



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ- ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Συστηματική εξελικτική μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στους βακτηριακούς μεταφορείς πουρινών-πυριμιδινών

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΑΤΣΑΚΗ

Βιολόγος MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ- ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Συστηματική εξελικτική μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και
εξειδίκευσης στους βακτηριακούς μεταφορείς πουρινών-πυριμιδινών**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΑΤΣΑΚΗ
Βιολόγος MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«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 της κ. Τατσάκη Αικατερίνης: 2-6-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 790α/1-7-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 4-7-2016

«Συστηματική εξελικτική μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στους βακτηριακούς μεταφορείς πουρινών-πυριμιδινών»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 982^α/28-9-2021

1. Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ
3. Διαλλινάς Γεώργιος, Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ
4. Χριστοφορίδης Σάββας, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Παπαμαρκάκη Θωμαΐς, Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Πολίτου Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Αμούτζιας Γρηγόριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 8-10-2021

Ιωάννινα 22-10-2021

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Πρόλογος

Η εκπόνηση μιας ερευνητικής εργασίας είναι μια προσπάθεια που διαρκεί χρόνια, δημιουργεί πλήθος εμπειριών και ποικίλα συναισθήματα. Η επιθυμία μου, για την εκπόνηση μιας τέτοιας εργασίας γεννήθηκε το 2012, όταν ολοκλήρωσα τις σπουδές μου στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών. Τότε, όμως, ένιωσα ότι δεν ήμουν ακόμη έτοιμη να διεξάγω την δική μου αυτόνομη έρευνα και θεώρησα σωστό να συμμετάσχω σε ένα μεταπτυχιακό πρόγραμμα που θα μου επέτρεπε να εμβαθύνω στο γνωστικό αντικείμενο του ενδιαφέροντος μου, αλλά και να αποκτήσω την απαραίτητη εργαστηριακή εμπειρία. Έτσι, όταν το 2015 ολοκλήρωσα το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Βιοτεχνολογία» δέχθηκα με μεγάλη χαρά την πρόταση του κ. Φριλίγγου για να ξεκινήσω τη Διδακτορική μου Διατριβή.

Η εργασία μου εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 2016-2021 και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2ος Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ). Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν με διάφορους τρόπους στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή της εργασίας κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη Διατριβή μου ως μέλος της ερευνητικής του ομάδας και κυρίως για την εμπιστοσύνη που έχει δείξει στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης και για την υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγησή του τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Εμμανουήλ Μικρό, Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον κ. Γεώργιο Διαλλινά, Καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την άριστη συνεργασία μας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας Σάββα Χριστοφορίδη, την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Θωμάϊδα Παπαμαρκάκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Αναστασία Πολίτου από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοπληροφορικής στη Μικροβιολογία Γρηγόριο Αμούτζια από

το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας Διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γρηγόριο Αμούτζια, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοπληροφορικής στη Μικροβιολογία από το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συμβολή του στις αναλύσεις βιοπληροφορικής της παρούσας μελέτης. Τον ευχαριστώ θερμά, γιατί, όποτε χρειάστηκα βοήθειά σε θέματα της ειδικότητας του, με μεγάλη προθυμία μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις του.

Ξεχωριστά θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω και τον κ. Εμμανουήλ Μικρό, Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και την ερευνητική του ομάδα για την πραγματοποίηση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Δρ. Κωνσταντίνο Κεσανόπουλο από το Εθνικό Κέντρο αναφοράς μηνιγγίτιδας που μας παραχώρησε το γονιδιωματικό DNA από το βακτηριακό στέλεχος *Neisseria meningitidis*.

Πολύ σημαντική ήταν και η συνεργασία μου με τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Μπότου και το διδάκτορα Βασίλη Γιαλελή για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν. Στην διδάκτορα Παναγιώτα Λάζου θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη φιλία της και τη συμβολή σε όλη τη διάρκεια τόσο των μεταπτυχιακών μου σπουδών, όσο και του διδακτορικού μου, αλλά πάνω από όλα να την ευχαριστήσω, γιατί παρά το δύσκολο πρόγραμμά της ήταν πάντα δίπλα μου όποτε τη χρειάστηκα.

Κατά τη διάρκεια περάτωσης της Διατριβής μου είχα τη χαρά να συνεργαστώ με την υποψήφια Διδάκτορα Ελένη Αναγνωστοπούλου, στο πλαίσιο της Μεταπτυχιακής της διατριβής και με την Αριάδνη Σμπούκη, στο πλαίσιο της πτυχιακής της εργασίας. Και οι δύο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της δουλειάς αυτής με ιδιαίτερο ενθουσιασμό. Τις ευχαριστώ θερμά για την εποικοδομητική μας συνεργασία.

Και, τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, στον πατέρα μου, Αναστάσιο που μου δίδαξε την αξία του να δουλεύεις σκληρά και να δίνεις τον καλύτερό εαυτό σου και στη μητέρα μου, Σωτηρία που με δίδαξε να συνδυάζω το πάθος με τη λογική, να μην ενθουσιάζομαι υπερβολικά όταν τα πράγματα πηγαίνουν καλά, αλλά και να μην απογοητεύομαι όταν πηγαίνουν άσχημα. Τους ευχαριστώ, γιατί με τη στήριξή τους μου δίδουν τη δυνατότητα να διεκδικώ τα όνειρά μου.

Αικατερίνη Α. Τατσάκη
Ιωάννινα, Οκτώβριος 2021

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	15
1.1. Διαμεμβρανικοί μεταφορείς	15
1.1.1. Είδη μεμβρανικών πρωτεϊνών-μεταφορέων	16
1.1.2. Μεταφορά υποστρώματος - Μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης.....	18
1.1.3. Δυσκολίες στη μελέτη των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου	22
1.1.4. Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων.....	24
1.1.4.1. Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2	26
1.1.4.1.1. Η δομή του μεταφορέα ουρακίλης <i>UraA</i>	30
1.1.4.1.2. Η δομή του μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού οξέος <i>UapA</i>	33
1.1.4.3 3. Σχέσεις δομής- λειτουργίας στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2- Η περίπτωση του μεταφορέα ξανθίνης <i>XanQ</i> της <i>E. coli</i>	36
1.2. Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών	40
1.2.1. Στρατηγικές για τη μελέτη των σχέσεων δομής- λειτουργίας των πρωτεϊνών: οριζόντια και κάθετη ανάλυση πρωτεϊνικών οικογενειών.....	40
1.2.2. Η εξελικτική στρατηγική της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών.....	43
1.2.3. Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών για την κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξέλιξης πρωτεϊνικών οικογενειών.	46
1.2.3.1. Εξέλιξη της εξειδίκευσης των υποδοχέων στεροειδών	49
1.2.3.2. Ανασύσταση μιας προγονικής κινάσης για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης ενός σύγχρονου αντικαρκινικού φαρμάκου	52
1.2.4. Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών σε μεμβρανικούς μεταφορείς.....	54
1.2.4.1. Προγονική λειτουργία και διαφοροποίηση ενός μεταφορέα καρβοξυλικού οξέος.....	54
1.2.4.2. Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών στους μεταφορείς νουκλεοτιδίων NTT.....	56
1.5. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	59
Υλικά και Μέθοδοι	61
2.1. Όργανα εργαστηρίου.....	61
2.2. Χημικά Αναλώσιμα.....	63

2.3. Διαλύματα	66
2.4. Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	68
2.5. Βιοπληροφορική και φυλογενετική ανάλυση	75
2.6. Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών (ASR)	77
2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση και εκκινητές	78
2.7.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	78
2.7.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (Overlap/extension) ...	80
2.8. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης	85
2.8.1. Παρασκευή πηγματος αгарόζης	85
2.8.2. Ηλεκτροφόρηση.....	85
2.8.3. Οπτικοποίηση του αποτελέσματος.....	85
2.9. Τεχνικές υποκλωνοποίησης: Περιοριστική πέψη (restriction)-Ανασύνδεση (ligation)	86
2.10. Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού.....	88
2.11. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	88
2.12. Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε μικρή κλίμακα (10mL)	89
2.13. Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών.....	90
2.14. Αναλύσεις πρωτεϊνών	90
2.14.1. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	90
2.14.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS - πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	91
2.14.3. Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	91
2.15. Δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)	92
2.15.1. Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς	92
2.15.2. Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση.....	93
2.15.3. Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς παρουσία μη σημασμένων αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων	94
2.15.4. Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων.....	94
2.15.5. Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων παρουσία υποστρώματος.....	95
2.15.6. Επίδραση του πρωτονιοφόρου CCCP (καρβονυλο-κυαναμιδο- χλωροφαινυλο-υδραζόνιο)	96
Αποτελέσματα.....	97
3.1. Κλάδος των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης.....	100

3.1.1. Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικής αλληλουχίας στον κλάδο των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης.....	100
3.1.2. Ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας <i>AncR1</i>	104
3.2. Κλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος	108
3.2.1. Υποκλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης-ουρικού οξέος.....	112
3.2.1.1. Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικής αλληλουχίας στον υποκλάδο των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης-ουρικού οξέος.....	112
3.2.1.2. Ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας <i>AncXUacT</i>	117
3.2.2. Υποκλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης.....	121
3.2.2.1 Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικών αλληλουχιών στον υποκλάδο των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης.....	121
3.2.2.1.1. Ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας <i>AncXanP</i> , κοινού προγόνου του κλάδου <i>XanQ/XanP</i>	124
3.2.2.1.2. Μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο της προγονικής αλληλουχίας <i>AncXanP</i>	127
3.2.2.2. Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικής αλληλουχίας στον κλάδο <i>XanQ</i>	129
3.2.2.2.1. Λειτουργική ανάλυση του <i>AncXanQ</i> : ικανότητα να μεταφέρει και γουανίνη εκτός από ξανθίνη.....	132
3.2.2.2.2. Ο συνδυασμός 5 μεταλλαγών μακριά από το κέντρο δέσμευσης περιορίζει την εξειδίκευση του <i>AncXanQ</i> στην αναγνώριση της ξανθίνης.....	140
3.2.2.2.3. Μια σύγχρονη περμεάση του κλάδου <i>XanQ</i> διατηρεί το προφίλ εξειδίκευσης του <i>AncXanQ</i>	144
3.2.2.2.4. Ο ρόλος της θέσης Ser/Gly 377 στην εξειδίκευση	153
3.2.2.2.4.1. Η παρουσία της Gly στη θέση 377 είναι ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση του <i>XanQ</i>	153
3.2.2.2.4.2. Η επαναφορά της Gly στη θέση 377 δεν είναι ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση του <i>AncXanQ</i> - 5M.....	158
3.2.2.2.4.3. Κανένα άλλο μετάλλαγμα μονής αντικατάστασης πέραν του S377G δε μπορεί να διευρύνει το προφίλ εξειδίκευσης του <i>XanQ</i>	161
3.2.2.2.4.4. Η επίδραση της αλλαγής S377G στη διεύρυνση της εξειδίκευσης του <i>XanQ</i> καταστέλλεται από επιστατικές αλληλεπιδράσεις με τις G27S και/ή S312T.....	165

3.2.2.2.4.5. Η εισαγωγή της Ser στη θέση 377 στο υπόβαθρο των περμεασών ξανθίνης/γουανίνης δεν είναι επαρκής για την αλλαγή της εξειδίκευσης.....	172
3.2.2.2.4.6. Στο υπόβαθρο του <i>AncXanQ</i> η εξειδίκευση για την ξανθίνη δε σχετίζεται με την αλλαγή <i>S27G</i>	177
Συζήτηση	183
4.1. Η ευρεία εξειδίκευση ουρακίλης/θυμίνης εμφανίζεται κατά την εξέλιξη σε μια μικρή ομάδα ορθολόγων από εντεροβακτήρια.....	185
4.2. Η διπλή εξειδίκευση για οξειδωμένες πουρίνες έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης-ουρικού οξέος.....	187
4.3. Οι σύγχρονοι μεταφορείς ξανθίνης εξελίχθηκαν από ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορείς ξανθίνης/γουανίνης.	190
4.3.1. Μεταφορείς με ικανότητα μεταφοράς γουανίνης ανιχνεύονται για πρώτη φορά στον κλάδο <i>XanQ/UapA</i>	191
4.3.2. Ένα ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2 μπορεί να μεταφέρει τόσο ξανθίνη όσο και γουανίνη.....	192
4.3.3. Κατάλοιπα εκτός του κέντρου δέσμευσης διαμορφώνουν την εξέλιξη της εξειδίκευσης στον κλάδο <i>XanQ</i>	196
4.4. Συμπεράσματα–Προοπτικές.....	200
Περίληψεις	203
Βιβλιογραφία	209
Παραρτήματα	231

Συντμήσεις

BAD (biotin acceptor domain): περιοχή δέσμευσης βιοτίνης

BSA (Bovine Serum Albumin): Αλβουμίνη ορού βοός

DMSO (dimethyl sulfoxide): διμεθυλο - σουλφοξείδιο

DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

EDTA ethylene diamino-tetra-acetic acid

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

LacY- epitope επίτοπος LacY – αλληλουχία του καρβοξυτελικού

δωδεκαπεπτιδίου της διαπεράσης λακτόζης LacY

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

LB θρεπτικό υλικό Luria –Bertani ή Luria Broth

NCS (Nucleobase-Cation Symporter): συμμεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων – κατιόντων

NEM (N-ethylmaleimide): N-αιθυλμηλεϊμίδιο

PCR (polymerase chain reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

pH ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξωνίου $[H_3O^+]$ ενός διαλύματος

PMS (phenazinemethosulphate): μεθοσουλφονικό φαιναζίνη

PVDF (polyvinylidene difluoride): διφθοριούχο πολύ-βινυλιδένιο

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis):

ηλεκτροφόρηση επί πήγματος πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθειϊκού νατρίου

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

TM (transmembrane segment): διαμεμβρανικό τμήμα

wt (wild type): φυσικού τύπου

1

Εισαγωγή

1.1 Διαμεμβρανικοί μεταφορείς

Οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς επιτελούν μία ουσιώδη λειτουργία σε όλα τα κυτταρικά συστήματα, ελέγχοντας την μετακίνηση διαλυτών ουσιών και ιόντων διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών. Είναι απαραίτητοι σε διεργασίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η νευροδιαβίβαση, η κυτταρική επικοινωνία, η πρόσληψη ή απομάκρυνση φαρμάκων από το κύτταρο και για τη ρύθμιση της εσωτερικής ομοιοστασίας των κυττάρων, την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον τους και με άλλα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες (κυστική ίνωση, υπερουριχαιμία, διαταραχές νευροδιαβίβασης, διαβήτης, εγκεφαλική συμφόρηση, καρκίνος), στην ανθεκτικότητα έναντι

φαρμάκων (πρωτεΐνες MDR), και στην στόχευση μερικών από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα φάρμακα (fluoxetine, omeprazol, furosemide, lidocaine) (Cézar-Razquin *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015; Nigam, 2015; Wong *et al.*, 2014). Επίσης, οι μικροβιακοί διαμεμβρανικοί μεταφορείς έχουν σημαντικές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία (Kell *et al.*, 2015), είναι σημαντικοί στόχοι ανάπτυξης φαρμάκων σε αυξοτροφικά παθογόνα βακτήρια (Jain *et al.*, 2015; Herbert *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2015; Liechti and Goldberg, 2013) ή πρωτόζωα (Lanfear, 2011; De Koning *et al.*, 2005), ενώ η μελέτη των συστημάτων διαμεμβρανικής μεταφοράς στα βακτήρια του μικροβιώματος του ανθρώπου μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση των μεταβολικών αλληλεπιδράσεων και αλληλεξαρτήσεων κατά την απορρόφηση σημαντικών μεταβολιτών, βιταμινών ή φαρμάκων και στην δυνατότητα ουσιαστικής βελτίωσης αντικαρκινικών ή άλλων θεραπευτικών σχημάτων λαμβάνοντας υπόψη, για παράδειγμα, το μικροπεριβάλλον των καρκινικών όγκων (Iida *et al.*, 2013; Vande *et al.*, 2014; Degnan *et al.*, 2014; Genee *et al.*, 2016).

1.1.1 Είδη μεμβρανικών πρωτεϊνών-μεταφορέων

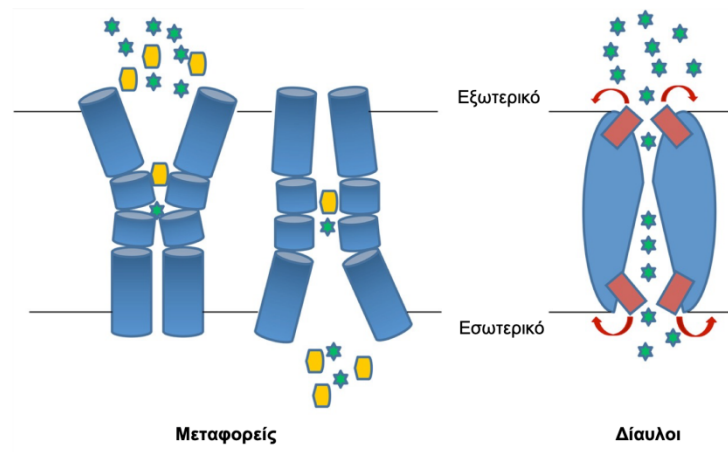
Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς σύμφωνα με το διεθνές σύστημα φυλογενετικής λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας (Transporter Classification, TC system) (<http://www.tcdb.org>) (Saier *et al.*, 2021) ταξινομούνται σε δύο γενικές κατηγορίες: τους **διαύλους** (channels) και τους **μεταφορείς, περμεάσες ή πρωτεΐνες-φορείς** (transporters, permeases, carriers). Οι δύο κατηγορίες πρωτεϊνών-μεταφορέων μοιράζονται αρκετά κοινά χαρακτηριστικά, όπως η εξειδίκευση και η εκλεκτικότητα, δευτεροταγείς δομές που απαρτίζονται από αρκετές α- έλικες και στοιχεία που ρυθμίζουν την τοπολογία και τη λειτουργικότητά τους, αλλά έχουν θεμελιώδεις διαφορές στο μηχανισμό λειτουργίας τους. Οι **διάυλοι** δημιουργούν ανοιχτούς πόρους στο εσωτερικό της μεμβράνης επιτρέποντας τη διέλευση κυρίως ιόντων ή μικρών διαλυτών ουσιών (π.χ. νερό, ουρία, αμμώνιο ή γλυκερόλη). Οι διάυλοι σχηματίζουν έναν συνεχή πόρο, ο οποίος δεν είναι μονίμως ανοικτός, αλλά, μπορεί επιλεκτικά να ανοίγει και να κλείνει σε απόκριση ενός χημικού σήματος. Σε αντίθεση με τους μεταφορείς, ένας διάυλος μπορεί να είναι ανοιχτός και στις δύο πλευρές μιας μεμβράνης ταυτόχρονα (**Εικόνα 1.1**). Όταν ένας διάυλος είναι ανοικτός ένα ή περισσότερα μόρια μπορούν να διέλθουν σύμφωνα με τη βαθμίδωση συγκέντρωσης. Έτσι, οι διάυλοι επιτελούν πάντα διευκολυνόμενη διάχυση, δηλαδή δεν συσσωρεύουν αλλά απλώς εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις ιόντων ή μικρομορίων εκατέρωθεν της μεμβράνης (equilibrative transport) (Diallinas, 2014).

Οι **μεταφορείς** είναι πολυτοπικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως τοπολογικά ένζυμα, δηλαδή καταλύουν τη μεταφορά υποστρώματων από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Περιλαμβάνουν μία μόνο θέση δέσμευσης υποστρώματος που αλληλεπιδρά ειδικά με ένα μόριο υποστρώματος σε κάθε κύκλο μεταφοράς. Συνεπώς, υπακούουν, στις περισσότερες περιπτώσεις, στην θεωρία των Michaelis-Menten και χαρακτηρίζονται από την εξειδίκευση προς το υπόστρωμα, τη συγγένεια προς το υπόστρωμα (K_m), την ικανότητα μεταφοράς και τη μέγιστη ταχύτητα μεταφοράς (V_{max}). Οι μεταφορείς δημιουργούν δυναμικά ενεργά κέντρα μέσα στη μεμβράνη που είναι προσβάσιμα μόνο από την μία πλευρά της μεμβράνης κάθε φορά, μέσω αλλαγών διαμόρφωσης. Με άλλα λόγια, οι μεταφορείς δεν περιέχουν συνεχή ανοιχτό πόρο προσβάσιμο και από τις δύο πλευρές μιας μεμβράνης σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες-διαύλους (**Εικόνα 1.1**). Πρόκειται για μεμβρανικές πρωτεΐνες με πολλά διαμεμβρανικά τμήματα (TMs) συνήθως 10-14, που οργανώνονται γενικά σε δύο δομικές περιοχές (domains), μεταξύ των οποίων σχηματίζεται το ενεργό κέντρο (κέντρο πρόσδεσης). Τα διαμεμβρανικά τμήματα ενώνονται μεταξύ τους με σχετικά μικρά, υδρόφιλα τμήματα, τους βρόχους (loops) (Diallinas, 2014).

Οι μεταφορείς μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις **διευκολυνόμενης διάχυσης** (facilitated diffusion), σε αυτή την περίπτωση αναφέρονται και ως **μονομεταφορείς** (uniporters), αλλά και αντιδράσεις **ενεργού μεταφοράς** (active transport) που στηρίζονται στη λειτουργία ενός μηχανισμού σύζευξης μεταξύ διαμεμβρανικής μεταφοράς υποστρώματος και μιας συγκεκριμένης διεργασίας παραγωγής ενέργειας. Στην περίπτωση που η ενέργεια παρέχεται άμεσα από μια πρωτογενή πηγή ενέργειας (π.χ. μια χημική αντίδραση, όπως είναι η υδρόλυση του ATP) οι μεταφορείς ονομάζονται πρωτεΐνες **πρωτογενούς ενεργού μεταφοράς** (primary active transporters). Όταν η ενέργεια παρέχεται έμμεσα από μια δευτερογενή πηγή ενέργειας (κατά κανόνα μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων H^+ ή Na^+), ονομάζονται πρωτεΐνες **δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς** (secondary active transporters). Οι μεταφορείς ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου μπορούν να λειτουργήσουν ως **συμμεταφορείς** (symporters), που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς την ίδια κατεύθυνση, και ως **αντιμεταφορείς** (antiporters) που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς διαμετρικά αντίθετες κατευθύνσεις (Yan, 2017).

Το κεντρικό μοτίβο λειτουργίας των μεταφορέων είναι η **εναλλασσόμενη πρόσβαση** (alternating access), δηλαδή το ενεργό κέντρο «στρέφεται» διαδοχικά προς την εσωτερική και την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης με διαμορφωτικές αλλαγές που επάγονται από την

πρόσδεση του υποστρώματος (Kaback, 2015). Για την εναλλασσόμενη πρόσβαση, κεντρικό ρόλο έχουν οι κινήσεις ανάμεσα στις δύο δομικές περιοχές (two-domain mechanisms) σε συνδυασμό με τοπικές αναδιατάξεις δομικών στοιχείων που ελέγχουν την πρόσβαση προς το ενεργό κέντρο από την εσωτερική ή την εξωτερική πλευρά (gating) (Drew and Boudker, 2016), όπως περιγράφεται αναλυτικά στην επόμενη ενότητα.

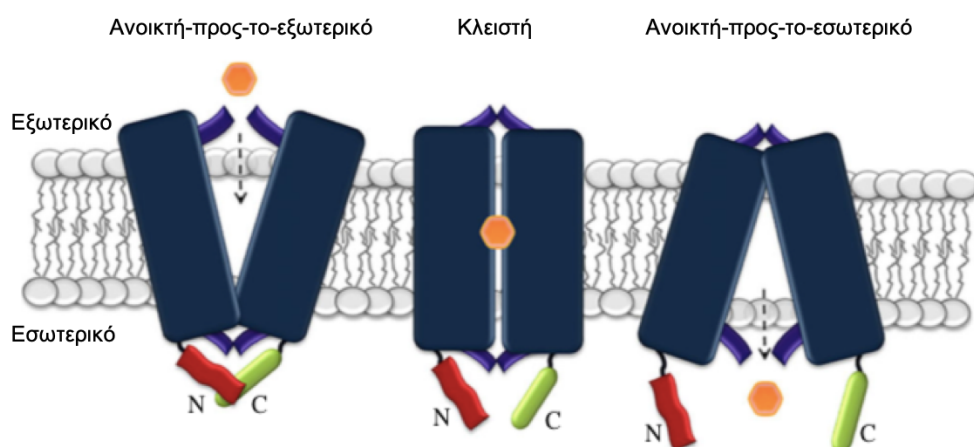


Εικόνα 1.1. Μεταφορείς και διάυλοι. Αριστερά: ένας μεταφορέας έχει μία θέση πρόσδεσης με το υπόστρωμα (εμφανίζεται ως κίτρινο πεντάγωνο) ελεύθερη προς τη μία ή την άλλη πλευρά της μεμβράνης. Η δέσμευση του υποστρώματος προκαλεί μεταβολή της διαμόρφωσης, η οποία εκθέτει τη θέση πρόσδεσης στην αντίθετη πλευρά της μεμβράνης, όπου θα απελευθερωθεί τελικά το υπόστρωμα (μοντέλο εναλλασσόμενης πρόσβασης-alternating access). Η μεταφορά ιόντων (εμφανίζονται ως πράσινα αστέρια) μπορεί να γίνεται προς την ίδια, ή προς την αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με την μεταφερόμενη ουσία. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου μεταφοράς, το δεσμευμένο μόριο υποστρώματος δεν εκτίθεται ποτέ και στις δύο πλευρές της μεμβράνης ταυτόχρονα.. Δεξιά: ένας διάυλος σχηματίζει έναν δυνητικά συνεχή πόρο, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις αυτός ο πόρος ελέγχεται από «μοριακά» φίλτρα διαλογής (selectivity filters) (εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα) και όχι από την εναλλαγή διαμορφώσεων. Μόλις ενεργοποιηθεί ή ανοίξει, ένας διάυλος επιτρέπει τη συνεχή μετακίνηση αρκετών μορίων υποστρώματος (που εμφανίζονται ως πράσινα αστέρια), τα οποία είναι κυρίως ιόντα ή μικρές πολικές ενώσεις και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης ταυτόχρονα (Diallinas, 2014).

1.1.2 Μεταφορά υποστρώματος - Μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης

Ο τρόπος δράσης των περισσότερων διαμεμβρανικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου, βασίζεται στο μοντέλο της εναλλασσόμενης-πρόσβασης (**alternating-access model**), το οποίο επιτρέπει τη διαμορφωτική μετάβαση του μεταφορέα μεταξύ καταστάσεων στις οποίες η θέση δέσμευσης του υποστρώματος εκτίθεται σε αντίθετες πλευρές της μεμβράνης

με εναλλασσόμενο τρόπο (Kaback, 2015). Η γενική περιγραφή του μοντέλου περιλαμβάνει διακριτά στάδια διαμορφωτικών αλλαγών τα οποία υφίσταται ο μεταφορέας προκειμένου να ολοκληρώσει ένα κύκλο μεταφοράς (**Εικόνα 1.2**). Σύμφωνα με το μοντέλο της εναλλασσόμενης-πρόσβασης ο μεταφορέας είναι προσβάσιμος ή ανοικτός-προς-την-περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης (**outward open**) προκειμένου να δεσμεύσει το υπόστρωμα, στη συνέχεια μέσω ενός ενδιάμεσου σταδίου κατά το οποίο είναι μη προσβάσιμος ή κλειστός και ως προς τις δύο πλευρές της μεμβράνης (**occluded**), απελευθερώνει το υπόστρωμα στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης (**inward open**) (**Εικόνα 1.2**). Τέλος, απαιτείται επαναφορά στην αρχική, ανοικτή-προ-το εξωτερικό του κυττάρου διαμόρφωση, για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος λειτουργίας (Kaback, 2015).



Εικόνα 1.2. Τρεις διακριτές διαμορφώσεις των μεταφορέων. Στην πρώτη διαμόρφωση ο μεταφορέας είναι ανοικτός προς τα έξω (*outward facing*), μετά την πρόσδεση του υποστρώματος αλλάζει η διαμόρφωση του σε κλειστή και ως προς τις δύο πλευρές της μεμβράνης (*occluded*), και στην τρίτη διαμόρφωση ο μεταφορέας είναι ανοικτός προς τα μέσα (*inward facing*), επιτρέποντας την αποσύνδεση του υποστρώματος (Mikros and Diallinas, 2019).

Για την περιγραφή της εναλλαγής μεταξύ αυτών των διαμορφώσεων που επιτρέπουν την εναλλασσόμενη πρόσβαση του ενεργού κέντρου, έχουν προταθεί τρεις ξεχωριστοί μηχανισμοί εναλλασσόμενης πρόσβασης, οι οποίοι σχετίζονται με την δομική διαμόρφωση των μεταφορέων (Drew and Boudker, 2016) (**Εικόνα 1.3**):

(i) Ο **μηχανισμός «διακόπτη» (rocker switch)**, στον οποίο έντονες αλλαγές διαμόρφωσης που επάγονται από την πρόσδεση υποστρώματος στην μεσεπιφάνεια μεταξύ δύο σχετικά συμμετρικών δομικών περιοχών (*domains*) σε συνδυασμό με τοπικές αναδιατάξεις απλών

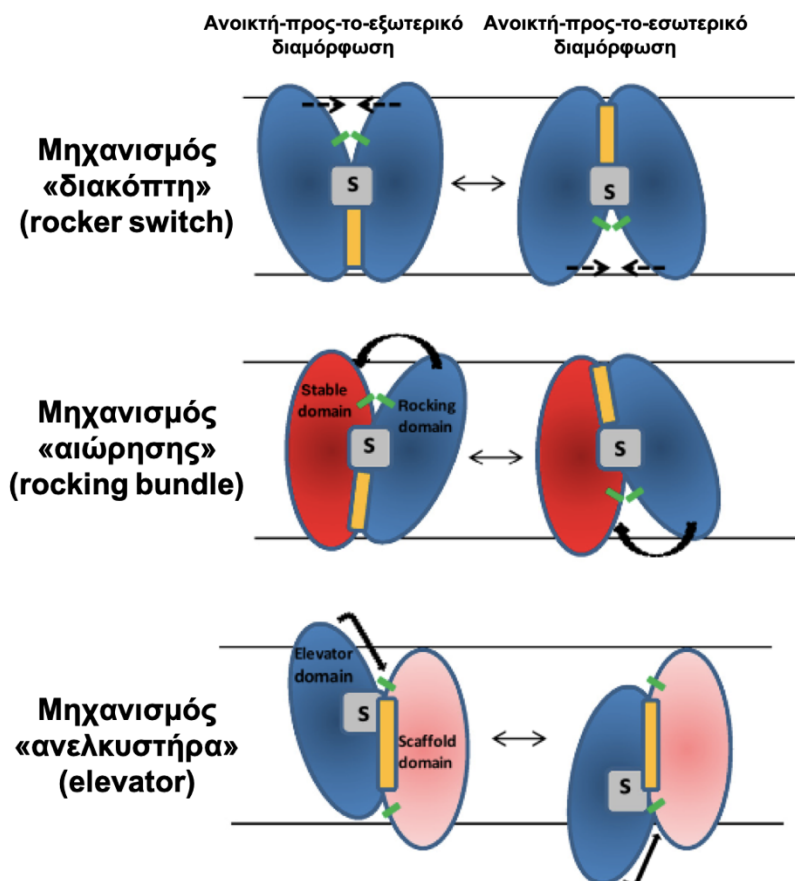
δομικών στοιχείων ελέγχουν την έξοδο ή είσοδο προς το κέντρο δέσμευσης από την εσωτερική ή την εξωτερική πλευρά (gating) (**Εικόνα 1.3**, άνω πάνελ). Ο μηχανισμός αυτός έχει προταθεί κυρίως για τους μεταφορείς της υπεροικογένειας MFS (Major Facilitator Superfamily) που λειτουργούν με συμμεταφορά ιόντων, αλλά και με διευκολυνόμενη διάχυση (Yan, 2015), βάσει των κρυσταλλικών δομών που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα.

(ii) Ο μηχανισμός «**αιώρησης**» (**rocking bundle**), θεωρεί ότι βασικό ρόλο έχει η κίνηση της μίας από τις δύο δομικές περιοχές γύρω από την άλλη με την οποία εξασφαλίζεται η εναλλασσόμενη πρόσβαση του κέντρου δέσμευσης, με αλλαγές διαμόρφωσης που είναι λιγότερο εκτενείς από ό,τι στον μηχανισμό «διακόπτη» (**Εικόνα 1.3**, μεσαίο πάνελ). Το μοντέλο αυτό σχετίζεται με πιο σύνθετα στοιχεία ελέγχου της πρόσβασης (gating) και πιθανόν πιο αυστηρούς περιορισμούς στην σύζευξη της μεταφοράς υποστρώματος και ιόντος (ion coupling). Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταφορέα που χρησιμοποιεί αυτό το μηχανισμό είναι ο συμμεταφορέας αμινοξέων/ Na^+ LeuT της οικογένειας NSS (Neurotransmitter Sodium Symporter) (Li and Tajkhorshid, 2019), καθώς και άλλοι μεταφορείς της υπεροικογένειας APC (Amino acid- Polyamine- Cation).

(iii) Ο μηχανισμός «**ανελκυστήρα**» (**elevator**), στο οποίο η μία από τις δύο δομικές περιοχές (core domain ή transport domain) ολισθαίνει πάνω στην άλλη (scaffold ή gate domain) οδηγώντας ουσιαστικά το υπόστρωμα έως τη θέση του κέντρου δέσμευσης στη μεσεπιφάνεια των δύο δομικών περιοχών και η σύζευξη με την διαμεμβρανική μετακίνηση γίνεται με το κλείσιμο των αντίστοιχων σημείων ελέγχου (gates) που πιθανόν αίρουν τους στερεοχημικούς περιορισμούς και επιτρέπουν στο υπόστρωμα να κινηθεί προς την απέναντι πλευρά (Drew and Boudker, 2016; Chang *et al.*, 2019) (**Εικόνα 1.3**, κάτω πάνελ). Αρκετοί μεταφορείς χρησιμοποιούν το μηχανισμό «ανελκυστήρα» (Garaeva and Slotboom, 2020), όπως ο συμμεταφορέας ασπαρτικού/ Na^+ Glt_{Ph} της οικογένειας EAAT (Excitatory Amino Acid Transporter) (Boudker *et al.*, 2007; Yernool *et al.*, 2004), αλλά και οι μεταφορείς ουρακίλης/ H^+ UraA (Yu *et al.*, 2017) και ξανθίνης-ουρικού οξέος/ H^+ UapA (Alguet *et al.*, 2016; Diallinas 2021) της οικογένειας NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporters/Nucleobase:Cation Symporters-2), όπως περιγράφεται σε επόμενες ενότητες (βλ. ενότητες 1.1.4.3.1 και 1.1.4.3.2, αντίστοιχα). Σε όλες τις περιπτώσεις, όπου προτείνεται ο μηχανισμός «ανελκυστήρα» οι μεταφορείς σχηματίζουν διμερή ή ολιγομερή μέσω αλληλεπίδρασης των δομικών περιοχών scaffold.

Ωστόσο, η κατανόηση των μοριακών αυτών μηχανισμών είναι ακόμη ελλιπής, καθώς οι πρώτες δομικές-λειτουργικές αναλύσεις περμεασών σε υψηλή ευκρίνεια εμφανίσθηκαν στη βιβλιογραφία σχετικά πρόσφατα (Drew and Boudker, 2016; Yan, 2015; Quistgaard *et al.*,

2016; Alguet *et al.*, 2016). Αυτό μπορεί να αντανάκλα εν μέρει, στις δυσκολίες στη μελέτη των διαμεμβρανικών μεταφορέων, όπως περιγράφεται στην ενότητα που ακολουθεί.



Εικόνα 1.3. Μηχανισμοί εναλλασσόμενης-πρόσβασης (Alternating-access mechanisms). Οι τρεις κύριοι μηχανισμοί για την εναλλαγή των μεταφορέων από την ανοικτή προς τα έξω στην ανοικτή προς τα μέσα διαμόρφωση. **Μηχανισμός «διακόπτη» (rocker-switch)** (Άνω πάνελ): Δύο δομικά παρόμοιες περιοχές (μπλε) κινούνται για να παρέχουν πρόσβαση ή απελευθέρωση των υποστρωμάτων (S) από κάθε πλευρά της μεμβράνης. Η θέση δέσμευσης του υποστρώματος διαμορφώνεται από κατάλοιπα που βρίσκονται και στις δύο περιοχές. **Μηχανισμός «αιώρησης» (rocking-bundle)** (Μεσαίο πάνελ): Η μία από τις δύο δομικές περιοχές (rocking domain) (μπλε) κινείται γύρω από την άλλη που είναι σταθερή (stable domain) (κόκκινο), εξασφαλίζοντας την προσβασιμότητα και την απελευθέρωση του υποστρώματος. Η θέση δέσμευσης του υποστρώματος δημιουργείται από κατάλοιπα που βρίσκονται στη διεπαφή και των δύο δομικών περιοχών. **Μηχανισμός «ανεγκυστήρα» (elevator)** (Κάτω πάνελ): Η μία από τις δύο δομικές περιοχές (elevator domain) (μπλε), η οποία φιλοξενεί τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, ολισθαίνει πάνω στην άλλη που παραμένει άκαμπτη (scaffold domain) (ροζ), ώστε να μετατοπιστεί το υπόστρωμα. Και στους τρεις μηχανισμούς συγκεκριμένες δομικές περιοχές (Dynamic domains occluding transport), που απεικονίζονται ως κίτρινοι ράβδοι, λειτουργούν ως φραγμοί για να αποφευχθεί η διαρροή του υποστρώματος σε λάθος κατεύθυνση. Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις, η μεταφορά μπορεί να περιλαμβάνει δράση που προκαλείται από το υπόστρωμα από πύλες ελέγχου ή μοριακά «φίλτρα»

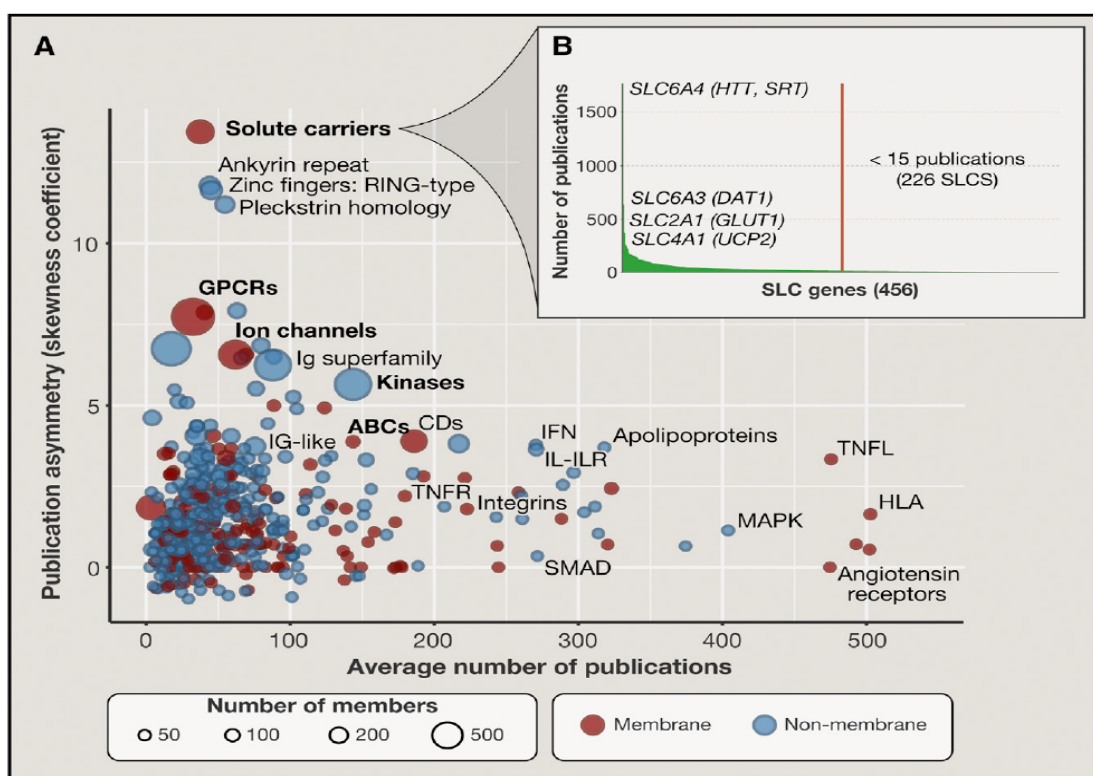
διαλογής (*gating elements*) που υπάρχουν πάνω ή κάτω από τη θέση δέσμευσης υποστρώματος (απεικονίζονται ως πράσινοι ράβδοι) (Diallinas, 2021).

1.1.3 Δυσκολίες στη μελέτη των ενεργητικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου

Παρά τον κεντρικό ρόλο των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην επιβίωση και εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς ως σύνολο παραμένουν μία από τις λιγότερο μελετημένες ομάδες πρωτεϊνών σε σχέση με άλλες ομάδες (César-Razquin *et al.*, 2015). Στα Βακτήρια, 75,7% των γονιδίων που κωδικοποιούν για διαμεμβρανικούς μεταφορείς αναφέρονται στις βάσεις δεδομένων ως «άγνωστης» λειτουργίας (Elbourne *et al.*, 2017). Ακόμη και στην *Escherichia coli*, όπου οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς αποτελούν το 12,6% των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs), το 53% αυτών δεν έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά (Elbourne *et al.*, 2017). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπου για διαμεμβρανικούς μεταφορείς κωδικοποιούν το 10% περίπου των γονιδίων, το 50% από αυτά δεν έχουν μελετηθεί (César-Razquin *et al.*, 2015). Η ομάδα των περμεασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, μεταφορείς SLC (Solute Carriers) είναι η δεύτερη μεγαλύτερη μετά την ομάδα των GPCRs (υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες). 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 ή αντιμεταφορείς). Η οικογένεια SLC περιλαμβάνει πάνω από 400 μέλη (και 65 ψευδογονίδια) που κατανέμονται σε 52 υποοικογένειες, από τα οποία το 50% δεν έχει μελετηθεί καθόλου στη βιβλιογραφία, ενώ πολύ λίγα μέλη είναι αυτά που έχουν μελετηθεί συστηματικά (**Εικόνα 1.4**) (César-Razquin *et al.*, 2015). Είναι, επίσης, χαρακτηριστικό ότι ελάχιστες ανθρώπινες περμεάσες έχουν αναλυθεί σε υψηλή ευκρίνεια με κρυσταλλογραφία (Gruswitz *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2014/2015; Arakawa *et al.*, 2015; Coleman *et al.*, 2016), όπως λίγες είναι και οι κρυσταλλογραφικές αναλύσεις συνολικά από ευκαρυωτικά ομόλογα. Μάλιστα σε ορισμένους από τους πιο μελετημένους, όπως είναι οι μεταφορείς Band 3 (Arakawa *et al.*, 2015) και GLUT1 (Deng *et al.*, 2014), η έρευνα φαίνεται να εστιάστηκε κυρίως εξαιτίας της άφθονης έκφρασής τους, αλλά και της εύκολης απομόνωσής τους από συγκεκριμένους τύπους κυττάρων (César-Razquin *et al.*, 2015).

Η δυσκολία μελέτης των περμεασών συνδέεται κυρίως με εγγενείς τεχνικές δυσχέρειες που πηγάζουν από την άρρηκτη σχέση των πρωτεϊνών αυτών με την βιολογική μεμβράνη και την δυναμική τους φύση. Η υδροφοβική τους φύση, το μεγάλο μέγεθος, η διαμεμβρανική

τοπολογία και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολη την απομόνωσή και τη διατήρησης της δομής και βιολογικής λειτουργίας τους, εκτός της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Ως εκ τούτου, η ανάλυση της δομής τους με κρυσταλλογραφία αποτελεί μεγάλη πρόκληση και αυτό συμφωνεί με την περιορισμένη διαθεσιμότητα πληροφοριών γενικότερα για τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Ένα επιπλέον πρόβλημα έγκειται στην ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων μόνο για ορισμένους SLCs (Uhlen *et al.*, 2015) γεγονός που δυσχεραίνει τη συστηματική μελέτη τους. Τέλος, οι δοκιμασίες προσδιορισμού της ενεργότητας δεν είναι τεχνικά εύκολες (δυσκολία χειρισμού και απομόνωσης κυττάρων για μέτρηση των προσλαμβανόμενων υποστρωμάτων), ακόμη και για τους SLCs με γνωστά υποστρώματα (César-Razquin *et al.*, 2015).



Εικόνα 1.4. Η SLC είναι η λιγότερο μελετημένη ομάδα γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Α) 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 κάθε ομάδας, ενώ με κόκκινο τονίζονται οι ομάδες που τουλάχιστον το 80% των μελών τους κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες. **Β)** Ο αριθμός των δημοσιεύσεων για κάθε SLC γονίδιο απεικονίζεται με φθίνουσα σειρά και σημειώνονται οι τέσσερις SLCs με τις περισσότερες δημοσιεύσεις. Η κόκκινη κάθετη γραμμή δείχνει το όριο των 15 δημοσιεύσεων (César-Razquin *et al.*, 2015).

Συνολικά, αν και υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο των SLCs, οι έρευνες δεν επικεντρώνονται στη συστηματική ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας τους (César-Razquin *et al.*, 2015). Το ίδιο ισχύει για τις περισσότερες οικογένειες μεταφορέων. Επιπλέον, δε γίνεται συστηματική προσπάθεια ορθολογικής σχεδίασης φαρμάκων βασιζόμενη στη συγκριτική μελέτη και κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων τους (Diallinas, 2014; Frillingos, 2012).

Μια από τις σημαντικότερες ομάδες βιομορίων που αναγνωρίζονται και μετακινούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στην κατεύθυνση αυτή είναι και οι νουκλεοτιδικές βάσεις, που χρησιμοποιούνται από μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας και ανάλογα τους όπως η 5-φθοροουρακίλη, η 6-μερκαπτοπουρίνη, η 6-θειογουανίνη, η οξυπουρινόλη και η αλλοπουρινόλη έχουν γνωστή αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση (Wilson *et al.*, 2014; Elion, 1989; Stamp, *et al.*, 2016). Η πλέον σημαντική διεργασία που επιτρέπει επιλεκτική στόχευση ή έλεγχο της δράσης των φαρμάκων αυτών ανάλογα με τον τύπο κυττάρου είναι η ρύθμιση της εισόδου πουρινών, πυριμιδινών και αναλόγων τους στο κύτταρο στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης. Η ρύθμιση αυτή εξαρτάται από την έκφραση και τη λειτουργικότητα ενός φάσματος διαφορετικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες ποικίλλουν από οργανισμό σε οργανισμό ή από κυτταρικό τύπο σε κυτταρικό τύπο. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για να μεταφέρουν πουρίνες ή πυριμιδίνες μέσα στα κύτταρα εξετάζονται στις επόμενες ενότητες.

1.1.4 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Τα νουκλεοτίδια είναι ουσιώδη σε όλους τους έμβιους οργανισμούς, τόσο ως μονομερή για τα νουκλεϊκά οξέα, μέσω των οποίων διατηρείται, αναπαράγεται και εκφράζεται η γενετική πληροφορία, όσο και ως μόρια με κεντρικό ρόλο στις πορείες μεταγωγής σήματος και στον μεταβολισμό ενέργειας. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των νουκλεοτιδίων θα πρέπει να ελέγχονται αυστηρά, με τη ρύθμιση των πορειών του καταβολισμού και της βιοσύνθεσής τους. Η βιοσύνθεση μπορεί να επιτευχθεί είτε με *de novo* πορείες, που αξιοποιούν ως πρόδρομα άλλα μόρια, όπως αμινοξέα, είτε με πορείες περίσωσης (salvage), που είτε επαναχρησιμοποιούν νουκλεοτιδικές βάσεις και νουκλεοσίδια που παράγονται με την αποικοδόμηση νουκλεοτιδίων και νουκλεϊκών οξέων μέσα στα κύτταρα, είτε τροφοδοτούνται με νουκλεοτιδικές βάσεις εξωγενώς, από διατροφικές πηγές ή από άλλα

κύτταρα. Η εξωγενής παροχή νουκλεοτιδικών βάσεων είναι σημαντική σε πολλά κυτταρικά συστήματα, ιδιαίτερα σε κύτταρα όπου υπολειτουργεί ή δεν λειτουργεί καθόλου η de novo πορεία. Επίσης, οι νουκλεοτιδικές βάσεις χρησιμοποιούνται καταβολικά ως πηγές αζώτου και πολλοί μικροοργανισμοί εξαρτώνται από την εξωγενή παροχή νουκλεοτιδικών βάσεων ως πηγών αζώτου.

Νουκλεοτιδικές βάσεις που παρέχονται εξωγενώς θα πρέπει να μεταφερθούν διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης για να προσληφθούν από τα κύτταρα, μία διεργασία στην οποία ενέχονται ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς. Πρόκειται για μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ή νουκλεοσιδίων που λειτουργούν με ενεργό μεταφορά εξαρτώμενη από διαβαθμίσεις ιόντων. Διαφορετικές ομάδες τέτοιων μεταφορέων χρησιμοποιούνται ανάλογα με το κυτταρικό σύστημα και οι αντίστοιχοι μεταφορείς των μικροοργανισμών εμπίπτουν εν γένει σε διαφορετικά δομικά πρότυπα από αυτές των ζώων ή των φυτών. Στον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά, χρησιμοποιούνται κυρίως μεταφορείς νουκλεοσιδίων CNT (Concentrative Nucleoside Transporters) και ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters), και ορισμένα μέλη της οικογένειας OAT (Organo Anion Transporter). Αυτοί οι μεταφορείς εμπλέκονται και στην πρόσληψη κυτταροτοξικών αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων (αντιμεταβολιτών) που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα σε θεραπείες κατά συμπαγών καρκινικών όγκων, υπερπλασιών των λεμφαδένων, ιογενών λοιμώξεων όπως ηπατίτιδας και AIDS ή έναντι φλεγμονωδών παθήσεων, όπως η νόσος Crohn (Pastor-Anglada *et al.*, 2005/2015). Σε παρασιτικά πρωτόζωα, χρησιμοποιούνται μεταφορείς νουκλεοσιδίων/νουκλεοτιδικών βάσεων ENT, οι οποίοι διαφέρουν σε σημαντικά δομικά-λειτουργικά τους γνωρίσματα από τους αντίστοιχους του ανθρώπου και έχουν προταθεί ως στόχοι ανάπτυξης ειδικών αντιπαρασιτικών φαρμάκων (Lanfear, 2011; De Koning *et al.*, 2005; Köse and Schiedel, 2009).

Σε Βακτήρια και Μύκητες χρησιμοποιούνται μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων που ανήκουν σε δύο άλλες οικογένειες, την NCS1 (Nucleobase:Cation Symporters-1) (που δεν έχει ομόλογα στα Μετάζωα) (Kryptou *et al.*, 2015; Sioupiouli *et al.*, 2017) και την NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporters/Nucleobase:Cation Symporters-2) που απαντάται σε όλα τα φύλα οργανισμών, αλλά τα λειτουργικά της ομόλογα στον άνθρωπο δεν μεταφέρουν πουρίνες/πυριμιδίνες, αλλά L-ασκορβικό οξύ (Frillingos, 2012; Papakostas and Frillingos 2012; Papakostas *et al.*, 2013; Cecchetto *et al.*, 2004; Gournas *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010; Bürzle *et al.*, 2013). Ως προς την δομική οργάνωση, οι μεταφορείς NCS1 (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010) και NAT/NCS2 (Yu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2011; Alguet *et al.*, 2016) που εντάσσονται στην Υπεροικογένεια APC (Amino acid-

Polyamine-Organocation Family) (Saier *et al.*, 2021; TCDB) διαφέρουν θεμελιωδώς από τους μεταφορείς νουκλεοσιδίων ή αναλόγων νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων του ανθρώπου ENT και OAT, δύο οικογένειες που εντάσσονται στην Υπεροικογένεια MFS (Major Facilitator Superfamily), ενώ οι CNT εμπίπτουν σε διαφορετικό δομικό πρότυπο (Johnson *et al.*, 2012). Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική σε σχέση με πιθανές προοπτικές ανάπτυξης νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων που να βασίζονται στην στόχευση των περμεασών παθογόνων βακτηρίων ή μυκήτων με ειδικά σχεδιασμένα ανάλογα πουρινών (Lougiakis *et al.*, 2016). Στα Φυτά, τέλος, περιλαμβάνεται ένα μεγάλο φάσμα πιθανών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων που ανήκουν στις οικογένειες ENT, NCS1, NAT/NCS2 ή και σε ξεχωριστές οικογένειες που έχουν εξελιχθεί μόνο στα Φυτά (POP/PUP, NBUT/UPS) (Girke *et al.*, 2014).

Η κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης των περμεασών νουκλεοτιδικών βάσεων και των μοριακών διαφορών που έχουν ανάλογα με το κυτταρικό σύστημα θα μπορούσε να οδηγήσει στον επιλεκτικότερο σχεδιασμό των κυτταροτοξικών αναλόγων πουρινών-πυριμιδινών που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, με στόχο τη βελτίωση της ειδικότητάς τους. Η προοπτική αυτή έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα Βακτήρια, λόγω της αυξανόμενης ανθεκτικότητας στα χρησιμοποιούμενα και διαρκώς εξελισσόμενα αντιβιοτικά και της ανάγκης εναλλακτικών στρατηγικών κατά των βακτηριακών λοιμώξεων (Maura *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016). Ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων ήδη διερευνώνται ως πιθανά φάρμακα για ορισμένα βακτήρια, όπως το *Mycobacterium tuberculosis* (Ferrari and Serpi, 2015), ενώ η εξάρτηση παθογόνων όπως της *Borrelia burgdorferi* ή του *Helicobacter pylori* που δεν διαθέτουν την *de novo* πορεία, από εξωγενή παροχή των νουκλεοτιδικών βάσεων (Jain *et al.*, 2012 and 2015; Liechti and Goldberg, 2012 and 2013; Miller *et al.*, 2012) προσφέρει τη δυνατότητα αξιοποίησης των αντίστοιχων περμεασών ως θεραπευτικών στόχων.

1.1.4.1 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2

Η οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporter/Nucleobase-Cation Symporter-2) είναι η μεγαλύτερη και ευρύτερη εξελικτικά οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων, η οποία με βάση την κατάταξη **COG (Cluster of Orthology Groups)** (Saier *et al.*, 2021), διαιρείται σε δύο φυλογενετικά διακριτές ομάδες, την **COG2233** ή NAT και την **COG2252** ή AzgA-like (**Εικόνα 1.5**).

Η υποοικογένεια **COG2233** ή **NAT**, περιλαμβάνει περισσότερα από 6000 μέλη σε όλες τις ταξινομικές βαθμίδες οργανισμών με εξαίρεση ορισμένα Πρωτόζωα και τον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η **COG2233** υποδιαιρείται σε τρεις μεγάλους κλάδους, με βάση τη φυλογενετική ανάλυση των λειτουργικά χαρακτηρισμένων ομολόγων. Ο ένας κλάδος περιλαμβάνει περμεάσες ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, από βακτήρια και μύκητες (Frillingos, 2012; Papakostas and Frillingos, 2012; Alguel *et al.*, 2016), ο δεύτερος περιλαμβάνει περμεάσες ουρακίλης/πυριμιδινών, μόνο από βακτήρια (Frillingos, 2012; Lu *et al.*, 2011), και ο τρίτος απαρτίζεται από ομόλογα σε ζώα και φυτά, όπου περιλαμβάνονται περμεάσες πουρινών/πυριμιδινών ευρύτερης εξειδίκευσης (Yamamoto *et al.*, 2010; Girke *et al.*, 2014), καθώς και τα ανθρώπινα ομόλογα που μεταφέρουν L-ασκορβικό οξύ (Bürzle *et al.*, 2013) (**Εικόνα 1.5**). Οι ελάχιστοι αντιπρόσωποι (ποσοστό <1%), οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί πειραματικά έως σήμερα, σχετίζονται με την κυτταρική πρόσληψη ουρακίλης, ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, σε μικροβιακούς οργανισμούς και φυτά, ενώ στα θηλαστικά σχετίζονται με την πρόσληψη της Βιταμίνης C. Αναλυτικότερα οι μεταφορείς οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά, έως σήμερα, αφορούν κυρίως μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος.

Στους μύκητες τα χαρακτηρισμένα ομόλογα αφορούν τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος **UapA** και **UapC** του μύκητα *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998), **AfUapA** του παθογόνου *Aspergillus fumigatus* (Goudela *et al.*, 2008) και **Xut1** της *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2005). Αντιπρόσωποι των φυτικών οργανισμών αποτελούν ο **Lpe1** του καλαμποκιού (*Zea mays*) (Argyrou *et al.*, 2001), ενώ πρόσφατα πραγματοποιήθηκε γονιδιωματική ανάλυση αναφορικά με τους μεταφορείς NAT/NCS2 στον αραβόσιτο (Chai *et al.*, 2018).

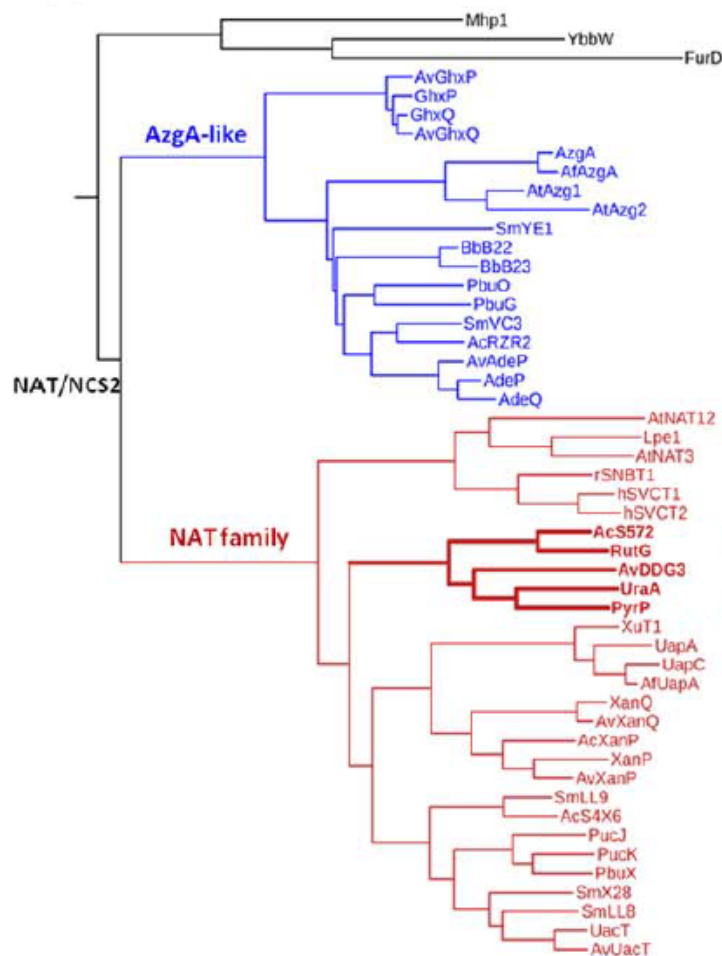
Οι βακτηριακοί μεταφορείς που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα περιλαμβάνουν τον μεταφορέα **UraA** (ουρακίλη) (Andersen *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2011; Botou *et al.*, 2018), τον **RutG** (ουρακίλη, θυμίνη, κυτοσίνη) (Botou *et al.*, 2018), τους μεταφορείς ξανθίνης **XanQ** και **XanP** (Karatza and Frillingos 2005), καθώς και τον **UacT** (ουρικού οξέος) (Papakostas and Frillingos, 2012) από την *E. coli*. ο μεταφορέας ξανθίνης **PbuX** (Christiansen *et al.*, 1997), και ουρικού **PucK** και **PucJ** του *B. subtilis* (Schultz *et al.*, 2001), ενώ πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν και οι μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού **SmXUacT** (SmLL9) και ουρικού **SmUacT1** (SmLL8), **SmUacT2** (SmX28) από το συμβιωτικό ριζόβιο *S. meliloti* (Botou *et al.*, 2020). Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί και ο χαρακτηρισμός του μεταφορέα **PIUacP** από το παθογόνο βακτήριο *Paenibacillus larvae*, ο οποίος σε αντίθεση με τους ομολόγους του μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού, εμφανίζει ένα διαφοροποιημένο

προφίλ εξειδίκευσης μεταφέροντας αδερίνη, γουανίνη και ουρακίλη (Stoffer-Bittner *et al.*, 2018).

Τέλος, στα μετάζωα, οι χαρακτηρισμένοι μεταφορείς NAT/NCS2 περιλαμβάνουν τον μεταφορέα ευρύτερης εξειδίκευσης, ουρακίλης /υποξανθίνης /ξανθίνης /γουανίνης /θυμίνης, **rSNBT1** του επίμυος από τον *Rattus norvegicus* (Rat) (Yamamoto *et al.*, 2010), καθώς και τα ομόλογα **hSVCT1** και **hSVCT2** του ανθρώπου, τα οποία αποτελούν αποκλειστικά μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος (Bürzle and Hediger, 2012).

Η υποοικογένεια **COG2252** ή **AzgA-like**, αποτελεί την δεύτερη ομάδα μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2, στην οποία περιλαμβάνονται μεταφορείς αδερίνης, υποξανθίνης ή/και γουανίνης από βακτήρια, μύκητες και φυτά (Papakostas *et al.*, 2013; Cecchetto *et al.*, 2004; Girke *et al.*, 2014). Συγκεκριμένα τα χαρακτηρισμένα ομόλογα αφορούν τους μεταφορείς υποξανθίνης/αδερίνης/γουανίνης **AzgA** του *A.nidulans* (Cecchetto *et al.*, 2004) και **Fcy21p** της *Candida albicans* (Hope *et al.*, 2004), οι **AtAzg1** και **AtAzg2** του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Mansfield *et al.*, 2009) και οι βακτηριακοί μεταφορείς αδερίνης **AdeP (PurP)** και **AdeQ (YicO)** (Papakostas *et al.*, 2013), υποξανθίνης/γουανίνης **GhxP (YjcD)** και **GhxQ (YgfQ)** της *E. coli* (Papakostas *et al.*, 2013; Kozmin *et al.*, 2013), αδερίνης, υποξανθίνης, γουανίνης, **SmAGHxT (SmVC3)** από το *S. meliloti* (Botou *et al.*, 2020), καθώς και οι ευρείας εξειδίκευσης **PIAzg1** και **PIAzg2**, από το *Paenibacillus larvae* (Alexander *et al.*, 2018) (**Εικόνα 1.5**).

Χαρακτηριστικό είναι επίσης το γεγονός ότι στην αμινοξική αλληλουχία των μεταφορέων της ομάδας NAT/COG2233 αλλά και της AzgA-like/COG2252, εντοπίζονται σημαντικά συντηρημένες περιοχές σε παρόμοιες θέσεις, οι οποίες όμως καταλαμβάνονται από διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι διαφορές αυτές αντανακλούν και στην διαφορά των υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν οι δύο ομάδες. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από δεδομένα που έχουν προκύψει από την διεξοδική μελέτη των μεταφορέων της *E. coli* XanQ (Frillingos, 2012), GhxP και AdeP (Papakostas *et al.*, 2013), UraA και RutG (Botou *et al.*, 2018) οι οποίοι αναλύθηκαν με εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση σε συντηρημένες περιοχές της αμινοξικής τους αλληλουχίας.



Εικόνα 1.5. Φυλογενετικό δέντρο των χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT/NCS2. Η NAT/NCS2 αποτελείται από δύο ομάδες ομολόγων που αναφέρονται ως ξεχωριστές υποοικογένειες. Η πρώτη, COG2233 (ή NAT) περιλαμβάνει περμεάσες ζανθίνης και/ή ουρικού οξέος από βακτήρια και μύκητες, ουρακίλης/πυριμιδινών από βακτήρια, ευρύτερης εξειδίκευσης περμεάσες πουρινών/πυριμιδινών από φυτά και ζώα και τα ανθρώπινα ομόλογα που μεταφέρουν ασκορβικό οξύ. Η δεύτερη ομάδα, COG2252 (ή AzgA-like) περιλαμβάνει μεταφορείς αδενίνης, υποξανθίνης και γουανίνης από βακτήρια, μύκητες και φυτά. Στο φυλογενετικό δένδρογραμμα απεικονίζονται οι λειτουργικά χαρακτηρισμένοι μεταφορείς της οικογένειας. Οι μεταφορείς Mhp1, YbbW και FurD (από την οικογένεια NCS1) χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδες (outgroup) (Botou et al., 2018).

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

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

Με βάση τις δομές των περμεασών ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) και ξανθίνης/ουρικού UapA (Alguet *et al.*, 2016) που περιγράφονται αναλυτικά στις ενότητες που ακολουθούν, οι μεταφορείς NAT/NCS2 έχουν 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs) με χαρακτηριστική αντίστροφη εσωτερική συμμετρία (7+7 inverted repeat) που οργανώνονται στο χώρο σε δύο δομικές περιοχές (domains), μία που περιέχει τα βασικά δομικά στοιχεία του ενεργού κέντρου, περιοχή του «πυρήνα», (core ή transport ή carrier ή elevator domain) και συγκροτείται από τα TMs 1-4 και 8-11 και μία που περιέχει σημαντικά στοιχεία για τον έλεγχο της πρόσβασης προς το ενεργό κέντρο, περιοχή της «εισόδου», (gate ή scaffold ή dimerization domain) και συγκροτείται από τα TMs 5-7 και 12-14. Το ενεργό κέντρο σχηματίζεται ανάμεσα στις δύο δομικές περιοχές, αλλά οι αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος προέρχονται αποκλειστικά από αμινοξέα της δομικής περιοχής του «πυρήνα». Ο ρόλος της δομικής περιοχής της «εισόδου» είναι να παρέχει μία πλατφόρμα για την πραγματοποίηση του μηχανισμού της εναλλασσόμενης πρόσβασης. Οι τελευταίες δομικές αναλύσεις (Diallinas, 2016; Alguet *et al.*, 2016) υποδεικνύουν ότι οι περμεάσες αυτές σχηματίζουν διμερή, μέσω αλληλεπίδρασης των δομικών περιοχών της «εισόδου», τα οποία μένουν σχετικά σταθερά, και η μετατόπιση του υποστρώματος μπορεί να επιτυγχάνεται με την κίνηση των περιοχών του «πυρήνα», που «ολισθαίνουν» πάνω στις περιοχές της «εισόδου» οδηγώντας ουσιαστικά το υπόστρωμα έως τη θέση πρόσδεσης και, στη συνέχεια, του επιτρέπουν να μετατοπισθεί προς την απέναντι πλευρά, σε συνδυασμό με το κλείσιμο των αντίστοιχων σημείων ελέγχου (gates) (elevator mechanism) (Drew and Boudker, 2016).

1.1.4.1.1 Η δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA

Η δομική ανάλυση του μεταφορέα ουρακίλης UraA, πραγματοποιήθηκε σε δύο διαμορφώσεις, την **ανοιχτή προς τον ενδοκυττάριο χώρο** (*inward-open*) (Lu *et al.*, 2011) και την **κλειστή διαμόρφωση** (*occluded*) (Yu *et al.*, 2017) (**Εικόνα 1.6**). Οι δύο διαμορφώσεις θεωρείται ότι αποτελούν καταστάσεις ισορροπίας στις οποίες συναντάται ο μεταφορέας και έχουν προκύψει από πειράματα κρυστάλλωσης, ανάλυσης 2.8 Å και 2.5 Å αντίστοιχα. Παρά το γεγονός ότι η πρώτη ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του UraA τον εμφανίζει ως μονομερές (Lu *et al.*, 2011), στην ανάλυση της κλειστής διαμόρφωσης (Yu *et*

al. 2017) ο UraA εμφανίζεται ως διμερές (**Εικόνα 1.7**). Παρόμοιος διμερισμός έχει παρατηρηθεί αρχικά στην κρυσταλλική δομή του ομόλογου μεταφορέα UapA (Alguel *et al.*, 2016) από την οικογένεια NAT/NCS2, όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

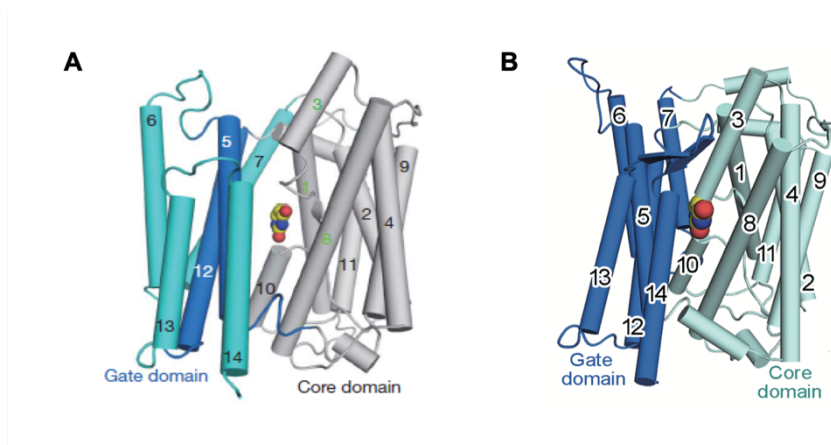
Με βάσει την πρώτη διαμόρφωση (*inward-open*) ο μεταφορέας UraA, αποτελείται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs 1-14), τα οποία διακρίνονται σε δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις (7+7 fold) έχοντας και τα δύο άκρα, αμινοτελικό και καρβοξυλικό, εντοπισμένα κυτταροπλασματικά. Τα TMs 13 και 14 δεν διαπερνούν εξ ολοκλήρου τη μεμβράνη. Στο κέντρο της δομής και συγκεκριμένα μεταξύ των α -ελίκων των TM3 και TM10 υπάρχει ένα ζεύγος αντιπαράλληλων β -κλώνων (β -strands), οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στη δομική οργάνωση του μορίου αλλά και στην αναγνώριση του υποστρώματος (**Εικόνα 1.6**).

Τα 14 διαμεμβρανικά τμήματα οργάνωνται στο χώρο σε δύο δομικές περιοχές, στην περιοχή του «πυρήνα» (*core ή transport ή carrier ή elevator domain*) και στην περιοχή «εισόδου» του υποστρώματος (*gate ή scaffold ή dimerization domain*). Η περιοχή του «πυρήνα» αποτελείται από τα τμήματα 1 έως 4 (TMs 1-4) και 8 έως 11 (TMs 8-11), ενώ η περιοχή της «εισόδου», αποτελείται από τα τμήματα 5 έως 7 (TMs 5-7) και 12 έως 14 (TMs 12-14) (**Εικόνα 1.6**). Εκτός από την υδροφοβική διασύνδεση μεταξύ της περιοχής πρόσδεσης και της περιοχής εισόδου του μορίου, δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μέσα στην περιοχή του πυρήνα μεταξύ των β -κλώνων (β -strands) των TM3 και TM10, μεταξύ των τμημάτων (TM3/TM10) γενικότερα, αλλά και με άλλα διαμεμβρανικά τμήματα, οι οποίοι αφενός διευκολύνουν την διαμόρφωση της περιοχής μεταξύ των τμημάτων 3 και 10 (TM3 και TM10), αφετέρου περιορίζουν την κίνηση των διαμεμβρανικών τμημάτων του «πυρήνα».

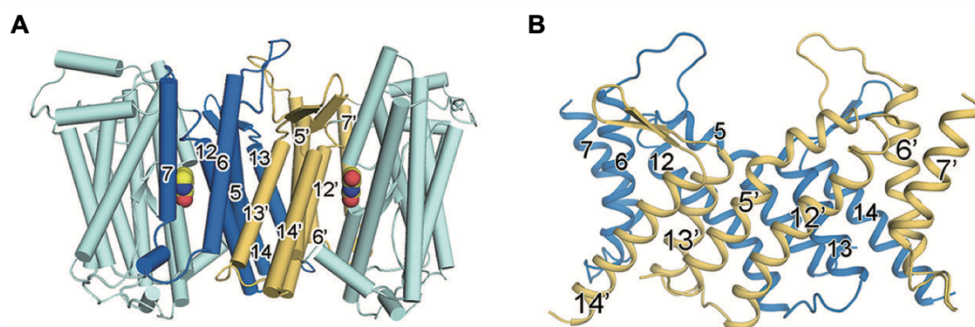
Παρά το γεγονός ότι η πρώτη ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του UraA τον εμφανίζει ως μονομερές (Lu *et al.*, 2011), στην ανάλυση της κλειστής διαμόρφωσης (Yu *et al.* 2017) ο UraA εμφανίζεται ως διμερές. Παρόμοιος διμερισμός έχει παρατηρηθεί αρχικά στην κρυσταλλική δομή του ομόλογου μεταφορέα UapA (Alguel *et al.*, 2016) από την οικογένεια NAT/NCS2, καθώς επίσης και σε δύο μεταφορείς της οικογένειας SLC4, τους AE1 και Bor1 (Arakawa *et al.*, 2015; Thurtle-Schmidt and Stroud, 2016), αλλά και στους SLC26Dg και SLC26A9 της οικογένειας SLC26 (Chang *et al.*, 2019; Walter *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2020). Ο μηχανισμός κατά τον οποίο γίνεται η μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή-προς-το-εξωτερικό διαμόρφωση στον UraA, περιγράφεται από τις σχετικές κινήσεις των διαμεμβρανικών τμημάτων TMs 5 και 12. Τα τμήματα αυτά φαίνεται να περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα που είναι σχεδόν κάθετος στη διεπαφή μεταξύ των δύο δομικών

περιοχών. Επίσης, ενώ στην αρχική διαμόρφωση τα διαμεμβρανικά TMs 5 και 12 είναι «ευθείες» α έλικες, στην νέα διμερή διαμόρφωση παρουσιάζουν κυρτότητα. Λόγω κυρτότητας και περιστροφής, καθώς το τμήμα TM5 κινείται προς την κεντρική δομική περιοχή και το TM12 τοποθετείται μακριά της, πραγματοποιείται η μετάβαση από την κλειστή στην ανοικτή-προς-το-εσωτερικό διαμόρφωση (Yu *et al.* 2017) (**Εικόνα 1.7**).

Παρόμοιες μετακινήσεις στην περιοχή εισόδου για την σταθεροποίηση του διμερούς και την μεταφορά του υποστρώματος παρατηρούνται και στον UraA (Alguel *et al.*, 2016). Επιπρόσθετα, για τον UraA, έχει προταθεί ότι οι δύο διαμορφώσεις του, ως μονομερές και ως διμερές, αποτελούν καταστάσεις οι οποίες είναι δυνατόν να αποτελούν μέρος μια δυναμικής ισορροπίας καθώς και ότι η διμερής κατάσταση είναι απαραίτητη για την λειτουργία του μεταφορέα (Yu *et al.* 2017).



Εικόνα 1.6. Δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E.coli*. Ο UraA οργανώνεται σε δύο δομικές περιοχές, την κεντρική περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος ή περιοχή του πυρήνα (core domain) και την περιοχή εισόδου (gate domain), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Η δομική ανάλυση του UraA έχει πραγματοποιηθεί σε δύο διαμορφώσεις, A) την ανοικτή προς τον ενδοκυττάριο χώρο (inward-open) (Lu *et al.*, 2011) και B) την κλειστή διαμόρφωση (occluded) (Yu *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.7. Διμερής συγκρότηση του UraA. Α) Τα δύο πρωτομερή μόρια του UraA, οργανώνονται κατά τον διμερισμό με την συμμετοχή των δύο περιοχών εισόδου (gate domain). Οι περιοχές του πυρήνα (core domains) χρωματίζονται με το κυανό χρώμα, ενώ με μπλε και κίτρινο τονίζονται οι περιοχές εισόδου (gate domains). Β) Τα διαμεμβρανικά τμήματα που σχηματίζουν τις περιοχές εισόδου και συμβάλλουν στην σταθεροποίηση του διμερούς (Yu *et al.* 2017).

Τα δεδομένα από τη δεύτερη κρυσταλλική δομή της οικογένειας για τον μεταφορέα UapA (Alguet *et al.*, 2016) που περιγράφεται στην επόμενη ενότητα, αλλά και τις άλλες κρυσταλλικές δομές, των δομικά συγγενικών ομολόγων SLC4A1 (Arakawa *et al.*, 2015) και SLC26Dg (Geertsma *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2020), υποδηλώνουν ότι οι NAT/NCS2 μπορεί να λειτουργούν ως διμερή, όπου οι περιοχές εισόδου (gate domain) από τις δύο υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους μένοντας σχετικά σταθερές και η μεταφορά επιτυγχάνεται με την κίνηση των περιοχών του πυρήνα (core domain). Επειδή η περιοχή του πυρήνα περιέχει όλα τα βασικά δομικά στοιχεία του κέντρου δέσμευσης (Alguet *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2011) και έτσι φαίνεται να υπάρχει μεγάλη ασυμμετρία σε σχέση με την περιοχή της εισόδου, ο μηχανισμός θεωρείται ότι είναι αυτός του «ανελκυστήρα» (elevator mechanism) (βλ. ενότητα 1.1.2), όπως προτάθηκε από τους Alguet *et al.* (2016). Μάλιστα, με βάση το δομικό πρότυπο του UapA, αλλά και από μελέτες Μοριακής Γενετικής, μεταλλάξεις σε αρκετές θέσεις απομακρυσμένες από το κέντρο δέσμευσης που έχει βρεθεί ότι επιτρέπουν την αναγνώριση και μεταφορά μη φυσιολογικών υποστρωμάτων (υποξανθίνη, αδενίνη) για τον UapA (Diallinas, 2014; Kosti *et al.*, 2010/2012; Papageorgiou *et al.*, 2008) βρίσκονται κυρίως στην μεσεπιφάνεια μεταξύ των core και gate domain και έχει προταθεί ότι ίσως εντοπίζονται σε θέσεις ελέγχου που λειτουργούν ως φίλτρα διαλογής υποστρωμάτων (selectivity gates) (Diallinas, 2014; Diallinas, 2016). Μικρές αλλαγές στην πλευρική ομάδα σε αυτές τις θέσεις μπορεί να αλλάζουν τις σχετικές θέσεις ανάμεσα στις δύο δομικές περιοχές και να επάγουν επιπρόσθετες αλλαγές διαμόρφωσης που καταλήγουν σε επιλεκτική μεταφορά ανάλογα με το υπόστρωμα.

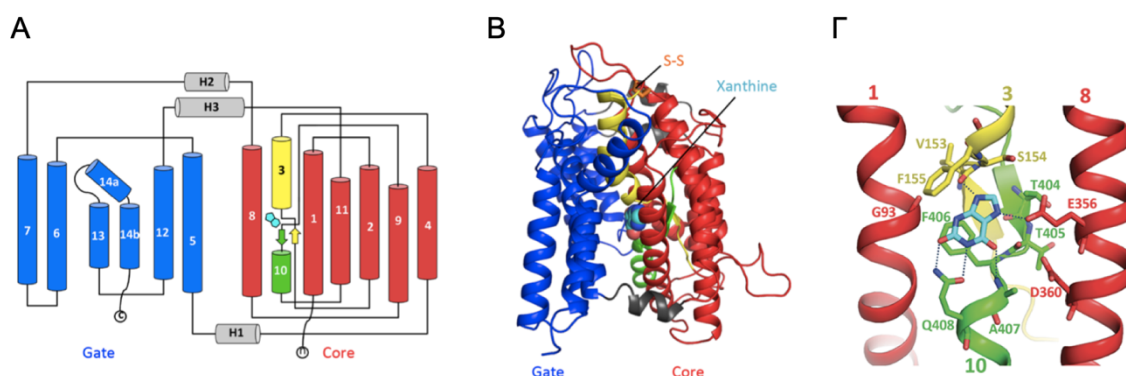
1.1.4.1.2 Η δομή του μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού οξέος UapA

Ο UapA είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος του μύκητα *Aspergillus nidulans*. Η δομή του (PDB ID 5I6C) λύθηκε με ευκρίνεια 3.5Å παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνη) στην **ανοιχτή προς τον ενδοκυττάριο χώρο (inward-open)** διαμόρφωση (**Εικόνα 1.8**). Όπως αποδείχθηκε, μοιάζει με αυτή του μεταφορέα ουρακίλης UraA, που ανήκει στην ίδια οικογένεια, αποτελείται δηλαδή από 2 δομικές περιοχές, την

περιοχή πυρήνα (core domain) και την περιοχή εισόδου (gate domain). Σχηματίζει διμερές, μέσω αλληλεπιδράσεων αποκλειστικά των περιοχών εισόδου των δύο πρωτομερών και ο διμερισμός θεωρείται ότι είναι σημαντικός για την μετακίνησή του μεταφορέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά συνεισφέρει και λειτουργικά, στην εξειδίκευση του (Alguel *et al.*, 2016).

Ο μεταφορέας UapA περιλαμβάνει 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), οργανωμένα σε δύο ανεστραμμένες δομικές επαναλήψεις (inverted repeats, 7+7) που σχηματίζουν στο χώρο την περιοχή πυρήνα (core domain) (TMs 1-4 και 8-11), και την περιοχή εισόδου (gate domain) (TMs 5-7 και 12-14) (**Εικόνα 1.8 A**), όπως και ο UraA, με τη διαφορά ότι ο UapA έχει μακρύτερους βρόχους (loops). Ειδικά, μάλιστα, στο βρόχο μεταξύ TM3 και TM4 στον UapA σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ 2 κυστεϊνών (**Εικόνα 1.8 B**), ο οποίος είναι σημαντικός για τη σωστή αναδίπλωση (folding) και στόχευση του μεταφορέα στη μεμβράνη (localization) (Alguel *et al.*, 2016), ενώ αυτό το ζεύγος κυστεϊνών δεν εντοπίζεται σε βακτηριακά ομόλογα (Botou *et al.*, 2020).

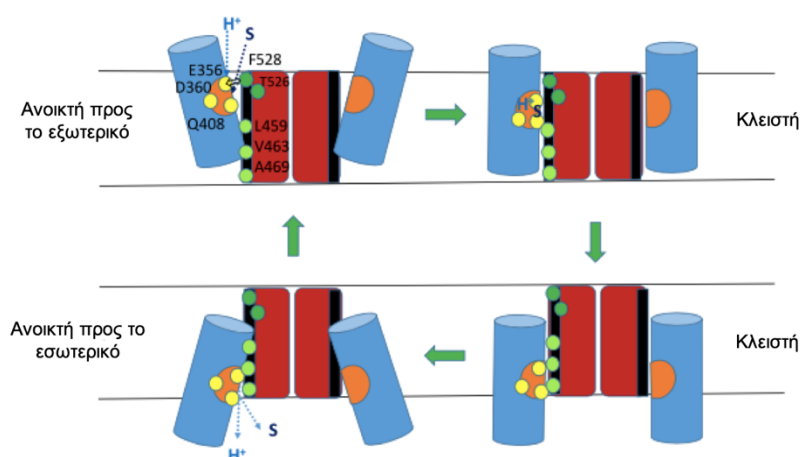
Από τη διαμόρφωση στην οποία έχει γίνει η κρυστάλλωση (inward-facing open), το διμερές φαίνεται να προκύπτει από την αλληλεπίδραση των διαμεμβρανικών τμημάτων 12, 13 και 14 (περιοχή εισόδου), και ειδικότερα του TM13. Λαμβάνοντας υπόψη τη δομή του διμερούς, αναδεικνύεται ο ρόλος του καταλοίπου, Arg481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



Εικόνα 1.8. Δομή του μεταφορέα UapA. Α) Τοπολογικό διάγραμμα του UapA (α-έλικες ως κύλινδροι, β-κλώνοι ως βέλη). Το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος μεταξύ των TM3 και 10 φαίνεται από την παρουσία ξανθίνης (γαλάζιο). Η περιοχή εισόδου επισημαίνεται με μπλε και η περιοχή πυρήνα με κόκκινο χρώμα. Διακρίνονται μη

ελικοειδείς περιοχές (κίτρινο) και β-κλώνοι (πράσινο). Β) Αναπαράσταση του πρωτομερούς του UarA, όπου η περιοχή εισόδου είναι μπλε και η περιοχή πυρήνα κόκκινη και οι έλικες που τις ενώνουν, γκρι. Η ξανθίνη (γαλάζιο) και ο δισουλφιδικός δεσμός (πορτοκαλί γραμμές) διακρίνονται, επίσης. Γ) Μεγέθυνση του κέντρου δέσμευσης ξανθίνης, όπου διακρίνονται τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δέσμευση και οι πλευρικές και κύριες αλυσίδες των Glu356, Gln408 και Ala407 και οι κύριες των Phe155, Val153 είναι σε απόσταση τάξεως δεσμού υδρογόνου από την ξανθίνη (Alguet *et al.*, 2016).

Από προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής προτείνεται ένα μονοπάτι μεταφοράς από το κέντρο δέσμευσης προς το εσωτερικό του κυττάρου, που υποστηρίζεται περαιτέρω και από τα βιοχημικά δεδομένα (Alguet *et al.*, 2016). Αρχικά, η ξανθίνη συνδέεται ισχυρά με το Gln408, όσο μετακινείται προς την κοιλότητα του κέντρου δέσμευσης, αλληλεπιδρά με αμινοξέα κοντά στο κέντρο δέσμευσης (Leu-459, Val-463 και Ser-466), ενώ η Arg-481, του απέναντι μονομερούς πλησιάζει την κεντρική κοιλότητα δέσμευσης. Έτσι, δημιουργείται ένα αποτελεσματικό φράγμα εκλεκτικότητας στην πορεία προς το κυτταρόπλασμα, όπου η ξανθίνη σχηματίζει παροδικά δεσμούς υδρογόνου και π-δεσμούς με την Arg-481, πριν περάσει στο εσωτερικό, μετά από αλλαγές διαμόρφωσης της πλευρικής αλυσίδας της Arg-481 και της αλληλεπίδρασης Arg-481/Gln-408. Παράλληλα μετακινείται το TM10 σταδιακά, διευκολύνοντας την έξοδο του προσδέτη. Ο μεταφορέας φαίνεται να ακολουθεί το μηχανισμό «ανεγκυστήρα» (elevator mechanism), όπου μετακινούνται οι TMs 1, 3, 8, 10 της περιοχής του πυρήνα, ώστε το υπόστρωμα να μεταφέρεται από την μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη (**Εικόνα 1.9**) (Alguet *et al.*, 2016; Diallinas 2021), ίσως όμως απαιτείται και η συνεισφορά επιπλέον αλλαγών διαμόρφωσης, όπως προκύπτει από τη δομή του διμερούς UraA (Yu *et al.* 2017).



Εικόνα 1.9. Μηχανισμός «ανεγκυστήρα» στο μεταφορέα UarA. Απεικονίζονται οι πιθανές τοπολογικές αλλαγές που προκαλούνται από τον μηχανισμό μεταφοράς στο διμερές του UarA. Κάθε πρωτομερές αποτελείται

από μια περιοχή του πυρήνα ή «ανελκυστήρα» (core/elevator domain) (μπλε) που φιλοξενεί το υπόστρωμα (S, ξανθίνη ή ουρικό οξύ) και τις θέσεις δέσμευσης H^+ (πορτοκαλί) και μια περιοχή του «ικριώματος» /ή διμερισμού (scaffold or dimerization domain) (κόκκινο). Στην ανοικτή προς τα έξω διαμόρφωση (outward-open), πρωτονίωση του E356, προκαλεί διακοπή της αλληλεπίδρασης των καταλοίπων E356-F528, επιτρέποντας στο υπόστρωμα να δεσμευτεί μεταξύ των E356 και Q408 (κίτρινες σφαίρες). Η πρόσδεση του υποστρώματος/ H^+ στη θέση δέσμευσης μεταβάλλει την τοπολογία και ενεργοποιεί την κίνηση της περιοχής του πυρήνα προς την περιοχή του ικριώματος, προκαλώντας το «κλείσιμο» της πρόσβασης του υποστρώματος και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης. Σε αυτή την κλειστή διαμόρφωση (occluded state), η περιοχή του πυρήνα ολισθαίνει προς τα κάτω, έως ότου η θέση δέσμευσης του υποστρώματος γίνει προσβάσιμη στην άλλη πλευρά της μεμβράνης, οπότε και απελευθερώνεται το υπόστρωμα/ H^+ . Στη συνέχεια, ο UapA επιστρέφει στην ανοικτή προς τα έξω διαμόρφωση (Diallinas, 2021).

1.1.4.3.3 Σχέσεις Δομής- Λειτουργίας στους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2- Η περίπτωση του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*

Οι σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT/NCS2 έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε δύο κυρίως ομόλογα, την περμεάση ξανθίνης/ουρικού UapA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*, και την περμεάση ξανθίνης XanQ της *E. coli*. Οι αναλύσεις του UapA στηρίχθηκαν καταρχάς σε γενετική και βιοχημική ανάλυση για την απομόνωση μεταλλαγών που αλλάζουν την εξειδίκευση και στην ερμηνεία του ρόλου των μεταλλαγών αυτών στο πλαίσιο της δομικής ανάλυσης του μορίου που κορυφώθηκε, με την κρυσταλλογραφική δομή του UapA (Alguet *et al.*, 2016). Σημαντικό αποτέλεσμα των αναλύσεων του UapA είναι ότι εντοπίστηκαν μεταλλαγές αμινοξέων που διευρύνουν την εξειδίκευση σε θέσεις μακριά από το ενεργό κέντρο πρόσδεσης, οι οποίες μπορεί να λειτουργούν ως πύλες ελέγχου της πρόσβασης προς το ενεργό κέντρο και, συγχρόνως, ως θέσεις διαλογής των υποστρωμάτων (selectivity gates) (Diallinas, 2014/2016/ 2021).

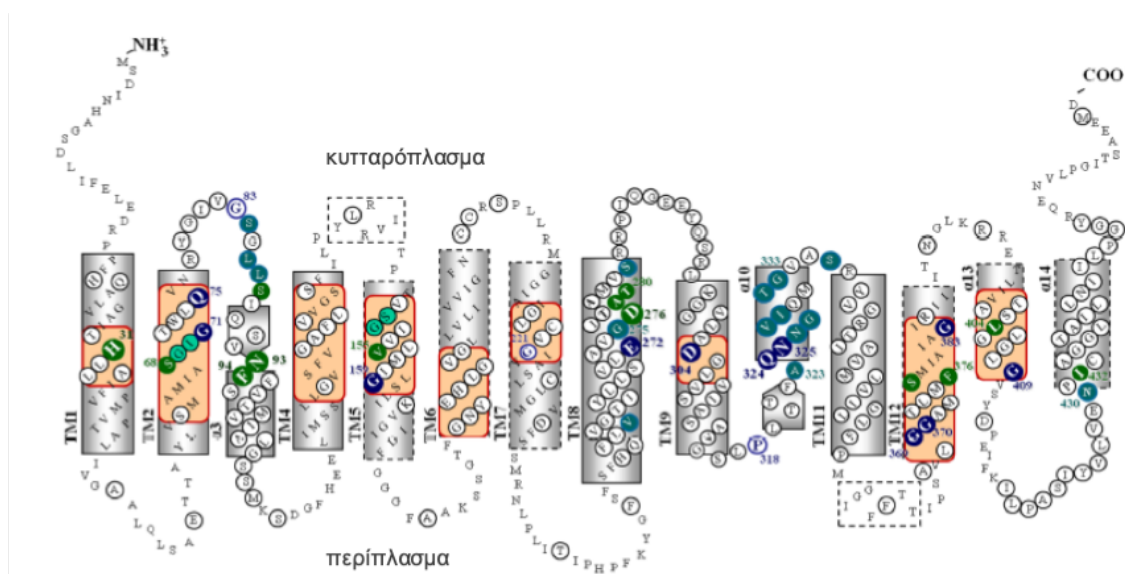
Ο μεταφορέας XanQ του εντεροβακτηρίου *E. coli*, που αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιείται, τα τελευταία χρόνια, ως πρότυπο μοριακό σύστημα για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων της οικογένειας NCS2 (Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006). Οι αναλύσεις του XanQ έχουν στηριχθεί σε **μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης** και διεξοδική *in vitro* μεταλλαξιγένεση στο σύνολο σχεδόν του μορίου (Frillingos, 2012; Karena *et al.*, 2015; Karena and Frillingos, 2011; Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010, Mermelekas *et al.*, 2010). Η μεθοδολογία αυτή, έχει εφαρμοστεί σε αρκετές συνεχόμενες περιοχές του XanQ,

όπως στην περιοχή του χαρακτηριστικού μοτίβου της οικογένειας (NAT signature motif) του TM10 και σε διαμεμβρανικά τμήματα και βρόγχους γύρω από αυτό (Karatzas *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010, Mermelekas *et al.*, 2010). Με τον ίδιο τρόπο έχουν μελετηθεί το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα (TM14) (Papakostas, 2008), το τρίτο διαμεμβρανικό τμήμα (Karena and Frillingos, 2011), το πρώτο και το δεύτερο διαμεμβρανικό τμήμα (παρούσα εργασία, Παράρτημα 10), συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας σε όλα τα διαμεμβρανικά τμήματα (Karena *et al.*, 2015), καθώς και πολικά αμινοξέα σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης (Karena and Frillingos, 2009).

