



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΚΑΙ
ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ (NAT)**

ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

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

Ημερομηνία αίτησης της κ Γεωργοπούλου Αικατερίνης: 12-5-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 589^α/3-10-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φριλίγγος Ευστάθιος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

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

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-10-2006

«Χαρτογράφηση του κέντρου δέσμευσης και μεταφοράς πουρινών των μεταφορέων των νουκλεοτιδικών βάσεων –ασκορβικού (NAT)»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 714^α/7-6-2011

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δραΐνας Κωνσταντίνος	Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Διαλλινάς Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας Τμήματος Βιολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Φριλίγγος Ευστάθιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-6-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μέρος της διατριβής αυτής χρηματοδοτήθηκε από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, στα πλαίσια του προγράμματος Συνεργασίας με Οργανισμούς Έρευνας και Τεχνολογίας χωρών εκτός Ευρώπης (NONEU-05). Για την ολοκλήρωσή της πολλοί ήταν εκείνοι που συνέβαλαν με το δικό τους τρόπο ο καθένας.

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο, για όλη τη συνεισφορά του για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Αρχικά, γιατί ήταν πάντα κοντά μου, από την αρχή ως το τέλος και μου προσέφερε και τις επιστημονικές του γνώσεις αλλά και την ηθική βοήθεια όταν τη χρειάστηκα. Με έμαθε να σκέφτομαι, να αξιολογώ, να ερμηνεύω και ακόμα, να παρουσιάζω τα αποτελέσματά μου με τρόπο επιστημονικό και ολοκληρωμένο. Η συνεργασία μας αλλά και το γενικότερο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο βοήθησαν στο να ολοκληρωθεί αυτή η δουλειά με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής και ιδιαίτερα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά και την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου για τη συμβολή τους στην περάτωση αυτής της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών καθώς και τα άλλα μέλη των εργαστηρίων αυτών, που βοήθησαν με τον δικό του τρόπο ο καθένας στην ανάπτυξη μιας φιλικής ατμόσφαιρας, που σε έναν εργασιακό τομέα κάνει τη διαφορά.

Στα πλαίσια της διατριβής μου είχα τη χαρά να συνεργαστώ με πολλούς ανθρώπους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Λιμπανοβνού Σωτηρία, Βούρβου Ελένη, Βλαντό Βασίλη και Μπότου Μαρία που συνεργαστήκαμε στα πλαίσια των διπλωματικών τους εργασιών, τους: Παναγιώτη Πάνο, Χριστίνα Θεοδωράκη και Αλέξανδρο Καλλή στα πλαίσια των μεταπτυχιακών τους διατριβών ειδίκευσης και τη Δρ. Σωτηρία Ταβουλάρη κατά την εκπόνηση της διδακτορικής της διατριβής.

Ξεχωριστά, θέλω να ευχαριστήσω τη φίλη και πρώτη μου «δασκάλα» στον εργαστηριακό πάγκο Δρ. Παναγιώτα Καρατζά, που ήταν κοντά μου κατά το ξεκίνημα αυτής της προσπάθειας αλλά έθεσε και τα θεμέλια για την περάτωσή της. Ευχαριστώ επίσης τους: Υ.Δ. Κατερίνα Καρενά, Δρ. Κωσταντίνο Παπακώστα και Δρ. Χαρά Βλάχου γιατί μέσω της συνεργασίας και της συνύπαρξής μας στον εργαστηριακό χώρο απέκτησα τρεις πολύ καλούς φίλους. Ξεχωριστό κομμάτι αποτελεί ο φίλος αλλά και συνεργάτης μου Δρ. Γεώργιος Μερμελέκας, που ως φίλος με στήριξε και με στηρίζει εδώ και πολλά χρόνια ενώ ως συνεργάτης υπήρξε βοηθός και εμψυχωτής όταν αυτό ήταν αναγκαίο.

Τελειώνοντας, νιώθω πολύ τυχερή που στη ζωή μου κέρδισα εκτός από γνώσεις και πολύ καλούς φίλους. Ευχαριστώ τη Βάσω, το Χρόνη, το Λευτέρη, το Χρήστο, τη Νικολέττα και την Έρση που είναι πάνω απ'όλα φίλοι μου. Ιδιαίτερω ευχαριστώ την Παωλίνα, την Κωνσταντίνα, την Κατερίνα και την Εύη με τις οποίες μας συνδέουν πολλά χρόνια φιλίας και οι οποίες ήταν πάντα κοντά μου σε όλες τις στιγμές, γλυκές και πικρές.

Τέλος, θα ήθελα να επισημάνω πώς όλη αυτή η προσπάθεια δεν θα είχε ολοκληρωθεί αν δεν είχα τη στήριξη της οικογένειάς μου. Ένα ευχαριστώ είναι λίγο για τους γονείς μου, που στηρίζουν κάθε μου βήμα και μου έμαθαν να αγωνίζομαι στη ζωή μου με επιμονή και αξιοπρέπεια. Και επειδή οι αδυναμίες δεν κρύβονται, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή τη διατριβή στην αδερφή μου Κωνσταντίνα, που τώρα κάνει ένα καινούριο ξεκίνημα στη ζωή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Δυναμική πρωτεϊνών και εξέλιξη	3
1.1.1 Μοριακή εξέλιξη των ενεργών κέντρων	4
1.2 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς	10
1.2.1 Ταξινόμηση των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς	10
1.2.2 Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς	11
1.3 Δομικές-κρυσταλλογραφικές μελέτες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς	15
1.3.1 Δομές ενεργών κέντρων δέσμευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του <i>διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων</i>	16
1.3.2 Δομές ενεργών κέντρων δέσμευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος	21
1.3.3 Δομές ενεργών κέντρων δέσμευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση κάποιο από τα γνωστά μηχανιστικά μοτίβα	28
1.4 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων	33
1.4.1 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	33
1.4.2 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 και το μοτίβο «υπογραφή» NAT	35
1.4.2.1 Το μοτίβο «υπογραφή» NAT	40
1.4.2.2 Ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα <i>A. nidulans</i>	42
1.4.2.3 Ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ του εντεροβακτηρίου <i>E. coli</i>	46
1.5 Η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2	54
1.6 Σκοπός της εργασίας	63

2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	65
2.1	Όργανα	67
2.2	Χημικά αναλώσιμα	69
2.3	Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	70
2.4	Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	74
2.4.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)	74
2.4.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πολλαπλών επικαλύψεων (multiple overlap-PCR)	78
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension) στο υπόστρωμα του χμιαρικού μεταφορέα $^{xanQ}N_{11}(419)C_1^{uapA}$	83
2.4.4	Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασυνδυασμός)	86
2.4.5	Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων	87
2.4.6	Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	88
2.5	Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων	90
2.6	Δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assays)	91
2.6.1	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα	91
2.6.1.1	Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα για προσδιορισμό των κινητικών σταθερών V_{max} και K_m	92
2.6.1.2	Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα παρουσία μη σημασμένων πιθανών προσδετών	92
2.6.1.3	Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα και επίδραση NEM	94
2.6.1.4	Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς και επίδραση NEM παρουσία ή απουσία μη ραδιενεργού υποστρώματος (ξανθίνη)	95
2.6.2	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (transport assay) σε μεμβρανικά κυστίδια	96
2.6.2.1	Δοκιμασία εκροής και ανταλλαγής υποστρώματος (Efflux-Exchange assay) σε μεμβρανικά κυστίδια	97
2.6.2.2	Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε μεμβρανικά κυστίδια παρουσία μη σημασμένου συνθετικού δεκαπενταπεπτιδίου	98

2.7	Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	99
2.8	Αναλύσεις πρωτεϊνών	101
2.8.1	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	101
2.8.2	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	101
2.8.3	Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	103
2.9	Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)	104
2.10	Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών (cysteine accessibility assay)	107
2.10.1	Σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού	107
2.11	<i>In silico</i> αναλύσεις	110
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	111
3.1	Επίδραση του υποστρώματος (ξανθίνης) στα κατάλοιπα της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα ξανθίνης XanQ	113
3.1.1	Επίδραση της ξανθίνης στο προφίλ ευαισθησίας της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή σε αλκυλίωση/απενεργοποίηση από NEM: Νέα στοιχεία για τις θέσεις Ala-323 και Asn-325	115
	Επίδραση του υποστρώματος στην ευαισθησία: Το υπόστρωμα «εκθέτει» τη θέση A323C για αλκυλίωση από το NEM	117
	Επίδραση του υποστρώματος στην αντιδραστικότητα: Το υπόστρωμα «προστατεύει» τη θέση N325C από αλκυλίωση από το NEM	121
3.1.2	Θέσεις καταλοίπων στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή που συνεισφέρουν στο προφίλ εξειδίκευσης: Gly-333 και Ser-336	124
	Μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης των καταλοίπων Gly-333, Val-334, Ser-336 και Val-339 και ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης	124
3.1.3	Ενεργότητες εκροής και ανταλλαγής ξανθίνης του μεταλλάγματος Q324N σε μεμβρανικά κυστίδια	129
3.1.4	Η ενεργότητα του μεταφορέα XanQ δεν επηρεάζεται από ένα συνθετικό 15πεπτίδιο με την αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή	131
3.2	Ανάλυση χημικών κατασκευών μεταξύ του μεταφορέα ξανθίνης XanQ και ομολόγων του με διαφορετική εξειδίκευση	133

3.2.1	Σχεδιασμός και κατασκευή χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ XanQ/UapA και XanQ/YgfU	135
3.2.2	Έλεγχος έκφρασης και ενεργότητας των χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ XanQ και UapA	140
3.2.3	Μεταλλαξιγένεση του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$	142
	Η εισαγωγή των Asn-430 και Ile-432 στο υπόβαθρο του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$ επαναφέρει την υψηλή έκφραση στη μεμβράνη και οδηγεί σε ανιχνεύσιμη αλλά μικρή ενεργότητα	144
	Η εισαγωγή της Tyr-425 στο υπόβαθρο του μεταλλαγμένου χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1(NPI)$ διατηρεί τα υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη αλλά υποβιβάζει την ενεργότητα	147
	Η περικοπή του υδρόφιλου συνδετικού τμήματος μεταξύ TM11 και TM12 στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1(NPI)$ οδηγεί σε υψηλή ενεργότητα	150
	Τα προφίλ εξειδίκευσης των χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1(NI)$, $N_{11}C_1(NPI)$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$ είναι διαφορετικά από αυτό του XanQ(wt)	154
	Η εισαγωγή ενός ζεύγους γλυκινών στο μέσον της έλικας TM12 στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ επαναφέρει πλήρως την ενεργότητα .	156
	Ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$ προσεγγίζει καλύτερα τις λειτουργικές ιδιότητες του XanQ(wt)	159
3.2.4	Οι χιμαιρικοί μεταφορείς μεταξύ XanQ/YgfU όπου αντικαθίσταται η έλικα TM12	162
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	163
4.1	Συνεισφορά της διατριβής στη χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου στους μεταφορείς NAT/NCS2	165
4.2	Η σχέση του μοτίβου-υπογραφή με το κέντρο δέσμευσης στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ	167
	Αναθεώρηση της τοπολογίας του μοτίβου-υπογραφή βάσει του μοντέλου της δομής του UraA	169
	Τόσο η Gln-324 όσο και η Asn-325 αποτελούν μέρος του κέντρου δέσμευσης της ξανθίνης στον XanQ	171

Η δέσμευση της ξανθίνης επάγει μια κρίσιμη αλλαγή διαμόρφωσης στη θέση Ala-323	174
Όλη η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή είναι προσβάσιμη από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον	175
Το συνολικό προφίλ αντιδραστικότητας και ευαισθησίας των καταλοίπων της έλικας 10 (μοτίβο-υπογραφή) υποδηλώνει μια λειτουργικά «ευαίσθητη» περιοχή	177
Η Gly-333 και η Ser-336 αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία της εξειδίκευσης	178
4.3 Άλλες θέσεις του μεταφορέα XanQ που συνεισφέρουν στο κέντρο δέσμευσης και η σχέση τους με το μοτίβο-υπογραφή	179
Τι γνωρίζουμε όμως εμείς για τη σημασία αυτών των καταλοίπων των TM1, TM3 και TM8 στο πρωτεϊνικό μόριο του XanQ;	179
4.4 Αναθεώρηση της τοπολογίας και νέα στοιχεία για το ρόλο του C-τελικού TM στη λειτουργία του μεταφορέα XanQ	183
Η επαναφορά των Asn-430 και Ile-432 στον χμαιοικό μεταφορέα N ₁₁ C ₁ είναι ικανές και αναγκαίες συνθήκες για την κανονική έκφρασή του στη μεμβράνη	185
Η επαναφορά της ενεργότητας του χμαιοικού μεταφορέα N ₁₁ C ₁ απαιτεί μια πιο «σφιχτή» δομή ενώ η εξειδίκευση είναι συνισταμένη περισσότερων παραγόντων	187
Ποιος είναι ο ρόλος του C-τελικού TM στους μεταφορείς NAT/NCS2;	190
4.5 Πώς μπορεί να συνέβαλαν διακριτά μοριακά στοιχεία του C-τελικού TM στην εξέλιξη της εξειδίκευσης του XanQ;	193
5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	197
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	205

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- Avidin-HRP:** σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης
- BAD:** τομέας δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain)
- BSA:** αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)
- C-less ή Cys-less:** (περμεάση) ελεύθερη κυστεϊνών
- DDM:** n-δωδεκυλο-β-D-μαλτοπυρανοσίδιο (n-dodecyl-β,D-maltopyranoside)
- DMSO:** διμεθυλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)
- DTT:** διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)
- EDTA:** αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid)
- GFP:** πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein)
- His₁₀:** αλληλουχία 10 καταλοίπων ιστιδινών
- HRP-Protein A:** πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με υπεροξειδάση ραπανιού (horseradish peroxidase-protein A)
- IPTG:** ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσίδιο (isopropyl-β,D-thiogalactopyranoside)
- KPi:** Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου
- LacY-epitope:** αλληλουχία του C-τελικού 12πεπτιδίου της περμεάσης της λακτόζης LacY
- lacZ p/o:** υποκινητής/χειριστής του οπερονίου της λακτόζης (promoter/operator)
- LB:** Θρεπτικό υλικό Luria Bertani (ή Luria Broth)
- MTSES⁻:** αιθυλο-σουλφονυλ-μεθανοθειοσουλφονικό (άλας νατρίου) [Sodium (2-Sulfonatoethyl)methanethiosulfonate]
- NAT:** Οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (Nucleobase-Ascorbate Transporters)
- NCS2:** Οικογένεια-2 συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-κατιόντων (Nucleobase-Cation Symporters-2)
- NEM:** N-αιθυλμηλεϊμίδιο (N-ethylmaleimide)
- OGM:** πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide)
- PAGE:** Ηλεκτροφόρηση πυκτώματος πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- PCR:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
- PMS:** μεθοσουλφονικό φαιναζίνιο (phenazine methosulphate)
- PVDF:** διφθοριούχο πολυ-βινυλιδένιο (polyvinylidene difluoride)

RSO: (κυστίδια) ορθού προσανατολισμού (Right-Side-Out)

SDS: θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate)

TBST: ρυθμιστικό διάλυμα Tris που περιέχει Triton X-100 (Tris Bufferd Saline-Triton X-100)

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

TM: (transmembrane domains) = διαμεμβρανικό τμήμα

Αμινοξέα:

A ή Ala: αλανίνη

C ή Cys: κυστεΐνη

D ή Asp: ασπαρτικό

E ή Glu: γλουταμικό

F ή Phe: φαινυλαλαλίνη

G ή Gly: γλυκίνη

H ή His: ιστοδίνη

I ή Ile: ισολευκίνη

K ή Lys: λυσίνη

L ή Leu: λευκίνη

M ή Met: μεθειονίνη

N ή Asn: ασπαραγγίνη

P ή Pro: προλίνη

Q ή Gln: γλουταμίνη

R ή Arg: αργινίνη

S ή Ser: σερίνη

T ή Thr: θρεονίνη

V ή Val: βαλίνη

W ή Trp: τρυπτοφάνη

Y ή Tyr: τυροσίνη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δυναμική πρωτεϊνών και εξέλιξη

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς και ιδιαίτερα οι μεταφορείς NAT/NCS2 που αποτελούν αντικείμενο 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. Πώς όμως αναπτύσσονται οι διαφορετικές λειτουργικές εξειδικεύσεις ανάμεσα σε πρωτεΐνες που διατηρούν σε μεγάλο βαθμό τα ίδια σημαντικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου και μοιράζονται το ίδιο γενικό μοτίβο δομής; Οι πρωτεΐνες αποτελούν δυναμικά και εξειδικευμένα βιολογικά συστήματα. Τα χαρακτηριστικά αυτά γενικά συνάδουν με έλλειψη ευελιξίας από άποψη αλλαγής και εξέλιξης των χαρακτηριστικών τους. Παρόλα αυτά, τα πρωτεϊνικά συστήματα χαρακτηρίζονται από μια αξιοσημείωτη ικανότητα να αποκτούν νέες λειτουργίες και να σχηματίζουν στο χώρο καινούριες δομές. Η προσπάθεια εύρεσης πειραματικών αποδείξεων για την εξελικτική προσαρμογή των πρωτεϊνών έχει μεγάλη σημασία, όχι μόνο για την ευρεία κατηγορία των πρωτεϊνών που φαίνεται να έχουν αποκλίνει από ελάχιστους κοινούς προγόνους, αλλά και για πρόσφατα δείγματα εξέλιξης των πρωτεϊνικών μορίων που έχουν καταγραφεί τις τελευταίες δεκαετίες, όπως είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε διάφορα φάρμακα από τους μικροοργανισμούς, καθώς και ενζύμων που αποδομούν πολύπλοκες χημικές ενώσεις (Tokuriki and Tawfik, 2009).

Ποια είναι όμως τα χαρακτηριστικά που κάνουν τις πρωτεΐνες να εξελίσσονται; Η έννοια της πρωτεϊνικής εξέλιξης αφορά ουσιαστικά την αλλαγή (προς το βέλτιστο) των ήδη υπαρχόντων μοριακών χαρακτηριστικών κάτω από την πίεση της φυσικής επιλογής. Πρωτεΐνες που ανταποκρίνονται σε μοντέλα απόλυτης λειτουργικής εξειδίκευσης και αντιπροσωπεύονται από μία μόνο καλώς ορισμένη και «σφιχτή» δομή έχουν σχετικά μικρές πιθανότητες να ανταποκριθούν σε εξελικτικές πιέσεις για οποιαδήποτε αλλαγή. Ωστόσο, στην πραγματικότητα, οι διαμορφωτικές διαφοροποιήσεις και η δυναμικότητα αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά της δομής όλων των βιολογικών πολυμερών. Με άλλα λόγια, τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να θεωρηθούν ως σύνολα από πολλές εναλλακτικές διαμορφώσεις (**διαμορφωμερή**), οι οποίες βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία με την κύρια εγγενή διαμόρφωση (native state) της εκάστοτε πρωτεΐνης (James and Tawfik, 2003).

Η διαμορφωτική ποικιλομορφία στις πρωτεΐνες μπορεί να παρατηρηθεί σε διάφορα επίπεδα, από τη διακύμανση στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων και τις τοπικές κινήσεις ευέλικτων περιοχών που συμμετέχουν στα κέντρα δέσμευσης έως και τις εναλλαγές στο επίπεδο της δευτεροταγούς δομής και αναδιατάξεις στο χώρο που αφορούν όλο το πρωτεϊνικό μόριο. Εναλλακτικές δομικές διαμορφώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά είδη αναδίπλωσης των πρωτεϊνικών μορίων και εν τέλει σε διαφορετικές λειτουργίες. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί το αντίσωμα IgE (SPE7) το οποίο μπορεί να δεσμεύσει τελείως διαφορετικά υποστρώματα, από απτίνες (μικρά μη πρωτεϊνικά μόρια τα οποία μπορούν να επάγουν την ανοσολογική απόκριση) μέχρι μεγάλες πρωτεΐνες, μέσω εναλλαγών μεταξύ εντελώς διαφορετικών προϋπαρχόντων δομικών ισομερών (διαμορφωμερών) (James and Tawfik, 2003).

Αυτού του τύπου η δομική και λειτουργική ποικιλομορφία αποτελεί τη βάση της πρωτεϊνικής **εξελισιμότητας** (evolvability), η οποία ορίζεται ως η ικανότητα των πρωτεϊνών να υιοθετούν γρήγορα νέες λειτουργίες μέσω ήδη υπαρχόντων δομικών αναδιπλώσεων ή και ακόμα να αναπτύσσουν εντελώς νέες δομικές διαμορφώσεις στο χώρο, οι οποίες μπορούν να επιτευχθούν με έναν ελάχιστο αριθμό αλλαγών στην αλληλουχία (Tokuriki and Tawfik, 2009). Από αυτή την άποψη, η **πλειοτροπικότητα** ή **χαμηλή εξειδίκευση** (promiscuity) που παρουσιάζουν ορισμένες πρωτεΐνες φαίνεται να αποτελεί ένα καλό σημείο εκκίνησης για τη διαφοροποίηση νέων λειτουργιών. Μεταλλαγές στις πρωτεΐνες χαμηλής εξειδίκευσης είναι πιο εύκολο να αλλάξουν το ισοζύγιο προς τη δημιουργία εναλλακτικών λειτουργιών και δομών και επομένως να αποτελέσουν το ακατέργαστο υλικό πάνω στο οποίο θα δράσει η φυσική επιλογή, οδηγώντας σε νέες προσαρμογές και σε περισσότερο εξειδικευμένες λειτουργίες βιομορίων (Tokuriki and Tawfik, 2009).

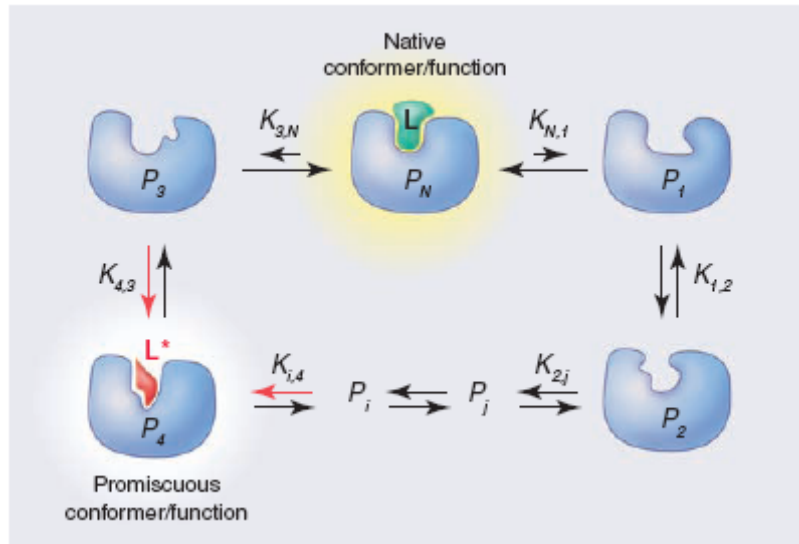
1.1.1 Μοριακή εξέλιξη των ενεργών κέντρων

Τα ενεργά κέντρα των πρωτεϊνών παρουσιάζουν ευελιξία καθώς υφίστανται έντονες διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη δέσμευση του υποστρώματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ενώ η σύνδεση του υποστρώματος και του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου πραγματοποιούνται μέσω «άκαμπτων» (rigid) και καλά οργανωμένων δομών, τα υπόλοιπα βήματα του κύκλου που ολοκληρώνει μια τέτοια σύνδεση (όπως η απελευθέρωση του προϊόντος) πραγματοποιούνται με πιο

«ευέλικτους» δομικά τρόπους, γεγονός που μπορεί να αποτελεί και τη βάση για την λειτουργική ποικιλότητα που αναπτύσσεται κατά την εξέλιξη. Πολλές πρωτεΐνες εμφανίζουν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες και υπάρχουν ένζυμα που έχουν εξελιχθεί ώστε να καταλύουν αντιδράσεις διαφορετικές από εκείνες που προορίζονταν να καταλύουν αρχικά (Khersonsky *et al.*, 2006). Η χαμηλή εξειδίκευση και πολυδυναμικότητα μπορεί να αποδοθεί σε διάφορα είδη υποστρωμάτων και προσδετών, τα οποία ανατρέπουν το ισοζύγιο των εναλλακτικών διαμορφώσεων μιας πρωτεΐνης προς όφελος διαμορφώσεων που εμφανίζονται αρχικά με μικρή συχνότητα αλλά είναι ικανές να προσδέσουν τα εναλλακτικά αυτά υποστρώματα με σημαντική συγγένεια (**Εικόνα 1.1**).

Ένα τέτοιο παράδειγμα ενζυμικής ευελιξίας αποτελεί η περίπτωση του κυτοχρώματος P450, το οποίο μπορεί να σχηματίζει μια σειρά από ενεργά κέντρα δέσμευσης μέσω διαφορετικών διαμορφώσεων που λαμβάνει, οι οποίες του επιτρέπουν να προσδένει μια πλειάδα υποστρωμάτων (Muralidhara *et al.*, 2008). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν μια συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της διαμορφωτικής ποικιλομορφίας και της πλειοτροπικότητας ως προς την εξειδίκευση. Από τις γνωστές δομές των ενεργών κέντρων του P450, η δομή CYP2A6 εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση για το υπόστρωμα ενώ η CYP3A4 είναι η δομή με τη χαμηλότερη εξειδίκευση και μεγαλύτερη πλειοτροπικότητα ως προς την αναγνώριση εναλλακτικών υποστρωμάτων (Skopalik *et al.*, 2008). Πειράματα κατευθυνόμενης μοριακής εξέλιξης (directed evolution) απέφεραν νέες ενζυμικές εξειδικεύσεις, απλά εισάγοντας μεταλλαγές σε εγγενώς ευέλικτες περιοχές των κέντρων δέσμευσης. Αυτές οι μεταλλαγές γενικά προκαλούν αποσταθεροποίηση, ευνοώντας μια αύξηση της εντροπίας και ευελιξίας των ενεργών κέντρων, έτσι ώστε νέες εξειδικεύσεις να προέλθουν από μια αρχική δομή με χαρακτηριστικά πλειοτροπικότητας και χαμηλής εξειδίκευσης. Παρομοίως, μεταλλαγές που σχεδιάστηκαν ώστε να επιλεγεί μια συγκεκριμένη εξειδίκευση, πολλές φορές επάγουν ευρεία εξειδίκευση και επιτρέπουν την αναγνώριση νέων, μη επιλεγμένων υποστρωμάτων.

Παρόλο που τα παραπάνω προτείνουν τη γενική ιδέα ότι τα πιο ευέλικτα ενεργά κέντρα είναι χαμηλής εξειδίκευσης και έχουν μεγαλύτερη εξελιξιμότητα, ο σύνδεσμος μεταξύ των ιδιοτήτων αυτών απαιτεί περισσότερη διερεύνηση.



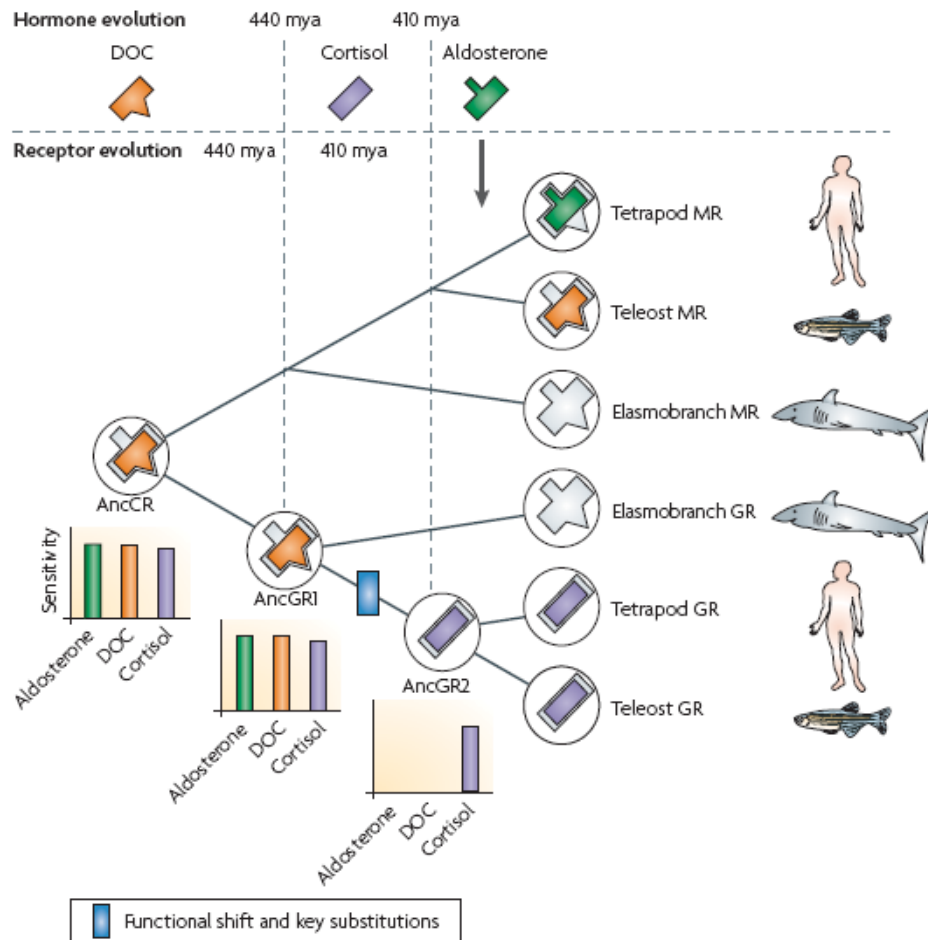
Εικόνα 1.1 Δυναμική των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξελικτικότητα των πρωτεϊνών. Το μοντέλο που παρουσιάζεται (Tokuriki and Tawfik, 2009) υποθέτει ότι οι πρωτεΐνες υπάρχουν σαν σύνολα διαμορφώσεων με κυρίαρχη την εγγενή (native) διαμόρφωση (P_N, η οποία αλληλεπιδρά με το εγγενές υπόστρωμα, L). Τα εναλλακτικά διαμορφωμερή αφορούν στις δομικές παραλλαγές, οι οποίες εκτείνονται από τις πλευρικές αλυσίδες των ισομερών και την αναδιάταξη της δομής των ενεργών κέντρων έως και ευρύτερες διαμορφωτικές μεταβάσεις. Μικρότερης συχνότητας διαμορφωμερή (π.χ. P₄) μπορούν να μεσολαβούν σε εναλλακτικές λειτουργίες όπως στη δέσμευση με χαμηλή συγγένεια του υποστρώματος L* (ενός υποστρώματος που η πρωτεΐνη δεν ήταν εξελικτικά εξειδικευμένη να μεταφέρει). Μεταλλαγές μπορούν σταδιακά να αλλάξουν αυτό το ισοζύγιο, έτσι ώστε τα πιο σπάνια διαμορφωμερή να ευνοούνται αυξάνοντας την ισχύ της δέσμευσης ενός εναλλακτικού υποστρώματος (π.χ. αύξηση της δέσμευσης του L* από το P₄). Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αυξηθεί η πλειοτροπικότητα του μεταφορέα P_N. Αντίστροφα, υψηλότερη εξειδίκευση του P_N μπορεί να επιτευχθεί με μεταλλαγές που οδηγούν σε μείωση της δέσμευσης του L* από το P₄.

Μια άλλη 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 πώς οι αλλαγές στην αλληλουχία των γονιδίων διαφοροποιούν τη λειτουργία και κατ'επέκταση τον φαινότυπό τους. Για να κατανοηθεί πλήρως αυτή η διαδικασία χρειάζεται να αναλυθεί πώς 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 (extant proteins) και συνεχίζονται με μελέτες στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και πρωτεϊνικής μηχανικής (protein engineering). Τέτοια πειράματα μπορούν να φέρουν στο φως άγνωστες πτυχές της διαφοροποίησης των πρωτεϊνικών δομών και να διαλευκάνουν σχέσεις δομής-λειτουργίας οι οποίες έχουν διαμορφωθεί κατά την εξελικτική διαδικασία.

Ωστόσο, για να ταυτοποιηθούν άμεσα 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 έχουν πλέον εκλείψει σήμερα (ancestral proteins). Μια προσέγγιση προς τη κατεύθυνση αυτή η οποία έχει εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια είναι ουσιαστικά η «αναγέννηση» (resurrection) της «αρχαίας» (προγονικής) πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και λειτουργική της ανάλυση (ancient gene resurrection; Thornton, 2004). Η διαδικασία περιλαμβάνει την εντόπιση της «αρχαίας» πρωτεΐνης μέσω αναζήτησης αλληλουχιών από υπάρχουσες πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα, από ευρείες βάσεις δεδομένων, και κατασκευή αναλυτικών φυλογενετικών δέντρων, *in vitro* σύνθεση του γονιδίου που κωδικοποιεί την «αρχαία» πρωτεΐνη, έκφρασή του σε κατάλληλα κύτταρα-«ξενιστές» και λειτουργικό χαρακτηρισμό των παραγόμενων πρωτεϊνών. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας σημειακή μεταλλαξιγένεση στην «αρχαία» πρωτεΐνη, εισάγονται μεταλλαγές οι οποίες θεωρούνται κύριας και ιστορικής σημασίας για την σταδιακή εξέλιξη της πρωτεΐνης, ώστε να οδηγηθεί σε μια νέα εξειδίκευση. Στη συνέχεια, μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός της δομής της αρχαίας πρωτεΐνης μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης, έτσι ώστε να γίνουν αντιληπτές οι διαμορφωτικές αλλαγές στα κέντρα δέσμευσης που προκαλούν οι εισαγόμενες μεταλλαγές και που οδηγούν τελικά στην εξέλιξη των κέντρων δέσμευσης και στην αναγνώριση ενός νέου υποστρώματος (αλλαγή εξειδίκευσης-νέος φαινότυπος) (Harms and Thornton, 2010).

Το πιο αναλυτικό παράδειγμα εφαρμογής της παραπάνω διαδικασίας είναι η περίπτωση του προσδιορισμού της λειτουργικής εξέλιξης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, **GR** (**Glucocorticoid Receptor**) ενός μεταγραφικού παράγοντα ελεγχόμενου από κορτιζόλη, που ρυθμίζει την απόκριση στο στρες και συναντάται στα ανώτερα σπονδυλωτά (Bridgham *et al.*, 2006; Ortlund *et al.*, 2007). Στον άνθρωπο και στα άλλα τετράποδα, η ορμόνη αλδοστερόνη ενεργοποιεί τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, **MR** (**Mineralocorticoid Receptor**), έναν ενδοκυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα που ελέγχει την ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών, ενώ στα ψάρια ο **MR** ενεργοποιείται από τη δεοξυκορτικοστερόνη **DOC** (**DeOxyCorticosterone**). Ο MR σχετίζεται με τον GR, μέσω διπλασιασμού του γονιδίου ενός «αρχαίου» υποδοχέα, του προγονικού υποδοχέα κορτικοειδών **AncCR** (**Ancestral Corticoid Receptor**), που έγινε πριν από περίπου 450 εκατομμύρια χρόνια.

Ο υποδοχέας AnCR μπορεί και αναγνωρίζει και τα τρία υποστρώματα (κορτιζόλη, αλδοστερόνη και δεοξυκορτικοστερόνη). Χρησιμοποιώντας την πειραματική προσέγγιση της «αναγέννησης» του **AncCR**, διαπιστώθηκε ότι χρειάστηκαν κάποιες καίριες μεταλλαγές έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν οι εξειδικεύσεις για τα υποστρώματα αλδοστερόνη και δεοξυκορτικοστερόνη του υποδοχέα **MR** και κορτιζόλη του υποδοχέα **GR** (Dean and Thornton, 2007) (**Εικόνα 1.2**).



Εικόνα 1.2 Εξέλιξη της εξειδίκευσης των υποδοχέων κορτικοστεροειδών. Χρονοδιάγραμμα της εξέλιξης των υποδοχέων για τις τρεις δομικά παρόμοιες στεροειδείς ορμόνες. Η δεοξυκορτικοστερόνη (DOC) είναι η αρχαία ορμόνη των σπονδυλωτών, ενώ η αλδοστερόνη εξελίχθηκε πολύ αργότερα γενεαλογικά στα σπονδυλωτά (στο σχήμα σημειώνεται με μαύρο βέλος). Οι νεώτεροι εξελικτικά υποδοχείς αλατοκορτικοειδών MRs μπορούν να ενεργοποιηθούν από αλδοστερόνη, DOC και σε ένα μικρότερο βαθμό από κορτιζόλη. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, GR, ενεργοποιείται μόνο από κορτιζόλη στα σπονδυλωτά με οστέινο σκελετό (bony vertebrates). Ο «αναγεννημένος» προγονικός υποδοχέας των κορτικοστεροειδών, AncCR, εμφανίζει παρόμοια ευαισθησία με τον υποδοχέα MR και στις τρεις ορμόνες. Η τεχνική της *in vitro* εξέλιξης χρησιμοποιήθηκε και για την «αναγέννηση» δύο νεώτερων προγόνων του GR υποδοχέα, των AncGR1 και AncGR2, από τη μελέτη των οποίων φαίνεται ότι η εξειδίκευση του GR για την κορτιζόλη εξελίχθηκε από μεταλλαγές στο μεσοδιάστημα της εξελικτικής απόστασης των AncGR1 και AncGR2 (στο σχήμα σημειώνεται με μπλέ ορθογώνιο). Οι προσεγγιστικές χρονολογήσεις από τα αρχεία των απολιθωμάτων σημειώνονται σαν εκατομμύρια χρόνια πριν (million years ago, mya).

Η παραπάνω πειραματική προσέγγιση βοήθησε στην κατανόηση των μηχανισμών της ιστορικής εξέλιξης των πρωτεϊνικών μορίων και ανέδειξε τον ρόλο της μοριακής επίστασης μεταξύ διαφορετικών μεταλλαγών του ίδιου μορίου (conformational epistasis) στη διαδικασία αυτή (Ortlund *et al.*, 2007). Σε γενικές γραμμές, η εξειδίκευση του ενεργού κέντρου μιας πρωτεΐνης εξελίσσεται μέσω «επιτρεπτικών» (permissive) υποκαταστάσεων που σταθεροποιούν τη δομή της πρωτεΐνης, επιτρέποντάς της έτσι να δεχτεί άλλες, μεταγενέστερες «κομβικής σημασίας» μεταλλαγές που θα οδηγήσουν σε μια νέα λειτουργία. Οι κομβικής σημασίας μεταλλαγές, ωστόσο, θα δρούσαν ως «αποσταθεροποιητικές» της πρωτεϊνικής δομής αν είχαν εισαχθεί στο μόριο πριν από την εμφάνιση των επιτρεπτικών μεταλλαγών, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία του φαινομένου της επίστασης, δηλ. ότι οι ίδιες μεταλλαγές μπορούν να έχουν εντελώς διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα αν εισαχθούν σε λίγο διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο (Bridgham *et al.*, 2009).

Τα διδάγματα από τις μελέτες μοριακής εξέλιξης που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι πολύ χρήσιμα κατά τον σχεδιασμό και την ερμηνεία των πειραμάτων *in vitro* μεταλλαξιγένεσης που αποτελούν βασικό εργαλείο για την κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας μεγάλων και εξελικτικά συντηρημένων ταξινομικών ομάδων πρωτεϊνών, όπως αυτές που εξετάζονται στην παρούσα διατριβή.

1.2 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς

1.2.1 Ταξινόμηση των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς

Στην πλασματική μεμβράνη ενός κυττάρου εντοπίζονται εξειδικευμένες δίοδοι και αντλίες που αποτελούν οργανωμένα πρωτεϊνικά συστήματα και συγκροτούνται από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ανάλογα με τον τρόπο που συνδέονται με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα διακρίνονται σε περιφερικές ή ενσωματωμένες.

Οι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες εμφανίζουν έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα και ένα ή περισσότερα τμήματά τους εισχωρούν εντός της μεμβράνης όπου συγκρατούνται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα οι περιφερικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν έμμεσα είτε με τα υδρόφιλα τμήματα των άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών είτε με τις υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων, χωρίς να εισχωρούν στο υδρόφοβο περιβάλλον της μεμβράνης (White and Wimley, 1999; Fiedler et al., 2010).

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

Η συστηματική ανάλυση των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτικών αλλά και των προκαρυωτικών οργανισμών, αποκαλύπτει ότι περίπου 30% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων τους, είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος από αυτές τις πρωτεΐνες (5-15% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων, ανάλογα με το είδος οργανισμού) είναι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Markowitz *et al.*, 2008; <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>) (Ren *et al.*, 2004; <http://www.membranetransport.org>).

Η μεταφορά μορίων, απλών οργανικών ενώσεων και ιόντων, αποτελεί τη βάση της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος. Την ανάγκη ακριβώς της πρόσληψης και ανακατανομής στον οργανισμό μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, νουκλεοτιδικές βάσεις, ιόντα, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές κ.ά, εξασφαλίζουν πολλοί διαφορετικοί εξειδικευμένοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς. Οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών διασφαλίζουν την αξιοποίηση των θρεπτικών πηγών άνθρακα, αζώτου, θείου, φωσφόρου, τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης μεταβολιτών, τον έλεγχο της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης, του pH και των συνθηκών λειτουργίας ενζυμικών ή άλλων μηχανισμών του κυττάρου, τη ρύθμιση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος και του κύκλου λειτουργίας των νευροδιαβιβαστών, των ορμονών και άλλων διακυτταρικών σημάτων και την άμυνα του οργανισμού μέσω της ενεργού εκροής φαρμάκων, αντιβιοτικών, αντιϊκών παραγόντων και τοξινών ή, τέλος, ρύθμιση της ανακατανομής αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι το ασκορβικό και το ουρικό οξύ (Hediger, 2000).

1.2.2 Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς

Για τις πρωτεΐνες μεταφοράς έχει ήδη καθιερωθεί ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας (Transport Commission, TC system, 1999) (<http://www.tcdb.org>) (Saier, 2000; Busch and Saier 2002; Chang *et al.*, 2004; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009). Σύμφωνα λοιπόν με αυτό το σύστημα (**Εικόνα 1.3**), οι πρωτεΐνες μεταφοράς ταξινομούνται σε **διαύλους** (channels) (**TC1**) και σε **μεταφορείς** (carriers) (**TC2, TC3, TC4**), ενώ κατατάσσονται σε ξεχωριστές κατηγορίες οι μεταφορείς που συμμετέχουν στα συστήματα ροής ηλεκτρονίων (ETS), όπως στην αναπνευστική αλυσίδα (**TC5**), πρωτεΐνες που λειτουργούν σε συνεργασία με άλλους, γνωστούς μεταφορείς (**TC8**) και πιθανοί μεταφορείς που δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (**TC9**).

Στην κατηγορία των διαύλων (**TC1**) κατατάσσονται οι πρωτεΐνες που επιτελούν διευκολυνόμενη διάχυση, δηλαδή δεν συσσωρεύουν αλλά απλώς εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις ιόντων ή μικρομορίων εκατέρωθεν της μεμβράνης (equilibrative transport) [π.χ. ο διάυλος K^+ (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2003)]. Η λειτουργία τους είναι απλή, εναλλάσσοντας μια ανοιχτή διαμόρφωση (open conformation) και μια κλειστή διαμόρφωση (closed conformation). Η εναλλαγή μεταξύ ανοιχτής και κλειστής διαμόρφωσης επιτυγχάνεται με ανταπόκριση είτε σε

ειδικά χημικά σήματα (ligand gating) είτε στη διαφορά δυναμικού της μεμβράνης (voltage gating).

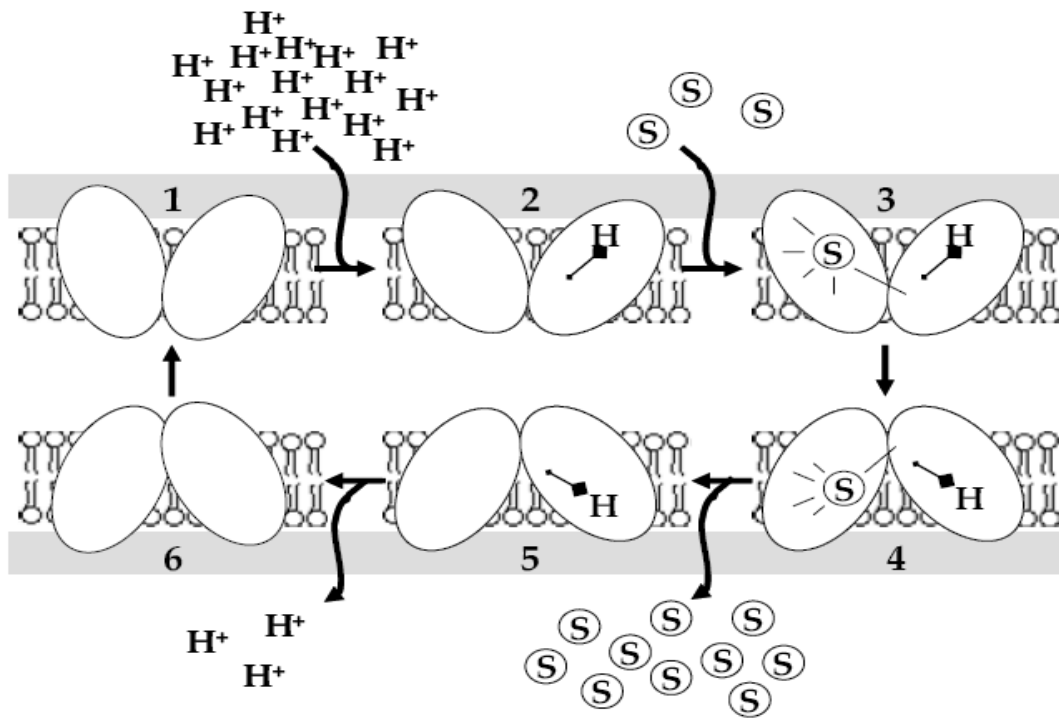
Στην κατηγορία των μεταφορέων (**TC2, TC3, TC4**) κατατάσσονται οι πρωτεΐνες που επιτελούν **ενεργό μεταφορά**, δηλαδή επιτρέπουν «ασύμμετρη» συσσώρευση ιόντων ή μικρομορίων, προς τη μία πλευρά της μεμβράνης, ακόμη και ενάντια στην διαβάθμιση συγκεντρώσεών τους (concentrative transport), και έχουν μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων (**Εικόνα 1.4**) (Saier *et al.*, 2000). Για να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς, είναι απαραίτητη η αξιοποίηση μιας μορφής ενέργειας για την μεταφορά ενός υποστρώματος από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Η ενέργεια αυτή μπορεί να προέρχεται είτε από μία «πρωτογενή» πηγή, όπως είναι το ATP, οπότε οι μεταφορείς ονομάζονται πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς **πρωτογενούς τύπου (Primary-TC3 active transporters** [π.χ. η αντλία καλίου-νατρίου ή $K^+, Na^+ / ATPase$ (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009)] είτε, έμμεσα, από μια «δευτερογενή» πηγή ενέργειας (ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων), έτσι, μιλάμε για πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς **δευτερογενούς τύπου, [Secondary-TC2 active transporters**, π.χ. ο μεταφορέας λακτόζης LacY (Newman *et al.*, 1981; Viitanen *et al.*, 1986; Abramson *et al.*, 2003; Guan and Kaback, 2006)].

Η κατηγορία των μεταφορέων δευτερογενούς τύπου περιλαμβάνει **μονομεταφορείς** [uniporters, π.χ. μονομεταφορέας γλυκερόλης GlpF της *E. coli* (Sweet *et al.*, 1990) και οι μονομεταφορείς γλυκόζης GLUT1-13 (Joost and Thorens, 2000; Zhao and Keating, 2007)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ενός μόνο είδους μορίου διαμέσου της μεμβράνης, ανεξάρτητα από την κίνηση άλλων ειδών μορίων, επιτελώντας διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion), **συμμεταφορείς** (symporters, π.χ. συμμεταφορέας γλυκόζης: νατρίου, hSGLT1 (Huntley *et al.*, 2006; Faham *et al.*, 2008)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς την ίδια κατεύθυνση, και **αντιμεταφορείς** [antiporters, π.χ. αντιμεταφορέας ATP/ADP του βοός, (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003)], που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς διαμετρικά αντίθετες κατευθύνσεις. Πολλοί μεταφορείς μπορούν να καταλύουν περισσότερες από μια αντιδράσεις (δηλ. συμμεταφορά και αντιμεταφορά), καθώς επίσης και σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να μετατρέψουν συμμεταφορείς σε αντιμεταφορείς ή μονομεταφορείς (Franco and Brooker, 1994; Lolkema and Poolman; 1995; Schroers *et al.*, 1997).

Υπάρχει τέλος και μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς που εντοπίζονται μόνο στα βακτήρια (Barabote and Saier, 2005) και ονομάζονται μεταφορείς ομάδας (**TC4, group translocators**). Η ομάδα αυτή των μεταφορέων, τροποποιούν τα υποστρώματά τους κατά τη διαμεμβρανική μεταφορά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, το σύστημα φωσφοτρανσφεράσης (PTS) της γλυκόζης που χρησιμοποιεί η *E. coli* σαν βασικό μηχανισμό πρόσληψης γλυκόζης και τροποποιεί το υπόστρωμα με φωσφορυλίωση κατά τη μεταφορά, ώστε να δεσμεύεται εξωκυτταρικά γλυκόζη αλλά στο κυτταρόπλασμα να αποδίδεται 6-φωσφορική γλυκόζη, σε μια διαδικασία που εξαρτάται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) (Tchieu *et al.*, 2001; Saier *et al.*, 2005) και ρυθμίζεται, σε πρωτεωμικό επίπεδο, από την αλληλεπίδραση με την κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή της περμεάσης λακτόζης LacY (Seok *et al.*, 1997; Sondej *et al.*, 1999; Sondej *et al.*, 2002; Cochu *et al.*, 2005).



Εικόνα 1.3: Ταξινομικές ομάδες των πρωτεϊνών μεταφοράς με βάση το διεθνές σύστημα ταξινόμησης και ονοματολογίας TC (<http://www.tcdb.org>)



Εικόνα 1.4: Μηχανισμός ενεργού μεταφοράς. Έξι στάδια διαμορφωτικών αλλαγών ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα που εκτελεί ενεργό μεταφορά, εξαρτώμενη από τη διαβάθμιση πρωτονίων (S, υπόστρωμα, H^+ , πρωτόνιο)

1.3 Δομικές-κρυσταλλογραφικές μελέτες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς

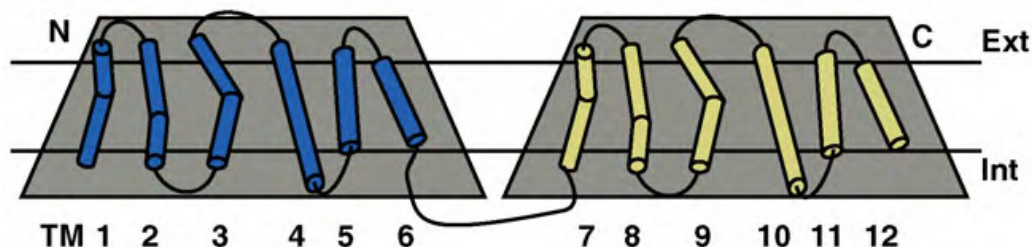
Παρά τη σπουδαιότητα που έχουν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες για τα βιολογικά συστήματα, λίγες σχετικά είναι οι πρωτεΐνες μεταφοράς και γενικά οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Οι περιπτώσεις όπου γνωρίζουμε αναλυτικά το ενεργό κέντρο, τις σημαντικές θέσεις αμινοξέων, τη δυναμική των δυναμικών διαμορφώσεων και το μηχανισμό λειτουργίας τέτοιων πρωτεϊνών είναι ελάχιστες. Η απομόνωση και καθαρισμός των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς αποτελεί ένα σημείο-κλειδί για τη μελέτη τους. Οι δυσκολίες, όμως, που υπάρχουν για την απομόνωση ενός μεταφορέα σε μεγάλη κλίμακα και, κατ' επέκταση, τη διατήρηση της δομής του σε διαλυτή μορφή είναι πολλές και οφείλονται κυρίως στην πολυπλοκότητα της οργάνωσης αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες, καταρχήν, θα πρέπει να εξαχθούν από τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα χωρίς να αποδιαταχθεί η υδροφοβική και αμφιπαθική τους φύση.

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

1. Δομές που το κέντρο δέσμευσής τους ακολουθεί το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του «**διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων**» (rocker switch)
2. Δομές που το κέντρο δέσμευσής τους ακολουθεί το δομικό-μηχανιστικό πρότυπο της «**ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος**» (gated porter)

1.3.1 Δομές ενεργών κέντρων δέσμευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων

Με βάση τις μέχρι τώρα λυθείσες δομές από την οικογένεια MFS προτείνεται ένας γενικός μηχανισμός μεταφοράς. Το κοινό γνώρισμα των δομών αυτών είναι η ύπαρξη δύο διακριτών δομικών περιοχών (domains), που αντιστοιχούν σε δύο δέσμες των έξι διαμεμβρανικών α-ελίκων, μία **N-τελική** και μία **C-τελική** (six-helix bundles, **N6** και **C6**) (**Εικόνα 1.5**-Παράδειγμα του μεταφορέα LacY): οι δύο αυτές περιοχές (N6 και C6 domains), παρά τον χαμηλό βαθμό ομολογίας στις αλληλουχίες τους, εμφανίζουν μεταξύ τους μια ψευδοσυμμετρία, που είναι ένδειξη εξέλιξης μέσω ενδομοριακού αναδιπλασιασμού (Saier, 2000; Poolman *et al.*, 2007). Οι δύο δομικά ομόλογες περιοχές (N6-C6) σχηματίζουν μια κοιλότητα (κέντρο δέσμευσης) και τα κατάλοιπα που δεσμεύουν το υπόστρωμα βρίσκονται στο βάση της κοιλότητας αυτής περίπου στο μέσο του μορίου. Η δέσμευση του υποστρώματος επάγει και τις κυριότερες διαμορφωτικές αλλαγές. Η κοιλότητα με το δεσμευμένο υπόστρωμα «κλείνει» από την περιπλαστική πλευρά και ταυτόχρονα ανοίγει από την κυτταροπλασματική πλευρά μέσω της δυναμικής κίνησης των N6 και C6 περιοχών, επιτρέποντας την εναλλασσόμενη πρόσβαση και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης (Kaback *et al.*, 2011). Αυτός ο μηχανισμός μεταφοράς είναι χαρακτηριστικός για την οικογένεια MFS, η οποία καλύπτει περίπου το 25% των πρωτεϊνών δευτερογενούς τύπου και αναφέρεται ως μοτίβο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων (rocker switch) για να τονιστούν οι απότομες αλλαγές διαμόρφωσης που φαίνεται να συμβαίνουν.



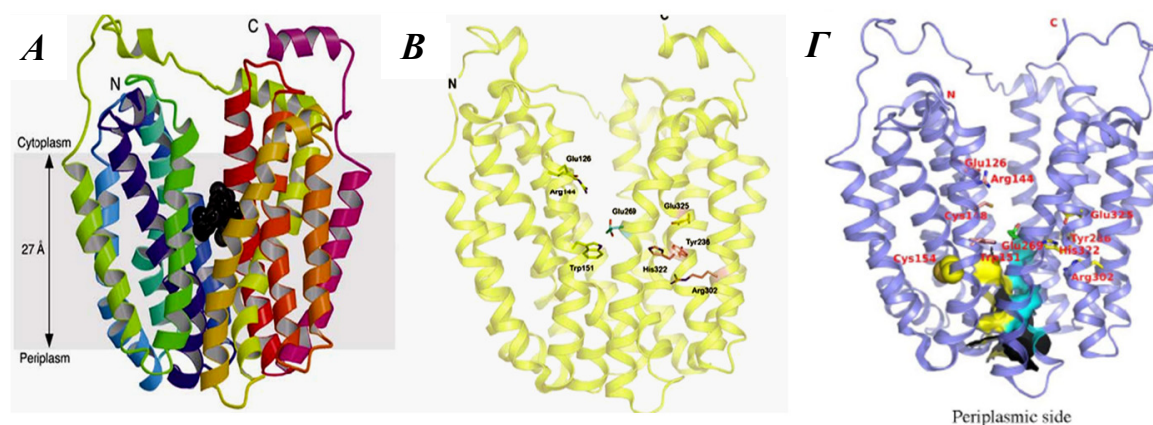
Εικόνα 1.5 Δευτεροταγής δομή της LacY που αποτελεί μοντέλο για όλους τους μεταφορείς της οικογένειας MFS. Στην εικόνα φαίνονται οι δομικές επαναλήψεις των 6 TM (Boudker *et al.*, 2010).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά, μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές λυθείσες δομές με εκτενή περιγραφή των κέντρων δέσμευσης, που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό πρότυπο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων.

Μεταφορέας λακτόζης LacY

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταφορέα που ακολουθεί το μοτίβο αυτής της κατηγορίας αποτελεί ο μεταφορέας λακτόζης LacY, δομικό πρότυπο για τη Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (MFS) αλλά και για άλλες πρωτεΐνες με μικρότερη συγγένεια αλληλουχίας (Abramson *et al.*, 2004). Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα LacY λύθηκε πρόσφατα σε ευκρίνεια ανάλυσης 3.5 Å (Abramson *et al.*, 2003). Η πρώτη δομή που λύθηκε ήταν παρουσία υποστρώματος (β-D-γαλακτοπυρανοσυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο, TDG) και χρησιμοποιώντας τη μεταλλαγμένη μορφή LacY-C154G (Abramson *et al.*, 2003). Ακολούθησε αργότερα, και η δημοσίευση της δομής του φυσικού τύπου LacY (Guan *et al.*, 2007). Στην πρώτη περίπτωση, επιλέχθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του μεταφορέα (C154G) για την οποία μοριακές βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες είχαν δείξει ότι έχει την ικανότητα δέσμευσης υποστρώματος (λακτόζη ή άλλο γαλακτοσίδιο) με υψηλή συγγένεια, αλλά έχει αμελητέα ικανότητα μεταφοράς. Επίσης, δεν υπόκειται σε σημαντικές αλλαγές διαμόρφωσης κατά τη δέσμευση του υποστρώματος και έχει υψηλή θερμοσταθερότητα και μικρή τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων (Smirnova and Kaback., 2003). Σε όψη παράλληλη προς τη μεμβράνη, η πρωτεΐνη εμφανίζει μια εσωτερική υδρόφιλη κοιλότητα ανοιχτή προς την κυτταροπλασματική πλευρά, όπου είναι συνδεδεμένο το υπόστρωμα (TDG): αυτό το «κέντρο» δέσμευσης υποστρώματος σχηματίζεται ουσιαστικά μεταξύ των δύο δομικά ομόλογων περιοχών N6 και C6 (Abramson *et al.*, 2003) (**Εικόνα 1.6Α**). Τα ίδια γενικά δομικά στοιχεία εμφανίζει και η κρυσταλλική δομή του φυσικού τύπου LacY (ευκρίνεια ανάλυσης 3.6 Å) (Guan *et al.*, 2007) (**Εικόνα 1.6Γ**), καθώς και η κρυσταλλική δομή του LacY-C154G απουσία υποστρώματος, που δόθηκε σε δύο διαφορετικά pH, 6.5 και 5.6, σε ευκρίνειες ανάλυσης 2.95 Å και 3.3 Å, αντίστοιχα (Mirza *et al.*, 2006) (**Εικόνα 1.6Β**). Παρά ταύτα, οι διαφορετικές αυτές κρυσταλλογραφικές δομές δίνουν και άλλες σημαντικές λεπτομέρειες στην διαμόρφωση του μορίου που ερμηνεύουν (α) την προσαρμογή της διαμόρφωσης γύρω από το ενεργό κέντρο (έλικες IV, V και VIII)

κατά την δέσμευση υποστρώματος (induced fit) (Mirza *et al.*, 2006) και (β) τον «φαινότυπο» του ανενεργού μεταλλάγματος C154G, το οποίο δεσμεύει αλλά δεν μεταφέρει το υπόστρωμα, γιατί δεν μπορεί να επιτευχθούν οι κατάλληλες αλλαγές διαμόρφωσης που απαιτεί ο μηχανισμός (Kaback *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2007).



Εικόνα 1.6 Α: Η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα LacY μαζί με υπόστρωμα (TDG), σε όψη παράλληλη προς την μεμβράνη (Abramson *et al.*, 2003). Οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες φαίνονται με διαφορετικό χρώμα η κάθε μια. Το υπόστρωμα TDG φαίνεται προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (με μαύρο χρώμα) το οποίο είναι ανοικτό προς την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.

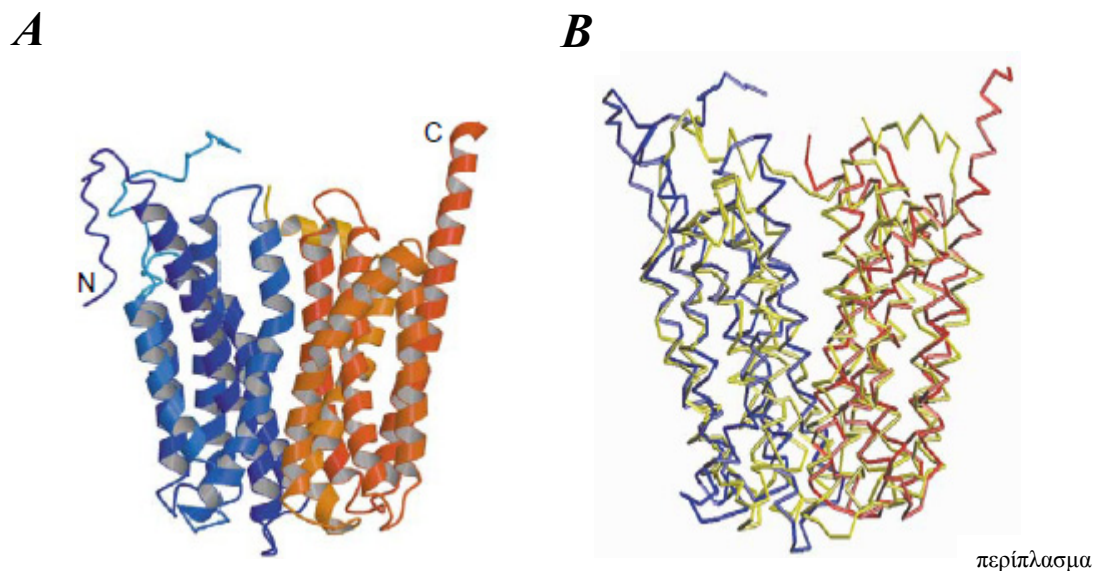
Β: Η κρυσταλλική δομή του μεταλλαγμένου μεταφορέα LacY (C154G) χωρίς συνδεδεμένο υπόστρωμα, σε όψη παράλληλη προς την μεμβράνη (Mirza *et al.*, 2006). Οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες εμφανίζονται και πάλι οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές. Μεταξύ της αμινοτελικής και καρβοξυ-τελικής περιοχής α-ελίκων, δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα.

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

Μεταφορέας GlpT

Πρόσφατα, στο ίδιο τεύχος του περιοδικού *Science* που δημοσίευσε την δομή της LacY (Abramson *et al.*, 2003), δημοσιεύθηκε και η κρυσταλλική δομή (σε ευκρίνεια 3.3 Å) του αντιμεταφορέα τριφωσφορικής γλυκερόλης/ανόργανου φωσφόρου GlpT της *E. coli* (Huang *et al.*, 2003), ενός ακόμη μέλους της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (MFS) (Saier, 2000). Η κρυσταλλική αυτή δομή (**Εικόνα 1.7Α**) αφορά μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα και παρουσιάζει δύο δομικά παρόμοιες περιοχές (domains) που συνδέονται μεταξύ τους με ένα μεγάλο υδρόφιλο συνδετικό τμήμα. Οι δύο περιοχές παρουσιάζουν συμμετρία και αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα

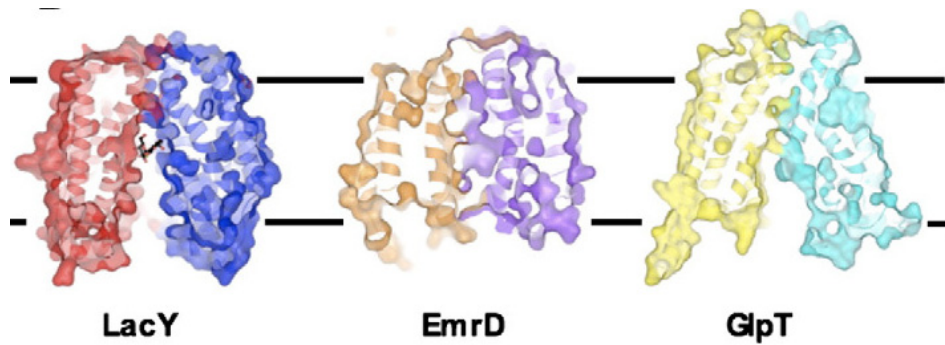
α-ελίκων η κάθε μία, όπως ακριβώς και στην LacY (Abramson *et al.*, 2003) (**Εικόνα 1.7B**). Στο κέντρο των περιοχών αυτών δημιουργείται το ενεργό κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Συνολικά, η δομή της GlpT είναι πολύ παρόμοια με αυτήν της LacY που ανήκει στην ίδια υπεροικογένεια (Abramson *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2004).



Εικόνα 1.7 **A.** Μεταφορέας GlpT της *E. coli* (Lemieux *et al.*, 2004): Οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες εμφανίζονται και πάλι οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές. Μεταξύ της N--τελικής (μπλε χρώμα) και C-τελικής περιοχής α-ελίκων (κόκκινο χρώμα), δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα, όπως και για την περμεάση της λακτόζης. **B.** Σύγκριση των δομών της LacY (κίτρινο χρώμα) και του GlpT (μπλε και κόκκινο χρώμα, για το N-τελικό και το C-τελικό άκρο αντίστοιχα).

