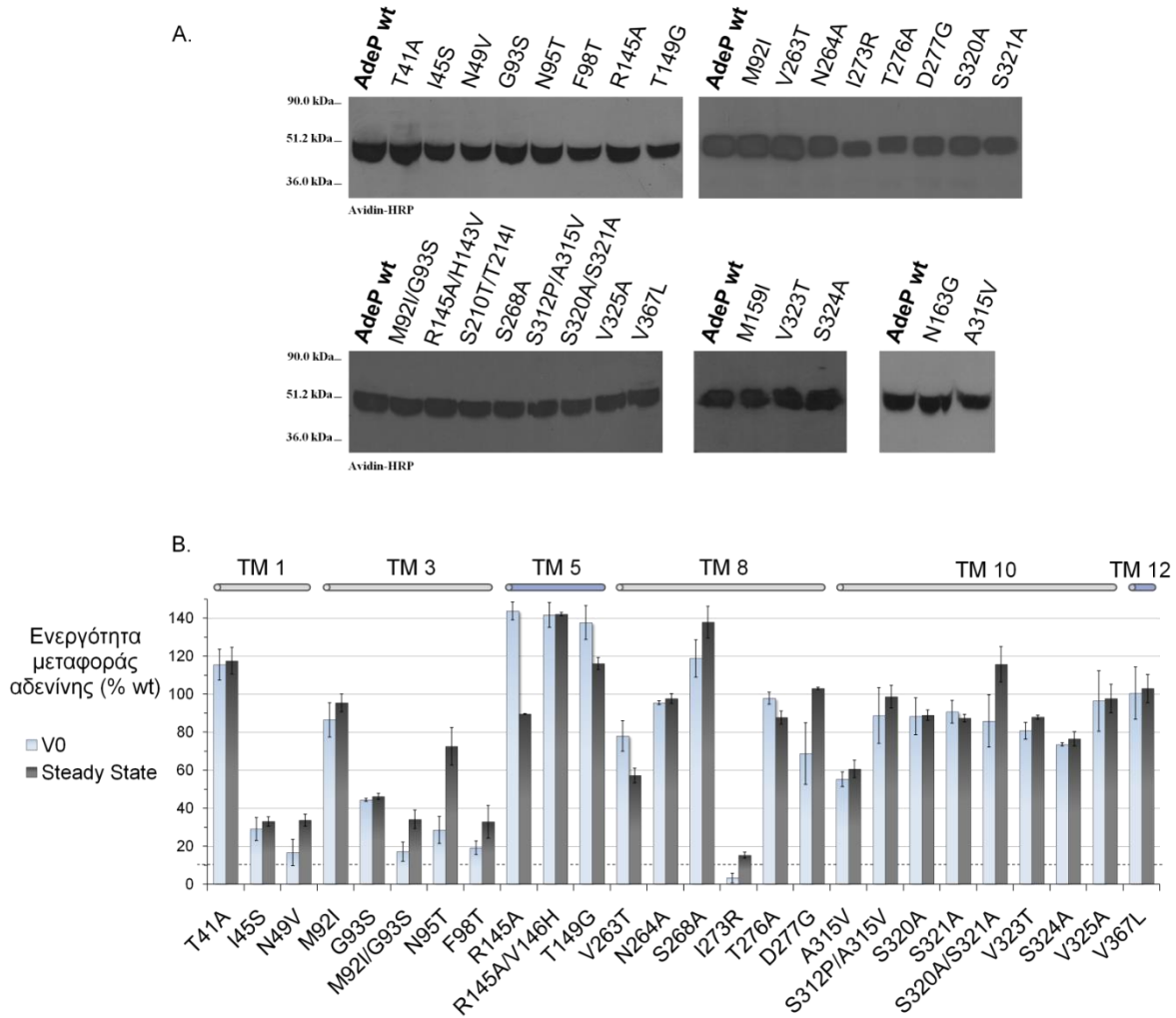
**Εικόνα 3.3: Μοντέλο της δομής των AdeP και GhxP βάσει της δομής του UapA (PDB: 5I6C)<sup>188</sup>.** Οι δύο δομές παρατίθενται για σύγκριση και επάνω δείχνονται οι θέσεις/αμινοξέα του AdeP που αλλάχθηκαν με τα αντίστοιχα του GhxP που δείχνονται κάτω. Οι θέσεις τις μεταλλαξιγένεσης εντοπίζονται στα TMs 1, 3, 8, 10 (core domain/γκρι έλικες), 5 και 12 (gate domain/μπλε έλικες) περιμετρικά των β-πτυχωτών φύλλων (βέλη) του ενεργού κέντρου και τα αμινοξέα που συντηρούνται σε κάθε μεταφορά χρωματίζονται βάση του χαρακτήρα τους (γαλάζιο για τα πολικά, πράσινο για τα θετικά φορτισμένα, κόκκινο για τα αρνητικά φορτισμένα, γκρι για μη πολικά κ.ο.κ.). Επιπρόσθετα, δείχνονται επιλεκτικά οι πλευρικές ομάδες των αναντικατάστατων θέσεων του AdeP\_D267/E318 και του GhxP\_T275/S323 (κόκκινη γραμματοσειρά), των σχεδόν αναντικατάστατων θέσεων του GhxP\_D271/E322 (πορτοκαλί γραμματοσειρά) και των θέσεων με αντικαταστάσεις που οδηγούν σε μείωση της συγγένειας για βασικά υποστρώματά του AdeP\_A91/T271 και του GhxP\_T35 (μωβ γραμματοσειρά)<sup>196</sup>.

### 3.2. Μεταλλαξιγένεση του AdeP σε θέσεις που διαφέρουν στον GhxP

Κατασκευάστηκαν 26 μεταλλάγματα του AdeP βάσει του σχεδιασμού που περιγράφηκε προηγουμένως. Οι μεταλλαγές που έγιναν στον AdeP ήταν οι T41A, I45S και N49V στο TM 1, M92I, G93S, M92I/G93S, N95T και F98T στο TM 3, R145A, R145A/V146H και T149G στο TM 5, V263T, N264A, S268A, I273R, T276A, και D277G στο TM 8, A315V, S312P/A315V, S320A, S321A, S320A/S321A, V323T, S324A και V325A στο TM 10 και V367L στο TM 12 (βλέπε Εικόνα 3.3).

Όλα τα μεταλλάγματα του AdeP βρέθηκε ότι εκφράζονται στην μεμβράνη της *E. coli* K-12 σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά του φυσικού τύπου (βλέπε **Εικόνα 3.4/A**). Έγινε πλήρης λειτουργική ανάλυση των 26 μεταλλαγμάτων ως προς την δυνατότητα αναγνώρισης όλων των βασικών υποστρωμάτων και ανταγωνιστών τόσο του AdeP όσο και του GhxP. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε η ικανότητα ενεργητικής μεταφοράς αδερίνης, γουανίνης και υποξανθίνης και, σε πειράματα ανταγωνισμού έναντι της μεταφοράς αδερίνης, η ικανότητα αναγνώρισης πουρίνης και 2,6-διαμινοπουρίνης (υψηλής συγγένειας προσδέτες του AdeP, με  $K_i < 10\mu\text{M}$ ), 6-χλωροπουρίνης και 9-μεθυλαδερίνης (χαμηλότερης συγγένειας προσδέτες του AdeP,  $K_i > 50\mu\text{M}$ ), γουανίνης και 6-θειογουανίνης (υψηλής συγγένειας υποστρώματα του GhxP που δεν αναγνωρίζονται από τον AdeP), υποξανθίνης και 6-μερκαπτοπουρίνης (υψηλής συγγένειας υποστρώματα του GhxP που αναγνωρίζονται με πολύ χαμηλή συγγένεια από τον AdeP), 1-μεθυλαδερίνης και 8-αζαγουανίνης (μέτριας συγγένειας προσδέτες για τον GhxP που δεν αναγνωρίζονται από τον AdeP) (βλέπε Εικόνα 5.11 συμπληρωματικής ενότητας).

Όλα τα μεταλλάγματα εμφανίζουν μετρήσιμη ενεργό μεταφορά αδερίνης ικανή για να υπολογιστούν πειραματικά οι σταθερές  $V_{\text{max}}/K_M$  και  $K_i$ , εκτός του I273R (TM 8) που δεν εμφάνισε ούτε ενεργό μεταφορά γουανίνης ή υποξανθίνης και δεν έγιναν περαιτέρω πειράματα με αυτό (βλέπε Εικόνα 3.4/B και **Πίνακα 3.1**). Τα μεταλλάγματα T41A (TM 1), V263T, N264A, T276A, D277G (TM 8) και V367L (TM 12) δεν παρουσιάζουν απόκλιση από το προφίλ εξειδίκευσης του AdeP. Τα μεταλλάγματα τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις από τον φυσικού τύπου AdeP χωρίζονται σε τρεις ομάδες, βάσει των διαφορών τους στην αναγνώριση των κατεξοχήν υποστρωμάτων του AdeP (αδερίνη και υψηλής συγγένειας ανάλογα αδερίνης), των υποστρωμάτων του GhxP που δεν αναγνωρίζονται από τον AdeP (γουανίνη, 6-θειογουανίνη) και των υποστρωμάτων του GhxP που αναγνωρίζονται σε μικρό βαθμό και από τον AdeP (υποξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη) (βλέπε Πίνακα 3.3).



**Εικόνα 3.4: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων του AdeP.** Τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα *E. coli* JW3692. **A)** Ανοσοαποτύπωση κατά western με αντίσωμα το σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε δείγματα μεμβρανικών κλασμάτων που περιέχουν τον φυσικό τύπο AdeP ή τα μεταλλάγματα του. **B)** Ενεργή μεταφορά αδενίνης (0.1μM) των μεταλλαγμάτων του AdeP συγκριτικά με την ενεργότητα του φυσικού τύπου (%) με τυπικές αποκλίσεις (γραμμές σφάλματος) από τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις. Οι αρχικοί ρυθμοί πρόσληψης αδενίνης (initial rates/V0, ανοιχτόχρωμες στήλες) μετρήθηκαν σε 5-10 δευτερόλεπτα και τα επίπεδα σταθερής κατάστασης αδενίνης (Steady State, σκουρόχρωμες στήλες) μετρήθηκαν σε 1-5 λεπτά. Οι τιμές ελέγχου μετρήθηκαν από στέλεχος που φέρει το πλασμίδιο pT7-5 χωρίς γονίδιο μεταφορέα και αφαιρέθηκαν από τις μετρήσεις των δειγμάτων σε όλες τις περιπτώσεις.



### **3.2.1. Τα μεταλλάγματα N49V, G93S και N95T εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για υποστρώματα του AdeP και αυξημένη για υποστρώματα του GhxP**

Τα μεταλλάγματα N49V (TM 1), G93S και N95T (TM 3) διαφοροποιούνται από το προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου AdeP καθώς εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για τα υψηλής συγγένειας υποστρώματα του AdeP (πουρίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη) (τα N49V και N95T έχουν επίσης πολύ μειωμένη συγγένεια για την αδερίνη αλλά και για τους χαμηλότερης συγγένειας προσδέτες 6-χλωροπουρίνη και 9-μεθυλαδερίνη) και συγχρόνως αναγνωρίζουν με σημαντική συγγένεια όλα τα βασικά υποστρώματα του GhxP (υποξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, γουανίνη, 6-θειογουανίνη) (βλέπε **Εικόνα 3.5** και **Πίνακα 3.2**). Ωστόσο, για τα μεταλλάγματα αυτά δεν ανιχνεύεται δραστικότητα ενεργητικής μεταφοράς γουανίνης ή υποξανθίνης.

### **3.2.2. Τα I45S, M92I και S268A αποτελούν μεταλλάγματα χαμηλής συγγένειας για πουρινικά ανάλογα**

Τα μεταλλάγματα I45S (TM 1), M92I (TM 3) και S268A (TM 8) εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια τόσο για όλα τα υποστρώματα του AdeP (αδερίνη, πουρίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη, 6-χλωροπουρίνη, 9-μεθυλαδερίνη), όσο και για τα υποστρώματα του GhxP που αναγνωρίζονται σε μικρό βαθμό από τον AdeP (υποξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη). Ο συνδυασμός των αντικαταστάσεων M92I και G93S στο διπλό μετάλλαγμα M92I/G93S οδηγεί σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση της συγγένειας για τα υποστρώματα του AdeP αλλά συγχρόνως επιτρέπει αναγνώριση με σημαντικά αυξημένη συγγένεια των υποστρωμάτων του GhxP (υποξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, γουανίνη), υποδεικνύοντας ότι υπερισχύει ο φαινότυπος της αλλαγής G93S (αλλαγή της εξειδίκευσης, όπως στο μονό μετάλλαγμα G93S) με την αντικατάσταση M92I να λειτουργεί επιστατικά, αποδιοργανώνοντας εντελώς την ικανότητα του G93S να αναγνωρίζει τα βασικά υποστρώματα του AdeP (αδερίνη και ανάλογα αδερίνης) (βλέπε **Εικόνα 3.5** και **Πίνακα 3.2**).

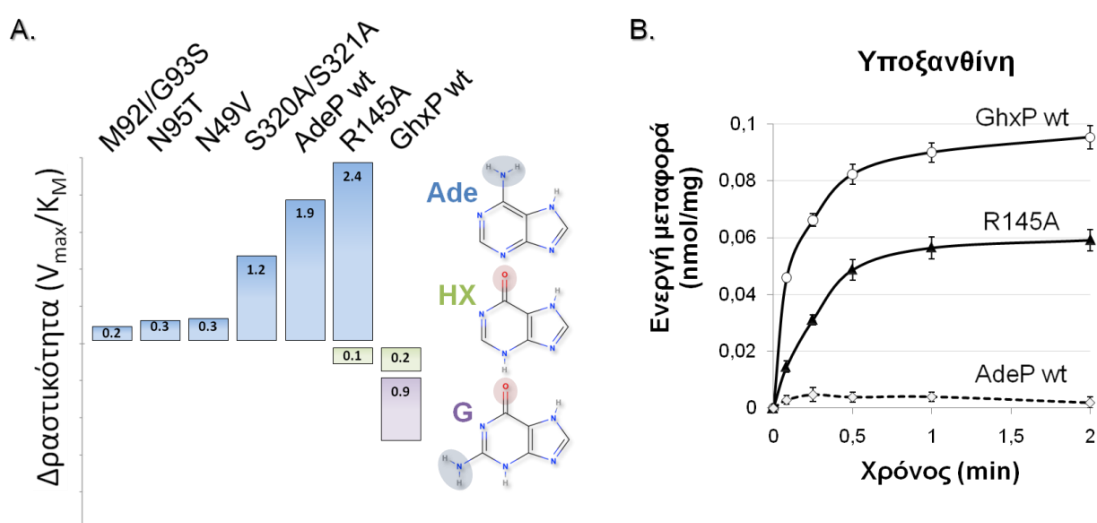
### **3.2.3. Τα μεταλλάγματα R145A A315V, S320A, S321A, S324A και V325A διευρύνουν το προφίλ εξειδίκευσης του AdeP προς την αναγνώριση υποξανθίνης**

Το μετάλλαγμα R145A στο TM 5 και τα μεταλλάγματα του TM 10 A315V, S320A, S321A, S324A και V325A, εμφανίζουν διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης καθώς διατηρούν την υψηλή συγγένεια για αδερίνη και όλα τα ανάλογα αδερίνης που αναγνωρίζει ο AdeP αλλά επιτρέπουν επίσης υψηλής συγγένειας αναγνώριση υποξανθίνης και του αναλόγου της 6-μερκαπτοπουρίνη. Επιπρόσθετα, το μετάλλαγμα A315V και τα διπλά μεταλλάγματα S312P/A315V και S320A/S321A αποκτούν μικρή συγγένεια και για την γουανίνη (βλέπε **Εικόνα 3.5** και **Πίνακα 3.2**). Ωστόσο, κανένα από τα μεταλλάγματα του TM 10 δεν εμφανίζει ενεργό μεταφορά γουανίνης ή υποξανθίνης.

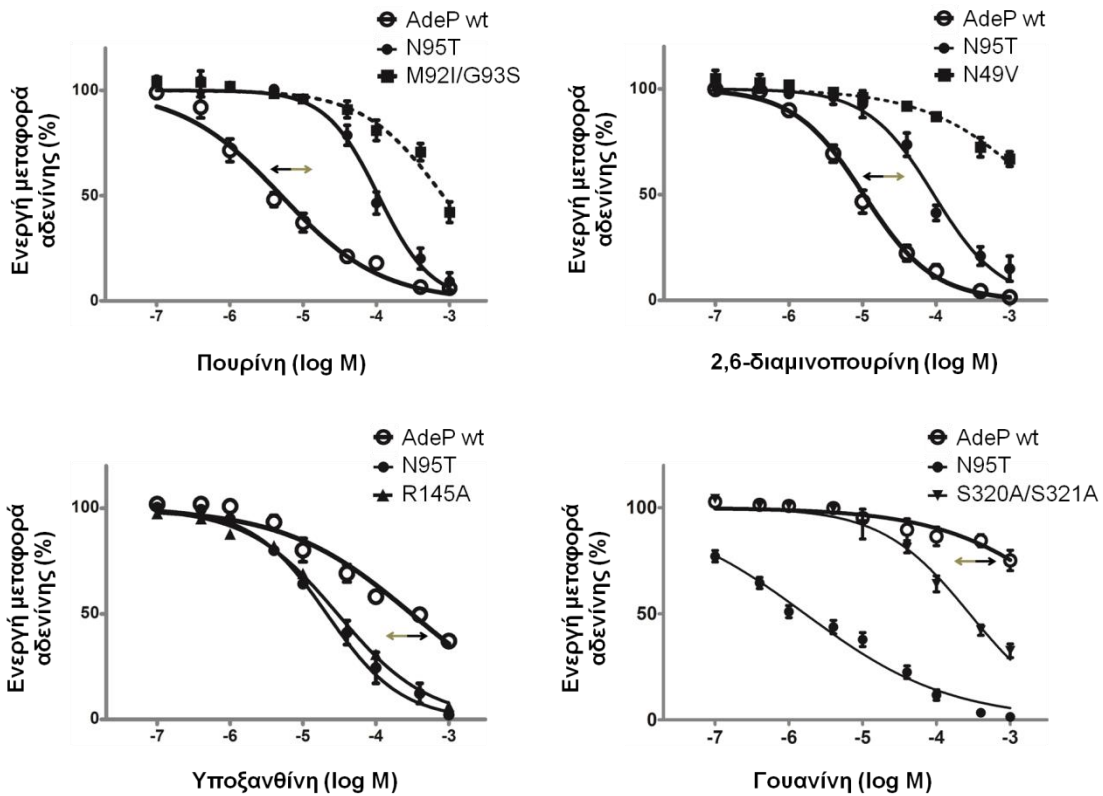


### 3.2.4. Το μετάλλαγμα R145A έχει δραστηριότητα ενεργητικής μεταφοράς υποξανθίνης

Αρκετά μεταλλάγματα του AdeP έχουν την τάση προς αναγνώριση της υποξανθίνης ως υπόστρωμα τους (βλέπε παραπάνω). Παρόλο αυτά, κανένα μετάλλαγμα δεν έδειξε ουσιαστικά να έχει ενεργότητα για την υποξανθίνη, με μόνο δύο εξαιρέσεις. Το μετάλλαγμα R145A και το διπλό μετάλλαγμα R145A/V146H στο TM 5 εμφανίζουν διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης και επιπρόσθετα μεταφέρουν την υποξανθίνη σε επίπεδα συγκρίσιμα με τον GhxP (βλέπε Εικόνα 3.5 και Πίνακα 3.2). Και τα δύο μεταλλάγματα (R145A και διπλό R145A/V146H) διατηρούν την ενεργότητα για αδενίνη στα επίπεδα του AdeP φυσικού τύπου ενώ ταυτόχρονα μεταφέρουν υποξανθίνη με υψηλή  $K_M \approx 4.5\mu\text{M}$  έναντι του GhxP με  $K_M \approx 9\mu\text{M}$ .



**Εικόνα 3.5.α:** Προφίλ εξειδίκευσης επιλεγμένων μεταλλαγμάτων του AdeP που διαφοροποιούνται από τον φυσικό τύπο. Τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025. **A)** Ικανότητα μεταφοράς αδενίνης (μπλε), υποξανθίνης (πράσινο) και γουανίνης (μωβ) του AdeP και επιλεγμένων μεταλλαγμάτων του, συγκριτικά με τον GhxP. **B)** Ενεργητική μεταφορά υποξανθίνης από το μετάλλαγμα AdeP\_R145A και τους μεταφορείς GhxP και AdeP για σύγκριση (οι τιμές του AdeP εμπίπτουν με τιμές αρνητικού μάρτυρα). Τα σημεία αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων μετρήσεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (γραμμές σφάλματος).



**Εικόνα 3.5.β: Προφίλ εξειδίκευσης επιλεγμένων μεταλλαγμάτων του AdeP που διαφοροποιούνται από τον φυσικό τύπο.** Τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025. Ανταγωνισμός αδενίνης (0.1μM) από πουρίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη, υποξανθίνη και γουανίνη. Σε κάθε γράφημα δείχνεται ο AdeP, το μετάλλαγμα AdeP\_N95T που διαφοροποιείται συνολικά από το προφίλ εξειδίκευσης του AdeP και επιπρόσθετα ένα μετάλλαγμα που διαφοροποιείται έντονα από τον AdeP στην ικανότητα αναγνώρισης ενός συγκεκριμένου ανταγωνιστή. Τα σημεία αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων μετρήσεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (γραμμές σφάλματος).

Πίνακας 3.1: Τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  των AdeP, GhxP και των μεταλλαγμάτων του AdeP

Περμεάση	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$V_{max}/K_M$ ( $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
<b>Κινητική για την μεταφορά αδενίνης (JW3692)</b>			
AdeP wt	1.2 ( $\pm 0.1$ )	2.3 ( $\pm 0.1$ )	1.92
T41A	0.4 ( $\pm 0.1$ )	1.8 ( $\pm 0.1$ )	4.5
I45S	3.2 ( $\pm 0.4$ )	3.0 ( $\pm 0.1$ )	0.94
N49V	43.2 ( $\pm 1.2$ )	13.0 ( $\pm 0.2$ )	0.30
M92I	4.4 ( $\pm 0.5$ )	12.2 ( $\pm 0.4$ )	2.77
G93S	1.2 ( $\pm 0.1$ )	1.6 ( $\pm 0.1$ )	1.33
M92I/G93S	6.5 ( $\pm 0.6$ )	1.2 ( $\pm 0.1$ )	0.19
N95T	21.4 ( $\pm 1.2$ )	6.3 ( $\pm 0.1$ )	0.29
F98T	9.3 ( $\pm 3.2$ )	2.1 ( $\pm 0.4$ )	0.23
R145A	0.7 ( $\pm 0.1$ )	1.7 ( $\pm 0.1$ )	2.43
R145A/V146H	0.7 ( $\pm 0.1$ )	0.9 ( $\pm 0.1$ )	1.29
T149G	1.1 ( $\pm 0.2$ )	1.8 ( $\pm 0.2$ )	1.64
V263T	2.0 ( $\pm 0.1$ )	3.7 ( $\pm 0.1$ )	1.85
N264A	1.4 ( $\pm 0.1$ )	4.7 ( $\pm 0.1$ )	3.36
S268A	2.3 ( $\pm 0.6$ )	2.1 ( $\pm 0.2$ )	0.91
I273R	ND	ND	ND
T276A	1.7 ( $\pm 0.3$ )	3.0 ( $\pm 0.2$ )	1.77
D277G	1.1 ( $\pm 0.2$ )	1.1 ( $\pm 0.1$ )	1.00
A315V	0.6 ( $\pm 0.1$ )	0.8 ( $\pm 0.1$ )	1.33
S312P/A315V	0.7 ( $\pm 0.1$ )	0.6 ( $\pm 0.1$ )	0.86
S320A	1.6 ( $\pm 0.3$ )	2.3 ( $\pm 0.1$ )	1.44
S321A	1.1 ( $\pm 0.1$ )	2.4 ( $\pm 0.1$ )	2.18
S320A/S321A	1.3 ( $\pm 0.2$ )	1.5 ( $\pm 0.1$ )	1.15
V323T	1.7 ( $\pm 0.3$ )	3.9 ( $\pm 0.2$ )	2.29
S324A	1.3 ( $\pm 0.3$ )	2.4 ( $\pm 0.2$ )	1.85
V325A	1.3 ( $\pm 0.3$ )	1.7 ( $\pm 0.1$ )	1.31
V367L	1.2 ( $\pm 0.1$ )	1.2 ( $\pm 0.1$ )	1.00
<b>Κινητική για την μεταφορά υποξανθίνης (JW3692)</b>			
GhxP wt	8.9 ( $\pm 1.1$ )	2.0 ( $\pm 0.1$ )	0.23
R145A/V146H	4.4 ( $\pm 0.2$ )	0.3 ( $\pm 0.1$ )	0.07
R145A	4.5 ( $\pm 0.4$ )	0.5 ( $\pm 0.1$ )	0.11

Για κύτταρα *E. coli* JW3692 που εκφράζουν την κάθε κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων αδενίνης (0.04 $\mu\text{M}$ -10 $\mu\text{M}$ ) και υποξανθίνης (0.1 $\mu\text{M}$ -40 $\mu\text{M}$ ), σε χρόνους 5-10 sec ή 15-20 sec αντίστοιχα και στους 25 °C. Τιμές αρνητικού μάρτυρα μετρήθηκαν από κύτταρα JW3692 μετασηματισμένα με πλασμίδιο pT7-5 που δεν φέρει γονίδιο μεταφορέα και αφαιρέθηκαν από όλες τις τιμές των δειγμάτων. Οι παράμετροι των εξισώσεων κινητικής καθορίστηκαν από την καμπύλη των Michaelis-Menten και οι τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  που δείχνονται αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων.

Πίνακας 3.2: Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα AdeP και των μεταλλαγμάτων του

Περμεάση	<i>Τιμές <math>K_i</math> (<math>\mu M</math>) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς αδερίνης (<math>L=0.1\mu M</math>)</i>									
	Νουκλεοτιδική βάση ή Ανταγωνιστής									
	A ( $K_M$ )	P	2,6-NP	6-CLP	9-MA	HX	6-MP	G	6-SG	
<b>AdeP wt</b>	1.2 ( $\pm 0.1$ )	3.4 ( $\pm 0.4$ )	8.8 ( $\pm 3.2$ )	40.7 ( $\pm 8.9$ )	96.2 ( $\pm 9.3$ )	150.1 ( $\pm 14.4$ )	158.2 ( $\pm 13.0$ )	ND	ND	
<b>1<sup>η</sup> ομάδα</b>	N49V	<b>43.2</b> ( $\pm 1.2$ )	ND	ND	ND	ND	98.9 ( $\pm 10.2$ )	145.9 ( $\pm 18.7$ )	<b>31.3</b> ( $\pm 4.8$ )	<b>115.3</b> ( $\pm 14.0$ )
	N95T	<b>21.4</b> ( $\pm 1.2$ )	<b>96.8</b> ( $\pm 12.5$ )	<b>88.8</b> ( $\pm 9.8$ )	ND	ND	<b>20.7</b> ( $\pm 1.7$ )	<b>38.8</b> ( $\pm 7.2$ )	<b>1.8</b> ( $\pm 0.3$ )	<b>46.3</b> ( $\pm 7.4$ )
	G93S	1.2 ( $\pm 0.1$ )	<b>89.0</b> ( $\pm 19.4$ )	<b>42.8</b> ( $\pm 6.5$ )	41.1 ( $\pm 9.1$ )	148.3 ( $\pm 44.4$ )	<b>15.6</b> ( $\pm 4.4$ )	<b>26.6</b> ( $\pm 5.0$ )	<b>47.9</b> ( $\pm 7.7$ )	ND
<b>2<sup>η</sup> ομάδα</b>	I45S	3.2 ( $\pm 0.4$ )	<b>10.4</b> ( $\pm 1.1$ )	<b>100.8</b> ( $\pm 14.1$ )	61.5 ( $\pm 8.6$ )	ND	ND	ND	ND	ND
	S268A	2.3 ( $\pm 0.6$ )	<b>46.4</b> ( $\pm 5.9$ )	<b>80.6</b> ( $\pm 6.5$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	M92I	<b>4.4</b> ( $\pm 0.5$ )	<b>73.2</b> ( $\pm 9.2$ )	<b>90.0</b> ( $\pm 12.7$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	M92I/G93S	<b>6.5</b> ( $\pm 0.6$ )	ND	ND	65.7 ( $\pm 11.3$ )	ND	<b>35.2</b> ( $\pm 3.5$ )	<b>34.7</b> ( $\pm 3.9$ )	<b>56.2</b> ( $\pm 8.7$ )	ND
<b>3<sup>η</sup> ομάδα</b>	R145A	0.7 ( $\pm 0.1$ )	3.4 ( $\pm 0.9$ )	2.8 ( $\pm 0.3$ )	24.1 ( $\pm 3.3$ )	35.9 ( $\pm 10.4$ )	<b>31.1</b> ( $\pm 7.2$ )	<b>47.9</b> ( $\pm 11.8$ )	ND	ND
	R145A/V146 H	0.7 ( $\pm 0.1$ )	2.9 ( $\pm 0.7$ )	4.1 ( $\pm 0.6$ )	NA	41.9 ( $\pm 8.1$ )	<b>28.0</b> ( $\pm 3.8$ )	<b>59.4</b> ( $\pm 8.0$ )	ND	ND
	S320A	1.6 ( $\pm 0.3$ )	2.9 ( $\pm 0.6$ )	16.0 ( $\pm 4.2$ )	30.9 ( $\pm 3.6$ )	116.9 ( $\pm 27.4$ )	<b>30.3</b> ( $\pm 6.9$ )	<b>62.6</b> ( $\pm 14.1$ )	ND	ND
	S321A	1.1 ( $\pm$ 0.1)	2.9 ( $\pm 0.2$ )	19.6 ( $\pm 5.3$ )	35.7 ( $\pm 9.8$ )	120.6 ( $\pm 18.0$ )	<b>31.6</b> ( $\pm 4.0$ )	<b>41.9</b> ( $\pm 10.9$ )	ND	ND
	S324A	1.3 ( $\pm 0.3$ )	1.1 ( $\pm 0.1$ )	8.8 ( $\pm 0.7$ )	NA	74.6 ( $\pm 7.9$ )	<b>40.3</b> ( $\pm 6.4$ )	<b>64.1</b> ( $\pm 9.3$ )	ND	ND
	V325A	1.3 ( $\pm 0.3$ )	1.8 ( $\pm 0.3$ )	11.6 ( $\pm 1.7$ )	NA	33.9 ( $\pm 5.1$ )	<b>42.1</b> ( $\pm 6.3$ )	<b>57.6</b> ( $\pm 4.7$ )	ND	ND
	A315V	0.6 ( $\pm 0.1$ )	<b>12.1</b> ( $\pm 3.2$ )	15.0 ( $\pm 2.1$ )	NA	57.0 ( $\pm 9.6$ )	<b>53.3</b> ( $\pm 18.5$ )	114.0 ( $\pm 29.0$ )	<b>185.4</b> ( $\pm 31.4$ )	ND
	S312P/A315V	0.7 ( $\pm 0.1$ )	<b>11.5</b> ( $\pm 2.1$ )	11.5 ( $\pm 1.8$ )	NA	104.2 ( $\pm 18.8$ )	<b>49.7</b> ( $\pm 9.4$ )	135.8 ( $\pm 27.1$ )	<b>105.4</b> ( $\pm 30.8$ )	ND
	S320A/S321A	1.3 ( $\pm 0.2$ )	2.0 ( $\pm 0.2$ )	5.3 ( $\pm 1.2$ )	21.5 ( $\pm 4.8$ )	50.8 ( $\pm 10.2$ )	<b>28.4</b> ( $\pm 5.0$ )	<b>78.3</b> ( $\pm 9.3$ )	<b>109.9</b> ( $\pm 24.5$ )	ND

συνέχεια Πίνακα 3.2:

Περμεάση	Τιμές $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς αδενίνης ( $L=0.1\mu\text{M}$ )								
	Νουκλεοτιδική βάση ή Ανταγωνιστής								
	A ( $K_M$ )	P	2,6-NP	6-CLP	9-MA	HX	6-MP	G	6-SG
T41A	0.4 ( $\pm 0.1$ )	<b>13.5</b> ( $\pm 3.9$ )	10.2 ( $\pm 2.3$ )	NA	46.4 ( $\pm 11.4$ )	ND	ND	ND	ND
F98T	9.3 ( $\pm 3.2$ )	4.1 ( $\pm 0.7$ )	9.7 ( $\pm 0.9$ )	NA	120.6 ( $\pm 4.7$ )	<b>64.6</b> ( $\pm 8.8$ )	<b>84.7</b> ( $\pm 11.0$ )	ND	ND
T149G	1.1 ( $\pm 0.2$ )	3.8 ( $\pm 1.0$ )	20.6 ( $\pm 2.2$ )	NA	106.0 ( $\pm 10.3$ )	89.6 ( $\pm 18.3$ )	93.4 ( $\pm 22.0$ )	ND	ND
V263T	2.0 ( $\pm 0.1$ )	5.3 ( $\pm 0.4$ )	17.6 ( $\pm 2.7$ )	NA	74.3 ( $\pm 20.0$ )	106.9 ( $\pm 25.0$ )	>400	ND	ND
N264A	1.4 ( $\pm 0.1$ )	5.2 ( $\pm 1.1$ )	<b>54.2</b> ( $\pm 9.4$ )	NA	176.2 ( $\pm 9.2$ )	147.6 ( $\pm 9.5$ )	208.0 ( $\pm 39.0$ )	ND	ND
T276A	1.7 ( $\pm 0.3$ )	4.2 ( $\pm 0.5$ )	8.9 ( $\pm 1.6$ )	NA	124.2 ( $\pm 15.0$ )	108.7 ( $\pm 25.6$ )	112.82 ( $\pm 23.4$ )	ND	ND
D277G	1.1 ( $\pm 0.2$ )	7.2 ( $\pm 1.0$ )	26.7 ( $\pm 0.7$ )	NA	66.4 ( $\pm 6.4$ )	149.7 ( $\pm 23.8$ )	163.0 ( $\pm 29.9$ )	ND	ND
V323T	1.7 ( $\pm 0.3$ )	4.3 ( $\pm 0.6$ )	16.3 ( $\pm 3.5$ )	NA	323.7 ( $\pm 35.5$ )	<b>57.0</b> ( $\pm 9.6$ )	170.7 ( $\pm 38.7$ )	ND	ND
V367L	1.2 ( $\pm 0.1$ )	6.1 ( $\pm 1.0$ )	9.9 ( $\pm 1.7$ )	NA	94.9 ( $\pm 18.7$ )	100.7 ( $\pm 24.6$ )	158.6 ( $\pm 44.3$ )	ND	ND

μεταλλάγματα που δεν διαφοροποιούνται από τον AdeP

Για κύτταρα *E. coli* JW3692 που εκφράζουν την αντίστοιχη κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων αδενίνης ( $0.1\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec και στους  $25^\circ\text{C}$ , παρουσία μη ραδιενεργού ανταγωνιστή σε συγκέντρωση  $0.1\mu\text{M}$ - $1\text{mM}$ . Οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  καθορίστηκαν βάση της σιγμοειδούς καμπύλης της εξίσωσης δόσης-απόκρισης (sigmoidal dose-response equation) και οι τιμές  $K_i$  υπολογίστηκαν μέσω των τιμών  $\text{IC}_{50}$  και της εξίσωσης των Cheng-Prusoff,  $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_M)]$ . Η ένδειξη ND (not determined) αφορά περιπτώσεις υποστρωμάτων πολύ χαμηλής συγγένειας όπου δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστούν με ακρίβεια τιμές  $\text{IC}_{50}$ , αλλά κατά προσέγγιση η μέση μέγιστη συγκέντρωση του ανταγωνιστή είναι είτε  $>400\mu\text{M}$ , είτε για τις περισσότερες περιπτώσεις των βασικών υποστρωμάτων του GhxP που δεν εντάσσονται στο προφίλ εξειδίκευσης του AdeP είναι  $>1000\mu\text{M}$ . Οι τιμές που δείχνονται αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων με την αντίστοιχη μέση απόκλιση. Συντμήσεις: NA, not assayed, L, η συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος; P, πουρίνη; 2,6-AP, 2,6-διαμινοπουρίνη; 6-CLP, 6-χλωροπουρίνη; 9-MA, 9-μεθυλοαδενίνη; HX, υποξανθίνη; 6-MP, 6-μερκαπτοπουρίνη; G, γουανίνη; 6-SG, 6-θειογουανίνη.