Σημαντικό αποτέλεσμα από τις αναλύσεις του XanQ είναι ότι εντοπίστηκε ένα σύνολο περίπου 40 σημαντικών θέσεων αμινοξέων (**Εικόνα 1.10**), που είτε είναι αναντικατάστατα για τον μηχανισμό λειτουργίας, είτε εμφανίζουν αυστηρούς περιορισμούς αντικατάστασης, είτε είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση κατά την αλκυλίωση των εισαχθέντων κυστεϊνών με NEM (Karena *et al.*, 2015). Στο δομικό μοντέλο, τα αναντικατάστατα αμινοξέα χαρτογραφούνται είτε στο ενεργό κέντρο, όπου αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα, είτε σε δίκτυα δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο έμμεσα, είτε στην μεσεπιφάνεια μεταξύ των περιοχών core και gate domain όπου μπορεί να παρέχουν δομική ευελιξία που χρειάζεται στον μηχανισμό εναλλασσόμενης πρόσβασης (Karena *et al.*, 2015).

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μελέτες, σε συνδυασμό και με δεδομένα από τα δομικά πρότυπα, καταδεικνύουν σημαντικές θέσεις αμινοξέων στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος και περιμετρικά αυτού, όπως τα αναντικατάστατα και πολύ συντηρημένα **Glu-272** (TM8) (Mermelekas *et al.*, 2010), **Gln-324** (TM10) και **Asn-325** (TM10) (Georgopoulou *et al.*, 2010). Το **χαρακτηριστικό μοτίβο NAT**, που αντιστοιχεί σε ένα βραχύ τμήμα α-έλικας στην κυτταροπλασματική πλευρά του TM10, αποδεικνύεται σημαντικό για τη δέσμευση υποστρώματος (Georgopoulou *et al.*, 2010; Karena and Frillingos 2011), καθώς περιλαμβάνει την Gln-324 που συμμετέχει απευθείας στην πρόσδεση της ξανθίνης αλλά και άλλες σημαντικές θέσεις που διαμορφώνουν το κέντρο δέσμευσης (Karena *et al.*, 2015; Botou *et al.*, 2020). Η **His-31** (TM1) είναι συντηρημένο, πολικό κατάλοιπο, που σχηματίζει ένα σημαντικό δεσμό υδρογόνου περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης, ώστε η ξανθίνη να μπορεί να προσδεθεί με υψηλή συγγένεια (Karena and Frillingos, 2009). Η **Phe-94** (TM3) και τα λιγότερο συντηρημένα **Asn-93** (TM3) και **Asp-276** (TM8) χαρακτηρίζονται ως σημαντικά για την εξειδίκευση (Karena and Frillingos, 2009).

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



Εικόνα 1.10. Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα ξανθίνης XanQ. Οι 14 διαμεμβρανικές έλικες (TMs 1-14), οργανώνονται στην περιοχή του «πυρήνα» (core domain) (περιβάλλονται από έντονο περίγραμμα) και στην περιοχή της «εισόδου» (gate domain). Κυκλωμένα είναι τα κατάλοιπα τα οποία έχουν αναλυθεί με στοχευμένη μεταλλαξήγνεση. Με σκούρο μπλε χρώμα επισημαίνονται τα κατάλοιπα που είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία του μεταφορέα. Αναντικατάστατα κατάλοιπα, που επηρεάζουν σοβαρά την έκφραση στη μεμβράνη τονίζονται με μπλε περίγραμμα. Με πράσινο χρώμα σημειώνονται τα κατάλοιπα, που υπόκεινται σε λειτουργικούς περιορισμούς σε σχέση με τις επιτρεπόμενες αντικαταστάσεις των πλευρικών ομάδων. Κατάλοιπα που εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή ή μέτρια ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM επισημαίνονται με πετρώλ χρώμα (Karena *et al.*, 2015).

Οι αναλύσεις του XanQ, ωστόσο, δεν αποκάλυψαν μεταλλαγές αμινοξέων που να μπορούν να συσχετισθούν με σημαντικές αλλαγές εξειδίκευσης παρά μόνο σε θέσεις περιμετρικά του κέντρου πρόσδεσης (Karena and Frillingos, 2009; Karena and Frillingos, 2011). Η ομάδα των σημαντικών θέσεων αμινοξέων του XanQ χρησιμοποιήθηκε ως βάση *ab initio* μελέτης

άλλων βακτηριακών ομολόγων του κλάδου των περμεασών ξανθίνης και/ή ουρικού, με ορθολογικά σχεδιασμένη μεταλλαξιγένεση, και αποκάλυψε ότι ο ρόλος μερικών από τα σημαντικά κατάλοιπα αμινοξέων, ιδίως στην περιοχή του κέντρου πρόσδεσης, διατηρείται σε μεγάλο βαθμό (Papakostas and Frillingos 2012; Botou *et al.*, 2020). Το ίδιο ισχύει και για το μυκητιακό ομόλογο του κλάδου (UapA) που έχει μελετηθεί ανεξάρτητα (Diallinas, 2016; Frillingos, 2012). Δεδομένου ότι οι μεταφορείς XanQ και UapA διαφέρουν με συγκεκριμένο τρόπο ως προς τη συγγένεια και την εξειδίκευση του ουρικού οξέος, της ξανθίνης και των άλλων αναλόγων πουρινών (Goudela *et al.*, 2005) και ότι τα μέχρι τώρα αποτελέσματα από τα δυο συστήματα μεταφορέων συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό (Diallinas and Gournas, 2008; Diallinas, 2021), η συγκριτική ανάλυση των δυο συστημάτων δίνει μια ισχυρή μοριακή βάση για τη μελέτη των σχέσεων δομής- λειτουργίας των μεταφορέων NCS2.

Συνολικά, επομένως, οι έως τώρα μελέτες σχέσεων δομής-λειτουργίας των περμεασών νουκλεοτιδικών βάσεων έχουν υποδείξει ορισμένες σημαντικές θέσεις αμινοξέων που φαίνεται να είναι σημαντικές για τον καθορισμό του προφίλ εξειδίκευσης του κάθε μεταφορέα. Ωστόσο, οι παραπάνω ενδείξεις δεν αρκούν για να δώσουν μία πλήρη εικόνα για τα αμινοξέα που καθορίζουν τους διαφορετικούς τύπους εξειδίκευσης, ούτε για τον τρόπο που έχουν εξελιχθεί οι εξειδικεύσεις των μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NCS2. Για να προσεγγιστούν τα ερωτήματα αυτά, απαιτείται η εισαγωγή νέων ερευνητικών προσεγγίσεων που δε θα στηρίζονται απλώς σε σχεδιασμούς μεταλλαξιγένεσης με βάση τη συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των σημερινών γονιδίων, αλλά θα λαμβάνουν υπόψη τους την εξελικτική ιστορία της απόκλισής τους. Μία τέτοια στρατηγική είναι και η Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών (**Ancestral Sequence Reconstruction**), που εφαρμόσαμε στην παρούσα Διατριβή, η οποία βασίζεται σε εξαγωγή, ανασύνθεση, λειτουργική ανάλυση και μεταλλαξιγένεση προγονικών πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Αυτή η εξελικτική προσέγγιση, όπως περιγράφεται στις ενότητες που ακολουθούν, έχει εφαρμοσθεί, μέχρι σήμερα, σε πολλούς διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών και έχει οδηγήσει στην αποκάλυψη σημαντικών μεταλλαγών που ήταν καθοριστικές για την εξέλιξη αυτών των πρωτεϊνών και των οποίων η σημασία αναδείχθηκε μόνο μέσα από την ανάλυση των προγονικών ομολόγων των αντίστοιχων φυλογενετικών κλάδων. Εντούτοις, η εφαρμογή της σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς παραμένει ιδιαίτερα περιορισμένη.

1.2 Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς και ιδιαίτερα οι μεταφορείς NCS2, που αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας Διατριβής, κατατάσσονται σε εξελικτικά ευρείες γονιδιακές οικογένειες, που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες με μεγάλη ομοιότητα δομής, αλλά και αρκετά διαφορετικές εξειδικεύσεις ως προς τη λειτουργία. Πως όμως αναπτύσσονται οι διαφορετικές λειτουργικές εξειδικεύσεις ανάμεσα σε πρωτεΐνες, που διατηρούν σε μεγάλο βαθμό τα ίδια αμινοξέα του ενεργού κέντρου και μοιράζονται το ίδιο γενικό μοτίβο δομής; Οι πρωτεΐνες αποτελούν δυναμικά και εξειδικευμένα βιολογικά συστήματα, που χαρακτηρίζονται από μια αξιοσημείωτη ικανότητα να αποκτούν νέες λειτουργίες και να σχηματίζουν καινούργιες δομές.

Μια προσέγγιση για την εξήγηση της εξέλιξης των πρωτεϊνικών μορίων είναι τα πειράματα εξέλιξης *in vitro*. Το κεντρικό ερώτημα για την εξέλιξη των πρωτεϊνών είναι το πως οι αλλαγές στην αλληλουχία των γονιδίων διαφοροποιούν τη λειτουργία και κατά επέκταση το φαινότυπό τους. Για να κατανοηθεί πλήρως αυτή η διαδικασία χρειάζεται να αναλυθεί πως συνεισφέρουν στα λειτουργικά αποτελέσματα των μεταλλαγών, οι αντίστοιχες τροποποιήσεις της πρωτεϊνικής δομής. Οι αναλύσεις αυτές ξεκινούν συνήθως από τη σύγκριση μεταξύ πρωτεϊνών, που υπάρχουν σήμερα και οι αλληλουχίες ή οι δομές τους είναι διαθέσιμες μέσω της ανάλυσης γνωστών γονιδιωμάτων και συνεχίζονται με μελέτες στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και πρωτεϊνικής μηχανικής. Τέτοια πειράματα μπορούν να αποκαλύψουν άγνωστες πτυχές της διαφοροποίησης των πρωτεϊνικών δομών και να διαλευκάνουν τις σχέσεις δομής -λειτουργίας, οι οποίες έχουν διαμορφωθεί κατά την εξελικτική διαδικασία (Tokuriki and Tawfik, 2009).

Ωστόσο, για να ταυτοποιηθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους ιστορικές μεταλλαγές (historical mutations) έχουν οδηγήσει σε νέες λειτουργίες θα ήταν αναγκαίο να συγκριθούν οι πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους από προγενέστερες μοριακές δομές, που πλέον έχουν εκλείψει (ancestral proteins). Μια προσέγγιση προς την κατεύθυνση αυτή, η οποία έχει εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια, είναι η «αναγέννηση» (resurrection) της προγονικής πρωτεΐνης και η λειτουργική της ανάλυση (Thornton, 2004).

1.2.1 Στρατηγικές για τη μελέτη των σχέσεων δομής- λειτουργίας των πρωτεϊνών: οριζόντια και κάθετη ανάλυση πρωτεϊνικών οικογενειών

Ένα καίριο ερευνητικό ερώτημα στο πεδίο των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μακρομορίων είναι το πώς αναπτύσσονται οι διαφορετικές λειτουργικές εξειδικεύσεις ανάμεσα σε ομόλογες πρωτεΐνες που ανήκουν σε γονιδιακές οικογένειες με ευρεία διάδοση και υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης και δεν διαφέρουν ουσιαστικά ούτε στο γενικό μοτίβο δομής, ούτε σε σημαντικά αμινοξέα του ενεργού τους κέντρου. Με άλλα λόγια, πώς μπορούν να κατανοηθούν τα δομικά-λειτουργικά στοιχεία και οι πλευρικές ομάδες αμινοξέων που έχουν παίξει καθοριστικό ρόλο για αυτές τις διαφορές εξειδίκευσης

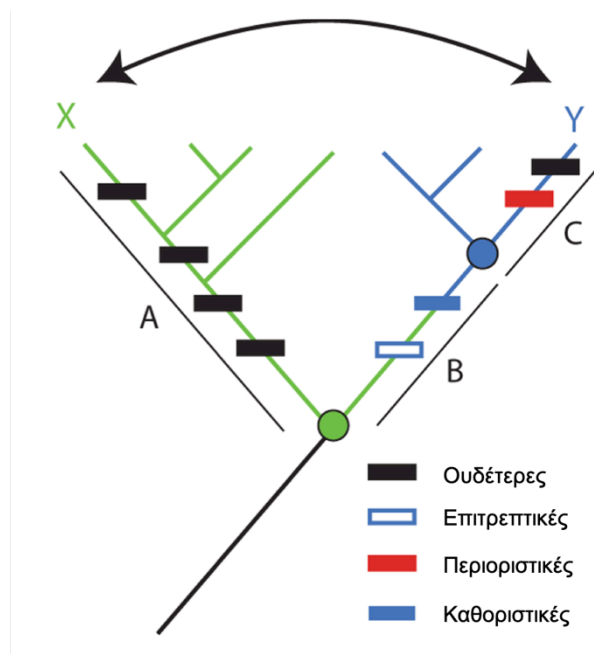
Ένας τρόπος για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό είναι με την «οριζόντια» σύγκριση των αλληλουχιών των σημερινών ομολόγων χρησιμοποιώντας ορθολογικούς σχεδιασμούς μεταλλαξιγένεσης. Σε αυτή την οριζόντια ανάλυση, μια πρωτεΐνη ενδιαφέροντος συγκρίνεται με τουλάχιστον μία ομόλογη πρωτεΐνη που έχει σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία και τη δομή, αλλά διαφορετική λειτουργία. Για να προσδιοριστούν οι καθοριστικές διαφορές στην αλληλουχία που είναι υπεύθυνες για τη λειτουργική παραλλαγή, αμινοξέα της μίας πρωτεΐνης αντικαθίστανται με τα αντίστοιχα της άλλης. Εφόσον εντοπιστούν τέτοιες αντικαταστάσεις καταλοίπων που αλλάζουν τη λειτουργία σε εκείνη του άλλου ομολόγου, μπορούν στη συνέχεια, να χαρτογραφηθούν στο δομικό μοντέλο για να εντοπιστούν δομικά στοιχεία που προσδίδουν τη διαφορά στη λειτουργία (Hochberg and Thornton, 2017).

Στην πράξη, βέβαια, τα πειράματα οριζόντιας ανταλλαγής συχνά αποτυγχάνουν να εντοπίσουν τις διαφορές στην αλληλουχία που ευθύνονται για τις λειτουργικές διαφορές (Gerlt and Babbitt, 2009; Li *et al.*, 2005). Οι οριζόντιες συγκρίσεις είναι αναποτελεσματικές, κυρίως γιατί δεν λαμβάνουν υπόψη τα πιθανά *εξελικτικά σενάρια* που έχουν οδηγήσει στις λειτουργικές διαφορές των σημερινών πρωτεϊνών και δεν μπορούν να αναδείξουν το ρόλο ορισμένων σημαντικών μεταλλαγών που ήταν καθοριστικές για την εδραίωση των διαφορετικών εξειδικεύσεων κατά την εξέλιξη (Harms and Thornton, 2010; Hochberg and Thornton, 2017). Η συσσώρευση, στα σημερινά ομόλογα πολλών, παράλληλων μεταλλαγών πέραν αυτών που ήταν κρίσιμες για τις αλλαγές εξειδίκευσης μπορεί να αποκρύβει τον πραγματικό ρόλο των καθοριστικών μεταλλαγών λόγω φαινομένων **διαμορφωτικής επίστασης** (conformational epistasis) (Harms and Thornton, 2010; Ortlund and Thornton, 2007; Starr and Thornton, 2016), δηλαδή το ίδιο αμινοξύ αποκτά διαφορετικό ρόλο από ό,τι είχε αρχικά, στο «περιβάλλον» των πολλών ακόμη μεταλλαγών που συνυπάρχουν σε άλλες θέσεις. Ως συνέπεια, αλλαγές αμινοξέων που υπήρξαν σημαντικές κατά την εξέλιξη για την εδραίωση μιας νέας λειτουργίας δεν μπορούν πλέον να αναδειχθούν στο υπόβαθρο των σημερινών μορίων, γιατί σε αυτά προκαλούν αρκετά διαφορετικές επιπτώσεις, λόγω

αλληλεπίδρασης με ορισμένες από τις άλλες θέσεις μεταλλαγών που έχουν εισαχθεί παράλληλα. Αυτού του τύπου οι παράλληλες μεταλλαγές, που ονομάζονται επιστατικές, επηρεάζουν τον ρόλο των καθοριστικών μεταλλαγών άμεσα ή έμμεσα, με φυσικές αλληλεπιδράσεις (Harms and Thornton, 2010; Ortlund and Thornton, 2007; Starr and Thornton, 2016). Οι επιστατικές μεταλλαγές μπορεί να είναι **επιτρεπτικές** (permissive), δηλαδή να προαπαιτούνται για την εδραίωση των καθοριστικών μεταλλαγών αυξάνοντας, για παράδειγμα, τη σταθερότητα του μορίου ή **περιοριστικές** (restrictive), δηλαδή να αποτρέπουν την αλλαγή εξειδίκευσης που θα επέφερε μία καθοριστική μεταλλαγή εισάγοντας επιπρόσθετους στερεοχημικούς περιορισμούς (**Εικόνα 1.11**) (Harms and Thornton, 2010; Starr and Thornton, 2016). Σε μία αποκλίνουσα πορεία εξέλιξης που οδηγεί στον διαχωρισμό των εξειδικεύσεων δύο συγγενικών ομόλογων (**Εικόνα 1.11**), οι επιτρεπτικές μεταλλαγές εμφανίζονται πριν από τις καθοριστικές, ενώ οι περιοριστικές εμφανίζονται αργότερα. Μια «οριζόντια» ανταλλαγή καταλοίπων θα έχει ως αποτέλεσμα μια μη λειτουργική πρωτεΐνη εάν μια θέση αμινοξέως (ή ένα σύνολο θέσεων) ενός ομόλογου είναι ασυμβίβαστη με το υπόβαθρο της αλληλουχίας του ομόλογου στο οποίο εισάγεται. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε επειδή οι επιτρεπτικές θέσεις που απαιτούνται για την εδραίωση της νέας λειτουργίας απουσιάζουν από το ένα ομόλογο, είτε επειδή υπάρχουν οι περιοριστικές θέσεις που αποτρέπουν την αλλαγή της λειτουργίας (**Εικόνα 1.11**) (Bloom *et al.*, 2010; Bridgham *et al.*, 2009; Ortlund *et al.*, 2007). Και στις δύο περιπτώσεις, οι διαφορές στην αλληλουχία που είναι πραγματικά ουσιώδεις για μια διαφορετική λειτουργία δε δύναται να εντοπιστούν, επειδή η επίδρασή τους επικαλύπτεται από την παρουσία ή την απουσία άλλων καταλοίπων που τροποποιούν τα λειτουργικά τους αποτελέσματα.

Τα τελευταία χρόνια, έχει αρχίσει να εφαρμόζεται μία νέα ερευνητική στρατηγική, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην επόμενη ενότητα, η οποία δε στηρίζεται σε απευθείας μεταλλαξιγένεση των σημερινών ομόλογων, αλλά βασίζεται στην «αναγέννηση» των αλληλουχιών των πιθανών προγονικών γονιδίων (**Ancestral Sequence Reconstruction, ASR**) μετά από λεπτομερείς βιοπληροφορικές φυλογενετικές αναλύσεις και στην εξελικτικά «κάθετη» σύγκριση μεταξύ των ανασυσταθέντων προγονικών αλληλουχιών και των σημερινών ομόλογων τους (Harms and Thornton, 2010; Thornton, 2004). Στόχος των αναλύσεων αναγέννησης προγονικών γονιδίων είναι να εντοπίζονται ζεύγη πιθανών προγονικών αλληλουχιών που να διαφέρουν μεν στην εξειδίκευση, αλλά ως προς την αλληλουχία να διαφέρουν όσο γίνεται λιγότερο, διατηρώντας κυρίως τις διαφορές στις καθοριστικές θέσεις, ή και σε θέσεις επιτρεπτικών μεταλλαγών, αλλά όχι σε θέσεις περιοριστικών μεταλλαγών που έχουν εισαχθεί επιπρόσθετα κατά την εξέλιξη στα σημερινά

ομόλογα. Η συγκριτική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης τέτοιων «προγονικών» ομολόγων (Εικόνα 1.11), θα μπορούσε να αποκαλύψει καλύτερα τη σημασία των καθοριστικών μεταλλαγών, σε ένα υπόβαθρο απαλλαγμένο από τις περισσότερες επιστατικές αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα στις «περιοριστικές» θέσεις.



Εικόνα 1.11. Οριζόντια και κάθετη ανάλυση των σχέσεων αλληλουχίας- λειτουργίας. Για τον εντοπισμό διαφορών στην αλληλουχία, που οδηγούν σε διαφοροποίηση στη λειτουργία (πράσινο ή μπλε) μεταξύ των παράλογων πρωτεϊνών X και Y, με οριζόντια σύγκριση (βέλος) θα λαμβάνονταν υπόψιν όλες οι αλλαγές στους κλάδους A, B, C (ορθογώνια με τα αντίστοιχα χρώματα). Επιτρεπτικές μεταλλάξεις από μόνες τους δεν επηρεάζουν τη λειτουργία, αλλά επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να δεχθεί μια νέα λειτουργία. Έτσι, αλλαγή αμινοξέων, σημαντικών για τη λειτουργία, μεταξύ των πρωτεϊνών X και Y οδηγεί σε μη λειτουργική πρωτεΐνη, γιατί δεν υπάρχουν οι απαραίτητες επιτρεπτικές μεταλλάξεις. Περιοριστικές μεταλλάξεις στην προγονική πρωτεΐνη επίσης δεν επιτρέπουν τέτοιες αλλαγές στις σύγχρονες X και Y. Με κάθετη ανάλυση καθορίζεται η λειτουργία της προγονικής πρωτεΐνης (κύκλος) και απομονώνει την τροποποίησή της προς τον κλάδο B, μειώνοντας τις αλλαγές που λαμβάνονται υπόψιν και περιορίζοντας την επίδραση της επίστασης (Hochberg and Thornton, 2017).

1.2.2 Η εξελικτική στρατηγική της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών

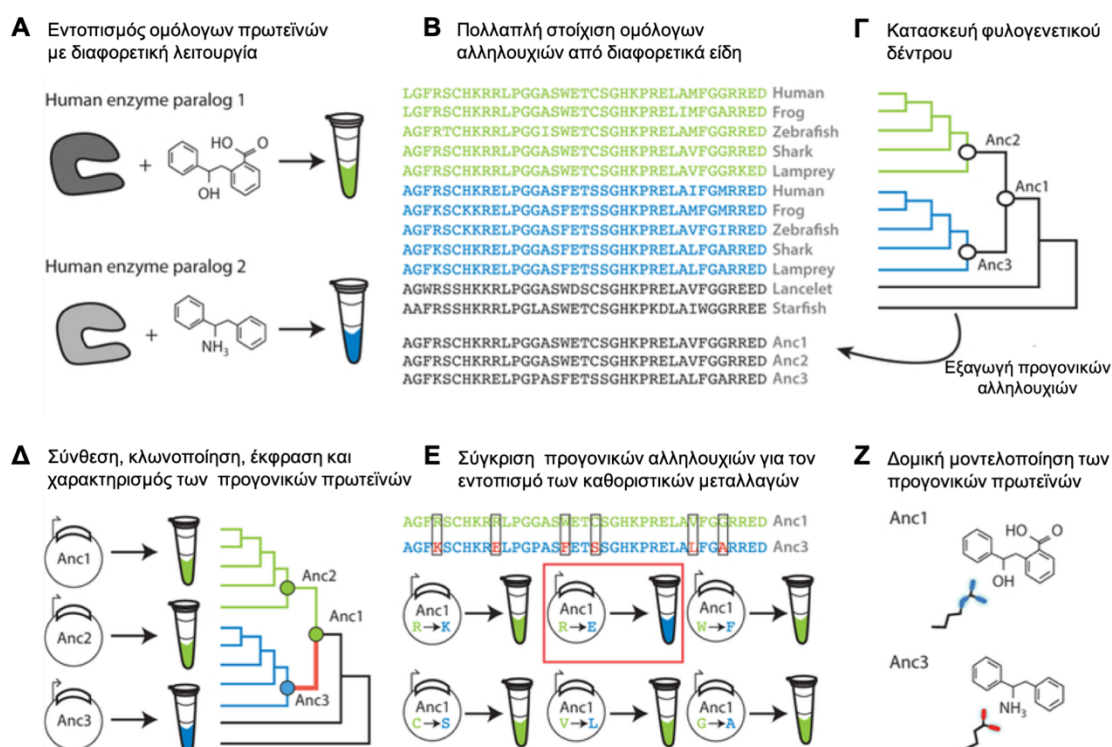
Οι περιορισμοί της οριζόντιας σύγκρισης μπορούν να αντιμετωπιστούν με την εξελικτική «κάθετη» ανάλυση που στηρίζεται στην ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών εξετάζοντας τον τρόπο με τον οποίο οι αλληλουχίες, οι δομές και οι λειτουργίες μιας

οικογένειας πρωτεϊνών άλλαξαν με την πάροδο του χρόνου. Η ιδέα ότι οι προγονικές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να «αναγεννηθούν» και να χαρακτηριστούν λειτουργικά προτάθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1960 (Zuckerlandl, 1963). Με την ανάπτυξη στατιστικών και φυλογενετικών μεθόδων, κατέστη δυνατή η εξαγωγή των αλληλουχιών των προγονικών πρωτεϊνών από τις αλληλουχίες των σημερινών απογόνων τους (Yang *et al.*, 1995). Στη συνέχεια, καθώς βελτιώθηκαν οι τεχνικές της σύνθεσης γονιδίων, έγινε εφικτή η έκφραση των ανασυσταθέντων προγονικών πρωτεϊνών και ο πειραματικός χαρακτηρισμός των βιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων τους (Gaucher *et al.*, 2003, Stackhouse *et al.*, 1990, Thornton *et al.*, 2003).

Με την ανασύσταση διαδοχικών κοινών προγόνων σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που προτείνει η κάθετη ανάλυση, μπορεί να απομονωθεί η μεταλλαγή που προκαλεί αλλαγή της λειτουργίας σε έναν συγκεκριμένο κλάδο. (**Εικόνα 1.12**). Υποψήφιος αλλαγές που καθόρισαν την αλλαγή εξειδίκευσης μπορούν να ελεγχθούν πειραματικά με την εισαγωγή τους στην «αναγεννημένη» προγονική πρωτεΐνη. Με αυτό τον τρόπο η προσέγγιση αυτή μειώνει σημαντικά τον αριθμό των διαφορών αλληλουχίας μεταξύ πρωτεϊνών με αποκλίνουσες λειτουργίες, καθιστώντας πολύ πιο εύκολη την αναγνώριση του συνόλου των καταλοίπων αλλαγής λειτουργίας και των δομικών στοιχείων που την επηρεάζουν. Επιπλέον, μειώνει και την επίδραση της επίστασης, επειδή οι καθοριστικές υποκαταστάσεις επανεισάγονται στα προγονικά υπόβαθρα αλληλουχίας πανομοιότυπα ή πολύ παρόμοια με εκείνα στα οποία συνέβησαν πραγματικά (Hochberg and Thornton, 2017).

Η ανασύσταση μιας προγονικής αλληλουχίας (ASR) ξεκινά με κίνητρο τη μελέτη μιας βιολογικά ή δομικά ενδιαφέρουσας ποικιλομορφίας σε μία κατηγορία πρωτεϊνών, την εξέλιξη και τους βιοχημικούς παράγοντες της οποίας θα θέλαμε να κατανοήσουμε (**Εικόνα 1.12, Α**). Η μέθοδος ASR απαιτεί μια στοίχιση των αλληλουχιών, ένα πιθανολογικό εξελικτικό μοντέλο και ένα φυλογενετικό δέντρο που να περιγράφει τις σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών (Thornton, 2004) (**Εικόνα 1.12, Β, Γ**). Τα πιθανολογικά μοντέλα εξέλιξης καθορίζουν τις συχνότητες εμφάνισης όλων των θέσεων αμινοξέων (Felsenstein, 2004). Ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων μοντέλων είναι διαθέσιμος, οπότε η τυπική στρατηγική είναι να εκτιμηθεί η προσαρμογή ενός συνόλου υποψήφιων μοντέλων στις στοιχημένες αλληλουχίες και να επιλεγεί το καταλληλότερο μοντέλο (Abascal *et al.*, 2005). Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών μπορούν στη συνέχεια να εξαχθούν από τη στοίχιση και το μοντέλο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML) ή μεθόδους Bayesian.

Με την ολοκλήρωση της φυλογενετικής ανάλυσης οι προγονικές αλληλουχίες σε κάθε εσωτερικό κόμβο του δέντρου μπορούν να εξαχθούν στατιστικά χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις της Μέγιστης Πιθανοφάνειας ή μεθόδους Bayesian. Οι μέθοδοι αυτοί προβλέπουν το πιθανότερο αμινοξύ για κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ δίνουν και τα αντίστοιχα ποσοστά (posterior probabilities) για κάθε αμινοξύ, καθώς και όλα τα εναλλακτικά αμινοξέα για κάθε θέση μαζί με τις αντίστοιχες πιθανότητες. Η τελική αλληλουχία που εξάγει το πρόγραμμα αντιπροσωπεύει την αλληλουχία της προγονικής πρωτεΐνης με την υψηλότερη πιθανότητα, με βάση των δεδομένων της στοίχισης των αλληλουχιών, του μοντέλου και της φυλογένεσης. Μόρια DNA που κωδικοποιούν για την «αναγεννημένη» προγονική πρωτεϊνική αλληλουχία μπορούν, στη συνέχεια, να συντεθούν, να κλωνοποιηθούν και οι πρωτεΐνες να εκφραστούν σε κατάλληλα συστήματα για βιολογική και/ή βιοχημική ανάλυση (Εικόνα 1.12 Δ, Ε, Ζ).



Εικόνα 1.12. Στρατηγική της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών. Το διάγραμμα ροής δείχνει τα απαιτούμενα στάδια για την ανασύσταση και το λειτουργικό χαρακτηρισμό ενός προγονικού γονιδίου. Μια υποθετική οικογένεια ενζύμων χρησιμοποιείται ως παράδειγμα. Α) Δύο παράλογα ένζυμα καταλύουν παρόμοιες αντιδράσεις με διαφορετικά υποστρώματα, προς διαφορετικά προϊόντα (χρώματα). Β) Οι αλληλουχίες των 2 ενζύμων (πράσινη και μπλε) στοιχίζονται (aligned) από πολλά είδη οργανισμών, περιλαμβάνοντας και παραομάδες (outgroups) (μαύρο). Γ) Η στοίχιση δίνει το πιο πιθανό εξελικτικό μοντέλο και εν συνεχεία το

φυλογενετικό δέντρο. Προγονικές αλληλουχίες εξάγονται με τη μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (*Maximum Likelihood*) για τους κόμβους (*nodes*) που αντιστοιχούν στον τελευταίο κοινό πρόγονο κάθε παράλογης ομάδας (*Anc2*, *Anc3*) και στον κόμβο που έγινε διπλασιασμός γονιδίων (*gene duplication*) πριν την εμφάνιση των 2 ομάδων. Δ) Οι αλληλουχίες DNA των προγονικών πρωτεϊνών συντίθενται και κλωνοποιούνται και ακολουθεί έκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός τους, ώστε να εντοπιστεί ο κλάδος, όπου εμφανίζεται η νέα λειτουργία (κόκκινο). Ε) Οι μεταλλάξεις, που οδήγησαν στη νέα λειτουργία (μπλε), πρέπει να εντοπίζονται μεταξύ των *Anc1* και *Anc3* (σημεία σε κουτάκι). Για τον εντοπισμό σημαντικών αντικαταστάσεων, αμινοξέα από την *Anc3* (κόκκινα στην μπλε αλληλουχία) εισάγονται στην *Anc1* και η πρωτεΐνη που προκύπτει ελέγχεται πειραματικά. Εδώ, η αντικατάσταση αργινίνης από γλουταμικό οξύ (κόκκινο κουτάκι) φέρει την αλλαγή στην εξειδίκευση. Ζ) Η κρυσταλλική δομή της προγονικής πρωτεΐνης ή η δομή που προκύπτει από μοντέλα ομολογίας χρησιμοποιείται, για να δώσει πληροφορίες για τον μηχανισμό με τον οποίο η καθοριστική αντικατάσταση οδήγησε σε νέα λειτουργία. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, το γλουταμικό οξύ της *Anc3* δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα στο νέο υπόστρωμα (Hochberg and Thornton, 2017).

Στις επόμενες ενότητες, παρουσιάζονται πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποίησαν τη στρατηγική της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών (ASR), η οποία οδήγησε στην αποκάλυψη σημαντικών μεταλλαγών που ήταν καθοριστικές για την εξέλιξη αυτών των πρωτεϊνών και των οποίων η σημασία αναδείχθηκε μόνο μέσα από την ανάλυση των προγονικών ομολόγων των αντίστοιχων φυλογενετικών κλάδων.

1.2.3 Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών για την κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξέλιξης πρωτεϊνικών οικογενειών

Εκτός από την κατανόηση του ρόλου των καθοριστικών μεταλλαγών, η «αναγέννηση» και μελέτη προγονικών αλληλουχιών έχει επιτρέψει να διερευνηθούν πολλές άλλες πτυχές της εξέλιξης των μακρομορίων και της δυναμικής που έχουν για ανάπτυξη νέων εξειδικεύσεων, οδηγώντας σε χρήσιμα συμπεράσματα για την δυναμική της μοριακής εξέλιξης (Tokuriki and Tawfik, 2009). Η ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών έχει εφαρμοσθεί σε αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών (Πίνακας 1.1), με την εργασία του Thornton και των συνεργατών του, για τη λειτουργική εξέλιξη των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (Thornton, 2003; Bridgham *et al.*, 2006; Ortlund *et al.*, 2007; Eick *et al.*, 2012), να αποτελεί το πιο αναλυτικό παράδειγμα εφαρμογής αυτής της στρατηγικής (Ενότητα 1.2.3.1) και την εξελικτική μελέτη κινασών τυροσίνης ως προς την ευαισθησία στο αντικαρκινικό φάρμακο Gleevec (Wilson *et al.*, 2015) να αποτελεί ίσως το πιο ενδιαφέρον από άποψη δυνατοτήτων κλινικής εφαρμογής (Ενότητα 1.2.3.2). Επιπλέον, ενδεικτική του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για το

νέο πεδίο της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών είναι η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων για τις πρωτεΐνες που έχουν ανασυσταθεί (Revenant, Resurrected protein database) (211 μέχρι σήμερα), ώστε τα δεδομένα να μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω στη μελέτη σύγχρονων πρωτεϊνών (Carletti *et al.*, 2020).

Κατηγορία πρωτεϊνών	Μεταλλαξικότητα		Αναφορά
	προγονικής πρωτεΐνης	κρυσταλλικής δομής πρωτεΐνης	
Ροδοψίνες			Chang <i>et al.</i> 2002
Υποδοχείς στεροειδών ορμονών	•	•	Thornton <i>et al.</i> , 2003 Bridgham <i>et al.</i> , 2006 Ortlund <i>et al.</i> , 2007 Eick <i>et al.</i> , 2012
Πρωτεϊνοσυνθετικοί παράγοντες (EF-Tu)			Gaucher <i>et al.</i> , 2003
Αφυδρογονάσες	•	•	Thomson <i>et al.</i> , 2005 Boucher <i>et al.</i> , 2014
GPCRs			Kuang <i>et al.</i> , 2006 Yokoyama <i>et al.</i> , 2008
Φθορίζουσες πρωτεΐνες GFP-like	•		Field <i>et al.</i> , 2010
ΑΤΡάσες			Finnigan <i>et al.</i> , 2011 Finnigan <i>et al.</i> , 2012
β-λακταμάσες		•	Risso <i>et al.</i> , 2013
Ουρικάσες	•	•	Kratzer <i>et al.</i> , 2014
Κινάσες	•		Howard <i>et al.</i> , 2014 Wilson <i>et al.</i> , 2015 Anderson <i>et al.</i> , 2015 Hadzipasic <i>et al.</i> 2020
Πυροφωσφορυλάσες γλυκόζης	•		Ebrecht <i>et al.</i> , 2015

Πρωτεΐνες δέσμευσης αμινοξέων (amino acid-binding protein family)	•	Clifton and Jackson, 2016
Υποδοχείς ακετυλοχολίνης		Prinston <i>et al.</i> , 2017
Λιπάσες		Jan <i>et al.</i> , 2017
Mamba Αμινεργικές τοξίνες	•	• Blanchet <i>et al.</i> , 2017
Μεταφορείς νουκλεοτιδίων NTT		Dean <i>et al.</i> , 2018
Νουκλεάσες-στοιχειοθέτες βάσεων κυτιδίνης και αδενίνης (cytidine and adenine base editors)		Koblan <i>et al.</i> , 2018
Μεταφορείς καρβοξυλικού οξέος		Savory <i>et al.</i> , 2018
Μεταγραφικοί παράγοντες Bicoid (Bcd)	•	Liu <i>et al.</i> , 2018
Κυκλάσες	•	Hendrikse <i>et al.</i> , 2018
Υποδοχείς Toll-like (TLR4)		Anderson <i>et al.</i> , 2019
Κασπάσες	•	• Grinshpon <i>et al.</i> , 2019
Αναγωγάσες καρβοξυλικού οξέος		Thomas <i>et al.</i> , 2019
Τρανσφεράσες		Yunus <i>et al.</i> , 2019
FMOs		• Nicoll <i>et al.</i> , 2019
Οξειδάσες	•	• Nakano <i>et al.</i> , 2019 Sugiura <i>et al.</i> , 2021
Αιμοσφαιρίνες	•	Pillai <i>et al.</i> , 2020

Συνθάσες τρυπτοφάνης	•	Schupfner <i>et al.</i> , 2020
Λυάσες αμμωνίας		Hendrikse <i>et al.</i> , 2020
Σουλφατάσες		Hendrikse <i>et al.</i> , 2021
Λουσιφεράσες	•	Schenkmayerova <i>et al.</i> , 2021
Υπεροξειδάσες (DyPs)	•	Zitare <i>et al.</i> , 2021
Κυτοχρώματα P450		Harz <i>et al.</i> , 2021
Αποκαρβοξυλάσες		Sun <i>et al.</i> , 2021
Παράγοντας πήξης VIII και Παράγοντας von Willebrand (VWF)		Zakas <i>et al.</i> , 2021

Πίνακας 1.1. Κατηγορίες πρωτεϊνών που έχουν μελετηθεί με τη στρατηγική της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών. Αναφέρονται οι οικογένειες πρωτεϊνών στις οποίες έχει εφαρμοστεί η μεθοδολογία της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών (έως τον Αύγουστο του 2021) και έχει πραγματοποιηθεί σύνθεση και λειτουργικός χαρακτηρισμός της προγονικής πρωτεΐνης. Επίσης, σημειώνονται οι περιπτώσεις στις οποίες έχει γίνει μεταλλαξιγένεση της προγονικής πρωτεΐνης, καθώς οι περιπτώσεις στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί κρυστάλλωση της «αναγεννημένης» προγονικής πρωτεΐνης. Με γκρι σκίαση σημειώνονται οι δύο κατηγορίες μεμβρανικών μεταφορέων, στις οποίες έχει εφαρμοστεί αυτή η μεθοδολογία, υποδεικνύοντας την περιορισμένη εφαρμογή της σε αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών.

1.2.3.1 Εξέλιξη της εξειδίκευσης των υποδοχέων στεροειδών

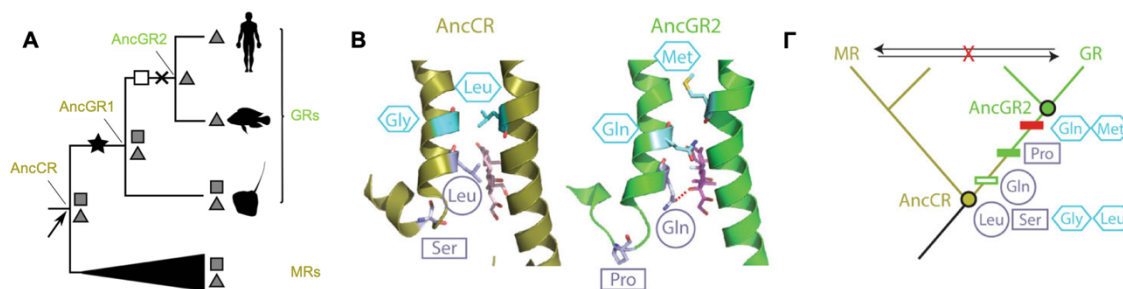
Οι υποδοχείς των μεταλλοκορτικοειδών (MR) και των γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Προέκυψαν μέσω διπλασιασμού από ένα μοναδικό προγονικό υποδοχέα και στη συνέχεια απέκλιναν ώστε να επιτελούν διαφορετικούς ρόλους. Ο υποδοχέας MR ενεργοποιείται από αλδοστερόνη και δεοξυκορτικοστερόνη και στον άνθρωπο και σε άλλα τετράποδα, είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών. Ο υποδοχέας GR ρυθμίζει την απόκριση στο στρες στα ανώτερα σπονδυλωτά και ενεργοποιείται μόνο από κορτιζόλη, η οποία διαφέρει από τα μεταλλοκορτικοειδή έχοντας ένα υδροξύλιο στη θέση C17. Κρυσταλλογραφικές μελέτες των σημερινών πρωτεϊνών GR και MR από θηλαστικά αποκάλυψαν διαφορές στη

γεωμετρία του ενεργού κέντρου (Li *et al.*, 2005). Στο τέλος μιας έλικας που ευθυγραμμίζει το ενεργό κέντρο ο MR έχει ένα κατάλοιπο σερίνης, ενώ ο GR φέρει προλίνη, μια διαφορά που θεωρείται ότι αλλάζει τη θέση της έλικας και έχει ως αποτέλεσμα ένα στενότερο ενεργό κέντρο στον MR από ό, τι στον GR (**Εικόνα 1.13, Β**). Επίσης, στον GR, μια συντηρημένη γλουταμίνη σε αυτή την έλικα κάνει μια συγκεκριμένη επαφή με το υδροξύλιο C17 της κορτιζόλης, ενώ η λευκίνη του MR κάνει μια μη πολική επαφή με τους προσδέτες της στην ίδια θέση (Li *et al.*, 2005). Οι οριζόντιες ανταλλαγές αμινοξέων σε αυτές τις δύο θέσεις είχαν ως αποτέλεσμα μη λειτουργικούς υποδοχείς (Li *et al.*, 2005). Εκείνη την εποχή, αυτό θεωρήθηκε ότι σημαίνει πως αυτές οι δύο θέσεις είναι σημαντικές για τη λειτουργικότητα των υποδοχέων, αλλά δεν επαρκούν για να αλλάξουν την εξειδίκευση.

Όταν ο τελευταίος κοινός πρόγονος των υποδοχέων MR και GR, AncCR, «ανασυστάθηκε» και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά, βρέθηκε να έχει παρόμοια ευαισθησία με τον υποδοχέα MR με εξειδίκευση τόσο αλδοστερόνης όσο και κορτιζόλης, καθώς και τα ίδια αμινοξέα στις προαναφερθείσες δυνητικά σημαντικές θέσεις με τον MR (Bridgham *et al.*, 2006) (**Εικόνα 1.13, Α, Β**). Με αυτό τον τρόπο υποδεικνύεται ότι η εξειδίκευση για την κορτιζόλη προέκυψε αργότερα στους υποδοχείς GR και έμενε να κατανοηθεί πώς η ευρεία εξειδίκευση του κοινού προγόνου μετατράπηκε στην εξειδίκευση για κορτιζόλη. Με την ανασύσταση και τον χαρακτηρισμό διαδοχικών προγονικών πρωτεϊνών κατά μήκος του κλάδου των GR, η αλλαγή αυτή στην εξειδίκευση απομονώθηκε σε ένα συγκεκριμένο μεσοδιάστημα στο οποίο έλαβαν χώρα οι δύο καθοριστικές μεταλλαγές. Όταν τα προκύπτοντα κατάλοιπα από το σημερινό GR εισήχθησαν στην προγονική ευρείας-εξειδίκευσης πρωτεΐνη, όχι μόνο μπορούσαν να γίνουν αποδεκτά για τη λειτουργικότητα, αλλά μπορούσαν επίσης να προσδώσουν στον προγονικό υποδοχέα εξειδίκευση για την κορτιζόλη (**Εικόνα 1.13, Γ**) (Ortlund *et al.*, 2007). Επιπλέον, οι κρυσταλλικές δομές των προγονικών πρωτεϊνών (Ortlund *et al.*, 2007) απέδειξαν ότι η υποκατάσταση σερίνης-προλίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της έλικας από την προγονική, MR- τύπου διαμόρφωση, μειώνοντας τη συγγένεια για όλα τα υποστρώματα και φέρνοντας το ενεργό κέντρο κοντά στον C17 της κορτιζόλης, όπου η υποκατάσταση λευκίνης-γλουταμίνης διαμόρφωσε ένα δεσμό υδρογόνου ειδικό για την κορτιζόλη, αποκαθιστώντας τη συγγένεια για αυτό το υπόστρωμα. Περαιτέρω ανάλυση υπέδειξε ότι πέντε ακόμη μεταλλάξεις που συνέβησαν την ίδια χρονική περίοδο ήταν επαρκείς για να υποστηρίξουν πλήρως την αλλαγή για την εξειδίκευση της κορτιζόλης.

Η ανάλυση αυτή υποδεικνύει επίσης και τους λόγους για τους οποίους απέτυχε η οριζόντια στρατηγική. Μετά τη λειτουργική αλλαγή, οι υποδοχείς GR απέκτησαν επιπρόσθετες,

περιοριστικές υποκαταστάσεις που στερεοχημικά παρεμποδίζουν τη διαμόρφωση της προγονικής έλικας (**Εικόνα 1.13 Β και Γ**) (Bridgham *et al.*, 2009). Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί οι σημερινοί υποδοχείς GR δεν μπορούν να «ανεχθούν» τα κατάλοιπα του MR στις καθοριστικές θέσεις. Επιπλέον, επιτρεπτικές υποκαταστάσεις, οι οποίες εμφανίστηκαν νωρίτερα στον κλάδο των GR, απαιτούνται, για τη σταθεροποίηση στοιχείων της δομής που αποσταθεροποιούνται από τις αντικαταστάσεις αλλαγής της λειτουργίας (Harms and Thornton, 2014). Αυτό εξηγεί γιατί οι σημερινοί υποδοχείς MR, από τους οποίους απουσιάζουν αυτές οι υποκαταστάσεις, δε μπορούν να δεχθούν τα κατάλοιπα του GR στις καθοριστικές θέσεις. Παρά τη σημαντική επίδρασή τους στην εξέλιξη των πρωτεϊνών, καμία από αυτές τις επιστατικά μεταλλάξεις δεν είχε ανιχνεύσιμες επιδράσεις στην εξειδίκευση των υποδοχέων όταν εισήχθησαν μόνες τους.



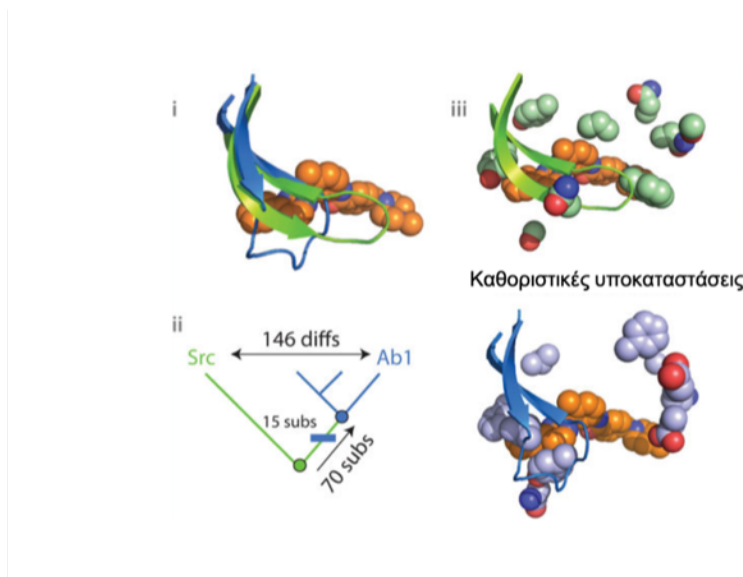
Εικόνα 1.13. Εξέλιξη της εξειδίκευσης των υποδοχέων μεταλοκορτικοειδών και γλυκοκορτικοειδών. Α) Επιτρεπτικές και περιοριστικές μεταλλάξεις καθόρισαν την εξέλιξη των υποδοχέων GR. Οι υποδοχείς GR και MR προέκυψαν μέσω διπλασιασμού από ένα προγονικό υποδοχέα (βέλος). Ο προγονικός υποδοχέας των AncCR ενεργοποιείται τόσο από την αλδοστερόνη όσο και από την κορτιζόλη (γκρι τετράγωνο, και τρίγωνο, αντίστοιχα). Η εξειδίκευση για την κορτιζόλη εξελίχθηκε με απώλεια της ευαισθησίας για την αλδοστερόνη (άσπρο τετράγωνο) στο μεσοδιάστημα της εξελικτικής απόστασης των AncGR1 και AncGR2. Οι μεταλλάξεις που οδήγησαν στην αλλαγή λειτουργίας προηγήθηκαν των επιτρεπτικών μεταλλάξεων (αστέρι), ενώ οι περιοριστικές μεταλλάξεις (X) ακολούθησαν. Οι MRs δεν έχουν τις επιτρεπτικές μεταλλάξεις και δεν μπορούν να δεχθούν τη νέα λειτουργία, ενώ οι GRs στον άνθρωπο και τα ψάρια έχουν περιοριστικές μεταλλάξεις που δεν επιτρέπουν την αναστροφή στην προγονική λειτουργία (Harms and Thornton, 2010). **Β)** (Αριστερά) Κρυσταλλική δομή του AncCR, κοινού προγόνου όλων των MRs και GRs (2Q1H) με δεσμευμένη την αλδοστερόνη (ράβδοι); (Δεξιά) δομή του AncGR2, προγόνου των GRs (3GN8), με δεσμευμένη την κορτιζόλη. Οι θέσεις που αλλάζουν την εξειδίκευση εμφανίζονται ως γαλάζιοι ράβδοι. Η αλλαγή Ser σε Pro (ορθογώνιο) επανατοποθετεί μία έλικα, επιτρέποντας στην υποκατάσταση Leu-Gln (κύκλος) να σχηματίσει έναν δεσμό υδρογόνου ειδικό για την κορτιζόλη (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή). Οι περιοριστικές υποκαταστάσεις (εξάγωνα) εισάγουν κατάλοιπα στον AncGR2 που δεν ευνοούν την προγονική διαμόρφωση (Hochberg and Thornton, 2017). **Γ)** Φυλογένεση που απεικονίζει την ιστορική σειρά των υποκαταστάσεων μεταξύ των AncCR και AncGR2. Η οριζόντια αλλαγή καταλοίπων μεταξύ των παραλόγων (βέλη) έχει ως αποτέλεσμα μη λειτουργικές πρωτεΐνες (Hochberg and Thornton, 2017).

1.2.3.2 Ανασύσταση μιας προγονικής κινάσης για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης ενός σύγχρονου αντικαρκινικού φαρμάκου

Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στο κυτταρικό κύκλο τις τοποθετεί στο κέντρο της έρευνας των αντικαρκινικών φαρμάκων. Παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία στο σύνολο των πρωτεϊνικών κινασών του γονιδιώματος, τα καταλυτικά τμήματα των κινασών έχουν διατηρήσει σχεδόν ταυτόσημες δομές. Έκπληξη προκαλεί το γεγονός ότι το αντικαρκινικό φάρμακο Gleevec παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα στην κινάση τυροσίνης Abl έναντι άλλων κινασών τυροσίνης με σχεδόν ταυτόσημη δομή συμπεριλαμβανομένης και της κινάσης Src. Το Gleevec αναστέλλει την κινάση Abl καταλαμβάνοντας την ενεργό θέση του Abl, ενώ δεν αναστέλλει αποτελεσματικά την δομικά παρόμοια κινάση Src (Nagar *et al.*, 2003). Η επιλεκτικότητα του Gleevec για την Abl είναι κλινικά σημαντική, αλλά η δομική της βάση παρέμεινε ένα μυστήριο για δεκαετίες παρά την αξιοσημείωτη ερευνητική προσπάθεια. Η Abl δεσμεύει το Gleevec πιο σφιχτά από ότι η Src, κυρίως επειδή ένα βήμα επαγόμενης προσαρμογής (induced-fit) μετά την αρχική δέσμευση αντιστρέφεται γρήγορα στην Src, αλλά πιο αργά στην Abl, οδηγώντας σε υψηλότερη συγγένεια (Agafonov *et al.*, 2014). Οι δομές των Abl και Src είναι πολύ παρόμοιες, με μόνη διαφορά ότι ένας βρόχος στην Abl διπλώνει πάνω από το Gleevec, αλλά καταλαμβάνει μια διαφορετική διαμόρφωση στην Src (**Εικόνα 1.14, i**). Η ανταλλαγή καταλοίπων εντός του βρόχου μεταξύ των δύο πρωτεϊνών δεν επηρέασε τη δέσμευση του Gleevec (Seeliger *et al.*, 2007), οπότε η διαμόρφωση του βρόχου θεωρήθηκε ασήμαντη για τη συγγένεια πρόσδεσης. Ο μεγάλος αριθμός των διαφορών στην αλληλουχία ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες—και η δομική τους ομοιότητα—δυσκόλεψαν περαιτέρω προσπάθειες για να προσδιοριστεί η βάση για τη διαφορά στη δέσμευση του Gleevec (**Εικόνα 1.14, ii**).

Μια πρόσφατη μελέτη έλυσε αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιώντας την κάθετη ανάλυση (Wilson *et al.*, 2015). Οι Wilson *et al.*, ανακατασκεύασαν και χαρακτήρισαν λειτουργικά προγονικές πρωτεΐνες στην πορεία των ιστορικών «διαδρομών» που ακολούθησαν οι Abl και Src από τον κοινό τους πρόγονο. Εστιάζοντας στο φυλογενετικό διάστημα στο οποίο προέκυψε η ευαισθησία στο Gleevec, οι συγγραφείς ήταν σε θέση να αναγνωρίσουν 15 υποκαταστάσεις στην αλληλουχία στον κλάδο Abl που προσδίδουν ευαισθησία στο Gleevec, όταν εισάγονται στην προγονική πρωτεΐνη (**Εικόνα 1.14, ii**). Η κινητική ανάλυση υπέδειξε ότι αυτές οι μεταβολές αλληλουχίας επιβραδύνουν την αναστροφή του σταδίου επαγόμενης προσαρμογής και έτσι αυξάνουν τη συγγένεια για το φάρμακο. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X της «αναγεννημένης» προγονικής πρωτεΐνης υπέδειξε ότι τα

κατάλοιπα αυτά κατανέμονται στην πρωτεΐνη κοντά στη βάση του βρόχου. Οι προγονικές καταστάσεις σε αυτές τις θέσεις, πριν εξελιχθεί η ευαισθησία στο Gleevec, συμμετείχαν σε ένα δίκτυο επαφών που προφανώς σταθεροποιούσε ολόκληρο τον θύλακα δέσμευσης κρατώντας τον βρόχο σε ευθεία διαμόρφωση (**Εικόνα 1.14, iii πάνω**), ενώ οι προκύπτουσες καταστάσεις διαταράσσουν αυτές τις επαφές, επιτρέποντας την αναδίπλωση (**Εικόνα 1.14, iii κάτω**). Έτσι, η μέθοδος της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών (ASR) συνέδεσε τις εξελικτικές αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία με τις αλλαγές στη δομή και μετά με τις αλλαγές στην κινητική και τελικά με τις αλλαγές στη βιολογική λειτουργία που συνολικά οδηγούν στην κατανόηση μιας βιοϊατρικά σημαντικής πτυχής της λειτουργικής ποικιλομορφίας μεταξύ των σημερινών πρωτεϊνών.



Εικόνα 1.14. Εξέλιξη της ευαισθησίας του αναστολέα Gleevec για τις κινάσες Ab1 και Src. (i) Υπέρθυση των ενεργών κέντρων της Ab1 (μπλε), μιας κινάσης ευαίσθητης στον αναστολέα Gleevec (πορτοκαλί σφαίρες) και της μη-ευαίσθητης στο Gleevec κινάσης Src (πράσινο). Στην περίπτωση της Ab1, ένας βρόχος διπλώνει πάνω από το Gleevec. (ii) Η κάθετη ανάλυση απομόνωσε την προέλευση της ευαισθησίας στο Gleevec στον κλάδο μεταξύ δύο «αναγεννημένων» προγονικών αλληλουχιών (κύκλοι, χρωματισμένοι ανάλογα με την ευαισθησία). Δεκαπέντε υποκαταστάσεις σε αυτόν τον κλάδο (μπλε ορθογώνιο) ήταν επαρκείς για να προσδώσουν την ευαισθησία όταν εισήχθησαν στην προγενέστερη προγονική αλληλουχία. (iii) Θέσεις των καθοριστικών υποκαταστάσεων στην Src (πάνω; PDB 2OIQ) και στην Ab1 (κάτω; PDB 1OPJ) (Hochberg and Thornton, 2017).

Κατά συνέπεια, οι παραπάνω μελέτες υποδηλώνουν την αποτελεσματικότητα της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών στον εντοπισμό των αλληλεπιδράσεων και στην ανάδειξη των καθοριστικών αλλαγών αμινοξέων που έχουν συμβάλει στις σημερινές

διαφορές εξειδίκευσης. Η ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών έχει εφαρμοστεί, όπως προαναφέρθηκε, σε πολλές οικογένειες πρωτεϊνών (Πίνακας 1.1) με σημαντικά αποτελέσματα, εντούτοις, η εφαρμογή της σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς, όπως παρουσιάζεται στην επόμενη ενότητα, παραμένει περιορισμένη.

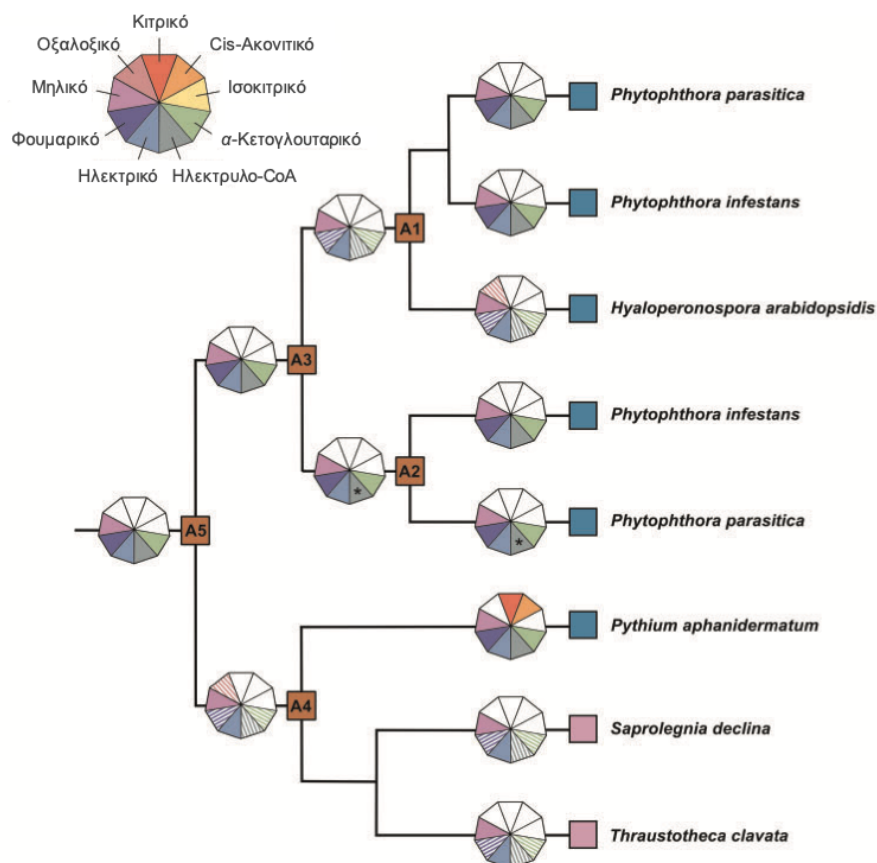
1.2.4 Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών σε μεμβρανικούς μεταφορείς

Όπως υποδεικνύεται από τις παραπάνω μελέτες, οι «αναγεννημένες» προγονικές αλληλουχίες αποτελούν κατάλληλο μοριακό υπόβαθρο για να αποκαλύψουν τις καθοριστικές μεταλλαγές που έχουν οδηγήσει στην εδραίωση μιας εξειδίκευσης καθώς είναι απαλλαγμένες από τις πολλαπλές παράλληλες μεταλλαγές που έχουν εισαχθεί κατά την εξέλιξη στα σημερινά ομόλογα. Μερικές από αυτές τις παράλληλες μεταλλαγές μπορεί να αποκρύπτουν τον ρόλο των καθοριστικών μεταλλαγών στα σημερινά ομόλογα, λόγω φαινομένων διαμορφωτικής επίστασης. Στις περμεάσες, που είναι μόρια με έντονη δυναμική εναλλαγής διαμορφώσεων κατά τη λειτουργία τους, τέτοιες επιστατικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο. Η κατανόηση του ρόλου των καθοριστικών και των επιστατικών μεταλλαγών και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους θα μπορούσε να αναδειχθεί καλύτερα με μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο των προγονικών μορίων. Οι γνώσεις αυτές θα ήταν σημαντικές, καθώς πολλά δομικά-λειτουργικά στοιχεία των μηχανισμών λειτουργίας των περμεασών, μεταξύ των οποίων και η σύνθετη σχέση των διαφορών στην αλληλουχία με τις διαφορές εξειδίκευσης, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητά στο μοριακό επίπεδο. Μέχρι σήμερα, μόνο δύο είναι οι μελέτες που εφάρμοσαν στρατηγική ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών για περμεάσες και σε καμία από αυτές δεν έχει γίνει περαιτέρω ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας με μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο του ανασυσταθέντος προγονικού μεταφορέα. Οι δύο αυτές γνωστές μελέτες αναφέρονται στη συνέχεια.

1.2.4.1 Προγονική λειτουργία και διαφοροποίηση ενός μεταφορέα καρβοξυλικού οξέος

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) μπορεί να εφοδιάσει τους οργανισμούς με νέα γονίδια, επεκτείνοντας το ρεπερτόριο του γενετικού υλικού που διατίθεται για εξελικτική καινοτομία και να επιτρέψει στους οργανισμούς- αποδέκτες να προσαρμοστούν σε ένα νέο περιβάλλον (Doolittle, 1999; Jain *et al.*, 2003; Keeling and Palmer, 2008; Richards and

Talbot, 2013). Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στους προκαρυώτες και αναγνωρίζεται ως ένας όλο και περισσότερο σημαντικός μηχανισμός που οδηγεί στην εξελικτική καινοτομία και προσαρμογή στους ευκαρυώτες (Keeling and Palmer, 2008). Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν χαρακτηρίσει πειραματικά τις λειτουργίες των γονιδίων που αποκτήθηκαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Friesen *et al.*, 2006; Gardiner *et al.*, 2012; Kirsch *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Alexander *et al.*, 2016) ή έχουν εξετάσει τη λειτουργική απόκλιση των γονιδίων μετά την απόκτηση τους (Aoki, 2004). Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών (Savory *et al.*, 2018) και η ετερόλογη έκφραση στο σύστημα του *Saccharomyces cerevisiae* για να εξεταστεί η εξελικτική ιστορία μιας οικογένειας μεταφορέων ωομυκήτων (oomycetes) που φαίνεται να αποκτήθηκε μέσω οριζόντιας μεταφοράς από μύκητες. Με εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας αποδείχθηκε ότι οι «αναγεννημένες» προγονικές πρωτεΐνες των ωομυκήτων που είχαν προέλθει από οριζόντια μεταφορά και οι σημερινοί απόγονοί τους μεταφέρουν δικαυβοξυλικά οξέα τα οποία είναι ενδιάμεσα του κύκλου του τρικαυβοξυλικού οξέος (κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του *Krebs*) (Εικόνα 1.15). Το προφίλ εξειδίκευσης των υποστρωμάτων της προγονικής πρωτεΐνης έχει διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό στους περισσότερους ωομύκητες, συμπεριλαμβανομένων τόσο των παθογόνων για φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, όσο και των ελεύθερης διαβίωσης, υποδεικνύοντας ότι η προγονική λειτουργία των μεταφορέων διατηρήθηκε μέσω «επιλογής» σε μια σειρά διαφορετικών κύκλων ζωής. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκε καμία ένδειξη πρόσκτησης νέας λειτουργίας (neofunctionalization) όσον αφορά στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων για παράλογα που έχουν διαφορετικά πρότυπα χρονικής έκφρασης. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια εντυπωσιακή διεύρυνση της εξειδίκευσης για ένα φυτικό παθογόνο ωομύκητα από το είδος *Pythium aphanidermatum* που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που επιτρέπει την πρόσληψη τρικαυβοξυλικού οξέος επιπλέον της πρόσληψης δικαυβοξυλικού οξέος (Εικόνα 1.15). Αυτό αποδεικνύει ότι τα γονίδια που προέρχονται από οριζόντια μεταφορά μπορούν να παρέχουν λειτουργικές προσθήκες στα γονιδιώματα-αποδέκτες καθώς και το απαιτούμενο υπόβαθρο για την εξέλιξη και διεύρυνση των πρωτεϊνικών λειτουργιών.

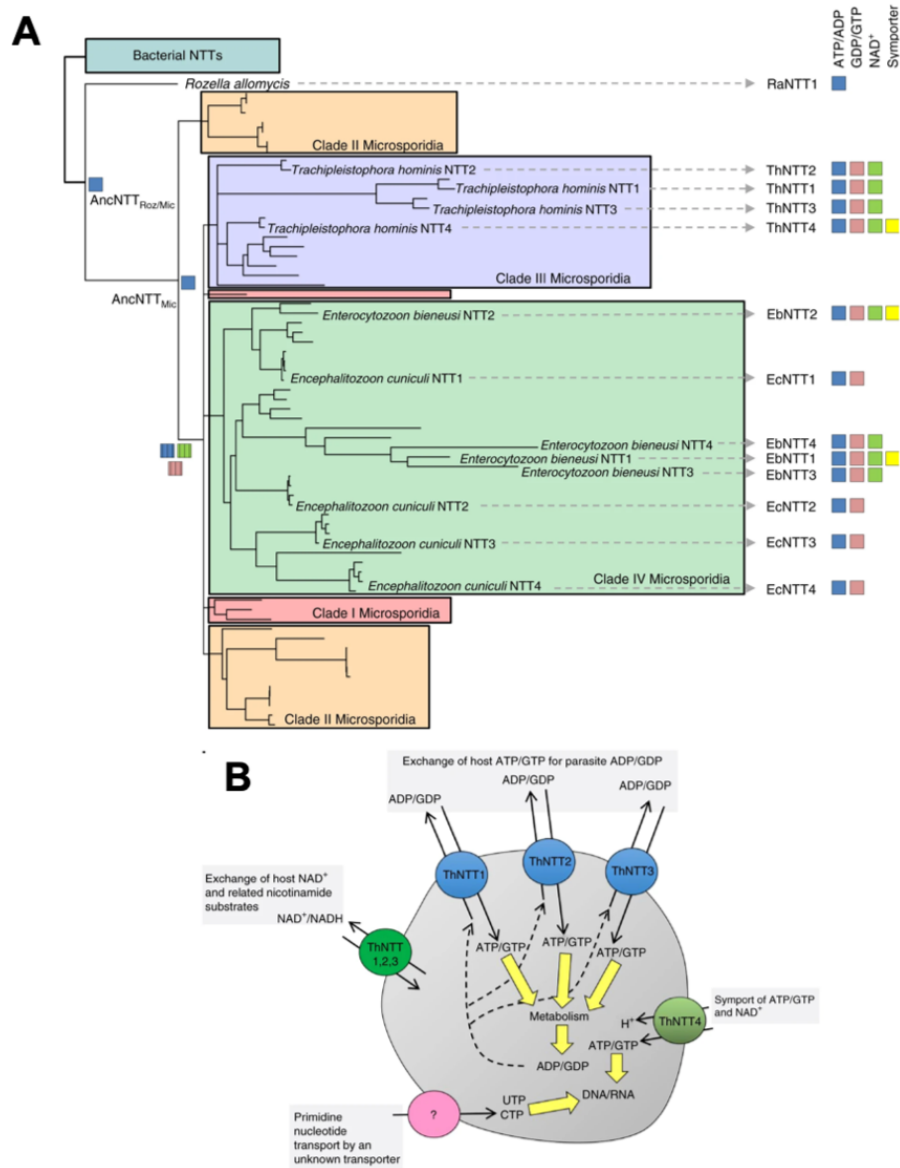


Εικόνα 1.15. Φυλογενετική ανάλυση των μεταφορέων των ωομυκήτων. Σχηματικό φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τη διατήρηση του προφίλ εξειδίκευσης των υποστρωμάτων των μεταφορέων ωομυκήτων που αποκτήθηκαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από μια προγονική κατάσταση (A5) μέσω βασικών εσωτερικών κόμβων (A1–A4) σε υπάρχοντες ωομύκητες και επέκταση του εύρους των υποστρωμάτων στο *Pythium aphanidermatum*. Το προφίλ εξειδίκευσης των υποστρωμάτων υποδηλώνεται από το εννεάγωνο στο οποίο διαφορετικά τμήματα αντιστοιχούν σε ενδιάμεσα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και επιβεβαιωμένα (δοκιμασίες πρόσληψης) ή πιθανά (δοκιμασίες ανταγωνισμού) υποστρώματα φέρουν τα αντίστοιχα χρώματα. Το προφίλ εξειδίκευσης των υποστρώματος για στελέχη που παρουσιάζουν χαμηλή ικανότητα μεταφοράς [^{14}C] ηλεκτρικού οξέος σκιάζονται. Οι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν υποστρώματα που χαρακτηρίζονται ως μέτριοι αναστολείς (αναστολή περίπου 50%) (Savory et al., 2018).

1.2.4.2 Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών στους μεταφορείς νουκλεοτιδίων NTT

Τα μικροσπορίδια είναι μια ομάδα παρασίτων που περνούν μέρος της ζωής τους μέσα στα κύτταρα ενός ευρέος φάσματος ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Didier and Weiss, 2011). Ένα από τα κοινά χαρακτηριστικά αυτών των παρασίτων είναι ότι δεν

μπορούν να συνθέσουν νουκλεοτίδια, μόρια που είναι και η κύρια πηγή ενέργειας του κυττάρου και επίσης τα δομικά στοιχεία του DNA. Αντ' αυτού, παίρνουν νουκλεοτίδια, ή τα δομικά συστατικά που χρειάζονται για να τα συνθέσουν από τα κύτταρα του ξενιστή τους (Dean *et al.*, 2016). Τα μικροσπορίδια έχουν πρωτεΐνες της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδίων (NTT) στην επιφάνειά τους που τους επιτρέπουν να εισάγουν νουκλεοτίδια από τον ξενιστή (Dean *et al.*, 2016; Tsaousis *et al.*, 2008). Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η απόκτηση των NTT μεταφορέων μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή αυτών των παρασίτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών (Dean *et al.*, 2018). Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν φυλογενετική ανάλυση και ανασύσταση δύο προγονικών NTTs (**Εικόνα 1.16, Α**), ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των οποίων υπέδειξε ότι μπορούν να μεταφέρουν ATP και ως εκ τούτου συμπεραίνεται ότι θα παρείχαν στα πρώιμα μικροσπορίδια την ικανότητα να γίνουν ενδοκυτταρικά ενεργειακά παράσιτα. Για να διερευνήσουν αν οι NTTs εξελίχθηκαν μέσω του διπλασιασμού γονιδίων (gene duplication), οι Dean *et al.*, χαρακτήρισαν τους NTTs τριών διαφορετικών σύγχρονων ειδών μικροσποριδίων (**Εικόνα 1.16, Α**). Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι η λειτουργία των NTT μεταφορέων εξελίχθηκε διευρύνοντας το εύρος των πουρινών που μπορούν να μεταφερθούν συμπεριλαμβάνοντας αλλαγές στον μηχανισμό της μεταφοράς που επιτρέπουν την καθαρή εισαγωγή νουκλεοτιδίων για τη για βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων, την ανάπτυξη και την αντιγραφή τους. Όπως διαπιστώθηκε, ο διπλασιασμός γονιδίων επέτρεψε τη διαφοροποίηση της λειτουργίας των μεταφορέων νουκλεοτιδίων για τη μεταφορά νέων υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των GTP και NAD⁺. Η εξέλιξη της λειτουργίας των μεταφορέων NTT είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια ενδογενών οδών για βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και παραγωγή ενέργειας, καθιστώντας τα μικροσπορίδια εξαρτώμενα από την NTT-διαμεσολαβούμενη πρόσληψη νουκλεοτιδίων για την επιβίωση τους (**Εικόνα 1.16, Β**). Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε τη σπουδαιότητα των μεταφορέων νουκλεοτιδίων για αυτή την ιατρικά και οικονομικά σημαντική ομάδα ενδοκυτταρικών παρασίτων.



Εικόνα 1.16. Διπλασιασμός γονιδίων και εξέλιξη των μεταφορέων NTTs των μικροσποριδίων. Α) Φυλογενετική ανάλυση των NTTs των μικροσποριδίων και της *Rozella allomycis*. Στα δεξιά σημειώνονται τα μεταφερόμενα υποστρώματα με τα αντίστοιχα χρώματα. Η μεταφορά ATP από τις «αναγεννημένες» προγονικές αλληλουχίες, *AncNTT_{Roz/Mic}* και *AncNTT_{Mic}* επισημαίνεται στους αντίστοιχους κόμβους (μπλέ τετράγωνα). Η τοπολογία των δένδρων υποδηλώνει ότι ο κοινός πρόγονος των Μικροσποριδίων στους κλάδους III και IV θα μπορούσε ήδη να μεταφέρει τόσο τα νουκλεοτίδια πουρινών, όσο και ενδεχομένως το NAD^+ , όπως υποδηλώνεται από τα αντίστοιχα χρώματος διακεκομμένα τετράγωνα. **Β)** Ένα μοντέλο της μεσολαβούμενης από τους NTTs απόκτησης ενέργειας και νουκλεοτιδίων για τον *T. hominis* από το κύτταρο ξενιστή. Οι NTTs βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των παρασίτων και μπορούν να δράσουν ως ανταλλάκτες (exchangers) (ThNTT1-3) ή συμμεταφορείς (symporters) (ThNTT4) που επιτρέπουν τον ενεργειακό παρασιτισμό ή την καθαρή πρόσληψη νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα. Οι μεταφορείς που χρησιμοποιούνται από τον *T. hominis* για την πρόσληψη πυριμιδινών είναι επί του παρόντος άγνωστοι (Dean et al., 2018).

Συμπερασματικά, από τις παραπάνω αναλύσεις διαπιστώνουμε πως υπάρχουν αρκετές ενδιαφέρουσες προοπτικές από την εφαρμογή της στρατηγικής αυτής, για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με την εξέλιξη και τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Με έναυσμα τα σημαντικά αποτελέσματα των ερευνών αυτών, εφαρμόσαμε στην παρούσα διατριβή τη στρατηγική της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών για να μελετήσουμε την εξέλιξη των διαφορών εξειδίκευσης στις βακτηριακές περμεάσες νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2. Οι περμεάσες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν ένα δυναμικό ερευνητικό πεδίο για τη μελέτη της μοριακής βάσης των διαφορών εξειδίκευσης, καθώς η σχέση των διαφορών στην αλληλουχία τους με τις διαφορές εξειδίκευσης είναι σύνθετη και σημαντικά στοιχεία των μηχανισμών λειτουργίας τους δεν είναι ακόμη κατανοητά σε μοριακό επίπεδο. Η εφαρμογή αυτής της εξελικτικής στρατηγικής, αναμένουμε να επιτρέψει την πληρέστερη κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων αμινοξέων των περμεασών στον καθορισμό της εξειδίκευσης, γνώση που θα ήταν πολύ χρήσιμη για την ανάλυση των διαφορών εξειδίκευσης σε οικογένειες περμεασών που αποτελούν στόχους για ανάπτυξη νέων φαρμάκων με περισσότερο εξειδικευμένες δράσεις.

1.3 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Η παρούσα Διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο μιας εκτενούς έρευνας που λαμβάνει χώρα στο εργαστήριο μας και η οποία αποσκοπεί στην κατανόηση των σχέσεων δομής λειτουργίας και εξειδίκευσης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporter/Nucleobase-Cation Symporter-2). Η οικογένεια αυτή εμφανίζει ευρεία εξελικτική διάδοση και συντήρηση ενός βασικού δομικού προτύπου, αλλά και ένα σημαντικό ρεπερτόριο διαφορετικών εξειδικεύσεων. Οι έως τώρα μελέτες των σχέσεων δομής λειτουργίας των μεταφορέων NAT/NCS2 έχουν στηριχθεί σε διεξοδική μεταλλαξιγένεση σημερινών ομολόγων και έχουν υποδείξει ορισμένες σημαντικές θέσεις αμινοξέων, χωρίς, ωστόσο, να δώσουν μία σαφή εικόνα για τα αμινοξέα που καθορίζουν τους διακριτούς τύπους εξειδίκευσης. Στην παρούσα εργασία, κεντρικός στόχος ήταν να εφαρμόσουμε, για πρώτη φορά στην οικογένεια NAT/NCS2, τη στρατηγική της **Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών**, για τον εντοπισμό και την πληρέστερη κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων αμινοξέων στην εξέλιξη των εξειδικεύσεων των πρωτεϊνών ενεργού διαμεμβρανικής μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων.

Η στρατηγική αυτή στηρίζεται στην θεώρηση ότι το μοριακό υπόβαθρο των προγονικών αλληλουχιών είναι καταλληλότερο για να αποκαλύψει τις καθοριστικές αλλαγές που οδήγησαν στις σημερινές διαφορές εξειδίκευσης, καθώς είναι απαλλαγμένο από τις πολλαπλές παράλληλες μεταλλαγές των σημερινών ομολόγων που έχουν συσσωρευτεί κατά την εξέλιξη.

Πιο αναλυτικά, στόχοι της παρούσας μελέτης είναι:

1. Η **φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικών αλληλουχιών** των σημερινών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων που αντιπροσωπεύουν την «κοινή ρίζα» δύο ή περισσότερων κλάδων ομολόγων μεταφορέων με διακριτά προφίλ εξειδίκευσης.
2. Η **ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση των προγονικών αλληλουχιών** που θα παραχθούν με γονιδιακή σύνθεση και θα μεταφερθούν για έκφραση σε κατάλληλο κυτταρικό σύστημα-ξενιστή μέσω κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης.
3. Η **ανάλυση μεταλλαξιγένεσης στο υπόβαθρο των προγονικών αλληλουχιών** με κριτήριο τις διαφορές στην αλληλουχία των προγονικών αλληλουχιών σε σχέση με τις σημερινές ομόλογες πρωτεΐνες διαφορετικής εξειδίκευσης.
4. Η **μοντελοποίηση και οι αναλύσεις μοριακής δυναμικής** των προγονικών αλληλουχιών για την κατανόηση σε δομικό πλαίσιο του ρόλου των μεταλλαγών που θα βρεθεί ότι έχουν σημαντική επίπτωση.

2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Όργανα εργαστηρίου

Κατά την εκπόνηση της παρούσας Διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω εργαστηριακά όργανα (σε αλφαβητική σειρά):

- Αναδευτήρας ενσωματωμένος σε θερμό θάλαμο (Incubator Shaker Series Innova 42)
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5415 D

- Επιτραπέζιος αναδευτήρας (KS130basic IKA-Werke GMBH&CO.KG, Germany)
- Επιτραπέζιος αναδευτήρας κυκλικής κίνησης (Rotator SB2, Stuart, England)
- Λάμπα UV (UV transilluminator, Canon, Europe)
- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut), Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας
- Μετρητής pH (πεχάμετρο) (pH Meter, pH 340 Package, 240V) (Beckmann Instruments, UK)
- Συσσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, California)
- Συσσκευή ηλεκτροφόρησης DNA (Horizontal Gel electrophoresis apparatus, Life Technologies)
- Συσσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California)
Χρησιμοποιήθηκε σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων (Microliter Syringes, Hamilton Bonaduz, Switzerland)
- Συσσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Mini Trans- Blot Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, California)- Η ηλεκτροφορητική μεταφορά (blotting) έγινε σε μεμβράνη πολυβινυλιδενικού διφθοριδίου (Polyvinylidene difluoride, PVDF, Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri)
- Συσσκευή ταχείας διήθησης (glass filter holder assembly, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA)- Χρησιμοποιήθηκαν ηθμοί διήθησης (Whatman GF/C, 25mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2μm) για την κατακράτηση του κυτταρικού κλάσματος
- Συσσκευή υπερήχων (Digital sonifier model 250-D, Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut)
- Υδατόλουτρο (ED-5A open Bath Circulator, Julabo, Germany)
- Υπερφυγόκεντρος Beckmann Optima™ Ultracentrifuge (Beckmann Instruments, Palo Alto, California)
- Φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (Speedvac concentrator, Savant Instruments, Hicksville, New York)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany)
- Φωτογραφική κάμερα με οθόνη απεικόνισης (DNA Photographic Transilluminator System, TFT LCD color monitor, Canon)
- Φωτόμετρο (Ultraspec-2001, Biochrom, Cambridge, England)

2.2 Χημικά Αναλώσιμα

Για την υλοποίηση των πειραματικών πρωτοκόλλων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αναλώσιμα (σε αλφαβητική σειρά):

- **Αναγωγικά αντιδραστήρια**
Διθειοθρεϊτόλη (DTT, Invitrogen)
- **Αναστολείς πρωτεασών**
4-2-αμινοαιθυλο βενζολ-σουλφονικό φθόριο υδροχλωρίου (AEBSF, pefabloc SC, Fluka)
- **Αντισώματα (antibodies)**
Σύζευγμα αβιδίνης- υπεροξειδάσης (avidin-HRP, Millipore, California, USA)
- **Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών**
GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus, ready to use (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)
Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)
- **Ένζυμα (enzymes) κλωνοποίησης και ανασυνδυασμού του DNA**
Αλκαλική φωσφατάση
alkaline phosphatase (Takara, BIO INC., Japan)
DNA πολυμεράση
Kapa HiFi DNA polymerase (KapaBiosystems, Boston, United States)
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες
BamHI, ApaI (Takara, BIO INC., Japan)
DNA λιγάση (συνδετάση) του βακτηριοφάγου T4
T4 DNA ligase (Takara, BIO INC., Japan)
- **Νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών**
αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη, ουρικό οξύ, ξανθίνη, υποξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 3-μέθυλοξανθίνη, 7-μέθυλοξανθίνη, 8-μέθυλοξανθίνη, οξυπουρινόλη, αλλοπουρινόλη, 2,6-διαμινοπουρίνη, 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη, 1-μεθυλογουανίνη, 7-μεθυλογουανίνη, 8-αζαγουανίνη, 5-φθοροουρακίλη (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) (**Εικόνα 2.1**)
- **Ολιγο-δεοξυριβονουκλεοτίδια**

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

- **Οργανικοί διαλύτες (organic solvents)**

αιθανόλη (ethanol absolute, Sigma Aldrich)

βενζόλιο (benzene, Panreac)

διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide-DMSO, Fluka)

μεθανόλη (methanol, Sigma Aldrich)

- **Πακέτα υλικών (kits)**

πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

(Nucleospin Plasmin Macherey-Nagel mini-prep, Duren, Germany)

πακέτο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

(ECL™ Western Blotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

πακέτο προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης

(BCA Protein assay reagent kit, Pierce, Thermo Scientific, USA)

πακέτο υλικών καθαρισμού DNA

(Nucleospin Extract II Macherey-Nagel, Duren, Germany)

- **Ραδιενεργά Υποστρώματα της εταιρείας Moravek Biochemicals (Brea, California)**

[8-³H] ξανθίνη (22.8Ci/mmol)

[2,8-³H] υποξανθίνη (27.7 Ci/mmol)

[8-³H] γουανίνη (21.2 Ci/mmol)

[2,8-³H] αδενίνη (31.8 Ci/mmol)

[8-¹⁴C] ουρικό οξύ (58 Ci/mmol)

[5,6-³H] ουρακίλη (32.5 Ci/mmol)

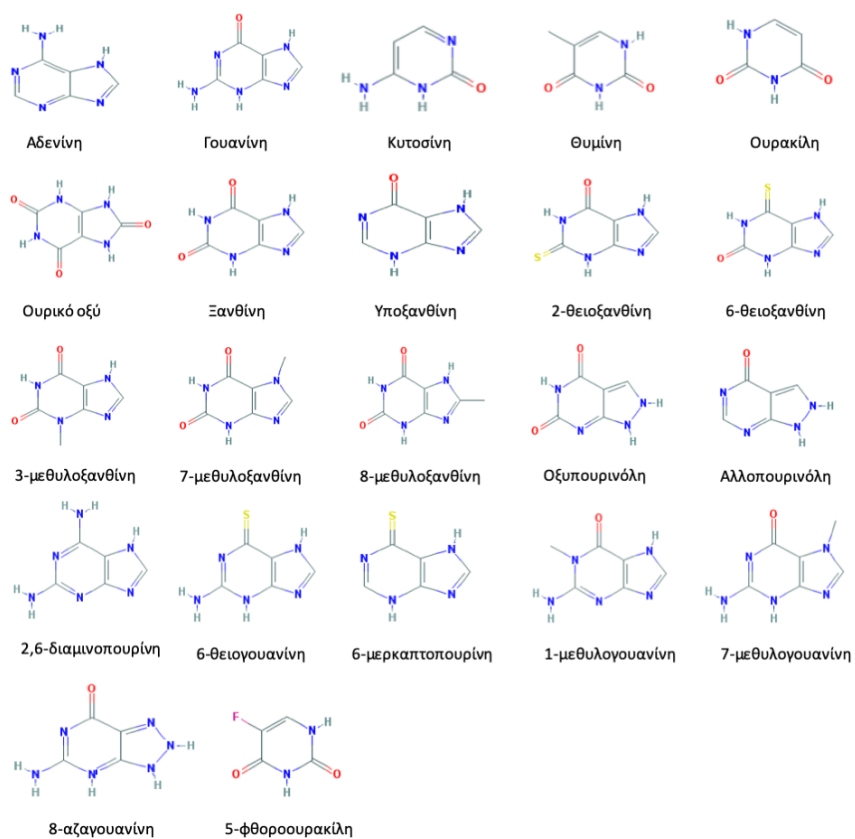
[methyl-³H] θυμίνη (50.6 Ci/mmol)

[³H] κυτοσίνη (18.8 Ci/mmol)

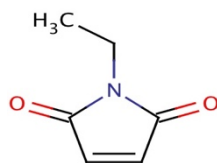
- **SH-αντιδραστήρια (thiol-reactive dyes)**

N-αιθυλμηλεϊμίδιο (N-Ethylmaleimide- NEM, Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri)
(Εικόνα 2.2)

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



Εικόνα 2.1. Ο συντακτικός τύπος νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων αυτών.



N-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM)

Εικόνα 2.2. Δομή του αλκυλιωτικού SH-αντιδραστήριου N-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM).

2.3 Διαλύματα

Τα παρακάτω διαλύματα (σε αλφαβητική σειρά) χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές μεθόδους, που αναφέρονται σε κάθε περίπτωση:

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) (§2.14.3)

Διάλυμα [2,8-³H] Αδενίνης (2.5μM): [2,8-³H] αδενίνης (31.8 Ci/mmol) 10 μL, 114μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

Διάλυμα [8-³H] Γουανίνης (2.5μM): [8-³H] γουανίνης (21.2 Ci/mmol) 50 μL, 44μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) (§2.14.2)

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

Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών (§2.13)

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

Μέθοδος: Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού (§2.10)

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) (§2.14.2)

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) (§2.14.2)

Διάλυμα [methyl-³H] Θυμίνης (2.5μM): [methyl-³H] θυμίνη (50.6 Ci/mmol) 10 μL, 2.65μl ddH₂O, 87.35μL μη-ραδιενεργού θυμίνης 2.5μM

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

Διάλυμα [³H] Κυτοσίνης (2.5μM): [³H] κυτοσίνη (18.8 Ci/mmol) 10 μL, 202.8μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) (§2.14.3)

Διάλυμα [³H] Ξανθίνης (25μM): 10μL [8-³H] ξανθίνη (22.8Ci/mmol), 82.4μL μη-ραδιενεργού ξανθίνης 25μM, 7.6μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

Διάλυμα [8-¹⁴C] Ουρικού οξέος (100μM): [8-¹⁴C] ουρικού οξέ (58 mCi/mmol) 10μL, 237.5μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών (§2.13)

Διάλυμα TBST 10x: Tris-HCl 0.1mM pH 7.4, Na₂Cl 1.5M, Triton X-100, 2% (v/v)

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) (§2.14.3)

Διάλυμα Τερματισμού (διαμεμβρανικής μεταφοράς): Kpi (pH 7.5) 0.1M, LiCl 0,1M.

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (§2.14.2)

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

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (§2.14.2)

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

Μέθοδος: Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού (§2.10)

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

Μέθοδος: Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού (§2.10)

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth) και άγαρ, pH 7.2: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Πεπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), άγαρ 1.5%, αποστείρωση

Μέθοδος: Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA (§2.11)

Ρυθμιστικό διάλυμα Kri, pH 7.5: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

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

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (§2.15)

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (pH 8.0) : Tris-acetate 40mM, Na_2EDTA 1mM

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (§2.8)

2.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

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

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

E. coli **T184** [*lacI*⁺ *O*⁺ *Z* *Y* (*A*), *prsL*, *met*, *thr*, *recA*, *hsdM*, *hsdR*/*F'*, *lacI*^q *O*⁺ *Z*^{D118} (*Y*+ *A*+)] (Teather *et al.*, 1980): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης των διαπερασών XanQ εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β, D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Το γονιδίωμα του στελέχους T184 δεν περιέχει ενδογενή γονίδια που να επάγονται με IPTG (*lacZ* *Y*). Σε *E. coli* T184 πραγματοποιούνται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ξανθίνης (Karatza and Frillingos, 2005).

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

E. coli **JW4025** (F⁻, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787 (::rrnB-3), λ -, *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, Δ *ghxPP*758::kan *hsdR*514) **Δ ghxP** (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε

για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* *ΔghxP* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς γουανίνης (Papakostas *et al.*, 2013).

E. coli **JW2482** (F-, *Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3)*, λ-, *rph-1*, *Δ(rhaD-rhaB)568, ΔuraA745::kan hsdR514*) **ΔuraA** (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* *ΔuraA* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ουρακίλης και θυμίνης (Papakostas *et al.*, 2013; Botou *et al.*, 2018).

E. coli **JW0327** (F-, *Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3)*, λ-, *rph-1*, *Δ(rhaD-rhaB)568, ΔcodB765::kan hsdR514*) **ΔcodB** (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* *ΔcodB* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς κυτοσίνης (Botou *et al.*, 2020).

Τα αρχικά πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

pT7-5: φορέας κλωνοποίησης των υπό μελέτη γονιδίων με στόχο την υπερέκφρασή τους μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ* p/o) [πρόκειται για πλασμίδιο μετρίου αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο (medium copy number), (Sahin-Toth *et al.*, 1995)].