Μεταφορέας EmrD

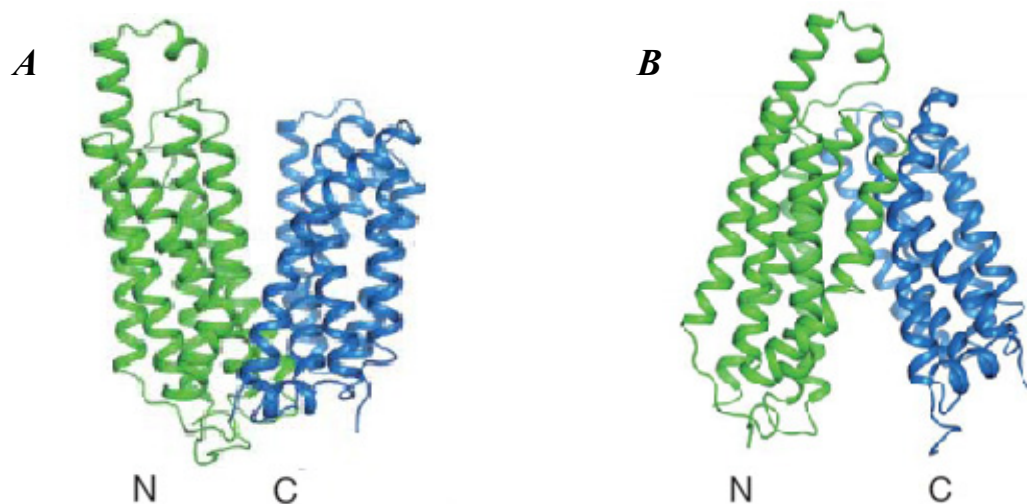
Στο περιοδικό Science, δημοσιεύτηκε η δομή του μεταφορέα EmrD, ο οποίος ανήκει και αυτός στην MFS. Ο EmrD είναι αντιμεταφορέας φαρμάκων: H^+ , βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη στην *E.coli* και επιτρέπει την εκροή μιας ποικιλίας αμφιπαθικών ενώσεων. Η λυθείσα δομή είναι σε ευκρίνεια 3.5 Å και δείχνει μια πρωτεΐνη ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. Σχηματίζει όπως και οι άλλες γνωστές δομές την ίδια κεντρική κοιλότητα, η οποία όμως περιέχει υδρόφοβα κατάλοιπα (**Εικόνα 1.8**). Η φύση των καταλοίπων έρχεται σε συμφωνία με το είδος των μεταφερόμενων υποστρωμάτων.



Εικόνα 1.8 Σύγκριση των δομών των μεταφορέων LacY, EmrD και GlpT της *E. coli*. Οι ψευδοσυμμετρικές δομικές περιοχές του κάθε μεταφορέα σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα (από Forrest *et al.*, 2011).

Μεταφορέας FucB

Η κρυσταλλική δομή του συμμεταφορέα L-φουκόζης:H⁺, λύθηκε πρόσφατα σε ευκρίνεια 3.1 Å (Dang *et al.*, 2010). Η νέα δομή συμπληρώνει τη γενική εικόνα για τη δομή των μεταφορέων που ανήκουν στην MFS, καθώς δείχνει μια πρωτεΐνη ανοιχτή προς το εξωτερικό του κυττάρου εν αντιθέσει με τις προηγούμενες δομές που δείχνουν τις πρωτεΐνες ανοιχτές προς το κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 1.9A**). Για τη δομή που δείχνει την πρωτεΐνη ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα πραγματοποιήθηκε μοντελοποίηση με το μεταφορέα LacY (Dang *et al.*, 2010) (**Εικόνα 1.9B**). Ο συνδυασμός της λυθείσας δομής και των προηγούμενων βιοχημικών και βιοφυσικών δεδομένων αποσαφήνισε το ενεργό κέντρο του μορίου, όπου φαίνεται να σχηματίζεται μια ευλύγιστη υδρόφιλη περιοχή με τη συμμετοχή των ελίκων 7 και 8, η οποία επιτρέπει στον μεταφορέα την περιστροφή των ψευδοσυμμετρικών περιοχών του ώστε να πάρει τις δύο διαμορφώσεις του (κυτταροπλασματική-περιπλασματική) (Dang *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.9 **A.** Μεταφορέας FucB της *E. coli* (Dang *et al.*, 2010), όπου εμφανίζονται και πάλι οι δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές, με διαμόρφωση ανοιχτή προς το περίπλασμα αυτήν τη φορά. **B.** Μεταφορέας FucB, σε διαμόρφωση ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα έπειτα από μοντελοποίηση με το μεταφορέα LacY (Dang *et al.*, 2010).

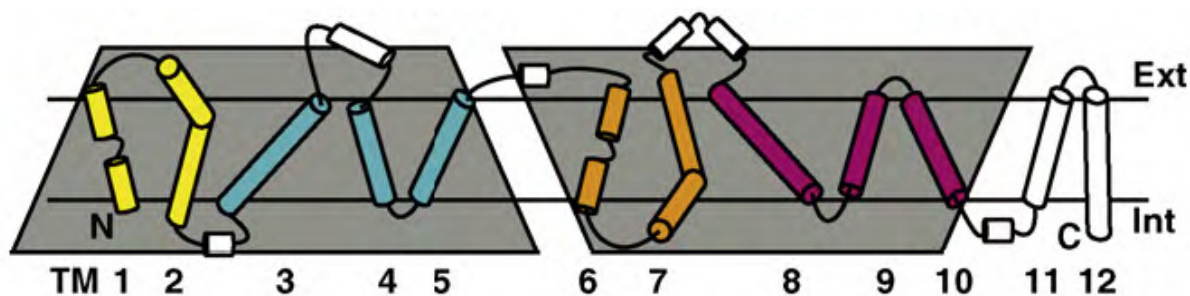
Με το ίδιο δομικό-μηχανιστικό μοτίβο μοντελοποιούνται και άλλες πρωτεΐνες, λιγότερο συγγενικές, όπως ο μεταφορέας μελιβιόζης της *E. coli* MelB (Yousef and Guan, 2009) καθώς και οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας ENT που μεταφέρουν το υπόστρωμά τους με διευκολυνόμενη διάχυση και όχι με ενεργό μεταφορά (Parageorgiou *et al.*, 2008; Valdes *et al.*, 2009).

1.3.2 Δομές ενεργών κέντρων δέσμευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου του υποστρώματος

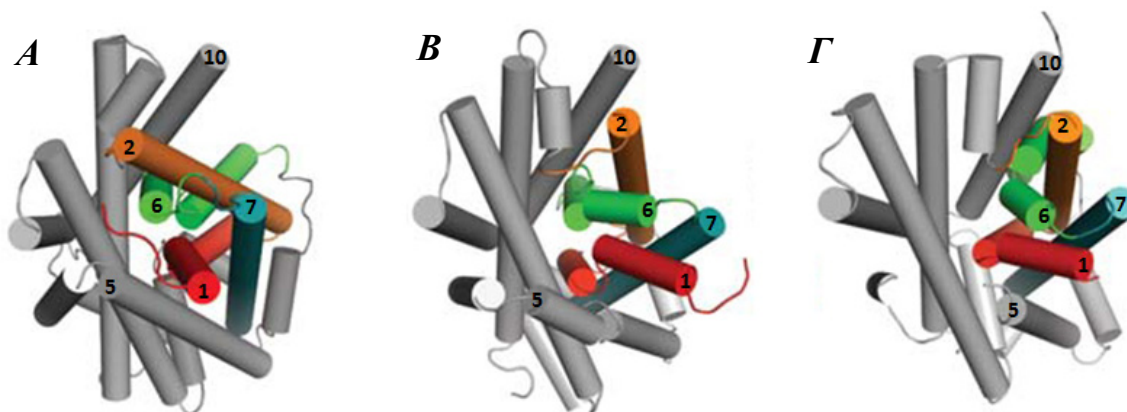
Μέχρι σήμερα έχουν αναλυθεί αρκετές δομές πρωτεϊνών δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς, από πολύ διαφορετικά συστήματα, που όμως ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό πρότυπο της ελεγχόμενης εισόδου – εξόδου υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, μέλη της υπεροικογένειας NSS (μεταφορείς σεροτονίνης, ντοπαμίνης, νορεδρεναλίνης) (Yamashita *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008; Faham *et al.*, 2008; Forrest *et al.*, 2008) APC (μεταφορείς αμινοξέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων) (Gao *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Shaffer *et al.*, 2009), της οικογένειας NCS1 (μεταφορείς κυτοσίνης-ουρακίλης-θειαμίνης-αλλαντοΐνης) (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010), ή της οικογένειας BTT (μεταφορείς βηταΐνης-χολίνης-

καρνιτίνης) (Ressl et al., 2009), μοιράζονται το παραπάνω δομικό-μηχανιστικό μοτίβο. Οι δομές αυτές σε συνδυασμό με βιοχημικά δεδομένα, έχουν οδηγήσει σε μια αρκετά καλή κατανόηση του γενικού μηχανισμού μεταφοράς.

Όλες αυτές οι πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το συνολικό αριθμό των ελίκων τους, έχουν 2 ψευδοσυμμετρικές μονάδες των 5 διαμεμβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM1-TM5 και TM6-TM10, αρίθμηση από τον πιο καλά μελετημένο μεταφορέα που ακολουθεί αυτό το δομικό-μηχανιστικό πρότυπο, LeuT), οι οποίες μεταξύ τους σχηματίζουν το κέντρο δέσμευσης και το μονοπάτι μεταφοράς (**Εικόνα 1.10**). Οι έλικες 1, 2 και 6 και 7 σχηματίζουν μια δομή η οποία είναι σημαντική για τη δέσμευση του υποστρώματος, η οποία είναι και αυτή που περιστρέφεται κατά τη μεταφορά (rocking bundle), έναντι των ελίκων 3, 4 και 8, 9 οι οποίες σχηματίζουν 2 διασταυρούμενα μοτίβα V φτιάχνοντας ένα σύμβολο δίσωσης (#) τα οποία κινούνται ελάχιστα κατά τη μεταφορά (scaffold). Ακόμη 2 έλικες, οι 5 και 10, οι οποίες συνδέουν τα δύο μέρη μεταξύ τους, είναι ευλύγιστες και μια κάμψη στο μέσο τους επιτρέπει την εναλλασσόμενη πρόσβαση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης κατά τη μεταφορά (**Εικόνα 1.11**). Επίσης συγκεκριμένα κατάλοιπα έχουν καίρια σημασία για την εξειδίκευση της μεταφοράς καθώς λειτουργούν ως πύλες, επιτρέποντας μόνο τα κατάλληλα κάθε φορά υποστρώματα να εισέλθουν στην κοιλότητα μεταφοράς (Forrest et al., 2008, 2009, 2010).



Εικόνα 1.10 Σχηματική απεικόνιση δευτεροταγούς δομής και τοπολογική οργάνωση του LeuT_{Aas}, όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρία των δύο τμημάτων (TMs 1-5 και TMs 6-10) και που αποτελεί γενικό μοντέλο για όλους τους μεταφορείς που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό μοτίβο της ελεγχόμενης εισόδου-εξόδου υποστρώματος (Boudker et al., 2010).



Εικόνα 1.11 **A.** Κρυσταλλογραφική δομή του LeuT ανοιχτή προς το εξωτερικό. **B.** Μοντελοποιημένη δομή του LeuT ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. **Γ.** Κρυσταλλογραφική δομή του vSGLT ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα η οποία συμπίπτει με την προβλεπόμενη από τη μοντελοποίηση του LeuT δομή (Forrest *et al.*, 2009).

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά, μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές λυθείσες δομές που ακολουθούν το δομικό-μηχανιστικό πρότυπο της ελεγχόμενης εισόδου – εξόδου υποστρώματος.

Μεταφορέας LeuT_{Aa}

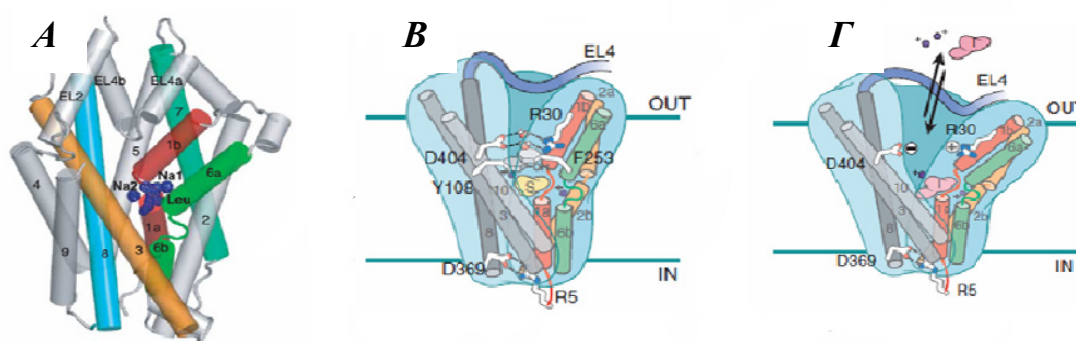
Πρόκειται για την κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα δευτερογενούς τύπου, της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών/νατρίου (NSS). Οι μεταφορείς NSS στον άνθρωπο, με πιο γνωστό και χαρακτηριστικό παράδειγμα τον μεταφορέα σεροτονίνης SERT, τερματίζουν την μετάδοση σήματος στη νευρική σύναψη χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικές διαβαθμίσεις, με τις οποίες επιτρέπουν την επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών από τη σύναψη στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων και της νευρογλοίας. Οι μεταφορείς αυτοί αποτελούν στόχους πολλών θεραπευτικών και ψυχοτρόπων ουσιών, ενώ η δυσλειτουργία τους έχει συσχετισθεί με πολλές ασθένειες του νευρικού συστήματος. Η πρώτη κρυσταλλική δομή που λύθηκε για έναν μεταφορέα NSS, το 2005, και μάλιστα σε εξαιρετικά υψηλή ευκρίνεια (1.9 Å), ασυνήθιστη για πρωτεΐνες αυτού του τύπου, αφορά ένα βακτηριακό ομόλογο από το θερμοφίλο βακτήριο *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}): η δομή δείχνει μια διαμόρφωση του μεταφορέα που φέρει συνδεδεμένο ένα μόριο υποστρώματος (λευκίνης) και δύο ιόντα νατρίου (Yamashita *et al.*, 2005) (**Εικόνα**

1.12). Πιο πρόσφατα, παρουσιάστηκαν και άλλες κρυσταλλικές δομές του ίδιου ομολόγου (LeuT_{Aa}), που είχαν λυθεί παρουσία των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (TCAs) χλομιπραμίνης (chlomipramine) (Singh *et al.*, 2007) ή δεσιπραμίνης (desipramine) (Zhou, Z., *et al.*, 2007), αναλόγων της ιμιπραμίνης (imipramine), τα οποία φαίνονται να δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις από ό,τι το υπόστρωμα (Singh *et al.*, 2007) και, ακόμη πιο πρόσφατα, λύθηκαν τρεις αντίστοιχες δομές του LeuT_{Aa} παρουσία των φαρμάκων σετραλίνης (sertraline), R-φλουοξετίνης ή S-φλουοξετίνης (fluoxetine) (Prozac), που ανήκουν στην κατηγορία των επιλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs) (Zhou *et al.*, 2009): η φυσιολογική σημασία των νεότερων αυτών δομών είναι εντόνως αμφισβητούμενη γιατί τα φάρμακα που δεσμεύονται και αναστέλλουν τους ομόλογους μεταφορείς νευροδιαβιβαστών στον άνθρωπο, όπως π.χ. τον hSERT (Tavoulari *et al.*, 2009), δεν αναμένεται να έχουν κάποιον αντίστοιχο ρόλο στα βακτηριακά συστήματα μεταφορέων (Rudnick, 2007)

Παρατηρώντας και τις 6 ανωτέρω κρυσταλλικές δομές του μεταφορέα LeuT_{Aa} βλέπουμε την ίδια γενική εικόνα. Ο πυρήνας της πρωτεΐνης αποτελείται από τα δέκα πρώτα διαμεμβρανικά τμήματα, με την περιοχή των τμημάτων 6-10 να εμφανίζει ψευδοσυμμετρία προς αυτήν των 1-5 μέσω ενός υποθετικού άξονα συμμετρίας στο επίπεδο της μεμβράνης και, μάλιστα, σε ανεστραμμένη διεύθυνση (inverted repeat) (**Εικόνα 1.10**) (Forrest *et al.*, 2008). Το υπόστρωμα και τα δύο ιόντα νατρίου εμφανίζονται προσδεδεμένα εντός του πυρήνα (core) της πρωτεΐνης, στο μέσον της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, σε μια αποκλεισμένη θέση δέσμευσης όπου απουσιάζουν μόρια ύδατος. Το κρυσταλλωμένο πρωτεϊνικό μόριο εμφανίζεται ως ομοδιμερές, με δύο τέτοιες θέσεις δέσμευσης (**Εικόνα 1.12A**). Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι δομές παρουσιάζουν το LeuT_{Aa} σε μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι «κλειστή» και το υπόστρωμα «παγιδευμένο» στο κέντρο δέσμευσης (substrate occluded state) (**Εικόνα 1.12B**). Μια ακόμη κρυσταλλική δομή του LeuT_{Aa} δημοσιεύθηκε πρόσφατα (Singh *et al.*, 2008), η οποία διαφέρει από όλες τις υπόλοιπες γιατί παρουσιάζει μια διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το εξωτερικό του κυττάρου («locked open»), παρουσία ενός ανταγωνιστικού αναστολέα του LeuT_{Aa}, της τρυπτοφάνης (Singh *et al.*, 2008) (**Εικόνα 1.12Γ**). Κεντρικό ρόλο στην δέσμευση υποστρώματος και στις 7 δομές που έχουν παρουσιασθεί έως σήμερα φαίνεται να έχουν δύο ενδιάμεσες ενδομεμβρανικές θηλειές που σχηματίζονται στο κέντρο των διαμεμβρανικών τμημάτων 1 και 6 διακόπτοντας τη συνέχεια των α-ελίκων στα

τμήματα αυτά. Επίσης σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και οι διαμεμβρανικές έλικες 5 και 10 (TM5 και TM10) καθώς εναλλάξ επιτρέπουν ή απαγορεύουν την πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος.

Η επίλυση της δομής του LeuT_{Aa} σε πολύ μεγάλη ευκρίνεια ανάλυσης (1.45-1.9 Å) ήταν καταλυτική για τη μελέτη των γνωστών ομολόγων του μεταφορέων νευροδιαβιβαστών. Πράγματι, η κρυσταλλική δομή του LeuT_{Aa} έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως μοντέλο για την διερεύνηση του μηχανισμού λειτουργίας των ευκαρυωτικών ομολόγων της οικογένειας συµμεταφορέων νευροδιαβιβαστών: Na⁺ (NSS family), όπως των μεταφορέων σεροτονίνης hSERT, και ντοπαμίνης hDAT (Singh, 2008): από τα σημαντικά στοιχεία για τους μεταφορείς αυτούς, τα οποία ερευνήθηκαν μετά την παρουσίαση της δομής του LeuT_{Aa}, με συνδυασμό βιοχημείας και βιοπληροφορικής, είναι η ανάλυση ενός κέντρου δέσμευσης ιόντων Cl⁻, το οποίο χρησιμοποιούν μόνο τα ευκαρυωτικά και όχι τα προκαρυωτικά ομόλογα NSS (Zomot *et al.*, 2007; Forrest *et al.*, 2007; Tavoulari *et al.*, 2011), η διερεύνηση του τρόπου δέσμευσης και του μηχανισμού αναστολής μιας σειράς γνωστών φαρμάκων που έχουν ως στόχους του μεταφορείς αυτούς, π.χ. imipramine, ibogaine, Prozac (Tavoulari *et al.*, 2009), και η παρουσίαση νέων στοιχείων για την κατανόηση του μηχανισμού της εναλλασσόμενης πρόσβασης του κέντρου δέσμευσης (alternate access), μέσω του συντονισμού ελίκων που μετατοπίζονται κατά τις εναλλαγές διαμόρφωσης (rocking bundle) και ελίκων που παραμένουν στην ίδια θέση (scaffold) (Forrest *et al.*, 2008, 2011).



Εικόνα 1.12 Α. Μεταφορέας LeuT_{Aa} του *Aquifex aeolicus* με την παρουσία λευκίνης (Yamashita *et al.*, 2005, Β. Σχηματική απεικόνιση του κέντρου δέσμευσης του LeuT_{Aa}, με διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το κυτταρόπλασμα και το υπόστρωμα (λευκίνη) «αποκλεισμένο» (Yamashita *et al.*, 2005), Γ. Σχηματική απεικόνιση του κέντρου δέσμευσης του LeuT_{Aa}, με διαμόρφωση «ανοιχτή» προς το εξωτερικό και το υπόστρωμα (τρυπτοφάνη) προσβάσιμο από το εξωτερικό περιβάλλον (Singh *et al.*, 2008)

Μεταφορέας vSGLT

Πρόσφατα, έγινε γνωστή η κρυσταλλική δομή ενός μέλους της οικογένειας συµμεταφορέων υποστρώματος και ιόντων νατρίου (Solute:Sodium Symporters, SSS family), του συµμεταφορέα γαλακτόζης/γλυκόζης:Na⁺ από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Vibrio parahaemolyticus*, vSGLT (*Vibrio sodium-glucose transporter*) (Faham *et al.*, 2008). Η οικογένεια των μεταφορέων SSS περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συµμεταφέρουν Na⁺ με σάκχαρα, αμινοξέα, ιόντα ή βιταμίνες. Μέλη αυτής της οικογένειας είναι σηµαντικά για τη φυσιολογία του ανθρώπου όπως οι συµμεταφορείς Na⁺:γλυκόζης/γαλακτόζης (hSGLT1, hSGLT2), που ελέγχουν την πρόσληψη γλυκόζης από το εντερικό επιθήλιο ενώ δυσλειτουργία του hSGLT1 συσχετίζεται µε σύνδροµο δυσαπορρόφησης γλυκόζης/γαλακτόζης (Loo *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2007). Η ανάλυση της δοµής του vSGLT είναι στα 3.0 Å και η πρωτεΐνη εμφανίζεται να αποτελείται από 14 διαµεµβρανικά τµήµατα µε διαµόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό. Σχηµατίζεται ένας πυρήνας από 2 μονάδες των 5 διαµεµβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM2-TM6 και TM7-TM11), µε το υπόστρωµα (γαλακτόζη) να είναι συνδεδεµένο στο κέντρο του πυρήνα (core) αποκλεισµένο από το εξωτερικό περιβάλλον (Faham *et al.*, 2008). Η δοµή αυτή παρουσιάζει οµοιότητες µε τη δοµή του LeuT, την ύπαρξη δηλαδή, των δύο δοµικά οµόλογων μονάδων ανεστραµµένης οργάνωσης (inverted repeats) (TM 2-6 και TM 7-11), παρά το γεγονός ότι πρόκειται για διαφορετικές οικογένειες μεταφορέων.

Μεταφορέας Mph1

Τελευταία, δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή ενός μέλους της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NCS1 (Nucleobase:Cation Symporter 1 family) (Weyand *et al.*, 2008). Πρόκειται για τον μεταφορέα Mph1 από το *Microbacterium liquefaciens*, που είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά ινδολυλο-μεθυλ- και βενζυλ-υδαντοϊνών (indolyl methyl-, benzyl-hydantoins). Η ανάλυση της δοµής είναι σε ευκρίνεια (resolution) 2.85 Å και η πρωτεΐνη εμφανίζεται να αποτελείται από 12 διαµεµβρανικά τµήµατα µε διαµόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό. Σχηµατίζεται ένας πυρήνας από 2 μονάδες των 5 διαµεµβρανικών ελίκων η κάθε μία (TM1-TM5 και TM6-TM10), µε το υπόστρωµα (βενζυλ-υδαντοΐνη) συνδεδεµένο στο κέντρο του πυρήνα αποκλεισµένο από το εξωτερικό περιβάλλον (Weyand *et al.*, 2008). Η δοµή

αυτή, επίσης παρουσιάζει την ίδια δομική οργάνωση με τον LeuT και τον vSGLT (τις δύο δομικά ομόλογες μονάδες των 5 ελίκων με ανεστραμμένη ψευδοσυμμετρική οργάνωση), παρά το γεγονός ότι πρόκειται για διαφορετικές οικογένειες μεταφορέων. Πολύ πρόσφατα (Shimamura *et al.*, 2010) δημοσιεύτηκε και μια δομή του μεταφορέα σε ευκρίνεια 3.8 Å με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό.

Ο μεταφορέας BetP

Ο μεταφορέας BetP είναι ένας μεταφορέας που λειτουργεί σαν τριμερές και είναι συμμεταφορέας βεταΐνης:Na⁺ από το *Corynebacterium glutamicum*. Ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων βεταΐνης/χολίνης/καρνιτίνης, που αποτελεί μια οικογένεια μεταφορέων των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται από τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής ωσμωτικής πίεσης και περιλαμβάνει μεταφορείς που είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά ωσμωλυτικών μορίων μέσα στο κύτταρο ώστε να επανέλθει η ισορροπία, ανταποκρινόμενοι στο υπερωσμωτικό στρες. Πρόσφατα, αναλύθηκε η δομή του μονομερούς του μεταφορέα BetP σε ευκρίνεια 3.3 Å (Ressl *et al.*, 2009), η οποία, αν εξαιρέσουμε το εκτενές C-τελικό άκρο, εμφανίζει τον μεταφορέα BetP με κυλινδρικό σχήμα και να αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα και μια α-έλικα με κάμψη (έλικα 7) στο περιπλασματικό μέρος της μεμβράνης. Παρατηρούμε ότι και η δομή αυτή εμφανίζει ομοιότητα με τις ήδη γνωστές δομές του LeuT, Mph1 και vSGLT, καθώς περιλαμβάνει 2 διακριτές δομικές μονάδες (TM5-7 και TM10-12) με αντίστροφη ψευδοσυμμετρία κατά το επίπεδο της μεμβράνης (Ressl *et al.*, 2009).

Μεταφορέας AdiC

Ο μεταφορέας AdiC ανήκει στην υπεροικογένεια μεταφορέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων APC, η οποία διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους για τη φυσιολογία πολλών οργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, ο αντιμεταφορέας L-αργινίνης:αγματίνης της *E. coli* AdiC, συμμετέχει σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε συνθήκες υψηλής οξύτητας. Πρόσφατα δημοσιεύτηκαν δύο δομές του συγκεκριμένου μεταφορέα που δίνουν παρόμοια εικόνα. Η πρώτη δομή είναι σε ευκρίνεια 3.6 Å (Gao *et al.*, 2009) και η δεύτερη σε

ευκρίνεια 3.2 Å (Fang *et al.*, 2009) και δείχνουν μια πρωτεΐνη με διαμόρφωση ανοιχτή στο εξωτερικό ελεύθερη υποστρώματος.

Μεταφορέας ArcT

Ακόμη ένα μέλος της υπεροικογένειας μεταφορέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων APC είναι και ο μεταφορέας ArcT. Πρόκειται για έναν H⁺ εξαρτώμενο μεταφορέα αμινοξέων από το θερμόφιλο *Methanocaldococcus jannaschii*, και η δομή του σε ευκρίνεια 2.35 Å (Shaffer *et al.*, 2009) εμφανίζει μια πρωτεΐνη με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό. Και αυτή η δομή εμφανίζει πολλές ομοιότητες με αυτή του LeuT όπως και του AdiC, όμως ένα κατάλοιπο λυσίνης στη θέση 158 βρίσκεται σε θέση ανάλογη με αυτή του δεύτερου ιόντος νατρίου στον LeuT, δείχνοντας πως μεταφορείς εξαρτώμενοι από διαφορετικά ιόντα μπορούν να έχουν παρόμοιες αρχές κατά το μηχανισμό μεταφοράς.

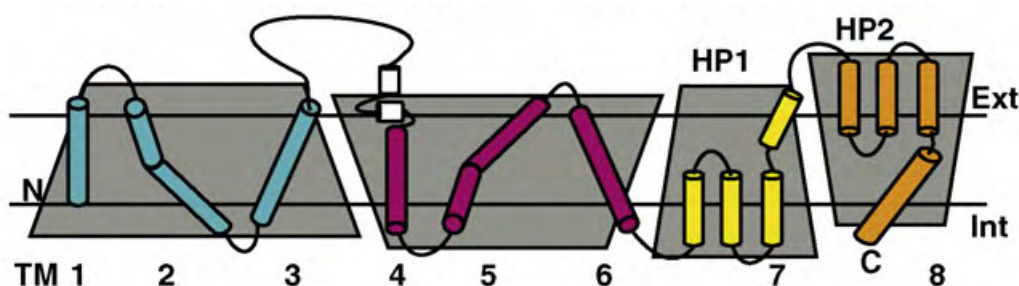
1.3.3 Δομές ενεργών κέντρων δέσμευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς που δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση κάποιο από τα γνωστά μηχανιστικά μοτίβα

Πολλές από τις μέχρι τώρα λυθείσες δομές διαμεμβρανικών μοντελοποιούνται με βάση τα παραπάνω δύο μηχανιστικά μοντέλα. Παρόλα αυτά, υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός δομών πρωτεϊνών που διαφέρουν από τα γνωστά μοντέλα και αποτελούν από μόνες τους ξεχωριστές κατηγορίες. Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά τέτοια παραδείγματα.

Μεταφορέας Glt_{Ph}

Οι μεταφορείς γλουταμικού (excitatory amino acid transporters EAAT1-5 στον άνθρωπο) είναι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που καταλύουν την πρόσληψη γλουταμικού από τη σύναψη στον ενδοκυτταρικό χώρο του προσυναπτικού νευρώνα ή των νευρογλοιακών κυττάρων, χρησιμοποιώντας προϋπάρχουσες διαβαθμίσεις ιόντων (Slotboom *et al.*, 1999). Πρόσφατα δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή, σε ευκρίνεια 3.2 Å, ενός ομολόγου των ευκαρυωτικών μεταφορέων γλουταμικού (Glt_{Ph}) από το υπερθερμόφιλο αρχαίο

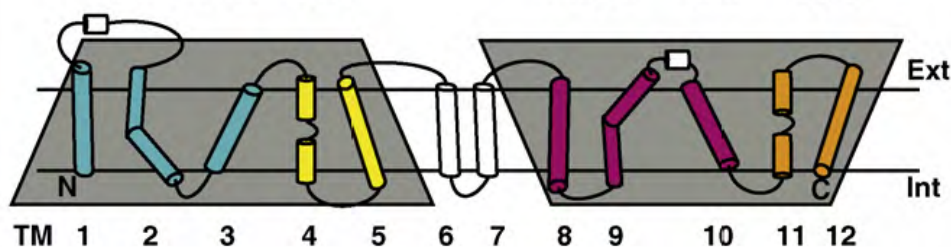
Pyrococcus horikoshii (Yernool *et al.*, 2004). Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του Glt_{Ph} , η οποία μπορεί να εκφραστεί ετερόλογα στη μεμβράνη της *E. coli* K-12 σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η δομή δείχνει ότι ο μεταφορέας Glt_{Ph} είναι ένα ομοτριμερές σε μορφή αβαθούς λεκάνης (basin) με ένα υδρόφιλο κοίλωμα ανοικτό προς την εξωκυτταρική πλευρά στον υδατικό διαλύτη. Στο κατώτατο όριο του ανοικτού αυτού κοιλώματος, δημιουργούνται τρεις διακριτές θέσεις δέσμησης υποστρώματος (binding sites), μία για κάθε υπομονάδα του τριμερούς. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι μεταξύ των τριών υπομονάδων σχηματίζεται ένας διαμεμβρανικός πόρος που θα μπορούσε να λειτουργήσει ανεξάρτητα ως διάυλος ιόντων Cl^- , όπως είχε προταθεί για τους μεταφορείς γλουταμικού EAAT4 και EAAT5 από μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας (Arriza *et al.*, 1997; Kavanaugh, 2004). Πρόσφατα έγινε λειτουργική ανάλυση του μεταφορέα Glt_{Ph} , μελετώντας απομονωμένη πρωτεΐνη που είχε ανασυσταθεί σε λιποσωμάτια, η οποία υποδεικνύει ότι ο μεταφορέας Glt_{Ph} είναι μεταφορέας με υψηλή εξειδίκευση για ασπαρτικό με K_m της τάξης των ~ 120 nM και παράλληλα η λειτουργία του εξαρτάται από την παρουσία Na^+ (Ryan *et al.*, 2009), παρά το γεγονός ότι αρχικά είχε προταθεί ότι πρόκειται για μεταφορέα γλουταμικού (Raunser *et al.*, 2006). Τέλος, ένα σημαντικό αποτέλεσμα που έχει προκύψει από την κρυσταλλική μελέτη του Glt_{Ph} είναι ότι διαλευκάνθηκε η τοπολογική οργάνωση του C-τελικού ημίσεος του μορίου, για την οποία οι αλγόριθμοι πρόβλεψης και τα αρχικά βιοχημικά πειράματα έδιναν αντικρουόμενα αποτελέσματα: για πρώτη φορά, σε έναν μεταφορέα δευτερογενούς τύπου, βρέθηκαν τόσο εκτεταμένα στοιχεία μικρών, μη διαμεμβρανικών, αμφιπαθικών τμημάτων (interrupted helices) και ενδιάμεσων, επανεισερχόμενων συνδετικών θηλειών (φουρκετών) (re-entrant loops) (Yernool *et al.*, 2004) (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13 Η δευτεροταγής δομή του μεταφορέα Glt_{Ph} , όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρική εσωτερική οργάνωση (από Boudker *et al.*, 2010).

Μεταφορέας NhaA

Ο μεταφορέας NhaA της *E. coli* και των εντεροβακτηρίων γενικότερα, είναι ένας αντιμεταφορέας Na^+/H^+ και λειτουργεί χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων για να εξάγει ιόντα νατρίου από το κύτταρο. Η δράση του εξαρτάται αυστηρά από τη βαθμίδωση του pH, με βέλτιστη λειτουργία σε αλκαλικό pH και απενεργοποίηση σε όξινες τιμές pH. Ο μεταφορέας κρυσταλλώθηκε σε ευκρίνεια 3.4 Å (Hunte *et al.*, 2005) και η δομή δείχνει μια διαμόρφωση «κλειδωμένη» σε όξινο pH, και ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. Είναι εμφανής η αντίστροφη ψευδοσυμμετρία που παρατηρείται και στον μεταφορέα Glt_{PH} με χαρακτηριστικό γνώρισμα τη σύζευξη των ελίκων 4 και 11 (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Δευτεροταγής δομή όπου φαίνεται η ψευδοσυμμετρική μοριακή οργάνωση του μεταφορέα (Boudker *et al.*, 2010).

Μεταφορέας AcrB

Ένα ακόμη παράδειγμα μεμβρανικού μεταφορέα που έχει κρυσταλλωθεί με ευκρίνεια 3.5 Å αποτελεί ο μεταφορέας AcrB της *E. coli* (Murakami *et al.*, 2002) και, πιο πρόσφατα, κρυσταλλώθηκε παρουσία υποστρώματος σε ευκρίνεια 2.8 Å (Murakami *et al.*, 2006). Ο μεταφορέας αυτός, συνεργαζόμενος με μια ακόμη ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη (AcrA) και με έναν διάυλο της εξωτερικής μεμβράνης (TolC), καταλύει την εκροή μιας μεγάλης ποικιλίας τοξικών ουσιών από το εσωτερικό του κυττάρου κατευθείαν στο θρεπτικό μέσο, παρακάμπτοντας το περίπλασμα (Zgurskaya and Nikaido, 1999; Nikaido, 2000), και χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική ενέργεια διαβάθμισης πρωτονίων (Thanassi *et al.*, 1997). Η κρυσταλλική δομή παρουσιάζει τρία πρωτομερή AcrB που είναι οργανωμένα ως ομοτριμερές. Στην διαμεμβρανική περιοχή, κάθε πρωτομερές έχει 12 διαμεμβρανικές α-έλικες. Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής που έγινε με την παρουσία του υποστρώματος, υποδεικνύει ότι το υπόστρωμα συνδέεται σε ένα από τα τρία

πρωτομερή και δε φαίνεται να υπάρχει υπόστρωμα στην κεντρική κοιλότητα του συμπλέγματος.

Αντιμεταφορέας ATP/ADP

Πρόσφατα επίσης, έχει δημοσιευθεί η κρυσταλλική δομή του αντιμεταφορέα ATP/ADP του βοός (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003), που ανήκει στην μεγάλη οικογένεια μεταφορέων των μιτοχονδρίων (MCF). Η δομή αυτή δόθηκε σε μεγάλη αναλυτική ευκρίνεια (2.2 Å) χρησιμοποιώντας την μεμβρανική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με έναν ισχυρό αναστολέα, το καρβοξυατρακτυλοσίδιο (carboxyatractyloside), το οποίο παγιδεύει τη διαμόρφωση προς την πλευρά που είναι ανοικτή στον διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο (Berg *et al.*, 2005). Ένα ομοδιμερές από δύο μόρια των έξι διαμεμβρανικών α-ελίκων διαμορφώνει μια συμπαγή διαμεμβρανική περιοχή, η οποία αποκαλύπτει ένα βαθύ κοίλωμα στην επιφάνεια προς τον χώρο μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών. Τα υποστρώματα δεσμεύονται στο κατώτατο όριο του κοιλώματος αυτού, και η μεταφορά τους, κατά τους συγγραφείς, επάγεται από την παροδική μετάπτωση του κοιλώματος σε διάυλο μεταφοράς νουκλεοτιδικών υποστρωμάτων.

Κλείνοντας με το κομμάτι που αφορά στις κρυσταλλικές δομές των πρωτεϊνών δευτερογενούς μεταφοράς που έχουν λυθεί έως σήμερα, πρέπει να τονιστεί ότι η πλειοψηφία των δομών αυτών προέρχονται από προκαρυωτικά ομόλογα, από βακτήρια (LacY, GltT, LeuT_{Aa}, vSGLT, Mph1, BetP, AcrB) ή αρχαία (Glt_{Ph}), και συχνά από θερμοφιλα ή υπερθερμοφιλα ομόλογα (LeuT_{Aa}, Glt_{Ph}, ArcT) ή από θερμοσταθερά μεταλλάγματα (LacY-C154G). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μερικές περιπτώσεις, απουσιάζουν επαρκή λειτουργικά δεδομένα για τις πρωτεΐνες που κρυσταλλώθηκαν (LeuT_{Aa}, Glt_{Ph}, Mph1), ενώ πληροφορίες από περισσότερες της μιας κρυσταλλογραφικές αναλύσεις για διαφορετικές λειτουργικές συνθήκες (π.χ. με και χωρίς υπόστρωμα ή αναστολείς) και/ή διαφορετικές διαμορφώσεις του μορίου, συνδυασμένες με επαρκή ανάλυση μεταλλαξιγένεσης και βιοχημικών μελετών, υπάρχουν σε δύο μόνο περιπτώσεις (LacY, LeuT_{Aa}). Όπως φαίνεται, η ανάλυση αυτών, αλλά και άλλων κρυσταλλικών δομών που θα έρθουν στο μέλλον, ρίχνει φως σε σημαντικά στοιχεία του μηχανισμού και των σχέσεων δομής-λειτουργίας των πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς και επιτρέπει ορθολογικότερο

σχεδιασμό αναλύσεων μεταλλαξιγένεσης για την κατανόηση του ρόλου συγκεκριμένων περιοχών του μορίου. Παρόλα αυτά, η στατική εικόνα δομής μιας τέτοιας πρωτεΐνης θα πρέπει να συνδυάζεται με λειτουργικά, βιοχημικά και βιοφυσικά δεδομένα που όχι μόνο επιβεβαιώνουν την κρυσταλλική δομή ή επιβεβαιώνονται από αυτή, αλλά και την αναδεικνύουν ακόμη περισσότερο. Χαρακτηριστική περίπτωση συνδυασμού δομικών και λειτουργικών δεδομένων αποτελεί το παράδειγμα του μεταφορέα λακτόζης LacY (Kaback *et al.*, 2007; Guan and Kaback, 2006; Kaback *et al.*, 2011).

1.4 Μεταφορές νουκλεοτιδικών βάσεων

Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους τόσο στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων όσο και στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων σε όλων των ειδών τα κύτταρα. Η μεταφορά τους λοιπόν, αποτελεί μια βασική βιολογική διεργασία τόσο για τους προκαρυωτικούς όσο και για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μεταφορά λοιπόν, των τόσο σημαντικών νουκλεοτιδικών βάσεων απαιτεί και την ύπαρξη εξειδικευμένων συστημάτων μεταφοράς. Πράγματι, μελέτες μοριακής γενετικής και φυσιολογίας αποδεικνύουν την ύπαρξη πολλών τέτοιων ειδικών συστημάτων σε αρκετά είδη βακτηρίων (Andersen *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2003; Karatza and Frillingos, 2005) και μυκήτων (Diallinas *et al.*, 1998; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005, 2006; Vlantí *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Diallinas, 2007; Hamari *et al.*, 2009). Παρόμοια βιολογικά συστήματα μεταφοράς είναι πλέον γνωστό ότι υπάρχουν και σε είδη Φυτών (Argyrou *et al.*, 2001; Maurino *et al.*, 2006), Μεταζώων (Yao *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2006), Πρωτοκτίστων (de Koning *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2009) αλλά και στον άνθρωπο (Diallinas and Gournas, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010).

Οι νουκλεοτιδικές βάσεις έχουν κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση όλων των κυττάρων. Εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες της ζωής σε όλους τους οργανισμούς, με κυριότερες την μεταβίβαση και αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας καθώς όπως προαναφέρθηκε αποτελούν τους «δομικούς λίθους» για τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων.

1.4.1 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Η διαμεμβρανική μεταφορά των νουκλεοτιδικών βάσεων επιτυγχάνεται με την παρουσία εξειδικευμένων διαμεμβρανικών μεταφορέων. Οι γνωστοί έως σήμερα μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων, καθώς και οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ομολογία με αυτούς, έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις βασικές οικογένειες (Diallinas and Gournas 2008), ενώ υπάρχουν και δύο ακόμη οικογένειες που εντοπίζονται μόνο σε είδη Φυτών (Desimone *et al.*, 2002).

Η πιο διαδεδομένη φυλογενετικά οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων είναι γνωστή ως οικογένεια **Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών Βάσεων – Ασκορβικού** (Nucleobase –Ascorbate Transporters, **NAT**) (de Koning and Diallinas,

2000) ή **οικογένεια-2 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων – Κατιόντων** (Nucleobase – Cation Symporters-2, **NCS2**) (TC 2.A.40, <http://www.tcdb.org>) (Gournas *et al.*, 2008; Pantazopoulou and Diallinas, 2007). Εκτενής αναφορά για την οικογένεια αυτή γίνεται στην παράγραφο 1.4.2.

Η οικογένεια **Μεταφορέων Πουρινών AzgA** (Purine Transporters, **AzgA**) (TC 2.A.1.40) ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, **MFS**) (TC 2.A.1) (<http://www.tcdb.org>) και αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα **AzgA** του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* που μεταφέρει τις νουκλεοτιδικές βάσεις αδενίνη-υποξανθίνη-γουανίνη (Cecchetto *et al.*, 2004; Goudela *et al.*, 2006, 2008). Η οικογένεια **AzgA** περιλαμβάνει επίσης μεταφορείς από διάφορους οργανισμούς όπως αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά, ενώ φαίνεται ότι δεν υπάρχει στα Μετάζωα.

Η οικογένεια **Μεταφορέων Σχετιζόμενων με Πουρίνες** (Purine Related Transporters, **PRT**) (de Koning & Diallinas, 2000) ή **οικογένεια-1 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων – Κατιόντων** (Nucleobase – Cation Symporters-1, **NCS1**) (Saier *et al.*, 2006). (TC 2.A.39, <http://www.tcdb.org>), αποτελείται από πάνω από 300 πρωτεΐνες προερχόμενες από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, αρχαία και φυτά. Πρόσφατα έχει αναλυθεί η κρυσταλλική δομή ενός μέλους (**Mph1**) της οικογένειας από το *Microbacterium liquefaciens* (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010).

Η οικογένεια **Μεταφορέων Εξισορρόπησης συγκεντρώσεων Νουκλεοσιδίων** (Equilibrative Nucleoside Transporters, **ENT**) (TC 2.A.57, <http://www.tcdb.org>) περιλαμβάνει μεταφορείς που μεταφέρουν νουκλεοσίδια και νουκλεοτιδικές βάσεις. Πρόκειται για ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς πουρινικών και πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και των κυτταροτοξικών αναλόγων τους που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα. Πολύ καλά μελετημένοι είναι οι **ENT** μεταφορείς στον άνθρωπο, **hENT1**, **hENT2** (Griffiths *et al.*, 1997), **hENT3** και **hENT4** (Hyde *et al.*, 2001) και οι ομόλογοί τους στα τρωκτικά (Yao *et al.*, 1997; Kiss *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2005). Ομόλογά τους υπάρχουν σε μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδεις σκώληκες και θηλαστικά (de Koning and Diallinas, 2000; Hyde *et al.*, 2001; Landfear *et al.*, 2004; de Koning *et al.*, 2005).

Οι δύο επόμενες οικογένειες απαντώνται μόνο στα Φυτά. Πρόκειται για τις οικογένειες των **Διαπερασών Οργανοκατιόντων των Φυτών** (Plant Organocation Permease, **POP**) (TC 2.A.7.14, <http://www.tcdb.org>) και των **Μεταφορέων**

Πρόσληψης Νουκλεοτιδικών βάσεων (Nucleobase Uptake Transporters, **NBUT**) (TC 2.A.7.19). Η οικογένεια POP περιλαμβάνει μεταφορείς υποστρωμάτων σχετιζόμενων με πουρίνες. Το μοναδικό μέλος της οικογένειας που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά είναι ο AtPUP1 της *A. thaliana*, εξειδικευμένος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων (αδενίνη, κυτοσίνη) ο οποίος εκτελεί συμμεταφορά των υποστρωμάτων του με πρωτόνια (Gillissen *et al.*, 2000). Η οικογένεια NBUT αποτελείται από μεταφορείς που έχουν ως υποστρώματα ουρεΐδες, κυτοσίνες και άλλα ανάλογα υποστρώματα. Αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας NBUT είναι οι μεταφορείς αλλαντοΐνης AtUPS1 και AtUPS2 της *A. thaliana*. Πρόκειται για τους πρώτους μεταφορείς αλλαντοΐνης που έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά σε φυτά.

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

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

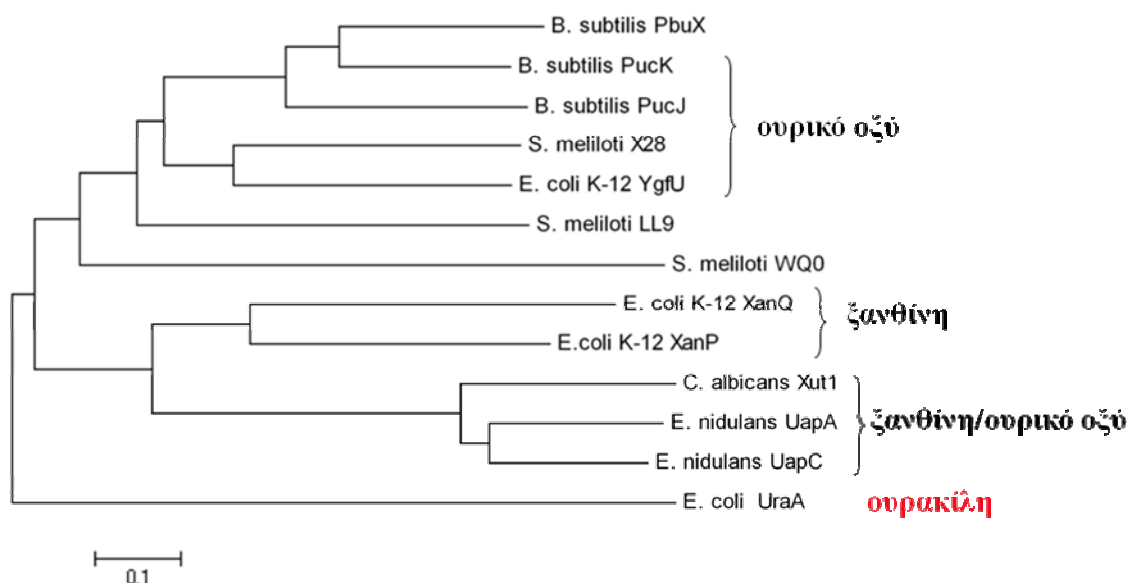
Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 αποτελεί το επίκεντρο του ενδιαφέροντος της παρούσας διατριβής, καθώς ο μεταφορέας XanQ που είναι το ερευνητικό μας αντικείμενο είναι μέλος της. Η οικογένεια NAT, είναι η μεγαλύτερη και πιο συντηρημένη οικογένεια νουκλεοτιδικών βάσεων. Περιλαμβάνει περισσότερα από 1000 μέλη από όλα σχεδόν τα είδη οργανισμών όπως Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά και θηλαστικά, εξαιρουμένων μόνο των γονιδιωμάτων ορισμένων ζυμομυκήτων, παρασιτικών πρωτοζώων και ενδοπαρασιτικών βακτηρίων (de Koning and Diallinas, 2000). Τα μέλη της οικογένειας αυτής, που προέρχονται από μικροοργανισμούς ή φυτά, είναι ειδικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρινών ή πυριμιδινών) (de Koning and

Diallinas, 2000; Gournas *et al.*, 2008). Ωστόσο, τα αντίστοιχα μέλη της οικογένειας που προέρχονται από θηλαστικά, είναι ειδικοί μεταφορείς L-ασκορβικού (Tsukaguchi *et al.*, 1999) αλλά ακόμη και πουρινών βάσει πρόσφατων μελετών (Yamamoto *et al.*, 2010).

Μια ανάλυση με βάση γνωστά γονιδιώματα που έχουν κατατεθεί (<http://img.jgi.doe.gov/>, <http://www.membranetransport.org/>), δείχνει ότι από τα Αρχαία το 27% των γονιδιωμάτων (n=23) περιέχει πιθανά γονίδια για μεταφορείς NAT, από τα Ευκάρυα το 68% (n=13) και από τα Βακτήρια το 61% (n=671) (Καρλετίδης Γ., 2010, Διπλωματική εργασία). Συχνά υπάρχουν πολλά ομόλογα NAT στον ίδιο οργανισμό. Τα περισσότερα από τα 23 Αρχαία που περιέχουν γονίδια NAT έχουν μόνο ένα (69%) ή δύο (20%) ομόλογα στο γονιδίωμά τους, ενώ τα Βακτήρια μπορεί να περιέχουν ένα (33%), δύο (28%), τρία ή τέσσερα (10%), ή και περισσότερα γονίδια NAT στο γονιδίωμά τους, με την *E. coli* να έχει το μεγαλύτερο αριθμό (10 ομόλογα). Από τα 13 Ευκάρυα, τα περισσότερα έχουν ένα (50%) ή δύο (20%) γονίδια NAT, αλλά ορισμένα φυτά έχουν μεγάλο αριθμό ομολόγων, όπως η *Arabidopsis thaliana* που έχει 14 γονίδια για μεταφορείς NAT (Καρλετίδης Γ., 2010, Διπλωματική εργασία).

Παρά τον μεγάλο αριθμό των μελών που ανήκουν στην οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2, ελάχιστα μέλη έχουν κλωνοποιηθεί και μελετηθεί σε γενετικό και μοριακό επίπεδο έως σήμερα, που είναι κυρίως μεταφορείς ουρικού ή ξανθίνης (**Εικόνα 1.15**). Οι χαρακτηρισμένοι λειτουργικά μεταφορείς είναι έως και σήμερα οι μεταφορείς του ασκομύκητα *A. nidulans* **UapA** (μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης) (Gorfinkiel *et al.*, 1993; Diallinas *et al.*, 1995, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001, 2004) και **UapC** (μεταφορέας πουρινών με ευρύτερη εξειδίκευση) (Diallinas *et al.*, 1995), οι μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* **XanQ** και **XanP** (Karatza and Frillingos, 2005), (www.ecogene.org) καθώς και οι πρόσφατα χαρακτηρισμένοι μεταφορείς ουρικού οξέος (χαμηλής συγγένειας) **YgfU**, και ξανθίνης (χαμηλής συγγένειας) **RutG** (Παπακώστας Κωνσταντίνος, Διδακτορική Διατριβή, 2011), οι μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης **Lpe1** της *Zea mays* (Argyrou *et al.*, 2001), **Xut1** της *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2005), **AfUapA** του *A. fumigatus* (Goudela *et al.*, 2006), οι μεταφορείς ξανθίνης **PbuX** και ουρικού **PucJ** και **PucK** του *Bacillus subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997, Schultz *et al.*, 2001), οι μεταφορείς ουρακίλης **UraA** της *E. coli* (Andersen *et al.*, 1995) και **PyrP** του *Lactococcus lactis* (Martinussen *et al.*, 2001), και οι μεταφορείς ασκορβικού **SVCT1** και **SVCT2** των

θηλαστικών (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Στα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας προστέθηκαν εντελώς πρόσφατα οι μεταφορείς **X28** και **WQ0** καθώς και **LL9** του ριζοβακτηρίου *Sinorhizobium meliloti* που χαρακτηρίστηκαν ως μεταφορείς ουρικού (X28 και WQ0) και ουρικού και ξανθίνης (με ευρεία εξειδίκευση) (LL9), καθώς και δύο μεταφορείς από ακραιόφιλους οργανισμούς, τον μεταφορέα ουρικού **PsyhT** από τον ψυχρόφιλο *Psychrobacter cryohalolentis* και τον μεταφορέα ξανθίνης **MoorT** από το θερμόφιλο κλοστρίδιο *Moorella thermoacetica* (Παπακώστας Κωνσταντίνος, Διδακτορική Διατριβή, 2011). Τέλος, χαρακτηρίστηκε και ο πρώτος μεταφορέας ουρακίλης στα θηλαστικά που λειτουργεί ως μεταφορέας ουρακίλης κυρίως και με μικρότερη συγγένεια ως μεταφορέας ξανθίνης, υποξανθίνης, γουανίνης ή θυμίνης. Πρόκειται για τον μεταφορέα **rSNBT1** ο οποίος απομονώθηκε από το εντερικό επιθήλιο του επίμουσ (Yamamoto *et al.*, 2010). Ο SNBT1 έχει μεγάλη ομολογία (50% ταυτότητα) με τους μεταφορείς ασκορβικού SVCT1 και SVCT2, ενώ τα ορθόλογά του στα πρωτεύοντα φαίνεται να έχουν απενεργοποιηθεί εξελικτικά και παραμένουν ως ψευδογονίδια.



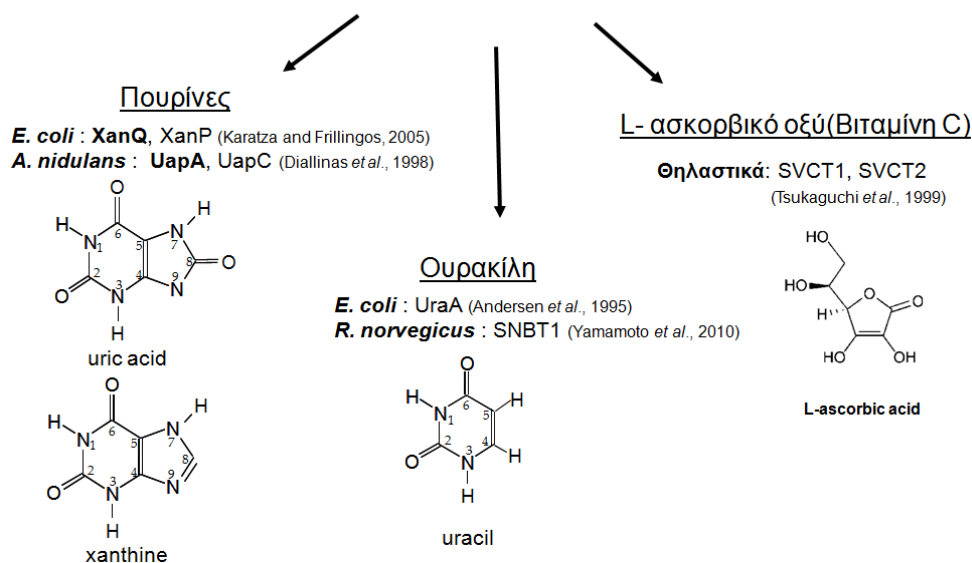
Εικόνα 1.15. Εξελικτικό δενδρόγραμμα μελών της οικογένειας NAT/NCS2. Εξελικτικό δενδρόγραμμα των γνωστών μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού της οικογένειας χρησιμοποιώντας τον μεταφορέα ουρακίλης UraA ως παρα-ομάδα. Το δενδρόγραμμα υπολογίστηκε με το πρόγραμμα MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2008).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες μεταφορέων ανάλογα με το υπόστρωμα τους. Μεταφορείς οξειδωμένων πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος), μεταφορείς ουρακίλης και μεταφορείς L-ασκορβικού (βιταμίνης C), που συναντάμε μόνο στα

θηλαστικά και συγκεκριμένα στα πρωτεύοντα (**Εικόνα 1.16**). Ενδιαφέρον, παρουσιάζει το γεγονός ότι τα υποστρώματα ουρακίλη, ουρικό οξύ και ξανθίνη έχουν τελείως διαφορετική χημική δομή από το άλλο μεταφερόμενο υπόστρωμα της οικογένειας NAT, L-ασκορβικό. Παρόλα αυτά, το ουρικό και το ασκορβικό έχουν παρόμοιες και συμπληρωματικές λειτουργίες στα θηλαστικά. Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που απαλλάσσουν το πλάσμα του αίματος από τις δραστικές μορφές (ελεύθερες ρίζες) οξυγόνου (Ames *et al.*, 1981; Frei *et al.*, 1989; Nyssonen *et al.*, 1997). Το ασκορβικό οξύ, επιπρόσθετα, είναι απαραίτητο για αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου διατηρεί τα ιόντα μεταλλικών συμπαραγόντων στην ανηγμένη τους μορφή και απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες, προφυλάσσοντας τους ιστούς από οξειδωτική καταστροφή. Επιπλέον, το ουρικό σταθεροποιεί το ασκορβικό οξύ στα βιολογικά υγρά (Sevanian *et al.*, 1991). Η σπουδαιότητα του ουρικού οξέος ως αντιοξειδωτικού, είναι ιδιαίτερα εμφανής σε είδη που δεν μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό οξύ. Κατά πόσον το γεγονός αυτό είναι σύμπτωση ή έχει παίξει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του μεταφορέα ασκορβικού των θηλαστικών από έναν μεταφορέα ουρικού, παραμένει άγνωστο (Hediger, 2002a, b).

Από τους 22 έως σήμερα χαρακτηρισμένους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT, οι μόνοι εκτενώς μελετημένοι είναι ο UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* (Diallinas *et al.*, 1995, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001, 2004), που λειτουργεί ως συμμεταφορέας ουρικού:H⁺ ή ξανθίνης:H⁺, και ο μεταφορέας XapQ, ειδικός συμμεταφορέας ξανθίνης:H⁺, από το εντεροβακτήριο *E. coli*. Από τα υπόλοιπα μέλη, αρκετές αλληλουχίες πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια NAT έχουν αναγνωρισθεί με *in silico* αναλύσεις σε συνδυασμό με γενετική-φυσιολογική ανάλυση βακτηριακών οπερονίων (Xi *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001; Loh *et al.*, 2006) και περιορισμένη ή και καθόλου βιοχημική ανάλυση, και οι λειτουργίες τους παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστες. Στα Φυτά, εξάλλου, έχουν αναγνωρισθεί 14 μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 από την *Arabidopsis thaliana* (AtNAT1-14) βάσει λεπτομερούς φυλογενετικής-γονιδιωματικής ανάλυσης και αναλύσεων έκφρασης (με χίμαιρες GFP) για ορισμένα από αυτά, χωρίς να υπάρχουν καθόλου λειτουργικά δεδομένα ή φαινότυποι από μία σειρά στελεχών με απαλοιφές (knock-out) των *AtNAT* που εξετάστηκαν (Maurino *et al.*, 2006).

NAT/NCS2 family nucleobase : cation symporters



Εικόνα 1.16 Διαχωρισμός της οικογένειας NAT σε τρεις ομάδες ανάλογα με το υπόστρωμα που μεταφέρουν και τα καλύτερα μελετημένα μέλη της κάθε ομάδας . Μεταφορείς οξειδωμένων πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, XanQ και UapA αντίστοιχα), μεταφορείς ουρακίλης (UraA,SNBT1) και μεταφορείς L-ασκορβικού (SVCT1 και SVCT2).

Συνοψίζοντας, γίνεται αντιληπτό ότι παρά τη σπουδαιότητα και την καθολική (σχεδόν) παρουσία των μεταφορέων της οικογένειας NAT σε όλα τα είδη των οργανισμών, οι μελέτες που έχουν γίνει για τις σχέσεις δομής – λειτουργίας αφορούν κατά κύριο λόγο δύο μόνο μέλη: τον εξειδικευμένο συμμεταφορέα ουρικού/ξανθίνης: H^+ UapA, από τον ασκομύκητα *A. nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amilis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Diallinas, 2006, 2007; Papageorgiou *et al.*, 2008) και τον εξειδικευμένο συμμεταφορέα ξανθίνης: H^+ XanQ, από το εντεροβακτήριο *E. coli* (Karatza and Frillingos, 2005; Goudela *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009, Georgopoulou *et al.*, 2010, Mermelekas *et al.*, 2010). Προσπάθειες κρυστάλλωσης και κρυσταλλογραφικής ανάλυσης τόσο του XanQ (H. Ronald Kaback, UCLA) όσο και του UapA (Bernadette Byrne, Imperial College, London) βρίσκονται σε εξέλιξη.

Ακολουθεί μια αναλυτική περιγραφή των έως τώρα δεδομένων από τα δύο καλύτερα μελετημένα ομόλογα της οικογένειας NAT (XanQ και UapA).

1.4.2.1 Το μοτίβο «υπογραφή» NAT

Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT/NCS2 (**Εικόνα 1.17**), ανέδειξε μια 10πεπτιδική αλληλουχία με υψηλό βαθμό συντήρησης, η οποία περιλαμβάνεται σε μια ευρύτερη περιοχή που ανακαλύφθηκε από πειράματα ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών UapA/UapC (Diallinas *et al.*, 1998). Η αλληλουχία αυτή [³²⁴(Q/E/P)-N-X/N-G-X-X-X/Q-X-T-(K/R/G)³³³] (αρίθμηση βάσει του μεταφορέα XanQ, όπου X υδρόφοβο αμινοξύ) ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT signature motif) (Diallinas *et al.*, 1998). Τα κατάλοιπα N325, G328 και T332 είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλα τα μέλη που έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά καθώς και στην συντριπτική πλειοψηφία όλων των ομολόγων, από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο, που προβλέπονται βάσει της αλληλουχίας (<http://www.membranetransport.org>). Το κατάλοιπο-324 παρουσιάζει υψηλή συντήρηση μεταξύ όλων των μελών, είτε ως γλουταμίνη (Q) στους μεταφορείς ξανθίνης, ουρικού ή ουρικού και ξανθίνης, του *A. nidulans* (UapA, UapC), του *A. nidulans* (AfUapC), της *C. albicans* (Xut1), του *B. subtilis* (PbuX, PucJ) και της *E. coli* (XanQ, XanP), είτε ως γλουταμικό (E) στους μεταφορείς ουρακίλης από βακτήρια (UraA, PyrP) και στον μεταφορέα πουρινών (ουρικού/ξανθίνης) της *Zea mays* (Lpe1), είτε ως προλίνη (P) στους μεταφορείς L-ασκορβικού του ανθρώπου (hSVCT1, hSVCT2). Το κατάλοιπο-333, επίσης, συντηρείται είτε ως λυσίνη (K) ή αργινίνη (R) στους μεταφορείς ακορβικού (hSVCT1, hSVCT2), ουρακίλης (UraA, PyrP), ουρικού (PucJ, YgfU), ή ουρικού και ξανθίνης (UapA, UapC, AfUapC, Xut1, Lpe1) είτε ως γλυκίνη (G) στους μεταφορείς ξανθίνης της *E. coli* (XanQ, XanP) και στον μεταφορέα ξανθίνης του *B. subtilis* (PbuX): βάσει αυτού του μοτίβου συντήρησης, έχει προταθεί συμμετοχή του καταλοίπου G/R/K333 στον καθορισμό της εξειδίκευσης ως προς την διάκριση υποστρωμάτων μεταξύ ουρικού και ξανθίνης και μεταξύ αναγνώρισης ή μη υποκαταστάσεων στη θέση 8 του πουρινικού δακτυλίου (Goudela *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006). Νεότερες μελέτες πάνω στα κατάλοιπα του μοτίβου υπογραφή αλλά και της ευρύτερης περιοχής γύρω από αυτό (Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010; Παπακώστας Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011) υποδεικνύουν ότι το μοτίβο υπογραφή φαίνεται να απαρτίζεται από 11 κατάλοιπα. Το 11^ο κατάλοιπο φαίνεται να είναι η Ala-323 η οποία εδράζεται δίπλα στα συντηρημένα κατάλοιπα της οικογένειας 324 και 325 και αποτελεί αντικείμενο

μελέτης και της παρούσας διατριβής. Έτσι η αλληλουχία του μοτίβου υπογραφή διαφοροποιείται ως εξής: [³²³(A/G/S)(Q/E/P)-N-X/N-G-X-X-X/Q-X-T-(K/R/G)³³³]. Ο ρόλος του μοτίβου «υπογραφή» NAT έχει μελετηθεί αναλυτικά στους μεταφορείς UapA και XanQ, όπως παρουσιάζεται παρακάτω (εδάφια 1.4.2.2 και 1.4.2.3).