### 3.3. Μεταλλαξιγένεση του GhxP σε θέσεις που διαφέρουν στον AdeP

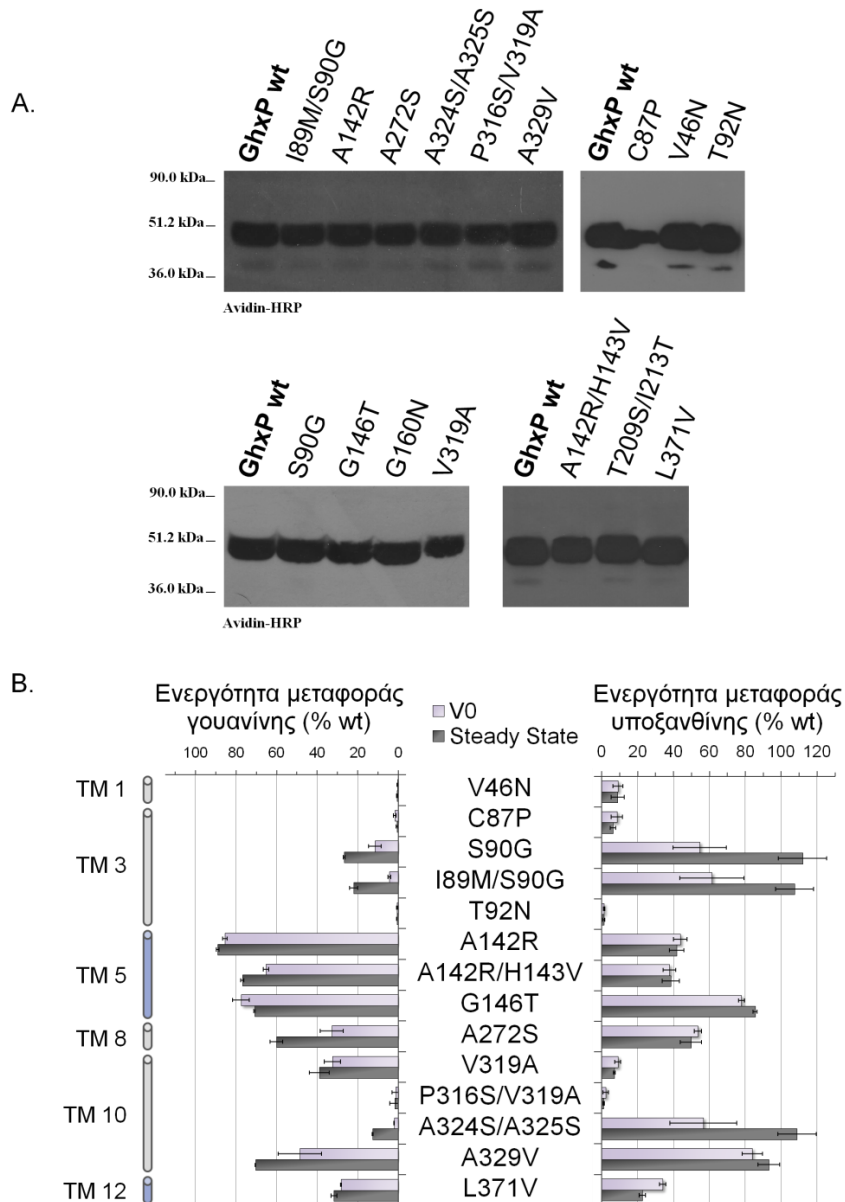
Η μεταλλαξιγένεση του GhxP έγινε στις θέσεις αμινοξέων που αντιστοιχούν στα μεταλλάγματα του AdeP που διαφέρουν σημαντικά στο προφίλ αναγνώρισης υποστρωμάτων από τον AdeP φυσικού τύπου (δηλαδή εμπίπτουν σε κάποια από τις τρεις ομάδες που αναφέρθηκαν παραπάνω). Οι μεταλλαγές που έγιναν στον GhxP ήταν οι V46N στο TM 1, C87P, S90G, I89M/S90G και T92N στο TM 3, A142R, A142R/H143V και G146T στο TM 5, A272S στο TM 8, V319A, P316S/V319A, A324S/A325S και A329V στο TMS 10 και L371V στο TM 12.

Όλα τα μεταλλάγματα του GhxP βρέθηκε ότι εκφράζονται στην μεμβράνη της *E. coli* K-12 σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά του φυσικού τύπου με μόνη εξαίρεση το μετάλλαγμα C87P στο TM 3 που η έκφραση του είναι υποδιπλάσια του φυσικού τύπου (βλέπε **Εικόνα 3.6/A**). Ως προς την ενεργότητα μεταφοράς των φυσικών υποστρωμάτων του GhxP (υποξανθίνη και γουανίνη), βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ενεργότητας ανάμεσα στα μεταλλάγματα, ενώ τα V46N (TM 1), C87P, T92N (TM 3) και P316S/V319A (TM 10) ήταν ανενεργά (με μηδενική ενεργότητα τόσο για γουανίνη όσο και για υποξανθίνη) (βλέπε **Εικόνα 3.6/B**). Επίσης, ορισμένα μεταλλάγματα εμφανίζουν ενεργότητα μεταφοράς μόνο με το ένα από τα δύο υποστρώματα: το V319A (TM 10) εμφανίζει μηδενική ενεργότητα για την υποξανθίνη αν και διατηρεί επίπεδα μεταφοράς γουανίνης παρόμοια με του GhxP φυσικού τύπου, ενώ τα I89M/S90G, S90G (TM 3) και A324S/A325S (TM 10) έχουν κανονικά επίπεδα ενεργότητας για την υποξανθίνη αλλά μηδενική ενεργότητα μεταφοράς γουανίνης (βλέπε **Εικόνα 3.6/B** και **Πίνακα 3.3**).

Όλα τα ενεργά μεταλλάγματα του GhxP αναλύθηκαν επίσης ως προς την ικανότητα αναγνώρισης των αναλόγων αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης που είχαν χρησιμοποιηθεί και για τα μεταλλάγματα του AdeP, σε πειράματα ανταγωνισμού έναντι της μεταφοράς γουανίνης ή υποξανθίνης. Κανένα από τα μεταλλάγματα του GhxP δεν εμφάνισε ικανότητα αναγνώρισης αδενίνης ή αναλόγων αδενίνης που είναι υποστρώματα/προσδέτες του AdeP και κανένα από αυτά δεν εμφάνισε μεγάλες αποκλίσεις στην συγγένεια για την γουανίνη, την υποξανθίνη και ανάλογα γουανίνης και υποξανθίνης που είναι υποστρώματα/προσδέτες του GhxP, σε σύγκριση με τον GhxP φυσικού τύπου, με μόνη εξαίρεση την μειωμένη συγγένεια 8-αζαγουανίνης (5- ως 15-φορές μεγαλύτερη  $K_i$  από την αντίστοιχη του φυσικού τύπου) που παρατηρήθηκε για τα I89M/S90G, S90G (TM 3), και A324S/A325S (TM 10) (βλέπε **Πίνακα 3.4**).

Είναι ενδιαφέρον ότι τα μεταλλάγματα του GhxP που μεταφέρουν μόνο το ένα από τα δύο υποστρώματα (γουανίνη ή υποξανθίνη), όπως αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια (συγκρίσιμη με του φυσικού τύπου) ακόμη και τα υποστρώματα που δεν μεταφέρουν: το V319A δεν μεταφέρει υποξανθίνη αλλά την αναγνωρίζει με  $K_i$  5.5 $\mu$ M (ίση με του φυσικού τύπου) σε πειράματα ανταγωνισμού έναντι της μεταφοράς γουανίνης, τα I89M/S90G, S90G και A324S/A325S δεν μεταφέρουν γουανίνη αλλά την αναγνωρίζουν με  $K_i$  1.3-2.1 $\mu$ M (συγκρίσιμη με του φυσικού τύπου) σε πειράματα ανταγωνισμού έναντι της μεταφοράς υποξανθίνης (βλέπε

Πίνακες 3.3 & 3.4). Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι το πρόβλημα με τα μη μεταφερόμενα υποστρώματα δεν είναι στην πρόσδεσή τους στο κέντρο δέσμευσης του μεταλλαγμένου μεταφορέα αλλά στην εναλλαγή διαμόρφωσης κατά την ενεργητική μεταφορά.



**Εικόνα 3.6: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων του GhxP.** Τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025. A) Ανοσοαποτύπωση κατά western με αντίσωμα το σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε δείγματα μεμβρανικών κλασμάτων που περιέχουν τον φυσικό τύπο GhxP ή τα μεταλλάγματα του. B) Ενεργή μεταφορά γουανίνης (0.1μM, κύτταρα JW4025) και υποξανθίνης (1μM, κύτταρα JW3692) των μεταλλαγμάτων του GhxP συγκριτικά με την ενεργότητα του φυσικού τύπου (%) με τυπικές αποκλίσεις (γραμμές σφάλματος) από τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις. Οι αρχικοί ρυθμοί πρόσληψης γουανίνης (initial rates/V0, ανοιχτόχρωμες στήλες) μετρήθηκαν σε 5-10 δευτερόλεπτα και τα επίπεδα σταθερής κατάστασης γουανίνης (Steady State, σκουρόχρωμες στήλες) μετρήθηκαν σε 1-5 λεπτά. Οι αρχικοί ρυθμοί πρόσληψης υποξανθίνης μετρήθηκαν σε 10-20 δευτερόλεπτα και τα επίπεδα σταθερής κατάστασής της μετρήθηκαν σε 1-5 λεπτά. Οι τιμές ελέγχου μετρήθηκαν από στέλεχος που φέρει το πλασμίδιο pT7-5 χωρίς γονίδιο μεταφορέα και αφαιρέθηκαν από τις μετρήσεις των δειγμάτων σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 3.3: Τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  του μεταφορέα GhxP και των μεταλλαγμάτων του

Περμεάση	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$V_{max}/K_M$ ( $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
<b>Κινητική για την μεταφορά γουανίνης (JW4025)</b>			
GhxP wt	1.1 ( $\pm 0.1$ )	1.0 ( $\pm 0.1$ )	0.91
V46N	ND	ND	ND
C87P	ND	ND	ND
S90G	ND	ND	ND
I89M/S90G	ND	ND	ND
T92N	ND	ND	ND
A142R	0.5 ( $\pm 0.1$ )	0.6 ( $\pm 0.1$ )	1.20
A142R/H143V	0.8 ( $\pm 0.1$ )	0.7 ( $\pm 0.1$ )	0.88
G146T	1.2 ( $\pm 0.1$ )	0.9 ( $\pm 0.1$ )	0.75
A272S	1.2 ( $\pm 0.3$ )	0.8 ( $\pm 0.1$ )	0.67
V319A	2.0 ( $\pm 0.3$ )	1.1 ( $\pm 0.1$ )	0.55
P316S/V319A	ND	ND	ND
A324S/A325S	ND	ND	ND
A329V	0.8 ( $\pm 0.3$ )	0.7 ( $\pm 0.1$ )	0.88
L371V	1.2 ( $\pm 0.4$ )	1.4 ( $\pm 0.1$ )	1.17
<b>Κινητική για την μεταφορά υποξανθίνης (JW3692)</b>			
GhxP wt	8.9 ( $\pm 1.1$ )	2.0 ( $\pm 0.1$ )	0.23
V46N	ND	ND	ND
C87P	ND	ND	ND
S90G	4.7 ( $\pm 0.8$ )	0.6 ( $\pm 0.1$ )	0.13
I89M/S90G	5.2 ( $\pm 0.5$ )	0.6 ( $\pm 0.1$ )	0.12
T92N	ND	ND	ND
A142R	7.9 ( $\pm 0.5$ )	0.8 ( $\pm 0.1$ )	0.10
A142R/H143V	7.4 ( $\pm 0.6$ )	0.7 ( $\pm 0.1$ )	0.10
G146T	8.9 ( $\pm 1.6$ )	1.3 ( $\pm 0.1$ )	0.15
A272S	17.2 ( $\pm 1.3$ )	1.1 ( $\pm 0.1$ )	0.06
V319A	ND	ND	ND
P316S/V319A	ND	ND	ND
A324S/A325S	5.6 ( $\pm 0.8$ )	0.6 ( $\pm 0.1$ )	0.11
A329V	6.2 ( $\pm 0.5$ )	1.2 ( $\pm 0.1$ )	0.19
L371V	13.9 ( $\pm 1.5$ )	1.6 ( $\pm 0.1$ )	0.12

Για κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025 που εκφράζουν την κάθε κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων υποξανθίνης (0.1  $\mu\text{M}$ -40  $\mu\text{M}$ ) ή γουανίνης (0.01  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 15-20 sec ή 10 sec αντίστοιχα και στους 25 °C. Τιμές αρνητικού μάρτυρα μετρήθηκαν από κύτταρα JW3692 ή JW4025 μετασχηματισμένα με πλασμίδιο pT7-5 που δεν φέρει γονίδιο μεταφορέα και αφαιρέθηκαν από όλες τις τιμές των δειγμάτων. Οι παράμετροι των εξισώσεων κινητικής καθορίστηκαν από την καμπύλη των Michaelis-Menten και οι τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  που δείχνονται αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων.



Πίνακας 3.4: Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα GhxP και των μεταλλαγμάτων του

Περμεάση	Τιμές $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς γουανίνης ( $L=0.1\mu\text{M}$ )				
	6-SG	HX	6-MP	8-AG	1-MG
GhxP wt	3.1 ( $\pm 0.3$ )	5.7 ( $\pm 1.1$ )	8.4 ( $\pm 1.5$ )	50.5 ( $\pm 6.9$ )	55.1 ( $\pm 7.4$ )
A142R	3.1 ( $\pm 0.4$ )	6.7 ( $\pm 0.8$ )	13.0 ( $\pm 2.6$ )	31.2 ( $\pm 3.0$ )	52.6 ( $\pm 8.9$ )
A142R/H143V	2.6 ( $\pm 0.3$ )	5.2 ( $\pm 0.5$ )	14.0 ( $\pm 3.0$ )	14.7 ( $\pm 3.6$ )	38.5 ( $\pm 3.5$ )
G146T	2.9 ( $\pm 0.3$ )	7.6 ( $\pm 0.4$ )	24.2 ( $\pm 4.6$ )	68.1 ( $\pm 4.6$ )	65.8 ( $\pm 9.4$ )
A272S	5.2 ( $\pm 0.5$ )	6.2 ( $\pm 0.6$ )	10.3 ( $\pm 1.7$ )	53.2 ( $\pm 6.6$ )	47.9 ( $\pm 5.7$ )
V319A	1.3 ( $\pm 0.2$ )	5.8 ( $\pm 0.6$ )	8.8 ( $\pm 1.6$ )	85.7 ( $\pm 16.8$ )	70.2 ( $\pm 12.6$ )
A329V	2.8 ( $\pm 0.5$ )	7.9 ( $\pm 0.9$ )	19.2 ( $\pm 3.7$ )	57.4 ( $\pm 7.1$ )	76.0 ( $\pm 5.3$ )
L371V	5.1 ( $\pm 0.5$ )	4.5 ( $\pm 0.8$ )	4.3 ( $\pm 0.4$ )	13.6 ( $\pm 2.5$ )	37.1 ( $\pm 7.7$ )

Περμεάση	Τιμές $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς υποξανθίνης ( $L=1\mu\text{M}$ )				
	G	6-SG	6-MP	8-AG	1-MG
GhxP wt	1.6 ( $\pm 0.1$ )	3.6 ( $\pm 0.2$ )	10.6 ( $\pm 1.9$ )	48.0 ( $\pm 7.4$ )	61.0 ( $\pm 13.0$ )
S90G	2.6 ( $\pm 0.2$ )	6.9 ( $\pm 0.9$ )	10.6 ( $\pm 1.4$ )	ND	64.6 ( $\pm 9.3$ )
I89M/S90G	2.3 ( $\pm 0.3$ )	4.2 ( $\pm 0.4$ )	7.0 ( $\pm 0.4$ )	ND	67.8 ( $\pm 11.9$ )
A324S/A325S	1.7 ( $\pm 0.2$ )	2.6 ( $\pm 0.1$ )	11.8 ( $\pm 1.4$ )	<b>207.0</b> ( $\pm 44.5$ )	57.8 ( $\pm 9.7$ )

Για κύτταρα *E. coli* JW4025 ή JW3692 που εκφράζουν την αντίστοιχη κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων γουανίνης ( $0,1\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec ή υποξανθίνης ( $1\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 15-20 sec και στους  $25^\circ\text{C}$ , παρουσία μη ραδιενεργού ανταγωνιστή σε συγκέντρωση  $0,1\mu\text{M}$ - $1\text{mM}$ . Οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  καθορίστηκαν βάση της σιγμοειδούς καμπύλης της εξίσωσης δόσης-απόκρισης (sigmoidal dose-response equation) και οι τιμές  $K_i$  υπολογίστηκαν μέσω των τιμών  $\text{IC}_{50}$  και της εξίσωσης των Cheng-Prusoff,  $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_M)]$ . Η ένδειξη ND (not determined) αφορά περιπτώσεις υποστρωμάτων πολύ χαμηλής συγγένειας όπου δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστούν με ακρίβεια τιμές  $\text{IC}_{50}$ , αλλά κατά προσέγγιση η μέση μέγιστη συγκέντρωση του ανταγωνιστή είναι είτε  $>400\mu\text{M}$ . Οι τιμές που δείχνονται αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων με την αντίστοιχη μέση απόκλιση. Συντμήσεις: L, η συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος; HX, υποξανθίνη; 6-MP, 6-μερκαπτοπουρίνη; G, γουανίνη; 6-SG, 6-θειογουανίνη.

### 3.4. Διερεύνηση του προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα αδενίνης/υποξανθίνης/γουανίνης Q92VC3 και σύγκριση με τα προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων AdeP, GhxP και των μεταλλάγματά τους

Πρόσφατα, στο πλαίσιο μιας μελέτης για την πιθανή σημασία του μεταβολισμού πουρινών κατά την συμβιωτική αζωτοδέσμευση στα ριζικά φυμάτια των ψυχανθών, ανακαλύφθηκε ένας μεταφορέας πουρινών ευρύτερης εξειδίκευσης που προέρχεται από το ριζοβακτήριο *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*<sup>200</sup>. Πρόκειται για τον μεταφορέα αδενίνης/υποξανθίνης/γουανίνης Q92VC3 (βλέπε Πίνακα 3.5), ο οποίος είναι ο μόνος γνωστός έως σήμερα μεταφορέας ευρείας εξειδίκευσης σε Πρωτεοβακτήρια από την ομάδα AzgA-like/COG2252. Στην παρούσα διατριβή, χαρακτηρίστηκε το προφίλ εξειδίκευσης του Q92VC3 με στόχο να συγκριθεί με τους συγγενικούς AdeP και GhxP καθώς και τα μεταλλάγματά τους, για να διαπιστωθεί η μοριακή βάση της διευρυμένης εξειδίκευσης του Q92VC3. Το έναυσμα για την παρούσα ανάλυση ήταν ότι από την εκτενή μεταλλαξιγένεση των AdeP και GhxP δεν κατέστη δυνατό να εντοπίσουμε κάποιο μετάλλαγμα με ευρεία εξειδίκευση ανάλογη του Q92VC3. Μόνο ένα μετάλλαγμα (AdeP\_R145A) βρέθηκε να μεταφέρει αδενίνη και υποξανθίνη, ενώ τα υπόλοιπα μεταφέρουν μόνο αδενίνη (όπως και ο φυσικού τύπου AdeP), μόνο γουανίνη και υποξανθίνη (όπως και ο φυσικού τύπου GhxP), μόνο γουανίνη (GhxP\_V319A) ή μόνο υποξανθίνη (GhxP\_I89M/S90G, GhxP\_S90G, GhxP\_A324S/A325S). Σε καμία περίπτωση δεν διαπιστώθηκε ταυτόχρονη ικανότητα μεταφοράς (ή, αναγνώριση με ισχυρή συγγένεια) τόσο αδενίνης όσο και γουανίνης για κάποιο από τα μεταλλάγματα αυτά.

Ο Q92VC3 αναγνωρίζει και μεταφέρει με υψηλή συγγένεια ( $K_M$  από 1.5 έως 4.5  $\mu\text{M}$ ) αδενίνη, γουανίνη και υποξανθίνη, έχοντας προτίμηση για την αδενίνη ( $V_{max}/K_M$  4-φορές μεγαλύτερη από ότι για την γουανίνη και 9-φορές μεγαλύτερη από ότι για την υποξανθίνη). Η ανάλυση αναγνώρισης μιας σειράς αναλόγων των υποστρωμάτων αυτών, σε πειράματα ανταγωνισμού έναντι της μεταφοράς αδενίνης, έδειξε ότι ο Q92VC3 αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια γουανίνη και υποξανθίνη ( $K_i < 2\mu\text{M}$ ), καθώς και τα αντίστοιχα 6-θειοανάλογα 6-θειογουανίνη ( $K_i = 150\mu\text{M}$ ) και 6-μερκαπτοπουρίνη ( $K_i = 20\mu\text{M}$ ), όπως και ο GhxP, αλλά και τα ανάλογα 2,6-διαμινοπουρίνη, 2-φθοροαδενίνη, 6-διμεθυλαμινο-αιθυλοαδενίνη ( $K_i$  50-70  $\mu\text{M}$ ) πουρίνη ( $K_i = 120\mu\text{M}$ ) και 6-χλωροπουρίνη ( $K_i = 190\mu\text{M}$ ), που αναγνωρίζονται επίσης με υψηλή συγγένεια από τον AdeP. Επιπρόσθετα, ο Q92VC3 αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια ( $K_i$  30-70  $\mu\text{M}$ ) τις κυτοκινίνες N6-βενζυλαμινοπουρίνη (ή N6-βενζυλαδενίνη) (BA) (σύνθεση και παραχώρηση από το συνεργαζόμενο εργαστήριο της Ν. Πουλής, Τμ. Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) και N6-βενζουλαδενίνη, οι οποίες δεν αναγνωρίζονται ούτε από τον AdeP ούτε από τον GhxP (βλέπε Εικόνα 3.7 και Πίνακα 3.6).

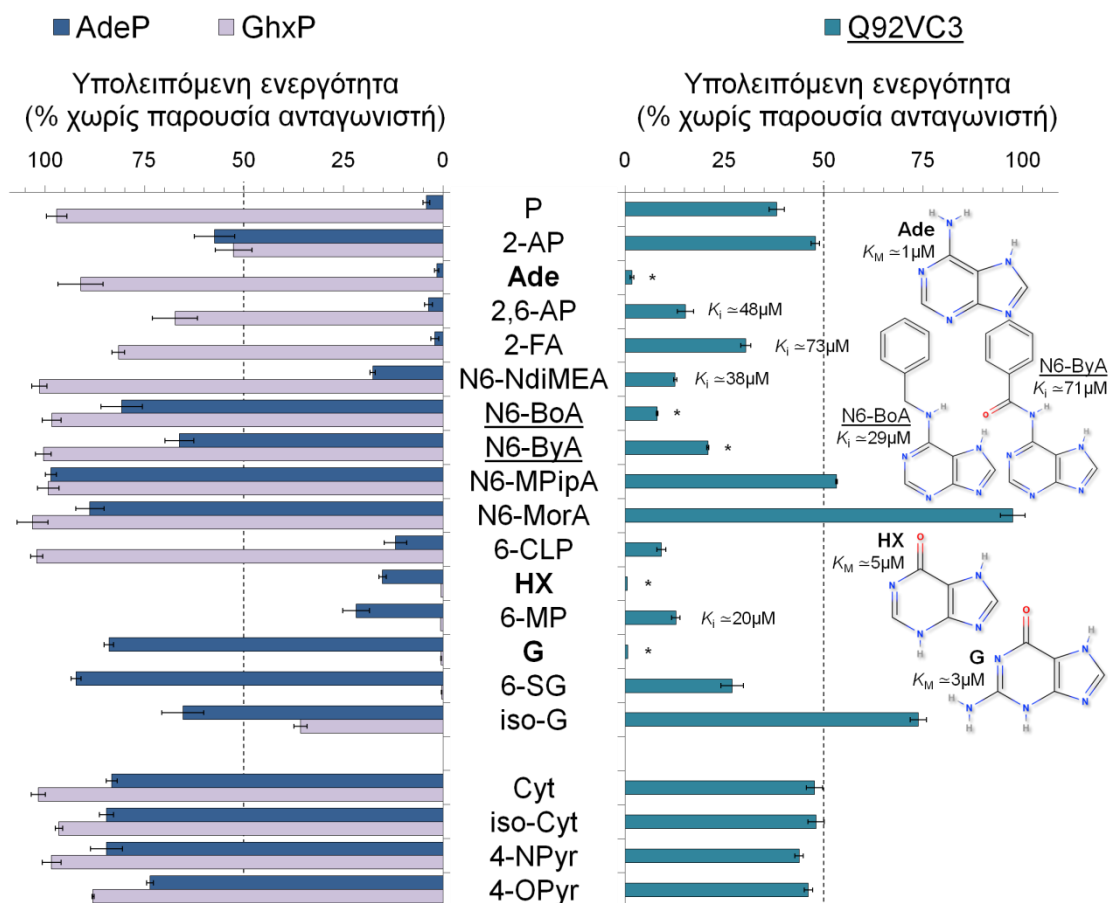
Συγκριτικά με τις θέσεις αμινοξέων που μελετήθηκαν με μεταλλαξιγένεση στους AdeP και GhxP στην παρούσα διατριβή (που διαφέρουν μεταξύ AdeP και GhxP), ο Q92VC3 συντηρεί όλα τα αμινοξέα που έχει ο AdeP στις θέσεις των TM 1 (Thr41, Ile45, Asn49)

και TM 3 (Met92, Gly93, Asn95, Phe98), καθώς και την Arg145 (TM 5) και τις Ser312, Ala315 και Ser321 (TM 10), αλλά διαφέρει στις υπόλοιπες θέσεις, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι Ser268 (TM 8), Ser320, Ser324 και Val325 (TM 10) όπου τα μεταλλάγματα του AdeP έδειξαν σημαντικές αλλαγές στον φαινότυπο. Η αντικατάσταση Ser268A (στον AdeP) οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης για όλα τα υποστρώματα, ενώ οι Ser320A και Val325A δεν έχουν επίπτωση στην συγγένεια για αδερίνη (και τα αντίστοιχα ανάλογα) αλλά επιτρέπουν αναγνώριση με υψηλή συγγένεια της υποξανθίνης (και 6-μερκαπτοπουρίνης), όχι όμως και της γουανίνης (ή 6-θειογουανίνης). Ο συνδυασμός, ωστόσο, αυτών των τριών αλλαγών θα μπορούσε να λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο. Στο υπόβαθρο του Q92VC3 (ο οποίος διαφέρει από τον AdeP στο 50% των αμινοξέων του χωρίς όμως να διαφέρει καθόλου στα αμινοξέα του προβλεπόμενου κέντρου δέσμησης), οι τρεις αντίστοιχες θέσεις έχουν Ala. Η συνύπαρξη των αλανινών (Ala268, Ala320, Ala325) με τα άλλα αμινοξέα σε δυνητικά σημαντικές θέσεις που διατηρούνται όπως και στον AdeP (Ile45, Asn49, Met92, Gly93, Arg145, Ser321) ίσως συνδέεται με την ευρύτερη εξειδίκευση του Q92VC3 (βλέπε Εικόνα 3.2/B).