Όλα τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από το γονίδιο που μελετάται σε κάθε περίπτωση, περιλαμβάνουν και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain, BAD) της οζαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumonia* (Consler *et al.*, 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/XanQ-BAD (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) της διαπεράσης XanQ φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/XanQ-Cys-less-BAD (Karatza *et al.*, 2006): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) της διαπεράσης XanQ με αλλαγμένα τα πέντε εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών σε σερίνες (Cys-less).

pT7-5/AvXanQ-BAD (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή 2021): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *AvXanQ* του *AvXanQ* φυσικού τύπου (wt) της *Aeromonas veronii* *parvotica*.

pT7-5/XanP-BAD (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanP*) της διαπεράσης XanP φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/AcS6Q3-BAD (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή 2021): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *AcS6Q3* του AcS6Q3 (WP_003655261) του *A.calcoaceticus*.

pT7-5/GhxP-BAD (Papakostas *et al.*, 2013): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*ghxP*) του μεταφορέα γουανίνης GhxP φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/AdeP-BAD (Papakostas *et al.*, 2013): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*adeP*) του μεταφορέα αδενίνης AdeP φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/SmAGHxT-BAD (Botou *et al.*, 2020): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*SmAGHxT*) του SmAGHxT (SmVC3) φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/SmXUacT-BAD (Botou *et al.*, 2020): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *SmXUacT* του μεταφορέα SmXUacT (SmLL9) φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/AcS4X6-BAD (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή 2021): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *AcS4X6* του AcS4X6 (WP_003654128) φυσικού τύπου (wt) του *Acinetobacter calcoaceticus* RUH2202.

pT7-5/SmUacT1-BAD (Botou *et al.*, 2020): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*SmUacT1*) του μεταφορέα SmUacT1 (SmLL8) φυσικού τύπου (wt).

pT7-5/UraA-BAD (Botou *et al.*, 2018): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*uraA*) του μεταφορέα UraA φυσικού τύπου (wt).

pEX-K4/AncXanP: φορέας κλωνοποίησης, που χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του προγονικού γονιδίου *AncXanP* κατά τη σύνθεσή του από την εταιρία MWG-Biotech (<http://www.eurofinngenomics.eu>).

pEX-A258/AncXanQ: φορέας κλωνοποίησης, που χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του προγονικού γονιδίου *AncXanQ* κατά τη σύνθεσή του από την εταιρία MWG-Biotech (<http://www.eurofinngenomics.eu>) (Εικόνα 2.3).

pEX-A258/AncXUacT: φορέας κλωνοποίησης, που χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του προγονικού γονιδίου *AncXUacT* κατά τη σύνθεσή του από την εταιρία MWG-Biotech (<http://www.eurofinngenomics.eu>).

pEX-A258/AncR1: φορέας κλωνοποίησης, που χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του προγονικού γονιδίου *AncR1* κατά τη σύνθεσή του από την εταιρία MWG-Biotech (<http://www.eurofinngenomics.eu>).

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν είναι:

Όλα τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν, εκτός από το γονίδιο που μελετάται σε κάθε περίπτωση, περιλαμβάνουν και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (*Biotin Acceptor Domain*) της οξαλοζικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumonia* (Consler et al., 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12- πεπτίδιο της *LacY* (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*AncXanP*-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που κατασκευάστηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και φέρει το γονίδιο *AncXanP*.

pT7-5/*AncXanP*(4M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που κατασκευάστηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanP*, με αλλαγές στις θέσεις 93 (S93N), 323 (S323A), 377 (G377S) και 430 (S430N).

pT7-5/*AncXanQ*-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5, το οποίο κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία και φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* (Εικόνα 2.4).

pT7-5/*AncXanQ*(S27G)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* με αλλαγή στη θέση 27 (S27G).

pT7-5/*AncXanQ*(G377S)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* με αλλαγή στη θέση 377 (G377S).

pT7-5/*AncXanQ*(S27G/G377S)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* με αλλαγές στις θέσεις 27 (S27G) και 377 (G377S).

pT7-5/*AncXanQ*(4M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* με αλλαγές στις θέσεις 27 (S27G), 116 (A116L), 191 (S191G) και 312 (T312S).

pT7-5/*AncXanQ*(5M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* με αλλαγές στις θέσεις 27 (S27G), 116 (A116L), 191 (S191G), 312 (T312S), και 377 (G377S).

pT7-5/*XanQ*(G27S)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγή στη θέση 27 (G27S).

pT7-5/*XanQ*(L116A)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγή στη θέση 116 (L116A).

pT7-5/*XanQ*(G191S)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγή στη θέση 191 (G191S).

pT7-5/*XanQ*(S312T)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγή στη θέση 312 (S312T).

pT7-5/*XanQ*(S377G)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγή στη θέση 377 (S377G).

pT7-5/*XanQ*(G27S/S377G)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγές στις θέσεις 27 (G27S) και 377 (S377G).

pT7-5/*XanQ*(G191S/S377G)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγές στις θέσεις 191 (G191S) και 377 (S377G).

pT7-5/*XanQ*(S312T/S377G)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγές στις θέσεις 312 (S312T) και 377 (S377G).

pT7-5/*XanQ*(4M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγές στις θέσεις 27 (G27S), 116 (L116A) , 191 (G191S) και 312 (S312T).

pT7-5/*XanQ*(5M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *XanQ* (Karatza and Frillingos, 2005) με αλλαγές στις θέσεις 27 (G27S), 116 (L116A) , 191 (G191S), 312 (S312T), και 377 (S377G).

pT7-5/*AncXUacT*-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5, το οποίο κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία και φέρει το προγονικό γονίδιο *AncXUacT*.

pT7-5/*AncR1*-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5, το οποίο κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία και φέρει το προγονικό γονίδιο *AncR1*.

pT7-5/*NmXanQ*-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*NmXanQ*) του NmXanQ (WP_002221138) φυσικού τύπου (wt) της *Neisseria meningitidis*.

pT7-5/*NmXanQ*(A191S)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*NmXanQ*) του NmXanQ φυσικού τύπου (wt) της *Neisseria meningitidis* με αλλαγή στη θέση 191 (A191S).

pT7-5/*NmXanQ*(G377S)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*NmXanQ*) του NmXanQ φυσικού τύπου (wt) της *Neisseria meningitidis* με αλλαγή στη θέση 377 (G377S).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(P20C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 20 (P20C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(F21C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 21 (F21C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(A24C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 24 (A24C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(L25C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 25 (L25C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(V26C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 26 (V26C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(G27C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 27 (G27C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(A28C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 28 (A28C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(I29C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 29 (I29C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(I35C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 35 (I35C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(F36C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 36 (I36C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(V37C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 37 (V37C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(P38C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 38 (P38C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(M39C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 39 (M39C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(V40C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 40 (V40C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(T41C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 41 (T41C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(P42C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 42 (P42C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(A43C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 43 (A43C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(L44C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 44 (L44C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(Y59C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 59 (Y59C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(L60C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 60 (L60C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(V61C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 61 (V61C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(M63C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 63 (M63C).

pT7-5/XanQ-Cys-less(A64C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 64 (A64C).

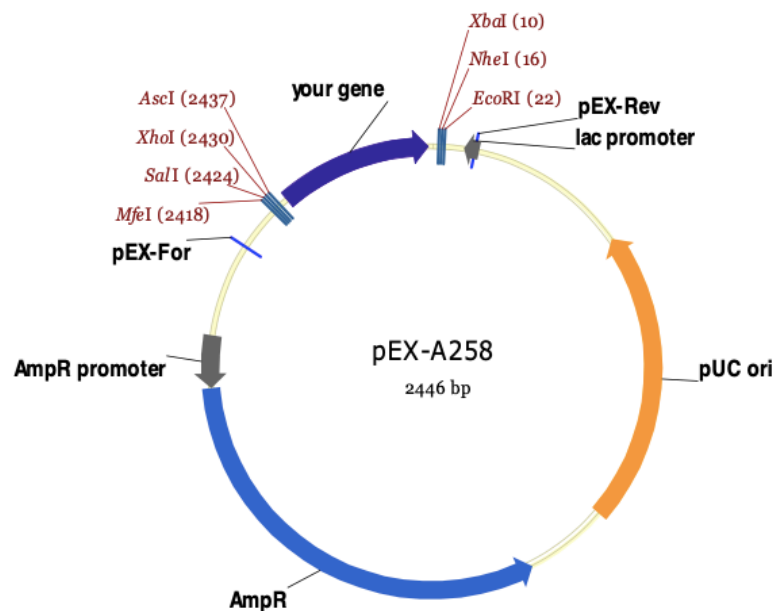
pT7-5/*XanQ*-Cys-less(M65C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 65 (M65C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(I66C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 66 (I66C).

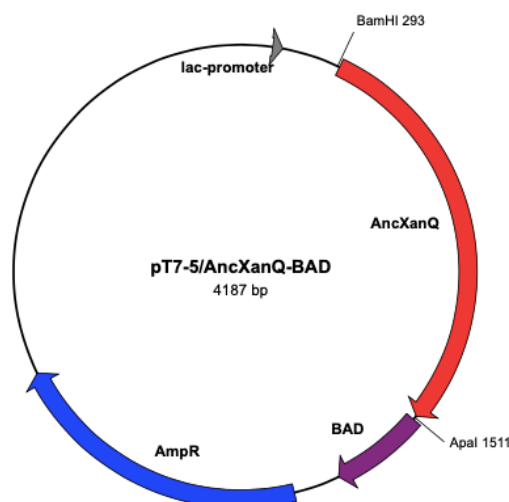
pT7-5/*XanQ*-Cys-less(A67C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 67 (A67C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(V76C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 76 (V76C).

pT7-5/*XanQ*-Cys-less(N77C)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*XanQ* - Cys-less) (Karatza *et al.*, 2006) με αλλαγή στη θέση 77 (N77C).



Εικόνα 2.3. Χάρτης του πλασμιδίου pEX-A258. Ο φορέας κλωνοποίησης pEX-A258 χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του προγονικού γονιδίου *AncXanQ* κατά τη σύνθεση του (*gene synthesis*) από την εταιρεία MWG-Biotech (<http://www.eurofinsgenomics.eu>).



Εικόνα 2.4. Χάρτης του πλασμιδίου pT7-5/AncXanQ-BAD. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται το προγονικό γονίδιο *AncXanQ*. Επισημαίνονται οι θέσεις των *Bam*HI και *Apa*I περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για την υποκλωνοποίηση του προγονικού γονιδίου στο πλασμίδιο pT7-5. Με μωβ χρώμα σημειώνεται η περιοχή δέσμευσης βιοτίνης *BAD* (biotin-acceptor domain), που επιτρέπει αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP. Ο πλασμιδιακός χάρτης κατασκευάστηκε με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου <http://www.bioinformatics.org/savvy/>.

2.5 Βιοπληροφορική και φυλογενετική ανάλυση

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκτενής φυλογενετική ανάλυση των ομολόγων που εμπίπτουν στον κλάδο των περμεασών ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της οικογένειας NAT/NCS2. Για την ανωτέρω ανάλυση, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στελεχών, καθώς και των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των αντίστοιχων ομολόγων, σε όλα τα φύλα των Βακτηρίων, Αρχαία και Ευκάρυα των οποίων τα γονιδιώματα έχουν αλληλουχηθεί πλήρως στη βάση δεδομένων JGI/IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Chen *et al.*, 2013), έως και τον Ιανουάριο του 2017 επιλέγοντας ένα γονιδίωμα από κάθε είδος. Από αυτή την αναζήτηση εντοπίστηκαν 750 περίπου ομόλογα, που εμπίπτουν στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, με βάση μια αρχική φυλογένεση, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι όλα τα ομόλογα αυτού του κλάδου προέρχονται κυρίως από τα Βακτήρια: από τα φύλα Proteobacteria, Firmicutes (κλάσεις Bacilli και Clostridia), Actinobacteria και Bacteroidetes. Εκτός από τα Βακτήρια ομόλογα αυτού του

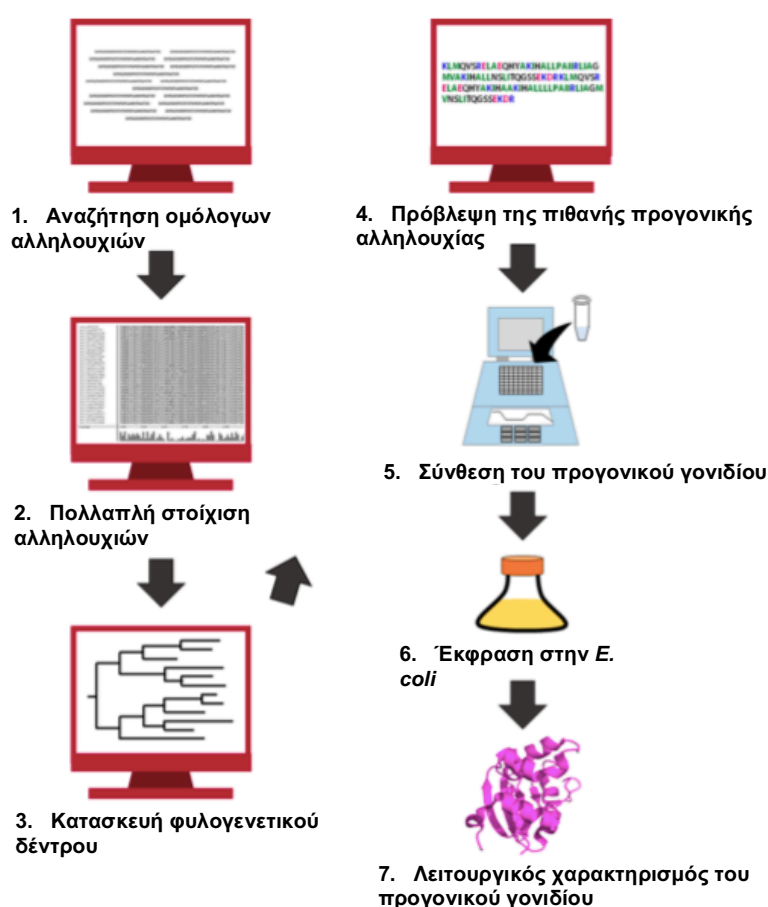
κλάδου απαντώνται επίσης σε Αρχαία και Μύκητες. Μετά την ανωτέρω ανάλυση εστιαστήκαμε στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, για τον εντοπισμό προγονικών αλληλουχιών, στον υποκλάδο των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού, καθώς στα Πρωτεοβακτήρια ανήκουν όλα τα χαρακτηρισμένα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2, συμπεριλαμβανομένου και του μεταφορέα XanQ της *E. coli*, που έχει μελετηθεί διεξοδικά με μεταλλαξιγένεση (Karena *et al.*, 2015).

Για το σκοπό αυτό τα ομόλογα των Πρωτεοβακτηρίων υποβλήθηκαν σε συστηματική φυλογενετική ανάλυση. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επιλογή όλων των γονιδιωμάτων που ανήκουν στο φύλο Πρωτεοβακτήρια από τη βάση δεδομένων IMG/M του JGI και ανακτήθηκαν συνολικά 2,795 βακτηριακά στελέχη, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως. Ακολούθησε ταξινόμηση των γονιδιωμάτων με βάση την κλάση σε α-, β-, γ-, δ- και ε-πρωτεοβακτήρια και πραγματοποιήθηκε αναζήτηση πρωτεϊνικών ομολόγων με το πρόγραμμα Blast-p ξεχωριστά για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανακτήθηκαν υποβλήθηκαν σε αρχική φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο neighbor-joining (Saitou *et al.*, 1987), προκειμένου να αποκλειστούν αλληλουχίες που δεν ανήκαν στην ομάδα μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων, χρησιμοποιώντας λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 για τη διάκριση των διαφορετικών ομάδων των ομολόγων. Με την ανωτέρω διαδικασία προέκυψαν 1,652 πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην φυλογενετική ομάδα «ξανθίνης/ουρικού» (δηλαδή, την ομάδα που περιλαμβάνει όλους τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος). Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε σε 445, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος και σε δεύτερη φάση σε 150, μετά από επιλογή ομολόγων από ένα στέλεχος ανά γένος. Αυτές οι 150 αλληλουχίες υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA 7), ώστε να κατασκευαστεί το φυλογενετικό δενδρόγραμμα όλων των ομολόγων «ξανθίνης/ουρικού». Η ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού, ακολουθήθηκε παράλληλα στο εργαστήριο μας και για την ανάλυση του υποκλάδου των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης και/ή θυμίνης (Botou *et al.*, 2018), καθώς και για την ανάλυση των ομολόγων μεταφορέων αδερίνης/υποξανθίνης/γουανίνης (υποοικογένεια COG2252) (Γιαλελής Β., Διδακτορική Διατριβή, 2020). Η φυλογενετική ανάλυση της ομάδας των ομολόγων μεταφορέων Azg-like/COG2252 στα Πρωτεοβακτήρια επαναλήφθηκε και στα πλαίσια της παρούσας Διατριβής (**Παράρτημα 13**).

2.6 Ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών (ASR)

Ακολουθούνται τα βασικά βήματα για την «ανασύσταση» προγονικών γονιδίων (Thornton 2004), όπως παρουσιάζονται συνοπτικά στην **Εικόνα 2.5** (Akanuma S., 2017). Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκτενής φυλογενετική ανάλυση των βακτηριακών ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 που εμπίπτουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων ξεχωριστά για καθέναν από τους 2 βασικούς φυλογενετικούς κλάδους της υποοικογένειας COG2233 (ουρακίλης και/ή θυμίνης, ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος) με το πρόγραμμα MEGA 7, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 2.5. Από την εκτενή φυλογενετική ανάλυση του υποκλάδου των ομολόγων ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος πραγματοποιήθηκε ανασύσταση τριών προγονικών αλληλουχιών: 1) του κοινού προγόνου όλης της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης, ο οποίος ονομάστηκε AncXanP και 2) του κοινού προγόνου της ομάδας, που αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα XanQ, ο οποίος ονομάστηκε AncXanQ και 3) του κοινού προγόνου της ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τους μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος SmXUacT και AcS4X6, ο οποίος ονομάστηκε AncXUacT. Από τη φυλογενετική ανάλυση του υποκλάδου των ομολόγων ουρακίλης και/ή θυμίνης (Botou *et al.*, 2018) πραγματοποιήθηκε ανασύσταση της προγονικής αλληλουχίας του κλάδου που αντιπροσωπεύεται από τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς RutG και AcS572 (ο οποίος αναφέρεται ως R1, Botou *et al.*, 2018) που ονομάστηκε AncR1. Για την εκτίμηση όλων των προγονικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Το πρόγραμμα αυτό δίνει το πιθανότερο αμινοξύ για κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα δίνει και τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης των αμινοξέων για κάθε θέση (το πρόγραμμα δίνει την πληροφορία αν η κάθε θέση αμινοξέος εμφανίζεται με ποσοστό >90% ή >50%), παρέχοντας σημαντική πληροφορία για την αξιοπιστία της προγονικής αλληλουχίας. Στη συνέχεια, για κάθε μία από τις πρωτεϊνικές «προγονικές» αλληλουχίες, που προέκυψαν από το πρόγραμμα MEGA 7, ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA, με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για βελτιστοποίηση της έκφρασης τους στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli*. Επιπλέον, στα άκρα των προγονικών αλληλουχιών προστέθηκαν οι αλληλουχίες των περιοριστικών ενζύμων *Bam*HI και *Apa*I, ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίησή τους σε επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα. Οι αλληλουχίες DNA για κάθε ένα από τα προγονικά γονίδια παρήχθησαν με γονιδιακή σύνθεση (gene synthesis) από την εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Ακολούθως, τα προγονικά γονίδια μεταφέρθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5 (βλ. Ενότητα 2.9), που περιέχει την

κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-acceptor domain, για σήμανση στο C-τελικό άκρο, βιοτινυλίωση in vivo και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με western αβιδίνης (Karatza and Frillingos, 2005). Τέλος, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με μετασχηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιούνται για δοκιμασίες μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος (T184), αδενίνης (JW3692), υποξανθίνης, γουανίνης (JW4025), ουρακίλης και θυμίνης (JW2482) (βλ. Ενότητα 2.15), ώστε να ολοκληρωθεί ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους.



Εικόνα 2.5. Στρατηγική της «ανασύστασης» προγονικών αλληλουχιών. Διάγραμμα ροής των σταδίων που απαιτούνται για την «ανασύσταση» και το χαρακτηρισμό ενός προγονικού γονιδίου (Akanuma S., 2017).

2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση και εκκινητές

2.7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου που προβλέπεται ως μέλος της οικογένειας NAT/NCS2 από το βακτηριακό στέλεχος *Neisseria meningitidis* (*NmXanQ*) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR ενός σταδίου με υπόστρωμα (εκμαγείο) ολικό γονιδιωματικό DNA, το οποίο προμηθεύτηκε το εργαστήριό μας από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Konstantinos Kesanopoulos, National Meningococcal Reference Laboratory, National School of Public Health, Athens, Greece). Το DNA της *Neisseria meningitidis* που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με PCR του γονιδίου *NmXanQ* απομονώθηκε από το στέλεχος *Neisseria meningitidis* 41615 isolate: W-5295 (<https://pubmlst.org/databases/>) (Το γονίδιο *NmXanQ* είναι πανομοιότυπο με το γονίδιο WP_002221138 του NCBI). Οι εκκινητές για την αντίδραση σχεδιάστηκαν με τρόπο, ώστε να εισαχθούν οι περιοριστικές θέσεις των ενζύμων BamHI και ApaI στα 5' και 3' άκρα του γονιδίου αντίστοιχα, και να επιτραπεί στην συνέχεια ένθεση (insertion) των προϊόντων PCR στην αλληλουχία του πλασμιδίου pT7-5 (Sahin-Toth *et al.*, 1995), με αντικατάσταση του περιοριστικού θράυσματος *BamHI/ApaI* στον φορέα (vector) pT7-5/XanQ-BAD. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στον **Πίνακα 2.1**.

Αναλυτικά για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν:

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

Η PCR εφαρμόσθηκε σε 30-κύκλους με τις εξής εναλλαγές θερμοκρασίας:

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

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'
NmXanQ- sense	GCAGGCGGATCCATG/AGC/GGT/CAT/ATG/GGA/AAA/GGG
NmXanQ- antisense	GCTACAGGGCC/C ¹³⁸⁹ TG/TTC/CAA/GTG/GTC/GGT/ATC/AAA/CTT/G

Πίνακας 2.1. Εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του γονιδίου NmXanQ. Με έντονα γράμματα φαίνονται οι αλληλουχίες που εισάγουν τις θέσεις περιορισμού BamHI (GGATCC) και ApaI (GGGCCC) στα 5' και 3' άκρα του γονιδίου.

2.7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (Overlap/extension)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τα μεταλλάγματα του AncXanP, του AncXanQ, του XanQ και του NmXanQ (σημειακά ή και πολλαπλά μεταλλάγματα στα αντίστοιχα υποστρώματα φυσικού τύπου), χρησιμοποιήθηκε η PCR δύο σταδίων (**Εικόνα 2.6**).

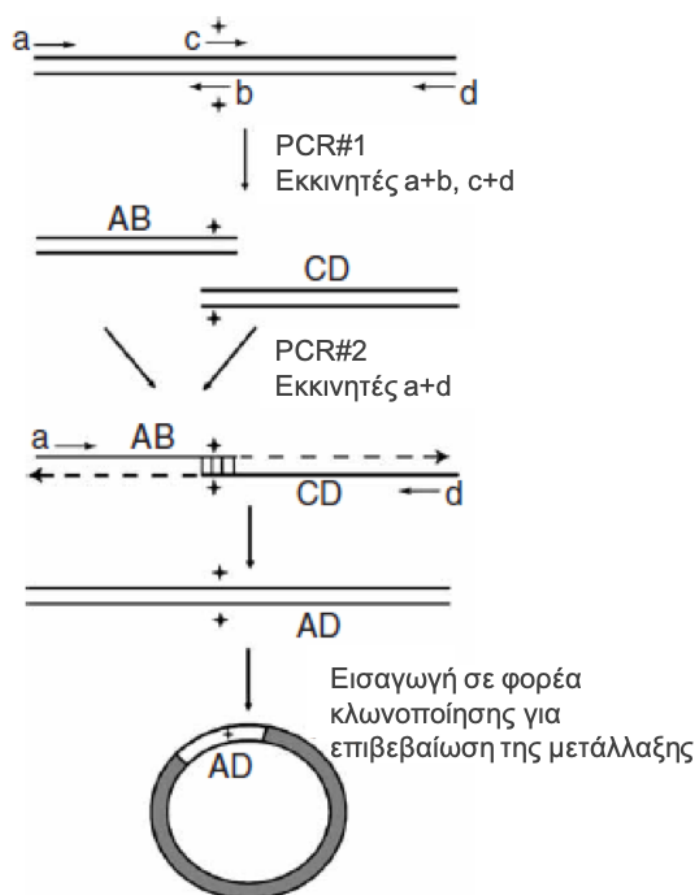
Στην PCR δύο σταδίων (Ho *et al.*, 1989; Heckman and Pease, 2007; Frillingos *et al.*, 1994; Karatza *et al.*, 2006), χρησιμοποιούνται κατάλληλοι συμπληρωματικοί εκκινητές (primers) για να δημιουργηθούν, από τα γονίδια-στόχους, συγκεκριμένα τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα μεταξύ τους άκρα (1^ο Στάδιο). Τα προϊόντα του 1^{ου} σταδίου συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα (template) σε επόμενες αντιδράσεις PCR (2^ο στάδιο), όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και με την χρήση των ίδιων εξωτερικών εκκινητών, όπως και στο 1^ο στάδιο, επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από τη συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία (contig) όλων των προηγούμενων τμημάτων (2^ο στάδιο). Η διαδικασία αυτή περιγράφεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.6**.

Η παραπάνω μεθοδολογία, που περιγράφεται και ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension) (Heckman and Pease, 2007), αποτελεί μέθοδο επιλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χμαιοτικών γονιδίων, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και δημιουργία γονιδίων χωρίς κωδικόνια Cys (Cys- less) με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση σε πολλές θέσεις (Frillingos and Kaback, 2001; Karatza *et al.*, 2006; Tavoulari and Frillingos, 2008).

Η PCR δύο σταδίων εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή σε τρεις περιπτώσεις: 1) για την κατασκευή της διαπεράσης AncXanP με 4 αμινοξικές αλλαγές στις θέσεις (S93N/S323A/G377S/S430N), για την κατασκευή της διαπεράσης AncXanQ με 5 αμινοξικές αλλαγές στις θέσεις (S27G/A116L/S191G /T312S/G377S) (**Εικόνα 2.7**), με 4 αλλαγές στις θέσεις (S27G/ A116L/S191G/T312S) και με 2 αλλαγές στις θέσεις (S27G/G377S), και για την κατασκευή της διαπεράσης XanQ με 5 αλλαγές στις θέσεις (G27S/L116A/G191S/S312T/S377G), με 4 αλλαγές στις θέσεις (G27S/L116A/G191S/S312T) και με 2 αλλαγές στις θέσεις (G27S/S377G, G191S/S377G, S312T/S377G), 2) για την κατασκευή μονών μεταλλαγμάτων στο υπόβαθρο του φυσικού

τύπου (wt) των διαπερασών AncXanQ (S27G, G377S), XanQ (G27S, L116A, G191S, S312T και S377G) και NmXanQ (A191S, G377S), αλλά και 3) για την κατασκευή διαπερασών μοναδικής κυστεΐνης (single-Cys mutants) (P20C, F21C, A24C, L25C, V26C, G27C, A28C, I29C, I35C, F36C, V37C, P38C, M39C, V40C, T41C, P42C, A43C, L44C, Y59C, L60C, V61C, M63C, A64C, M65C, I66C, A67C, V76C και N77C) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μία διαπεράση χωρίς εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys-less XanQ).

Στο τέλος κάθε σταδίου τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση αгарόζης (1%) και ανακτώνται με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).



Εικόνα 2.6. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου PCR δύο σταδίων. Σχηματικό διάγραμμα της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension). Το DNA και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια απεικονίζονται με γραμμές με κατεύθυνση από το 5'- στο 3'-. Η θέση εισαγωγής της μετάλλαξης σημειώνεται ως (+) και οι εκκινητές σημειώνονται με

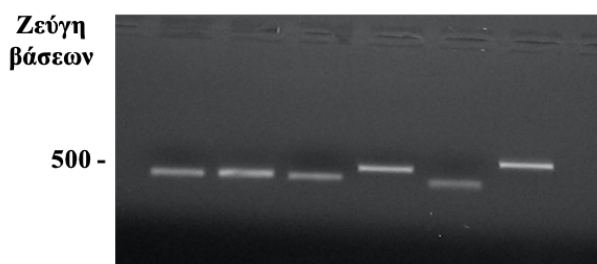
Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence 5'- 3')
1 AncXanP S93N	CAG/GGC/ACG/ AAC /TTT/GCG/TTT/CTA
2 AncXanP S323A	C/ACC/ACG/TTT/ GCG /CAG/AAT/AAT/GG
3 AncXanP G377S	G/ATG/TTT/ TCC /ACC/GCC/GTA/GC
4 AncXanP S430N	C/TTA/TTT/GAA/ AAC /CCG/ATC/ACT/ACA/GGC
5 AncXanQ S27G	GCT/CTC/CTC/ GGT /GCA/GTT/ACC
6 AncXanQ A116L	G/CAC/GAA/GAC/ TTA /ATG/ATC/TCG/ACG/C
7 AncXanQ S191G	CTC/GGC/TTA/ GGC /TTG/TTG/GTT/TTA/C
8 AncXanQ T312S	GTT/ATC/GCC/ TCC /GCT/ATT/GGT/TC
9 AncXanQ G377S	G/ATG/TTT/ TCC /ATG/ATT/GCG/ATC/GCA/G
10 XanQ G27S	GCT/CTC/GTT/ TCC /GCC/ATT/ACC/C
11 XanQ L116A	GT/TTT/CAC/GAA/GAG/ GCG /ATC/ATG/TC
12 XanQ G191S	CTC/GGC/GTT/ AGC /TTG/TTG/GTT/TTA/ATT/G
13 XanQ S312T	GTT/ATC/GCT/ ACC /GCT/GTC/GGT/TC
14 XanQ S377G	G/ATG/TTT/ GGT /ATG/ATT/GCG/ATC/GCA/GG
15 NmXanQ G377S	G/ATG/TTC/ TCC /TTG/ATT/GCG/ATT/GC
16 NmXanQ A191S	GAA/AAC/TTG/GGT/CTG/ TCT /TCG/CTG/GTG/C

Πίνακας 2.2. Παρουσιάζονται οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίστοιχη αντίδραση PCR, για αλλαγές επιλεγμένων καταλοίπων στην αλληλουχία των φυσικού τύπου (wt) *AncXanP*, *AncXanQ*, *XanQ* ή *NmXanQ*. Με έντονα γράμματα επισημαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων του υποστρώματος και με υπογράμμιση οι σιωπηλές αντικαταστάσεις, που χρησιμοποιούνται για βελτιστοποίηση παραμέτρων (μήκος, GC%, θερμοκρασία Tm) κατά τον σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence 5'- 3')
1 XanQ (Cys-less) P20C	GAG/GAT/CGC/CTT/ TGC /TTT/CAT/CAG
2 XanQ (Cys-less) F21C	C/CCT/CCC/ TGT /CAT/CA A /GCT/CTC
3 XanQ (Cys-less) A24C	CC/TTT/CAT/CAG/ TGT /CTC/GTT/GGT/GC
4 XanQ (Cys-less) L25C	C/TTT/CAT/CAG/GCT/ TGT /GTT/GGT/GC
5 XanQ (Cys-less) V26C	CAG/GCT/CT A / TGT /GGT/GCC/ATT/AC
6 XanQ (Cys-less) G27C	GCT/CTC/GTT/ TGT /GCC/ATT/ACC/C
7 XanQ (Cys-less) A28C	CT/CTC/GTT/GGT/ TGC /ATT/ACC/CAT/C
8 XanQ (Cys-less) I29C	CTC/GTT/GGT/GC A / TGT /ACC/CAT/CTG
9 XanQ (Cys-less) I35C	CTG/TTG/GCA/ TGT /TTC/GTT/CCG/ATG/G
10 XanQ (Cys-less) F36C	CTG/TTG/GCA/ATC/ TGT /GTT/CCG/ATG/G
11 XanQ (Cys-less) V37C	CTG/TTG/GCA/ATT/TTC/ TGT /CCG/ATG/GTA/AC
12 XanQ (Cys-less) P38C	CTG/TTG/GC G /ATC/TTC/GTT/ TGC /ATG/GTA/AC
13 XanQ (Cys-less) M39C	C/GTT/CCG/ TGT /GTA/ACT/ CCT /GCG/TTA/ATC/G
14 XanQ (Cys-less) V40C	C/GTT/CCT/ATG/ TGT /ACT/CCC/GCG/TTA/ATC/G
15 XanQ (Cys-less) T41C	G/ATG/GTA/ TGT /CCC/GCG/TTA/ATC/G
16 XanQ (Cys-less) P42C	G/ATG/GTA/ACC/ TGC /GCG/TTA/ATC/G

17	XanQ (Cys-less) A43C	GTA/ACC/CCC/ TGC /TTA/ATC/GTG/G
18	XanQ (Cys-less) L44C	G/ATG/GTA/ACT/ CCT /GCG/ TGT /ATC/GTG/G
19	XanQ (Cys-less) Y59C	CA/ACT/GCC/ TGC /CTT/GTT/TCT/ATG/G
20	XanQ (Cys-less) L60C	CT/GCC/TAT/ TGC /GTG/TCT/ATG/GC
21	XanQ (Cys-less) V61C	CT/GCC/TAT/CTT/ TGC /TCT/ATG/GC
22	XanQ (Cys-less) M63C	CTT/GTT/TCT/ TGT /GCG/ATG/ATC/GCC/TCT/G
23	XanQ (Cys-less) A64C	CTT/GTT/TCT/ATG/ TGC /ATG/ATC/GCC/TCT/G
24	XanQ (Cys-less) M65C	CTT/GTT/TCT/ATG/GCG/ TGT /ATC/GCC/TCT/G
25	XanQ (Cys-less) I66C	CT/ATG/GCG/ATG/ TGT /GCT/TCT/GGT/ATT/GG
26	XanQ (Cys-less) A67C	GCG/ATG/ATC/ TGT /TCT/GGT/ATT/GGT/ACC
27	XanQ (Cys-less) V76C	C/TGG/TTA/CAA/ TGC / AAT /CGC/TAC/GGC/ATC
28	XanQ (Cys-less) N77C	GG/TTA/CAA/GTA/ TGC /CGC/TAC/GGC/ATC

Πίνακας 2.3. Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μονών μεταλλάξεων με υπόστρωμα pT7-5/XanQ(Cys-less)-BAD με την αντίστοιχη αντίδραση PCR. Με έντονα γράμματα επισημαίνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων του υποστρώματος και με υπογράμμιση οι σιωπηλές αντικαταστάσεις, που χρησιμοποιούνται για βελτιστοποίηση παραμέτρων (μήκος, GC%, θερμοκρασία Tm) κατά τον σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών.



Εικόνα 2.7. PCR στάδιο I: πηγμα αγαρόζης 1% όπου απεικονίζονται τα τμήματα DNA το κάθε ένα από τα οποία δημιουργήθηκε με τους συμπληρωματικούς εκκινητές, και τα οποία έχουν συμπληρωματικά άκρα, ώστε στην PCR II να ενωθούν και να δημιουργήσουν την περμεάση ApcXanQ με 5 σημειακές μεταλλάξεις.

Για την επαλήθευση της αλληλουχίας DNA στα μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν με in vitro μεταλλαξιγένεση, δείγματα DNA απεστάλησαν στην εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany), όπου και αναλύθηκαν, με την μέθοδο του F. Sanger (ενζυμική αντίδραση πολυμερισμού και τερματισμός με 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια) σε Αυτόματο Αναλυτή Αλληλουχίας (Applied Biosystems).

2. 8 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήγμα αγαρόζης επιτρέπει την ανίχνευση, το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση ή και τον καθαρισμό διαφόρων μορίων και τμημάτων DNA. Στο εργαστήριό μας δείγματα DNA ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από κάθε αντίδραση PCR ή περιοριστική πέψη.

2.8.1 Παρασκευή πήγματος αγαρόζης

Το διάλυμα αγαρόζης 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), 0.5mg/ml προετοιμάζεται σε πινάκιο ως εξής: ανά 100ml TAE προστίθεται 1g αγαρόζης. Το ελαιώδες αγαρόζη διαλυτοποιείται σε σύντομο βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων. Μετά από μείωση της θερμοκρασίας σε ανεκτά επίπεδα, προστίθενται, ανά 100ml, 5μl από το διάλυμα EtBr, 10mg/ml, και το υγρό αποχέεται με προσοχή στο πινάκιο, όπου έχει τοποθετηθεί εκ τω προτέρων κτένι για τη δημιουργία οδόντωσης φρεατίων. Μετά τη στερεοποίηση του πήγματος, το κτένι αφαιρείται προσεκτικά υπό προσθήκη μικρού όγκου TAE στον κενό χώρο των φρεατίων και το πινάκιο με το πήγμα τοποθετείται επί της συσκευής ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με TAE.

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση

Μετά το πέρας της PCR ή την ολοκλήρωση της περιοριστικής πέψης 20μl από κάθε δείγμα αναμιγνύονται με 2μl διαλύματος φόρτωσης 10X και προστίθενται στα φρεάτια του πήγματος. Παράλληλα, σε επιλεγμένα φρεάτια προστίθενται και μάρτυρες μοριακών μεγεθών (100bp DNA ladder). Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού με σταθερή τάση 40V επί 45min, σε θερμοκρασία δωματίου.

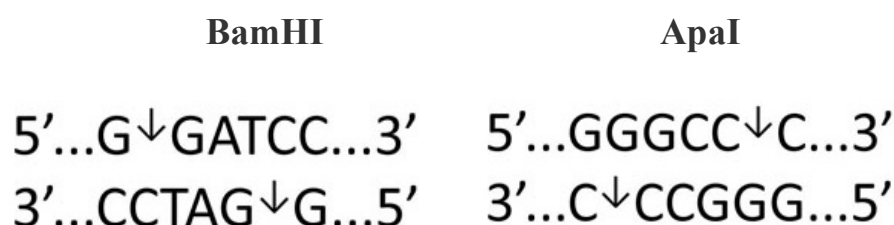
2.8.3 Οπτικοποίηση του αποτελέσματος

Εμφάνιση των ζωνών DNA γίνεται με έκθεση του πήγματος σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-transilluminator). Για καταχώρηση και επεξεργασία του αποτελέσματος γίνεται φωτογράφιση υπεριώδους και μεταφορά της εικόνας σε ηλεκτρονικό επεξεργαστή (DNA Photographic Transilluminator System).

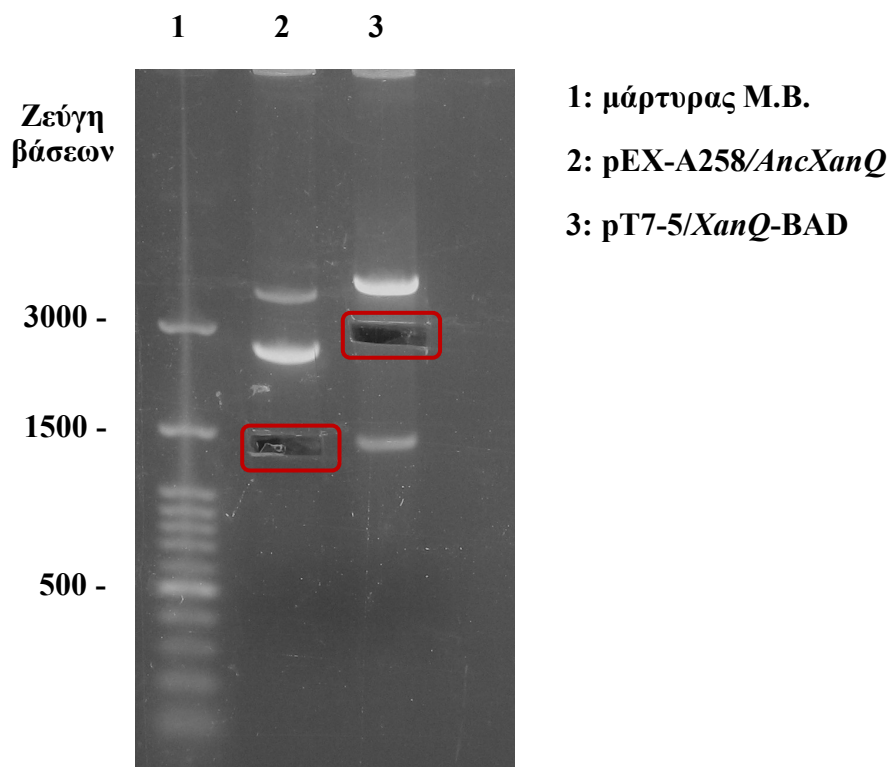
Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση οι επιθυμητές ζώνες αποκόπτονται από το πήγμα και ανακτώνται με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).

2.9 Τεχνικές υποκλωνοποίησης: Περιοριστική πέψη (restriction)-Ανασύνδεση (ligation)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης ο πλασμιδιακός φορέας **pT7-5/*XanQ*-BAD** (από μεγάλης κλίμακας παρασκευάσμα – maxi prep, 1μg/μL) και τα πλασμίδια που φέρουν τα προγονικά γονίδια *AncXanP*, *AncXanQ*, *AncXUacT* και *AncR1* ή τα προς ένθεση (insertion) προϊόντα DNA που είχαν προκύψει από τις αντιδράσεις PCR, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI* (**Εικόνα 2.8**). Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον φορέα pT7-5/*XanQ*-BAD, όσο και στους φορείς κλωνοποίησης που φέρουν τα προγονικά γονίδια, αλλά και στα PCR προϊόντα που δημιουργούνται με εκμαγείο τα pT7-5/*AncXanP*-BAD, pT7-5/*AncXanQ*-BAD, pT7-5/*NmXanQ*-BAD, pT7-5/*XanQ*(wt)-BAD, ή pT7-5/*XanQ*-Cys-less-BAD, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (§ 2.7).



Εικόνα 2.8. Θέσεις αναγνώρισης αλληλουχίας των ενζύμων BamHI και ApaI.



Εικόνα 2.9. Ηλεκτροφόρηση για απομόνωση-καθαρισμό επιθυμητών ζωνών μετά από περιοριστική πέψη. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης ύστερα από πέψη των πλασμιδιακών φορέων *pEX-A258* που περιείχε το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* (2) και *pT7-5/XanQ -BAD* (3) με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI*. Τα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη είναι: **3846 bp** («άκοπο» πλασμίδιο *pEX-A258*), **2446 bp** (τμήμα του πλασμιδίου *pEX-A258* που απομένει μετά την περιοριστική πέψη του γονιδίου *AncXanQ*) και **1389 bp** (γονίδιο *AncXanQ*, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως *insert*) (διαδρομή ηλεκτροφόρησης 2), καθώς και **4187 bp** («άκοπο» πλασμίδιο *pT7-5/XanQ -BAD*), **2789 bp** (τμήμα του *pT7-5/XanQ-BAD* που απομένει μετά την περιοριστική πέψη και το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως *vector*) και **1398 bp** (γονίδιο *XanQ* που αφαιρείται από το πλασμίδιο *pT7-5*) (διαδρομή ηλεκτροφόρησης 3). Οι επιθυμητές ζώνες των *insert* και *vector* που αφαιρέθηκαν από το πήγμα αγαρόζης σημειώνονται με κόκκινο πλαίσιο.

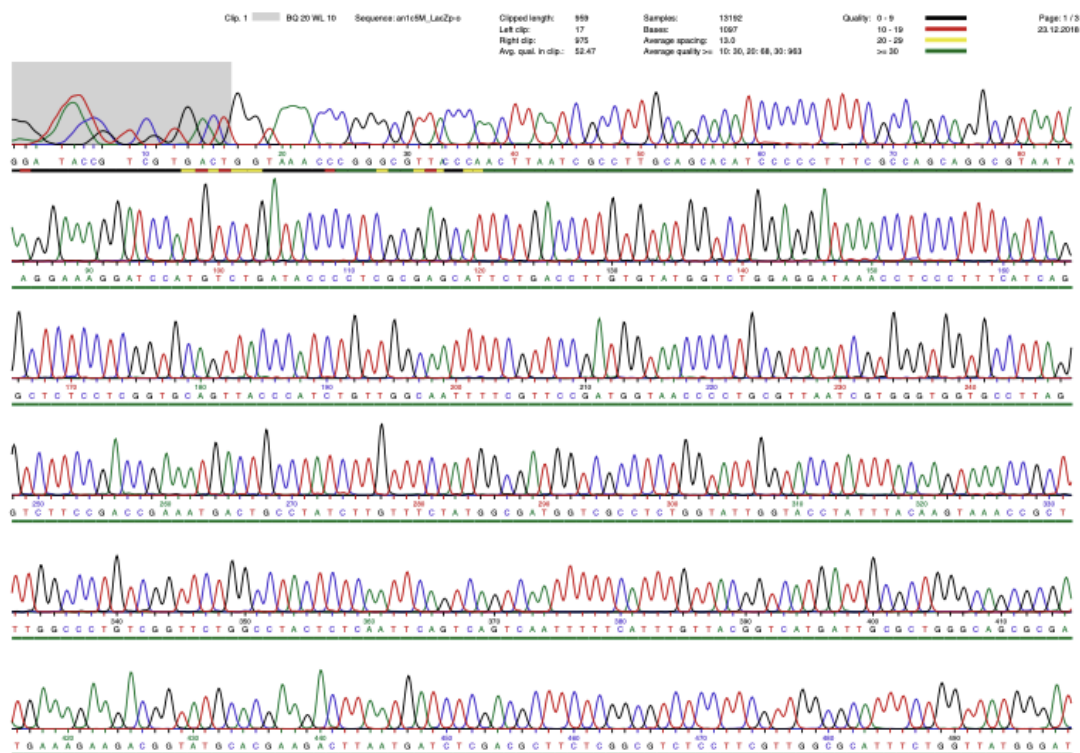
Στο τέλος της περιοριστικής πέψης, έγινε αποφωσφορυλίωση με αλκαλική φωσφατάση στα ελεύθερα 5' άκρα του φορέα (*vector*) προς αποφυγή ανεπιθύμητης ανασύνδεσης των ανοικτών άκρων του φορέα πριν την αντίδραση με το *insert* DNA. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1% (§2.8) (**Εικόνα 2.9**), καθαρίστηκαν με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (*Nucleospin Extract II*, *Macherey-Nagel*) και ανασυνδέθηκαν με χρήση *T4* DNA λιγάσης. Η αντίδραση της λιγάσης έγινε στους 16°C, για 15h, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL, με ποσότητες ενθέματος (*insert*) και φορέα (*vector*) σε μοριακή αναλογία 3:1.

2.10 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού

Κύτταρα *E. coli* TOP10F', T184, ΔadeP, ΔghxP, ΔcodB ή ΔuraA προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται πλήρης καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB (10ml) στους 37°C, για 16h. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα S.O.B. μέχρι τελικού όγκου 250ml. Η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους T184 γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη (0.01mg/ml), ενώ των ΔadeP, ΔghxP, ΔcodB και ΔuraA παρουσία καναμυκίνης (0.05mg/ml). Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση στον επωαστήρα του θερμού θαλάμου (37°C) μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει στην τιμή 0.6. Μετά από επώαση στον πάγο για 10min, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000rpm (10min, 4°C) και αναδιαλύονται σε 80mL ψυχρού διαλύματος TB. Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας επαναλαμβάνεται με επαναιώρηση σε 20mL ψυχρού TB που περιέχει 7% (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και τα κύτταρα χαρακτηρίζονται πλέον ως επιδεκτικά, έτοιμα για το μετασχηματισμό με τα κατάλληλα πλασμίδια (plasmid DNA prep) ή τα προϊόντα της αντίδρασης ανασύνδεσης. Τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

2.11 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA (από ligation product) προστίθεται σε επιδεκτικά TOP10F' και γίνεται επώαση σε πάγο για 5 min. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε προθερμασμένα στους 37°C τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ που περιέχει αμικικιλίνη (0.1 mg/ml). Οι αποικίες επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητά τους σε αμικικιλίνη και στη συνέχεια πραγματοποιείται απομόνωση του DNA σε μικρή κλίμακα με βάση πρωτόκολλο πακέτου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA. Σε κάθε περίπτωση, γίνεται επιβεβαίωση της αλληλουχίας του DNA (sequencing) ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *Bam*HI και *Apa*I σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech), όπως φαίνεται ενδεικτικά στην **Εικόνα 2.10**. Ακολουθεί εκ νέου μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, *E. coli* T184, ΔadeP, ΔghxP, ΔcodB ή ΔuraA με το επιβεβαιωμένο, πλέον, πλασμιδιακό DNA και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει γλυκερόλη (30%), στους -80°C.



Εικόνα 2.10. Ανάγνωση αλληλουχίας της κατασκευής *AncXanQ-5M-BAD* από τον αυτόματο αναλυτή αλληλούχησης της εταιρίας *MWG-Biotech*. Η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται με τους εκκινητές *LacZp/o* (*ATGATTACGGATTCACTGGCCGTC*) και *pTanti* (*GGGAGTCAGGCAACTATGG*) (αντίθετη κατεύθυνση, *reverse complement*). Η επιβεβαίωση της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε για όλες τις κατασκευές της παρούσας διατριβής. Στην εικόνα παρουσιάζεται τμήμα της αλληλουχίας της κατασκευής *AncXanQ-5M-BAD*, ύστερα από ανάγνωση με τον εκκινητή *LacZp/o*.

2.12 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε μικρή κλίμακα (10mL)

Κύτταρα *E. coli* που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 3mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αμικικιλίνη (0.1mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.01mg/mL), αν πρόκειται για κύτταρα T184, ή αμικικιλίνη (0.1 mg/mL) και καναμυκίνη (0.05mg/ml) αν πρόκειται για τα στελέχη ΔadeP, ΔghxP, ΔcodB ή ΔuraAγια 16h, στους 37°C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται αραίωση σε LB (1mL πλήρους καλλιέργειας + 9mL νέου LB), πάλι παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών και ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 2 ώρες (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης). Προστίθεται ισοπρόπυλο -θειο -β, D -γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM, για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, και η

ανάπτυξη συνεχίζεται για επιπλέον 2 ώρες. Ακολουθεί η φυγοκεντρική συγκομιδή των κυττάρων (6000 rpm, 10min, 4°C).

2.13 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την παρασκευή κλάσματος μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη κυττάρων *E. coli* T184, περιλαμβάνει ωσμωτικό σοκ, επώαση με EDTA και λυσοζύμη και κατεργασία με υπερήχους (Kaback, 1974; Frillingos *et al.*, 1994). Πιο αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι:

Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων *E. coli* T184 από 10ml καλλιέργειας (§ 2.12), τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10ml διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension buffer, §2.3). Ακολουθεί μια ακόμη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1ml διαλύματος επαναιώρησης, το οποίο περιέχει και αναστολέα πρωτεασών (Pefabloc) σε αναλογία 1ml διαλύματος επαναιώρησης: 1μl Pefabloc (τελική συγκέντρωση Pefabloc 0.2μM). Το εναιώρημα (1ml) μεταφέρεται σε μικροσωληνάρια τύπου erppendorf, φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 5min σε 13000rpm και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος σακχαρόζης (Sucrose buffer, §2.3) με Pefabloc (στην ίδια αναλογία). Ακολουθεί επώαση στους 4°C για 20min.

Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται εκ νέου σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 5min στις 13000rpm, επαναιωρούνται σε 800μl dH₂O και επωάζονται για 10 min, 4°C. Μετά το τέλος της επώασης, προστίθεται 10μl λυσοζύμης (αρχικής συγκέντρωσης 10mg/ml) και ακολουθεί εκ νέου επώαση για 30min στον πάγο. Αμέσως μετά, ακολουθεί θραύση των κυττάρων με τη χρήση συσκευής υπερήχων (sonication), (2 ώσεις των 15sec για κάθε δείγμα σε ένταση 40%, στη συσκευή Branson 250-D). Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (5min, 13000rpm), ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα άθραυστα κύτταρα (cell debris) και το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρείται για 30min σε 90000rpm στους 4°C. Τέλος, το ίζημα των μεμβρανών διαλυτοποιείται σε 40μL ddH₂O και τα δείγματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση και περαιτέρω αναλύσεις (§2.14) είτε αμέσως, είτε μετά από 12-24 ώρες, αφού ενδιάμεσα φυλαχθούν στους 4°C.

2.14 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.14.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

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

2.14.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ddH₂O έτσι ώστε τα μεμβρανικά δείγματα να εξισορροπηθούν στα 100μg πρωτεΐνης ανά 50μL. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer, §2.3) σε αναλογία 4:1 (δείγμα: διάλυμα φόρτωσης) και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου (12%) –δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πήγμα διαχωρισμού 12% και πήγμα επιστοίβαξης 5% σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.4).

	Πήγμα Επιστοίβαξης (30ml)	Πήγμα Διαχωρισμού (100ml)
30% Ακρυλαμίδιο	4.5 ml	42ml
Διάλυμα Διαχωρισμού	-	25ml
Διάλυμα Επιστοίβαξης	7.5ml	-
SDS 10% w/v	0.3ml	1ml
APS 10%w/v	0.3ml	1ml
TEMED	0.03ml	0.05ml
dH ₂ O	17.4ml	32ml

Πίνακας 2.4. Πρωτόκολλο για την παρασκευή πήγματος διαχωρισμού και πήγματος επιστοίβαξης (Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)).

2.14.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των διαχωρισμένων πλέον πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) σε διάλυμα μεταφοράς, για 4 ώρες στα 400 mA. Μετά

το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επώζεται για 16 ώρες στους 4°C σε Διάλυμα Αποκλεισμού [Blocking buffer: 5% BSA (αλβουμίνης ορού βοός) σε TBST 1x] για τη δέσμευση των κενών θέσεων.

Στη συνέχεια, ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με το σύζευγμα αβιδίνης- υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50.000 σε TBST (1X) - 5% BSA για 1 ώρα και έπειτα πραγματοποιούνται 8 πλύσεις με TBST (1X). Για την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος (ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του σήματος) χρησιμοποιείται η αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL).

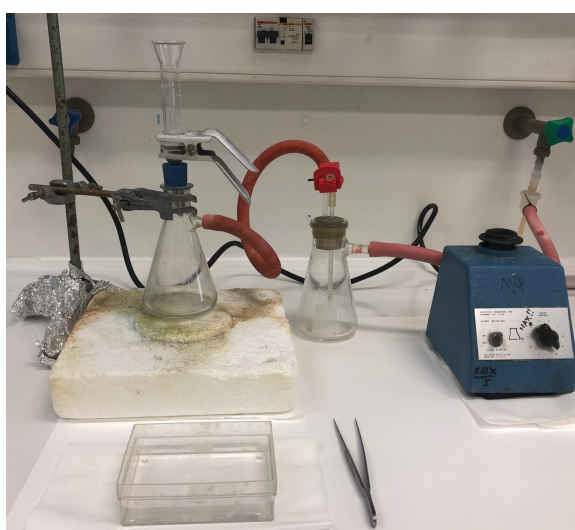
2.15 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)

2.15.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Κύτταρα *E. coli* T184, ΔadeP, ΔghxP, ΔcodB ή ΔuraA, μετασχηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα, §2.12). Μετά την ανάπτυξη και συγκομιδή των κυττάρων από 10ml καλλιέργειας, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος Kpi, pH 7.5 (§2.3) και φυγοκεντρούνται εκ νέου. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και επαναιώρησης σε Kpi επαναλαμβάνεται δυο φορές, με τη διαφορά ότι μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 1ml διαλύματος Kpi. Στη συνέχεια, ακολουθεί φωτομέτρηση στα 420nm δείγματος 10μl κυτταρικού εναιωρήματος σε 990μl ddH₂O, έτσι ώστε να εξισορροπηθούν τα κύτταρα προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Kpi σε OD_{420nm}=10, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7mg/ml, σύμφωνα με αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994). Στην περίπτωση των κυττάρων ΔuraA, το Kpi αντικαθίσταται από το ρυθμιστικό διάλυμα MK, pH 6.5 (§2.3).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [⁸⁻³H] ξανθίνης (22.8 Ci/mmol), [⁸⁻³H] γουανίνης (21.2 Ci/mmol), [⁸⁻¹⁴C] ουρικού οξέος (58 mCi/mmol), [2,8-³H] αδενίνης (31.8 Ci/mmol), [2,8-³H]υποξανθίνης (27.7 Ci/mmol), [³H] κυτοσίνη (18.8 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μM, 0.1 μM, 4μM, 0,1μM, 1μM και 0,1μM αντίστοιχα) σε 50 μL κυττάρων, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 10 min) (Karatza and Frillingos, 2005). Στις περιπτώσεις όπου το μελετώμενο υπόστρωμα είναι η [5,6-³H] ουρακίλη (32.5 Ci/mmol) ή η [methyl-³H] θυμίνη (50.6 Ci/mmol) χρησιμοποιούνται σε κάθε αντίδραση 50μl κυττάρων στα οποία

προστίθεται 20mM γλυκερόλη και ακολουθεί επώαση 3min 25°C. Μετά το πέρας της επώασης προστίθεται το υπόστρωμα τελικής συγκέντρωσης 0.1μM για χρόνους 5sec-5min. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 2x3ml διαλύματος τερματισμού (§2.3) και ακολουθεί ταχεία διήθηση υπό κενό (rapid filtration) (**Εικόνα 2.11**), σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2μm (Frillingos *et al.*, 1994). Μετά την επώαση, ο ηθμός μεταφέρεται σε κατάλληλα σωληνάρια σπινθηρισμού (scintillation vials) στα οποία προστίθεται 2x4ml διάλυμα υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid) (§2.3). Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται μετά από 24h σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter) (§2.1).



Εικόνα 2.11. Βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τη μέτρηση διαμεμβρακής μεταφοράς είναι μια απλή συσκευή ταχείας διήθησης υπό κενό στην οποία ο ηθμός, κατάλληλου μεγέθους πόρων, σταθεροποιείται υπεράνω μιας κωνικής φιάλης κενού. Κατά την ταχεία διήθηση, τα κύτταρα (μαζί με το κλάσμα των μεταφερόμενων μορίων που έχει εισέλθει σε αυτά) συγκρατούνται από τον ηθμό, ενώ το εξωμεμβρανικό διάλυμα της αντίδρασης ρέει μέσω του ηθμού και συγκεντρώνεται στη φιάλη κενού. Μετά τη διαδικασία της διήθησης οι ηθμοί μεταφέρονται σε υγρό σπινθηρισμού για να μετρηθεί η ραδιενέργεια.

2.15.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση

Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης, όπως στην περίπτωση της ανάλυσης κινητικής πρόσληψης ξανθίνης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης μετρήθηκε στα 10 και 15 sec για τους μεταφορείς AncXanQ (και για τα μεταλλαγμένα στο υπόβαθρό του), NmXanQ και AncXUacT ή στα 5 και 10 sec για το μεταφορέα XanQ, καθώς και για τα αντίστοιχα

μεταλλάγματα στο υπόβαθρό του, ενώ οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.1μM έως 40μM. Στην περίπτωση κινητικής πρόσληψης γουανίνης η αρχική ταχύτητα πρόσληψης των υποστρωμάτων μετρήθηκε στα 5 και 10 sec, για τον μεταφορέα ApcXanQ και τον NmXanQ, καθώς και για τα αντίστοιχα μεταλλάγματα, ενώ για το μεταφορέα XanQ-S377G στα 10 και 15 sec, ενώ οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.01μM έως 40μM. Στην περίπτωση ανάλυσης κινητικής πρόσληψης για το υπόστρωμα του ουρικού οξέος η αρχική ταχύτητα για το μεταφορέα ApcXUacT μετρήθηκε στα 10 και 15, σε συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος από 1μM έως 10μM. Αντίστοιχα για την περίπτωση ανάλυσης κινητικής πρόσληψης για το υπόστρωμα της ουρακίλης η αρχική ταχύτητα για το μεταφορέα ApcR1 μετρήθηκε στα 5 και 10, σε συγκεντρώσεις ουρακίλης από 0.1μM έως 10μM.

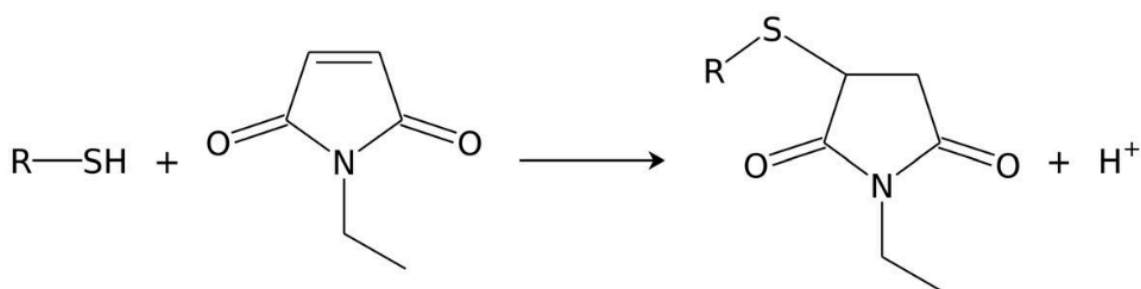
Οι σταθερές V_{max} και K_m εξάγονται από τα διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 7* (<http://www.graphpad.com>).

2.15.3 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς παρουσία μη σημασμένων αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων

Στα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [^3H] ξανθίνης, [^3H] γουανίνης ή [5,6- ^3H] ουρακίλης από άλλες πουρίνες, πυριμιδίνες ή ανάλογα αυτών, πραγματοποιήθηκε προεπάση των κυττάρων με μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (0.1 μM έως 1 mM) (**Εικόνα 2.1**) για 5min και στη συνέχεια ακολούθησε δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς με [8- ^3H] ξανθίνη (1 μM), [^3H] γουανίνη (0.1 μM) ή [5,6- ^3H] ουρακίλης (0.1 μM) αντίστοιχα. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 και 15 sec και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism7*, μέσω της ανάλυσης «non-linear regression curve fit/sigmoidal dose response». Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο δείκτης R^2 , ο οποίος πρέπει να είναι >0.9 και ο παράγοντας Hill co-efficient (Weiss, 1997), ο οποίος θα πρέπει να είναι κοντά στο -1 για ένα μεταφορέα που έχει ένα κέντρο δέσμευσης. Οι τιμές K_i που δίνονται προκύπτουν από την εφαρμογή του τύπου των Cheng and Prusoff (1973) $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_M)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [8- ^3H] ξανθίνης, [^3H] γουανίνης ή [5,6- ^3H] ουρακίλης.

2.15.4 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών SH-αντιδραστηρίων, προηγείται επώαση με το αντίστοιχο αντιδραστήριο (NEM) (**Εικόνα 2.12**), σε τελική συγκέντρωση 2mM για 10min, στους 25°C. Ο τερματισμός των αντιδράσεων γίνεται με διθειοθρεϊτόλη (DTT) (σε μοριακή περίσσεια 10x έναντι του SH-αντιδραστηρίου) και η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ξανθίνης γίνεται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2mM) και ασκορβικού καλίου (20mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994).



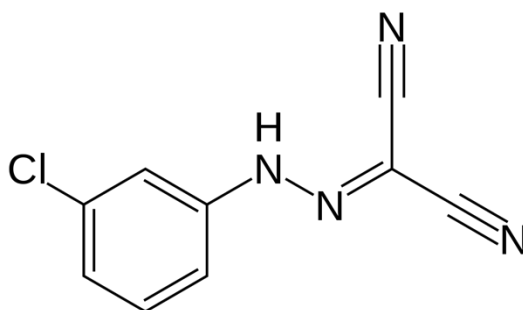
Εικόνα 2.12. Αντίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) με τις SH-ομάδες των κυστεϊνών (Sasidharan *et al.*, 2012).

2.15.5 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων παρουσία υποστρώματος

Ακολουθείται η διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.15.1, μέχρι την εξισορρόπηση των κυττάρων σε OD₄₂₀=10. Ακολουθεί επώαση 1ml κυττάρων με ξανθίνη τελικής συγκέντρωσης 1mM για 10min στους 25°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση με κατάλληλης συγκέντρωσης αντιδραστηρίου (NEM) για 10min στους 25°C. Ο τερματισμός των αντιδράσεων γίνεται με διθειοθρεϊτόλη (DTT) (σε μοριακή περίσσεια 10x έναντι του NEM). Ακολούθως, στο 1ml κυττάρων προστίθενται 39ml Kpi pH 7.5 (§2.3) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10min, 4°C). Η διαδικασία της φυγοκέντρησης και επαναιώρησης σε Kpi επαναλαμβάνεται δυο φορές, με τη διαφορά ότι μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 1ml διαλύματος Kpi. Ακολουθούν τρεις ακόμη φυγοκεντρήσεις (13000 rpm, 1min). Μετά την τρίτη φυγοκέντρηση τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,6ml Kpi και πραγματοποιείται εκ νέου εξισορρόπηση των κυττάρων σε OD₄₂₀=10. Ακολουθεί δοκιμασία ενεργού μεταφοράς, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.15.1., παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2mM) και ασκορβικού καλίου (20mM).

2.15.6 Επίδραση του πρωτονιοφόρου CCCP (καρβονυλο-κυαναμιδο-χλωροφαινυλο-υδραζόνιο)

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών πρωτονιοφόρων μορίων, προηγείται επώαση με το αντίστοιχο αντιδραστήριο (CCCP) (Εικόνα 2.13), σε τελικές συγκέντρωσεις 0.1-100 μM για 5 min, στους 25°C και στη συνέχεια ακολουθεί δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς με [8- ^3H]ξανθίνη (1 μM) ή [^3H]γουανίνη (0.1 μM) (Kaback et al., 1974). Το αρχικό διάλυμα του CCCP προετοιμάζεται σε DMSO και οι μετρήσεις αρνητικού ελέγχου (απουσία CCCP) γίνονται σε δείγματα στα οποία έχει προστεθεί αντίστοιχος όγκος DMSO (1 μl σε σύνολο 50 μl).



Εικόνα 2.13. Δομή του πρωτονιοφόρου αντιδραστηρίου CCCP (καρβονυλο-κυαναμιδο-χλωροφαινυλο-υδραζόνιο) (<https://www.medchemexpress.com>).

3

Αποτελέσματα

Η NAT/NCS2, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί την κυριότερη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων στα Βακτήρια και περιλαμβάνει αρκετές χιλιάδες ομολόγων που εμφανίζουν ιδιαίτερα συντηρημένη την προβλεπόμενη περιοχή του ενεργού κέντρου, αλλά διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς τα μεταφερόμενα υποστρώματα. Αποτελείται από δύο μεγάλες ομάδες ομολόγων που αναφέρονται ως ξεχωριστές υποοικογένειες (Saier *et al.*, 2021) (**Εικόνα 3.1**). Η μία, COG2233 ή NAT/NCS2 υποδιαιρείται σε τρεις μεγάλους κλάδους, με βάση τη φυλογενετική ανάλυση των λειτουργικά χαρακτηρισμένων ομολόγων. Ο ένας κλάδος περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, από βακτήρια και

μύκητες (Frillingos 2012; Papakostas and Frillingos 2012; Alguet *et al.*, 2016), ο δεύτερος περιλαμβάνει μεταφορείς ουρακίλης/πυριμιδινών μόνο από βακτήρια (Botou *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017) και ο τρίτος απαρτίζεται από ομόλογα σε ζώα και φυτά, όπου περιλαμβάνονται μεταφορείς πουρινών/πυριμιδινών ευρύτερης εξειδίκευσης (Yamamoto *et al.*, 2010; Girke *et al.*, 2014) καθώς και τα ανθρώπινα ομόλογα που μεταφέρουν L-ασκορβικό οξύ (Bürzle *et al.*, 2013). Η δεύτερη ομάδα, COG2252 ή AzgA-like (Cecchetto *et al.*, 2004), περιέχει ομόλογα που μεταφέρουν αδενίνη, γουανίνη ή/και υποξανθίνη, από βακτήρια, μύκητες και φυτά (Papakostas *et al.*, 2013; Cecchetto *et al.*, 2004; Girke *et al.*, 2014) (**Εικόνα 3.1**) .

Η μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των NAT/NCS2 έως τώρα έχει στηριχθεί σε διεξοδικές αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης από δύο κυρίως ομόλογα, το μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *Escherichia coli* (Karena *et al.*, 2015) και το μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού οξέος UapA του *Aspergillus nidulans* (Kosti *et al.*, 2012), καθώς και στη μοντελοποίηση στο πρότυπο της δομής δύο ομολόγων, του βακτηριακού μεταφορέα ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) και του μυκητιακού UapA (Alguet *et al.*, 2016) που έχουν αναλυθεί με κρυσταλλογραφία σε υψηλή ευκρίνεια. Οι γνώσεις που προκύπτουν από τις μελέτες αυτές έχουν επιτρέψει την κατανόηση του ρόλου ορισμένων σημαντικών θέσεων αμινοξέων που είτε αποτελούν ιδιαίτερα συντηρημένα και αναντικατάστατα κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης σε όλα τα ομόλογα που έχουν μελετηθεί, είτε συμμετέχουν σε δίκτυα δεσμών υδρογόνου περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης που συμβάλλουν σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το ομόλογο (Alguet *et al.*, 2016; Karena *et al.*, 2015), είτε εντοπίζονται σε θέσεις διακριτές από το κέντρο δέσμευσης και, σε μυκητιακά τουλάχιστον ομόλογα, μπορεί να λειτουργούν ως φίλτρα διαλογής υποστρωμάτων (selectivity gates) (Kosti *et al.*, 2012; Dhalluin 2014).

Οι έως τώρα μελέτες σχέσεων δομής-λειτουργίας των περμεασών νουκλεοτιδικών βάσεων έχουν υποδείξει, επομένως, ορισμένες σημαντικές θέσεις αμινοξέων, αλλά δεν έχουν δώσει σαφή εικόνα για τα αμινοξέα που καθορίζουν τους διακριτούς τύπους εξειδίκευσης ή πώς εξελίχθηκαν αυτές οι εξειδικεύσεις. Για να προσεγγίσουμε αυτά τα ερωτήματα, στην παρούσα διατριβή, εφαρμόσαμε μία *εξελικτική* στρατηγική (Ancestral Sequence Reconstruction), η οποία βασίζεται σε λεπτομερή φυλογενετική ανάλυση, ανασύσταση και δομική-λειτουργική ανάλυση προγονικών αλληλουχιών.

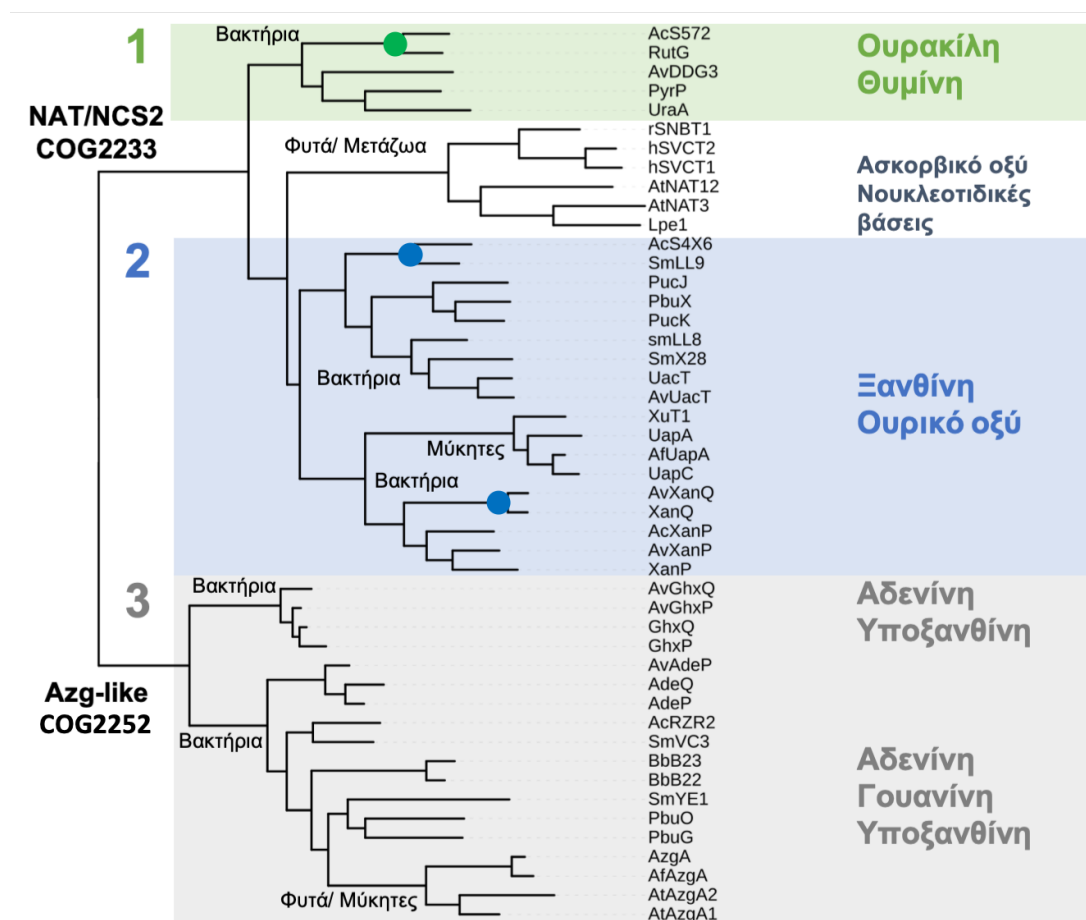
Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε αναλυτικά φυλογενετικά δέντρα για τους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2, ξεχωριστά για καθέναν από τους τρεις βασικούς φυλογενετικούς κλάδους (ουρακίλης και/ή θυμίνης, ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, αδενίνης και/ή

υποξανθίνης/γουανίνης) (**Εικόνα 3.1**) και προχωρήσαμε σε ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση προγονικών αλληλουχιών σε επιλεγμένους υποκλάδους.

Για την ομάδα ομολόγων του κλάδου **ουρακίλης και/ή θυμίνης**, είχε ήδη προηγηθεί φυλογενετική ανάλυση στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων στο πλαίσιο προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου μας (Botou *et al.*, 2018). Βασιζόμενοι σε αυτή τη φυλογένεση επιλέξαμε για περαιτέρω ανάλυση και εφαρμογή της μεθόδου της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών τον κλάδο που αντιπροσωπεύεται από τους μεταφορείς RutG και AcS572, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 3.1.

Για την ομάδα ομολόγων του κλάδου **ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος** πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική ανάλυση και αναζήτηση ομολόγων σε Βακτήρια, Αρχαία και Μύκητες (**Παράρτημα 1, Εικόνα Π1**) και εν συνεχεία εκτενής φυλογενετική ανάλυση στα Πρωτεοβακτήρια (**Παράρτημα 1, Εικόνα Π2**). Από την ανάλυση αυτή εστιαστήκαμε στις αλληλουχίες κοινών προγόνων για τους υποκλάδους που αντιπροσωπεύονται από τους μεταφορείς SmXUacT/AcS4X6 (Ενότητα 3.2.1), XanQ/XanP (Ενότητα 3.2.2.1) και XanQ/AvXanQ (Ενότητα 3.2.2.2).

Για την ομάδα των ομολόγων του κλάδου **αδενίνης και/ή υποξανθίνης/γουανίνης** (υποοικογένεια COG2252), είχε πραγματοποιηθεί συστηματική φυλογενετική ανάλυση σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα γονιδιώματων από τα τρία κύρια βακτηριακά φύλα (Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes, Ακτινοβακτήρια) (Γιαλελής Β., Διδακτορική Διατριβή, 2020), ενώ φυλογενετική ανάλυση των ομολόγων που εμπίπτουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα και στην παρούσα Διατριβή (**Παράρτημα 13**). Από τις παραπάνω αναλύσεις προέκυψε ότι τα ομόλογα αυτής της ομάδας δε μπορούν να διαφοροποιηθούν σαφώς σε διακριτούς υποκλάδους. Κατά συνέπεια δεν είναι εφικτό να προχωρήσουμε σε εξαγωγή προγονικών αλληλουχιών για αυτή την ομάδα των μεταφορέων.

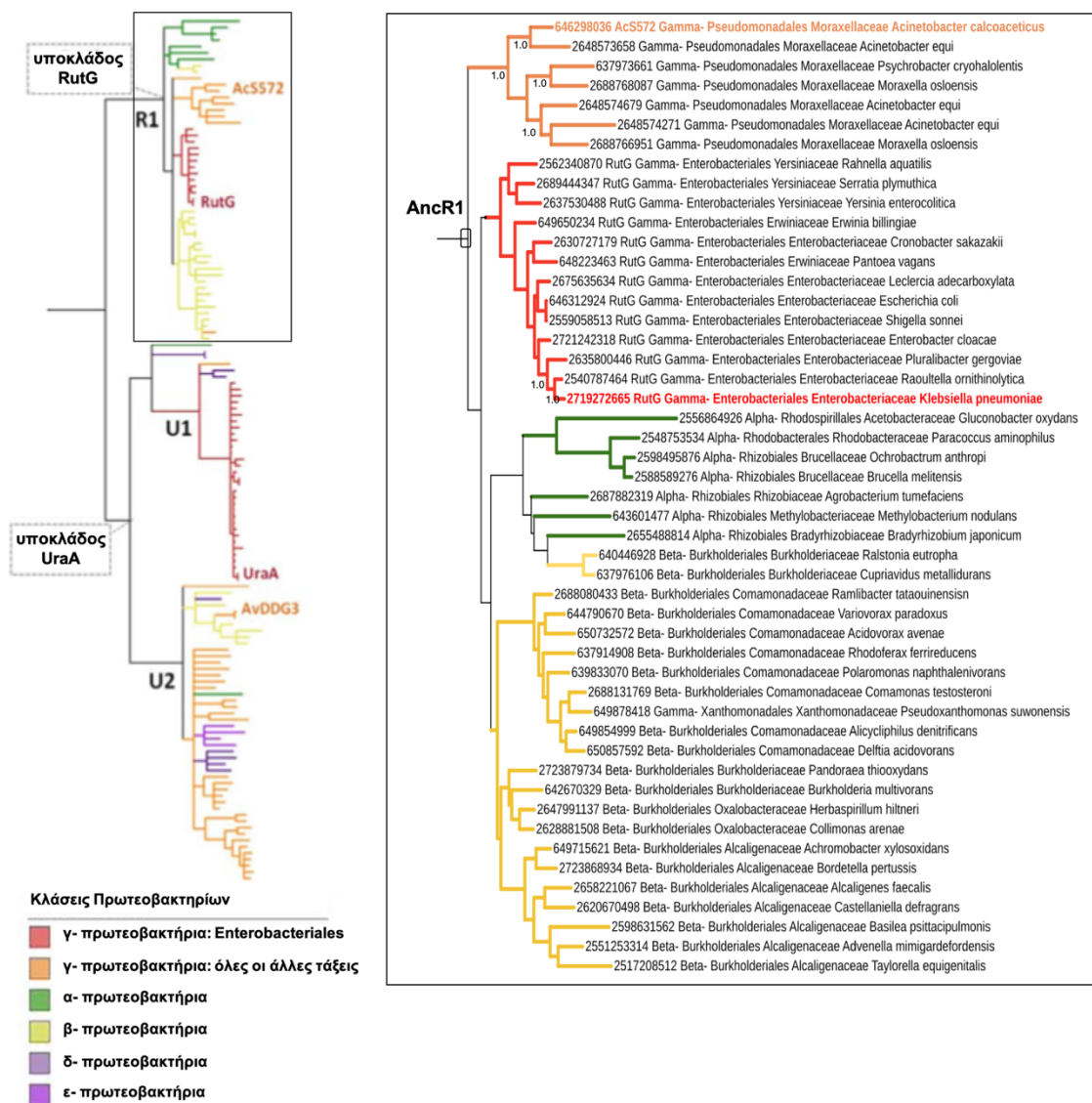


Εικόνα 3.1. Φυλογενετική ανάλυση των λειτουργικά χαρακτηρισμένων ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 από Βακτήρια, Μύκητες, Φυτά και Μετάζωα. Η οικογένεια NAT/NCS2 διακρίνεται σε δύο ομόλογες ομάδες ορθόλογων πρωτεϊνών την COG2233 (ή NAT/NCS2) και την COG2252 (ή AzgA-like). Στο φυλογενετικό δέντρο απεικονίζονται τα λειτουργικά χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας και επισημαίνονται τα κυριότερα υποστρώματα που μεταφέρονται από αυτά. Με πράσινη σκίαση επισημαίνεται ο υποκλάδος της COG2233 που περιλαμβάνει μεταφορείς πυριμιδινών (ουρακίλης/θυμίνης), με μπλε σκίαση επισημαίνεται ο υποκλάδος της COG2233 μεταφορείς 2-οξυ πουρινών (ξανθίνης/ουρικού οξέος) και με γκρι σκίαση σημειώνεται η υποοικογένεια COG2252 ή AzgA-like, η οποία περιλαμβάνει μεταφορείς αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης. Για τους ανωτέρω τρεις φυλογενετικούς κλάδους πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τον καθένα εκτενής φυλογενετική ανάλυση των βακτηριακών ομολόγων τους (που εμπίπτουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων) και σε επιλεγμένους υποκλάδους (επισημαίνονται ως σφαίρες) εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών.

3.1 Κλάδος των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης

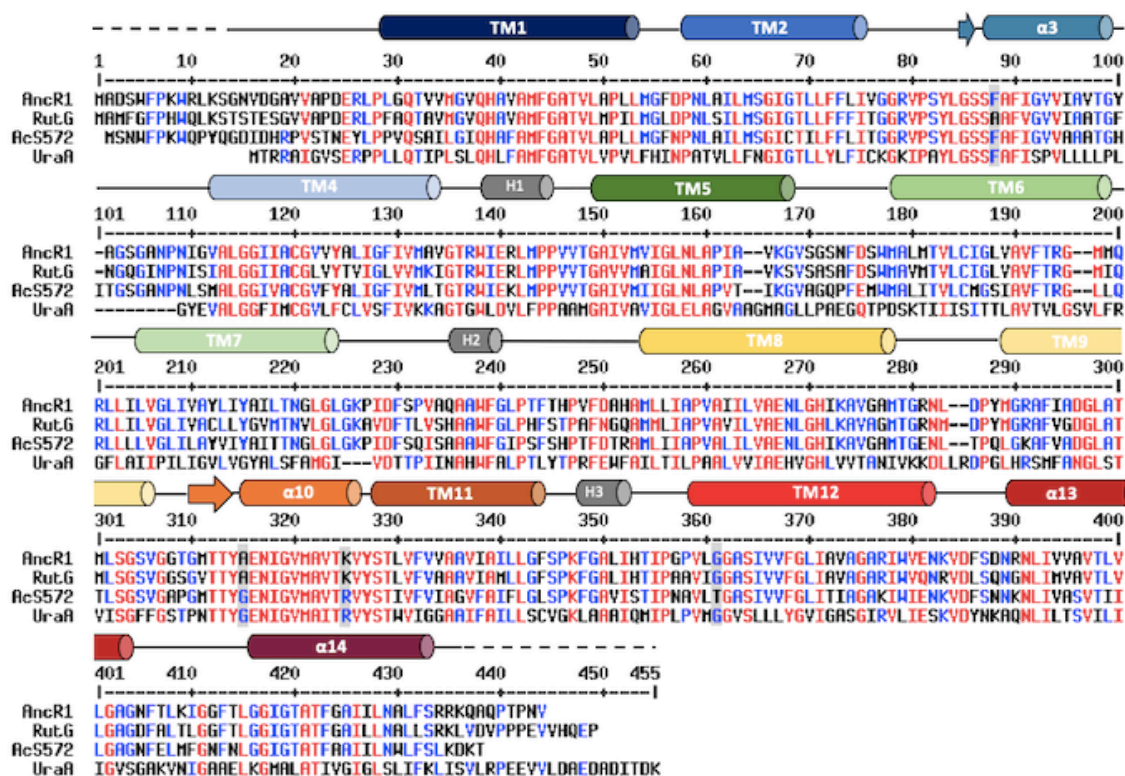
3.1.1 Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικής αλληλουχίας στον κλάδο των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης

Ο κλάδος των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης/ θυμίνης αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα ουρακίλης UraA της *Escherichia coli* που έχει μελετηθεί συστηματικά και έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία σε υψηλή ευκρίνεια (Lu *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2017), καθώς και τους εξής λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς από γ-πρωτεοβακτήρια: το RutG της *E. coli* (Botou *et al.*, 2018) υψηλής συγγένειας μεταφορέα ουρακίλης και θυμίνης και χαμηλής συγγένειας για την ξανθίνη, το μεταφορέα ουρακίλης AcS572 του *Acinetobacter calcoaceticus* (Botou *et al.*, 2018) και το μεταφορέα ουρακίλης AvDDG3 του *Aeromonas veronii* (Botou *et al.*, 2018). Στο πλαίσιο μιας εκτενούς μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας σχετικά με τους μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης (Botou *et al.*, 2018) διερευνήθηκε η φυλογενετική κατάταξη και κατανομή όλων των μεταφορέων που εμπίπτουν στην ομάδα αυτή στο σύνολο των Πρωτεοβακτηρίων και κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο όλων των ομολόγων ουρακίλης/θυμίνης (**Εικόνα 3.2**). Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση προκύπτει ότι τα ομόλογα της ομάδας αυτής διαφοροποιούνται σε δύο διακριτούς υποκλάδους. Ο πρώτος υποκλάδος (υποκλάδος UraA) περιλαμβάνει έναν κύριο φυλογενετικό κλάδο με όλα τα ομόλογα που σχετίζονται με το μεταφορέα ουρακίλης UraA και απαντώνται κυρίως στα Enterobacteriales (κλάδος U1), αλλά και έναν μικρότερο φυλογενετικό κλάδο, στον οποίο κατατάσσονται ομόλογα του UraA που ανήκουν σε στελέχη μη- εντεροβακτηρίων, αλλά και σε β-, δ- και ε-πρωτεοβακτήρια (κλάδος U2). Η δεύτερη φυλογενετική ομάδα (υποκλάδος RutG) περιλαμβάνει όλα τα ομόλογα του RutG τα οποία απαντώνται στα Enterobacteriales αλλά και σε ορισμένα γ- (Moraxellaceae), β- (Burkholderiales) και α-πρωτεοβακτήρια (Rhizobiales) (κλάδος R1) (Botou *et al.*, 2018). Με βάση τη φυλογένεση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης (Botou *et al.*, 2018), επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση ο κλάδος που αντιπροσωπεύεται από τους μεταφορείς RutG και AcS572, ο οποίος αναφέρεται ως κλάδος R1 (Botou *et al.*, 2018) και έγινε εξαγωγή της αντίστοιχης προγονικής αλληλουχίας που ονομάστηκε AncR1. Για την εκτίμηση της προγονικής αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).



Εικόνα 3.2. Φυλογενετική ανάλυση της ομάδας ομολόγων των μεταφορέων ουρακίλης /θυμίνης στα Πρωτεοβακτήρια. Φυλογενετικό δένδρογραμμα αντιπροσωπευτικών ομολόγων της ομάδας UraA (133 πρωτεϊνικές αλληλουχίες) από Πρωτεοβακτήρια, στο οποίο διακρίνονται οι κλάδοι U1, U2 και R1 στους οποίους ανήκουν οι γνωστοί μεταφορείς UraA και RutG της *E. coli*, καθώς και οι AcS572 του *A. calcoaceticus* και AvDDG3 του *A. veronii* ramnolica. Η ανάλυση (Botou et al., 2018) πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Maximum Likelihood με βάση το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton matrix-based (MEGA 7), ενώ η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Bootstrap (1000 replicates, διακλαδώσεις με bootstrap value <50% δεν εμφανίζονται). Περιλαμβάνονται όλα τα ομόλογα βακτηρίων που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG, εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά γένος. Η εικόνα αριστερά αποτελεί μέρος της δημοσίευσης Botou et al., 2018. Δεξιά σε μεγέθυνση παρουσιάζεται ο κλάδος R1 στον οποίο εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών και έγινε εξαγωγή της προγονικής αλληλουχίας AncR1.

Έχοντας διαθέσιμη την προγονική αλληλουχία AncR1, μήκους 437 αμινοξέων, πραγματοποιήσαμε, στη συνέχεια, πλήρη ανάλυση της στοίχισης της με αυτές των χαρακτηρισμένων μεταφορέων του κλάδου ουρακίλης/θυμίνης. Από την ανάλυση αυτή διαπιστώθηκε ότι η προγονική αλληλουχία AncR1 που έχει 78% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων με το μεταφορέα RutG και 73% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων με το μεταφορέα AcS572 διαφέρει από το μεταφορέα RutG σε μία μόνο θέση και σε 3 θέσεις από το μεταφορέα AcS572 (**Εικόνα 3.3**), οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές για τη λειτουργικότητα σύμφωνα με την ανάλυση μεταλλαξιγένεσης του XanQ (Karena *et al.*, 2015), αλλά και των UraA, RutG και AcS572 (Botou *et al.*, 2018). Δύο από αυτές τις θέσεις, οι 73 και 289 έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο και των τριών σύγχρονων μεταφορέων (Botou *et al.*, 2018). Η θέση 73 σύμφωνα με τον μηχανισμό μεταφοράς υποστρώματος που έχει προταθεί για τον μεταφορέα UraA (Lu *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2017), είναι μία θέση του ενεργού κέντρου που αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα μέσω του βενζολικού δακτυλίου της φαινυλομάδας, αλλά και μέσω δεσμού υδρογόνου από το αμιδικό άζωτο της κύριας αλυσίδας στη θέση αυτή και έχει συσχετιστεί με την εξειδίκευση για ουρακίλη (Botou *et al.*, 2018). Ο AncR1 διατηρεί την Phe73 (**Εικόνα 3.3**), η οποία είναι σχεδόν απόλυτα συντηρημένη σε όλα τα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 (Botou *et al.*, 2018) και διαφέρει μόνο σε μια μικρή ομάδα ομολόγων (ορθόλογα του RutG σε Enterobacteriales) που έχουν Ala. Από τα πειράματα μεταλλαξιγένεσης διαπιστώθηκε ότι το μετάλλαγμα F73A στον UraA αναγνωρίζει τη θυμίνη και μπορεί επίσης να τη μεταφέρει, σε αντίθεση με τον φυσικού τύπου UraA. Το αντίστοιχο μετάλλαγμα στον AcS572 (F87A) αναγνωρίζει τη θυμίνη, αλλά δεν τη μεταφέρει (Botou *et al.*, 2018). Η θέση αυτή έχει μελετηθεί και στο μεταφορέα RutG, το μετάλλαγμα A88F μεταφέρει τόσο την ουρακίλη και τη θυμίνη, αλλά όχι την ξανθίνη που επίσης είναι υπόστρωμα του RutG φυσικού τύπου (Botou *et al.*, 2018). Μια ακόμη θέση που έχει μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση είναι η θέση 289. Σε αυτή τη θέση ο AncR1 έχει Ala, όπως και ο μεταφορέας RutG. Το μετάλλαγμα στην αντίστοιχη θέση στο RutG (A308G) παρουσιάζει σημαντική ενεργότητα για την ουρακίλη και τη θυμίνη, ενώ δε μεταφέρει την ξανθίνη, παρόλο που την αναγνωρίζει. Επίσης, τα μεταλλάγματα G289A και G308A στον UraA και στον AcS572, αντίστοιχα, μεταφέρουν ουρακίλη και δε βρέθηκε να παρουσιάζουν διαφορά στο προφίλ της εξειδίκευσής τους σε σχέση με τους αντίστοιχους μεταφορείς φυσικού τύπου.

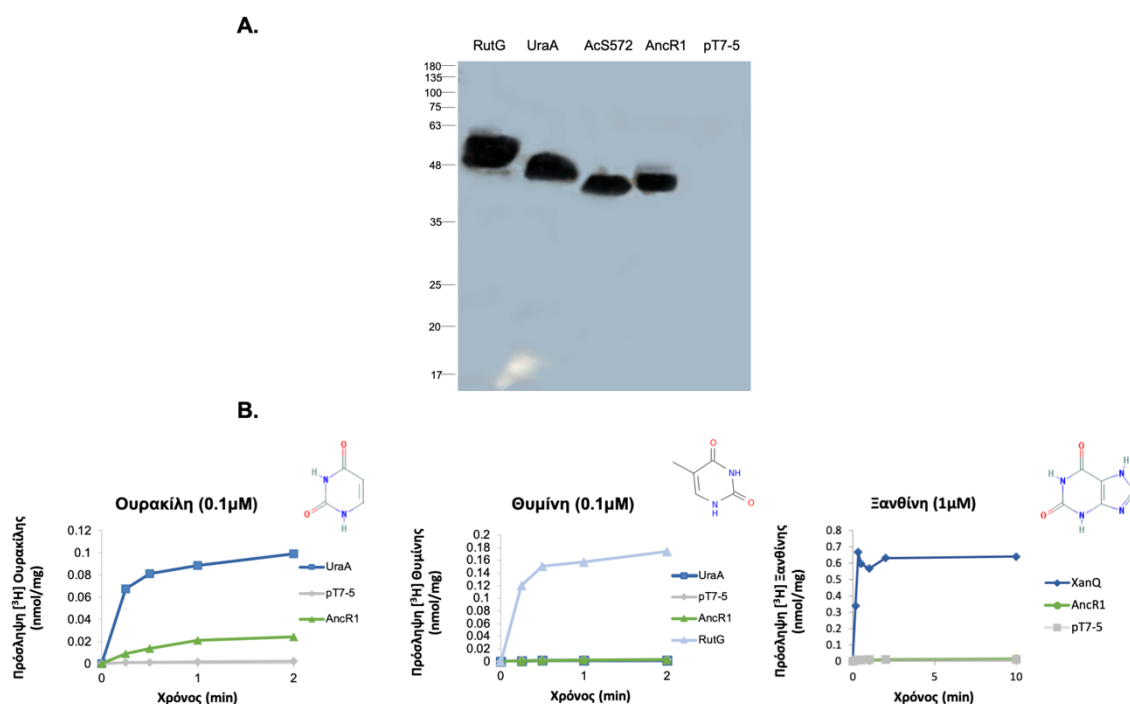


Εικόνα 3.3. Ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών του προγονικού μεταφορέα AncR1 και των χαρακτηρισμένων σύγχρονων μεταφορέων UraA, RutG και AcS572. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988). Κατάλοιπα που απαντώνται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (συντήρηση σε >90% των αλληλουχιών) υποδηλώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ θέσεις χαμηλής συντήρησης (>50%) υποδηλώνονται με μπλε χρώμα. Με γκρι φόντο σημειώνονται οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ της προγονικής αλληλουχίας AncR1 και χαρακτηρισμένων μεταφορέων του υποκλάδου R1 (Botou et al., 2018) σε δυνητικώς σημαντικές θέσεις αμινοξέων, οι οποίες έχουν αποκαλυφθεί βάσει της ανάλυσης μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα XanQ (Karena et al., 2015). Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν από το πρότυπο της δομής του UraA (Yu et al., 2017) επισημαίνονται πάνω από τις αντίστοιχες αλληλουχίες.