XanQ	323	A	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	333	(ξανθίνη)
XanP	335	G	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	G	345	(ξανθίνη)
PbuX	292	S	Q	N	V	G	L	V	Q	L	T	G	302	(ξανθίνη)
Moort	317	I	E	S	A	A	G	V	A	E	G	G	327	(ξανθίνη)
YgfU	360	S	Q	N	V	G	L	V	S	V	T	R	370	(ουρικό)
PucK	294	S	Q	N	V	G	I	V	Q	L	S	K	304	(ουρικό)
PucJ	297	A	Q	N	A	G	L	L	Q	L	T	K	307	(ουρικό)
X28	315	A	Q	N	V	G	L	L	Q	I	T	G	325	(ουρικό)
WQ0	306	G	E	N	V	G	I	V	R	A	T	N	316	(ουρικό)
LL9	309	A	Q	N	V	G	L	V	A	V	T	G	319	(ξανθίνη/ουρικό)
PsyhT	319	S	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	329	(ξανθίνη/ουρικό)
UapA	407	A	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R	417	(ξανθίνη/ουρικό)
UapC	406	A	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	R	416	(ξανθίνη/ουρικό)
AfUap	405	A	Q	N	N	G	V	I	A	L	T	K	415	(ξανθίνη/ουρικό/οξυουρινόλη)
Xut1	385	A	Q	N	N	G	V	I	S	I	T	K	395	(ξανθίνη/ουρικό)
Lpe1	345	V	E	N	A	G	L	L	A	V	T	R	355	(ξανθίνη/ουρικό)
UraA	289	G	E	N	I	G	V	M	A	I	T	R	299	(ουρακίλη)
PyrP	305	G	E	N	I	G	V	M	A	I	T	K	315	(ουρακίλη)
RutG	308	A	E	N	I	G	V	M	A	V	T	K	318	(ξανθίνη/ουρακίλη)
SNBT1	396	S	E	N	V	G	A	L	G	I	T	R	406	(ουρακίλη/πουρίνες)
SVCT1	387	S	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K	397	(ασκορβικό)
SVCT2	342	S	P	N	I	G	V	L	G	I	T	K	452	(ασκορβικό)

Εικόνα 1.17 Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», ³²³AQN^XGXXXXT^G³³³, των 22 χαρακτηρισμένων μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2: *E. coli* XanQ (P67444) και XanP (P0AGM9) (Karatza and Frillingos, 2005), UraA (P0AGM7) (Andersen *et al.*, 1995), YgfU (Q46821) (Παπακώστας Κ., Διδ.Διατριβή, 2011), RutG (P75892) (ξανθίνη-Παπακώστας Κ., Διδ.Διατριβή, 2011 /ουρακίλη- Loh *et al.*, 2006), από το *Bacillus subtilis* PbuX (P42086), PucK (O32140), και PucJ (O32139) (Christiansen *et al.*, 1997, Schultz *et al.*, 2001), από το *Sinorhizobium meliloti* SM1021 LL9 (Q92LL9), X28 (Q92X28), WQ0 (Q92WQ0) (Παπακώστας Κ., Διδ.Διατριβή, 2011), από το *Psychrobacter cryohalolentis* K5 Pcryo_1913 (PsyhT) (Q1Q9G3) (Παπακώστας Κ., Διδ.Διατριβή, 2011), από το *Moorella thermoacetica* Moth_2118 (MoorT) (Q2RGM9) (Μερμελέκας Γ., Διδ. Διατριβή, 2009; Παπακώστας Κ., Διδ.Διατριβή, 2011), από το *Clostridium perfringens* YcpX (P50487) (Brynstad *et al.*, 1994), από το *Lactococcus lactis* PyrP (Q9CF78) (Turner *et al.*, 1994, Martinussen *et al.*, 2001), από το *A. nidulans* UapA (Q07307) και UapC (P487777) (Diallinas *et al.*, 1995), από το *Aspergillus fumigatus* AfUapA (XP748919) (Pantazopoulou A. and Diallinas G., 2007) από το *Candida albicans* Xut1 (AAX2221) (Goudela *et al.*, 2005), από το *Zea mays* Lpe1 (Q41960) (Argyrou *et al.*, 2001), από το *Homo sapiens* SVCT1 (SLC23A1) (Q9UHI7) και SVCT2 (SLC23A2) (Q9UGH3) (Tsukaguchi *et al.*, 1999), από το *Ratus norvegicus* SNBT1 (D2KX48) (Yamamoto *et al.*, 2010). Με τη διακεκομμένη γραμμή χωρίζονται τα 10 κατάλοιπα που απαρτίζουν το μοτίβο υπογραφή από το πιθανό 11^ο που μπορεί να ανήκει και αυτό σε αυτή την αλληλουχία. Το 11^ο κατάλοιπο προηγείται στην αλληλουχία του αρχικού καταλοίπου του μοτίβου υπογραφή και εμφανίζει μικρή συντήρηση ανάμεσα στα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

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

Ο πολυκυτταρικός ασκομύκητας *A. nidulans* είναι ικανός να προσλαμβάνει πουρίνες και πυριμιδίνες από το περιβάλλον του. Στο σύστημα του *Aspergillus*, οι πουρίνες, σε αντίθεση με τις πυριμιδίνες, μπορούν να καταβολιστούν πλήρως και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικές πηγές αζώτου. Στον *A. nidulans*, υπάρχουν δύο μεταφορείς της οικογένειας NAT, ο UapA και ο UapC (Diallinas *et al.*, 1995). Ο UapA είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης, ενώ μπορεί να μεταφέρει και ανάλογα πουρινών όπως το 2-θειουρικό, τη 2-θειοξανθίνη, την αλλοπουρινόλη και την οξυπουρινόλη (Diallinas and Scazzocchio, 1989; Gorfinkiel *et al.*, 1993). Ο UapC είναι ένας ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέας πουρινών, υψηλής συγγένειας για ξανθίνη (K_m 5 μ M), χαμηλότερης συγγένειας για ουρικό οξύ και πολύ μικρής συγγένειας για άλλες φυσικές πουρίνες ή ανάλογα πουρινών (Diallinas *et al.*, 1995). Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι οι δύο μεταφορείς φέρουν ταυτότητα καταλοίπων που φτάνει το 62% και παρόλα αυτά έχουν σαφείς διαφορές όσον αφορά στην εξειδίκευση και συγγενεία τους για το μεταφερόμενο υπόστρωμα (Diallinas *et al.*, 1998).

Ως προς τις σχέσεις δομής-λειτουργίας τους, έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ο μεταφορέας UapA. Πρόκειται για έναν υψηλής συγγένειας (K_m 7-8 μ M) συμμεταφορέα ουρικού/ξανθίνης: H^+ , αλλά με περιορισμένη ικανότητα πρόσληψης και αναλόγων πουρινών, όπως 2-θειουρικού, 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλοξανθίνης, και των φαρμάκων αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Goudela *et al.*, 2005).

Το γονίδιο *uap* ήταν το πρώτο γονίδιο ενός μεταφορέα της οικογένειας NAT που κλωνοποιήθηκε (Diallinas and Scazzocchio, 1989) και προσδιορίστηκε ως προς την αλληλουχία του (Gorfinkiel *et al.*, 1993). Η πρώτη προσπάθεια για την αναγνώριση σημαντικών περιοχών για τη λειτουργία του μεταφορέα UapA έγινε με πειράματα ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών μεταξύ UapA και του ευρύτερης εξειδίκευσης μεταφορέα NAT του *A. nidulans*, UapC, που κατασκευάστηκαν βάσει του πρωτοκόλλου λειτουργικής συμπλήρωσης *in vivo* (*in vivo complementation*) (Diallinas *et al.*, 1998). Στη συνέχεια, με πειράματα μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης και κατασταλτικών μεταλλαγών δεύτερης θέσης (*second-site suppressor mutations*) επιλεγμένων μεταλλαγμάτων του UapA, εντοπίστηκαν σημαντικά κατάλοιπα του μεταφορέα (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000; Amilis *et*

al., 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008). Τα πειράματα αυτά ανέδειξαν μια ευρεία περιοχή 70 περίπου καταλοίπων του UapA που θεωρήθηκε κρίσιμη για την αναγνώριση των διαφορετικών υποστρωμάτων και την εξειδίκευση των μεταφορέων του *Aspergillus* (Diallinas *et al.*, 1998). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του 8^{ου} και 9^{ου} διαμεμβρανικού τμήματος στο τοπολογικό μοντέλο των 12 διαμεμβρανικών τμημάτων. Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση των χημικών πρωτεϊνών, κατασκευάστηκε, με στοχευμένη πλέον μεταλλαξιγένεση, μια ακόμη χημική πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από την πλήρη αλληλουχία του UapA, όπου όμως η κρίσιμη περιοχή των 70 καταλοίπων είχε αντικατασταθεί από την αντίστοιχη αλληλουχία του UapC. Η χημική αυτή πρωτεΐνη συμπεριφέρθηκε λειτουργικά όπως ο μεταφορέας UapC, εμφάνισε δηλ. την ευρύτερη εξειδίκευση ως προς τις πουρίνες που έχει ο μεταφορέας UapC (Diallinas *et al.*, 1998). Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των μελών της οικογένειας NAT/NCS2 έδειξε ότι η περιοχή των 70 καταλοίπων περιλαμβάνει μια χαρακτηριστική υποπεριοχή αλληλουχίας, 10 περίπου καταλοίπων, με πολύ υψηλή συντήρηση, που ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT (Εικόνα 1.17).

Μεταγενέστερες μελέτες μεταλλαξιγένεσης ανέδειξαν τη λειτουργική σχέση της περιοχής αυτής με την δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος στον UapA (Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, οι μελέτες εστίαστηκαν αρχικά στα εξελικτικά συντηρημένα κατάλοιπα της περιοχής του μοτίβου υπογραφή Gln-408, Asn-409, Gly-411, Thr-416 και Arg-417 που εντοπίζονται στην αλληλουχία του UapA (Koukaki *et al.*, 2005). Η ανάπτυξη του ασκομύκητα σε συνθήκες μοναδικής πηγής αζώτου, ουρικού ή ξανθίνης ή ακόμα και άλλων πουρινών, αναστελλόταν σημαντικά παρουσία μεταλλαγών των καταλοίπων Gln-408 ή Asn-409, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα κατάλοιπα είναι ουσιαστικής σημασίας για τη λειτουργία του UapA. Αντίθετα, μεταλλαγές στα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα του μοτίβου Gly-411 και Thr-416 (G411A, G411P, T416N) βρέθηκε ότι αλλάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα, με τέτοιο τρόπο ώστε, εκτός από ξανθίνη και ουρικό οξύ, να αναγνωρίζει, με μικρότερη συγγένεια, υποξανθίνη και αδείνη (Koukaki *et al.*, 2005), ενώ μετάλλαγμα R417G οδηγεί σε αδυναμία αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης/ουρικού με υποκαταστάσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της πουρίνης (8-αζαξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη) (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Παράλληλα, τα αποτελέσματα των μελετών

οδήγησαν στην πρόταση ότι τα κατάλοιπα Gln-408 και Asn-409 είναι απαραίτητα για την δέσμευση και την μεταφορά του υποστρώματος, αντίστοιχα. Πειράματα ανταγωνισμού με ανάλογα πουρινών έδειξαν ότι το μετάλλαγμα Q408E μπορεί να εμπλέκεται άμεσα στη δέσμευση υποστρώματος σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το πρωτονιωμένο άζωτο N9-H των πουρινών 7-δεαζαξανθίνης, υποξανθίνης ή γουανίνης (Koukaki *et al.*, 2005) ή με την κετοομάδα C8=O του ουρικού οξέος (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη τυχαίας μεταλλαξιγένεσης έδειξε ότι στην ευρύτερη περιοχή αλληλουχίας μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 8 και 9 (Diallinas *et al.*, 1998) εμπεριέχονται δύο ακόμα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα, Glu-356 και Asp-388, που είναι ουσιαστικά για τη λειτουργία του μεταφορέα UapA (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Η συστηματική μελέτη του μεταφορέα UapA συνεχίστηκε αναδεικνύοντας και άλλες σημαντικές περιοχές του μορίου εκτός της περιοχής του μοτίβου υπογραφή. Μια τέτοια περιοχή αποτελεί το δωδέκατο διαμεμβρανικό τμήμα του UapA. Στο μέσον περίπου της έλικας αυτής βρίσκεται μία φαινυλαλαίνη (Phe-528), κατά την αντικατάσταση της οποίας με κάποιο αμινοξύ μικρού μεγέθους (Ser, Ala) προκύπτουν διαφοροποιήσεις στην αναγνώριση και μεταφορά υποστρωμάτων από το μεταφορέα. Συγκεκριμένα αναγνωρίζονται, με χαμηλή συγγένεια, μια σειρά πουρινών (όπως υποξανθίνη, γουανίνη), χωρίς όμως να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του UapA για τα φυσιολογικά του υποστρώματα (ουρικό οξύ, ξανθίνη, οξυπουρινόλη) (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η Phe-528 λειτουργεί ως μοριακό «φίλτρο» για την αναγνώριση των κατάλληλων πουρινών στον UapA και τον αποκλεισμό των πουρινών που δεν είναι υποστρώματα, χωρίς όμως να αποτελεί «αυστηρά», τμήμα του ενεργού κέντρου του μορίου (Vlanti *et al.*, 2006). Ακολούθως, βρέθηκε ότι και τα κατάλοιπα T526 και Q113, το πρώτο στο 12^ο διαμεμβρανικό τμήμα και το δεύτερο στο συνδετικό τμήμα μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 1 και 2 «χαλαρώνουν» την εξειδίκευση του μεταφορέα UapA, αλλά και πάλι χωρίς να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Μελετήθηκε, επίσης, ο ρόλος του μοτίβου Q⁸⁵H⁸⁶ στο μέσον του 1^{ου} διαμεμβρανικού τμήματος του UapA, καθώς και ενός μοτίβου «επανάληψης λευκινών» (leucine zipper) που υπάρχει μόνο στον UapA και όχι σε άλλους μεταφορείς NAT και αποτελείται από τρία κατάλοιπα λευκίνης (L77, L84, L91) που εμπίπτουν διαδοχικά στην μία όψη της προβλεπόμενης διαμεμβρανικής α-έλικας

(Pantazopoulou and Diallinas, 2006). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι το μοτίβο επανάληψης λευκινών παίζει ρόλο στην προσαρμογή του διαμεμβρανικού τμήματος 1 με άλλα διαμεμβρανικά τμήματα του UapA για το καταλληλότερο πακετάρισμα της δομής, η συντηρημένη Q85 είναι σημαντική για τη συγγένεια δέσμευσης και την εξειδίκευση του μεταφορέα, ενώ η συντηρημένη H86 παίζει ρόλο στην έκφραση και την ορθή στόχευση του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη και όχι στη λειτουργία του UapA αυτή καθαυτή (Pantazopoulou and Diallinas, 2006).

Σε πιο πρόσφατες μελέτες, συνδυασμού στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και κατασταλτικών μεταλλαγών που απομονώθηκαν επιλέγοντας για στελέχη του ασκομύκητα με ικανότητα αύξησης σε αδενίνη, οδήγησε την ερευνητική ομάδα του Γ. Διαλλινά να προτείνει ένα μοντέλο λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των περιοχών του διαμεμβρανικού τμήματος 1, διαμεμβρανικού τμήματος 12 και της ευρύτερης περιοχής του μοτίβου υπογραφή μεταξύ των τμημάτων 8 και 9, κατά το οποίο η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζει την συγγένεια δέσμευσης και την εξειδίκευση του UapA για το ουρικό οξύ, που αποτελεί το κυρίως υπόστρωμα του μεταφορέα UapA (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Μια τελευταία μελέτη από το εργαστήριο αυτό υποδεικνύει ότι κατάλοιπα των ελίκων TM9 και TM10 μπορεί να εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταφοράς υποστρώματος και προτείνει ότι υπάρχουν σημαντικές θέσεις τόσο στην κυτταροπλασματική όσο και την εξωκυττάρια πλευρά του UapA οι οποίες καθορίζουν επιλεκτικά την πρόσβαση των υποστρωμάτων στο μονοπάτι μεταφοράς εν είδει πύλης (selective gates) (Kosti *et al.*, 2010).

Μέχρι σήμερα, ο μεταφορέας UapA αποτελεί το εκτενέστερα μελετημένο παράδειγμα ενός *ευκαρυωτικού* μέλους της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2 family). Οι μελέτες του UapA μας δίνουν μια σημαντική βάση σύγκρισης για την κατανόηση των διαφορών αναγνώρισης υποστρωμάτων και εξειδίκευσης, σε σχέση με τον άλλο πολύ καλά μελετημένο μεταφορέα NAT, από ένα πρότυπο *βακτηριακό* σύστημα, τον XanQ, ο οποίος παρουσιάζεται στη συνέχεια.

1.4.2.3 Ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ του εντεροβακτηρίου *E. coli*

Το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 περιέχει 10 γονίδια που κατατάσσονται στην οικογένεια NAT/NCS2 (www.membranetransport.org), εκ των οποίων 5 διατηρούν καθαρά την αλληλουχία του μοτίβου-«υπογραφή» A/G-Q/E-N-X-G-X-X-X-T-G/R/K, και τα γονιδιακά τους προϊόντα έχουν χαρακτηριστεί, οι XanQ και XanP ως ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης (Karatza and Frillingos, 2005), ο UraA ως μεταφορέας ουρακίλης (Anderesen *et al.*, 1995), ο YgfU, πρόσφατα, ως μεταφορέας ουρικού (χαμηλής συγγένειας) (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή, 2011) και ο RutG, ως μεταφορέας ξανθίνης (χαμηλής συγγένειας) (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή, 2011). Τα υπόλοιπα 5 NAT γονίδια δεν διατηρούν το χαρακτηριστικό μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας (Karatza and Frillingos, 2005), και πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα αντίστοιχα γονιδιακά προϊόντα είτε δεν εκφράζονται σε επαρκή επίπεδα στη μεμβράνη (YicO) είτε δεν μπορούν να μεταφέρουν κανένα από τα τρία πιθανά υποστρώματα, ουρικό, ξανθίνη ή ουρακίλη (YbbY, YgfQ, YjcD, PurP) (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή, 2011).

Έως σήμερα, από τα 10 ομόλογα της *E. coli*, οι σχέσεις δομής-λειτουργίας έχουν μελετηθεί εκτενώς με μεταλλαξιγένεση στον μεταφορέα XanQ (Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009, Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Πρόκειται για έναν υψηλής συγγένειας συμμεταφορέα ξανθίνης: H^+ (K_m 4-5 μM) (Karatza and Frillingos, 2005). Παρά το γεγονός ότι η *E. coli* δεν χρησιμοποιεί πουρίνες (εκτός αδενίνης) ως μοναδική πηγή αζώτου και δεν μπορούν να εφαρμοσθούν πρωτόκολλα δοκιμασιών αύξησης (growth assays) σε ξανθίνη, υποξανθίνη ή ουρικό, όπως στο σύστημα του *A. nidulans* (Papageorgiou *et al.*, 2008), υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής άλλων μεθοδολογιών, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και βιοφυσικής, κυρίως, που προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στο βακτηριακό σύστημα. Τα μεθοδολογικά πλεονεκτήματα μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

(1) Τα βακτηριακά μέλη της οικογένειας NAT περιέχουν μικρό σχετικά αριθμό καταλοίπων κυστεΐνης (π.χ. 5 στον XanQ και 4 στον XanP), γεγονός που επιτρέπει ευχερέστερη εφαρμογή των μεθόδων της μεταλλαξιγένεσης κυστεΐνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) (Frillingos *et al.*, 1998), μετά από κατασκευή λειτουργικών μεταφορέων ελεύθερων κυστεϊνών (Cys-less permeases). Αντίθετα, για την εφαρμογή των μεθοδολογιών κυστεΐνικής

σάρωσης σε ευκαρυωτικούς μεταφορείς που περιέχουν συχνά μεγάλο αριθμό καταλοίπων Cys, χρησιμοποιούνται κατ' ανάγκη μεταφορείς που έχουν απαλλαγθεί από *ορισμένες* μόνο και όχι όλες τις εγγενείς (native) κυστεΐνες (μεταφορείς απεμπλουτισμένοι κυστεϊνών, Cys-depleted) (Huntley *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004), εκτός λίγων εξαιρέσεων, για μεταφορείς με 3-8 εγγενή κατάλοιπα Cys, όπως σε περιπτώσεις μεταφορέων από ζυμομύκητες (Berhe *et al.*, 2001; Hatanaka *et al.*, 2001) ή ασκομύκητες (Unkles *et al.*, 2005; Kafasla *et al.*, 2007). Πλήρως λειτουργικοί μεταφορείς ελεύθεροι κυστεϊνών έχουν ήδη κατασκευασθεί και ελεγχθεί λειτουργικά στο εργαστήριό μας τόσο για τον μεταφορέα XanQ όσο και για τον XanP.

(2) Η υπερέκφραση και απομόνωση μεμβρανικών πρωτεϊνών από ένα βακτηριακό σύστημα είναι πιο προσιτή τεχνικά, όπως μαρτυρά και η σχεδόν καθολική επικράτηση βακτηριακών ομολόγων μεταξύ των κρυσταλλικών δομών των μεταφορέων που έχουν λυθεί (κεφάλαιο 1.3).

(3) Υπάρχει επίσης η ευχέρεια μελέτης συγκεκριμένων συνιστωσών του μηχανισμού λειτουργίας τόσο σε πρωτεολιποσωμάτια όσο και σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out membrane vesicles, ή ghost cells) ή σε σφαιροπλάστες (sphaeroplasts), όπου μπορούν να μετρηθούν σταθερές δέσμευσης υποστρωμάτων ή προσδετών υψηλής συγγένειας, ενεργότητες ανταλλαγής (exchange), αντιρροπιστικής ροής (counterflow) ή εκροής (efflux) υποστρώματος (Frillingos *et al.*, 1998; Guan and Kaback, 2006; Kaback *et al.*, 2007, παρούσα εργασία).

Η συστηματική σημειακή μεταλλαξιγένεση και μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα XanQ, που βρίσκεται σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας, ανέδειξαν μερικές σημαντικές περιοχές αλληλουχίας και κατάλοιπα κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία του XanQ (Karatzas *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009; Georgopoulou *et al.*, 2010, Mermelekas *et al.*, 2010).

Μοτίβο «υπογραφή»

Η πρώτη περιοχή που υποβλήθηκε σε συστηματική μεταλλαξιγένεση ήταν η περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» NAT, η οποία ήδη είχε αναδειχτεί ως σημαντική και συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας (βλ.

Εδάφια 1.3.3.1 και 1.3.3.2). Στον μεταφορέα XanQ περιλαμβάνει τα κατάλοιπα ³²³(AQNNGVIQMTG)³³³, και ακολουθείται εκατέρωθεν από μικρές περιοχές αλληλουχίας (GSLPLTTFA) -ανοδικά- και (VASRYVG) -καθοδικά- του μοτίβου αυτού (Karatzá *et al.*, 2006). Πρώτα εξετάστηκαν τα κατάλοιπα του μοτίβου που εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης. Τα κατάλοιπα αυτά στον XanQ είναι η Gln-324, η Asn-325, η Gly-327, η Thr-332 και η Gly-333. Η εικόνα που έδωσε η ανάλυση αυτών των καταλοίπων (Karatzá *et al.*, 2006) μοιάζει αρκετά με την γενική εικόνα των αποτελεσμάτων για τα αντίστοιχα κατάλοιπα του UapA (Koukaki *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα:

- Τα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325 (Q324 και N325) είναι απολύτως απαραίτητα (αναντικατάστατα) για τη μεταφορά υποστρώματος (ξανθίνης). Η Q324 φαίνεται ότι χρειάζεται για την δέσμευση και μεταφορά υποστρώματος με υψηλή συγγένεια (high affinity) εφόσον τα μεταλλάγματα Q324E και Q324N έχουν εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια μεταφοράς (15 φορές μεγαλύτερη K_m από τον φυσικού τύπου XanQ) και δεν αναγνωρίζουν κανένα από τα ανάλογα ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκαν ως προσδέτες (ligands) (Karatzá *et al.*, 2006).
- Τα κατάλοιπα T332 και G333, δεν είναι αναντικατάστατα ως προς τη λειτουργία του XanQ μιας και η αντικατάστασή τους δεν οδηγεί σε απενεργοποίηση αλλά προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην εξειδίκευση αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης, π.χ. το μετάλλαγμα G333R «χαλαρώνει» τους περιορισμούς για την αναγνώριση υποκαταστάσεων στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου και επιτρέπει δέσμευση 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης, οι οποίες δεν αναγνωρίζονται από τον φυσικού τύπου μεταφορέα (Karatzá *et al.*, 2006; Goudela *et al.*, 2005).
- Η αντικατάσταση του G327 με Pro, Cys, ή Ala οδηγεί σε αύξηση της V_{max} κατά 2-3 φορές, χωρίς άλλη σημαντική επίπτωση στην κινητική μεταφοράς ξανθίνης ή στην εξειδίκευση αναγνώρισης πουρινών (Karatzá *et al.*, 2006).
- Επίσης, βρέθηκαν δύο κατάλοιπα με πιθανώς σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα του μορίου του XanQ στη μεμβράνη, ένα πριν (Pro318) και ένα μετά (Gly340) το μοτίβο-υπογραφή, εφόσον η μεταλλαξιγένεση των καταλοίπων αυτών οδηγούσε συστηματικά σε μεταλλάγματα με μηδενική ή ελάχιστη έκφραση στη μεμβράνη της *E. coli* (Karatzá *et al.*, 2006).

Επόμενο βήμα, και συνηθισμένη πειραματική προσέγγιση για ανάλυση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς, ήταν η ανάλυση της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το ειδικό SH-αντιδραστήριο *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM). Η δοκιμασία αλκυλίωσης έδειξε ότι όλες οι θέσεις κατάλοιπων στην περιοχή του μοτίβου υπογραφή είναι προσβάσιμες από το NEM και ορισμένες από αυτές είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση του αντίστοιχου μεταλλάγματος κυστεϊνης (single-Cys mutant) μετά από τροποποίηση με το NEM. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει συμμετοχή των θέσεων αυτών στον μηχανισμό λειτουργίας. Οι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση θέσεις εντοπίζονται σε συνεχόμενα κατάλοιπα της αλληλουχίας του μοτίβου υπογραφή (323-329) και σε μία πλευρά α-έλικας στην αλληλουχία καθοδικά του μοτίβου υπογραφή (332, 333, 336, 339) (Karatza *et al.*, 2006, Georgopoulou *et al.*, 2010).

Διαμεμβρανικό τμήμα 12 (TM12)

Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της αλληλουχίας 419-450, όπου εμπεριέχεται το 12^ο διαμεμβρανικό τμήμα του XanQ (Papakostas *et al.*, 2008) καθώς και οι εκτεταμένες σημειακές μεταλλαξιγενέσεις σε θέσεις που θεωρήθηκαν σημαντικές σε αυτή την περιοχή αλληλουχίας, ανέδειξαν το ρόλο δύο ακόμη σημαντικών θέσεων, στο μέσον περίπου της προβλεπόμενης διαμεμβρανικής α-έλικας, που είναι οι Ile432 (Phe528 στον μεταφορέα UapA) και Asn430 (Thr526 στον UapA) (Papakostas *et al.*, 2008; Παπακώστας Κ. Διδ. Διατριβή, 2011). Χωρίς να είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία του XanQ, τα δύο αυτά κατάλοιπα φαίνεται ότι προκαλούν συγκεκριμένους στερεοχημικούς περιορισμούς στη δέσμευση του υποστρώματος ή αναλόγων του, οι οποίοι οδηγούν σε μεταλλάγματα με μειωμένη ή καθόλου ενεργότητα και μειωμένη συγγένεια για τη μεταφορά ξανθίνης και την αναγνώριση αναλόγων με ογκώδεις υποκαταστάτες. Συγκεκριμένα:

- Για την Asn-430

Μεταλλαξιγένεση της Asn-430 έδωσε την περμεάση N430C, που έχει υψηλή ενεργότητα αλλά είναι πολύ ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από το NEM (IC₅₀ 10μM) και παρουσία ενός μη-μεταφερόμενου υψηλής συγγένειας αναλόγου ξανθίνης, της 2-θειοξανθίνης, προστατεύεται απόλυτα από την επίδραση αυτή. Οι παρατηρήσεις οδηγούν στην υπόθεση ότι αυτό το κατάλοιπο βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Το γεγονός ότι το φυσιολογικό υπόστρωμα, η ξανθίνη, δεν

προστατεύει σε παρόμοιες συνθήκες ($\leq 1\text{mM}$) μπορεί να σημαίνει ότι η συγγένεια πρόσδεσης της ξανθίνης είναι χαμηλότερη από αυτή της 2-θειοξανθίνης, ή ότι λόγω της μεγάλης ταχύτητας μεταφοράς το μεταφερόμενο υπόστρωμα μένει για λιγότερο χρόνο στο κέντρο δέσμευσης από ένα μη-μεταφερόμενο ανάλογο, οπότε δεν παρουσιάζει κάποια ανάλογη προστασία (Papakostas *et al.*, 2008; Παπακώστας Κ. Διδ. Διατριβή, 2011). Παρόμοια εικόνα, δηλαδή υψηλή ενεργότητα, ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM και άλλα αλκυλιωτικά αντιδραστήρια, και απόλυτη προστασία από την απενεργοποίηση από ένα μη-μεταφερόμενο ανάλογο υψηλής συγγένειας αλλά μικρότερη προστασία από το μεταφερόμενο υπόστρωμα, έχει παρατηρηθεί και σε άλλη μία περίπτωση μεταλλάγματος δευτερογενούς μεταφορέα. Πρόκειται για το Cys-148 στην περμεάση λακτόζης LacY της *E. coli* (Frillingos *et al.*, 1998), το οποίο είχε προταθεί ότι βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης και αυτή η εγγύτητα αποδείχθηκε τελικά με την επίλυση της δομής της LacY (Abramson *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2007)

- Για την Ile-432

Ως προς την Ile-432, η οποία βρίσκεται στην άλλη πλευρά της διαμεμβρανικής α-έλικας αλλά στο ίδιο βάθος στη μεμβράνη με την Asn-430, τα αποτελέσματα από την εκτενή μεταλλαξιγένεση δείχνουν ότι μπορεί να επηρεάζει τη δέσμευση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης έμμεσα. Απαιτείται στη συγκεκριμένη θέση ένα κατάλοιπο με πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένου μεγέθους και προσανατολισμού για να επιτρέπεται η σωστή πρόσδεση και μεταφορά του υποστρώματος. Μια αντικατάσταση της Ile-432 που δίνει πιο μεγάλο όγκο ή παρόμοιο όγκο και διαφορετικό προσανατολισμό πλευρικής ομάδας (όπως Phe, Trp, Met ή ακόμα και Leu) οδηγεί σε απενεργοποίηση γιατί μπορεί να εμποδίζει έμμεσα την πρόσδεση ή μεταφορά του υποστρώματος, μέσω στερεοχημικών παρεμποδίσεων και ανεπιθύμητης αναδιάταξης των ελίκων που επηρεάζουν το κατάλοιπο Asn-430 το οποίο βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης. Για τον ίδιο λόγο αλλαγές της Ile-432 με μικρότερο όγκο πλευρικής ομάδας (Ala, Ser, Thr, Val) μπορεί να επιτρέπουν την πρόσληψη ξανθίνης, έστω και με μειωμένη συγγένεια, όμως εμποδίζουν την αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης με ογκώδεις αντικαταστάσεις στον πυριμιδινικό δακτύλιο, κάτι που φαίνεται ιδιαίτερα από την αδυναμία αναγνώρισης των αναλόγων 1-μεθυλοξανθίνη και 6-θειοξανθίνη (Papakostas *et al.*, 2008; Παπακώστας Κ. Διδ. Διατριβή, 2011).

Άλλες περιοχές του XanQ που ανέδειξε η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης

Πρόσφατα, μια συστηματική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης των πολικών καταλοίπων αμινοξέων του XanQ που προβλέπεται ότι βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα οδήγησε στην αποκάλυψη δύο ακόμα αναντικατάστατων καταλοίπων για τη λειτουργία του μεταφορέα, του Glu-272, στο κυτταροπλασματικό άκρο της έλικας TM8, και του Asp-304, στην έλικα TM9a που βρίσκεται πριν από την αλληλουχία του μοτίβου υπογραφή, καθώς και δύο καταλοίπων με σημαντικό ρόλο στη συγγένεια δέσμευσης πουρινών ή στην εξειδίκευση, της His-31, στο μέσο της έλικας TM1, και της Asn-93, στο μέσο της έλικας TM3 (Karena and Frillingos, 2009). Τόσο ο χημικός χαρακτήρας της πλευρικής αλυσίδας όσο και ο λειτουργικός ρόλος των τεσσάρων αυτών καταλοίπων φαίνεται να είναι γενικά συντηρημένος κατά την εξέλιξη, μεταξύ των ομολόγων μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2, βάσει της εκτενούς βιοπληροφορικής ανάλυσης που έγινε (Karena and Frillingos, 2009) και της σύγκρισης με δεδομένα που υπάρχουν για άλλους χαρακτηρισμένους μεταφορείς της οικογένειας (Pantazopoulou and Diallinas, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Varma *et al.*, 2008).

Εντελώς πρόσφατα, μια εκτενέστερη μελέτη κυστεϊνικής σάρωσης ανέδειξε νέα σημαντικά κατάλοιπα στις περιοχές ανοδικά του μοτίβου «υπογραφή» (αλληλουχία 272-305) (Mermelekas *et al.*, 2010). Στην περιοχή αυτή, που ήταν γνωστό ότι περιέχει τα αναντικατάστατα Glu-272 και Asp-304 (Karena and Frillingos, 2009), περιέχονται μια σειρά από σημαντικά για τη λειτουργία του μεταφορέα κατάλοιπα. Αυτά είναι τα Ala-273, Gly-275, Ser-284 (υψηλή ευαισθησία σε NEM η οποία, στην περίπτωση της Gly-275, αυξάνεται παρουσία του υποστρώματος), Tyr-293, Arg-296, Gly-300 και Val-301 (χαμηλή ευαισθησία σε NEM), η Gly-305 που είναι σημαντική για την έκφραση στη μεμβράνη και την ενεργότητα, το μοτίβο ²⁷⁸-TATA-²⁸¹ το οποίο είναι συντηρημένο στα μέλη που μεταφέρουν ξανθίνη και/ή ουρικό οξύ, και φαίνεται να είναι σημαντικό για το κατάλληλο πακετάρισμα της δομής αλληλεπιδρώντας με άλλες περιοχές του μορίου με αποτέλεσμα οι μεταλλαγές του να επηρεάζουν δραματικά την έκφραση και/ή την ενεργότητα, και το Asp-276 όπου είναι απαραίτητη η παρουσία μιας καρβοξυλομάδας (Mermelekas *et al.*, 2010). Άρα αποκαλύπτεται ότι εκτός από το πολύ σημαντικό και ήδη μελετημένο μοτίβο «υπογραφή» (³²³-AQN³³³XGXXXXTG-³³³), υπάρχουν άλλα δύο συντηρημένα και σημαντικά μοτίβα, το ²⁷²-EXXGDXXAT-²⁸¹ στο περιπλασματικό άκρο

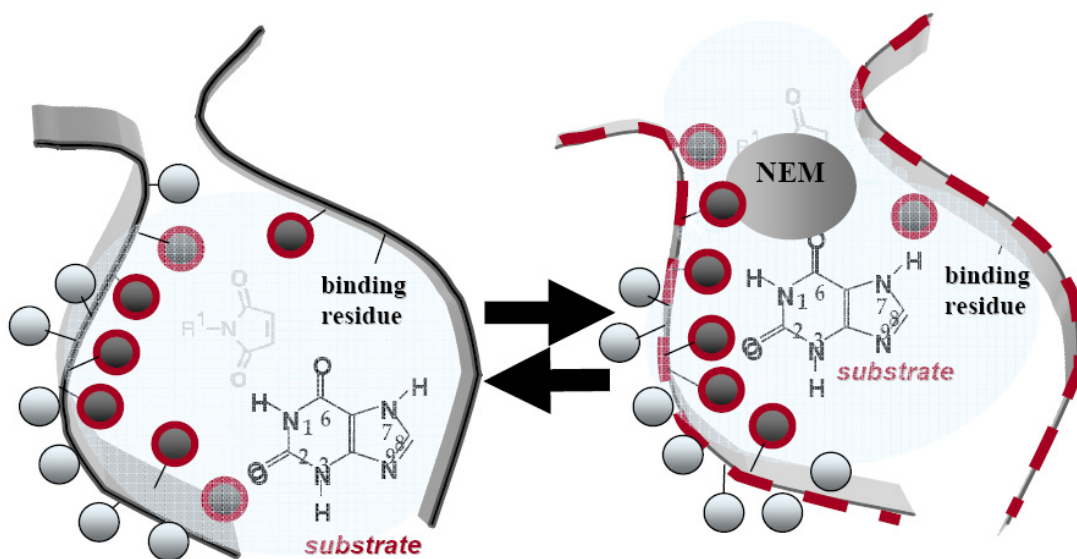
του TM8 και το ³⁰⁰-GXXXDG-³⁰⁵ στο TM9a. Είναι ενδιαφέρον ότι η ευρύτερη αλληλουχία 100 περίπου αμινοξέων που περιλαμβάνει τις TM8, ενδιάμεση υδρόφιλη περιοχή, TM9a, μοτίβο «υπογραφή», και TM9b (κατάλοιπα 257-354) δε φαίνεται να περιέχει άλλα σημαντικά κατάλοιπα εκτός των τριών συντηρημένων μοτίβων που αποκαλύφθηκαν (Mermelekas *et al.*, 2010).

Συνοπτικά, ο μεταφορέας XanQ αποτελεί πλέον παράδειγμα αναλυτικής εξέτασης των σχέσεων δομής-λειτουργίας για ένα βακτηριακό ομόλογο της οικογένειας NAT/NCS2, με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης, και από την παράλληλη σειρά μελετών που γίνεται σε ένα βακτηριακό (XanQ) και σε ένα ευκαρυωτικό (UapA) μέλος της οικογένειας αυτής, προκύπτουν σημαντικά συμπεράσματα για την λειτουργική ομολογία των δύο συστημάτων. Δεδομένου ότι 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 δύο συστήματα μεταφορέων συμφωνούν σε πολύ σημαντικό βαθμό (Diallinas and Gounas, 2008), η συγκριτική ανάλυση των δύο συστημάτων δίνει μια ισχυρή μοριακή βάση για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NAT.

Σημαντικό ωστόσο βήμα στην κατανόηση του μηχανισμού δέσμευσης των μεταφορέων NAT γενικότερα, και του μεταφορέα XanQ ειδικότερα αποτελεί η αποσαφήνιση ενός ολοκληρωμένου μοντέλου των σχέσεων δομής-λειτουργίας για την οικογένεια NAT/NCS2 όπου θα προσδιορίζονται: I, αναντικατάστατα κατάλοιπα του μηχανισμού που είναι βασικά για όλους τους μεταφορείς NAT. II, πλευρικές ομάδες καταλοίπων που υπαγορεύουν συγκεκριμένες αλλαγές εξειδίκευσης. III, οι θέσεις των καταλοίπων αυτών σε σχέση με το ενεργό κέντρο δέσμευσης-μεταφοράς υποστρωμάτων.

Πώς, όμως, ορίζεται αυτό το σημαντικό υποσύνολο καταλοίπων ή μοριακών περιοχών-στόχων; Πρόκειται καταρχήν για θέσεις καταλοίπων που έχουν αναδειχθεί από τις προηγούμενες μελέτες συστηματικής μεταλλαξιγένεσης του μεταφορέα XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009, Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010) και όπου συμβαίνει ένα εκ των εξής: *είτε* (1) οποιαδήποτε αλλαγή πλευρικής ομάδας αναστέλλει τη λειτουργία της πρόσληψης υποστρώματος (ξανθίνης), *είτε* (2) η λειτουργία επιτρέπεται μόνο με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, π.χ. μέγεθος ή υδρόφοβο/πολικό χαρακτήρα της

πλευρικής ομάδας, είτε (3) η λειτουργία επιτρέπεται ακόμη και με μεγάλες αλλαγές, αλλά αύξηση του μεγέθους της πλευρικής ομάδας με αλκυλίωση οδηγεί σε απενεργοποίηση. Όπως έχει φανεί και από άλλες μελέτες με μεταφορείς «δευτερογενούς» τύπου (Kaback et al., 2007; Tavoulari and Frillingos, 2008), οι θέσεις αυτές είναι πιθανό να εμπλέκονται ενεργά στον μηχανισμό αναγνώρισης-μεταφοράς υποστρώματος και καθορισμού της εξειδίκευσης. Στην περίπτωση (3), ιδιαίτερα, αναφερόμαστε στην ομάδα των μεταλλαγμάτων κυστεϊνών που είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο και άλλα SH-αντιδραστήρια (NEM-sensitive mutants) (Εικόνα 1.18). Εφόσον οι θέσεις αυτών των μεταλλαγμάτων αναμένεται να είναι στην περιφέρεια του κέντρου δέσμευσης ή σε σημαντικές περιοχές της διαμεμβρανικής διόδου του υποστρώματος (Εικόνα 1.18), μπορεί να είναι κομβικής σημασίας για τον μηχανισμό ή ακόμη, όπως έχει δείχτει σε μία τουλάχιστον ανάλογη περίπτωση (MelY; Tavoulari and Frillingos, 2008), για τον καθορισμό της προτίμησης επιλογής μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων (substrate selectivity).



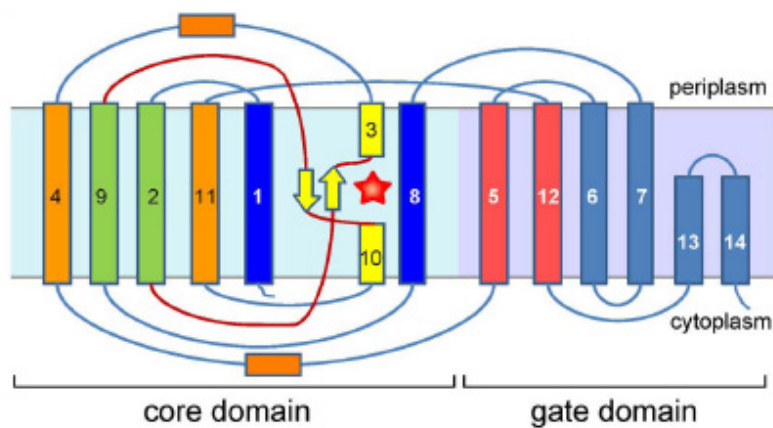
Εικόνα 1.18 Δομικός-μηχανιστικός ρόλος καταλοίπων όπου η αύξηση του μεγέθους μιας εγκατεστημένης Cys (Cys-mutant) από SH-ειδικά αντιδραστήρια (όπως το NEM) οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση ενός ενεργού μορίου μεταφορέα (NEM-sensitive positions): Τα κατάλοιπα αυτά (κύκλοι κόκκινου περιγράμματος στο σχήμα) δεν αντιδρούν απευθείας με το υπόστρωμα, δεν είναι δηλ. κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης, αλλά παρεμποδίζουν τις αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση υποστρώματος (όπως φαίνεται π.χ. δεξιά στο σχήμα) και καταστέλλουν τη δυναμική κίνηση του μεταφορέα κατά την εναλλαγή των διαμορφώσεων του ενεργού κέντρου (αμφίδρομα έντονα βέλη στο σχήμα). Κατάλοιπα αυτού του τύπου βρίσκονται κατά κανόνα στην περιφέρεια του κέντρου δέσμευσης ή «επενδύουν» σημαντικές περιοχές της διόδου του υποστρώματος (π.χ. πολικές όψεις αμφιπαθικών α-ελίκων), σε θέσεις υψηλής εξελικτικής συντήρησης (Karena and Frillingos, 2009).

1.5 Η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2

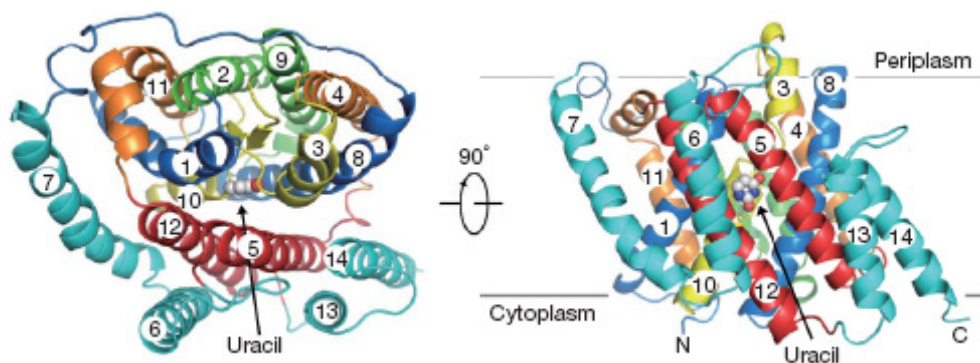
Εντελώς πρόσφατα (Lu *et al.*, 2011) λύθηκε η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός μέλους της οικογένειας NAT/NCS2. Σε αυτό το σημείο υπενθυμίζεται ότι καμία κρυσταλλική δομή δεν είχε λυθεί για τους μεταφορείς NAT έως σήμερα, και όλες οι πληροφορίες που υπήρχαν για τη δομή τους και για τον τρόπο λειτουργίας τους προέρχονταν μόνο από βιοχημικά, μοριακά και βιοφυσικά δεδομένα από τα 22 χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας και ιδιαίτερα από τα εκτενώς μελετημένα UraA και XanQ. Η μέχρι τώρα εικόνα που είχαμε για την τοπολογική οργάνωση των μεταφορέων NAT προερχόταν από αλγόριθμους πρόβλεψης δομής και έδινε ένα γενικό τοπολογικό μοντέλο με δύο κύρια χαρακτηριστικά: **(A)** Μέχρι και το 8ο διαμεμβρανικό τμήμα (TM8), όλοι οι αλγόριθμοι συμφωνούν εν γένει τόσο στον αριθμό όσο και στα όρια των προβλεπόμενων TMs και για όλους, τους χαρακτηρισμένους τουλάχιστον, μεταφορείς NAT. **(B)** Μετά το TM8, δηλ. στο C-τελικό τρίτο του μορίου, τόσο οι διαφορετικοί αλγόριθμοι (βλ. Καρενά, 2007) όσο και ο κάθε αλγόριθμος εφαρμοζόμενος σε διαφορετικά ομόλογα μεταφορέων (Μερμελέκας Γ., Διδ. Διατριβή 2009) δίνει αρκετά διαφορετικές προβλέψεις, κυρίως γιατί υπάρχει αβεβαιότητα στην ανάλυση της εκτενούς συνδετικής περιοχής μεταξύ 8ου και 9ου TM. Η νέα κρυσταλλική δομή που έρχεται να ρίξει φως στην τοπολογική οργάνωση των μεταφορέων NAT προέρχεται από τον συμμεταφορέα ουρακίλης/H⁺ UraA της *E. coli* (Andersen *et al.*, 1995).

Η δομή του UraA λύθηκε σε ευκρίνεια 2.8 Å και αντιπροσωπεύει ένα νέο δομικό μοντέλο σε σχέση με τα μοντέλα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που έχουν λυθεί έως σήμερα. Η δομή αποτελείται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs 1-14), τα οποία χωρίζονται σε δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις (**Εικόνα 1.19**) με το αμινο- και καρβοξυτελικό άκρο να εντοπίζονται κυτταροπλασματικά (**Εικόνα 1.20**). Τα TM13 και TM14 δεν διαπερνούν εξ ολοκλήρου τη μεμβράνη αλλά μέχρι περίπου τη μέση (**Εικόνα 1.19**). Μεταξύ των TM3 και TM10 υπάρχει ένα ζεύγος από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες (**Εικόνα 1.19**) οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην δομική οργάνωση του μορίου και στην αναγνώριση υποστρώματος και εντοπίζονται περίπου στο κέντρο της δομής (**Εικόνα 1.19**). Κάθε β-πτυχωτή επιφάνεια ακολουθείται από εκτεταμένες «ελεύθερες» περιοχές («unwound

fragment») που καταλήγουν στα διαμεμβρανικά TM3 και TM10. Ασυνεχείς έλικες έχουν παρατηρηθεί και στις δομές άλλων διαμεμβρανικών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου [LeuT_{La}, GlpT] όπου το δομικό μοτίβο α-έλικα/«θηλειά»/α-έλικα φαίνεται να συσχετίζεται με τη μεταφορά των ιόντων (Scrapanti and Hunte, 2007). Το 11-πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή της οικογένειας NAT, και που από μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας (Karatza *et al.*, 2006; Georgoroulou *et al.*, 2010, Mermelekas *et al.*, 2010; Μερμελέκας, Γ., Διδ.Διατριβή 2009), της ερευνητικής ομάδας του Γ. Διαλλινά (Diallinas *et al.*, 1998; Amillis *et al.*, 2000; Koukaki *et al.*, 2005) καθώς και από αλγορίθμους τοπολογίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) προβλεπόταν κατά μεγάλο μέρος του σαν μια κυτταροπλασματική ή επανεισερχόμενη «θηλειά», στη λυθείσα δομή του UraA αποτελεί τη 10^η α-έλικα (μέρος του TM10) που είναι ενσωματωμένη στη μεμβράνη (**Εικόνα 1.19**). Οι αναλύσεις κυστεϊνικής σάρωσης του XanQ, βέβαια, είχαν ήδη αναδείξει ότι η περιοχή των καταλοίπων Ile-329 έως Val-339 (που περιλαμβάνει τη μισή αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή, 329-333) θα πρέπει να είναι σε διάταξη α-έλικας, λόγω της περιοδικότητας της ευαισθησίας των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων κυστεϊνης στο αντιδραστήριο NEM (Karatza *et al.*, 2006).



Εικόνα 1.19 Τοπολογικό διάγραμμα του μεταφορέα ουρακίλης UraA. Τα TMs διευθετούνται σε δύο διακριτές περιοχές, την περιοχή του «πυρήνα» (core domain) και την περιοχή της «εισόδου» (gate domain). Το κόκκινο αστέρι συμβολίζει το υπόστρωμα (ουρακίλη).



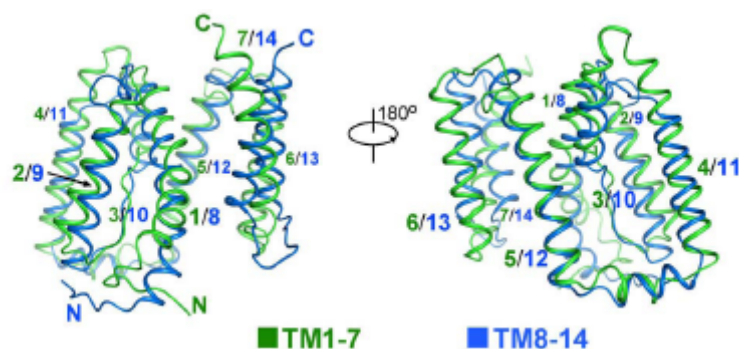
Εικόνα 1.20 Η δομή του UraA αποκαλύπτει ένα νέο δομικό μοτίβο. Απεικονίζονται δύο κάθετες όψεις της δομής, μία όπως φαίνεται από το περίπλασμα (αριστερά) και μία όπως φαίνεται από το πλάι της μεμβράνης (δεξιά). Η δεσμευμένη ουρακίλη επισημαίνεται με βέλος.

Οι 14 διαμεμβρανικές έλικες (TM1-14) του UraA χωρίζονται σε δύο διακριτές δομικές επαναλήψεις. Η πρώτη περιλαμβάνει τα TM1 έως TM7 και η δεύτερη τα TM8 έως TM14. Οι δύο αυτές δομικές επαναλήψεις σχετίζονται μεταξύ τους, με άξονα συμμετρίας τη μεμβράνη, αν περιστραφεί η μία ως προς την άλλη κατά 180° (**Εικόνα 1.21**). Η παρουσία τέτοιων δομικών επαναλήψεων είναι επίσης ένα κοινό γνώρισμα των δομών πολλών πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς (LeuT) καθώς και διαύλων (FocA). Τα 14 TMs χωρικά οργανώνονται στην περιοχή του «πυρήνα» (core domain) και στην περιοχή της «εισόδου» (gate domain). Η περιοχή του «πυρήνα» αποτελείται από τις έλικες 1 έως 4 (TM1-TM4) και 8 έως 11 (TM8-TM11) ενώ η περιοχή της «εισόδου» από τις υπόλοιπες 6 έλικες (TM5-TM7 και TM12-TM14) (**Εικόνα 1.22**). Ο χώρος που σχηματίζεται μεταξύ των δύο περιοχών καταλαμβάνεται κυρίως από υδρόφοβα κατάλοιπα των TM1, TM3 και TM8 (περιοχή «πυρήνα») και TM5 και TM12 (περιοχή «εισόδου») (**Εικόνα 1.22**).

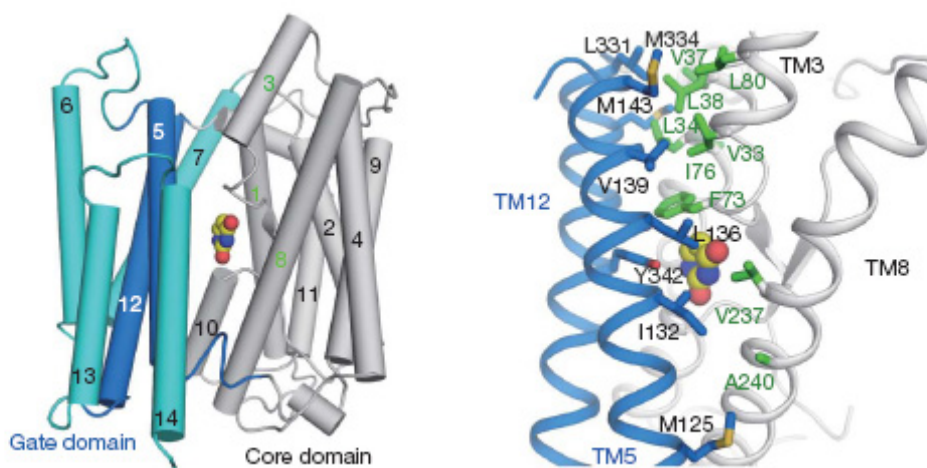
Οι αλληλεπιδράσεις των περιοχών στο εσωτερικό του μορίου σταθεροποιούνται από τη δέσμευση ενός μορίου β -NG (β -εννεϋλογλυκοσιδίου), το οποίο προστέθηκε κατά το τελευταίο στάδιο του καθαρισμού της πρωτεΐνης, ενώ η ουρακίλη είχε συμπεριληφθεί καθ'όλη τη διάρκεια του καθαρισμού καθώς και στο στάδιο της κρυστάλλωσης. Η παρουσία του β -NG δεν εμποδίζει τη δέσμευση της ουρακίλης και τη μεταφορά της, αλλά η απουσία του β -NG στο μόριο της πρωτεΐνης που δεν περιλαμβάνει δεσμευμένο υπόστρωμα οδηγεί σε κατακρήμνισή της, εμποδίζοντας περαιτέρω βιοχημικές μελέτες.

Παρά την υδρόφοβη φύση του, ο χώρος που σχηματίζεται μεταξύ των περιοχών του «πυρήνα» και της «εισόδου», περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου που βρίσκονται «κρυμμένοι» στην περιοχή του «πυρήνα» μεταξύ των

TM3 και TM10 και των β-πτυχωτών επιφανειών στο κέντρο του μορίου. Εκτός των συμβατικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών, η υδροξυλομάδα της Tyr-288 [αντιστοιχεί στην Phe-222 στον XanQ, κατάλοιπο που προηγείται του 1^{ου} κατάλοιπου του μοτίβου-υπογραφή (Ala-323)] του TM10, σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου με το οξυγόνο του καρβονυλίου και το άζωτο της αμιδικής ομάδας της Ser-71 (αντιστοιχεί στη Ser-91 στον XanQ) του TM3. Υπάρχουν άλλοι 12 δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των TM3/TM10 και των άλλων διαμεμβρανικών τμημάτων. Αυτές οι εκτενείς αλληλεπιδράσεις μπορεί να διευκολύνουν τη διαμόρφωση των «ελεύθερων» εκτεταμένων τμημάτων των TM3 και TM10 καθώς και να περιορίζουν την κίνηση των διαμεμβρανικών ελίκων μέσα στην περιοχή του «πυρήνα».



Εικόνα 1.21 Υπέρθυση των δύο ανεστραμμένων δομικών επαναλήψεων του UraA.

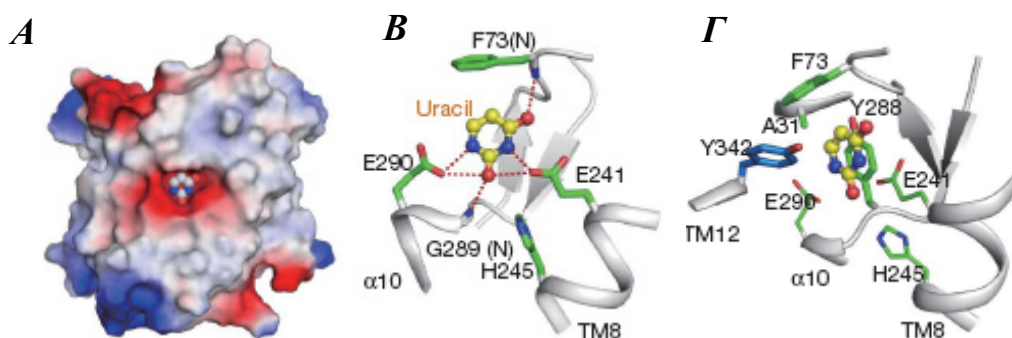


Εικόνα 1.22 Αριστερά: με μπλέ χρώμα σημειώνονται οι έλικες που συμμετέχουν στο σχηματισμό της περιοχής της «εισόδου» (gate domain) και με γκρι οι έλικες της περιοχής του «πυρήνα» (core domain). Δεξιά: Σημειώνονται τα κατάλοιπα που προκαλούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών του «πυρήνα» (πράσινο χρώμα) και της «εισόδου» (μπλέ χρώμα). Η ουρακίλη σημειώνεται με κίτρινες σφαίρες.

Οι αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και οι συνδετικές «θηλειές» των TM3 και TM10 παρέχουν ουσιαστικά ένα «καταφύγιο» για την ουρακίλη μεταξύ των περιοχών του «πυρήνα» και της «εισόδου». Ο πυριμιδικός δακτύλιος της ουρακίλης ο οποίος στη δομή είναι παράλληλος προς τις β-πτυχωτές επιφάνειες (**Εικόνα 1.23Γ**), περιστοιχίζεται από αρνητικά ηλεκτροστατικά δυναμικά (**Εικόνα 1.23Α**). Η αναγνώριση της ουρακίλης πραγματοποιείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από την περιοχή του «πυρήνα», περιλαμβάνοντας κατάλοιπα από τα TM1, TM3, TM8, TM10 και TM12 (περιοχή «εισόδου»). Δύο κατάλοιπα γλουταμικού, το Glu-241 (αντιστοιχεί στο αναντικατάστατο Glu-272 στον XanQ) και το Glu-290 (αντιστοιχεί στην επίσης αναντικατάστατη Gln-324 στον XanQ), «αγκυροβολούν» την ουρακίλη σχηματίζοντας από δύο δεσμούς υδρογόνου το καθένα (**Εικόνα 1.23Β**). Αντικατάσταση των γλουταμικών με αλανίνη οδηγεί σε πλήρη απώλεια της δεσμευτικής ικανότητας του UraA για την ουρακίλη. Επιπρόσθετα, τα δύο άτομα οξυγόνου των κετοομάδων της ουρακίλης σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα αζώτου των αμιδίων της Phe-73 (αντιστοιχεί στην Phe-94 στον XanQ) και της Gly-289 (αντιστοιχεί στο 1^ο κατάλοιπο του μοτίβου-υπογραφή και αντικείμενο μελέτης και της παρούσας διατριβής, Ala-323 στον XanQ). Μια υδροξυλομάδα στο μόριο του β-NG, σχηματίζει επίσης δεσμούς υδρογόνου με ένα άτομο αζώτου του ιμιδαζολίου της His-245 (αντιστοιχεί στο Asp-276 στον XanQ) αλλά και με το οξυγόνο της κετοομάδας στη θέση 2 της ουρακίλης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένα μόριο νερού μπορεί να καταλαμβάνει τη θέση του υδροξυλίου του β-NG στη φυσική δομή και να δημιουργεί παρόμοιες αλληλεπιδράσεις. Σε αυτή την περίπτωση η His-245 μπορεί να συνεισφέρει στη δέσμευση της ουρακίλης με ένα δεσμό υδρογόνου δια μέσου ενός μορίου νερού. Σε συμφωνία με αυτή τη θεωρία είναι και το γεγονός της απώλειας της δεσμευτικής ικανότητας του UraA για την ουρακίλη όταν η His-245 αντικατασταθεί με Ala.

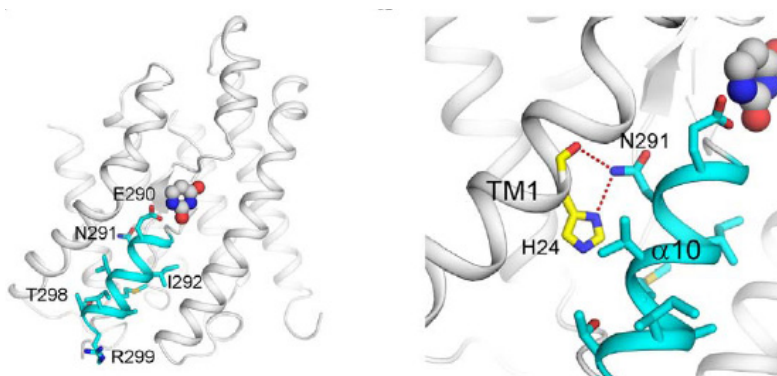
Το μόριο της ουρακίλης το συντονίζουν εκτός από τους δεσμούς υδρογόνου που προαναφέρθηκαν, και αλληλεπιδράσεις van der Waals που περιλαμβάνουν τα κατάλοιπα Ala-31 (αντιστοιχεί στην Pro-38 στον XanQ), Phe-73 (αντιστοιχεί στην Phe-94 στον XanQ), Tyr-288 [αντιστοιχεί στην Phe-222 στον XanQ, κατάλοιπο που προηγείται του 1^{ου} καταλοίπου του μοτίβου-υπογραφή (Ala-323)] και Tyr-342 (αντιστοιχεί στην Phe-376 στον XanQ). Η Phe-73 εμποδίζει την πρόσβαση από το περίπλασμα στο δεσμευμένο υπόστρωμα, ενώ ο φαινολικός δακτύλιος της Tyr-288 διευθετείται παράλληλα ως προς τον πυριμιδικό δακτύλιο της ουρακίλης. Η Tyr-

342 είναι το μόνο κατάλοιπο από την περιοχή της «εισόδου» που συνεισφέρει στη δέσμευση της ουρακίλης (**Εικόνα 1.23Γ**). Η παρουσία αρωματικών καταλοίπων γύρω από το κέντρο δέσμευσης είναι κάτι συνηθισμένο για μεμβρανικούς μεταφορείς (vSGLT, BetP, AdiC, LacY). Τα ογκώδη αυτά κατάλοιπα μπορούν να απομονώσουν αποτελεσματικά το υπόστρωμα από το εξωτερικό περιβάλλον αλλά και να συνεισφέρουν στη σταθερότερη δέσμευση του υποστρώματος στην περίπτωση των μεταφορέων πουρινών/πυριμιδινών μέσω της αλληλεπίδρασης παράλληλων αρωματικών δακτυλίων (aromatic stacking).



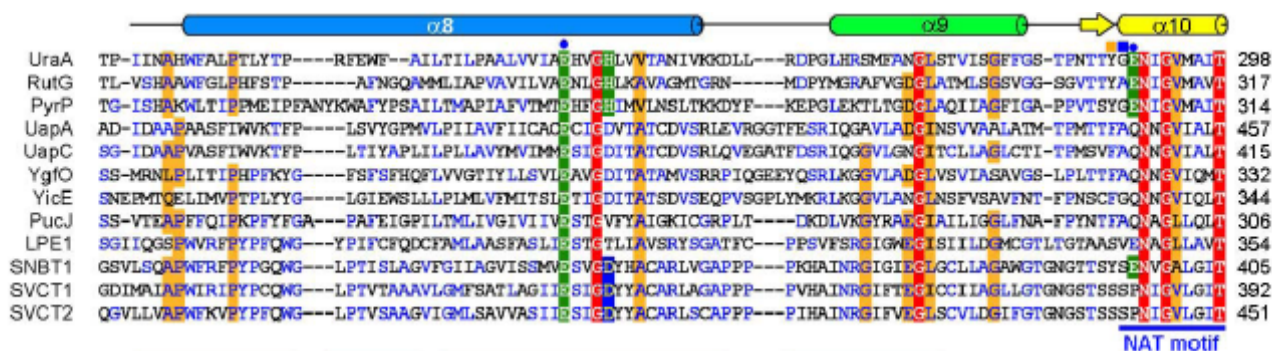
Εικόνα 1.23 Συντονισμός της ουρακίλης από τον UraA. **A**. Η ουρακίλη βρίσκεται σε μια κοιλότητα και περιβάλλεται από αρνητικά ηλεκτροστατικά δυναμικά. Το μόριο της ουρακίλης συντονίζεται από πολικές αλληλεπιδράσεις (**B**) και αλληλεπιδράσεις van der Waals (**Γ**).

Η απόλυτα συντηρημένη στα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας NAT, Asn-291, που εντοπίζεται στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή, φαίνεται να στρέφεται μακριά από το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος στη λυθείσα δομή του UraA (**Εικόνα 1.24**).



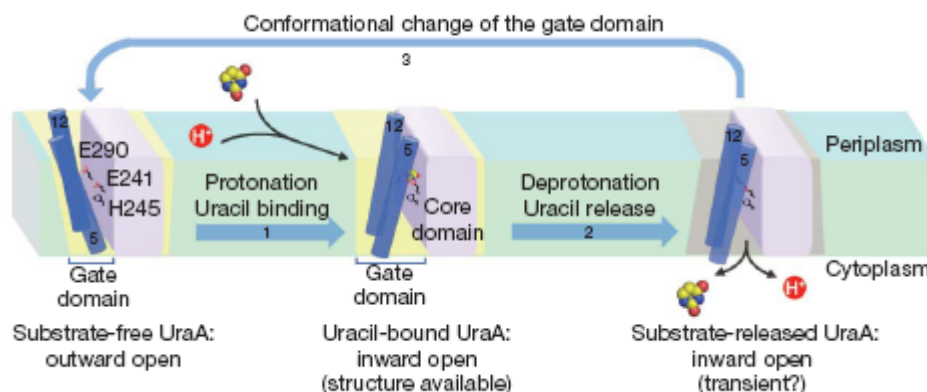
Εικόνα 1.24 Αριστερά: Η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (γαλάζιο χρώμα) όπως εντοπίζεται στη δομή του UraA. Δεξιά: Η Asn291 του μοτίβου-υπογραφή σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το άτομο του οξυγόνου του καρβονυλίου και με την πλευρική αλυσίδα του μαδαζολικού δακτυλίου της απόλυτα συντηρημένης στα μέλη της οικογένειας NAT, His24. Οι δεσμοί υδρογόνου σημειώνονται με κόκκινες διάστικτες γραμμές.