**Πίνακας 3.5:** Τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  των μεταφορέων AdeP, GhxP και Q92VC3

Περμεάση	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$V_{max}/K_M$ ( $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
<b><i>Κινητική για τη μεταφορά αδερίνης (JW3692)</i></b>			
AdeP	1.2 ( $\pm 0.1$ )	2.3 ( $\pm 0.1$ )	1.92
Q92VC3	1.5 ( $\pm 0.3$ )	2.6 ( $\pm 0.2$ )	1.73
<b><i>Κινητική για τη μεταφορά υποξανθίνης (JW3692)</i></b>			
GhxP	8.9 ( $\pm 1.1$ )	2.0 ( $\pm 0.1$ )	0.25
Q92VC3	4.5 ( $\pm 0.8$ )	0.9 ( $\pm 0.1$ )	0.20
<b><i>Κινητική για τη μεταφορά γουανίνης (JW4025)</i></b>			
GhxP	1.1 ( $\pm 0.1$ )	1.0 ( $\pm 0.1$ )	0.91
Q92VC3	2.7 ( $\pm 0.4$ )	1.3 ( $\pm 0.1$ )	0.48

Για κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025 που εκφράζουν την κάθε κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων αδερίνης (0.04 $\mu\text{M}$ -10 $\mu\text{M}$ ), υποξανθίνης (0.1 $\mu\text{M}$ -40 $\mu\text{M}$ ) ή γουανίνης (0.01 $\mu\text{M}$ -10 $\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec, 15-20 sec ή 10 sec αντίστοιχα και στους 25 °C. Τιμές αρνητικού μάρτυρα μετρήθηκαν από κύτταρα JW3692 ή JW4025 μετασχηματισμένα με πλασμίδιο pT7-5 που δεν φέρει γονίδιο μεταφορέα και αφαιρέθηκαν από όλες τις τιμές των δειγμάτων. Οι παράμετροι των εξισώσεων κινητικής καθορίστηκαν από την καμπύλη των Michaelis-Menten και οι τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  που δείχνονται αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων.



**Εικόνα 3.7: Σύγκριση των προφίλ εξειδίκευσης των AdeP και GhxP με τον ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέα Q92VC3 του *S. meliloti*.** Ποσοστό (%) της πρόσληψης (τυπικές αποκλίσεις από τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις) αδενίνης (0.1μM) για τους AdeP/Q92VC3 και υποξανθίνης (1μM) για τον GhxP, που διατηρείται παρουσία 1mM πιθανών ανταγωνιστών (0.4mM στις περιπτώσεις των αναλόγων N6-NdiMEA, MPipA, MorA, BoA, ByA), σε κύτταρα *E. coli* JW3692. Οι αρχικοί ρυθμοί πρόσληψης αδενίνης μετρήθηκαν σε 5-10 δευτερόλεπτα και υποξανθίνης σε 10-20 δευτερόλεπτα, μετά την παρέλευσης 5 λεπτών επώασης με τον κάθε πιθανό ανταγωνιστή. Για τις περιπτώσεις ανταγωνιστών όπου η αναστολή της ενεργότητας μετρήθηκε  $\geq 50\%$  έγινε κινητική ανάλυση και υπολογίστηκαν τιμές  $K_i$  (βλέπε Πίνακα 3.7). Ενδεικτικά, για τα ανάλογα υψηλής συγγένειας ( $K_i < 100 \mu\text{M}$ ) παρατίθενται οι τιμές  $K_i$  ενώ για τα υποστρώματα του Q92VC3 (αδενίνη/υποξανθίνη/γουανίνη) και τις κυτοκίνες (BoA, ByA) που χαρακτηριστικά αναγνωρίζονται μόνο από τον Q92VC3, παρατίθενται οι χημικές δομές τους και οι τιμές  $K_i$  ή  $K_M$  (\*). Συντμήσεις: P, πουρίνη; Ade, αδενίνη; 2-AP, 2-αμινοπουρίνη, 2,6-AP, 2,6-διαμινοπουρίνη; 6-CLP, 6-χλωροπουρίνη; N6-NdiMEA, N6-(διμεθυλαμινο)αιθυλοαδενίνη; N6-MPipA, N6-(4-μεθυλοπιπεραζινο)αδενίνη; N6-MorA, N6-(μορφολίνο)αδενίνη; N6-BoA, N6-βενζοϋλαδενίνη; N6-ByA, N6-βενζυλαδενίνη; HX, υποξανθίνη; 6-MP, 6-μερκαπτοπουρίνη; 2-FA, 2-φθοροαδενίνη; G, γουανίνη; 6-SG, 6-θειογουανίνη; iso-G, ισογουανίνη; Cyt, κυτοσίνη; iso-Cyt, ισοκυτοσίνη; 4-NPyr, 4-αμινοπυριμιδίνη; 4-OPyr, 4-κετοπυριμιδίνη (ή 4-υδροξυπυριμιδίνη).

Πίνακας 3.6: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων AdeP, GhxP και Q92VC3

Νουκλεοτιδική βάση ή Ανταγωνιστής	Τιμές $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς αδενίνης ( $L=0.1\mu\text{M}$ )		Τιμές $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς υποξανθίνης ( $L=1\mu\text{M}$ )
	Περμεάση		
	<u>AdeP</u>	<u>Q92VC3</u>	<u>GhxP</u>
<b>A</b> ( $K_M$ )	1.2 ( $\pm 0.1$ )	1.5 ( $\pm 0.2$ )	ND
<b>P</b>	3.4 ( $\pm 0.4$ )	126.5 ( $\pm 36.8$ )	ND
<b>2,6-AP</b>	8.8 ( $\pm 3.2$ )	48.3 ( $\pm 9.4$ )	ND
<b>2-FA</b>	38.3 ( $\pm 3.9$ )	72.5 ( $\pm 20.4$ )	ND
<b>6-CLP</b>	40.7 ( $\pm 8.9$ )	188.7 ( $\pm 21.6$ )	ND
<b>N6-NdiMA</b>	70.4 ( $\pm 8.6$ )	37.6 ( $\pm 14.3$ )	ND
<b>9-MA</b>	96.2 ( $\pm 9.3$ )	ND	ND
<b>N6-BoA</b>	ND	29.0 ( $\pm 6.2$ )	ND
<b>N6-ByA</b>	ND	70.8 ( $\pm 19.8$ )	ND
<b>HX</b>	150.1 ( $\pm 14.4$ )	1.4 ( $\pm 0.2$ )	8.9 ( $\pm 1.1$ ) ( $K_M$ )
<b>6-MP</b>	158.2 ( $\pm 13.0$ )	20.0 ( $\pm 4.8$ )	10.6 ( $\pm 1.9$ )
<b>G</b>	ND	1.9 ( $\pm 0.3$ )	1.6 ( $\pm 0.1$ )
<b>6-SG</b>	ND	151.2 ( $\pm 6.9$ )	3.6 ( $\pm 0.2$ )
<b>8-AZG</b>	ND	ND	48.0 ( $\pm 7.4$ )
<b>1-MG</b>	ND	ND	61.0 ( $\pm 13.0$ )

Για κύτταρα *E. coli* JW3692 που εκφράζουν την αντίστοιχη κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων αδενίνης ( $0.1\mu\text{M}$ ) ή υποξανθίνης ( $1\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec και στους  $25^\circ\text{C}$ , παρουσία μη ραδιενεργού ανταγωνιστή σε συγκέντρωση  $0.1\mu\text{M}$ - $1\text{mM}$ . Οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  καθορίστηκαν βάση της σιγμοειδούς καμπύλης της εξίσωσης δόσης-απόκρισης (sigmoidal dose-response equation) και οι τιμές  $K_i$  υπολογίστηκαν μέσω των τιμών  $\text{IC}_{50}$  και της εξίσωσης των Cheng-Prusoff,  $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_M)]$ . Η ένδειξη ND (not determined) αφορά περιπτώσεις υποστρωμάτων πολύ χαμηλής συγγένειας όπου δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστούν με ακρίβεια τιμές  $\text{IC}_{50}$ , αλλά κατά προσέγγιση η μέση μέγιστη συγκέντρωση του ανταγωνιστή είναι είτε  $>1000\mu\text{M}$ . Οι τιμές που δείχνονται αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων με την αντίστοιχη μέση απόκλιση. Συντμήσεις: L, η συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος; A, αδενίνη; P, πουρίνη; 2,6-AP, 2,6-διαμινοπουρίνη; 2-FA, 2-φθοροαδενίνη; 6-CLP, 6-γλωροπουρίνη; N6-NdiMA, N6-(N-διμεθυλεθύλιο)αδενίνη; 9-MA, 9-μεθυλοαδενίνη; N6-ByA, N6-βενζυλαδενίνη; N6-BoA, N6-βενζοϋλαδενίνη; HX, υποξανθίνη; 6-MP, 6-μερκαπτοπουρίνη; G, γουανίνη; 6-SG, 6-θειογουανίνη; 8-AZG, 8-αζαγουανίνη; 1-MG, 1-μεθυλογουανίνη.

### 3.5. Έλεγχος αναλόγων αδενίνης/γουανίνης σε πειράματα κυτταροτοξικότητας *in vivo*

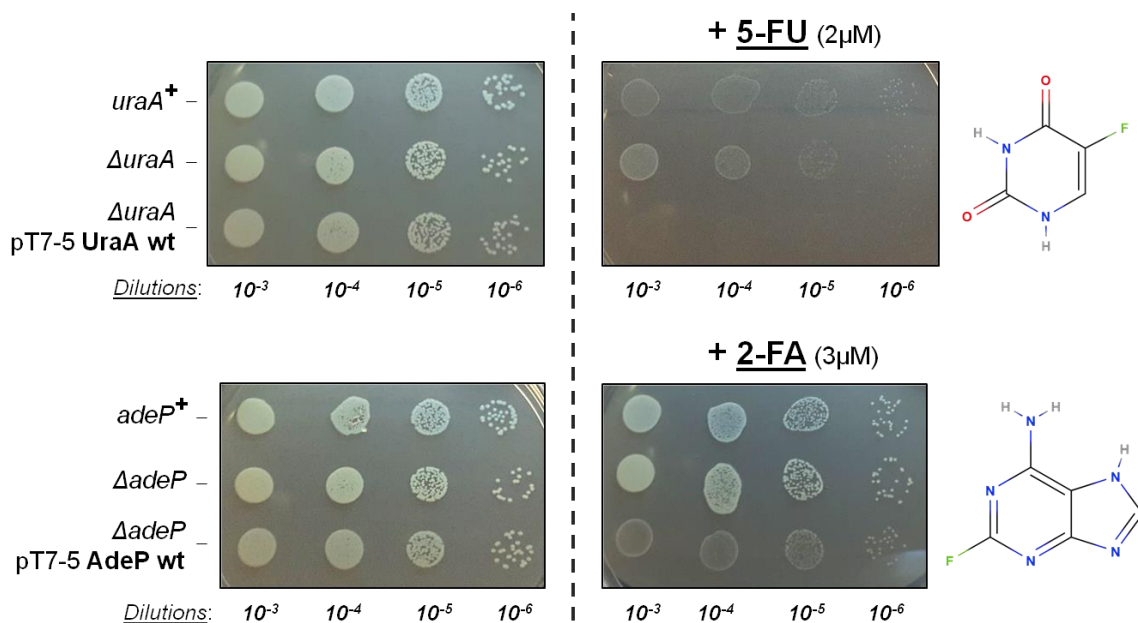
Από τα ανάλογα πουρινών τα οποία αναγνωρίζουν ο AdeP ή ο GhxP, ορισμένα έχουν αναφερθεί ως βακτηριοτοξικά κατά της *E. coli*, όπως 6-γλωροπουρίνη<sup>168</sup> και 2-φθοροαδενίνη (2-FA)<sup>182</sup> που αποτελούν προσδέτες του AdeP, ή 6-μερκαπτοπουρίνη και 6-θειογουανίνη που αποτελούν προσδέτες του GhxP<sup>165</sup>. Επίσης, κυτταροτοξική δράση έχει η 2,6-διαμινοπουρίνη<sup>167</sup> η οποία αναγνωρίζεται με ισχυρή συγγένεια από τον AdeP, η 2-αμινοπουρίνη<sup>166</sup> η οποία αναγνωρίζεται με πολύ χαμηλή συγγένεια από τον AdeP και τον GhxP, η 8-αζαγουανίνη<sup>169</sup>, η οποία αναγνωρίζεται με αρκετά υψηλή συγγένεια από τον GhxP, και η 2-ισογουανίνη<sup>170</sup> η οποία αναγνωρίζεται με πολύ χαμηλή συγγένεια από τον GhxP.

Τα παραπάνω ανάλογα αδενίνης/γουανίνης ελέγχθηκαν για πιθανή κυτταροτοξική τους δράση *in vivo* σε κυτταροκαλλιέργειες *E. coli* K-12. Παράλληλα, ελέγχθηκε ως θετικός μάρτυρας το ανάλογο 5-φθοροουρακίλη (5-FU) που είναι γνωστό ως ισχυρό βακτηριοτοξικό. Τα ανάλογα τοποθετήθηκαν σε στερεές καλλιέργειες ελάχιστου θρεπτικού μέσου εμβολιασμένες με *E. coli* K-12 για την παρατήρηση ζωνών αναστολής της κυτταρικής αύξησης (βλέπε §2.3 υλικών και μεθόδων). Δοκιμάστηκε εύρος ποσοτήτων 1-100μg αυτών των αναλόγων ανά τρυβλίο στερεής καλλιέργειας. Εκτός της μεθόδου για την παρατήρηση ζωνών αναστολής (Kirby-Bauer), χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος ελέγχου σταγόνων (spot test ή drop test) κατά την οποία το κυτταροτοξικό ανάλογο διαλύθηκε απευθείας στο στερεό θρεπτικό μέσο σε συγκεντρώσεις 1-10μM (βλέπε §2.3 υλικών και μεθόδων).

Στις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόσαμε δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης για τα στελέχη *E. coli* K-12 που ελέγχθηκαν (Keio collection JW3692/*adeP*-knockout, JW4025/*ghxP*-knockout, JW2482/*uraA*-knockout, με ή χωρίς εξωχρωμοσωμική έκφραση του UraA, GhxP ή AdeP φυσικού τύπου ή μεταλλαγμάτων του AdeP, ανά περίπτωση, από το πλασμίδιο pT7-5), παρά μόνο με την 5-FU (θετικό control) (για όλα τα στελέχη, εκτός από τα *uraA*-knockout που εμφανίζουν μικρή ευαισθησία στο φάρμακο) και με την 2-FA (για όλα τα στελέχη, με σαφώς μεγαλύτερη ευαισθησία για τα *adeP*-knockout στελέχη που εκφράζουν εξωγενώς τον AdeP φυσικού τύπου).

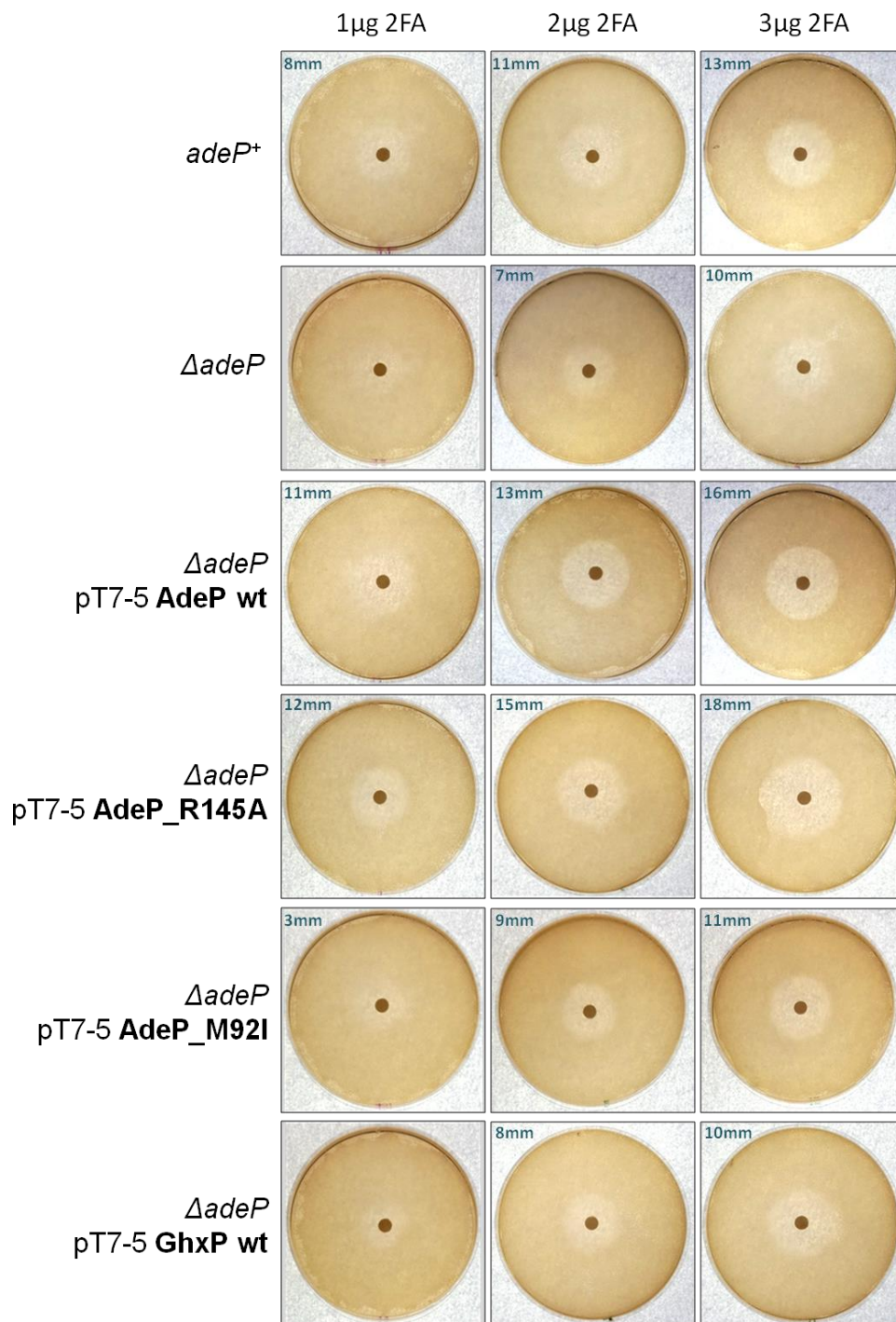
Στην ανάλυση αυτή εντάχθηκαν επιλεκτικά τα μετάλλαγμα του AdeP R145A και M92I ως αντιπροσωπευτικά, με το M92I ως μετάλλαγμα με μικρή συγγένεια για την 2-FA αλλά και για όλα τα άλλα ανάλογα που αναγνωρίζει ο AdeP και το R145A ως μετάλλαγμα με υψηλή συγγένεια για την 2-FA και διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με τον AdeP. Όταν το μετάλλαγμα R145A εκφράζεται εξωγενώς εμφανίζεται αυξημένη ευαισθησία στην 2-FA, ενώ το μετάλλαγμα M92I φαίνεται ανθεκτικότερο στην δράση της 2-φθοροαδενίνης από όταν εκφράζεται εξωγενώς ο AdeP φυσικού τύπου (βλέπε **Εικόνες 3.8 & 3.9**). Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν είναι ποσοτικά και τα αποτελέσματα που

έχουμε θα πρέπει να θεωρηθούν ως προκαταρκτικά καθώς αφορούν ορισμένα μόνο μεταλλάγματα του AdeP. Ωστόσο, από την βιοχημική ανάλυση το μετάλλαγμα R145A αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια την 2-φθοροαδενίνη ( $K_i \approx 25\mu\text{M}$ ) παρόμοια με τον AdeP ( $K_i \approx 35\mu\text{M}$ ), ενώ αντίθετα το M92I εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για την 2-φθοροαδενίνη ( $K_i \approx 110\mu\text{M}$ ).



**Εικόνα 3.8: Spot test στελεχών *E. coli* JW3692 ή JW2482 για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας από 5-FU και 2-FA.** Αριστερά, εμβόλια διαδοχικών συγκεντρώσεων κυττάρων *uarA*<sup>+</sup>/Δ*adeP* (JW3692) και *adeP*<sup>+</sup>/Δ*uraA* (JW2482) με ή χωρίς εξωγενή έκφραση των μεταφορέων UraA και AdeP μέσω του πλασμιδίου pT7-5, σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο και χωρίς την παρουσία 5-FU ή 2-FA. Δεξιά, παρατηρούμενη τοξικότητα σε εμβόλια διαδοχικών συγκεντρώσεων των ίδιων κυττάρων σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο παρουσία 2μM 5-FU ή 3μM 2-FA (φαίνονται οι αντίστοιχες δομές). Ο μεταφορέας UraA θεωρείται ο μόνος μεταφορέας της *E. coli* με υψηλή συγγένεια για την 5-FU<sup>149,179</sup> και η δράση της 5-FU δείχνεται ως θετικός μάρτυρας της τοξικότητας. Η τοξικότητα από 5-FU επάγεται όταν υπερεκφράζεται εξωγενώς ο UraA σε σχέση με την ενδογενή έκφραση του, ενώ απουσία του UraA παρατηρείται σχετική ανθεκτικότητα σε αυτή. Και για την περίπτωση της 2-FA εμφανίζεται μεγαλύτερη ευαισθησία όταν υπερεκφράζεται εξωγενώς ο υψηλής συγγένειας για την 2-FA AdeP ( $K_i \approx 35\mu\text{M}$ ) σε σχέση με την ενδογενή έκφραση του.





**Εικόνα 3.9: Ζώνες αναστολής της αύξησης στελεχών *E. coli* JW2482 ή JW3692 για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας από 2-FA.** Κύτταρα *adeP*<sup>+</sup>/*DuraA* (JW2482) και *uarA*<sup>+</sup>/ $\Delta$ *adeP* (JW3692) με ή χωρίς εξωγενή έκφραση των μεταφορέων AdeP, GhxP και των μεταλλαγμάτων AdeP\_R145A και AdeP\_M92I μέσω του πλασμιδίου pT7-5, καλλιεργήθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο παρουσία φίλτρων εμποτισμένων με 1μg, 2μg ή 3μg 2-FA. Οι παρατηρούμενες ζώνες αναστολής εκφράζουν την τοξικότητα της 2-FA στα διαφορετικά στελέχη και οι μετρήσεις των διαμέτρων τους αναγράφονται σε mm. Μεγαλύτερη ευαισθησία παρατηρείται όταν υπερεκφράζονται ο AdeP ή το μετάλλαγμα του R145A που έχουν υψηλή συγγένεια για την 2-FA ( $K_i \approx 35\mu\text{M}$  και  $K_i \approx 25\mu\text{M}$  αντίστοιχα) εμφανίζοντας μεγαλύτερες ζώνες αναστολής (11mm και 12mm αντίστοιχα στο 1μg), ενώ το μετάλλαγμα M92I και ο GhxP φαίνονται ανθεκτικότεροι στην δράση της 2-FA.

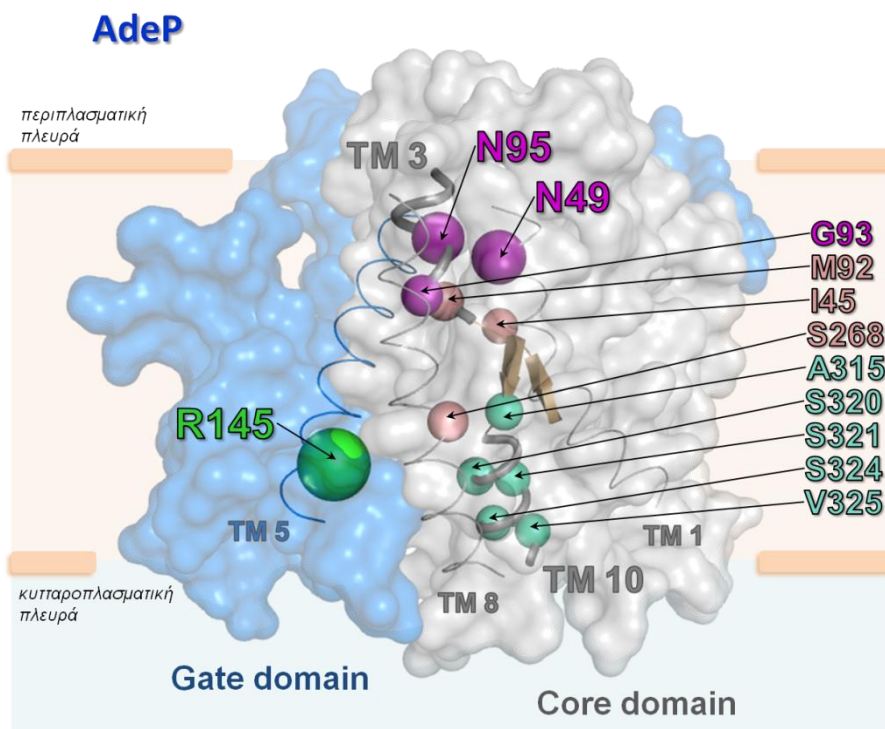


### 4.1. Η εξειδίκευση του AdeP ρυθμίζεται από θέσεις περιφερικά του κέντρου δέσμευσης

Εφόσον η ομάδα AzgA-like δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και ακόμα δεν υπάρχει κρυσταλλογραφικά γνωστή δομή ομολόγου της, οι βασικές πληροφορίες για την δομή προκύπτουν από την σύγκριση με τους χαμηλής ομολογίας μεταφορείς της NAT/COG2233<sup>66,179</sup>. Λόγω της χαμηλής ταυτότητας αλληλουχίας μεταξύ των δύο ομάδων (COG2252 και COG2233), στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν στοιχίσεις βασισμένες στην προβλεπόμενη τριτοταγή δομή των μελών τους<sup>196</sup>. Σε αυτές τις στοιχίσεις παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην τοπολογία των TMs του κέντρου δέσμευσης (ιδίως στα 3 και 10), αλλά και απομακρυσμένων περιοχών του gate domain (π.χ. TMs 12-14). Επιπρόσθετα, στην μοντελοποίηση του μυκητιακού μεταφορέα AzgA βάσει της δομής του UraA (COG2233), προέκυψαν διαφορές στην στοίχιση σημαντικών για την λειτουργία θέσεων (Asp339 στο κέντρο δέσμευσης αντί της αναντικατάστατης και απόλυτα συντηρημένης Asp342 του TM 8)<sup>198</sup>.

Για να αποφύγουμε τα προβλήματα στοίχισης, βασίσαμε την επιλογή των θέσεων-στόχων της μεταλλαξιγένεσης σε μοτίβα αλληλουχίας εξ ολοκλήρου από AzgA-like ομόλογα. Στα μοτίβα περιλαμβάνονται όλες οι απόλυτα συντηρημένες και σημαντικές για την λειτουργία θέσεις των AdeP και GhxP Asp267/271, Thr271/275 (TM 8), Glu318/322 (TM 10) αντίστοιχα<sup>196</sup>, ενώ περιφερικότερα ή σε πιο απομακρυσμένες θέσεις, εντοπίστηκαν διαφορετικού χαρακτήρα αμινοξέα μεταξύ των κλάδων AdeP/Q και GhxP/Q. Εφόσον από την μέχρι τώρα ανάλυση δεν είχαν συσχετιστεί θέσεις με την διακριτή εξειδίκευση των AdeP και GhxP, επικεντρωθήκαμε σε αυτές τις διαφορές αμινοξικού χαρακτήρα που από την σύγκριση των αλληλουχιών AncAdeP και AncGhxP στα μοτίβα, παρουσιάζουν ισχυρή συντήρηση εντός των φυλογενετικών κλάδων τους.

Η μεταλλαξιγένεση στον AdeP αποκάλυψε δώδεκα θέσεις της αλληλουχίας που οι σημειακές αντικαταστάσεις τους με τα αμινοξέα του GhxP, διατηρούν μεν την ενεργότητα αδενίνης, αλλά τροποποιούν με διαφορετικό τρόπο το προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου. Αυτές οι θέσεις βρίσκονται στην περιφέρεια του κέντρου δέσμευσης και οι αντικαταστάσεις που εισήχθησαν στα TM 1 και 3 (περιπλασματική πλευρά) μιμούνται το προφίλ εξειδίκευσης του GhxP, ενώ οι αντικαταστάσεις στο TM 10 και της Arg145 στο TM 5 (κυτταροπλασματική πλευρά) εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για υποστρώματα τόσο του AdeP όσο και του GhxP. (βλέπε **Εικόνα 4.1**). Όλα τα μεταλλάγματα διατηρούν την ενεργότητα για την αδενίνη και στην πλειοψηφία τους με ανεπηρέαστες τιμές  $K_M$ , υποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάζουν την βασική αρχιτεκτονική του κέντρου δέσμευσης για την μεταφορά, ενώ επιπρόσθετα, η καθολική έκφραση των μεταλλαγμάτων στην πλασματική μεμβράνη, υποδεικνύει ότι οι αλλαγές δεν επηρεάζουν την συνολική δομή του μεταφορέα.



**Εικόνα 4.1:** Θέσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης που ρυθμίζουν την εξειδίκευση στον AdeP. Μοντέλο της δομής του AdeP, με τις θέσεις των οποίων οι αντικαταστάσεις αλλάζουν το προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου να χρωματίζονται βάση της αλλαγής που επιφέρουν. Οι αντικαταστάσεις των θέσεων Asn49 (TM 1), Gly93, Asn95 (TM 3) που μεταβάλλουν την εξειδίκευση προς την αναγνώριση γουανίνης έναντι αδενίνης ( $\mu\omega\beta$ ) και της Arg145 του gate domain (TM 5) που επιτρέπει μετρήσιμη μεταφορά υποξανθίνης (πράσινο), παρουσίασαν τις πιο χαρακτηριστικές αποκλίσεις από το προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου και δείχνονται με σφαίρες μεγαλύτερου μεγέθους. Οι αντικαταστάσεις στις θέσεις Ile45 (TM 1), Met92 (TM 3) και Ser268 (TM 8) οδηγούν σε συνολική μείωση της αναγνώρισης των υποστρωμάτων (κόκκινο) και στις θέσεις Ala315, Ser320, Ser321, Ser324 και Val325 του TM 10 εμφανίζουν διευρυμένη συγγένεια τόσο για κανονικά όσο και μη υποστρώματα του AdeP (γαλάζιο).

#### 4.1.1. Αντικαταστάσεις στην κυτταροπλασματική πλευρά του AdeP επιτρέπουν την αναγνώριση και μεταφορά υποξανθίνης

Οι σημειακές αντικαταστάσεις των κυτταροπλασματικά προσανατολισμένων θέσεων στο TM 10 αλλά και της Arg145 στο TM 5, μετατρέπουν τον AdeP σε μεταφορέα διττής εξειδίκευσης με υψηλή συγγένεια για αδενίνη/υποξανθίνη ( $K_i < 50\mu\text{M}$ ). Για πρώτη φορά στους βακτηριακούς μεταφορείς της NAT/NCS2, παρουσιάζονται μεταλλάγματα απομακρυσμένων από το κέντρο δέσμευσης θέσεων που εμφανίζουν διεύρυνση του προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου<sup>66,179</sup>. Όσον αφορά τους ευκαρυωτικούς μεταφορείς της NAT/COG2233, τέτοιες θέσεις έχουν βρεθεί μόνο στον μυκητιακό μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού UapA (και όχι στον ομόλογο μεταφορέα AzgA) και έχουν χαρακτηριστεί ως μοριακά “φίλτρα” για την διαλογή των υποστρωμάτων (gating elements)<sup>10,11</sup>.

Σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα του AdeP, τα σημειακά μεταλλάγματα απομακρυσμένων από το κέντρο δέσμευσης θέσεων του UapA (TMs 11, 13 και 14 ή στον βρόγχο ελεύθερης διαμόρφωσης που ενώνει τα TMs 1 και 2)<sup>233-236</sup>, εμφανίζουν μικρή μόνο συγγένεια για μη κανονικά υποστρώματα. Για την επίτευξη ουσιαστικής διεύρυνσης στην εξειδίκευση του UapA και υψηλή συγγένεια ( $K_i < 100\mu\text{M}$ ) για μη κανονικά υποστρώματα, απαιτείται συνδυασμός απομακρυσμένων αντικαταστάσεων με αντικαταστάσεις στο κέντρο δέσμευσης (π.χ. UapA\_Q408E/R481G/T526M). Ακόμα και στην εξαίρεση του συνδυαστικού μεταλλάγματος UapA\_R481G/T526M που αναγνωρίζει ουρακίλη και περιλαμβάνει θέσεις εξ ολοκλήρου εκτός του κέντρου δέσμευσης, έχει δειχθεί ότι κατά τον διμερισμό του μεταφορέα η Arg481 εντοπίζεται στο κέντρο δέσμευσης του γειτονικού πρωτομερούς<sup>188</sup>.

Τα μεταλλάγματα του AdeP στο TM 10, εμφανίζουν διεύρυνση του προφίλ εξειδίκευσης με υψηλή συγγένεια για τις υποξανθίνη/6-μερκαπτοπουρίνη ( $K_i < 50\mu\text{M}$ ). Οι αντικαταστάσεις που εισήχθησαν αφορούν την κατάργηση πολικών αλλά και στερεοχημικών παρεμποδιστών (Ser/Val σε Ala). Οι αντικαταστάσεις συγκεντρώνονται τοπολογικά στην κυτταροπλασματική πλευρά του TM 10 και ίσως να χαλαρώνουν τον επιλεκτικό ρόλο μιας υποθετικής πύλης διαλογής, έτσι ώστε, μη κανονικά υποστρώματα να διαρρέουν προς το κυτταρόπλασμα<sup>10</sup>. Επιπρόσθετα, από πειράματα στον μελετημένο μεταφορέα XanQ (COG2233), θεωρείται ότι η κυτταροπλασματική πλευρά του TM 10 περιέχει θέσεις-ρυθμιστές για την λειτουργική ακεραιότητα της πορείας των μεταφερόμενων υποστρωμάτων και πιθανά εμπλέκεται σε αλλαγές της διαμόρφωσης για τον σκοπό αυτό<sup>192</sup>.

Εντυπωσιακή διεύρυνση του προφίλ εξειδίκευσης στον AdeP, ασκεί η σημειακή αντικατάσταση της Arg145 από Ala στο TM 5 του gate domain. Το μετάλλαγμα AdeP\_R145A επιτρέπει εκτός από υψηλής συγγένειας αναγνώριση της υποξανθίνης και την μεταφορά της με  $K_M$  συγκρίσιμο με τον GhxP ( $K_M < 5\mu\text{M}$ ). Ενώ υψηλή συγγένεια για μη κανονικά υποστρώματα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχει ήδη παρατηρηθεί στον UapA και στον AdeP από τα μεταλλάγματα του TM 10, είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται μετρήσιμη ενεργότητα μη κανονικού υποστρώματος στην NCS2 από μόνο μετάλλαγμα του gate domain. Η αντικατάσταση της Arg145 από Ala, δεν επηρεάζει την λειτουργία του κέντρου δέσμευσης καθώς διατηρεί την υψηλή ενεργότητα του φυσικού τύπου για την αδενίνη ( $K_M < 1\mu\text{M}$ ).

Σύμφωνα με τις γνωστές δομές της NAT/COG2233, τα αμινοξέα κατά μήκος του TM 5 (αλλά και στο TM 12), μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ core και gate domain κατά την μετατόπιση των υποστρωμάτων (ακόμα και στην αναγνώρισή τους)<sup>77,188</sup>. Η Arg145 προβλέπεται από την μοντελοποίηση της δομής να βρίσκεται σε ευέλικτη περιοχή του κυτταροπλασματικού άκρου του TM 5 στο gate domain (πιθανά και σε βρόγχο ελεύθερης διαμόρφωσης που συνδέει τα TMs 4 και 5, βλέπε Εικόνα 5.10/A συμπληρωματικής ενότητας) και είναι πιθανό να ευθύνεται ειδικά για την παρεμπόδιση

της μεταφοράς υποξανθίνης στον AdeP. Είναι ενδεικτικό ότι το διπλό μετάλλαγμα AdeP\_R145A/V146H επιφέρει τον ίδιο φαινότυπο με το μονό AdeP\_R145A, ενώ τα μεταλλάγματα AdeP\_M159I και N163G που βρίσκονται αντιδιαμετρικά της Arg145 προς την περιπλασματική πλευρά του TM 5, δεν παρουσίασαν αποκλίσεις από τον φυσικό τύπο. Υπάρχει η ανάγκη *in silico* μοντελοποίησης της δομής του AdeP και ανάλυσης μοριακής δυναμικής για το πως η Arg145 εμποδίζει την μεταφορά υποξανθίνης από τον AdeP.

#### **4.1.2. Οι αντικαταστάσεις των Asn49, Gly93 και Asn95 του AdeP προσομοιάζουν το προφίλ εξειδίκευσης του GhxP**

Σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα στο TM 10 και το AdeP\_R145A που μετατρέπουν τον AdeP σε μεταφορέα αδενίνης-υποξανθίνης, τα περιπλασματικά προσανατολισμένα μεταλλάγματα N49V (TM 1), G93S και N95T (TM 3) “μιμούνται” την εξειδίκευση του GhxP. Τα μεταλλάγματα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την γουανίνη και ταυτόχρονη απώλεια της ικανότητας αναγνώρισης αναλόγων αδενίνης, ενώ τα G93S και N95T αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια και την υποξανθίνη. Η απώλεια του διδοντικού δεσμού υδρογόνου που επιτρέπει η Asn95 όταν αντικατασταθεί με πολικό αμινοξύ παρόμοιου όγκου (Thr), φαίνεται να χαλαρώνει την επιλεκτικότητα για γουανίνη/υποξανθίνη και οδηγεί στην βέλτιστη αναγνώριση τους σε σχέση με τα υπόλοιπα μεταλλάγματα του AdeP.

Το γεγονός ότι οι αντικαταστάσεις των γειτονικών Asn49 και Asn95 (βλέπε Εικόνα 5.10/A συμπληρωματικής ενότητας) επιδρούν αρνητικά και στην κινητική αδενίνης (20-40 φορές υψηλότερο  $K_M$  από τον φυσικό τύπο), υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή τους στην δέσμευσή της. Είναι πιθανό οι Asn49 και Asn95 να βρίσκονται πιο κοντά στο κέντρο δέσμευσης από ότι είχε αρχικά υποπτευθεί. Παρόμοιο φαινότυπο εμφανίζει και το μετάλλαγμα AdeP\_G93S, διατηρώντας όμως την υψηλή ενεργότητα αδενίνης, η οποία όμως επηρεάζεται όταν συνδυαστεί με διπλανή αντικατάσταση στο διπλό μετάλλαγμα AdeP\_M92I/G93S, (6.5 φορές υψηλότερο  $K_M$  από τον φυσικό τύπο). Στον ομόλογο AzgA του *A. nidulans*, η αντίστοιχη θέση της Asn95 του AdeP διατηρείται ως Asn131 και μαζί με τις Asp339 (TM 8) και Glu394 (TM 10) (AdeP/Asn264 και Glu318), προτάθηκαν στην ανάλυση μοριακής δυναμικής να βρίσκονται εντός του κέντρου δέσμευσης (όπως και η Gly129, αντίστοιχη της Gly93 του AdeP) και μάλιστα να αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματά του αδενίνη/γουανίνη/υποξανθίνη<sup>198</sup>.

Το TM 3 περιλαμβάνει θέσεις που ρυθμίζουν την εξειδίκευση και βρίσκονται εντός του κέντρου δέσμευσης και στους μελετημένους μεταφορείς της NAT/COG2233<sup>77,193</sup>. Ειδικότερα στον μεταφορέα XanQ, η αντικατάσταση της Asn93 από Ser ή Ala επιτρέπει χαμηλής συγγένειας μεταφορά ουρικού (μη κανονικό υπόστρωμα) χωρίς να επηρεάζεται η ενεργότητα ξανθίνης<sup>237</sup>. Οι αντίστοιχες θέσεις στον μυκητιακό UapA Ser154 και στον μεταφορέα ουρικού της *E. coli* UacT Thr100, θεωρείται ότι σχετίζονται με την διπλή εξειδίκευση ξανθίνης/ουρικού<sup>238</sup>, ενώ πειραματικά το μετάλλαγμα UacT\_T100A οδηγεί

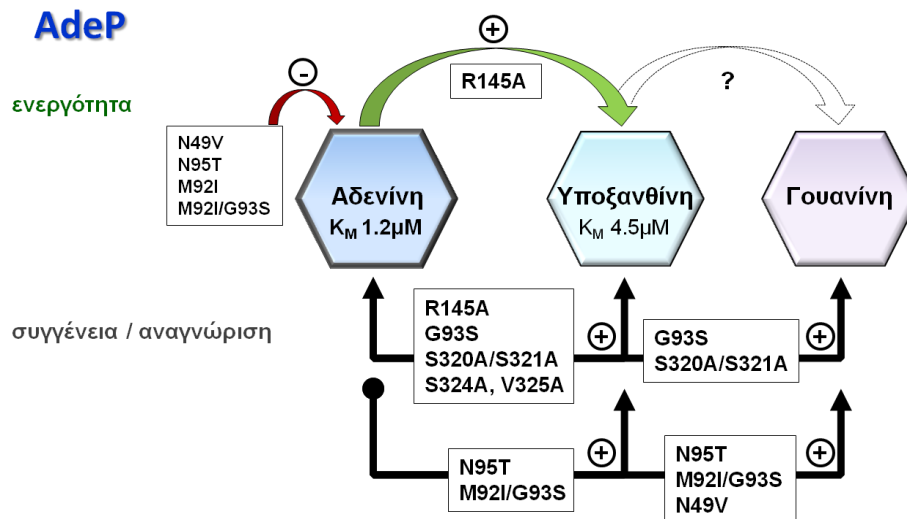
στην αναγνώριση ουρικού και ξανθίνης (μη κανονικό υπόστρωμα)<sup>196</sup>. Επιπρόσθετα, η αντικατάσταση της Phe73 από Ala στον μεταφορέα UraA, διευρύνει την εξειδίκευση επιτρέποντας υψηλής συγγένειας μεταφορά θυμίνης (μη κανονικό υπόστρωμα) και διατηρώντας παράλληλα την ενεργότητα ουρακίλης<sup>77,149</sup>.

Ωστόσο σε αντίθεση με τους μεταφορείς της NAT/COG2233, η τροποποίηση της εξειδίκευσης που επιφέρουν τα μεταλλάγματα του AdeP συνοδεύεται με ταυτόχρονη απώλεια της συγγένειας για τα φυσικά υποστρώματα (ανάλογα αδενίνης). Οι αντικαταστάσεις των Asn49, Gly93 και Asn95, δεν χαλαρώνουν απλά τον επιλεκτικό ρόλο τέτοιων πυλών επιτρέποντας την αναγνώριση και μη κανονικών υποστρωμάτων, αλλά λειτουργούν σαν μοριακά φίλτρα για την αναγνώριση γουανίνης (και υποξανθίνης) σε βάρος της αναγνώρισης αδενίνης. Είναι πιθανό και η περιπλασματική πλευρά του TM 3 να λειτουργεί σαν πύλη διαλογής των υποστρωμάτων όπως το TM 10 κυτταροπλασματικά, αλλά με διαφορετικό τρόπο. Οι Asn49, Gly93 και Asn95, αποτελούν τις μόνες θέσεις του AdeP που βρέθηκαν να σχετίζονται άμεσα με το διακριτό προφίλ εξειδίκευσης του AdeP σε σχέση με τον GhxP.

#### **4.1.3. Η Ser268 πιθανά εμπλέκεται στην σταθερότητα του core domain**

Το μετάλλαγμα AdeP\_S268A του TM 8 (όπως και τα I45S και M92I των TMs 1 και 3 αντίστοιχα) παρουσιάζει γενικευμένη απώλεια της συγγένειας για ανάλογα πουρινών, χωρίς όμως να επηρεάζεται η λειτουργία του κέντρου δέσμευσης (διατήρηση υψηλής ενεργότητας αδενίνης). Από τις γνωστές δομές της οικογένειας, η Ser268 πιθανά βρίσκεται σε περιοχή του κέντρου δέσμευσης (TMs 1, 3, 8 και 10) που γειτνιάζει με τα TMs 2, 4, 9 και 11 που το περιβάλλουν (βλέπε Εικόνα 5.10/A συμπληρωματικής ενότητας).

Αυτά τα δύο επίπεδα στο core domain έχειδειχθεί ότι σταθεροποιούνται μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων<sup>77</sup>, αλλά και ορισμένων πολικών αλληλεπιδράσεων που στον UarA εντοπίζονται γύρω από την Asp388<sup>194</sup> (αντίστοιχη της Asp298 του AdeP στο TM 9). Στην περίπτωση του μεταλλάγματος AdeP\_S268A, η κατάργηση της πολικής ομάδας (Ser) πιθανά διαταράσσει το δίκτυο πολικών αλληλεπιδράσεων με τις γειτονικές αναντικατάστατες για την λειτουργία Asp267, Thr271 (TM 8) ή της Asp298 (TM 9). Είναι χαρακτηριστικό ότι όλες οι αντικαταστάσεις που εισήχθησαν στην περιοχή των TMs 8 και 9 στον AdeP από παλαιότερη μεταλλαξιγένεση στο εργαστήριό μας (D267A/E/N, T271A/D/N, D298E/N), οδήγησαν σε απώλεια λειτουργίας ή χαμηλή συγγένεια για τους υψηλής συγγένειας προσδέτες του AdeP<sup>196</sup>. Παρόμοιο φαινότυπο με το μετάλλαγμα S268A παρουσιάζουν και οι αντικαταστάσεις των Ile45 και Met92, οι οποίες θα μπορούσαν επίσης να συμμετέχουν στην σταθερότητα του core domain μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.



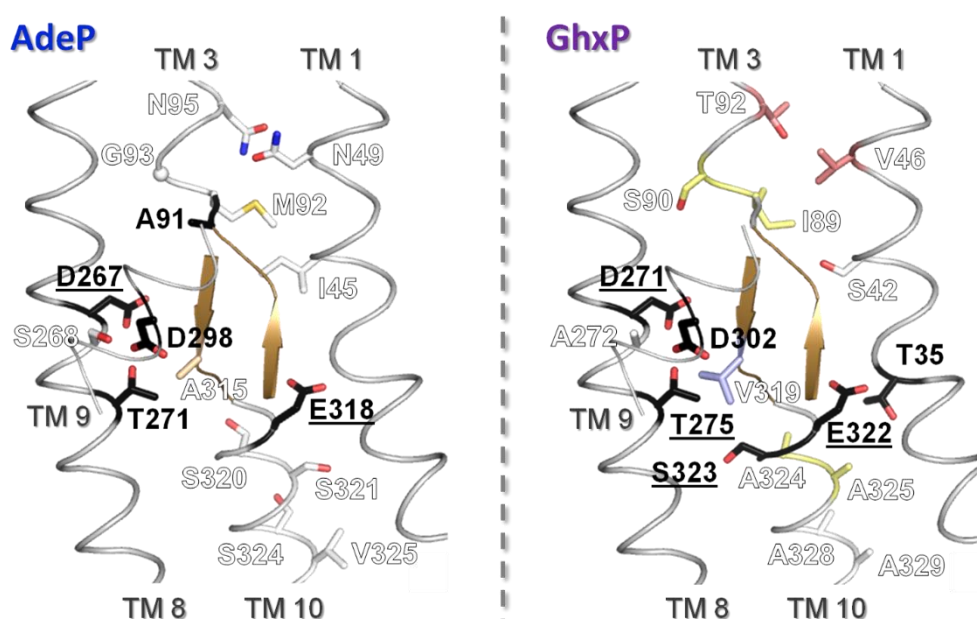
**Εικόνα 4.2:** Γράφημα περίληψης των μεταλλαγμάτων του AdeP που τροποποιούν την εξειδίκευση του φυσικού τύπου. Τα μεταλλάγματα χωρίζονται ανάλογα την αλλαγή που δημιουργούν στο προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου, τόσο στην ενεργότητα για τα βασικά υποστρώματα (επάνω) όσο και στην συγγένεια για αυτά και τα ανάλογά τους (κάτω).

#### 4.2. Οι αντικαταστάσεις περιφερικά του κέντρου δέσμευσης στον GhxP δεν τροποποιούν την εξειδίκευση

Ο GhxP παρουσιάζει ένα ιδιαίτερα αυστηρό προφίλ εξειδίκευσης από το οποίο δεν αποκλίνουν και τα μεταλλάγματα του. Ωστόσο, ορισμένα μεταλλάγματα στα TMs 1, 3 και 10 διαφοροποιούνται από τον φυσικό τύπο εμφανίζοντας απώλεια της ενεργότητας ενός ή και των δύο υποστρωμάτων του (υποξανθίνης/γουανίνης) (βλέπε **Εικόνα 4.3**). Η απώλεια ενεργότητας για τα βασικά υποστρώματα δεν επηρεάζει την αναγνώριση τους, υποδεικνύοντας παρεμπόδιση της μεταφοράς τους μετά το κέντρο δέσμευσης. Επιπρόσθετα, η διατήρηση της ενεργότητας ενός εκ των δύο υποστρωμάτων από διαφορετικά μεταλλάγματα, υποδεικνύει την συμμετοχή διαφορετικών θέσεων για την μεταφορά υποξανθίνης (Val319) ή γουανίνης (Ser90, Ala324/325) στον GhxP.

Συγκριτικά με τα αντίστοιχα μεταλλάγματα του AdeP που διατηρούν καθολικά την ενεργότητα για την αδενίνη, φαίνεται ότι οι σημαντικές για την λειτουργία θέσεις του κέντρου δέσμευσης διαφέρουν μεταξύ των AdeP και GhxP. Ήδη από τα αρχικά πειράματα του εργαστηρίου μας, είχαν βρεθεί θέσεις με αναντικατάστατο ρόλο για την λειτουργία του GhxP (Thr275 και Ser323 στα TMs 8 και 10), οι οποίες δεν βρέθηκαν να είναι απαραίτητες για την λειτουργία του AdeP (Thr271 και Ser319)<sup>196</sup>. Αυτή η ετερογένεια στον ρόλο των αμινοξέων περιμετρικά ή εντός του κέντρου δέσμευσης μεταξύ των AdeP και GhxP, μπορεί να ρυθμίζει και την μεταφορά των διακριτών υποστρωμάτων τους. Σε συνάφεια με τα παραπάνω, ήδη από την μοντελοποίηση του μυκητιακού ομόλογου ευρείας εξειδίκευσης AzgA υποστηρίζεται ότι η δέσμευση της υποξανθίνης και της γουανίνης επιτυγχάνεται με διαφορετικό προσανατολισμό από ότι η αδενίνη<sup>198</sup>.

Εκτός από την περιοχή του κέντρου δέσμευσης, διαφορές στην λειτουργία μεταξύ των μεταλλαγμάτων των δύο μεταφορέων εντοπίζονται και σε θέσεις απομακρυσμένες από το κέντρο δέσμευσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι στο υπόβαθρο του AdeP αρκεί η μεμονωμένη αντικατάσταση της Arg145 από Ala για να επιτευχθεί η μεταφορά υποξανθίνης, αλλά στον GhxP η αντίστοιχη αλλαγή Ala142 σε Arg (και στο διπλό μετάλλαγμα GhxP\_A142R/H143V) δεν επηρεάζει ούτε την ενεργότητα ούτε την αναγνώριση της υποξανθίνης. Μπορεί λοιπόν οι αντικαταστάσεις του AdeP περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης αλλά και σε πιο απομακρυσμένες θέσεις να έχουν σημαντική επίπτωση στο προφίλ εξειδίκευσης, αλλά στον ομόλογο GhxP φαίνεται ότι λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο.



**Εικόνα 4.3:** Σύγκριση της ευρύτερης περιοχής του κέντρου δέσμευσης μεταξύ AdeP και GhxP. *Αριστερά*, δείχνεται η τοπολογική σχέση των θέσεων εξειδίκευσης (λευκό) με τις σημαντικές για την λειτουργία θέσεις του AdeP στα TMs 1, 3, 8, 10 και η Asp298 του TM 9 που οριοθετούν το κέντρο δέσμευσης (μαύρο) και υπογραμμίζονται οι αναντικατάστατες για την λειτουργία θέσεις<sup>196</sup>. *Δεξιά*, δείχνονται οι αντίστοιχες θέσεις στον GhxP και με διαφορετικό χρώμα οι θέσεις όπου οι αντικαταστάσεις με αμινοξέα του AdeP οδήγησαν σε συνολική απώλεια της λειτουργίας (κόκκινο), απώλεια ενεργότητας για την γουανίνη (κίτρινο) και απώλεια ενεργότητας για την υποξανθίνη (μπλε).



### 4.3. Πιθανές υποδείξεις για την μοριακή βάση της διάκρισης εξειδίκευσης αδενίνης-γουανίνης θα μπορούσαν να προκύψουν από τον χαρακτηρισμό του μεταφορέα Q92VC3

Η από κοινού αναγνώριση αδενίνης και γουανίνης, φαίνεται ασύμβατη στους μεταφορείς AdeP και GhxP της *E. coli*, ωστόσο, ο AdeP μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με ομόλογα ευρύτερης εξειδίκευσης, ειδικά και για τις τρεις πουρίνες (αδενίνη, υποξανθίνη, γουανίνη). Σε σχέση με τον GhxP, ο AdeP εμφανίζει υψηλότερη συνολική ταυτότητα αλληλουχίας αλλά και υψηλότερη ομοιότητα στα ισχυρά μοτίβα που βρέθηκαν για την AzgA-like, με ομόλογα ευρύτερης εξειδίκευσης όπως ο Q92VC3 του *S. meliloti* (βλέπε Πίνακα 5.1 και Εικόνα 5.7 συμπληρωματικής ενότητας) ή ο PbuG του *B. subtilis*. Επιπρόσθετα, ο AdeP εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για την υποξανθίνη και την 6-μερκαπτοπουρίνη ( $K_i \approx 150\mu\text{M}$ ), η οποία μπορεί να μετατραπεί σε υψηλή συγγένεια ή ακόμα και ενεργότητα για την υποξανθίνη μόνο με σημειακές μεταλλάξεις. Ωστόσο, από κανένα μετάλλαγμα των μοτίβων δεν παρατηρήθηκε μεταφορά γουανίνης, ενώ υψηλή συγγένεια για αυτήν εμφάνισαν μόνο τα μεταλλάγματα των θέσεων Asp49/95 και Gly93.

Για την εντόπιση χαρακτηριστικών του προφίλ εξειδίκευσης, αλλά και διαφορών σε θέσεις της αλληλουχίας που πιθανά συνδέονται με την αναγνώριση αδενίνης-γουανίνης, μελετήθηκε εκτενώς στην *E. coli* ο μεταφορέας αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης Q92VC3 του *S. meliloti*. Η συμβίωση ψυχανθούς-ριζοβίου που περιλαμβάνει το *S. meliloti*, έχει μελετηθεί στο φυτό *Medicago truncatula*. Σε αυτό το συμβιωτικό σύστημα δημιουργούνται φυμάτια μη καθορισμένου τύπου (indeterminate nodules), όπου τα μολυσμένα φυτικά κύτταρα περιέχουν ριζόβια που υπόκεινται σε διαδοχικούς διπλασιασμούς του γονιδιώματος τους για να διαφοροποιηθούν σε αζωτοδεσμευτικά βακτήρια<sup>239-241</sup>. Η αυξημένη ανάγκη νουκλεοτιδίων για την διαδικασία, μπορεί να καλυφθεί εν μέρει από μεταφορείς της NAT/NCS2 όπως ο Q92VC3. Είναι ενδεικτικό ότι στον γενετικό τόπο όπου κωδικοποιείται ο Q92VC3 εντοπίζονται γονίδια του μεταβολισμού πουρινών, όπως της φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράσης αδενίνης/γουανίνης<sup>242</sup>, υποδεικνύοντας την συμμετοχή των μεταφερόμενων πουρινών από τον Q92VC3 στο μονοπάτι της περίσωσης.

Ο Q92VC3 είναι ο μόνος γνωστός έως σήμερα AzgA-like μεταφορέας ευρείας εξειδίκευσης από Πρωτεοβακτήρια. Εκτός από προκαταρκτικά πειράματα του εργαστηρίου μας (Μπότου, Διδακτορική Διατριβή, 2016), το προφίλ εξειδίκευσης του Q92VC3 χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Ο Q92VC3 εμφανίζει επικαλυπτόμενη εξειδίκευση με τους ομόλογους μεταφορείς AdeP και GhxP για υποκατεστημένα ανάλογα στην θέση 6 του πουρινικού δακτυλίου, αλλά εμφανίζει προτίμηση για ανάλογα αδενίνης/υποξανθίνης έναντι αναλόγων γουανίνης (6-SG, 1-MG, 8-AZG). Επιπρόσθετα, ο Q92VC3 βρέθηκε να αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια σημαντικούς ρυθμιστές της αλληλεπίδρασης φυτού-ριζοβίου για τον σχηματισμό φυματίων, όπως οι κυτοκινίνες τύπου ζεατίνης 6-βενζυλ- και 6-βενζοϋλ-αδενίνη<sup>200,243</sup>. Οι



κυτοκινίνες παράγονται από τα φυτικά κύτταρα ως απόκριση στους παράγοντες Nod των ριζοβίων για την έναρξη της προσβολής και την δημιουργία φυματίων, αλλά και από τα ίδια τα ριζόβια ή διαφορετικά βακτήρια της ριζόσφαιρας<sup>244-246</sup>.

Εκτός από τον χαρακτηρισμό του Q92VC3, το προφίλ εξειδίκευσης και η αλληλουχία του συγκρίθηκαν με τους συγγενικούς AdeP και GhxP καθώς και με τα μεταλλάγματά τους. Ως προς τις θέσεις αμινοξέων που μελετήθηκαν με μεταλλαξιγένεση στους AdeP και GhxP, ο Q92VC3 συντηρεί τα αμινοξέα του AdeP στα TMs 1 και 3, καθώς και την Arg145 (TM 5), αλλά εμφανίζει διαφορές στα TMs 8 και 10, χωρίς ωστόσο να μπορεί να προβλεφθεί κάποια ειδική συσχέτιση με το διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης του ή την ενεργότητα για την γουανίνη. Ο συνδυασμός των θέσεων που ρυθμίζουν την εξειδίκευση στον Q92VC3 πιθανόν να λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο από τα ομόλογα της *E. coli*.

### **4.3. Τα γ-Πρωτεοβακτήρια του μικροβιώματος του λεπτού εντέρου συντηρούν AzgA-like ομόλογα διαφορετικών εξειδικεύσεων για τις πουρίνες αδενίνη-γουανίνη**

Από την φυλογενετική ανάλυση στην ομάδα AzgA-like (COG2252), παρατηρήθηκε ότι συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων συντηρούν στο γονιδίωμά τους πολλαπλά ομόλογα AzgA-like μεταφορέων. Είναι ενδεικτικό ότι από το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 κωδικοποιούνται δύο ζεύγη παραλόγων (τέσσερα αντίγραφα), τα AdeP/AdeQ και GhxP/GhxQ, με τους AdeQ και GhxQ να εμφανίζουν σποραδική κατανομή εντός των γενών *Escherichia/Shigella* (βλέπε Εικόνα 5.4 συμπληρωματικής ενότητας). Ειδικότερα, πολλαπλά AzgA-like ομόλογα παρατηρούνται σε γονιδιώματα βακτηρίων που αποικίζουν το λεπτό έντερο μεταζώων όπως της οικογένειας γ-Πρωτεοβακτηρίων Enterobacteriaceae (χαρακτηριστική αύξηση στα γένη *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Shigella* και *Escherichia*), αλλά και των οικογενειών Enterococcaceae, Lactobacillaceae και Clostridiaceae (βλέπε **Εικόνα 4.4**). Αντίθετα, φυλογενετικές ομάδες που εντοπίζονται κατά βάση σε διαφορετικούς οικολογικούς θώκους, όπως τα α-, δ- και ε-Πρωτεοβακτηρία ή ακόμα και οι Bacteroidetes που αποικίζουν το φτωχότερο σε θρεπτικά παχύ έντερο<sup>247</sup>, συντηρούν κατά βάση μονά αντίγραφα γονιδίων για AzgA-like ομόλογα (βλέπε Εικόνα 4.4).

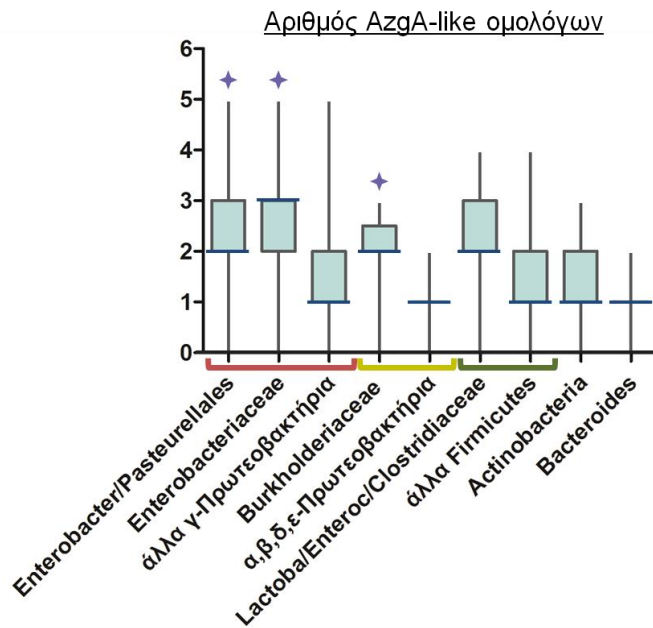
Ειδικότερα για τα γ-Πρωτεοβακτήρια, η παρουσία πολλαπλών AzgA-like ομολόγων επεκτείνεται και σε επίπεδο τάξης. Οι φυλογενετικά συγγενικές τάξεις συμβιωτικών ή δυνητικά παθογόνων Enterobacteriales και Pasteurellales<sup>248</sup>, συντηρούν περισσότερα ομόλογα συγκριτικά με τα υπόλοιπα γ-Πρωτεοβακτήρια (βλέπε Εικόνα 4.4). Βασιζόμενοι στους λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς AdeP και GhxP της *E. coli*, συσχέτισαμε την ύπαρξη πολλαπλών AzgA-like ομολόγων σε αυτές τις τάξεις (αλλά και στο γένος ευκαιριακών παθογόνων *Aeromonas*<sup>249,250</sup>) με την εξέλιξη διαφορετικών μεταφορέων για την πρόσληψη αδενίνης ή γουανίνης/(υποξανθίνης). Επιπρόσθετα, ομόλογα του GhxP συντηρούνται στην οικογένεια Burkholderiaceae, που εντοπίζονται συχνά στο έντερο μεταζώων<sup>251,252</sup> και αποτελεί την μόνη οικογένεια β-Πρωτεοβακτηρίων με περισσότερα από δύο AzgA-like ομόλογα (βλέπε Εικόνα 4.4).

Η ύπαρξη πολλαπλών AzgA-like ομολόγων μπορεί να σχετίζεται με την συμβίωση στο έντερο των ανώτερων οργανισμών και η εξέλιξη διακριτών εξειδικεύσεων αδενίνης-γουανίνης πιθανά συνιστά ειδική προσαρμογή των γ-Πρωτεοβακτηρίων στο περιβάλλον του. Το περιβάλλον του εντέρου εξασφαλίζει σταθερές συνθήκες με συνεχή παρουσία θρεπτικών συστατικών και αποτελεί ένα από τους πλέον ευνοϊκούς οικολογικούς θώκους για γονιδιακή επέκταση και η απουσία εξελικτικής πίεσης επιτρέπει την εμφάνιση, διατήρηση και εξέλιξη νέων γονιδίων με πλεονεκτικές εξειδικεύσεις. Έναν βασικό τρόπο γονιδιακής επέκτασης αποτελεί ο γονιδιακός διπλασιασμός και στην περίπτωση των ορθόλογων AdeP και GhxP, η προγονική πιθανά διευρυμένη εξειδίκευση μοιράστηκε στην μεταφορά αδενίνης ή γουανίνης (subfunctionalization)<sup>253</sup> (βλέπε Εικόνα 4.5).