3.1.2 Ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας AncR1

Μετά την εξαγωγή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας AncR1 και την ανάλυση της στοίχισης της με αυτές των χαρακτηρισμένων σύγχρονων μεταφορέων UraA, RutG και AcS572, ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί για την προγονική πρωτεΐνη με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για βελτιστοποίηση της έκφρασης της στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli* (Παράρτημα 2, Εικόνα Π3). Η αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί για το προγονικό γονίδιο παρήχθη με γονιδιακή σύνθεση και μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5, που περιέχει την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-acceptor domain, για σήμανση στο C-

τελικό άκρο, βιοτινυλίωση *in vivo* και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με western έναντι αβιδίνης (Karatza and Frillingos, 2005). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε με μετασχηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριό μας για δοκιμασίες μεταφοράς ξανθίνης (T184), ουρικού οξέος (T184), αδενίνης (JW3692), υποξανθίνης, γουανίνης (JW4025), ουρακίλης, θυμίνης (JW2482) και κυτοσίνης (JW0327) (Papakostas *et al.*, 2013; Botou *et al.*, 2018) και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά western, η οποία υπέδειξε ότι το προϊόν του προγονικού γονιδίου *AncR1* εμφανίζει ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη της *E. coli* (Εικόνα 3.4 Α). Ακολούθησαν δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος, αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης, ουρακίλης, θυμίνης και κυτοσίνης (Εικόνα 3.4 Β). Από το σύνολο των πουρινών-πυριμιδινών που ελέγχθησαν, η προγονική αλληλουχία *AncR1* εμφάνισε ενεργότητα μόνο για την ουρακίλη (Εικόνα 3.4 Β, Πίνακας 3.1).



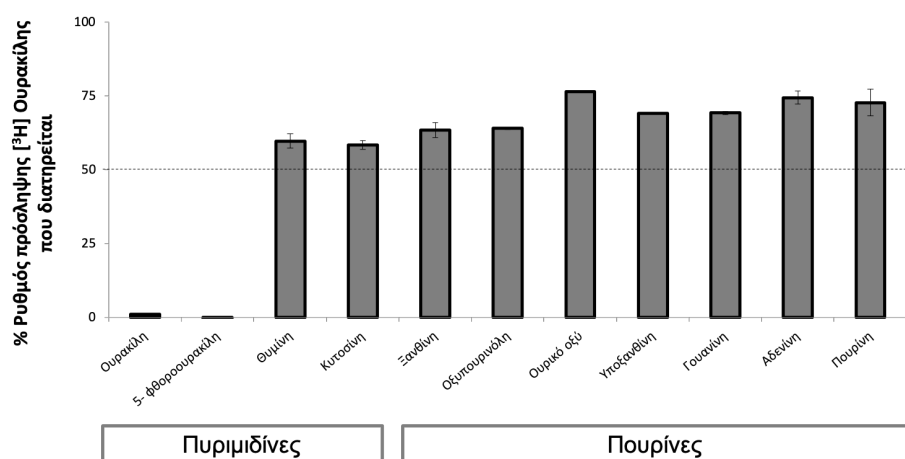
Εικόνα 3.4. Ανάλυση των επιπέδων στη μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς πουρινών/πυριμιδινών του προγονικού μεταφορέα *AncR1* μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. (α) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραίωση 1:50,000 και οπτικοποίηση του

προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Κλάσματα μεμβρανών από *E. coli* K-12 που εκφράζουν εξωχρωμοσωμικά τις περμεάσες UraA, RutG και AcS572 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (β) *E. coli* JW2482 ή T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ουρακίλης (0.1μM) στους 25°C για χρόνους 15sec-2min, [^3H] θυμίνης (0.1μM) στους 25°C για χρόνους 15sec-2min και [^3H] ξανθίνης (1μM) στους 25°C για χρόνους 10sec-10min. [Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί μεταφορείς ουρακίλης UraA (Botou et al., 2018), ουρακίλης, θυμίνης και ξανθίνης RutG (Botou et al., 2018) και ξανθίνης XanQ (Karatza and Frillingos, 2005)]. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Περμεάση	K_M (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_M (mL min ⁻¹ mg ⁻¹)
UraA	0.21±0.04	3±0.1	14.3
RutG	0.56±0.08	13.2±0.5	23.6
AcS572	0.85± 0.09	7.1± 0.2	8.4
AncR1	2.3±0.5	0.35±0.02	0.15

Πίνακας 3.1. Τιμές K_M και V_{max} του AncR1 για την ουρακίλη. Κύτταρα *E. coli* JW2482 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ουρακίλης (0.04-40μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (JW2482 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_M και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα. [Οι τιμές που δίνονται για τους γνωστούς μεταφορείς UraA RutG και AcS572 προέρχονται από τη δημοσίευση του εργαστηρίου μας (Botou et al., 2018)].

Για να διερευνηθεί το προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncR1 πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ουρακίλης με μια σειρά αναλόγων πουρινών-πυριμιδινών από τα οποία προέκυψε ότι η προγονική αλληλουχία AncR1 αναγνωρίζει την 5-φθοροουρακίλη (K_i 5.7μM), έχοντας παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης με τους σύγχρονους μεταφορείς AcS572 και UraA (Εικόνα 3.5, Πίνακας 3.2). Αντίθετα ο μεταφορέας RutG εμφανίζει ένα πιο διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης, καθώς αναγνωρίζει τη θυμίνη, την ξανθίνη και την οξυπουρινόλη, εκτός από την 5-φθοροουρακίλη.



Εικόνα 3.5. Προφίλ εξειδίκευσης του *AncR1*. Κύτταρα *E. coli* JW2482 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση της περμεάσης *AncR1* από πλασμίδια pT7-5/-BAD υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης (0.1μM, 25°C) μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες μετρήθηκαν στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (JW2482 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Περμεάση	<i>K_i</i> (μM)			
	5-FU	Θυμίνη	Ξανθίνη	Οξυπουρινόλη
UraA	1.8±0.2	ND	ND	ND
RutG	0.7±0.1	1.6±0.1	55.7± 12.9	34.1± 3.8
AcS572	2.9±0.3	ND	ND	ND
AncR1	5.7±0.2	ND	ND	ND

Πίνακας 3.2. Τιμές *K_i* για τον προγονικού μεταφορέα *AncR1* και τους σύγχρονους μεταφορείς *UraA*, *RutG* και *AcS572* ως προς τον ανταγωνισμό [³H] ουρακίλης με 5-φθοροουρακίλη, θυμίνη, ξανθίνη και οξυπουρινόλη. Κύτταρα *E. coli* JW2482 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης (0.1μM) στους 25°C, μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* JW2482 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές *IC*₅₀ (συγκεντρώσεις μη σημασμένου προσδέτη που προκαλούν 50% αναστολή του υποστρώματος) εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές *K_i* υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου *L* είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H] ουρακίλης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα.

με τυπικές αποκλίσεις <20%. (Οι τιμές που δίνονται για τους γνωστούς μεταφορείς *UraA* *RutG* και *AcS572* προέρχονται από τη δημοσίευση Botou *et al.*, 2018).

Συνολικά για τον κλάδο των ομόλογων μεταφορέων ουρακίλης/ θυμίνης πραγματοποιήθηκε ανασύσταση του κοινού προγόνου του υποκλάδου που αντιπροσωπεύεται από τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης *RutG* της *E. coli* και ουρακίλης *AcS572* του *A. calcoaceticus*. Από τη λειτουργική ανάλυση του προγονικού μεταφορέα διαπιστώθηκε πως εμφανίζει ένα αυστηρό προφίλ εξειδίκευσης για την ουρακίλη, υποδεικνύοντας μια μακρά εξελικτική παρουσία της εξειδίκευσης για την ουρακίλη και μια πρόσφατη απόκλιση για επιπλέον εξειδίκευση για τη θυμίνη που εμφανίζεται μόνο στα *Enterobacteriales*.

3.2 Κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος

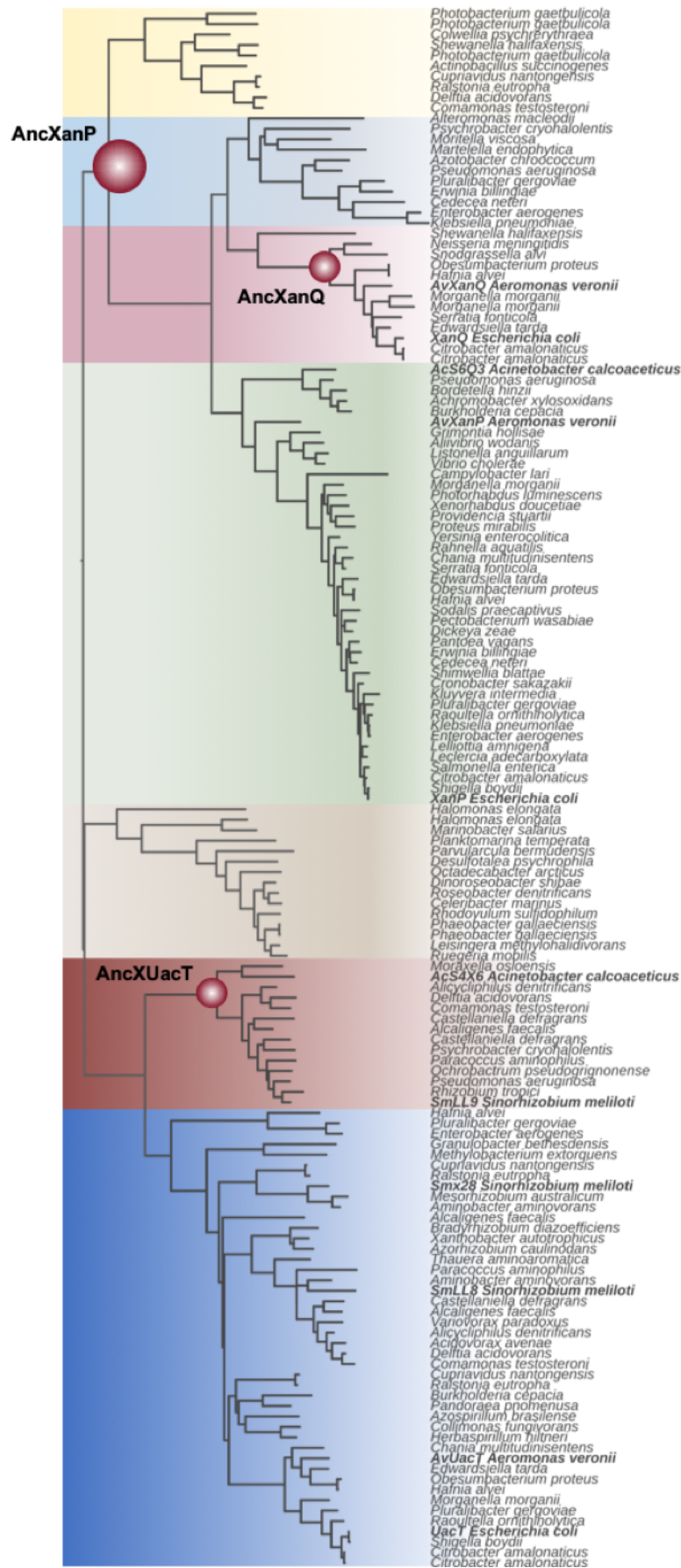
Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος της οικογένειας NAT/NCS2 αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος *UapA* του *Aspergillus nidulans* που έχει μελετηθεί διεξοδικά (Diallinas, 2016) και έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία σε υψηλή αναλυτική ευκρίνεια (Alguel *et al.*, 2016), καθώς και τους εξής λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς από Βακτήρια: το μεταφορέα ξανθίνης *XanQ* της *E. coli* που έχει μελετηθεί διεξοδικά στο εργαστήριο μας με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στο μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας του (Karena *et al.*, 2015; Karena and Frillingos, 2011; Karena and Frillingos, 2009; Karatza and Frillingos, 2005), το μεταφορέα ξανθίνης *XanP* της *E. coli* που ανιχνεύεται με πολύ χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης στη μεμβράνη και παρουσιάζει ελάχιστη ενεργότητα (Karatza and Frillingos, 2005) και το μεταφορέα *UacT* της *E. coli* που είναι εξειδικευμένος κυρίως για τη μεταφορά ουρικού οξέος (Papakostas and Frillingos, 2012). Επιπλέον, σε αυτό τον κλάδο κατατάσσονται: ο διπλής εξειδίκευσης μεταφορέας ξανθίνης/ ουρικού οξέος *SmXUacT* (*SmLL9*) και οι μεταφορείς ουρικού οξέος *SmUacT1* (*SmLL8*) και *SmUacT2* (*SmX28*) από το ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν από το εργαστήριο μας σε συνεργασία με το εργαστήριο του Ε. Φλεμετάκη στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Botou *et al.*, 2020), καθώς και τρεις μεταφορείς από παθογόνα βακτήρια, που χαρακτηρίστηκαν πρόσφατα στο πλαίσιο της Διατριβής της Π. Λάζου (2021). Πρόκειται για τα ορθόλογα των *XanQ* και *XanP* από την *Aeromonas veronii* (το ορθόλογο του *XanQ* εμφανίζει υψηλά επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης, όπως και ο *XanQ*, ενώ το ορθόλογο του *XanP* δεν εκφράζεται

στη μεμβράνη) και το ορθόλογο του XanP από το *Acinetobacter calcoaceticus* που εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης, όπως και ο μεταφορέας XanP (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021).

Για τη φυλογενετική ανάλυση των ομολόγων που εμπίπτουν στον κλάδο των περμεασών ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος της οικογένειας NAT/NCS2 πραγματοποιήθηκε, αρχικά, αναζήτηση στελεχών σε όλα τα φύλα των Βακτηρίων, Αρχαία και Ευκάρυα των οποίων τα γονιδιώματα έχουν αλληλουχηθεί πλήρως στη βάση δεδομένων JGI/IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Chen *et al.*, 2013). Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση (**Παράρτημα 1, Εικόνα Π1**) προέκυψε ότι όλα τα ομόλογα αυτού του κλάδου προέρχονται στην πλειοψηφία από τα Βακτήρια: κυρίως από τα φύλα Proteobacteria, Firmicutes (κλάσεις Bacilli και Clostridia), Actinobacteria και Bacteroidetes. Εκτός από τα Βακτήρια, ομόλογα αυτού του κλάδου απαντώνται επίσης σε Αρχαία και Μύκητες.

Μετά την ανωτέρω ανάλυση εστιαστήκαμε στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, καθώς σε αυτή τη φυλογενετική ομάδα ανήκουν όλα τα χαρακτηρισμένα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2, συμπεριλαμβανομένου και του μεταφορέα XanQ της *E. coli*, που έχει μελετηθεί διεξοδικά με μεταλλαξιγένεση (Karena *et al.*, 2015). Τα ομόλογα των Πρωτεοβακτηρίων υποβλήθηκαν σε περαιτέρω συστηματική φυλογενετική ανάλυση (**Παράρτημα 1, Εικόνα Π2 και Εικόνα 3.6**), από την οποία προκύπτει ότι διαφοροποιούνται σε δύο διακριτές υποομάδες ομολόγων: μία που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης και μία που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος (**Εικόνα 3.6**). Ο υποκλάδος των μεταφορέων ξανθίνης χωρίζεται περαιτέρω σε τέσσερις υποομάδες. Η πρώτη περιέχει κυρίως ομόλογα από β- και γ-πρωτεοβακτήρια (τάξη Vibrionales), η δεύτερη περιλαμβάνει Enterobacteriales και άλλες τάξεις γ-πρωτεοβακτηρίων, η τρίτη αποτελείται από δύο ομόλογα που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια (τάξη Neisseriales) και ομόλογα γ-πρωτεοβακτηρίων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι γνωστοί μεταφορείς XanQ των *E. coli* και *A. veronii* που είναι ειδικοί και υψηλής συγγένειας μεταφορείς ξανθίνης, και η τελευταία υποομάδα που αποτελείται από τους μεταφορείς XanP και περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς XanP των *E. coli*, *A. veronii* και *A. calcoaceticus*. Ο υποκλάδος των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού χωρίζεται περαιτέρω σε τρεις υποομάδες. Η πρώτη περιέχει ομόλογα κυρίως από α-πρωτεοβακτήρια, ένα ομόλογο από δ-πρωτεοβακτήρια και μερικά ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια (τάξη Oceanospirillales), η δεύτερη περιλαμβάνει ομόλογα από α-, β- και γ-πρωτεοβακτήρια, στην οποία συμπεριλαμβάνονται και οι λειτουργικά

χαρακτηρισμένοι μεταφορείς AcS4X6 από το *A. calcoaceticus* και SmXUacT (SmLL9) από το *Sinorhizobium meliloti* που είναι μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού οξέος και η τρίτη υποομάδα στην οποία περιλαμβάνονται οι μεταφορείς ουρικού οξέος SmUacT1 (SmLL8) και SmUacT2 (SmX28) από το *S. meliloti*, καθώς και οι μεταφορείς UacT και AnUacT των *E. coli* και *A. veronii*, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.6. Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 150 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το Φύλο των Πρωτεοβακτηρίων που ανήκουν στον κλάδο ξανθίνης/ουρικού (C1_Xanthine-Uric Acid; Chaliotis et al., 2018). Φυλογενετικό δενδρόγραμμα μιας σειράς 150 ομολόγων που περιλαμβάνονται σε αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα των Πρωτεοβακτηρίων (εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά γένος, κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG). Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση προκύπτει ότι τα ομόλογα αυτής της ομάδας διαφοροποιούνται σε επτά διακριτές υποομάδες ομολόγων κάθε μία από τις οποίες επισημαίνεται με διαφορετικό χρώμα. Με ροζ σημειώνεται ο κλάδος που αντιπροσωπεύεται από τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης XanQ (*E. coli*) και AvXanQ (*Aeromonas veronii*). Με πράσινο σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ουρικού οξέος XanP (*E. coli*), AvXanP (*Aeromonas veronii*) και AcS6Q3 (*Acinetobacter calcoaceticus*). Με κίτρινο σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει ομόλογα κυρίως από β-πρωτεοβακτήρια και κάποια ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια (τάξη Vibrionales) και με γαλάζιο ο κλάδος που περιλαμβάνει ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια. Με κόκκινο σημειώνεται ο κλάδος που αντιπροσωπεύεται από οι λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης/ ουρικού οξέος SmXUacT (SmLL9) (*Sinorhizobium meliloti*) και AcS4X6 (*Acinetobacter calcoaceticus*). Με μπλε σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ουρικού οξέος SmUacT1 (SmLL8) (*S. meliloti*), SmUacT2 (SmX28) (*S. meliloti*), AvUacT (*Aeromonas veronii*) και UacT (*E. coli*) και με καφέ ο κλάδος που περιλαμβάνει ομόλογα, κυρίως από α-πρωτεοβακτήρια και κάποια ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια (τάξη Oceanospirillales). Στο σχήμα σημειώνονται οι κλάδοι για τους οποίους πραγματοποιήθηκε η ανάλυση προγονικών αλληλουχιών (κόκκινες σφαίρες). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Maximum Likelihood με βάση το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton matrix-based (MEGA 7). Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κλάδους υπολογίστηκαν με την μέθοδο bootstrap (1000 επαναλήψεις). Διακλαδώσεις με bootstrap value <50% δεν εμφανίζονται.

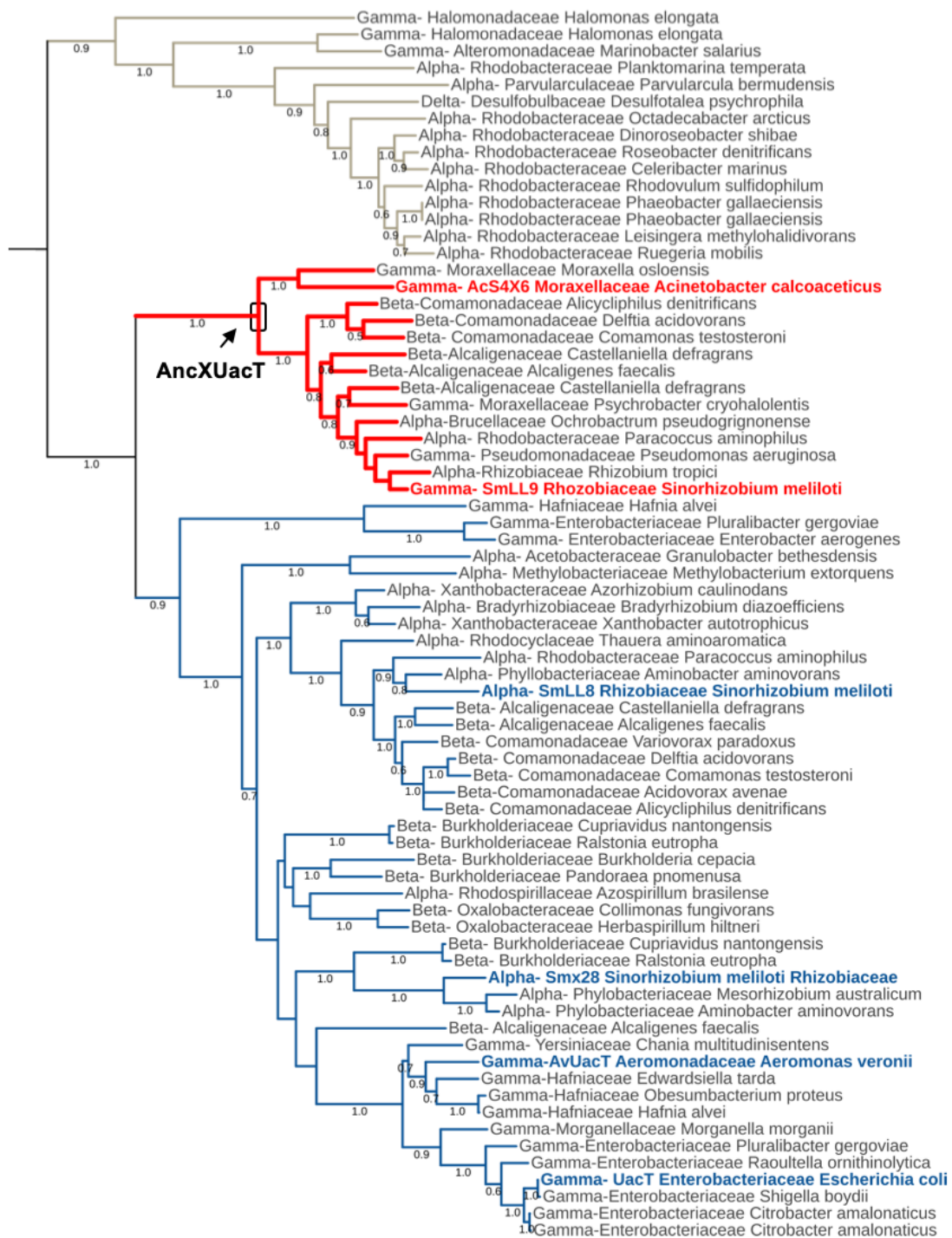
3.2.1 Υποκλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης-ουρικού οξέος

3.2.1.1 Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικής αλληλουχίας στον υποκλάδο των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης-ουρικού οξέος

Ο υποκλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού SmXUacT (SmLL9) του *Sinorhizobium meliloti*, ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς στο εργαστήριο μας (Botou et al., 2020), καθώς και τους εξής λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς: τον μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού AcS4X6 από το *A. calcoaceticus* (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021) και τους μεταφορείς ουρικού οξέος SmUacT1 (SmLL8) και SmUacT2 (SmX28) από το *S. meliloti* (Botou et al., 2020), UacT από την *E. coli* (Papakostas and Frillingos, 2012) και AvUacT από την *Aeromonas veronii* (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021). Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τους μεταφορείς αυτής της ομάδας, όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (Εικόνα 3.6) και όπως φαίνεται λεπτομερέστερα στην Εικόνα 3.7, προκύπτει ότι

τα ομόλογά της ομάδας αυτής διαφοροποιούνται σε τρεις διακριτούς υποκλάδους. Ο πρώτος περιλαμβάνει ομόλογα κυρίως από α- πρωτεοβακτήρια, ένα ομόλογο από δ- πρωτεοβακτήρια και μερικά ομόλογα από γ- πρωτεοβακτήρια (τάξη Oceanospirillales), ο δεύτερος περιέχει ομόλογα από α-, β- και γ- πρωτεοβακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικά χαρακτηρισμένων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος SmXUacT (SmLL9) και AcS4X6 και ο τρίτος υποκλάδος αποτελείται από τους μεταφορείς ουρικού οξέος SmUacT1 (SmLL8), SmUacT2 (SmX28), UacT και AnUacT.

Βασιζόμενοι φυλογένεση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος εστιαστήκαμε για περαιτέρω ανάλυση και εφαρμογή της μεθόδου της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών στον υποκλάδο που αντιπροσωπεύεται από τους μεταφορείς SmXUacT και AcS4X6 (**Εικόνα 3.7**, επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα) και πραγματοποιήσαμε εξαγωγή της αντίστοιχης προγονικής αλληλουχίας που ονομάστηκε AncXUacT. Για την εκτίμηση της προγονικής αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

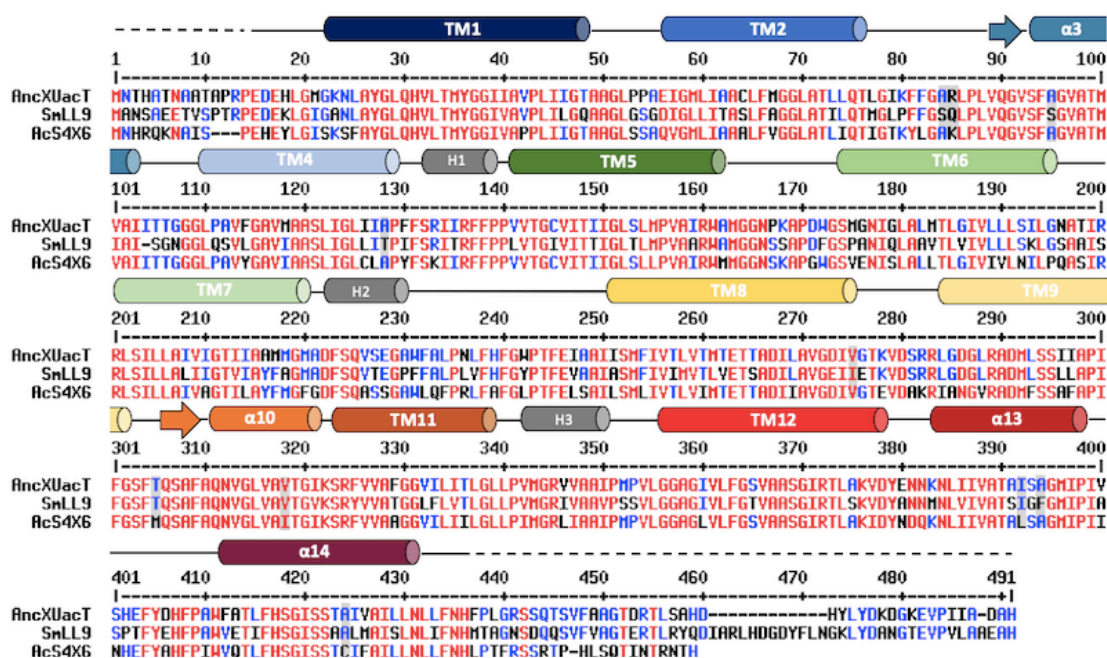


Εικόνα 3.7. Φυλογενετική ανάλυση του κλάδου ξανθίνης-ουρικού οξέος της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2 στα Πρωτεοβακτήρια. Φυλογενετικό δένδρογραμμα μιας σειράς 78 ομολόγων που περιλαμβάνονται σε αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα των Πρωτεοβακτηρίων (εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά γένος, κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG). Με κόκκινο σημειώνεται ο κλάδος που αντιπροσωπεύεται από οι λειτουργικούς γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης/ ουρικού οξέος SmXUacT (SmLL9) (Sinorhizobium meliloti) και AcS4X6 (Acinetobacter calcoaceticus) από τον οποίο εξήχθη η ακολουθία του προγονικού μεταφορέα

AncXUacT. Με μπλε σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ουρικού οξέος *SmUacT1* (*SmLL8*) (*S. meliloti*), *SmUacT2* (*SmX28*) (*S. meliloti*), *AvUacT* (*A. veronii*) και *UacT* (*E. coli*). Με καφέ σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει ομόλογα κυρίως από α-πρωτεοβακτήρια και κάποια ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια (τάξη *Oceanospirillales*). Κανένα γνωστό ομόλογο δεν περιλαμβάνεται σε αυτό τον κλάδο. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο *Maximum Likelihood* με βάση το μοντέλο *Jones-Taylor-Thornton matrix-based* (MEGA 7). Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κλάδους υπολογίστηκαν με την μέθοδο *bootstrap* (1000 επαναλήψεις). Διακλαδώσεις με *bootstrap value* <50% δεν εμφανίζονται.

Μετά την εξαγωγή της προγονικής αλληλουχίας, μήκους 478 αμινοξέων πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση της με τις αλληλουχίες των μεταφορέων *SmXUacT* (*SmLL9*) και *AcS4X6*. Όπως προέκυψε από την ανάλυση αυτή (Εικόνα 3.8), η προγονική αλληλουχία *AncXUacT* διαφέρει από το μεταφορέα *SmXUacT* (με τον οποίο έχει 74% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων) σε 6 θέσεις αμινοξέων και σε 4 θέσεις από το μεταφορέα *AcS4X6* (με τον οποίο έχει 71% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων), οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές για τη λειτουργικότητα σύμφωνα με την ανάλυση μεταλλαξιγένεσης του *XanQ* (Karena *et al.*, 2015). Αναφορικά με τις διαφορές του ως προς το μεταφορέα *SmXUacT* πρόκειται για τις θέσεις 84, 85, 95, 132, 284 και 406 (αρίθμηση σύμφωνα με το μεταφορέα *XanQ*), ενώ οι διαφορές του από το μεταφορέα *AcS4X6* εντοπίζονται στις θέσεις 318, 334, 404 και 436. Οι θέσεις αυτές έχουν μελετηθεί με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο μεταφορέα *XanQ* (Karena *et al.*, 2015). Από την ανάλυση αυτή έχει αποδειχθεί ότι οι θέσεις 85, 404, 406 και 436 υπόκεινται σε περιορισμούς ως προς τις αντικαταστάσεις της πλευρικής ομάδας. Οι θέσεις 84, 132, 284 και 334 παρουσιάζουν ευαισθησία στο αλκυλιωτικό αντιδραστήριο NEM. Η θέση 95 βρίσκεται περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος και έτσι μπορεί να συνεισφέρει στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων *Asn93*, *Glu272* και *Asp276*, ενώ η θέση 318 είναι σημαντική για την έκφραση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Δύο από τις προαναφερθείσες θέσεις, οι 284 και 318, έχουν μελετηθεί και στο υπόβαθρο του *SmXUacT* (Botou *et al.*, 2020). Στη θέση 284 ο μεταφορέας *SmXUacT* φέρει Ile και πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση σε Cys και Ser (το αντίστοιχο αμινοξύ του *XanQ*) και στη θέση 318 φέρει Thr και πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση σε Cys. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης οι θέσεις αυτές δε φαίνεται να επηρεάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα. Από την άλλη πλευρά, η προγονική αλληλουχία *AncXUacT* διατηρεί, όπως προκύπτει από την ανάλυση στοίχισης (Εικόνα 3.8), τα ίδια αμινοξέα σε σημαντικές θέσεις με αυτά που φέρουν οι σημερινοί μεταφορείς. Μια από τις θέσεις αυτές είναι και Ser-93 (αρίθμηση και αμινοξύ με βάση τον

SmXUacT). Η Ser-93 (TM3) φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στον SmXUacT, με το μετάλλαγμα S93N να εμφανίζει σχετικά μικρή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης και επίσης κατά πολύ μειωμένη συγγένεια για το ουρικό οξύ (8-οξυ-ξανθίνη), αλλά και για τα ανάλογα 8-μεθυλοξανθίνη και 7-μεθυλοξανθίνη (Botou *et al.*, 2020). Επομένως, η Ser-93 φαίνεται να σχετίζεται με την εξασφάλιση της διπλής εξειδίκευσης για την ξανθίνη και το ουρικό οξύ, όπως έχει φανεί για τα πολικά κατάλοιπα στην ίδια θέση σε άλλες ομόλογες περμεάσες, XanQ (Asn-93), UacT (Thr-100), UapA (Ser-154), αν και σε διαφορετικό βαθμό για κάθε μία (Frillingos 2012, Papakostas and Frillingos 2012, Amillis *et al.*, 2011). Ο ρόλος της Ser/Asn- 93 που είναι σημαντικός για την εξειδίκευση των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος εξετάζεται παρακάτω (βλ. Ενότητα. 3.2.2.1).

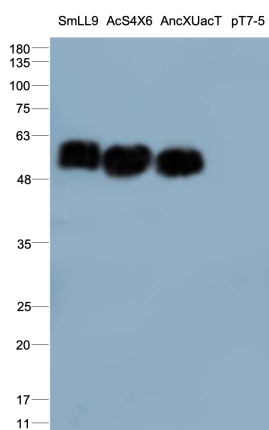


Εικόνα 3.8. Ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών του προγονικού μεταφορέα ApcXUacT και των χαρακτηρισμένων σύγχρονων μεταφορέων SmXUacT (SmLL9) και AcS4X6. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988). Κατάλοιπα που απαντώνται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (συντήρηση σε >90% των αλληλουχιών) υποδηλώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ με μπλε υποδεικνύονται θέσεις χαμηλής συντήρησης (>50%). Με γκρι σκίαση επισημαίνονται οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ της προγονικής αλληλουχίας ApcXUacT και χαρακτηρισμένων μεταφορέων SmXUacT και AcS4X6 σε δυννητικώς σημαντικές θέσεις αμινοξέων, οι οποίες έχουν αποκαλυφθεί βάσει της ανάλυσης μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα XanQ (Karena *et al.*, 2015). Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν με βάση το πρότυπο της δομής του UapA (Alguet *et al.*, 2016), επισημαίνονται πάνω από τις αντίστοιχες αλληλουχίες.

3.2.1.2 Ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας AncXUacT

Μετά την εξαγωγή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, AncXUacT, και τη σύγκριση αυτής με τις αλληλουχίες των σύγχρονων χαρακτηρισμένων μεταφορέων SmXUacT και AcS4X6 ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί για την προγονική πρωτεΐνη με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για βελτιστοποίηση της έκφρασης της στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli* (Παράρτημα 2, Εικόνα Π4). Η αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί για το προγονικό γονίδιο παρήχθη με γονιδιακή σύνθεση και μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5, που περιέχει την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-acceptor domain, για σήμανση στο C-τελικό άκρο, βιοτινυλίωση in vivo και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με western αβιδίνης (Karatza and Frillingos, 2005). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε με μετασχηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* και ακολούθησε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του.

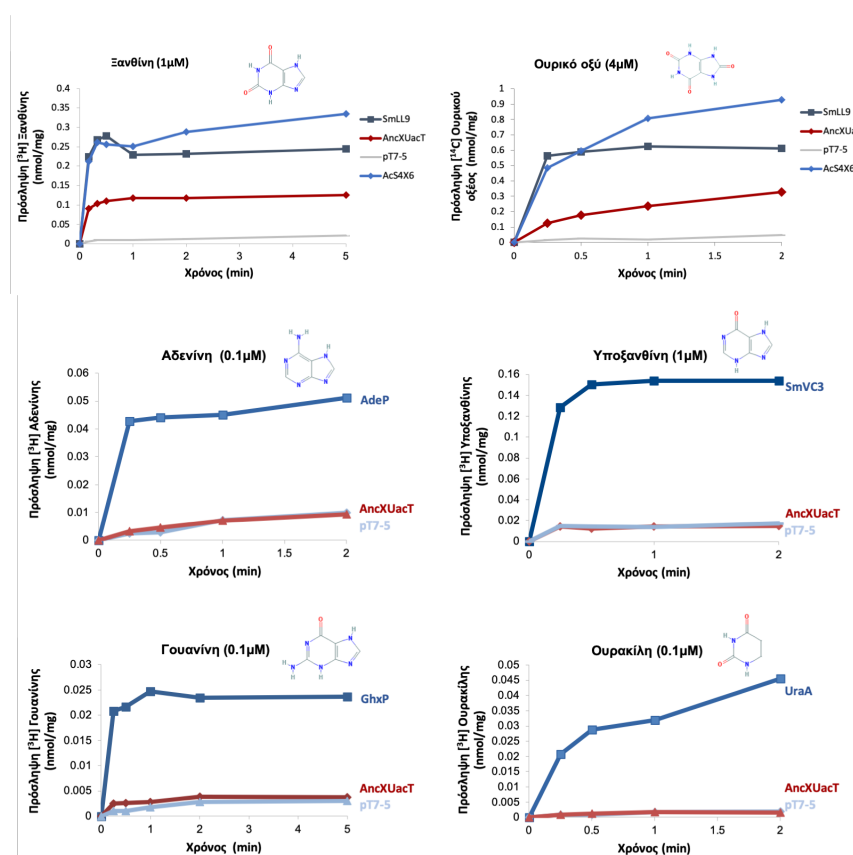
Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά western, η οποία υπέδειξε ότι το προϊόν του προγονικού γονιδίου *AncXUacT* εκφράζεται στη μεμβράνη της *E. coli* σε ικανοποιητικά επίπεδα, συγκρίσιμα με αυτά των σύγχρονων μεταφορέων του κλάδου SmXUacT και AcS4X6 (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9. Ανάλυση των επιπέδων στη μεμβράνη του προγονικού μεταφορέα *AncXUacT* μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραίωση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Κλάσματα μεμβρανών από *E. coli* K-12 που εκφράζουν εξωχρωμοσωμικά τις

περμεάσες *SmXUacT* (*SmLL9*) και *AcS4X6* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pT7-5/BAD*, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (*Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range*).

Αφού ελέγχθηκε η έκφραση της προγονικής αλληλουχίας *AncXUacT*, ακολούθησαν δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος, αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης, και ουρακίλης (**Εικόνα 3.10**). Από το σύνολο των πιθανών υποστρωμάτων που εξετάστηκαν, η προγονική αλληλουχία *AncXUacT* εμφάνισε ενεργότητα τόσο για την ξανθίνη όσο και για το ουρικό οξύ (**Εικόνα 3.10, Πίνακας 3.3**), όπως και οι σύγχρονοι μεταφορείς *SmXUacT* και *AcS4X6*. Επιπλέον, όπως διαπιστώθηκε από την κινητική ανάλυση (**Πίνακας 3.3**), ο *AncXUacT* παρουσιάζει υψηλή συγγένεια τόσο για την ξανθίνη όσο και για το ουρικό οξύ (K_m 7.7 και 36.5, αντίστοιχα), αλλά μειωμένη ικανότητα μεταφοράς και για τα δυο υποστρώματα συγκριτικά με τους σύγχρονους μεταφορείς (V_{max}/K_M 195 και 123 για την ξανθίνη και το ουρικό οξύ, αντίστοιχα).



Εικόνα 3.10. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς πουρινών/πυριμιδινών του προγονικού μεταφορέα *AncXUacT*. *E. coli* T184 (για την πρόσληψη ξανθίνης και ουρικού οξέος), JW3692 (για την πρόσληψη αδενίνης και υποξανθίνης), JW4025 (για την πρόσληψη γουανίνης) και JW2482 (για την πρόσληψη ουρακίλης) που εκφράζουν

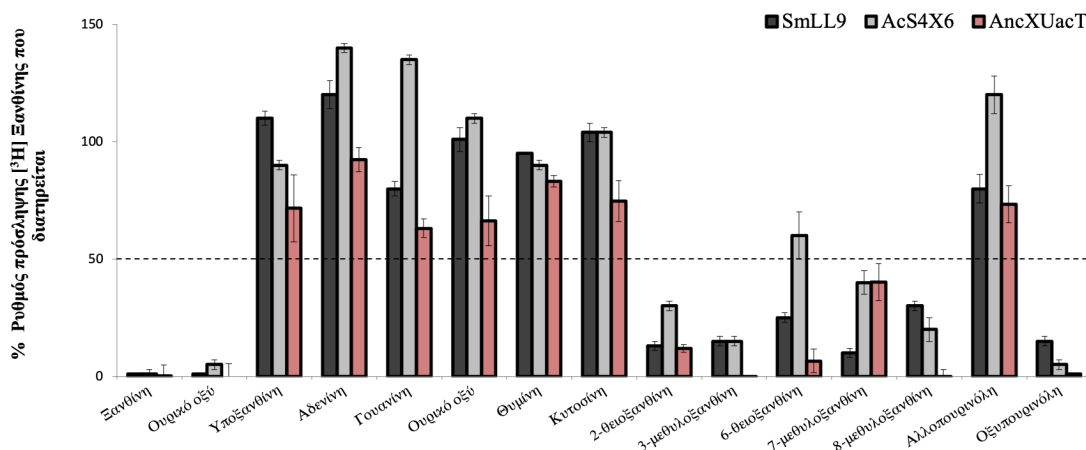
τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM), [^{14}C] ουρικού οξέος (4μM), [^3H] αδενίνης (0,1μM), [^3H] υποξανθίνη (1μM), [^3H] γουανίνης (0,1μM) και [^3H] ουρακίλης (0,1μM) στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. [Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί μεταφορείς ξανθίνης *XanQ* (Karatzá and Frillingos, 2005), ξανθίνης/ ουρικού οξέος *SmXUacT* (*SmLL9*) (Botou et al., 2020), αδενίνης *AdeP* (Papakostas et al., 2013), υποξανθίνης/γουανίνης/αδενίνης *SmAGHxT* (*SmVC3*) (Botou et al., 2020), γουανίνης/ υποξανθίνης *GhxP* (Papakostas et al., 2013) και ουρακίλης *UraA* (Botou et al., 2018)].

Περμεάση	Υπόστρωμα	K_M (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max} / K_M (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)
SmXUacT	Ξανθίνη	3.3±0.9	3.9±0.3	1,182
	Ουρικό οξύ	27.3±6.9	13.3±0.9	487
AcS4X6	Ξανθίνη	22.9 (±3.6)	31.7 (±2.3)	1,384
	Ουρικό οξύ	32.8 (±3.7)	31.4 (±1.4)	826
AncXUacT	Ξανθίνη	7.7±1.4	1.5±0.1	195
	Ουρικό οξύ	36.5±2.9	4.1±1	123

Πίνακας 3.3. Τιμές K_M και V_{max} του *AncXUacT* για την ξανθίνη και το ουρικό οξύ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [^{14}C] ουρικού οξέος (1-400 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 10 και 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_M και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.. (Οι αντίστοιχες τιμές K_M και V_{max} του μεταφορέα *SmXUacT* προέρχονται από την πρόσφατη δημοσίευση του εργαστηρίου μας Botou et al., 2020 και του *AcS4X6* από τη Διδακτορική Διατριβή της Λάζου Π., 2021).

Για να διερευνηθεί το προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα *AncXUacT* πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης με μια σειρά αναλόγων πουρινών (Εικόνα 3.11). Παράλληλα, για τα ανάλογα τα οποία φάνηκε να αναγνωρίζονται από τον *AncXUacT* σε σημαντικό βαθμό (αναστολή ενεργότητας πάνω από 50% από τον πιθανό προσδέτη σε 1000x μοριακή περίσσεια έναντι ξανθίνης), ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1μM έως 1mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} και στην συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i (Πίνακας 3.4). Από τα παραπάνω πειράματα διαπιστώθηκε ότι η προγονική αλληλουχία

AncXUacT αναγνωρίζει το ουρικό οξύ (K_i 20,8 μ M), τη 2-θειοξανθίνη (K_i 97,2 μ M), την 3-μεθυλοξανθίνη (K_i 77,6 μ M), την 6-θειοξανθίνη (K_i 69,1 μ M), την 7-μεθυλοξανθίνη (K_i 189,6 μ M), την 8-μεθυλοξανθίνη (K_i 45,2 μ M) και την οξυπουρινόλη (K_i 79,5 μ M), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ του AncXUacT και των σύγχρονων μεταφορέων του υποκλάδου ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος (SmXUacT και AcS4X6) (Εικόνα 3.11, Πίνακας 3.4).



Εικόνα 3.11. Προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncXUacT συγκριτικά με τους σύγχρονους μεταφορείς SmXUacT (SmLL9) και AcS4X6. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H]ξανθίνης (1 μ M, 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Ανταγωνιστής	Κ _i (μM)		
	SmXUacT	AcS4X6	AncXUacT
Ουρικό οξύ	12.8(±3.2)	1.0 (±0.2)	3.9±0.3
2-Θειοξανθίνη	77.8(±15.3)	44.8 (±4.2)	97.2±4.5
3-Μεθυλοξανθίνη	22.3(±4.4)	61.4 (±7.4)	77.6±2.7
6-Θειοξανθίνη	219.8(±9.2)	106.9 (±18.5)	69.1±1.3
7-Μεθυλοξανθίνη	114.8(±25.4)	148.2 (±29.8)	189.6±12.3
8-Μεθυλοξανθίνη	164.5(±23.0)	21.9 (±3.8)	45.2±2.0
Οξυπουρινόλη	34.1(±3.2)	50.5 (±1.9)	79.5±4.1

Πίνακας 3.4. Τιμές K_i του προγονικού μεταφορέα *AncXUacT* συγκριτικά με των σύγχρονων μεταφορέων *SmXUacT* και *AcS4X6* ως προς τον ανταγωνισμό [3H] ξανθίνης με τους αντίστοιχους μη σημασμένους προσδέτες. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3H] ξανθίνης (1 μ M) στους 25°C, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1 μ M-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [3H] ξανθίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%. (Οι τιμές που δίνονται για τους γνωστούς μεταφορείς *SmXUacT* και *AcS4X6* προέρχονται από τη δημοσίευση Botou et al., 2020 και τη Διδακτορική Διατριβή της Λάζου Π., 2021, αντίστοιχα).

3.2.2 Υποκλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης

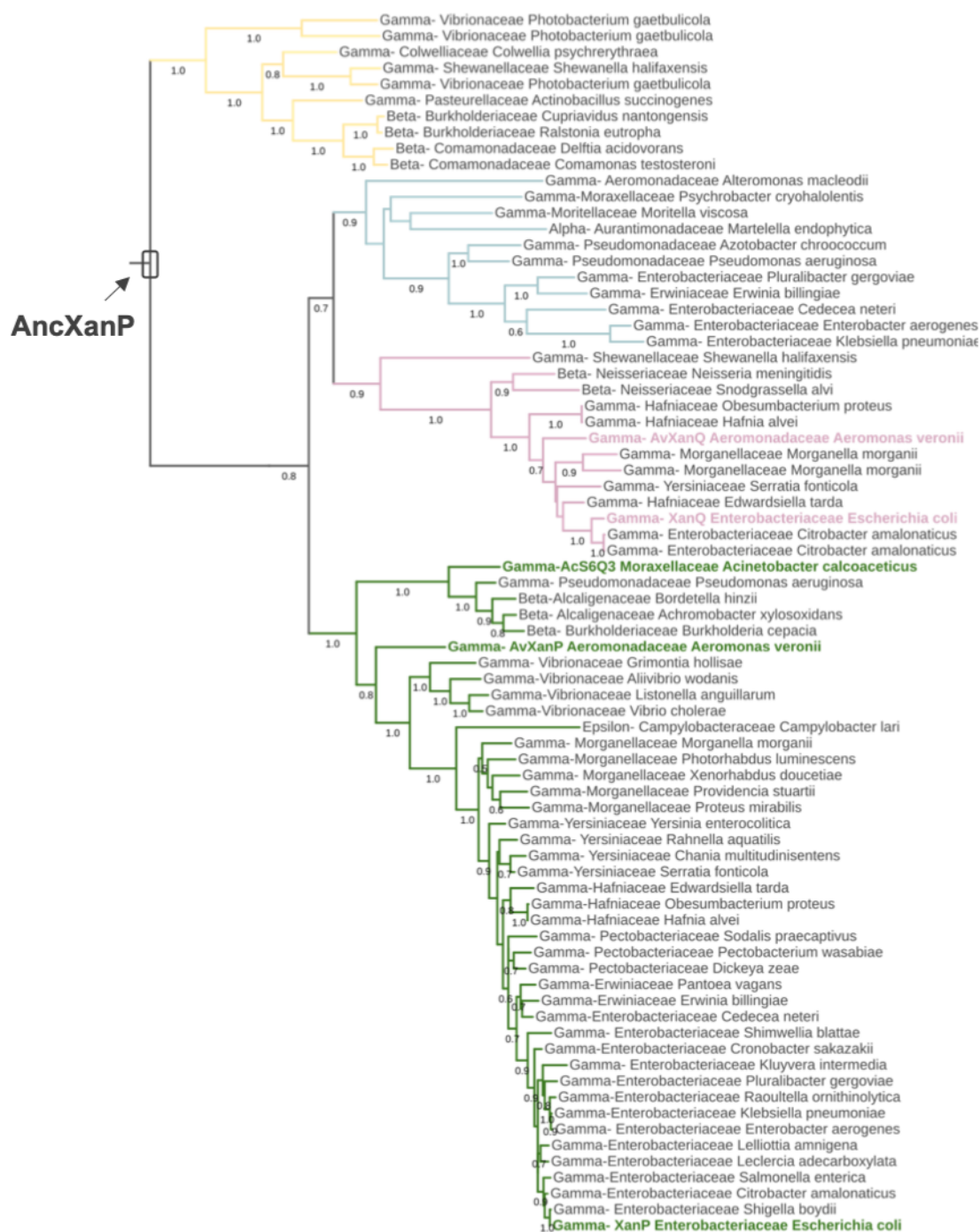
3.2.2.1 Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικών αλληλουχιών στον υποκλάδο των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης

Ο υποκλάδος των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*, ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς με μεταλλαξιγένεση στο εργαστήριο μας (Karena et al., 2015; Karena and Frillingos, 2011; Karena and Frillingos, 2009; Karatza and Frillingos, 2005), το μεταφορέα ξανθίνης AvXanQ της *A. veronii* (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021), το μεταφορέα ξανθίνης XanP της *E. coli* που ανιχνεύεται με πολύ χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης στη μεμβράνη και παρουσιάζει ελάχιστη ενεργότητα για την ξανθίνη (Karatza and Frillingos, 2005), το μεταφορέα AvXanP της *A. veronii*, ο οποίος δεν εκφράζεται στη μεμβράνη (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021) και το μεταφορέα AcS6Q3 από το *A. calcoaceticus* που εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021).

Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τους μεταφορείς αυτής της ομάδας, όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (βλ. Ενότητα 3.2) (**Εικόνα 3.6**) και όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.12**, προκύπτει ότι τα ομόλογά της ομάδας αυτής διαφοροποιούνται σε τέσσερις διακριτούς υποκλάδους. Ο πρώτος περιέχει κυρίως ομόλογα από β - και γ -πρωτεοβακτήρια (τάξη Vibrionales), ο δεύτερος περιλαμβάνει κυρίως Enterobacteriales και άλλες τάξεις γ -πρωτεοβακτηρίων, ο τρίτος αποτελείται από δύο ομόλογα που ανήκουν στα β - πρωτεοβακτήρια (τάξη Neisseriales) και ομόλογα γ -

πρωτεοβακτηρίων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι γνωστοί μεταφορείς XanQ των *E. coli* και *A. veronii* και ο τελευταίος υποκλάδος που αποτελείται από τους μεταφορείς XanP και περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς XanP των *E. coli*, *A. veronii* και *A. calcoaceticus*.

Με βάση την φυλογενετική ανάλυση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ξανθίνης καθώς και την ανάλυση των μοτίβων αλληλουχίας, η οποία υπέδειξε ότι οι ομάδα που αντιπροσωπεύεται τους ειδικούς υψηλής συγγένειας και ενεργότητας μεταφορείς ξανθίνης (XanQ των *E. coli* και *A. veronii*) (**Εικόνα 3.12**, ροζ χρώμα) διαφέρει από όλες τις άλλες του φυλογενετικού δέντρου σε τέσσερις δυνητικώς σημαντικές θέσεις (βλ. Ενότητα 3.2.2.2) αποφασίσαμε να προβούμε σε ανασύσταση 2 προγονικών αλληλουχιών σε αυτόν τον υποκλάδο: 1) του κοινού προγόνου όλης της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης, ο οποίος ονομάστηκε **AncXanP** (**Εικόνα 3.12**) και, 2) του κοινού προγόνου της ομάδας, που αντιπροσωπεύεται από το μεταφορέα XanQ, ο οποίος ονομάστηκε **AncXanQ** (**Εικόνα 3.12**- ομάδα που επισημαίνεται με ροζ χρώμα). Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των δυο προγονικών αλληλουχιών περιγράφεται στις ενότητες 3.2.2.1 και 3.2.2.2, αντίστοιχα.



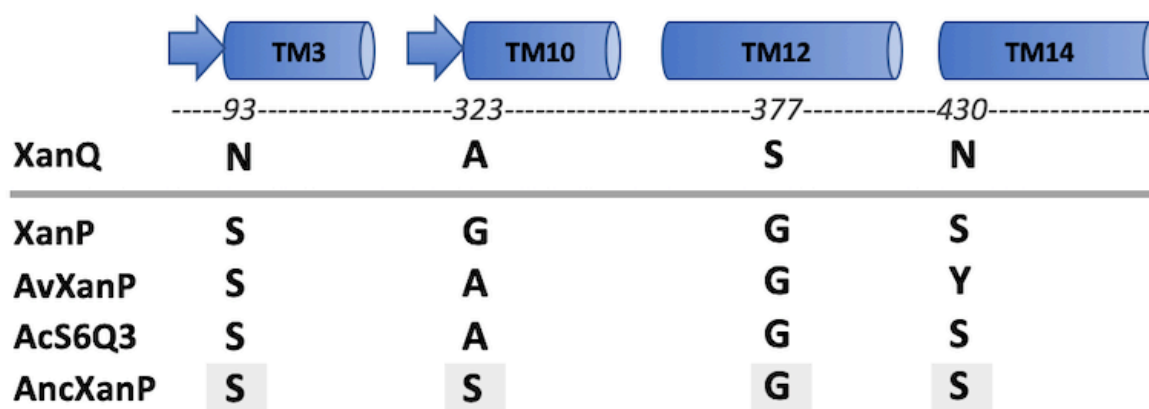
Εικόνα 3.12. Φυλογενετική ανάλυση του κλάδου ξανθίνης της οικογένειας μεταφορέων NAT/ NCS2 στα Πρωτεοβακτήρια. Φυλογενετικό δενδρόγραμμα μιας σειράς 72 ομολόγων που περιλαμβάνονται σε αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα των Πρωτεοβακτηρίων (εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά γένος, κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG). Με ροζ σημειώνεται ο κλάδος που αντιπροσωπεύεται από τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης XanQ (*E. coli*) και AvXanQ (*Aeromonas veronii*). Με πράσινο σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ουρικού οξέος XanP (*E. coli*), AvXanP (*Aeromonas veronii*) και AcS6Q3 (*Acinetobacter calcoaceticus*). Με κίτρινο σημειώνεται ο κλάδος που περιλαμβάνει

ομόλογα κυρίως από β-πρωτεοβακτήρια και κάποια ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια (τάξη *Vibrionales*) και με γαλάζιο ο κλάδος που περιλαμβάνει ομόλογα από γ-πρωτεοβακτήρια. Κανένα γνωστό ομόλογο δεν περιλαμβάνεται σε αυτούς τους δυο κλάδους (κίτρινο και γαλάζιο). Με ορθογώνιο πλαίσιο σημειώνεται ο κλάδος από τον οποίο εξήχθη η ακολουθία *AncXanP* (κοινός πρόγονος όλων των μεταφορέων ξανθίνης). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο *Maximum Likelihood* με βάση το μοντέλο *Jones-Taylor-Thornton matrix-based* (MEGA 7). Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κλάδους υπολογίστηκαν με την μέθοδο *bootstrap* (1000 επαναλήψεις). Διακλαδώσεις με *bootstrap value* <50% δεν εμφανίζονται στην εικόνα.

3.2.2.1.1 Ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας *AncXanP*, κοινού προγόνου του κλάδου *XanQ/XanP*

Με βάση τη φυλογένεση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ξανθίνης επιλέξαμε να μελετήσουμε αρχικά τον κοινό πρόγονο όλων των ομολόγων του κλάδου *XanQ/XanP*, ο οποίος ονομάστηκε ***AncXanP*** (Εικόνα 3.12). Για την εκτίμηση της προγονικής αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Μετά την εξαγωγή της προγονικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση της με τις αλληλουχίες των πέντε χαρακτηρισμένων μεταφορέων του υποκλάδου *XanQ/XanP* (Εικόνα 3.13). Από την ανάλυση αυτή διαπιστώθηκε ότι η προγονική αλληλουχία *AncXanP*, που έχει 63% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων με το μεταφορέα *XanQ*, διαφέρει από αυτόν σε μόνο 4 από τις συνολικά 46 θέσεις αμινοξέων, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές για τη λειτουργικότητα του *XanQ* (Karena *et al.*, 2015) (Εικόνα 3.13). Πρόκειται για τις θέσεις Asn-93, Ala-323, Ser-377 και Asn-430 (αρίθμηση και αμινοξύ με βάση τον *XanQ*). Οι θέσεις αυτές έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση τόσο στον *XanQ* όσο και σε άλλα NAT/NCS2 ομόλογα και δεν έχουν συσχετισθεί με κάποια σαφή διαφορά εξειδίκευσης, αν και ορισμένες από αυτές έχει προταθεί ότι ενδεχομένως συμβάλλουν στην εξειδίκευση¹.

¹ Ο ρόλος των τεσσάρων αυτών θέσεων εξετάζεται αναλυτικά την Ενότητα 3.2.2.2.



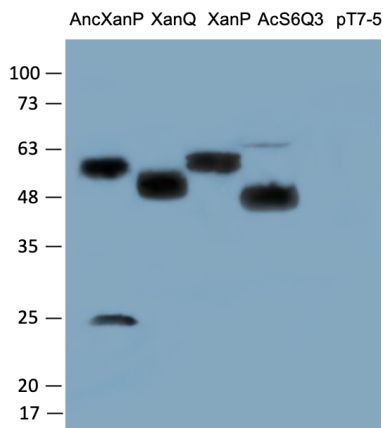
*Εικόνα 3.13. Διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ της προγονικής αλληλουχίας AncXanP και χαρακτηρισμένων μεταφορέων του υποκλάδου XanQ/XanP. Η πρωτεϊνική αλληλουχία του AncXanP ελέγχθηκε για διαφορές σε δυνητικώς σημαντικές θέσεις αμινοξέων, οι οποίες έχουν αποκαλυφθεί βάσει της ανάλυσης μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα XanQ (Karana et al., 2015). Στην πρώτη γραμμή αναφέρονται τα σημαντικά κατάλοιπα όπως εμφανίζονται στην αλληλουχία του XanQ της *E. coli* K-12. Με γκρι πλαίσιο σημειώνονται οι διαφορές στις τέσσερις θέσεις μεταξύ του AncXanP και του XanQ, οι οποίες αποτέλεσαν και στόχους μεταλλαξιγένεσης (βλ. επόμενη ενότητα). Πάνω από κάθε στήλη σημειώνεται το διαμεμβρανικό τμήμα (TM) στο οποίο ανήκει το κάθε αμινοξύ. Η αρίθμηση γίνεται με βάση τον μεταφορέα XanQ.*

Ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA για την πρωτεϊνική αλληλουχία, AncXanP, μήκους 465 αμινοξέων, με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για βελτιστοποίηση της έκφρασης της στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli* (Παράρτημα 2, Εικόνα Π5). Η αλληλουχία αυτή παρήχθησε με γονιδιακή σύνθεση και μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5, που περιέχει την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-acceptor domain, για σήμανση στο C-τελικό άκρο, βιοτινυλίωση in vivo και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με western αβιδίνης (Karatzas and Frillingos, 2005). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε, στη συνέχεια, με μετασχηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* προκειμένου να χαρακτηριστεί λειτουργικά.

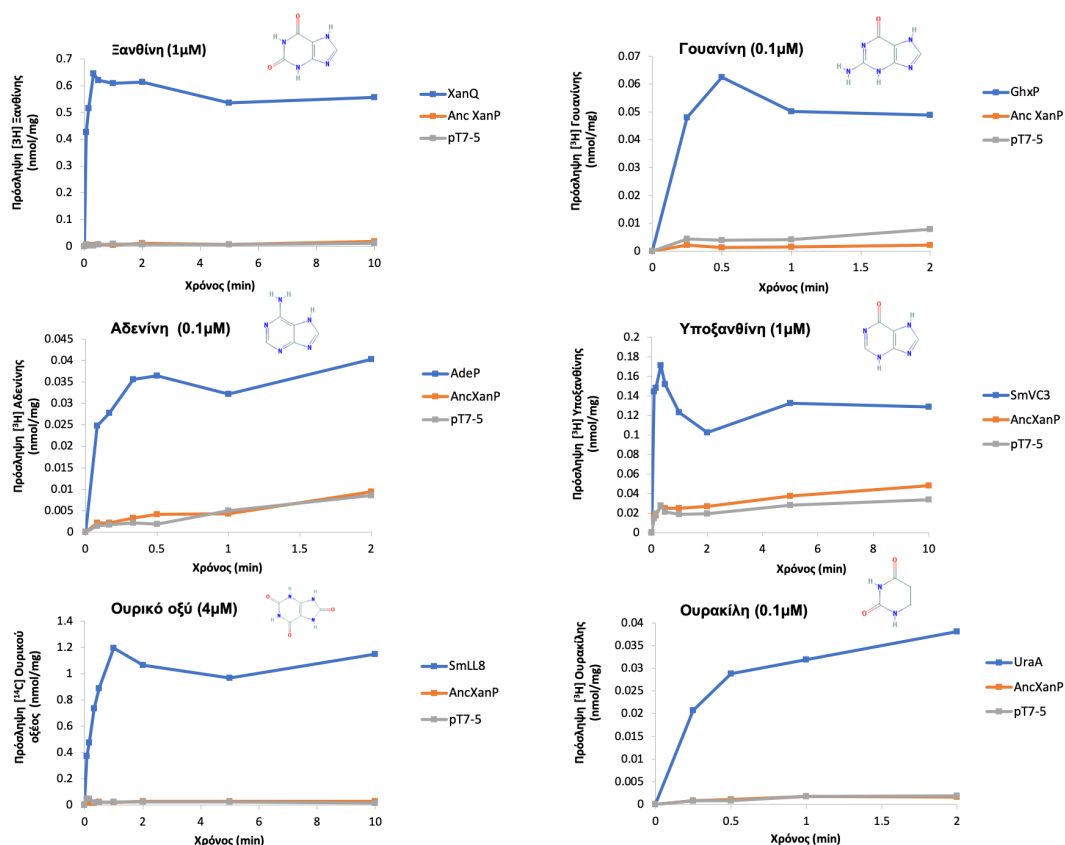
Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά western που πραγματοποιήθηκε αρχικά, υπέδειξε ότι το προϊόν του προγονικού γονιδίου AncXanP παρουσιάζει ελαφρώς μειωμένα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, σε σύγκριση με αυτά του μεταφορέα XanQ. Επίσης παρατηρήθηκαν και κάποια πιθανά πρωτεϊνικά C-τελικά θραύσματα που υποδεικνύουν κάποια δομική αστάθεια του πρωτεϊνικού προϊόντος του προγονικού αυτού γονιδίου στη μεμβράνη (Εικόνα 3.14, Α). Ακολούθησαν δοκιμασίες μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος, αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης και ουρακίλης. Η προγονική αλληλουχία AncXanP δεν

εμφάνισε ανιχνεύσιμη ενεργότητα για κάποια από τις πουρίνες-πυριμιδίνες, που ελέγχθησαν (Εικόνα 3.14, B).

A.



B.



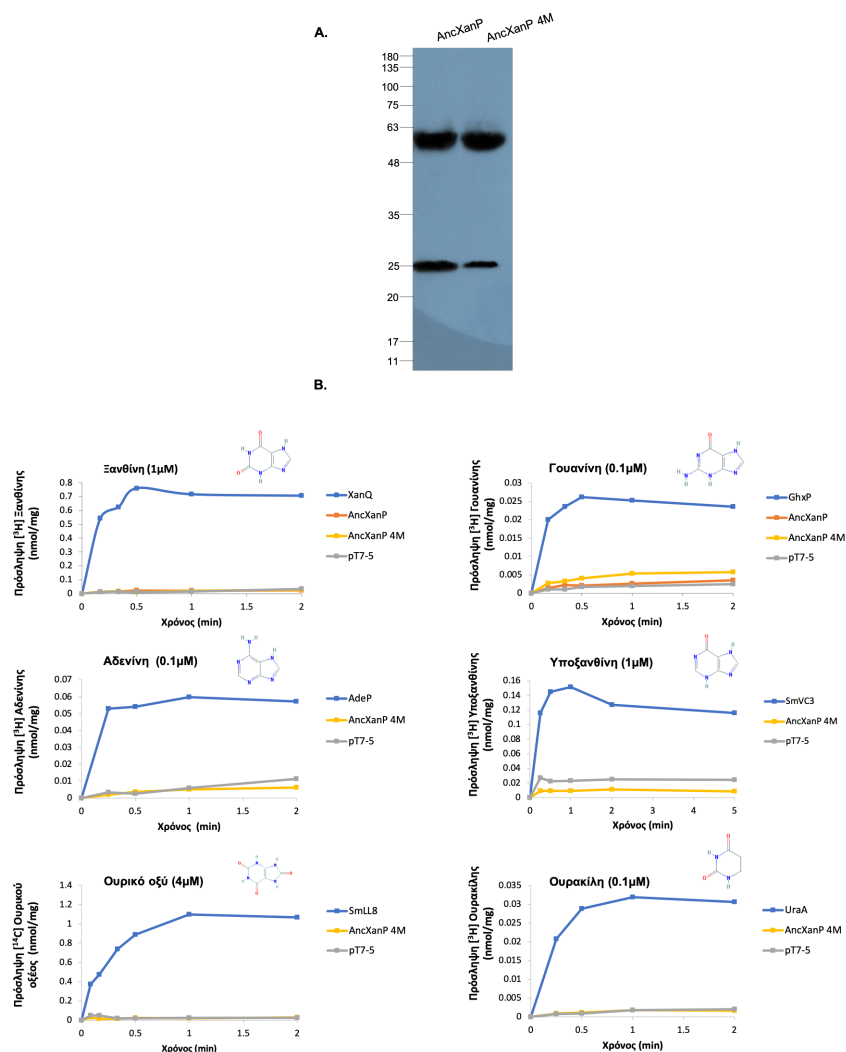
Εικόνα 3.14. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς πουρινών/πυριμιδινών του προγονικού μεταφορέα AncXanP μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής

πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραίωση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημιοφωταύγεια (ECL). Κλάσματα μεμβρανών από *E. coli* K-12 που εκφράζουν εξωχρωμοσωμικά τις περμεάσες XanQ, XanP και AcS6Q3 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) *E. coli* T184 (για την πρόσληψη ξανθίνης και ουρικού οξέος), JW4025 (για την πρόσληψη γουανίνης), JW3692 (για την πρόσληψη αδενίνης και υποξανθίνης) και JW2482 (για την πρόσληψη ουρακίλης) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM), [^3H] γουανίνης (0.1μM), [^3H] αδενίνης (0.1μM), [^3H] υποξανθίνης (1μM), [^{14}C] ουρικού οξέος (4μM) και [^3H] ουρακίλης (0.1μM) στους 25°C για χρόνους 5sec-10min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. [Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί μεταφορείς ξανθίνης XanQ (Karatza and Frillingos, 2005), γουανίνης/ υποξανθίνης GhxP (Papakostas et al., 2013), αδενίνης AdeP (Papakostas et al., 2013), υποξανθίνης/γουανίνης/αδενίνης SmVC3 (SmAGHxT) (Botou et al., 2020), ουρικού οξέος SmLL8 (SmUacT1) (Botou et al., 2020) και ουρακίλης UraA (Botou et al., 2018)].

3.2.2.1.2 Μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο της προγονικής αλληλουχίας AncXanP

Η σύγκριση μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών της προγονικής αλληλουχίας AncXanP με τα χαρακτηρισμένα ομόλογα του κλάδου ξανθίνης, οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικών διαφοροποιήσεων μεταξύ του AncXanP και του XanQ σε τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με ιδιαίτερη σημασία (Εικόνα 3.13). Πρόκειται για τις θέσεις Ser-93, Ser-323, Gly-377 και Ser-430. Στις αντίστοιχες θέσεις στο μεταφορέα XanQ απαντώνται Asn, Ala, Ser και Asn. Για να μελετηθεί η μοριακή βάση αυτών των αλλαγών, κατασκευάστηκε ένα τετραπλό μετάλλαγμα που περιλαμβάνει τις αντίστοιχες αλλαγές και στις τέσσερις θέσεις συνδυαστικά (S93N/S323A/G377S/S430N) και αναφέρεται ως AncXanP- 4M.

Το τετραπλό μετάλλαγμα, AncXanP- 4M, εκφράζεται στη μεμβράνη σε παρόμοια επίπεδα με τον AncXanP, παρουσιάζοντας επίσης κάποια πιθανά πρωτεϊνικά C-τελικά θραύσματα, όπως και ο AncXanP (Εικόνα 3.15, A). Επιπλέον, από τις δοκιμασίες μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος, αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης και ουρακίλης που ακολούθησαν, όπως και ο AncXanP, το μετάλλαγμα AncXanP- 4M δεν εμφάνισε ανιχνεύσιμη ενεργότητα για κάποιο από τα υποστρώματα που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.15, B).



Εικόνα 3.15. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς πουρινών/πυριμιδινών του μεταλλάγματος *AncXanP-4M* μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* *K-12*. (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) *E. coli* T184 (για την πρόσληψη ξανθίνης και ουρικού οξέος), JW4025 (για την πρόσληψη γουανίνης), JW3692 (για την πρόσληψη αδενίνης και υποξανθίνης) και JW2482 (για την πρόσληψη ουρακίλης) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM), [^3H] γουανίνης (0.1μM), [^3H] αδενίνης (0.1μM), [^3H] υποξανθίνης (1μM), [^{14}C] ουρικού οξέος (4μM) και [^3H] ουρακίλης (0.1μM) στους 25°C για χρόνους 5sec-10min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* *K-12* μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. [Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί

μεταφορείς ξανθίνης XanQ (Karatzas and Frillingos, 2005), γουανίνης/ υποξανθίνης GhxP (Papakostas et al., 2013), αδενίνης AdeP (Papakostas et al., 2013), υποξανθίνης/γουανίνης/αδενίνης SmVC3 (SmAGHxT) (Botou et al., 2020), ουρικού οξέος SmLL8 (SmUacT1) (Botou et al., 2020) και ουρακίλης UraA (Botou et al., 2018)].

3.2.2.2 Φυλογενετική ανάλυση και εξαγωγή προγονικής αλληλουχίας στον κλάδο XanQ

Ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ της *E. coli* είναι ο μοναδικός μεταξύ των λειτουργικά γνωστών μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2, καθώς είναι ειδικός για την ξανθίνη και όχι για οποιαδήποτε άλλη πουρίνη ή πυριμιδίνη. Ο XanQ κατατάσσεται φυλογενετικά στον κλάδο XanQ/UapA της υποοικογένειας NAT/COG2233 (κλάδος C1_Ξανθίνης-Ουρικού οξέος) (Chalioitis et al., 2018). Ο κλάδος XanQ/UapA περιέχει αρκετούς χαρακτηρισμένους μεταφορείς τόσο για την ξανθίνη όσο και για το ουρικό οξύ, συμπεριλαμβανομένου του UapA του *Aspergillus nidulans* που έχει μελετηθεί διεξοδικά (Diallinas 2016) και έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία σε υψηλή αναλυτική ευκρίνεια (Alguel et al., 2016) και του SmXUacT (SmLL9) του *Sinorhizobium meliloti* (Botou et al., 2020), καθώς και μεταφορείς ειδικούς για το ουρικό οξύ, όπως ο UacT της *E. coli* (Papakostas and Frillingos, 2012), και οι SmUacT1 (SmLL8) και SmUacT2 (SmX28) από το *Sinorhizobium meliloti* (Botou et al., 2020) (**Παράρτημα 1, Εικόνα Π1**). Παρά την υψηλή ομοιότητα στην αλληλουχία και στα βασικά κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης, ο ειδικός για την ξανθίνη XanQ, διαφέρει, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, από τους παραπάνω μεταφορείς σε ένα συνδυασμό τεσσάρων χαρακτηριστικών σημαντικών καταλοίπων.

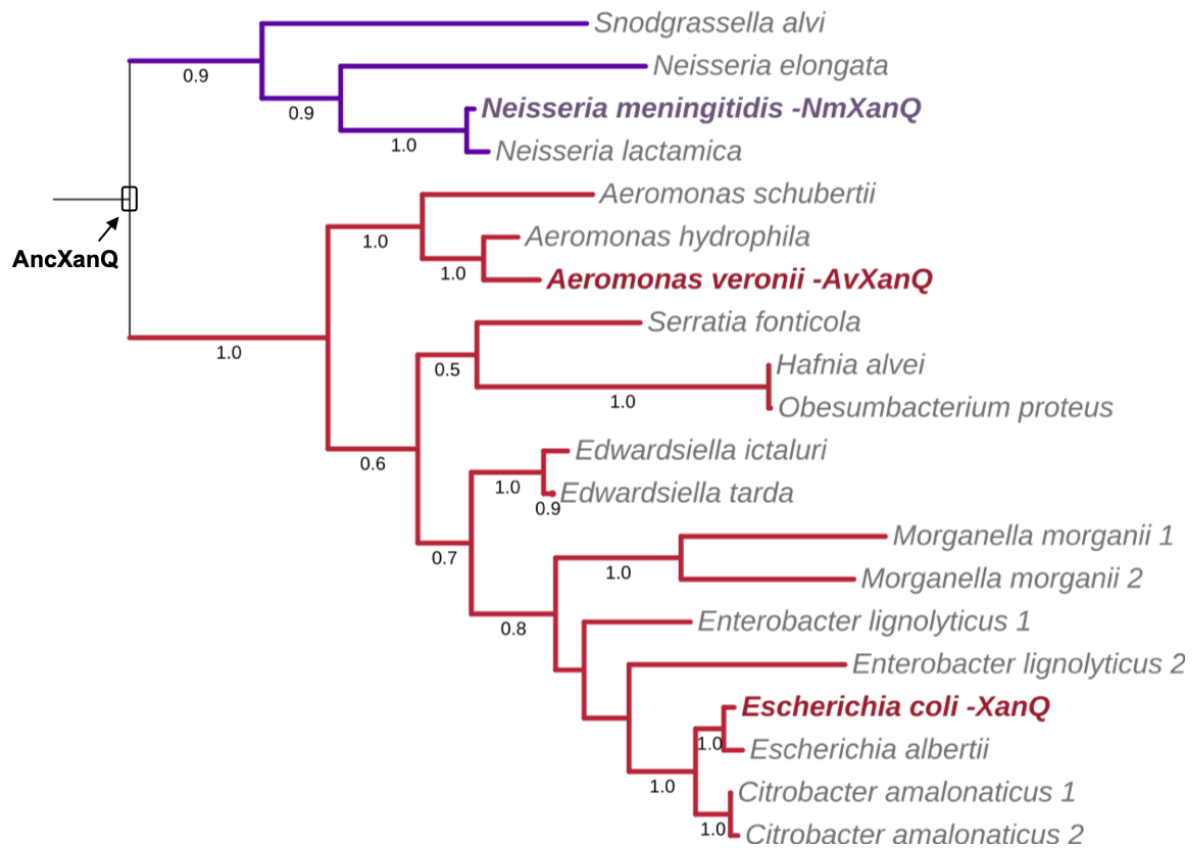
Για να μελετήσουμε εκτενέστερα αυτόν τον κλάδο πραγματοποιήσαμε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, λεπτομερή φυλογενετική ανάλυση όλων των ομολόγων του κλάδου XanQ/UapA που ανήκουν στο Φύλο των Πρωτεοβακτηρίων (**Παράρτημα 1, Εικόνα Π2**). Ο κλάδος αυτός αποτελείται, όπως προαναφέρθηκε, από επτά μονοφυλετικές υποομάδες (**Εικόνα 3.6**), μια από αυτές, στην οποία περιέχεται ο μεταφορέας XanQ, ονομάστηκε κλάδος XanQ. Όλα τα ομόλογα στον κλάδο XanQ (**Εικόνα 3.16, A**) εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία τους (>65% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων) και φέρουν ένα συνδυασμό τεσσάρων σημαντικών καταλοίπων που δεν υπάρχει σε κανένα άλλο μέλος της NAT/NCS2 (**Παράρτημα 5, Παράρτημα 6 και Εικόνα 3.16, B**). Πρόκειται για τα κατάλοιπα: Asn93 (αρίθμηση σύμφωνα με τον XanQ), η οποία συμμετέχει σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου περιφερικά του κέντρου δέσμευσης και έχει συνδεθεί με την προτίμηση για την ξανθίνη έναντι του ουρικού οξέος (Karena and Frillingos, 2011; Frillingos, 2012); Ala323, η οποία

βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος και μπορεί επίσης να συμβάλλει στην εξειδίκευση (Georgopoulou *et al.*, 2010; Papakostas and Frillingos, 2012); Ser/Gly377, η οποία βρίσκεται δίπλα σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο Phe/Tyr που συμμετέχει στο συντονισμό του υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης (Karena *et al.*, 2015) και Asn430, η οποία είναι μακριά από το κέντρο δέσμευσης, αλλά μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την εξειδίκευση (Papakostas *et al.*, 2008; Kosti *et al.*, 2012). Τα κατάλοιπα Asn93 και Asn430 είναι απόλυτα συντηρημένα στον κλάδο XanQ και δεν απαντώνται σε κανένα άλλο ομόλογο της NAT/NCS2, η Ala323 είναι απόλυτα συντηρημένη στον κλάδο XanQ, αλλά εντοπίζεται και σε ορισμένα άλλα NAT/NCS2 ομόλογα (που φέρουν Ala, Gly ή Ser σε αυτή τη θέση), και η Ser377 που είναι παρούσα σε ένα υποσύνολο μόνο του κλάδου XanQ, ενώ όλα τα άλλα βακτηριακά ομόλογα έχουν Gly σε αυτή τη θέση (**Παράρτημα 6, Εικόνα 3.16, Β**).

Οι προηγούμενες μελέτες μεταλλαξιγένεσης του XanQ (Frillingos, 2012; Karena *et al.*, 2015) καθώς και άλλων ομολόγων στον κλάδο XanQ/ UapA (Papakostas and Frillingos, 2012; Botou *et al.*, 2020) που περιλαμβάνουν περισσότερα πάνω από 1000 μεταλλαγμένα σε πάνω από το 80% των καταλοίπων του μεταφορέα, δεν έχουν αποκαλύψει κανένα μετάλλαγμα που να αποκλίνει από το προφίλ του XanQ, το οποίο είναι ειδικό για την ξανθίνη. Αυτός είναι και λόγος για τον οποίο εστιαστήκαμε στη μελέτη του αυτού και εξετάσαμε τον κοινό πρόγονο του κλάδου XanQ.

Για την εκτίμηση της προγονικής αλληλουχίας του XanQ κλάδου χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood) με χρήση του προγράμματος φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Το πρόγραμμα προβλέπει το πιθανότερο αμινοξύ για την κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ δίνει και τα αντίστοιχα ποσοστά για κάθε αμινοξύ. Τα ποσοστά αυτά (posterior probabilities) για τα περισσότερα κατάλοιπα ήταν >90% (και >80% για τα κατάλοιπα που προβλέπεται να βρίσκονται εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων) (**Παράρτημα 3, Εικόνα 3.16, Γ**). Η προγονική αυτή πρωτεΐνη, η οποία ονομάστηκε AncXanQ, διαφέρει από τον XanQ στο 24% των καταλοίπων της συνολικής αλληλουχίας της και συντηρεί όλα τα σημαντικά κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης (**Παράρτημα 5**). Ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί για την προγονική πρωτεΐνη με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για βελτιστοποίηση της έκφρασης της στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli* (**Παράρτημα 4**).

A.



B.

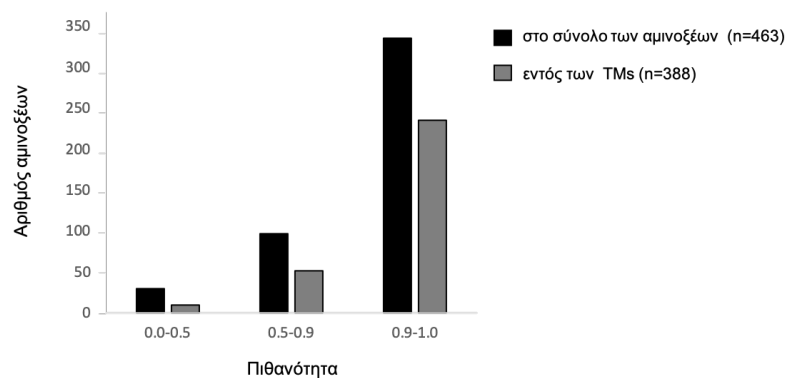
Κλάδος XanQ

QSVN⁹³FSFV (TM3)
TTF^{A323}QNNGVI (TM10)
MF^{(G/S)377}MI (TM12)
(Q/E)^{N430}PI (TM14)

AncXanQ

QSVN⁹³FSFV (TM3)
TTF^{A323}QNNGVI (TM10)
MF^{G377}MI (TM12)
QN⁴³⁰PI (TM14)

Γ.



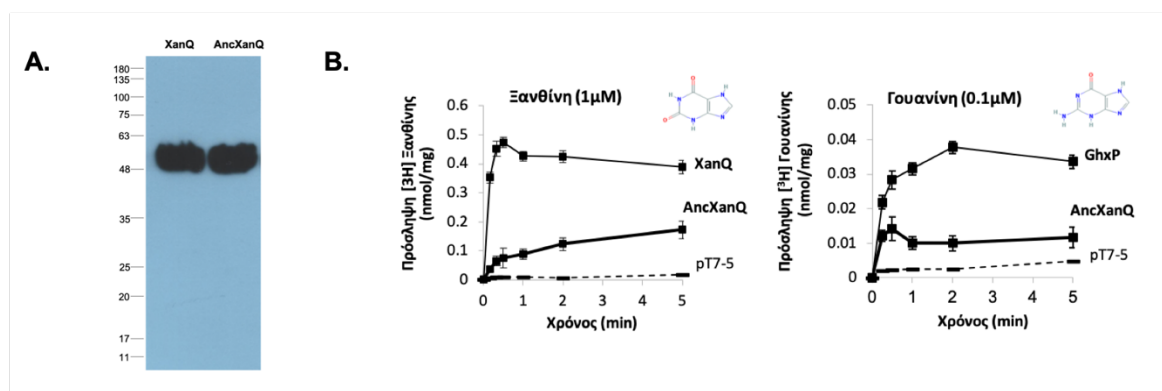
Εικόνα 3.16. Φυλογενετική ανάλυση της ομάδας των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης στα Πρωτεοβακτήρια και ανάλυση της αλληλουχίας του *AncXanQ*. Α) Φυλογενετικό δένδρογραμμα μιας σειράς 20 αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών από το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων που ανήκουν στον κλάδο ξανθίνης της οικογένειας NAT/NCS2 και συγκεκριμένα στον υποκλάδο που αντιπροσωπεύεται από μεταφορέα *XanQ* της *E. coli*. Ο υποκλάδος αυτός χωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποομάδες, η πρώτη περιλαμβάνει ομόλογα που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια (τάξη *Neisseriales*) και η δεύτερη ομόλογα γ-πρωτεοβακτηρίων στην οποία περιλαμβάνεται και ο γνωστός μεταφορέας ξανθίνης *XanQ* της *E. coli*. Με ορθογώνιο πλαίσιο σημειώνεται ο κοινός πρόγονος του κλάδου των μεταφορέων ξανθίνης που ονομάστηκε *AncXanQ*. Στην ανάλυση περιλαμβάνονται όλα τα ομόλογα βακτηρίων που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG, εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά είδος. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο *Maximum Likelihood* με βάση το μοντέλο *Jones-Taylor-Thornton matrix-based* (MEGA 7), ενώ η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο *Bootstrap* (1000 επαναλήψεις). Διακλαδώσεις με *bootstrap value* <50% δεν εμφανίζονται. Β) Χαρακτηριστικά κατάλοιπα αμινοξέων που συντηρούνται στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης, απαντώνται και στον προγονικό μεταφορέα *AncXanQ*. Με κόκκινο και υπογράμμιση σημειώνονται τα κατάλοιπα που είναι σημαντικά για τη λειτουργικότητα του *XanQ* (Karena et al., 2015) και συντηρούνται μόνο στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης (κλάδος *XanQ*) και όχι σε οποιοδήποτε άλλο κλάδο NAT/NCS2 μεταφορέων (βλ. Εικόνα 3.6) (Η πλήρης στοίχιση της αλληλουχίας του *AncXanQ* και όλων των ομολόγων του κλάδου ξανθίνης δίνεται στο Παράρτημα 5). Γ) Πιθανότητες των προβλεπόμενων αμινοξέων της προγονικής πρωτεΐνης *AncXanQ*. Αριθμός των προβλεπόμενων αμινοξέων στην εξαχθείσα πρωτεϊνική αλληλουχία του *AncXanQ* (στο σύνολο της αλληλουχίας, μαύρο) ή εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων (γκρι) σε σχέση με την πιθανότητα εμφάνισης τους για κάθε θέση. Η αλληλουχία του *AncXanQ* (Παράρτηματα 3 και 4) εξήχθη με τη μέθοδο *Maximum Likelihood* (MEGA7).

3.2.2.2.1 Λειτουργική ανάλυση του *AncXanQ*: ικανότητα να μεταφέρει και γουανίνη εκτός από ξανθίνη

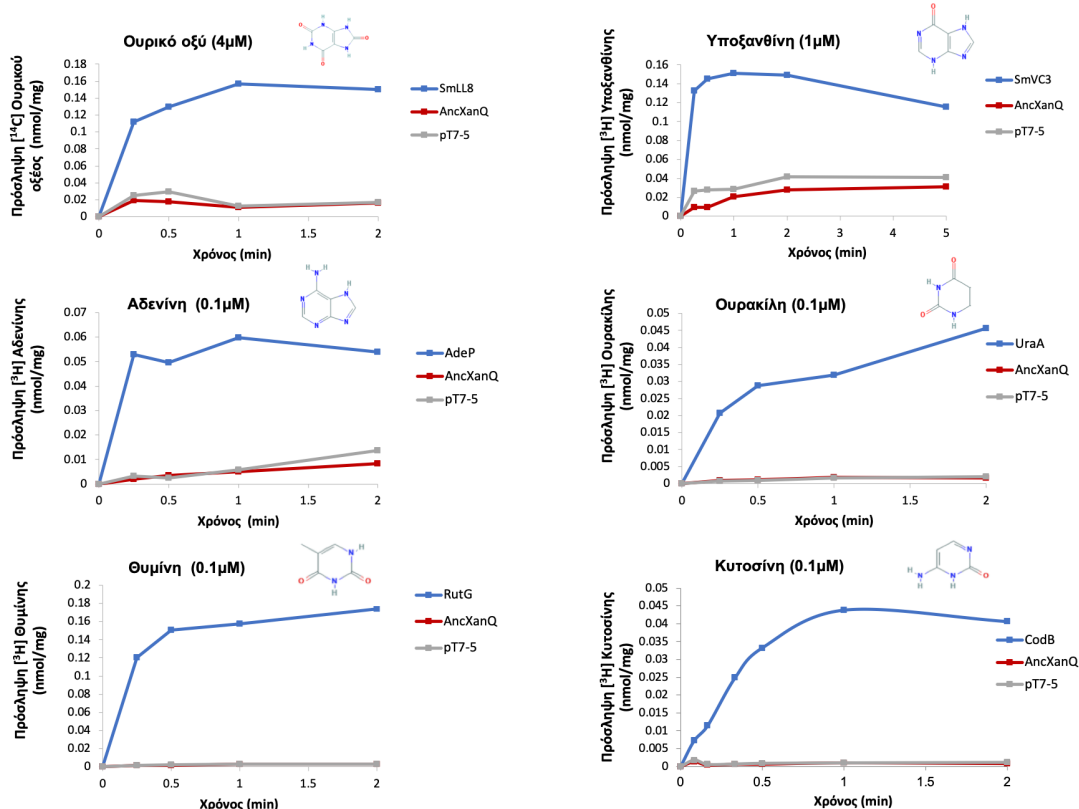
Η αλληλουχία DNA για το προγονικό γονίδιο *AncXanQ* αφού παρήχθη με γονιδιακή σύνθεση, μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5 που περιέχει την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-acceptor domain, για σήμανση στο C-τελικό άκρο, βιοτινυλίωση *in vivo* και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με western αβιδίνης (Karatzas and Frillingos, 2005). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε με μετασχηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli*, ώστε να χαρακτηριστεί λειτουργικά.

Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά western υπέδειξε ότι το προϊόν του προγονικού γονιδίου *AncXanQ* είναι σταθερό στη μεμβράνη της *E. coli* K-12, εμφανίζοντας ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης συγκρίσιμα με αυτά του μεταφορέα *XanQ* (Εικόνα 3.17 Α). Ακολούθησαν δοκιμασίες μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος, αδενίνης, γουανίνης, υποξανθίνης, ουρακίλης, θυμίνης και κυτοσίνης (Εικόνες 3.17Β και Εικόνα 3.18). Από το

σύνολο των πουρινών και πυριμιδινών που εξετάστηκαν η προγονική αλληλουχία AncXanQ εμφανίζει μικρή, αλλά σημαντική ενεργότητα για την ξανθίνη (αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης στο 20% και 30% αντίστοιχα, σε σχέση με το μεταφορέα XanQ) και τη γουανίνη [αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης γουανίνης στο 30%, σε σχέση με το μεταφορέα γουανίνης GhxP της *E. coli* (Papakostas *et al.*, 2013)]. Επιπλέον, προκειμένου να διαπιστωθεί πειραματικά εάν ο προγονικός μεταφορέας AncXanQ εξαρτάται από τη διαβάθμιση πρωτονίων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ενεργού μεταφοράς ξανθίνης και γουανίνης παρουσία του πρωτονιοφόρου CCCP (καρβονυλο-κυαναμιδο-χλωροφαίνυλο-υδραζόνιο) (Παράρτημα 7). Επώαση με το CCCP, το οποίο καταργεί την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων (Kaback *et al.*, 1974), αναστέλλει πλήρως τόσο την ενεργότητα της ξανθίνης όσο και της γουανίνης. Άρα πρόκειται για πρωτεΐνη ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου, που εξαρτάται απόλυτα από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του XanQ (Karatza and Frillingos, 2005).



Εικόνα 3.17. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς [^3H] ξανθίνης και [^3H] γουανίνης του προγονικού μεταφορέα AncXanQ μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM) και [^3H] γουανίνης (0.1μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί μεταφορείς ξανθίνης XanQ (Karatza and Frillingos, 2005) και γουανίνης/ υποξανθίνης GhxP (Papakostas *et al.*, 2013).