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε γενικά για την οικογένεια NAT, ο UraA φαίνεται να είναι ένας εξαρτώμενος από διαβάθμιση πρωτονίων μεταφορέας ουρακίλης και να επιτελεί συμμεταφορά ουρακίλης/ H^+ . Η μετατόπιση του πρωτονίου βασίζεται πάνω στην πρωτονίωση και αποπρωτονίωση καταλοίπων που συμμετέχουν σε αυτό το μηχανισμό δέσμησης και απελευθέρωσής του. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, τα κατάλοιπα **Glu-241** (αντιστοιχεί στο αναντικατάστατο Glu-272 στον XanQ), **His-245** (αντιστοιχεί στο Asp-276 στον XanQ) και **Glu-290** (αντιστοιχεί στην επίσης αναντικατάστατη Gln-324 στον XanQ), που μπορούν πρωτονιωθούν και αποπρωτονιωθούν, βρίσκονται στο χώρο που σχηματίζεται μεταξύ της περιοχής του «πυρήνα» και της περιοχής της «εισόδου» και είναι απαραίτητα για τη δέσμηση της ουρακίλης (**Εικόνα 1.23B**). Αυτή η διευθέτηση των καταλοίπων υπονοεί ότι εμπλέκονται στον κύκλο μεταφοράς του πρωτονίου. Περιέργως όμως, μόνο η **Glu-241** είναι απόλυτα συντηρημένο κατάλοιπο στους μεταφορείς της οικογένειας NAT. Η **His-245** συναντάται ως Asp, Val ή Thr στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας ενώ το **Glu-290** ως Gln ή Pro. Μια πιο προσεκτική ματιά στη συντήρηση αυτών των καταλοίπων αποκαλύπτει ότι, στους μεταφορείς πυριμιδινών (RutG, PyrP και SNBT1) το **Glu-290** συντηρείται (**Εικόνα 1.25**). Το ίδιο παρατηρείται και για τη συντήρηση της **His-245** στους μεταφορείς RutG και PyrP που αποτελούν συμμεταφορείς H^+ /πυριμιδινών ενώ στα μέλη της οικογένειας που συμμεταφέρουν με το υπόστρωμα και Na^+ (SNBT1, SVCT1) η ιστιδίνη αντικαθίσταται με ασπαρτικό (Asp). Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν μια δυνητική συντήρηση στους μηχανισμούς μεταφοράς ιόντων με την **His-245** να παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του H^+ και το Asp να έχει αντίστοιχο ρόλο στη μεταφορά του Na^+ (Lu *et al.*, 2011). Θα πρέπει ωστόσο να επισημανθεί ότι η παρατήρηση αυτή δεν μπορεί να δικαιολογήσει γιατί οι μεταφορείς UapA και XanQ που έχουν Asp στη θέση αυτή λειτουργούν ως συμμεταφορείς πουρινών/ H^+ ενώ και για την UraA δεν έχει αποδειχθεί ότι συμμεταφέρει ιόντα H^+ αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι μεταφέρει την ουρακίλη με μηχανισμό διευκολυνόμενης διάχυσης (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή, 2011).



Εικόνα 1.25 Στοιχισή αλληλουχιών χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NAT που περιλαμβάνει τις διαμεμβρανικές έλικες TM8, TM9 και TM10 (μοτίβο-υπογραφή) του UraA. Τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής του UraA σημειώνονται πάνω από τη στοιχισή των αλληλουχιών. Τα απόλυτα και υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα σημειώνονται με κόκκινη και πορτοκαλί γραμμοσκίαση αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα που συνδέονται με τις πλευρικές και κύριες ομάδες τους, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με την ουρακίλη σημειώνονται με μπλέ σφαίρες και μπλέ τετράγωνα αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα που συνδέονται με την ουρακίλη μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals σημειώνονται με πορτοκαλί τετράγωνα. Τα ουσιώδη κατάλοιπα Glu και His σημειώνονται με πράσινη γραμμοσκίαση. Η στοιχισή των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalW. Στην παραπάνω στοιχισή, που προέρχεται από τη δημοσίευση των Lu *et al.* (2011), οι συντμήσεις YgfO και YicE (παλαιότερες ονομασίες) αναφέρονται στους μεταφορείς XanQ και XanP, αντίστοιχα (νεότερες ονομασίες).

Ο μηχανισμός που προτείνεται για τη μεταφορά της ουρακίλης από τον UraA βάσει των δομικών και βιοχημικών αναλύσεων (Lu *et al.*, 2011) συνοψίζεται στα εξής: η προεπιλεγμένη διαμόρφωση του μεταφορέα χωρίς δεσμευμένο υπόστρωμα είναι ανοιχτή προς το περίπλασμα και τα δύο κατάλοιπα Glu (241 και 290) είναι αποπρωτονιωμένα. Τα αρνητικά φορτία των Glu δεν επιτρέπουν την προσέγγιση των περιοχών του «πυρήνα» και της «εισόδου». Κατά τη δέσμευση της ουρακίλης και του H^+ , τουλάχιστον ένα από τα δύο κατάλοιπα Glu πρωτονιώνεται και η περιοχή της «εισόδου» υπόκειται σε διαμορφωτικές αλλαγές, δημιουργώντας μια δομή ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. Είναι δυνατόν να συμβαίνει μια μετατόπιση του H^+ από το Glu στην His-245, και έπειτα, από την His-245 στο κυτταρόπλασμα, μέσω μορίων νερού που βρίσκονται στο ανοιχτό προς το κυτταρόπλασμα κέντρο δέσμευσης. Η αποπρωτονίωση μπορεί να δημιουργεί τοπικές διαμορφωτικές αλλαγές γύρω από τα κατάλοιπα **Glu-241**, **His-245** και **Glu-290**, οδηγώντας στην απελευθέρωση της ουρακίλης. Η ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα, αποπρωτονιωμένη διαμόρφωση του μεταφορέα είναι παροδική και γρήγορα επανέρχεται στην ανοιχτή προς το περίπλασμα κατάσταση ώστε να δεσμεύσει ξανά υπόστρωμα και να αρχίσει ένας καινούριος κύκλος μεταφοράς (Εικόνα 1.26).



Εικόνα 1.26 Μοντέλο εργασίας που απεικονίζει τον πιθανό μηχανισμό μεταφοράς του UraA. Τα κατάλοιπα Glu-241, His-245 και Glu-290 σημειώνονται πάνω στο μοντέλο λόγω της σημαντικότητας που έχουν στην αναγνώριση του υποστρώματος και την μετατόπιση του πρωτονίου. Για λόγους απλούστευσης σημειώνονται μόνο τα TM5 και TM12 της περιοχής της «εισόδου» (gate domain).

Το μοντέλο αυτό (**Εικόνα 1.26**) προβλέπει ότι η περιοχή του «πυρήνα» παρέχει τη μοριακή βάση για την εξειδίκευση του υποστρώματος και τη μετακίνηση των ιόντων (H^+/Na^+), ενώ οι διαμορφωτικές αλλαγές της περιοχής της «εισόδου» επιτρέπουν την μετατόπιση του υποστρώματος. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ακόμα αναπάντητα ερωτήματα για το μηχανισμό μεταφοράς της ουρακίλης, όπως η στοιχειομετρία της αντίδρασης μεταφοράς ουρακίλης/ H^+ , ο μηχανισμός με τον οποίο τα συντηρημένα κατάλοιπα **Glu** και **His** πυροδοτούν τις διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης. Ωστόσο, η νέα αυτή δομή που ήρθε στο φως και που αποτελεί την πρώτη δομή για τους μεταφορείς της οικογένειας NAT, δίνει τις βάσεις για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δέσμευσης και τις διαφορές εξειδίκευσης που χαρακτηρίζουν τους μεταφορείς NAT.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνήσει τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στο κέντρο δέσμευσης των μεταφορέων NAT/NCS2, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο εργασίας τον μεταφορέα XanQ της *E. coli* και επίσης να διαλευκάνει τους καθοριστές εξειδίκευσης της μεταφοράς του υποστρώματος μεταξύ του XanQ και άλλων μελών της οικογένειας (UapA, YgfU). Πιο συγκεκριμένα οι κύριοι άξονες της εργασίας ήταν:

- Εξέταση με λειτουργικό τρόπο των σημαντικών καταλοίπων που έχουν αναδειχτεί με την κλασσική μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης στον μεταφορέα XanQ ως προς την ικανότητά τους για τη δέσμευση του υποστρώματος. Στην πορεία της διατριβής, η διερεύνηση αυτή εστιάστηκε στη μελέτη του ρόλου των σημαντικών καταλοίπων της περιοχής του μοτίβου «υπογραφή», για το οποίο υπήρχαν ήδη σημαντικές ενδείξεις ότι εμπλέκεται στη δέσμευση του υποστρώματος (Karatza *et al.*, 2006) και, πειραματικά, πραγματοποιήθηκε με μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος (ξανθίνη) στις λειτουργικές ιδιότητες μιας σειράς μεταλλαγμάτων του μοτίβου-υπογραφή.
- Μελέτη και ανάδειξη των καθοριστών της εξειδίκευσης (περιοχών ή/και καταλοίπων) της μεταφοράς του υποστρώματος που διαφοροποιούν το προφίλ αναγνώρισης πουρινών του XanQ από αυτό του UapA ή του YgfU, κατασκευάζοντας χιμαιρικούς μεταφορείς μεταξύ των ομολόγων. Κατά την εξέλιξη της διατριβής εστιαστήκαμε στο διαμεμβρανικό τμήμα 12 (TM12) (Papakostas *et al.*, 2008) και στη μελέτη του ρόλου του στην εξέλιξη της αναγνώρισης του υποστρώματος και της διαφοράς εξειδίκευσης μεταξύ των μεταφορέων XanQ και UapA.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι, σύμφωνα με το δομικό μοντέλο της οικογένειας που προέκυψε πρόσφατα από την κρυσταλλογραφική ανάλυση του UraA (Lu *et al.*, 2011), η μεν περιοχή του μοτίβου-υπογραφή που εξετάζουμε στο μέρος A είναι βασική στην δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain) και περιέχει τουλάχιστον ένα κατάλοιπο που εμπλέκεται άμεσα στο κέντρο δέσμευσης (Gln-324, αντίστοιχο του Glu-290 στον UraA), ενώ η περιοχή του TM12 που εξετάζουμε στο μέρος B ανήκει στη δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain) και μπορεί να παίζει

καθοριστικό ρόλο στις αλλαγές διαμόρφωσης που επιτρέπουν την εναλλασσόμενη πρόσβαση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης από τις δύο πλευρές της μεμβράνης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Όργανα

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω εργαστηριακά όργανα:

- ✦ Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5415 D
- ✦ Συσσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California)
- ✦ Φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory products GmbH, Hanau, Germany)
- ✦ Συσσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων (Microliter Syringes), Hamilton (Bonaduz, Switzerland)
- ✦ Συσσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Mini Trans-Blot transfer (Bio-Rad, Hercules, California). Η ηλεκτροφορητική μεταφορά έγινε σε μεμβράνη πολυβινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri)
- ✦ Φυγόκεντρος Sorval RC-5B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut)
- ✦ Φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (Speedvac concentrator) (Savant Instruments, Hicksville, New York)
- ✦ Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut), του Λειτουργικού-Κλινικοεργαστηριακού Τομέα της Ιατρικής Σχολής (εργαστήριο Φαρμακολογίας) ή του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος (εργαστήριο Βιοχημείας)
- ✦ Συσσκευή ταχείας διήθησης (glass filter holder assembly) (Fischer Scientific, Pittsburg, 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), η οποία ήταν εγκατεστημένη στο χώρο του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων (I.B.E.I)
- ✦ Υπερφυγόκεντρος Beckman Optima™ ULtracentrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, California),
- ✦ Υδατόλουτρο (ED-5A open Bath Circulator) (Julabo, Germany)

- Φασματοφωτόμετρο Ultraspec-2001 (Biochrom, Cambridge, England)
- Φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (SpeedVac concentrator) (Savant Instruments, Hicksville, New York)
- DNA Photographic Transilluminator System (Fotodyne, New Berlin, Wisconsin)
- Μετρητής pH (πεχάμετρο) (pH Meter, pHI 340 Package, 240V) (Beckmann Instruments, UK)

2.2 Χημικά αναλώσιμα

Για την ολοκλήρωση των πειραματικών μεθόδων της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αναλώσιμα:

- Η ραδιενεργός [8-³H] ξανθίνη (18 Ci/mmol) και το [¹⁴C]ουρικό οξύ (50 mCi/mmol) ήταν από την εταιρεία Moravek Biochemicals (Brea, California) και οι φυσικές νουκλεοτιδικές βάσεις (αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη, ξανθίνη) από την Sigma (St. Louis, Missouri).
- Τα oligo-δεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction**) συντέθηκαν κατά παραγγελία από την εταιρεία BioSpring GmbH (Frankfurt, Germany).
- Ένζυμα κλωνοποίησης-ανασυνδρασμού του DNA: Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η Phusion High Fidelity DNA πολυμεράση (Phusion High Fidelity PCR system) από την εταιρεία Tools for Molecular Biology-FINNZYMES (Espoo, Finland). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI, *Apa*I, η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4, που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις ανασύνδεσης (ligation) και η αλκαλική φωσφατάση [για την αποφωσφορυλίωση των πλασμιδιακών φορέων (vectors)] ήταν είτε της εταιρείας MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Germany) είτε της εταιρείας Takara (BIO INC, Japan).
- Αντισώματα (antibodies): Το αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών (anti-PentaHis- HRP) είναι της εταιρείας Qiagen (West Sussex, UK). Το σύζευγμα πρωτεΐνης Α-υπεροξειδάσης ραπανιού [horseradish peroxidase (HRP)-conjugated protein A], που χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα, καθώς και το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης ραπανιού (avidin-HRP) ήταν της εταιρείας Amersham Pharmacia Bio-Tech (Uppsala, Sweden). Το αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεΐμιδιού του Oregon (βλ. παρακάτω) ήταν από την Molecular Probes (Eugene, Oregon).
- Απορρυπαντικά (detergents): Για την εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών από μεμβρανικά κυστίδια της *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το ήπιο απορρυπαντικό *n*-δωδεκυλο-β,D-μαλτοπυρανοσίδιο (DDM), της εταιρείας Sigma (St. Louis, Missouri).

- Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών: Χρησιμοποιήθηκαν οι GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus ready to use, της Fermentas (St. Leon-Rot, Germany), για ηλεκτροφορήσεις DNA, και Prestained SDS-PAGE Standards, Low-Range Bio-Rad Laboratories (Hercules, California) για ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.
- Συσκευασίες υλικών (kits): (1) Για απομόνωση DNA: Συσκευασία υλικών καθαρισμού τμημάτων DNA από δείγματα πήγματος αγαρόζης Nucleospin Extract II Macherey-Nagel (Duren, Germany), Συσκευασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany). (2) Για απομόνωση πρωτεϊνών: Σφαιρίδια δισθενούς νικελίου, Ni-IDA Probond™ Purification, της εταιρείας Invitrogen. (3) Για αποτύπωση Western: Συσκευασία πρωτοκόλλου ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL™ Western BLotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).
- SH- αντιδραστήρια (thiol- reactive reagents): Το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) ήταν της εταιρείας Sigma (St. Louis, Missouri). Το μεθανο-θειο-σουλφονικό αιθυλσουλφονικό (άλας νατρίου) (MTSES) ήταν από την εταιρεία Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Το πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green 488 Maleimide, OGM) από την εταιρεία Molecular Probes (Eugene, Oregon).

Τα υπόλοιπα χημικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων διαλυμάτων ήταν της υψηλότερης απαιτούμενης καθαρότητας και κατά κύριο λόγο αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma (St. Louis, Missouri).

2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

- *E. coli* **TOP10F'** (F' {Lac^q, Tn10 (Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) φ80LacZΔM15 ΔLacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara-Leu)7697 gaLU gaLK rpsL(Str^R) endA1 nupG) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (μετά από την αντίδραση λιγάσης (Ligation) σε

μεγάλη κλίμακα λόγω του μεγάλου βαθμού επιδεκτικότητας (competence efficiency) που διαθέτει.

- *E. coli* **T184** (LacL⁺ O⁺ Z⁻ Y⁻ (A), prsL, met⁻, thr⁻, recA, hsdM, hsdR/F⁻, LacI^q, O⁺, Z^{D118} (Y⁺, A⁺) (Teather *et al.*, 1980): χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση των μεταφορέων XanQ εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης, LacZ(p/o), υπό το μεταγραφικό έλεγχο του ισοπρόπυλο-β, D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Το γονιδίωμα του στελέχους T184 δεν περιέχει ενδογενή γονίδια που να επάγονται από IPTG (Lac Z⁻ Y⁻).
- *E. coli* **XL1-Blue** (endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 reLA1 Lac glnV44 F'[Tn10 proAB⁺ LacI^q Δ(LacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) (Stratagene): χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης των χμαιρικών μεταφορέων XanQ/UapA εξαιτίας των αμελητέων επιπέδων έκφρασης που εμφάνιζαν οι χμαιρικοί μεταφορείς στο στέλεχος *E. coli* T184
- *E. coli* **DH5α** (F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 reLA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻) (Gibco-BRL): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BW25113** (Δ (araD-araB) 567, ΔLacZ4787 (rrnB-3), Lambda⁻, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) (Datsenko and Wanner, 2000): το στέλεχος αυτό υπήρχε στο εργαστήριο καθώς είχε χρησιμοποιηθεί για τα πειράματα απαλοιφής των ενδογενών γονιδίων xanQ (Καρατζά, 2006). Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BL21 (DE3)** (F⁻ ompT gaL dcm Lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [LacI LacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BL21 (DE3) pLysS** (F⁻ ompT gaL dcm Lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS(cm^R) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-Blue.
- *E. coli* **BL21-CodonPlus-RIPL** (F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal (DE3) endA Hte [argU prol Cam^r]^{*} [argU ileY LeuW Strep/Spec^{r1*}]) (Invitrogen): στέλεχος που έχει αναπτυχθεί για την επαύξηση της πιθανότητας επιτυχίας ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών στην *E. coli* K-12. Μας παραχωρήθηκε από τον Υποψήφιο (τότε) Διδάκτορα Σταμάτιο Λιοκάτη και την Επ. Καθηγήτρια

Αναστασία Πολίτου. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως το στέλεχος *E. coli* XL1-BLue.

Τα αρχικά πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- **pT7-5** : φορέας κλωνοποίησης των υπό μελέτη γονιδίων με στόχο την υπερέκφρασή τους μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου της λακτόζης, *lacZ*(p/o) [πρόκειται για πλασμίδιο μετρίου αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο (medium copy number), βλ. Sahin-Toth *et al.*, 1995b].
- **pT7-5/*xanQ*-Cys-less-His₁₀** (Karatza *et al.*, 2006): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/*xanQ*-His₁₀** (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ φυσικού τύπου (wt), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.
- **pT7-5/*xanQ*-BAD** (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ φυσικού τύπου (wt), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (**Biotin Acceptor Domain**) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1993) ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο του LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.
- **pT7-5/*melY*-BAD** (Frillingos and Kaback, 2001): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*melY*) του μεταφορέα μελιβιόζης MelY του *Enterobacter cloacae* (Tavoulari and Frillingos, 2008) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (**Biotin Acceptor Domain**) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1993) ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

- ✦ **pT7-5/*lacY*-C154G-His₁₀** (Smirnova and Kaback, 2003; Abramson *et al.*, 2003): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*lacY*) της περμεάσης της λακτόζης (LacY) της *E. coli* με αλλαγμένη την Cys-154 σε Gly [μετάλλαγμα που είχε χρησιμοποιηθεί για την αρχική κρυστάλλωση της LacY διότι δεσμεύει με υψηλή συγγένεια αλλά χωρίς να μεταφέρει το υπόστρωμα, εμφανίζει σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης και αυξημένη θερμοσταθερότητα (Smirnova and Kaback, 2003)] και με την αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) το C- τελικό άκρο.
- ✦ **pT7-5/*ygfU*-His₁₀** (Papakostas and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*ygfU*) του YgfU, υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.

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

- ✦ **pT7-5/*xanQ*-Cys-less-X(323-339)C-His₁₀**: πρόκειται για ανασυνδυασμένα pT7-5 που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριό μας (Karatzá *et al.*, 2006).
- ✦ **pT7-5/*xanQ*-Cys-less-X#C-BAD**: ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με αλλαγμένα τα 5 εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less), και ένα επιπλέον κατάλοιπο κυστεΐνης (single-Cys mutant, μεταφορέα μοναδικής κυστεΐνης) στη θέση # και αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (BAD-tag, Karatzá and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.
- ✦ **pT7-5/*xanQ*-G333R-BAD**: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ με αλλαγμένη τη Gly στη θέση 333 σε Arg και αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο του LacY (BAD-tag, Karatzá and Frillingos, 2005) στο C-τελικό άκρο.

- ✦ **pT7-5/*uapA*-His₁₀**: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*uapA*) του *UapA* του *Aspergillus nidulans*, με την αλληλουχία 10 συνεχόμενων καταλοίπων ιστοιδίνης (His₁₀) το C- τελικό άκρο.

2.4 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Οι τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA (τεχνικές κλωνοποίησης DNA ή γενετικής μηχανικής) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων από επιλεγμένα τμήματα DNA μέσω μιας διαδοχικής σειράς *in vivo* και *in vitro* σταδίων, δηλ. παραγωγή πολλών κλώνων DNA (**DNA cloning**) καθώς επίσης και ανασυνδυασμό αυτών των προς μελέτη τμημάτων με την τελική εισαγωγή τους σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς (**DNA recombination**). Το σύνολο των σχετικών τεχνικών αναφέρεται ως *τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA technology)* όπου χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα μοριακά εργαλεία και μέθοδοι.

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

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τα μεταλλάγματα του XanQ (σημειακά μεταλλάγματα σε υπόστρωμα φυσικού τύπου, συνδυασμός σημειακών μεταλλαγμάτων ή χμιαρικών γονιδίων) χρησιμοποιήθηκε η PCR δύο σταδίων (**Εικόνα 2.1**).

Κατά την PCR δύο σταδίων (Ho *et al.*, 1989, Frillingos *et al.*, 1994, Karatza *et al.*, 2006), χρησιμοποιούνται κατάλληλα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) για να δημιουργηθούν, από τα γονίδια-στόχους, τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (1^ο στάδιο) (**Εικόνα 2.1**). Τα προϊόντα του 1^{ου} σταδίου συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται στο 2^ο στάδιο ως υποστρώματα (εκμαγεία), όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και, με τη χρήση των ίδιων εξωτερικών ολιγονουκλεοτιδίων, όπως στο 1^ο στάδιο, επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από την συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία (contig) όλων των προηγούμενων τμημάτων (2^ο στάδιο) (**Εικόνα 2.1**). Η παραπάνω μεθοδολογία, που συνήθως περιγράφεται ως PCR επικάλυψη/επέκτασης (overlap/extension) (Ho *et al.*, 1989) αποτελεί μέθοδο εκλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χμιαρικών γονιδίων, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και δημιουργία γονιδίων χωρίς

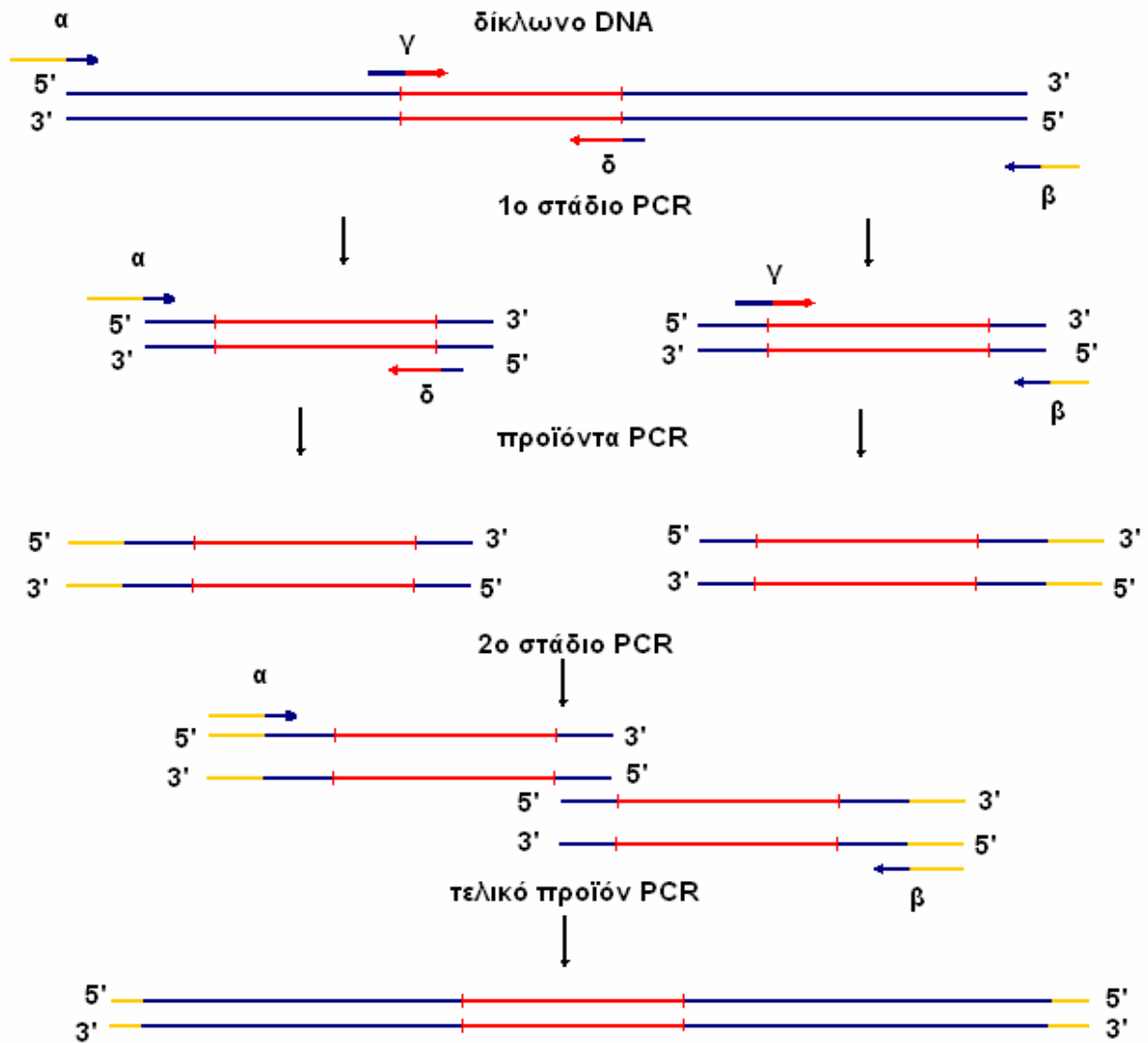
κωδικόνια Cys (Cys-less) με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση σε πολλές θέσεις (Frillingos and Kaback, 2001; Karatza *et al.*, 2006; Tavoulari and Frillingos, 2008). Στο τέλος κάθε σταδίου, τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε 1% πήγμα αγαρόζης και ανακτώνται με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA από πήγμα αγαρόζης Nucleospin Extract II Macherey-Nagel (Duren, Germany).

Για κάθε στάδιο PCR χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή αντίστοιχες ποσότητες προϊόντων PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης και καθαρισμό.
- 10 μ M από κάθε εκκινητή
- 5X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Phusion HF polymerase buffer) που περιέχει 7.5 mM MgCl₂.
- 2.5 mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP)
- 1 U/ μ L DNA πολυμεράση (Phusion HF)
- Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη millipore μέχρι τελικό όγκο 100 μ L.

Κατά κανόνα, η PCR εφαρμόστηκε σε 30 κύκλους, με τις εξής εναλλαγές θερμοκρασίας :

	<u>1^ο στάδιο PCR</u>	<u>2^ο στάδιο PCR</u>
	94° C για 5 min	94° C για 5 min
Αποδιάταξη δίκλωνου DNA (<i>Denaturation</i>)	94° C για 1 min	94° C για 1 min
Πρόσδεση εκκινητών (<i>Annealing</i>)	50° C για 1 min	50° C για 2 min
Επιμήκυνση του DNA (<i>Elongation</i>)	72° C για 1.5 min	72° C για 2 min
	72° C για 7 min	72° C για 7 min



Εικόνα 2.1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου PCR δύο σταδίων.

Οι δύο εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις PCR είναι:

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
LacZ (p/o) sense	5' - ATGATTACGGATTCACCTGGCCGTC - 3'
Y _K (pT7-5) - His ₁₀ antisense	5' - GACGGGGAGTTCAGGCAACTATGG - 3'

Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις PCR φαίνονται στους Πίνακες 2.1-2.2. Οι εκκινητές για σημειακά μεταλλάγματα σε επιλεγμένες θέσεις του *XanQ* φυσικού τύπου (single-point mutants) καθώς και για τα συνδυαστικά σημειακά μεταλλάγματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.1** και για την κατασκευή των χιμαιρικών γονιδίων μεταξύ των γονιδίων *xanQ* και *ygfU* στον **Πίνακα 2.2**.

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-GTTATTCAGATGACT <u>CGT</u> GTCGCTTCAC -3'	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-G333R- BAD
5'-CTGGCGTTGCT <u>AAC</u> CGTTATGTC -3'	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-S336N-BAD
5'-CAGATGACTGGT <u>TGT</u> GCTTCACGTTATG -3'	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-V334C-BAD
5'-GCTTCACGTTAT <u>GCT</u> GGTCGAAC -3'	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-V339A-BAD
5'-CAGATGACT <u>CGAG</u> TTGCT <u>AAT</u> CGTTAT <u>GCT</u> GGTCGAACCATC -3'	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-G333R/S336N/ V339A- BAD
5'-CAGATGACT <u>CGATGT</u> GCT <u>AAT</u> CGT <u>TGGGCT</u> GGTCGAACCATC -3'	pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G333R/V334C/S336N/Y338W/V3 39A - BAD

Πίνακας 2.1 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του φυσικού τύπου *xanQ* με εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων ή συνδυασμού σημειακών μεταλλάξεων και οι εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Το σημειακό μετάλλαγμα G333R είχε κατασκευαστεί από την Δρ. Καρατζά Παναγιώτα κατά τη διάρκεια της διδακτορικής της διατριβής. Υπογραμμισμένη και με έντονα γράμματα φαίνεται η τριπλέτα βάσεων που εισάγει την αλλαγή στη θέση του επιλεγέντος αμινοξέος. Ο τρόπος ονομασίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που ακολουθείται σε όλη την εργασία, πχ *XanQ*(wt)-S336N, αναφέρεται στον αριθμό του καταλοίπου που υφίσταται την αλλαγή (336), στο κατάλοιπο που υπάρχει φυσιολογικά στη θέση αυτή (S, Ser) και στο κατάλοιπο που εισάγεται (N, Asn)

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-CCGAAATTTTCAAGATACTACCGGCCGTAC -3'	pT7-5/ ^{<i>xanQ</i>} N ₁₁ (419)C ₁ ^{<i>ygfU</i>} -BAD
5'- CTTTTCTAAGCTGCCAGCCTC -3'	pT7-5/ ^{<i>ygfU</i>} N ₁₁ (415)C ₁ ^{<i>xanQ</i>} -BAD

Πίνακας 2.2 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία των χιμαιρικών γονιδίων μεταξύ των φυσικού τύπου *xanQ* και *ygfU* και οι εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Με μπλε χρώμα φαίνεται το μέρος της αλληλουχίας του εκκινητή που προέρχεται από την αλληλουχία του *xanQ* ενώ με κόκκινο χρώμα φαίνεται το μέρος της αλληλουχίας του εκκινητή που προέρχεται από την αλληλουχία του *ygfU*. Ο τρόπος ονομασίας των ανασυνδυασμένων χιμαιρικών πλασμιδίων που ακολουθείται σε όλη την εργασία, πχ,

$xanQ$ N₁₁(419)C₁^{ygU} αναφέρεται στον αριθμό των αμινοτελικών ελίκων που προέρχονται από το ένα γονίδιο (N₁₁), το γονίδιο από το οποίο προέρχονται ($xanQ$), τον αριθμό των καρβοξυτελικών ελίκων που προέρχονται από το άλλο γονίδιο (C₁), το γονίδιο από το οποίο προέρχονται (ygU) και τη θέση της αλληλουχίας του γονιδίου από το οποίο προέρχονται οι αμινοτελικές έλικες στην οποία πραγματοποιείται η ένωση με το άλλο γονίδιο (419).

2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πολλαπλών επικαλύψεων (multiple-overlap PCR)

Η κατασκευή των χμαιρικών γονιδίων μεταξύ των γονιδίων *xanQ* και *uapA* πραγματοποιήθηκε με μια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, επικάλυψης/επέκτασης. Συγκεκριμένα, ολόκληρες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων και του μοτίβου – υπογραφή της οικογένειας NAT καθώς και του διαμεμβρανικού τμήματος 12, από το γονίδιο *xanQ* αντικαταστάθηκαν με τις αντίστοιχες από το γονίδιο *uapA*. Οι αντικαταστάσεις των περιοχών πραγματοποιήθηκαν βασιζόμενες στη στοίχιση των αλληλουχιών των δύο γονιδίων χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Εικόνα 2.2). Κατασκευάστηκαν οκτώ διαφορετικά χμαιρικά γονίδια των οποίων οι εσωτερικοί εκκινητές φαίνονται στον Πίνακα 2.3. Στη συνέχεια αναφέρεται ενδεικτικά η εφαρμογή της τεχνικής αυτής για τη δημιουργία του πλασμιδίου pT7-5/ $xanQ$ N₆(208)C₆^{uapA}-BAD (Εικόνα 2.3A).

Κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις PCR, όπου ενισχύθηκαν: το N₆ τμήμα του *xanQ* έως τη θέση 208 της αλληλουχίας του, το C₆ τμήμα του *uapA* έως τη θέση 547 της αλληλουχίας του και το καρβοξυτελικό άκρο του *xanQ* (Εικόνα 2.3B). Τα παραπάνω τμήματα ενισχύθηκαν με τους εκκινητές που φαίνονται στους Πίνακες 2.3 και Πίνακες 2.4. Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύνδεση των τριών τμημάτων σε μοριακή αναλογία 1 : 1 : 1 σε μία αντίδραση PCR, χωρίς την προσθήκη εκ νέου υποστρώματος (Εικόνα 2.3Γ). Τα τρία προϊόντα PCR λόγω των συμπληρωματικών τους άκρων υβριδίζουν με αποτέλεσμα να παίρνουμε σαν τελικό προϊόν το χμαιρικό γονίδιο pT7-5/ $xanQ$ N₆(208)C₆^{uapA} (Εικόνα 2.3Δ). Τα προϊόντα του πρώτου και δεύτερου σταδίου ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1% και καθαρίζονται με βάση το πρωτόκολλο καθαρισμού της συσκευασίας υλικών καθαρισμού τμημάτων DNA από δείγματα

πήγματος αραρόζης Nucleospin Extract II Macherey-Nagel (Duren, Germany). Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/*melY*-BAD. Με τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκαν και τα υπόλοιπα χμιαρικά γονίδια που φαίνονται στον **Πίνακα 2.3**.

XanQ	MSDINHAG-----	8
UapA	MDNSIHSTDGPDSVIPNSNPKKTVRQVRLLARHLTTREGLIGDYDYGF LFRPELPFMKK	60
XanQ	---SDLIFELED RPPFHQALVGAITHLLAIFVPMVTPALIVGAALQLSAETTAYLVSMAM	65
UapA	DPRAPPPFGLNEKIPVLLAFILGLQHALAMLAGVVTPPLIISSSLPSDLQQYLVSTSL	120
XanQ	IASGIGTWLQVNRYGI-----VGSGLLSIQSVNFSFVTVMIALGSSMKSDGFHEELIMS	119
UapA	IVCGLLSMVQITRFHIYKTPYYIGSGVLSVMGVSFSSIIISVASGAFNQMYSNQFCQLDEAG	180
XanQ	-----SLLGVSVFVGAFLVVGSSFILP-YLRRVITPTVSGIVVLMIGLSLIKVGII	168
UapA	NRLPCPEAYGALIGTSACCALVEILLAFVPPKVIQKIFPPIVTGPTVMLIGISLIGTGFK	240
XanQ	DFGGGFAAKSSGTFG-----NYEHLGVGLLVIVVIGFNCCRSPLLRMGGIAI	216
UapA	DWAGGSACMDDGMLCPSATAPRPLPWGSPFEFIGLGFVFSIIILCERFGAPIMKSCSVVI	300
XanQ	GLCVGYIASLCLGMVDFSSMRNPLITIPHPFKYGFSSFSFHQFLVVGTTIYLLSVLEAVGD	276
UapA	GLLVGCVIAAACGYFSHADIDAAPAASFIVWKTFPLSVYGPMLPIIAVFIICACECIGD	360
XanQ	ITATAMVSRRRPIQGEEYQSRLKGGVLADGLVSVIASAVGSLPLTTFAQNNGVIQMTGVAS	336
UapA	VTATCDVSRLEVRGGTFESRIQGAVLADGINSVVAALATMPMTTFAQNNGVIALTRCAN	420
XanQ	RYVGRTIAVMLVILGLFPMIGGFFTTIPSAVLGGAMTLMFSMIAIAGIRI IITNGLKRRE	396
UapA	RWAGYCCCLILIVAGIFAKFAAAIVAI PNSVMGGMKTF LFASVVISGQAI VAKAPFTRRN	480
XanQ	TLIVATSLGLGLVSYDPEIFK-ILPAS-----IYVLVENPICAGGLTALLNI	444
UapA	RFILTASMALGYGATLVPTWFGNVFPQTENRDLEGFENAIELVLETGFAVTAFAVAMLLNA	540
XanQ	ILPGGYRQENVLPGITSAEEMD-----	466
UapA	IMPAEVEEIGAVTPMPVSAHDNRDGEAEYQSKQA	574

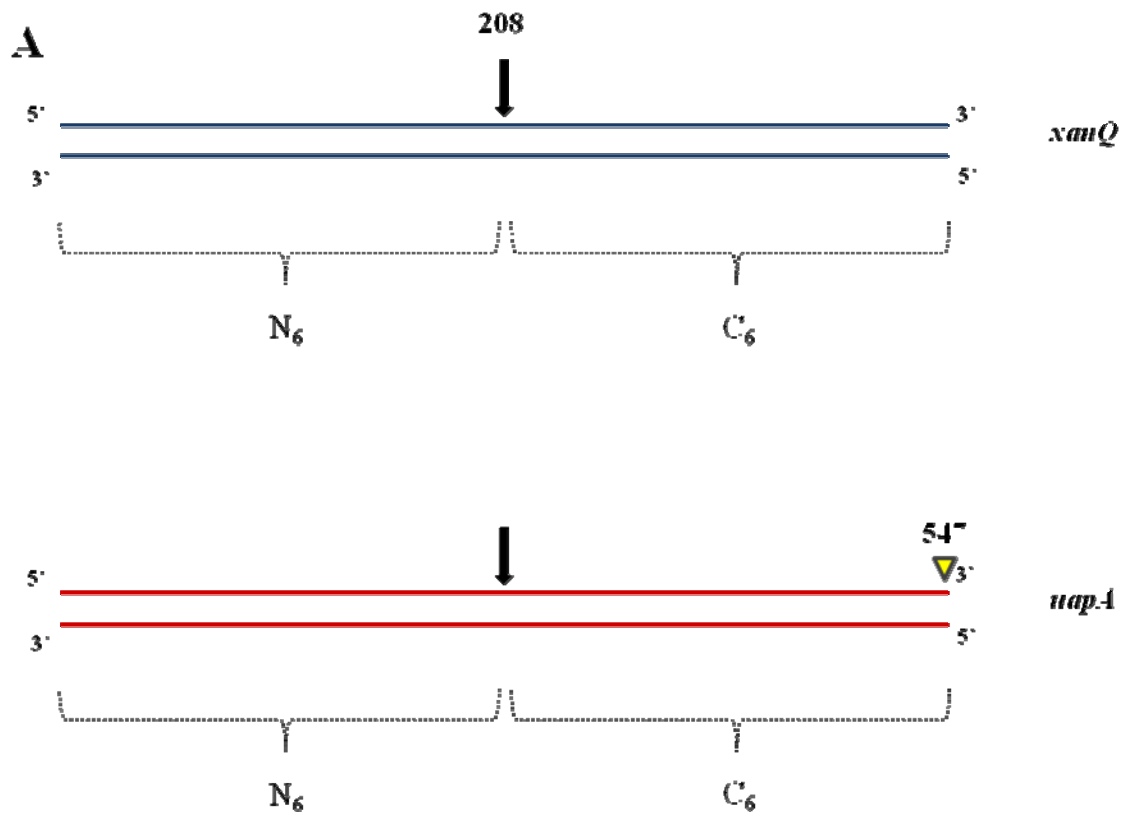
Εικόνα 2.2 Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών των γονιδίων *xanQ* και *uapA*. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) .

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-GCAGTCCGTTGATGAAGTCCTG-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₆ (208)C ₆ ^{uapA} -BAD
5'-GAGTATCAGTCTCGCATCCAGG-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₈ (295)C ₄ ^{uapA} -BAD
5'-CCTCCGCTGTCACAATGACC-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₈ (314)C ₄ ^{uapA} -BAD
5'-CGTTATGTTCGGTTACTGCTGCTG-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₈ (340)C ₄ ^{uapA} -BAD
5'-GGCAGTTATGGGAGGGATGAAG-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₈ (367)C ₄ ^{uapA} -BAD
5'-GAGTATCAGTCTCGCATCCAGG-3' & 5'-GTTTGGGAATGTATTGCCAGCCTC-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₈ (295)- ^{uapA} C ₃ (420)-C ₁ ^{xanQ} -BAD
5'-CGTTATGTTCGGTTACTGCTGCTG-3' & 5'-GTTTGGGAATGTATTGCCAGCCTC-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₈ (340)- ^{uapA} C ₃ (420)-C ₁ ^{xanQ} -BAD
5'-CGAAATTTTCAAGATCTTCCTCAGACCG-3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (419)C ₁ ^{uapA} -BAD

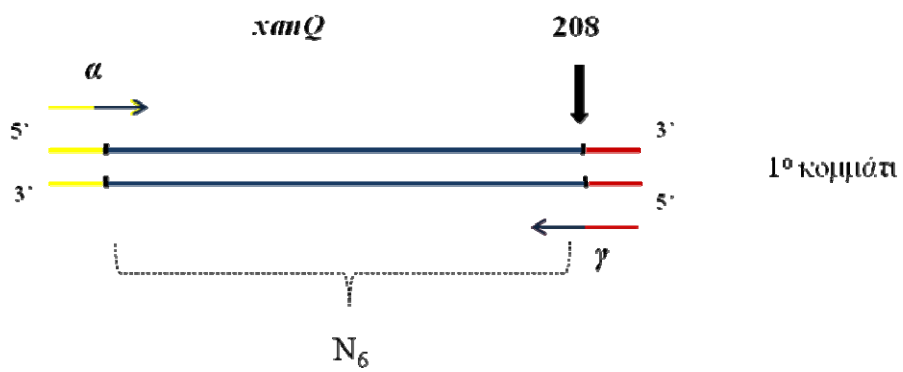
Πίνακας 2.3 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία των χιμαιρικών γονιδίων μεταξύ των φυσικού τύπου *xanQ* και *uapA* και οι εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Με μπλε χρώμα φαίνεται το μέρος της αλληλουχίας του εκκινητή που προέρχεται από την αλληλουχία του *xanQ* ενώ με κόκκινο χρώμα φαίνεται το μέρος της αλληλουχίας του εκκινητή που προέρχεται από την αλληλουχία του *uapA*. Ο τρόπος ονομασίας των ανασυνδυασμένων χιμαιρικών πλασμιδίων που ακολουθείται σε όλη την εργασία, πχ. ^{xanQ}N₆(208)C₆^{uapA} αναφέρεται στον αριθμό των αμινοτελικών ελίκων που προέρχονται από το ένα γονίδιο (N₆), το γονίδιο από το οποίο προέρχονται (^{xanQ}), τον αριθμό των καρβοξυτελικών ελίκων που προέρχονται από το άλλο γονίδιο (C₆), το γονίδιο από το οποίο προέρχονται (^{uapA}) και τη θέση της αλληλουχίας του γονιδίου από το οποίο προέρχονται οι αμινοτελικές έλικες στην οποία πραγματοποιείται η ένωση με το άλλο γονίδιο (208).

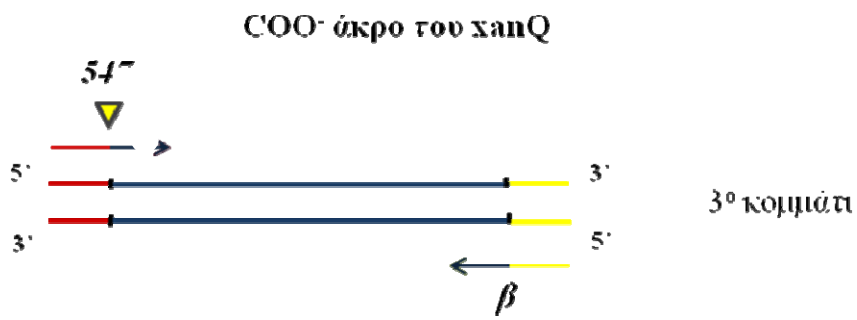
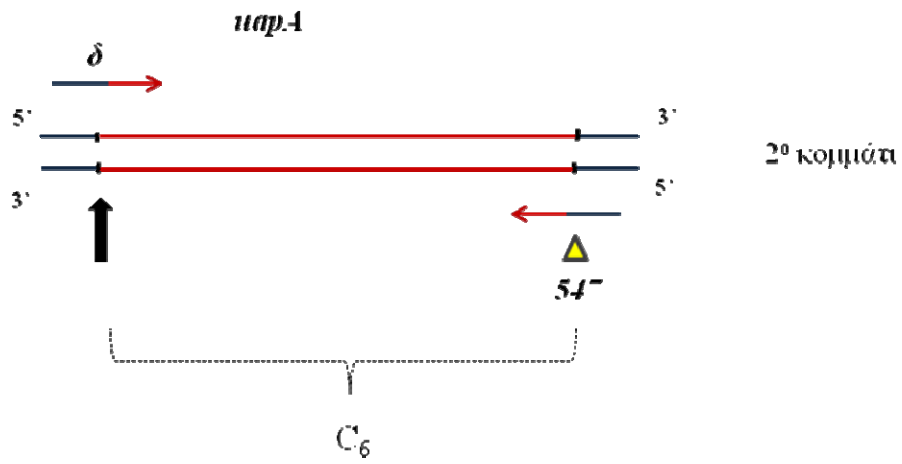
<p>Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence) για τον καρβοξυτελικό επίτοπο των χιμαιρών</p> <p>Uap(547)nQ</p> <p>5'-GCTGAAGTTCGAGCAGGAAAACGTTC-3'</p>

Πίνακας 2.4 Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου για τον καρβοξυτελικό επίτοπο των χιμαιρών από το γονίδιο του *xanQ*, κοινός για όλες τις χίμαιρες.

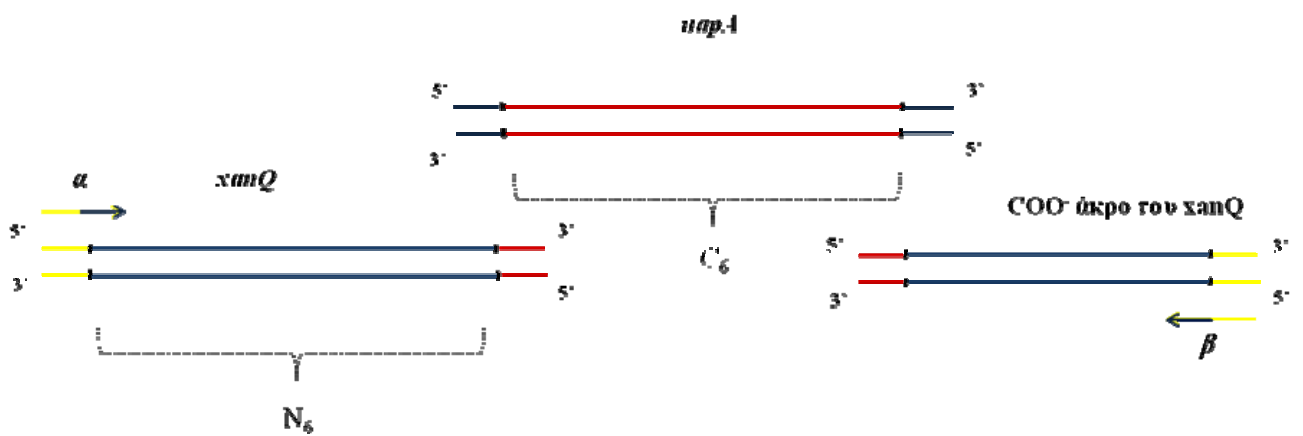


B 1^ο στάδιο PCR

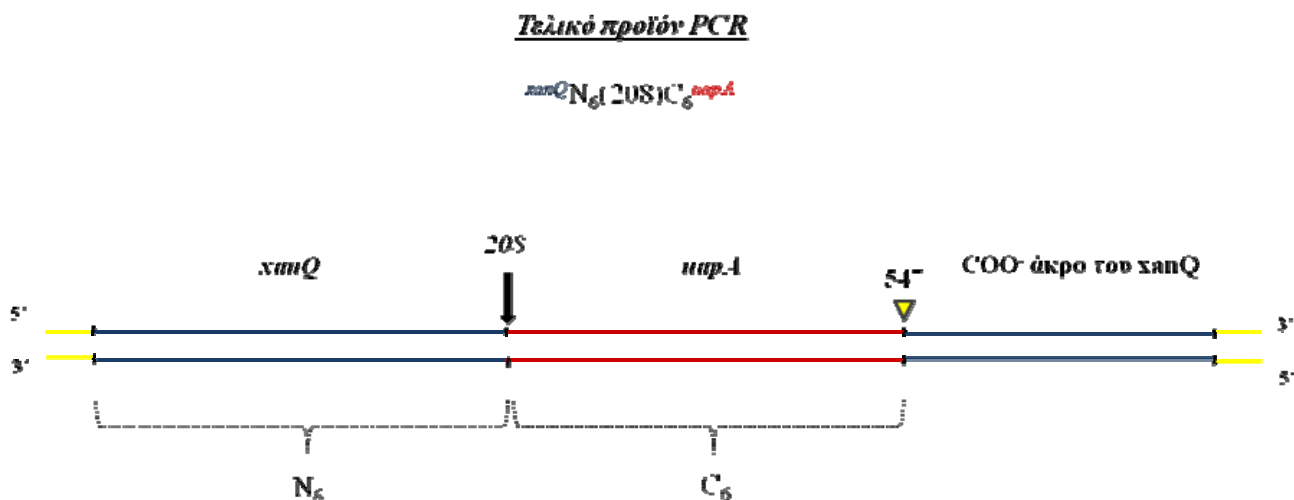




Γ 2^ο στάδιο PCR



Δ



Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου PCR πολλαπλών επικαλύψεων όπως εφαρμόστηκε για τη δημιουργία του $^{xanQ}N_6(208)C_6^{uapA}$.

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension) στο υπόστρωμα του χιμαιρικού μεταφορέα $^{xanQ}N_{11}(419)C_1^{uapA}$

Η αρχή της μεθόδου της PCR δύο σταδίων εφαρμόζεται σε αυτήν την περίπτωση ακριβώς όπως αναφέρεται στο εδάφιο 2.4.1 με τη διαφορά ότι πραγματοποιείται στο υπόστρωμα του χιμαιρικού πλέον μεταφορέα $^{xanQ}N_{11}(419)C_1^{uapA}$. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων ή συνδυασμού σημειακών μεταλλάξεων ή απαλοιφής καταλοίπων στο υπόστρωμα του χιμαιρικού μεταφορέα των οποίων οι αλληλουχίες των εσωτερικών εκκινητών νοηματικού κλώνου φαίνονται στους Πίνακες 2.5, 2.6 και 2.7 αντίστοιχα.

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-GTGCTTGAG <u>AAC</u> GGGTTTGCG-3'	pT7-5/ $^{xanQ}N_{11}(T526N)C_1^{uapA}$ -BAD

5'-GCTTGAGACTGGT <u>ATT</u> GCGGTCAC -3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (F528I)C ₁ ^{uapA} -BAD
5'-GAAAATGCGATCT <u>TAC</u> CTCGTGCTTG -3'	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (E521Y)C ₁ ^{uapA} -BAD

Πίνακας 2.5 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του χιμαιρικού μεταφορέα ^{xanQ}N₁₁(419)C₁^{uapA} με εισαγωγή νέων κωδικονίων σε επιλεγμένες θέσεις και οι εσωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους. Η αρίθμηση αναφέρεται στη θέση που αντιστοιχεί στην αρίθμηση της αλληλουχίας του μεταφορέα UapA διότι στο κομμάτι που προέρχεται από τον UapA, πραγματοποιούνται οι αλλαγές.

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence) και αλληλουχία εκμαγείο που χρησιμοποιήθηκαν	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-GCTTGAGAG <u>AAC</u> GGT <u>ATT</u> GCGGTCAC -3' & ^{xanQ} N ₁₁ (419)C ₁ ^{uapA}	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (T526N/F528I)C ₁ ^{uapA} -BAD
5'-GCTTGAGAG <u>AACC</u> T <u>ATT</u> GCGGTCAC -3' & ^{xanQ} N ₁₁ (419)C ₁ ^{uapA}	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (T526N/G527P/F528I)C ₁ ^{uapA} -BAD
5'-GAAAATGCGATCT <u>TAC</u> CTCGTGCTTG -3' & ^{xanQ} N ₁₁ (T526N/F528I)C ₁ ^{uapA}	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (E521Y/ T526N/F528I)C ₁ ^{uapA} -BAD
5'-GAAAATGCGATCT <u>TAC</u> CTCGTGCTTG -3' & ^{xanQ} N ₁₁ (T526N/G527P/F528I)C ₁ ^{uapA}	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (E521Y/ T526N/ G527P /F528I)C ₁ ^{uapA} -BAD
5'- GTTTGCGGTC <u>GGTGGG</u> TTTGTTG-3' & ^{xanQ} N ₁₁ (419)C ₁ ^{uapA}	pT7-5/ ^{xanQ} N ₁₁ (T531G/A532G)C ₁ ^{uapA} -BAD

Πίνακας 2.6 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του χιμαιρικού μεταφορέα ^{xanQ}N₁₁(419)C₁^{uapA} με εισαγωγή συνδυασμού νέων κωδικονίων σε επιλεγμένες θέσεις, οι εσωτερικοί εκκινητές καθώς και οι αλληλουχίες-εκμαγεία που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους.

Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence) και αλληλουχία εκμαγείο που χρησιμοποιήθηκαν	Προϊόν ανασυνδυασμού DNA
5'-CTCAGACC...ATCGAGCTCGTGC -3' & $^{xanQ}N_{11}(419)C_1^{uapA}$	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}C_1\Delta^{uapA}$ -BAD
5'-CCTCAGACC...ATCT <u>TAC</u> CTCGTGC -3' & $^{xanQ}N_{11}(419)C_1^{uapA}$	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}(E521Y)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD
5'-GCTTGAGA <u>AACGGTATT</u> GCGGTCAC -3 & $pT7-5/^{xanQ}N_{11}(\Delta)C_1^{uapA}$ -BAD	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}(T526N/ F528I)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD
5'-GCTTGAGA <u>AACCCTATT</u> GCGGTCAC -3' & $pT7-5/^{xanQ}N_{11}(\Delta)C_1^{uapA}$ -BAD	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}(T526N/G527P/F528I)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD
5'-GCTTGAGA <u>AACGGTATT</u> GCGGTCAC -3 & $pT7-5/^{xanQ}N_{11}(E521Y)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}(E521Y/T526N/ F528I)\Delta C_1^{uapA}$ - BAD
5'-GCTTGAGA <u>AACCCTATT</u> GCGGTCAC -3' & $pT7-5/^{xanQ}N_{11}(E521Y)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}(E521Y/T526N/G527P / F528I)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD
5'- GTTTGCGGTC <u>GGTGGG</u> TTTGTG-3' & $pT7-5/^{xanQ}N_{11}(\Delta)C_1^{uapA}$ -BAD	$pT7-5/^{xanQ}N_{11}(T531G/A532G)\Delta C_1^{uapA}$ -BAD

<p>5'-CTATTGCGGT<u>CGGTGGG</u>TTTGTTC-3'</p> <p>&</p> <p>pT7-5/^{xanQ}N₁₁(/T526N/G527P/F528I)ΔC₁^{uapA}-BAD</p>	<p>pT7-5/^{xanQ}N₁₁(T526N/G527P/F528I/ T531G/A532G)ΔC₁^{uapA}-BAD</p>
<p>5'-CTATTGCGGT<u>CGGTGGG</u>TTTGTTC-3'</p> <p>&</p> <p>pT7-5/^{xanQ}N₁₁(E521Y/T526N/G527P / F528I)ΔC₁^{uapA}-BAD</p>	<p>pT7-5/^{xanQ}N₁₁(E521Y/T526N/G527P / F528I/ T531G/A532G)ΔC₁^{uapA}-BAD</p>

Πίνακας 2.7 Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του χιμαιρικού μεταφορέα ^{xanQ}N₁₁(419)C₁^{uapA} με απαλοιφή 11 κωδικονίων στη σειρά (Δ) (βλ. και Πίνακα 3.7, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ) και στο υπόστρωμα αυτό εισαγωγή συνδυασμού νέων κωδικονίων σε επιλεγμένες θέσεις, οι εσωτερικοί εκκινητές καθώς και οι αλληλουχίες-εκμαγεία που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους.

2.4.4 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασυνδυασμός)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης ο πλασμιδιακός φορέας pT7-5/*xanQ*-His₁₀ (από μεγάλης κλίμακας παρασκευάσμα maxi – prep, 1 μg/μL) και τα προς ένθεση (insertion) προϊόντα DNA, που είχαν προκύψει από τις αντιδράσεις PCR, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI* (**Εικόνα 2.4**). Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/*xanQ*-His₁₀ όσο και στα προϊόντα PCR που κατασκευάζονται με εκμαγείο τα pT7-5/*xanQ*-His₁₀ ή pT7-5/*xanQ*-Cysless-His₁₀.



Εικόνα 2.4. Περιοριστικές θέσεις αλληλουχίας για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *ApaI* και *BamHI*.

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

2.4.5 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)	
Πεπτόνη	1% (w/v)
Εκχύλισμα ζύμης	0.5% (w/v)
NaCl	1% (w/v)
SOB	
Εκχύλισμα ζύμης	0.5 %
Τρυπτόνη (βακτηριακής προέλευσης)	2%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
TB	
Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCL	250 mM

Κύτταρα από όλα τα κυτταρικά στελέχη *E. coli* (κεφάλαιο 2.3) προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Στα πειράματα αρχικού μετασχηματισμού των προϊόντων ανασυνδυασμού DNA (ligation products) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* Top10F'. Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (εδάφιο 2.4.6), για τα πειράματα έκφρασης-λειτουργικής ανάλυσης των μεταλλαγμάτων του XanQ χρησιμοποιήθηκαν τα *E. coli* T184, ενώ για τα πειράματα έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών XanQ/UapA δοκιμάστηκαν και όλα τα άλλα στελέχη που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.3.

Η προετοιμασία των επιδεκτικών κυττάρων έγινε, όπως αναφέρθηκε, με το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Συγκεκριμένα, αρχικά γίνεται καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB (10 mL) στους 37 °C για 16 h. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα SOB μέχρι τελικού όγκου 250 mL. Αν κάποιο κυτταρικό στέλεχος έχει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (π.χ. T184 σε στρεπτομυκίνη) τότε η ανάπτυξη γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής. Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει την τιμή 0.6. Μετά από επώση για 10 min στον πάγο, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm (4 °C, 10 min) και αναδιαλύονται σε 80 mL ψυχρού διαλύματος TB. Επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα της διαδικασίας με επαναιώρηση σε 20 mL TB που περιέχει 7% (v/v) διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) και τα κύτταρα είναι πλέον επιδεκτικά σε μετασχηματισμό με πλασμίδια ή με προϊόντα της αντίδρασης ανασύνδεσης (ligation products). Τα επαναιωρημένα κύτταρα χωρίζονται σε aliquots και αποθηκεύονται στους - 80 °C.

2.4.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Επιδεκτικά κύτταρα που λαμβάνονται από τους - 80 °C αφήνονται να επανέλθουν αργά στον πάγο (0-4 °C). Στη συνέχεια, πλασμιδιακό DNA από προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης ή από απομόνωση DNA (mini ή maxi-prep) προστίθεται σε αυτά και ακολουθεί επώση για 5 min στον πάγο (0-4 °C). Τέλος, τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία προθερμασμένα στους 37 °C,

με θρεπτικό μέσο επιλογής LB-άγαρ (1.5 %) που περιέχει αμπικιλίνη (100 µg/mL). Μονές αποικίες από την στερεή καλλιέργεια λαμβάνονται μετά από 16 h επώασης (37 °C) και αναπτύσσονται περαιτέρω, σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (2-3 mL), παρουσία αμπικιλίνης.

Ακολουθεί απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του πακέτου απομόνωσης DNA Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany) και στη συνέχεια το απομονωθέν πλασμιδιακό DNA υποβάλλεται σε έλεγχο αλληλούχισης (sequencing), προς επιβεβαίωση της σωστής επιθυμητής αλληλουχίας ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *Bam*HI και *Apa*I, σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας, από την εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Το επιβεβαιωμένο πλέον πλασμιδιακό DNA μετασχηματίζεται εκ νέου σε κύτταρα (συνήθως) *E. coli* T184 (κεφάλαιο 2.5) και ακολουθεί αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει 30% γλυκερόλη στους - 80 °C.

2.5 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων

Ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα (10 mL):

(Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών και Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε αέραια κύτταρα)

Κύτταρα *E. coli* T184 (στην περίπτωση της παρασκευής κλάσματος μεμβρανών των χμαιοτικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν και όλα τα υπόλοιπα κυτταρικά στελέχη που αναφέρονται στην παράγραφο 2.3) που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 3 mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αμικιλίνη (0.1 mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL), για 16 h, στους 37 °C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται αραίωση σε LB (1 mL πλήρους καλλιέργειας + 9 mL νέου LB + αντιβιοτικών) και ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 2 h (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης). Στο σημείο αυτό προστίθεται ισοπροπυλο-θειο-β, D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM, για την επαγωγή της έκφρασης του XanQ, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για 2 h ακόμη.

Ανάπτυξη σε μεγάλη κλίμακα (1 L):

(Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων)

Κύτταρα *E. coli* T184 που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αμικιλίνη (0.1 mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL), στις ίδιες συνθήκες όπως στη μικρή κλίμακα. Κατόπιν, γίνεται αραίωση σε LB δύο δοχεία (5 mL πλήρους καλλιέργειας + 495 mL νέου LB + αντιβιοτικών) και ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 3.5 h (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης). Στο σημείο αυτό προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM για την επαγωγή της έκφρασης του XanQ, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για 2.5 h ακόμη.

2.6 Δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assays)

2.6.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα KP_i (pH 7.5)	
KH_2PO_4/ K_2HPO_4	0.1 M
Διάλυμα τερματισμού (pH 5.5)	
KP_i	0.1 M
LiCl	0.1 M
Υγρό σπινθηρισμού	
Τολουόλιο	66% (v/v)
Triton-X	33% (v/v)
2,5-δифαινυλ-οξαζολη (PPO)	4% (w/v)
1,4-δισ(5-φαινυλοξαζολ-2-υλ)βενζόλιο (POPOP)	0.04% (w/v)

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα επιθυμητά πλασμίδια, αναπτύσσονται σε μικρή κλίμακα (10 mL καλλιέργειας). Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 6000 rpm στους 4 °C για 10 min και επαναωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KP_i . Ακολουθεί επανάληψη του βήματος αυτού και τελικά τα κύτταρα επαναωρούνται σε 1 mL KP_i . Στη συνέχεια, εξισορροπούνται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD_{420}) και προστίθεται κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος ώστε η τελική τιμή OD_{420} να είναι 10. Η τιμή αυτή ισοδυναμεί με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL βάσει αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994; Karatza and Frillingos, 2004).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (18 Ci/mmol) (τελική συγκέντρωση 1 μM) ή [^{14}C]ουρικού οξέος (50 mCi/mmol) (τελική συγκέντρωση 2 mM) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα σε 50 μL κυττάρων (35 μg

ολικής πρωτεΐνης), για διάφορους χρόνους (5 sec ως 10 min) (βλ. Karatza and Frillingos 2005). Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με 2x 3 mL διαλύματος τερματισμού, με ταχεία διήθηση υπό κενό (rapid filtration), σε ηθμό διήθησης Watman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm (Frillingos *et al.*, 1994). Μετά τη διήθηση, ο ηθμός μεταφέρεται σε σωληνάκια σπινθηρισμού (scintillation vials) που περιέχουν 6 mL υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid) και αφήνεται να επωασθεί για 24 h. Τα [^3H] δείγματα μετρώνται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος και του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής).

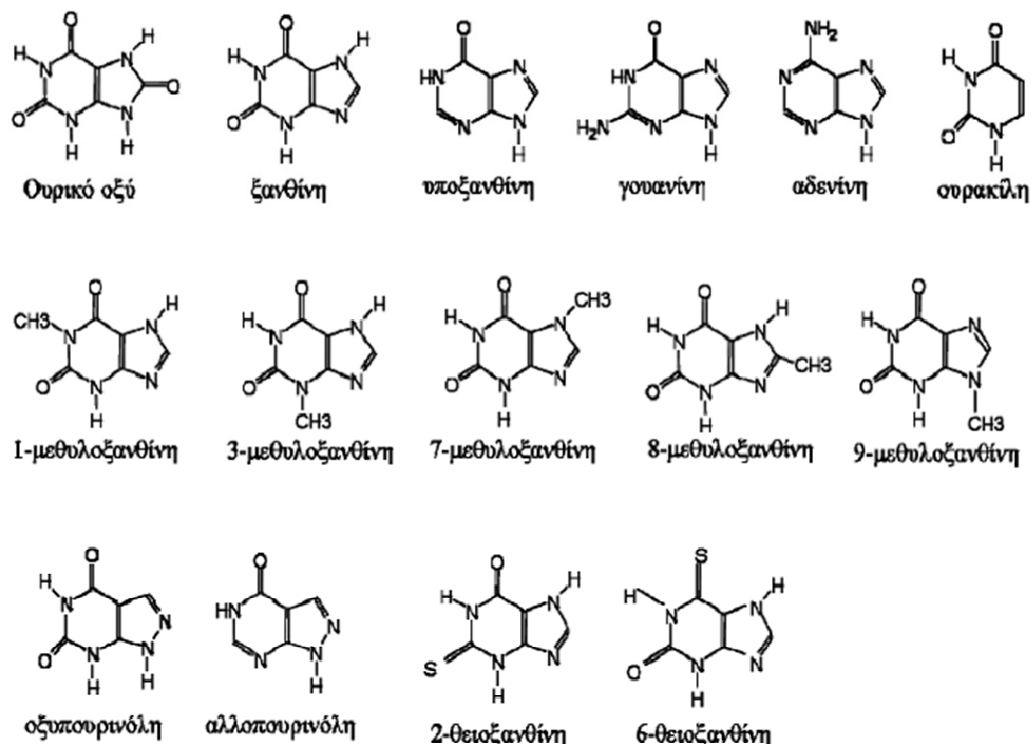
2.6.1.1 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα για προσδιορισμό των κινητικών σταθερών V_{max} και K_m

Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης του υποστρώματος μετρήθηκε είτε στα 5 και 10 sec ή στα 10 και 20 sec και οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.1 μM έως 100 μM . Οι κινητικές σταθερές V_{max} και K_m εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism4* (<http://www.graphpad.com/>).