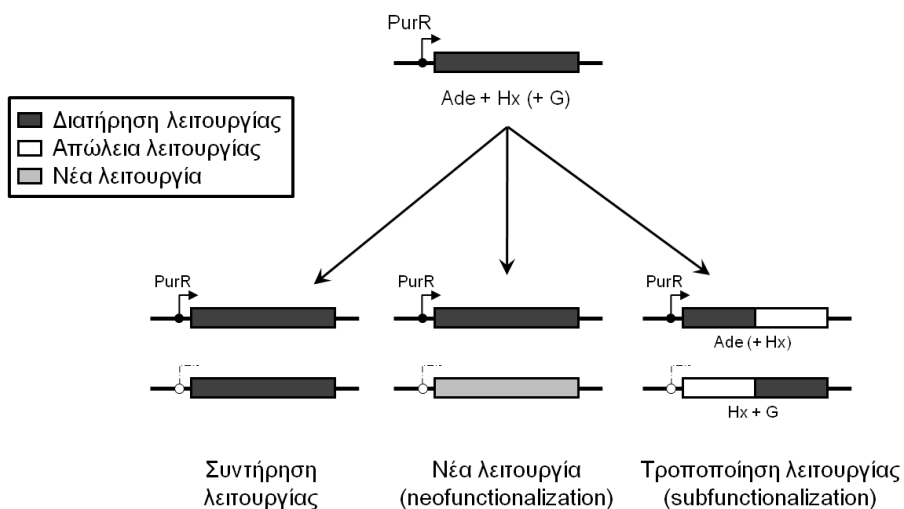
Ίσως η διάκριση των εξειδικεύσεων να σχετίζεται με την ρύθμιση από τον μεταγραφικό παράγοντα PurR (PurR regulon)<sup>32</sup>. Στα Firmicutes όπου δεν συντηρείται η διάκριση αδενίνης-γουανίνης, η ενεργοποίηση του PurR εξαρτάται από τα επίπεδα ενός κεντρικού μορίου για τον μεταβολισμό των πουρινών του PRPP (5-phosphoribosyl-1-rygrophosphate)<sup>254,255</sup>. Αντίθετα, στα συγγενικά γένη *Escherichia* και *Salmonella* που συντηρούν τους AdeP και GhxP, η μεταγραφική καταστολή από τον PurR γίνεται απευθείας από το μεταφερόμενο υπόστρωμα της υποξανθίνης (ή της γουανίνης)<sup>57,256,257</sup>. Είναι ενδιαφέρον ότι ο GhxP βρίσκεται εκτός του ρεγουλόνιου<sup>32</sup> και ο PurR καταστέλλει τον μεταφορέα AdeP με απαραίτητους συγκαταστολείς τα βασικά υποστρώματα του GhxP.

Η δέσμευση των πουρινών από το εξωκυττάριο περιβάλλον αποτελεί ουσιαστικό βήμα για το μονοπάτι της περίσωσης και την ενσωμάτωση τους στα IMP, AMP και GMP. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αδενίνης οδηγεί σε αναστολή της αύξησης της *E. coli* (όπως και στα γένη *Salmonella* και *Enterobacter*)<sup>258-260</sup> λόγω διατάραξης στην ισορροπία μεταξύ των παραγόμενων AMP και GMP<sup>259,261</sup>. Η αφθονία θρεπτικών στο λεπτό έντερο των μεταζώων, που αποτελεί οικολογικό θώκο της *E. coli* και κατ' επέκταση της οικογένειας Enterobacteriaceae, είναι πιθανό να οδηγεί σε συσσώρευση της αδενίνης από την λειτουργία του AdeP. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι η ρύθμιση που επιφέρει ο PurR, επιτρέπει την εκμετάλλευση των βασικών αναγκών για το μονοπάτι της περίσωσης, διατηρώντας όμως πάντα την ισορροπία μεταξύ των παραγόμενων νουκλεοτιδίων.

Τέλος, η διττή ενεργότητα γουανίνης/υποξανθίνης που παρουσιάζει ο GhxP φαίνεται να είναι θεμελιώδους σημασίας αφού επιτρέπει την παραγωγή του GMP μέσω της μεταφερόμενης γουανίνης και του IMP μέσω της υποξανθίνης. Μάλιστα, η ιδιαιτερότητα της υποξανθίνης έγκειται στην δυνατότητα του IMP να μετατρέπεται αμφίδρομα σε AMP ή GMP ανάλογα με τις ανάγκες σε dNTPs<sup>262</sup>, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην διατήρηση της ισορροπίας των παραγόμενων νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η λειτουργία του GhxP εξασφαλίζει μέσω του ενεργού συμπλόκου των υποστρωμάτων του με τον PurR, την διασταυρούμενη ρύθμιση (έλεγχος μιας μεταβολικής οδού από το προϊόν μιας συγγενικής οδού) της *de novo* σύνθεσης πουρινών αλλά αποτρέπει και την συσσώρευση αδενίνης από τον AdeP<sup>257,263</sup>.



**Εικόνα 4.4: Αριθμός AzgA-like ομολόγων από γονιδιώματα ειδών χαρακτηριστικών ομάδων βακτηρίων.** Για την δημιουργία του box plot εντοπίστηκαν AzgA-like ομόλογα από 240 γονιδιώματα/είδη γ-Πρωτεοβακτηρίων (κόκκινο, 103 από τις τάξεις Pasteurellales και Enterobacteriales - στην οποία περιλαμβάνονται και 37 από την οικογένεια Enterobacteriaceae - και 137 από τις άλλες τάξεις), 148 είδη α, β, δ, ε-Πρωτεοβακτηρίων (κίτρινο, 112 και 36 από την οικογένεια Burkholderiaceae), 283 είδη Firmicutes (πράσινο, 221 και 62 από τις οικογένειες Lactobacillaceae Enterococcaceae και Clostridiaceae), 193 είδη Ακτινοβακτηρίων και 18 είδη Bacteroides. Σημειώνονται οι ομάδες που συντηρούν ομόλογα του GhxP (αστερίσκοι). Οι μπλε γραμμές δείχνουν την διάμεση τιμή κάθε ομάδας.



**Εικόνα 4.5: Υπόθεση για την εξέλιξη των διακριτών εξειδικεύσεων μεταξύ AdeP και GhxP μετά από γονιδιακό διπλασιασμό.** Διπλασιασμός με διατήρηση του νέου αντιγράφου<sup>264</sup>. Η εξέλιξη των ορθόλογων μεταφορέων AdeP και GhxP είναι πιθανό να προέκυψε από την τροποποίηση της λειτουργίας (subfunctionalization) ενός προγονικού γονιδίου μεταφορέα διευρυμένης εξειδίκευσης αδενίνης/υποξανθίνη/γουανίνης. Η διαφορετική εξειδίκευση των AdeP και GhxP εξελίχθηκε παράλληλα μετά τον διπλασιασμό του προγονικού γονιδίου εκτός της ρύθμισης από τον PurR. Από την μεταλλαξιγένεση του AdeP, παρατηρήθηκε ότι η μηδενική ενεργότητα για την υποξανθίνη αντιστρέφεται με σημειακή μεταλλαγή, υποδεικνύοντας εξελικτικά πρόσφατη απώλεια της ικανότητας μεταφοράς της από τον AdeP.

#### 4.4. Προοπτική των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της διατριβής διευρύνουν τις γνώσεις μας για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας των μεταφορέων πουρινών της AzgA-like και φανερώνουν ότι αντικαταστάσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης αλλά και σε πιο απομακρυσμένες θέσεις, μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στο προφίλ εξειδίκευσης. Τέτοιες θέσεις εντοπίστηκαν στον AdeP, ενισχύοντας τα δεδομένα για την ύπαρξη δομικών περιοχών αλλά και ειδικών μοριακών φίλτρων διαλογής των υποστρωμάτων κατά την πορεία μεταφοράς τους. Η πλαστικότητα του μεταφορέα AdeP επιτρέπει ενδελεχή μεταλλαξιγένεση και αποτελεσματική μελέτη των μηχανισμών που ορίζουν την εξειδίκευση του, ακόμα και απουσία κρυσταλλογραφικά γνωστής δομής του.

Ενώ επιτεύχθηκε η μεταφορά υποξανθίνης μέσω σημειακής μεταλλαγής από τον AdeP, η μεταφορά της γουανίνης πιθανά απαιτεί συνδυαστικά μεταλλάγματα. Τα μεταλλάγματα όμως του AdeP που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια γουανίνης, παράλληλα εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για την αδενίνη (π.χ. N49V, M92I/G93S, N95T). Σε ένα συνδυαστικό μετάλλαγμα θα πρέπει να εισαχθεί και η αντικατάσταση R145A, έτσι ώστε, σε περίπτωση απώλειας της ενεργότητας αδενίνης να εξασφαλιστεί η λειτουργία του μεταλλάγματος με την ενεργότητα στην υποξανθίνη. Τέλος, για να διερευνηθεί τοπολογικά ο ρόλος συγκεκριμένων θέσεων που επηρεάζουν την εξειδίκευση (π.χ. Arg145, Asn49/95), είναι απαραίτητο να ενταχθούν στην μελέτη *in silico* αναλύσεις μοριακής δυναμικής σε δομικά μοντέλα των AdeP και GhxP.

Βασικό χαρακτηριστικό της AzgA-like/COG2252 που αναδεικνύει την βιολογική σημασία των ομολόγων της, αποτελεί η υψηλή συγγένεια για αντιμεταβολίτες<sup>165,186,196</sup>. Οι αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες στην ιατρική πρακτική ως αντικαρκινικά ή ανοσοκατασταλτικά φάρμακα<sup>162</sup>. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά μπορούν να λειτουργήσουν και ως βακτηριοτοξικοί παράγοντες, με βασικό χαρακτηριστικό τους τις μειωμένες παρενέργειες στον ξενιστή. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να επιτευχθεί με την ειδική στόχευση των AzgA-like μεταφορέων, ομόλογα των οποίων δεν υπάρχουν στον άνθρωπο. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση και ενώ η τοξικότητα ορισμένων αντιμεταβολιτών στην *E. coli* είχε ήδη συσχετιστεί με την λειτουργία του GhxP<sup>165</sup>, η 2-φθοροαδενίνη είναι το πρώτο πουρινικό τοξικό ανάλογο που σχετίζεται με την λειτουργία του AdeP.

Τα πειράματα αναστολής της αύξησης της *E. coli* K-12 από αντιμεταβολίτες, έδειξαν την επαγόμενη από τον AdeP ευαισθησία στην 2-φθοροαδενίνη. Για την τιτλοδότηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) 2-φθοροαδενίνης στην *E. coli*<sup>159,265</sup>, θα πρέπει να ενταχθεί στην μελέτη η μικρομέθοδος αραιώσεων υγρών καλλιιεργειών (broth microdilution) με την χρήση μικροπλακιδίων (microtiter plates)<sup>266</sup>. Επιπρόσθετα, για την διερεύνηση της τοξικότητας της 2-φθοροαδενίνης σε άλλους δυνητικά παθογόνους οργανισμούς, μπορούν στην ανάλυση να ενταχθούν στελέχη των γ-Πρωτεοβακτηρίων

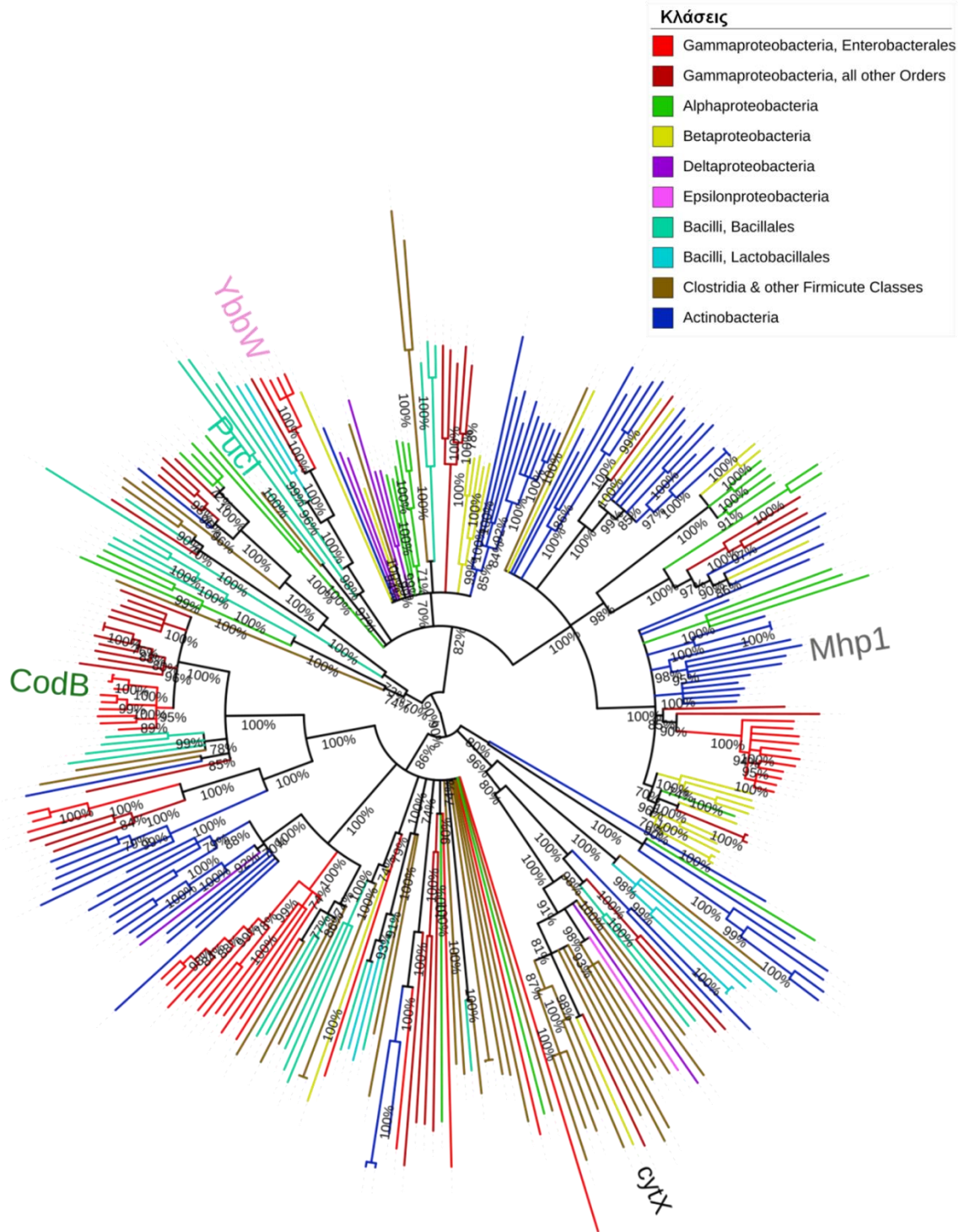
*Aeromonas veronii* και *Acinetobacter calcoaceticus* (τάξη Enterobacterales) που ήδη χρησιμοποιούνται πειραματικά στο εργαστήριό μας (Λάζου & Φριλίγγος, αδημοσίευτα δεδομένα).

Οι αντιμεταβολίτες 6-μερκαπτοπουρίνη και 6-θειογουανίνη (θειοπουρίνες) έχουν βασική εφαρμογή στην αντιμετώπιση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (IBD)<sup>164,267</sup>. Αν και ο μηχανισμός δράσης τους θεωρούταν γνωστός, πρόσφατα παρατηρήθηκε σε μοντέλο ποντικού για την μελέτη της κολίτιδας ότι ειδικά η 6-θειογουανίνη (και όχι η 6-μερκαπτοπουρίνη) μεταβολίζεται στην ενεργή μορφή της από τα βακτήρια του εντέρου, με την τοπική μετατροπή της να σχετίζεται με ταχύτερη μείωση της φλεγμονώδους απόκρισης<sup>268</sup>. Αυτή η ενδιαφέρουσα παρατήρηση έρχεται σε αντιδιαστολή με την συνήθη υπόθεση ότι ο μεταβολισμός του ξενιστή ανταγωνίζεται για τα προφάρμακα τον μεταβολισμό των μικροβίων<sup>269</sup> και δείχνει την κρισιμότητα της συνεκτίμησης του μικροβιώματος στην αποτελεσματικότερη διάθεση των φαρμάκων.

Ο GhxP είναι ο κύριος μεταφορέας θειοπουρινών και σε αντίθεση με βακτηριακούς μεταφορείς διευρυμένης εξειδίκευσης (π.χ. Q92VC3) εμφανίζει υψηλή συγγένεια για την 6-θειογουανίνη. Από την φυλογενετική ανάλυση δείξαμε ότι ο GhxP συντηρείται καθολικά στα εντεροβακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae, η οποία συνδέεται ισχυρά με την αιτιοπαθογένεια των IBD<sup>270-273</sup> αλλά και με την δυσβίωση του εντέρου κατά την πορεία της νόσου<sup>274</sup>. Λόγω ετερογένειας του εντερικού μικροβιώματος των ασθενών<sup>275</sup>, η συνεκτίμηση των μικροβιακών πληθυσμών που προσλαμβάνουν με υψηλή συγγένεια την 6-θειογουανίνη (μέσω του GhxP και των ομολόγων του) ίσως εξασφαλίζει την αποτελεσματική διάθεση του φαρμάκου και αποτελεί ένα βήμα προς τον ορθολογικό σχεδιασμό του θεραπευτικού σχήματος. Ο σχεδιασμός μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή ασθενών που θα ωφεληθούν περισσότερο από την θεραπεία παρά τον κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών από την χρήση της, αλλά και στην δημιουργία νέων φαρμακοτεχνικών μορφών 6-θειογουανίνης με σκοπό την παράκαμψη μέρους της γαστρεντερικής οδού για την τοπική αποδέσμευση του φαρμάκου<sup>276</sup>.

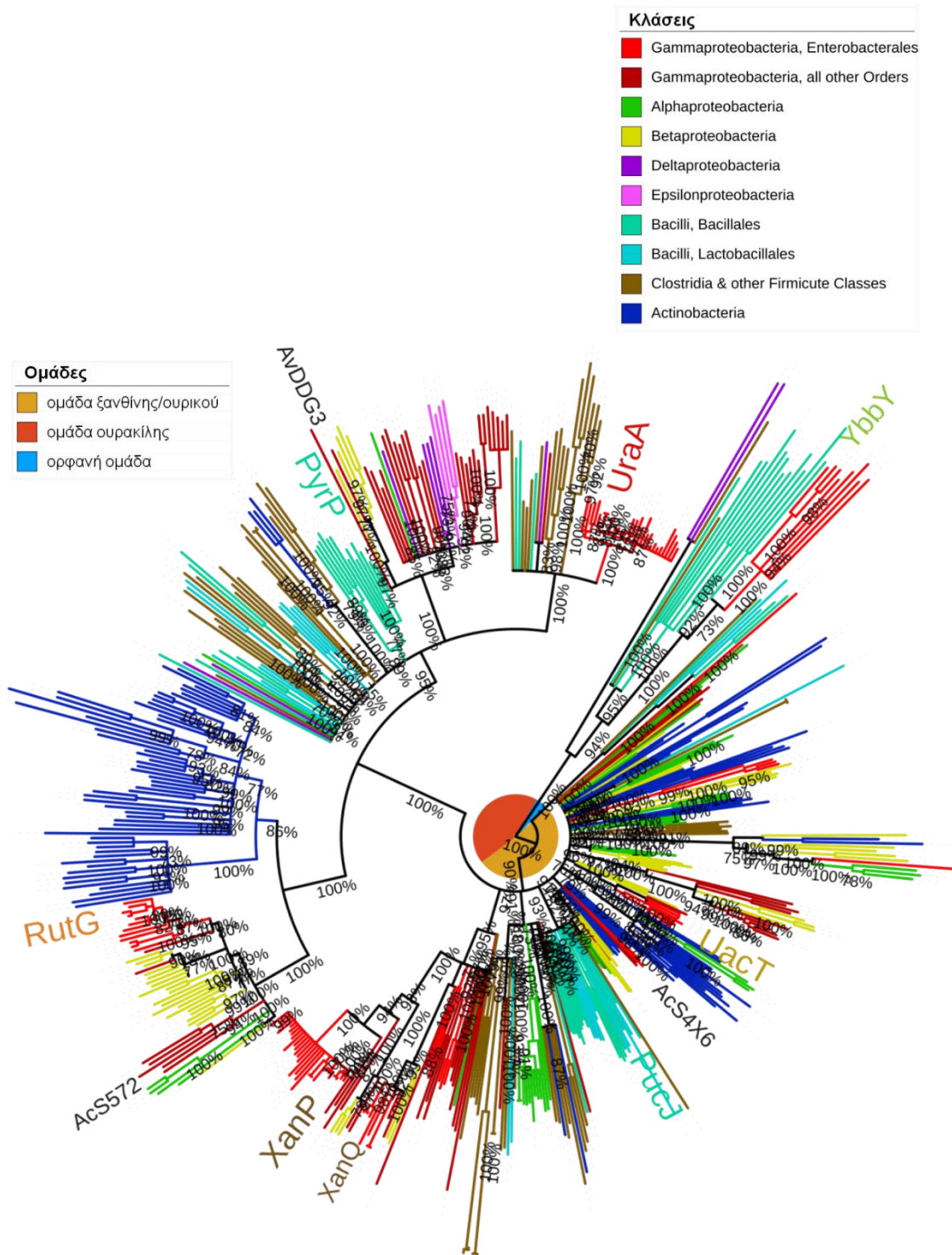


## 5. Συμπληρωματική ενότητα



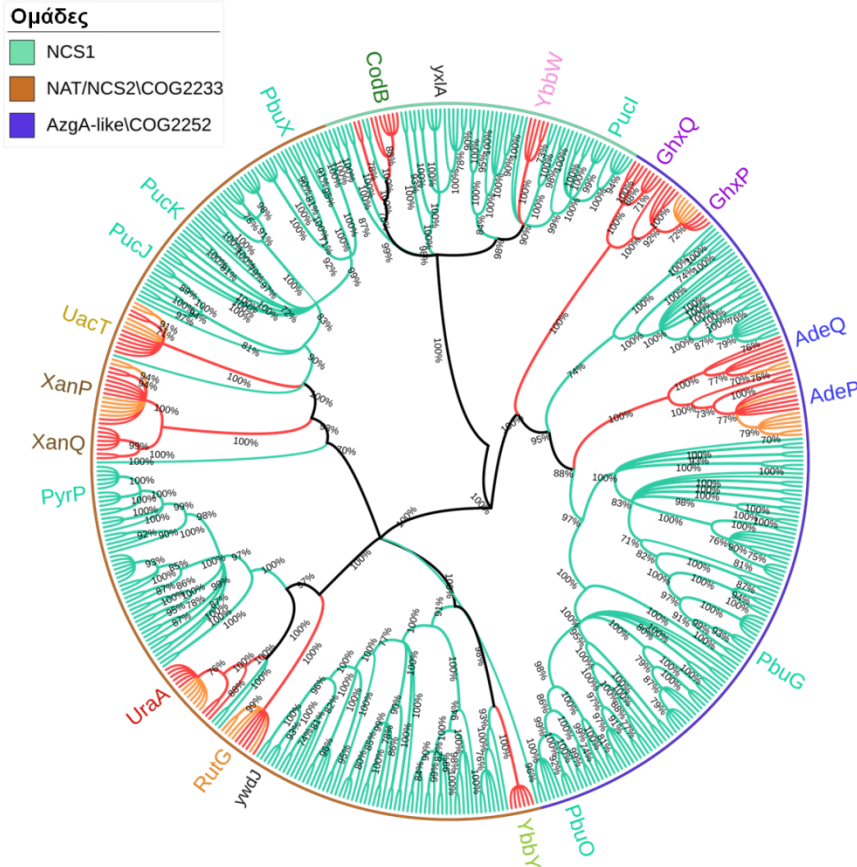
**Εικόνα 5.1:** Φυλογενετικό δέντρο των βακτηριακών ομολόγων της οικογένειας NCS1. Το δέντρο κατασκευάστηκε με την μέθοδο NJ, και περιλαμβάνει 301 ομόλογα από 185 γένη Πρωτεοβακτηρίων, Firmicutes και Ακτινοβακτηρίων. Οι κλάδοι χρωματίζονται βάση της κλάσης που ανήκουν και επισημαίνονται στις άκρες τους οι γνωστοί μεταφορείς και η μη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη *cytX*<sup>277</sup>. Διακλαδώσεις με bootstrap value <70% δεν εμφανίζονται.



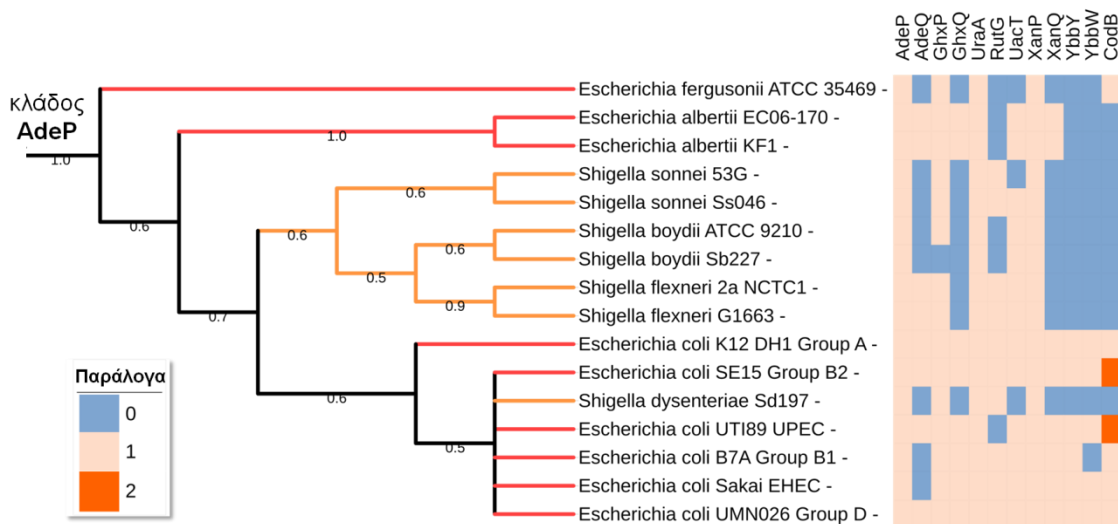


**Εικόνα 5.2:** Φυλογενετικό δέντρο των βακτηριακών ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2. Το δέντρο κατασκευάστηκε με την μέθοδο NJ, και περιλαμβάνει 566 ομόλογα από 276 γένη Πρωτεοβακτηρίων, Firmicutes και Ακτινοβακτηρίων. Οι κλάδοι χρωματίζονται βάση της κλάσης που ανήκουν και επισημαίνονται στις άκρες τους οι γνωστοί μεταφορείς και ο μεταφορέας AcS4X6 του *A. calcoaceticus* (Λάζου & Φριλίγγος, αδημοσίευτα δεδομένα). Διακλαδώσεις με bootstrap value <70% δεν εμφανίζονται.

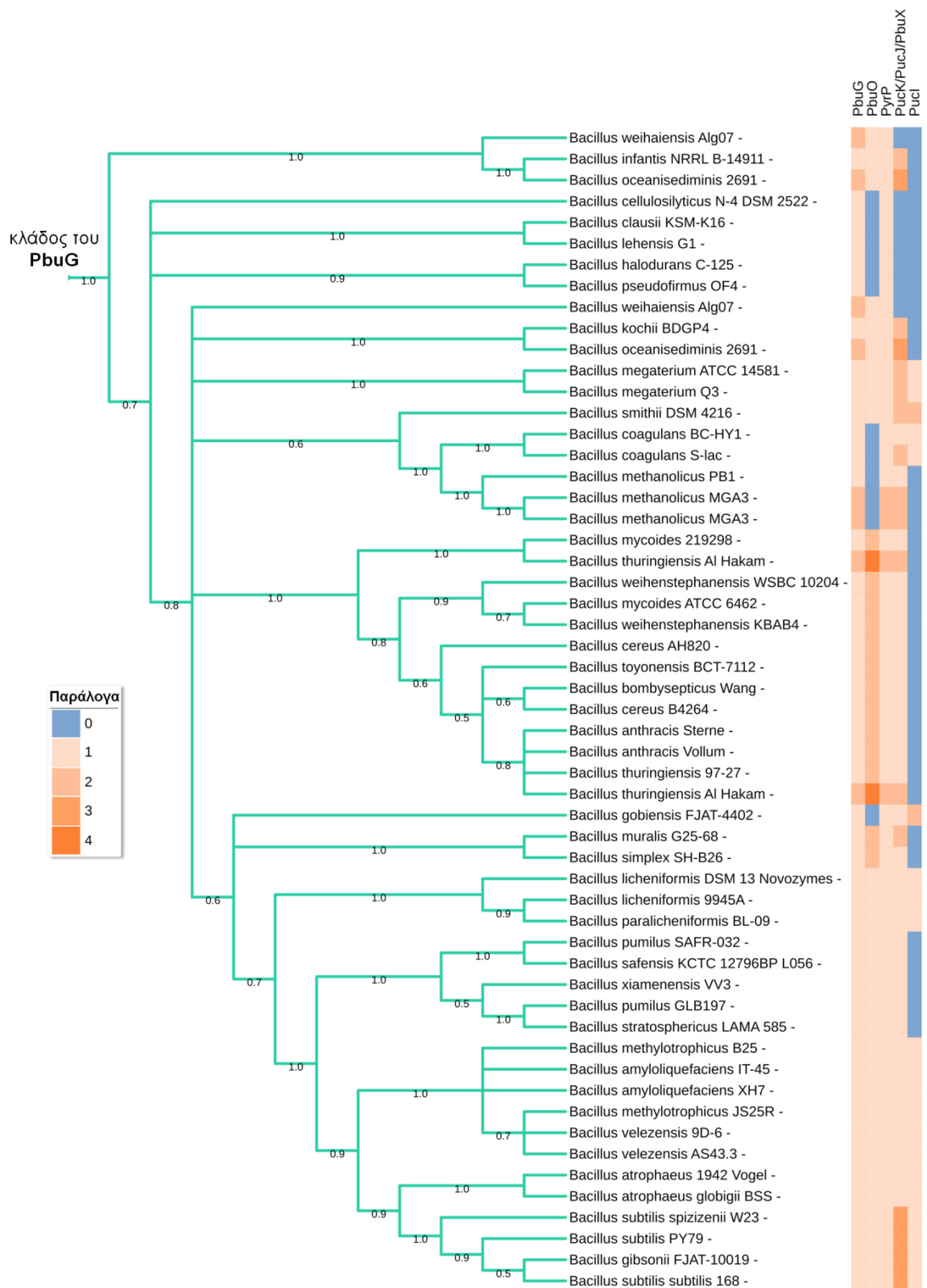




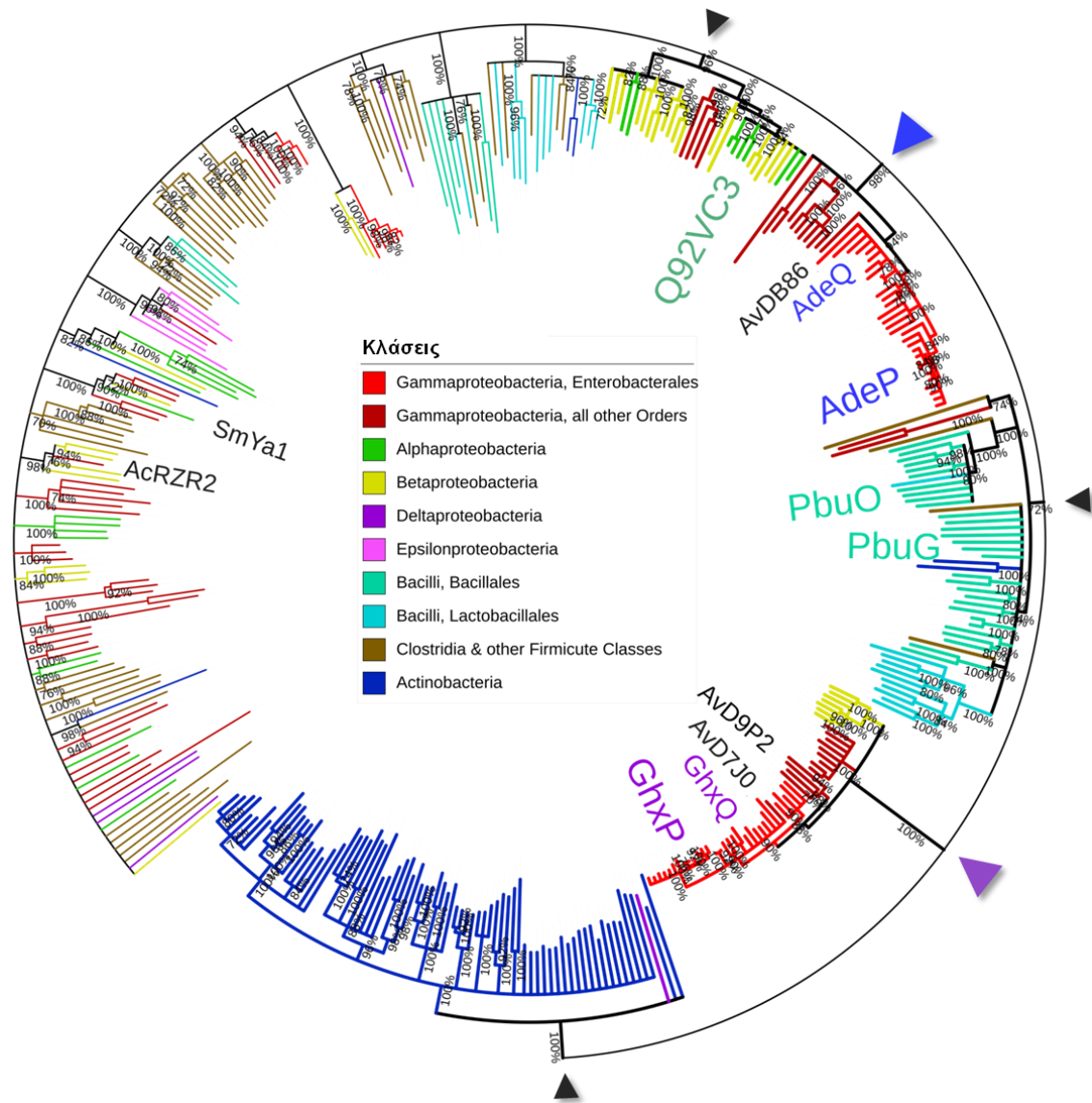
**Εικόνα 5.3: Κατανομή των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων των οικογενειών NCS1, NAT/NCS2 και AzgA-like στα γένη *Escherichia/Shigella* και *Bacillus*.** Φυλογενετικό δέντρο με την μέθοδο NJ των γενών *Escherichia* (κόκκινο), *Shigella* (πορτοκαλί) και *Bacillus* (πράσινο). Στις άκρες των κλάδων επισημαίνονται οι γνωστοί μεταφορείς και οι μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες yxiA και ywdJ<sup>278,279</sup> των στελεχών *B. subtilis* subsp *subtilis* 168 και *E. coli* K-12. Διακλαδώσεις με bootstrap value <70% δεν εμφανίζονται.