Εικόνα 3.18. Ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς πουρινών/πυριμιδινών της προγονικής αλληλουχίας *AncXanQ* μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. *E. coli* T184 (για την πρόσληψη ουρικού οξέος), JW3692 (για την πρόσληψη υποξανθίνης και αδενίνης), JW2482 (για την πρόσληψη ουρακίλης και θυμίνης) και JW0327 (για την πρόσληψη κυτοσίνης) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^{14}C] ουρικού οξέος (4μM), [^3H] υποξανθίνης (1μM), [^3H] αδενίνης (0,1μM), [^3H] ουρακίλης (0,1μM), [^3H] θυμίνης (0.1μM) και [^3H] κυτοσίνης (0.1μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. [Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί μεταφορείς ουρικού οξέος SmLL8 (SmUacT1) (Botou et al., 2020), υποξανθίνης/γουανίνης/αδενίνης SmVC3 (SmAGHxT) (Botou et al., 2020), αδενίνης AdeP (Papakostas et al., 2013), ουρακίλης UraA (Botou et al., 2018), ουρακίλης/θυμίνης/ξανθίνης RutG (Botou et al., 2018) και κυτοσίνης CodB (Botou and Frillingos, unpublished results)].

Από την ανάλυση κινητικής που πραγματοποιήθηκε για την ξανθίνη και τη γουανίνη υποδεικνύεται ότι ο AncXanQ έχει υψηλή συγγένεια για την ξανθίνη (K_m 6,5 μM), παρόμοια με αυτή του μεταφορέα XanQ (K_M 4,1 μM), αλλά σημαντικά μειωμένη ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης (V_{max}/K_M), περίπου υποπενταπλάσια από αυτήν του XanQ (**Πίνακας 3.5**). Όσον αφορά τη γουανίνη, μεταφέρεται από τον AncXanQ με υψηλή συγγένεια (K_M 0.24 μM), υψηλότερη και από αυτή του σύγχρονου μεταφορέα γουανίνης-υποξανθίνης

GhxP της *E. coli* (Papakostas *et al.*, 2013), αλλά μικρότερη μέγιστη ταχύτητα ($V_{\max}$), με αποτέλεσμα συγκρίσιμη ικανότητα μεταφοράς ($V_{\max}/K_M$) σε σχέση με το σύγχρονο μεταφορέα γουανίνης (Πίνακας 3.5).

Μεταφορέας		Υπόστρωμα που μεταφέρει	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Προγονικός μεταφορέας	AncXanQ	Ξανθίνη	6.5 (± 0.9)	2.4 (± 0.1)	370
		Γουανίνη	0.24 (± 0.05)	0.25 (± 0.02)	1040
Σύγχρονος μεταφορέας	XanQ	Ξανθίνη	4.1 (± 0.5)	7.5 (± 1.1)	1830
	GhxP	Γουανίνη	1.10 (± 0.12)	1.02 (± 0.09)	930

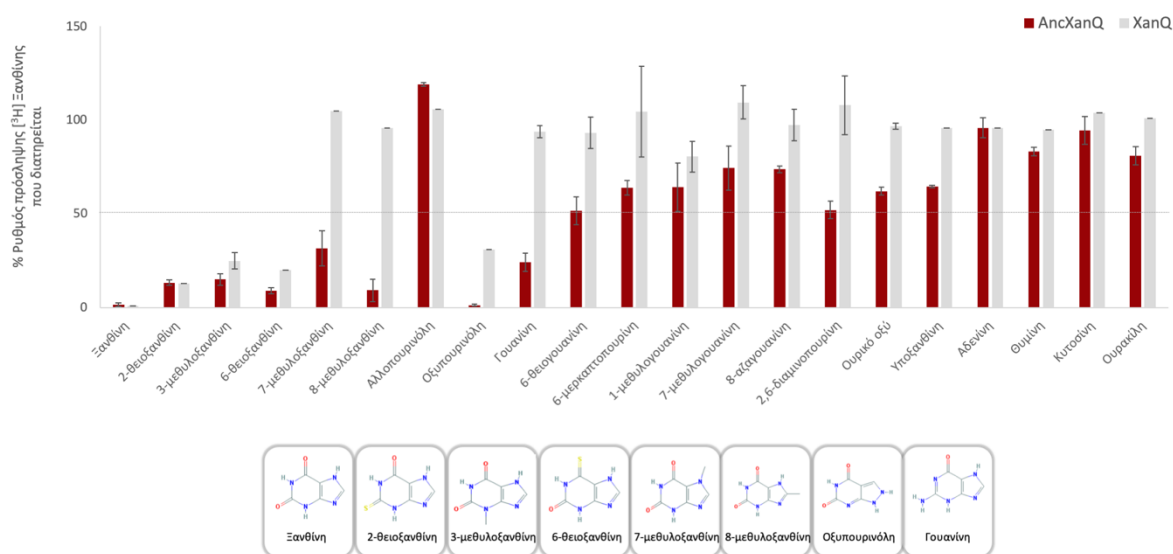
Πίνακας 3.5. Τιμές K_M και $V_{\max}$ του AncXanQ για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [^3H] γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_M και $V_{\max}$ εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.. (Οι αντίστοιχες τιμές K_M και $V_{\max}$ των μεταφορέων XanQ και GhxP προέρχονται από τις δημοσιεύσεις του εργαστηρίου μας Karena *et al.*, 2015 και Papakostas *et al.*, 2013, αντίστοιχα).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ με πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [^3H] ξανθίνης (1 μM) και [^3H] γουανίνης (0.1 μM) από μια σειρά πιθανών προσδετών. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης του AncXanQ αναστέλλεται με υψηλή συγγένεια από τη γουανίνη (K_i 51.6 μM) και από τα ανάλογα 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη και οξυπουρινόλη (Εικόνα 3.19 και Πίνακας 3.6), έχοντας ένα ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης συγκριτικά με το μεταφορέα XanQ, ο οποίος δεν αναγνωρίζει τη γουανίνη, την 7-μεθυλοξανθίνη και την 8-μεθυλοξανθίνη. Όσο αφορά στην ενεργότητα πρόσληψης γουανίνης, αναστέλλεται με υψηλή συγγένεια από την υποξανθίνη, την 6-θειογουανίνη, την 6-μερκαπτοπουρίνη, την 1-μεθυλογουανίνη και την 8-αζαγουανίνη που αποτελούν υποστρώματα και του σύγχρονου μεταφορέα GhxP (Papakostas *et al.*, 2013), αλλά αναστέλλεται επιπλέον από την ξανθίνη (K_i 54.9 μM), την αδείνη, την 2,6-

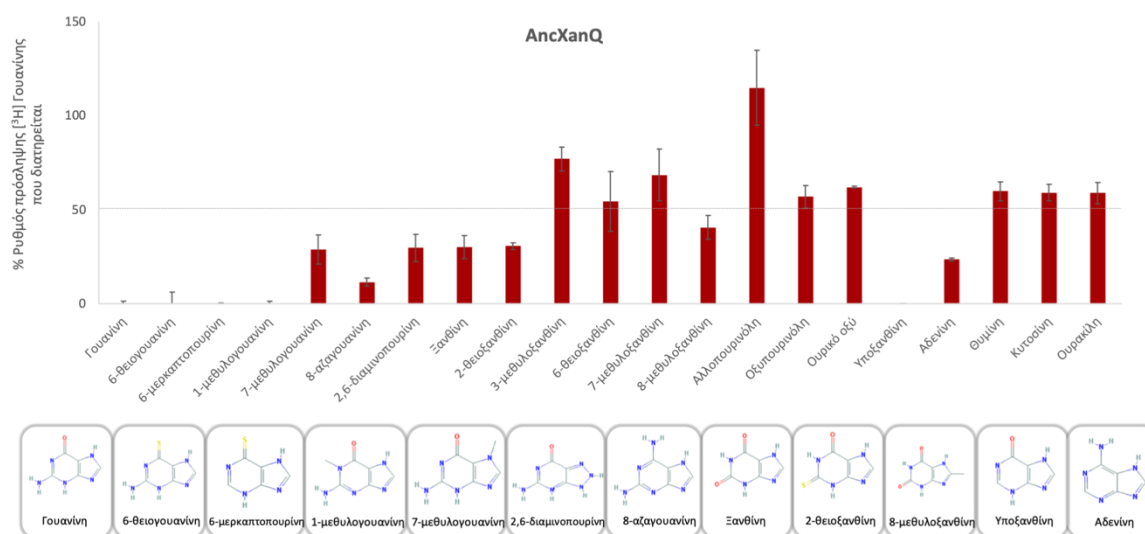
διαμινοπουρίνη και την 7-μεθυλογουανίνη, που δεν αναγνωρίζονται από τον GhxP (**Εικόνα 3.20, Πίνακας 3.6**).

Για όλα τα ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης τα οποία φάνηκε να αναγνωρίζονται από τον AncXanQ σε σημαντικό βαθμό (αναστολή ενεργότητας πάνω από 50% από τον πιθανό προσδέτη σε 1000x μοριακή περίσσεια έναντι ξανθίνης ή γουανίνης), ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1μM έως 1mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC₅₀ και στη συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i, οι οποίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.6**.

Συνολικά, ο AncXanQ αναγνωρίζει ως υποστρώματα όχι μόνο την ξανθίνη και την γουανίνη, αλλά και την αδενίνη και την υποξανθίνη και όλα τα ανάλογα αυτών, εκτός από την αλλοπουρινόλη και το ουρικό οξύ. Το προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ είναι ευρύτερο από οποιοδήποτε προφίλ εξειδίκευσης σύγχρονου μεταφορέα της NAT/NCS2 που έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής, είτε πρόκειται για βακτηριακό είτε για ευκαρυωτικό μεταφορέα.



Εικόνα 3.19. Προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncXanQ συγκριτικά με το σύγχρονο μεταφορέα XanQ με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.20. Προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncXanQ με ανταγωνισμό ως προς τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση του αντίστοιχου μεταφορέα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0.1 μM, 25°C) μετά από προεπάωση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

K _i (μM)		
Ανταγωνιστής	XanQ	AncXanQ
	Πρόσληψη ξανθίνης	
Γουανίνη	n. a.	51.6 (±10.8)
2-Θειοξανθίνη	91.1 (±10.1)	111.5 (±14.6)
3-Μεθυλοξανθίνη	71.9 (±9.2)	49.6 (±13.3)
6-Θειοξανθίνη	40.6 (±8.3)	31.1 (±14.3)
7-Μεθυλοξανθίνη	n. a.	213.5 (±27.2)
8-Μεθυλοξανθίνη	n. a.	7.3 (±0.5)
Οξυπουρινόλη	29.1 (±3.8)	7.7 (±2.2)
	GhxP	AncXanQ
	Πρόσληψη γουανίνης	

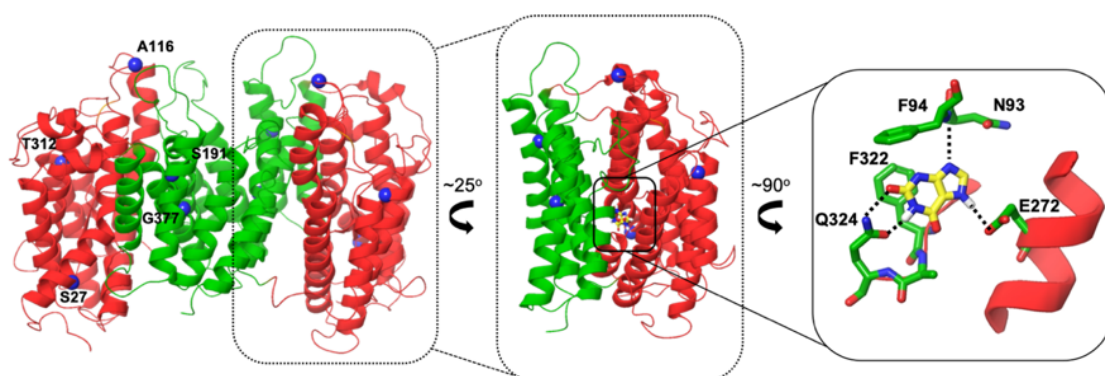
Ξανθίνη	n. a.	54.9 (±4.0)
Υποξανθίνη	5.7 (±1.1)	5.2 (±0.2)
Αδενίνη	n. a.	139.4 (±18.0)
6-Θειογουανίνη	3.1 (±0.3)	2.4 (±0.3)
6-Μερκαπτοπουρίνη	8.4 (±1.5)	1.9 (±0.2)
1-Μεθυλογουανίνη	55.1 (±7.4)	2.2 (±0.5)
7-Μεθυλογουανίνη	n. a.	154.5 (±48.5)
8-Αζαγουανίνη	50.5 (±6.9)	40.2 (±10.1)
2,6-Διαμινοπουρίνη	n. a.	67.2 (±13.5)

*Πίνακας 3.6. Τιμές K_i του προγονικού μεταφορέα AncXanQ συγκριτικά με των σύγχρονων μεταφορέων XanQ και GhxP ως προς τον ανταγωνισμό [^3H] ξανθίνης ή [^3H] γουανίνης με τους αντίστοιχους μη σημασμένους προσδέτες. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) και [^3H] γουανίνης (0,1 μM) στους 25°C, μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0,1 μM -1 mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5-15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης ή [^3H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%. (Οι τιμές που δίνονται για τους γνωστούς μεταφορείς XanQ και GhxP προέρχονται από τις δημοσιεύσεις Karena *et al.*, 2015 και Papakostas *et al.*, 2013, αντίστοιχα).*

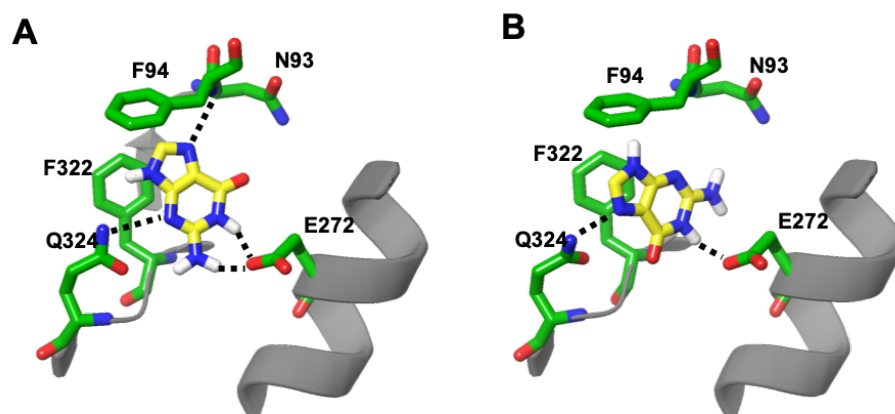
Για να κατανοήσουμε τον τρόπο αλληλεπίδρασης της ξανθίνης και της γουανίνης στο κέντρο δέσμευσης του AncXanQ, κατασκευάσαμε σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ), το δομικό μοντέλο του AncXanQ. Το μοντέλο κατασκευάστηκε στο πρότυπο του μοντέλου του XanQ, το οποίο είχε κατασκευαστεί στην ανοιχτή-προς-το-εσωτερικό διαμόρφωση (*inward-open*) (Botou *et al.*, 2020) με βάση το πρότυπο της κρυσταλλικής δομής του UapA (PDB 5I6C) (Alguet *et al.*, 2016). Το μοντέλο του AncXanQ περιλαμβάνει 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs), εκ των οποίων τα TMs 1-4 και 8-11 σχηματίζουν τη δομική περιοχή του «πυρήνα» (core domain) και τα TMs 5-7 και 12-14 τη δομική περιοχή της «εισόδου» (gate domain) (Εικόνα 3.21). Όλες οι διαμεμβρανικές έλικες και οι συνδετικοί βρόχοι εμφανίζουν το ίδιο

μήκος, όπως και στον XanQ, ως συνέπεια της υψηλής (76%) ταυτότητας που έχουν οι αλληλουχίες των δύο μεταφορέων.

Δεδομένου ότι ο AncXanQ μεταφέρει τόσο την ξανθίνη όσο και τη γουανίνη, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις Μοριακής Δυναμικής και υπολογισμοί induced-fit docking (από τη συνεργαζόμενη ομάδα του Ε. Μικρού, Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ), ώστε να εξακριβωθεί ο τρόπος δέσμησης των δυο υποστρωμάτων στο κέντρο δέσμησης του μεταφορέα. Η ξανθίνη προσδένεται στο κέντρο δέσμησης του AncXanQ, με τον τρόπο που δεσμεύεται στον UapA (Alguet *et al.*, 2016) και στον XanQ (Botou *et al.*, 2020) (**Εικόνα 3.21**). Όσο αφορά στην πρόσδεση της γουανίνης, οι παραπάνω αναλύσεις υπέδειξαν ότι αυτή σταθεροποιείται στο ενεργό κέντρο του AncXanQ μέσω δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των N1H και C2-NH₂ με την καρβοξυλική ομάδα του E272 καθώς και του N3 με τη Q324, N7 με την καρβονυλική ομάδα της κύριας αλυσίδας της F94 και π-π αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις κάθετης διεύθυνσης (T-stacking) μεταξύ των F322 και F94 (**Εικόνα 3.22, A**). Στη δεύτερη διαμόρφωση χαμηλότερης ενέργειας (**Εικόνα 3.22, B**), σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ των N1H και E272, C6=O με την καρβονυλική ομάδα της κύριας αλυσίδας της A323 και του N7 με τη Q324, καθώς και π-π αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις κάθετης διεύθυνσης (T-stacking) μεταξύ των F322 και F94, αντίστοιχα.



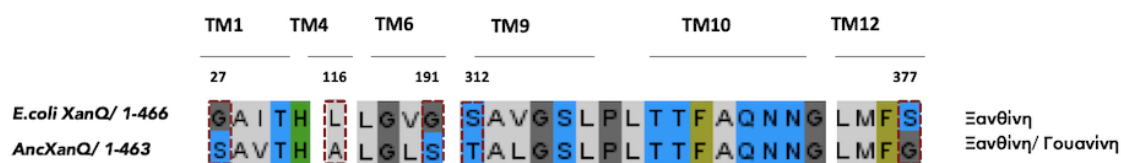
Εικόνα 3.21. Απεικόνιση του δομικού προτύπου του AncXanQ. Η δομική περιοχή του «πυρήνα» (core domain) σημειώνεται με κόκκινο χρώμα και η δομική περιοχή της «εισόδου» (gate domain) με πράσινο. Οι θέσεις των καταλοίπων S27, A116, T312, S191 και G377 (θέσεις στις οποίες ο AncXanQ διαφέρει από τον XanQ και αποτέλεσαν στόχους μεταλλαξιογένεσης, βλ. επόμενη ενότητα) παρουσιάζονται ως μπλε σφαίρες, ενώ σε μεγέθυνση επισημαίνεται και ο προβλεπόμενος προσανατολισμός και οι αλληλεπιδράσεις της ξανθίνης στο κέντρο δέσμησης. Η κατασκευή του δομικού προτύπου του AncXanQ πραγματοποιήθηκε από τη συνεργαζόμενη ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ).



Εικόνα 3.22. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής της αλληλεπίδρασης του ApcXanQ με τη γουανίνη. Παρουσιάζεται ο προσανατολισμός και οι αλληλεπιδράσεις της γουανίνης στο κέντρο δέσμευσης του ApcXanQ, με βάση τις δύο διαμόρφώσεις χαμηλότερης ενέργειας (lowest-energy binding mode). A) Η γουανίνη προσανατολίζεται έτσι ώστε το C2-NH2 της να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το E272 (διακεκομμένη γραμμή) και το N7 δεσμό υδρογόνου με την καρβονυλική ομάδα της κύριας αλυσίδας της F94. B) Η γουανίνη προσανατολίζεται έτσι ώστε το C6=O της να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την καρβονυλική ομάδα της κύριας αλυσίδας της A323 και το N7 δεσμό υδρογόνου με τη Q324. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τη συνεργαζόμενη ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ).

3.2.2.2.2 Ο συνδυασμός 5 μεταλλαγών μακριά από το κέντρο δέσμευσης περιορίζει την εξειδίκευση του ApcXanQ στην αναγνώριση της ξανθίνης

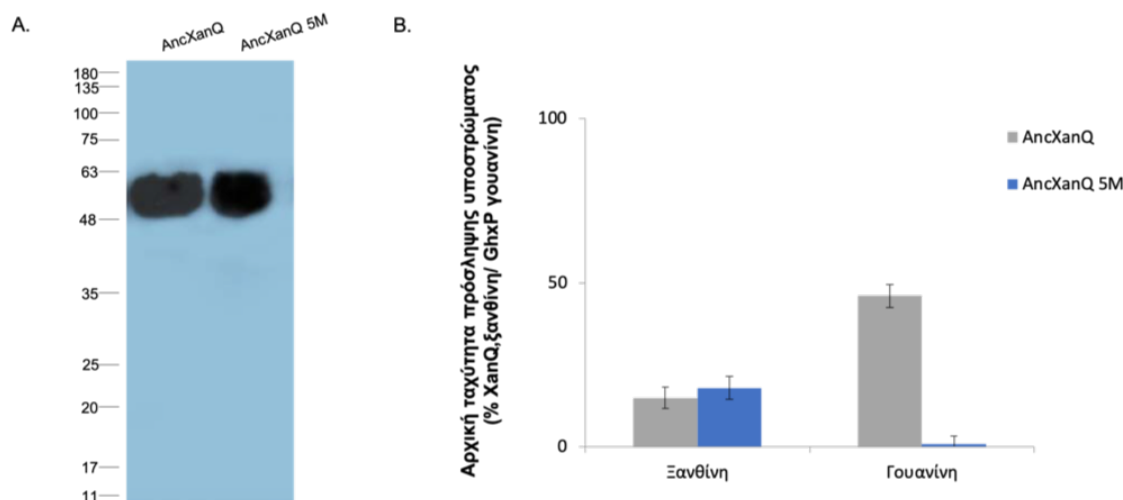
Αν δε λάβουμε υπόψιν τις θέσεις στις οποίες διατηρείται ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας, ο ApcXanQ διαφέρει από τον XanQ σε πέντε μόνο θέσεις αμινοξέων που βρίσκονται εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων (**Εικόνα 3.23** και **Παράρτημα 5**). Τα αμινοξέα που διαφέρουν στον ApcXanQ είναι: η Ser27 (Gly στον XanQ), η Ala116 (Leu στον XanQ), η Ser191 (Gly στον XanQ), η Thr312 (Ser στον XanQ) και η Gly377 (Ser στον XanQ). Επιπλέον, τα κατάλοιπα αυτά εντοπίζονται σε θέσεις μακριά από την προβλεπόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (**Εικόνα 3.21**).



Εικόνα 3.23. Διαφορές στην αλληλουχία των μεταφορέων AncXanQ και XanQ. Από την ανάλυση στοίχισης διαπιστώθηκε ότι ο AncXanQ διαφέρει από τον υψηλής συγγένειας μεταφορέα ξανθίνης XanQ σε πέντε θέσεις εντός των 14 διαμεμβρανικών τμημάτων (Στις πέντε αυτές διαφορές δε συμπεριλαμβάνονται αλλαγές στις οποίες διατηρείται ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος π.χ. αλλαγή από λευκίνη σε ισολευκίνη). Πρόκειται για τις θέσεις Gly-27 (στο TM 1), Leu-116 (TM4), Gly-191 (TM6), Ser-312 (TM9) και Ser-377 (TM12) (αμινοξύ και αρίθμηση με βάση το μεταφορέα XanQ). Στις αντίστοιχες θέσεις ο AncXanQ φέρει Ser, Ala, Ser, Thr και Gly. Οι θέσεις αυτές αποτέλεσαν στόχους μεταλλαξιγένεσης στο υπόβαθρο τόσο του AncXanQ όσο και του XanQ (βλ. επόμενες ενότητες). Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988).

Για να εξετάσουμε τη διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ του AncXanQ και του XanQ κατασκευάσαμε ένα πενταπλό μετάλλαγμα το οποίο περιλαμβάνει όλες τις σχετικές αλλαγές (S27G / A116L / S191G/T312S / G377S) που ονομάστηκε AncXanQ-5M. Από τη λειτουργική του ανάλυση διαπιστώθηκε ότι το πενταπλό μετάλλαγμα εκφράζεται κανονικά στη μεμβράνη *E.coli* σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του AncXanQ (**Εικόνα 3.24, Α**), μεταφέρει ξανθίνη με παρόμοιες κινητικές ιδιότητες με αυτές του AncXanQ φυσικού τύπου, αλλά δεν μπορεί να μεταφέρει τη γουανίνη (**Εικόνα 3.24 Β, Πίνακας 3.7**). Από την ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ-5M, προέκυψε ότι σε αντιδιαστολή με τον AncXanQ δεν αναγνωρίζει τη γουανίνη και την 8-μεθυλοξανθίνη, αν και μπορεί να αναγνωρίσει με υψηλή συγγένεια 7-μεθυλοξανθίνη (**Εικόνα 3.25, Πίνακας 3.8**). Για τα ανάλογα ξανθίνης τα οποία αναγνωρίζονται από τον AncXanQ-5M σε σημαντικό βαθμό (αναστολή ενεργότητας πάνω από 50% από τον πιθανό προσδέτη σε 1000x μοριακή περίσσεια έναντι ξανθίνης), ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1 μM έως 1 mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC₅₀ και στην συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i, οι οποίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.8**.

Συνολικά, το μετάλλαγμα AncXanQ-5M είναι ένας μεταφορέας ειδικός για την ξανθίνη με προφίλ εξειδίκευσης παρόμοιο με αυτό του XanQ.

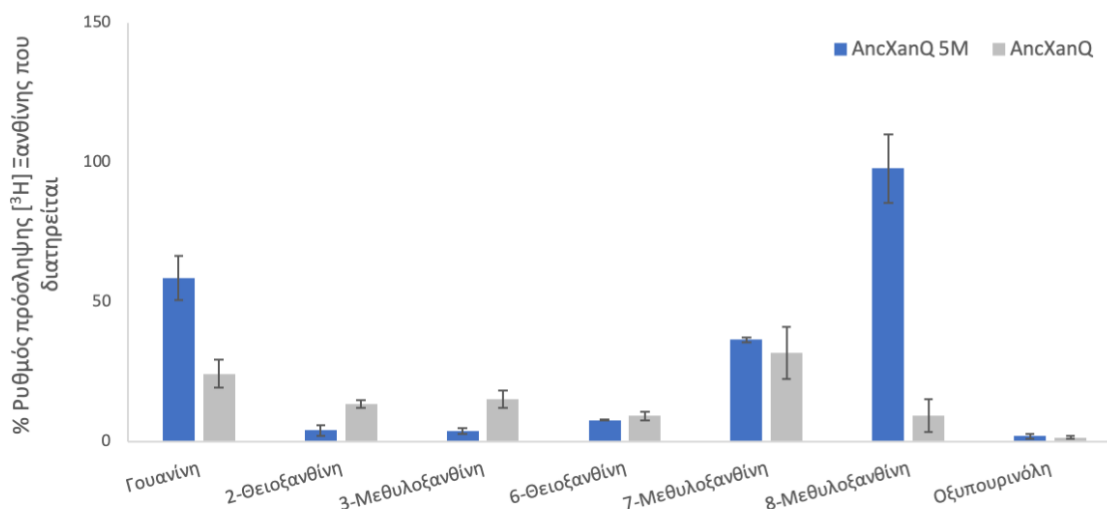


Εικόνα 3.24. Ανάλυση των επιπέδων στη μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης και $[^3\text{H}]$ γουανίνης του AncXanQ και του μεταλλάγματος AncXanQ 5M. (α) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραίωση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (β) *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (1μM) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης (0.1μM), στους 25°C. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 5 έως 15 sec). Σε κάθε περίπτωση, έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 με κενό φορέα pT7-5) και οι τελικές τιμές παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που εκφράζουν τον XanQ και τον GhxP, αντίστοιχα. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Περμεάση	Υπόστρωμα που μεταφέρει	K_M (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max} / K_M (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)
AncXanQ	Ξανθίνη	6.5 (±0.9)	2.4 (±0.1)	370
	Γουανίνη	0.24 (±0.05)	0.25 (±0.02)	1040
AncXanQ 5M	Ξανθίνη	4.4 (±1.5)	3.9 (±0.3)	870

Πίνακας 3.7. Τιμές K_M και V_{max} των AncXanQ και AncXanQ 5M για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (0.1-100 μM) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με

κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.



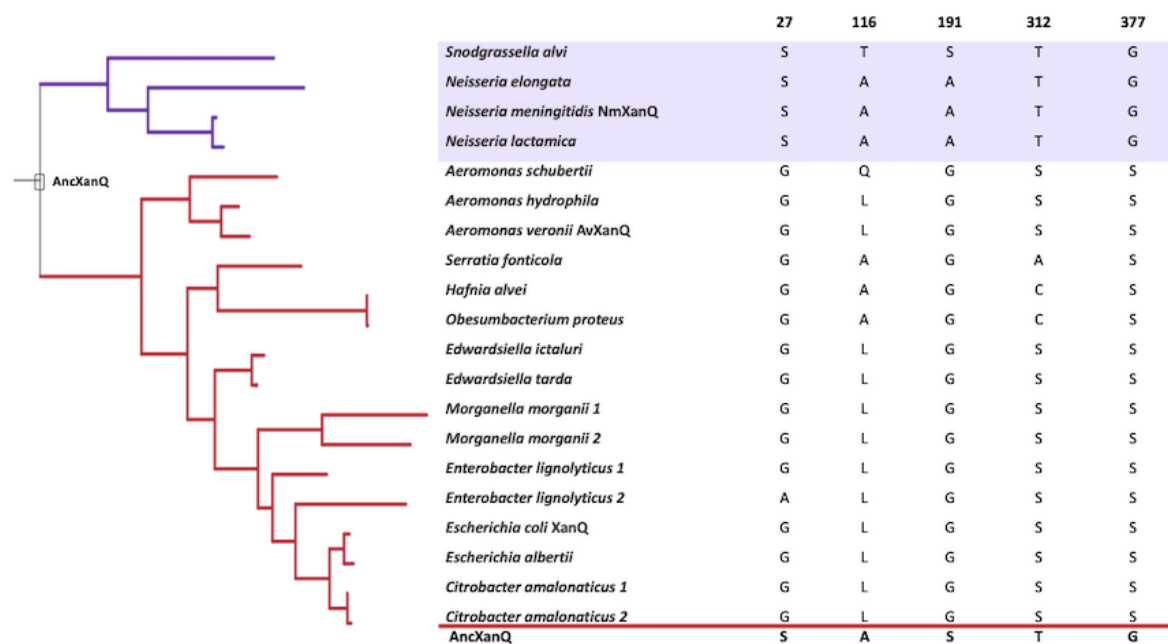
Εικόνα 3.25. Προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncXanQ και του μεταλλάγματος 5M με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM , 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Ανταγωνιστής	Κ _i (μM)	
	AncXanQ	AncXanQ 5M
Γουανίνη	51.6 (±10.8)	n. a.
2-Θειοξανθίνη	111.5 (±14.6)	67.4 (±15.9)
3-Μεθυλοξανθίνη	49.6 (±13.3)	61.3 (±16.9)
6-Θειοξανθίνη	31.1 (±14.3)	46.4 (±12.6)
7-Μεθυλοξανθίνη	213.5 (±27.2)	38.6 (±9.8)
8-Μεθυλοξανθίνη	7.3 (±0.5)	n. a.
Οξυπουρινόλη	7.7 (±2.2)	27.9 (±3.7)

Πίνακας 3.8. Τιμές K_i του προγονικού μεταφορέα *AncXanQ* και του μεταλλάγματος 5M για ανάλογα ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM) στους 25°C, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

3.2.2.2.3 Μια σύγχρονη περμεάση του κλάδου XanQ διατηρεί το προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ

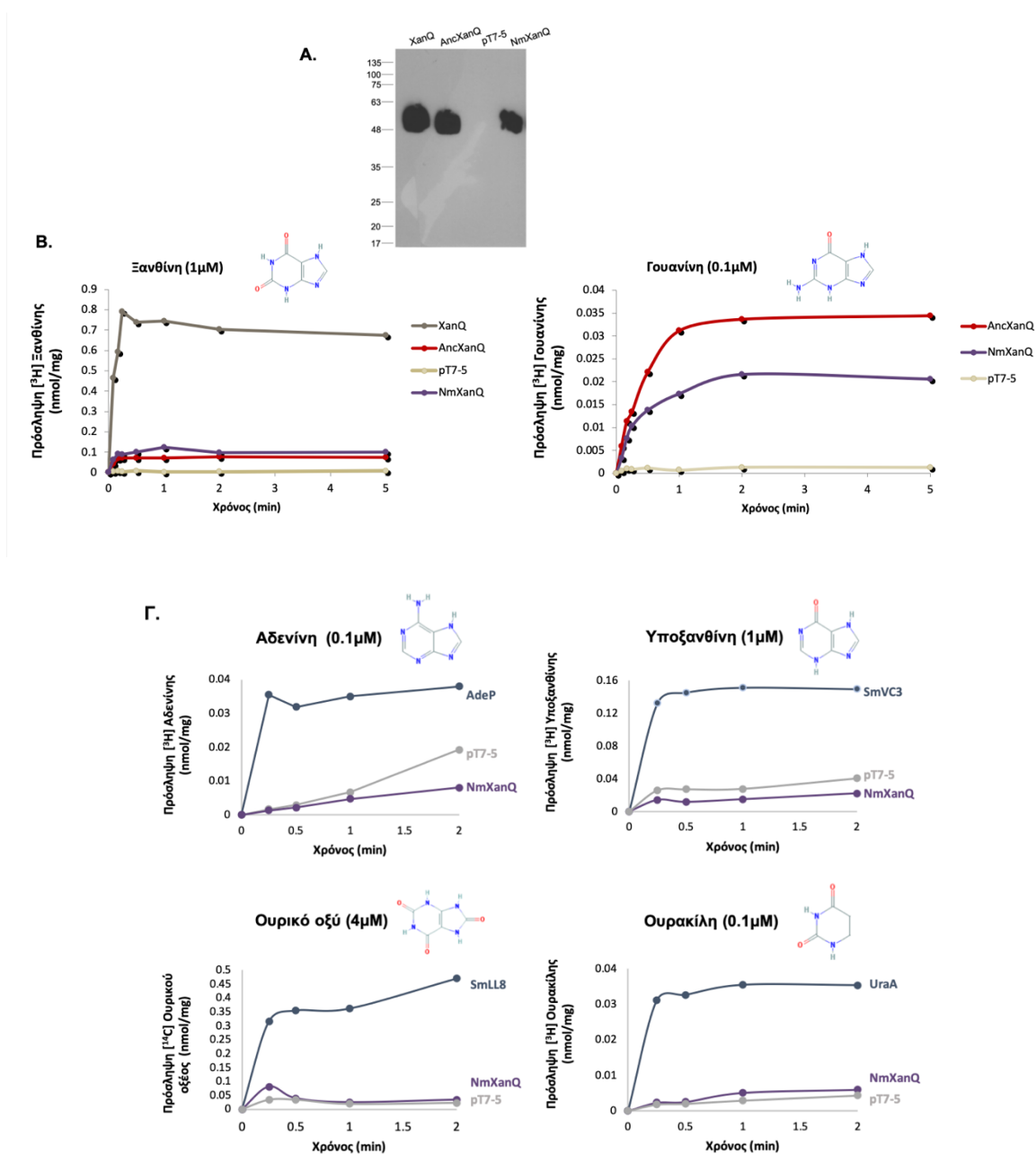
Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα σύγχρονα ομόλογα του κλάδου XanQ, ο συνδυασμός των προαναφερθέντων πέντε χαρακτηριστικών αμινοξέων του AncXanQ, διατηρείται μόνο σε ένα μικρό σύνολο ορθολόγων που έχουν Ser, Ala/Thr, Ser/Ala, Thr και Gly στις αντίστοιχες θέσεις (**Παράρτημα 5, Εικόνα 3.26**). Τα ορθόλογα αυτά προέρχονται από β-πρωτεοβακτήρια, κυρίως του γένους *Neisseria* και αποτελούν έναν ξεχωριστό υποκλάδο στον κλάδο XanQ (**Εικόνα 3.26**). Όλα τα άλλα ομόλογα του κλάδου XanQ που προέρχονται από γ-πρωτεοβακτήρια συντηρούν ένα συνδυασμό Gly, Leu/Ala/Gln, Gly, Ser/Cys/Ala, και Ser στις αντίστοιχες θέσεις. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις επιλέξαμε να μελετήσουμε πειραματικά ένα ομόλογο του κλάδου XanQ, αυτό της *Neisseria meningitidis* (που ονομάστηκε NmXanQ), το οποίο διατηρεί τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα του AncXanQ. Για την ακρίβεια ο NmXanQ περιέχει ένα συνδυασμό Ser27/Ala116/Ala191/Thr312/Gly377, ο οποίος διαφέρει σε ένα κατάλοιπο (Ala191) από τον AncXanQ (Ser191). Για το λόγο αυτό, κατασκευάσαμε επίσης το μετάλλαγμα NmXanQ A191S (βλ. παρακάτω).



Εικόνα 3.26. Διαφορές στις θέσεις 27, 116, 191, 312 και 377 μεταξύ της προγονικής αλληλουχίας *AncXanQ* και των 20 σύγχρονων ομολόγων του υποκλάδου *XanQ*. Στην εικόνα παρουσιάζεται ένα τμήμα της στοίχισης (η πλήρης στοίχιση απεικονίζεται στο **Παράρτημα 5**) της προγονικής αλληλουχίας *AncXanQ* και των 20 ομολόγων που απαρτίζουν τον υποκλάδο *XanQ* (αριστερά) που περιλαμβάνει τις 5 θέσεις αμινοξικών καταλοίπων (27, 116, 191, 312 και 377, αρίθμηση με βάση το μεταφορέα *XanQ*) στις οποίες ο *AncXanQ* διαφέρει από τον *XanQ*. Η ανάλυση αυτή υποδεικνύει ότι ο *AncXanQ* διατηρεί τα αμινοξέα που έχουν σε αυτές τις θέσεις τα ομόλογα από τα β-πρωτεοβακτήρια (μωβ σκίαση). Για τη στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το μεταφορέα NmXanQ (**Παράρτημα 8**) κινητοποιήθηκε από το γονιδιωματικό DNA της *N. meningitidis* και εκφράστηκε μέσω pT7-5 στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli* K-12, ώστε να χαρακτηριστεί λειτουργικά. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά western υπέδειξε ότι το προϊόν του γονιδίου *nmxanq* παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη της *E. coli* (**Εικόνα 3.27A**). Ακολούθησαν δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς μιας σειράς ραδιενεργά σημασμένων υποστρωμάτων (**Εικόνα 3.27 A και B**). Από το σύνολο των πουρινών-πυριμιδινών που ελέγχθησαν διαπιστώθηκε ότι ο NmXanQ μεταφέρει την ξανθίνη αλλά και τη γουανίνη, όπως ο AncXanQ, σε αντίθεση με το σύγχρονο μεταφορέα XanQ, που είναι ειδικός για ξανθίνη (**Εικόνα 3.27 B**). Ακόμη, δε βρέθηκε να μεταφέρει αδερίνη, υποξανθίνη, ουρικό οξύ και ουρακίλη (**Εικόνα 3.27 Γ**). Οι ενεργότητες μεταφοράς του NmXanQ τόσο για την ξανθίνη όσο και για τη γουανίνη αναστέλλονται από

το πρωτονιοφόρο αντιδραστήριο CCCP, υποδηλώνοντας ότι εξαρτώνται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης πρωτονίων (Παράρτημα 7).



Εικόνα 3.27. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς πουρινών/πυριμιδινών του ομολόγου XanQ της *N. meningitidis* (NmXanQ) μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (80μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αρραίωση 1:50,000 και

οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Κλάσματα μεμβρανών από *E. coli* K-12 που εκφράζουν εξωχρωμοσωμικά τις περμεάσες XanQ και AncXanQ χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) και [^3H] γουανίνης (0.1 μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Γ. Πειράματα διαμεμβρανικής μεταφοράς για την πρόσληψη [^3H] αδερίνης (0.1 μM), [^3H] υποξανθίνης (1 μM), [^{14}C] ουρικού οξέος (4 μM) και [^3H] ουρακίλης (0.1 μM). Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. [Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί μεταφορείς αδερίνης AdeP (Papakostas et al., 2013), υποξανθίνης/γουανίνης/αδερίνης SmVC3 (SmAGHXt) (Botou et al., 2020), ουρικού οξέος SmLL8 (SmUacT1) (Botou et al., 2020) και ουρακίλης UraA (Botou et al., 2018)].

Από την ανάλυση κινητικής που πραγματοποιήθηκε για την ξανθίνη και τη γουανίνη υποδεικνύεται ότι ο NmXanQ μεταφέρει ξανθίνη με παρόμοια συγγένεια και ικανότητα μεταφοράς με τον AncXanQ (8 φορές χαμηλότερη ικανότητα μεταφοράς σε σχέση με τον XanQ) και γουανίνη με 7 φορές χαμηλότερη συγγένεια και 10 φορές χαμηλότερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τον AncXanQ (K_M 1.56 μM , $V_{\max}/K_M$ 110) (Πίνακας 3.9).

Ξανθίνη

Περμεάση	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
XanQ (wt)	4.1 (± 0.5)	7.5 (± 1.1)	1830
AncXanQ	6.5 (± 0.9)	2.3 (± 0.1)	370
NmXanQ	11.8 (± 3.5)	2.5 (± 0.2)	210

Γουανίνη

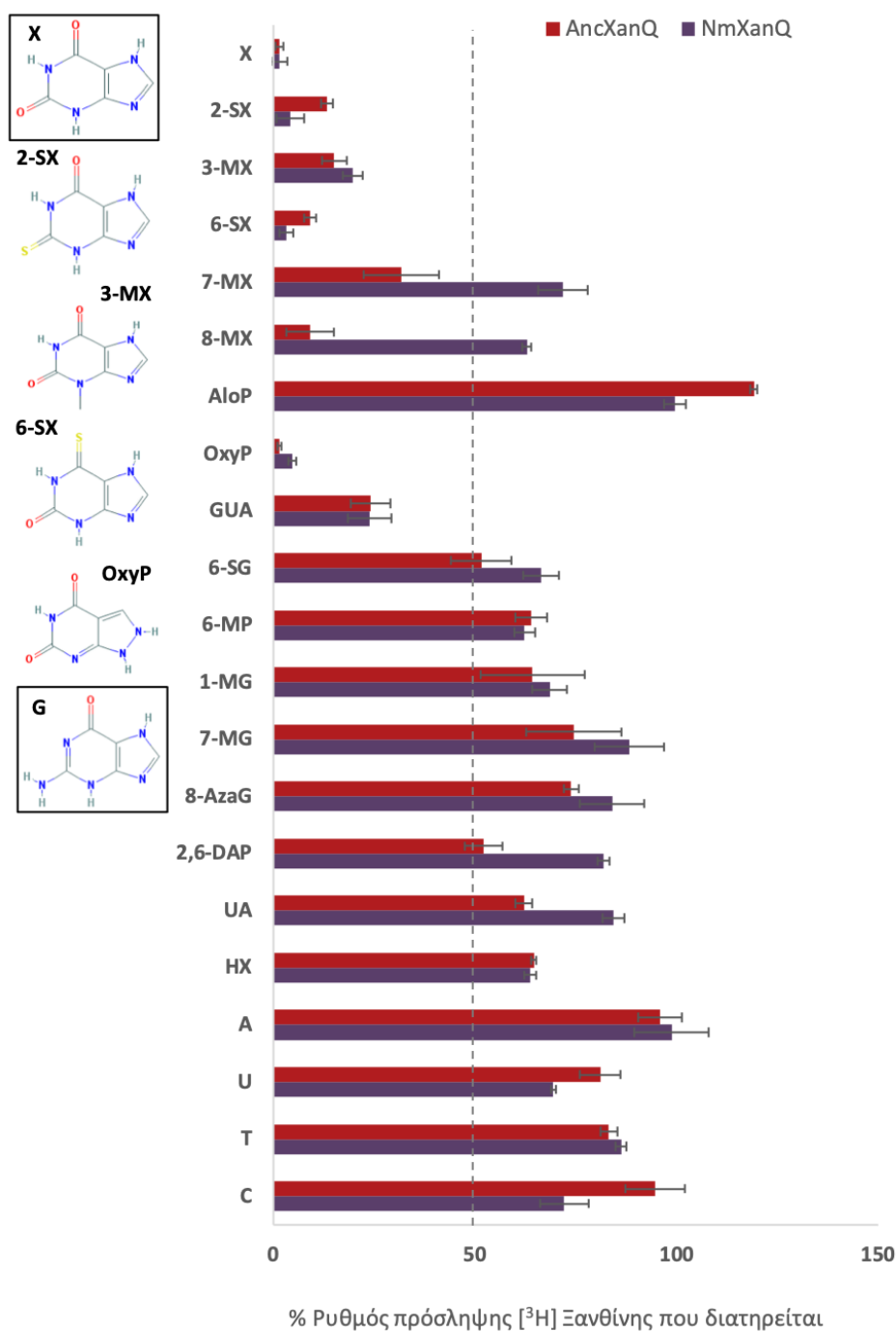
Περμεάση	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
AncXanQ	0.24 (± 0.05)	0.25 (± 0.02)	1040
NmXanQ	1.56 (± 0.07)	0.17 (± 0.01)	110

Πίνακας 3.9. Τιμές K_M και $V_{\max}$ του μεταφορέα NmXanQ για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [^3H] γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με

κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.

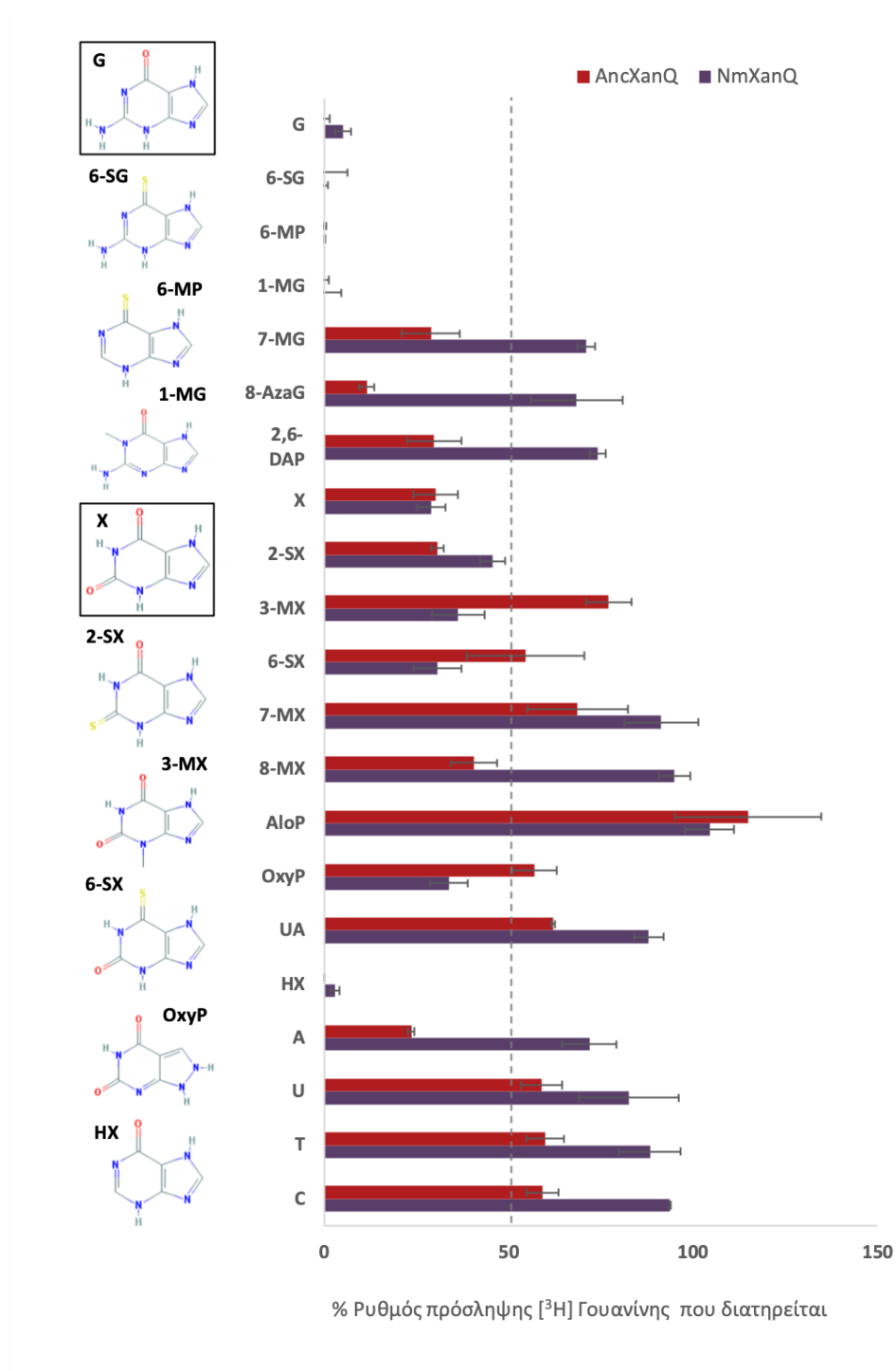
Για να αναλυθεί το προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ, διενεργήσαμε πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [3H] ξανθίνης (1 μM) και [3H] γουανίνης (0.1 μM) από μια σειρά πιθανών προσδετών. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης του NmXanQ αναστέλλεται με υψηλή συγγένεια από τη γουανίνη (K_i 29 μM) και από τα ανάλογα 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και οξυπουρινόλη, αλλά όχι από την 7-μεθυλξανθίνη, την 8-μεθυλξανθίνη ή το ουρικό οξύ (**Εικόνα 3.28** και **Πίνακας 3.10**). Από τα ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζονταν από τον NmXanQ, όλα αναγνωρίζονται και από τον AncXanQ, ο οποίος αναγνωρίζει επιπλέον τις 7- και 8-μεθυλοξανθίνη. Όσο αφορά στην ενεργότητα πρόσληψης γουανίνης, αναστέλλεται με υψηλή συγγένεια από ξανθίνη (K_i 50.6 μM), υποξανθίνη, 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη και 1-μεθυλγουανίνη, αλλά όχι από αδενίνη, 2,6-διαμινοπουρίνη, 7-μεθυλγουανίνη ή 8-αζαγουανίνη (**Εικόνα 3.29**, **Πίνακας 3.10**). Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η σύγχρονη περμεάση NmXanQ έχει ευρύτερη εξειδίκευση από το μεταφορέα XanQ, αλλά λιγότερο διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης συγκριτικά με τον προγονικό μεταφορέα AncXanQ (**Πίνακας 3.10**).

Το μετάλλαγμα NmXanQ A191S εμφανίζει τις ίδιες ακριβώς οι λειτουργικές ιδιότητες, υποδεικνύοντας ότι η θέση Ala/Ser191 δεν είναι σημαντική για την εξειδίκευση (**Παράρτημα 9**).



Εικόνα 3.28. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα NmXanQ συγκριτικά με τον προγονικό μεταφορέα AncXanQ με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν

έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (*S.D*) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.29. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα NmXanQ συγκριτικά με τον προγονικό μεταφορέα AncXanQ με ανταγωνισμό ως προς τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0.1 μM, 25°C) μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη ραδιοενεργά σημασμένους προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι

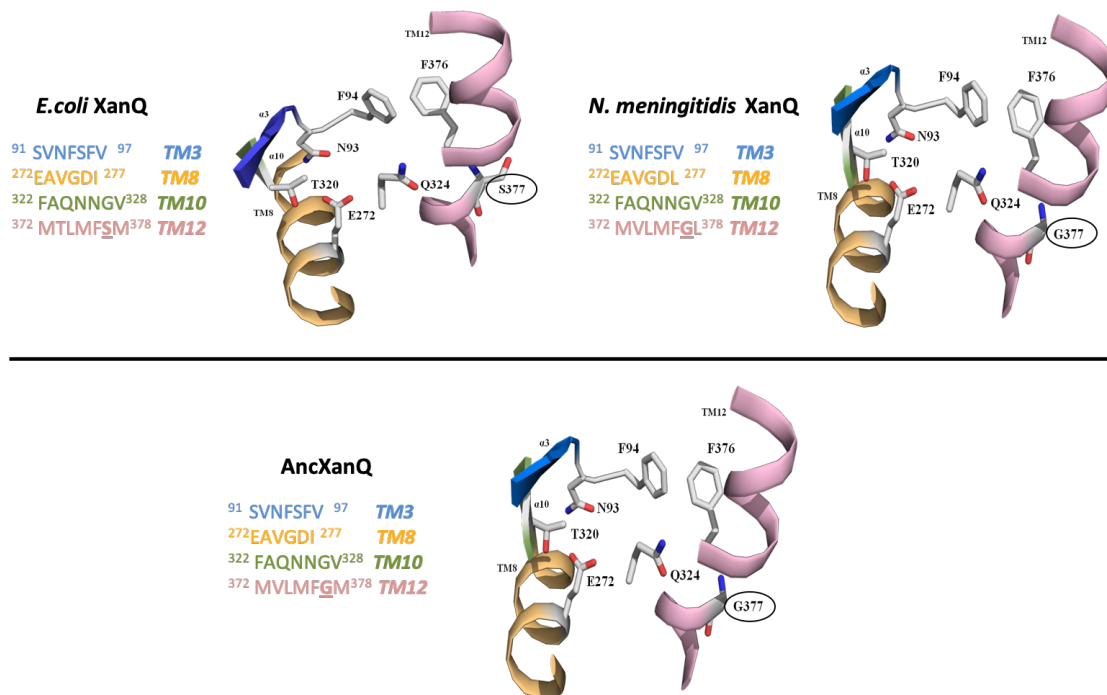
ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Ανταγωνιστής	K _i (μM)		
	ΧanQ	AncΧanQ	NmΧanQ
Πρόσληψη ξανθίνης			
Γουανίνη	n. a.	51.6 (±10.8)	29.0 (±6.0)
2-Θειοξανθίνη	91.1 (±10.1)	111.5 (±14.6)	38.4 (±5.8)
3-Μεθυλοξανθίνη	71.9 (±9.2)	49.6 (±13.3)	62.8 (±11.8)
6-Θειοξανθίνη	40.6 (±8.3)	31.1 (±14.3)	41.3 (±8.5)
7-Μεθυλοξανθίνη	n. a.	213.5 (±27.2)	n. a.
8-Μεθυλοξανθίνη	n. a.	7.3 (±0.5)	n. a.
Οξυπουρινόλη	29.1 (±3.8)	7.7 (±2.2)	2.7 (±0.8)
Πρόσληψη γουανίνης			
Ξανθίνη	n. a.	54.9 (±4.0)	50.6 (±8.5)
Υποξανθίνη	n. a.	5.2 (±0.2)	21.1 (±5.2)
Αδενίνη	n. a.	139.4 (±18.0)	n. a.
6-Θειογουανίνη	n. a.	2.4 (±0.3)	6.4 (±2.5)
6-Μερκαπτοπουρίνη	n. a.	1.9 (±0.2)	5.6 (±1.0)
1-Μεθυλογουανίνη	n. a.	2.2 (±0.5)	22.1 (±5.1)
7-Μεθυλογουανίνη	n. a.	154.5 (±48.5)	n. a.
8-Αζαγουανίνη	n. a.	40.2 (±10.1)	n. a.
2,6-Διαμινοπουρίνη	n. a.	67.2 (±13.5)	n. a.

Πίνακας 3.10. Τιμές K_i του μεταφορέα NmΧanQ για μια σειρά αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων. Κύτταρα E. coli T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0,1μM) στους 25°C, μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0,1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5-15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα E. coli T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC₅₀ εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and

Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [3H] ξανθίνης ή [3H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

Με την ολοκλήρωση του λειτουργικού χαρακτηρισμού του ομολόγου της *N. meningitidis* διαπιστώνουμε πως ο NmXanQ, όπως και ο AncXanQ είναι ευρείας εξειδίκευσης μεταφορέας ξανθίνης και γουανίνης, ενώ ο XanQ είναι ειδικός για τη μεταφορά της ξανθίνης. Δεδομένου ότι όλα τα σημαντικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στο μηχανισμό της δέσμευσης και μεταφοράς του υποστρώματος είναι ίδια στο υπόβαθρο και τριών μεταφορέων XanQ, NmXanQ και AncXanQ (Εικόνα 3.30), συμπεραίνουμε ότι η παρουσία των καταλοίπων Ser27/Ala116/Ser(ή Ala)191/Thr312/Gly377 στον κλάδο XanQ συσχετίζεται πιθανόν με μια ευρεία εξειδίκευση (ξανθίνη και γουανίνη), εφόσον ο συνδυασμός Gly27/Leu116/Gly191/Ser312/Ser377, υποδεικνύει εξειδίκευση για την ξανθίνη. Για να διερευνήσουμε πληρέστερα το ρόλο των παραπάνω θέσεων και κυρίως της θέσης Ser/Gly377, η οποία βρίσκεται δίπλα στη Phe376 που έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα (Karena *et al.*, 2015), μελετήσαμε μια σειρά μεταλλαγμάτων στο υπόβαθρο των τριών μεταφορέων AncXanQ, NmXanQ και XanQ, όπως αναλύεται στην επόμενη ενότητα.



Εικόνα 3.30. Δομική απεικόνιση και απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος των XanQ, NmXanQ και AncXanQ. Σημειώνονται τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο μηχανισμό δέσμευσης του υποστρώματος, καθώς και οι διαφορές στη θέση 377 (σε μαύρο κύκλο) μεταξύ του

XanQ (Ser) και των *NmXanQ* (Gly) και *AncXanQ* (Gly) που αποτέλεσαν στόχους μεταλλαξιγένεσης. Η ξανθίνη αλληλεπιδρά στο κέντρο δέσμευσης με τα κατάλοιπα *Gln*-324, *Glu*-272, *Phe*-94 και *Ala*-323, ενώ η *Phe*-376 (TM12) εμφανίζει π-π αλληλεπιδράσεις με την ξανθίνη και την αμιδική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του *Gln*-324 (Karena *et al.*, 2015). Η παρουσία της γλυκίνης, ίσως επιτρέπει μεγαλύτερη ευελιξία στην κίνηση του TM12, το οποίο συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις των παραπάνω αμινοξέων, επιτρέποντας τη μεταφορά της γουανίνης, όπως αναμένεται να αποδειχθεί και από τα πειράματα μεταλλαξιγένεσης. Τα δομικά μοντέλα δημιουργήθηκαν με βάση το δομικό πρότυπο του *UapA* (PDB ID 5I6C) (Alguel *et al.*, 2016), με το διαδικτυακό εργαλείο SWISS-MODEL, ενώ η οπτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα PyMOL.

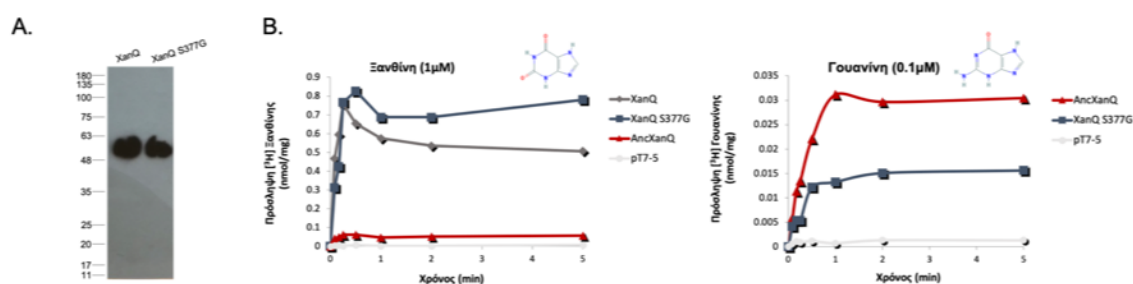
3.2.2.2.4 Ο ρόλος της θέσης Ser/Gly 377 στην εξειδίκευση

Με βάση τα αποτελέσματα μας οι *AncXanQ* και *NmXanQ* είναι ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς ξανθίνης και γουανίνης, ενώ ο *XanQ* και ο *AncXanQ*-5M είναι ειδικοί για την ξανθίνη. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι η παρουσία των καταλοίπων Ser27/Ala116/Ser (ή Ala)191/Thr312/Gly377 στον κλάδο *XanQ* συσχετίζεται με μια ευρεία εξειδίκευση για πουρίνες, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο συνδυασμός Gly27/Leu116/Gly191/Ser312/Ser377, υποδεικνύει εξειδίκευση για την ξανθίνη. Από τις πέντε αυτές θέσεις, στην ανασυσταθείσα προγονική αλληλουχία του *AncXanQ*, η μόνη που συντηρείται με πιθανότητα >90% είναι η Gly377. Για τις θέσεις Ser27 και Thr312 η πιθανότητα είναι 50% -90%, ενώ για την Ala116 και τη Ser191 τα ποσοστά εμφάνισης είναι <50% (Παράρτημα 3, Πίνακας Π1). Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η Ser/Gly377 είναι ένα από τα τέσσερα χαρακτηριστικά κατάλοιπα του κλάδου *XanQ* (Παράρτημα 6), ενώ βρίσκεται ακριβώς δίπλα σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο Phe/Tyr (Phe376 στον *XanQ*), το οποίο με βάση τα δεδομένα από τη δομική μοντελοποίηση των *UapA* (Alguel *et al.*, 2016) και *UraA* (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) συμμετέχει στο συντονισμό του υποστρώματος στην ανοιχτή προς τα έξω διαμόρφωση της περμεάσης. Για να διερευνήσουμε λεπτομερέστερα το ρόλο της Ser/Gly377, κατασκευάσαμε και μελετήσαμε λειτουργικά μια σειρά μεταλλαγμάτων στα υπόβαθρα και των τριών μεταφορέων *XanQ*, *NmXanQ* και *AncXanQ*, ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των οποίων αναλύεται στις επόμενες ενότητες.

3.2.2.2.4.1 Η παρουσία της Gly στη θέση 377 είναι ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση του *XanQ*

Αρχικά, εξετάσαμε εάν η εισαγωγή της Gly αντί της Ser στη θέση 377 στο υπόβαθρο μιας περμεάσης ειδικής για την ξανθίνη είναι επαρκής για να διευρύνει την εξειδίκευση. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε λειτουργικά το μετάλλαγμα S377G στο υπόβαθρο του XanQ. Από τη λειτουργική ανάλυση προκύπτει ότι ο XanQ-S377G εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων *E. coli* K-12 (T184), παρόμοια με αυτά του XanQ φυσικού τύπου (**Εικόνα 3.31 A**) και πράγματι, διαπιστώθηκε πως μπορεί να μεταφέρει την ξανθίνη (σε παρόμοια επίπεδα με τον XanQ φυσικού τύπου), αλλά και τη γουανίνη σε χαμηλά επίπεδα ενεργότητας (**Εικόνα 3.31 B**). Η κινητική ανάλυση υποδεικνύει ότι το μονό μετάλλαγμα στη θέση 377 έχει παρόμοιες κινητικές ιδιότητες με τον XanQ φυσικού τύπου ως προς την ξανθίνη, υψηλή συγγένεια (K_M 0.57 μ M) για τη γουανίνη, αλλά σημαντικά μειωμένη ικανότητα για τη μεταφορά της (**Πίνακας 3.11**).

Για να εξεταστεί προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης, από μια σειρά πιθανών προσδετών (**Εικόνες 3.32 και 3.33**). Από τα αποτελέσματα υποδεικνύεται ότι η ενεργότητα ξανθίνης αναστέλλεται από τη γουανίνη (K_i 42.3 μ M), τη 2-θειοξανθίνη, την 6-θειοξανθίνη και την οξυπουρινόλη, αλλά όχι από την 7-μεθυλοξανθίνη, την 8-μεθυλοξανθίνη και το ουρικό οξύ. Παράλληλα, το μετάλλαγμα XanQ-S377G διαφέρει τόσο από τον AncXanQ, όσο και από τον XanQ φυσικού τύπου, στη μη αναγνώριση της 3-μεθυλοξανθίνης (**Εικόνα 3.32, Πίνακας 3.12**). Όσο αφορά στην ενεργότητα πρόσληψης της γουανίνης, αυτή αναστέλλεται από την ξανθίνη (K_i 22.3 μ M), την υποξανθίνη, την 1-μεθυλογουανίνη, την 6-θειογουανίνη, την 6-μερκαπτοπουρίνη και την 7-μεθυλογουανίνη, αλλά όχι από την αδενίνη, 2,6-διάμινοπουρίνη και την 8-άζαγουανίνη (**Εικόνα 3.33, Πίνακας 3.12**).

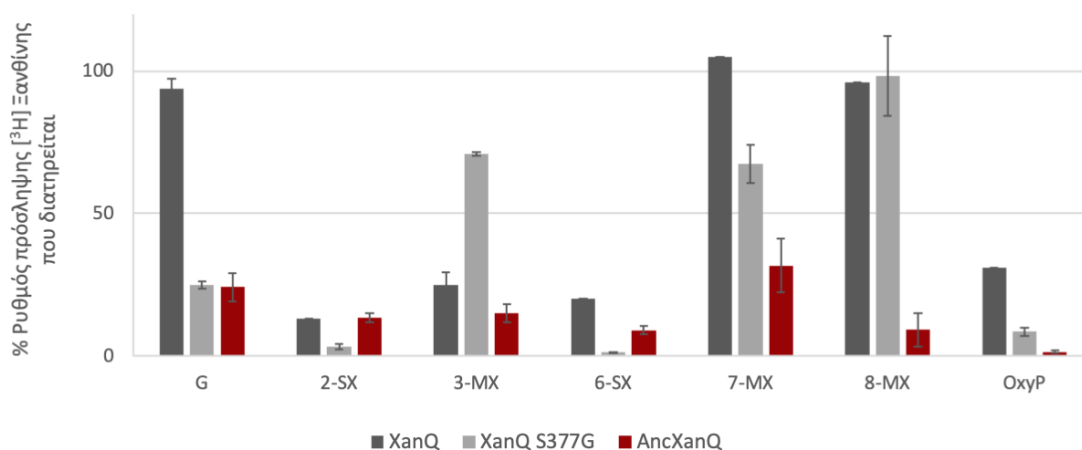


Εικόνα 3.31. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς [3 H] ξανθίνης και [3 H] γουανίνης του μεταλλάγματος XanQ S377G. (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (80 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση

SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) και [^3H] γουανίνης (0.1 μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

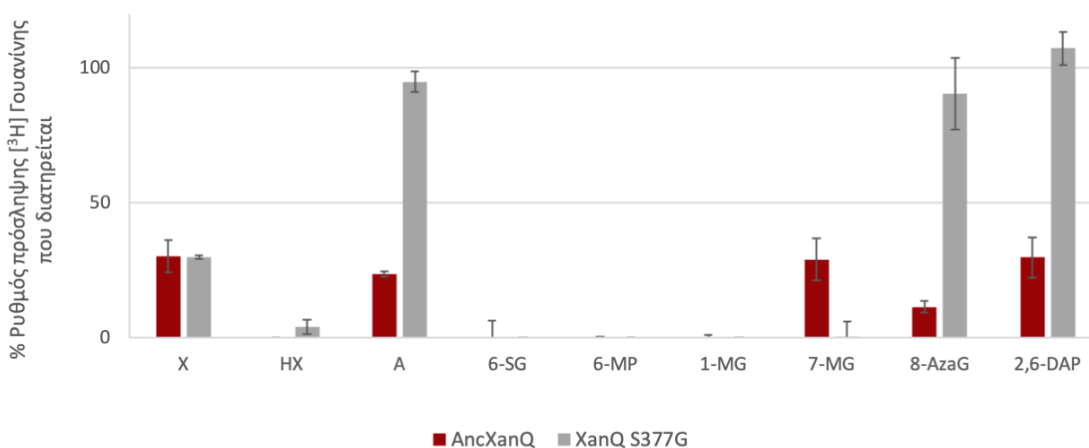
Ξανθίνη			
Περμεάση	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
XanQ (wt)	4.1 (± 0.5)	7.5 (± 1.1)	1830
XanQ/S377G	3.6 (± 1.3)	11.8 (± 1.2)	2880
AncXanQ	6.5 (± 0.9)	2.3 (± 0.1)	370
Γουανίνη			
Περμεάση	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
XanQ/S377G	0.57 (± 0.18)	0.16 (± 0.02)	280
AncXanQ	0.24 (± 0.05)	0.25 (± 0.02)	1040

Πίνακας 3.11. Τιμές K_m και $V_{\max}$ του μεταλλάγματος XanQ S377G για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [^3H] γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και $V_{\max}$ εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.



Εικόνα 3.32. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος XanQ S377G με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη.

Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης ($1\mu\text{M}$, 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδότες (1mM) για 5min . Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα $5\text{-}15\text{ sec}$. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδότες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.33. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος XanQ S377G με ανταγωνισμό ως προς τη γουανίνη.

Κύτταρα *E. coli* JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]γουανίνης ($0.1\mu\text{M}$, 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδότες (1mM) για 5min . Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec . Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδότες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

K_i (μM)			
Ανταγωνιστής	XanQ	XanQ/S377G	AncXanQ
Πρόσληψη ξανθίνης			
Γουανίνη	n. a.	42.3 (±11.9)	51.6 (±10.8)
2-Θειοξανθίνη	91.1 (±10.1)	71.5 (±17.4)	111.5 (±14.6)
3-Μεθυλοξανθίνη	71.9 (±9.2)	n. a.	49.6 (±13.3)
6-Θειοξανθίνη	40.6 (±8.3)	3.0 (±0.8)	31.1 (±14.3)
7-Μεθυλοξανθίνη	n. a.	n. a.	213.5 (±27.2)
8-Μεθυλοξανθίνη	n. a.	n. a.	7.3 (±0.5)
Οξυπουρινόλη	29.1 (±3.8)	3.0 (±0.2)	7.7 (±2.2)
Πρόσληψη γουανίνης			
Ξανθίνη	n. a.	22.3 (±5.1)	54.9 (±4.0)
Υποξανθίνη	n. a.	17.8 (±5.3)	5.2 (±0.2)
Αδενίνη	n. a.	n. a.	139.4 (±18.0)
6-Θειογουανίνη	n. a.	4.5 (±2.1)	2.4 (±0.3)
6-Μερκαπτοπουρίνη	n. a.	15.0 (±2.7)	1.9 (±0.2)
1-Μεθυλογουανίνη	n. a.	6.6 (±0.3)	2.2 (±0.5)
7-Μεθυλογουανίνη	n. a.	3.6 (±1.5)	154.5 (±48.5)
8-Αζαγουανίνη	n. a.	n. a.	40.2 (±10.1)
2,6-Διαμινοπουρίνη	n. a.	n. a.	67.2 (±13.5)

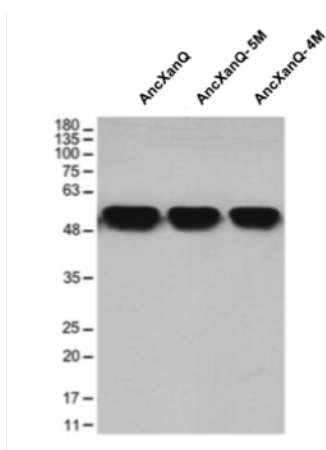
Πίνακας 3.12. Τιμές K_i του μεταλλάγματος XanQ S377G για μια σειρά αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0,1μM) στους 25°C, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0,1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5-15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC₅₀ εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για στιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H] ξανθίνης ή της [³H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

3.2.2.2.4.2 Η επαναφορά της Gly στη θέση 377 δεν είναι ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση του AncXanQ- 5M

Η παρουσία της της Gly στη θέση 377 εξετάστηκε και στο υπόβαθρο ενός ακόμη μεταφορέα ειδικού για την ξανθίνη, αυτό του AncXanQ-5M. Στο υπόβαθρο του AncXanQ-5M, έγινε επαναφορά της Gly στη θέση 377 και έτσι προέκυψε ένα τετραπλό μετάλλαγμα, το οποίο περιλαμβάνει τις αλλαγές (S27G/A116L/S191G/T312S) και ονομάστηκε AncXanQ-4M.

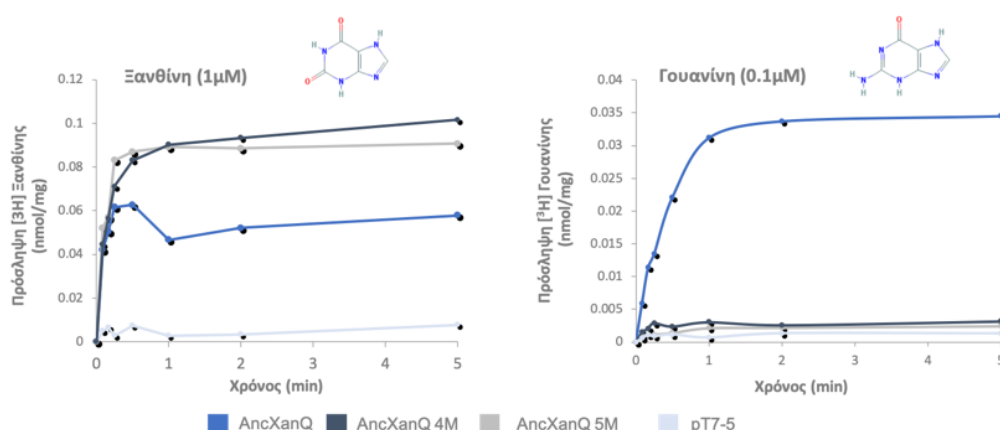
Το μετάλλαγμα AncXanQ-4M εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη της *E. coli* K-12 (Εικόνα 3.34), μεταφέρει την ξανθίνη με κινητικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του AncXanQ (K_M 9.5 μ M, V_{max} 4.9 nmol min⁻¹ mg⁻¹), αλλά όπως και ο AncXanQ-5M δε μπορεί να μεταφέρει τη γουανίνη (Εικόνα 3.35, Πίνακας 3.13). Ακόμη, το προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ-4M διαφοροποιείται ελάχιστα από αυτό του AncXanQ-5M, καθώς ο AncXanQ-4M αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια τη 2-θειοξανθίνη, την 3-μεθυλοξανθίνη, την 6-θειοξανθίνη και την οξυπουρινόλη, αλλά όχι την 7-μεθυλοξανθίνη (Εικόνα 3.36, Πίνακας 3.14). Για τα ανάλογα ξανθίνης τα οποία φάνηκε να αναγνωρίζονται σε σημαντικό βαθμό (αναστολή ενεργότητας πάνω από 50% από τον πιθανό προσδέτη σε 1000x μοριακή περίσσεια έναντι ξανθίνης), ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1 μ M έως 1mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC₅₀ και στην συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i , οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.14.

Η αντικατάσταση, συνεπώς, της Ser377 με Gly σε αυτή την περίπτωση δεν είναι επαρκής για να αποκατασταθεί η ευρεία εξειδίκευση του AncXanQ.



Εικόνα 3.34. Ανάλυση των επιπέδων στη μεμβράνη των AncXanQ, AncXanQ- 4M και AncXanQ- 5M. (α) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (80μg ολικής πρωτεΐνης ανά

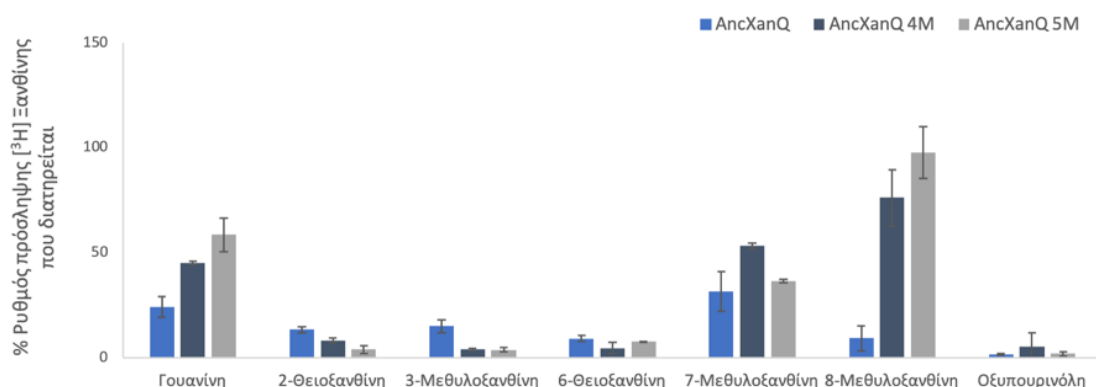
διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.35. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης και $[^3\text{H}]$ γουανίνης των *AncXanQ*, *AncXanQ 4M* και *AncXanQ 5M*. *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (1 μM) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης (0.1 μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
AncXanQ	6.5 ($\pm$ 0.9)	2.4 ($\pm$ 0.1)	370
AncXanQ 4M	9.5 ($\pm$ 0.8)	4.9 ($\pm$ 0.2)	520
AncXanQ 5M	4.4 ($\pm$ 1.5)	3.9 ($\pm$ 0.3)	870

Πίνακας 3.13. Τιμές K_m και $V_{\max}$ των *AncXanQ*, *AncXanQ 4M* και *AncXanQ 5M* για την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (0.1-100 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 10 και 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και $V_{\max}$ εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.



Εικόνα 3.36. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος *AncXanQ* 4M. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM , 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα *pT7-5*) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Ανταγωνιστής	Κ _i (μM)		
	AncXanQ	4M	5M
Γουανίνη	51.6 (±10.8)	n. a.	n. a.
2-Θειοξανθίνη	111.5 (±14.6)	49.6 (±11.1)	67.4 (±15.9)
3-Μεθυλοξανθίνη	49.6 (±13.3)	41.2 (±11.8)	61.3 (±16.9)
6-Θειοξανθίνη	31.1 (±14.3)	2.7 (±0.4)	46.4 (±12.6)
7-Μεθυλοξανθίνη	213.5 (±27.2)	n. a.	38.6 (±9.8)
8-Μεθυλοξανθίνη	7.3 (±0.5)	n. a.	n. a.
Οξυπουρινόλη	7.7 (±2.2)	3.1 (±0.2)	27.9 (±3.7)

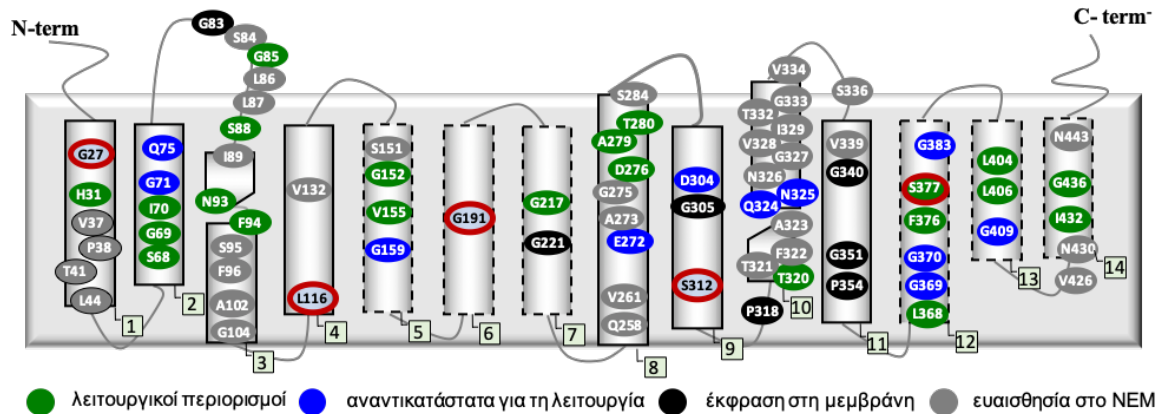
Πίνακας 3.14. Τιμές Κ_i του προγονικού μεταφορέα *AncXanQ* και των μεταλλαγμάτων 4M και 5M για ανάλογα ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) στους 25°C, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1 μM -1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα *pT7-5*) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC₅₀

εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [3H] ξανθίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

3.2.2.2.4.3 Κανένα άλλο μετάλλαγμα μονής αντικατάστασης πέραν του S377G δε μπορεί να διευρύνει το προφίλ εξειδίκευσης του XanQ

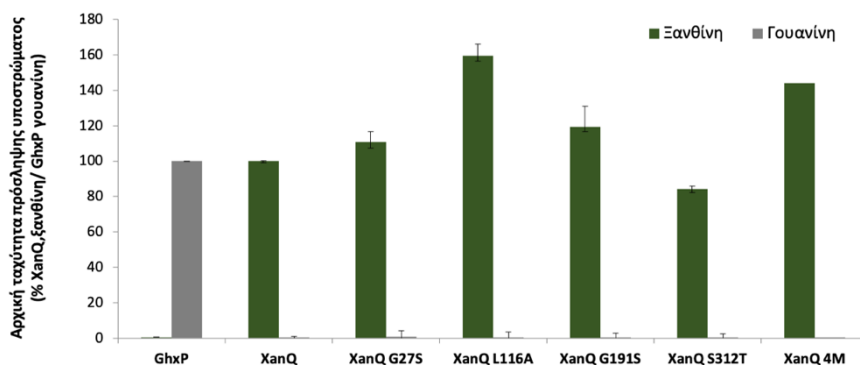
Ο μεταφορέας XanQ έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια στο εργαστήριο μας με συστηματική μεταλλαξιγένεση (Εικόνα 3.37). Μάλιστα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής για να ολοκληρώσουμε τη μελέτη των διαμεμβρανικών τμημάτων TM1 και TM2, εξετάσαμε με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) όλες τις θέσεις που δεν είχαν μελετηθεί (Παράρτημα 10). Παρά το μεγάλο αριθμό αντικαταστάσεων που έχουν πραγματοποιηθεί στο μεταφορέα XanQ (>80% των καταλοίπων του έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση), καμία μεταλλαγή εκτός από τη S377G δεν ήταν ικανή να αλλάξει ουσιαστικά το αυστηρό προφίλ εξειδίκευσης για την ξανθίνη και να επιτρέψει τη μεταφορά και άλλων υποστρωμάτων (Frillingos, 2012; Karena *et al.*, 2015). Για να μελετηθεί περαιτέρω η συνεισφορά της κάθε μιας από τις 5 προαναφερθείσες θέσεις, στις οποίες ο XanQ διαφέρει από τον AncXanQ (Εικόνα 3.21 και Εικόνα 3.23), στην εξειδίκευση του μεταφορέα XanQ κατασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά 4 ακόμη μονά μεταλλάγματα στο υπόβαθρο του XanQ (G27S, L116A, G191S και S312T), καθώς ένα συνδυαστικό μετάλλαγμα που περιλαμβάνει και τις τέσσερις αλλαγές, XanQ-4M (G27S, L116A, G191S και S312T).

Τοπολογικό μοντέλο XanQ



Εικόνα 3.37. Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα XanQ. Το παρουσιαζόμενο μοντέλο προκύπτει από *in silico* ανάλυση με το πρόγραμμα TMHMM. Οι 14 διαμεμβρανικές έλικες (TMs 1-14), οργανώνονται στην περιοχή του «πυρήνα» (core domain) (περιβάλλονται από έντονο περίγραμμα) και στην περιοχή της «εισόδου» (gate domain). Μέσα σε κύκλο απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που έχουν μελετηθεί με στοχευμένη μεταλλαξιογένεση στον XanQ στις αντίστοιχες θέσεις και έχει αποδειχθεί πως είναι σημαντικά για τη λειτουργικότητα του μεταφορέα. (Karatza et al., 2006; Georgopoulou et al., 2010; Mermelekas et al., 2010; Parakostas et al., 2008; Karena and Frillingos, 2009; Karena and Frillingos, 2011; Karena et al., 2015; παρούσα εργασία). Με μπλε χρώμα επισημαίνονται τα κατάλοιπα που είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία του μεταφορέα, με πράσινο οι θέσεις που αντιστοιχούν σε κατάλοιπα τα οποία υπόκεινται σε λειτουργικούς περιορισμούς σε σχέση με τις επιτρεπόμενες αντικαταστάσεις των πλευρικών ομάδων, με μαύρο τα κατάλοιπα που επηρεάζουν την έκφραση στη μεμβράνη και με γκρι κατάλοιπα που εμφανίζουν υψηλή ή μέτρια ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM. Οι αμινοξικές θέσεις που μελετώνται στην παρούσα διατριβή και αποτελούν τις διαφορές μεταξύ XanQ και ApcXanQ σημειώνονται με κόκκινο περίγραμμα. Με μαύρο περίγραμμα επισημαίνονται τα κατάλοιπα του πρώτου διαμεμβρανικού τμήματος τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (Παράρτημα 10).

Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας τους, τα μεταλλάγματα μετασχηματίστηκαν σε κατάλληλα στελέχη *E.coli* και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της έκφρασής τους στη μεμβράνη και η ικανότητά τους να καταλύουν ενεργό μεταφορά ξανθίνης και γουανίνης. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι όλα τα μεταλλάγματα εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη (Εικόνα 3.40, A) και όλα μεταφέρουν μόνο την ξανθίνη και όχι τη γουανίνη όπως και ο XanQ(wt) (Εικόνα 3.38). Ακόμη, ανάλυση κινητικής υπέδειξε όλα τα μεταλλάγματα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την ξανθίνη (Πίνακας 3.15).

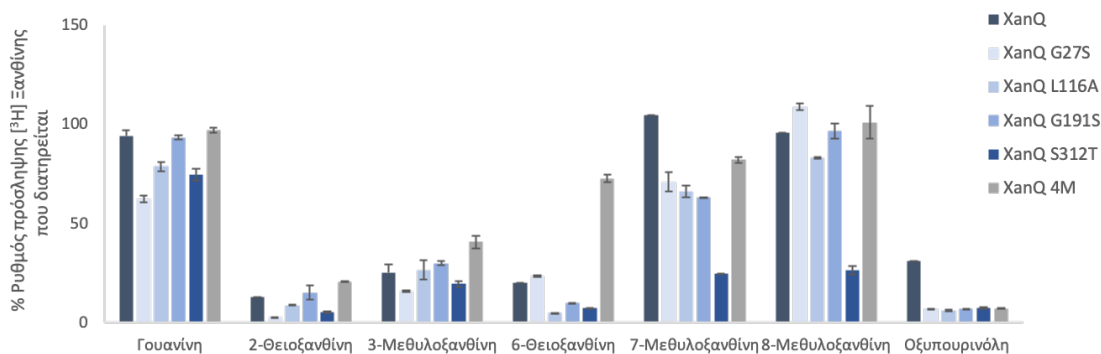


Εικόνα 3.38. Ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς [^3H] ξανθίνης και [^3H] γουανίνης των μεταλλαγμάτων, *XanQ* G27S, L116A, G191S, S312T και 4M. *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) και [^3H] γουανίνης (0.1 μM), στους 25°C. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 5 έως 15 sec). Σε κάθε περίπτωση, έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 με κενό φορέα pT7-5) και οι τελικές τιμές παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που εκφράζουν τον *XanQ* και τον GhxP, αντίστοιχα. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

	K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$V_{\max} / K_M$ ($\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
XanQ	4.1 ($\pm$ 0.5)	7.5 ($\pm$ 1.1)	1830
XanQ G27S	12.6 ($\pm$ 2.2)	32.4 ($\pm$ 2.1)	2570
XanQ L116A	6.4 ($\pm$ 0.7)	77.1 ($\pm$ 3.1)	12040
XanQ G191S	5.6 ($\pm$ 0.6)	55.8 ($\pm$ 2.5)	9960
XanQ S312T	2.7 ($\pm$ 0.6)	24.9 ($\pm$ 1.7)	9220
XanQ 4M	7.6 ($\pm$ 0.4)	92.7 ($\pm$ 1.2)	12200

Πίνακας 3.15. Τιμές K_m και $V_{\max}$ των *XanQ*, G27S, L116A, G191S, S312T και 4M για την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0.1-100 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 10 και 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και $V_{\max}$ εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης υπέδειξαν ότι όλα τα μεταλλάγματα αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια τη 2-θειοξανθίνη, την 3-μεθυλοξανθίνη και την οξυπουρινόλη, ενώ κανένα δε βρέθηκε να αναγνωρίζει τη γουανίνη (Εικόνα 3.39). Το τετραπλό μετάλλαγμα XanQ-4M σε αντίθεση με τον XanQ(wt) δεν αναγνωρίζει την 6-θειοξανθίνη, ενώ το μετάλλαγμα S312T αναγνωρίζει επιπλέον την 7-μεθυλοξανθίνη και την 8-μεθυλοξανθίνη, που δεν αναγνωρίζονται από το φυσικού τύπου μεταφορέα (Εικόνα 3.39). Για τα ανάλογα ξανθίνης που αναγνωρίζονται σε σημαντικό βαθμό (αναστολή ενεργότητας πάνω από 50% από τον πιθανό προσδέτη σε 1000x μοριακή περίσσεια έναντι ξανθίνης), ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1μM έως 1mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC₅₀ και στην συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.16.



Εικόνα 3.39. Προφίλ εξειδίκευσης των XanQ, G27S, L116A, G191S, S312T και 4M. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Περμεάση	K _i (μM)					
	2-SX	3-MX	6-SX	7-MX	8-MX	Οξυπουρινόλη
XanQ (wt)	91.1 (±10.1)	71.9 (±9.2)	40.6 (±8.3)	n.a.	n.a.	29.1 (±3.8)
XanQ G27S	30.5 (±3.0)	35.1 (±19.4)	12.1 (±3.8)	n.a.	n.a.	17.1 (±2.5)
XanQ L116A	16.5 (±2.7)	34.1 (±8.4)	33.2 (±6.1)	n.a.	n.a.	17.8 (±5.3)
XanQ G191S	32.8 (±6.9)	22.6 (±6.1)	13.6 (±5.0)	n.a.	n.a.	15.0 (±3.9)

XanQ S312T	21.2 (±7.3)	23.7 (±8.1)	24.9 (±3.8)	74.5 (±15.0)	65.0 (±17.5)	23.2 (±4.5)
XanQ 4M	82.7 (±14.1)	32.3 (±7.9)	n.a.	n.a.	n.a.	49.5 (±12.0)

Πίνακας 3.16. Τιμές K_i των XanQ, G27S, L116A, G191S, S312T και 4M για ανάλογα ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1μM) στους 25°C, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδότες (0.1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [3 H] ξανθίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

Από το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων διαπιστώνουμε ότι στο υπόβαθρο του XanQ η αντικατάσταση της Ser377 (TM12) με Gly είναι από μόνη της ικανή να διευρύνει την εξειδίκευση και να μετατρέψει τον XanQ σε έναν μεταφορέα ξανθίνης/γουανίνης με δυνατότητα αναγνώρισης ενός ευρέος φάσματος πουρινών και αναλόγων πουρινών, ενώ οι άλλες 4 αντικαταστάσεις δε φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την εξειδίκευση του XanQ, αλλά είτε μία από αυτές είτε περισσότερες από μία συνδυαστικά, δρουν επιστατικά στην S377G και εμποδίζουν την επίδρασή της στην διεύρυνση της εξειδίκευσης, όπως εξετάζεται στην επόμενη ενότητα.

3.2.2.2.4.4 Η επίδραση της αλλαγής S377G στη διεύρυνση της εξειδίκευσης του XanQ καταστέλλεται από επιστατικές αλληλεπιδράσεις με τις G27S και/ή S312T

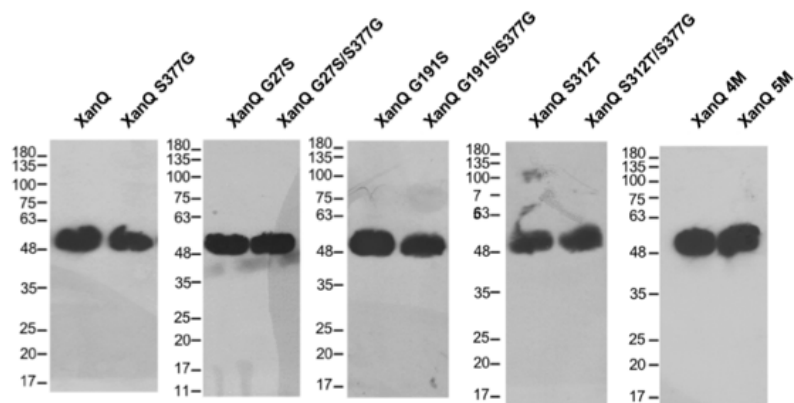
Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξετάσουμε αν η επίδραση της αλλαγής S377G στην εξειδίκευση μπορεί να διατηρηθεί και σε διαφορετικά υπόβαθρα του XanQ ή αν υπάρχει κάποια αλλαγή ή συνδυασμός αλλαγών οι οποίες δρουν επιστατικά στην S377G και εμποδίζουν την επίδρασή της στην διεύρυνση της εξειδίκευσης. Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε και αναλύσαμε λειτουργικά τα συνδυαστικά μεταλλάγματα G27S/ S377G, G191S/S377G, S312T/S377G και G27S/L116A/G191S/S312T/S377G (αναφέρεται ως XanQ-5M). Μετά την επαλήθευση της αλληλουχίας τους, τα μεταλλάγματα μετασχηματίστηκαν σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της έκφρασής τους στη μεμβράνη και η ικανότητά τους να καταλύουν ενεργό μεταφορά ξανθίνης και γουανίνης. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανοσοαποτύπωσης κατά

western υποδεικνύεται ότι όλα τα συνδυαστικά μεταλλάγματα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (**Εικόνα 3.40 Α**). Επιπλέον, από το σύνολο των μεταλλαγμάτων που υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς για το υπόστρωμα της ξανθίνης και της γουανίνης, μόνο το διπλό μετάλλαγμα G191S/S377G εμφάνισε ενεργότητα και για τα δύο υποστρώματα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.40 Β**. Όλα τα υπόλοιπα μεταλλάγματα μεταφέρουν μόνο την ξανθίνη με υψηλή συγγένεια και ικανότητα μεταφοράς (**Εικόνα 3.40 Β, Πίνακας 3.17**). Το μετάλλαγμα G191S/S377G έχει υψηλή συγγένεια για την ξανθίνη, ενώ όσο αφορά στο υπόστρωμα της γουανίνης εμφανίζει παρόμοιες κινητικές σταθερές με το μετάλλαγμα S377G (**Πίνακας 3.17**).