2.6.1.2 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα παρουσία μη σημασμένων πιθανών προσδετών

Στην περίπτωση των πειραμάτων ανταγωνισμού πρόσληψης ξανθίνης πραγματοποιήθηκε προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (0.1 μM έως 1mM) για 5 min και στη συνέχεια επάση με [^3H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν είτε στα 5 και 10 sec ή στα 10 και 20 sec και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος που προκαλούν 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism4*. Οι τιμές K_i που δίνονται προέκυψαν 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 [^3H]ξανθίνης. Οι μη σημασμένοι προσδέτες (**Εικόνα 2.5**) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

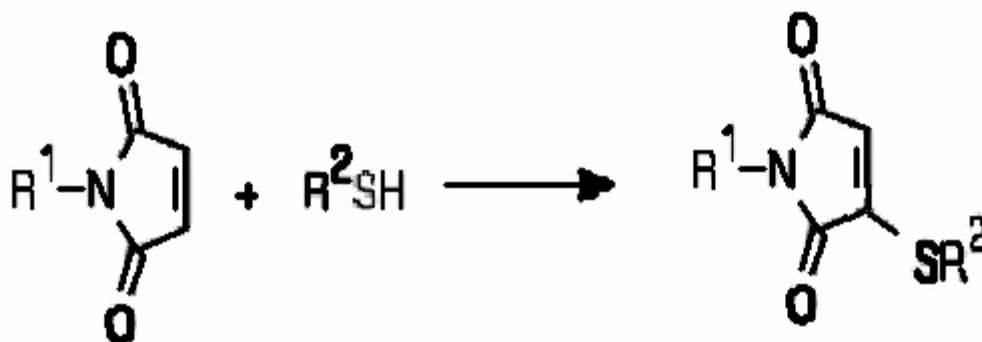
- X: ξανθίνη
- U: ουρικό οξύ
- H: υποξανθίνη
- Ur: ουρακίλη
- A: αδενίνη
- G: γουανίνη
- Ap: αλλοπουρινόλη
- Op: οξυπουρινόλη
- 1: 1-μεθυλοξανθίνη
- 3: 3-μεθυλοξανθίνη
- 7: 7-μεθυλοξανθίνη
- 8: 8-μεθυλοξανθίνη
- 9: 9-μεθυλοξανθίνη
- 2: 2-θειοξανθίνη
- 6: 6-θειοξανθίνη



Εικόνα 2.5: Δομές νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων τους

2.6.1.3 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα και επίδραση NEM

Για τα πειράματα επίδρασης *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) (Εικόνα 2.6) στην ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης, τα κυτταρικά δείγματα προετοιμάστηκαν όπως και παραπάνω και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις NEM για 10 min στους 25 °C. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη διθειοθρεϊτόλης (DTT) σε 10πλάσια μοριακή συγκέντρωση έναντι του μηλεϊμιδίου. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης έγινε με την παρουσία μεθοσουλφονικού φαινιζινίου (phenazine methosulfate, PMS 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Konings *et al.*, 1971; Karatza and Frillingos, 2005).



Εικόνα 2.6: Αντίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) με τις SH-ομάδες των κυστεϊνών (από Molecular Probes, www.probes.invitrogen.com)

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

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με ανάπτυξη των μετασχηματισμένων με τα επιθυμητά πλασμίδια κυττάρων *E. coli* T184, σε μικρή κλίμακα (10 mL καλλιέργειας). Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 6000 rpm στους 4 °C για 10 min και επαναιωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KP_i , το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται και τελικά τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 mL KP_i . Ακολούθως γίνεται εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD_{420}) και προστίθεται κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος ώστε η τελική τιμή OD_{420} να είναι 10. Η τιμή αυτή ισοδυναμεί με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL βάσει αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (βλ. ανωτέρω). Στη συνέχεια χωρίζονται 4 δείγματα των 500 μL κυτταρικού εναιωρήματος: στα δύο από αυτά προστίθεται μη ραδιενεργή ξανθίνη τελικής συγκέντρωσης 1 mM και στα άλλα δύο KOH σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Τα δείγματα προεπιάζονται για 10 min, στους 25 °C, και, στη συνέχεια, προστίθεται NEM σε τελική συγκέντρωση από 20 μM έως 1 mM, ανάλογα με το μέταλλαγμα και την επιθυμητή εφαρμογή (βλ. Karatza *et al.*, 2006; Parakostas *et al.*, 2008). Η αντίδραση του NEM τερματίζεται με την προσθήκη 10πλάσιας μοριακής συγκέντρωσης DTT έναντι του NEM. Στη συνέχεια ακολουθούν δύο φυγοκεντρικές εκπλύσεις με 40 mL διαλύματος KP_i και 3 φυγοκεντρικές εκπλύσεις με 1 mL διαλύματος KP_i . Τέλος, μετά από νέα εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD_{420}), ώστε η τιμή OD_{420} σε όλα τα δείγματα να είναι 10, ακολουθεί δοκιμασία

ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (1 μM), παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) (Konings *et al.*, 1971; Parakostas *et al.*, 2008).

2.6.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay) σε μεμβρανικά κυστίδια

Τα μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out, RSO) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμασίες διαμεμβρανικής μεταφοράς εφόσον έχουν ακέραιη την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη των αρχικών κυττάρων, όπου εκφράζεται ο εξεταζόμενος μεταφορέας ή μεταλλάγματά του και, παράλληλα, έχουν ακέραιη την συσκευή της αναπνευστικής αλυσίδας στο εσωτερικό αυτής της μεμβράνης. Για να γίνει δοκιμασία ενεργού μεταφοράς (active transport assay) σε κυστίδια RSO για μεταφορείς δευτερογενούς τύπου, που εξαρτώνται από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων, όπως είναι και ο XanQ (Karatza and Frillingos, 2005), απαιτείται ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας, με τεχνητούς δότες ηλεκτρονίων υπό συνθήκες καλής οξυγόνωσης (Konings *et al.*, 1971). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή είναι η εξής:

Διάλυμα μεμβρανικών κυστιδίων (για την παρασκευή των κυστιδίων, βλ. παρακάτω, κεφάλαιο 2.9), που λαμβάνονται από την κατάψυξη ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), αραιώνεται 10 φορές σε διάλυμα 0.1 M KPi pH 7.5, 10 mM MgSO_4 . Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης (18 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μM) σε 50 μL κυστιδίων για διάφορους χρόνους (5 sec ως 2 min). Η υπόλοιπη διαδικασία είναι όπως στα ακέραια κύτταρα (εδάφιο 2.6.1) με τη διαφορά ότι στην περίπτωση των κυστιδίων η διαδικασία γίνεται πάντοτε παρουσία μεθοσουλφονικού φαινιζινίου (PMS, 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), τα οποία χρησιμοποιούνται ως τεχνητοί δότες ηλεκτρονίων (e^-) για την ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας στο σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Konings *et al.*, 1971).

2.6.2.1 Δοκιμασία εκροής και ανταλλαγής υποστρώματος (Efflux-Exchange assay) σε μεμβρανικά κυστίδια

Σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού εκτός από τις δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς υποστρώματος μπορεί να εξετασθούν και επιμέρους αντιδράσεις του κύκλου μεταφοράς του υποστρώματος σε μη ενεργοποιημένες συνθήκες. Οι αντιδράσεις αυτές αφορούν είτε στην εκροή του υποστρώματος από το εσωτερικό του κυττάρου (efflux) είτε στην ανταλλαγή υποστρώματος εσωτερικά και εξωτερικά του κυττάρου (exchange). Οι επιμέρους αυτές αντιδράσεις μπορούν να μελετηθούν μόνο σε μη ενεργοποιημένες συνθήκες στο σύστημα των μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού και για να διασφαλιστεί αυτό απαιτείται η παρουσία νιγερισίνης, ενός αντιμεταφορέα H^+/K^+ που καταργεί τη διαβάθμιση του pH και εξισώνει ουσιαστικά την ηλεκτροχημική ενέργεια (πρωτονιο-κινητήρια δύναμη) με τη συνιστώσα της διαφοράς δυναμικού, σε συνδυασμό με βαλινομυκίνη, ενός ειδικού μεταφορέα K^+ που καταργεί τη διαφορά δυναμικού η οποία, στις συνθήκες του πειράματος, οφείλεται κυρίως στην υψηλή συγκέντρωση K^+ στο ρυθμιστικό διάλυμα (Lardy *et al.*, 1966). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή είναι η εξής:

Για τα πειράματα εκροής υποστρώματος:

Διάλυμα μεμβρανικών κυστιδίων (για την παρασκευή των κυστιδίων, βλ. παρακάτω, κεφάλαιο 2.11), που λαμβάνονται από την κατάψυξη ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), αραιώνεται σε διάλυμα 0.1 M KP_i pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$ έως τελική συγκέντρωση 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Η δοκιμασία εκροής [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης (18 Ci/mmol) γίνεται ως εξής: σε 50 μL κυστιδίων συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ προστίθεται το ραδιενεργό υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση 1mM. Επιπλέον προστίθεται βαλινομυκίνη και νιγερισίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 50 μM και 0.5 μM αντίστοιχα. Τα κυστίδια επωάζονται υπό αργή ανάδευση για περίπου 20 min και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο και ακολουθεί ολονύκτια επώαση σε ψυχρό θάλαμο (4°C , 16h). Την επόμενη μέρα τα «φορτωμένα» με ραδιενεργό υπόστρωμα κυστίδια δοκιμάζονται για την εκροή του ραδιενεργού υποστρώματος ως εξής: από το διάλυμα των κυστιδίων λαμβάνονται 2 μL και τοποθετούνται σε 0.4 mL διαλύματος 0.1 M KP_i pH 7.5 όπου και επωάζονται για διάφορους χρόνους έτσι ώστε να δοθεί η δυνατότητα στο ραδιενεργό υπόστρωμα

λόγω της διαφοράς των συγκεντρώσεων να εξωθηθεί από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωκυττάριο διάλυμα. Συγκεκριμένα οι χρόνοι για τα πειράματα εκροής είναι:

0'', 0'', 0'', 5'', 10'', 15'', 20'', 30'', 1', 2', 5', 10'

Σημείωση: Στο χρόνο 0'' τα κυστίδια τοποθετούνται σε διάλυμα 0.1 M KP_i pH 7.5 που περιέχει ήδη διάλυμα τερματισμού οπότε θεωρείται ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί επώαση. Λαμβάνονται τρεις χρόνοι 0'' και εξάγεται μέσος όρος των τιμών αυτών.

Για τα πειράματα ανταλλαγής υποστρώματος:

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με τα πειράματα εκροής υποστρώματος με τη μοναδική διαφορά ότι στο διάλυμα 0.1 M KP_i pH 7.5 όπου τοποθετούνται τα 2 μ L των «φορτωμένων» με ραδιενεργό υπόστρωμα για επώαση, προστίθεται και μη σημασμένο υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση ίδια με αυτή του σημασμένου υποστρώματος (0.1 M KP_i pH 7.5 , ξανθίνη 1mM) έτσι ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί η ανταλλαγή του ραδιενεργού (εσωτερικό κυττάρου) με το μη σημασμένο υπόστρωμα (εξωκυττάριο διάλυμα). Οι χρόνοι επώασης για τα πειράματα ανταλλαγής υποστρώματος είναι ίδιοι με εκείνους των πειραμάτων εκροής.

2.6.2.2 Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς σε μεμβρανικά κυστίδια παρουσία μη σημασμένου συνθετικού δεκαπενταπεπτιδίου

Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού δοκιμάστηκαν για την ικανότητα πρόσληψης [$8\text{-}^3\text{H}$]ξανθίνης (18 Ci/mmol) παρουσία συνθετικού δεκαπενταπεπτιδίου που μας παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρού (Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Η αλληλουχία του πεπτιδίου περιλαμβάνει την περιοχή του μοτίβου υπογραφή της οικογένειας NAT/NCS2 όπως αυτή απαντάται στο γονιδίωμα του μεταφορέα UapA και συγκεκριμένα αποτελείται από τα παρακάτω κατάλοιπα:



Στην περίπτωση των συγκεκριμένων πειραμάτων πραγματοποιήθηκε προεπώαση σε 50 μ L μεμβρανικών κυστιδίων με το μη σημασμένο δεκαπενταπεπτίδιο σε τελικές συγκεντρώσεις: 30 μ M, 15 μ M, 6 μ M, 3 μ M, 1.5 μ M, 0.6 μ M και 0.3 μ M για 5 min και στη συνέχεια επώαση με [^3H]ξανθίνη (1 μ M) παρουσία μεθοσουλφονικού

φαινιζινίου (PMS, 0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM) για χρόνους από 5 έως 20 sec.

2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Διαλύματα

Διάλυμα επαναιώρησης	
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	100 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
Διάλυμα σακχαρόζης	
Tris-HCl pH 8	25 mM
Σακχαρόζη	45% (w/v)
Na ₂ EDTA	1 mM

Κλάσματα μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη της *E. coli* παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο συνδυασμού οσμωτικού σοκ, επώασης με EDTA/ λυσοζύμη και κατεργασίας με υπερήχους (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994). Αναλυτικότερα, μετά την ανάπτυξη κυττάρων σε μικρή κλίμακα ακολουθεί συλλογή τους και έκπλυση με 10 mL διαλύματος επαναιώρησης. Πραγματοποιείται νέα φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε 1 mL του ίδιου διαλύματος και φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο eppendorf (13000 rpm, 5 min) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος σακχαρόζης. Μετά από επώση στον πάγο (0-4 °C) για 20 min, συλλέγεται το κυτταρικό ίζημα, όπως παραπάνω, και ακολουθεί επαναιώρηση σε 0.8 mL ddH₂O και επώαση στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη λυσοζύμης (0.125 mg/mL τελική συγκέντρωση) και επώαση για 30 min στον πάγο (0-4 °C). Στη συνέχεια, γίνεται ομοιογενοποίηση του κυτταρολύματος με υπερήχους (συσκευή 250-D της Branson Ultrasonics), όπου εφαρμόζονται 2 ώσεις των 15 sec σε ένταση 40%. Μετά από

φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο eppendorf (13000 rpm, 5 min) για την απομάκρυνση των άθραυστων κυττάρων (cell debris), ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση (Optima Ultracentrifuge, 90000 rpm, 20 min) όπου συλλέγεται το ίζημα των μεμβρανών. Το κλάσμα των μεμβρανών επαναδιαλυτοποιείται σε 40 μ L ddH₂O και φυλάσσεται στους 4 °C, για περαιτέρω χρήση μέσα στις επόμενες 24 h (ηλεκτροφορητική ανάλυση και ανοσοαποτύπωση).

2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.8.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

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

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

Διαλύματα

Διάλυμα διαχωρισμού pH 8.8	
Tris – HCl	1.5 M
SDS	0.4% (w/v)
Διάλυμα επιστοίβαξης pH 6.8	
Tris – HCl	0.5 M
SDS	0.4% (w/v)
30% Ακετυλαμίδιο/Bis 37.5:1 (Biorad)	
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης	
Tris-HCl pH 8.3	0.025 M
Γλυκίνη	0.192 M
SDS	0.1% (w/v)
Διάλυμα φόρτωσης 4X	
Tris-HCl pH 6.8	250 mM
SDS	9.2 % (w/v)

Μπλε της βρωμοφαινόλης	0.2 % (w/v)
Γλυκερόλη	40% (v/v)
DTT	100 mM
Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS)	
APS	10% (w/v)
Πήκτωμα διαχωρισμού (100 mL)	
30% ακρυλαμίδιο	42 mL
Διάλυμα διαχωρισμού	25mL
dH ₂ O	32 mL
10% SDS	1 mL
10% APS	1 mL
Πήκτωμα επιστοιβαξης (30 mL)	
30% ακρυλαμίδιο	4.5 mL
Διάλυμα επιστοιβαξης	7.5 mL
dH ₂ O	17.4 mL
10% SDS	0.3 mL
10% APS	0.3 mL
TEMED	0.03 mL

Για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθήθηκε η κλασική διαδικασία όπως περιγράφεται από τον Laemmli (1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα 12% (w/v) ως πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) και 3% (w/v) ως πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel). Πριν από την ηλεκτροφόρηση, προστίθεται στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) από διάλυμα 4x. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Ως δείκτης πρότυπων μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, της εταιρείας Bio-Rad Laboratories.

2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διαλύματα

Διάλυμα μεταφοράς	
Tris-HCl pH 8.3	25 mM
Γλυκίνη	192 mM
Μεθανόλη	20% (v/v)
Διάλυμα Western TBST 10X	
Tris-HCl pH 7.4	0.1 mM
NaCl	1.5 M
Triton-X	2% (v/v)

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, γίνεται ηλεκτροφορητική μεταφορά των διαχωρισμένων πλέον πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri) σε διάλυμα μεταφοράς, για 4 h στα 400 mA. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται για 16 h σε διάλυμα TBST-5% αλβουμίνης ορού βοός (BSA) (blocking buffer) για τη δέσμευση των κενών θέσεων.

Στη συνέχεια ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με τα εξής αντισώματα ή πρωτεΐνες:

- Επώαση με αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των 10 ιστιδινών συζευγμένο με υπεροξειδάση (anti-PentaHis-HRP) σε αραιώση 1:5000 σε TBST-5% BSA για 1 h, γίνονται 5 εκπλύσεις με 1X TBST και στη συνέχεια ανίχνευση του σήματος.
- Για τις βιοτινυλιωμένες διαπεράσεις (XanQ-BAD) χρησιμοποιείται σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 σε TBST-5% BSA για 1 h και στη συνέχεια 8 εκπλύσεις με TBST.
- Στην περίπτωση των πειραμάτων ανάλυσης σήμανσης κυστεϊνών *in situ* γίνεται ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (Anti-OGM) σε αραιώση 1:3000 σε TBST-5% BSA, ακολουθούν 8 εκπλύσεις με TBST και στη συνέχεια προσθήκη δευτέρου αντισώματος, που είναι το σύζευγμα πρωτεΐνης-A-υπεροξειδάσης (HRP-labeled protein A) σε αναλογία 1:50000 για 1 h.

2.9 Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)

Διαλύματα

KP ₁ pH 6.6	1 M
MgSO ₄	1 M
K ₂ EDTA pH 7.0	0.5 M
σακχαρόζη	30%
Tris-HCl pH 8.0	1 M

Τα μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out, RSO) αποτελούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για την μελέτη μεμβρανικών πρωτεϊνών *in situ*. Στην ουσία πρόκειται για βακτηριακά κύτταρα στα οποία έχει αφαιρεθεί αφενός το κυτταρικό τοίχωμα και η εξωτερική μεμβράνη, και αφετέρου τα εσωτερικά συστατικά του κυτταροπλάσματος, διατηρώντας στο ακέραιο την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη (Kaback, 1974; Konings *et al.*, 1971). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία αποτελεί προσαρμογή

γνωστών πρωτοκόλλων απομόνωσης κυστιδίων (Kaback, 1971; Frillingos and Kaback, 1996), όπως παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:

- Γίνεται ανάπτυξη κυττάρων *E.coli*, του στελέχους T184, που εκφράζουν τα υπό εξέταση μεταλλάγματα του XanQ, σε μεγάλη κλίμακα (κεφάλαιο 2.4)
- Στη συνέχεια συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4°C, Beckmann JA-14)
- Γίνεται έκπλυση με διάλυμα 0.1 M KP_i pH 6.6 και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4 °C, Beckmann JA-14).
- Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα 30 mM Tris-HCl pH 8, 30% σακχαρόζη σε αναλογία 100 mL διαλύματος/ g κυττάρων.
- Στη συνέχεια προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και $K_2\text{EDTA}$ σε τελική συγκέντρωση 10 mM, ακολουθεί αργή ανάδευση για 1 h.
- Για τη συλλογή του προϊόντος της κυτταρικής λύσης γίνεται φυγοκέντρηση (6000 rpm, 30 min, 25 °C, Beckmann JA-14)
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 10 mL διαλύματος 0,1 M KP_i pH 6.6, 20 mM MgSO_4 , 30% σουκρόζη, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNAase. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε 1000 mL προθερμασμένου (37°C) 50 mM KP_i pH 6.6 και επωάζεται υπό ανάδευση για 15 min στους 37 °C.
- Προσθήκη $K_2\text{EDTA}$ pH 7.0 σε τελική συγκέντρωση 10 mM συνεχίζεται η επώαση για άλλα 15 min και στη συνέχεια προστίθεται MgSO_4 σε τελική συγκέντρωση 15 mM για ακόμη 15 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (8500 rpm, 1 h, 4 °C, Beckmann JA-14)
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 88 mL παγωμένου διαλύματος 0,1 M KP_i pH 6.6, 10 mM $K_2\text{EDTA}$.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2500 rpm, 30 min , 4 °C, Beckmann JA-20)
- Συλλέγεται το υπερκείμενο, και το ίζημα αναδιαλύεται σε 44 mL διαλύματος 0,1 M KP_i pH 6.6, 10 mM $K_2\text{EDTA}$ και γίνεται νέα φυγοκέντρηση (2500 rpm, 30 min , 4 °C, Beckmann JA-20), συλλέγεται πάλι το υπερκείμενο.

- Φυγοκέντρηση των υπερκειμένων για τη συλλογή των μεμβρανικών κυστιδίων (15000 rpm, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-20).
- Το ίζημα, που περιέχει τα μεμβρανικά κυστίδια, αναδιαλύεται σε 44 mL διαλύματος 0.1 M KP_i pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$ και νέα φυγοκέντρηση (15000 rpm, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-20).
- Το τελικό ίζημα των κυστιδίων διαλυτοποιείται σε 500 μ L διαλύματος 0.1 M KP_i pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$ και φυλάσσονται στους -80 °C αφού πρώτα καταψυχθούν σε υγρό άζωτο.
- Ακολουθεί μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA (εδάφιο 2.7.1)

Τα μεμβρανικά κυστίδια RSO χρησιμοποιήθηκαν τόσο σε δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς (εδάφιο 2.6.2) όσο και σε δοκιμασίες προσβασιμότητας κυστεϊνών (εδάφιο 2.10.1)

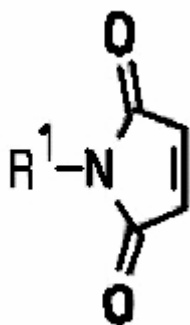
2.10 Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών (cysteine accessibility assay)

2.10.1 Σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού

Διαλύματα

KP _i pH 7.5	1 M
MgSO ₄	1 M
NaP _i pH 7.5	1 M
DDM	20%
Διάλυμα αποδιάταξης	
NaP _i pH 7.5	100 mM
Urea	6 M
SDS	0.5%
Na ₂ EDTA, pH 8.0	0.5 M

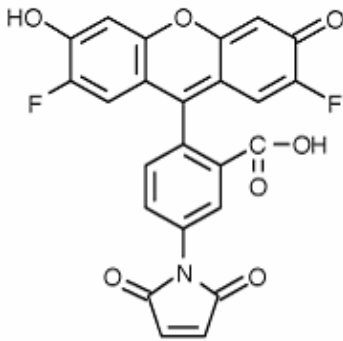
Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται έλεγχος των κυστεϊνών από ειδικά αντιδραστήρια σουλφυδρυλομάδων σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSO). Η μέθοδος αποτελεί προσαρμογή άλλων πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούν φθορίζοντα SH-αντιδραστήρια (Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005; Nie *et al* 2007) και είναι η πρώτη φορά που εφαρμόζεται σε αυτό το σύστημα στο εργαστήριό μας, αν και είχε εφαρμοσθεί με επιτυχία σε προηγούμενη εργασία, σε ακέραια κύτταρα (Karatza *et al.*, 2006). Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε κυρίως το ειδικό SH-αντιδραστήριο N-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) (Εικόνα 2.7). Η διαδικασία του πειράματος είναι η εξής:



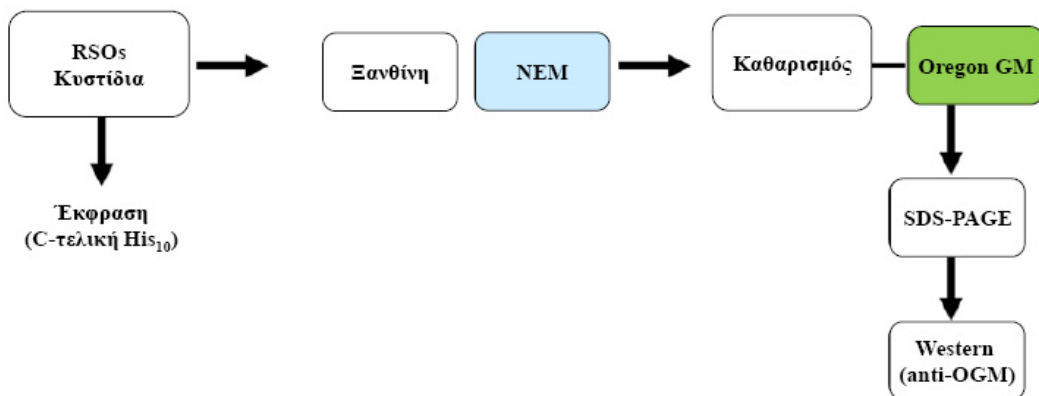
Εικόνα 2.7. *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM, *N*-ethylmaleimide)

Μεμβρανικά κυστίδια RSO (κεφάλαιο 2.9) σε τελική συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 4 mg/mL, επώζονται παρουσία ή απουσία NEM 2mM, παρουσία ή απουσία υποστρώματος (ξανθίνη 1 mM) για 10 min στους 25 °C, και, κατόπιν, εκπλένονται 2 φορές με 1 mL διαλύματος 0.1 M KPi pH 7.5, 10 mM MgSO_4 και 1 φορά με 1 mL διαλύματος 100mM NaPi pH 7.5. Στη συνέχεια, γίνεται διαλυτοποίηση των κυστιδίων σε 100 μL διαλύματος 100 mM NaPi pH 7.5 που περιέχει 2% w/v *n*-δωδεκυλο- β -D-μαλτοπυρανοσιδίου (DDM) (Wu *et al.*, 1994, Wu and Kaback, 1994) και ακολουθεί επώαση για 30 min στους 4 °C για την εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών από τη μεμβράνη. Σε κάθε δείγμα μεμβρανικού εκχυλίσματος προστίθενται 300 μL διαλύματος εξισορρόπησης (100mM NaPi pH 7.5, 150 mM NaCl , 30 mM ιμιδαζόλιο, 0,02% DDM) που επιπλέον περιέχει 50 μL προ-εξισορροπημένων σφαιριδίων Ni-IDA (Probond) και το μίγμα αναδεύεται για 1 h στους 4 °C. Μετά το πέρας της επώασης γίνεται έκπλυση με 600 μL διαλύματος 100 mM NaPi pH 7.5, 150 mM NaCl , που περιέχει 100 mM ιμιδαζόλιο και 0.02% DDM, και προστίθεται 1 mL διαλύματος αποδιάταξης (διάλυμα ουρίας/SDS) για 10 min υπό ανάδευση. Ακολουθεί επώαση με 100 μL του ίδιου διαλύματος που περιέχει και 0.2 mM OGM (**Εικόνα 2.8**) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Η δράση του OGM τερματίζεται με την προσθήκη 300 μL διαλύματος αποδιάταξης που περιέχει 5 mM β -μερκαπτοαιθανόλη για 3 min. Η έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια Ni-IDA επιτυγχάνεται με την προσθήκη 50 μL διαλύματος φόρτωσης (1X) (βλ. εδάφιο 2.8.2) που περιέχει 0.07 M Na_2EDTA , pH 8.0 και επώαση για 10 min στους 37 °C: το στάδιο έκλυσης επαναλαμβάνεται μία φορά και τα δύο εκλούσματα συλλέγονται και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και

ανοσοαποτύπωση με Anti-OGM και PentaHis-HRP (βλ. κεφάλαιο 2.8). Η διαδικασία φαίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.9**.



Εικόνα 2.8: Η δομή του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (OGM)



Εικόνα 2.9: Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών (cysteine accessibility assay) σε μεμβρανικά κυστίδια

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

2.11 *In silico* αναλύσεις

Η αλληλουχία DNA του XanQ και των άλλων ομολόγων του μεταφορέα αυτού στην *E. coli*, καθώς και οι αντίστοιχες αλληλουχίες αμινοξέων, εξήχθησαν από βάσεις δεδομένων που καταγράφουν την πλήρη αλληλουχία γονιδιώματος της *E. coli* K-12, σύμφωνα με τις νεότερες διαθέσιμες ενημερώσεις (The EcoGene database of *E. coli* sequence and function, www.ecogene.org).

Για την προσέγγιση του τοπολογικού μοντέλου της πρωτεΐνης έγινε καταρχήν εξέταση θεωρητικών προβλέψεων με όλους τους διαθέσιμους αλγόριθμους. Ιδιαίτερα, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) (Granseth *et al.*, 2005). Η ανάλυση στοίχισης των κωδικοποιουσών αλληλουχιών των μεταφορέων NAT/NCS2 πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

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

Η μοντελοποίηση ομολογίας του XanQ (homology modeling) με τη δομή του UraA, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη γνωστή κρυσταλλική δομή του τελευταίου σαν υπόβαθρο στη βάση δεδομένων SWISSPROT και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα DeepView/Swiss PDB viewer ή το PyMol 0.97 (DeLano Scientific, LLC).

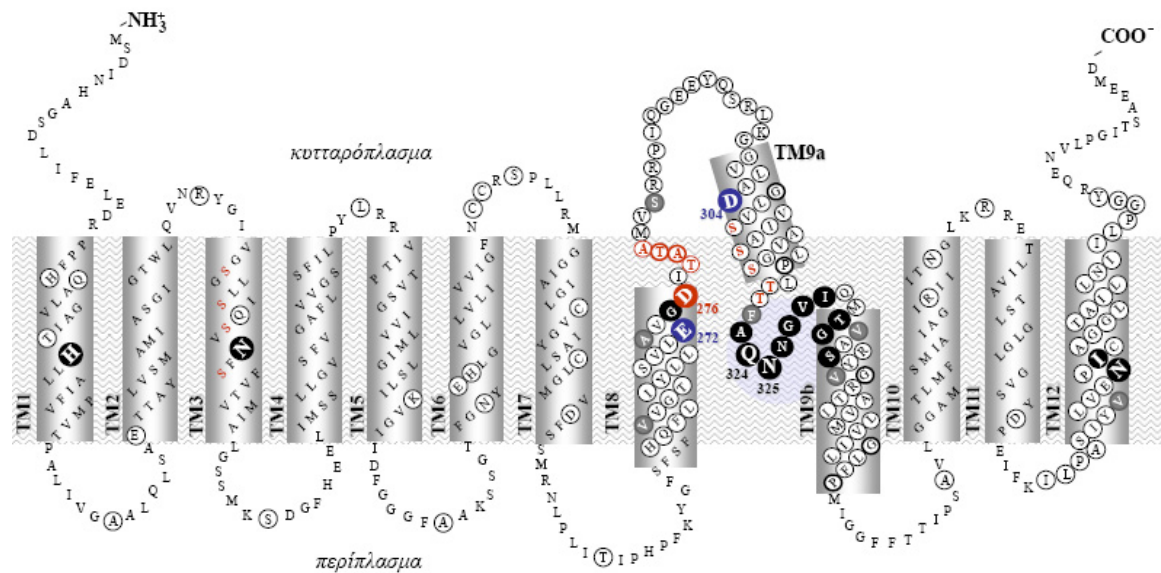
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση του υποστρώματος (ξανθίνης) στα κατάλοιπα της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα ξανθίνης XanQ

Τα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του μοτίβου-υπογραφή της οικογένειας, μιας συντηρημένης αλληλουχίας 11 αμινοξικών καταλοίπων που εντοπίζεται μεταξύ των διαμεμβρανικών ελίκων 9a και 9b στο πιθανό τοπολογικό μοντέλο του XanQ (Εικόνα 3.1). Προηγούμενες μελέτες τόσο στο βακτηριακό ομόλογο XanQ (Karatzá *et al.*, 2006) όσο και στο ευκαρυωτικό UapA (Koukaki *et al.*, 2005) είχαν προτείνει ότι το μοτίβο-υπογραφή μπορεί να περιέχει καθοριστές για τη λειτουργία του κέντρου δέσμησης και για την εκλεκτικότητα αναγνώρισης του υποστρώματος. Αρχικά, η αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή (A/G/S)(Q/E/P)NXGXXXXT(R/K/G) συσχετίστηκε με τον καθορισμό της εξειδίκευσης του υποστρώματος βάσει ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών UapA/UapC στο σύστημα του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998). Μεταγενέστερα, μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης στα συντηρημένα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή του UapA (Koukaki *et al.*, 2005) υπέδειξε θέσεις που εμπλέκονται στην πρόσδεση των υποστρωμάτων με τον πουρινικό δακτύλιο, είτε έμμεσα, επηρεάζοντας τις αλλαγές διαμόρφωσης του μεταφορέα κατά τη δέσμηση υποστρώματος, είτε άμεσα, συμμετέχοντας στο κέντρο δέσμησης (Q408E) (Koukaki *et al.*, 2005).

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας στο σύστημα της *E. coli* (Καρατζά, 2006), η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και η μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης στο μοτίβο-υπογραφή του XanQ είχαν δείξει ότι τα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325 είναι απολύτως απαραίτητα (αναντικατάστατα) και, μάλιστα, η Gln-324 φαίνεται ότι χρειάζεται για τη δέσμηση και μεταφορά υποστρώματος με υψηλή συγγένεια (high affinity). Επίσης, μια πλευρά α-έλικας καθοδικά του μοτίβου (Ile-329, Thr-332, Gly-333, Ser-334, Val-339) ήταν ήδη γνωστό ότι είναι ευαίσθητη σε απενεργοποίηση από το N-αιθυλμυεϊμίδιο (NEM) (Karatzá *et al.*, 2006). Παρ' όλα αυτά, μέχρι την έναρξη της παρούσας διατριβής δεν είχε πραγματοποιηθεί συστηματική ανάλυση της αλληλεπίδρασης του υποστρώματος με τα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή ούτε στο βακτηριακό (Karatzá *et al.*, 2006) ούτε στο μυκητιακό σύστημα (Koukaki *et al.*, 2005). Σε αυτή την ενότητα της διατριβής μελετήθηκε η επίδραση της δέσμησης του υποστρώματος (ξανθίνη) στην αλκυλίωση μιας σειράς περμεασών μοναδικής κυστεϊνης (single-Cys mutants) της

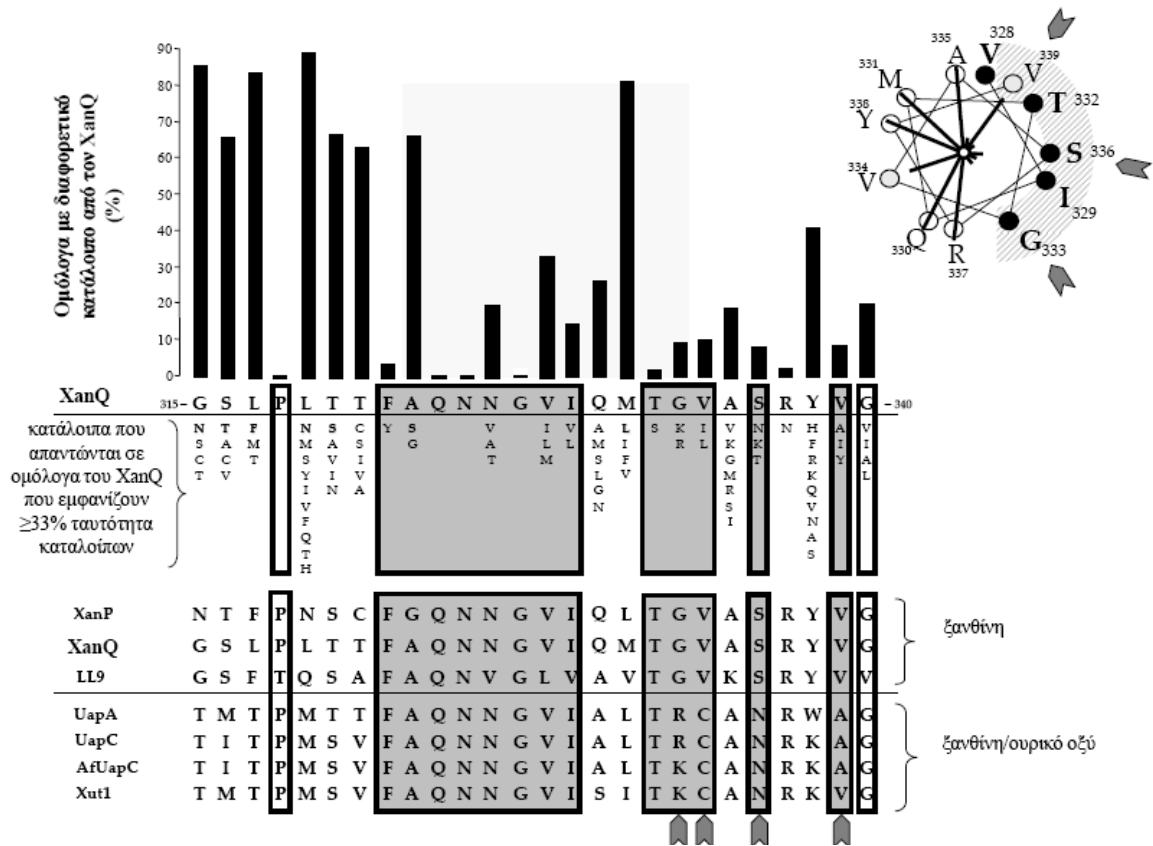
περιοχής του μοτίβου-υπογραφή από τον ειδικό αλκυλιωτικό παράγοντα NEM. Στόχος μας ήταν να εξετάσουμε κατά πόσον κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή του XanQ μπορεί να συμμετέχουν άμεσα στο κέντρο δέσμησης (οπότε η αλκυλίωση των αντίστοιχων μεταλλάγματων μοναδικής Cys θα έπρεπε να παρεμποδίζεται στερεοχημικά από το υπόστρωμα) ή να επηρεάζονται έμμεσα από τη δέσμηση υποστρώματος (οπότε τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μοναδικής Cys θα μπορούσαν να ανταποκρίνονται στην αλλαγή διαμόρφωσης που επάγει το υπόστρωμα με αύξηση της αντιδραστικότητάς τους προς το αλκυλιωτικό αντιδραστήριο).



Εικόνα 3.1 Πιθανό τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα XanQ. Το μοντέλο είναι βασισμένο στον θεωρητικό αλγόριθμο πρόβλεψης TMHMM και σε πειραματικά δεδομένα για τη διεύθυνση του C-τελικού άκρου προς το κυτταρόπλασμα (Granseth *et al.*, 2005) και των θέσεων που είναι προσβάσιμες από υδρόφιλα αντιδραστήρια σε συνδετικές περιοχές μεταξύ των 12 διαμεμβρανικών ελίκων ή στην επανεισερχόμενη θηλιά του μοτίβου-υπογραφή (Mermelekas *et al.*, 2010). Τα αναντικατάστατα κατάλοιπα σημειώνονται με έντονο χρώμα. Οι θέσεις που παρουσιάζουν ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το NEM σημειώνονται με σκούρο υπόβαθρο. Τα κατάλοιπα που έχουν αναλυθεί με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης σημειώνονται με κύκλο. Τα κατάλοιπα που αποτελούν αντικείμενο αυτής της ενότητας είναι αριθμημένα ενώ οι πιθανές αμφιπαθικές α-έλικες των περιοχών καταλοίπων 299-323 και 330-357 σημειώνονται ως TM9a και TM9b, αντίστοιχα.

3.1.1 Επίδραση της ξανθίνης στο προφίλ ευαισθησίας της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή σε αλκυλίωση/απενεργοποίηση από NEM: Νέα στοιχεία για τις θέσεις Ala-323 και Asn-325

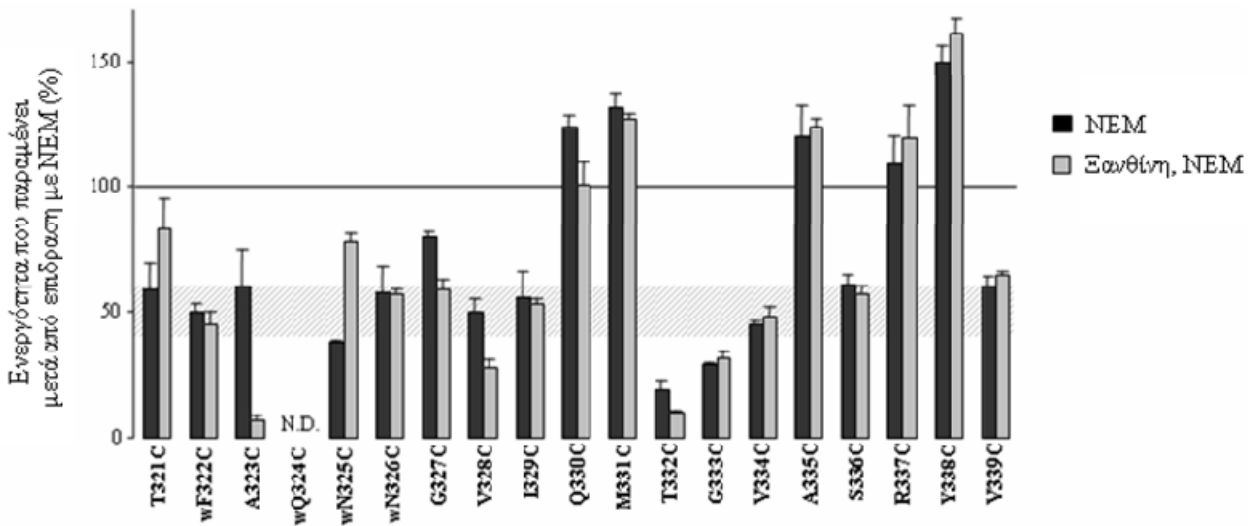
Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή του XanQ (Karatzá *et al.*, 2006) ανέδειξε μια ομάδα καταλοίπων, συμπεριλαμβανομένων των Ala-323, Asn-326, Gly-327, Val-328, Ile-329, Thr-332, Gly-333 και Ser-334, των οποίων η αντικατάσταση με κυστεΐνη δεν επηρεάζει σημαντικά την ενεργότητα αλλά η ενεργότητα αναστέλλεται ισχυρά όταν τροποποιηθούν από το NEM. Μερικά από αυτά τα κατάλοιπα σχηματίζουν μια όψη α-έλικας στην αρχή του TM9b (**Εικόνα 3.1**). Η αρχική μεταλλαξιγένεση (Karatzá *et al.*, 2006) ανέδειξε επίσης δύο αναντικατάστατα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή, τα Gln-324 και Asn-325. Η ευαισθησία των θέσεων αυτών στο NEM δεν μπορούσε να ελεγχθεί με ακρίβεια γιατί τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονών κυστεϊνών ήταν ανενεργά (Karatzá *et al.*, 2006). Βιοπληροφορικές αναλύσεις (Georgoroulou *et al.*, 2010) αποκαλύπτουν ότι όλα τα ευαίσθητα σε απενεργοποίηση κατάλοιπα του XanQ αντιστοιχούν σε θέσεις με υψηλή συντήρηση ως προς την πλευρική αλυσίδα, ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας NAT (**Εικόνα 3.2**). Όπως έχει αποδειχθεί σε άλλους μεταφορείς (Frillingos and Kaback, 1997; Tamura *et al.*, 2001; Tavoulari and Frillingos, 2008), τέτοια ευαίσθητα σε απενεργοποίηση και συντηρημένα κατάλοιπα αναμένεται να εντοπίζονται σε θέσεις οι οποίες είτε είναι σημαντικές για τη διαμόρφωση και την εναλλαγή των διαμορφώσεων κατά το μηχανισμό είτε βρίσκονται στο μονοπάτι δέσμευσης υποστρώματος και έρχονται σε άμεση επαφή με αυτό. Για τη διάκριση μεταξύ των δύο αυτών πιθανών εκδοχών, αναλύθηκε η επίδραση της δέσμευσης του υποστρώματος στην ευαισθησία (**sensitivity**) (δηλαδή στο βαθμό απενεργοποίησης) και στην αντιδραστικότητα (**reactivity**) (δηλαδή στο βαθμό αλκυλίωσης) των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης έναντι του αλκυλιωτικού παράγοντα NEM.



Εικόνα 3.2 Συσχέτιση του βαθμού συντήρησης της αλληλουχίας 315-340 με το βαθμό ευαισθησίας των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης στο NEM. Το ιστόγραμμα δείχνει τη διακύμανση της πλευρικής αλυσίδας ανάμεσα στα 188 πιο συγγενικά ομόλογα του XanQ (ταυτότητα αλληλουχίας $\geq 33\%$), παρουσιάζοντας το ποσοστό των ομόλογων που έχει διαφορετικό αμινοξύ από το XanQ σε κάθε θέση της αλληλουχίας. Η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (κατάλοιπα 323-333) σημειώνεται με το γραμμωσκιασμένο ορθογώνιο. Επίσης σημειώνονται τα κατάλοιπα συγγενικών ομόλογων που διαφέρουν στις αντίστοιχες θέσεις από τον XanQ. Στο κάτω μέρος, παρουσιάζεται μια σύγκριση μεταξύ των αλληλουχιών της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή των μεταφορέων ξανθίνης XanQ (P67444) και YicE (XanP) (P0AGM9) από την *E. coli*, ξανθίνης/ουρικού UapA (Q07307) και UapC (P487777) από τον *A. nidulans*, AfUapA (XP748919) από τον *A. fumigates*, Xut1 (AAX2221) από την *C. Albicans* και LL9 (Q92LL9) από το *Sinorhizobium meliloti*.. Οι θέσεις που αντιστοιχούν σε κατάλοιπα σημαντικά για την έκφραση του μεταφορέα XanQ σημειώνονται με λευκά πλαίσια. Οι θέσεις που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από το NEM σημειώνονται με γκρι πλαίσια ενώ θέσεις όπου οι μεταφορείς από τους μύκητες διαφέρουν σημειώνονται με βέλη. Πάνω δεξιά απεικονίζεται η κάτω α-έλικας της περιοχής των καταλοίπων 328-339 του XanQ, όπου οι θέσεις που εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM σημειώνονται με μαύρους κύκλους (Karatz et al., 2006). Οι γραμμές που εκκινούν από το κέντρο της κάτω α-έλικας είναι ανάλογες της τιμής IC₅₀ για κάθε μετάλλαγμα (βλ. παρακάτω).

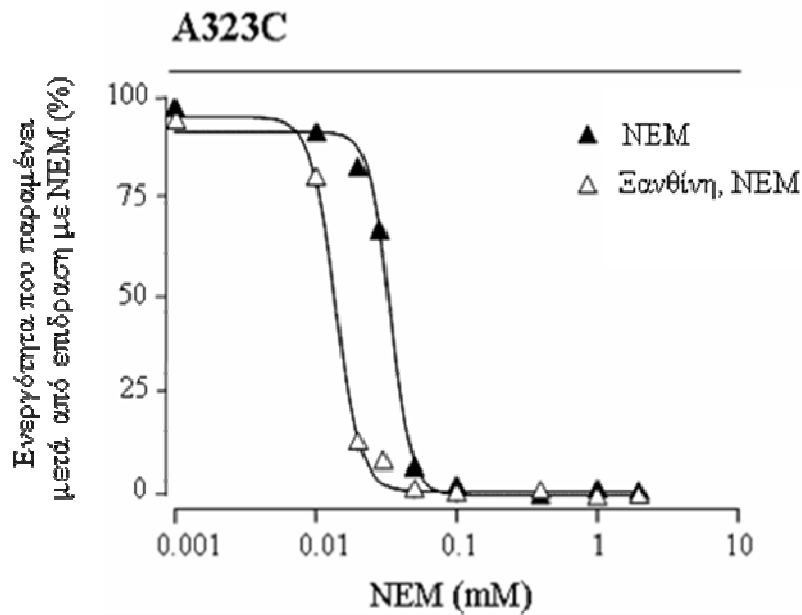
Επίδραση του υποστρώματος στην ευαισθησία: Το υπόστρωμα «εκθέτει» τη θέση A323C για αλκυλίωση από το NEM

Κάθε ενεργό μετάλλαγμα μονής κυστεΐνης στην περιοχή αλληλουχίας 321-339 του XanQ δοκιμάστηκε για την επίδραση του NEM, ενός μικρού και σχετικά υδρόφοβου αλκυλιωτικού παράγοντα, στην αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης. Τα πειράματα μέτρησης της ενεργότητας έγιναν αφού είχε προηγηθεί επώαση με το NEM παρουσία ή απουσία υποστρώματος και στη συνέχεια έκπλυση της περίσσειας αντιδραστηρίων (**Εικόνα 3.3**). Η αρχική δοκιμασία των μεταλλαγμάτων πραγματοποιήθηκε στη συγκέντρωση NEM η οποία απουσία υποστρώματος προκαλεί αναστολή της ενεργότητας κατά 50% (δηλαδή στη συγκέντρωση IC_{50}) (Karatza *et al.*, 2006). Στη συγκέντρωση αυτή (διαφορετική για κάθε μετάλλαγμα), ελέγχθηκε η επίδραση του υποστρώματος στο βαθμό της αναστολής (**Εικόνα 3.3**). Στη συνέχεια έγιναν πειράματα δοσοεξάρτησης σε ένα κατάλληλο εύρος συγκεντρώσεων NEM ώστε να καθοριστεί η επίδραση του υποστρώματος στην τιμή IC_{50} του κάθε μεταλλάγματος (**Πίνακας 3.1**). Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι από τα 15 μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης που εξετάστηκαν, το A323C αντιδρά στην παρουσία του υποστρώματος με σημαντική αύξηση της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το NEM, αφού η IC_{50} μειώνεται από 34 σε 14 μM (**Εικόνα 3.4**). Η ευαισθησία των υπόλοιπων μεταλλαγμάτων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία του υποστρώματος (**Εικόνα 3.3**, **Πίνακας 3.1**). Για τα κατάλοιπα Phe-322, Asn-325 και Asn-326, τα οποία οδηγούν σε ανενεργά μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τις υποκατεστημένες κυστεΐνες των συγκεκριμένων θέσεων σε φυσικού τύπου υπόβαθρο (wild-type background). Χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή τα μεταλλάγματα F322C(wt) και N326C(wt) τα οποία εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα (Karatza *et al.*, 2006) και το μετάλλαγμα N325C(wt) το οποίο εμφανίζει χαμηλή αλλά ανιχνεύσιμη ενεργότητα (Karatza *et al.*, 2006). Αυτά τα τρία μεταλλάγματα είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το NEM, ενώ η XanQ(wt) παρά την παρουσία των 5 εγγενών κυστεϊνών δεν παρουσιάζει ευαισθησία στη δράση του αντιδραστηρίου (Karatza and Frillingos, 2005). Παρουσία του υποστρώματος η ευαισθησία του μεταλλάγματος N325C(wt) σε απενεργοποίηση από το NEM μειώνεται δραματικά (η IC_{50} αυξάνεται από 89 μM σε 1 mM) ενώ η ευαισθησία των F322C(wt) και N326C(wt) παραμένει στα ίδια επίπεδα (**Εικόνα 3.3**, **Πίνακας 3.1**).



Εικόνα 3.3 Επίδραση της ξανθίνης στην ευαισθησία των μεταλλάγματων μονής κυστεΐνης στο NEM.

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(C-less-BAD) ή pT7-5/*xanQ*(wild-type-BAD) που εκφράζουν τα αντίστοιχα μεταλλάγματα αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37° C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2 h συλλέγονται και επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 7.5). Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM), μετά από προεπάωση με NEM για 10 min στους 25° C παρουσία ή απουσία μη σημασμένης ξανθίνης (1 mM) και έκπλυση της περίσσειας αντιδραστηρίων πριν την έναρξη της δοκιμασίας μεταφοράς. Η προεπάωση με το NEM πραγματοποιήθηκε σε διαφορετική συγκέντρωση για το κάθε μετάλλαγμα, ανάλογα με την ευαισθησία που παρουσίαζε το καθένα στη δράση του αντιδραστηρίου, σύμφωνα με αρχικά πειράματα που είχαν γίνει απουσία υποστρώματος (Karatza et al., 2006). Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 10 μM (G327C), 20 μM (A323C), 40 μM (G333C), 50 μM (N326C(wt), I329C, T332C), 60 μM (S336C), 100 μM (N325C(wt), V328C), 0.2mM (V334C), 0.4 mM (F322C(wt), V339C), 1 mM (T321C) και 2 mM (Q330C, M331C, A335C, R337C, Y338C). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν ποσοστό % επί των τιμών που προέρχονται από κύτταρα που έχουν προεπωαστεί απουσία NEM και οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Δεν υπολογίστηκαν τιμές (ND) για τα μεταλλάγματα Q324C και Q324C(wt) λόγω χαμηλών αρχικών ταχυτήτων πρόσληψης ξανθίνης



Εικόνα 3.4 Επίδραση της ξανθίνης στην ευαισθησία του μεταλλάγματος A323C στο NEM. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν το μετάλλαγμα από πλασμίδιο pT7-5/*xanQ*(A323C-BAD) υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C, παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM). Προηγήθηκε επώαση με NEM (1 μM – 2 mM) για 10 min στους 25° C, παρουσία ή απουσία μη σημασμένης ξανθίνης (1 mM) και έκπλυση της περίσσειας αντιδραστηρίων μετά τον τερματισμό της αντίδρασης. Μετρήθηκαν οι αρχικές ταχύτητες σε χρόνους 5 – 20 sec και οι τιμές προσαρμόστηκαν στις κατάλληλες εξισώσεις για να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις NEM που προκαλούν 50% αναστολή της ενεργότητας (IC_{50}), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *Prism4*. Οι συγκεντρώσεις IC_{50} που υπολογίστηκαν είναι 34 μM (για την επίδραση του NEM απουσία ξανθίνης) και 14 μM (για την επίδραση του NEM παρουσία ξανθίνης).

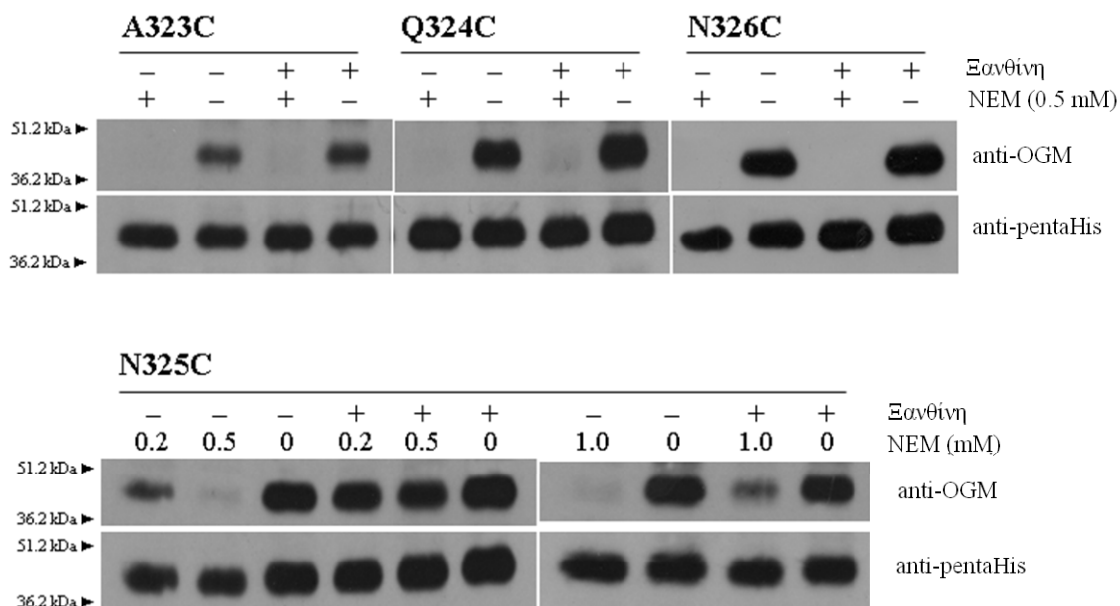
IC₅₀ (μM)

Μετάλλαγμα	Έκθεση στο NEM απουσία υποστρώματος	Έκθεση στο NEM παρουσία 1 mM ξανθίνης
XanQ(wt)	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
XanQ(Cys-less)	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
T321C	1000	1500
F322C(wt)	400	450
A323C	34	14
Q324C ή Q324C(wt)	ND	ND
N325C(wt)	89	1000
N326C(wt)	50	50
G327C	12	10
V328C	96	80
I329C	50	50
Q330C	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
M331C	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
T332C	40	35
G333C	35	38
V334C	210	230
A335C	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
S336C	60	55
R337C	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
Y338C	Δεν αναστέλλεται	Δεν αναστέλλεται
V339C	400	410

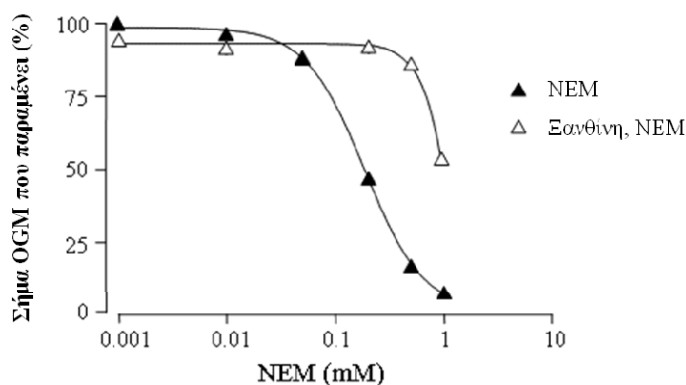
Πίνακας 3.1 Επίδραση της ξανθίνης στην IC₅₀ των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης για το NEM. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τον μεταφορέα φυσικού τύπου ή τα αντίστοιχα μεταλλάγματα από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(C-less-BAD) ή pT7-5/*xanQ*(wild-type-BAD) υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM), παρουσία PMS (0.2 mM) και ασκορβικού (20 mM). Είχε προηγηθεί επώαση με NEM (σε συγκεντρώσεις 1 μM έως 2 mM) για 10 min στους 25° C, παρουσία ή απουσία μη σημασμένης ξανθίνης (1 mM) και έκπλυση της περίσσειας αντιδραστηρίων μετά τον τερματισμό της αντίδρασης. Μετρήθηκαν οι αρχικές ταχύτητες σε χρόνους 5-20 sec και οι τιμές προσαρμόστηκαν στις κατάλληλες εξισώσεις για να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις NEM που προκαλούν 50% αναστολή της ενεργότητας (IC₅₀), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *Prism4*. Δεν υπολογίστηκαν τιμές (ND) για τα μεταλλάγματα Q324C και Q324C(wt) λόγω χαμηλών αρχικών ταχυτήτων πρόσληψης ξανθίνης ενώ οι τιμές IC₅₀ των μεταλλαγμάτων F322C(wt), N325C(wt) και N326C(wt) είναι στο υπόβαθρο του φυσικού τύπου XanQ. Στα πειράματα ελέγχου, τόσο ο φυσικού τύπου μεταφορέας XanQ(wt) όσο και ο μεταφορέας ελεύθερος κυστεΐνων XanQ(Cys-less) δεν αναστέλλονται καθόλου από το NEM.

Επίδραση του υποστρώματος στην αντιδραστικότητα: Το υπόστρωμα «προστατεύει» τη θέση N325C από αλκυλίωση από το NEM

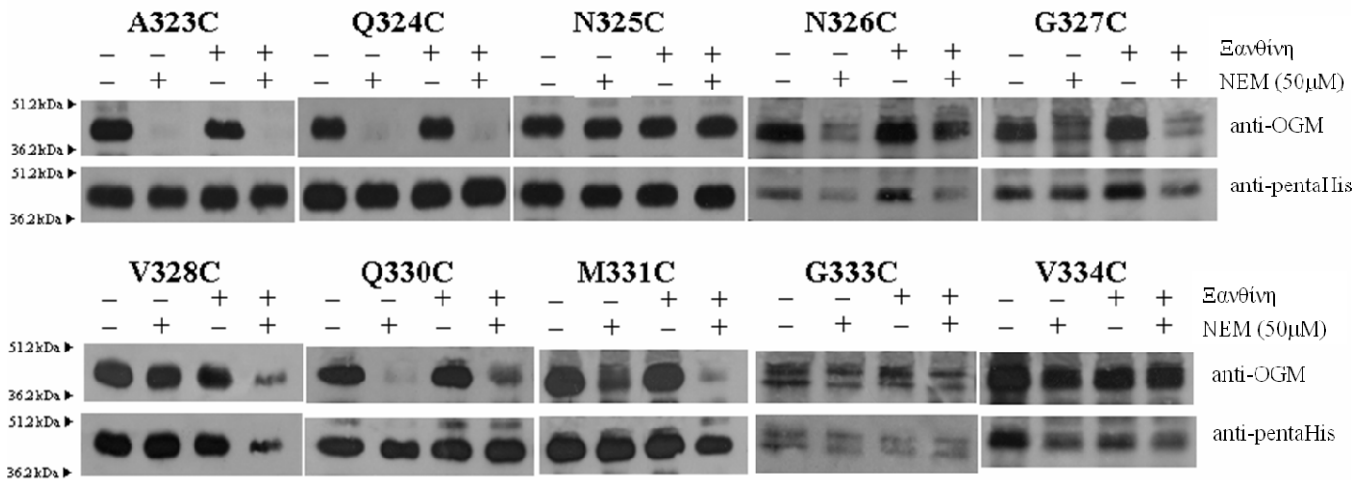
Τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης Q324C, N325C και N326C που είναι ανενεργά, καθώς και το μετάλλαγμα A323C, το οποίο αντιδρά στην επώαση με το υπόστρωμα με αύξηση της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση από το NEM, υποβλήθηκαν σε αλκυλίωση ώστε να καθοριστεί ο βαθμός της τροποποίησης (αλκυλίωσης) από το NEM παρουσία ή απουσία υποστρώματος (**Εικόνα 3.5**). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι κάθε ένα από τα παραπάνω μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης αντιδρά με το NEM σε υψηλό βαθμό. Ωστόσο, η αντιδραστικότητα του μεταλλάγματος N325C παρεμποδίζεται από την παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνης) είτε ολοκληρωτικά (σε συγκεντρώσεις 0.2 – 0.5 mM NEM) είτε εν μέρει (σε συγκέντρωση 1 mM NEM) (**Εικόνα 3.5**). Χρησιμοποιώντας ένα εύρος συγκεντρώσεων NEM διαπιστώθηκε ότι η ξανθίνη αλλάζει το EC_{50} του μεταλλάγματος N325C από 0.19 mM σε 2.04 mM, όπως προσδιορίστηκε από το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism4* (**Εικόνα 3.6**). Η αντιδραστικότητα των άλλων τριών μεταλλαγμάτων δεν μεταβάλλεται σημαντικά από την παρουσία του υποστρώματος είτε χρησιμοποιώντας μεγάλες (**Εικόνα 3.5**) είτε μικρές συγκεντρώσεις NEM (10 – 200 μ M). Επίσης εξετάστηκε η αντιδραστικότητα όλων των άλλων μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης της περιοχής αλληλουχίας 323 – 334 σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση NEM (50 μ M), παρουσία ή απουσία ξανθίνης (**Εικόνα 3.7**). Διαπιστώθηκε ότι η αντιδραστικότητα των μεταλλαγμάτων στο NEM σε αυτή την περιοχή αλληλουχίας ακολουθεί ένα διαφορετικό μοτίβο από αυτό της ευαισθησίας στη δράση του αντιδραστηρίου (**Εικόνα 3.8**) ενώ η παρουσία του υποστρώματος δεν επιφέρει δραστικές αλλαγές σε αυτές τις συνθήκες.



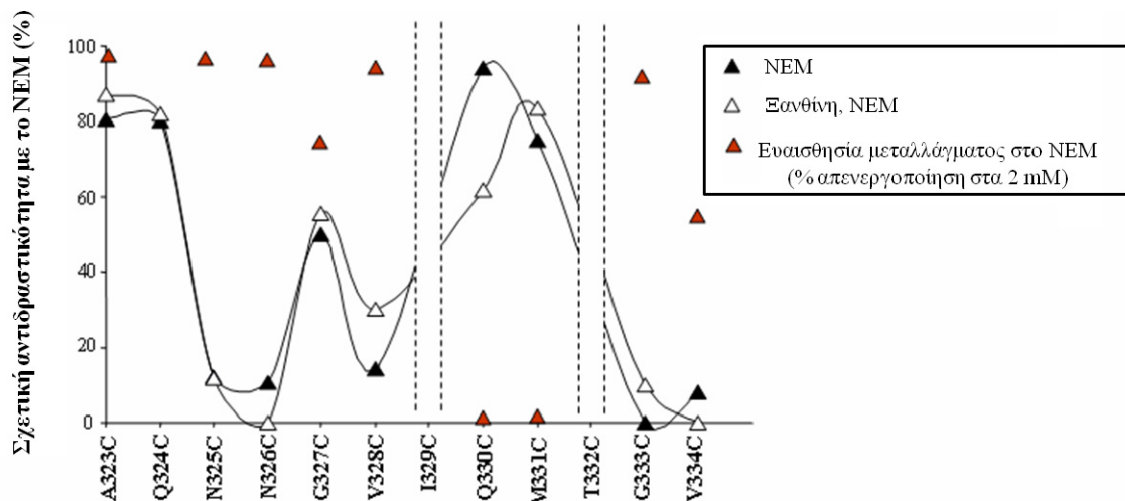
Εικόνα 3.5 Επίδραση της ξανθίνης στην αντιδραστικότητα μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης με το NEM. Μεμβρανικά κυστίδια RSO που έχουν παρασκευαστεί από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα μεταλλάγματα A323C, Q324C, N325C ή N326C από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(single-Cys-His₁₀) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία αλκυλίωσης παρουσία ή απουσία ξανθίνης (1 mM). Μετά την επώαση με το NEM (10 min, 25° C, στις συγκεντρώσεις που φαίνονται) και τον τερματισμό της αντίδρασης, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν με DDM, 2% (w/v). Οι XanQ απομονώθηκαν από το εκχύλισμα των μεμβρανικών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺, αποδιατάχθηκαν σε διάλυμα SDS/ουρίας, και οι κυστεΐνες που απέμειναν ελεύθερες σημάνθηκαν με το Πράσινο Μηλεϊμίδιο του Όρεγκον (Oregon Green Maleimide, OGM) (0.2 mM). Ακολούθησε SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση (α) αντισώματος έναντι του OGM, για τον έλεγχο του ποσοστού σήμανσης [άνω] και (β) αντισώματος pentaHis για τον έλεγχο της ολικής πρωτεΐνης που εκλούεται από τη στήλη [κάτω]. Στα αριστερά, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.6 Καμπύλες δόσο-εξάρτησης της αντιδραστικότητας του N325C με το NEM, παρουσία ή απουσία ξανθίνης. Τιμές EC₅₀ εξήχθησαν χρησιμοποιώντας μη γραμμική συσχέτιση των δεδομένων (βλ. Εικόνα 3.5) στη σιγμοειδή εξίσωση δόσο-εξάρτησης του υπολογιστικού προγράμματος *Prism4*. Η τιμή που αντιστοιχεί στο ποσοστό σήμανσης από το OGM που διατηρείται σε κάθε περίπτωση, εξάγεται χρησιμοποιώντας τον λόγο (LE_{NEM}/LE_{OGM}) όπου LE_{NEM} και LE_{OGM} αντιστοιχούν στο βαθμό σήμανσης από το OGM παρουσία ή απουσία προεπάασης με το NEM, αντιστοίχως. Η ποσοτικοποίηση της σήμανσης προέκυψε από διαίρεση της πυκνότητας της κάθε ζώνης που αντιστοιχεί στο σήμα του anti-OGM προς την πυκνότητα της αντίστοιχης ζώνης που δίνει το σήμα του anti-PentaHis, χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Quantity One (Bio-Rad).