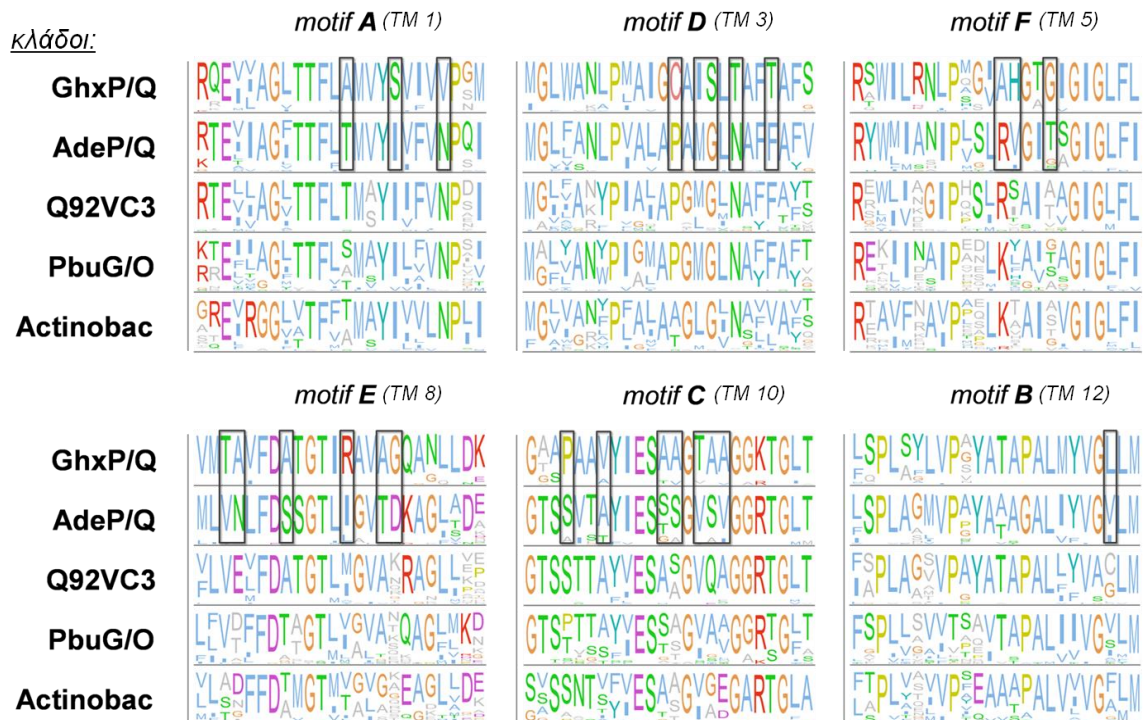
**Εικόνα 5.4: Κλάδος των ομολόγων του μεταφορέα AdeP από τα γένη *Escherichia* και *Shigella*.** Σε χρωματικό πίνακα δείχνεται ο αριθμός παραλόγων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων των οικογενειών NCS1, NAT/NCS2 και AzgA-like που εμφανίζονται σε κάθε στέλεχος.



**Εικόνα 5.5:** Κλάδος των ομολόγων του μεταφορέα PbuG στο γένος *Bacillus*. Σε χρωματικό πίνακα δείχνεται ο αριθμός παραλόγων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων των οικογενειών NCS1, NAT/NCS2 και AzgA-like που εμφανίζονται σε κάθε στέλεχος.



**Εικόνα 5.6:** Φυλογενετικό δέντρο των βακτηριακών ομολόγων της οικογένειας *AzgA-like*. Το κατασκευάστηκε με την μέθοδο NJ, και περιλαμβάνει 409 ομόλογα από 279 γένη Πρωτεοβακτηρίων, Firmicutes και Ακτινοβακτηρίων. Οι κλάδοι χρωματίζονται βάση της κλάσης που ανήκουν και επισημαίνονται στις άκρες τους οι γνωστοί μεταφορείς. Διακλαδώσεις με bootstrap value <70% δεν εμφανίζονται. Με βέλη επισημαίνονται οι καλά διαχωρισμένοι κλάδοι μεταφορέων AdeP/AdeQ (μπλε) και GhxP/GhxQ (μωβ), ο κλάδος β-, α-Πρωτεοβακτηρίων (συμπεριλαμβανομένου του Q92VC3) και φυτοπαθογόνων γ-Πρωτεοβακτηρίων (*Xanthomonadales*) (30 ομόλογα), ο κλάδος των PbuG/PbuO του γένους *Bacillus* μαζί με ομόλογα από λακτοβάκιλλους (*Lactobacillales*) (49 ομόλογα) και ο μονοφυλετικός κλάδος των Ακτινοβακτηρίων (78 ομόλογα) (μαύρο).



Εικόνα 5.7: Συντήρηση των έξι ισχυρών μοτίβων αλληλουχίας στους διαχωρισμένους κλάδους των βακτηριακών ομολόγων της AzgA-like. Τα αμινοξέα απεικονίζονται με τον χρωματικό κώδικα ClustalX<sup>280</sup> και με πλαίσια δείχνονται οι θέσεις/στόχοι της μεταλλαξιγένεσης στους μεταφορείς AdeP και GhxP.

### Αλληλουχίες πιθανών προγόνων των κλάδων AdeP/Q και GhxP/Q

Θέσεις με μέγιστη πιθανότητα  $P_m < 0,9$

Θέσεις με μέγιστη πιθανότητα  $P_m < 0,5$

>AncGhxP

MSTQAS**ETQAS**TTGFLDRYFQISARGSSVRQEVYIAGLTTFLAMVYSVVFVPSMLGAAGFDTS**AVFVATCLIA**AFGSLLMGLWANLPPIAIGCAISLTAFTAFS**L**VVLGQGLS**IA**VALGAV**F**LMGV**L**FTLISVTGIR**SW**ILRNLP**AG**IAHGTGIGIGLFLLLIAANGVGLVVKNP**GA**GLP**V**SLGDI**T**SFPV**L**MSVLGLAAIFGLERRVPGGILLV**IA**IS**AL**GLIFDPAV**TY**TGLF**AL**PSLGGEGSSSLIGAMDI**G**GALNPVVLPSVLALVMTAVFDATGTRAVAGQAG**L**LD**ED**GQIINGGRALTADSVSSIVSGF**V**GGAPAAAYIESAAGTAAGGKTGLTAV**V**VGL**L**FL**LI**IFLSPLAGLVPAYATAPALMYVGLLMLS**SV**SKL**HF**DD**S**V**D**AMAGLVCAVFI**V**LT**C**NI**V**TGIMLG**F**CTLVIGR**L**FAG**EW**RKLN**V**GT**V**IA**V**ALAVFY**AG**GWAI

>AncAdeP

QT**I**PT**QA**AN**Q**SFLDRYF**K**LKE**H**GT**T**VR**TE**I**I**AG**F**TT**F**LT**M**VY**I**VFN**P**NS**I**LGAAGMDTQAVFVTT**CL**IA**A**FG**S**I**L**MGLFANLPIALAPAMGLNAFFAY**V**LVGAMGLSQVGMGA**I**FWGAV**G**L**L**SLFRIRYWLIANIP**L**S**I**RV**G**IS**A**GIGLFI**AL**IG**F**H**NA**GIVVAN**PA**T**L**V**T**LGDI**T**S**L**PV**LL**GL**LG**FI**IA**ILAARN**I**HA**AI**L**IS**II**V**TLLGL**LL**DPDV**TY**NG**I**F**S**L**PP**S**I**TS**V**VGQ**V**DLAGALN**I**GL**LG**IF**S**VM**L**VN**L**FDSSG**T**LLAVTDKAGLADE**K**GR**F**PNMKR**AL**Y**V**DSVSS**V**LG**E**FMGTSSVTAY**IE**SA**SG**VAVGGRTGLTAVVVG**V**L**FL**LI**IF**LSPLAGLVPAYATAGALI**Y**V**G**ILMA**SS**LAK**V**KWDDL**TE**AT**PA**F**V**TAV**M**MP**F**S**S**ITEG**I**ALGFIT**Y**V**V**M**K**LF**T**G**K**W**K**ELN**I**CV**V**IV**AL**LE**FL**K**Y**IF**V**DA**H**

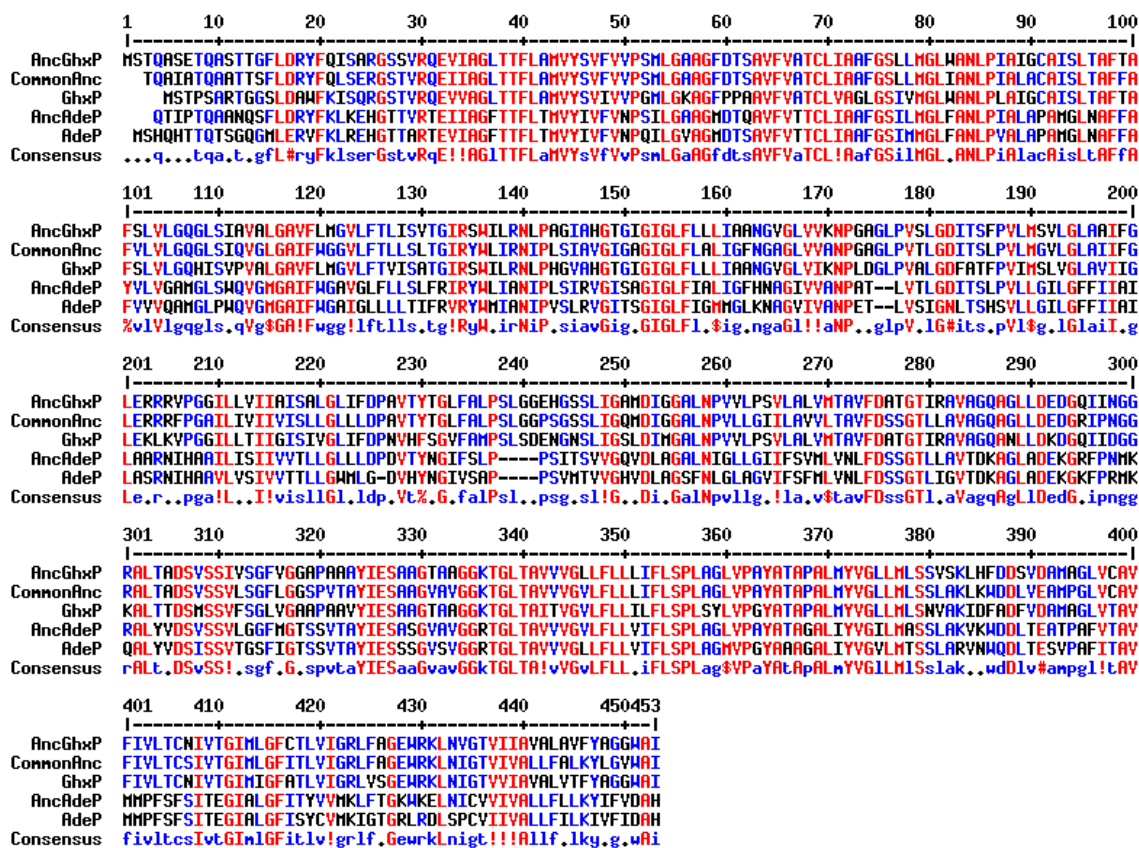
>CommonAnc (Κοινός πρόγονος)

IQAIATQAAT**S**FLDRYF**Q**LSE**R**G**S**TVR**Q**E**I**AG**L**TT**F**LA**M**V**Y**S**V**F**V**V**P**S**L**GAAG**F**DT**S**AV**F**V**A**T**CL**IA**A**FG**S**LL**M**GL**I**ANLP**I**AL**A**CA**I**S**L**IA**A**FF**A**F**V**LV**L**G**Q**GL**S**I**V**GL**A**I**F**W**G**GV**L**FT**L**LS**L**T**G**IR**W**L**I**R**N**I**P**LS**I**AV**G**I**G**AG**I**GL**F**LA**L**IG**F**NGAGLV**V**AN**P**GA**G**LP**V**T**L**GD**I**T**S**L**P**V**L**MG**V**LG**L**AI**I**F**G**L**E**RR**R**FP**G**AI**L**I**V**I**V**IS**L**L**G**L**L**DP**A**V**TY**T**G**L**F**AL**PS**L**G**GP**S**GS**S**L**I**G**Q**MD**I**G**G**AL**N**P**V**LL**G**I**L**AV**V**LT**AV**FD**SS**G**T**LL**AV**AG**Q**AG**L**LD**ED**GR**I**PN**G**CR**AL**T**A**DS**V**SS**V**LS**G**F**I**G**S**FP**V**TAY**IE**SA**AG**V**AV**GG**R**T**G**L**T**AV**V**V**G**L**FL**LI**IF**LS**P**LAG**L**V**P**AY**A**T**A**P**A**L**MY**V**G**LL**MS**SL**A**K**L**K**W**DD**L**V**E**AMP**GL**V**CA**V**I**V**L**T**C**S**I**V**T**G**I**M**L**G**F**CT**L**V**I**G**R**L**F**AG**EW**R**K**L**N**I**G**T**V**IV**AL**LE**F**AL**K**Y**LG**V**W**AI



Πίνακας 5.1: Ποσοστό συνολικής ταυτότητας αλληλουχιών (μέσω Clustal 2.1)

	GhxP	GhxQ	AncGhxP	AdeP	AdeQ	AncAdeP	Q92VC3
GhxP:	100.00	81.96	77.95	35.07	38.86	42.89	38.86
GhxQ:	81.96	100.00	79.25	35.28	36.49	43.02	36.32
AncGhxP:	77.95	79.25	100.00	41.12	40.41	52.25	38.51
AdeP:	35.07	35.28	41.12	100.00	73.81	76.07	52.37
AdeQ:	38.86	36.49	40.41	73.81	100.00	70.07	47.86
AncAdeP:	42.89	43.02	52.25	76.07	70.07	100.00	52.83
Q92VC3:	38.86	36.32	41.12	52.37	47.86	52.83	100.00



Εικόνα 5.8: Στοιχισμός αλληλουχιών των μεταφορέων AdeP και GhxP με τους πιθανούς προγόνους AncAdeP, AncGhxP και CommonAnc. Η στοιχισμός έγινε με το διαδικτυακό πρόγραμμα MultAlin<sup>281</sup>. Οι θέσεις υψηλής συντήρησης (συντήρηση σε >90% των αλληλουχιών) δείχνονται με κόκκινο και οι θέσεις χαμηλής συντήρησης (συντήρηση σε >50% των αλληλουχιών) δείχνονται με μπλε.

Πίνακας 5.2: Τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  των μεταφορέων AdeP, GhxP και των μεταλλαγμάτων τους

Περμεάση	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$V_{max}/K_M$ ( $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
<b>Κινητική για την μεταφορά αδενίνης (JW3692)</b>			
AdeP wt	1.2 ( $\pm 0.1$ )	2.3 ( $\pm 0.1$ )	1.92
M159I	1.0 ( $\pm 0.2$ )	1.2 ( $\pm 0.1$ )	1.20
N163G	1.5 ( $\pm 0.1$ )	1.4 ( $\pm 0.1$ )	0.93
S210T/T214I	0.6 ( $\pm 0.1$ )	0.7 ( $\pm 0.1$ )	1.17
<b>Κινητική για την μεταφορά υποξανθίνης (JW3692)</b>			
GhxP wt	8.9 ( $\pm 1.1$ )	2.0 ( $\pm 0.1$ )	0.23
G160N	7.4 ( $\pm 1.2$ )	1.3 ( $\pm 0.1$ )	0.18
T209S/I213T	13.0 ( $\pm 2.6$ )	1.7 ( $\pm 0.1$ )	0.13
<b>Κινητική για την μεταφορά γουανίνης (JW4025)</b>			
GhxP wt	1.1 ( $\pm 0.1$ )	1.0 ( $\pm 0.1$ )	0.91
G160N	1.5 ( $\pm 0.2$ )	1.9 ( $\pm 0.1$ )	1.27
T209S/I213T	3.0 ( $\pm 0.2$ )	3.2 ( $\pm 0.1$ )	1.07

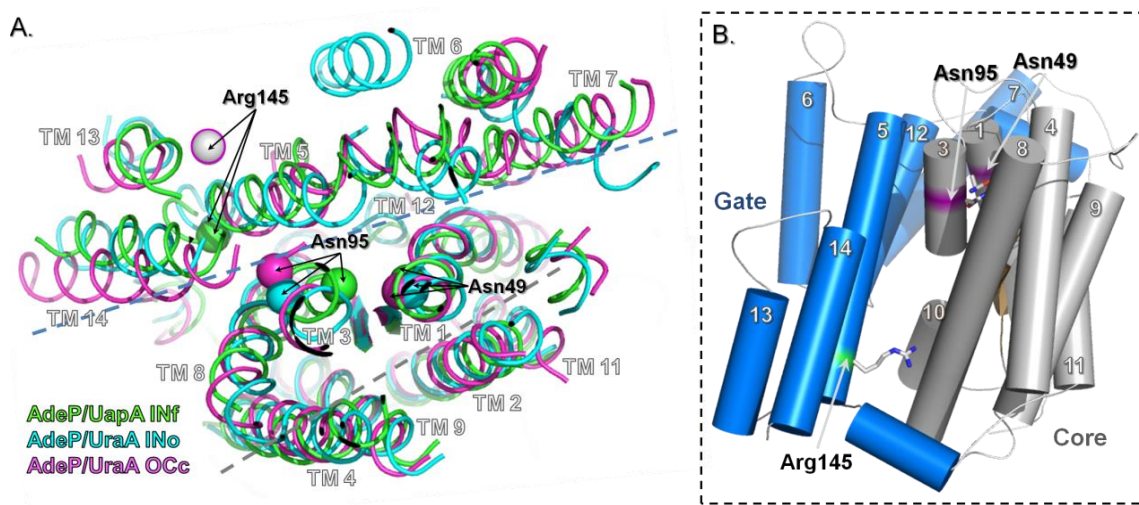
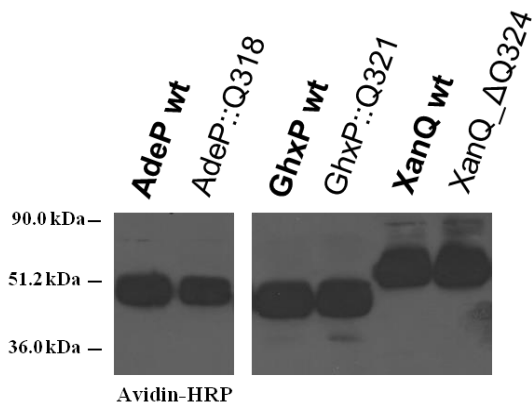
Για κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025 που εκφράζουν την κάθε κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων αδενίνης (0.04  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$ ), υποξανθίνης (0.1  $\mu\text{M}$ -40  $\mu\text{M}$ ) ή γουανίνης (0.01  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec, 15-20 sec ή 10 sec αντίστοιχα και στους 25 °C. Τιμές αρνητικού μάρτυρα μετρήθηκαν από κύτταρα JW3692 ή JW4025 μετασχηματισμένα με πλασμίδιο pT7-5 που δεν φέρει γονίδιο μεταφορέα και αφαιρέθηκαν από όλες τις τιμές των δειγμάτων. Οι παράμετροι των εξισώσεων κινητικής καθορίστηκαν από την καμπύλη των Michaelis-Menten και οι τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$  που δείχνονται αντιπροσωπεύουν μέσο όρο τριών μετρήσεων.

Πίνακας 5.3: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων AdeP, GhxP και μεταλλαγμάτων τους

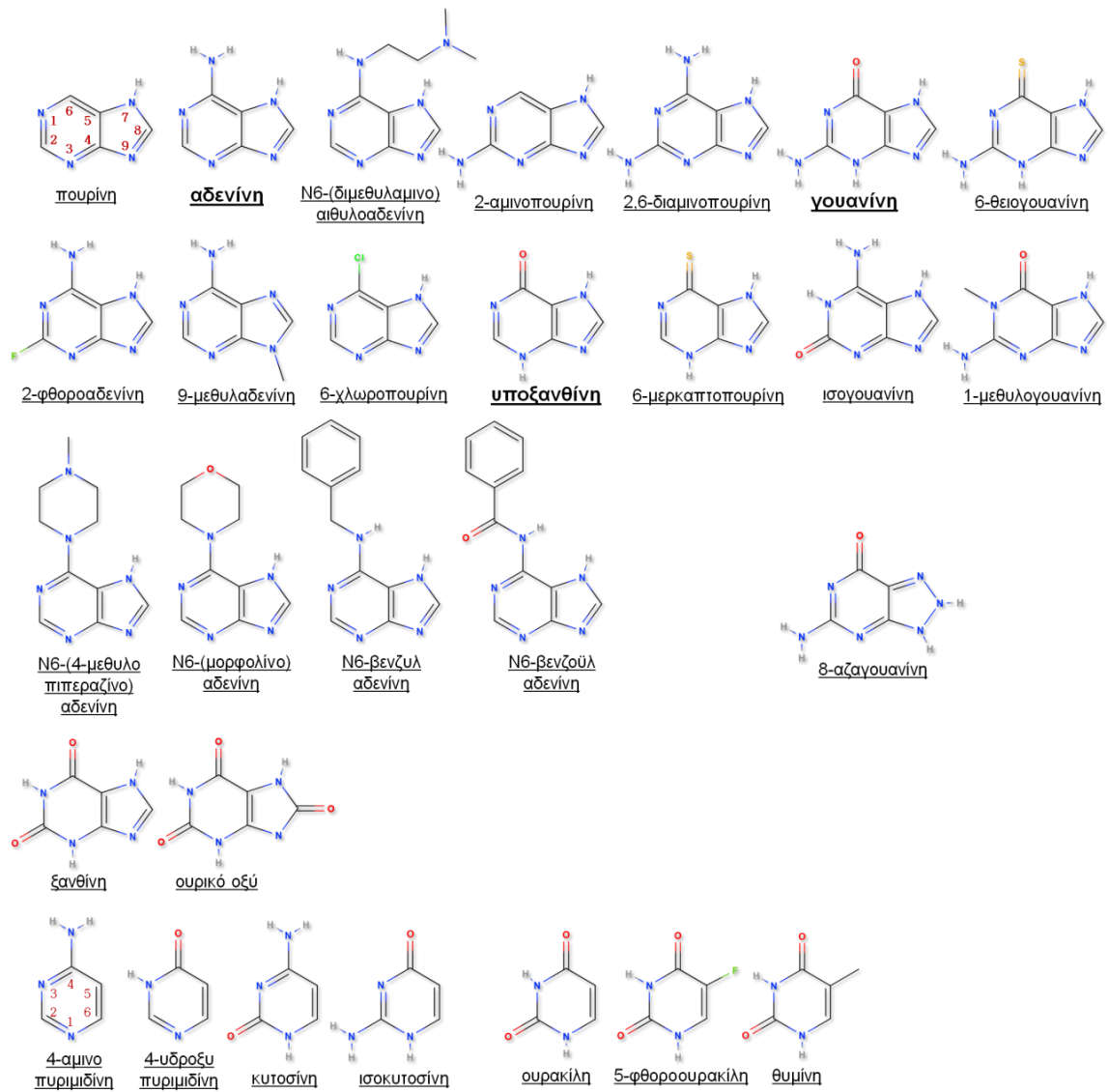
<b>Τιμές <math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς αδενίνης (<math>L=0.1\mu\text{M}</math>)</b>					
Περμεάση	Ανταγωνιστής				
	<b>P</b>	<b>2,6-NP</b>	<b>9-MA</b>	<b>HX</b>	<b>6-MP</b>
AdeP wt	3.4 ( $\pm 0.4$ )	8.8 ( $\pm 3.2$ )	96.2 ( $\pm 9.3$ )	150.1 ( $\pm 14.4$ )	158.2 ( $\pm 13.0$ )
M159I	7.4 ( $\pm 2.3$ )	12.0 ( $\pm 4.2$ )	66.0 ( $\pm 17.7$ )	ND	ND
N163G	<b>20.0</b> ( $\pm 8.8$ )	8.3 ( $\pm 2.0$ )	58.5 ( $\pm 6.9$ )	106.2 ( $\pm 24.5$ )	ND
S210T/ T214I	0.8 ( $\pm 0.1$ )	2.7 ( $\pm 0.4$ )	11.5 ( $\pm 1.1$ )	104.6 ( $\pm 7.2$ )	118.2 ( $\pm 17.8$ )
<b>Τιμές <math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>) για τον ανταγωνισμό της μεταφοράς γουανίνης (<math>L=0.1\mu\text{M}</math>)</b>					
Περμεάση	Ανταγωνιστής				
	<b>6-SG</b>	<b>HX</b>	<b>6-MP</b>	<b>8-AG</b>	<b>1-MG</b>
GhxP wt	3.1 ( $\pm 0.3$ )	5.7 ( $\pm 1.1$ )	8.41 ( $\pm 1.5$ )	50.5 ( $\pm 6.9$ )	55.1 ( $\pm 7.4$ )
G160N	2.1 ( $\pm 0.3$ )	8.1 ( $\pm 1.4$ )	11.0 ( $\pm 1.0$ )	60.1 ( $\pm 9.7$ )	65.2 ( $\pm 8.2$ )
T209S/ I213T	6.1 ( $\pm 0.7$ )	10.2 ( $\pm 0.9$ )	15.2 ( $\pm 3.2$ )	74.3 ( $\pm 11.5$ )	58.2 ( $\pm 8.3$ )

Για κύτταρα *E. coli* JW3692 ή JW4025 που εκφράζουν την αντίστοιχη κατασκευή, μετρήθηκαν τιμές αρχικής ενεργότητας ραδιενεργών ισοτόπων αδενίνης (0.1  $\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec, υποξανθίνης (1  $\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 15-20 sec ή γουανίνης (0.1  $\mu\text{M}$ ) σε χρόνους 5-10 sec και στους 25 °C, παρουσία μη ραδιενεργού ανταγωνιστή σε συγκέντρωση 0.1  $\mu\text{M}$ -1mM. Οι τιμές  $IC_{50}$  καθορίστηκαν βάση της σιγμοειδούς καμπύλης της εξίσωσης δόσης-απόκρισης (sigmoidal dose-response equation) και οι τιμές  $K_i$  υπολογίστηκαν μέσω των τιμών  $IC_{50}$  και της εξίσωσης των Cheng-Prusoff,  $K_i = IC_{50}/[1+(L/K_M)]$ . Η ένδειξη ND (not determined) αφορά περιπτώσεις υποστρωμάτων πολύ χαμηλής συγκέντρωσης όπου δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστούν με ακρίβεια τιμές  $IC_{50}$ , αλλά κατά προσέγγιση η μέση μέγιστη συγκέντρωση του ανταγωνιστή είναι  $>1000\mu\text{M}$ . Οι τιμές που δείχνονται αντιπροσωπεύουν με μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων με την αντίστοιχη μέση απόκλιση. Συντμήσεις: L, η συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος; P, πουρίνη; 2,6-AP, 2,6-διαμινοπουρίνη; 9-MA, 9-μεθλοαδενίνη; HX, υποξανθίνη; 6-MP, 6-μερκαπτοπουρίνη; 6-SG, 6-θειογουανίνη; 8-AG, 8-αζαγουανίνη; 1-MG; 1-μεθυλογουανίνη.

**Εικόνα 5.9:** Έκφραση των μεταλλαγμάτων ένθεσης και αφαίρεσης καταλοίπου Gln. Ανοσοαποτύπωση κατά western με αντίσωμα το σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε δείγματα μεμβρανικών κλασμάτων κυττάρων *E. coli* JW3692 που περιέχουν τους μεταφορείς AdeP, GhxP, XanQ και τα μεταλλάγματα AdeP::Q318, GhxP::Q321, XanQ\_ΔQ324.



**Εικόνα 5.10:** Τοπολογία των Asn49/95 και Arg145 του AdeP που πιθανά συμμετέχουν στα επιλεκτικά μοριακά φίλτρα πουρινών του περιπλάσματος και του κυτταροπλάσματος αντίστοιχα. **Α)** Υπέρθυση των τρισδιάστατων θεωρητικών μοντέλων του AdeP (μονομερή) βάσει των κρυσταλλογραφικά γνωστών δομών της NCS2, UapA (PDB: 5I6C) (πράσινο) και UraA σε διαμόρφωση ανοικτή προς το περίπλασμα (PDB: 3QE7) (γαλάζιο) και αποφραγμένη (PDB: 5XLS) (μωβ). Δείχνεται η τοπολογία των θέσεων Asn49/95 του περιπλασματικού φίλτρου και η Arg145 του κυτταροπλασματικού φίλτρου, η οποία πιθανά βρίσκεται σε περιοχή ελεύθερης διαμόρφωσης εκτός ελικοειδούς δομής. Οι διακοπτόμενες γραμμές ορίζουν τον διαχωρισμό των core και gate domains (μπλε) και τον νοητό διαχωρισμό του core domain μεταξύ των TMs του κέντρου δέσμευσης και των TMs 2, 4, 9 και 11 που το περιβάλλουν (γκρι). **Β)** Η τοπολογία των Asn49/95 και Arg145 στο core και gate domain αντίστοιχα με βάση την δομή του UapA.