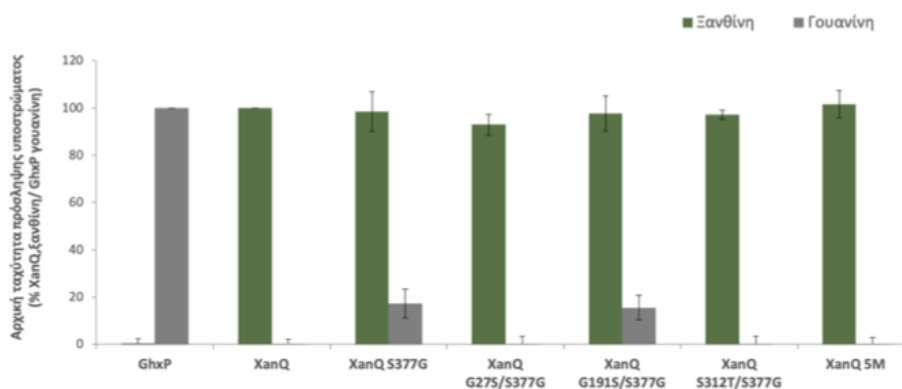
Περαιτέρω ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων με πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης στην περίπτωση του G191S/S377G υπέδειξε ότι όλοι οι συνδυασμοί αλλαγών έχουν ακριβώς το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με τον XanQ φυσικού τύπου με μικρές διαφορές στις σταθερές K_i (**Εικόνα 3.41, Πίνακας 3.18**), εκτός από το διπλό μετάλλαγμα G191S/S377G που αναγνωρίζει επιπλέον τη γουανίνη (K_i 34.2 μ M). Επίσης, σε ανταγωνισμό με τη γουανίνη το μετάλλαγμα G191S/S377G αναγνωρίζει επιπλέον την ξανθίνη (K_i 32 μ M), την υποξανθίνη, την 1-μεθυλογουανίνη, την 6-θειογουανίνη, την 6-μερκαπτοπουρίνη και την 7-μεθυλογουανίνη (**Εικόνα 3.42, Πίνακας 3.18**), έχοντας ένα προφίλ εξειδίκευσης αρκετά όμοιο με αυτό του S377G.

Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι η παρουσία της G191S δεν έχει καμία επίπτωση στη διπλή εξειδίκευση ξανθίνης/γουανίνης, ενώ η επίδραση του S377G στη διεύρυνση της εξειδίκευσης του XanQ φαίνεται να καταστέλλεται από επιστατικές αλληλεπιδράσεις με την G27S και/ή την S312T.

A.



B.

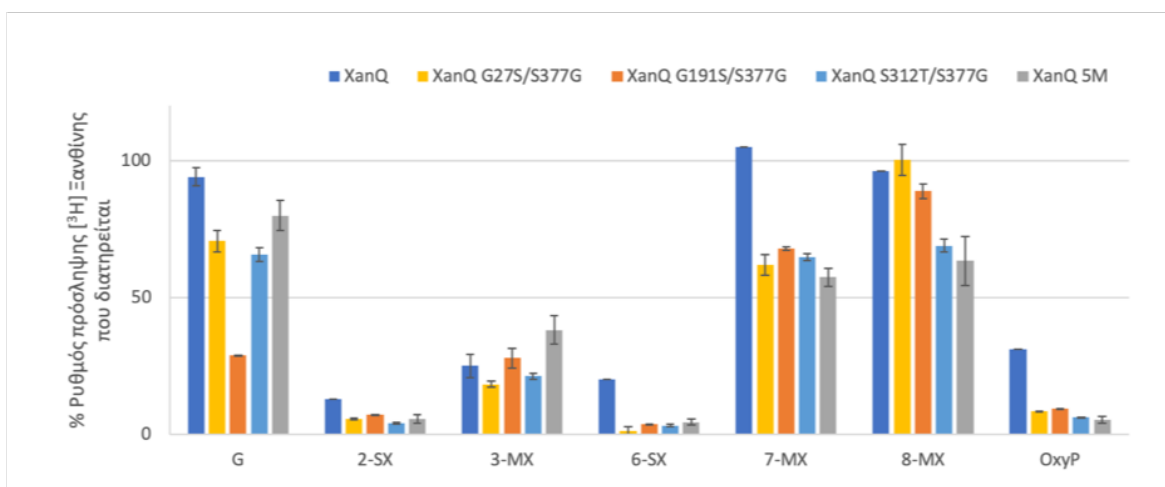


Εικόνα 3.40. Ανάλυση των επιπέδων στη μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης και $[^3\text{H}]$ γουανίνης των, *XanQ* G27S/S377G, *XanQ* G191S/S377G, *XanQ* S312T/S377G και *XanQ* 5M. (α) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (β) *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (1μM) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης (0.1μM), στους 25°C. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τις τιμές αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 5 έως 15 sec). Σε κάθε περίπτωση, έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 με κενό φορέα pT7-5) και οι τελικές τιμές παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που εκφράζουν τον *XanQ* και τον GhxP, αντίστοιχα. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Κινητική πρόσληψης ξανθίνης			
Περμεάση	K_M (μM)	V_{max} ($nmolmg^{-1}min^{-1}$)	V_{max} / K_M ($\mu L min^{-1} mg^{-1}$)
XanQ (wt)	4.1 (± 0.5)	7.5 (± 1.1)	1830
XanQ G27S/S377G	4.1 (± 0.5)	28.9 (± 1.1)	7050
XanQ G191S/S377G	4.3 (± 0.8)	50.8 (± 2.8)	11814
XanQ S312T/S377G	3.1 (± 0.4)	35.1 (± 1.2)	11323
XanQ 5M	3.5 (± 1.2)	45.6 (± 4.7)	13030

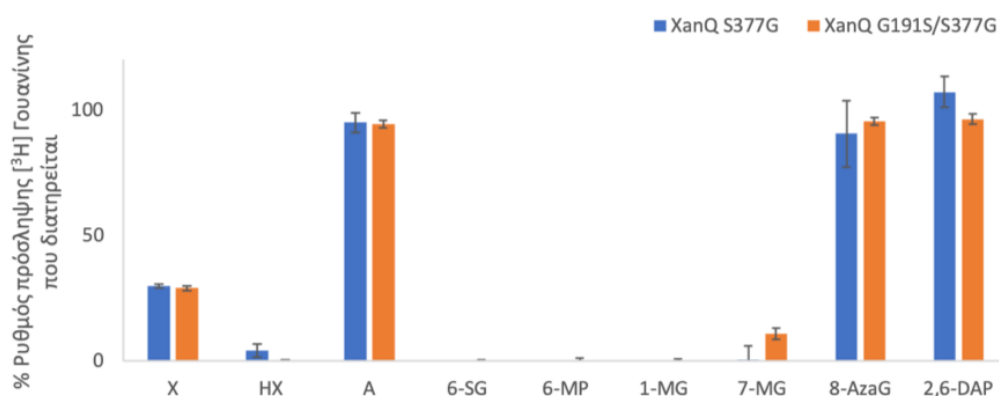
Κινητική πρόσληψης γουανίνης			
Περμεάση	K_M (μM)	V_{max} ($nmolmg^{-1}min^{-1}$)	V_{max} / K_M ($\mu L min^{-1} mg^{-1}$)
XanQ S377G	0.57 (± 0.18)	0.16 (± 0.02)	280
XanQ G191S/S377G	0.68 (± 0.05)	0.4 (± 0.01)	588

Πίνακας 3.17. Τιμές K_m και V_{max} των XanQ 5M, XanQ G27S/ S377G, XanQ G191S / S377G και XanQ S312T/ S377G για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [3H] γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.



Εικόνα 3.41. Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων XanQ G27S/ S377G, XanQ G191S / S377G, XanQ S312T/ S377G και XanQ 5M με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί

με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από δύο ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.42. Προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος XanQ G191S/ S377G με ανταγωνισμό ως προς τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0.1μM, 25°C) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Κ _i (μM)					
Περμεάση	Πρόσληψη ξανθίνης				
	G	2-SX	3-MX	6-SX	OxyP
XanQ (wt)	n.a.	91.1 (±10.1)	71.9 (±9.2)	40.6 (±8.3)	29.1 (±3.8)
XanQ G27S/S377G	n.a.	21.1 (±5.6)	56.1 (±10.6)	16.1 (±2.0)	15.6 (±4.1)
XanQ G191S/S377G	34.2 (±9.4)	22.8 (±5.8)	30.5 (±5.0)	18.2 (±2.5)	19.5 (±2.5)
XanQ S312T/S377G	n.a.	16.4 (±3.6)	21.0 (±6.8)	14.7 (±6.5)	6.2 (±2.3)
XanQ 5M	n.a.	48.6 (±7.3)	32.1 (±8.0)	35.6 (±6.7)	25.1 (±5.6)

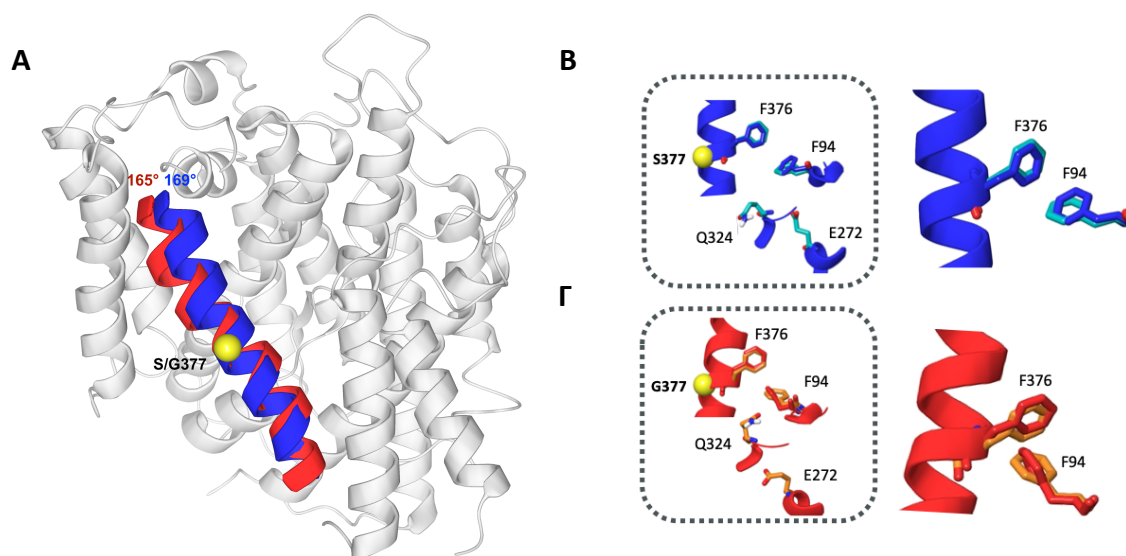
Περμεάση	Πρόσληψη γουανίνης					
	X	HX	6-SG	6-MP	1-MG	7-MG
XanQ S377G	22.3 (±5.1)	18.7 (±5.3)	4.5 (±2.1)	15.0 (±2.7)	6.6 (±0.3)	3.6 (±1.5)

XanQ G191S/S377G	32.0 (±5.0)	15.2 (±1.9)	4.1 (±1.5)	9.4 (±2.6)	5.7 (±0.9)	9.9 (±1.6)
-----------------------------	--------------------	--------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Πίνακας 3.18. Τιμές K_i των μεταλλαγμάτων XanQ 5M, XanQ G27S/S377G, XanQ G191S/S377G και XanQ S312T/S377G για μια σειρά αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων. Κύτταρα E. coli T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1μM) και [3 H] γουανίνης (0,1μM) στους 25°C, μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0,1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5-15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα E. coli T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [3 H] ξανθίνης ή της [3 H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 2 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

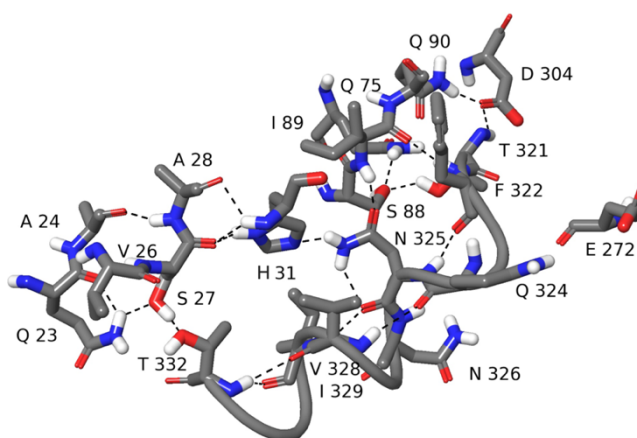
Για να κατανοήσουμε καλύτερα τις μεταβολές στην εξειδίκευση του XanQ που παρατηρήθηκαν λόγω της μεταλλαγής S377G, πραγματοποιήσαμε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Docking) σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ), τόσο στον φυσικού τύπου XanQ, όσο και στο μετάλλαγμα XanQ-S377G. Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψε ότι η παρουσία της Gly377 στη μεταλλαγμένη μορφή του XanQ προκαλεί μια κλίση στην έλικα 12, καθώς τμήμα της έλικας 12 (που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 365-377) φαίνεται να κάμπτεται στον XanQ-S377G κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής σε σύγκριση με τον XanQ (wt), όπως προκύπτει από την παρακολούθηση της γωνίας που σχηματίζεται μεταξύ των ατόμων Ca των καταλοίπων 366, 377 και 384. Αυτή η κάμψη του TM12 επιτρέπει στη F376 να αλληλεπιδρά με τη F94 με διαφορετικό τρόπο ως μοριακό “φίλτρο” (gating element) για τη διαλογή της γουανίνης (**Εικόνα 3.43**). Τόσο στον XanQ (wt) όσο και στον XanQ-S377G, η φαινυλομάδα 376 είναι σχετικά άκαμπτη, ενώ η φαινυλομάδα 94 κυμαίνεται περισσότερο στον XanQ (wt) σε σύγκριση με τον XanQ-S377G. Επιπλέον, στον φυσικού τύπου XanQ, παρατηρείται μια καλά διατηρημένη αλληλεπίδραση κάθετης διευθέτησης (T-stacking) στο 80% διαμορφώσεων, ενώ η δεύτερη πιο συχνή διαμόρφωση του φαινυλίου που αντιπροσωπεύει μόνο το 3% των διατάξεων, δεν ευνοεί την αλληλεπίδραση με τη F376 (**Εικόνα 3.43, Β**). Αντίθετα, στον XanQ-S377G, το 88% των δίδρων F94-F376 αντιστοιχούν σε διαμορφώσεις που δεν επιτρέπουν την αλληλεπίδραση των δύο φαινυλομάδων (**Εικόνα 3.43, Γ**).

Παράλληλα, όσο αφορά στην πιθανή επιστατική επίδραση της G27S στο φαινότυπο της S377G, από τις αναλύσεις της Μοριακής Δυναμικής υποδεικνύεται ότι η εισαγωγή της Ser στη θέση της Gly27 στο TM1 προσθέτει δύο επιπλέον δεσμούς υδρογόνου, με τα κατάλοιπα Thr332 (TM10) και His31 (TM1), αντίστοιχα, σε ένα υπάρχον εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου στην δομική περιοχή του «πυρήνα» (core domain) του XanQ, το οποίο συμπεριλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων στα TM9 (Asp304), TM3 (Gln90, Ser88), TM2 (Gln75), TM1 (His31) και TM10 (Asn325, Thr321) (**Εικόνα 3.44**). Οι αλληλεπιδράσεις σε αυτό το δίκτυο, όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, είναι καθοριστικής σημασίας για τη δέσμευση και μεταφορά του υποστρώματος, βάσει των αποτελεσμάτων από τη μεταλλαξιγένεση στις θέσεις His31-Asn325 (Karena and Frillingos, 2009; Frillingos, 2012) και Gln75-Asp304 (Karena *et al.*, 2015). Οι πρόσθετοι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων Ser27-Thr332 και Ser27-His31 μπορεί να επηρεάσουν την τοποθέτηση των καταλοίπων Phe322 και Gln324 στο κέντρο δέσμευσης με αποτέλεσμα να αποκαθιστούν τους περιορισμούς εξειδίκευσης που είχαν αρθεί στο μετάλλαγμα S377G.



Εικόνα 3.43. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της επίδρασης της μεταλλαγής S377G στον XanQ. (A) Μέγιστη γωνία απόκλισης που σχηματίζεται μεταξύ των ατόμων Ca των καταλοίπων 366, 377 και 384 στο TM12 στον XanQ- S377G (κόκκινο) σε σχέση με τον XanQ φυσικού τύπου (μπλε), όπως προκύπτει από την προσομοίωση MD που πραγματοποιήθηκε από τη συνεργαζόμενη ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ). (B) Αλληλεπίδραση μεταξύ της F376 (TM12) και της F94 (TM3) στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος του XanQ φυσικού τύπου. Η κάθετη διευθέτηση (T-stacking) των F376-F94 παρατηρείται στο 80% (μπλε) των διαμορφώσεων, ενώ στη δεύτερη συχνότερη διαμόρφωση που αντιστοιχεί στο 3%, δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση (ανοιχτό μπλε). (C) Αλληλεπίδραση μεταξύ της F376 (TM12) και της F94 (TM3) στο μετάλλαγμα XanQ-S377G. Η F376 δεν αλληλεπιδρά με τη F94, καθώς στο 88% των διαμορφώσεων

(κόκκινο) η διάταξη της F94 δεν ευνοεί την αλληλεπίδραση. Το ίδιο ισχύει και για το δεύτερο πιο συχνό διέδρο (πορτοκαλί) που αντιστοιχεί στο 3% των διαμορφώσεων.

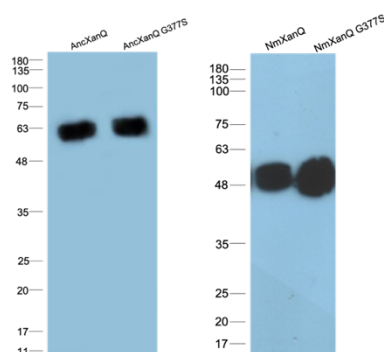


Εικόνα 3.44. Εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου στον XanQ (G27S) που συνδέει διαφορετικά μέρη της δομικής περιοχής του πυρήνα. Το κατάλοιπο Ser27 (στον XanQ-G27S) συνδέεται με τη Phe322 και τη Gln324 στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος μέσω των καταλοίπων His31 και Asn325. Η παρουσία της Ser27 ενισχύει το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου με δύο πρόσθετους δεσμούς (α) μεταξύ της κύριας αλυσίδας C=O και της His31 και (β) μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας -OH και της Thr332, που οδηγούν σε αλλαγή της θέσης των καταλοίπων Gln324 και Phe322 στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης. Αυτή η αλλαγή θα μπορούσε να εξηγήσει την επιστατική επίδραση της αλλαγής G27S στον XanQ-S377G. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τη συνεργαζόμενη ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ).

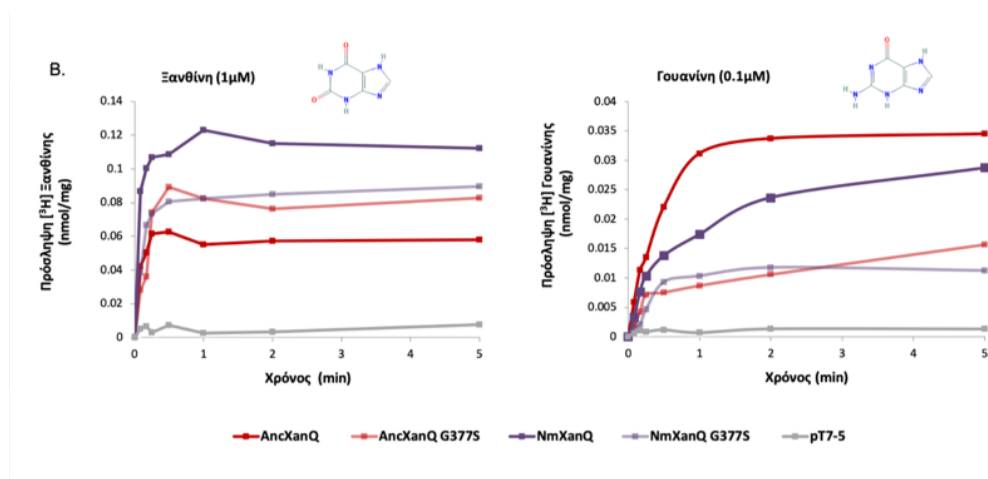
3.2.2.2.4.5 Η εισαγωγή της Ser στη θέση 377 στο υπόβαθρο των περμεασών ξανθίνης/γουανίνης δεν είναι επαρκής για την αλλαγή της εξειδίκευσης

Προκειμένου να εξετάσουμε εάν η εισαγωγή της Ser αντί της Gly στη θέση 377 στο υπόβαθρο των διπλής εξειδίκευσης μεταφορέων ξανθίνης/γουανίνης είναι επαρκής για να οδηγήσει σε εξειδίκευση για την ξανθίνη, κατασκευάσαμε το μετάλλαγμα G377S στο υπόβαθρο τόσο του προγονικού μεταφορέα AncXanQ (AncXanQ-G377S), όσο και του σύγχρονου NmXanQ (NmXanQ-G377S). Αφού ελέγχθησαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων στη μεμβράνη της *E.coli* και βρέθηκε ότι και τα δυο μεταλλάγματα παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα έκφρασης, όπως και οι αντίστοιχο φυσικού τύπου μεταφορείς (**Εικόνα 3.45**), πραγματοποιήθηκαν, στη συνέχεια, πειράματα ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης και [^3H] γουανίνης από τα οποία διαπιστώθηκε ότι η μεταλλαγή G377S και στα δυο διαφορετικά υπόβαθρα δεν επηρεάζει τη μεταφορά της γουανίνης (**Εικόνα 3.46**), δε μπορεί δηλαδή να οδηγήσει από μόνη της σε τροποποίηση της εξειδίκευσης. Έτσι ο AncXanQ-G377S μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη, όπως ο AncXanQ

(**Εικόνα 3.17**) και μάλιστα παρουσιάζει δύο φορές υψηλότερη συγγένεια για την ξανθίνη (K_M 3.4 μ M) και δύο φορές χαμηλότερη συγγένεια για τη γουανίνη (K_M 0.5 μ M), συγκριτικά με το φυσικού τύπου μεταφορέα, όπως υποδεικνύεται από την κινητική ανάλυση (**Πίνακας 3.19**). Ομοίως, η μονή αλλαγή G377S στο υπόβαθρο του NmXanQ οδήγησε σε αύξηση της συγγένειας για την ξανθίνη (σχεδόν κατά δυο φορές) (K_M 6.8 μ M) και σε μείωση της συγγένειας για τη γουανίνη κατά σχεδόν τρεις φορές (K_M 5.01 μ M) σε σχέση με τον NmXanQ (wt) (**Πίνακας 3.19**).



Εικόνα 3.45. Ανάλυση των επιπέδων στη μεμβράνη των μεταλλαγμάτων *AneXanQ* G377S και *NmXanQ* G377S μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



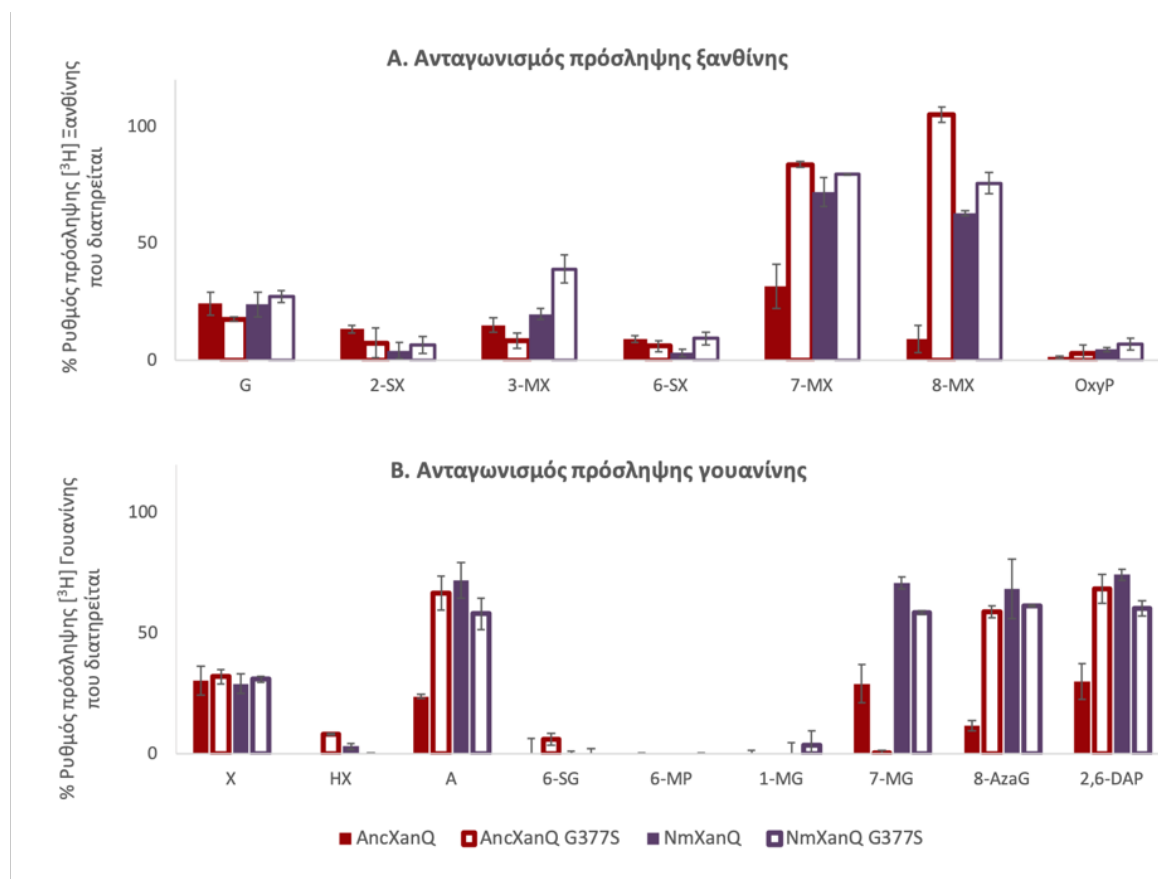
Εικόνα 3.46. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης και $[^3\text{H}]$ γουανίνης των μεταλλαγμάτων *AncXanQ G377S* και *NmXanQ G377S*. *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης ($1\mu\text{M}$) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης ($0.1\mu\text{M}$), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

		K_M (μM)	$V_{\max}$ ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	$V_{\max}/K_M$ ($\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
AncXanQ	Ξανθίνη	6.5 (± 0.9)	2.4 (± 0.1)	370
	Γουανίνη	0.24 (± 0.05)	0.25 (± 0.02)	1040
AncXanQ/G377S	Ξανθίνη	3.4 (± 0.7)	2.6 (± 0.2)	750
	Γουανίνη	0.5 (± 0.08)	0.46 (± 0.05)	920
NmXanQ	Ξανθίνη	11.8 (± 3.5)	2.5 (± 0.2)	210
	Γουανίνη	1.56 (± 0.07)	0.17 (± 0.01)	110
NmXanQ/G377S	Ξανθίνη	6.8 (± 2.0)	4.2 (± 0.7)	620
	Γουανίνη	5.01 (± 0.75)	0.35 (± 0.02)	70

Πίνακας 3.19. Τιμές K_m και $V_{\max}$ των μεταλλαγμάτων *AncXanQ G377S* και *NmXanQ G377S* για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης ($0.1\text{-}100\mu\text{M}$) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης ($0.01\text{-}40\mu\text{M}$). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και $V_{\max}$ εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Για να αναλυθεί το προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων *AncXanQ-G377S* και *NmXanQ-G377S*, διενεργήσαμε πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης $[^3\text{H}]$ ξανθίνης ($1\mu\text{M}$) και $[^3\text{H}]$ γουανίνης ($0.1\mu\text{M}$) από μια σειρά πιθανών προσδετών. Από τα πειράματα

αυτά διαπιστώθηκε ότι το προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ-G377S δεν είναι τόσο ευρύ όσο του AncXanQ, ενώ το προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ-G377S είναι πανομοιότυπο με αυτό του φυσικού τύπου μεταφορέα (**Εικόνα 3.47 και Πίνακας 3.26**). Πιο αναλυτικά, αναστολή της πρόσληψης ξανθίνης επιτεύχθηκε για τον AncXanQ-G377S παρουσία γουανίνης (K_i 33.8 μ M), 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλοξανθίνης, 6-θειοξανθίνης και οξυπουρινόλης, αλλά όχι παρουσία 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του AncXanQ χωρίς τη μετάλλαξη. Επιπλέον, αναστολή της πρόσληψης γουανίνης πραγματοποιήθηκε παρουσία ξανθίνης (K_i 35 μ M), υποξανθίνης, 1-μεθυλογουανίνης, 6-θειοξανθίνης, 6-μερκαπτοπουρίνης και 7-μεθυλογουανίνης, ενώ ο AncXanQ αναγνωρίζει επιπλέον, την αδενίνη, την 2,6-διαμινοπουρίνη και την 8-αζαγουανίνη (**Εικόνα 3.47, Πίνακας 3.26**). Το μετάλλαγμα NmXanQ/G377S εμφανίζει ακριβώς το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με το μεταφορέα φυσικού τύπου, αναγνωρίζοντας τα ίδια ανάλογα τόσο σε ανταγωνισμό με την ξανθίνη, όσο και σε ανταγωνισμό με τη γουανίνη (**Εικόνα 3.47**). Επιπλέον, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.26** και οι σταθερές αναστολής (K_i) της πρόσληψης ξανθίνης και γουανίνης για τα αντίστοιχα ανάλογα δε διαφέρουν σημαντικά.



Εικόνα 3.47. Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων *AncXanQ G377S* και *NmXanQ G377S* με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη (Α) και τη γουανίνη (Β). Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM, 25°C) και [³H] γουανίνης (0.1μM, 25°C) μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Ανταγωνιστής	Κ _i (μM)			
	AncXanQ	AncXanQ G377S	NmXanQ	NmXanQ G377S
Πρόσληψη ξανθίνης				
Γουανίνη	51.6 (±10.8)	33.8 (±5.6)	29.0 (±6.0)	27.6 (±7.0)
2-Θειοξανθίνη	111.5 (±14.6)	38.1 (±3.0)	38.4 (±5.8)	62.2 (±12.7)
3-Μεθυλοξανθίνη	49.6 (±13.3)	46.9 (±1.8)	62.8 (±11.8)	40.2 (±7.7)
6-Θειοξανθίνη	31.1 (±14.3)	12.2 (±1.8)	41.3 (±8.5)	35.6 (±8.7)
7-Μεθυλοξανθίνη	213.5 (±27.2)	n. a.	n. a.	n. a.
8-Μεθυλοξανθίνη	7.3 (±0.5)	n. a.	n. a.	n. a.
Οξυπουρινόλη	7.7 (±2.2)	4.2 (±0.7)	2.7 (±0.8)	26.0 (±6.1)
Πρόσληψη γουανίνης				
Ξανθίνη	54.9 (±4.0)	35.0 (±7.4)	50.6 (±8.5)	30.6 (±4.8)
Υποξανθίνη	5.2 (±0.2)	18.2 (±2.4)	21.1 (±5.2)	22.8 (±3.4)
Αδενίνη	139.4 (±18.0)	n. a.	n. a.	n. a.
6-Θειογουανίνη	2.4 (±0.3)	7.1 (±3.9)	6.4 (±2.5)	28.4 (±1.3)
6-Μερκαπτοπουρίνη	1.9 (±0.2)	8.0 (±1.9)	5.6 (±1.0)	6.1 (±8.6)
1-Μεθυλογουανίνη	2.2 (±0.5)	25.1 (±6.8)	22.1 (±5.1)	14.6 (±2.7)
7-Μεθυλογουανίνη	154.5 (±48.5)	5.1 (±1.5)	n. a.	n. a.
8-Αζαγουανίνη	40.2 (±10.1)	n. a.	n. a.	n. a.
2,6-Διαμινοπουρίνη	67.2 (±13.5)	n. a.	n. a.	n. a.

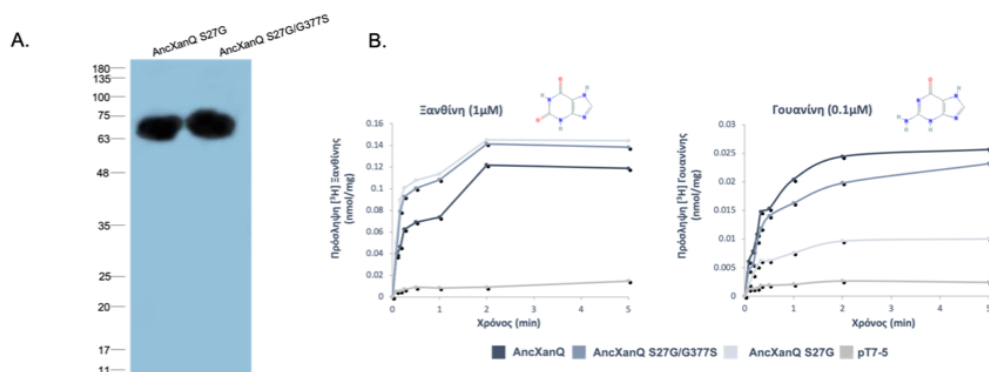
Πίνακας 3.20. Τιμές Κ_i των μεταλλαγμάτων *AncXanQ G377S* και *NmXanQ G377S* για μια σειρά αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0.1μM) στους 25°C, μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM) για

5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5-15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [3H] ξανθίνης ή [3H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.

Η μεταλλαγή G377S, επομένως, δεν επηρεάζει τη λειτουργία και το προφίλ εξειδίκευσης του NmXanQ. Από τα ανωτέρω πειραματικά αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της σερίνης αντί της γλυκίνης στη θέση 377 δεν είναι ικανή από μόνη της να οδηγήσει σε εξειδίκευση για την ξανθίνη.

3.2.2.2.4.6 Στο υπόβαθρο του AncXanQ η εξειδίκευση για την ξανθίνη δε σχετίζεται με την αλλαγή S27G

Με αφορμή τα δεδομένα από την ανάλυση του μεταλλάγματος AncXanQ-G377S, το οποίο διατηρεί το προφίλ ευρείας εξειδίκευσης γουανίνης/ξανθίνης σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από τη λειτουργική ανάλυση του AncXanQ-5M (S27G/A116L/S191G/T312S/G377S) και του AncXanQ-4M (S27G/A116L/S191G/T312S) που είναι ειδικοί για την ξανθίνη, θελήσαμε να εξετάσουμε αν η εξειδίκευση για την ξανθίνη σχετίζεται με την αλλαγή S27G ή με κάποια επιστατική αλληλεπίδραση της G377S με τη S27G, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του XanQ. Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε δυο ακόμη μεταλλάγματα τα AncXanQ-S27G και AncXanQ-2M (S27G/G377S). Τόσο το μονό όσο και το διπλό μετάλλαγμα ανιχνεύονται σε ικανοποιητικά επίπεδα στη μεμβράνη της *E. coli* και όπως διαπιστώθηκε από τον έλεγχο ενεργού μεταφοράς ξανθίνης και γουανίνης έχουν ενεργότητα και για τα δύο υποστρώματα (Εικόνα 3.48).



Εικόνα 3.48. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη και της ενεργότητας μεταφοράς [^3H] ξανθίνης και [^3H] γουανίνης των μεταλλαγμάτων *AncXanQ S27G* και *AncXanQ 2M*. (A) Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραίωση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). (B) *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1μM) και [^3H] γουανίνης (0.1μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

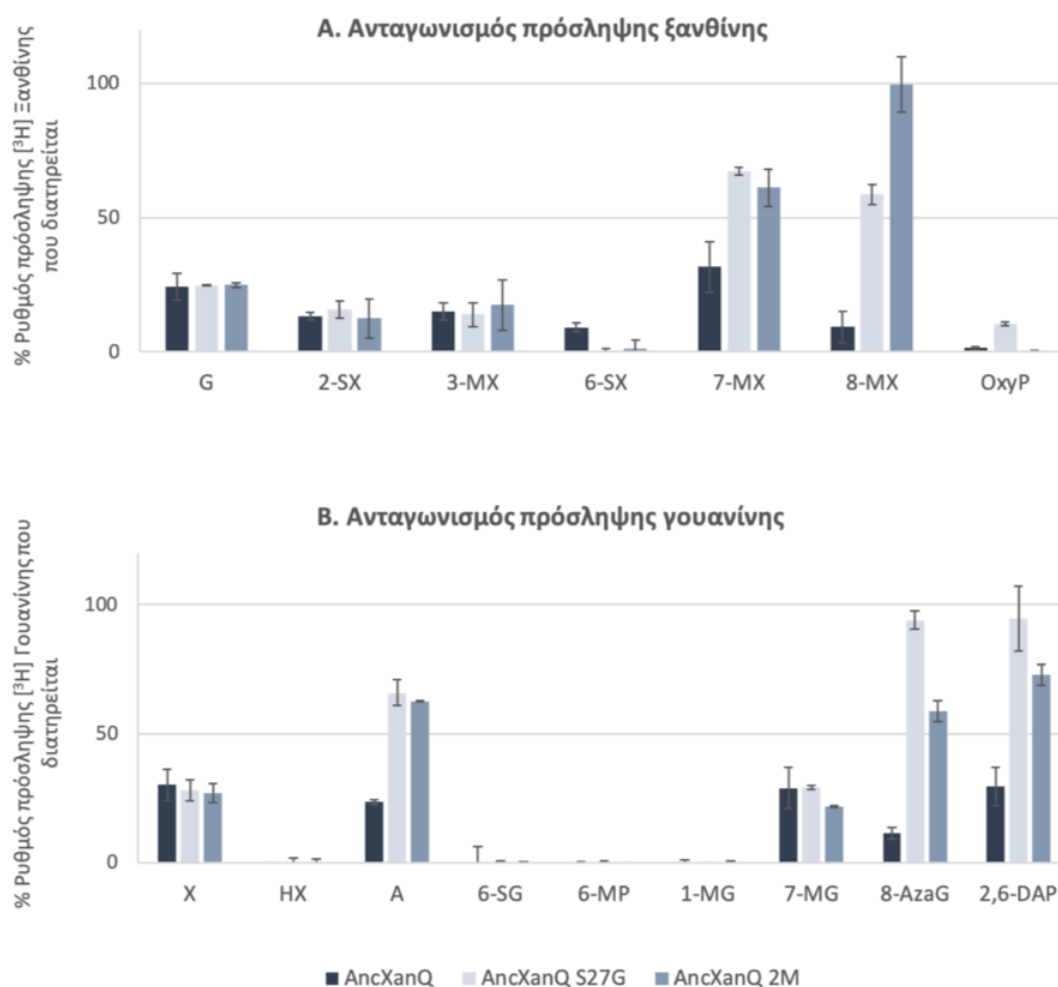
Ακολούθησε κινητική ανάλυση της μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης και γουανίνης, η οποία υπέδειξε ότι και τα δύο μεταλλάγματα έχουν παρόμοια συγγένεια για την ξανθίνη συγκριτικά με τον *AncXanQ* (wt), ενώ παρουσιάζουν τέσσερις φορές χαμηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα της γουανίνης σε σχέση με τον *AncXanQ* (wt) (Πίνακας 3.21).

		K_M (μM)	V_{max} (nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_M (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
AncXanQ	Ξανθίνη	6.5 (±0.9)	2.4 (±0.1)	370
	Γουανίνη	0.24 (±0.05)	0.25 (±0.02)	1040
AncXanQ S27G	Ξανθίνη	5.8 (±1.1)	4.2 (±0.2)	720
	Γουανίνη	1.02 (±0.09)	0.18 (±0.01)	180
AncXanQ 2M	Ξανθίνη	6.7 (±0.6)	3.5 (±0.1)	520
	Γουανίνη	0.85 (±0.06)	0.42 (±0.01)	490

Πίνακας 3.21. Τιμές K_m και V_{max} των μεταλλαγμάτων *AncXanQ S27G* και *AncXanQ 2M* για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [^3H] γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Τέλος, από τα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [^3H] ξανθίνης και [^3H] γουανίνης από μια σειρά αναλόγων, προέκυψε ότι ο *AncXanQ-S27G* και ο *AncXanQ-2M* σε ανταγωνισμό με την ξανθίνη, αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια τη γουανίνη, τη 2-θειοξανθίνη, την 3-μεθυλοξανθίνη, την 6-θειοξανθίνη και την οξυπουρινόλη, αλλά όχι την

7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη σε αντίθεση με τον AncXanQ (wt) (**Εικόνα 3.49 A, Πίνακας 3.22**). Επίσης, σε ανταγωνισμό με τη γουανίνη και τα δυο μεταλλάγματα αναγνωρίζουν την ξανθίνη, την υποξανθίνη, την 1-μεθυλογουανίνη, την 6-θειοξανθίνη, την 6-μερκαπτοπουρίνη και την 7-μεθυλογουανίνη, ενώ δεν αναγνωρίζουν την αδείνη, την 8-αζαγουανίνη και τη 2,6-διαμινοπουρίνη που αναγνωρίζονται από τον AncXanQ (wt) (**Εικόνα 3.49 B, Πίνακας 3.22**). Για τα ανάλογα ξανθίνης και γουανίνης τα οποία φάνηκε να αναγνωρίζονται από τον AncXanQ-S27G και τον AncXanQ-G377S σε σημαντικό βαθμό (αναστολή ενεργότητας πάνω από 50% από τον πιθανό προσδέτη σε 1000x μοριακή περίσσεια έναντι ξανθίνης ή γουανίνης), ακολούθησαν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1μM έως 1mM, ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC₅₀ και στην συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i, οι οποίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.22**.



Εικόνα 3.49. Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων *AncXanQ S27G* και *AncXanQ 2M* με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη (A) και τη γουανίνη (B). Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1μM, 25°C) και [³H] γουανίνης (0.1μM, 25°C) μετά από προεπόαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM) για 5min. Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D) από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Ανταγωνιστής	K _i (μM)		
	AncXanQ	AncXanQ/S27G	AncXanQ 2M
Πρόσληψη ξανθίνης			
Γουανίνη	51.6 (±10.8)	27.0 (±6.2)	16.6 (±3.1)
2-Θειοξανθίνη	111.5 (±14.6)	23.2 (±14.6)	22.9 (±2.5)
3-Μεθυλοξανθίνη	49.6 (±13.3)	33.0 (±6.1)	47.8 (±8.6)
6-Θειοξανθίνη	31.1 (±14.3)	50.3 (±17.7)	26.4 (±4.9)
7-Μεθυλοξανθίνη	213.5 (±27.2)	n. a.	n. a.
8-Μεθυλοξανθίνη	7.3 (±0.5)	n. a.	n. a.
Οξυπουρινόλη	7.7 (±2.2)	24.5 (±8.5)	6.4 (±2.8)
Πρόσληψη γουανίνης			
Ξανθίνη	54.9 (±4.0)	36.0 (±9.2)	28.7 (±7.3)
Υποξανθίνη	5.2 (±0.2)	7.5 (±4.3)	12.8 (±2.2)
Αδενίνη	139.4 (±18.0)	n. a.	n. a.
6-Θειογουανίνη	2.4 (±0.3)	22.6 (±7.0)	8.6 (±1.6)
6-Μερκαπτοπουρίνη	1.9 (±0.2)	13.9 (±3.0)	9.9 (±2.2)
1-Μεθυλογουανίνη	2.2 (±0.5)	17.4 (±3.4)	14.2 (±2.9)
7-Μεθυλογουανίνη	154.5 (±48.5)	30.1 (±10.0)	32.4 (±10.4)
8-Αζαγουανίνη	40.2 (±10.1)	n. a.	n. a.
2,6-Διαμινοπουρίνη	67.2 (±13.5)	n. a.	n. a.

Πίνακας 3.22. Τιμές K_i των μεταλλαγμάτων *AncXanQ S27G* και *AncXanQ 2M* για μια σειρά αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό

μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης ($1\mu\text{M}$) και [^3H] γουανίνης ($0,1\mu\text{M}$) στους 25°C , μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες ($0,1\mu\text{M}$ - 1mM) για 5 min . Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 - 15 sec . Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης ή [^3H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις $<20\%$.

Συνολικά, φαίνεται να έχουν το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με το μετάλλαγμα AncXanQ-G377S (Πίνακας 3.20). Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι η εξειδίκευση για την ξανθίνη δε σχετίζεται με την αλλαγή S27G, ενώ επίσης δε διαπιστώθηκε κάποιου είδους επιστατική αλληλεπίδραση της G377S με τη S27G, όπως συνέβη στην περίπτωση του μεταφορέα XanQ (βλ. ενότητα 3.2.2.2.4.1).

Συνοπτικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση μεταλλαξιγένεσης είναι τα εξής:

Έπειτα από λεπτομερή σύγκριση της προγονικής αλληλουχίας AncXanQ, που μεταφέρει γουανίνη και ξανθίνη, με τις σημερινές αλληλουχίες του υποκλάδου των μεταφορέων ξανθίνης και ειδικότερα των XanQ και AnXanQ που είναι ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης και δεν αναγνωρίζουν ούτε μεταφέρουν γουανίνη και τις αλληλουχίες του υποκλάδου που περιλαμβάνει τα ορθόλογα από β-πρωτεοβακτήρια (αποτελούν έναν ξεχωριστό υποκλάδο στον κλάδο XanQ), και ειδικότερα του NmXanQ που όπως διαπιστώθηκε είναι διπλής εξειδίκευσης μεταφορέας ξανθίνης/γουανίνης, προέκυψαν διαφορές σε 5 θέσεις που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα (Παράρτημα 5, Εικόνα 3.26). Πρόκειται για τις θέσεις Ser-27 (στο TM 1), Ala-116 (TM4), Ser-191 (TM6), Thr-312 (TM9) και Gly-377 (TM12) στον AncXanQ. Στους σημερινούς ειδικούς για την ξανθίνη μεταφορείς στις αντίστοιχες θέσεις απαντώνται Gly, Leu, Gly, Ser και Ser, αντίστοιχα, ενώ ο ξανθίνης/γουανίνης μεταφορέας NmXanQ διατηρεί- με εξαίρεση τη θέση 191 στην οποία φέρει Ala- τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα του AncXanQ. Για να μελετηθεί η σημασία αυτών των θέσεων στην εξειδίκευση των μεταφορέων κατασκευάστηκε και μελετήθηκε λειτουργικά ένα σύνολο μεταλλαγμάτων τόσο στο υπόβαθρο του προγονικού μεταφορέα AncXanQ, όσο και σε αυτό των σύγχρονων μεταφορέων XanQ και NmXanQ.

Συγκεκριμένα:

- Στο υπόβαθρο του **AncXanQ** κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν λειτουργικά τα εξής μεταλλάγματα: **AncXanQ-5M** (S27G/A116L/S191G/T312S/G377S), **AncXanQ-4M** (S27G/A116L/S191G/T312S), **AncXanQ-2M** (S27G/G377S), **AncXanQ-G377S** και **AncXanQ-S27G**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της λειτουργικής μας ανάλυσης, ο AncXanQ-5M και ο AncXanQ-4M μεταφέρουν την ξανθίνη, αλλά χάνουν την ικανότητα μεταφοράς γουανίνης, ενώ όλα τα υπόλοιπα μεταλλάγματα μεταφέρουν ξανθίνη και γουανίνη και είναι ευρείας εξειδίκευσης για αναγνώριση πουρινών, όπως και ο AncXanQ.
- Στο υπόβαθρο του **XanQ** εξετάστηκαν τα εξής μεταλλάγματα: **XanQ-5M** (G27S/L116A/G191S/S312T/S377G), **XanQ-4M** (G27S/L116A/G191S/S312T), **XanQ G27S/S377G**, **XanQ G191S/S377G**, **XanQ S312T/S377G**, **XanQ-G27S**, **XanQ-L116A**, **XanQ-G191S**, **XanQ-S312T** και **XanQ-S377G**. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το μετάλλαγμα **XanQ-S377G** και το διπλό **XanQ-G191S/S377G** μεταφέρουν ξανθίνη και γουανίνη και έχουν διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης για πουρίνες, ενώ όλα τα υπόλοιπα μεταλλάγματα έχουν αυστηρό προφίλ εξειδίκευσης για ξανθίνη, όπως και ο XanQ (wt).
- Στο υπόβαθρο του **NmXanQ** κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν τα μεταλλάγματα **NmXanQ/G377S** και **NmXanQ/A191S**. Τα δύο αυτά μεταλλάγματα έχουν ακριβώς το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης (μεταφορά ξανθίνης και γουανίνης, με ευρύ φάσμα αναγνώρισης πουρινών) με το μεταφορέα φυσικού τύπου.

4

Συζήτηση

Η οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 αποτελεί τυπικό παράδειγμα μιας εξελικτικά ευρείας οικογένειας πρωτεϊνών που διατηρεί υψηλό βαθμό συντήρησης στην αλληλουχία και στη δομή του ενεργού κέντρου, αλλά περιλαμβάνει μεταφορείς με σημαντικές διαφορές στην εξειδίκευση (Frillingos 2012). Η ανάλυση της μοριακής βάσης των διαφορών εξειδίκευσης που παρουσιάζουν οι μεταφορείς της οικογένειας αυτής, έχει στηριχθεί μέχρι σήμερα στη συστηματική μεταλλαξιγένεση δύο κυρίως ομολόγων, της περμεάσης ξανθίνης/ουρικού οξέος UapA του *Aspergillus nidulans*

(Diallinas, 2016) και της περμεάσης ξανθίνης XanQ της *Escherichia coli* (Karena *et al.*, 2015), καθώς και σε συγκριτική ανάλυση των ομολόγων αυτών με άλλους σημερινούς μεταφορείς. Τα δεδομένα από τις αναλύσεις αυτές έχουν υποδείξει θέσεις αμινοξέων που έχουν κομβική σημασία για τη λειτουργικότητα των μεταφορέων, αλλά δεν έχουν δώσει μια σαφή εικόνα για τα αμινοξέα που καθορίζουν τους διαφορετικούς τύπους εξειδίκευσης. Αυτό μπορεί να αντανακλά εν μέρει το ότι οι αναλύσεις έχουν επικεντρωθεί σε έναν μόνο υποκλάδο της οικογένειας (μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος) (Frillingos 2012). Σημαντικότερος, ίσως, λόγος είναι ότι οι αναλύσεις αυτές δεν λαμβάνουν υπόψη την εξελικτική ιστορία της απόκλισης των εξειδικεύσεων, αλλά εστιάζονται στη σύγκριση μεταξύ πρωτεϊνών που υπάρχουν σήμερα.

Για να μελετήσουμε τις διαφορές εξειδίκευσης στην οικογένεια NAT/NCS2, στην παρούσα Διατριβή, χρησιμοποιήσαμε μια διαφορετική, εξελικτική στρατηγική που βασίζεται στην ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών. Από την εισαγωγή αυτής της μεθόδου (Chang *et al.*, 2002; Thornton *et al.*, 2003; Thornton, 2004), η ανασύσταση προγονικών αλληλουχιών έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση διαφορετικών ομάδων πρωτεϊνών με σημαντικά συμπεράσματα για τη μοριακή βάση της εμφάνισης των διαφορετικών λειτουργιών και εξειδικεύσεων των σύγχρονων πρωτεϊνών. Μελέτες αυτού του τύπου έχουν υποδείξει ότι οι νέες λειτουργίες συχνά προέρχονται από λίγες αλλαγές στην αλληλουχία και σχετικά απλούς μηχανισμούς οι οποίοι, ωστόσο, δε γίνονται αντιληπτοί στα σημερινά ομόλογα λόγω επιστατικών επιδράσεων από άλλες μεταλλάξεις (Harms and Thornton, 2010; Hochberg και Thornton, 2017; Yang *et al.*, 2020). Η εφαρμογή αυτής της πειραματικής στρατηγικής σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς είναι περιορισμένη μέχρι σήμερα (Dean *et al.*, 2018; Savory *et al.*, 2018), εν μέρει λόγω της έλλειψης δομικών και λειτουργικών στοιχείων για επαρκή αριθμό ομολόγων στις περισσότερες περιπτώσεις.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε αυτή τη μέθοδο για να μελετήσουμε την εξέλιξη των εξειδικεύσεων των βακτηριακών μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήσαμε ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση προγονικών αλληλουχιών σε επιλεγμένους υποκλάδους των μεταφορέων ουρακίλης και/ή θυμίνης, ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος και ξανθίνης της NAT/NCS2. Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν ξεχωριστά εξελικτικά σενάρια για την ανάπτυξη των σχετικών προφίλ εξειδίκευσης στους τρεις ξεχωριστούς υποκλάδους που μελετήθηκαν: 1) ο **AncR1**, κοινός προγονικός για τον κλάδο των ομόλογων μεταφορέων ουρακίλης/ θυμίνης, είναι ειδικός για την ουρακίλη, υποδεικνύοντας μια μακρά εξελικτική παρουσία της εξειδίκευσης για την ουρακίλη και μια πρόσφατη απόκλιση για επιπλέον εξειδίκευση για τη θυμίνη που

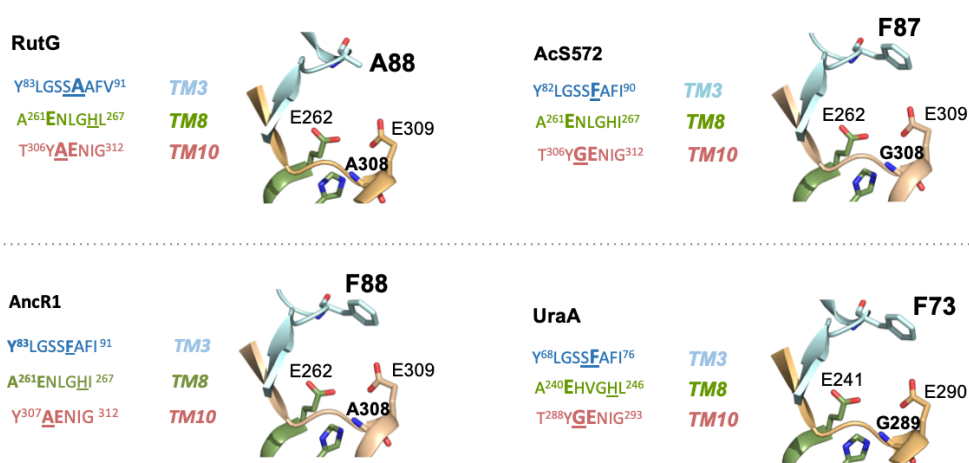
εμφανίζεται σε ένα μόνο υποκλάδο που περιλαμβάνει ορθόλογα από Enterobacteriales, 2) ο **AncXUacT**, κοινός προγονικός μιας ομάδας μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος, είναι επίσης μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος, υπονοώντας μια βαθιά εξελικτική προέλευση της διπλής εξειδίκευσης για οξειδωμένες πουρίνες και 3) ο **AncXanQ**, κοινός πρόγονος για μια ομάδα ειδικών για την ξανθίνη μεταφορέων είναι ένας ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέας πουρινών, υποδηλώνοντας ότι οι σύγχρονες ειδικές για την ξανθίνη περμεάσες έχουν προέλθει από μεταφορείς ξανθίνης-γουανίνης ευρύτερης εξειδίκευσης και ότι η εξειδίκευση για την ξανθίνη συνδέεται με λίγες αλλαγές εκτός της περιοχής του κέντρου δέσμευσης.

4.1 Η ευρεία εξειδίκευση ουρακίλης/θυμίνης εμφανίζεται κατά την εξέλιξη σε μια μικρή ομάδα ορθολόγων από εντεροβακτήρια

Για τον κλάδο των ομόλογων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης πραγματοποιήθηκε ανασύσταση του κοινού προγόνου, AncR1, του υποκλάδου που αντιπροσωπεύεται από τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης RutG της *E. coli* και ουρακίλης AcS572 του *A. calcoaceticus* (R1 subcluster) (Botou *et al.*, 2018). Όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες (Botou *et al.*, 2018), ο AcS572 είναι μεταφορέας ουρακίλης και εμφανίζει το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με το μεταφορέα UraA, ενώ ο RutG παρουσιάζει ένα πιο διευρυμένο προφίλ εξειδίκευσης μεταφέροντας και τη θυμίνη εκτός από την ουρακίλη και αναγνωρίζοντας επιπλέον τόσο την ξανθίνη όσο και την οξυπουρινόλη. Από τη λειτουργική ανάλυση του AncR1, διαπιστώθηκε ότι μεταφέρει μόνο την ουρακίλη και μάλιστα, με υψηλή συγγένεια, ελαφρώς χαμηλότερη από αυτή των σύγχρονων μεταφορέων, αλλά με σημαντικά μειωμένη ικανότητα μεταφοράς (**Πίνακας 3.1**). Ο AncR1 εμφανίζει, επομένως, το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με τους σύγχρονους μεταφορείς AcS572 και UraA και δε συντηρεί την ευρεία εξειδίκευση του RutG.

Η διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ των AncR1 και RutG μπορεί ενδεχομένως να αποδοθεί στην παρουσία του καταλοίπου Phe-73 (TM3) (αρίθμηση με βάση τον UraA) στην προγονική αλληλουχία (**Εικόνα 3.3, Εικόνα 4.1**). Ο AncR1 διατηρεί την Phe-73, η οποία είναι σχεδόν απόλυτα συντηρημένη σε όλα τα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 (Botou *et al.*, 2018) και διαφέρει μόνο σε μια μικρή ομάδα ομόλογων (ορθόλογα του RutG σε Enterobacteriales) που έχουν Ala (**Εικόνα 3.2**). Το κατάλοιπο αυτό είναι σημαντικό για την εξειδίκευση για ουρακίλη. Όπως έχει αποδειχθεί η Phe-73 σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου (μέσω του C=O του πεπτιδικού σκελετού) με την ουρακίλη και συνεισφέρει στη

συγκράτηση της ουρακίλης στο ενεργό κέντρο μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals (Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017). Η Ala που συντηρείται μόνο στον RutG και στα ορθόλογα από την ομάδα των εντεροβακτηρίων, δεν επηρεάζει την διαμόρφωση των δεσμών υδρογόνου με την ουρακίλη, αλλά επιτρέπει επιπρόσθετα τον συντονισμό της θυμίνης ή ακόμη και της ξανθίνης στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (Botou *et al.*, 2018). Στην παρούσα διατριβή, διαπιστώσαμε ότι AncR1, ο οποίος συντηρεί το κατάλοιπο της Phe σε αυτή τη θέση, έχει το ίδιο αυστηρό προφίλ εξειδίκευσης για ουρακίλη και 5-FU, όπως ο AcS572 και ο UraA, επιβεβαιώνοντας τη σημασία της Phe-73 στην εξειδίκευση για την ουρακίλη.



Εικόνα 4.1. Δομική απεικόνιση και απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος των RutG, AcS572, UraA και AncR1. Απεικονίζονται τα κατάλοιπα που συγκροτούν την περιοχή περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος, καθώς και οι διαφορές στα κατάλοιπα Ala-88 (RutG), Phe-87 (AcS572), Phe-73 (UraA), και Phe-88 (AncR1). Το δομικό μοντέλο του AncR1 δημιουργήθηκε με βάση το δομικό πρότυπο του UraA 5XLS, με το διαδικτυακό εργαλείο SWISS-MODEL, ενώ η οπτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL. (Η εικόνα, με εξαίρεση ότι αφορά στον AncR1, αποτελεί μέρος της δημοσίευσής Botou *et al.*, 2018).

Ακόμη, η εκτενής βιοπληροφορική ανάλυση που είχε πραγματοποιηθεί για την κατανομή των γονιδίων *uraA* και *rutG* σε όλα τα στελέχη της ομάδας *Escherichia/Shigella* (Botou *et al.*, 2018), οδήγησε στη διαπίστωση ότι τα ορθόλογα του μεταφορέα ουρακίλης UraA εμφανίζονται στο σύνολο των στελεχών, και μάλιστα, με ιδιαίτερη συντήρηση, ενώ τα ορθόλογα του μεταφορέα ουρακίλης, θυμίνης και ξανθίνης RutG, εμφανίζουν σποραδική κατανομή. Η παρουσία του μεταφορέα ουρακίλης UraA σε όλα τα στελέχη της ομάδας *Escherichia/Shigella* χωρίς εξαιρέσεις, υποδηλώνει ότι ο UraA αποτελεί τον κύριο

μεταφορέα ουρακίλης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι ο προγονικός μεταφορέας AncR1 εμφανίζει ένα αυστηρό προφίλ εξειδίκευσης για την ουρακίλη, υποδεικνύει μια μακρά εξελικτική παρουσία της εξειδίκευσης για την ουρακίλη και μια μεταγενέστερη εμφάνιση μιας νέας λειτουργικότητας (ικανότητα μεταφοράς της θυμίνης) σε μια μικρή ομάδα ορθολόγων στα εντεροβακτήρια. Αυτά τα ορθόλογα σχετίζονται πιθανόν με μια προσαρμογή για το μονοπάτι Rut (Rut pathway). Ο RutG αποτελεί μέρος του οπερονίου *rut* που σχετίζεται με το μονοπάτι μεταβολισμού των πυριμιδινών Rut, το οποίο δίνει την δυνατότητα καταβολισμού, εκτός της ουρακίλης, και της θυμίνης (Loh *et al.*, 2006). Ανάλυση των γονιδιωμάτων στελεχών της τάξης Enterobacterales, συσχετίζει την παρουσία του μεταφορέα RutG με την ύπαρξη του οπερονίου *rut*, γεγονός το οποίο διαφοροποιείται σε στελέχη βακτηρίων τα οποία δεν ανήκουν στα εντεροβακτήρια. Στα μη-εντεροβακτήρια, τα ομόλογα του RutG, είτε δεν σχετίζονται με το οπερόνιο *rut*, είτε απουσιάζουν, υποδεικνύοντας ότι το μονοπάτι Rut, μπορεί να χρησιμοποιεί πυριμιδίνες που προέρχονται από ενδογενείς διεργασίες, ή να χρησιμοποιούν κάποιον άλλο μεταφορέα για την εισαγωγή των πυριμιδινών στα κύτταρα (Kim *et al.*, 2010; Parales and Ingraham, 2010; Botou *et al.*, 2018). Στα ορθόλογα των Enterobacterales που έχουν το οπερόνιο *rut*, η επιπλέον εμφάνιση της εξειδίκευσης για τη θυμίνη σχετίζεται ενδεχομένως με μια προσαρμογή για το μονοπάτι Rut.

Συνολικά, η ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση του κοινού προγόνου από τον κλάδο R1, σε συνδυασμό με την εκτενή βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τους μεταφορείς πουρινών-πυριμιδινών της οικογένειας NAT/NCS2 (Botou *et al.*, 2018), αφενός επιβεβαιώνει πρότερες μελέτες για τους μεταφορείς που έχουν μελετηθεί διεξοδικά, αφετέρου θέτει τις ενδείξεις για την πιθανή εξελικτική και φυσιολογική σημασία των μεταφορέων.

4.2 Η διπλή εξειδίκευση για οξειδωμένες πουρίνες έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης-ουρικού οξέος

Για τον κλάδο των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος πραγματοποιήσαμε ανασύσταση του κοινού προγόνου, AncXUacT, του υποκλάδου που αντιπροσωπεύεται από τα χαρακτηρισμένα ομόλογα SmXUacT (SmLL9) του *Sinorhizobium meliloti* και AcS4X6 του *Acinetobacter calcoaceticus* που έχουν μελετηθεί ως προς το προφίλ εξειδίκευσής τους στο εργαστήριό μας (Botou *et al.*, 2020, Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021). Από τα

αποτελέσματά μας προέκυψε ότι ο προγονικός μεταφορέας, AncXUacT, έχει την ικανότητα να μεταφέρει τόσο την ξανθίνη όσο και το ουρικό οξύ με υψηλή συγγένεια, παρόμοια με αυτή των σύγχρονων μεταφορέων SmXUacT και AcS4X6, αλλά σημαντικά μειωμένη ικανότητα μεταφοράς και για τα δύο υποστρώματα συγκριτικά με τους σύγχρονους μεταφορείς (**Εικόνα 3.10, Πίνακας 3.3**). Όσον αφορά στο προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncXUacT, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά ως προς την αναγνώριση αναλόγων πουρινών σε σχέση με τους σημερινούς μεταφορείς (**Εικόνα 3.11, Πίνακας 3.4**).

Η ομοιότητα στο προφίλ εξειδίκευσης μεταξύ των AncXUacT και SmXUacT/AcS4X6, μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι ο προγονικός μεταφορέας συντηρεί, τα ίδια αμινοξέα με αυτά που φέρουν οι σημερινοί μεταφορείς στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης, αλλά και περιφερειακά αυτού, και τα οποία έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην πρόσληψη και μεταφορά της ξανθίνης και του ουρικού οξέος (Frillingos, 2012; Botou *et al.*, 2020). Οι ελάχιστες διαφορές που φέρει στην αμινοξική του αλληλουχία ο AncXUacT σε σχέση με τους σημερινούς μεταφορείς εντοπίζονται σε θέσεις μακριά από το κέντρο δέσμευσης και όσες από αυτές έχουν μελετηθεί με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στον μεταφορέα XanQ, αλλά και στον SmXUacT, δε βρέθηκε να επηρεάζουν την εξειδίκευση (Karena *et al.*, 2015; Botou *et al.*, 2020). Συγκεκριμένα, ο AncXUacT, όπως προκύπτει από την ανάλυση στοίχισης (**Εικόνα 3.8**), διαφέρει από τον SmXUacT σε 11 θέσεις αμινοξέων που εντοπίζονται εντός διαμεμβρανικών τμημάτων (λαμβάνοντας υπόψιν θέσεις στις οποίες αλλάζει ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας). Πρόκειται για τις θέσεις Lys-23 (TM1), Ala-95 (TM3), Ala-127 (TM4), Met-148 (TM5), Gly-178 (TM6), Val-215 (TM7), Thr-256 (TM8), Phe-324, Ala-335 (TM11), Thr-422 και Leu-428 (TM14) (αρίθμηση σύμφωνα με τον SmXUacT). Στις αντίστοιχες θέσεις στον SmXUacT εντοπίζονται τα εξής: Ala-23, Ser-95, Thr-127, Thr-148, Gln-178, Tyr-215, Ile-256, Tyr-324, Thr-335, Ala-442 και Ser-428. Με εξαίρεση τη θέση 215, σε όλες τις άλλες ο AncXUacT συντηρεί το ίδιο αμινοξύ που έχει ο μεταφορέας AcS4X6 (εκτός από τρεις θέσεις στις οποίες συντηρείται ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας των αμινοξέων) και για αυτό πιθανότητα δεν παρατηρείται διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ του προγονικού και των σύγχρονων μεταφορέων δεδομένου ότι οι SmXUacT και AcS4X6 δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική διαφορά στην εξειδίκευση. Το ίδιο ισχύει και στις διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ των AncXUacT και AcS4X6. Ο AncXUacT διαφέρει από το μεταφορέα AcS4X6 σε 9 θέσεις αμινοξέων εντός διαμεμβρανικών τμημάτων. Οι θέσεις αυτές είναι: Gly-22, Val-42 (TM1), Thr-62, Ser-64 (TM2), Phe-115 (TM4), Gly-175, Gly-178 (TM6), Val-215 (TM7) και Thr-328 (TM8)

(αρίθμηση σύμφωνα με τον SmXUacT). Στις αντίστοιχες θέσεις στον AcS4X6 εντοπίζονται: Ser-22, Pro-42, Ala-62, Ala-64, Tyr-115, Glu-175, Glu-178 (TM6), Tyr-215 (TM7) και Ala-328. Με εξαίρεση τη θέση 215, στην οποία AncXUacT διαφέρει και από τα δύο σημερινά ομόλογά του, σε όλες τις άλλες θέσεις συντηρεί το ίδιο αμινοξύ που έχει ο SmXUacT ή αμινοξύ του ίδιου χαρακτήρα. Με εξαίρεση τη θέση 215 όλες οι άλλες αντίστοιχες θέσεις έχουν μελετηθεί με μεταλλαξυγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στο πλαίσιο προηγούμενων ερευνών του εργαστηρίου μας, ενώ δύο από αυτές, οι θέσεις 42 και 64, εξετάστηκαν στην παρούσα Διατριβή (**Παράρτημα 10**) και καμία δε βρέθηκε να έχει κάποιου είδους επίπτωση στην εξειδίκευση. Με βάσει την ανωτέρω ανάλυση, ο συνδυασμός των θέσεων όπου διαφέρει ο AncXUacT από τους σύγχρονους μεταφορείς του κλάδου δεν προκύπτει να είναι σημαντικός για την εξειδίκευση, σε αντίθεση με την περίπτωση του AncXanQ, στην οποία προέκυψε ότι ακόμη λιγότερες αλλαγές εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων ήταν καθοριστικές για την αλλαγή της εξειδίκευσης στον κλάδο XanQ.

Μια ακόμη σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από το λειτουργικό χαρακτηρισμό του AncXUacT, σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα από την ανάλυση του AncXanQ, είναι η ενίσχυση της σημασίας της Asn-93 (TM3) στην εξειδίκευση για την ξανθίνη. Ο AncXUacT συντηρεί Ser στη θέση 93, όπως και οι σημερινοί μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού SmXUacT και AcS4X6, και εμφανίζει ενεργότητα και για τα δύο υποστρώματα. Από την άλλη πλευρά, όλοι οι μεταφορείς του κλάδου XanQ συντηρούν Asn σε αυτή τη θέση στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, κάτι που συμβαίνει αποκλειστικά στον κλάδο XanQ και έχει συνδεθεί με την εξειδίκευση για την ξανθίνη έναντι του ουρικού οξέος, σύμφωνα με αρκετές μελέτες μεταλλαξιγένεσης (Karena and Frillingos, 2009; Karena and Frillingos, 2011; Amillis *et al.*, 2011; Papakostas and Frillingos, 2012; Botou *et al.*, 2020). Επιπλέον, ο AncXanQ, ο NmXanQ, καθώς και όλα τα μεταλλάγματα του κλάδου XanQ που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη διατηρούν αυτό το κατάλοιπο της Asn93 και, ανεξάρτητα από το ιδιαίτερο προφίλ υποστρώματος που παρουσιάζει ο καθένας, όλοι είναι μεταφορείς υψηλής συγγένειας για την ξανθίνη και δεν αναγνωρίζουν το ουρικό οξύ. Έτσι, τα νέα δεδομένα μας από την ανάλυση των προγονικών μεταφορέων AncXUacT και AncXanQ ενισχύουν την υπόθεση ότι η Asn-93 είναι σημαντική για την εξειδίκευση ως προς την ξανθίνη, ενώ η παρουσία της Ser σε αυτή τη θέση φαίνεται να σχετίζεται με την εξασφάλιση της διπλής εξειδίκευσης για την ξανθίνη και το ουρικό οξύ.

4.3 Οι σύγχρονοι μεταφορείς ξανθίνης εξελίχθηκαν από ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορείς ξανθίνης/γουανίνης

Για τον κλάδο των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης πραγματοποιήσαμε ανασύσταση του κοινού προγόνου, AncXanQ, του υποκλάδου που αντιπροσωπεύεται από τον καλά μελετημένο και ειδικό για την ξανθίνη μεταφορέα XanQ της *E. coli*. Ο υποκλάδος αυτός χωρίζεται σε δύο υποομάδες, μια που περιλαμβάνει ομόλογα από β-πρωτεοβακτήρια (τάξη Neisseriales) και μια που περιέχει ομόλογα γ-πρωτεοβακτηρίων (**Εικόνα 3.16, Α**) στην οποία περιλαμβάνονται και οι δυο χαρακτηρισμένοι ειδικοί για την ξανθίνη μεταφορείς XanQ των *E. coli* και *A. veronii*. Από τη λειτουργική ανάλυση προέκυψε ότι ο προγονικός μεταφορέας AncXanQ, σε αντίθεση με τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς αυτού του κλάδου, είναι ένας ευρείας εξειδίκευσης μεταφορέας τόσο για την ξανθίνη όσο και για τη γουανίνη, ενώ μπορεί επίσης να αναγνωρίσει με υψηλή συγγένεια μια σειρά βάσεων και αναλόγων πουρινών (**Πίνακες 3.5 και 3.6**). Με βάση την παρατήρηση αυτή, αποφασίσαμε στη συνέχεια να μελετήσουμε πειραματικά ένα ομόλογο από τον κλάδο των β-πρωτεοβακτηρίων, αυτό της *N. meningitidis*, το οποίο επίσης βρέθηκε να μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη, όπως και ο AncXanQ. Από εξελικτική άποψη, αυτό συνεπάγεται απώλεια της ικανότητας δέσμευσης και μεταφοράς γουανίνης και των αναλόγων γουανίνης στον υποκλάδο των ορθολόγων των γ-πρωτεοβακτηρίων (**Εικόνα 3.16 Α**).

Συνολικά, τα αποτελέσματα από την μελέτη της προγονικής αλληλουχίας AncXanQ, όπως αναλύεται στις ενότητες που ακολουθούν, ενισχύουν τις γνώσεις μας για τους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2 σε τρεις κατευθύνσεις. Πρώτον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα βακτηριακά μέλη της NAT/NCS2 που είναι αυστηρά ειδικοί μεταφορείς για την ξανθίνη μπορεί να έχουν προκύψει από την εξέλιξη μεταφορέων πουρινών ευρείας εξειδίκευσης. Δεύτερον, εκτός από τους μεταφορείς που είναι ειδικοί για την ξανθίνη (και/ή το ουρικό οξύ) και τους μεταφορείς που είναι ειδικοί για τη γουανίνη (και υποξανθίνη και/ή αδενίνη), οι οποίοι ανήκουν σε διαφορετικές υποοικογένειες (NAT/COG2233 και AzgA-like/COG2252, αντίστοιχα), η NAT/NCS2 περιέχει ομόλογα που μπορούν να μεταφέρουν και τα δύο υποστρώματα ξανθίνη και γουανίνη, όπως είναι ο μεταφορέας NmXanQ της *N. meningitidis*. Τρίτον, αποδεικνύεται ότι αλλαγές μακριά από την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος του XanQ μπορούν να επηρεάσουν δραστικά την εξειδίκευση του μεταφορέα, όπως προέκυψε από την ανάλυση του μεταλλάγματος S377G, καθώς και ότι τα αποτελέσματα αυτών των αλλαγών είναι ευαίσθητα σε άλλες

μικρές αλλαγές που μπορεί να έχουν επιστατικές επιπτώσεις σε αυτές, ανάλογα με το μοριακό υπόβαθρο, όπως φαίνεται να συμβαίνει με την αλλαγή G27S.

4.3.1 Μεταφορείς με ικανότητα μεταφοράς γουανίνης ανιχνεύονται για πρώτη φορά στον κλάδο XanQ/UapA

Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής αναλύσαμε λειτουργικά τον κοινό πρόγονο μιας ομάδας ειδικών για την ξανθίνη μεταφορέων (AncXanQ), καθώς και ένα σύγχρονο ομόλογο του ίδιου κλάδου (NmXanQ). Τόσο ο AncXanQ όσο και ο NmXanQ βρέθηκαν ικανοί να μεταφέρουν και τη γουανίνη πέραν της ξανθίνης. Κανένα από τα σύγχρονα ομόλογα μεταφορέων της ομάδας ξανθίνης/ ουρικού (XanQ/ UapA) του κλάδου NAT/COG2233 που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, δεν έχει αντίστοιχη ικανότητα μεταφοράς της γουανίνης. Το ίδιο ισχύει και για τους μεταφορείς γουανίνης που ανήκουν στον κλάδο AzgA-like/COG2252. Παρά τη δομική ομοιότητα της ξανθίνης με τη γουανίνη, κανένας χαρακτηρισμένος μεταφορέας αυτής της ομάδας δεν έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί και τις δύο ενώσεις ως υποστρώματα. Επιπλέον, κανένα μετάλλαγμα στους γνωστούς μέχρι σήμερα μεταφορείς, πέραν του S377G XanQ της *E. coli* δεν έχει βρεθεί ικανό να μεταφέρει τη γουανίνη. Η μεταλλαγή S68T στον XanQ της *E. coli*, ενώ δεν επηρεάζεται η συγγένεια για την ξανθίνη σε σχέση με το XanQ φυσικού τύπου, αναγνωρίζει οριακά γουανίνη, αλλά δεν τη μεταφέρει (Karena *et al.*, 2015). Μέχρι σήμερα, μελέτες με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση σε άλλα βακτηριακά ομόλογα του κλάδου δεν είχαν οδηγήσει σε σημαντική τροποποίηση της εξειδίκευσης. Επιπρόσθετα, από τη συστηματική μεταλλαξιγένεση του UapA (Kourkoulou *et al.*, 2021; Kosti *et al.*, 2010; Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008; Amillis *et al.*, 2001), έχουν προκύψει μεταλλάγματα ή συνδυασμοί μεταλλαγμάτων που προκαλούν διεύρυνση του προφίλ εξειδίκευσης και αναγνώριση της γουανίνης, αλλά η ικανότητα μεταφοράς γουανίνης δεν έχει αναφερθεί, από κανένα μετάλλαγμα μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα, στη θέση Q408, αντικατάσταση της γλουταμίνης από γλουταμινικό οξύ (Q408E), οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια για ξανθίνη και ουρικό οξύ, ενώ το μετάλλαγμα αναγνωρίζει επιπλέον τη γουανίνη και την υποξανθίνη (Koukaki *et al.*, 2005). Την ίδια επίδραση έχουν και οι συνδυαστικές αλλαγές Q408E/T526M και Q408E/T526L (Papageorgiou *et al.*, 2008). Άλλα μεταλλάγματα, μονής αντικατάστασης ή συνδυαστικά, στις θέσεις V463I (Kosti *et al.*, 2010), R481G/T526M (Kosti *et al.*, 2010), E356D/T526M (Papageorgiou *et al.*, 2008), και τα διπλά μεταλλάγματα στη θέση F528 (Q113L/F528S, F406Y/F528S, A441V/F528S, V463I/F528S, A469E/F528S,

R481G/F528S, R481L/F528S, R481Q/F528S) (Kosti *et al.*, 2010, Alguet *et al.*, 2016), έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν τη γουανίνη, την υποξανθίνη και άλλα ανάλογα (ουρακίλη ή αδενίνη, κατά περίπτωση), χωρίς ωστόσο να μπορούν να μεταφέρουν τη γουανίνη.

Με τη λειτουργική ανάλυση του AncXanQ διαπιστώνεται, επομένως, για πρώτη φορά η ικανότητα ενός ομολόγου στον κλάδο XanQ/UapA να μεταφέρει τη γουανίνη. Μάλιστα, ο AncXanQ εμφανίζει υψηλή συγγένεια για την ξανθίνη, αλλά και για τη γουανίνη. Είναι, επίσης, ενδιαφέρον ότι τόσο η γουανίνη όσο και η ξανθίνη αναστέλλουν τη μεταφορά η μία της άλλης με μία έως δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερη συγγένεια (K_i περίπου 50 μM) από τις σταθερές που προκύπτουν από τις δοκιμασίες κινητικής ανάλυσης ($K_M < 0.5\mu\text{M}$ για γουανίνη και 6.5 μM για ξανθίνη). Το ίδιο παρατηρείται με όλες τις περμεάσες γουανίνης /ξανθίνης και τα μεταλλάγματα που ελέγχθηκαν στον κλάδο XanQ (**Πίνακες 3.5, 3.6, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 και 3.22**). Για να εξηγήσουμε τα αποτελέσματά αυτά πραγματοποιήσαμε μελέτες Μοριακής Δυναμικής (σε συνεργασία με την ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού, Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ) για τον AncXanQ, από τις οποίες διαπιστώσαμε ότι η γουανίνη προσανατολίζεται με διαφορετικό τρόπο από την ξανθίνη στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος, παρόλο που οι βασικές αλληλεπιδράσεις για τη δέσμευση του υποστρώματος πραγματοποιούνται από τα ίδια αμινοξέα (**Εικόνες 3.21, 3.22**). Όσον αφορά τον τρόπο δέσμευσης της γουανίνης, δεν υπάρχουν προηγούμενα δεδομένα από οποιονδήποτε μεταφορέα που να έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία είτε στην NAT/NCS2 είτε σε οποιαδήποτε άλλη οικογένεια. Οι κρυσταλλικές δομές ενζύμων της *E. coli* που σχετίζονται με τη γουανίνη τυπικά παρουσιάζουν δισθενείς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των N1H και C2-NH₂ ή C2-NH₂ και N3 με ένα κατάλοιπο γλουταμικού ή κάποιο καρβοξυλικό της κύρια αλυσίδας, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των GuaD (Shek *et al.*, 2019), XapA (Dandanell *et al.*, 2005) και XGPRTase (Vos *et al.*, 1998) που παραπέμπουν στον τρόπο δέσμευσης όπως αυτός παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.22**. Ωστόσο, τα ένζυμα που χρησιμοποιούν τόσο γουανίνη όσο και ξανθίνη όπως τα XapA ή XGPRTase δεσμεύουν τη γουανίνη και την ξανθίνη με παρόμοιες αλληλεπιδράσεις και προσανατολισμούς, σε αντίθεση με τους μεταφορείς γουανίνης και ξανθίνης που εξετάσαμε στην παρούσα Διατριβή.

4.3.2 Ένα ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2 μπορεί να μεταφέρει τόσο ξανθίνη όσο και γουανίνη

Ένα μέρος της παρούσας Διατριβής ήταν η μελέτη του ομολόγου XanQ από το παθογόνο βακτήριο *N. meningitidis*. Από τα αποτελέσματά της λειτουργικής του ανάλυσης προέκυψε για πρώτη φορά ένα προφίλ εξειδίκευσης γουανίνης/ξανθίνης για έναν βακτηριακό μεταφορέα της NAT/NCS2. Όπως διαπιστώθηκε, ο NmXanQ μπορεί να μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη, καθώς επίσης αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια υποξανθίνη και αρκετά ανάλογα (6-SG, 6-MP, 1-MP) επιπλέον των προσδετών που αναγνωρίζονται από τους XanQ μεταφορείς που είναι ειδικοί για την ξανθίνη (οξυπουρινόλη, 3-MX, 2-SX, 6-SX) (**Πίνακας 3.10**). Οι λειτουργικές ιδιότητες του NmXanQ θυμίζουν, χωρίς να είναι ταυτόσημες, το προφίλ του προγονικού μεταφορέα AncXanQ, ο οποίος έχει ένα ευρύτερο φάσμα προσδετών (συμπεριλαμβανομένων αναλόγων που δεν αναγνωρίζονται από τους XanQ ή GhxP, **Πίνακας 3.6**) και είναι ένας πιο αποτελεσματικός μεταφορέας για τη γουανίνη.

Είναι ενδιαφέρον ότι ο XanQ της *Neisseria* συνδυάζει τις ιδιότητες δύο ξεχωριστών μεταφορέων που χρησιμοποιούνται στην *E. coli* για τη μεταφορά ξανθίνης (XanQ) και γουανίνης (GhxP). Ο NmXanQ αναγνωρίζει σχεδόν όλους τους προσδέτες των XanQ και GhxP και έχει παρόμοιες τιμές K_M για την ξανθίνη και τη γουανίνη με τον XanQ και τον GhxP, αντίστοιχα, διαφέροντας μόνο στην ικανότητα μεταφοράς των δυο υποστρωμάτων (10 φορές χαμηλότερη ικανότητα μεταφοράς) (**Πίνακας 3.9**). Αξίζει να αναφερθεί ότι τόσο η *E. coli* όσο και η *A. veronii* διατηρούν ένα ξεχωριστό ομόλογο (GhxP/GhxQ), στην υποοικογένεια AzgA-like/COG2252, η οποία είναι ειδική για την πρόσληψη γουανίνης (και υποξανθίνης) (Papakostas *et al.*, 2013), ενώ τα Neisseriales δεν περιέχουν ένα τέτοιο ομόλογο (**Εικόνα 4.2, Παραρτήματα 11, 12 και 13**). Τα GhxP/GhxQ απουσιάζουν από τα γονιδιώματα των Neisseriales που έχουν το XanQ (που μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη), ενώ άλλα β-πρωτεοβακτήρια (Burkholderiales) που δεν έχουν το XanQ διατηρούν τόσο το XanP (παράλογο που μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά το XanQ), το οποίο επίσης απουσιάζει από τα γονιδιώματα των Neisseriales (**Εικόνα 3.12, Παράρτημα 11**) όσο και GhxP/GhxQ ομόλογα (**Εικόνα 4.2, Παράρτημα 11**).

Παράλληλα, τα ορθόλογα από τα β-πρωτεοβακτήρια (Neisseriales) φαίνεται να έχουν διατηρήσει την αποτελεσματικότητα τους τόσο για την ξανθίνη όσο και για τη γουανίνη, έχοντας παρόμοια απόδοση για τη μεταφορά της ξανθίνης με τον AncXanQ και χαμηλότερη ικανότητα μεταφοράς της γουανίνης συγκριτικά με τον προγονικό μεταφορέα, όπως αποδεικνύεται από τη λειτουργική ανάλυση του ορθολόγου της *N. meningitidis* (**Πίνακες 3.9 και 3.10**). Από την άλλη πλευρά, τα ορθόλογα που είναι ειδικά για την ξανθίνη και διαθέτουν ένα ξεχωριστό μεταφορέα για τη γουανίνη φαίνεται να έχουν και αυξημένη αποτελεσματικότητα για τη μεταφορά της ξανθίνης σε σχέση τόσο με τον NmXanQ, όσο

και με τον AncXanQ, όπως υποδεικνύεται από τα ορθόλογα της *E. coli* αλλά και του *A. veronii* (Λάζου Π., Διδακτορική Διατριβή, 2021). Είναι επομένως πιθανό ότι κατά την εξέλιξη συνέβησαν στον υποκλάδο των γ-πρωτεοβακτηρίων φαινόμενα διπλασιασμού γονιδίων (gene duplication) και έτσι τα στελέχη αυτά απέκτησαν διαφορετικά παράλογα τα οποία εξειδικεύτηκαν για την ξανθίνη και τη γουανίνη, αντίστοιχα βελτιστοποιώντας την αποτελεσματικότητά τους. Αντίστοιχα φαινόμενα δεν παρατηρήθηκαν στον υποκλάδο των β-πρωτεοβακτηρίων. Είναι γνωστό ότι οι προγονικές πρωτεΐνες, γενικώς, ήταν ευρύτερης εξειδίκευσης (promiscuous) και οι σύγχρονες υψηλής- εξειδίκευσης πρωτεΐνες εξελίχθηκαν μετά από διπλασιασμό αυτών των προγονικών γονιδίων διαχωρίζοντας και βελτιστοποιώντας τις προγονικές λειτουργίες (Siddiq *et al.*, 2017). Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται και από τη δική μας μελέτη.

Τέλος, αναφορικά με τον NmXanQ, είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι το προφίλ εξειδίκευσης του θα ήταν αδύνατο να προβλεφθεί χωρίς τη γνώση που προέκυψε από τη μελέτη του AncXanQ και αυτή ήταν που μας ώθησε να εξετάσουμε τις ιδιότητες του XanQ της *N.meningitidis*. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του τονίζουν την αδυναμία των δεδομένων που προκύπτουν από τη φυλογενετική ανάλυση για την πρόβλεψη του προφίλ εξειδίκευσης ακόμη και πολύ στενά συνδεδεμένων ομολόγων μεταφορέων εάν δεν είναι διαθέσιμα λειτουργικά δεδομένα και, επίσης, αναδεικνύουν τη συνεισφορά της μεθόδου της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών για πιο στοχευμένη και αποτελεσματική έρευνα στο πεδίο της μελέτης πρωτεϊνών.

Διδακτορική Διατριβή, 2021) καθώς και τα αντίστοιχα υποστρώματά τους επισημαίνονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο *Maximum Likelihood* με βάση το μοντέλο *Jones-Taylor-Thornton matrix-based* (MEGA 7). Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κύριους κλάδους υπολογίστηκαν με την μέθοδο *bootstrap* (1000 επαναλήψεις).

4.3.3 Κατάλοιπα εκτός του κέντρου δέσμευσης διαμορφώνουν την εξέλιξη της εξειδίκευσης στον κλάδο XanQ

Σημαντικό μέρος της παρούσας Διατριβής ήταν η μελέτη μιας σειράς μεταλλάξεων στο υπόβαθρο τόσο των προγονικών αλληλουχιών, όσο και των σημερινών μεταφορέων. Τα αποτελέσματά της μεταλλαξιγένεσης ανέδειξαν ένα ακόμη σημαντικό κατάλοιπο για την εξειδίκευση ξανθίνης στους μεταφορείς XanQ, αυτό της Ser-377 (TM12). Στο πλαίσιο προηγούμενων μελετών μεταλλαξιγένεσης του εργαστηρίου μας, η Ser-377 είχε αλλαχθεί σε Cys, Ala και Thr (Karena *et al.*, 2015), αλλά αυτές οι αντικαταστάσεις δεν είχαν επίπτωση στην εξειδίκευση (μάλιστα, η S377T οδηγεί σε απενεργοποίηση). Υπό το πρίσμα αυτών των ευρημάτων, τα αποτελέσματά μας στην παρούσα διατριβή ότι το μετάλλαγμα S377G διευρύνει το προφίλ εξειδίκευσης του XanQ, επιτρέποντας τη μεταφορά γουανίνης και την αναγνώριση με υψηλή συγγένεια πολλών αναλόγων γουανίνης (Πίνακες 3.11 και 3.12), υποδηλώνει μια ιδιαίτερη επίδραση της αντικατάστασης με Gly που έρχεται σε συμφωνία με τα δεδομένα από τις αναλύσεις Μοριακής Δυναμικής. Η Gly-377 στο μετάλλαγμα S377G βρίσκεται στη μέση της διαμεμβρανικής έλικας 12 και η παρουσία της Gly φαίνεται να προωθεί μια κλίση της έλικας που αποσταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της Phe-376 με τη Phe-94 στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος (Εικόνες 3.43 και 4.3). Phe-376 και Phe-94 μπορούν να αντικατασταθούν χωρίς σημαντική επίπτωση στην ενεργότητα, παρά το ότι συμβάλλουν στον συντονισμό του υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης. Τα δυο αυτά κατάλοιπα συντηρούνται ως αρωματικά αμινοξέα στους μεταφορείς NAT/COG2233. Η Phe-94 συμμετέχει σε αλληλεπίδραση κάθετης διευθέτησης (T-stacking) με τον δακτύλιο της νουκλεοτιδικής βάσης του υποστρώματος και σε ένα δεσμό υδρογόνου μέσω της αμινικής ομάδας της κύριας αλυσίδας με το N9 της ξανθίνης. Η Phe-376 συμβάλλει στην συγκράτηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο στην ανοιχτή-προς-το-εσωτερικό διαμόρφωση (*inward-open*) του μεταφορέα (Alguet *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017; Karena *et al.*, 2015; Botou *et al.*, 2020). Τα μεταλλάγματα που διατηρούν τον αρωματικό δακτύλιο (F94Y, F376Y) στον XanQ δεν αναστέλλουν την πρόσδεση και τη μεταφορά της ξανθίνης, αλλά η αντικατάσταση ενός από τα δύο φαινύλια οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας κατά 80-90% (F94C, F376C) ή 40-60% (F94I, F376L). Τα μεταλλάγματα

F94Y, F94I (Karena and Frillingos, 2011) και F376L (Karena *et al.*, 2015) παρουσιάζουν πολύ μικρές αλλαγές στην εξειδίκευση, συμπεριλαμβανομένης μιας μείωσης της συγγένειας για την 3-MX στο μετάλλαγμα F94I, η οποία θυμίζει την απώλεια συγγένειας για την 3-MX που παρατηρείται στο μετάλλαγμα S377G (**Πίνακας 3.12**). Στον UraA και στους μεταφορείς ουρακίλης γενικότερα, η μεταλλαγή της αντίστοιχης Phe με Ala οδηγεί σε διεύρυνση της εξειδίκευσης ως προς τη δέσμευση και πρόσληψη της θυμίνης (Botou *et al.*, 2018). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η απορρύθμιση της αλληλεπίδρασης των καταλοίπων Phe376-Phe94 (**Εικόνα 3.43, Εικόνα 4.3**) είναι πιθανό να σχετίζεται με τη διευρυμένη εξειδίκευση του μεταλλάγματος S377G.