Εικόνα 3.7 Προφίλ αντιδραστικότητας των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης με το NEM (50 μ M). Μembranικά κυστιδία RSO που έχουν παρασκευαστεί από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα μεταλλάγματα A323C, Q324C, N325C, N326C, G327C, V328C, Q330C, M331C, G333C ή V334C από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(single-Cys-His₁₀) επώαστηκαν με NEM (50 μ M, 10 min, 25 °C), παρουσία ή απουσία ξανθίνης (1 mM) και, μετά την επώαση, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν με DDM, 2% (w/v). Οι XanQ απομονώθηκαν από το εκχύλισμα των μεμβρανικών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺, αποδιατάχθηκαν σε διάλυμα SDS/ουρίας, και οι κυστεΐνες που απέμειναν ελεύθερες σημάνθηκαν με το Πράσινο Μηλεϊμίδιο του Όρεγκον (Oregon Green Maleimide, OGM) (0.2 mM). Ακολούθησε SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση, με χρήση (α) αντισώματος έναντι του OGM, για τον έλεγχο του ποσοστού σήμανσης [άνω] και (β) αντισώματος pentaHis για τον έλεγχο της ολικής πρωτεΐνης που εκλούεται από τη στήλη [κάτω]. Στα αριστερά, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.8 Προφίλ αντιδραστικότητας των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης με το NEM και σύγκριση με το προφίλ της ευαισθησίας σε απενεργοποίηση. Η τιμή της σχετικής αντιδραστικότητας του κάθε μεταλλάγματος (βλ.Εικόνα 3.7) εξάγεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση $((LE_{OGM} - LE_{NEM})/LE_{OGM})$ όπου LE_{OGM} και LE_{NEM} αντιστοιχούν στο βαθμό σήμανσης από το OGM απουσία ή παρουσία προεπάσης με το NEM, αντιστοίχως. Η ποσοτικοποίηση της σήμανσης προέκυψε από διαίρεση της πυκνότητας της κάθε ζώνης που αντιστοιχεί στο σήμα του anti-OGM προς την πυκνότητα της αντίστοιχης ζώνης που δίνει το σήμα του anti-PentaHis, χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Quantity One (Bio-Rad). Με κόκκινα τρίγωνα σημειώνονται οι τιμές της ευαισθησίας του κάθε μεταλλάγματος σε απενεργοποίηση, ως τιμές της ενεργότητας που παραμένει μετά από επώαση με 2 mM NEM (Karatzá *et al.*, 2006)

3.1.2 Θέσεις καταλοίπων στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή που συνεισφέρουν στο προφίλ εξειδίκευσης: Gly-333 και Ser-336

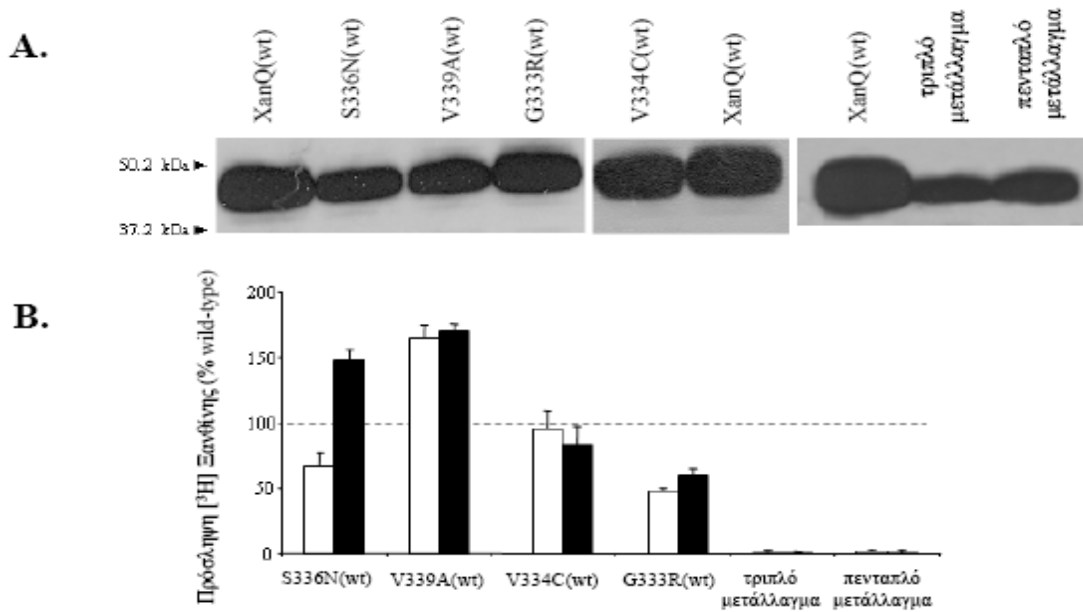
Η παρατηρούμενη συσχέτιση της συντήρησης της πλευρικής αλυσίδας των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης με την ευαισθησία που παρουσιάζουν σε απενεργοποίηση από το NEM (**Εικόνα 3.2**) είναι ιδιαίτερα εμφανής στην αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή (κατάλοιπα 323-333) και αμέσως πριν το μοτίβο (κατάλοιπα 315-322). Στην περιοχή που ακολουθεί το μοτίβο και αποτελεί το τμήμα μιας α-έλικας (κατάλοιπα 333-339) η συντήρηση αυτή δεν είναι τόσο προφανής. Είναι ενδιαφέρον, μάλιστα, ότι όλα τα κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή που αντιστοιχούν σε θέσεις ευαίσθητες σε NEM στον ειδικό μεταφορέα ξανθίνης XanQ συντηρούνται και στο μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA καθώς και στους υπόλοιπους γνωστούς μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης (Xut1, UapC, AfUapA) (**Εικόνα 3.2**). Αντιθέτως, τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν σε θέσεις ευαίσθητες σε NEM αλλά εντοπίζονται στη μία όψη της α-έλικας του XanQ που ακολουθεί αμέσως μετά το μοτίβο συντηρούνται σε άλλους μεταφορείς με εξειδίκευση για ξανθίνη (XanP, LL9) αλλά διαφέρουν σημαντικά στους μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης (**Εικόνα 3.2**). Πρόκειται για τα κατάλοιπα Gly-333, Val-334, Ser-336 και Val-339, τα οποία στους μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης αντικαθίστανται από Arg/Lys, Cys, Asn και Ala, αντίστοιχα. Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε στην εφαρμογή μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης, δηλαδή να τροποποιήσουμε τον XanQ αντικαθιστώντας αυτά τα τέσσερα κατάλοιπα (είτε ένα – ένα είτε συνδυασμούς αυτών) με τα αμινοξέα που απαντώνται στις αντίστοιχες θέσεις του μεταφορέα UapA με στόχο να ελεγχθεί αν οι αντικαταστάσεις διαφοροποιούν το προφίλ εξειδίκευσης του XanQ.

Μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης των καταλοίπων Gly-333, Val-334, Ser-336 και Val-339 και ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης

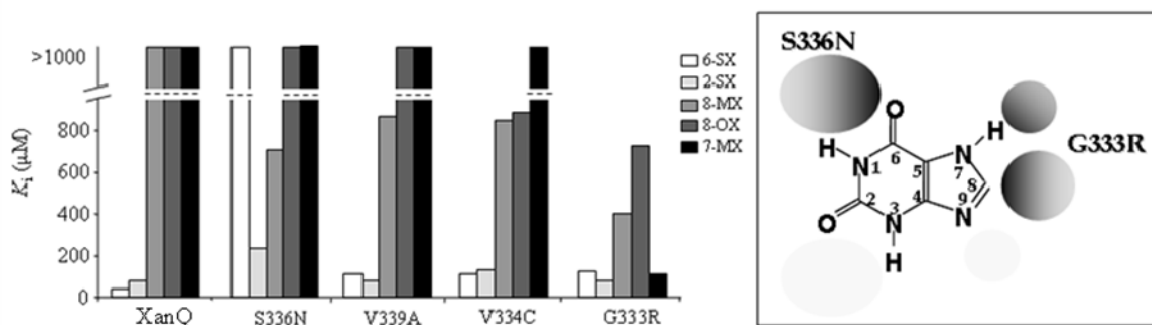
Κατασκευάστηκαν τα εξής μεταλλάγματα: V334C(wt), S336N(wt), V339A(wt), G333R/V334C/S336N/Y338W/V339A(wt) και G333R/S336N/V339A(wt), τα οποία αναλύθηκαν σε σύγκριση με τον XanQ φυσικού τύπου καθώς και με το μετάλλαγμα G333R(wt) που είχε μελετηθεί παλαιότερα (Karatza *et al.*, 2006). Και τα τέσσερα μονά μεταλλάγματα (G333R(wt), V334C(wt), S336N(wt) και V339A(wt) εκφράζονται στην

μεμβράνη των κυττάρων της *E. coli* σε επίπεδα όμοια με εκείνα του XanQ(wt) και εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ενεργότητας. Αντιθέτως, τα συνδυαστικά μεταλλάγματα (G333R/V334C/S336N/Y338W/V339A(wt) και G333R/S336N/V339A(wt)) είναι ανενεργά και τα επίπεδα έκφρασής τους στη μεμβράνη είναι της τάξεως των 25-35% σε σχέση με τα επίπεδα του XanQ(wt) (**Εικόνα 3.9A και B**).

Η κινητική ανάλυση των ενεργών μεταλλαγμάτων έδειξε ότι εμφανίζουν ίση (V334C(wt)) ή διπλάσια συγγένεια για το υπόστρωμα (μειωμένη K_m) ενώ οι τιμές V_{max} εμφανίζονται είτε μειωμένες κατά 2.5 και 1.5 φορές (μεταλλάγματα G333R(wt) και S336N(wt) αντιστοίχως) είτε αυξημένες κατά 3 και 4 φορές (μεταλλάγματα V339A(wt) και V334C(wt) αντιστοίχως) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του XanQ(wt) (**Πίνακας 3.2**). Μετά από έλεγχο του προφίλ της εξειδίκευσης σε πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ραδιενεργού ξανθίνης (1 μM) από μη σημασμένες νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα (1 mM) (**Πίνακας 3.3**) διαπιστώθηκε ότι, σε αντιδιαστολή με τον φυσικού τύπου XanQ, το μετάλλαγμα G333R αναγνωρίζει τα ανάλογα 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη, ενώ το μετάλλαγμα S336N δεν αναγνωρίζει την 6-θειοξανθίνη η οποία αναγνωρίζεται ισχυρά από τον φυσικού τύπου XanQ. Αντιθέτως, τα μεταλλάγματα V334C και V339A παρουσιάζουν μικρότερες αποκλίσεις από το προφίλ εξειδίκευσης του XanQ(wt). Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται ακόμη περισσότερο από τα αποτελέσματα πειραμάτων δοσο-εξάρτησης όπου υπολογίσθηκαν οι σταθερές K_i για κάθε ανάλογο πουρίνης και βρέθηκε ότι τα μεταλλάγματα S336N και G333R διαφέρουν καθαρά από τον XanQ(wt) ως προς την αναγνώριση της 6-θειοξανθίνης (S336N) και των 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης (G333R) (**Εικόνα 3.10 και Πίνακας 3.4**). Επειδή τα μεταλλάγματα G333R και V334C έδειξαν μια μικρή συγγένεια για αναγνώριση ουρικού οξέος (8-οξυ-ξανθίνης) (K_i 737-875 μM) και, εκτός του G333R που αναγνώριζε ισχυρά την 8-μεθυλοξανθίνη (K_i 409 μM), και τα άλλα τρία μονά μεταλλάγματα είχαν μια μικρή συγγένεια για το ανάλογο αυτό (K_i 685-843 μM) (**Πίνακας 3.4**), εξετάσθηκε επίσης η πιθανότητα τα μεταλλάγματα να μεταφέρουν και άλλα υποστρώματα εκτός της ξανθίνης. Συγκεκριμένα, τα μεταλλάγματα του XanQ υποβλήθηκαν σε δοκιμασία μεταφοράς [^{14}C]ουρικού οξέος, χρησιμοποιώντας ως θετικό μάρτυρα τον μεταφορέα YgfU (Παπακώστας Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2010). Βρέθηκε ότι κανένα από τα έξι μεταλλάγματα (μονά ή πολλαπλά) δεν ήταν ικανό να μεταφέρει ουρικό οξύ σε συγκεντρώσεις 0.04 mM – 2 mM.



Εικόνα 3.9 Επίπεδα έκφρασης και ενεργότητα μεταλλαγμάτων του XanQ στις θέσεις Gly-333, Val-334, Ser-336 και Val-339. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(wild-type-BAD) που φέρουν τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις συνελέγησαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. **A.** Κλάσματα μεμβρανών που παρασκευάστηκαν από τα κύτταρα αυτά (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%), ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 και οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης υπεροξειδάσης με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Στα αριστερά σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range). **B.** Παράλληλα, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM), στους 25 $^{\circ}\text{C}$. Η αρχική ταχύτητα (V_0) μετρήθηκε σε 10-30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) σε 1-10 min. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) (αρχική ταχύτητα: $0.021 \pm 0.006 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων, σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές εκφράζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών της XanQ(wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από 3 πειράματα. Τριπλό μεταλλάγμα είναι το G333R/S336N/V339A(wt). Πενταπλό μεταλλάγμα είναι το G333R/V334C/S336N/Y338W/V339A(wt).



Εικόνα 3.10 Τιμές K_i των μεταλλαγμάτων G333R, V334C, S336N και V339A για μια σειρά αναλόγων. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα μεταλλάγματα από πλασμίδια pT7-5/*xanQ*(wild-type-BAD) που φέρουν τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM) μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες σε συγκεντρώσεις από 0.1 μM – 1 mM. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν με βάση το πρόγραμμα Prism 4. Οι μη σημασμένοι πιθανοί προσδέτες ήταν: 6-θειοξανθίνη (6-SX), 2-θειοξανθίνη (2-SX), 8-μεθυλοξανθίνη (8-MX), ουρικό οξύ (8-OX) και 7-μεθυλοξανθίνη (7-MX). Ένθετο δεξιά: Συντακτικός τύπος ξανθίνης. Οι σκιασμένες περιοχές δείχνουν τις θέσεις του πουρινικού δακτυλίου όπου μια υποκατάσταση οδηγεί σε αποκλίσεις στην αναγνώριση των αντίστοιχων αναλόγων από τα μεταλλάγματα S336N και G333R.

Μετάλλαγμα	K_m (μM)	V_{\max} (nmol min^{-1} mg^{-1} protein)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
V334C(wt)	4.6 ± 0.9	25.8 ± 1.5	5609
G333R(wt)	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.3	1037
S3336N(wt)	2.0 ± 0.3	4.5 ± 0.2	2250
V339A(wt)	2.4 ± 0.3	19.6 ± 0.7	8167
Τριπλό μετάλλαγμα	ND	ND	
Πενταπλό μετάλλαγμα	ND	ND	

Πίνακας 3.2 Τιμές K_m και V_{\max} μεταλλαγμάτων του XanQ στις θέσεις Val-334, Gly-333, Ser-336 και Val-339. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα μεταλλάγματα από πλασμίδια pT7-5/xanQ(wild-type-BAD) που φέρουν τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις. Οι τιμές K_m και V_{\max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές του μεταφορέα φυσικού τύπου. Οι K_m και V_{\max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 4*. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται. Στις περιπτώσεις των συνδυαστικών μεταλλαγμάτων (ND), τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν αλλά δεν προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές λόγω των πολύ χαμηλών τιμών της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης ξανθίνης (≤ 0.05 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Τριπλό μετάλλαγμα είναι το G333R/S336N/V339A(wt). Πενταπλό μετάλλαγμα είναι το G333R/V334C/S336N/Y338W/V339A(wt).

Ρυθμός πρόσληψης [³H] ξανθίνης (%)

	XanQ(wt)	G333R(wt)	V334C(wt)	S336N(wt)	V339A(wt)
Ανταγωνιστές					
Υποξανθίνη	91	80	87	97	84
Αδενίνη	90	81	100	107	90
Γουανίνη	75	90	67	91	67
Ουρακίλη	98	98	84	105	90
6-θειοξανθίνη	12	11	8	61	17
2-θειοξανθίνη	15	12	6	23	14
3-μεθυλοξανθίνη	15	1	21	8	17
8-μεθυλοξανθίνη	93	18	46	36	31
Ουρικό οξύ	90	50	46	89	76
7-μεθυλοξανθίνη	100	20	79	69	64
Οξυπουρινόλη	30	10	8	7	8
Αλλοπουρινόλη	99	60	56	75	88

Πίνακας 3.3 Προφίλ εξειδίκευσης μεταλλαγμάτων του XanQ στις θέσεις Gly-333, Val-334, Ser-336 και Val-339. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/xanQ(wild-type-BAD) που φέρουν τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών που λαμβάνονται για τα αντίστοιχα μεταλλάγματα απουσία ανταγωνιστών, δηλαδή όταν τα κύτταρα δεν έχουν προεπωαστεί με μη σημασμένους προσδέτες. Οι σημαντικότερες διαφορές των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τον μεταφορέα XanQ φυσικού τύπου φαίνονται με έντονα γράμματα.

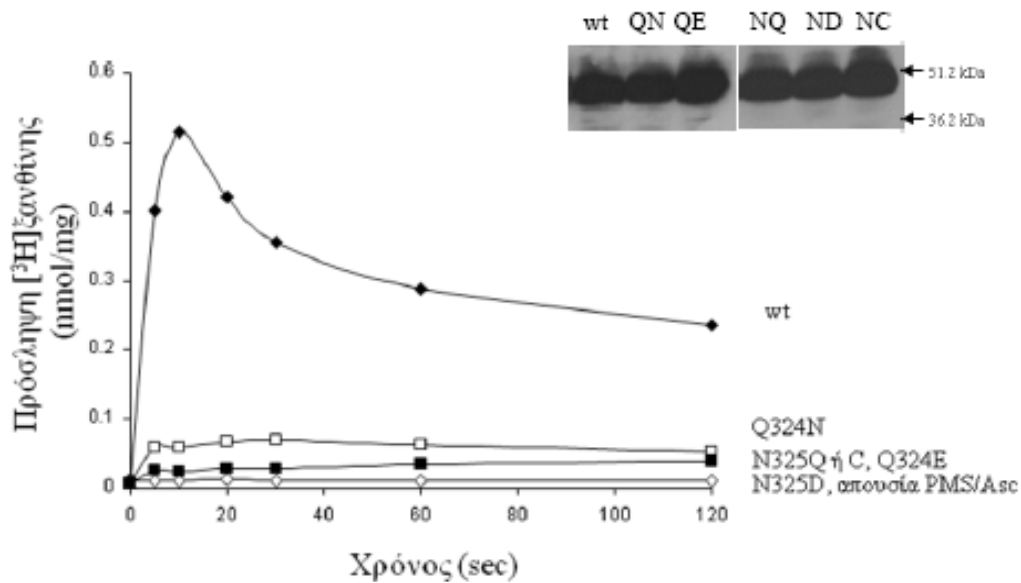
 K_i (μM)

	XanQ(wt)	G333R(wt)	V334C(wt)	S336N(wt)	V339A(wt)
Ανταγωνιστές					
6-θειοξανθίνη	41	121	108	>1000	111
2-θειοξανθίνη	91	80	116	234	82
3-μεθυλοξανθίνη	72	14	32	50	56
8-μεθυλοξανθίνη	>1000	409	832	685	843
Ουρικό οξύ	>1000	737	875	>1000	>1000
7-μεθυλοξανθίνη	>1000	107	>1000	>1000	>1000

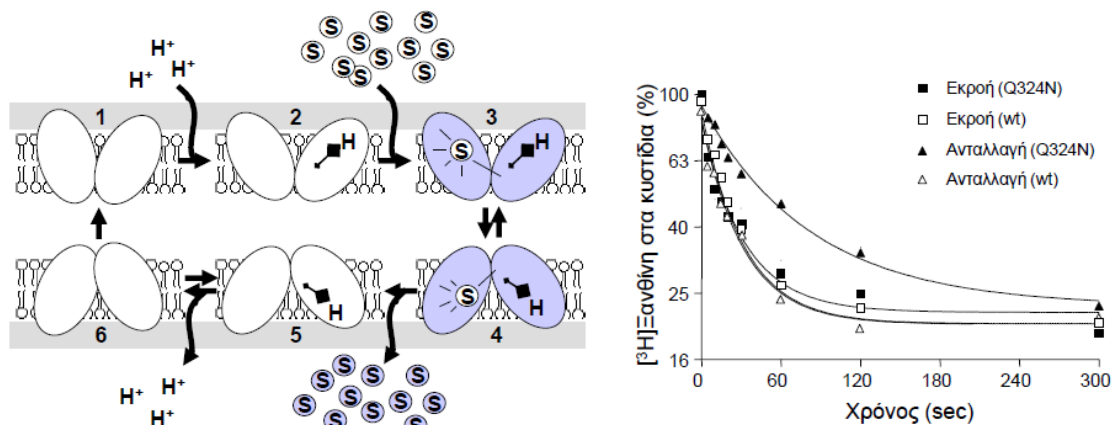
Πίνακας 3.4 Τιμές K_i των μεταλλαγμάτων G333R, V334C, S336N και V339A για μια σειρά αναλόγων. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τα μεταλλάγματα από πλασμίδια pT7-5/xanQ(wild-type-BAD) που φέρουν τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες σε συγκεντρώσεις από 0.1 μM – 1 mM. Η πειραματική διαδικασία φαίνεται στο υπόμνημα του **Πίνακα 3.3**. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H] ξανθίνης (Cheng, Y.C., and Prusoff, W.H., 1973). Οι σημαντικότερες διαφορές των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τον μεταφορέα φυσικού τύπου φαίνονται με έντονα γράμματα.

3.1.3 Ενεργότητες εκροής και ανταλλαγής ξανθίνης του μεταλλάγματος Q324N σε μεμβρανικά κυστίδια

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των αναντικατάστατων καταλοίπων του μοτίβου-υπογραφή, έγιναν έλεγχοι της ενεργότητας μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού (right-side out, RSO vesicles) που εκφράζουν είτε την XanQ(wt) ή την XanQ-C-less (ως θετικό μάρτυρα) είτε ένα από τα σημειακά μεταλλάγματα των θέσεων 324 (Q324N, Q324E, Q324C) ή 325 (N325Q, N325D, N325C). Καταρχήν έγινε έλεγχος της ενεργού μεταφοράς σε πλήρως ενεργοποιημένες συνθήκες, μετά από τροφοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας με το οξειδοαναγωγικό ζεύγος PMS/ασκορβικού, ώστε να δημιουργηθεί η διαβάθμιση πρωτονίων που είναι απαραίτητη για την μεταφορά μέσω του XanQ (Karatza and Frillingos, 2005). Αυτά τα πειράματα επιβεβαίωσαν ότι όλα τα μεταλλάγματα των Gln-324 ή Asn-325 έχουν αμελητέα ή ελάχιστα επίπεδα ενεργότητας, ενώ συγχρόνως έδειξαν ότι το μετάλλαγμα Q324N διατηρεί κάποια ανιχνεύσιμα επίπεδα ενεργότητας στα ενεργοποιημένα μεμβρανικά κυστίδια (**Εικόνα 3.11**). Θέλοντας να εξετάσουμε περαιτέρω αυτήν την μικρή ενεργότητα του Q324N, υποβάλαμε τα κυστίδια σε δοκιμασίες εκροής (efflux) και ανταλλαγής (exchange) ξανθίνης, οι οποίες αποτελούν αντιδράσεις του κύκλου μεταφοράς του υποστρώματος, σε μη ενεργοποιημένες συνθήκες (**Εικόνα 3.12**). Το μετάλλαγμα Q324N εμφανίζει σημαντικά μικρότερη ταχύτητα ανταλλαγής ξανθίνης από τον XanQ(wt), ενώ οι ταχύτητες εκροής και στις δύο περιπτώσεις είναι παρόμοιες. Με ανάλυση των καμπυλών προόδου των αντιδράσεων στο πρόγραμμα *Prism4*, οι ταχύτητες αυτές μπορούν να υπολογιστούν σε $0.012 \pm 0.002 \text{ sec}^{-1}$ ($t_{1/2} = 41.7 \text{ sec}$) για την ανταλλαγή μέσω του Q324N, $0.029 \pm 0.005 \text{ sec}^{-1}$ ($t_{1/2} = 17.2 \text{ sec}$) για την ανταλλαγή μέσω του XanQ(wt), και περίπου 0.031 sec^{-1} ($t_{1/2} = 16.1 \text{ sec}$) και στις δύο περιπτώσεις για τις αντιδράσεις εκροής. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η αντικατάσταση της Gln-324 με Asn είναι συμβατή με μικρή ενεργότητα σε συνθήκες όπου κινητήρια δύναμη για τον κύκλο μεταφοράς δεν αποτελεί η διαβάθμιση πρωτονίων αλλά αυτή της ξανθίνης. Η σχετικά μικρή ενεργότητα του Q324N για ανταλλαγή ξανθίνης είναι συμβατή και με την πολύ μικρή συγγένεια δέσμευσης για ξανθίνη που έχει αυτό το μετάλλαγμα (Karatza *et al.*, 2006), ενώ το γεγονός ότι η αντίδραση εκροής γίνεται κανονικά υποδεικνύει ότι η αντικατάσταση της Gln-324 δεν επηρεάζει το μηχανισμό πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης.



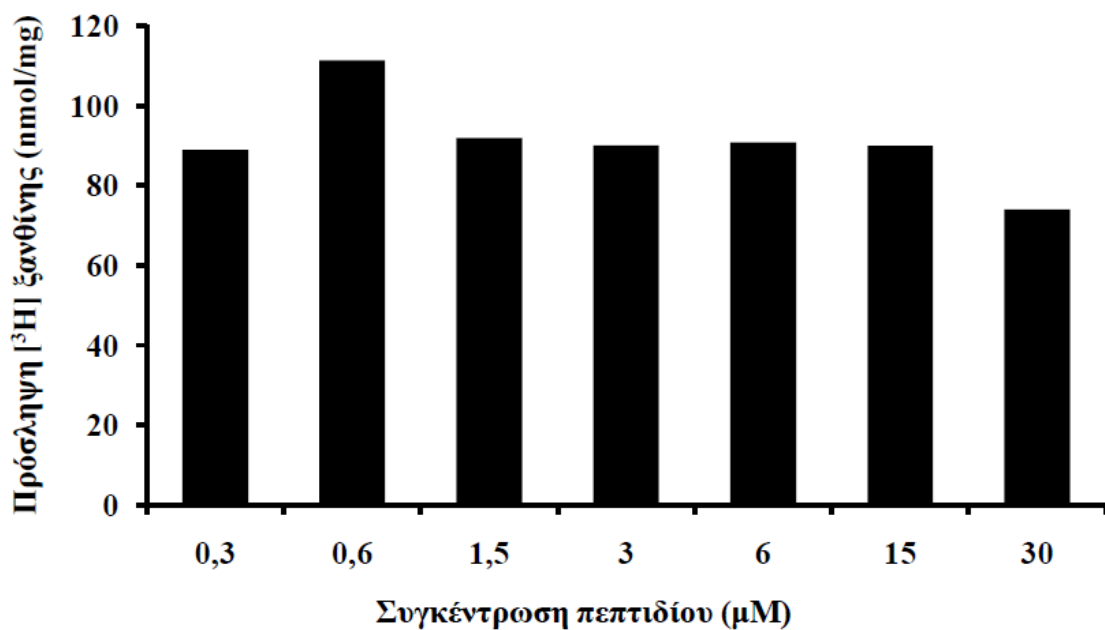
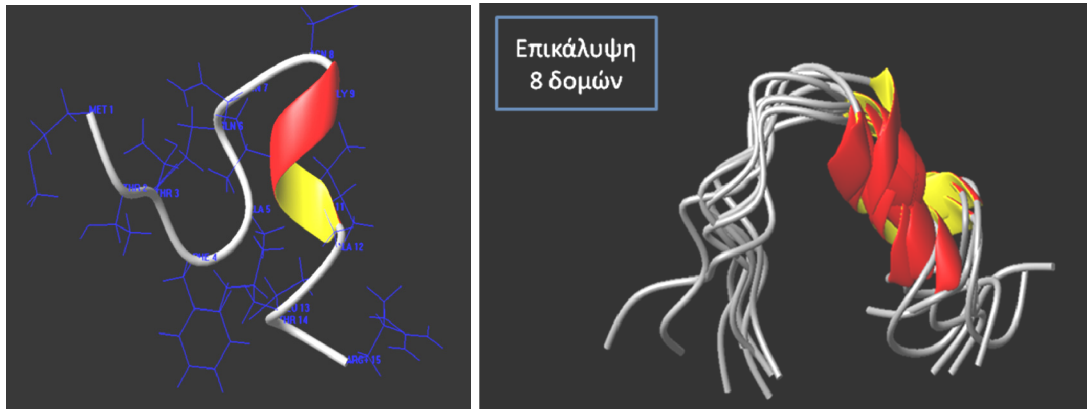
Εικόνα 3.11. Επίπεδα ενεργού μεταφοράς των μεταλλαγμάτων των θέσεων Gln-324 και Asn-325 σε μεμβρανικά κυστίδια. Καμπύλη χρονικής προόδου για τη δοκιμασία πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 1mg/mL) που εκφράζουν τις περμεάσες XanQ(wt), Q324N, Q324E, N325Q, N325D ή N325C, απουσία ή παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM). Οι τιμές των αρνητικών μαρτύρων (κυστίδια που επωάζονται απουσία PMS/ασκορβικού) αφαιρούνται από τις τελικές μετρήσεις σε κάθε περίπτωση. Στο ένθετο δεξιά φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων περμεασών στα μεμβρανικά κυστίδια (10 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με το σύζευγμα αβιδίνης-HRP.



Εικόνα 3.12. Εκροή και ανταλλαγή ξανθίνης από το μετάλλαγμα Q324N. Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού που εκφράζουν την περμεάση φυσικού τύπου XanQ(wt) ή το μετάλλαγμα Q324N (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 10 mg/mL, σε KPi 0.1 M, pH 7.5) επώαστηκαν με [³H]ξανθίνη (1 mM) για 16 h, παρουσία νιγερισίνης (0.5 μM) και βαλινομυκίνης (50 μM), και στη συνέχεια αραιώθηκαν (σε 200πλάσιο όγκο) σε διάλυμα KPi 0.1 M, pH 7.5, που περιείχε μη ραδιενεργή ξανθίνη (1 mM) (αντίδραση ανταλλαγής), ή δεν περιείχε καθόλου ξανθίνη (αντίδραση εκροής). Μετρήθηκε η ραδιενέργεια που παραμένει στα κυστίδια ως συνάρτηση του χρόνου όπως φαίνεται στην εικόνα δεξιά. Αριστερά φαίνονται οι αντιδράσεις αυτές στο γενικό διάγραμμα λειτουργίας των μεταφορέων που εξαρτώνται από διαβάθμιση πρωτονίων (S, υποστρώμα), όπου η αντίδραση ανταλλαγής (exchange) αντιστοιχεί στην παλινδρόμηση μεταξύ των διαμορφώσεων 3 και 4 (γαλάζιο φόντο), ενώ η αντίδραση εκροής (efflux) αντιστοιχεί στην συνεχή λειτουργία του κύκλου 1-6 καθώς χρησιμοποιεί τη διαβάθμιση του υποστρώματος (S, στη δική μας περίπτωση, ξανθίνη) για να ωθήσει και τα επόμενα στάδια που απαιτούν απελευθέρωση και επαναπρόσληψη πρωτονίων.

3.1.4 Η ενεργότητα του μεταφορέα XanQ δεν επηρεάζεται από ένα συνθετικό 15πεπτίδιο με την αλληλουχία του μοτίβου-υπογραφή

Με αφορμή τα ευρήματά μας για τη σημασία των καταλοίπων Asn-325, Ala-323 και Gln-324 σε σχέση με την επίδραση της δέσμευσης υποστρώματος, θελήσαμε να εξετάσουμε κατά πόσον ένα συνθετικό ολιγοπεπτίδιο που είχε κατασκευασθεί από το εργαστήριο του Εμμανουήλ Μικρού (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ), με αλληλουχία H-Met-Thr-Thr-Phe-Ala-Gln-Asn-Asn-Gly-Val-Ile-Ala-Leu-Thr-Arg-OH, που είναι αυτή του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα UraA (τα αμινοξέα που φαίνονται με έντονη γραφή είναι συντηρημένα και στον XanQ), μπορεί να ανταγωνιστεί τον μεταφορέα XanQ ως προς τη δέσμευση του υποστρώματος (ξανθίνης). Το 15πεπτίδιο αναλύθηκε με NMR στον εργαστήριο του Ε. Μικρού και βρέθηκε ότι εμφανίζει μία μικρή περιοχή με δομή α-έλικας (Gly-Val-Ile-Ala) ανάμεσα σε δύο περιοχές ελεύθερης διαμόρφωσης (**Εικόνα 3.13**). Σε πειράματα που έγιναν με μεμβρανικά κυστίδια που εκφράζουν τον μεταφορέα XanQ(wt), βρέθηκε ότι αυτό το 15πεπτίδιο δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα πρόσληψης [³H]ξανθίνης σε δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς, υποδεικνύοντας ότι δεν μπορεί να ανταγωνιστεί το κέντρο δέσμευσης (**Εικόνα 3.13**). Το αποτέλεσμα αυτό βέβαια είναι συμβατό με την πιθανή δομή του μεταφορέα όπως τη γνωρίζουμε σήμερα από το δομικό πρότυπο του ομολόγου του UraA (Lu *et al.*, 2011), που δείχνει ότι η συνολική δομή αυτής της αλληλουχίας είναι πολύ διαφορετική στο περιβάλλον του εγγενούς μορίου και ότι το κέντρο δέσμευσης περιλαμβάνει και άλλους σημαντικούς καθοριστές εκτός του μοτίβου-υπογραφή (βλ. Συζήτηση, κεφάλαιο 4.3).



Εικόνα 3.13. Το 15πεπτίδιο MTTFAQNNGVIALTR δεν επηρεάζει την ενεργότητα του μεταφορέα XanQ. Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 1mg/mL) που εκφράζουν την περμεάση φυσικού τύπου XanQ(wt) επώασθησαν με το συνθετικό πεπτίδιο σε εύρος συγκεντρώσεων 0.3-30μM (που αντιστοιχούν περίπου σε μοριακή αναλογία από 1:1 έως 100:1 σε σχέση με τον XanQ) όπως φαίνεται στην εικόνα, και έγινε έλεγχος της ενεργότητας μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) παρουσία PMS και ασκορβικού καλίου. Η ενεργότητα (μέγιστα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης που μετρώνται στα 15-20 sec επώασης) δίνεται σαν εκατοστιαίο ποσοστό επί της ενεργότητας του XanQ(wt) που δεν έχει επωαστεί με το πεπτίδιο. Στο πάνω μέρος φαίνεται η δομή του πεπτιδίου όπως δόθηκε με NMR από το εργαστήριο του Ε. Μικρού.

3.2 Ανάλυση χιμαιρικών κατασκευών μεταξύ του μεταφορέα ξανθίνης XanQ και ομολόγων του με διαφορετική εξειδίκευση

Η κατασκευή και ανάλυση χιμαιρικών μεταφορέων είναι ένα σημαντικό μοριακό εργαλείο για την κατανόηση των διαφορών στην επιλεκτικότητα υποστρώματος και στο προφίλ εξειδίκευσης μεταξύ συγγενικών πρωτεϊνών. Στην περίπτωση της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2, αν και τα συνολικά ποσοστά ομοιότητας του XanQ με τις αλληλουχίες των γνωστών ομολόγων που έχουν σαφείς διαφορές στην εξειδίκευση είναι σχετικά περιορισμένη (π.χ. <30% ταυτότητα καταλοίπων με τον UapA ή τον YgfU), υπάρχουν περιοχές αλληλουχίας με πολύ υψηλή συντήρηση, όπως η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (3.1) και σημαντικά μοτίβα αλληλουχίας στις έλικες 1, 3, 8, 9a και 12 (Παπακώστας, 2011). Εφόσον συγκεκριμένες θέσεις καταλοίπων στις περιοχές αυτές έχουν συνδεθεί με την αναγνώριση και μεταφορά υποστρώματος ή την εξειδίκευση (Mermelekas et al., 2010; Karena and Frillingos, 2009; Papakostas et al., 2008; Karatza et al., 2006), θεωρήσαμε ότι η ανάλυση χιμαιρικών κατασκευών που ανακατανέμουν τις αντίστοιχες περιοχές αλληλουχίας μεταξύ των διαφορετικών ομολόγων θα μπορούσε να μας οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της μοριακής βάσης των διαφορών εξειδίκευσης. Στην παρούσα διατριβή, εστιαστήκαμε στην ανάλυση χιμαιρικών μεταφορέων όπου έχει αντικατασταθεί η **έλικα 12 (TM12)** του XanQ, για λόγους που εξηγούνται παρακάτω.

Καταρχήν, με βάση ανάλυση στοίχισης (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli* (Καρατζά, 2006) και των αντίστοιχων τμημάτων των μεταφορέων ουρικού YgfU της *E. coli* (Παπακώστας, 2011) και ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* (Βλαντή, 2009) σχεδιάστηκαν χιμαιρικοί μεταφορείς. Οι χιμαιρικοί αυτοί μεταφορείς περιέχουν ολόκληρα τμήματα (διαμεμβρανικές έλικες) από τους μεταφορείς YgfU και UapA στο υπόβαθρο του μεταφορέα XanQ. Τα τμήματα αυτά περιλαμβάνουν τις αμφιπαθικές έλικες TM8, TM9a, TM9b και/ή TM12. Οι χιμαιρικοί μεταφορείς που προέκυψαν αναλύθηκαν αρχικά ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους στη μεμβράνη και την ικανότητά τους για την πρόσληψη ξανθίνης αλλά και ουρικού. Οι περισσότεροι από τους χιμαιρικούς μεταφορείς που κατασκευάστηκαν ήταν ανενεργοί και δεν εκφράζονταν στην μεμβράνη του στελέχους K-12 της *E. coli* εκτός από έναν, ο οποίος βρέθηκε ότι εκφράζεται σε χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα στη μεμβράνη διαφόρων κυτταρικών στελεχών της *E. coli*. Ο χιμαιρικός αυτός μεταφορέας περιέχει τα πρώτα 11 διαμεμβρανικά τμήματα από τον XanQ

και το διαμεμβρανικό τμήμα TM12 από τον UapA και ονομάστηκε $N_{11}C_1$ ή $^{xanQ}N_{11}(419)C_1^{uapA}$ (βλ. Μέθοδοι, εδάφιο 2.4.2).

Παρά το γεγονός ότι εκφράζεται, ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1$ παραμένει ανενεργός. Για τον λόγο αυτό υποβλήθηκε σε στοχευμένη σημειακή μεταλλαξιγένεση βασισμένη σε προηγούμενες αναλύσεις δομής-λειτουργίας που είχαν πραγματοποιηθεί στον XanQ (Papakostas *et al.*, 2008) αλλά και σε λογικό σχεδιασμό με βάση τις διαφορές των δύο ομολόγων (XanQ και UapA) σε συγκεκριμένες θέσεις καταλοίπων, με στόχο τη βελτίωση της έκφρασης στη μεμβράνη και την περίσωση της ενεργότητας. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, βρέθηκε ότι συνδυαστικά μεταλλάγματα στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ επανέφεραν την έκφραση στην μεμβράνη αλλά και την ενεργότητα ακόμη και σε ποσοστό 100%. Οι μεταλλαγμένοι χιμαιρικοί μεταφορείς παρουσιάζουν επίσης διαφορές στην αναγνώριση προσδετών και στο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με αυτό του μεταφορέα XanQ φυσικού τύπου (wt). Από το σύνολο των αποτελεσμάτων μας, προέκυψαν νέα συμπεράσματα ως προς τον ρόλο συγκεκριμένων περιοχών της έλικας TM12 σε σχέση με τον καθορισμό της δομικής σταθερότητας ή έκφρασης στη μεμβράνη, της επιλογής υποστρώματος (ξανθίνης ή ουρικού) και του προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων NAT/NCS2.

3.2.1 Σχεδιασμός και κατασκευή χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ XanQ/UapA και XanQ/YgfU

Οι χιμαιρικοί μεταφορείς σχεδιάστηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες του XanQ που είχαν αναδείξει λειτουργικά σημαντικές περιοχές αλληλουχίας όπως το μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NAT (Karatza *et al.*, 2006) και την ευρύτερη περιοχή γύρω από αυτό (Karena and Frillingos 2009; Mermelekas *et al.*, 2010) ή τη διαμεμβρανική έλικα 12 (Papakostas *et al.*, 2008). Η αλληλουχία του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος του XanQ συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των UapA (**Εικόνα 3.14**) και YgfU (**Εικόνα 3.15**) και σε συνδυασμό με το πιθανό τοπολογικό μοντέλο του XanQ (βλ. Εικόνα 3.1) ολόκληρες περιοχές αλληλουχίας από το XanQ αντικαταστάθηκαν με τις αντίστοιχες από τους μεταφορείς UapA και YgfU. Οι αντικαταστάσεις των περιοχών πραγματοποιήθηκαν σε θέσεις «κλειδιά» έτσι ώστε να περιλαμβάνουν περιοχές που έχουν αναδειχτεί ως σημαντικές ή περιέχουν σημαντικά κατάλοιπα για τη λειτουργία του XanQ (**Εικόνα 3.14**, **Εικόνα 3.15**). Δημιουργήθηκαν 8 διαφορετικοί χιμαιρικοί μεταφορείς XanQ/UapA (**Εικόνα 3.16**) και 2 χιμαιρικοί μεταφορείς XanQ/YgfU (**Εικόνα 3.17**). Οι ονοματολογίες και οι συντμήσεις όλων των χιμαιρικών κατασκευών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.5**. Η προέλευση σημαντικών περιοχών του κάθε χιμαιρικού μορίου, δηλαδή κατά πόσον προέρχονται από την αλληλουχία του μεταφορέα XanQ, του μεταφορέα UapA ή του YgfU, συνοψίζεται στον **Πίνακα 3.6**.

XanQ	MSDINHAG-----	8
UapA	MDNSIHSTDGPDSVIPNSNPKKTVRQVRLLARHLTTREGLIGDYDYGFLEFRPELPFMKK	60
XanQ	---SDLIFELEDPPFFHQALVGAITHLLAIFVPMVTPALIVGAALQLSAETTAYLVSMAM	65
UapA	DPRAPPPFFGLNEKIPVLLAFILGLQHALAMLAGVVTPPLIISSLSLPSDLQQYLVSTSL	120
XanQ	IASGIGTWLQVNRYSI-----VGSGLLSIQSVNFSFVTVMIALGSSMKSDGFHEELIMS	119
UapA	IVCGLLSMVQITRFHIYKTPYYIGSGVLSVMGVSFSSIIISVASGAFNQMYSNQFCQLDEAG	180
XanQ	-----SLLGVSVFVGAFLVVGSSFILP-YLRRVITPTVSGIVVLMIGLSLIKVGII	168
UapA	NRLPCPEAYGALIGTSACCALVEILLAFVFPKVIQKIFPPIVTGPTVMLIGISLIGTGFK	240
		208 ↓
XanQ	DFGGGFAAKSSGTFG-----NYEHLGVGLLVIVVIGFNCCRSPLLRMGGIAI	216
UapA	DWAGGSACMDDGMLCPSATAPRPLPWGSPFEFIGLGFVFSIIICERFGAPIMKSCSVVI	300
XanQ	GLCVGYIASLCLGMVDFSSMRNLPLITIPHPFKYGFSSFHQFLVVGTIYLLSVLEAVGD	276
UapA	GLLVGCVIAAACGYFSHADIDAAPAASFIVWKTFPLSVYGPMLPIIAVFIICACECIGD	360
		295 314 ↓ ↓
XanQ	ITATAMVSRRPPIQGEYQSRLKGGVLDGLVSVIASAVGSLPLTTFAQNNNGVIQMTGVAS	336
UapA	VTATCDVSRLEVRGGTFESRIQGAVLADGINSVVAALATMTPMTTFAQNNNGVIALTRCAN	420
		340 367 ↓ ↓
XanQ	RYVGRITIAVMLVILGLFPMIGGFFTTIPSAVLGGAMTLMFSMIAIAGIRIIITNGLKRRE	396
UapA	RWAGYCCCLILIVAGIFAKFAAAIVAI PNSVMGGMKTFLFASVVISGQAI VAKAPFTRRN	480
		419/420 ↓ ↓
XanQ	TLIVATSLGLGLGVSYDPEIFK-ILPAS-----IYVLVENPICAGGLTALLNI	444
UapA	RFILTASMALGYGATLVPTWFGNVFPQTENRDLEGFENAIELVLETGFAVNTAFVAMLLNA	540
		452 ↓
XanQ	ILPGGYRQENVLPGITSAEEMD-----	466
UapA	IMPAEVEEIGAVTPMPVSAHDNRDGEAEYQSKQA	574

Εικόνα 3.14 Ανάλυση στοιχίσης των κωδικοποιουσών αλληλουχιών των γονιδίων *xanQ* και *uapA*. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Με βέλη έχουν επισημανθεί τα αμινοξικά κατάλοιπα που υπάρχουν στις θέσεις όπου ξεκινάει η ανταλλαγή των αλληλουχιών των μεταφορέων XanQ και UapA ενώ οι αριθμοί αντιστοιχούν στην αρίθμηση των καταλοίπων με βάση την αλληλουχία του XanQ.

```

XanQ      MSDIN-----HAGSDLIFELED RPP-FHQALVGAITHLLAIFVPMVTPALIVGAALQLSA 54
YgfU      MNAIDSQLPSSSGQDRPTDEVDRILSPGKLIILGLQHVLVVMYAGAVAVPLMIGDRLGLSK 60

XanQ      ETTAYLVSMAMIASGIGTWLQVNRYG-IVGSGLLSIQSVNFSFVTVMIALGSSMKSDGFH 113
YgfU      EAIAMLISSDLFCCGIVTLLQCIGIGRFMGIRLPVIMSVTFAAVTPMIAIG-----MN 113

XanQ      EELIMSSLLGVSFVGAFLVVGSSFILPYLRRVITPTVSGIVVLMIGLSLIKVGIIIDFGGG 173
YgfU      PDIGLLGIFGATIAAGFITLLAPLIGRLMPLFPPLVTVGVVITSIGLSIIQVGIDWAAG- 172

XanQ      FAAKSSGTFGNYEHLGVGLLVLIIVVIGFNCCRSPLLRMGGIAIGLCVGYIASLCLGMVDF 233
YgfU      --GKGNPQYGNPVYLGISFAVLIFILLITRYAKGFMSNVAVLLGIVFGFLLSMMNEVNL 230

XanQ      SSMRNLP LITIPHPFKYGF S-FSEHQFLVVGTIYLLSVLEAVGDITATAMVSRRP IQGEE 292
YgfU      SGLHDASWF AIVTPMSFGMP I FDPVSILTM TAVLIIVFIESMGMFLALGEIVGRKLSHD 290

XanQ      YQSR LKGGV LADGLVSVIASAVGSLPLTTFAQNNGVIQMTGVASRYVGR TIAVMLVILGL 352
YgfU      IIRGLR----VDGVGTMIGGTFNSFPHTSFSQNVGLVSVTRVHSRWWVCIASGIIILIFGM 346

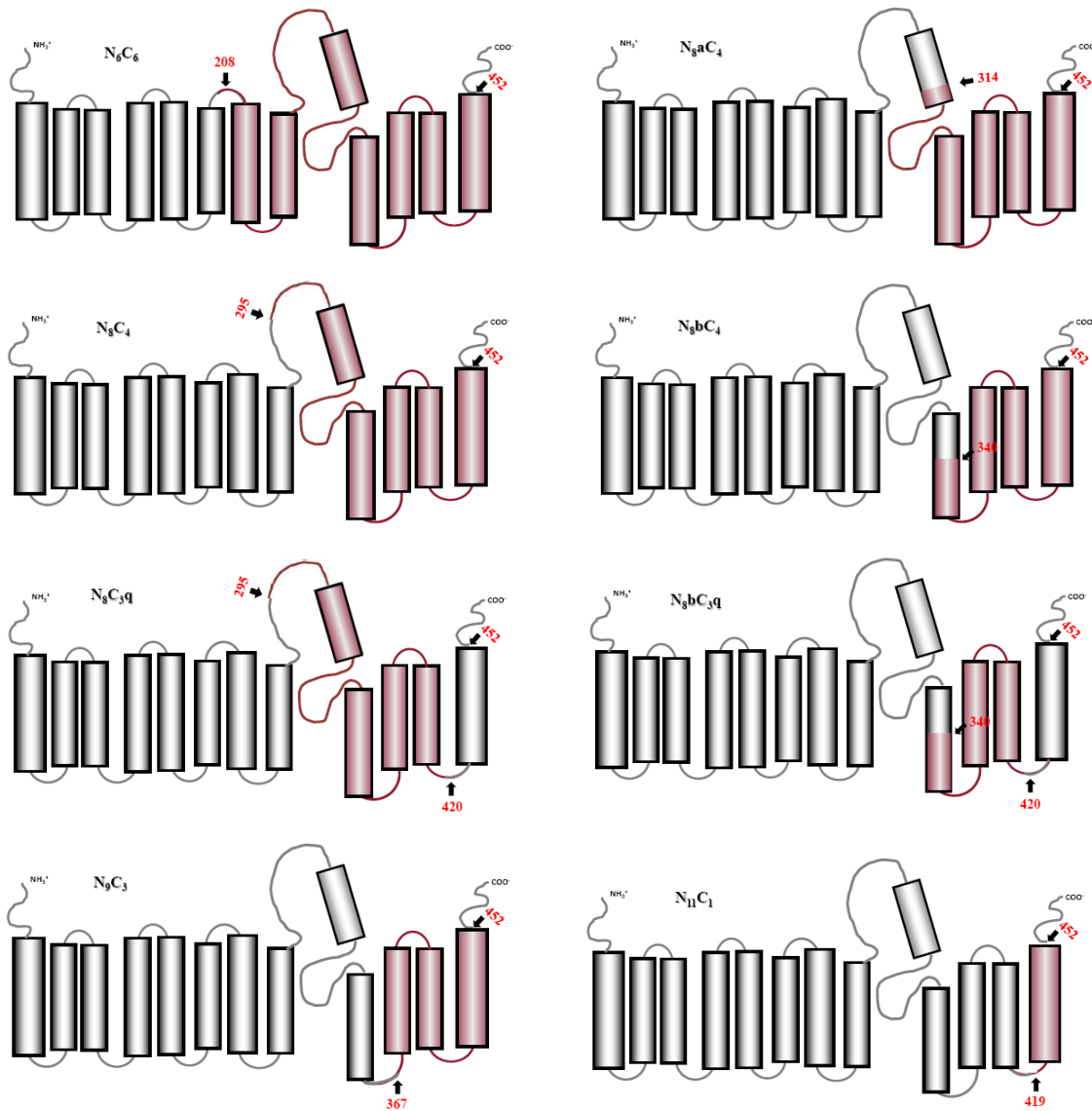
XanQ      FPMIGGFFTTIPSAVLGGAMTLMFSMIAIAGIRIIITN--GLKRRETLIVATSLGLGLGV 410
YgfU      VPKMAVLVASIPQFVLGGAGLVMEFGMVLATGIRILSR CNYYTNRYNLYIVVAISLGVGMTP 406

          419
          ↓
XanQ      SYDPEIFKILPASIYVLVENPICAGGLTAILLNIIIPGGYRQENVLPGITSAEEMD---- 466
YgfU      TLSHDFFSKLPAVLQPLLHSGIMLATLSAVVNLNVFFNGYQHHADLVKESVSDKDLKVRTV 466

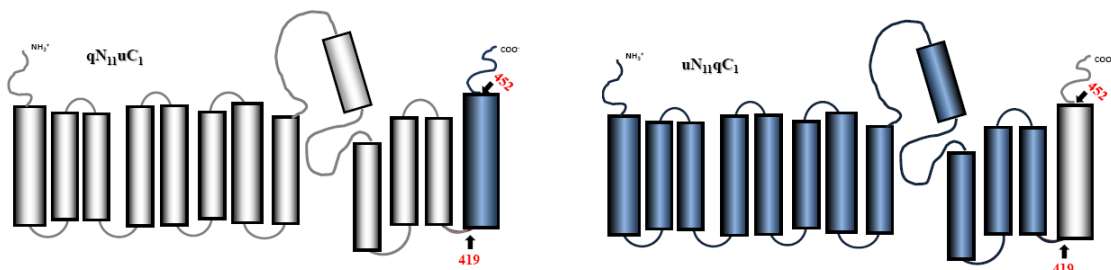
XanQ      -----
YgfU      RMWLLMRKLLKKNHGE 482

```

Εικόνα 3.15 Ανάλυση στοίχισης των κωδικοποιουσών αλληλουχιών των γονιδίων *xanQ* και *ygfU*. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Με βέλη έχουν επισημανθεί τα αμινοξικά κατάλοιπα που υπάρχουν στις θέσεις όπου ξεκινάει η ανταλλαγή των αλληλουχιών των μεταφορέων XanQ και YgfU ενώ οι αριθμοί αντιστοιχούν στην αρίθμηση των καταλοίπων με βάση την αλληλουχία του XanQ.



Εικόνα 3.16 Σχηματική απεικόνιση των χημαιρικών μεταφορέων XanQ/UarA. Η απεικόνιση βασίζεται στη στοίχιση των αλληλουχιών και στο τοπολογικό μοντέλο του XanQ (Εικόνα 3.1). Με γκρι χρώμα σημειώνονται τα τμήματα που προέρχονται από την αλληλουχία του XanQ ενώ με ανοιχτό κόκκινο εκείνα που προέρχονται από τον UarA. Τα βέλη σημειώνουν τις θέσεις όπου ξεκινάει ή τελειώνει η ανταλλαγή των αλληλουχιών των μεταφορέων XanQ και UarA ενώ οι αριθμοί αντιστοιχούν στην αρίθμηση των καταλοίπων με βάση την αλληλουχία του XanQ.



Εικόνα 3.17 Σχηματική απεικόνιση των χημαιρικών μεταφορέων XanQ/YgfU. Η απεικόνιση βασίζεται στη στοίχιση των αλληλουχιών και στο τοπολογικό μοντέλο του XanQ (Εικόνα 3.1). Με γκρι χρώμα σημειώνονται τα τμήματα που προέρχονται από την αλληλουχία του XanQ ενώ με μπλε εκείνα που προέρχονται από τον YgfU. Τα βέλη σημειώνουν τις θέσεις όπου ξεκινάει ή τελειώνει η ανταλλαγή των αλληλουχιών των μεταφορέων XanQ και YgfU ενώ οι αριθμοί αντιστοιχούν στην αρίθμηση των καταλοίπων με βάση την αλληλουχία του XanQ.

Χημικός Μεταφορέας	Σύντηξη
$xanQ N_6(208)C_6^{uapA}$	N_6C_6
$xanQ N_8(295)C_4^{uapA}$	N_8C_4
$xanQ N_8(314)C_4^{uapA}$	N_8aC_4
$xanQ N_8(340)C_4^{uapA}$	N_8bC_4
$xanQ N_9(367)C_3^{uapA}$	N_9C_3
$xanQ N_{11}(419)C_1^{uapA}$	$N_{11}C_1$
$xanQ N_8(295)-uapA C_3(420)-C_1^{xanQ}$	N_8C_3q
$xanQ N_8(340)-uapA C_3(420)-C_1^{xanQ}$	N_8bC_3q
$xanQ N_{11}(419)C_1^{ygfU}$	$qN_{11}uC_1$
$ygfU N_{11}(419)C_1^{xanQ}$	$uN_{11}qC_1$

Πίνακας 3.5 Η ονοματολογία των χημικών μεταφορέων. Δίνεται η πλήρης ονοματολογία των χημικών κατασκευών μεταξύ XanQ και UapA, ή YgfU καθώς και οι συντημήσεις αυτών. Στο κείμενο και στις εικόνες για λόγους ευκολίας χρησιμοποιούνται οι συντημήσεις των χημικών μεταφορέων.

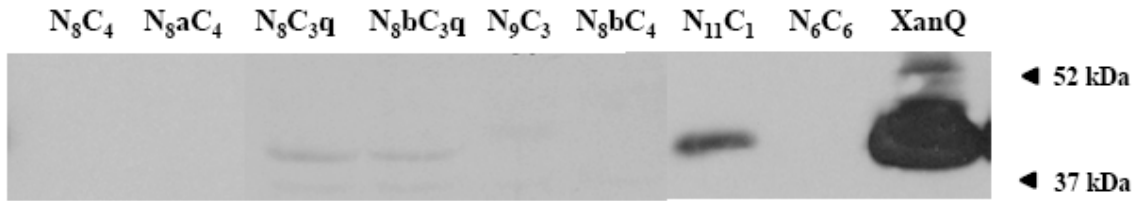
Όνομα	TMS1-6	TMS7-8	TMS9a	Μοτίβο υπογραφή	TMS9b	TMS10-11	TMS12	C-άκρο
N_6C_6	XanQ	UapA	UapA	UapA	UapA	UapA	UapA	XanQ
N_8C_4	XanQ	XanQ	UapA	UapA	UapA	UapA	UapA	XanQ
N_8aC_4	XanQ	XanQ	XanQ	UapA	UapA	UapA	UapA	XanQ
N_8bC_4	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	UapA	UapA	UapA	XanQ
N_9C_3	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	UapA	UapA	XanQ
$N_{11}C_1$	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	UapA	XanQ
N_8C_3q	XanQ	XanQ	UapA	UapA	UapA	UapA	XanQ	XanQ
N_8bC_3q	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	UapA	UapA	XanQ	XanQ
$qN_{11}uC_1$	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	XanQ	YgfU	YgfU
$uN_{11}qC_1$	YgfU	YgfU	YgfU	YgfU	YgfU	YgfU	XanQ	XanQ

Πίνακας 3.6 Η προέλευση σημαντικών διαμεμβρανικών τμημάτων στους χημικούς μεταφορείς.

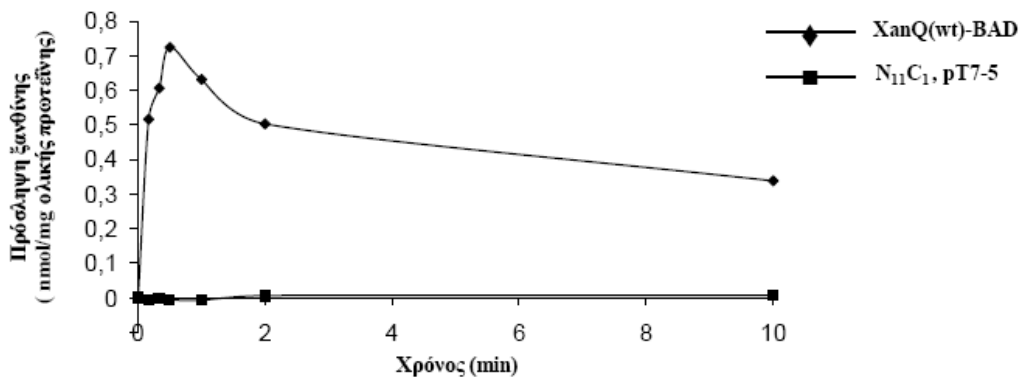
3.2.2 Έλεγχος έκφρασης και ενεργότητας των χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ XanQ και UapA

Οι 8 χιμαιρικοί μεταφορείς XanQ/UapA που κατασκευάστηκαν ελέγχθηκαν αρχικά ως προς ορθότητα της αλληλουχίας τους σε αυτόματο αναλυτή (MWG-Biotech. A.G, Ebersberg, Germany). Στη συνέχεια εισήχθησαν με τη μορφή ανασυνδυασμένων pT7-5 πλασμιδίων σε κύτταρα *E. coli* T184 και επιχειρήθηκε επαγωγή της έκφρασής τους μέσω του *lacZp/o* (με IPTG). Τα προκύπτοντα στελέχη υπεβλήθησαν σε λειτουργικό χαρακτηρισμό ως προς την έκφραση των χιμαιρικών μεταφορέων και την ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης. Αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη των κυττάρων. Οι περισσότεροι χιμαιρικοί μεταφορείς παρουσίασαν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, εκτός από τη χίμαιρα N₁₁C₁-BAD η οποία εκφραζόταν σε χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα (**Εικόνα 3.18**). Σε δοκιμασία ενεργού πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) η εκφραζόμενη χίμαιρα N₁₁C₁-BAD παρουσίασε μηδενικά επίπεδα ενεργότητας (**Εικόνα 3.19**). Επίσης, η ενεργότητα της χίμαιρας N₁₁C₁-BAD ήταν μηδενική τόσο σε δοκιμασίες με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις [³H]ξανθίνης (100 μM) όσο και σε δοκιμασίες πρόσληψης [¹⁴C]ουρικού (1 mM).

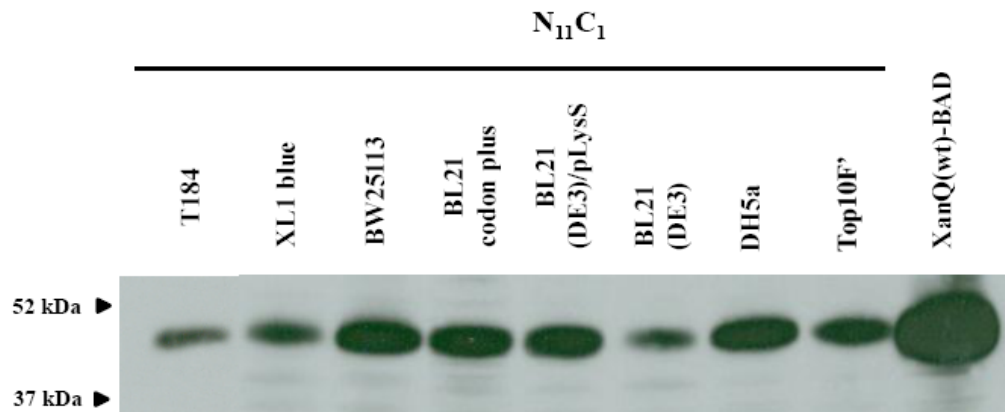
Επειδή ο χιμαιρικός μεταφορέας N₁₁C₁ παρουσίασε χαμηλά επίπεδα έκφρασης αλλά μηδενική ενεργότητα στα κύτταρα *E. coli* T184, έγινε εισαγωγή του πλασμιδίου pT7-5/N₁₁C₁-BAD σε μια σειρά στελεχών της *E. coli* K-12, ώστε να ελεγχθεί κατά πόσον αυτή η χίμαιρα εκφράζεται καλύτερα ή εμφανίζει σημαντική ενεργότητα σε κάποιο από τα άλλα στελέχη της *E. coli*. Παρατηρούμε ότι ο N₁₁C₁ εκφράζεται στη μεμβράνη της *E. coli* σε όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν, αλλά τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σχετικά χαμηλά (**Εικόνα 3.20**). Όλα τα ανωτέρω στελέχη που εκφράζουν το χιμαιρικό μεταφορέα N₁₁C₁ υπεβλήθησαν σε δοκιμασίες πρόσληψης [8-³H] ξανθίνης (1-100 μM) καθώς και [¹⁴C]ουρικού (1 mM) αλλά δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα σε καμία από αυτές τις περιπτώσεις.



Εικόνα 3.18 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών XanQ/UapA. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα αντίστοιχα χιμαιρικά γονίδια από πλασμίδια pT7-5/*xanQ-uapA*-BAD (βλ. Εικόνα 3.16) τα οποία είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των χιμαιρικών μεταφορέων. Τα δείγματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (**avidin-HRP**) σε αραιώση 1:50000. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (**ECL**). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.19 Η χίμαιρα $N_{11}C_1$ έχει μηδενική ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση του $N_{11}C_1$ από πλασμίδιο pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8-^3\text{H}$]ξανθίνης (1 µM). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν T184 μετασχηματισμένα με pT7-5/*xanQ*(wt)-BAD και ως αρνητικός μάρτυρας T184 μετασχηματισμένα με pT7-5.



Εικόνα 3.20 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$ σε διάφορα στελέχη *E. coli*. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* διαφόρων στελεχών που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση της χίμαιρας $N_{11}C_1$ από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD. Ο μεταφορέας φυσικού τύπου που χρησιμοποιείται ως μόριο ελέγχου (XanQ(wt)-BAD) έχει παρόμοια επίπεδα έκφρασης σε όλα τα εξεταζόμενα κυτταρικά στελέχη (Μερμελέκας, Γ., Διδ. Διατριβή, 2009) – στην εικόνα, φαίνεται η έκφραση του XanQ(wt) μόνο σε κύτταρα T184. Τα δείγματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με αβιδίνη (**avidin-HRP**). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (**ECL**). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

3.2.3 Μεταλλαξιγένεση του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$

Ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1$ υποβλήθηκε σε στοχευμένη σημειακή μεταλλαξιγένεση βασισμένη σε προηγούμενες αναλύσεις δομής-λειτουργίας που είχαν πραγματοποιηθεί στον XanQ (Papakostas *et al.*, 2008) αλλά και σε λογικό σχεδιασμό με βάση τις διαφορές των δύο ομολόγων (XanQ και UapA) σε συγκεκριμένες θέσεις καταλοίπων της έλικας TM12. Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν καταρχήν η βελτίωση της έκφρασης του $N_{11}C_1$ στη μεμβράνη και η περίσωση της ενεργότητας και, στη συνέχεια, η κατανόηση των μοριακών καθοριστών της έλικας TM12 που συμμετέχουν στην εξασφάλιση βέλτιστης έκφρασης και ενεργότητας, στην επιλογή υποστρώματος (ξανθίνη ή ουρικό) και στο προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων NAT/NCS2. Οι ονοματολογίες και οι συντμήσεις όλων των μεταλλαγμάτων του $N_{11}C_1$ τα οποία κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.7**. Η λογική του σχεδιασμού και της ανάλυσης των μεταλλαγών εξηγείται στη συνέχεια.