**Εικόνα 5.11: Χημικοί τύποι νουκλεοτιδικών βάσεων και των αναλόγων τους που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της διατριβής. Με κόκκινη αρίθμηση δείχνονται οι θέσεις υποκατάστασης του πουρινικού και του πυριμιδινικού δακτυλίου.**



## 6. Περίληψη διατριβής

---

Οι μεταφορείς πουρινών-πυριμιδινών των βακτηρίων κατανέμονται σε δύο οικογένειες, τις NCS1 και NAT/NCS2, στις οποίες τα ομόλογα του ανθρώπου εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση. Ειδικότερα, η οικογένεια NAT/NCS2 χωρίζεται σε δύο φυλογενετικά υποσύνολα, τα οποία αντιπροσωπεύονται από μεταφορείς ουρακίλης και ξανθίνης και/ή ουρικού (ομάδα NAT/COG2233) και μεταφορείς υποξανθίνης, γουανίνης και/ή αδενίνης (ομάδα AzgA-like/COG2252), αντίστοιχα. Μέχρι σήμερα η ομάδα AzgA-like δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και δεν έχει αναλυθεί κρυσταλλογραφικά η δομή κάποιου μέλους της. Ωστόσο, τα λειτουργικώς γνωστά ομόλογα AdeP και GhxP της *E. coli* K-12, εμφανίζουν δύο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά: α) υψηλή ταυτότητα αλληλουχίας με μεγάλη ομοιότητα στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης, αλλά αυστηρά διακριτές εξειδικεύσεις για την μεταφορά αδενίνης ή υποξανθίνης/γουανίνης αντίστοιχα και β) υψηλή συγγένεια για κλασσικούς αντιμεταβολίτες που χρησιμοποιούνται στην ιατρική πρακτική ως αντικαρκινικά ή ανοσοκατασταλτικά φάρμακα εδώ και πολλές δεκαετίες.

Στόχος της διατριβής ήταν να χαρτογραφήσουμε τα διαφορετικά προφίλ εξειδίκευσης των AzgA-like μεταφορέων και να διερευνήσουμε την μοριακή βάση της διάκρισης εξειδικεύσεων των AdeP και GhxP, καταλήγοντας στον εντοπισμό αμινοξέων της αλληλουχίας τους που πιθανώς ελέγχουν την εξειδίκευση. Η στρατηγική που ακολουθήσαμε στηρίζεται σε α) φυλογενετική ανάλυση και ανάλυση μοτίβων αλληλουχίας της AzgA-like, β) ανάλυση μεταλλαξιγένεσης στους AdeP και GhxP για συγκεκριμένες θέσεις όπως υποδεικνύονται από την φυλογενετική ανάλυση, γ) ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης φυσικών μεταφορέων και των μεταλλαγμάτων τους με μια σειρά αναλόγων αδενίνης/γουανίνης ώστε να διερευνηθεί το εύρος των διαφορών εξειδίκευσης και δ) μελέτη της επίδρασης αντιμεταβολιτών με βάση τις αδενίνη/γουανίνη σε πειράματα κυτταροτοξικότητας *in vivo*.

Από την φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι η διατήρηση δύο τουλάχιστον ομολόγων με διακριτές εξειδικεύσεις αντίστοιχων των AdeP και GhxP, εντοπίζεται κατά βάση σε γ-Πρωτεοβακτήρια συμβιωτικών οικογενειών και κυρίως του εντέρου μεταζώων (τάξεις Enterobacterales, Pasteurellales και Aeromonadales). Οι μεταφορείς AdeP και GhxP διαχωρίζονται φυλογενετικά σχηματίζοντας δύο διακριτούς κλάδους ομολόγων που φαίνεται να σχετίζονται με την μεταφορά αδενίνης ή υποξανθίνης/γουανίνης αντίστοιχα. Για να εξετάσουμε την ενδεχόμενη συσχέτιση συγκεκριμένων περιοχών της αλληλουχίας με την λειτουργία των AzgA-like μεταφορέων, εντοπίσαμε με πληροφορική ανάλυση χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας μεταξύ των ομολόγων από όλα τα Πρωτεοβακτήρια. Στα μοτίβα αλληλουχίας περιλαμβάνονται καταρχήν όλες οι απόλυτα συντηρημένες θέσεις αμινοξέων του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης των AdeP και GhxP, οι οποίες είχαν μελετηθεί λειτουργικά σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου (Papakostas, Botou,

and Frillingos, 2013, *J. Biol. Chem.* 288, 36827-36840). Παρατηρήσαμε επίσης, ότι εντός των μοτίβων αλλά σε περιφερειακές ή απομακρυσμένες από το κέντρο δέσμευσης θέσεις, συντηρούνται αμινοξέα διαφορετικού χαρακτήρα πλευρικής ομάδας μεταξύ των κλάδων των AdeP και GhxP. Είναι πιθανό αυτές οι διαφορές να δικαιολογούν την διάκριση των εξειδικεύσεων τους. Για να εντοπιστούν οι ισχυρά συντηρημένες θέσεις διαφορών ανάμεσα στα ομόλογα του AdeP και στα ομόλογα του GhxP, έγινε εξαγωγή και ανάλυση της αλληλουχίας των προγονικών αλληλουχιών του κάθε κλάδου (AncAdeP/AncGhxP). Οι θέσεις διαφορών αμινοξέων που εντοπίστηκαν από την σύγκριση των προγονικών αλληλουχιών στις περιοχές των μοτίβων, αποτέλεσαν τους στόχους μεταλλαξιγένεσης της παρούσας διατριβής στους AdeP και GhxP.

Αρχικά, έγινε μεταλλαξιγένεση σε όλες τις θέσεις-στόχους στον AdeP και στην συνέχεια, οι θέσεις μεταλλαγών που εμφάνισαν σημαντικές λειτουργικές επιπτώσεις στον AdeP, αντικαταστάθηκαν και στον GhxP (με την αντίστροφη αλλαγή σε κάθε περίπτωση). Η μεταλλαξιγένεση στον AdeP αποκάλυψε δώδεκα θέσεις της αλληλουχίας, όπου οι αντικαταστάσεις που εισήχθησαν δεν επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα αδενίνης, αλλά τροποποιούν το προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού τύπου. Τα μεταλλάγματα αυτά διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την αλλαγή που επιφέρουν στην εξειδίκευση: α) τα N49V, G93S και N95T στην περιπλασματική πλευρά των διαμεμβρανικών τμημάτων (TMs) 1 και 3 εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για υποστρώματα που αναγνωρίζει ο φυσικού τύπου AdeP (όπως πουρίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη) αλλά αυξημένη για υποστρώματα του GhxP (κυρίως υποξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, αλλά και γουανίνη), β) τα I45S, M92I και S268A περιμετρικά του κέντρου δέσμευσης μειώνουν την συγγένεια για όλα τα ανάλογα πουρινών που εξετάστηκαν, γ) τα R145A, A315V, S320A, S321A, S324A και V325A στην κυτταροπλασματική πλευρά των TMs 5 και 10 φαίνεται να διευρύνουν το προφίλ εξειδίκευσης, καθώς διατηρούν την υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα που αναγνωρίζει ο φυσικού τύπου AdeP (αδενίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη, πουρίνη) αλλά εμφανίζουν σημαντική συγγένεια και για ορισμένα από τα υποστρώματα του GhxP (υποξανθίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, αλλά όχι γουανίνη ή 6-θειογουανίνη), ενώ επιπλέον, το μετάλλαγμα AdeP\_R145A (και το διπλό R145A/V146H) εμφανίζει την ιδιότητα να μεταφέρει και υποξανθίνη με πολύ υψηλή συγγένεια ( $K_M$  στα επίπεδα του φυσικού τύπου GhxP).

Στις αντίστοιχες θέσεις έγινε μεταλλαξιγένεση και στο υπόβαθρο του GhxP. Στον GhxP οι αντικαταστάσεις που εισήχθησαν οδήγησαν είτε σε πλήρη απώλεια της λειτουργίας με οποιοδήποτε υπόστρωμα (V46N, C87P, T92N, P316S/V319A) είτε σε απώλεια ενεργότητας ειδικά για την γουανίνη (S90G, I89M/S90G, A324S/A325S) είτε σε μία περίπτωση (V319A), απώλεια ενεργότητας ειδικά για την υποξανθίνη. Σε όλες τις περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές αλλαγές στις συγγένειες αναγνώρισης των φυσικού τύπου υποστρωμάτων ή αναλόγων, από τα πειράματα ανταγωνισμού (τα μεταλλάγματα που μεταφέρουν μόνο το ένα από τα δύο υποστρώματα αναγνωρίζουν με

υψηλή συγγένεια ακόμη και το υπόστρωμα που δεν μεταφέρουν). Κανένα από τα μεταλλάγματα του GhxP δεν εμφάνισε ικανότητα αναγνώρισης ή μεταφοράς αδενίνης ή αναλόγων της. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι οι αντικαταστάσεις περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης, αλλά και σε πιο απομακρυσμένες θέσεις, μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στο προφίλ εξειδίκευσης, αλλά μεταξύ των AdeP και GhxP πιθανώς να λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο. Οι θέσεις που εντοπίστηκαν στον AdeP ενισχύουν τα δεδομένα για την ύπαρξη δομικών περιοχών αλλά και ειδικών μοριακών “φίλτρων” που εμπλέκονται στην διαλογή των υποστρωμάτων κατά την πορεία μεταφοράς τους. Η ανάλυση της μεταλλαξιγένεσης στους AdeP και GhxP έδειξε ότι η αυστηρή διάκριση της εξειδίκευσης χαλαρώνει μόνο για την υποξανθίνη, ενώ δεν επιτεύχθηκε η άρση της διάκρισης μεταξύ αδενίνης και γουανίνης με κανένα από τα μεταλλάγματα.

Για την εντόπιση διαφορών στην προτίμηση αναλόγων καθώς και διαφορών σε θέσεις της αλληλουχίας που πιθανά συνδέονται με την αναγνώριση αδενίνης-γουανίνης, μελετήθηκε εκτενώς στην *E. coli*, ο μεταφορέας αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης Q92VC3 του *S. meliloti* και συγκρίθηκε το προφίλ εξειδίκευσης και η αλληλουχία του με τους συγγενικούς AdeP και GhxP καθώς και με τα μεταλλάγματα τους. Ο Q92VC3 βρέθηκε ότι παρουσιάζει ευρεία εξειδίκευση, περιλαμβάνοντας μεταξύ των υποστρωμάτων του ανάλογα πουρινών που αναγνωρίζονται τόσο από τον AdeP όσο και από τον GhxP. Επιπρόσθετα, ο Q92VC3 βρέθηκε να αναγνωρίζει και ανάλογα που δεν αναγνωρίζονται ούτε από τον AdeP ούτε από τον GhxP, όπως ορισμένες κυτοκινίνες (ανάλογα αδενίνης με υποκατεστημένη την αμινομάδα στη θέση 6) οι οποίες πιθανόν να σχετίζονται με την ρύθμιση της αλληλεπίδρασης φυτού-ριζοβίου για τον σχηματισμό φυματίων.

Η υψηλή συγγένεια των μεταφορέων της AzgA-like για αντιμεταβολίτες αναδεικνύει την σημασία της μελέτης των βακτηριακών ομολόγων της οικογένειας αυτής. Οι αντιμεταβολίτες θα μπορούσαν να λειτουργήσουν και ως βακτηριοτοξικά φάρμακα με μειωμένες παρενέργειες στον ξενιστή λόγω της δυνατότητας ειδικής στόχευσης των AzgA-like μεταφορέων που δεν έχουν ομόλογα στον άνθρωπο. Στα πλαίσια της διατριβής, ελέγξαμε όλα τα πουρινικά ανάλογα/αντιμεταβολίτες για τα οποία εμφανίζουν υψηλή συγγένεια οι AdeP και GhxP, για πιθανή βακτηριοτοξική δράση τους στην *E. coli* K-12. Στις συνθήκες που μελετήθηκαν, το μόνο ανάλογο που παρουσίασε αναστολή της αύξησης της *E. coli* ήταν η 2-φθοροαδενίνη. Αν και η κυτταροτοξικότητα άλλων αντιμεταβολιτών στην *E. coli* είχε ήδη συσχετιστεί με την λειτουργία του GhxP, η 2-φθοροαδενίνη είναι το πρώτο κυτταροτοξικό ανάλογο/αντιμεταβολίτης που συνδέεται από τα πειράματά μας με την λειτουργία του AdeP.



The bacterial purine-pyrimidine transporters are divided in two families, namely NCS1 and NAT/NCS2, whose members are not functionally related with their human homologues. The family NAT/NCS2 is divided in two homology clusters represented by permeases for uracil and xanthine and/or uric acid (cluster of NAT/COG2233) and for hypoxanthine, guanine and/or adenine (cluster of AzgA-like/COG2252), respectively. To date, the AzgA-like members are not well studied and their structure is not yet crystallographically resolved. However, the functionally characterized homologues AdeP and GhxP of *E. coli* K-12 share two interesting features: a) high sequence identity with similar key binding site determinants, but strict distinction in their specificity profiles for adenine or hypoxanthine/guanine respectively, and b) high affinity for known antimetabolite drugs that are used for decades in medical practice as anticancer agents or immunosuppressants.

In the present study, we aimed to map the distinct specificity profiles of AzgA-like transporters and delineate the different molecular characteristics of AdeP and GhxP, in order to determine amino acid residues that are involved in the specificity split. To this end, we based our research in: a) phylogenetic analysis and sequence motif discovery in AzgA-like cluster, b) rationally designed mutagenesis in AdeP and GhxP according to our phylogenetic analysis, c) analysis of the specificity profiles of wild type transporters and their mutants using adenine/guanine based analogues, in order to elucidate the range of the specificity split and d) use of adenine/guanine based antimetabolites as *in vivo* toxicity agents in *E. coli* K-12.

Our phylogenetic analysis revealed that the specificity split between AdeP and GhxP, is present in symbiotic members of  $\gamma$ -Proteobacteria and mainly in those of the gut of metazoan (orders Enterobacterales, Pasteurellales and Aeromonadales). AdeP and GhxP form two distinct clades, representing homologues for the uptake of adenine or hypoxanthine/guanine, respectively. To get insight into the correlation between sequence and function in AzgA-like transporters, we performed *in silico* analysis to identify putative sequence motifs of transporter homologues in Proteobacteria. The detected sequence motifs mainly include the highly conserved and critical for function binding site residues in AdeP and GhxP, which were functionally characterized in previous studies (Papakostas, Botou, and Frilingos (2013), *J. Biol. Chem.* 288, 36827-36840). By comparing the motifs between AdeP and GhxP clades, we observed a distinct conservation pattern of amino acid residues in close proximity or distant from the binding site. These differences could relate to their distinct specificity profiles. To pinpoint strongly conserved amino acid differences between homologues of AdeP and GhxP clades, we reconstructed ancestral sequences for each clade (AncAdeP/AncGhxP). Comparing the motif regions of the two ancestral

sequences, we detected sites with different amino acid residues. Based on the above findings, we rationally designed a mutagenesis approach to study the specificity split between AdeP and GhxP.

Initially, AdeP was subjected to site-directed mutagenesis at all targeted sites, and substitutions that led in severe alteration of the specificity profile, were subsequently applied to GhxP (with the corresponding substitutions in each case). Mutagenesis analysis in AdeP revealed 12 sites, where the inserted substitutions maintain adenine activity, while affecting the specificity profile of the wild type. AdeP mutants were divided in three groups according to the resulting specificity changes: a) AdeP\_N49V, G93S and N95T, of the periplasmic edges of transmembrane segments (TMs) 1 and 3, which modify the specificity profile by reducing affinity for AdeP substrates and increasing affinity for GhxP substrates, b) AdeP\_I45S, M92I and S268A, in close proximity to the binding site, which severely reduce affinity for purine analogs, c) AdeP\_R145A, A315V, S320A, S321A, S324A and V325A, of the cytoplasmic edges of TMs 5 and 10, which broaden the specificity profile, by preserving high affinity for AdeP substrates (adenine, 2,6-diaminopurine, purine) while gaining high affinity for some GhxP substrates as well (hypoxanthine, 6-mercaptopurine, but not guanine or 6-thioguanine). Most surprisingly, AdeP\_R145A shows the ability to transport hypoxanthine with high affinity ( $K_M$  levels similar to wild type GhxP)

The corresponding sites were also subjected to mutagenesis in GhxP background. Neither of the GhxP mutants was found to alter the specificity profile of the wild type, while substitutions led either to loss of function (V46N, C87P, T92N, P316S/V319A), or loss of guanine activity (S90G, I89M/S90G, A324S/A325S), or in one case, loss of hypoxanthine activity (V319A). In all cases, we did not observed significant changes in affinity of physiological substrates or analogues from the ligand binding assays (the mutants that show loss of activity for either substrates, recognize with high affinity the substrate that they do not transport). In addition, neither of the GhxP mutants showed recognition or transport of adenine or any of its analogues. Our results reveal that substitutions at the periphery of the binding site or at distant positions, may affect the specificity profile, but may also function differently between AdeP and GhxP. The residues found in AdeP. strongly recommend the existence of structural regions and specific molecular filters for substrate selection in their translocation pathway. Mutagenesis analysis in AdeP and GhxP respectively, showed that the strict specificity split can be relaxed for hypoxanthine but not for guanine.

To pinpoint differences in substrate preferences and in residues that might relate to adenine-guanine selectivity, we studied in *E. coli*, the adenine/guanine/hypoxanthine transporter Q92VC3 of *S. meliloti* and we compared its specificity profile along with its sequence with the closely related transporters, AdeP and GhxP (wild type and mutants). The transporter, Q92VC3, showed broad specificity profile, recognizing purine analogues

which are also recognized by AdeP and GhxP. In addition, Q92VC3 recognizes, with high affinity, substrates that are not recognized by AdeP or GhxP, such as cytokine analogues (adenine analogues with substitutions in C6-NH<sub>2</sub>) which might relate to regulation of the plant-rhizobium interaction for the formation of symbiotic nodules.

AzgA-like transporters show high affinity for antimetabolite drugs, thus underlying the biological significance of its bacterial homologues. Antimetabolites can also function as bacteriotoxic agents with minor side effects to the host organism, by specifically targeting AzgA-like transporters that are not conserved in humans. Thereby, we tested all analogues/antimetabolites that are recognized with high affinity by AdeP or GhxP, for their toxicity in *E. coli* K-12. According to the developed methodology, the only analogue with inhibitory effect in growth of *E. coli* was 2-fluoroadenine. Despite the fact that other known toxic antimetabolites have been associated with GhxP function, our results revealed 2-fluoroadenine as the first toxic compound to be associated with AdeP function.





## 8. Βιβλιογραφία

---

1. Koberlin, M.S., Snijder, B., Heinz, L.X., Baumann, C.L., Fauster, A., Vladimer, G.I., Gavin, A.C. & Superti-Furga, G. A Conserved Circular Network of Coregulated Lipids Modulates Innate Immune Responses. *Cell* **162**, 170-183 (2015).
2. Mulkidjanian, A.Y., Galperin, M.Y. & Koonin, E.V. Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins. *Trends Biochem Sci* **34**, 206-215 (2009).
3. Schrum, J.P., Zhu, T.F. & Szostak, J.W. The origins of cellular life. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002212 (2010).
4. Kell, D.B., Dobson, P.D. & Oliver, S.G. Pharmaceutical drug transport: the issues and the implications that it is essentially carrier-mediated only. *Drug Discov Today* **16**, 704-714 (2011).
5. Kell, D.B. & Oliver, S.G. How drugs get into cells: tested and testable predictions to help discriminate between transporter-mediated uptake and lipoidal bilayer diffusion. *Front Pharmacol* **5**, 231 (2014).
6. Lin, L., Yee, S.W., Kim, R.B. & Giacomini, K.M. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 543-560 (2015).
7. Nigam, S.K. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov* **14**, 29-44 (2015).
8. Hediger, M.A., Clemençon, B., Burrier, R.E. & Bruford, E.A. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* **34**, 95-107 (2013).
9. Gouaux, E. & Mackinnon, R. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **310**, 1461-1465 (2005).
10. Diallinas, G. Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front Pharmacol* **5**, 207 (2014).
11. Diallinas, G. Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure. *Trends Genet* **32**, 576-590 (2016).
12. Dean, M. & Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 123-142 (2005).
13. Forrest, L.R., Kramer, R. & Ziegler, C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 167-188 (2011).
14. Yan, N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys* **44**, 257-283 (2015).
15. Gadsby, D.C. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 344-352 (2009).
16. Mitchell, P. A general theory of membrane transport from studies of bacteria. *Nature* **180**, 134-136 (1957).
17. Shi, Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys* **42**, 51-72 (2013).
18. Yan, N. A Glimpse of Membrane Transport through Structures-Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *J Mol Biol* **429**, 2710-2725 (2017).
19. Niven, J.E. & Laughlin, S.B. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol* **211**, 1792-1804 (2008).
20. Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **59**, 49-63 (1991).
21. Darbani, B., Kell, D.B. & Borodina, I. Energetic evolution of cellular Transportomes. *BMC Genomics* **19**, 418 (2018).

22. Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A. & Saier, M.H., Jr. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **430**, 116-125 (1998).
23. Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J. & Emili, A. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**, 531-537 (2005).
24. Gong, Y., Kakihara, Y., Krogan, N., Greenblatt, J., Emili, A., Zhang, Z. & Houry, W.A. An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* **5**, 275 (2009).
25. Moraes, T.F. & Reithmeier, R.A. Membrane transport metabolons. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2687-2706 (2012).
26. Srere, P.A. Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* **56**, 89-124 (1987).
27. Srere, P.A. Macromolecular interactions: tracing the roots. *Trends Biochem Sci* **25**, 150-153 (2000).
28. Babu, M., Greenblatt, J.F., Emili, A., Strynadka, N.C., Reithmeier, R.A. & Moraes, T.F. Structure of a SLC26 anion transporter STAS domain in complex with acyl carrier protein: implications for *E. coli* YchM in fatty acid metabolism. *Structure* **18**, 1450-1462 (2010).
29. Jacob, F. & Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318-356 (1961).
30. Andersen, P.S., Smith, J.M. & Mygind, B. Characterization of the upp gene encoding uracil phosphoribosyltransferase of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* **204**, 51-56 (1992).
31. Parales, R.E. & Ingraham, J.L. The surprising Rut pathway: an unexpected way to derive nitrogen from pyrimidines. *J Bacteriol* **192**, 4086-4088 (2010).
32. Cho, B.K., Federowicz, S.A., Embree, M., Park, Y.S., Kim, D. & Palsson, B.O. The PurR regulon in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Nucleic Acids Res* **39**, 6456-6464 (2011).
33. Marbach, D., Costello, J.C., Kuffner, R., Vega, N.M., Prill, R.J., Camacho, D.M., Allison, K.R., Kellis, M., Collins, J.J. & Stolovitzky, G. Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nat Methods* **9**, 796-804 (2012).
34. Hove-Jensen, B., Andersen, K.R., Kilstrup, M., Martinussen, J., Switzer, R.L. & Willemoes, M. Phosphoribosyl Diphosphate (PRPP): Biosynthesis, Enzymology, Utilization, and Metabolic Significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **81** (2017).
35. Bagnara, A.S. & Finch, L.R. The effects of bases and nucleosides on the intracellular contents of nucleotides and 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **41**, 421-430 (1974).
36. Hermann, T. & Patel, D.J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**, 820-825 (2000).
37. Seetharaman, S., Zivarts, M., Sudarsan, N. & Breaker, R.R. Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures. *Nat Biotechnol* **19**, 336-341 (2001).
38. Baker, J.L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R.B. & Breaker, R.R. Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* **335**, 233-235 (2012).
39. Mandal, M. & Breaker, R.R. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 451-463 (2004).
40. Furukawa, K., Ramesh, A., Zhou, Z., Weinberg, Z., Vallery, T., Winkler, W.C. & Breaker, R.R. Bacterial riboswitches cooperatively bind Ni(2+) or Co(2+) ions and control expression of heavy metal transporters. *Mol Cell* **57**, 1088-1098 (2015).
41. Batey, R.T., Gilbert, S.D. & Montange, R.K. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* **432**, 411-415 (2004).

42. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C. & Breaker, R.R. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**, 577-586 (2003).
43. Christiansen, L.C., Schou, S., Nygaard, P. & Saxild, H.H. Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol* **179**, 2540-2550 (1997).
44. Hoglund, P.J., Nordstrom, K.J., Schioth, H.B. & Fredriksson, R. The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Mol Biol Evol* **28**, 1531-1541 (2011).
45. Schlessinger, A., Matsson, P., Shima, J.E., Pieper, U., Yee, S.W., Kelly, L., Apeltsin, L., Stroud, R.M., Ferrin, T.E., Giacomini, K.M. & Sali, A. Comparison of human solute carriers. *Protein Sci* **19**, 412-428 (2010).
46. Perland, E. & Fredriksson, R. Classification Systems of Secondary Active Transporters. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 305-315 (2017).
47. Cesar-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R.A., Hepworth, D., Hediger, M.A., Edwards, A.M. & Superti-Furga, G. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* **162**, 478-487 (2015).
48. Rask-Andersen, M., Masuram, S., Fredriksson, R. & Schioth, H.B. Solute carriers as drug targets: current use, clinical trials and prospective. *Mol Aspects Med* **34**, 702-710 (2013).
49. Williams, A.J., Harland, L., Groth, P., Pettifer, S., Chichester, C., Willighagen, E.L., Evelo, C.T., Blomberg, N., Ecker, G., Goble, C. & Mons, B. Open PHACTS: semantic interoperability for drug discovery. *Drug Discov Today* **17**, 1188-1198 (2012).
50. Williams, A.L., Jacobs, S.B., Moreno-Macias, H., Huerta-Chagoya, A., Churchhouse, C., Marquez-Luna, C., Garcia-Ortiz, H., Gomez-Vazquez, M.J., Burt, N.P., Aguilar-Salinas, C.A., Gonzalez-Villalpando, C., Florez, J.C., Orozco, L., Haiman, C.A., Tusie-Luna, T. & Altshuler, D. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature* **506**, 97-101 (2014).
51. Vince, J.W. & Reithmeier, R.A. Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. *J Biol Chem* **273**, 28430-28437 (1998).
52. Dahl, N.K., Jiang, L., Chernova, M.N., Stuart-Tilley, A.K., Shmukler, B.E. & Alper, S.L. Deficient HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in an AE1 mutant with normal Cl<sup>-</sup> transport can be rescued by carbonic anhydrase II presented on an adjacent AE1 protomer. *J Biol Chem* **278**, 44949-44958 (2003).
53. Reithmeier, R.A. A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers. *Blood Cells Mol Dis* **27**, 85-89 (2001).
54. Sterling, D., Reithmeier, R.A. & Casey, J.R. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *J Biol Chem* **276**, 47886-47894 (2001).
55. Arakawa, T., Kobayashi-Yurugi, T., Alguel, Y., Iwanari, H., Hatae, H., Iwata, M., Abe, Y., Hino, T., Ikeda-Suno, C., Kuma, H., Kang, D., Murata, T., Hamakubo, T., Cameron, A.D., Kobayashi, T., Hamasaki, N. & Iwata, S. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science* **350**, 680-684 (2015).
56. Vince, J.W. & Reithmeier, R.A. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger AE1. *Biochemistry* **39**, 5527-5533 (2000).
57. Meng, L.M. & Nygaard, P. Identification of hypoxanthine and guanine as the co-repressors for the purine regulon genes of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**, 2187-2192 (1990).
58. Schumacher, M.A., Choi, K.Y., Zalkin, H. & Brennan, R.G. Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: minor groove binding by alpha helices. *Science* **266**, 763-770 (1994).
59. Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M. & Yan, N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **510**, 121-125 (2014).

60. Gruswitz, F., Chaudhary, S., Ho, J.D., Schlessinger, A., Pezeshki, B., Ho, C.M., Sali, A., Westhoff, C.M. & Stroud, R.M. Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9638-9643 (2010).
61. Schlessinger, A., Khuri, N., Giacomini, K.M. & Sali, A. Molecular modeling and ligand docking for solute carrier (SLC) transporters. *Curr Top Med Chem* **13**, 843-856 (2013).
62. Zhou, Y., Liao, L., Wang, C., Li, J. & Chi, P. Cryo-EM structure of the human concentrative nucleoside transporter CNT3. **18**, e3000790 (2020).
63. Chi, X., Jin, X., Chen, Y., Lu, X., Tu, X., Li, X., Zhang, Y. & Lei, J. Structural insights into the gating mechanism of human SLC26A9 mediated by its C-terminal sequence. **6**, 55 (2020).
64. Coleman, J.A., Green, E.M. & Gouaux, E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* **532**, 334-339 (2016).
65. Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyarot, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Ponten, F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
66. Frillingos, S. Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol* **3**, 250-272 (2012).
67. Boudker, O. & Verdon, G. Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci* **31**, 418-426 (2010).
68. Lolkema, J.S., Dobrowolski, A. & Slotboom, D.J. Evolution of antiparallel two-domain membrane proteins: tracing multiple gene duplication events in the DUF606 family. *J Mol Biol* **378**, 596-606 (2008).
69. Madej, M.G., Dang, S., Yan, N. & Kaback, H.R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5870-5874 (2013).
70. Madej, M.G. & Kaback, H.R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E4831-4838 (2013).
71. Abramson, J., Iwata, S. & Kaback, H.R. Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins (Review). *Mol Membr Biol* **21**, 227-236 (2004).
72. Kaback, H.R., Smirnova, I., Kasho, V., Nie, Y. & Zhou, Y. The alternating access transport mechanism in LacY. *J Membr Biol* **239**, 85-93 (2011).
73. Madej, M.G., Sun, L., Yan, N. & Kaback, H.R. Functional architecture of MFS D-glucose transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E719-727 (2014).
74. Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K., Carpenter, E.P., Rutherford, N.G., Hadden, J.M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S.G., Hope, R.J., Norbertczak, H.T., Roach, P.C., Iwata, S., Henderson, P.J. & Cameron, A.D. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science* **322**, 709-713 (2008).
75. Yamashita, A., Singh, S.K., Kawate, T., Jin, Y. & Gouaux, E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **437**, 215-223 (2005).
76. Vastermark, A. & Saier, M.H., Jr. Evolutionary relationship between 5+5 and 7+7 inverted repeat folds within the amino acid-polyamine-organocation superfamily. *Proteins* **82**, 336-346 (2014).
77. Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Deng, D., Dang, S., Zhang, X., Wang, J. & Yan, N. Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature* **472**, 243-246 (2011).