Εκτός από την έμμεση επίπτωση της S377G στο κέντρο δέσμευσης όπως προτείνεται στην προηγούμενη παράγραφο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι η S377G, επίσης, αλλάζει τη δυναμική της μεταφοράς προκαλώντας αποσύζευξη στην ολίσθηση της δομικής περιοχής του «πυρήνα» (core ή transport domain), η οποία οδηγεί ουσιαστικά το υπόστρωμα έως τη θέση του κέντρου δέσμευσης (μοντέλο του «ανελκυστήρα»), κατ'αναλογία με όσα προτάθηκαν πρόσφατα για το μυκητιακό NAT/NCS2 ομόλογο UapA (Diallinas, 2021). Η υπόθεση αυτή μπορεί να στηριχθεί στα εξής δεδομένα: Πρώτον, η S377 στον XanQ βρίσκεται στη μέση του TM12, μια έλικα της δομικής περιοχής της «εισόδου» (scaffold ή gate domain) που αποτελεί μέρος της μεσεπιφάνειας στην οποία ολισθαίνει η δομική περιοχή του «πυρήνα» οδηγώντας το υπόστρωμα στη θέση του κέντρου δέσμευσης (elevator mechanism). Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι, με την κλίση του TM12 (**Εικόνα 3.43**), η αλλαγή S377G επηρεάζει την ολίσθηση της δομικής περιοχής του «πυρήνα» (core domain), όπως προτείνεται από το μηχανισμό «ανελκυστήρα» (elevator), και ρυθμίζει την κινητική της μεταφοράς. Αρκετές μεταλλάξεις στη δομική περιοχή «εισόδου» στον UapA (συμπεριλαμβανομένων αλλαγών στο TM12, σε θέσεις που αντιστοιχούν στον XanQ στα M375, I379, R385) μπορούν να διευρύνουν την εξειδίκευση του UapA (που είναι εξαιρετικά επιλεκτικός μεταφορέας για ξανθίνη και ουρικό οξύ) και να επιτρέψουν την αναγνώριση και/ή μεταφορά και άλλων πουρινών ή, ακόμη και της ουρακίλης: οι μεταλλάξεις αυτές στον UapA προτείνεται ότι προκαλούν αλλαγές στη δυναμική της ολίσθησης της δομικής περιοχής «πυρήνα» (Diallinas, 2021). Κατ'αναλογία, η αντικατάσταση S377G στον XanQ θα μπορούσε να επηρεάσει την εξειδίκευση με παρόμοιο τρόπο. Δεύτερον, η S377G δεν επηρεάζει τη συγγένεια για την ξανθίνη ή για τα περισσότερα αναλόγια ξανθίνης (με βάση τις σχετικές K_M και K_i , **Πίνακες 3.11 και 3.12**), υποδεικνύοντας ότι η αλλαγή αυτή δεν αλλάζει τη συνολική τοπογραφία του κέντρου δέσμευσης, αλλά εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη γουανίνη και άλλα μη κανονικά υποστρώματα (όπως η υποξανθίνη και ανάλογα

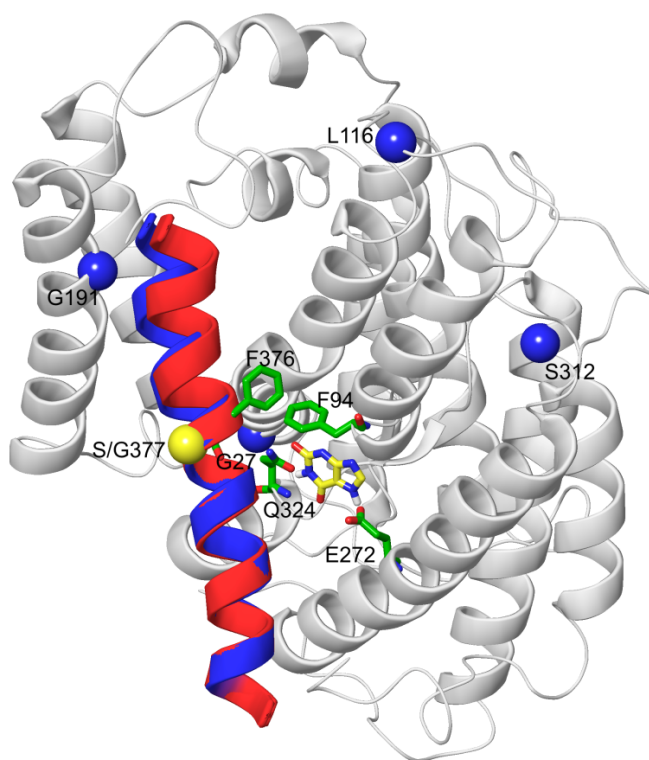
γουανίνης/υποξανθίνης), υποδηλώνοντας ότι η αλλαγή στη συγγένεια για τη γουανίνη και τα ανάλογά της δε μπορεί να οφείλεται μόνο σε τροποποίηση της γεωμετρίας και των αλληλεπιδράσεων στο κέντρο δέσμησης. Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα που πήραμε με υποστρώματα εκτός της γουανίνης, ότι η S377G οδηγεί σε αναγνώριση/πρόσδεση (τιμές K_i) αυτών των μη κανονικών υποστρωμάτων, χωρίς όμως να τα μεταφέρει, υποδεικνύουν ότι η τροποποίηση στη συγγένεια δέσμησης και τις αλληλεπιδράσεις του κέντρου δέσμησης είναι σίγουρα μία συνιστώσα της αλλαγής που επάγει η S377G. Συνοπτικά, είναι πιθανό ότι το μετάλλαγμα S377G μπορεί να επηρεάσει τόσο τη δέσμηση της γουανίνης και άλλων μη κανονικών υποστρωμάτων, όσο και τη δυναμική της μεταφοράς. Κατ' αναλογία με το μηχανισμό που προτείνεται για τον UapA (Diallinas, 2021), μη κανονικά υποστρώματα, όπως η γουανίνη μπορούν επίσης να εισέλθουν στο κέντρο δέσμησης του XanQ, αλλά λόγω του διαφορετικού προσανατολισμού και/ή της ασθενέστερης δέσμησης μπορεί να μη γίνεται δυνατή η ολίσθηση του «ανελκυστήρα» και η αλλαγή στην ανοιχτή προς το εσωτερικό διαμόρφωση (inward conformation). Στο μετάλλαγμα S377G, η αποσύζευξη (uncoupling) του «ανελκυστήρα» από τη δέσμηση του υποστρώματος μπορεί να επιτρέπει τη μετατόπιση της γουανίνης λόγω «χαλαρότερης» πρόσδεσης ή/και αποσύζευξης του μηχανισμού της ολίσθησης.

Η επίδραση που έχει η αλλαγή S377G στην εξειδίκευση δε διατηρείται σε όλα τα υπόβαθρα των ορθολόγων ή των μεταλλαγμάτων του XanQ. Η συνύπαρξη της αλλαγής S377G με την G27S ή την S312T ή και τις δύο μαζί (στο μετάλλαγμα XanQ-5M) καταργεί την επίδρασή της στην εξειδίκευση και αποκαθιστά το ειδικό για την ξανθίνη προφίλ εξειδίκευσης. Αντίθετα, η συνύπαρξη της αλλαγής S377G με τη G191S δεν επηρεάζει τον φαινότυπο του S377G. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.44**, η επιστατική επίδραση της G27S (TM1) ενδεχομένως να οφείλεται στην ενίσχυση ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιεί την περιοχή του κέντρου δέσμησης (Karena *et al.*, 2015): οι πρόσθετες αλληλεπιδράσεις που προκαλούνται από τη G27S ενδέχεται να επηρεάζουν την τοποθέτηση του καταλοίπου Gln-324 στην περιοχή δέσμησης του υποστρώματος με αποτέλεσμα την αποκατάσταση των περιορισμών που δεν επέτρεπαν την πρόσδεση της γουανίνης και είχαν αρθεί στο μετάλλαγμα S377G. Ένα τέτοιο επιστατικό αποτέλεσμα δε φαίνεται να υπάρχει στην περίπτωση της G191S (TM6), η οποία συνιστά μια αντικατάσταση ενός καταλοίπου της δομικής περιοχής της «εισόδου» που δεν συμμετέχει σε κάποιο ανάλογο δίκτυο δεσμών υδρογόνου.

Η αντίστροφη μεταλλαγή, G377S, αποδείχθηκε ότι δεν επηρεάζει την εξειδίκευση στους μεταφορείς ξανθίνης /γουανίνης ευρύτερης εξειδίκευσης στον AncXanQ ή στον NmXanQ.

Το ίδιο ισχύει και για την αντικατάσταση S27G ή για τη συνδυαστική μεταλλαγή S27G/G377S στον AncXanQ. Ωστόσο, ο συνδυασμός τεσσάρων ή πέντε μεταλλαγών συμπεριλαμβανομένων των S27G ή S27G/G377S επιπλέον των A116L/S191G/T312S οδηγεί σε περιορισμό της εξειδίκευσης, κατάργηση της αναγνώρισης και της μεταφοράς γουανίνης. Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι εύκολο να ερμηνευτεί, αλλά σαφώς υποδεικνύει ότι διαφορετικές επιστατικές αλληλεπιδράσεις είναι δυνατό να λάβουν χώρα σε ελαφρώς διαφορετικά μοριακά υπόβαθρα. Στον AncXanQ, για παράδειγμα, η αλλαγή T312S θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι πιο σημαντική για τον περιορισμό της εξειδίκευσης από την S27G ή την G377S.

Επομένως, τα δεδομένα μας από την ανάλυση μεταλλαξιγένεσης υποδεικνύουν ότι οι επιστατικές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν κατάλοιπα εκτός του κέντρου δέσμευσης ενδεχομένως να έχουν διαμορφώσει την εξέλιξη της εξειδίκευσης στο βακτηριακό κλάδο XanQ. Είναι ενδιαφέρον ότι τέτοιου είδους εξαρτώμενες από το «περιβάλλον» (context-dependent) επιστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταλλαγών σε απομακρυσμένες θέσεις έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμες για την εξέλιξη των εξειδικεύσεων στην οικογένεια NAT/NCS2 και από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο μυκητιακό ομόλογο UapA (Kourkoulou *et al.*, 2021).



Εικόνα 4.3. Συνολικό δομικό μοντέλο του μεταφορέα XanQ φυσικού τύπου σε σύμπλεγμα με την ξανθίνη. Το παρουσιαζόμενο τρισδιάστατο μοντέλο προκύπτει από προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής (Molecular Docking) από τη συνεργαζόμενη ομάδα του καθηγητή Ε. Μικρού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ). Επισημαίνονται τα βασικά κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης Q324 και E272, το αλληλεπιδρών ζεύγος F376-F94 και το TM12 (με μπλε χρώμα). Το TM12 στο αντίστοιχο δομικό στιγμιότυπο του XanQ S377G που υπερτίθεται του XanQ φυσικού τύπου εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα. Το κατάλοιπο S/G377 επισημαίνεται με κίτρινη σφαίρα και τα κατάλοιπα G27, L116, G191 και S312 με μπλε σφαίρες.

Συνολικά, από τα αποτελέσματα της ανάλυσης του AncXanQ προέκυψε ότι ένας σχετικά μικρός αριθμός καταλοίπων εκτός της περιοχής του κέντρου δέσμευσης μπορεί να επηρεάσει την εξειδίκευση των μεταφορέων του κλάδου XanQ, ενώ τα κατάλοιπα αυτά θα μπορούσαν να διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των ειδικών για ξανθίνη μεταφορέων από μεταφορείς ευρύτερης εξειδίκευσης. Η αλλαγή ακόμη και ενός από αυτά τα κατάλοιπα (S377G) επιτρέπει τη μετατροπή του σημερινού XanQ μεταφορέα που είναι ειδικός για την ξανθίνη σε ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέα ξανθίνης/γουανίνης. Η αλλαγή στο συγκεκριμένο αμινοξύ είναι παρούσα στον μεταφορέα ξανθίνης/γουανίνης XanQ από γονιδιώματα των *Neisseria* που στερούνται ομόλογους μεταφορείς γουανίνης GhxP/GhxQ. Η αντίστροφη αλλαγή (G377S) δεν επαρκεί για να περιορίσει την εξειδίκευση αυτού του σημερινού XanQ στην αναγνώριση και μεταφορά μόνο της ξανθίνης, ενώ θα χρειαζόταν συνδυασμός αρκετών διαφορετικών αλλαγών στην περίπτωση αυτή, όπως υποδεικνύεται από τη μεταλλαξιγένεση του AncXanQ. Έτσι, μερικές από τις άλλες διαφορές μπορεί να αντιπροσωπεύουν "περιοριστικές" (restrictive) μεταλλάξεις που ελαχιστοποιούν τις πιθανότητες για απώλεια της ικανότητας μεταφοράς γουανίνης από τον XanQ σε βακτήρια που στερούνται εφεδρικούς μεταφορείς για τη γουανίνη. Αντιστρόφως, οι διαφορές στις ίδιες θέσεις, ειδικά η αλλαγή S27G (Εικόνα 3.44) ή η T312S, μπορεί να αντιπροσωπεύουν "επιτρεπτικές" (permissive) μεταλλάξεις που θα διευκόλυναν την υιοθέτηση μιας νέας λειτουργίας για τη μεταφορά της γουανίνης κατά την εμφάνιση μιας κρίσιμης πρόσθετης αλλαγής (S377G) στο υπόβαθρο των XanQ που είναι ειδικοί για την ξανθίνη.

4.4 Συμπεράσματα- Προοπτικές

Όπως είναι γνωστό οι λειτουργικές ιδιότητες των διαμεμβρανικών μεταφορέων είναι δύσκολο να προβλεφθούν με βάση την αλληλουχία τους και τη φυλογενετική τους κατανομή, καθώς μικρές αλλαγές στην αλληλουχία σε συνδυασμό με τις επιστατικές αλληλεπιδράσεις από άλλες αλλαγές, άλλες πρωτεΐνες ή ακόμη και το ίδιο το περιβάλλον

μεμβράνης μπορεί να έχουν καθοριστικά αποτελέσματα. Μέχρι σήμερα, οι σχετικές έρευνες αναφορικά με τις σχέσεις δομής-λειτουργίας των διαμεμβρανικών μεταφορέων έχει βασιστεί αποκλειστικά στη μελέτη σύγχρονων ομολόγων. Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή εφαρμόσαμε για πρώτη φορά μια εξελικτική προσέγγιση βασιζόμενη σε ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση προγονικών αλληλουχιών. Η στρατηγική αυτή εφαρμόστηκε σε κλάδους που αντιπροσωπεύονταν από λειτουργικά χαρακτηρισμένους μεταφορείς και περιλάμβαναν μικρές ομάδες συγγενικών ομολόγων με μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία και διαφορές στην εξειδίκευση. Από τη μελέτη μας προκύπτουν τρία σημαντικά συμπεράσματα για τους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2.

Πρώτον, επιβεβαιώνεται η σπουδαιότητα θέσεων αμινοξέων που ήδη από προηγούμενες μελέτες γνωρίζαμε πως σχετίζονται με την εξειδίκευση. Πρόκειται για τις θέσεις Phe-73 που σχετίζεται με την εξειδίκευση για την ουρακίλη και τη Ser-93 που συνδέεται με τη διπλή εξειδίκευση για ξανθίνη και ουρικό οξύ. Δεύτερον, εντοπίζονται νέες θέσεις αμινοξέων καθοριστικές για την εξειδίκευση. Τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν τη Ser-377 ως ένα σημαντικό κατάλοιπο που είναι υπεύθυνο για την εξειδίκευση ξανθίνης. Τρίτον, διαπιστώνεται πως ένας μικρός συνδυασμός αλλαγών εκτός του κέντρου δέσμευσης μπορεί να επηρεάσει δραστικά την εξειδίκευση των μεταφορέων, όπως προέκυψε στην περίπτωση του AncXanQ, και ότι τα αποτελέσματα αυτών των αλλαγών είναι ευαίσθητα σε άλλες μικρές αλλαγές που μπορεί να έχουν επιστατικές επιπτώσεις σε αυτές, ανάλογα με το μοριακό υπόβαθρο.

Συνολικά, βασιζόμενοι στην εφαρμογή της στρατηγικής της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών, αποκαλύψαμε λειτουργικά προφίλ και προφίλ εξειδίκευσης που δεν θα μπορούσαν να προβλεφθούν μόνο από τη σύγκριση των σημερινών ομολόγων. Η εφαρμογή τέτοιων εξελικτικών μεθόδων θα μπορούσε να προσφέρει έναν νέο αποτελεσματικό τρόπο για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξειδίκευσης στις πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς.

Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

Η οικογένεια NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporter/ Nucleobase-Cation Symporter-2) εμφανίζει ευρεία εξελικτική διάδοση και συντήρηση ενός βασικού δομικού προτύπου, αλλά και ένα σημαντικό ρεπερτόριο διαφορετικών εξειδικεύσεων. Οι έως τώρα μελέτες για την κατανόηση της εξειδίκευσης των μεταφορέων αυτών έχουν στηριχθεί σε συγκριτική ανάλυση και διεξοδική μεταλλαξιγένεση σημερινών ομολόγων. Ωστόσο, η σχέση των διαφορών στην αλληλουχία τους με τις διαφορές εξειδίκευσης είναι πολύπλοκη και τέτοιες μελέτες συνήθως δε δίνουν μια σαφή εικόνα για τα αμινοξέα που καθορίζουν τους διαφορετικούς τύπους εξειδίκευσης ή το πως εξελίχθηκαν οι διαφορετικές εξειδικεύσεις. Στην παρούσα Διατριβή, για να κατανοήσουμε τη μοριακή βάση των διαφορών εξειδίκευσης στους μεταφορείς NAT/NCS2 εφαρμόσαμε μια εξελικτική στρατηγική (Ancestral Sequence Reconstruction) που στηρίζεται σε φυλογενετική ανάλυση και ανασύσταση των προγονικών αλληλουχιών.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε εκτενή φυλογενετική ανάλυση, ανασύσταση και λειτουργική ανάλυση των προγονικών αλληλουχιών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν την «κοινή ρίζα» τριών μονοφυλετικών κλάδων βακτηριακών NAT/NCS2 ομολόγων με διακριτά προφίλ εξειδίκευσης. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε (i) τον κλάδο των ομολόγων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης (ii) τον κλάδο των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος και (iii) τον υποκλάδο που αντιπροσωπεύεται από τους ειδικούς για την ξανθίνη μεταφορείς. Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν ξεχωριστά εξελικτικά σενάρια για την ανάπτυξη των σχετικών προφίλ εξειδίκευσης στους τρεις ξεχωριστούς κλάδους που μελετήθηκαν. Πιο αναλυτικά:

(i) Με βάση τη φυλογένεση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης στα Πρωτεοβακτήρια (Botou *et al.*, *Mol Microbiol.* 2018; 108(2):204-219), πραγματοποιήσαμε ανασύσταση και ανάλυση της προγονικής αλληλουχίας για έναν κλάδο (αναφέρεται ως κλάδος R1) που αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα ουρακίλης/θυμίνης RutG της *E. coli* και τον ειδικό για την ουρακίλη μεταφορέα AcS572 του *A. calcoaceticus*. Η προγονική αλληλουχία που αναφέρεται ως AncR1 παρήχθησε με γονιδιακή σύνθεση και μεταφέρθηκε σε *E. coli* K-12, ώστε να χαρακτηριστεί λειτουργικά. Ο AncR1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην πλασματική μεμβράνη και βρέθηκε ότι είναι ειδικός για την ουρακίλη, όπως και ο AcS572. Περαιτέρω ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης του AncR1 υπέδειξε ότι αυτό είναι πιο αυστηρό από του σύγχρονου μεταφορέα RutG, υπονοώντας μια μακρά εξελικτική

παρουσία της εξειδίκευσης για την ουρακίλη και μια πρόσφατη απόκλιση για επιπλέον εξειδίκευση για τη θυμίνη που εμφανίζεται μόνο στα Enterobacterales.

(ii) Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής φυλογενετική ανάλυση των βακτηριακών ομόλογων ξανθίνης/ουρικού οξέος της οικογένειας NAT/NCS2 που εμπίπτουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων και έγινε ανασύσταση του AncXUacT, κοινού προγόνου για έναν υποκλάδο που αντιπροσωπεύεται από τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος SmXUacT του *Sinorhizobium meliloti* και AcS4X6 του *Acinetobacter calcoaceticus*. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ο AncXUacT ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη της *E. coli* και όπως και οι σημερινές περμεάσες του κλάδου μεταφέρει τόσο την ξανθίνη όσο και το ουρικό οξύ. Επιπλέον, κινητική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τον AncXUacT υπέδειξε ότι έχει σχετικά υψηλή συγγένεια, αλλά χαμηλή ικανότητα μεταφοράς, τόσο για το ουρικό οξύ όσο και για την ξανθίνη. Το προφίλ εξειδίκευσης του AncXUacT δεν διαφέρει ουσιαστικά από αυτό των σημερινών ομολόγων του, υποδηλώνοντας μια βαθιά εξελικτική προέλευση της διπλής εξειδίκευσης για οξειδωμένες πουρίνες.

(iii) Αναλύσαμε μια μονοφυλετική ομάδα μεταφορέων στην οικογένεια NAT/NCS2 που αντιπροσωπεύεται από το γνωστό ειδικό για την ξανθίνη μεταφορέα XanQ της *E. coli*. Πραγματοποιήθηκε ανασύσταση του AncXanQ, πιθανού κοινού προγόνου αυτού του κλάδου, έκφρασή του στην *E. coli* K-12 και λειτουργικός χαρακτηρισμός του από τον οποίο διαπιστώθηκε ότι, σε αντίθεση με τον XanQ, ο AncXanQ είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας τόσο για την ξανθίνη όσο και για τη γουανίνη. Το προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ είναι ιδιαίτερα ευρύ, καθώς αναγνωρίζει όχι μόνο τη γουανίνη και την ξανθίνη, αλλά και την αδενίνη και την υποξανθίνη και όλα τα ανάλογα τους που εξετάστηκαν, εκτός από την αλλοπουρινόλη και το ουρικό οξύ. Από τα δεδομένα μας υποδεικνύεται ότι οι σύγχρονες ειδικές για την ξανθίνη περμεάσες έχουν προέλθει από μεταφορείς ξανθίνης-γουανίνης ευρύτερης εξειδίκευσης.

Για να κατανοήσουμε τη διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ του AncXanQ και του σημερινού ειδικού για την ξανθίνη μεταφορέα XanQ, υποβάλαμε και τα δύο ομόλογα σε ορθολογικά σχεδιασμένη συνδυαστική μεταλλαξιγένεση. Ο AncXanQ διατηρεί όλα τα σημαντικά κατάλοιπα του XanQ και διαφέρει σε πέντε μόνο κατάλοιπα εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων, τα οποία εντοπίζονται σε θέσεις μακριά από την προβλεπόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος. Τα αμινοξέα του AncXanQ που διαφέρουν είναι: Ser27 (Gly στον XanQ); Ala116 (Leu στον XanQ); Ser191 (Gly στον XanQ); Thr312 (Ser στον XanQ) και Gly377 (Ser στον XanQ). Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης υπέδειξαν ότι ο συνδυασμός των αλλαγών σε αυτές τις πέντε θέσεις δεν επηρεάζει τον

XanQ, αλλά είναι ικανός να αλλάξει το ευρύ προφίλ εξειδίκευσης του AncXanQ σε έναν ειδικό για την ξανθίνη μεταφορά.

Για να εξεταστεί η επίδραση των πέντε αμινοξέων στην εξειδίκευση για τη γουανίνη, σε ένα παρεμφερές, αλλά διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και ανάλυση του ομολόγου από τη *Neisseria meningitidis* (NmXanQ) που διατηρεί στις προαναφερθείσες πέντε θέσεις ένα συνδυασμό Ser27/Ala116/Ala191/Thr312/Gly377, ο οποίος διαφέρει σε ένα μόνο κατάλοιπο (Ala191) από τον AncXanQ. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι αυτό το ομόλογο αποτελεί επίσης ένα μεταφορέα ξανθίνης/γουανίνης με λειτουργικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του AncXanQ, ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι πέντε αυτές θέσεις αμινοξέων, εκτός του προβλεπόμενου κέντρου δέσμησης, μπορεί να είναι υπεύθυνες για την ευρύτερη εξειδίκευση του AncXanQ.

Από τις πέντε αυτές παραλλαγές, η Ser/Gly377 βρίσκεται ακριβώς δίπλα σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο Phe/Tyr, το οποίο με βάση τα δεδομένα από τη δομική μοντελοποίηση των UapA και UraA συμμετέχει στο συντονισμό του υποστρώματος. Για να διερευνήσουμε λεπτομερέστερα το ρόλο της Ser/Gly377, κατασκευάσαμε και μελετήσαμε λειτουργικά μια σειρά μεταλλαγμάτων στα υπόβαθρα των μεταφορέων XanQ, NmXanQ και AncXanQ. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση της Ser377 με Gly διευρύνει την εξειδίκευση του XanQ προς έναν φαινότυπο όμοιο με αυτόν του AncXanQ. Από την άλλη πλευρά, τα μεταλλάγματα AncXanQ-G377S και NmXanQ-G377S παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση γουανίνης/ξανθίνης. Για να κατανοήσουμε καλύτερα τις μεταβολές στην εξειδίκευση του XanQ που παρατηρήθηκαν λόγω της μεταλλαγής S377G πραγματοποιήσαμε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (σε συνεργασία με την ομάδα του Εμμανουήλ Μικρού, Τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ). Από τις αναλύσεις αυτές διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση S377G προκαλεί μια κάμψη στη διαμεμβρανική έλικα 12 με αποτέλεσμα την αναδιάταξη της F376 σε σχέση με τη F94 στο κέντρο δέσμησης του XanQ. Αυτή η επίδραση μπορεί να ερμηνεύσει τη διεύρυνση που παρατηρείται στην εξειδίκευση. Τέλος, η επίδραση της αλλαγής S377G στη διεύρυνση της εξειδίκευσης του XanQ φαίνεται να καταστέλλεται από επιστατικές αλληλεπιδράσεις με τη G27S ή άλλες μεταλλάξεις.

Συνολικά, η μελέτη μας αναφορικά με τον AncXanQ που βασίστηκε στη στρατηγική της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών, μας βοήθησε να αποκαλύψουμε νέα κατάλοιπα σημαντικά για την εξειδίκευση - συγκεκριμένα, αναδείχθηκε ο ρόλος της Ser377 του XanQ στον καθορισμό της εξειδίκευσης - και να προβλέψουμε με ακρίβεια το λειτουργικό προφίλ ενός σημερινού ομολόγου από ένα σημαντικό παθογόνο.

Ph.D. Thesis Summary

The NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporter/ Nucleobase-Cation Symporter-2) family encompasses secondary active transporters with wide evolutionary distribution and diversity in substrate profiles. To date, the molecular basis of specificity differences has been studied through horizontal comparisons and mutational analysis of present-day homologs. However, the sequence-specificity correlation of transporters is complex and such studies usually fail to identify key residues sufficient to switch the specificity of one transporter to another. In this study, we applied a strategy based on phylogenetic analysis and resurrection of ancestral sequences for addressing the evolutionary basis of specificity deviations.

In this respect, we performed extensive phylogenetic analysis, reconstruct and analyze functionally the last common ancestral genes of three monophyletic subgroups of bacterial NAT/NCS2 transporters, characterized by homologs of different specificities. In particular, we studied (i) the uracil/thymine clade (ii) the xanthine/uric acid clade and (iii) the clade represented by xanthine-specific permeases. Our results reveal distinct evolutionary scenarios for the development of the relevant substrate profiles in the three clades. In more detail:

(i) Based on the phylogeny of the UraA homology cluster in Proteobacteria ((Botou *et al.*, *Mol Microbiol.* 2018; 108(2):204-219), we reconstructed and studied the ancestral homolog for a clade (termed R1) represented by the uracil/thymine transporter RutG of *E. coli* and the uracil-specific AcS572 of *A. calcoaceticus*. After gene synthesis the ancestral sequence, referred to as AncR1, was transferred and assayed in *E. coli* K-12. AncR1 is expressed at high levels in the plasma membrane and found to be specific for uracil, similarly to AcS572, whereas RutG transports uracil, thymine and xanthine. The specificity profile of AncR1 was also tested and proved to be more strict than the one of the modern RutG transporter, implying a long evolutionary presence of the uracil specificity and a recent derivation of the additional specificity for thymine which only appears in Enterobacterales.

(ii) We performed extensive phylogenetic analysis of the bacterial homologs of xanthine/uric acid permeases of the NAT/NCS2 family and reconstructed AncXUacT, the ancestral homolog for a clade represented by the xanthine/uric acid transporters SmXUacT of *Sinorhizobium meliloti* and AcS4X6 of *Acinetobacter calcoaceticus*. Our results show that AncXUacT is detected at high protein levels in the membrane of host *E. coli* and as its present-day descendants' transports both xanthine and uric acid. Further kinetic analysis of

AncXUacT showed it has relatively high affinity, but low capacity for both uric acid and xanthine. The specificity profile of AncXUacT does not differ substantially from its present-day orthologs, implying an evolutionary deep origin of this dual profile for oxidized purines.

(iii) We analyzed a monophyletic group of permeases in the Nucleobase-Ascorbate Transporter/Nucleobase-Cation Symporter-2 (NAT/NCS2) family represented by the well-known xanthine-specific XanQ of *E. coli*. We reconstructed AncXanQ, the putative common ancestor of this clade, expressed it in *E. coli* K-12, and found that, in contrast to XanQ, it encodes a high-affinity permease for both xanthine and guanine. The ligand profile of AncXanQ is broad, as it recognizes not only guanine and xanthine, but also adenine and hypoxanthine, and all of their analogs tested, except allopurinol and uric acid. Our data provide evidence that the modern xanthine-specific permeases have derived from xanthine-guanine transporters of broader specificity.

To understand the difference between AncXanQ and its present-day xanthine-specific descendant XanQ, we subjected both homologs to rationally designed combinatorial mutagenesis. AncXanQ conserves all binding-site residues of XanQ and differs substantially in only five intramembrane residues outside the binding site. The deviating amino acids of AncXanQ are: Ser27 (Gly in XanQ); Ala116 (Leu in XanQ); Ser191 (Gly in XanQ); Thr312 (Ser in XanQ); and Gly377 (Ser in XanQ). Our results demonstrate that the combination of replacements at these five positions does not affect XanQ, but is sufficient to change the promiscuous AncXanQ to a xanthine-specific permease variant.

To examine whether these specificity-related changes are also valid in a different transporter background we analyzed the *Neisseria meningitidis* ortholog (NmXanQ) that retains a combination of Ser27/Ala116/Ala191/Thr312/Gly377, which differs in one residue (Ala191) from AncXanQ. Our results indicate that this homolog is also a xanthine/guanine transporter with functional properties similar to AncXanQ, reinforcing the view that these five amino acid residues outside the predicted binding site might be responsible for the broader specificity of AncXanQ.

Of the five variations, Ser/Gly377 is next to a conserved Phe/Tyr which is expected to contribute to substrate coordination based on the structural evidence from UraA and UapA. To explore the role of Ser/Gly377 in more detail, we engineered and studied a series of mutants in the AncXanQ, NmXanQ, and XanQ backgrounds. Indeed, replacement of Ser377 with Gly enlarges the specificity of XanQ towards an AncXanQ-phenotype. On the other hand, the engineered AncXanQ-G377S and NmXanQ-G377S yield broad-specificity guanine/xanthine permeases. To better understand the specificity alterations of XanQ

observed due to the S377G mutation we performed Molecular Dynamics simulations (in collaboration with the group of Emmanuel Mikros, at the Department of Pharmaceutical Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens). It appears that the S377G replacement tilts transmembrane helix 12 resulting in rearrangement of F376 relative to F94 in the XanQ binding pocket. This effect may explain the enlarged specificity. The specificity effect of S377G can be masked by G27S or other mutations through epistatic interactions. Overall, our study on AncXanQ, based on the Ancestral Reconstruction approach, helped us to elucidate new specificity determinants- specifically, we reveal Ser377 of XanQ as a major determinant- and to correctly predict the functional profile of a present-day homolog from an important pathogen.

Βιβλιογραφία

Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–5.

Agafonov, R.V., Wilson, C., Otten, R., Buosi, V., and Kern, D. (2014). Energetic dissection of Gleevec's selectivity toward human tyrosine kinases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 848–53.

Akanuma, S. (2017). Characterization of Reconstructed Ancestral Proteins Suggests a Change in Temperature of the Ancient Biosphere. *Life* 7, 33.

Alexander, C. R., Dingman, D. W., Schultes, N. P., and Mourad, G. S. (2018). The solute transport profile of two Aza-guanine transporters from the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *FEMS Microbiol Lett.* 365 (7).

Alexander, W. G., Wisecaver, J. H., Rokas, A., and Hittinger, C.T. (2016). Horizontally acquired genes in early-diverging pathogenic fungi enable the use of host nucleosides and nucleotides. *Proc Natl Acad Sci.* 113, 4116–4121.

Alguel, Y., Amillis, S., Leung, J., Lambrinidis, G., Capaldi, S., Scull, N. J., Cravens, G., Iwata, S., Armstrong, A., Mikros, E., Diallinas, G., Cameron, A. D., and Byrne, B. (2016). Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nature Commun.* 7, 11336.

- Amillis, S., Koukaki, M., and Diallinas, G. (2001). Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid- xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J Mol Biol.* 313, 765-774.
- Amillis, S., Kosti, V., Pantazopoulou, A., Mikros, E., and Diallinas, G. (2011). Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J Mol Biol.* 411, 567–580.
- Andersen, P. S., Frees, D., Fast, R., and Mygind, B. (1995). Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J Bacteriol.* 177, 2008–2013.
- Anderson, D. P., Whitney, D. S., Hanson-Smith, V., Woznica, A., Campodonico-Burnett, W., Volkman, B. F., King, N., Thornton, J. W., and Prehoda, K. E. (2015). Evolution of an ancient protein function involved in organized multicellularity in animals. *eLife* 5, e10147.
- Anderson, J. A., Loes, A. N., Waddell, G. L., and Harms, M. J. (2019). Tracing the evolution of novel features of human Toll-like receptor 4. *Protein Science* 28, 1350-1358.
- Aoki, S. (2004). Resurrection of an ancestral gene: functional and evolutionary analyses of the Ngrol genes transferred from *Agrobacterium* to *Nicotiana*. *J Plant Res.* 117, 329–337.
- Arakawa, T., Kobayashi-Yurugi, T., Alguet, 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., and Iwata, S. (2015). Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science* 350, 680-684.
- Argyrou, E., Sophianopoulou, V., Schultes, N., and Diallinas, G. (2001). Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 13, 953–964.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008.
- Blanchet, G., Alili, D., Protte, A., Upert, G., Gilles, N., Tepshi, L., Stura, E. A., Mourier, G., and Servent, D. (2017). Ancestral protein resurrection and engineering opportunities of the mamba aminergic toxins. *Scientific reports* 7, 2701.
- Bloom, J. D., Gong, L. I., and Baltimore, D. (2010). Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* 328, 1272–75.

- Botou, M., Lazou, P., Papakostas, K., Lambrinidis, G., Evangelidis, T., Mikros, E., and Frillingos, S. (2018). Insight on specificity of uracil permeases of the NAT/NCS2 family from analysis of the transporter encoded in the pyrimidine utilization operon of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 108, 204-219.
- Botou, M., Yalélis, V., Lazou, P., Zantza, I., Papakostas, K., Charalambous, V., Mikros, E., Flemetakis, E., and Frillingos, S. (2020). Specificity profile of NAT/NCS2 purine transporters in *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*. *Mol Microbiol.* 114, 151-171.
- Boucher, J. I., Jacobowitz, J. R., Beckett, B. C., Classen, S., and Theobald, D. L. (2014). An atomic-resolution view of neofunctionalization in the evolution of apicomplexan lactate dehydrogenases. *eLife* 3, e02304.
- Boudker, O., Ryan, R. M., Yernool, D., Shimamoto, K., and Gouaux, E. (2007). Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* 445, 387-393.
- Bridgham, J. T., Carroll, S. M., and Thornton, J. W. (2006). Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science* 312, 97–101.
- Bridgham, J. T., Ortlund, E. A., and Thornton, J. W. (2009). An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution. *Nature* 461, 515–19.
- Bürzle, M., and Hediger, M. A. (2012). Functional and physiological role of vitamin C transporters. *Curr Top Membr.* 70, 357–375.
- Bürzle, M., Suzuki, Y., Ackermann, D., Miyazaki, H., Maeda, N., Clemençon, B., Burrier, R., and Hediger, M. A. (2013). The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Mol Aspects Med* 34, 436-454.
- Carletti, M. S., Monzon, A. M., Garcia-Rios, E., Benitez, G., Hirsh, L., Fornasari, M. S., and Parisi, G. (2020). Revenant: a database of resurrected proteins. *Database (Oxford)* baaa031.
- Carrasco, N., Herzlinger, D., Mitchell, R., De Chiara, S., Danho, W., Gabriel, T. F., and Kaback, H. R. (1984). Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes. *Proc. Natl Acad. Sci.* 81, 4672-4676.

- Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004). The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*: Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J Biol Chem.* 279, 3132-3141.
- Cézar-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R. A., Hepworth, D., Hediger, M. A., Edwards, A. M., and Superti-Furga, G. (2015). A call for systematic research on solute carriers. *Cell* 162, 478-486.
- Chai, W., Peng, X., Liu, B., Wang, J., Zhu, Z., Liu, Y., Zhao, K., Cheng, B., Si, W., and Jiang, H. (2018). Comparative Genomics, Whole-Genome Re-sequencing and Expression Profile Analysis of Nucleobase: Cation Symporter 2 (NCS2) Genes in Maize. *Front Plant Sci.* 28, 856.
- Chaliotis, A., Vlastaridis, P., Ntountoumi, C., Botou, M., Yaelis, V., Lazou, P., Tatsaki, E., Mossialos, D., Frilingos, S., and Amoutzias, G. D. (2018). NAT/NCS2-hound: A web server for the detection and evolutionary classification of prokaryotic and eukaryotic nucleobase-cation symporters of the NAT/NCS2 family. *GigaScience* 7, 1-8.
- Chang, B. S., Jönsson, K., Kazmi, M. A., Donoghue, M. J., and Sakmar, T. P. (2002). Recreating a functional ancestral archosaur visual pigment. *Mol Biol Evol.* 19, 1483–1489.
- Chang, Y. N., Jaumann, E. A., Reichel, K., Hartmann, J., Oliver, D., Hummer, G., Joseph, B., and Geertsma, E. R. (2019). Structural basis for functional interactions in dimers of SLC26 transporters. *Nat Commun.* 10, 2032.
- Chen, I. M. A., Markowitz, V. M., Chu, K., Anderson, I., Mavromatis, K., Kyrpides, N. C., and Ivanova, N. N. (2013). Improving microbial genome annotations in an integrated database context. *PloS One* 8, e54859.
- Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
- Cheng, G., Dai, M., Ahmed, S., Hao, H., Wang, X., and Yuan, Z. (2016). Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol.* 7, 470.
- Chi, X., Jin, X., Chen, Y., Lu, X., Tu, X., Li, X., Zhang, Y., Lei, J., Huang, J., Huang, Z., Zhou, Q., and Pan, X. (2020). Structural insights into the gating mechanism of human SLC26A9 mediated by its C-terminal sequence. *Cell Discov.* 6, 55.

- Christiansen, L. C., Schou, S., Nygaard, P., and Saxild, H. H. (1997). Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol.* 179, 2540–2550.
- Clifton, B. E., and Jackson, C. J. (2016). Ancestral Protein Reconstruction Yields Insights into Adaptive Evolution of Binding Specificity in Solute-Binding Proteins. *Cell Chem Biol.* 23, 236-245.
- Consler, T. G., Persson, B. L., Jung, H., Zen, K. H., Jung, K., Prive, G. G., Verner, G. E., and Kaback, H. R. (1993). Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 90, 6934–6938.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Dandanell, G., Szczepanowski, R. H., Kierdaszuk, B., Shugar, D., and Bochtler, M. (2005). *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase II, the product of the *xapA* gene. *J. Mol. Biol.* 348, 113-125.
- Dean, P., Hirt, R. P. and Embley, T. M. (2016). Microsporidia: why make nucleotides if you can steal them? *PLoS Pathog.* 12, e1005870.
- Dean, P., Sendra, K. M., Williams, T. A., Watson, A. K., Major, P., Nakjang, S., Kozhevnikova, E., Goldberg, A. V., Kunji, E. R. S., and Embley, T. M. (2018). Transporter gene acquisition and innovation in the evolution of Microsporidia intracellular parasites. *Nat. Comm.* 9, 1709.
- Degnan, P. H., Barry, N. A., Mok, K. C., Taga, M. E., and Goodman, A. L. (2014). Human gut microbes use multiple transporters to distinguish vitamin B12 analogs and compete in the gut. *Cell Host & Microbe* 15, 47-57.
- De Koning, H. P., Bridges, D. J., and Burchmore, R. J. (2005). Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 987-1020.
- Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., and Yan, N. (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510, 121–125.

Deng, D., Sun, P., Yan, C., Ke, M., Jiang, X., Xiong, L., Ren, W., Hirata, K., Yamamoto, M., Fan, S., and Yan, N. (2015). Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature* 526, 391–396.

Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A., and Scazzocchio, C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J.* 17, 3827–3837.

Diallinas, G., and Gournas, C. (2008). Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems. *Channels* 2, 363–372.

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

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

Diallinas, G. (2021). Transporter specificity : A tale of loosened elevator-sliding. *Trends Biochem. Sci.* 46, 708-717.

Didier, E. S., and Weiss, L. M. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 490–495.

Dimroth, P. (1997). Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1318, 11-51.

Doolittle, W. F. (1999). Lateral genomics. *Trends Cell Biol.* 9, M5–M8.

Drew, D., and Boudker, O. (2016). Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem.* 85, 543-572.

Ebrecht, A. C., Orlof, A. M., Sasoni, N., Figueroa, C. M., Iglesias, A. A., and Ballicora, M. A. (2015). On the Ancestral UDP-Glucose Pyrophosphorylase Activity of GalF from *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 6, 1253.

Eick, G. N., Colucci, J. K., Harms, M. J., Ortlund, E. A., and Thornton, J. W. (2012). Evolution of minimal specificity and promiscuity in steroid hormone receptors. *PLoS Genetics* 8, e1003072.

- Elbourne, L. D. H., Tetu, S. G., Hassan, K. A., and Paulsen, I. T. (2017). TransportDB 2.0: A Database for Exploring Membrane Transporters in Sequenced Genomes from All Domains of Life. *Nucleic Acids Res.* 45, D320–D324.
- Elion, G. B. (1989). The purine path to chemotherapy. *Science* 244, 41–47.
- Felsenstein, J. (2004). Inferring Phylogenies. *Systematic Biology* 53, 669–670.
- Ferrari, V., and Serpi, M. (2015). Nucleoside analogs and tuberculosis: new weapons against an old enemy. *Future Med Chem.* 7, 291–314.
- Field, F. S. and Matz, M. V. (2010). Retracing Evolution of Red Fluorescence in GFP-Like Proteins from Faviina Corals. *Mol. Biol. Evol.* 27, 225–233.
- Finnigan, G. C., Ryan, M., and Stevens, T. H. (2011). A genome-wide enhancer screen implicates sphingolipid composition in vacuolar ATPase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187, 771–83.
- Finnigan, G. C., Hanson-Smith, V., Stevens, T. H., and Thornton, J. W. (2012). Evolution of increased complexity in a molecular machine. *Nature* 481, 360–364.
- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., Rasmussen, J. B., Solomon, P. S., McDonald, B. A., and Oliver, R. P. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat Genet.* 38, 953–956.
- Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Persson, B., and Kaback, H. R. (1994). Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33, 8074–8081.
- Frillingos, S., and Kaback, H. R. (2001). Altering sugar transport specificity of a bacterial oligosaccharide H^+ symporter (OHS) by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 268, 223–226.
- Frillingos, S. (2012). Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol.* 3, 250–272.
- Garaeva, A. A., and Slotboom, D. J. (2020). Elevator-type mechanisms of membrane transport. *Biochem Soc Trans.* 48, 1227–1241.

Gardiner, D. M., McDonald, M. C., Covarelli, L., Solomon, P. S., Rusu, A. G., Marshall, M., Kazan, K., Chakraborty, S., McDonald, B. A., and Manners, J. M. (2012). Comparative pathogenomics reveals horizontally acquired novel virulence genes in fungi infecting cereal hosts. *PLoS Pathog.* 8, e1002952.

Gaucher, E. A., Thomson, J. M., Burgan, M. F., and Benner, S. A. (2003). Inferring the palaeoenvironment of ancient bacteria on the basis of resurrected proteins. *Nature* 425, 285–88.

Geertsma, E. R., Chang, Y. N., Shaik, F. R., Neldner, Y., Pardon, E., Steyaert, J., and Dutzler, R. (2015). Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family. *Nature Struct. Mol. Biol.* 22, 803-808.

Genee, H. J., Bali, A. P., Petersen, S. D., Siedler, S., Bonde MT, Gronenberg, L. S., Kristensen, M., Harrison, S. J., and Sommer, M. O. (2016). Functional mining of transporters using synthetic selections. *Nature Chem Biol.* 12, 1015-1022.

Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E., and Frillingos, S. (2010). Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the Ygfo xanthine permease: Asn-325 binds and Ala-323 senses substrate. *J. Biol. Chem.* 285, 19422-19433.

Gerlt, J. A., and Babbitt, P. C. (2009). Enzyme (re)design: lessons from natural evolution and computation. *Curr Opin Chem Biol.* 13, 10-8.

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

Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S., and Dhalluin, G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol Membr Biol.* 22, 263–275.

Goudela, S., Reichard, U., Amillis, S., and Dhalluin, G. (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol.* 45, 459-472.

Gournas, C., Papageorgiou, I., and Dhalluin, G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol Biosyst.* 4, 404-416.

Grinshpon, R. D., Shrestha, S., Titus-McQuillan, J., Hamilton, P. T., Swartz, P. D., and Clark, A. C. (2019). Resurrection of ancestral effector caspases identifies novel networks for evolution of substrate specificity. *Biochem J.* 476, 3475–3492.

Gruswitz, F., Chaudhary, S., Ho, J. D., Schlessinger, A., Pezeshki, B., Ho, C. M., Sali, A., Westhoff C. M., and Stroud, R. M. (2010). Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9638–9643.

Hadzipasic, A., Wilson, C., Nguyen, V., Kern, N., Kim, C., Pitsawong, W., Villali, J., Zheng, Y., and Kern, D. (2020). Ancient origins of allosteric activation in a Ser-Thr kinase. *Science*, 367, 912–917.

Harms, M. J., and Thornton, J. W. (2010). Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 360-366.

Harms, M. J., and Thornton, J. W. (2014). Historical contingency and its biophysical basis in glucocorticoid receptor evolution. *Nature* 512, 203–7.

Hartz, P., Strohmaier, S. J., El-Gayar, B. M., Abdulmughni, A., Hutter, M. C., Hannemann, F., Gillam, E. M. J., and Bernhardt, R. (2021). Resurrection and characterization of ancestral CYP11A1 enzymes. *FEBS J.* [published online ahead of print, 2021 Jun 6].

Heckman, K. L., and Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature protocols* 2, 924–932.

Hendrikse, N. M., Charpentier, G., Nordling, E. and Syrén, P. (2018). Ancestral diterpene cyclases show increased thermostability and substrate acceptance. *FEBS J.* 285, 4660-4673.

Hendrikse, N. M., Holmberg Larsson, A., Svensson Gelius, S., Kuprin, S., Nordling, E., and Syrén, P. O. (2020). Exploring the therapeutic potential of modern and ancestral phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases as supplementary treatment of hereditary tyrosinemia. *Sci Rep.* 10, 1315.

Hendrikse, N. M., Sandegren, A., Andersson, T., Blomqvist, J., Makower, Å., Possner, D., Su, C., Thalén, N., Tjernberg, A., Westermarck, U., Rockberg, J., Svensson Gelius, S., Syrén, P. O., and Nordling, E. (2021). Ancestral lysosomal enzymes with increased activity harbor therapeutic potential for treatment of Hunter syndrome. *iScience* 24, 102154.

Herbert, M., Sauer, E., Smethurst, G., Krai, A., Hilpert, A. K., and Reidl, J. (2003). Nicotinamide ribosyl uptake mutants in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 71, 5398-5401.

- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Hope, W. W., Tabernero, L., Denning, D. W., and Anderson, M. J. (2004). Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4377–4386.
- Hochberg, G., and Thornton, J. W. (2017). Reconstructing Ancient Proteins to Understand the Causes of Structure and Function. *Annu Rev Biophys* 46, 247–269.
- Howard, C. J., Hanson-Smith, V., Kennedy, K. J., Miller, C. J., Lou, H. J., Johnson, A. D., Turk B. E., and Holt, L. J. (2014). Ancestral resurrection reveals evolutionary mechanisms of kinase plasticity. *eLife* 3, e04126.
- Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., Molina, D. A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., Dai, R. M., Kiu, H., Cardone, M., Naik, S., Patri, A. K., Wang, E., Marincola, F. M., Frank, K. M., Belkaid, Y., Trinchieri, G., and Goldszmid, R. S. (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 342, 967-70.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jan, A. H., Dubreucq, E., Drone, J., and Subileau, M. (2017). A glimpse into the specialization history of the lipases/ acyltransferases family of CpLIP2. *Biochim Biophys Acta* 1865, 1105-1113.
- Jain, R., Rivera, M. C., Moore, J. E., and Lake, J. A. (2003). Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol* 20, 1598–1602.
- Jain, S., Sutchu, S., Rosa, P. A., Byram, R., and Jewett, M. W. (2012). *Borrelia burgdorferi* harbors a transport system essential for purine salvage and mammalian infection. *Infect Immun* 80, 3086-3093.
- Jain, S., Showman, A. C., and Jewett, M. W. (2015). Molecular dissection of a *Borrelia burgdorferi* in vivo essential purine transport system. *Infect Immun* 83, 2224-2233.
- Johnson, M. D. L., Echlin, H., Dao, T. H., and Rosch, J. W. (2015). Characterization of NAD salvage pathways and their role in virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 161, 2127-2136.

- Johnson, Z. L., Cheong, C. G., and Lee, S. Y. (2012). Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature* 483, 489-493.
- Kaback, H. R., Reeves, J. P., Short S. A., and Lombardi, F. J. (1974). Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles: XVIII. The mechanism of action of carbonylcyanide *m*chlorophenylhydrazone. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 215-222.
- Kaback, H. R. (2015). A chemiosmotic mechanism of symport. *Proc Natl Acad Sci.* 112, 1259-64.
- Karatza, P., and Frillingos, S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol.* 22, 251-261.
- Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E., and Frillingos, S. (2006). Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential and Ile-329–Val-339 form an alpha-helix. *J Biol Chem.* 281, 39881-39890.
- Karena, E., and Frillingos, S. (2009). Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: His-31 and Asn-93 are crucial for affinity and specificity, and Asp-304 and Glu-272 are irreplaceable. *J Biol Chem.* 284, 24257-24268.
- Karena, E., and Frillingos, S. (2011). The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 286, 39595-39605.
- Karena, E., Tatsaki, E., Lambrinidis, G., Mikros, E., and Frillingos, S. (2015). Analysis of conserved NCS2 motifs in the *Escherichia coli* xanthine permease XanQ. *Mol Microbiol.* 98, 502-517.
- Karlin, A., and Akabas, M. H. (1998). Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 293, 123–145.
- Keeling, P. J., and Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet.* 9, 605–618.
- Kell, D. B., Swainston, N., Pir, P., and Oliver, S. G. (2015). Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 33, 237-246.
- Kirsch, R., Gramzow, L., Theißen, G., Siegfried, B. D., Ffrench-Constant, R. H., Heckel, D. G., and Pauchet, Y. (2014). Horizontal gene transfer and functional diversification of plant cell wall

degrading polygalacturonases: key events in the evolution of herbivory in beetles. *Insect Biochem Mol Biol.* 52, 33–50.

Kim, K. S., Pelton, J. G., Inwood, W. B., Andersen, U., Kustu, S., and Wemmer, D. E. (2010). The Rut pathway for pyrimidine degradation: novel chemistry and toxicity problems. *J Bacteriol.* 192, 4089–4102.

Koblan, L. W., Doman, J. L., Wilson, C., Levy, J. M., Tay, T., Newby, G. A., Maianti, J. P., Raguram, A., and Liu, D. R. (2018). Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol.* 36, 843–846.

Konings, W. N., Barnes, E. M. Jr., and Kaback, H. R. (1971). Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. 2. The coupling of reduced phenazine methosulfate to the concentrative uptake of beta- galactosides and amino acids. *J. Biol. Chem.* 19, 5857–61.

Köse, M., and Schiedel, A. C. (2009). Nucleoside/nucleobase transporters: Drug targets of the future? *Future Med Chem.* 1, 303–326.

Kosti, V., Papageorgiou, I., and Diallinas, G. (2010). Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol Biol.* 397, 1132–43.

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

Kourkoulou, A., Zantza, I., Foti, K., Mikros, E., and Diallinas, G. (2021). Context-dependent cryptic roles of specific residues in substrate selectivity of the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.* in press.

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

Kozmin, S. G., Stepchenkova, E. I., Chow, S. C., and Schaaper, R. M. (2013). A critical role for the putative NCS2 nucleobase permease YjcD in the sensitivity of *Escherichia coli* to cytotoxic and mutagenic purine analogs. *mBio.* 4, e00661–13.

- Kratzer, J. T., Lanaspá, M. A., Murphy, M. N., Cicerchi, C., Graves, C. L., Tipton, P. A., Ortlund, E. A., Johnson, R. J., and Gaucher, E. A. (2014). Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proc Natl Acad Sci.* 111, 3763-3768.
- Kryptou, E., Evangelidis, T., Bobonis, J., Pittis, A. A., Gabaldón, T., Scazzocchio, C., Mikros, E., and Dhalluin, G. (2015). Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Mol Microbiol.* 96, 927-950.
- Kuang, D., Yao, Y., MacLean, D., Wang, M., Hampson, D. R., and Chang, B. S. W. (2006). Ancestral reconstruction of the ligand-binding pocket of Family C G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci.* 103, 14050-14055.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33, 1870-1874.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanfear, S. M. (2011). Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell* 10, 483-493.
- Li, J., Zhao, Z., and Tajkhorshid, E. (2019). Locking Two Rigid-body Bundles in an Outward-Facing Conformation: The Ion-coupling Mechanism in a LeuT-fold Transporter. *Sci Rep.* 9, 19479.
- Li, Y., Suino, K., Daugherty, J., and Xu, H. E. (2005). Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell* 19, 367-80.
- Liechti, G., and Goldberg, J. B. (2012). *Helicobacter pylori* relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis. *J Bacteriol.* 194, 839-854.
- Liechti, G., and Goldberg, J. B. (2013). *Helicobacter pylori* salvages purines from extracellular host cell DNA utilizing the outer-membrane associated nuclease NucT. *J Bacteriol.* 195, 4387-4398.
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., and Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Rev Drug Discov.* 14, 543-560.

- Liu, Q., Onal, P., Datta, R. R., Rogers, J. M., Schmidt-Ott, U., Bulyk, M. L., Small, S., and Thornton, J. W. (2018). Ancient mechanisms for the evolution of the bicoid homeodomain's function in fly development. *Elife* 7, e34594.
- Loh, K. D., Gyaneshwar, P., Markenscoff Papadimitriou, E., Fong, R., Kim, K. S., Parales, R., Zhou, Z., Inwood, W., and Kustu, S. (2006). A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism. *Proc Natl Acad Sci.* 103, 5114–5119.
- Lougiakis, N., Gavriil, E. S., Kairis, M., Sioupouli, G., Lambrinidis, G., Benaki, D., Kryptou, E., Mikros, E., Marakos, P., Pouli, N., and Dhallinas, G. (2016). Design and synthesis of purine analogues as highly specific ligands for FcyB, a ubiquitous fungal nucleobase transporter. *Bioorg Med Chem.* 24, 5941-5952.
- Lu, F., Jiang, S., Fan, J., Lu, H., Deng, G., Dang, D., Zhang, S., Wang, J., and Yan, N. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature* 472, 243-6.
- Mansfield, T. A., Schultes, N. P., and Mourad, G. S. (2009). AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 583, 481–486.
- Maura, D., Ballok, A. E, and Rahme, L. G. (2016). Considerations and caveats in anti-virulence drug development. *Curr. Opin. Microbiol.* 33, 41-46.
- Mermelekas, G., Georgopoulou, E., Kallis, A., Botou, M., Vlantos, V., and Frillingos, S. (2010). Cysteine- scanning Analysis of Helices TM8, TM9a, and TM9b and Intervening Loops in the YgfO Xanthine Permease. *J. Biol. Chem.* 285, 35011-35020.
- Mikros, E., and Dhallinas, G. (2019). Tales of tails in transporters. *Open biology* 9, 190083.
- Miller, E. F, Vaish, S., and Maier, R. J. (2012). Efficiency of purine utilization by *Helicobacter pylori*: roles for adenosine deaminase and a NupC homolog. *PLoS One* 7, e38727.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859-71.

Nicoll, C. R., Bailleul, G., Fiorentini, F., Mascotti, M. L., Fraaije, M. W., and Mattevi, A. (2020). Ancestral-sequence reconstruction unveils the structural basis of function in mammalian FMOs. *Nat Struct Mol Biol.* 27, 14-24.

Nigam, S. K. (2015). What do drug transporters really do? *Nature Rev Drug Discov.* 14, 29-44.

Nakano, S., Niwa, M., Asan, Y., and Ito, S. (2019). Following the Evolutionary Track of a Highly Specific L-Arginine Oxidase by Reconstruction and Biochemical Analysis of Ancestral and Native Enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 00459-19.

Ortlund, E. A., Bridgham, J. T., Redinbo, M. R., and Thornton, J. W. (2007). Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science* 317, 1544-1548.

Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., and Diallinas, G. (2008). Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol.* 382, 1121-1135.

Papakostas, K., Georgopoulou, E., and Frillingos, S. (2008). Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfU xanthine permease. *J. Biol. Chem.* 283, 13666-13678.

Papakostas, K., and Frillingos, S. (2012). Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 287, 15684-15695.

Papakostas, K., Botou, M., and Frillingos, S. (2013). Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* 288, 36827-36840.

Parales, R. E., and Ingraham, J. L. (2010). The surprising Rut pathway: an unexpected way to derive nitrogen from pyrimidines. *J Bacteriol.* 192, 4086-4088.

Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, P., Larráyo, I., Martínez-Picado, J., and Casado, F. J. (2005). Cell entry and export of nucleoside analogs. *Virus Res.* 107, 151-164.

Pastor-Anglada, M., and Pérez-Torras, S. (2015). Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front. Pharmacol.* 6, 13.

Patching, S. G. (2018). Recent developments in nucleobase cation symporter-1 (NCS1) family transport proteins from bacteria, archaea, fungi and plants. *J. Biosci.* 43, 797-815.

- Pillai, A. S., Chandler, S. A., Liu, Y., Signore, A. V., Cortez-Romero, C. R., Benesch, J. L. P., Laganowsky, A., Storz, J. F., Hochberg, G. K. A., and Thornton, J. W. (2020). Origin of complexity in haemoglobin evolution. *Nature* 581, 480–485.
- Prinston, J. E., Emlaw, J. R., Dextraze, M. F., Tessier, C. J. G., Pérez-Areales, F. J., McNulty, M. S., and DaCosta, C. J. B. (2017). Ancestral Reconstruction Approach to Acetylcholine Receptor Structure and Function. *Structure* 25, 1295–1302.
- Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., and Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17, 123–132.
- Richards, T. A., and Talbot, N. J. (2013). Horizontal gene transfer in osmotrophs: playing with public goods. *Nat Rev Microbiol.* 11, 720–727.
- Risso, V. A., Gavira, J. A., Mejia-Carmona, D. F., Gaucher, E. A., and Sanchez-Ruiz, J. M. (2013). Hyperstability and substrate promiscuity in laboratory resurrections of Precambrian β -lactamases. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 2899–2902.
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lengeler, J. W., and Kaback, H. R. (1995). Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12. *Biochem Biophys Res Commun.* 208, 1116–1123.
- Saier, M. H., Reddy, V. S., Moreno-Hagelsieb, G., Hendargo, K. J., Zhang, Y., Iddamsetty, V., Lam, K., Tian, N., Russum, S., Wang, J., and Medrano-Soto, A. (2021). The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 update. *Nucleic Acids Res.* 49, D461–D467.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406–425.
- Sasidharan, K., Soga, T., Tomita, M., and Murray, D. B. (2012). A yeast metabolite extraction protocol optimised for time-series analyses. *PloS one* 7, e44283.
- Savory, F. R., Milner, D. S., Miles, D. C., and Richards, T. A. (2018). Ancestral Function and Diversification of a Horizontally Acquired Oomycete Carboxylic Acid Transporter. *Mol Biol Evol.* 35, 1887–1900.
- Schenkmyerova, A., Pinto, G. P., Toul, M., Marek, M., Hernychova, L., Planas-Iglesias, J., Daniel Liskova, V., Pluskal, D., Vasina, M., Emond, S., Dörr, M., Chaloupkova, R., Bednar, D., Prokop, Z.,

Hollfelder, F., Bornscheuer, U. T., and Damborsky, J. (2021). Engineering the protein dynamics of an ancestral luciferase. *Nat Commun.* 12, 3616.

Schultz, A. C., Nygaard, P., and Saxild, H. H. (2001). Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J Bacteriol.* 183, 3293–3302.

Schupfner, M., Straub, K., Busch, F., Merkl, R., and Sterner, R. (2020). Analysis of allosteric communication in a multienzyme complex by ancestral sequence reconstruction. *Proc Natl Acad Sci.* 117, 346-354.

Seeliger, M. A., Nagar, B., Frank, F., Cao, X., Henderson, M. N., and Kuriyan, J. (2007). c-Src binds to the cancer drug imatinib with an inactive Abl/c-Kit conformation and a distributed thermodynamic penalty. *Structure* 15, 299–311.

Shek, R., Hilaire, T., Sim, J., and French, J. B. (2019). Structural determinants for substrate selectivity in guanine deaminase enzymes of the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 58, 3280-3292.

Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., Sharples, D., Sansom, M. S. P., Iwata, S., Henderson, P. J. F., and Cameron, A. D. (2010). Molecular Basis of Alternating Access Membrane Transport by the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1. *Science* 328, 470-473.

Siddiq, M. A., Hochberg, G. K., and Thornton, J. W. (2017). Evolution of protein specificity: insights from ancestral protein reconstruction. *Curr Opin Struct Biol.* 47, 113-122.

Sioupouli, G., Lambrinidis, G., Mikros, E., Amillis, S., and Diallinas, G. (2017). Cryptic purine transporters in *Aspergillus nidulans* reveal the role of specific residues in the evolution of specificity in the NCS1 family. *Mol Microbiol.* 103, 319-332.

Smyth, D. G., Blumenfeld, O. O., and Komingsberg, W. (1964). Reactions of *N*-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem. J.* 91, 589-595.

Stackhouse, J., Presnell, S. R., McGeehan, G. M., Nambiar, K. P., and Benner, S. A. (1990). The ribonuclease from an extinct bovid ruminant. *FEBS Lett.* 262, 104–6.

Stamp, L. K., Chapman, P. T., and Palmer, S. C. (2016). Allopurinol and kidney function: An update. *Joint Bone Spine* 83, 19–24.

- Starr, T. N., and Thornton, J. W. (2016). Epistasis in protein evolution. *Protein Sci.* 25, 1204–1218.
- Stoffer-Bittner, A. J., Alexander, C. R., Dingman, D. W., Mourad, G. S., and Schultes, N. P. (2018). The solute transport and binding profile of a novel nucleobase cation symporter 2 from the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *FEBS Open Bio.* 8, 1322–1331.
- Sugiura, S., Nakano, S., Niwa, M., Hasebe, F., Matsui, D., and Ito, S. (2021). Catalytic mechanism of ancestral L-lysine oxidase assigned by sequence data mining. *J Biol Chem.* 297, 101043.
- Sun, Y., Calderini, E., and Kourist, R. (2021). A Reconstructed Common Ancestor of the Fatty Acid Photo-decarboxylase Clade Shows Photo-decarboxylation Activity and Increased Thermostability. *Chembiochem.* 22, 1833–1840.
- Tavoulari, S., and Frillingos, S. (2008). Substrate selectivity of the melibiose permease (MelY) from *Enterobacter cloacae*. *J Mol Biol.* 376, 681–693.
- Teather, R. M., Bramhill, J., Riede, I., Wright, J. K., Furst, M., Aichele, G., Wilhelm, V., and Overath, P. (1980). Lactose carrier protein of *Escherichia coli*: Construction and expression of plasmids carrying the Y gene of the lac operon. *Eur. J. Biochem.* 108, 223–231.
- Thomas, A., Cutlan, R., Finnigan, W., Giezen, M., and Harmer, N. (2019). Highly thermostable carboxylic acid reductases generated by ancestral sequence reconstruction. *Com Biol.* 2, 429.
- Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P., and Benner, S. A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genet.* 37, 630–635.
- Thornton, J. W., Need, E., and Crews, D. (2003). Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301, 1714–1717.
- Thornton, J. W. (2004). Resurrecting ancient genes: experimental analysis of extinct molecules. *Nature Rev Genet* 5, 366–375.
- Thurtle-Schmidt, B. H., and Stroud, R. M. (2016). Structure of Bor1 supports an elevator transport mechanism for SLC4 anion exchangers. *Proc Natl Acad Sci.* 113, 10542–10546.
- Tokuriki, N., and Tawfik, D. S. (2009). Protein dynamism and evolvability. *Science* 324, 203–207.
- Tsaousis, A. D., Kunji, E. R., Goldberg, A. V., Lucocq, J. M., Hirt, R. P., and Embley, T. M. (2008). A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 453, 553–6.

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., Szigartyo, 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. and Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419.

Vande Voorde, J., Balzarini, J., and Liekens, S. (2014). Mycoplasmas and cancer: Focus on nucleoside metabolism. *EXCLI J.* 13, 300-322.

Vos, S., Parry, R. J., Burns, M. R., de Jersey, J., and Martin, J. L. (1998). Structures of free and complexed forms of *Escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *J. Mol. Biol.* 282, 875–889.

Walter, J. D., Sawicka, M., and Dutzler, R. (2019). Cryo-EM structures and functional characterization of murine Slc26a9 reveal mechanism of uncoupled chloride transport. *Elife* 8, e46986.

Weiss, J. N. (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 11, 835–841.

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., and Cameron, A. D. (2008). Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science* 322, 709-713.

Wilson, C., Agafonov, R. V., Hoemberger, M., Kutter, S., Zorba, A., Halpin, J., Buosi, V., Otten, R., Waterman, D., Theobald, D. L., and Kern, D. (2015). Using ancient protein kinases to unravel a modern cancer drug's mechanism. *Science* 347, 882-886.

Wilson, P. M., Danenberg, P. V., Johnston, P. G., Lenz, H. J., and Ladner, R. D. (2014). Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 11, 282–298.

Wong, K., Ma, J., Rothnie, A., Biggin, P. C., and Kerr, I. D. (2014). Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem. Sci.* 39, 8–16.

- Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J. Y., Yoshida, Y., Ohta, K. Y., and Yuasa, H. (2010). Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. *J Biol Chem.* 285, 6522–6531.
- Yan, N. (2015). Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys.* 44, 257-283.
- Yan, N. A (2017). Glimpse of Membrane Transport through Structures-Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *J Mol Biol.* 429, 2710-2725.
- Yang, Z., Kumar, S., and Nei, M. (1995). A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. *Genetics* 141, 1641–50.
- Yang, G., Miton, C. M., and Tokuriki, N. (2020). A mechanistic view of enzyme evolution. *Protein Sci.* 29, 1724-1747.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811–818.
- Yokoyama, S., Yang, H., Starmer, W. T. (2008). Molecular basis of spectral tuning in the red- and green-sensitive (M/LWS) pigments in vertebrates. *Genetics* 179, 2037-2043.
- 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., and Yan, N. (2017). Dimeric structure of the uracil: proton symporter UraA provides mechanistic insights into the SLC4/23/26 transporters. *Cell Research* 27, 1020-103.
- Yunus, I. S., Palma, A., Trudeau, D. L., Tawfik, D. S., and Jones, P. R. (2020). Methanol-free biosynthesis of fatty acid methyl ester (FAME) in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab Eng.* 57, 217-227.
- Zakas, P. M., Coyle, C. W., Brehm, A., Bayer, M., Solecka-Witulska, B., Radford, C. E., Brown, C., Nesbitt, K., Dwyer, C., Kannicht, C., Spencer, H. T., Gaucher, E. A., Doering, C. B., and Lillicrap, D. (2021). Molecular coevolution of coagulation factor VIII and von Willebrand factor. *Blood advances* 5, 812–822.

Zhao, H., Xu, C., Lu, H.L., Chen, X., St Leger, R. J., and Fang, W. (2014). Host-to- pathogen gene transfer facilitated infection of insects by a pathogenic fungus. *PLoS Pathog.* 10, e1004009.

Zitare, U. A., Habib, M. H., Rozeboom, H., Mascotti, M. L., Todorovic, S., and Fraaije, M. W. (2021). Mutational and structural analysis of an ancestral fungal dye-decolorizing peroxidase. *FEBS J.* 288, 3602-3618.

Zuckerkindl, E., and Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evol. Gen. Prot.* 97, 97–166.

Γιαλελής, Β. (2020). Διερεύνηση της εξέλιξης των εξειδικεύσεων των διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Λάζου, Π. (2021). Διερεύνηση του φάσματος των πολυμορφισμών των μεταφορέων πουρινών-πυριμιδινών σε συμβιωτικά και παθογόνα βακτήρια. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

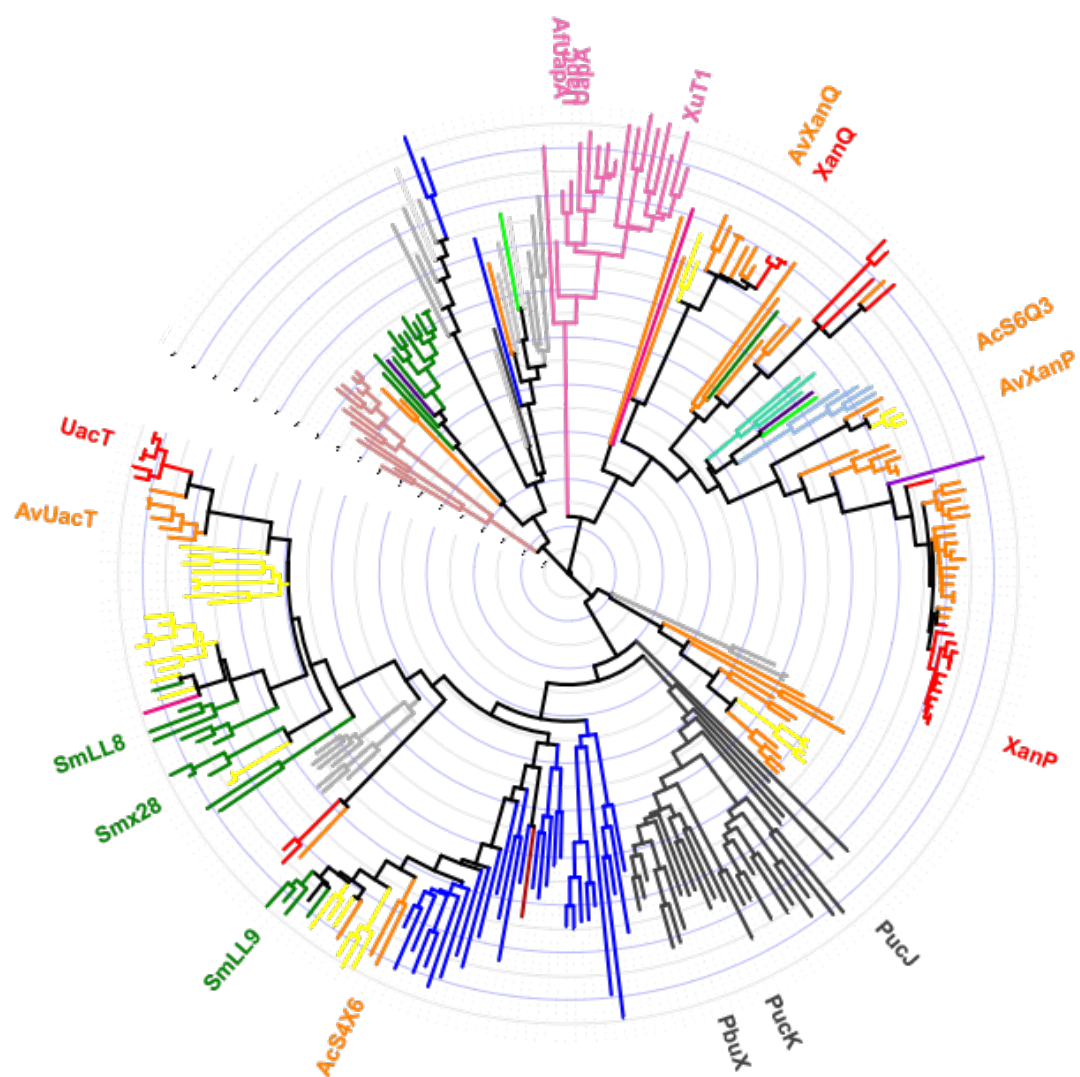


Παραρτήματα

Παράρτημα 1

Φυλογενετική ανάλυση του κλάδου ξανθίνης-ουρικού οξέος της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2

Εικόνα Π1. Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 284 ομολόγων από Βακτήρια, Αρχαία και Μύκητες που ανήκουν στον κλάδο των ξανθίνης/ ουρικού οξέος της οικογένειας NAT/NCS2. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στελεχών, καθώς και των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των αντίστοιχων ομολόγων, σε όλα τα φύλα των Βακτηρίων, Αρχαία και Ευκάρυα των οποίων τα γονιδιώματα έχουν αλληλουχηθεί πλήρως στη βάση δεδομένων JGI/IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Chen *et al.*, 2013), έως και τον Ιανουάριο του 2017, επιλέγοντας ένα γονιδίωμα από κάθε είδος. Από αυτή την αναζήτηση εντοπίστηκαν 750 περίπου ομόλογα, που εμπίπτουν στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, με βάση μια αρχική φυλογένεση (Neighbor Joining) που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Από την εκτενή αυτή φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι όλα τα ομόλογα αυτού του κλάδου προέρχονται κυρίως από τα Βακτήρια: από τα φύλα των Πρωτεοβακτηρίων, Firmicutes (κλάσεις Bacilli και Clostridia), Actinobacteria και Bacteroidetes. Εκτός από τα Βακτήρια, ομόλογα αυτού του κλάδου απαντώνται επίσης σε Αρχαία και Μύκητες. Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε σε 284, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά γένος. Τα ομόλογα αυτά (284 αλληλουχίες), υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA 7), ώστε να κατασκευαστεί το τελικό φυλογενετικό δένδrogramma (παρούσα εικόνα). Λειτουργικά χαρακτηρισμένα ομόλογα επισημαίνονται με έντονη γραμματοσειρά με τα χρώματα που αντιστοιχούν στην κάθε ταξινομική ομάδα, όπως παρουσιάζονται κάτω από φυλογενετικό δένδrogramma.



Genome Classes

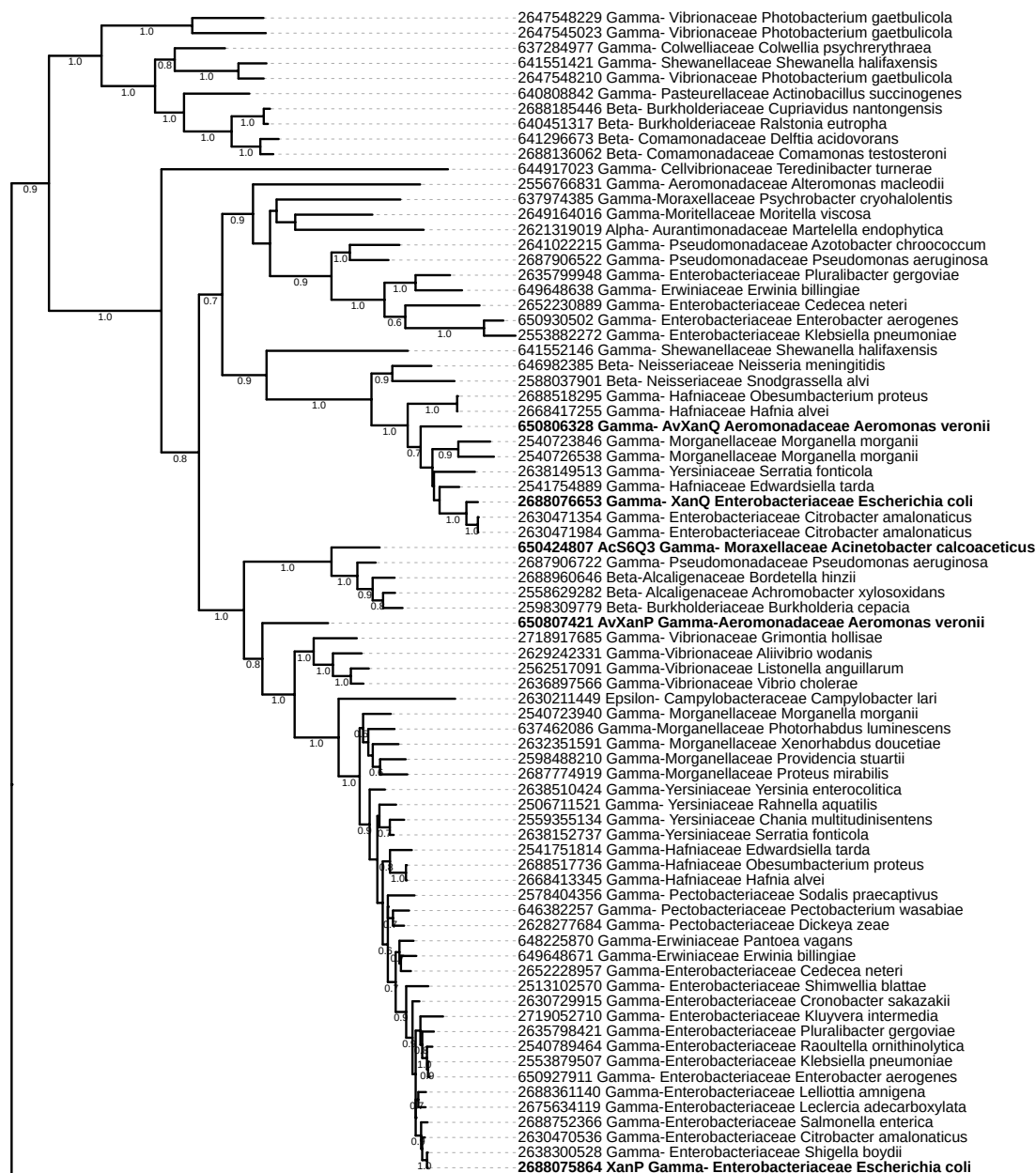
- Gammaproteobacteria; Enterobacterales
- Gammaproteobacteria; all other orders
- Alphaproteobacteria
- Betaproteobacteria
- Deltaproteobacteria
- Epsilonproteobacteria

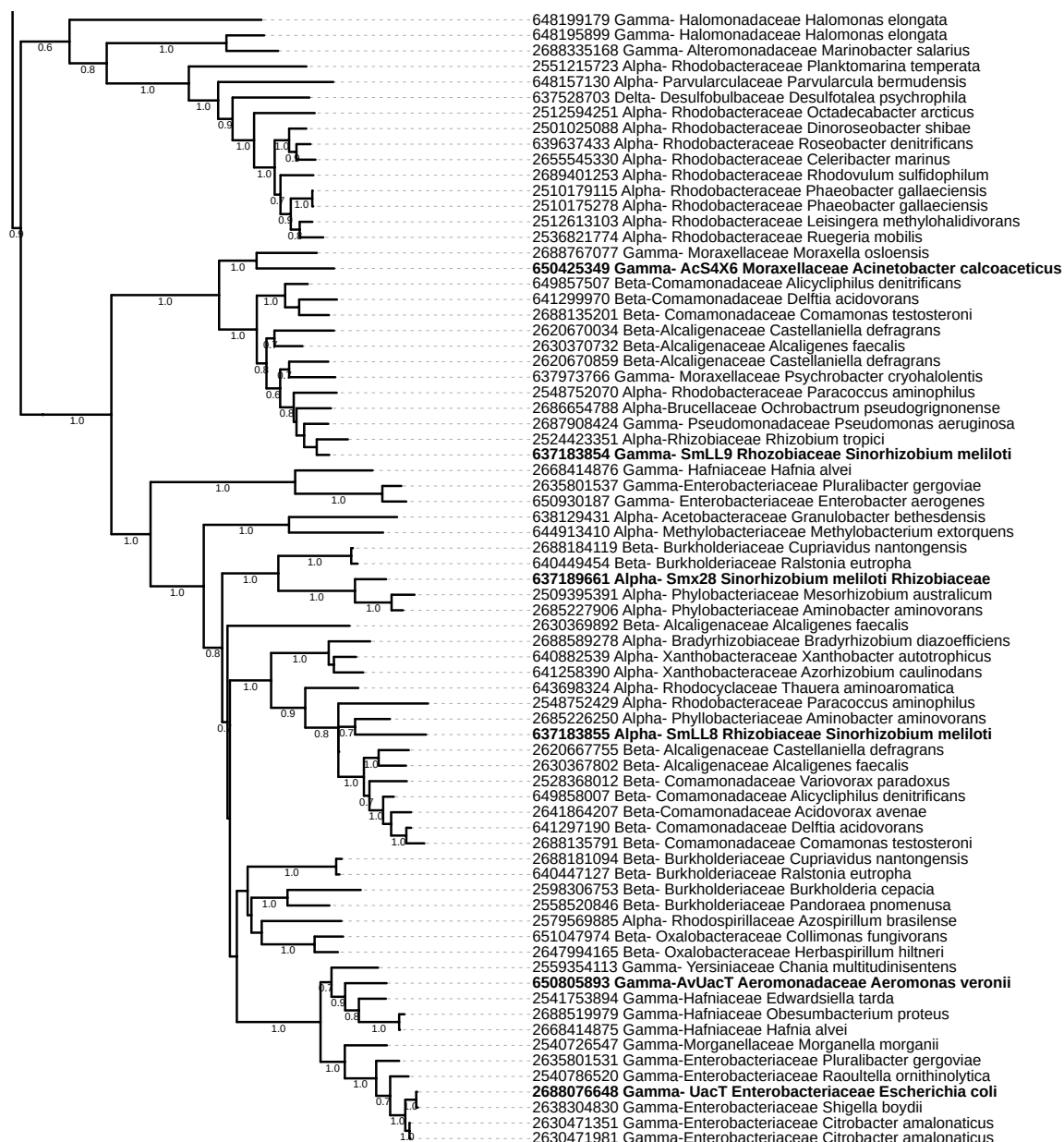
- Firmicutes; Bacilli
- Firmicutes; Clostridia
- Firmicutes; other
- Actinobacteria
- Bacteroidetes
- Fungi

- Archaea
- Verrucomicrobia
- Cyanobacteria
- Spirochaetes
- Acidobacteria
- Deinococcus/Thermus

Εικόνα Π2. Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 150 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το Φύλο των Πρωτεοβακτηρίων που ανήκουν στον κλάδο ξανθίνης/ουρικού.

Πραγματοποιήθηκε επιλογή όλων των γονιδιωμάτων που ανήκουν στο φύλο Πρωτεοβακτηρίων από τη βάση δεδομένων IMG/M του JGI και ανακτήθηκαν συνολικά 2,795 βακτηριακά στελέχη, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως (έως και τον Ιανουάριο του 2017). Ακολούθησε ταξινόμηση των γονιδιωμάτων με βάση την κλάση σε α-, β-, γ-, δ- και ε- πρωτεοβακτήρια και πραγματοποιήθηκε αναζήτηση πρωτεϊνικών ομολόγων με το πρόγραμμα Blast-p ξεχωριστά για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανακτήθηκαν υποβλήθηκαν σε αρχική φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο neighbor-joining (Saitou *et al.*, 1987), προκειμένου να αποκλειστούν αλληλουχίες που δεν ανήκαν στην ομάδα μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων, χρησιμοποιώντας λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς τις οικογένειας NAT/NCS2 για τη διάκριση των διαφορετικών ομάδων των ομολόγων. Με τη διαδικασία αυτή προέκυψαν 1,652 πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην φυλογενετική ομάδα ξανθίνης/ουρικού. Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε σε 445, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος και σε δεύτερη φάση σε 150, μετά από επιλογή ομολόγων από ένα στέλεχος ανά γένος. Αυτές οι 150 αλληλουχίες υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA 7), ώστε να κατασκευαστεί το φυλογενετικό δενδρόγραμμα όλων των ομολόγων «ξανθίνης/ουρικού» (παρούσα εικόνα). Με έντονη γραμματοσειρά επισημαίνονται τα γνωστά ομόλογα από την *E. coli* (Karatza and Frillingos, 2005; Papakostas and Frillingos, 2012), το *Sinorhizobium* (Botou *et al.*, 2020), το *Aeromonas* και το *Acinetobacter* (Διδακτορική Διατριβή, Λάζου Π. 2021). Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κλάδους υπολογίστηκαν με την μέθοδο bootstrap (1000 επαναλήψεις). Διακλαδώσεις με bootstrap value <50% δεν εμφανίζονται.

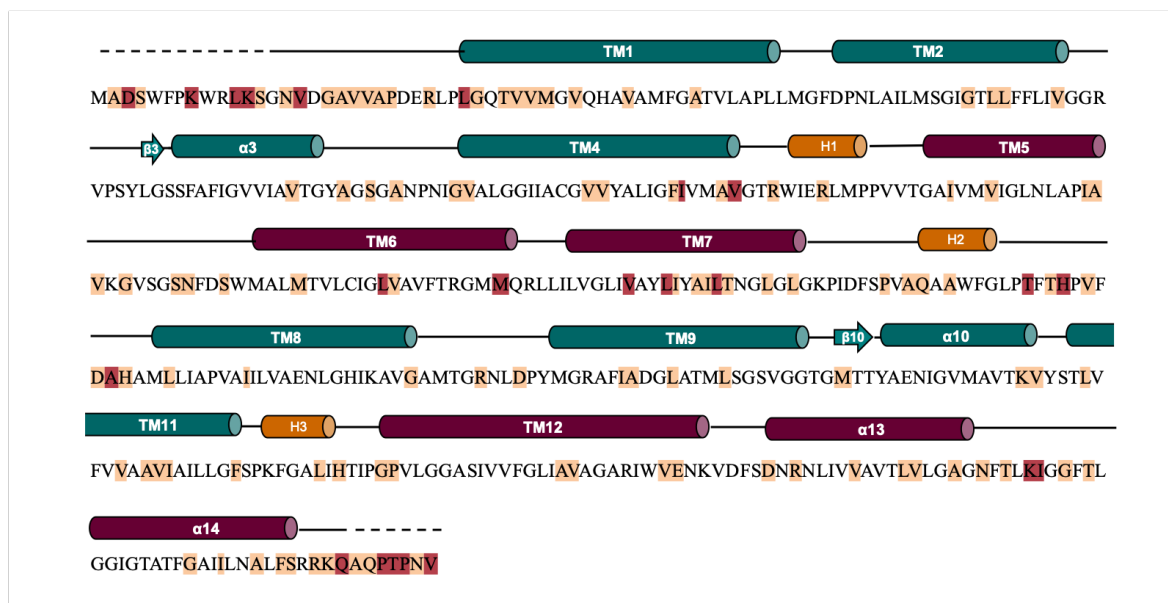




Παράρτημα 2

Αλληλουχίες αμινοξέων και πλήρεις κωδικεύουσες αλληλουχίες των προγονικών πρωτεϊνών *AncR1*, *AncXUacT* και *AncXanP*

Εικόνα Π3. Αλληλουχία αμινοξέων του *AncR1*, όπως αυτή εξήχθη από το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Το πρόγραμμα αυτό δίνει το πιθανότερο αμινοξύ για κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα δίνει και τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης των αμινοξέων για κάθε θέση. Αμινοξέα με πιθανότητα <90% (αλλά >50%) ή <50% επισημαίνονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν με βάση το πρότυπο της δομής του UraA (Yu *et al.*, 2017), επισημαίνονται πάνω από την αλληλουχία.