Μεταλλαγμένοι χιμαιρικοί μεταφορείς στο υπόβαθρο $N_{11}C_1$	Σύντμηση
$N_{11}C_1/E521Y$	$N_{11}C_1(Y)$
$N_{11}C_1/T526N$	$N_{11}C_1(N)$
$N_{11}C_1/F528I$	$N_{11}C_1(I)$
$N_{11}C_1/T526N/F528I$	$N_{11}C_1(NI)$
$N_{11}C_1/T526N/G527P/F528I$	$N_{11}C_1(NPI)$
$N_{11}C_1/E521Y/T526N/F528I$	$N_{11}C_1Y(NI)$
$N_{11}C_1/E521Y/T526N/G527P/F528I$	$N_{11}C_1Y(NPI)$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1$	$N_{11}C_1\Delta$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/T526N/F528I$	$N_{11}C_1\Delta(NI)$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/T526N/G527P/F528I$	$N_{11}C_1\Delta(NPI)$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/E521Y$	$N_{11}C_1\Delta Y$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/E521Y/T526N/F528I$	$N_{11}C_1\Delta Y(NI)$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/E521Y/T526N/G527P/F528I$	$N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$
$N_{11}C_1/T531G/A532G$	$N_{11}C_1G2$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/T531G/A532G$	$N_{11}C_1\Delta G2$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/T531G/A532G/T526N/G527P/F528I$	$N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$
$N_{11}-\Delta 509-519(EL6)-C_1/T531G/A532G/E521Y/T526N/G527P/F528I$	$N_{11}C_1\Delta Y(NPI)G2$

Πίνακας 3.7 Η ονοματολογία των μεταλλαγμάτων του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$. Δίνεται η πλήρης ονοματολογία των μεταλλαγμένων χιμαιρικών μεταφορέων που κατασκευάστηκαν στο υπόβαθρο του $N_{11}C_1$, καθώς και οι συντμήσεις αυτών. Η σύντμηση EL6 αναφέρεται στην εξωτερική συνδετική περιοχή-6 (extracellular loop-6) του XapQ, όπως δίνεται από το τοπολογικό μοντέλο. Η αρίθμηση που αναγράφεται στους χιμαιρικούς μεταφορείς για τα κατάλοιπα του TM12 είναι με βάση την αλληλουχία του UapA. Στο κείμενο και στις εικόνες για λόγους ευκολίας χρησιμοποιούνται μόνο οι συντμήσεις.

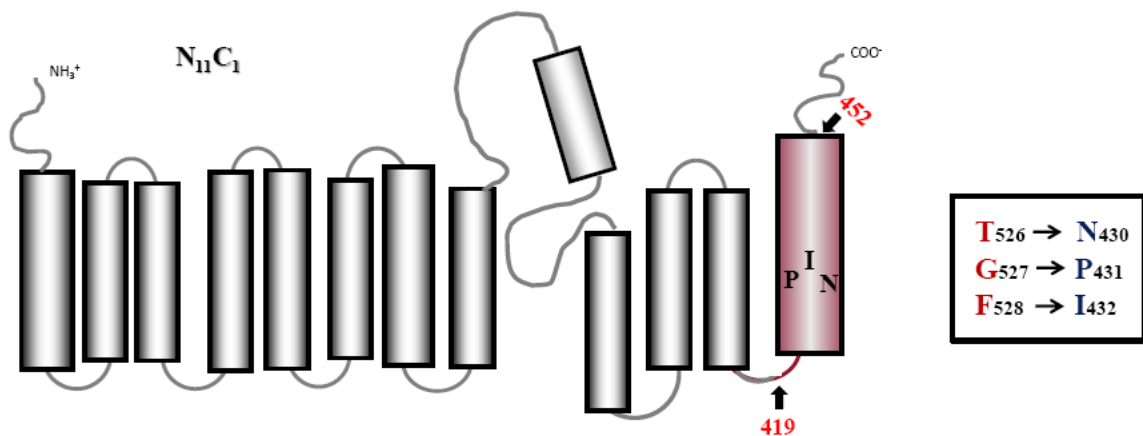
Η εισαγωγή των Asn-430 και Ile-432 στο υπόβαθρο του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$ επαναφέρει την υψηλή έκφραση στη μεμβράνη και οδηγεί σε ανιχνεύσιμη αλλά μικρή ενεργότητα

Προηγούμενες μελέτες κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα XanQ (Parakostas *et al.*, 2008) είχαν αναδείξει ότι τα κατάλοιπα Asn-430 και Ile-432 στο μέσον της έλικας TM12 βρίσκονται πιθανόν κοντά στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος και μικρές αλλαγές στην πλευρική αλυσίδα τους επηρεάζουν την εξειδίκευση. Επίσης, αν αντικατασταθούν με τα αντίστοιχα αμινοξέα που έχει στις θέσεις αυτές ο UapA, τα μεταλλάγματα του XanQ που προκύπτουν (N430T και I432F) είναι ανενεργά (Parakostas *et al.*, 2008). Από την άλλη πλευρά, τα κατάλοιπα στις αντίστοιχες θέσεις του UapA (Thr-526 και Phe-528) έχει επίσης φανεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση της εξειδίκευσης ως προς την μεταφερόμενη πουρίνη και έχει προταθεί ότι συμμετέχουν σε ένα είδος μοριακού φίλτρου που επιλέγει ποια πουρίνη θα έχει πρόσβαση στο ενεργό κέντρο (Parageorgiou *et al.*, 2008; Vlanti *et al.*, 2006; Amillis *et al.*, 2001). Ήταν λοιπόν λογικό να εξετάσουμε αν η επαναφορά των δύο αυτών αμινοξέων (Asn-430, Ile-432) στο γενετικό υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ θα διέσωζε την ενεργότητα ή θα βελτιώνει την έκφραση του χιμαιρικού μεταφορέα. Γι αυτό κατασκευάστηκαν τα σημειακά μεταλλάγματα $N_{11}C_1(N)$, $N_{11}C_1(I)$ και $N_{11}C_1(NI)$ (**Εικόνα 3.21**).

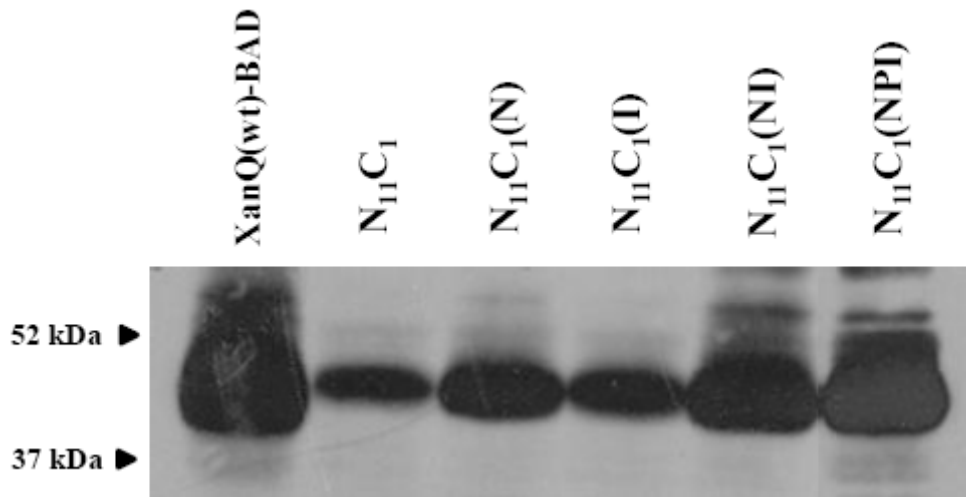
Οι μεταλλαγμένοι χιμαιρικοί μεταφορείς $N_{11}C_1(N)$ και $N_{11}C_1(I)$ εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα από το χιμαιρικό μεταφορέα $N_{11}C_1$ τα οποία όμως παραμένουν σχετικά χαμηλά (20-25% σε σχέση με τον XanQ φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.22**). Παρά τη βελτίωση της έκφρασης, η ενεργότητα των $N_{11}C_1(N)$ και $N_{11}C_1(I)$ παραμένει μηδενική (**Εικόνα 3.23**). Στο διπλό όμως μετάλλαγμα, $N_{11}C_1(NI)$, η έκφραση στη μεμβράνη φτάνει σε πολύ υψηλά επίπεδα, συγκρίσιμα με του XanQ (70% σε σχέση με τον XanQ φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.22**), ενώ εμφανίζεται και ανιχνεύσιμη ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης (**Εικόνα 3.23**).

Μεταξύ των Asn-430 και Ile-432 στην αλληλουχία του XanQ υπάρχει η Pro-431 η οποία στους περισσότερους άλλους μεταφορείς NAT (συμπεριλαμβανομένου του UapA) συντηρείται ως Gly. Για να εξετάσουμε κατά πόσον η διαφορά αυτή (Pro/Gly) μπορεί να είναι σημαντική στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$, επαναφέραμε και την Pro στη θέση Gly-527 του χιμαιρικού μεταφορέα κατασκευάζοντας το μετάλλαγμα $N_{11}C_1(NPI)$ (**Εικόνα 3.21**). Ο μεταλλαγμένος χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1(NPI)$ εμφάνισε, σε σχέση με τον

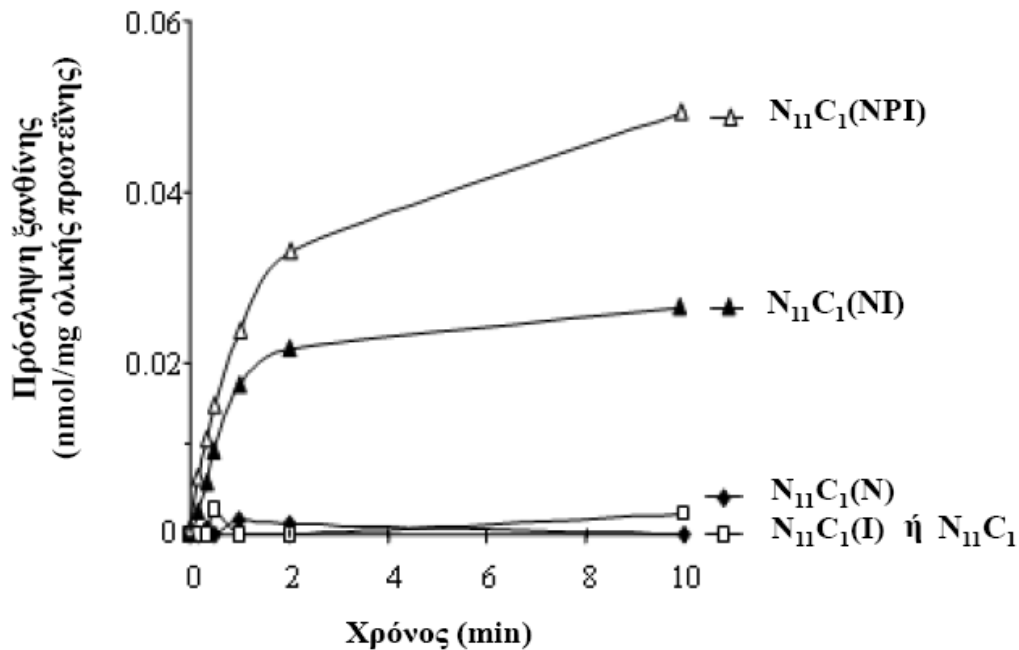
$N_{11}C_1(NI)$, ελαφρά βελτιωμένα επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης (80% των επιπέδων του XanQ φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.22**) και σημαντική βελτίωση στην ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, η οποία ωστόσο παραμένει πολύ χαμηλή (περίπου 2% της ενεργότητας του XanQ φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.23**). Σε κινητική ανάλυση με συγκεντρώσεις $[8-^3H]$ ξανθίνης 1 μM έως 40 μM , τόσο ο $N_{11}C_1(NI)$ όσο και ο $N_{11}C_1(NPI)$ εμφάνιζαν μικρές τιμές ενεργότητας που δεν μας επέτρεψαν να εξάγουμε κινητικές σταθερές K_m και V_{max} (βλ. Πίνακα 3.8, παρακάτω). Από την άλλη πλευρά, πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης $[8-^3H]$ ξανθίνης (1 μM) από μη ραδιενεργά ανάλογα πουρινών (1 mM) έδειξαν ότι και οι δύο χίμαιρες, $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$, εμφανίζουν πολύ διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης από τον XanQ καθώς αναγνωρίζουν περισσότερα ανάλογα της ξανθίνης (κυρίως 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, αλλά εν μέρει και ουρικό, ουρακίλη και αλλοπουρινόλη), έχουν δηλαδή πιο «χαλαρή» εξειδίκευση. Το σημείο αυτό εξετάζεται πιο αναλυτικά παρακάτω (βλ. Πίνακα 3.9).



Εικόνα 3.21 Θέσεις των καταλοίπων όπου εισήχθησαν αντικαταστάσεις στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ για την κατασκευή των μεταλλαγμένων χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1(N)$, $N_{11}C_1(I)$, $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$. Η σχηματική απεικόνιση έγινε όπως και στην Εικόνα 3.17. Για τις συντμήσεις, βλ. Πίνακα 3.7



Εικόνα 3.22 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των $N_{11}C_1(N)$, $N_{11}C_1(I)$, $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD. Δείγματα μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

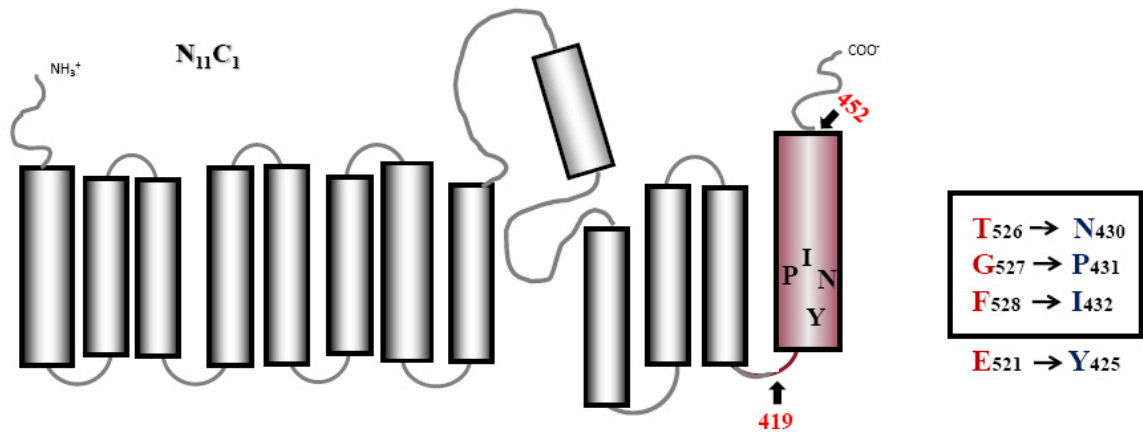


Εικόνα 3.23 Επίπεδα ενεργότητας των $N_{11}C_1(N)$, $N_{11}C_1(I)$, $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1 μ M). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα T184 μετασηματισμένα με τον κενό φορέα pT7-5. Σε παράλληλα πειράματα, κανένα από τα παραπάνω μεταλλάγματα δεν εμφάνισε ενεργότητα μεταφοράς [14 C]ουρικού (1 mM).

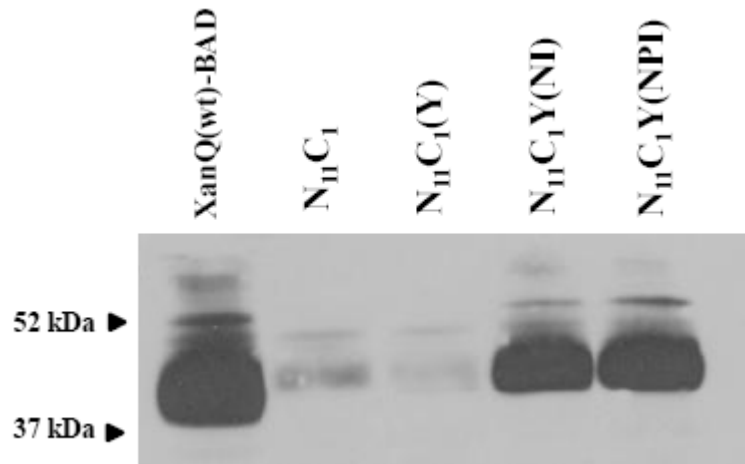
Η εισαγωγή της Tyr-425 στο υπόβαθρο του μεταλλαγμένου χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1(NPI)$ διατηρεί τα υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη αλλά υποβιβάζει την ενεργότητα

Από τις μελέτες κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα XanQ στην έλικα TM12 (Parakostas *et al.*, 2008) δεν είχαν βρεθεί άλλες θέσεις μεταλλαγμάτων που να οδηγούν κατευθείαν σε απενεργοποίηση ή σε υψηλή ευαισθησία σε απενεργοποίηση μετά από επίδραση με NEM εκτός από τις Asn-430 και Ile-432 που εξετάσαμε παραπάνω. Ωστόσο, είχαν εντοπισθεί ορισμένες θέσεις, κυρίως στην περιπλαστική πλευρά της έλικας TM12, όπου τα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης εμφάνιζαν χαμηλή ενεργότητα (20-30% του C-less). Η πιο ενδιαφέρουσα από αυτές τις θέσεις είναι η Tyr-425, γιατί (1) βρίσκεται στην ίδια πλευρά α-έλικας και δύο στροφές ανοδικά της Ile-432, (2) η μεταλλαγή της σε Cys οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα ενεργότητας (<40%) τόσο στο C-less όσο και στο φυσικού τύπου υπόβαθρο (Parakostas *et al.*, 2008) και (3) η αντίστοιχη θέση στον μεταφορέα ουρικού UarA καταλαμβάνεται από ένα εντελώς διαφορετικό αμινοξύ (Glu-521). Για τους λόγους αυτούς εξετάσαμε αν η επαναφορά της Tyr-425 στο χιμαιρικό υπόβαθρο των ενεργών μεταλλαγμάτων του $N_{11}C_1$ θα μπορούσε να οδηγήσει σε περαιτέρω βελτίωση της ενεργότητας, κατασκευάζοντας και αναλύοντας τα μεταλλάγματα $N_{11}C_1(Y)$, $N_{11}C_1Y(NI)$ και $N_{11}C_1Y(NPI)$ (**Εικόνα 3.24**).

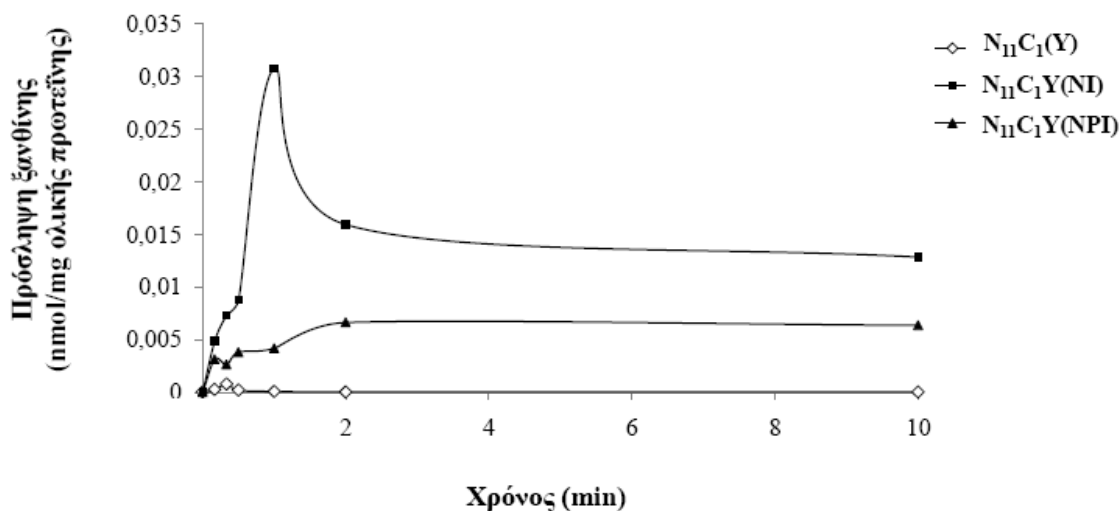
Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η εισαγωγή της Tyr-425 στο υπόβαθρο του $N_{11}C_1(NPI)$ ή του $N_{11}C_1(NI)$ διατηρεί σε υψηλά επίπεδα την έκφραση στη μεμβράνη (**Εικόνα 3.25**), αλλά δε βελτιώνει την ενεργότητα. Στην πραγματικότητα, οδηγεί σε μικρή μείωση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης, που είναι ούτως ή άλλως πολύ χαμηλή και στις προηγούμενες χίμαιρες (**Εικόνα 3.26**). Η μεμβρανική έκφραση των $N_{11}C_1Y(NI)$ και $N_{11}C_1Y(NPI)$ ήταν στα επίπεδα του 60% σε σχέση με τον XanQ(wt), ενώ η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης ήταν μικρότερη από 1.5% και δε μας επέτρεψε να προχωρήσουμε σε πειράματα κινητικής ή ανταγωνισμού από μη ραδιενεργά ανάλογα υποστρώματος. Στο υπόβαθρο της ανενεργής χίμαιρας $N_{11}C_1$, η εισαγωγή της Tyr-425 δε μπορεί να βελτιώσει τα επίπεδα έκφρασης (στην πραγματικότητα, η έκφραση της $N_{11}C_1(Y)$ είναι μειωμένη σε σχέση με την ήδη χαμηλή έκφραση της $N_{11}C_1$) (**Εικόνα 3.25**) ενώ δεν οδηγεί σε ανιχνεύσιμη ενεργότητα (**Εικόνα 3.26**).



Εικόνα 3.24 Θέσεις των καταλοίπων όπου εισήχθησαν αντικαταστάσεις στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ για την κατασκευή των μεταλλαγμένων χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1(Y)$, $N_{11}C_1Y(NI)$ και $N_{11}C_1Y(NPI)$. Η σχηματική απεικόνιση έγινε όπως και στην Εικόνα 3.17. Για τις συντημήσεις, βλ. Πίνακα 3.7



Εικόνα 3.25 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των $N_{11}C_1(Y)$, $N_{11}C_1Y(NI)$ και $N_{11}C_1Y(NPI)$ (αριστερά) και $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$ (δεξιά). Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD. Δείγματα μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.26 Επίπεδα ενεργότητας των $N_{11}C_1(Y)$, $N_{11}C_1Y(NI)$ και $N_{11}C_1Y(NPI)$. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (1 μM). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα T184 μετασχηματισμένα με τον κενό φορέα pT7-5. Σε παράλληλα πειράματα, κανένα από τα παραπάνω μεταλλάγματα δεν εμφάνισε ενεργότητα μεταφοράς [^{14}C]ουρικού (1 mM).

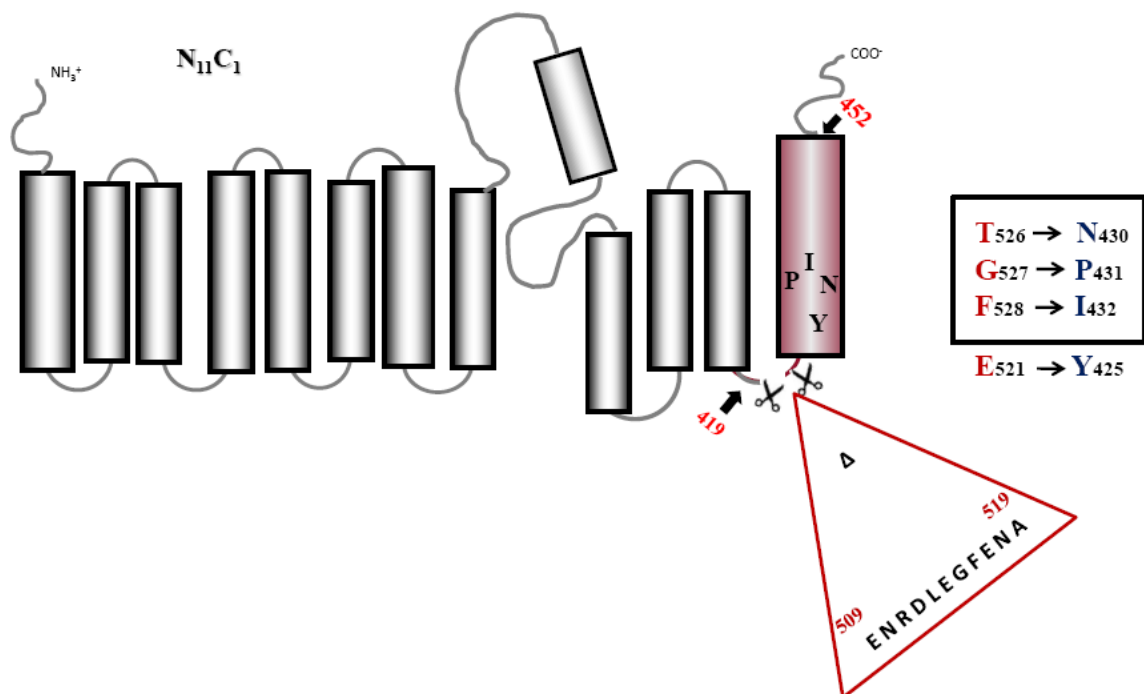
Η περικοπή του υδρόφιλου συνδετικού τμήματος μεταξύ TM11 και TM12 στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ (NPI) οδηγεί σε υψηλή ενεργότητα

Εκτός από τις διαφορές σε κατάλοιπα της έλικας TM12, ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1$ καθώς και όλα τα μεταλλάγματά του που εξετάσαμε μέχρι τώρα διαφέρουν από τον XanQ φυσικού τύπου ως προς το μήκος του υδρόφιλου συνδετικού τμήματος μεταξύ TM11 και TM12. Συγκεκριμένα, το μήκος της υδρόφιλης αυτής περιοχής (κατάλοιπα 415-422 στον XanQ) είναι κατά 11 αμινοξέα μεγαλύτερο τόσο στη χίμαιρα $N_{11}C_1$ όσο και στον UapA (**Εικόνα 3.14**). Η μεγάλη συνδετική περιοχή (υπερδιπλάσια αυτής του XanQ) μπορεί να συνδέεται με τη μικρή έως μηδενική ενεργότητα των προηγούμενων μεταλλαγμάτων του $N_{11}C_1$ γιατί ίσως χαλαρώνει τη λειτουργική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο κρίσιμες περιοχές του μορίου (μοτίβο-υπογραφή και έλικα TM12) και δεν επιτρέπει τη σωστή σύζευξη της δέσμευσης της ξανθίνης με τις αλλαγές διαμόρφωσης στο ενεργό κέντρο που είναι απαραίτητες για την κατάλυση της ενεργού μεταφοράς. Για τον ίδιο λόγο, η ίδια συνδετική περιοχή στον μεταφορέα ουρικού UapA θα μπορούσε να περιορίζει την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης και να συνεισφέρει στη διαφορετική εξειδίκευση του UapA σε σχέση με τον XanQ. Για τους παραπάνω λόγους, εξετάσαμε κατά πόσον η απαλοιφή της αντίστοιχης υδρόφιλης αλληλουχίας (ENRDLEGFENA) από τον $N_{11}C_1$ και τα μεταλλάγματά του θα μπορούσε να βελτιώσει την ενεργότητα ή να επαναφέρει το προφίλ εξειδίκευσης του XanQ, κατασκευάζοντας και αναλύοντας τα μεταλλάγματα $N_{11}C_1\Delta$, $N_{11}C_1\Delta$ (NPI), $N_{11}C_1\Delta$ (Y), $N_{11}C_1\Delta$ Y(NI) και $N_{11}C_1\Delta$ Y(NPI) (**Εικόνα 3.27**).

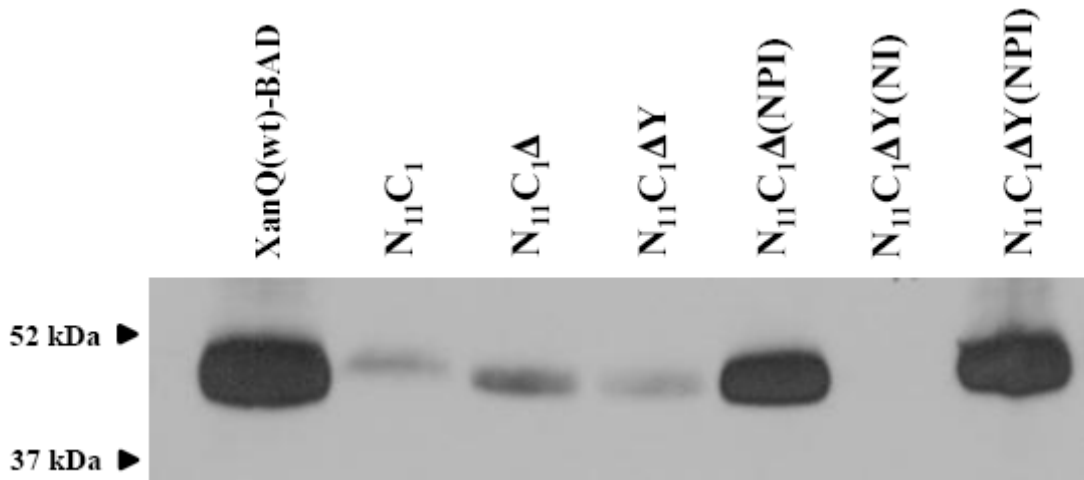
Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η περικοπή της αλληλουχίας του συνδετικού τμήματος βελτιώνει θεαματικά την ενεργότητα των χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1$ (NPI) και $N_{11}C_1$ Y(NPI) ενώ δεν επηρεάζει την ενεργότητα ή την έκφραση στο υπόβαθρο των ελάχιστα εκφραζόμενων $N_{11}C_1$ ή $N_{11}C_1$ (Y). Συγκεκριμένα, οι χίμαιρες $N_{11}C_1\Delta$ και $N_{11}C_1\Delta$ (Y) εμφανίζουν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, παρόμοια με του $N_{11}C_1$ (**Εικόνα 3.28**), και είναι ανενεργές (**Εικόνα 3.29**). Αντίθετα, οι χίμαιρες $N_{11}C_1\Delta$ (NPI) και $N_{11}C_1\Delta$ Y(NPI) εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης (60-70% σε σχέση με τον XanQ φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.28**) και έχουν υψηλές ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης, περίπου 50-60% σε σχέση με τον XanQ (**Εικόνα 3.29**). Κινητική ανάλυση αυτών των ενεργοτήτων έδειξε ότι οι $N_{11}C_1\Delta$ (NPI) και $N_{11}C_1\Delta$ Y(NPI) εμφανίζουν παρόμοιες K_m με

αυτήν του XanQ(wt) (3.8-4 μM) και υποδιπλάσιες περίπου V_{max} (2.8-3.3 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) (Πίνακας 3.8).

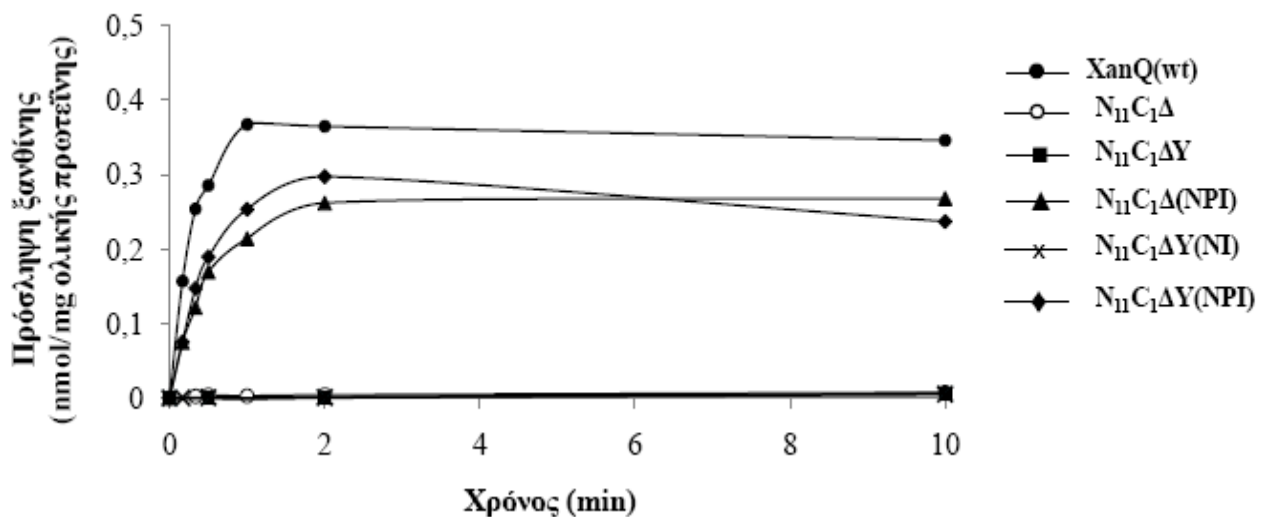
Από την άλλη πλευρά, οι ιδιότητες του μεταλλάγματος $N_{11}C_1\Delta Y(NI)$ δείχνουν ότι, απουσία της Pro-431, η περικοπή του συνδετικού τμήματος δε μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη ενεργότητα αλλά, τουταντίον, οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δομής, αφού η μεταλλαγμένη αυτή χίμαιρα δεν εκφράζεται καθόλου στη μεμβράνη (Εικόνα 3.28). Το αποτέλεσμα αυτό είναι πολύ σημαντικό από εξελικτική άποψη, καθώς αποκαλύπτει μια «καθοριστική» μεταλλαγή (Δ) που ενεργοποιεί ουσιαστικά το χιμαιρικό μόριο, αλλά μόνο στην περίπτωση που προϋπάρχει μια δεύτερη, «σταθεροποιητική» μεταλλαγή (P): όταν απουσιάζει η «σταθεροποιητική» μεταλλαγή P, η «καθοριστική» μεταλλαγή Δ οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δομής και αδυναμία σωστής έκφρασης στη μεμβράνη. Με άλλα λόγια, χρειάζεται να έχει εγκατασταθεί πρώτα η Pro-431 (ίσως για να φέρει το αμινοξύ Asn-430 στη σωστή θέση και προσανατολισμό που επιτρέπει πρόσβαση της ξανθίνης στο ενεργό κέντρο) για να μπορέσει να αναδειχθεί ο «ωφέλιμος» ρόλος που έχει η σμίκρυνση του υδρόφιλου συνδετικού τμήματος (μεταλλαγή Δ) στον μηχανισμό της μεταφοράς. Όταν υπάρχει Gly στη θέση 431, η περικοπή του συνδετικού τμήματος οδηγεί πιθανόν σε ενεργειακή αποσταθεροποίηση και κατάρρευση της δομής (ή «εξελικτικό αδιέξοδο»).



Εικόνα 3.27 Θέσεις των καταλοίπων όπου εισήχθησαν αντικαταστάσεις στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ για την κατασκευή των μεταλλαγμένων χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1\Delta$, $N_{11}C_1\Delta Y$, $N_{11}C_1\Delta(NI)$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)$, $N_{11}C_1\Delta Y(NI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$. Η σχηματική απεικόνιση έγινε όπως και στην Εικόνα 3.17. Για τις συντμήσεις, βλ.Πίνακα 3.7



Εικόνα 3.28 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των $N_{11}C_1\Delta$, $N_{11}C_1\Delta Y$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)$, $N_{11}C_1\Delta Y(NI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD. Δείγματα μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.29 Επίπεδα ενεργότητας των $N_{11}C_1\Delta$, $N_{11}C_1\Delta Y$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)$, $N_{11}C_1\Delta Y(NI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[8-^3H]$ ξανθίνης (1 μ M). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα T184 μετασχηματισμένα με τον κενό φορέα pT7-5. Σε παράλληλα πειράματα, κανένα από τα παραπάνω μεταλλάγματα δεν εμφάνισε ενεργότητα μεταφοράς $[^{14}C]$ ουρικού (1 mM).

Χίμαιρα	K_m (μM)	V_{\max} (nmol min^{-1} $\text{mg}^{-1} \text{ protein}$)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
XanQ(wt)	4.5±0.5	7.9±1.0	1755
N ₁₁ C ₁	ND	ND	
N ₁₁ C ₁ (N)	ND	ND	
N ₁₁ C ₁ (I)	ND	ND	
N ₁₁ C ₁ (NI)	ND	ND	
N ₁₁ C ₁ (NPI)	ND	ND	
N ₁₁ C ₁ Y(NPI)	ND	ND	
N ₁₁ C ₁ Δ(NPI)	3.8±1.0	2.8±0.3	736
N ₁₁ C ₁ ΔY(NPI)	4.0±0.2	3.3±0.1	825
N ₁₁ C ₁ Δ(NPI)G2	3.7±0.5	3.7±0.2	1000
N ₁₁ C ₁ ΔY(NPI)G2	4.5±1.0	9.8±0.7	2177

Πίνακας 3.8 Κινητική ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης των χιμαιρικών μεταφορέων. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/N₁₁C₁-BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ξανθίνης. Οι K_m και V_{\max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις [³H] ξανθίνης 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM , και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές του XanQ που εξετάστηκε παράλληλα (βλ. και Πίνακα 3.2). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα T184 μετασχηματισμένα με τον κενό φορέα pT7-5. Οι K_m και V_{\max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 4*. Οι τιμές που φαίνονται προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται. Στις περιπτώσεις των N₁₁C₁, N₁₁C₁(N), N₁₁C₁(I), N₁₁C₁(NI), N₁₁C₁(NPI) και N₁₁C₁Y(NPI), δεν προσδιορίστηκαν κινητικές σταθερές λόγω των πολύ χαμηλών τιμών της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης ξανθίνης σε όλες τις συγκεντρώσεις ($\leq 0.15 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (ND).

Τα προφίλ εξειδίκευσης των χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1(NI)$, $N_{11}C_1(NPI)$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$ είναι διαφορετικά από αυτό του XanQ(wt)

Μια άλλη σημαντική παράμετρος των έως τώρα αποτελεσμάτων μας είναι ότι όσοι από τους μεταλλαγμένους χιμαιρικούς μεταφορείς XanQ/UapA παρουσίασαν ενεργότητα εμφανίζουν διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης από αυτό του XanQ(wt). Οι μικρής ενεργότητας χίμαιρες $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$ επιτρέπουν την αναγνώριση πολλών πουρινών ή συνθετικών αναλόγων που δεν αναγνωρίζονται καθόλου από τον XanQ φυσικού τύπου. Ορισμένες από τις διαφορές αυτές, που αφορούν κυρίως την αναγνώριση αναλόγων με αντικαταστάσεις στις θέσεις 7 και 8 του πουρινικού δακτυλίου, διατηρούνται και στις υψηλής ενεργότητας χίμαιρες $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$ (Πίνακας 3.9).

Πιο αναλυτικά, οι χίμαιρες $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$ αναγνωρίζουν πολύ ισχυρά την 7-μεθυλοξανθίνη (αναστολή ενεργότητας κατά 71% και 74%) και την 8-μεθυλοξανθίνη (αναστολή κατά 80% και 91%), οι οποίες δεν αναγνωρίζονται καθόλου από τον XanQ. Επίσης, αναγνωρίζουν πολύ καλύτερα (>98% αναστολή) την 3-μεθυλοξανθίνη και την οξυπουρινόλη (7-καρβο, 8-αζαξανθίνη), ενώ η $N_{11}C_1(NPI)$ αναγνωρίζει σε μικρό βαθμό και το ουρικό (8-οξυξανθίνη) (37% αναστολή). Ομοίως, οι χίμαιρες $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$ αναγνωρίζουν ως προσδέτες την 7-μεθυλοξανθίνη (αναστολή κατά 63% και 53%), την 8-μεθυλοξανθίνη (αναστολή κατά 84% και 73%) και την οξυπουρινόλη (αναστολή κατά 98% και 94%), ενώ η $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ αναγνωρίζει εν μέρει και το ουρικό (46% αναστολή) (Πίνακας 3.9). Αντίθετα, οι $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$ δεν αναγνωρίζουν καθόλου την ουρακίλη ή την αλλοπουρινόλη, οι οποίες αναγνωρίζονται σε μικρό βαθμό από τις χίμαιρες $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$. Επίσης, η αναστολή της ενεργότητάς τους από την 3-μεθυλοξανθίνη είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται για τον XanQ φυσικού τύπου (72-75%).

Βλέπουμε λοιπόν ότι, παρά την επαναφορά των κρίσιμων καταλοίπων της έλικας TM12 και την «διόρθωση» του συνδετικού τμήματος μεταξύ TM11 και TM12, το χιμαιρικό υπόβαθρο $N_{11}C_1$ δεν επιτρέπει την επαναφορά της εξειδίκευσης του XanQ. Η πλήρης επαναφορά της εξειδίκευσης μπορεί να εξαρτάται από πιο λεπτές διαφορές πλευρικών ομάδων, σε θέσεις που δεν είχαν αναδειχθεί από την αρχική μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στο μόριο του XanQ (Papakostas *et al.*, 2008).

Ρυθμός πρόσληψης [³H] ξανθίνης (%)

	N ₁₁ C ₁		N ₁₁ C ₁ Δ		N ₁₁ C ₁ ΔG2		
XanQ	NI	NPI	NPI	Y/NP	NPI	Y/NP	
Ανταγωνιστές							
Ουρικό οξύ	97	95	63	54	93	98	70
Υποξανθίνη	96	81	70	82	120	176	94
Αδενίνη	96	102	112	101	158	286	137
Γουανίνη	94	110	143	85	74	70	73
Ουρακίλη	101	71	48	72	116	132	87
2-θειοξανθίνη	13	21	9	4	7	6	5
3-μεθυλοξανθίνη	25	3	2	18	14	36	15
6-θειοξανθίνη	20	9	27	4	8	8	10
7-μεθυλοξανθίνη	105	30	36	37	47	147	40
8-μεθυλοξανθίνη	96	20	9	16	27	55	35
Αλλοπουρινόλη	106	75	51	86	157	196	103
Οξυπουρινόλη	31	0	0	2	6	10	1

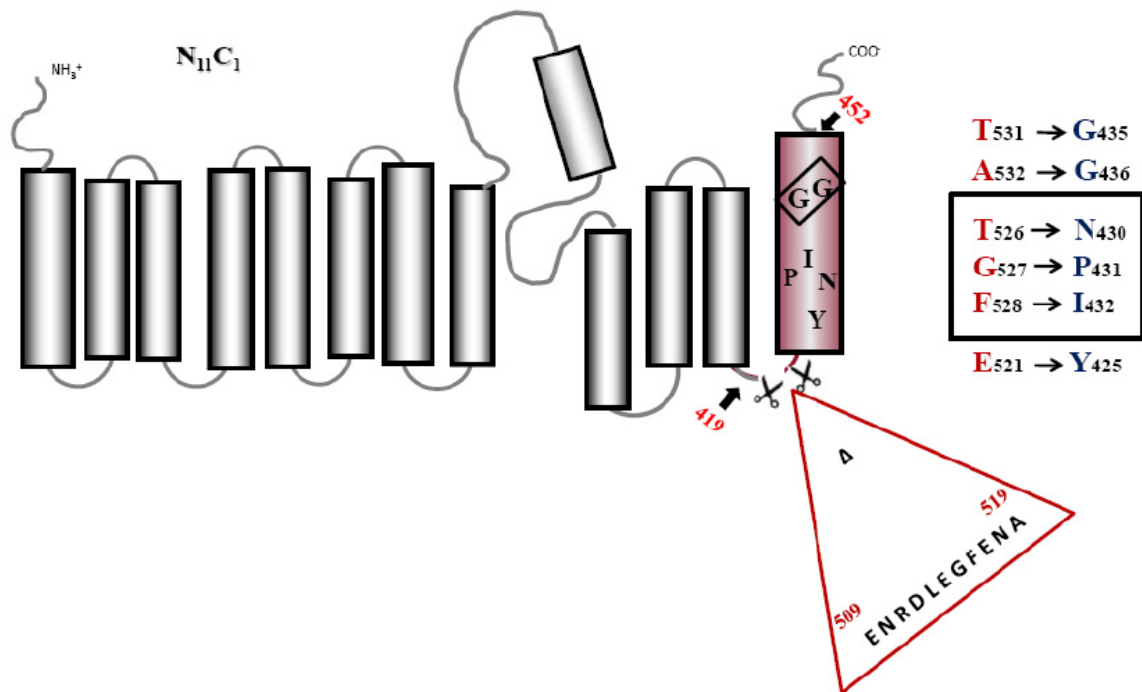
Πίνακας 3.9 Εξειδίκευση των χημικών μεταφορέων ως προς την αναγνώριση διαφόρων πουρινών. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/N₁₁C₁-BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [8-³H] ξανθίνης (1 μM) μετά από επώαση με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec ή 10 και 20 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % ποσοστό των τιμών που προέρχονται από κύτταρα που δεν έχουν προεπωαστεί με τους μη σημασμένους προσδέτες και δίνονται συγκριτικά με τα αντίστοιχα που προσδιορίστηκαν για τον XanQ φυσικού τύπου (βλ. Πίνακα 3.3). Οι τιμές προέρχονται από 3 πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) μικρότερες του 20% σε κάθε περίπτωση. Οι σημαντικότερες αποκλίσεις σε σχέση με τον XanQ(wt) σημειώνονται με έντονη γραφή.

Η εισαγωγή ενός ζεύγους γλυκινών στο μέσον της έλικας TM12 στο υπόβαθρο της χίμαιρας N₁₁C₁Δ(NPI) επαναφέρει πλήρως την ενεργότητα

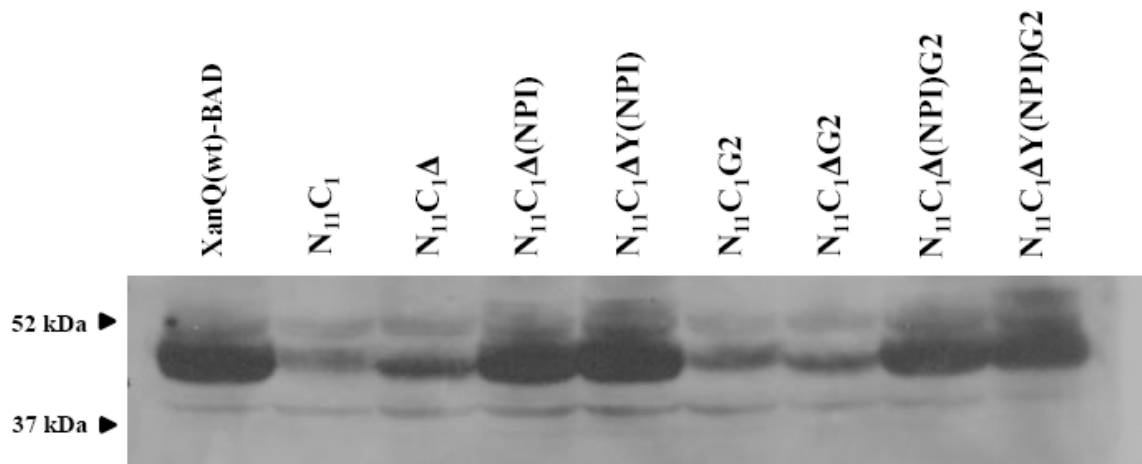
Από τους χιμαιρικούς μεταφορείς που εξετάστηκαν έως τώρα, κανένας δεν εμφάνισε ενεργότητα σε ίδια επίπεδα με του XanQ ή όμοιο προφίλ εξειδίκευσης. Ορισμένοι από αυτούς τους μεταφορείς διαφέρουν από τον XanQ σε ελάχιστες θέσεις της έλικας TM12, όπως ο N₁₁C₁ΔY(NPI) που διαφέρει κατά μόνο 8 μη συντηρητικές αλλαγές (πρβλ. Εικόνα 3.15 και Εικόνα 3.28). Από τις διαφορές που παραμένουν μεταξύ του N₁₁C₁ΔY(NPI) και του XanQ, οι μόνες που εντοπίζονται στο μέσον της έλικας TM12 και, μάλιστα, μία στροφή α-έλικας καθοδικά της Ile-432, αφορούν ένα ζεύγος γλυκινών του XanQ (Gly-435, Gly-436) οι οποίες στον UapA και στις χίμαιρες που κατασκευάστηκαν έως τώρα αντικαθίστανται με Thr και Ala, αντίστοιχα. Ήταν λογικό, επομένως, να εξετάσουμε κατά πόσον η επαναφορά των δύο αυτών γλυκινών στην αλληλουχία των προηγούμενων χιμαιρικών μεταφορέων μπορεί να αποκαταστήσει πλήρως την ενεργότητα ή να βελτιώσει το προφίλ εξειδίκευσης ως προς την αναγνώριση αναλόγων της ξανθίνης. Γι αυτό το λόγο κατασκευάσαμε και αναλύσαμε τα μεταλλάγματα N₁₁C₁G2, N₁₁C₁ΔG2, N₁₁C₁Δ(NPI)G2 και N₁₁C₁ΔY(NPI)G2 (**Εικόνα 3.30**).

Η εισαγωγή των Gly-435 και Gly-436 στο χιμαιρικό υπόβαθρο των μεταφορέων N₁₁C₁Δ(NPI) και N₁₁C₁ΔY(NPI) οδηγεί σε διατήρηση των υψηλών επιπέδων έκφρασης στη μεμβράνη (50-60% σε σχέση με τα επίπεδα του XanQ φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.31**) και διπλασιασμό της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης η οποία φτάνει πλέον στο 100% της ενεργότητας του XanQ (**Εικόνα 3.32**). Συγκεκριμένα, ο χιμαιρικός μεταφορέας N₁₁C₁ΔY(NPI)G2 εμφανίζει αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης [³H]ξανθίνης (1 μM) που είναι ίδια με του XanQ, ενώ ο N₁₁C₁Δ(NPI)G2 εμφανίζει την ίδια αρχική ταχύτητα και λίγο μειωμένα επίπεδα συσσώρευσης (70%). Σε κινητική ανάλυση της ενεργότητας, ο N₁₁C₁ΔY(NPI)G2 εμφανίζει την ίδια K_m (4.5 μM) και λίγο υψηλότερη V_{max} από αυτή του XanQ, ενώ ο N₁₁C₁Δ(NPI)G2 εμφανίζει παρόμοια K_m (3.7 μM) και μειωμένη V_{max} (περίπου 50% αυτής του XanQ) (**Πίνακας 3.8**). Η ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης έδειξε ότι και οι δύο αυτοί μεταφορείς προσεγγίζουν περισσότερο στο προφίλ του XanQ από ό,τι οι αντίστοιχοι χιμαιρικοί μεταφορείς που δεν έχουν το ζεύγος των γλυκινών (**Πίνακας 3.9**). Από την άλλη πλευρά, η εισαγωγή των Gly-435 και Gly-436 στο υπόβαθρο των ανενεργών και ελάχιστα εκφραζόμενων N₁₁C₁ και N₁₁C₁Δ δεν

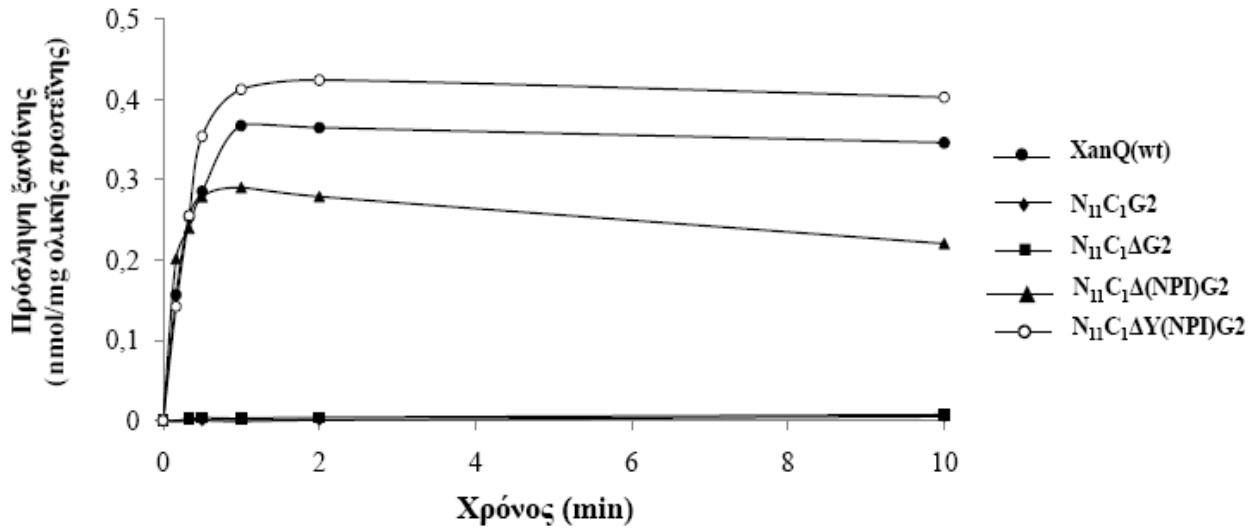
μπορεί να βελτιώσει την έκφραση (Εικόνα 3.31) ή να περισώσει την ενεργότητα (Εικόνα 3.32).



Εικόνα 3.30 Θέσεις των καταλοίπων όπου εισήχθησαν αντικαταστάσεις στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ για την κατασκευή των μεταλλαγμένων χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1G2$, $N_{11}C_1\Delta G2$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)G2$. Η σχηματική απεικόνιση έγινε όπως και στην Εικόνα 3.17. Για τις συντημήσεις, βλ. Πίνακα 3.7.



Εικόνα 3.31 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των $N_{11}C_1G2$, $N_{11}C_1\Delta G2$, $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)G2$. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/ $N_{11}C_1$ -BAD. Δείγματα μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και αποτύπωση με αβιδίνη (avidin-HRP). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Στο αριστερό μέρος του ηλεκτροφορήματος, σημειώνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).



Εικόνα 3.32 Επίπεδα ενεργότητας των *N₁₁C₁G2*, *N₁₁C₁ΔG2*, *N₁₁C₁Δ(NPI)G2* και *N₁₁C₁ΔY(NPI)G2*. Κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG (0.5 mM) για την έκφραση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων από πλασμίδια pT7-5/*N₁₁C₁*-BAD συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) και υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα T184 μετασχηματισμένα με τον κενό φορέα pT7-5. Σε παράλληλα πειράματα, κανένα από τα παραπάνω μεταλλάγματα δεν εμφάνισε ενεργότητα μεταφοράς [^{14}C]ουρικού (1 mM).

Ο χιμαιρικός μεταφορέας N₁₁C₁Δ(NPI)G2 προσεγγίζει καλύτερα τις λειτουργικές ιδιότητες του XanQ(wt)

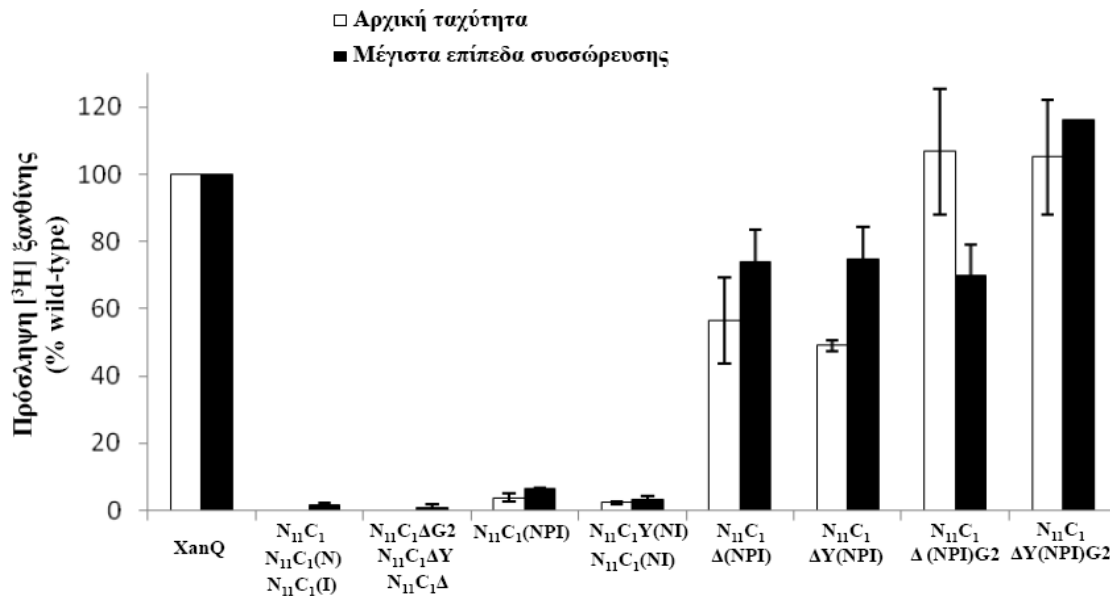
Με τη σύγκριση των μεταλλαγμάτων του χιμαιρικού μεταφορέα N₁₁C₁ προκύπτει ότι η σταδιακή επαναφορά των αμινοξέων Asn-430/Ile-432 (NI), Pro-431 (P), Gly-435/Gly-436 (G2) και η «διόρθωση» του μήκους της συνδετικής περιοχής πριν από την TM12 (Δ) αποκαθιστά πλήρως την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης και την έκφραση στη μεμβράνη, σε επίπεδα παρόμοια με του XanQ. Η ενεργότητα αποκαθίσταται κατά 50% με το συνδυασμό Δ(NPI) και κατά 100% με το συνδυασμό Δ(NPI)G2 (**Εικόνα 3.33**), ενώ η έκφραση στη μεμβράνη αποκαθίσταται κατά 50-80% με οποιονδήποτε από τους συνδυασμούς (NI), (NPI), Δ(NPI) ή Δ(NPI)G2 (**Εικόνα 3.34**). Η επαναφορά της Tyr-425 (Y) σε συνδυασμό με τις προηγούμενες μεταλλαγές δε φαίνεται γενικά να επηρεάζει ιδιαίτερα την έκφραση ή την ενεργότητα, αν και εμφανίζεται να αποσταθεροποιεί τελείως την έκφραση στις ελάχιστα εκφραζόμενες χίμαιρες N₁₁C₁ και N₁₁C₁Δ (Εικόνες 3.26 και 3.29), ενώ βελτιώνει σε κάποιο βαθμό την ενεργότητα (αυξάνοντας τη V_{max}) στις ενεργές χίμαιρες N₁₁C₁(NPI) και N₁₁C₁Δ(NPI)G2 (**Πίνακας 3.8**).

Η σειρά με την οποία εισάγονται οι παραπάνω αλλαγές στο χιμαιρικό υπόβαθρο έχει καθοριστική σημασία για τη βελτίωση της ενεργότητας ή της έκφρασης. Φαίνεται, για παράδειγμα, ότι αν δεν έχει εισαχθεί ο συνδυασμός των Asn-430/Ile-432 (NI), δε μπορεί να ανακτηθεί σημαντική έκφραση στη μεμβράνη για καμιά από τις χίμαιρες, αφού όλες οι χίμαιρες που δεν έχουν τον συνδυασμό (NI) ή (NPI) εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Επίσης, αν δεν έχει εισαχθεί η Pro-431 (P), η περικοπή του συνδετικού τμήματος (Δ) αντί να οδηγήσει σε υψηλή ενεργότητα, οδηγεί σε πλήρη κατάρρευση της δομής (Εικόνα 3.29). Ως προς την ενεργότητα, το ζεύγος γλυκινών (G2) δε μπορεί να βελτιώσει την ενεργότητα αν δεν έχουν προηγηθεί οι εισαγωγές των μεταλλαγών (NPI) και Δ, ενώ η περικοπή του συνδετικού τμήματος (Δ) δε μπορεί να ενεργοποιήσει τη χίμαιρα αν δεν έχει προηγηθεί η εισαγωγή του συνδυασμού (NPI).

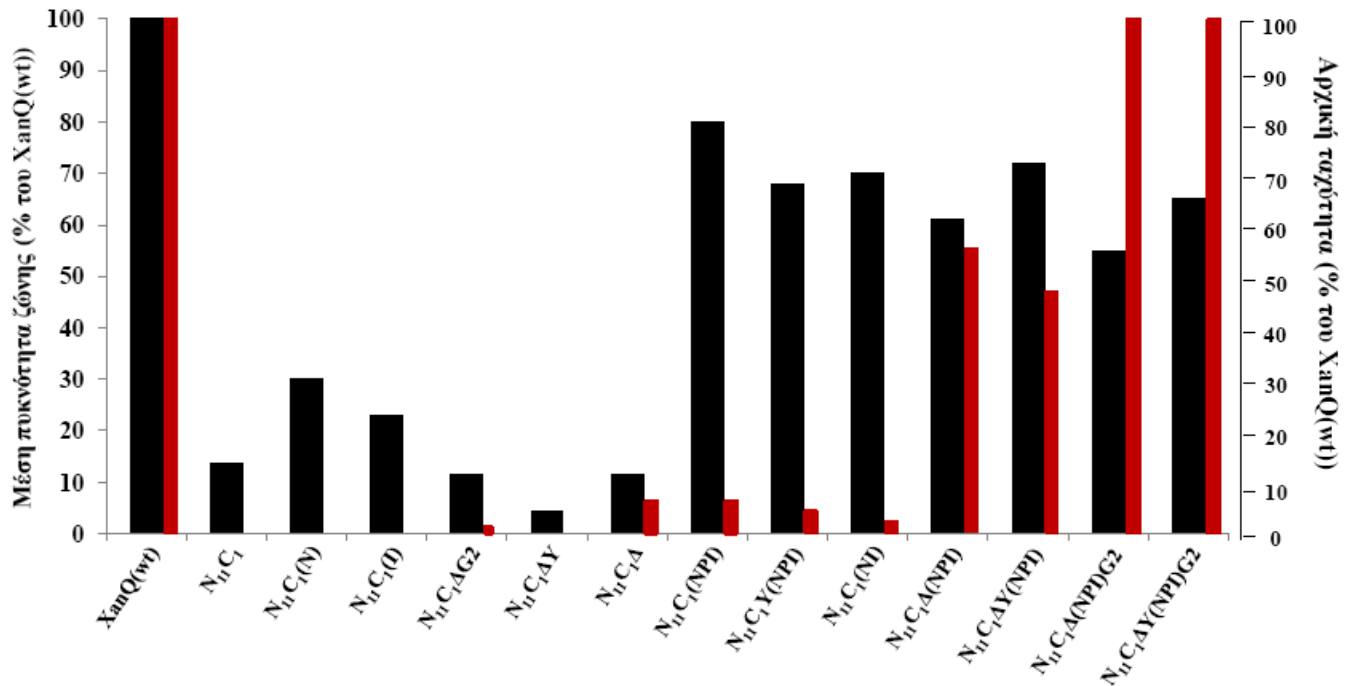
Ως προς το προφίλ εξειδίκευσης, οι χίμαιρες όπου έχει εισαχθεί μόνο ο συνδυασμός (NI) ή (NPI) εμφανίζουν πολύ χαμηλή εξειδίκευση (high promiscuity), καθώς αναγνωρίζουν πολλά μη φυσιολογικά υποστρώματα, η οποία βέβαια συνοδεύεται από πολύ χαμηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Η εξειδίκευση βελτιώνεται σταδιακά, παράλληλα με τη βελτίωση της ενεργότητας, όταν εισαχθεί, σε δεύτερο στάδιο, η περικοπή του συνδετικού τμήματος (Δ) και, σε τρίτο στάδιο, ο συνδυασμός των γλυκινών

(G2) (**Πίνακας 3.9**). Η παράλληλη εισαγωγή της Tyr-425 οδηγεί σε μικρή περαιτέρω βελτίωση της ενεργότητας, αλλά διαφοροποιεί και το προφίλ εξειδίκευσης των ενεργών χιμαιρικών μεταφορέων. Συγκεκριμένα, όταν εισαχθεί στο υπόβαθρο της χίμαιρας που περιέχει ήδη το συνδυασμό Δ(NPI), αποτρέπει τη δυνατότητα αναγνώρισης ουρικού βελτιώνοντας έτσι σε μικρό βαθμό την εξειδίκευση, ενώ, όταν εισαχθεί στο υπόβαθρο της χίμαιρας με το συνδυασμό Δ(NPI)G2, φαίνεται να διατηρεί σε υψηλότερα επίπεδα τη δυνατότητα αναγνώρισης 7-μεθυλοξανθίνης, 8-μεθυλοξανθίνης και οξυπουρινόλης, εμποδίζοντας την περαιτέρω βελτίωση της εξειδίκευσης (**Πίνακας 3.9**).

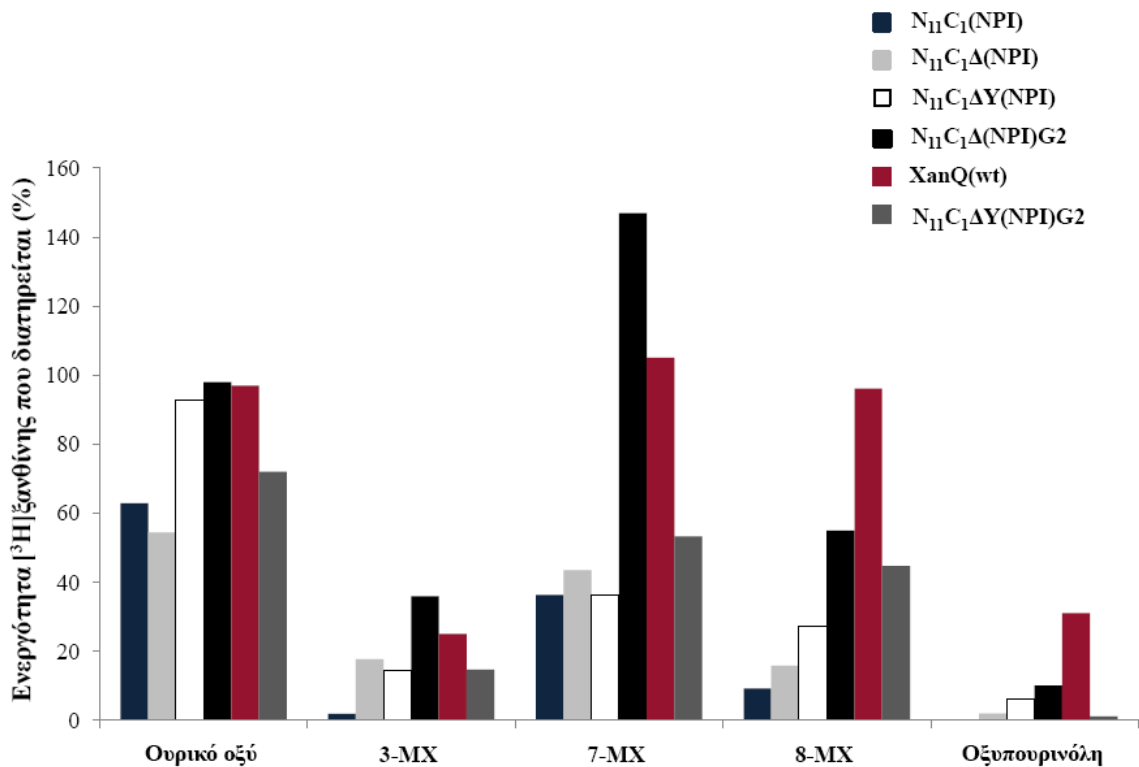
Συνοπτικά, ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$ είναι αυτός που προσεγγίζει καλύτερα τις λειτουργικές ιδιότητες του XanQ, αφού εμφανίζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, παρόμοια επίπεδα ενεργότητας για μεταφορά ξανθίνης, καθώς και μεγαλύτερη ομοιότητα με τον XanQ ως προς την εξειδίκευση, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά από τις διαφορές στην ικανότητα αναγνώρισης ουρικού, 7-μεθυλοξανθίνης, 8-μεθυλοξανθίνης και οξυπουρινόλης (**Εικόνα 3.35**).