78. Cao, Y., Jin, X., Levin, E.J., Huang, H., Zong, Y., Quick, M., Weng, J., Pan, Y., Love, J., Punta, M., Rost, B., Hendrickson, W.A., Javitch, J.A., Rajashankar, K.R. & Zhou, M. Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. *Nature* **473**, 50-54 (2011).
79. Lee, C., Kang, H.J., von Ballmoos, C., Newstead, S., Uzdavinys, P., Dotson, D.L., Iwata, S., Beckstein, O., Cameron, A.D. & Drew, D. A two-domain elevator mechanism for sodium/proton antiport. *Nature* **501**, 573-577 (2013).
80. Luo, P., Yu, X., Wang, W., Fan, S., Li, X. & Wang, J. Crystal structure of a phosphorylation-coupled vitamin C transporter. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 238-241 (2015).
81. Reyes, N., Ginter, C. & Boudker, O. Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature* **462**, 880-885 (2009).
82. Garaeva, A.A. & Slotboom, D.J. Elevator-type mechanisms of membrane transport. *Biochem Soc Trans* **48**, 1227-1241 (2020).
83. Drew, D. & Boudker, O. Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem* **85**, 543-572 (2016).
84. Booth, P.J. & Curnow, P. Folding scene investigation: membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 8-13 (2009).
85. van den Brink-van der Laan, E., Chupin, V., Killian, J.A. & de Kruijff, B. Stability of KcsA tetramer depends on membrane lateral pressure. *Biochemistry* **43**, 4240-4250 (2004).
86. Gupta, K., Donlan, J.A.C., Hopper, J.T.S., Uzdavinys, P., Landreh, M., Struwe, W.B., Drew, D., Baldwin, A.J., Stansfeld, P.J. & Robinson, C.V. The role of interfacial lipids in stabilizing membrane protein oligomers. *Nature* **541**, 421-424 (2017).
87. Koshy, C. & Ziegler, C. Structural insights into functional lipid-protein interactions in secondary transporters. *Biochim Biophys Acta* **1850**, 476-487 (2015).
88. Laganowsky, A., Reading, E., Allison, T.M., Ulmschneider, M.B., Degiacomi, M.T., Baldwin, A.J. & Robinson, C.V. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature* **510**, 172-175 (2014).
89. Dowhan, W. & Bogdanov, M. Molecular genetic and biochemical approaches for defining lipid-dependent membrane protein folding. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1097-1107 (2012).
90. Screpanti, E. & Hunte, C. Discontinuous membrane helices in transport proteins and their correlation with function. *J Struct Biol* **159**, 261-267 (2007).
91. Krishnamurthy, H., Piscitelli, C.L. & Gouaux, E. Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**, 347-355 (2009).
92. Singh, S.K. & Pal, A. Biophysical Approaches to the Study of LeuT, a Prokaryotic Homolog of Neurotransmitter Sodium Symporters. *Methods Enzymol* **557**, 167-198 (2015).
93. Colas, C., Ung, P.M. & Schlessinger, A. SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. *Medchemcomm* **7**, 1069-1081 (2016).
94. Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. & Iwata, S. Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli. *Science* **301**, 610-615 (2003).
95. Forrest, L.R. & Rudnick, G. The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. *Physiology (Bethesda)* **24**, 377-386 (2009).
96. Slotboom, D.J. Structural and mechanistic insights into prokaryotic energy-coupling factor transporters. *Nat Rev Microbiol* **12**, 79-87 (2014).
97. Mitchell, P. Osmochemistry of solute translocation. *Res Microbiol* **141**, 286-289 (1990).
98. Kumar, H., Kasho, V., Smirnova, I., Finer-Moore, J.S., Kaback, H.R. & Stroud, R.M. Structure of sugar-bound LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1784-1788 (2014).
99. Wang, H. & Gouaux, E. Substrate binds in the S1 site of the F253A mutant of LeuT, a neurotransmitter sodium symporter homologue. *EMBO Rep* **13**, 861-866 (2012).

100. Ryan, R.M. & Vandenberg, R.J. Elevating the alternating-access model. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 187-189 (2016).
101. Boudker, O., Ryan, R.M., Yernool, D., Shimamoto, K. & Gouaux, E. Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* **445**, 387-393 (2007).
102. Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E. & Michel, H. Structure of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* **435**, 1197-1202 (2005).
103. Coudray, N., S, L.S., Lasala, R., Zhang, Z., Clark, K.M., Dumont, M.E., Rohou, A., Beckstein, O. & Stokes, D.L. Structure of the SLC4 transporter Bor1p in an inward-facing conformation. *Protein Sci* **26**, 130-145 (2017).
104. Birch, J., Axford, D., Foadi, J., Meyer, A., Eckhardt, A., Thielmann, Y. & Moraes, I. The fine art of integral membrane protein crystallisation. *Methods* **147**, 150-162 (2018).
105. Baker, D. & Sali, A. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* **294**, 93-96 (2001).
106. Boyd, C.M. & Bubeck, D. Advances in cryoEM and its impact on beta-pore forming proteins. *Curr Opin Struct Biol* **52**, 41-49 (2018).
107. Majumder, P., Mallela, A.K. & Penmatsa, A. Transporters through the looking glass. An insight into the mechanisms of ion-coupled transport and methods that help reveal them. *J Indian Inst Sci* **98**, 283-300 (2018).
108. Dmitriev, O.Y., Lutsenko, S. & Muyldermans, S. Nanobodies as Probes for Protein Dynamics in Vitro and in Cells. *J Biol Chem* **291**, 3767-3775 (2016).
109. Lam, A.Y., Pardon, E., Korotkov, K.V., Hol, W.G.J. & Steyaert, J. Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from *Vibrio vulnificus*. *J Struct Biol* **166**, 8-15 (2009).
110. Broecker, J., Eger, B.T. & Ernst, O.P. Crystallogensis of Membrane Proteins Mediated by Polymer-Bounded Lipid Nanodiscs. *Structure* **25**, 384-392 (2017).
111. Chen, K.Y., Sun, J., Salvo, J.S., Baker, D. & Barth, P. High-resolution modeling of transmembrane helical protein structures from distant homologues. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003636 (2014).
112. Zhu, T., Cao, S., Su, P.C., Patel, R., Shah, D., Chokshi, H.B., Szukala, R., Johnson, M.E. & Hevener, K.E. Hit identification and optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis. *J Med Chem* **56**, 6560-6572 (2013).
113. Wen, P.C., Verhalen, B., Wilkens, S., McHaourab, H.S. & Tajkhorshid, E. On the origin of large flexibility of P-glycoprotein in the inward-facing state. *J Biol Chem* **288**, 19211-19220 (2013).
114. Kaback, H.R. A chemiosmotic mechanism of symport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1259-1264 (2015).
115. Montanari, F. & Ecker, G.F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction--Recent advances and future challenges. *Adv Drug Deliv Rev* **86**, 17-26 (2015).
116. Guler, G., Gartner, R.M., Ziegler, C. & Mantele, W. Lipid-Protein Interactions in the Regulated Betaine Symporter BetP Probed by Infrared Spectroscopy. *J Biol Chem* **291**, 4295-4307 (2016).
117. Rauch, C., Paine, S.W. & Littlewood, P. Can long range mechanical interaction between drugs and membrane proteins define the notion of molecular promiscuity? Application to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR). *Biochim Biophys Acta* **1830**, 5112-5118 (2013).
118. Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Wu, J. & Kaback, H.R. Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *Faseb j* **12**, 1281-1299 (1998).
119. Sorgen, P.L., Hu, Y., Guan, L., Kaback, H.R. & Girvin, M.E. An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14037-14040 (2002).
120. Kourkoulou, A., Pittis, A.A. & Diallinas, G. Evolution of substrate specificity in the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) protein family. *Microb Cell* **5**, 280-292 (2018).

121. Kryptou, E., Evangelidis, T., Bobonis, J., Pittis, A.A., Gabaldon, T., Scazzocchio, C., Mikros, E. & Diallinas, G. Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Mol Microbiol* **96**, 927-950 (2015).
122. Vitart, V., Rudan, I., Hayward, C., Gray, N.K., Floyd, J., Palmer, C.N., Knott, S.A., Kolcic, I., Polasek, O., Graessler, J., Wilson, J.F., Marinaki, A., Riches, P.L., Shu, X., Janicijevic, B., Smolej-Narancic, N., Gorgoni, B., Morgan, J., Campbell, S., Biloglav, Z., Barac-Lauc, L., Pericic, M., Klaric, I.M., Zgaga, L., Skaric-Juric, T., Wild, S.H., Richardson, W.A., Hohenstein, P., Kimber, C.H., Tenesa, A., Donnelly, L.A., Fairbanks, L.D., Aringer, M., McKeigue, P.M., Ralston, S.H., Morris, A.D., Rudan, P., Hastie, N.D., Campbell, H. & Wright, A.F. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* **40**, 437-442 (2008).
123. Sugihara, J., Smirnova, I., Kasho, V. & Kaback, H.R. Sugar recognition by CscB and LacY. *Biochemistry* **50**, 11009-11014 (2011).
124. Mohlmann, T., Bernard, C., Hach, S. & Ekkehard Neuhaus, H. Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biol (Stuttg)* **12 Suppl 1**, 26-34 (2010).
125. Chen, Y.J., Pornillos, O., Lieu, S., Ma, C., Chen, A.P. & Chang, G. X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18999-19004 (2007).
126. Saier, M.H., Jr., Reddy, V.S., Tsu, B.V., Ahmed, M.S., Li, C. & Moreno-Hagelsieb, G. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Res* **44**, D372-379 (2016).
127. Wong, F.H., Chen, J.S., Reddy, V., Day, J.L., Shlykov, M.A., Wakabayashi, S.T. & Saier, M.H., Jr. The amino acid-polyamine-organocation superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **22**, 105-113 (2012).
128. Chaliotis, A., Vlastaridis, P., Ntountoumi, C., Botou, M., Yaelis, V., Lazou, P., Tatsaki, E., Mossialos, D., Frillingos, S. & Amoutzias, G.D. NAT/NCS2-hound: a webserver for the detection and evolutionary classification of prokaryotic and eukaryotic nucleobase-cation symporters of the NAT/NCS2 family. *Gigascience* **7** (2018).
129. de Koning, H. & Diallinas, G. Nucleobase transporters (review). *Mol Membr Biol* **17**, 75-94 (2000).
130. Kryptou, E., Kosti, V., Amillis, S., Myriantopoulos, V., Mikros, E. & Diallinas, G. Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 transporter. *J Biol Chem* **287**, 36792-36803 (2012).
131. Patching, S.G. Recent developments in nucleobase cation symporter-1 (NCS1) family transport proteins from bacteria, archaea, fungi and plants. *J Biosci* **43**, 797-815 (2018).
132. Vlantı, A. & Diallinas, G. The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol Microbiol* **68**, 959-977 (2008).
133. Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N.G., Hadden, J.M., Sharples, D., Sansom, M.S., Iwata, S., Henderson, P.J. & Cameron, A.D. Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science* **328**, 470-473 (2010).
134. Suzuki, S. & Henderson, P.J. The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *J Bacteriol* **188**, 3329-3336 (2006).
135. Weyand, S., Shimamura, T., Beckstein, O., Sansom, M.S., Iwata, S., Henderson, P.J. & Cameron, A.D. The alternating access mechanism of transport as observed in the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *J Synchrotron Radiat* **18**, 20-23 (2011).
136. Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J.Y., Yoshida, Y., Ohta, K.Y. & Yuasa, H. Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. *J Biol Chem* **285**, 6522-6531 (2010).

137. Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., King, A.E., Cass, C.E. & Young, J.D. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* **447**, 735-743 (2004).
138. Yao, S.Y., Ng, A.M., Cass, C.E., Baldwin, S.A. & Young, J.D. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem* **286**, 32552-32562 (2011).
139. Pastor-Anglada, M. & Perez-Torras, S. Emerging Roles of Nucleoside Transporters. *Front Pharmacol* **9**, 606 (2018).
140. Pastor-Anglada, M., Urtasun, N. & Perez-Torras, S. Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Compr Physiol* **8**, 1003-1017 (2018).
141. Engel, K., Zhou, M. & Wang, J. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem* **279**, 50042-50049 (2004).
142. Al-Salabi, M.I. & de Koning, H.P. Purine nucleobase transport in amastigotes of *Leishmania mexicana*: involvement in allopurinol uptake. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3682-3689 (2005).
143. Natto, M.J., Wallace, L.J., Candlish, D., Al-Salabi, M.I., Coutts, S.E. & de Koning, H.P. *Trypanosoma brucei*: expression of multiple purine transporters prevents the development of allopurinol resistance. *Exp Parasitol* **109**, 80-86 (2005).
144. Girke, C., Arutyunova, E., Syed, M., Traub, M., Mohlmann, T. & Lemieux, M.J. High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7 (ENT7) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1850**, 1921-1929 (2015).
145. Wright, N.J. & Lee, S.Y. Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors. **26**, 599-606 (2019).
146. Patching, S.G., Baldwin, S.A., Baldwin, A.D., Young, J.D., Gallagher, M.P., Henderson, P.J. & Herbert, R.B. The nucleoside transport proteins, NupC and NupG, from *Escherichia coli*: specific structural motifs necessary for the binding of ligands. *Org Biomol Chem* **3**, 462-470 (2005).
147. Saier, M.H., Jr., Eng, B.H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D.A., Hutchinson, W.J., Jack, D.L., Lai, E.C., Liu, H.J., Nusinew, D.P., Omar, A.M., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Quan, J.A., Sliwinski, M., Tseng, T.T., Wachi, S. & Young, G.B. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 1-56 (1999).
148. Johnson, Z.L., Cheong, C.G. & Lee, S.Y. Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature* **483**, 489-493 (2012).
149. Botou, M., Lazou, P., Papakostas, K. & Lambrinidis, G. 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*. **108**, 204-219 (2018).
150. Niopek-Witz, S., Deppe, J., Lemieux, M.J. & Mohlmann, T. Biochemical characterization and structure-function relationship of two plant NCS2 proteins, the nucleobase transporters NAT3 and NAT12 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 3025-3035 (2014).
151. Jain, S., Showman, A.C. & Jewett, M.W. Molecular dissection of a *Borrelia burgdorferi* in vivo essential purine transport system. *Infect Immun* **83**, 2224-2233 (2015).
152. Landfear, S.M. Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* **10**, 483-493 (2011).
153. Liechti, G. & Goldberg, J.B. *Helicobacter pylori* relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis. *J Bacteriol* **194**, 839-854 (2012).
154. Lane, A.N. & Fan, T.W. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res* **43**, 2466-2485 (2015).
155. Murray, A.W. The biological significance of purine salvage. *Annu Rev Biochem* **40**, 811-826 (1971).
156. Cabrita, M.A., Baldwin, S.A., Young, J.D. & Cass, C.E. Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol* **80**, 623-638 (2002).



157. Inoue, K. Molecular Basis of Nucleobase Transport Systems in Mammals. *Biol Pharm Bull* **40**, 1130-1138 (2017).
158. Burzle, M., Suzuki, Y., Ackermann, D., Miyazaki, H., Maeda, N., Clemencon, B., Burrier, R. & Hediger, M.A. The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Mol Aspects Med* **34**, 436-454 (2013).
159. Pfaller, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* **125**, S3-13 (2012).
160. Sommer, M.O. & Dantas, G. Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr Opin Microbiol* **14**, 556-563 (2011).
161. Jain, S., Sutchu, S., Rosa, P.A., Byram, R. & Jewett, M.W. *Borrelia burgdorferi* harbors a transport system essential for purine salvage and mammalian infection. *Infect Immun* **80**, 3086-3093 (2012).
162. Elion, G.B. The purine path to chemotherapy. *Science* **244**, 41-47 (1989).
163. Hitchings, G.H. A biochemical approach to chemotherapy. *Drug Intell Clin Pharm* **16**, 843-848 (1982).
164. Sahasranaman, S., Howard, D. & Roy, S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* **64**, 753-767 (2008).
165. Kozmin, S.G., Stepchenkova, E.I., Chow, S.C. & Schaaper, R.M. A critical role for the putative NCS2 nucleobase permease YjcD in the sensitivity of *Escherichia coli* to cytotoxic and mutagenic purine analogs. *MBio* **4**, e00661-00613 (2013).
166. Sowers, L.C., Fazakerley, G.V., Eritja, R., Kaplan, B.E. & Goodman, M.F. Base pairing and mutagenesis: observation of a protonated base pair between 2-aminopurine and cytosine in an oligonucleotide by proton NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5434-5438 (1986).
167. Piccirilli, J.A., Krauch, T., Moroney, S.E. & Benner, S.A. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. *Nature* **343**, 33-37 (1990).
168. Schwarz, S., Siewert, B., Csuk, R. & Rauter, A.P. New antitumor 6-chloropurine nucleosides inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Eur J Med Chem* **90**, 595-602 (2015).
169. Farkas, W.R., Jacobson, K.B. & Katze, J.R. Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **781**, 64-75 (1984).
170. Yang, X.L., Sugiyama, H., Ikeda, S., Saito, I. & Wang, A.H. Structural studies of a stable parallel-stranded DNA duplex incorporating isoguanine:cytosine and isocytosine:guanine basepairs by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys J* **75**, 1163-1171 (1998).
171. Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E. & Scheiner, J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* **179**, 663-666 (1957).
172. Longley, D.B., Harkin, D.P. & Johnston, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330-338 (2003).
173. Bean, B. & Tomasz, A. Inhibitory effects and metabolism of 5-fluoropyrimidine derivatives in pneumococcus. *J Bacteriol* **106**, 412-420 (1971).
174. Itsko, M. & Schaaper, R.M. dGTP starvation in *Escherichia coli* provides new insights into the thymineless-death phenomenon. *PLoS Genet* **10**, e1004310 (2014).
175. Rogers, H.J. & Perkins, H.R. 5-Fluorouracil and mucopeptide biosynthesis by *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* **77**, 448-459 (1960).
176. Tomasz, A. & Borek, E. The mechanism of bacterial fragility produced by 5-fluorouracil: the accumulation of cell wall precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 324-327 (1960).
177. Tomasz, A. & Borek, E. The mechanism of an osmotic instability induced in *E. coli* K-12 by 5-fluorouracil. *Biochemistry* **1**, 543-552 (1962).

178. Tsukamura, M. In vitro susceptibility of mycobacteria, especially of *Mycobacterium intracellulare*, to 5-fluorouracil and pattern of development of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to the drug. *Microbiol Immunol* **23**, 427-429 (1979).
179. Karena, E., Tatsaki, E., Lambrinidis, G., Mikros, E. & Frillingos, S. Analysis of conserved NCS2 motifs in the *Escherichia coli* xanthine permease XanQ. *Mol Microbiol* **98**, 502-517 (2015).
180. Cohen, S.S., Flaks, J.G., Barner, H.D., Loeb, M.R. & Lichtenstein, J. THE MODE OF ACTION OF 5-FLUOROURACIL AND ITS DERIVATIVES. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 1004-1012 (1958).
181. Ahmad, S.I., Kirk, S.H. & Eisenstark, A. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **52**, 591-625 (1998).
182. Saxild, H.H. & Nygaard, P. Genetic and physiological characterization of *Bacillus subtilis* mutants resistant to purine analogs. *J Bacteriol* **169**, 2977-2983 (1987).
183. Diallinas, G. & Gournas, C. Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)* **2**, 363-372 (2008).
184. Faaland, C.A., Race, J.E., Ricken, G., Warner, F.J., Williams, W.J. & Holtzman, E.J. Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochim Biophys Acta* **1442**, 353-360 (1998).
185. Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F. & Hediger, M.A. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**, 70-75 (1999).
186. Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C. & Drevet, C. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J Biol Chem* **279**, 3132-3141 (2004).
187. Yu, J., Ge, J., Heuveling, J., Schneider, E. & Yang, M. Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5243-5248 (2015).
188. Alguel, Y., Amillis, S., Leung, J., Lambrinidis, G. & Capaldi, S. Structure of eukaryotic purine/H(+) symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. **7**, 11336 (2016).
189. Papakostas, K. & Frillingos, S. Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **287**, 15684-15695 (2012).
190. Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S. & Diallinas, G. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J Mol Biol* **350**, 499-513 (2005).
191. Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E. & Frillingos, S. Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the YgfO xanthine permease: ASN-325 binds and ALA-323 senses substrate. *J Biol Chem* **285**, 19422-19433 (2010).
192. Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix. *J Biol Chem* **281**, 39881-39890 (2006).
193. Yu, X., Yang, G., Yan, C., Baylon, J.L., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Hasegawa, K., Okumura, H., Wang, T., Tajkhorshid, E., Li, S. & Yan, N. Dimeric structure of the uracil:proton symporter UraA provides mechanistic insights into the SLC4/23/26 transporters. *Cell Res* **27**, 1020-1033 (2017).
194. Kourkoulou, A. & Grevias, P. Specific Residues in a Purine Transporter Are Critical for Dimerization, ER Exit, and Function. **213**, 1357-1372 (2019).
195. Pyle, E., Kalli, A.C., Amillis, S., Hall, Z., Lau, A.M., Hanyaloglu, A.C., Diallinas, G., Byrne, B. & Politis, A. Structural Lipids Enable the Formation of Functional Oligomers of the Eukaryotic Purine Symporter UapA. *Cell Chem Biol* **25**, 840-848.e844 (2018).

196. Papakostas, K., Botou, M. & Frillingos, S. Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* **288**, 36827-36840 (2013).
197. Kosti, V., Lambrinidis, G., Myrianthopoulos, V., Diallynas, G. & Mikros, E. Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. *PLoS One* **7**, e41939 (2012).
198. Kryptou, E., Lambrinidis, G., Evangelidis, T., Mikros, E. & Diallynas, G. Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Mol Microbiol* **93**, 129-145 (2014).
199. Burton, K. Adenine transport in *Escherichia coli*. *Proc Biol Sci* **255**, 153-157 (1994).
200. Botou, M., Yalelis, V., Lazou, P., Zantza, I., Papakostas, K., Charalambous, V., Mikros, E., Flemetakis, E. & Frillingos, S. Specificity profile of NAT/NCS2 purine transporters in *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti*. (2020).
201. Mansfield, T.A., Schultes, N.P. & Mourad, G.S. AtAzc1 and AtAzc2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **583**, 481-486 (2009).
202. Kose, M. & Schiedel, A.C. Nucleoside/nucleobase transporters: drug targets of the future? *Future Med Chem* **1**, 303-326 (2009).
203. de Koning, H.P., Bridges, D.J. & Burchmore, R.J. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 987-1020 (2005).
204. Sahin-Toth, M., Frillingos, S., Lengeler, J.W. & Kaback, H.R. Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 1116-1123 (1995).
205. Consler, T.G., Tsolas, O. & Kaback, H.R. Role of proline residues in the structure and function of a membrane transport protein. *Biochemistry* **30**, 1291-1298 (1991).
206. Carrasco, N., Herzlinger, D., Mitchell, R., DeChiara, S., Danho, W., Gabriel, T.F. & Kaback, H.R. Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4672-4676 (1984).
207. Karatza, P. & Frillingos, S. Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol* **22**, 251-261 (2005).
208. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59 (1989).
209. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 2006.0008 (2006).
210. Teather, R.M., Muller-Hill, B., Abrutsch, U., Aichele, G. & Overath, P. Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Mol Gen Genet* **159**, 239-248 (1978).
211. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580 (1983).
212. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
213. Kaback, H.R. The role of the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system in the transport of sugars by isolated membrane preparations of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **243**, 3711-3724 (1968).
214. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
215. Burnette, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203 (1981).

216. Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res* **43**, D261-269 (2015).
217. Tatusov, R.L., Koonin, E.V. & Lipman, D.J. A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637 (1997).
218. Grigoriev, I.V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., Kuo, A., Minovitsky, S., Nikitin, R., Ohm, R.A., Otilar, R., Poliakov, A., Ratnere, I., Riley, R., Smirnova, T., Rokhsar, D. & Dubchak, I. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res* **40**, D26-32 (2012).
219. Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I.V. & Dubchak, I. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res* **42**, D26-31 (2014).
220. Chen, I.A., Markowitz, V.M., Chu, K., Palaniappan, K., Szeto, E., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Andersen, E., Huntemann, M., Varghese, N., Hadjithomas, M., Tennessen, K., Nielsen, T., Ivanova, N.N. & Kyrpides, N.C. IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system. *Nucleic Acids Res* **45**, D507-d516 (2017).
221. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410 (1990).
222. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539 (2011).
223. Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. & Noble, W.S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202-208 (2009).
224. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M. & Barton, G.J. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191 (2009).
225. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-2729 (2013).
226. Letunic, I. & Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* **44**, W242-245 (2016).
227. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**, W296-w303 (2018).
228. Omasits, U., Ahrens, C.H., Muller, S. & Wollscheid, B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* **30**, 884-886 (2014).
229. Alcaraz, L.D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L.E., Souza, V., Herrera-Estrella, L. & Olmedo, G. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* **11**, 332 (2010).
230. Hall, B.G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* **30**, 1229-1235 (2013).
231. Harms, M.J. & Thornton, J.W. Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 360-366 (2010).
232. Martzoukou, O., Karachaliou, M., Yalellis, V., Leung, J., Byrne, B., Amillis, S. & Diallynas, G. Oligomerization of the UapA Purine Transporter Is Critical for ER-Exit, Plasma Membrane Localization and Turnover. *J Mol Biol* **427**, 2679-2696 (2015).

233. Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J Mol Biol* **313**, 765-774 (2001).
234. Kosti, V., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol Biol* **397**, 1132-1143 (2010).
235. Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol* **382**, 1121-1135 (2008).
236. Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J Mol Biol* **357**, 808-819 (2006).
237. Karena, E. & Frillingos, S. The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **286**, 39595-39605 (2011).
238. Amillis, S., Kosti, V., Pantazopoulou, A., Mikros, E. & Diallinas, G. Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J Mol Biol* **411**, 567-580 (2011).
239. Penterman, J., Abo, R.P., De Nisco, N.J., Arnold, M.F., Longhi, R., Zanda, M. & Walker, G.C. Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3561-3566 (2014).
240. Udvardi, M. & Poole, P.S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 781-805 (2013).
241. Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**, 2093-2105 (2003).
242. Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. & Puhler, A. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9889-9894 (2001).
243. Gamas, P., Brault, M., Jardinaud, M.F. & Frugier, F. Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For? *Trends Plant Sci* **22**, 792-802 (2017).
244. Cooper, J.B. & Long, S.R. Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *Plant Cell* **6**, 215-225 (1994).
245. Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C. & Sadowsky, M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**, 1307-1312 (2007).
246. Kisiala, A., Laffont, C., Emery, R.J. & Frugier, F. Bioactive cytokinins are selectively secreted by *Sinorhizobium meliloti* nodulating and nonnodulating strains. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 1225-1231 (2013).
247. Donaldson, G.P., Lee, S.M. & Mazmanian, S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**, 20-32 (2016).
248. Gao, B., Mohan, R. & Gupta, R.S. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 234-247 (2009).

249. Goncalves Pessoa, R.B., de Oliveira, W.F., Marques, D.S.C., Dos Santos Correia, M.T., de Carvalho, E. & Coelho, L. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microb Pathog* **130**, 81-94 (2019).
250. Hickman-Brenner, F.W., MacDonald, K.L., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Brenner, D.J. & Farmer, J.J., 3rd *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol* **25**, 900-906 (1987).
251. Kokou, F., Sasson, G. & Friedman, J. Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish. **4**, 2456-2465 (2019).
252. Rojo, D., Mendez-Garcia, C., Raczowska, B.A., Bargiela, R., Moya, A., Ferrer, M. & Barbas, C. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol Rev* **41**, 453-478 (2017).
253. Bratlie, M.S., Johansen, J., Sherman, B.T., Huang da, W., Lempicki, R.A. & Drablos, F. Gene duplications in prokaryotes can be associated with environmental adaptation. *BMC Genomics* **11**, 588 (2010).
254. Sinha, S.C., Krahn, J., Shin, B.S., Tomchick, D.R., Zalkin, H. & Smith, J.L. The purine repressor of *Bacillus subtilis*: a novel combination of domains adapted for transcription regulation. *J Bacteriol* **185**, 4087-4098 (2003).
255. Weng, M., Nagy, P.L. & Zalkin, H. Identification of the *Bacillus subtilis* pur operon repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7455-7459 (1995).
256. Choi, K.Y. & Zalkin, H. Structural characterization and corepressor binding of the *Escherichia coli* purine repressor. *J Bacteriol* **174**, 6207-6214 (1992).
257. Houlberg, U. & Jensen, K.F. Role of hypoxanthine and guanine in regulation of *Salmonella typhimurium* pur gene expression. *J Bacteriol* **153**, 837-845 (1983).
258. Dalal, F.R., Gots, R.E. & Gots, J.S. Mechanism of adenine inhibition in adenine-sensitive mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **91**, 507-513 (1966).
259. Levine, R.A. & Taylor, M.W. Mechanism of adenine toxicity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **149**, 923-930 (1982).
260. Moyed, H.S. Inhibition of the biosynthesis of pyrimidine portion of thiamine by adenosine. *J Bacteriol* **88**, 1024-1029 (1964).
261. Gawel, D., Fijalkowska, I.J., Jonczyk, P. & Schaaper, R.M. Effect of dNTP pool alterations on fidelity of leading and lagging strand DNA replication in *E. coli*. *Mutat Res* **759**, 22-28 (2014).
262. Itsko, M. & Schaaper, R.M. Suppressors of dGTP Starvation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **199** (2017).
263. Meng, L.M., Kilstrup, M. & Nygaard, P. Autoregulation of PurR repressor synthesis and involvement of purR in the regulation of purB, purC, purL, purMN and guaBA expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **187**, 373-379 (1990).
264. Hahn, M.W. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates. *J Hered* **100**, 605-617 (2009).
265. Matuschek, E., Ahman, J., Webster, C. & Kahlmeter, G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* **24**, 865-870 (2018).
266. Coffey, B.M. & Anderson, G.G. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods Mol Biol* **1149**, 631-641 (2014).
267. de Boer, N.K.H. Thiopurine Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: Making New Friends Should Not Mean Losing Old Ones. *Gastroenterology* **156**, 11-14 (2019).

268. Oancea, I., Movva, R., Das, I., Aguirre de Carcer, D., Schreiber, V., Yang, Y., Purdon, A., Harrington, B., Proctor, M., Wang, R., Sheng, Y., Lobb, M., Lourie, R., P, O.C., Duley, J.A., Begun, J. & Florin, T.H. Colonic microbiota can promote rapid local improvement of murine colitis by thioguanine independently of T lymphocytes and host metabolism. *Gut* **66**, 59-69 (2017).
269. Florin, T., Movva, R., Begun, J., Duley, J., Oancea, I. & Cuiv, P.O. Colonic thioguanine pro-drug: Investigation of microbiome and novel host metabolism. *Gut Microbes* **9**, 175-178 (2018).
270. Blake, D.P., Hillman, K., Fenlon, D.R. & Low, J.C. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J Appl Microbiol* **95**, 428-436 (2003).
271. Dautin, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins (Basel)* **2**, 1179-1206 (2010).
272. Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sephiri, S. & Krause, D.O. High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**, 669-675 (2007).
273. Liu, Y., Zhang, Y., Dong, P., An, R., Xue, C., Ge, Y., Wei, L. & Liang, X. Digestion of Nucleic Acids Starts in the Stomach. *Sci Rep* **5**, 11936 (2015).
274. Vester-Andersen, M.K., Mirsepasi-Lauridsen, H.C., Prosberg, M.V. & Mortensen, C.O. Increased abundance of proteobacteria in aggressive Crohn's disease seven years after diagnosis. **9**, 13473 (2019).
275. Wills, E.S., Jonkers, D.M., Savelkoul, P.H., Masclee, A.A., Pierik, M.J. & Penders, J. Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation. *PLoS One* **9**, e90981 (2014).
276. Atreya, I., Dhall, A., Dvorsky, R., Atreya, R., Henninger, C., Grun, M., Hofmann, U., Schaeffeler, E., Lopez-Posadas, R., Daehn, I., Zenker, S., Dobroni, M., Neufert, C., Billmeier, U., Zundler, S., Fritz, G., Schwab, M. & Neurath, M.F. Designer Thiopurine-analogues for Optimised Immunosuppression in Inflammatory Bowel Diseases. *J Crohns Colitis* **10**, 1132-1143 (2016).
277. Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A. & Gelfand, M.S. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **277**, 48949-48959 (2002).
278. Yoshida, K., Shindo, K., Sano, H., Seki, S., Fujimura, M., Yanai, N., Miwa, Y. & Fujita, Y. Sequencing of a 65 kb region of the Bacillus subtilis genome containing the lic and cel loci, and creation of a 177 kb contig covering the gnt-sacXY region. *Microbiology* **142** ( Pt 11), 3113-3123 (1996).
279. Yoshida, K., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y.H., Nakaura, Y. & Fujita, Y. Identification of additional TnrA-regulated genes of Bacillus subtilis associated with a TnrA box. *Mol Microbiol* **49**, 157-165 (2003).
280. Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680 (1994).
281. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-10890 (1988).