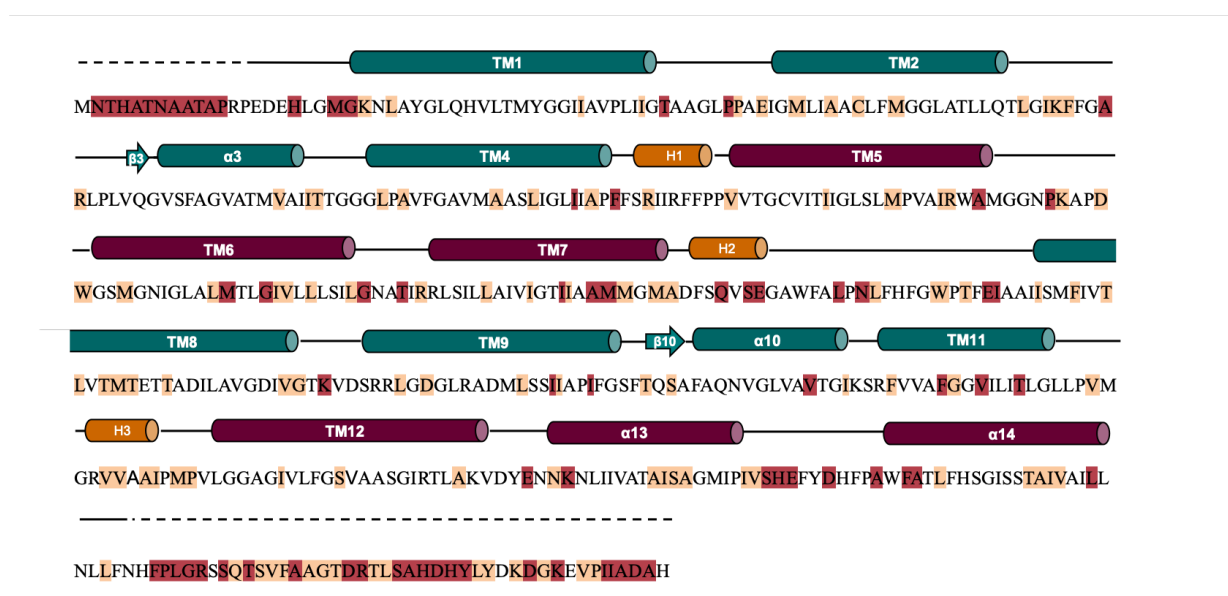


Πλήρης κωδικεύουσα αλληλουχία του *AncR1*

ATG	GCT	GAT	TCT	TGG	TTT	CCT	AAA	TGG	CGG	CTC	AAA	AGC	GGT	42
M	A	D	S	W	F	P	K	W	R	L	K	S	G	14
AAC	GTG	GAT	GGT	GCT	GTG	GTA	GCT	CCG	GAT	GAA	CGC	CTG	CCT	84
N	V	D	G	A	V	V	A	P	D	E	R	L	P	28
TTA	GGT	CAG	ACC	GTT	GTA	ATG	GGC	GTT	CAG	CAT	GCA	GTG	GCC	126
L	G	Q	T	V	V	M	G	V	Q	H	A	V	A	42
ATG	TTT	GGT	GCG	ACC	GTG	TTA	GCC	CCT	CTT	CTG	ATG	GGC	TTT	168

M	F	G	A	T	V	L	A	P	L	L	M	G	F	56
GAT	CCT	AAC	CTT	GCC	ATT	CTC	ATG	TCA	GGC	ATT	GGC	ACC	CTC	210
D	P	N	L	A	I	L	M	S	G	I	G	T	L	70
CTG	TTT	TTC	TTA	ATT	GTC	GGC	GGA	CGG	GTC	CCT	TCA	TAT	CTT	252
L	F	F	L	I	V	G	G	R	V	P	S	Y	L	84
GGC	TCG	TCA	TTT	GCG	TTT	ATT	GGC	GTC	GTT	ATC	GCA	GTC	ACG	294
G	S	S	F	A	F	I	G	V	V	I	A	V	T	98
GGC	TAT	GCG	GGC	AGC	GGC	GCA	AAC	CCT	AAC	ATT	GGC	GTA	GCA	336
G	Y	A	G	S	G	A	N	P	N	I	G	V	A	112
CTG	GGA	GGT	ATT	ATC	GCG	TGC	GGC	GTC	GTT	TAT	GCA	CTG	ATT	378
L	G	G	I	I	A	C	G	V	V	Y	A	L	I	126
GGC	TTT	ATT	GTC	ATG	GCA	GTC	GGA	ACG	CGG	TGG	ATC	GAA	CGG	420
G	F	I	V	M	A	V	G	T	R	W	I	E	R	140
CTC	ATG	CCC	CCT	GTT	GTC	ACG	GGT	GCA	ATC	GTG	ATG	GTC	ATC	462
L	M	P	P	V	V	T	G	A	I	V	M	V	I	154
GGC	CTG	AAC	CTG	GCA	CCT	ATT	GCA	GTC	AAA	GGC	GTC	AGC	GGC	504
G	L	N	L	A	P	I	A	V	K	G	V	S	G	168
AGC	AAC	TTT	GAT	AGC	TGG	ATG	GCC	CTG	ATG	ACG	GTC	CTG	TGC	546
S	N	F	D	S	W	M	A	L	M	T	V	L	C	182
ATC	GGC	TTA	GTT	GCC	GTT	TTT	ACT	CGC	GGA	ATG	ATG	CAG	CGC	588
I	G	L	V	A	V	F	T	R	G	M	M	Q	R	196
TTA	TTG	ATC	CTG	GTT	GGC	CTC	ATC	GTT	GCC	TAC	TTG	ATC	TAT	630
L	L	I	L	V	G	L	I	V	A	Y	L	I	Y	210
GCC	ATC	CTA	ACG	AAC	GGG	CTA	GGC	TTA	GGC	AAA	CCG	ATC	GAT	672
A	I	L	T	N	G	L	G	L	G	K	P	I	D	224
TTC	AGC	CCG	GTG	GCC	CAG	GCC	GCA	TGG	TTC	GGC	CTG	CCG	ACG	714
F	S	P	V	A	Q	A	A	W	F	G	L	P	T	238
TTT	ACC	CAT	CCG	GTG	TTC	GAT	GCC	CAT	GCA	ATG	TTA	TTG	ATC	756
F	T	H	P	V	F	D	A	H	A	M	L	L	I	252
GCA	CCG	GTG	GCC	ATT	ATC	CTG	GTG	GCA	GAA	AAT	CTG	GGC	CAT	798
A	P	V	A	I	I	L	V	A	E	N	L	G	H	266
ATC	AAA	GCC	GTC	GGC	GCA	ATG	ACC	GGT	CGC	AAT	CTC	GAT	CCC	840
I	K	A	V	G	A	M	T	G	R	N	L	D	P	280
TAT	ATG	GGT	CGG	GCA	TTT	ATT	GCA	GAT	GGG	CTG	GCC	ACC	ATG	882
Y	M	G	R	A	F	I	A	D	G	L	A	T	M	294
CTG	TCT	GGC	TCA	GTT	GGC	GGC	ACC	GGC	ATG	ACC	ACG	TAC	GCT	924
L	S	G	S	V	G	G	T	G	M	T	T	Y	A	308
GAA	AAT	ATC	GGT	GTT	ATG	GCG	GTT	ACC	AAA	GTT	TAC	TCA	ACG	966
E	N	I	G	V	M	A	V	T	K	V	Y	S	T	322
TTA	GTT	TTT	GTT	GTC	GCA	GCT	GTT	ATT	GCG	ATT	TTA	CTC	GGC	1008
L	V	F	V	V	A	A	V	I	A	I	L	L	G	336
TTT	TCG	CCC	AAA	TTT	GGC	GCG	TTA	ATC	CAT	ACC	ATT	CCC	GGT	1050
F	S	P	K	F	G	A	L	I	H	T	I	P	G	350
CCC	GTA	TTA	GGA	GGC	GCA	TCT	ATT	GTT	GTA	TTC	GGT	CTG	ATT	1092
P	V	L	G	G	A	S	I	V	V	F	G	L	I	364
GCA	GTT	GCT	GGC	GCA	CGC	ATC	TGG	GTA	GAA	AAC	AAA	GTT	GAT	1134
A	V	A	G	A	R	I	W	V	E	N	K	V	D	378
TTT	TCT	GAT	AAT	CGC	AAT	CTT	ATC	GTC	GTA	GCC	GTC	ACA	TTA	1176
F	S	D	N	R	N	L	I	V	V	A	V	T	L	392
GTC	CTT	GGT	GCC	GGG	AAC	TTT	ACA	CTT	AAA	ATC	GGG	GGT	TTT	1218
V	L	G	A	G	N	F	T	L	K	I	G	G	F	406
ACA	CTT	GGA	GGC	ATT	GGG	ACT	GCT	ACT	TTT	GGC	GCT	ATT	ATC	1260
T	L	G	G	I	G	T	A	T	F	G	A	I	I	420
TTA	AAC	GCG	CTG	TTC	TCT	CGC	CGT	AAA	CAA	GCT	CAA	CCT	ACT	1302
L	N	A	L	F	S	R	R	K	Q	A	Q	P	T	434
CCT	AAT	GTG	TAA											1311

Εικόνα Π4. Αλληλουχία αμινοξέων του AncXUacT, όπως αυτή εξήχθη από το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7. Αμινοξέα με πιθανότητα <90% (αλλά >50%) ή <50% επισημαίνονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν με βάση το πρότυπο της δομής του UapA (Alguet *et al.*, 2016), επισημαίνονται πάνω από την αλληλουχία.

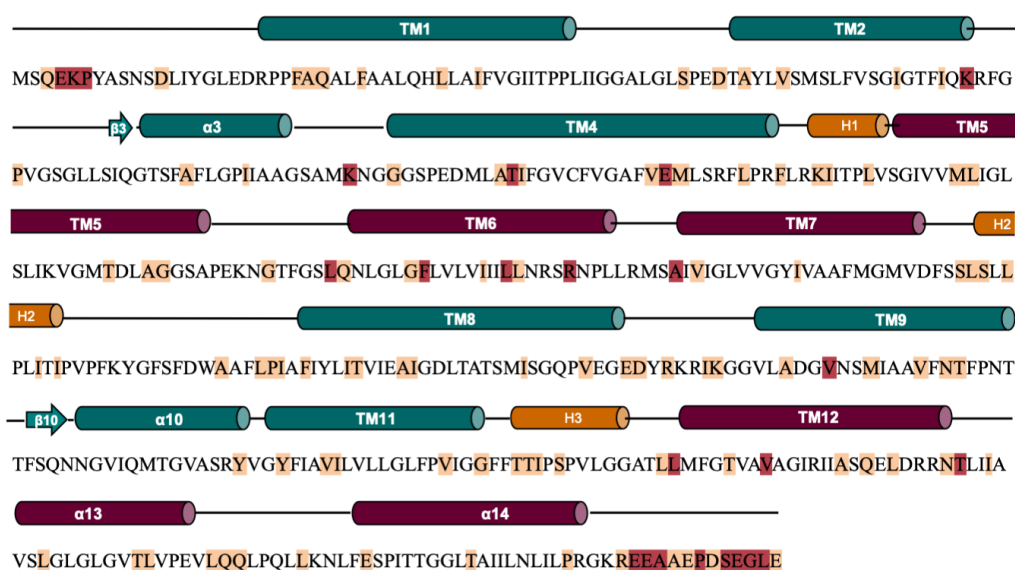


Πλήρης κωδικεύουσα αλληλουχία του AncXUacT

ATG	AAC	ACC	CAT	GCA	ACC	AAC	GCA	GCA	ACC	GCA	CCT	CGT	CCT	42
M	N	T	H	A	T	N	A	A	T	A	P	R	P	14
GAG	GAT	GAA	CAT	CTG	GGT	ATG	GGT	AAA	AAC	CTG	GCC	TAT	GGT	84
E	D	E	H	L	G	M	G	K	N	L	A	Y	G	28
CTT	CAG	CAT	GTT	TTG	ACC	ATG	TAT	GGT	GGT	ATT	ATC	GCG	GTT	126
L	Q	H	V	L	T	M	Y	G	G	I	I	A	V	42
CCT	TTA	ATC	ATC	GGT	ACT	GCT	GCC	GGT	CTT	CCC	CCT	GCT	GAA	168
P	L	I	I	G	T	A	A	G	L	P	P	A	E	56
ATC	GGT	ATG	CTT	ATT	GCA	GCC	TGT	CTC	TTT	ATG	GGT	GGT	TTA	210
I	G	M	L	I	A	A	C	L	F	M	G	G	L	70
GCC	ACC	TTA	CTT	CAA	ACC	TTA	GGC	ATC	AAA	TTC	TTT	GGT	GCA	252
A	T	L	L	Q	T	L	G	I	K	F	F	G	A	84
AGA	CTC	CCT	CTA	GTC	CAG	GGT	GTC	TCT	TTT	GCG	GGT	GTC	GCG	294
R	L	P	L	V	Q	G	V	S	F	A	G	V	A	98
ACG	ATG	GTT	GCG	ATC	ATC	ACC	ACT	GGT	GGA	GGA	CTC	CCG	GCA	336
T	M	V	A	I	I	T	T	G	G	G	L	P	A	112

GTC	TTT	GGT	GCA	GTT	ATG	GCG	GCA	TCC	TTA	ATC	GGC	CTT	ATC	378
V	F	G	A	V	M	A	A	S	L	I	G	L	I	126
ATC	GCA	CCC	TTT	TTC	AGC	CGG	ATT	ATC	CGG	TTT	TTC	CCT	CCC	420
I	A	P	F	F	S	R	I	I	R	F	F	P	P	140
GTC	GTA	ACG	GGA	TGC	GTG	ATC	ACG	ATC	ATT	GGA	TTG	AGC	CTA	462
V	V	T	G	C	V	I	T	I	I	G	L	S	L	154
ATG	CCG	GTT	GCA	ATT	CGC	TGG	GCA	ATG	GGT	GGG	AAT	CCG	AAA	504
M	P	V	A	I	R	W	A	M	G	G	N	P	K	168
GCC	CCT	GAC	TGG	GGA	AGC	ATG	GGC	AAT	ATC	GGC	TTG	GCC	TTA	546
A	P	D	W	G	S	M	G	N	I	G	L	A	L	182
ATG	ACG	CTT	GTT	ATC	GTC	TTA	TTG	CTG	AGC	ATC	CTG	GGT	AAT	588
M	T	L	V	I	V	L	L	L	S	I	L	G	N	196
GCA	ACC	ATT	CGT	CGC	TTA	AGC	ATC	TTA	TTG	GCC	ATT	GTC	ATC	630
A	T	I	R	R	L	S	I	L	L	A	I	V	I	210
GGA	ACC	ATC	ATC	GCA	GCC	ATG	ATG	GGC	ATG	GCA	GAT	TTC	AGC	672
G	T	I	I	A	A	M	M	G	M	A	D	F	S	224
CAG	GTG	AGC	GAA	GGC	GCC	TGG	TTC	GCC	CTG	CCG	AAT	CTG	TTC	714
Q	V	S	E	G	A	W	F	A	L	P	N	L	F	238
CAT	TTC	GGC	TGG	CCC	ACG	TTC	GAA	ATT	GCC	GCA	ATT	ATC	AGC	756
H	F	G	W	P	T	F	E	I	A	A	I	I	S	252
ATG	TTT	ATC	GTT	ACG	CTC	GTG	ACG	ATG	ACC	GAA	ACG	ACG	GCT	798
M	F	I	V	T	L	V	T	M	T	E	T	T	A	266
GAT	ATC	CTG	GCA	GTC	GGC	GAT	ATC	GTT	GGC	ACG	AAA	GTC	GAT	840
D	I	L	A	V	G	D	I	V	G	T	K	V	D	280
TCA	CGC	CGC	TTG	GGC	GAT	GGC	CTG	CGC	GCA	GAT	ATG	CTG	TCC	882
S	R	R	L	G	D	G	L	R	A	D	M	L	S	294
TCA	ATT	ATC	GCA	CCC	ATC	TTT	GGC	AGC	TTT	ACG	CAG	TCT	GCC	924
S	I	I	A	P	I	F	G	S	F	T	Q	S	A	308
TTT	GCG	CAA	AAT	GTT	GGG	TTA	GTC	GCT	GTC	ACC	GGT	ATC	AAA	966
F	A	Q	N	V	G	L	V	A	V	T	G	I	K	322
TCG	CGT	TTT	GTA	GTT	GCG	TTT	GGA	GGC	GTA	ATC	CTC	ATT	ACG	1008
S	R	F	V	V	A	F	G	G	V	I	L	I	T	336
CTG	GGA	CTG	CTC	CCA	GTA	ATG	GGT	CGC	GTA	GTT	GCC	GCA	ATC	1050
L	G	L	L	P	V	M	G	R	V	V	A	A	I	350
CCT	ATG	CCC	GTT	CTG	GGA	GGC	GCA	GGC	ATT	GTT	CTC	TTC	GGG	1092
P	M	P	V	L	G	G	A	G	I	V	L	F	G	364
TCG	GTT	GCA	GCC	TCT	GGA	ATC	CGT	ACA	CTT	GCC	AAG	GTC	GAT	1134
S	V	A	A	S	G	I	R	T	L	A	K	V	D	378
TAC	GAG	AAC	AAC	AAG	AAT	CTG	ATC	ATC	GTC	GCC	ACC	GCC	ATT	1176
Y	E	N	N	K	N	L	I	I	V	A	T	A	I	392
TCT	GCC	GGT	ATG	ATT	CCA	ATT	GTC	GCA	CCC	GAA	TTC	TAC	GAT	1218
S	A	G	M	I	P	I	V	A	P	E	F	Y	D	406
CAT	TTT	CCC	GCC	TGG	TTT	CAA	ACC	CTG	TTC	CAT	TCT	GGG	ATT	1260
H	F	P	A	W	F	Q	T	L	F	H	S	G	I	420
TCA	TCT	ACT	GCA	ATT	GTC	GCC	ATT	CTG	TTA	AAC	CTG	TTA	TTC	1302
S	S	T	A	I	V	A	I	L	L	N	L	L	F	434
AAC	CAT	TTC	CCT	TTA	GGG	AAC	TCT	TCA	CAA	CAG	TCT	GTC	TTC	1344
N	H	F	P	L	G	N	S	S	Q	Q	S	V	F	448
GCG	GCT	GGT	ACC	GAT	CGT	ACT	CTG	TCT	GCT	CAT	GAT	CAT	TAC	1386
A	A	G	T	D	R	T	L	S	A	H	D	H	Y	462
CTC	TAC	GAT	AAA	GAT	GGT	AAA	GAA	GTT	CCT	ATT	ATC	GCC	GAT	1428
L	Y	D	K	D	G	K	E	V	P	I	I	A	D	476
GCG	CAT	TAA												(1434)
A	H													(478)

Εικόνα Π5. Αλληλουχία αμινοξέων του AncXanP, όπως αυτή εξήχθη από το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7. Το πρόγραμμα αυτό δίνει το πιθανότερο αμινοξύ για κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα δίνει και τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης των αμινοξέων για κάθε θέση. Αμινοξέα με πιθανότητα <90% (αλλά >50%) ή <50% επισημαίνονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν με βάση το πρότυπο της δομής του UapA (Alguel *et al.*, 2016), επισημαίνονται πάνω από την αλληλουχία.



Πλήρης κωδικεύουσα αλληλουχία του AncXanP

ATG	TCT	CAG	GAG	AAA	CCT	TAT	GCA	TCT	AAT	TCT	GAC	36
M	S	Q	E	K	P	Y	A	S	N	S	D	12
CTG	ATA	TAT	GGT	CTG	GAG	GAT	CGC	CCT	CCC	TTT	GCT	72
L	I	Y	G	L	E	D	R	P	P	F	A	24
CAG	GCT	CTC	TTT	GCA	GCC	CTT	CAG	CAT	CTG	TTG	GCA	108
Q	A	L	F	A	A	L	Q	H	L	L	A	36
ATT	TTC	GTT	GGT	ATC	ATA	ACC	CCT	CCT	TTA	ATC	ATT	144
I	F	V	G	I	I	T	P	P	L	I	I	48
GGT	GGT	GCC	TTA	GGT	CTT	TCC	CCT	GAA	GAC	ACT	GCC	180
G	G	A	L	G	L	S	P	E	D	T	A	60
TAT	CTT	GTT	TCT	ATG	TCC	CTT	TTC	GTT	TCT	GGT	ATT	216
Y	L	V	S	M	S	L	F	V	S	G	I	72
GGT	ACC	TTT	ATC	CAA	GTA	AAA	CGC	TTT	GGC	CCT	GTC	252

G	T	F	I	Q	V	K	R	F	G	P	V	84
GGT	TCT	GGC	CTA	CTC	TCA	ATT	CAG	GGC	ACG	TCA	TTT	288
G	S	G	L	L	S	I	Q	G	T	S	F	96
GCG	TTT	CTA	GGC	CCT	ATT	ATT	GCA	GCG	GGC	AGC	GCA	324
A	F	L	G	P	I	I	A	A	G	S	A	108
ATG	AAA	AAC	GGC	GGT	GGA	AGC	CCC	GAG	GAC	ATG	TTA	360
M	K	N	G	G	G	S	P	E	D	M	L	120
GCG	ACG	ATC	TTT	GGC	GTC	TGT	TTC	GTT	GGC	GCA	TTT	396
A	T	I	F	G	V	C	F	V	G	A	F	132
GTC	GAA	ATG	CTG	TCA	CGT	TTT	CTT	CCC	CGT	TTC	TTG	432
V	E	M	L	S	R	F	L	P	R	F	L	144
CGT	AAA	ATC	ATT	ACC	CCT	CTG	GTC	AGC	GGT	ATT	GTG	468
R	K	I	I	T	P	L	V	S	G	I	V	156
GTA	ATG	TTG	ATC	GGC	TTA	AGC	CTG	ATT	AAA	GTC	GGC	504
V	M	L	I	G	L	S	L	I	K	V	G	168
ATG	ACC	GAT	CTG	GCC	GGA	GGA	AGC	GCA	CCT	GAG	AAA	540
M	T	D	L	A	G	G	S	A	P	E	K	180
AAC	GGT	ACG	TTC	GGC	AGC	CTC	CAG	AAT	CTC	GGC	TTA	576
N	G	T	F	G	S	L	Q	N	L	G	L	192
GGT	TTC	TTG	GTT	TTA	GTC	ATT	ATC	ATC	TTG	CTA	AAC	612
G	F	L	V	L	V	I	I	I	L	L	N	204
CGC	AGT	CGC	AAC	CCG	TTG	CTA	CGC	ATG	TCG	GCA	ATC	648
R	S	R	N	P	L	L	R	M	S	A	I	216
GTC	ATT	GGG	CTA	GTC	GTC	GGC	TAT	ATC	GTG	GCA	GCC	684
V	I	G	L	V	V	G	Y	I	V	A	A	228
TTC	ATG	GGC	ATG	GTG	GAT	TTC	AGC	AGT	TTA	AGC	TTA	720
F	M	G	M	V	D	F	S	S	L	S	L	240
TTG	CCG	TTA	ATC	ACC	ATC	CCG	GTT	CCG	TTC	AAA	TAC	756
L	P	I	L	T	I	P	V	P	F	K	Y	252
GGC	TTT	AGT	TTT	GAT	TGG	GCA	GCC	TTC	CTG	CCC	ATT	792
G	F	S	F	D	W	A	A	F	L	P	I	264
GCC	TTC	ATT	TAT	CTG	ATC	ACC	GTG	ATT	GAA	GCA	ATC	828
A	F	I	Y	L	I	T	V	I	E	A	I	276
GGC	GAT	CTT	ACC	GCC	ACG	TCC	ATG	ATC	TCC	GGC	CAG	864
G	D	L	T	A	T	S	M	I	S	G	Q	288
CCC	GTT	GAA	GGG	GAA	GAT	TAT	CGG	AAA	CGG	ATC	AAA	900
P	V	E	G	E	D	Y	R	K	R	I	K	300
GGT	GGC	GTC	CTG	GCA	GAT	GGT	GTC	AAT	TCT	ATG	ATC	936
G	G	V	L	A	D	G	V	N	S	M	I	312
GCC	GCT	GTC	TTC	AAT	ACC	TTT	CCA	AAC	ACC	ACG	TTT	972
A	A	V	F	N	T	F	P	N	T	T	F	324
TCA	CAA	AAT	AAT	GGG	GTT	ATT	CAG	ATG	ACT	GGC	GTC	1008
S	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	V	336
GCT	TCA	CGT	TAT	GTC	GGG	TAC	TTT	ATC	GCG	GTA	ATC	1044
A	S	R	Y	V	G	Y	F	I	A	V	I	348
CTG	GTT	CTG	CTC	GGC	TTA	TTT	CCG	GTT	ATT	GGC	GGC	1080
L	V	L	L	G	L	F	P	V	I	G	G	360
TTC	TTC	ACG	ACC	ATT	CCC	TCG	CCG	GTT	CTG	GGA	GGC	1116
F	F	T	T	I	P	S	P	V	L	G	G	372
GCA	ACC	CTG	TTG	ATG	TTT	GGA	ACC	GTT	GCC	GTA	GCA	1152
A	T	L	L	M	F	G	T	V	A	V	A	384
GGT	ATT	CGC	ATC	ATC	GCC	TCC	CAG	GAA	TTA	GAT	CGC	1188
G	I	R	I	I	A	S	Q	E	L	D	R	396
CGT	AAC	ACA	CTT	ATT	ATC	GCC	GTC	TCT	TTA	GGT	TTA	1244

R	N	T	L	I	I	A	V	S	L	G	L	408
GGG	CTT	GGC	GTC	ACT	TTA	GTC	CCC	GAA	GTA	TTA	CAG	1260
G	L	G	V	T	L	V	P	E	V	L	Q	420
CAG	TTG	CCA	CAG	TTA	CTG	AAA	AAC	TTA	TTT	GAA	TCT	1296
Q	L	P	Q	L	L	K	N	L	F	E	S	432
CCT	ATT	ACT	ACA	GGC	GGG	TTA	ACT	GCG	ATT	ATC	TTA	1332
P	I	T	T	G	G	L	T	A	I	I	L	444
AAT	CTG	ATC	CTC	CCT	CGA	GGC	AAA	CGA	GAA	GAA	GCA	1365
N	L	I	L	P	R	G	K	R	E	E	A	456
GCG	GAA	CCT	GAT	TCA	GAA	GGC	CTG	GAG	TTA			1392
A	E	P	D	S	E	G	L	E				465

Παράρτημα 3

Αλληλουχία αμινοξέων του *AncXanQ*

Εικόνα Π6. Αλληλουχία αμινοξέων του *AncXanQ*, όπως αυτή εξήχθη από το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης **MEGA 7** (Kumar *et al.*, 2016). Το πρόγραμμα αυτό δίνει το πιθανότερο αμινοξύ για κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα δίνει και τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης των αμινοξέων για κάθε θέση. Αμινοξέα με πιθανότητα <90% (αλλά >50%) ή <50% επισημαίνονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Τα 5 αμινοξέα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία σημειώνονται με αστερίσκο. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων και τα κατάλοιπα που σχετίζονται με τη δέσμευση της ξανθίνης (μαύροι κύκλοι), όπως αυτά προκύπτουν με βάση το πρότυπο της δομής του UapA (Alguet *et al.*, 2016), επισημαίνονται πάνω από τις αντίστοιχες αλληλουχίες.



Πίνακας Π1: Αλληλουχία αμινοξέων του ApcXapQ, όπως αυτή εξήχθη από το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Δίνεται για κάθε θέση το πιθανότερο αμινοξύ με το ποσοστό εμφάνισής του που αναγράφεται στα δεξιά, καθώς επίσης και το 2^ο ή και το 3^ο πιθανό αμινοξύ, εφόσον υπάρχει για κάθε θέση, με τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης. Αμινοξέα με πιθανότητα <90% (αλλά >50%) ή <50% επισημαίνονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Τα 5 αμινοξέα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία σημειώνονται με γκρι χρώμα και έντονη γραφή.

	1 ^η Επιλογή	Ποσοστό	2 ^η Επιλογή	Ποσοστό	3 ^η Επιλογή	Ποσοστό
1	M	1				
2	S	0.86	A	0.08	T	0.04
3	D	0.66	E	0.11	G	0.06
4	T	0.18	N	0.11	S	0.09
5	P	0.16	T	0.15	S	0.14
6	R	0.27	S	0.1	Q	0.09
7	E	0.23	D	0.23	K	0.1
8	H	0.87	N	0.05	S	0.02
9	S	0.96	P	0.02	T	0.01
10	D	1				
11	L	1				
12	V	0.78	I	0.22		
13	Y	1				

14	G	0.73	E	0.12	Q	0.04
15	L	1				
16	E	1				
17	D	1				
18	K	0.95	R	0.05		
19	P	1				
20	P	1				
21	F	0.99				
22	H	0.33	Y	0.12	S	0.07
23	Q	0.78	N	0.14	H	0.05
24	A	0.45	T	0.36	S	0.07
25	L	0.96	M	0.02	F	0.01
26	L	0.5	M	0.37	I	0.06
27	S	0.68	G	0.25	A	0.06
28	A	1				
29	V	0.9	I	0.06	L	0.02
30	T	1				
31	H	1				
32	L	1				
33	L	1				
34	A	1				
35	I	0.99	M	0.01		
36	F	1				
37	V	1				
38	P	1				
39	M	1				
40	V	0.67	I	0.33		
41	T	0.98	A	0.02		
42	P	1				
43	A	1				
44	L	1				
45	I	0.99	V	0.01		
46	V	1				
47	G	1				
48	G	0.95	A	0.01	S	0.01
49	A	1				
50	L	1				
51	G	0.76	K	0.09	E	0.06
52	L	1				
53	P	0.92	S	0.08		
54	T	0.53	A	0.3	S	0.07

55	E	0.94	D	0.05		
56	M	0.71	T	0.16	I	0.09
57	T	1				
58	A	0.99				
59	Y	1				
60	L	1				
61	V	1				
62	S	1				
63	M	1				
64	A	0.95	S	0.04		
65	M	1				
66	V	0.8	I	0.2		
67	A	1				
68	S	1				
69	G	1				
70	I	0.77	V	0.23		
71	G	1				
72	T	1				
73	Y	0.72	W	0.22	F	0.05
74	L	0.95	I	0.03	M	0.01
75	Q	1				
76	V	0.99	I	0.01		
77	N	0.98	H	0.01		
78	R	1				
79	F	0.73	Y	0.26		
80	G	1				
81	P	0.96	A	0.01	S	0.01
82	V	0.58	I	0.41		
83	G	1				
84	S	1				
85	G	1				
86	L	1				
87	L	1				
88	S	1				
89	I	1				
90	Q	1				
91	S	1				
92	V	1				
93	N	1				
94	F	1				
95	S	1				

96	F	1				
97	V	1				
98	T	0.99				
99	V	1				
100	M	1				
101	I	1				
102	A	1				
103	L	0.98	M	0.01		
104	G	1				
105	S	0.75	A	0.12	T	0.04
106	A	0.58	G	0.34	S	0.05
107	M	1				
108	K	0.99				
109	E	0.4	K	0.23	Q	0.11
110	D	0.4	G	0.27	S	0.11
111	G	1				
112	M	0.52	L	0.39	I	0.04
113	H	0.6	N	0.28	Q	0.02
114	E	0.89	K	0.06	D	0.02
115	D	0.51	E	0.33	N	0.13
116	A	0.39	T	0.13	L	0.12
117	M	0.89	I	0.1	V	0.01
118	I	0.72	M	0.16	V	0.1
119	S	1				
120	T	0.99				
121	L	1				
122	L	0.99	F	0.01		
123	G	1				
124	V	0.99	I	0.01		
125	S	0.98	A	0.01	T	0.01
126	F	1				
127	V	1				
128	G	1				
129	A	1				
130	F	1				
131	L	0.99				
132	V	1				
133	M	0.67	V	0.24	I	0.08
134	G	1				
135	S	0.94	A	0.03	T	0.02
136	S	1				

137	W	0.91	F	0.06	Y	0.01
138	I	0.38	L	0.35	V	0.2
139	L	1				
140	P	1				
141	Y	0.98	F	0.02		
142	L	1				
143	K	0.99	R	0.01		
144	R	0.89	K	0.11		
145	V	0.92	I	0.08		
146	I	1				
147	T	1				
148	P	1				
149	T	1				
150	V	1				
151	S	1				
152	G	1				
153	V	0.98	I	0.01		
154	V	1				
155	V	1				
156	L	0.83	M	0.17		
157	M	1				
158	I	1				
159	G	1				
160	L	1				
161	S	1				
162	L	1				
163	I	1				
164	K	0.65	H	0.24	R	0.06
165	V	1				
166	G	1				
167	I	1				
168	I	0.86	V	0.12	W	0.01
169	D	1				
170	F	1				
171	G	1				
172	G	1				
173	G	1				
174	F	0.99	Y	0.01		
175	A	0.93	S	0.05	G	0.01
176	A	1				
177	K	0.76	M	0.22	R	0.01

178	S	0.62	A	0.33	T	0.02
179	N	0.82	S	0.1	D	0.07
180	G	0.99				
181	T	1				
182	F	1				
183	G	1				
184	S	0.62	N	0.35	T	0.01
185	Y	0.53	M	0.18	W	0.15
186	E	0.91	D	0.04	Q	0.04
187	N	1				
188	L	0.55	I	0.38	M	0.04
189	G	0.98	A	0.01		
190	L	0.97	I	0.01	M	0.01
191	S	0.39	A	0.36	G	0.23
192	L	0.26	S	0.23	T	0.13
193	L	0.69	F	0.3	I	0.01
194	V	1				
195	L	1				
196	L	0.62	F	0.15	C	0.11
197	V	0.59	I	0.4	M	0.01
198	V	0.86	I	0.14		
199	I	0.69	L	0.18	V	0.11
200	V	0.73	A	0.12	L	0.06
201	F	1				
202	N	1				
203	C	1				
204	M	0.33	C	0.31	F	0.07
205	R	0.69	K	0.31		
206	N	1				
207	P	1				
208	W	0.64	L	0.35		
209	L	1				
210	R	1				
211	M	1				
212	S	0.98	A	0.01	G	0.01
213	G	1				
214	I	1				
215	A	0.99				
216	I	0.82	V	0.18		
217	G	1				
218	L	0.97	M	0.03		

219	I	0.75	V	0.11	M	0.07
220	A	0.77	V	0.18	S	0.02
221	G	1				
222	Y	1				
223	I	0.54	V	0.42	A	0.02
224	V	0.78	I	0.17	M	0.02
225	A	1				
226	L	0.97	M	0.01	I	0.01
227	F	0.74	C	0.09	M	0.05
228	M	0.9	L	0.09		
229	G	1				
230	M	0.99	I	0.01		
231	V	1				
232	D	1				
233	F	1				
234	S	1				
235	A	0.47	T	0.14	S	0.11
236	L	0.9	M	0.07	F	0.01
237	Q	0.71	H	0.14	R	0.06
238	N	0.95	D	0.05		
239	L	0.95	M	0.02	V	0.01
240	P	1				
241	L	0.95	M	0.02	V	0.01
242	I	0.62	V	0.32	M	0.03
243	T	1				
244	V	0.53	I	0.36	L	0.08
245	P	1				
246	V	0.85	I	0.13	M	0.01
247	P	1				
248	F	1				
249	K	1				
250	Y	1				
251	G	1				
252	F	1				
253	A	0.48	S	0.43	T	0.04
254	F	1				
255	D	0.99	E	0.01		
256	W	1				
257	H	0.99				
258	A	0.99				
259	F	1				

260	M	0.53	L	0.22	I	0.19
261	V	0.98	I	0.01	L	0.01
262	A	0.99				
263	G	1				
264	T	0.87	A	0.08	S	0.02
265	I	1				
266	Y	0.99				
267	L	0.99				
268	L	1				
269	S	1				
270	V	0.98	I	0.01		
271	L	0.76	F	0.24		
272	E	1				
273	A	1				
274	V	1				
275	G	1				
276	D	1				
277	I	0.69	I	0.21	M	0.06
278	T	1				
279	A	1				
280	T	1				
281	A	1				
282	M	1				
283	V	0.95	I	0.05		
284	S	1				
285	N	0.33	D	0.3	H	0.17
286	R	0.62	Q	0.34	K	0.03
287	P	1				
288	I	0.95	V	0.05		
289	E	0.68	Q	0.15	D	0.12
290	G	1				
291	P	0.84	E	0.09	D	0.02
292	E	0.82	A	0.07	D	0.05
293	Y	1				
294	T	0.58	Q	0.23	M	0.1
295	K	0.78	R	0.09	N	0.06
296	R	1				
297	L	1				
298	R	0.87	S	0.06	K	0.05
299	G	1				
300	G	1				

301	V	1				
302	L	0.99	M	0.01		
303	A	1				
304	D	1				
305	G	1				
306	L	0.98	M	0.01		
307	V	1				
308	S	1				
309	V	0.99	I	0.01		
310	I	0.99				
311	A	1				
312	T	0.61	S	0.35	A	0.04
313	A	1				
314	L	0.99	F	0.01		
315	G	1				
316	S	1				
317	L	1				
318	P	1				
319	L	0.99	M	0.01		
320	T	1				
321	T	1				
322	F	1				
323	A	1				
324	Q	1				
325	N	1				
326	N	1				
327	G	1				
328	V	1				
329	I	1				
330	Q	1				
331	M	1				
332	T	1				
333	G	1				
334	V	1				
335	A	1				
336	S	1				
337	R	1				
338	H	0.96	Y	0.04		
339	V	0.99	I	0.01		
340	G	I				
341	K	0.98	R	0.02		

342	Y	0.79	F	0.19	H	0.01
343	I	1				
344	A	1				
345	V	0.88	A	0.08	I	0.03
346	I	0.98	M	0.01		
347	L	1				
348	V	0.98	I	0.02		
349	L	0.82	I	0.09	M	0.04
350	L	1				
351	G	1				
352	L	1				
353	F	1				
354	P	1				
355	V	0.96	I	0.02		
356	V	0.99	I	0.01		
357	G	1				
358	R	0.98	K	0.01		
359	F	0.64	I	0.11	V	0.1
360	F	1				
361	T	1				
362	T	1				
363	I	1				
364	P	1				
365	S	0.69	A	0.27	T	0.02
366	P	1				
367	V	1				
368	L	0.97	M	0.03		
369	G	1				
370	G	1				
371	A	1				
372	M	1				
373	V	0.75	I	0.1	T	0.1
374	L	0.58	I	0.22	V	0.19
375	M	1				
376	F	1				
377	G	0.97	S	0.03		
378	M	0.87	L	0.11	I	0.01
379	I	1				
380	A	1				
381	I	0.95	V	0.03	T	0.02
382	A	1				

383	G	1				
384	I	0.53	V	0.47		
385	R	1				
386	I	1				
387	I	0.97	L	0.02	V	0.01
388	I	0.84	V	0.12	M	0.03
389	S	0.98	T	0.01		
390	H	0.96	N	0.03		
391	G	1				
392	L	0.46	I	0.39	F	0.1
393	R	0.35	N	0.2	K	0.15
394	R	1				
395	R	1				
396	E	1				
397	T	0.52	A	0.4	S	0.02
398	L	0.45	V	0.36	I	0.13
399	I	1				
400	V	0.84	A	0.11	I	0.03
401	A	1				
402	T	1				
403	S	1				
404	L	0.98	I	0.01	V	0.01
405	G	1				
406	L	0.99	M	0.01		
407	G	1				
408	L	1				
409	G	1				
410	V	1				
411	A	0.75	S	0.25	T	0.01
412	Y	0.71	F	0.28	H	0.01
413	E	0.54	D	0.44		
414	P	1				
415	E	0.9	D	0.07	N	0.01
416	V	0.97	I	0.02		
417	F	1				
418	R	0.46	K	0.38	Q	0.04
419	Q	0.58	H	0.16	V	0.06
420	L	1				
421	P	1				
422	D	0.73	E	0.17	N	0.03
423	S	0.51	G	0.18	L	0.07

424	I	0.57	L	0.19	V	0.1
425	K	0.87	Y	0.04	H	0.03
426	V	0.69	I	0.15	M	0.15
427	L	0.99				
428	F	0.85	V	0.08	L	0.04
429	Q	0.74	E	0.24		
430	N	1				
431	P	1				
432	I	1				
433	C	1				
434	A	0.48	M	0.36	T	0.1
435	G	1				
436	G	1				
437	I	0.99	V	0.01		
438	T	0.99	A	0.01		
439	A	1				
440	I	0.98	V	0.02		
441	I	0.91	L	0.04	V	0.03
442	L	0.86	M	0.13		
443	N	1				
444	L	0.99	I	0.01		
445	V	0.94	I	0.03	L	0.02
446	L	0.97	M	0.02	I	0.01
447	P	1				
448	Q	0.51	E	0.14	H	0.13
449	D	0.4	N	0.21	E	0.1
450	K	0.83	R	0.14	Q	0.01
451	K	0.19	R	0.18	T	0.16
452	E	0.35	D	0.13	Q	0.12
453	Q	0.18	K	0.16	R	0.15
454	A	0.69	T	0.08	S	0.05
455	V	0.23	I	0.12	A	0.12
456	Q	0.15	E	0.11	H	0.11
457	F	0.16	Q	0.16	L	0.12
458	D	0.5	E	0.33	N	0.06
459	D	0.53	E	0.18	N	0.11
460	D	0.46	E	0.45	N	0.03
461	A	0.13	V	0.12	H	0.1
462	V	0.19	L	0.16	P	0.15
463	E	0.58	D	0.19	Q	0.1

Παράρτημα 4

Πλήρης κωδικεύουσα αλληλουχία του *AncXanQ*

GGATCCATG/TCT/GAT/ACC/CCT/CGC/GAG/CAT/TCT/GAC/CTT/GTG/TAT/GGT/CTG (45)
M S D T P R E H S D L V Y G L (15)
/GAG/GAT/AAA/CCT/CCC/TTT/CAT/CAG/GCT/CTC/CTC/TCT/GCC/GTT/ACC/CAT/ (93)
E D K P P F H Q A L L S A V T H (31)
/CTG/TTG/GCA/ATT/TTC/GTT/CCG/ATG/GTA/ACC/CCT/GCG/TTA/ATC/GTG/GGT/ (141)
L L A I F V P M V T P A L I V G (47)
/GGT/GCC/TTA/GGT/CTT/CCG/ACC/GAA/ATG/ACT/GCC/TAT/CTT/GTT/TCT/ATG/ (189)
G A L G L P T E M T A Y L V S M (63)
/GCG/ATG/GTC/GCC/TCT/GGT/ATT/GGT/ACC/TAT/TTA/CAA/GTA/AAC/CGC/TTT/ (237)
A M V A S G I G T Y L Q V N R F (79)
/GGC/CCT/GTC/GGT/TCT/GGC/CTA/CTC/TCA/ATT/CAG/TCA/GTC/AAT/TTT/TCA/ (285)
G P V G S G L L S I Q S V N F S (95)
/TTT/GTT/ACG/GTC/ATG/ATT/GCG/CTG/GGC/AGC/GCG/ATG/AAA/GAA/GAC/GGT/ (333)
F V T V M I A L G S A M K E D G (111)
/ATG/CAC/GAA/GAT/GCA/ATG/ATT/TCG/ACG/CTT/CTC/GGC/GTC/TCC/TTC/GTT/ (381)
M H E D A M I S T L L G V S F V (127)
/GGC/GCA/TTT/CTG/GTT/ATG/GGA/TCT/TCA/TGG/ATC/TTG/CCC/TAT/CTC/AAA/ (429)
G A F L V M G S S W I L P Y L K (143)
/CGG/GTT/ATT/ACG/CCT/ACC/GTC/AGC/GGT/GTC/GTG/GTA/CTG/ATG/ATC/GGC/ (477)
R V I T P T V S G V V V L M I G (159)
/TTA/AGC/CTG/ATT/AAA/GTC/GGC/ATT/ATC/GAT/TTT/GGT/GGA/GGA/TTT/GCA/ (525)
L S L I K V G I I D F G G G F A (175)
/GCC/AAA/AGC/AAC/GGT/ACG/TTC/GGC/AGC/TAC/GAA/AAC/CTC/GGC/TTA/AGC/ (573)
A K S N G T F G S Y E N L G L S (191)
/TTA/TTG/GTT/TTA/CTG/GTG/GTG/ATC/GTG/TTT/AAC/TGC/ATG/CGC/AAC/CCG/ (621)
L L V L L V V I V F N C M R N P (207)
/TGG/CTA/CGC/ATG/AGC/GGG/ATC/GCC/ATT/GGG/CTA/ATT/GCC/GGC/TAT/ATC/ (669)
W L R M S G I A I G L I A G Y I (223)
/GTG/GCC/TTA/TTC/ATG/GGC/ATG/GTG/GAT/TTC/AGC/GCC/CTG/CAG/AAT/TTG/ (717)
V A L F M G M V D F S A L Q N L (239)
/CCG/TTA/ATC/ACC/GTG/CCG/GTG/CCG/TTC/AAA/TAC/GGC/TTT/GCC/TTT/GAT/ (765)
P L I T V P V P F K Y G F A F D (255)
/TGG/CAT/GCC/TTC/ATG/GTG/GCA/GGC/ACG/ATT/TAT/CTG/CTT/AGC/GTG/CTG/ (813)
W H A F M V A G T I Y L L S V L (271)
/GAA/GCA/GTC/GGC/GAT/ATC/ACC/GCC/ACG/GCA/ATG/GTT/TCC/AAT/CGC/CCC/ (861)
E A V G D I T A T A M V S N R P (287)
/ATT/GAA/GGG/CCA/GAG/TAT/ACC/AAA/CGG/CTG/CGT/GGC/GGC/GTG/CTG/GCA/ (909)
I E G P E Y T K R L R G G V L A (303)
/GAT/GGT/CTG/GTT/TCT/GTT/ATC/GCC/ACC/GCT/ATT/GGT/TCA/TTA/CCA/TTA/ (957)
D G L V S V I A T A I G S L P L (319)
/ACC/ACG/TTT/GCG/CAA/AAT/AAT/GGG/GTT/ATT/CAG/ATG/ACT/GGC/GTC/GCT/ (1005)
T T F A Q N N G V I Q M T G V A (335)
/TCA/CGT/CAT/GTC/GGG/AAA/TAC/ATC/GCG/GTA/ATT/CTG/GTT/TTA/CTC/GGC/ (1053)

S R H V G K Y I A V I L V L L G (351)
 /TTA/TTT/CCG/GTA/GTA/GGC/CGT/TTC/TTC/ACG/ACC/ATT/CCC/TCG/CCA/GTT/ (1101)
 L F P V V G R F F T T I P S P V (367)
 /CTG/GGA/GGC/GCA/ATG/GTA/TTG/ATG/TTT/GGT/ATG/ATT/GCC/ATC/GCA/GGG/ (1149)
 L G G A M V L M F G M I A I A G (383)
 /ATT/CGC/ATC/ATC/ATC/TCT/CAT/GGT/TTA/CGT/CGC/CGT/GAA/ACA/CTT/ATT/ (1197)
 I R I I I S H G L R R R E T L I (399)
 /GTC/GCC/ACT/TCT/TTA/GGT/TTA/GGG/CTT/GGC/GTC/GCC/TAC/GAA/CCC/GAA/ (1245)
 V A T S L G L G L G V A Y E P E (415)
 /GTC/TTT/CGT/CAA/TTG/CCA/GAT/TCT/ATT/AAG/GTA/TTA/TTC/CAA/AAC/CCT/ (1293)
 V F R Q L P D S I K V L F Q N P (431)
 /ATT/TGT/GCT/GGC/GGG/ATT/ACT/GCG/ATT/ATC/TTA/AAT/CTG/GTA/CTC/CCT/ (1341)
 I C A G G I T A I I L N L V L P (447)
 /CAA/GAT/AAG/AAA/GAA/CAA/GCC/GTT/CAA/TTT/GAT/GAT/GAT/GCT/GTC/GAG/ (1389)
 Q D K K E Q A V Q F D D D A V E (463)
/GGC/CC

Συχνότητα εμφάνισης συνώνυμων κωδικονίων στην αλληλουχία του AncXanQ και του XanQ της *E. coli*.

Aa	Codon	Codon usage in <i>anc-xanQ</i>	Codon usage in <i>xanQ</i>	Aa	Codon	Codon usage in <i>anc-xanQ</i>	Codon usage in <i>xanQ</i>
F	TTT	0.60	0.64	T	ACT	0.16	0.16
	TTC	0.40	0.36		ACC	0.48	0.44
L	TTA	0.31	0.34	Y	ACA	0.04	0.08
	TTG	0.10	0.12		ACG	0.32	0.32
	CTT	0.12	0.12		TAT	0.64	0.58
	CTC	0.14	0.10		TAC	0.36	0.42
I	CTA	0.05	0.05	N	AAT	0.50	0.50
	CTG	0.28	0.27		AAC	0.50	0.50
	ATT	0.57	0.51		AAA	0.82	0.86
	ATC	0.43	0.43		AAG	0.18	0.14
V	ATA	0.00	0.06	D	GAT	0.88	0.80
	GTT	0.29	0.40		GAC	0.12	0.20
	GTC	0.29	0.31	E	GAA	0.71	0.73
	GTA	0.17	0.11		GAG	0.29	0.27
H	GTG	0.25	0.18		CGT	0.40	0.18
	CAT	0.87	0.86		CGC	0.47	0.56
	CAC	0.13	0.14		CGA	0.00	0.13
	CAA	0.64	0.20	G	CGG	0.13	0.13
Q	CAG	0.36	0.80		AGA	0.00	0.00
	TCT	0.35	0.22		AGG	0.00	0.00
S	TCC	0.10	0.18		GGT	0.31	0.31
	TCA	0.19	0.18	C	GGC	0.44	0.45
	TCG	0.06	0.10		GGA	0.10	0.09
	AGT	0.00	0.07		GGG	0.15	0.15
	AGC	0.29	0.25		TGT	0.50	0.60

P	CCT	0.29	0.26	A	TGC	0.50	0.40
	CCC	0.21	0.32		GCT	0.13	0.15
	CCA	0.21	0.10		GCC	0.43	0.31
	CCG	0.29	0.32		GCA	0.26	0.31
					GCG	0.18	0.23

Παράρτημα 5

Πλήρης στοίχιση της αλληλουχίας του *AncXanQ* και των ομολόγων του κλάδου *XanQ*

Εικόνα Π7. Ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών του προγονικού μεταφορέα *AncXanQ* και όλων των σύγχρονων μεταφορέων του κλάδου *XanQ*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988). Κατάλοιπα που είναι απόλυτα συντηρημένα υποδηλώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ κατάλοιπα που απαντώνται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (>90%) υποδηλώνονται με μπλε χρώμα. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν από το πρότυπο της δομής του UapA (Alguel *et al.*, 2016), επισημαίνονται πάνω από τις αντίστοιχες αλληλουχίες. Τα 5 αμινοξέα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία σημειώνονται με αστερίσκο. Οι συντμήσεις των ομολόγων έχουν ως εξής: As, *Aeromonas schubertii*; Ah, *Aeromonas hydrophila*; Av, *Aeromonas veronii*; Ea, *Escherichia albertii*; Ca, *Citrobacter amalonaticus*; El, *Enterobacter lignolyticus*; Ei, *Edwardsiella ictaluri*; Et, *Edwardsiella tarda*; Sf, *Serratia fonticola*; Mm, *Morganella morganii*; Ha, *Hafnia alvei*; Op, *Obesumbacterium proteus*; Sa, *Snodgrassella alvi*; Ne, *Neisseria elongata*; Nm, *Neisseria meningitidis* και Nl, *Neisseria lactamica*.

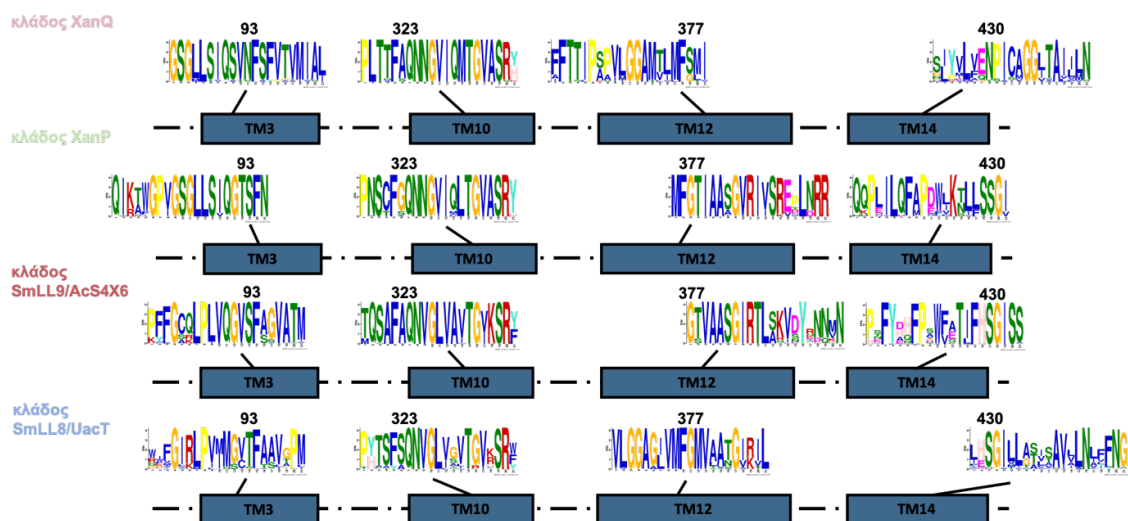
	α13										α14										
	401																				500
AncXanQ	MIAIAGIRII	ISHGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVAYPEVFP	RQLPDSIKVL	FQNPICAGGI	TAIILNLVLP	QDKKEQAVQF	DDDAVE												
AsXanQ	MIAIAGGRII	ISHGFSRRRES	LIVATSLGLG	LGVSYPNLF	RVLDPDIYML	VENPICVGGI	TAIIMNLVLP	ASRRRARQQ	QGEAP----	LDDADSLSS											
AhXanQ	MIAIAGGRII	ISHGFDRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPNVF	KVLPAGIYML	VENPICAGGI	TAIIMNLVLP	QSRRRQAAN	ATEAVELIQL	SDKPDTRFAT											
AvXanQ	MIAIAGGRII	ISHGFDRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPNVF	KVLPAGIYML	VENPICAGGI	TAIIMNLVLP	QSRKRKAAR	DAAVEVIQL	SDKPDVIFTA											
XanQ	MIAIAGIRII	ITNGLKRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	KILPASIVVL	VENPICAGGL	TAIILNIIIP	GGYRQENVLP	GITSAEEMD												
EaXanQ	MIAIAGIRII	ITNGLKRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	KILPASIVVL	VENPICAGGL	TAIVLNIIIP	GGYRQENVLP	GITPTEEMDE	Q											
CaXanQ1	MIAIAGIRII	ITNGLKRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	KILPASIVVL	VENPICAGGL	TAIILNIIIP	GGYRPEEVLP	GIISPEETD												
CaXanQ2	MIAIAGIRII	ITNGLKRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	KILPASIVVL	VENPICAGGL	TAIILNIIIP	GGYRPEEVLP	GIASPEETD												
ElXanQ1	MIAIAGIRII	ISNGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	KILPASIVVL	VENPICAGGL	TAIVLNIIIP	--IRREAPDK	AASQVEELE												
ElXanQ	MIAIAGIRII	ISNGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDAVF	RVLPSLYVL	VENPICAGGL	TAIILNIIIP	MRKKAERVRE	EDEPTGTLSA	EEEMD											
EtXanQ	MIAIAGIRII	ISNGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDAVF	RVLPSLYVL	VENPICAGGL	TAIILNIIIP	MRKKAERVRE	RDVAEPLRG	EEEMD											
ElXanQ2	MIAIAGIRII	ISNGFRRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYSPEIF	QVLPPSLYVL	VENPICAGGL	TAIIMSILLP	QDYRQEELLR	ASFNDTEQVD	APMIQPHHE											
SfXanQ	MIAIAGIRII	LSNGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	RILPESIVVL	VENPICAGGL	TAIFLNIIIP	QN-KSEKPGV	QEDEFEGVPA	EKNTD											
MmXanQ1	MIAIAGIRII	ISNGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	SILPPSLYIL	AENPICVGGI	TAIILNIIIP	VGQPRGAANE	EEPDMLADEL	EAMLDIPDAE											
MmXanQ2	MIAIAGIRII	LSNGLRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDAVF	HVLPSTLYAL	AENPICMGGV	TAIILNIIIP	ISKETEPDDI	EE-SVREEEV												
HaXanQ	MIALAGIKII	LCGMDRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	RVLPSIVVL	FENPICAGGV	TAIILNIIIP	RVNKRQGEDE	LEELIKPVTE	NFTQAK											
OpXanQ	MIALAGIKII	LCGMDRRRET	LIVATSLGLG	LGVSYPDPIF	RVLPSIVVL	FENPICAGGV	TAIILNIIIP	RVNKRQGEDE	LEELIKPVTE	NFTQAK											
SaXanQ	LIVTAGIRII	ITAGIRRRREA	VICATSLGLG	LGVAPEPEVF	AQLP--I--L	FQNPICMGGI	VAIILNIVLP	HDKSEPAVYL	SDD-IPH												
NeXanQ	LIVTAGIRII	MSHGINRRREM	VIAATSLGLG	LGVSFKPEVF	GQLP--LKE	FQNPICMGGI	AALLNIVLP	ADNASRVYLS	DDLEV												
NmXanQ	LIAIAGVRIL	VSHGIRRRREA	VIAATSVGLG	LGVAPEPEVF	KNLP--V--L	FQNSISAGGI	TAVLLNLVLP	EDKTEAAVKF	DTDHLEH												
NlXanQ	LIAIAGVRIL	VSHGIRRRREA	VIAATSVGLG	LGVAPEPEVF	KNLP--V--L	FQNSISAGGI	TAVLLNLVLP	EDKTEAAVKF	DTDHLEH												
	501										530										
AncXanQ	VSNDRTTF																				
AsXanQ	RPA--PSATA										RQQGLATDEA										
AhXanQ	RSAGQPSASK										GEGSPEPVPG										
AvXanQ											EAVAPQVERI										
XanQ																					
EaXanQ																					
CaXanQ1																					
CaXanQ2																					
ElXanQ1																					
ElXanQ																					
EtXanQ																					
ElXanQ2																					
SfXanQ																					
MmXanQ1											RDLPDMAMSA										ENKRVI
MmXanQ2																					
HaXanQ																					
OpXanQ																					
SaXanQ																					
NeXanQ																					
NmXanQ																					
NlXanQ																					

Παράρτημα 6

Συντήρηση τεσσάρων σημαντικών καταλοίπων στον κλάδο XanQ

Εικόνα Π8. Συντήρηση τεσσάρων καταλοίπων στα χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας των TM 3, 10, 12 14. Η ανάλυση των μοτίβων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε έναν από τους τέσσερεις κλάδους των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού οξέος που αντιπροσωπεύονταν από λειτουργικώς χαρακτηρισμένα ομόλογα (με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, **Εικόνα 3.6**) με το πρόγραμμα MEME. Τα ομόλογα του κλάδου XanQ, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους κλάδους συντηρούν ένα συνδυασμό τεσσάρων καταλοίπων που όπως έχει αποδειχθεί είναι σημαντικά για τη λειτουργικότητα του XanQ (Karena *et al.*, 2015). Αυτά είναι: η Asn-93 (αρίθμηση με βάση τον XanQ), η Ala-323, η Ser/Gly-377 και η Asn-430. Από αυτές τις θέσεις η Asn-93 και η Asn-430 είναι απόλυτα συντηρημένες στον κλάδο XanQ και δεν απαντώνται σε κανένα άλλο ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2, η Ala-323 είναι απόλυτα συντηρημένη στον κλάδο XanQ, αλλά ενδέχεται να είναι παρούσα και σε άλλους NAT/NCS2 μεταφορείς (που μπορεί να έχουν Ala, Gly ή Ser σε αυτή τη

θέση), ενώ τέλος η Ser-377 είναι απόλυτα συντηρημένη σε έναν υποκλάδο του κλάδου XanQ, ενώ όλα τα βακτηριακά NAT/NCS2 ομόλογα φέρουν Gly στην αντίστοιχη θέση.

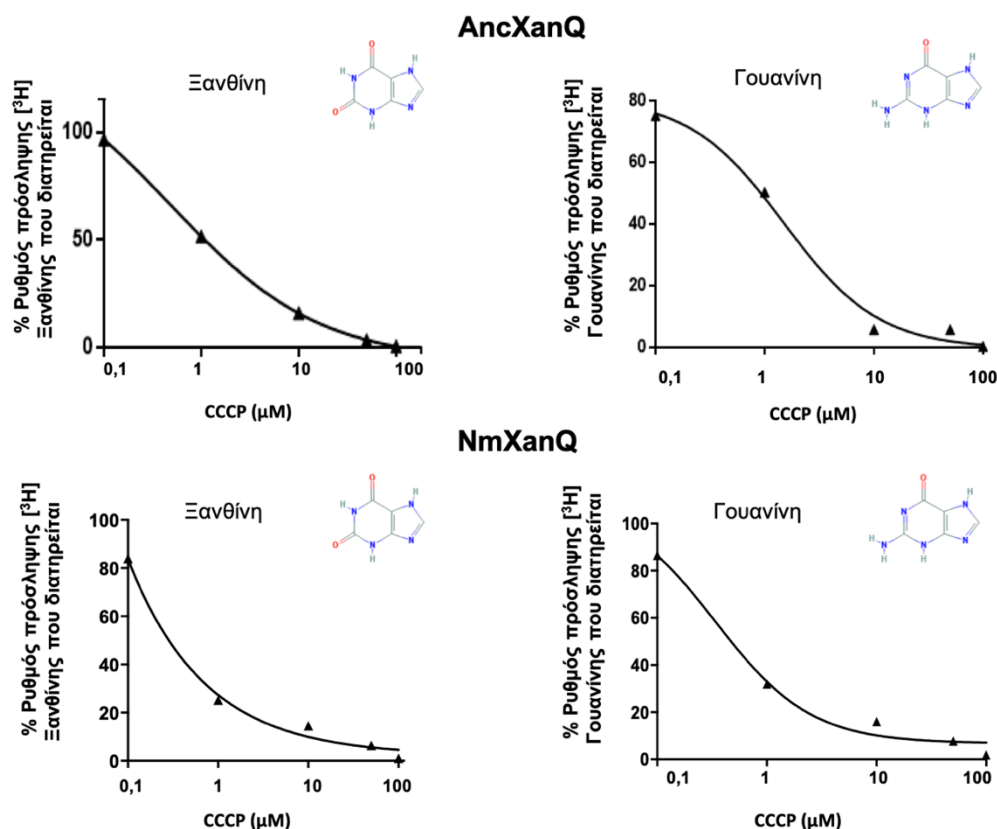


Παράρτημα 7

Εξάρτηση των *AncXanQ* και *NmXanQ* από τη διαβάθμιση πρωτονίων

Εικόνα Π9. Επίδραση του πρωτονιοφόρου CCCP στην ενεργότητα των μεταφορέων *AncXanQ* και *NmXanQ*. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0,1μM), αντίστοιχα στους 25°C παρουσία του CCCP (0.1-100 μM). Οι τιμές του θετικού μάρτυρα (λαμβάνεται ως 100%) προκύπτουν από τα αντίστοιχα κύτταρα απουσία του CCCP. Οι τιμές που αντιστοιχούν σε κάθε σημείο αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC₅₀ εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές IC₅₀ που προέκυψαν είναι 1.28±0.26 μM, 0.82±0.15 μM, 0.34±0.10 μM και 0.32±0.08 μM CCCP του *AncXanQ* (για την ξανθίνη), του *AncXanQ* (για

τη γουανίνη), του NmXanQ (για την ξανθίνη) και του NmXanQ (για τη γουανίνη), αντίστοιχα.



Παράρτημα 8

**Πλήρης κωδικεύουσα αλληλουχία του μεταφορέα XanQ από το παθογόνο
βακτήριο *Neisseria meningitidis***

ATG	AGC	GGT	CAT	ATG	GGA	AAA	GGG	GCG	GAT	GCG	CCT	GAT	TTG	GTG	TAC	48
M	S	G	H	M	G	K	G	A	D	A	P	D	L	V	Y	16
GGT	TTG	GAG	GAT	AGG	CCG	CCG	TTC	GGT	AAT	GCG	CTG	TTG	AGC	GCG	GTT	96
G	L	E	D	R	P	P	F	G	N	A	L	L	S	A	V	32
ACC	CAT	CTT	TTG	GCG	ATT	TTC	GTG	CCG	ATG	ATT	ACG	CCC	GCG	CTG	ATT	144
T	H	L	L	A	I	F	V	P	M	I	T	P	A	L	I	48
GTG	GGC	GGC	GCG	CTG	GAA	CTG	CCG	GTG	GAG	ATG	ACG	GCG	TAT	CTC	GTG	192
V	G	G	A	L	E	L	P	V	E	M	T	A	Y	L	V	64

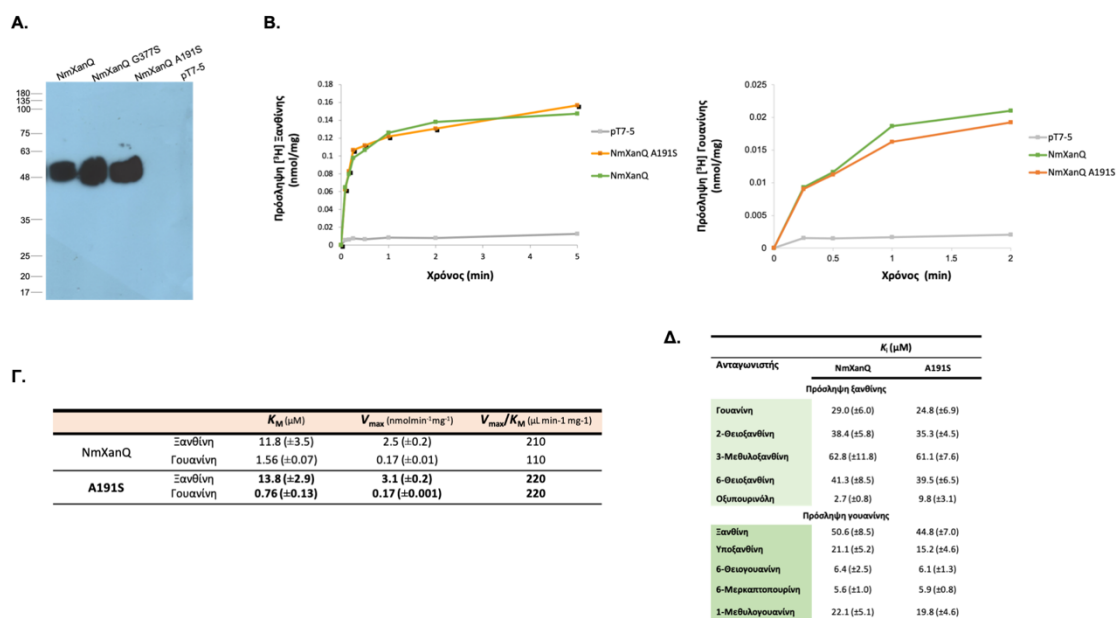
TCG	ATG	GCG	ATG	GTT	GCG	TCG	GGT	GTC	GGC	ACT	TAT	TTG	CAG	GTC	AAC	240
S	M	A	M	V	A	S	G	V	G	T	Y	L	Q	V	N	80
CGC	TTC	GGG	CCG	GTC	GGT	TCG	GGG	ATG	CTG	TCT	ATC	CAG	TCG	GTG	AAT	288
R	F	G	P	V	G	S	G	M	L	S	I	Q	S	V	N	96
TTC	TCG	TTC	GTT	ACC	GTC	ATG	ATT	GCG	CTG	GGC	GCG	GGG	ATG	AAA	GAG	336
F	S	F	V	T	V	M	I	A	L	G	A	G	M	K	E	112
GGC	GGT	TTG	ACT	AAG	GAT	GCG	ATG	ATT	TCG	ACG	CTC	TTG	GGC	GTA	TCG	384
G	G	L	T	K	D	A	M	I	S	T	L	L	G	V	S	128
TTT	GTC	GGC	GCG	TTT	TTG	GTG	TGT	TTC	TCG	GCG	TGG	CTT	CTG	CCG	TAT	432
F	V	G	A	F	L	V	C	F	S	A	W	L	L	P	Y	144
TTG	AAA	AAA	GTG	ATT	ACG	CCG	ACG	GTC	AGC	GGT	GTG	GTG	GTG	ATG	CTG	480
L	K	K	V	I	T	P	T	V	S	G	V	V	V	M	L	160
ATC	GGC	TTG	AGT	TTG	GTA	CAC	GTC	GGT	ATT	ACC	GAT	TTC	GGC	GGC	GGC	528
I	G	L	S	L	V	H	V	G	I	T	D	F	G	G	G	176
TTC	GGC	GCA	AAG	GCG	GAC	GGC	ACG	TTC	GGC	TCG	ATG	GAA	AAC	TTG	GGG	576
F	G	A	K	A	D	G	T	F	G	S	M	E	N	L	G	192
CTG	GCA	TCG	CTG	GTG	CTG	CTG	ATT	GTG	CTG	GTG	TTC	AAC	TGC	ATG	AAA	624
L	A	S	L	V	L	L	I	V	L	V	F	N	C	M	K	208
AAC	CCG	CTG	CTG	CGG	ATG	AGC	GGC	ATT	GCG	GTC	GGT	CTG	ATT	GCC	GGC	672
N	P	L	L	R	M	S	G	I	A	V	G	L	I	A	G	224
TAT	ATC	GTC	GCG	CTG	TTT	TTG	GGC	AAG	GTG	GAT	TTT	TCG	GCA	CTG	CAA	720
Y	I	V	A	L	F	L	G	K	V	D	F	S	A	L	Q	240
AAC	CTG	CCG	CTG	GTT	ACG	CTG	CCC	GTA	CCG	TTT	AAA	TAT	GGT	TTT	GCT	768
N	L	P	L	V	T	L	P	V	P	F	K	Y	G	F	A	256
TTT	GAC	TGG	CAC	GCA	TTT	ATT	GTG	GCG	GGT	GCG	ATT	TTC	CTG	TTG	AGC	816
F	D	W	H	A	F	I	V	A	G	A	I	F	L	L	S	272
GTG	TTT	GAG	GCG	GTC	GGC	GAT	TTG	ACC	GCA	ACG	GCA	ATG	GTG	TCC	GAT	864
V	F	E	A	V	G	D	L	T	A	T	A	M	V	S	D	288
CAG	CCG	ATT	GAA	GGC	GAG	GAA	TAC	ACC	AAA	CGC	CTG	CGC	GGC	GGC	GTG	912
Q	P	I	E	G	E	Y	T	K	R	L	R	G	G	V		304
TTG	GCA	GAC	GGC	TTG	GTG	TCG	GTG	ATT	GCG	ACG	GCT	TTG	GGT	TCG	CTG	960
L	A	D	G	L	V	S	V	I	A	T	A	L	G	S	L	320
CCG	CTG	ACA	ACG	TTT	GCG	CAA	AAC	AAC	GGC	GTG	ATT	CAG	ATG	ACC	GGC	1008
P	L	T	T	F	A	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	336
GTG	GCT	TCG	CGC	CAT	GTG	GGC	AAA	TAT	ATT	GCC	GTG	ATT	TTG	GTG	CTG	1056
V	A	S	R	H	V	G	K	Y	I	A	V	I	L	V	L	352
TTG	GGT	CTG	TTC	CCC	GTT	GTC	GGA	CGC	GCG	TTT	ACG	ACG	ATT	CCG	AGT	1104
L	G	L	F	P	V	V	G	R	A	F	T	T	I	P	S	368
CCG	GTT	TTA	GGC	GGC	GCG	ATG	GTT	TTG	ATG	TTC	GGC	TTG	ATT	GCG	ATT	1152
P	V	L	G	G	A	M	V	L	M	F	G	L	I	A	I	384
GCG	GGT	GTG	CGG	ATT	TTG	GTC	AGC	CAC	GGC	ATC	CGC	AGG	CGC	GAG	GCG	1200
A	G	V	R	I	L	V	S	H	G	I	R	R	R	E	A	400
GTG	ATT	GCG	GCG	ACT	TCG	GTC	GGC	TTG	GGC	TTG	GGC	GTG	GCG	TTT	GAG	1248
V	I	A	A	T	S	V	G	L	G	L	G	V	A	F	E	416
CCG	GAA	GTG	TTT	AAA	AAC	CTG	CCT	GTC	TTG	TTC	CAA	AAC	TCT	ATT	TCC	1296
P	E	V	F	K	N	L	P	V	L	F	Q	N	S	I	S	432
GCC	GGC	GGC	ATT	ACG	GCA	GTC	TTG	CTG	AAT	TTG	GTC	TTG	CCC	GAA	GAT	1344
A	G	G	I	T	A	V	L	L	N	L	V	L	P	E	D	448
AAA	ACC	GAG	GCG	GCG	GTC	AAG	TTT	GAT	ACC	GAC	CAC	TTG	GAA	CAC	TGA	1389
K	T	E	A	A	V	K	F	D	T	D	H	L	E	H		463

Παράρτημα 9

Το μεταλλάγμα A191S στη *Neisseria meningitidis*

Εικόνα Π10. Λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταλλάγματος NmXanQ/A191S. Α. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη του μεταλλάγματος NmXanQ/A191S μετά από έκφραση σε κύτταρα *E. coli* K-12. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/-BAD. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Κλάσματα μεμβρανών από *E. coli* K-12 που εκφράζουν εξωχρωμοσωμικά τις περμεάσες NmXanQ και NmXanQ/G377S χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). Β. Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης και γουανίνης. *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης (0.1μM), στους 25°C για χρόνους 5sec-5min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα της κατάλληλης σειράς *E. coli* K-12 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Γ. Τιμές Km και Vmax του μεταλλάγματος NmXanQ/A191S για την ξανθίνη και τη γουανίνη. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που εκφράζουν τις αντίστοιχες περμεάσες από πλασμίδια pT7-5/-BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (0.1-100 μM) και [³H] γουανίνης (0.01-40 μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές Km και Vmax εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Prism7, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα. Δ) Τιμές Ki του του μεταλλάγματος NmXanQ/A191S για μια σειρά αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων. Κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM) και [³H] γουανίνης

(0,1μM) στους 25°C, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM) για 5 min. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5-15 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* T184 ή JW4025 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές IC₅₀ εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H] ξανθίνης ή [³H] γουανίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις <20%.



Παράρτημα 10

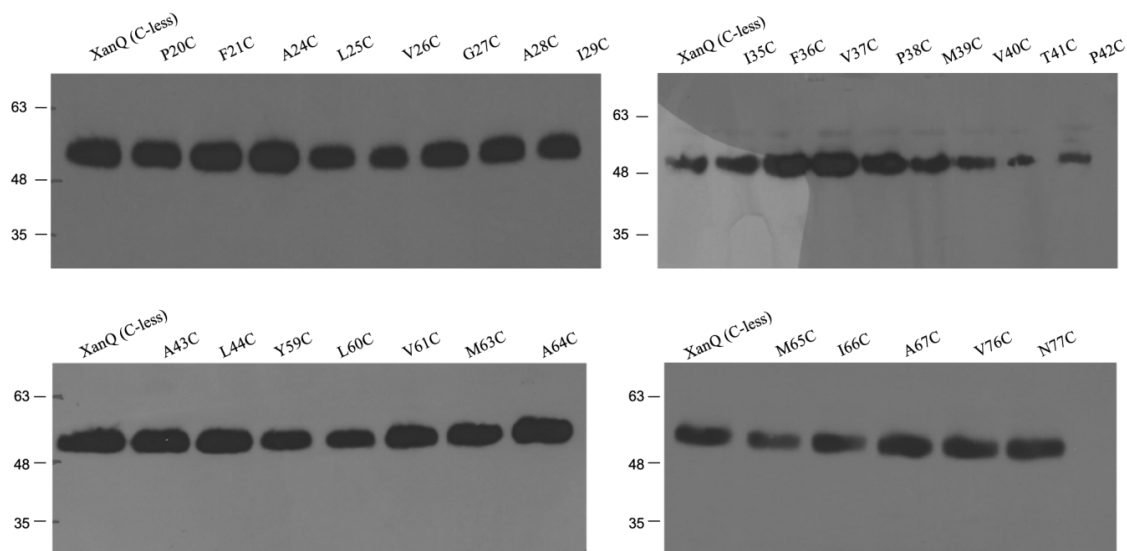
Μελέτη των διαμεμβρανικών τμημάτων TM1 και TM2 του μεταφορέα ξανθίνης XanQ με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης

Σε μια προσπάθεια να εμπλουτίσουμε τα λειτουργικά δεδομένα που ήδη είχαμε διαθέσιμα από τη συστηματική μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα XanQ (Karena and Frillingos 2009,

2011; Karena *et al.*, 2015), αποφασίσαμε να ολοκληρώσουμε τη μελέτη των διαμεμβρανικών τμημάτων TM1 και TM2, εξετάζοντας με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) όλες τις θέσεις που δεν είχαν μελετηθεί. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν συνολικά 28 τα μεταλλάγματα P20C, F21C, A24C, L25C, V26C, G27C, A28C, I29C, I35C, F36C, V37C, P38C, M39C, V40C, T41C, P42C, A43C, L44C (TM1) και Y59C, L60C, V61C, M63C, A64C, M65C, I66C, A67C, V76C και N77C (TM2). Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας τους, οι διαπεράσεις μοναδικής κυστεϊνης εκφράστηκαν μέσω IPTG-επαγόμενων πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* (T184) και ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψε πως όλα τα μεταλλάγματα εκφράζονται στη μεμβράνη στα επίπεδα του XanQ (Cys-less) και όλα εμφανίζουν ικανοποιητικά επίπεδα ενεργότητας για την ξανθίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης του N-αιθυλμλεϊμιδίου (NEM), ενός μικρού, σχετικά υδρόφοβου SH-αντιδραστηρίου που μπορεί να διαπερνά τη μεμβράνη και να έχει πρόσβαση τόσο σε περιπλασμικές, όσο και σε κυτταροπλασματικές ή και ενδομεμβρανικές θέσεις μιας πολυτοπικής μεμβρανικής πρωτεΐνης (Smyth *et al.*, 1964; Karlin and Akabas 1998), για τα μεταλλάγματα του TM1 και του TM2. Επώαση με 2mM NEM οδήγησε σε πλήρη απενεργοποίηση των μεταλλαγμάτων V37C, P38C, T41C και L44C. Στα υπόλοιπα μεταλλάγματα η ενεργότητα παραμένει ουσιαστικά στα ίδια επίπεδα. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η ευαισθησία των μεταλλαγμάτων αυτών στην απενεργοποίηση από το NEM, προχωρήσαμε σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήσαμε ένα εύρος συγκεντρώσεων του αντιδραστηρίου παρουσία ή απουσία του υποστρώματος της ξανθίνης, έτσι ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση του NEM που οδηγεί σε αναστολή της ενεργότητάς τους κατά 50% (IC₅₀). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέταλλαγμα L44C εμφανίζει υψηλή ευαισθησία στο NEM. Μικρότερη ευαισθησία στην αναστολή από το NEM εμφανίζουν τα άλλα τρία μεταλλάγματα, V37C, P38C, και T41C. Σε κάθε περίπτωση η ευαισθησία στο NEM δεν επηρεάζεται από την παρουσία του υποστρώματος.

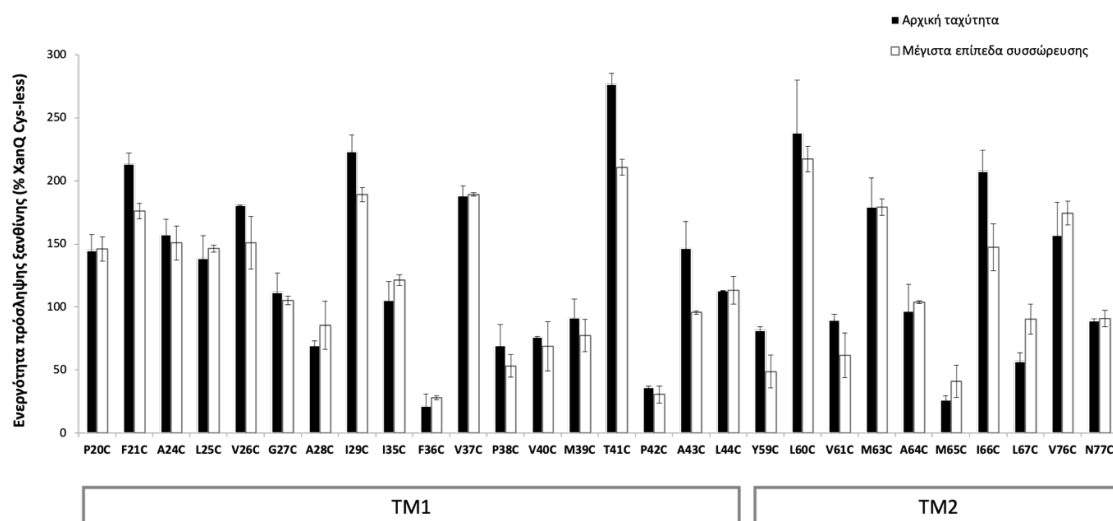
Εικόνα Π11. Επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη περμεασών από πλασμίδια pT7-5/XanQ (Cys-less)-BAD, που έφεραν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις. Τα δείγματα μεμβρανών (100μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (streptavidin-

HRP), σε αραιώση 1:50,000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Αριστερά των ηλεκτροφορημάτων, σημειώνονται οι θέσεις πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

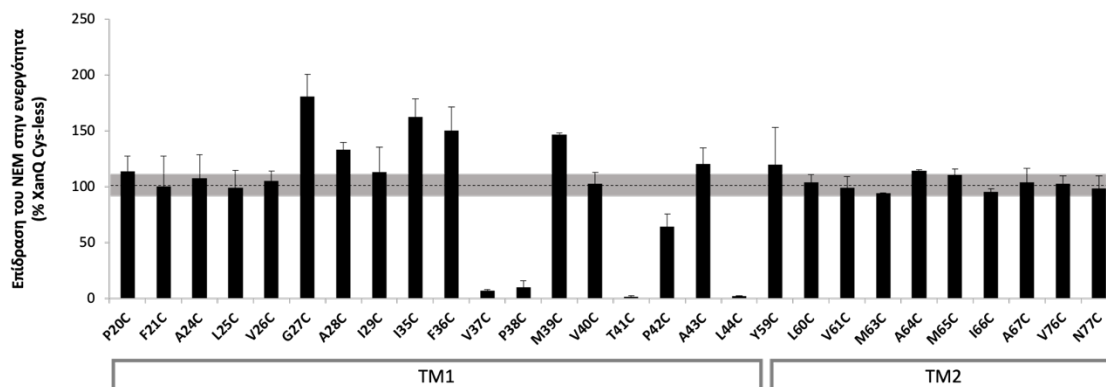


Εικόνα Π12. Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης.

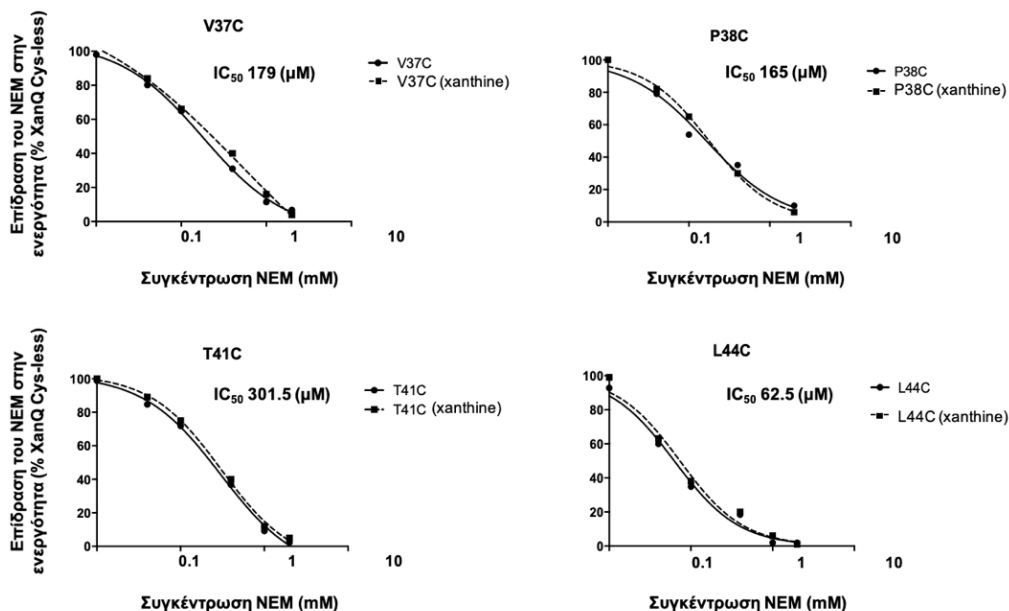
Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη διαπερασών από πλασμίδια pT7-5/ XanQ (Cys-less)-BAD που έφεραν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25°C. Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (όπως μετρήθηκαν σε χρόνους 10sec - 30sec) (ράβδοι με σκούρο χρώμα), καθώς και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης μέσα στα κύτταρα (όπως μετρήθηκαν σε χρόνους 1- 10min) (ράβδοι με ανοιχτό χρώμα), ως ποσοστά % των αντίστοιχων τιμών του XanQ Cys-less στο ίδιο πείραμα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 2 ανεξάρτητους πειραματικούς προσδιορισμούς, με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση (S.D.).



Εικόνα Π13. Επίδραση του NEM (2mM) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των υπό μελέτη διαπερασών από πλασμίδια pT7-5/*XanQ* (Cys-less)-BAD που έφεραν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις συνελέγησαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25°C, μετά από προεπώαση με NEM (2mM, 10 min, 25°C). Μετά την επώαση, η αντίδραση του NEM τερματίστηκε με προσθήκη DTT (20mM), η περίσσεια των αντιδραστηρίων απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν και πάλι σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, στην κατάλληλη συγκέντρωση (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς έγινε παρουσία ασκορβικού καλίου (20mM) και φαιναζινικού μεθοσουλφιδίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2mM). Παρουσιάζονται οι ταχύτητες μέγιστης πρόσληψης ξανθίνης, όπως μετρήθηκαν σε 10– 30sec, ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία NEM για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 2 πειράματα. Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στον αντίστοιχο μέσο όρο που μετρήθηκε για την Cys-less XanQ-BAD (δείγμα ελέγχου) σε παράλληλα πειράματα.



Εικόνα Π14. Επίδραση του NEM στην ενεργότητα των V37C, P38C, T41C και L44C παρουσία υποστρώματος. Ακολουθείται η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα Π12 για συγκεντρώσεις NEM 1μM- 2mM παρουσία ή απουσία ξανθίνης (1mM). Οι πειραματικές τιμές προσαρμόστηκαν στην εξίσωση $y = B + (T - B) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - \log x)h)})$, για δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη (πρόγραμμα Prism 7), όπου y οι τιμές ενεργότητας, B (bottom) η ελάχιστη και T (top) η μέγιστη τιμή του y , h η μεταβλητή Hill και IC_{50} οι τιμές της συγκέντρωσης NEM που οδηγούν σε αναστολή 50%, όπως εξήχθησαν από την εξίσωση και αναγράφονται σε κάθε γράφημα. Οι τιμές IC_{50} παρουσία υποστρώματος είναι πανομοιότυπες με αυτές που εξήχθησαν απουσία ξανθίνης.



Παράρτημα 11

Παρουσία των ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 στα στελέχη του κλάδου XanQ

Πίνακας Π2. Αναφέρεται η παρουσία/απουσία και ο αριθμός των ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2 (ξεχωριστά για κάθε υποκλάδο της οικογένειας) στα γονιδιώματα όλων των στελεχών που απαρτίζουν τον κλάδο XanQ. Ο κλάδος αυτός χωρίζεται σε δύο υποομάδες, η πρώτη περιλαμβάνει ομόλογα που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια (τάξη Neisseriales), επισημαίνονται με γκρι σκίαση και η δεύτερη ομόλογα γ-πρωτεοβακτηρίων. Με παύλα απεικονίζονται τα ομόλογα που απουσιάζουν από τα αντίστοιχα γονιδιώματα.

Στέλεχος	Ομόλογα γονίδια			
	NAT/COG2233			AzgA-like/COG2252
	Xanthine-Uric Acid		Uracil	
	XanQ-XanP	LL9-UacT		
<i>Snodgrassella alvi</i>	1	-	1	1
<i>Neisseria elongata</i>	1	-	1	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	-	1	1
<i>Neisseria lactamica</i>	1	-	1	1
<i>Aeromonas schubertii</i>	2	1	1	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	1	1	3
<i>Aeromonas veronii</i>	2	1	1	3
<i>Serratia fonticola</i>	2	1	1	3
<i>Hafnia alvei</i>	2	2	1	2
<i>Obesumbacterium proteus</i>	2	2	1	2
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	2	1	1	2
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	1	1	2
<i>Morganella morganii</i>	3	1	1	4
<i>Enterobacter lignolyticus</i>	3	1	2	5
<i>Escherichia coli</i>	2	1	2	4
<i>Escherichia albertii</i>	2	1	1	4
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	3	2	1	5

Παράρτημα 12

Πολυμορφισμοί των ορθολόγων του XanQ στο σύνολο του γένους της *Neisseria*

Πίνακας Π3. Παρουσιάζονται οι πολυμορφισμοί που καταγράφηκαν στους ομόλογους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 σε στελέχη του γένους *Neisseria* (διαθέσιμα στις βάσεις δεδομένων JGI). Χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αλληλουχίας το ομόλογο *xanQ* από το στέλεχος *N. meningitidis* 41615 το οποίο χαρακτηρίστηκε λειτουργικά στην παρούσα μελέτη, έγινε αναζήτηση των ομόλογων μεταφορέων για κάθε ένα είδος ξεχωριστά [*N. meningitidis*, *N. elongata*, και *N. lactamica*, (ορθόλογα του XanQ απουσιάζουν εντελώς στο είδος *N. gonorrhoeae*)] και έγινε καταγραφή των πολυμορφισμών για τα ομόλογα μεταφορέων μεταξύ του ίδιου είδους. Με γκρι σκίαση απεικονίζονται τα ομόλογα που απουσιάζουν από τα αντίστοιχα γονιδιώματα, ενώ με παύλα τα ομόλογα μεταξύ του ίδιου είδους που δεν εμφανίζουν διαφορές στην αμινοξική τους αλληλουχία.

Species	Strain	<i>xanQ</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> genomes (n= 99)		
<i>Neisseria meningitidis</i>		(relative to the ortholog of <i>N. meningitidis</i> 41615)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> 41615	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> B6116/77	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> COL-201504-11	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> FDAARGOS_212	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> FDAARGOS_214	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> G2136	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M18755	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M21273	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M21717	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22783	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22790	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22804	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22809	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22811	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22819	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22822	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22828	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M23347	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M24705	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M26263	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M26417	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M27477	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. C 053442	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. A WUE 2594	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> 331401	T152M

<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> DE8555	L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> L91543	L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25964	L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> NM3682	L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> NM3683	L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. C FAM18	L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22293	V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22425	V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M04-240196	V348M
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M18727	V348M
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. Cnl ST-53 a-14	V348M
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M21374	H463R
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> DE8669	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> FDAARGOS_210	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> H44/76	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> LNP21362	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M21955	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> NCTC12163	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> NCTC3372	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. A Z2491	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. B MC58	H4Q M5L
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> 8013	A11S Q289R
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. Group B FDAARGOS_211	H4Q M5L A11S
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. Group B FDAARGOS_215	H4Q M5L A11S
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> WUE2121	H4Q M5L L196P
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> 38277	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M01-240149	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M01-240355	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M0579	H4Q M5L

		V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M07149	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M07161	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M07162	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M07165	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M07999	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M08000	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M08001	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M09261	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M09293	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M10208	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M12752	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22189	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22191	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22160	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22718	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22722	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22740	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22745	H4Q M5L

		V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22747	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22748	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22759	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22769	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22772	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22797	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22801	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M23413	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M24730	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25070	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25073	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25074	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25087	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25419	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25438	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25456	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25459	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25462	H4Q M5L

		V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25472	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25474	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M25476	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M27559	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M7124	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> NM3686	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> NZ-05/33	H4Q M5L V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> FDAARGOS_209	H4Q M5L A11S V203I
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> M22814	H4Q M5L A11S V203I N442S
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> sv. B alpha710	H4Q M5L A11S V203I Q289R A453V
<i>Neisseria elongata</i>	<i>N. elongata glycolytica</i> ATCC 29315	(N-terminal) * P12T G17R R21K G25A E54K V57S M89L T101G A108S G113Q L115M T116D K117T D118N I121M T123A S128A

		C136A F137G L160M V166I H167S G169A D172E G178A K180L A181G D182N E189Q L191I S195A L196F I200V L221M I222V V227A F230I L231M K233M A238V L244A V245F A256E D258H H260T I263F A267L I268V F269Y V273I D288G Q289E P290D I291Y E295A Y296F T297R K298W Y345F V348A L371I A383T I384V V391M R396N A400M V407I A414S E416K K421G N422Q V425L
--	--	---

		S430P S432C A433M I436L T437A V439L (C-tail)*
<i>Neisseria elongata</i> genomes (n= 4)		
<i>Neisseria elongata</i>		(relative to the ortholog of <i>N. elongata</i> glycolytica ATCC 29315)
<i>Neisseria elongata</i>	<i>N. elongata</i> glycolytica ATCC 29315	-
<i>Neisseria elongata</i>	<i>N. elongata</i> NCTC 11050	-
<i>Neisseria elongata</i>	<i>N. elongata</i> M15911	I227V W295R A446D
<i>Neisseria elongata</i>	<i>N. elongata</i> glycolytica M15910	S6F A8T I227A W295R S450N
<i>Neisseria lactamica</i>	<i>N. lactamica</i> M17106	L244P Q289R
<i>Neisseria lactamica</i> genomes (n= 3)		
<i>Neisseria lactamica</i>		(relative to the ortholog of <i>N. lactamica</i> M17106)
<i>Neisseria lactamica</i>	<i>N. lactamica</i> M17106	-
<i>Neisseria lactamica</i>	<i>N. lactamica</i> ST-640	-
<i>Neisseria lactamica</i>	<i>N. lactamica</i> Y92-1009	R309Q
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> genomes (n= 45)		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090	Absent from genome
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> FA19	Absent from genome
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> MS11	Absent from genome
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> FC428	Absent from genome
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> WHO strains (n=14)	Absent from genome
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> 27 more strains	Absent from genome

* Το XanQ της *N. elongata* glycolytica ATCC 29315 διαφέρει από αυτό της *N. meningitidis* 41615 (NmXanQ) επιπλέον σε 5/7 κατάλοιπα στο N-τελικό άκρο terminus και σε 15/24 κατάλοιπα στο C-τελικό άκρο.

Παράρτημα 13

Φυλογενετική ανάλυση της ομάδας ομολόγων μεταφορέων AzgA-like/COG2252 στα Πρωτεοβακτήρια

Εικόνα Π15. Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 132 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το Φύλο των Πρωτεοβακτηρίων που ανήκουν στον κλάδο αδερίνης/υποξανθίνης/γουανίνης (υποοικογένεια COG2252). Αρχικά πραγματοποιήθηκε επιλογή όλων των γονιδιωμάτων που ανήκουν στο φύλο Πρωτεοβακτήρια από τη βάση δεδομένων IMG/M του JGI και ανακτήθηκαν συνολικά 7,406 βακτηριακά στελέχη, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως (έως τον Ιανουάριο του 2021). Ακολούθησε ταξινόμηση των γονιδιωμάτων με βάση την κλάση σε α-, β-, γ-, δ- και ε- πρωτεοβακτήρια και πραγματοποιήθηκε αναζήτηση πρωτεϊνικών ομολόγων με το πρόγραμμα Blast-p ξεχωριστά για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανακτήθηκαν υποβλήθηκαν σε αρχική φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο neighbor-joining (Saitou *et al.*, 1987), προκειμένου να αποκλειστούν αλληλουχίες που δεν ανήκαν στην ομάδα μεταφορέων AzgA-like/COG2252. Με την ανωτέρω διαδικασία προέκυψαν 1,146 πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην φυλογενετική ομάδα AzgA-like/COG2252. Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε σε 302, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος. Φυλογενετική ανάλυση σε αυτές τις 302 αλληλουχίες με το πρόγραμμα Neighbor Joining επέτρεψε τη διάκριση των ομολόγων που ανήκουν στους κλάδους GhxP και AdeP, όπως αυτοί αντιπροσωπεύονται από τους γνωστούς μεταφορείς γουανίνης/υποξανθίνης GhxP και αδερίνης AdeP, αντίστοιχα (Papakostas *et al.*, 2013). Τα ομόλογα αυτών των 2 κλάδων, μαζί με τα ομόλογα της οικογένειας Neisseriaceae (132 αλληλουχίες συνολικά), υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA 7), ώστε να κατασκευαστεί το τελικό φυλογενετικό δένδrogramma (παρούσα εικόνα). Λειτουργικά χαρακτηρισμένα ομόλογα από την *E. coli* K-12 (Papakostas *et al.*, 2013) επισημαίνονται με έντονη γραμματοσειρά, ενώ το ομόλογο από τη *N. meningitidis* σημειώνεται με κόκκινο χρώμα.