Εικόνα 3.33 Σύνοψη των επιπέδων μεταφοράς [3H]ξανθίνης (1 μM) που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$. Τα δεδομένα προέρχονται από πειράματα ενεργού μεταφοράς που παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά στις Εικόνες 3.24, 3.27, 3.30 και 3.33. Για τις συντμήσεις βλ. Πίνακα 3.7.



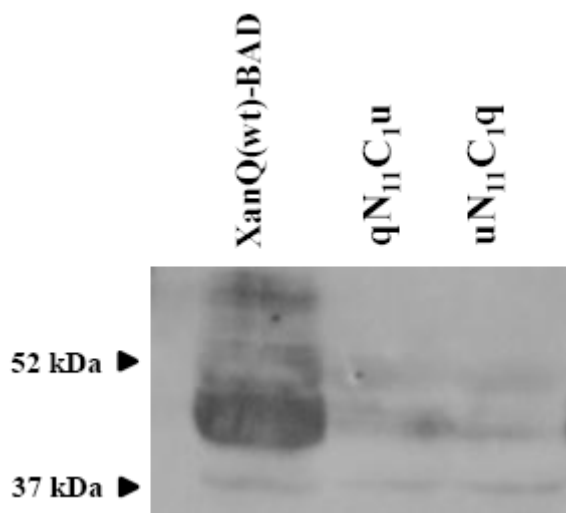
Εικόνα 3.34 Σύνοψη των επιπέδων μεμβρανικής έκφρασης που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα του χμιαϊκού μεταφορέα N₁₁C₁. Τα δεδομένα προέρχονται από πειράματα ανοσοαποτύπωσης που παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά στις Εικόνες 3.23, 3.26, 3.29 και 3.32. Για τις συντημήσεις βλ. Πίνακα 3.7. Οι κόκκινες λεπτές ράβδοι αντιστοιχούν στις τιμές ενεργότητας, (αρχική ταχύτητα) των αντίστοιχων χμιαϊκών μεταφορέων.



Εικόνα 3.35 Σύνοψη των σημαντικότερων διαφορών στο προφίλ εξειδίκευσης που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα του χμιαϊκού μεταφορέα N₁₁C₁. Τα δεδομένα προέρχονται από πειράματα ανταγωνισμού της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης από μη ραδιενεργά ανάλογα, όπως παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.9. Για τις συντημήσεις βλ. Πίνακα 3.7.

3.2.4 Οι χιμαιρικοί μεταφορείς μεταξύ XanQ/YgfU όπου αντικαθίσταται η έλικα TM12

Παράλληλα με την κατασκευή και τον λειτουργικό έλεγχο των χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ XanQ και UapA προχωρήσαμε στην κατασκευή χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ XanQ και YgfU, ανταλλάσσοντας τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στην περιοχή της έλικας TM12. Πρόκειται για τις χιμαιρικές κατασκευές qN₁₁C_{1u} και uN₁₁C_{1q} (βλ. Εικόνες 3.16 και 3.18 και Πίνακα 3.5). Μετά την επιβεβαίωση της κωδικής αλληλουχίας (MWG-Biotech. A.G, Ebersberg, Germany), οι δύο χίμαιρες εισήχθησαν με τη μορφή ανασυνδυασμένων pT7-5 πλασμιδίων σε κύτταρα *E. coli* T184. Τα προκύπτοντα στελέχη αρχικά ελέγχθηκαν για τα επίπεδα της IPTG-επαγόμενης έκφρασής τους στη μεμβράνη των κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του XanQ(wt). Διαπιστώθηκε ότι και οι δύο χίμαιρες παρουσιάζουν μηδενικά επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3.36) και, κατά συνέπεια, μηδενική ενεργότητα στα κύτταρα T184. Στα πλαίσια της διατριβής αυτής, οι ανωτέρω χίμαιρες δεν αξιοποιήθηκαν περαιτέρω για μελέτες προσδιορισμού των καθοριστών της έκφρασης, της ενεργότητας ή της εξειδίκευσης ως προς την αναγνώριση διαφορετικών υποστρωμάτων.



Εικόνα 3.36 Επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών qN₁₁C_{1u} και uN₁₁C_{1q}. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα αντίστοιχα pT7-5/*xanQ-ygfU*-BAD ή pT7-5/*ygfU-xanQ*-BAD που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των χιμαιρικών περμεασών. Τα δείγματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (**avidin-HRP**) σε αραιώση 1:50000. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (**ECL**). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βάρων (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συνεισφορά της διατριβής στη χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου στους μεταφορείς NAT/NCS2

Η οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT) ή συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-κατιόντων 2 (NCS2) είναι τυπικό παράδειγμα μιας εξελικτικά ευρείας οικογένειας πρωτεϊνών (πάνω από 2000 δυνητικά μέλη με βάση τις αναλύσεις γονιδιωμάτων σε όλες τις ομάδες οργανισμών) που διατηρεί υψηλό βαθμό συντήρησης στην αλληλουχία και στη δομή του ενεργού κέντρου αλλά περιλαμβάνει μεταφορείς με σημαντικές διαφορές στην εξειδίκευση και στη δομή των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται. Μέχρι σήμερα, ελάχιστα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 έχουν χαρακτηριστεί αναλυτικά και μόνο δύο έχουν υποβληθεί σε συστηματικές μελέτες μεταλλαξιγένεσης (UapA, XanQ), ενώ μόλις πριν ένα μήνα παρουσιάστηκε η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός ομολόγου της οικογένειας, του UraA (Lu *et al.*, 2011). Το ενδιαφέρον από τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας αυτής της οικογένειας είναι διπλό: αφενός, να κατανοηθούν οι μηχανισμοί που διέπουν τη λειτουργία του ενεργού κέντρου και την εξέλιξη των διαφορετικών εξειδικεύσεων και, αφετέρου, να αναπτυχθούν δυνατότητες εφαρμογής για τον σχεδιασμό ειδικών αντιμικροβιακών φαρμάκων (αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων).

Αν και πολλά δομικά ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων χρησιμοποιούνται ήδη ως αντικαρκινικά και αντιϊικά, κυρίως, φάρμακα, εμφανίζουν σημαντικά προβλήματα στην εφαρμογή τους, που σχετίζονται με παρενέργειες λόγω κυτταροτοξικής δράσης σε υγιή κύτταρα και αδυναμία πρόσληψης ή δευτερογενή επαγωγή ανθεκτικότητας από τα κύτταρα-στόχους. Όπως έχει επισημανθεί, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αναγνώρισης και πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανακάλυψη νέων, πιο αποτελεσματικών πρωτοκόλλων θεραπείας (Freeman *et al.*, 1993; Mesnil and Yamasaki 2000; Nicholas *et al.*, 2003). Ιδιαίτερα, τα ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων δεν έχουν αξιοποιηθεί παρά ελάχιστα ως δυνητικά αντιμικροβιακά φάρμακα. Τέτοια φάρμακα θα μπορούσε να λειτουργούν ως ειδικοί αναστολείς των αντίστοιχων μεταφορέων των κυττάρων-στόχων ή ως τοξικά υποστρώματα που να προσλαμβάνονται μόνο από τα κύτταρα-στόχους (Landfear, 2009). Προς αυτήν την κατεύθυνση εφαρμογής, ένα μεγάλο πλεονέκτημα που προσφέρει η οικογένεια NAT/NCS2 είναι ότι υπάρχει μια καθαρή διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ των ομολόγων των μικροοργανισμών που έχουν εξετασθεί

(βακτηρίων και μυκήτων) και των ομολόγων που λειτουργούν στον άνθρωπο. Μάλιστα, τα ορθόλογα των μεταφορέων πουρινών και πυριμιδινών της οικογένειας φαίνεται να έχουν απενεργοποιηθεί στον άνθρωπο και τα άλλα πρωτεύοντα και υπάρχουν μόνο ως ψευδογονίδια (Yamamoto *et al.*, 2010). Οι στρατηγικές που θα επιτρέψουν την κατανόηση τέτοιων διαφορών στο μοριακό επίπεδο γίνονται ολοένα πιο αναγκαίες καθώς διαρκώς οι βάσεις δεδομένων εμπλουτίζονται με νέους πιθανούς μεταφορείς, μεγάλο μέρος των οποίων ανήκουν σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

Η στρατηγική που εφαρμόζεται στην παρούσα διατριβή για τη μελέτη των βασικών καθοριστών του ενεργού κέντρου και των διαφορών εξειδίκευσης των μεταφορέων NAT στηρίζεται στην αναλυτική μεταλλαξιγένεση ενός βακτηριακού ομολόγου, του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*. Ήδη, από τις συστηματικές μελέτες μεταλλαξιγένεσης του XanQ που καλύπτουν μέχρι σήμερα πάνω από το 50% των καταλοίπων του μορίου (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009; Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010; Karena, Botou, *et al.*, υπό προετοιμασία) έχει προκύψει ένα σύνολο σημαντικών θέσεων (κατάλοιπα αναντικατάστατα για τη λειτουργία του μεταφορέα, θέσεις στις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία καταλοίπου με συγκεκριμένο χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας, ή θέσεις που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση με αλκυλίωση) πολλές από τις οποίες έχουν αντίστοιχα σημαντικό ρόλο και στον ομόλογο μεταφορέα UraA (Amillis *et al.*, 2011). Σ' αυτές τις σημαντικές θέσεις υπάρχει μεγάλη συντήρηση της πλευρικής ομάδας των καταλοίπων, πολύ μεγαλύτερη από τη συντήρηση της αλληλουχίας σε άλλες θέσεις μεταξύ των διαφορετικών ομολόγων της οικογένειας NAT/NCS2. Η παρούσα διατριβή εξετάζει διεξοδικότερα ορισμένες από αυτές τις θέσεις που φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος ώστε να συνδράμει στην γενικότερη κατανόηση του μηχανισμού αλλά και της μοριακής εξέλιξης του ενεργού κέντρου των μεταφορέων NAT.

Από τα αποτελέσματα της διατριβής, τα οποία αξιολογούνται και με το πρόσφατο δομικό μοντέλο που βασίζεται στη δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011), αποκαλύπτονται (α) κατάλοιπα της έλικας 10 (μοτίβο-υπογραφή) που συμμετέχουν άμεσα (Asn-325, Gln-324, Ala-323) ή ρυθμίζουν την εξειδίκευση του κέντρου δέσμευσης (Gly-333, Ser-336), (β) σημαντικοί καθοριστές της δομικής ακεραιότητας και της εξειδίκευσης του ενεργού κέντρου στην έλικα 14 (C-τελικό διαμεμβρανικό τμήμα).

4.2 Η σχέση του μοτίβου-υπογραφή με το κέντρο δέσμευσης στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ

Προηγούμενες μελέτες τόσο στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ όσο και στον ομόλογο μυκητιακό UapA, ανέδειξαν την περιοχή του μοτίβου-υπογραφή, ενός συντηρημένου μοτίβου αλληλουχίας των μεταφορέων NAT (Diallinas *et al.*, 1998), ως μια περιοχή με κρίσιμα κατάλοιπα, τόσο για την λειτουργία όσο και για την εξειδίκευση των μεταφορέων. Μέχρι σήμερα οι ενδείξεις για την εμπλοκή των κρίσιμων καταλοίπων στη δέσμευση του υποστρώματος ήταν έμμεσες καθώς δεν είχαν πραγματοποιηθεί μελέτες με την επίδραση του υποστρώματος στα κατάλοιπα αυτής της περιοχής αλληλουχίας. Συγκεκριμένα, από την μεταλλαξιγένεση των συντηρημένων καταλοίπων του μοτίβου στον μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA (Koukaki *et al.*, 2005) είχε προταθεί ότι η Gln-408 (αντίστοιχη της Gln-324 στον XanQ) μπορεί να αλληλεπιδρά απευθείας με το υπόστρωμα βάσει του προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος Q408E, ενώ η Asn-409 (αντίστοιχη της Asn-325) είναι αναντικατάστατη για τη λειτουργία. Επίσης, η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του XanQ (Karatzá *et al.*, 2006) είχε υποδείξει ότι η Gln-324 είναι απαραίτητη για τη δέσμευση υποστρώματος και οποιουδήποτε αναλόγου του με υψηλή συγγένεια βάσει κυρίως της κινητικής ανάλυσης των μεταλλαγμάτων Q324N και Q324E, ενώ η Asn-325 είναι και εδώ αναντικατάστατη για τη λειτουργία. Συγχρόνως, τα δύο τελευταία κατάλοιπα του μοτίβου, Thr-416/Thr-332 και Arg-417/Gly-333 φάνηκαν και στις δύο προηγούμενες μελέτες ότι μπορεί να συνεισφέρουν στον καθορισμό της εξειδίκευσης.

Στην παρούσα διατριβή έγινε μια συστηματική μελέτη της αλκυλίωσης όλων των θέσεων του μοτίβου-υπογραφή και παρακείμενων περιοχών του μεταφορέα XanQ, χρησιμοποιώντας ως βάση τα μεταλλάγματα μονών κυστεϊνών που υπήρχαν ήδη (Καρατζά, Π., Διδακτορική Διατριβή, 2006), και μελετήθηκε η επίδραση του υποστρώματος (ξανθίνη) στην σημειακή αλκυλίωση των παραπάνω θέσεων με τον αλκυλιωτικό παράγοντα NEM, η οποία πλέον υποστηρίζει μια άμεση αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα και με το κέντρο δέσμευσης για δύο τουλάχιστον από τις θέσεις του μοτίβου-υπογραφή. Συγκεκριμένα, η Asn-325, ένα κατάλοιπο απόλυτα συντηρημένο ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2, βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι παρουσία του υποστρώματος (ξανθίνη) η θέση αυτή

προστατεύεται πλήρως από αλκυλίωση από τον αλκυλιωτικό παράγοντα NEM. Η άποψη αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι η γειτονική Ala-323 αντιδρά στη δέσμευση υποστρώματος με μια διαμορφωτική αλλαγή που ανιχνεύεται σαν αυξημένη ευαισθησία του μεταλλάγματος A323C σε απενεργοποίηση από το NEM. Το παρεμβαλλόμενο κατάλοιπο Gln-324, το οποίο είναι απόλυτα συντηρημένο ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 που μεταφέρουν πουρίνες, φαίνεται ότι είναι απαραίτητο για τη δέσμευση του υποστρώματος και μπορεί να συμμετέχει στο κέντρο δέσμευσης άμεσα. Επιπρόσθετα, η παρακείμενη περιοχή του μοτίβου (κατάλοιπα 326-329) καθώς και τα κατάλοιπα 332, 333 και 336 λαμβάνουν μέρος στο σχηματισμό του μονοπατιού διόδου της πουρίνης, αφού η αλκυλίωση των κυστεϊνών που εισήχθησαν στις παραπάνω θέσεις δεν εμποδίζει αυτή καθαυτή τη δέσμευση του υποστρώματος αλλά οδηγεί σε απενεργοποίηση, πιθανόν λόγω παρεμπόδισης της απελευθέρωσης του υποστρώματος από το κέντρο δέσμευσης (binding pocket).

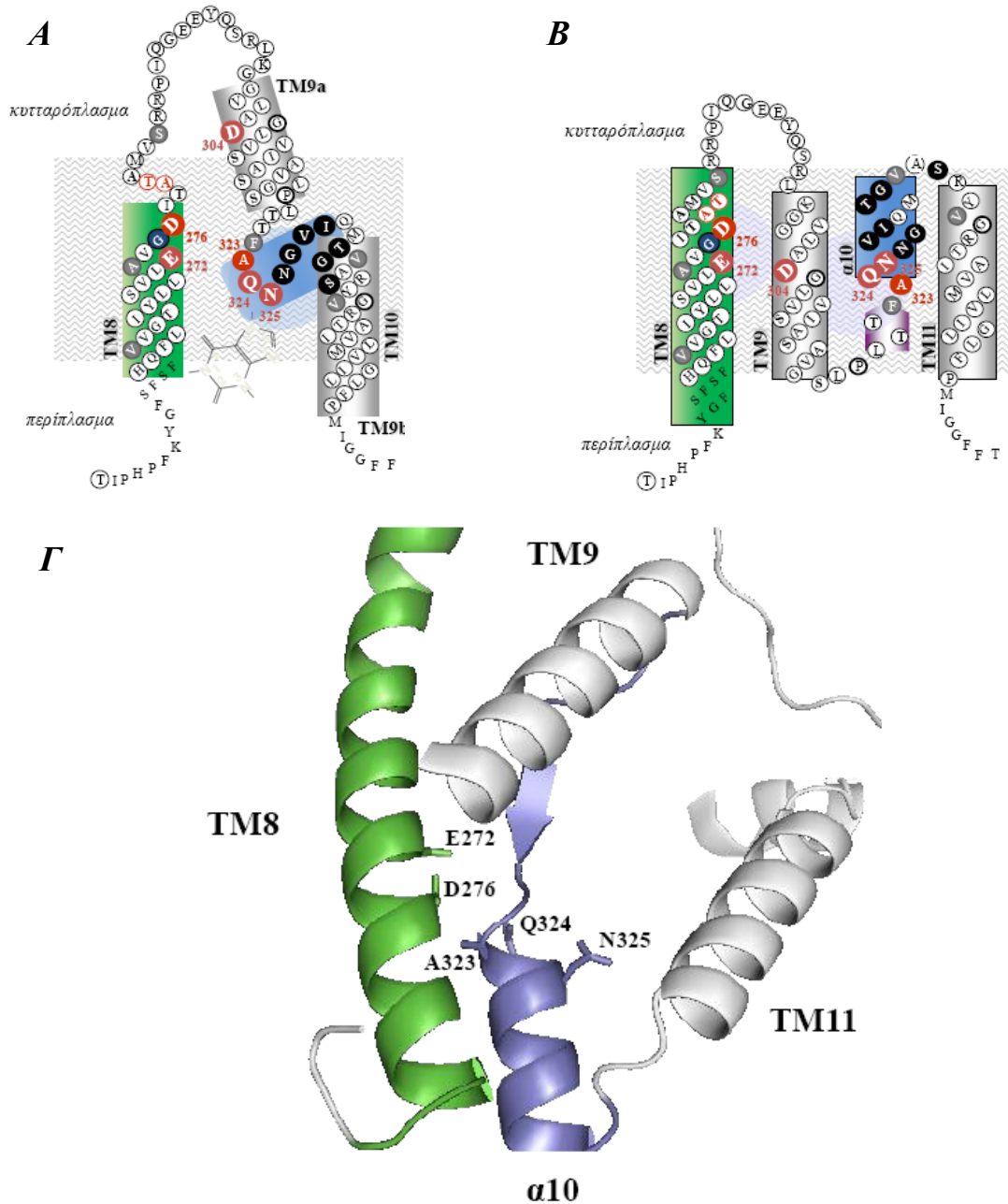
Το σύνολο των αποτελεσμάτων αυτών ενισχύεται από παράλληλες αλλά ανεξάρτητες μελέτες του εργαστηρίου μας (Μερμελέκας, Γ., Διδακτορική διατριβή, 2009) που έδειξαν ότι όλη η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή του XanQ είναι προσβάσιμη από το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻ (δηλαδή «επικοινωνεί» με το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον) και ότι η δέσμευση της ξανθίνης έχει όμοια προστατευτική επίδραση και στην αλκυλίωση της θέσης Asn-325 από το MTSES⁻. Συνδυαστικά, οι δύο σειρές δεδομένων υποστηρίζουν καθαρά ότι η προστατευτική επίδραση του υποστρώματος (ξανθίνης) πάνω στη θέση Asn-325 οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση (Georgoroulou *et al.*, 2010). Η μοντελοποίηση της πιθανής δομής του ενεργού κέντρου του XanQ βάσει της κρυσταλλικής δομής του ομολόγου UraA που ανακοινώθηκε πρόσφατα (Lu *et al.*, 2011) μας δείχνει ότι, αν και η τοπολογία στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή είναι αρκετά διαφορετική από ό,τι προβλεπόταν αρχικά (Εικόνα 4.1), τα τρία σημαντικά κατάλοιπα του μοτίβου (Gln-324, Ala-323, Asn-325) βρίσκονται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης.

Αναθεώρηση της τοπολογίας του μοτίβου-υπογραφή βάσει του μοντέλου της δομής του UraA

Παρόλα τα βιοχημικά και λειτουργικά δεδομένα που και η συγκεκριμένη διατριβή αλλά και προηγούμενες μελέτες έχουν προσφέρει, η προβλεπόμενη τοπολογία της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή και των περιοχών εκατέρωθεν αυτού έως πολύ πρόσφατα δεν ήταν σαφής (**Εικόνα 4.1**). Πριν την εμφάνιση της λυθείσας δομής του ομόλογου της οικογένειας NAT, UraA (Lu *et al.*, 2011), οι αλγόριθμοι πρόβλεψης έδιναν σαν γενικό τοπολογικό μοντέλο για όλους τους μεταφορείς NAT, 12 διαμεμβρανικά τμήματα με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο να εντοπίζονται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος (Granseth *et al.*, 2005). Ειδικότερα για τον XanQ, συνδυασμός βιοχημικών-λειτουργικών δεδομένων και ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του, προβλέπει ένα μοντέλο με 12 TMs, με την περιοχή του μοτίβου-υπογραφή να εντοπίζεται πιθανώς ως μια επανεισερχόμενη θηλειά (reentrant loop) που «βλέπει» προς την υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα του μορίου και έχει πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος (ξανθίνη) (**Εικόνα 4.1A**) (Μερμελέκας, Γ., Διδακτορική διατριβή, 2009). Φως στην τοπολογία του μεταφορέα XanQ καθώς και όλων των μεταφορέων της οικογένειας NAT έρχεται να «ρίξει» η εντελώς πρόσφατα λυμένη κρυσταλλική δομή του μεταφορέα UraA (Lu *et al.*, 2011).

Στη δομή του UraA, το μοτίβο-υπογραφή αποτελεί κεντρικό τμήμα της δομικής περιοχής «πυρήνα» (core domain) που συμμετέχει στην ειδική δέσμευση του υποστρώματος (ουρακίλης) και δεν εμφανίζεται σαν περιοχή ελεύθερης διαμόρφωσης αλλά αποτελεί μια μικρή α-έλικα στο διαμεμβρανικό τμήμα 10 (**Εικόνα 4.1B**). Επίσης, όλη η ευρύτερη περιοχή εκατέρωθεν του μοτίβου που είχε αρχικά θεωρηθεί ότι περιέχει δύο μόνο διαμεμβρανικά τμήματα TM8 και TM9a-b (Mermelekas *et al.*, 2010) φαίνεται ότι αποτελείται από τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα (TM8, TM9, TM10, TM11) τα οποία συνιστούν το δεύτερο μοτίβο επανάληψης στη δομική περιοχή «πυρήνα» (**Εικόνα 4.1Γ**).

Το πιο σημαντικό εύρημα του πρώτου μέρους της διατριβής, ότι δηλαδή η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή έχει άμεση σχέση με το κέντρο δέσμευσης φαίνεται να επαληθεύεται και από τη δομή του UraA. Συγκεκριμένα, από τη μοντελοποίηση της πιθανής δομής του XanQ (homology modeling) προκύπτει ότι τα κατάλοιπα Ala-323, Gln-324 και Asn-325 (TM10) βρίσκονται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης μαζί με τα επίσης σημαντικά Glu-272 και Asp-276 (TM8) (**Εικόνα 4.1**).



Εικόνα 4.1. Τοπολογία της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή στον XanQ. **A.** Αρχικό μοντέλο για την τοπολογία της περιοχής των TM8, TM9a-b και του μοτίβου-υπογραφή με βάση αλγορίθμους πρόβλεψης (TMHMM) και βιοχημικά-λειτουργικά δεδομένα για την προσβασιμότητα από υδρόφιλα αντιδραστήρια (Mermelekas *et al.*, 2010). **B.** Αναθεωρημένο μοντέλο για την τοπολογία της ίδιας περιοχής με βάση τη δομή του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011) που δείχνει τέσσερα TMs και το μοτίβο-υπογραφή να αντιστοιχεί σε μια μικρή α-έλικα του TM10. **Γ.** Δομικό μοντέλο της περιοχής των TM8-11 του XanQ που στηρίζεται σε μοντελοποίηση βάσει της κρυσταλλικής δομής του UraA (PDB 3QE7). Τα σημαντικά κατάλοιπα της αντίστοιχης αλληλουχίας του XanQ σημειώνονται με κόκκινο (αναντικατάστατα και/ή σημαντικά ως προς τη δέσμευση υποστρώματος) ή μαύρο υπόβαθρο (ευαίσθητα σε αλκυλίωση από το NEM). Οι έλικες TM8 και α10 (μοτίβο-υπογραφή) σημειώνονται με πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα.

Τόσο η Gln-324 όσο και η Asn-325 αποτελούν μέρος του κέντρου δέσμευσης της ξανθίνης στον XanQ

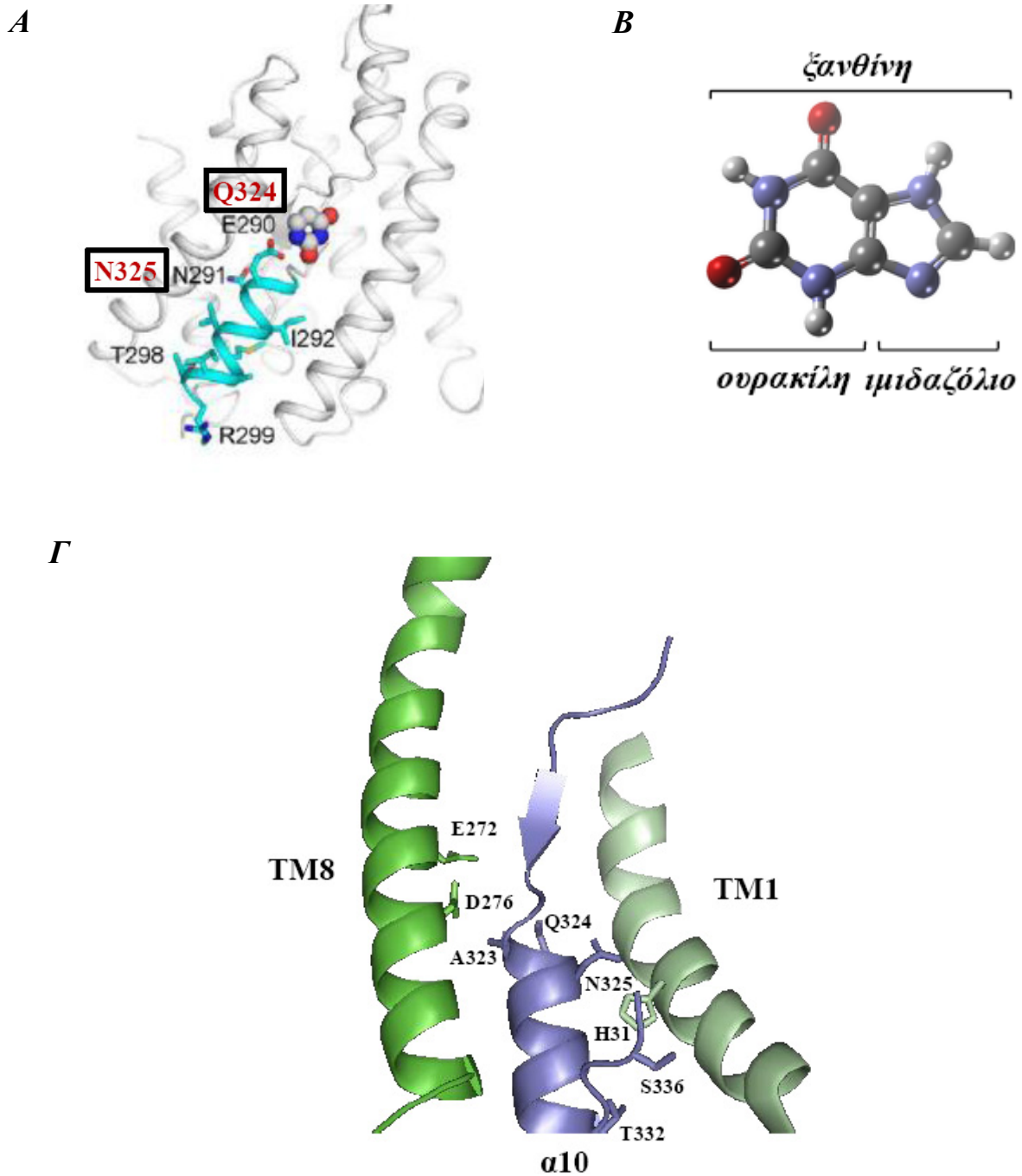
Τα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325 είναι χαρακτηριστικά για το μοτίβο-υπογραφή NAT και εμφανίζουν πολύ υψηλή συντήρηση ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας NAT. Η Asn-325 είναι απόλυτα συντηρημένη ενώ η Gln-324 συναντάται μόνο ως γλουταμίνη (στους μεταφορείς πουρινών), γλουταμικό (στους μεταφορείς ουρακίλης) ή προλίνη (στους μεταφορείς ασκορβικού SVCT1 και 2). Τα δεδομένα από τη βιοχημική μελέτη του XanQ δείχνουν ότι τα δύο αυτά κατάλοιπα θα πρέπει να ανήκουν στον κέντρο δέσμευσης για τους εξής λόγους: (α) Αντικατάσταση της Asn-325 οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση διατηρώντας όμως την ικανότητα δέσμευσης της ξανθίνης η οποία εμποδίζει πλήρως την πρόσβαση ειδικών αντιδραστηρίων στη θέση αυτή. (β) Αντικατάσταση της Gln-324 οδηγεί σε αδυναμία δέσμευσης του υποστρώματος (ξανθίνη) ή αναλόγων του με υψηλή συγγένεια και «αναισθησία» σε αλλαγές αλκυλίωσης παρουσία του υποστρώματος.

Η καθαρή εικόνα για τον φαινότυπο των μεταλλαγμάτων της θέσης Gln-324 που προκύπτει κυρίως από τα αρχικά πειράματα μεταλλαξιγένεσης (Karatza *et al.*, 2006) αποδεικνύει ότι το κατάλοιπο αυτό είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη πρόσδεση του υποστρώματος και πιθανόν αλληλεπιδρά άμεσα με τη ξανθίνη στο κέντρο δέσμευσης. Άμεση αλληλεπίδραση έχει επίσης προταθεί για το αντίστοιχο κατάλοιπο Gln-408 στον ομόλογο μυκητιακό μεταφορέα UapA, βάσει των ιδιοτήτων του μεταλλάγματος Q408E που προτείνεται ότι δεσμεύεται απευθείας με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της πουρίνης στη θέση N9 (Koukaki *et al.*, 2005). Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία και με το δομικό μοντέλο που προκύπτει από την κρυσταλλογραφία του ομολόγου UraA (**Εικόνα 4.2**). Στη δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011), το Glu-290 (αντίστοιχο της Gln-324 στον XanQ και της Gln-408 στον UapA) αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα (ουρακίλη) με δύο δεσμούς υδρογόνου. Ωστόσο, η γειτονική Asn-291 (αντίστοιχη της Asn-325 στον XanQ και της Asn-409 στον UapA) στρέφεται από την άλλη πλευρά και σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου με την His-24 του TM1 (αντίστοιχη των His-31 στον XanQ και His-86 στον UapA). Η τελευταία αυτή παρατήρηση δημιουργεί ερωτήματα για τον ακριβή ρόλο του καταλοίπου Asn-325 στο κέντρο δέσμευσης.

Το βασικό εύρημα που υποστηρίζει άμεση εμπλοκή του καταλοίπου Asn-325 με το κέντρο δέσμευσης στον XanQ είναι ότι το υπόστρωμα (ξανθίνη) προστατεύει

τη θέση Asn-325 από αλκυλίωση καθώς η παρουσία της ξανθίνης εμποδίζει την αντίδραση της N325C είτε με το NEM (παρούσα διατριβή) είτε με το MTSES (Μερμελέκας, Γ., Διδακτορική διατριβή, 2009). Το κατάλοιπο αυτό αποτελεί ένα από τα τέσσερα (Asn-325, Gln-324, Glu-272, Asp-304) που είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία του XanQ. Η προστασία που του παρέχει το υπόστρωμα μπορεί είτε να υποδηλώνει ότι το κατάλοιπο Asn-325 μετατοπίζεται σε ένα λιγότερο προσβάσιμο περιβάλλον εξαιτίας διαμορφωτικών αλλαγών που προκαλούνται κατά τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε ότι η Asn-325 βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος και κατά τη δέσμευσή του εμποδίζεται η αλκυλίωση της θέσης λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στον μεταφορέα UraA το αντίστοιχο κατάλοιπο είναι η Asn-291 (**Εικόνα 4.2A**), η οποία στη δομή δε «βλέπει» το υπόστρωμα (ουρακίλη) αλλά στρέφεται από την άλλη πλευρά του κέντρου δέσμευσης. Το γεγονός αυτό δεν υποδηλώνει αναγκαστικά ότι η Asn-325 του XanQ δεν αλληλεπιδρά με τη ξανθίνη, γιατί πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν η διαφορά μεγέθους που έχουν τα δύο υποστρώματα (ουρακίλη/ξανθίνη): η ξανθίνη αποτελείται ουσιαστικά από έναν δακτύλιο ουρακίλης συντηγημένο με έναν δακτύλιο ιμιδαζολίου (**Εικόνα 4.2B**) και άρα «απαιτεί» περισσότερο χώρο για τη δέσμευσή της στην υδρόφιλη θέση του κέντρου δέσμευσης. Το ενδεχόμενο μιας άμεσης αλληλεπίδρασης της Asn-325 με τη ξανθίνη κατά τη διευθέτησή της στο κέντρο δέσμευσης θα μπορούσε να φανεί από πειράματα προσομοίωσης των αλληλεπιδράσεων του ενεργού κέντρου του XanQ με το υπόστρωμα μέσω μοριακής δυναμικής (molecular dynamics). Τέτοια πειράματα είναι σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας και σε συνεργασία με τα εργαστήρια του Γ. Διαλλινά και του Ε. Μικρού.

Παρά το ότι απενεργοποιεί τον μεταφορέα, η αντικατάσταση της Asn-325 στον XanQ δεν μειώνει την υψηλή συγγένεια δέσμευσης, όπως αποδεικνύεται από το εύρημα ότι τα μεταλλάγματα N325C και N325C(wt) αντιδρούν με το υπόστρωμα, καθώς επηρεάζονται από αυτό στις δοκιμασίες αλκυλίωσης. Μια εξήγηση θα ήταν ότι η δέσμευση υποστρώματος στα μεταλλάγματα του Asn-325 (τα οποία είναι ανενεργά) δεν επιφέρει τις απαιτούμενες αλλαγές στη διαμόρφωση του μεταφορέα ώστε να οδηγήσουν στην απελευθέρωση του υποστρώματος στο κυτταρόπλασμα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε τοπικές διαμορφωτικές αποκλίσεις σε σχέση με τον XanQ(wt) που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας του μεταφορέα. Ένας ανάλογος ρόλος μπορεί να ισχύει για το αντίστοιχο κατάλοιπο Asn-409 στον UarA, που είναι επίσης αναντικατάστατο για τη λειτουργία (Koukaki *et al.*, 2005).



Εικόνα 4.2. Οι έλικες που γειτνιάζουν με το μοτίβο-υπογραφή στη δομή του XanQ. **A.** Η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (γαλάζιο χρώμα) όπως εντοπίζεται στη δομή του UraA (έλικα $\alpha 10$). Με κόκκινο χρώμα και σε μαύρο πλαίσιο σημειώνονται τα κατάλοιπα του XanQ που αντιστοιχούν στα Glu-290 και Asn-291. **B.** Η δομή της ξανθίνης και η σχέση της με την ουρακίλη. **Γ.** Δομικό μοντέλο του μοτίβου-υπογραφή (έλικα $\alpha 10$) και των δύο γειτονικών α -ελίκων (TM8 και TM1) του XanQ που στηρίζεται σε μοντελοποίηση βάσει της κρυσταλλικής δομής του UraA (PDB 3QE7). Οι έλικες TM1, TM8 και $\alpha 10$ (μοτίβο-υπογραφή) σημειώνονται με λαδί, πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα.

Η δέσμευση της ξανθίνης επάγει μια κρίσιμη αλλαγή διαμόρφωσης στη θέση Ala-323

Ο ρόλος της Ala-323 αναδεικνύεται για πρώτη φορά στους μεταφορείς NAT με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής. Πρόκειται για ένα κατάλοιπο του XanQ που βρίσκεται δίπλα στα Gln-324 και Asn-325 τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στο κέντρο δέσμευσης της ξανθίνης. Το κατάλοιπο Ala-323 δεν είναι αναντικατάστατο, αλλά η θέση αυτή (A323C) αντιδρά έντονα με τα ειδικά αλκυλιωτικά αντιδραστήρια (NEM, MTSES) και η δέσμευση του υποστρώματος (ξανθίνης) οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία απενεργοποίησης από το NEM. Η σημαντική αυτή διαφορά υποδηλώνει ότι η αλλαγή διαμόρφωσης που προκαλεί η δέσμευση της ξανθίνης εκθέτει τη θέση Ala-323 σε ένα περιβάλλον που επηρεάζεται πιο έντονα από τη δράση του NEM, αν και η αντιδραστικότητα της A323C αυτή καθαυτή δεν υφίσταται δραματική αλλαγή (βλ. Αποτελέσματα, κεφάλαιο 3.1.1). Τέτοιου είδους επίδραση του υποστρώματος είναι ενδεικτική μιας θέσης που βρίσκεται κοντά στο κέντρο δέσμευσης και χωρίς να παρεμποδίζεται άμεσα από αυτό, μετατοπίζεται σε ένα περιβάλλον που επιτρέπει πιο εύκολη «απόφραξη» του μονοπατιού διόδου του υποστρώματος από το μηλεϊμήδιο. Αντίστοιχα φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί και σε κατάλοιπα άλλων μεταφορέων που βρίσκονται κοντά στο κέντρο δέσμευσής τους, με τυπικό παράδειγμα την περμεάση λακτόζης, LacY (Kaback *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2009; Frillingos and Kaback, 1997).

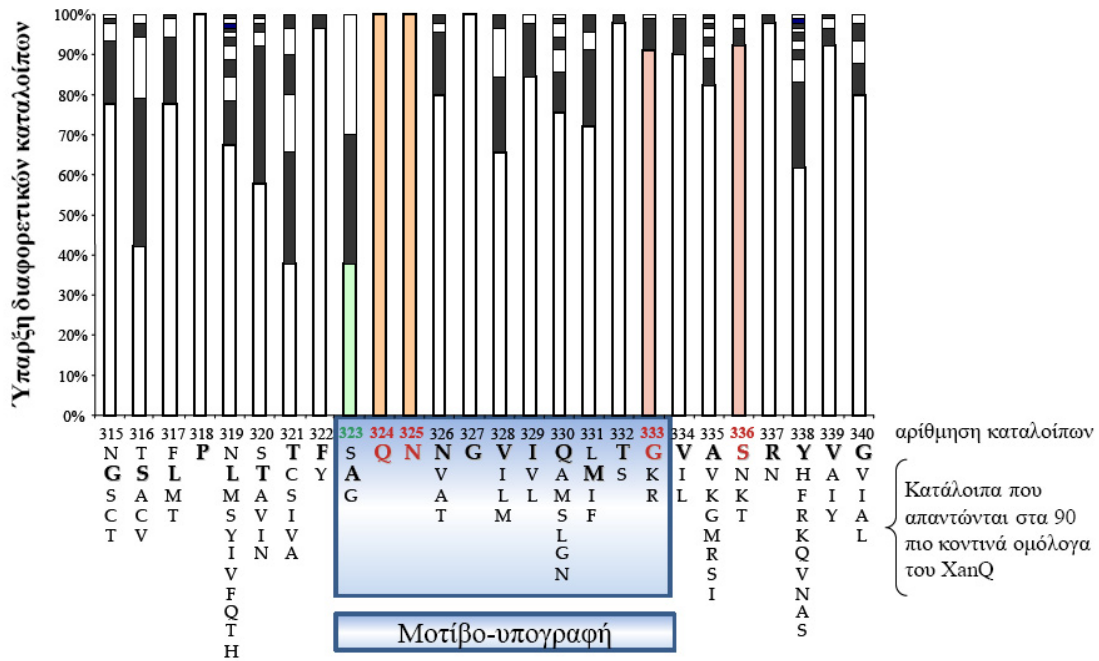
Στην πραγματικότητα, η Ala-323 μπορεί να συμμετέχει και η ίδια στη δέσμευση του υποστρώματος μέσω του αζώτου της κύριας αλυσίδας της όπως υποδηλώνει η μοντελοποίηση βάσει της δομής του UraA (**Εικόνα 4.2Γ**). Στη δομή του ομόλογου μεταφορέα UraA, η αντίστοιχη θέση (Gly-289) βρίσκεται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα (ουρακίλη) και το άζωτο του αμιδίου της Gly-289 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο μιας κετοομάδας της ουρακίλης, συνεισφέροντας στη δέσμευσή της (Lu *et al.*, 2011).

Το σύνολο των αποτελεσμάτων μας για τη θέση Ala-323, σε συνδυασμό με το ότι παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης και απαντάται πάντοτε ως αμινοξύ μικρού μεγέθους (αλανίνη, γλυκίνη ή σερίνη) στα μέλη της οικογένειας (**Εικόνα 4.3**), μας οδήγησαν να συμπεριλάβουμε και αυτή τη θέση αλληλουχίας στο μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NAT (Georgoroulou *et al.*, 2010), μια πρόταση που υιοθετήθηκε ευρύτερα στη συνέχεια (Lu *et al.*, 2011).

Όλη η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή είναι προσβάσιμη από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον

Εκτός όμως από τα παραπάνω, όλα τα μεταλλάγματα στις θέσεις αλληλουχίας του μοτίβου-υπογραφή NAT του μεταφορέα XanQ είναι προσβάσιμα από το εξωκυτταρικό υδρόφιλο περιβάλλον (Μερμελέκας, Γ., Διδακτορική διατριβή, 2009), κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο για μια περιοχή που αποτελεί μέρος ή συνέχεια του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος εντός της κεντρικής υδρόφιλης κοιλότητας και θα πρέπει να εμφανίζει εναλλασσόμενη πρόσβαση από τις δύο πλευρές της μεμβράνης (Kaback *et al.*, 2007; Frillingos and Kaback, 1997; Tamura *et al.*, 2001). Με την εξαίρεση των N325C και A323C που φαίνεται να αλληλεπιδρούν πιο άμεσα με το κέντρο δέσμευσης, η προσβασιμότητα ή η αντιδραστικότητα των άλλων καταλοίπων του μοτίβου είτε με το MTSES⁻ είτε με το NEM δεν επηρεάζεται από την παρουσία του υποστρώματος, υποδηλώνοντας ότι τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται κοντά στο κέντρο δέσμευσης και όχι σε απόσταση από την κεντρική υδρόφιλη κοιλότητα. Στην αντίθετη περίπτωση, θα περιμέναμε πιο δραματικές αλλαγές διότι κατάλοιπα που είναι προσβάσιμα από το υδρόφιλο περιβάλλον αλλά απομακρυσμένα από το κέντρο δέσμευσης υπόκεινται σε πιο έντονες αλλαγές διαμόρφωσης (Kaback *et al.*, 2007).

Παρατηρώντας το αναθεωρημένο μοντέλο του μεταφορέα XanQ (Εικόνα 4.2) φαίνεται ότι τα κατάλοιπα που απαρτίζουν την έλικα α10 (μοτίβο-υπογραφή) βρίσκονται στην «καρδιά» του κέντρου δέσμευσης και όπως είναι αναμενόμενο υφίστανται περιορισμούς ως προς τις διαμορφωτικές αλλαγές που μπορούν να δεχτούν. Άλλωστε και η δομή μιας α-έλικας είναι πιο συμπαγής απ' ό,τι η ελεύθερη δομή ενός συνδετικού τμήματος μεταξύ δύο ελίκων που προβλεπόταν αρχικά για το μοτίβο-υπογραφή (Εικόνα 4.1A). Όλα τα παραπάνω προσφέρουν μια εναλλακτική εξήγηση για τη δραματικά μειωμένη ευαισθησία στους αλκυλιωτικούς παράγοντες NEM και MTSES⁻ που εμφανίζει ο N325C παρουσία του υποστρώματος. Όπως έχει υποστηριχθεί και σε άλλες περιπτώσεις (Nie *et al.*, 2009; Tavoulari and Frillingos, 2008), η δέσμευση του υποστρώματος στον (ανενεργό) N325C μπορεί να επάγει μια διαμορφωτική αλλαγή που «παγιδεύει» τη θέση 325 σε ένα υδρόφοβο περιβάλλον μέσω του αποκλεισμού της υδρόφιλης κοιλότητας από την κυτταροπλασματική πλευρά. Ο αποκλεισμός αυτός περιορίζει και την προσβασιμότητα του N325C στα αντιδραστήρια MTSES⁻ και NEM.



Εικόνα 4.3. Η συντήρηση των σημαντικών καταλοίπων του μοτίβου-υπογραφή NAT. Ιστόγραμμα με τον αριθμό και τη σχετική συχνότητα των διαφορετικών καταλοίπων τα οποία απαντώνται σε κάθε θέση στα 90 ομόλογα που είναι συγγενέστερα με τον XanQ (>40% ταυτότητα αλληλουχίας). Με έντονη γραφή σημειώνονται τα κατάλοιπα που απαντώνται στον XanQ. Σε κάθε θέση αλληλουχίας καταγράφονται τα κατάλοιπα που απαντώνται στην ίδια θέση στα υπόλοιπα ομόλογα με σειρά μειούμενης συχνότητας. Οι σημαντικές θέσεις στον XanQ τονίζονται με πορτοκαλί (αναντικατάστατα και εμπλεκόμενα στη δέσμευση υποστρώματος, Gln-324, Asn-325), πράσινο (εμπλεκόμενο στο κέντρο δέσμευσης, Ala-323) και ροζ (εμπλεκόμενα με την εξειδίκευση, Gly-333 και Ser-336).

Το συνολικό προφίλ αντιδραστικότητας και ευαισθησίας των καταλοίπων της έλικας 10 (μοτίβο-υπογραφή) υποδηλώνει μια λειτουργικά «ευαίσθητη» περιοχή

Παρόλο που όλα τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή αντιδρούν ισχυρά τόσο με το NEM (παρούσα διατριβή) όσο και με το MTSES⁻ (Μερμελέκας, Γ., Διδακτορική διατριβή, 2009), η ευαισθησία τους σε απενεργοποίηση από τα δύο αντιδραστήρια διαφέρει αρκετά. Για την ακρίβεια το προφίλ ευαισθησίας είναι πολύ διακριτό από το προφίλ αντιδραστικότητας, είτε με το NEM είτε με το MTSES⁻. Για παράδειγμα, τα μεταλλάγματα Q330C και M331C είναι προσβάσιμα και αντιδρούν ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις NEM, αλλά παρουσιάζουν ενεργότητα που δεν επηρεάζεται καθόλου από την παρουσία του αντιδραστήριου. Αντιθέτως, τα μεταλλάγματα N326C και V328C αντιδρούν λιγότερο, αλλά είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το NEM (Αποτελέσματα, κεφάλαιο 3.1.1, Εικόνα 3.8).

Η μεγαλύτερη ευαισθησία ορισμένων μεταλλαγμάτων σε απενεργοποίηση δεν αντικατοπτρίζει απλά την προσβασιμότητα ή αντιδραστικότητα των θέσεων αυτών αλλά μια πιο ειδική λειτουργική συνέπεια. Ανεξαρτήτως του αλκυλιωτικού παράγοντα που χρησιμοποιείται (Georgoroulou *et al.*, 2010), οι θέσεις που παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε απενεργοποίηση φαίνεται να συγκροτούν έναν κεντρικό «πυρήνα» του μοτίβου-υπογραφή (κατάλοιπα 323-329 και 332-333) και εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 (Εικόνα 4.3), όπως αναμένεται συνήθως για κατάλοιπα μεμβρανικών πρωτεϊνών με ευαισθησία στο NEM (Frillingos *et al.*, 1998). Ενώ οι θέσεις 323 και 325 όπως είπαμε μπορεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με το κέντρο δέσμησης, η ομοιοπολική προσθήκη του ογκώδους μηλεϊμιδίου ή της 2-αιθυλο-σουλφονικής (MTS) ομάδας στις θέσεις 326-329 ή 332-333 μπορεί να εμποδίζει την ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς του υποστρώματος με αποτέλεσμα την «παγίδευσή» του στο κέντρο δέσμησης και την απώλεια της ενεργότητας. Από την άλλη πλευρά, δεν υπάρχουν ενδείξεις για κάποια άμεση στερεοχημική παρεμπόδιση των θέσεων του μοτίβου (εκτός της N325C) από τη δέσμηση υποστρώματος. Θα πρέπει να πούμε όμως ότι η αντιδραστικότητα κάποιων μεταλλαγμάτων, όπως των A323C και Q330C, είναι πολύ έντονη και δεν δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού «λεπτών» διαφορών ως προς την επίδραση του υποστρώματος, στις πειραματικές συνθήκες που εξετάσαμε.

Η Gly-333 και η Ser-336 αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία της εξειδίκευσης

Αντικαταστάσεις των καταλοίπων Gly-333 και Ser-336 που εντοπίζονται στην μικρή συνδετική περιοχή που ακολουθεί την έλικα 10 (Εικόνα 4.2Γ) είτε με Arg είτε με Asn, αντιστοίχως, οδηγούν σε μεταλλάγματα που διαφοροποιούν το προφίλ εξειδίκευσής τους σε σχέση με αυτό του XanQ φυσικού τύπου, υποδηλώνοντας ότι τα κατάλοιπα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της εξειδίκευσης του μεταφορέα. Συγκεκριμένα, τα μεταλλάγματα G333R και S336N αντιστρέφουν κατά ένα μέρος τα στοιχεία-«κλειδιά» που διαφοροποιούν ως προς την εξειδίκευση τους μεταφορείς ξανθίνης XanQ και XanP από τους μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης των ασκομυκήτων UapA (Koukaki *et al.*, 2005), Xut1 (Goudela *et al.*, 2005) και AfUapA (Goudela *et al.*, 2008). Ειδικότερα, το μετάλλαγμα G333R, και σε μικρότερο βαθμό το S336N, αναγνωρίζει την 8-μεθυλοξανθίνη, η οποία αναγνωρίζεται επίσης από τα μυκητιακά ομόλογα (K_i από 50 έως 100 μM), ενώ το μετάλλαγμα S336N εμφανίζει μειωμένη συγγένεια για την 6-θειοξανθίνη η οποία αναγνωρίζεται ισχυρά από τον φυσικού τύπου XanQ (K_i 40 μM), αλλά αποτελεί ένα χαμηλής συγγένειας υπόστρωμα για τα μυκητιακά ομόλογα (K_i από 250 έως 350 μM). Ωστόσο, οι αντικαταστάσεις αυτές έχουν και επιπρόσθετες συνέπειες στο προφίλ εξειδίκευσης που είναι πρωτόγνωρες, τόσο για τους βακτηριακούς όσο και για τους μυκητιακούς μεταφορείς φυσικού τύπου (wild type). Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η ικανότητα του μεταλλάγματος G333R να δεσμεύει 7-μεθυλοξανθίνη (K_i 107 μM) και η μειωμένη συγγένεια του S336N για τη δέσμευση 2-θειοξανθίνης (K_i 234 μM).

Σε κάθε περίπτωση, οι διαφοροποιήσεις που παρουσιάζουν αυτά τα μεταλλάγματα του XanQ ως προς την εξειδίκευση και το προφίλ αναγνώρισης των διαφορετικών αναλόγων δεν υποστηρίζουν μια άμεση συμμετοχή των Gly-333 και Ser-336 στο κέντρο δέσμευσης αλλά υποδεικνύουν ότι συνεισφέρουν στη βέλτιστη αναγνώριση του υποστρώματος αλληλεπιδρώντας έμμεσα. Αντικαταστάσεις του καταλοίπου Thr-332 έχουν δείξει ότι και η θέση αυτή (που εντοπίζεται στο τέλος της έλικας 10, Εικόνα 4.2Γ) επηρεάζει την εξειδίκευση πιθανότατα με παρόμοιο τρόπο, ιδιαίτερα με την περίπτωση του μεταλλάγματος T332N να συνεισφέρει στην αναγνώριση της 8-μεθυλοξανθίνης (K_i 196 μM) (Karatza *et al.*, 2006). Οι αντίστοιχες θέσεις των Thr-332 και Gly-333 (Thr-416 και Arg-417) έχει φανεί ότι συνεισφέρουν στον καθορισμό της εξειδίκευσης και στον ομόλογο μεταφορέα UapA (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005).

4.3 Άλλες θέσεις του μεταφορέα XanQ που συνεισφέρουν στο κέντρο δέσμευσης και η σχέση τους με το μοτίβο-υπογραφή

Η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή, η οποία δείξαμε ότι περιέχει σημαντικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στο κέντρο δέσμευσης του XanQ, μοντελοποιείται ως μια μικρή α -έλικα στο TM10 η οποία βρίσκεται κοντά στα TM1 και TM8, με βάση τη δομή του ομόλογου μεταφορέα UraA (Εικόνα 4.2). Εκτός από τα σημαντικά κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή, η συστηματική μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα ξανθίνης XanQ έχει αποκαλύψει και άλλες θέσεις όπου είτε τα ίδια τα κατάλοιπα (Glu-272, Asp-304) ή η λειτουργική τους ομάδα (Asp-276) είναι αναντικατάστατα είτε η λειτουργία αναστέλλεται εντελώς με την αλκυλίωση από το NEM (Leu-86, Gly-275, Asn-430) είτε οι αντικαταστάσεις που μπορούν να γίνουν είναι περιορισμένες (His-31, Asn-93, Phe-94, Ala-279, Thr-280, Ile-432). Τα περισσότερα από τα κατάλοιπα αυτά εντοπίζονται σε χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας των TM1 (His-31), TM3 (Leu-86, Asn-93, Phe-94) και TM8 (Glu-272, Gly-275, Asp-276, Ala-279, Thr-280), τα οποία φαίνεται να περιβάλλουν την περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (TM10) στο μοντέλο της ομόλογης δομής του UraA (Lu *et al.*, 2011) δημιουργώντας έναν κλωβό ή «καταφύγιο» για τη δέσμευση του υποστρώματος (Εικόνα 4.4). Μάλιστα, 4 από αυτά τα κατάλοιπα (Glu-272, Asp-276, Asn-93, Phe-94) αντιστοιχούν σε θέσεις που συμμετέχουν άμεσα στο κέντρο δέσμευσης στη δομή του UraA (Εικόνα 4.4A).

Τι γνωρίζουμε όμως εμείς για τη σημασία αυτών των καταλοίπων των TM1, TM3 και TM8 στο πρωτεϊνικό μόριο του XanQ;

Συστηματικές μελέτες μεταλλαξιγένεσης των πολικών καταλοίπων του XanQ είχαν δείξει ότι η πλευρική ομάδα του His-31 στο TM1 θα πρέπει να συμμετέχει σε έναν δεσμό υδρογόνου που είναι σημαντικός για την εξασφάλιση της υψηλής συγγένειας δέσμευσης για ξανθίνη (Karena and Frillingos, 2009). Ο ρόλος αυτός φαίνεται να είναι έμμεσος και μάλιστα το δομικό μοντέλο που έχουμε σήμερα (Εικόνα 4.4A) προτείνει ότι η His-31 (H31) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Asn-325 (N325) του μοτίβου-υπογραφή, η οποία μπορεί με τον τρόπο αυτό να σταθεροποιείται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης και να επιτρέπει τη σωστή

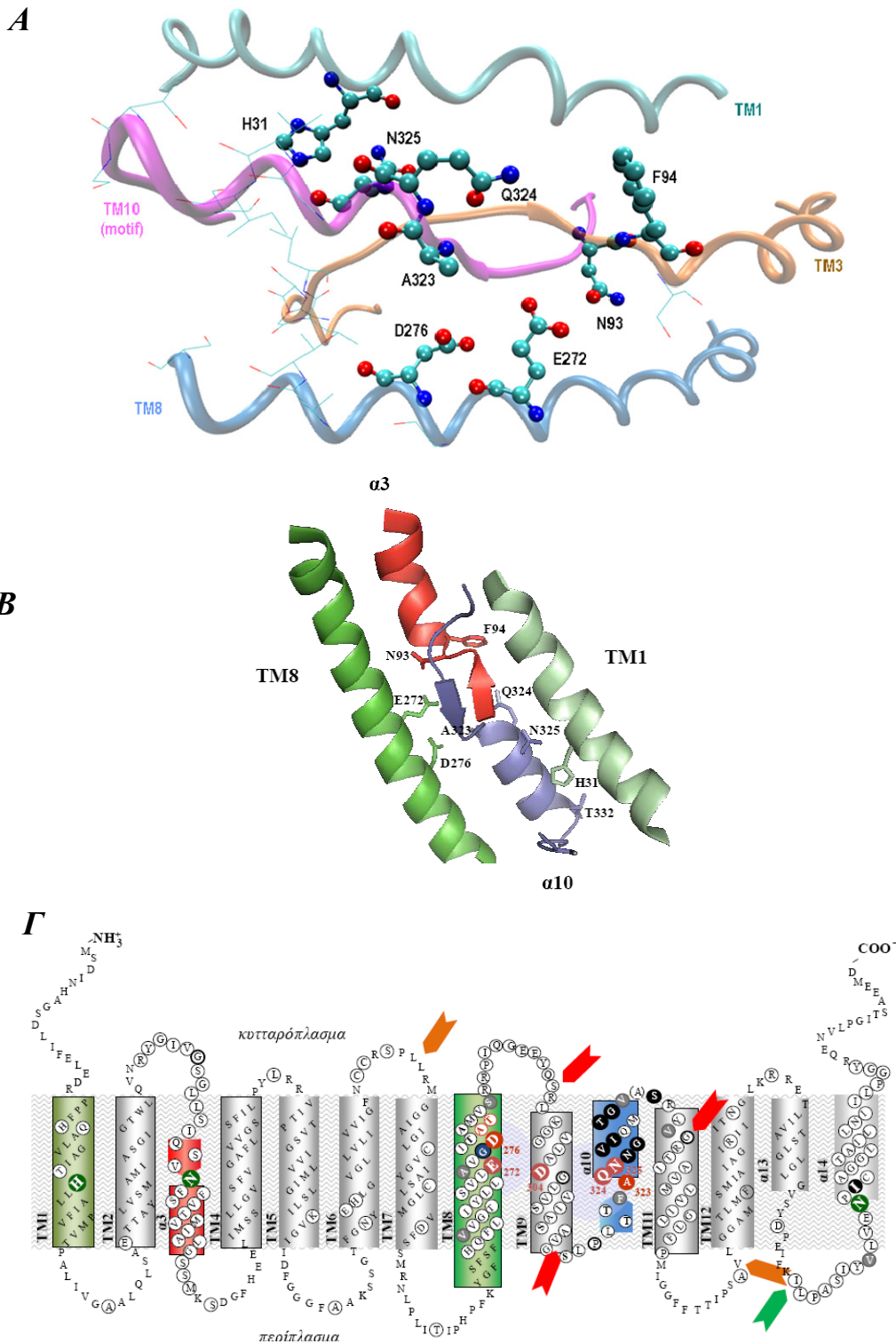
πρόσδεση της ξανθίνης (βλ. κεφάλαιο 4.2). Εξάλλου, και το ίδιο το TM1 έχει ενεργό ρόλο στη δέσμευση του υποστρώματος στον UraA μέσω του καταλοίπου Ala-31 (αντιστοιχεί στην Pro-38 στον XanQ) που σχηματίζει δεσμούς van der Waals με το μόριο της ουρακίλης, σταθεροποιώντας έτσι τη δέσμευσή του (Lu *et al.*, 2011). Δεν γνωρίζουμε τους πιθανούς ρόλους άλλων δυνητικά σημαντικών θέσεων του TM1 στον XanQ, καθώς δεν έχει γίνει συνολική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης στην περιοχή αυτή. Ωστόσο, ο σημαντικός ρόλος της His-31 (μιας ιστιδίνης που είναι απόλυτα συντηρημένη στους μεταφορείς NAT) έχει αναδειχθεί και σε άλλους ομόλογους μεταφορείς, όπως στον UapA (Pantazopoulou and Diallinas, 2006) και στους hSVT1 και hSVCT2 (Varma *et al.*, 2008). Στον μυκητιακό μεταφορέα UapA, πάντως, η αντίστοιχη ιστιδίνη (His-86) φαίνεται να είναι σημαντική όχι για τη συγγένεια του κέντρου δέσμευσης προς το υπόστρωμα αλλά για τη συνολική δομική σταθερότητα ή ορθή στόχευση του μορίου στη μεμβράνη, πιθανόν μέσω αλληλεπίδρασης με το TM3 (Amillis *et al.*, 2011) και την περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (Parageorgiou *et al.*, 2008).

Όσον αφορά στο TM3, σημειακή μεταλλαξιγένεση και μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης που πραγματοποιήθηκε σε αυτό το τμήμα αλληλουχίας ανέδειξε κυρίως τη θέση Asn-93 ως κρίσιμη για την εξειδίκευση της λειτουργίας του XanQ (Karena and Frillingos, υπό προετοιμασία; Karena and Frillingos, 2009). Αντικατάσταση της Asn-93 με ένα μικρότερο κατάλοιπο (Ser ή Ala) οδηγούσε σε εντελώς διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης με κύριο χαρακτηριστικό την αναγνώριση αναλόγων με διαφορές στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ξανθίνης αλλά και τη δυνατότητα μεταφοράς ουρικού (8-οξυ-ξανθίνης) που δεν είναι φυσικό υπόστρωμα για τον XanQ (Karena and Frillingos, 2009). Ομοίως, διαφορετική επιλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα προκύπτει όταν η αντίστοιχη θέση του TM3 στον ομόλογο μεταφορέα ουρικού YgfU (Thr-100) αντικατασταθεί με Ser ή Ala (Παπακώστας, Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011). Αν και οι επιδράσεις αυτές θα μπορούσε να είναι έμμεσες, η μοντελοποίηση του XanQ (και άλλων βακτηριακών ομολόγων) με βάση την πρόσφατη κρυσταλλική δομή του UraA υποστηρίζει ότι ο ρόλος της θέσης Asn-93 (N93) στην εξειδίκευση μπορεί να οφείλεται σε άμεση αλληλεπίδραση (δεσμό υδρογόνου) με το Glu-272 (E272) του TM8 το οποίο ανήκει στο κέντρο δέσμευσης (**Εικόνα 4.4A-B**). Επιπρόσθετα, στον UraA, το ένα άτομο οξυγόνου της ουρακίλης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο αζώτου του αμιδίου της Phe-73 (Lu *et al.*, 2011) που αντιστοιχεί στην Phe-94 (F94) στον XanQ, ένα κατάλοιπο μετά την N93,

επιβεβαιώνοντας τη σημαντικότητα και τη συμμετοχή της περιοχής αυτής στη δέσμευση του υποστρώματος.

Τη σύσταση του κέντρου δέσμευσης του XanQ ολοκληρώνουν στο δομικό του μοντέλο τα κατάλοιπα Glu-272 (E272) και Asp-276 (D276) της έλικας TM8 (**Εικόνα 4.4A-B**). Τα κατάλοιπα αυτά έχουν αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμα για τη λειτουργία του XanQ με αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης (Karena and Frillingos, 2009; Mermelekas *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα, το Glu-272 είναι αναντικατάστατο ως προς τη λειτουργία (Karena and Frillingos, 2009) ενώ η θέση του Asp-276 απαιτεί μια καρβοξυλική ομάδα (Asp ή Glu) η οποία είναι πιθανό να συμμετέχει στο μηχανισμό πρωτονίωσης – αποπρωτονίωσης κατά τη συµμεταφορά H⁺:ξανθίνης (Mermelekas *et al.*, 2010). Η κρυσταλλογραφική δομή του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011) δείχνει ότι το Glu-241 (που αντιστοιχεί στο Glu-272 του XanQ) αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα (ουρακίλη) με δύο δεσμούς υδρογόνου, ενώ η His-245 (που αντιστοιχεί στο Asp-276) σχηματίζει επίσης δεσμούς υδρογόνου με το υπόστρωμα πιθανόν μέσω ενός παρεμβαλλόμενου μορίου νερού, ενώ και τα δύο αυτά κατάλοιπα του TM8 προτείνεται ότι συμμετέχουν και στην πρωτονίωση – αποπρωτονίωση του μεταφορέα κατά το μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς (Lu *et al.*, 2011).

Συνοπτικά, λαμβάνοντας υπ' όψιν τόσο τα βιοχημικά και μοριακά δεδομένα όσο και το μοντέλο της δομής του XanQ, φαίνεται ότι το αρχικό τμήμα του μοτίβου-υπογραφή (στην αρχή της έλικας 10) αφενός συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις που συντονίζουν το υπόστρωμα (ξανθίνη) στο κέντρο δέσμευσης (A323, Q324) μαζί με συγκεκριμένα κατάλοιπα της έλικας TM8 (E272, D276) και της αρχής της έλικας 3 (N93, F94) και αφετέρου σταθεροποιεί τη δομή γύρω από το κέντρο δέσμευσης με αλληλεπιδράσεις (του N325) με την έλικα TM1 (H31).



Εικόνα 4.4. Δομή και τοπολογία του κέντρου δέσμευσης του XapQ. Α. Ανάλυση των καταλοίπων που είναι πιθανό να συμμετέχουν στο κέντρο δέσμευσης βάσει μοντελοποίησης πάνω στο δομικό πρότυπο του UraA (PDB 3QE7). Η απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996). **Β.** Γενική εικόνα των TM1, TM3, TM8 και TM10 που σχηματίζουν έναν «κλωβό» για τη δέσμευση του υποστρώματος. **Γ.** Αναθεωρημένο τοπολογικό μοντέλο του XapQ όπως αυτό προκύπτει από την κρυσταλλική δομή του UraA. Τα σφηνοειδή βέλη δείχνουν τις θέσεις όπου έγινε ανταλλαγή τμημάτων από τον UraA για την κατασκευή χιμαιρικών πρωτεϊνών (κεφάλαιο 4.4). Σημαντικά κατάλοιπα του XapQ φαίνονται με κόκκινο, πράσινο ή μαύρο υπόβαθρο (βλ. κείμενο). Οι έλικες TM1, $\alpha 3$, TM8 και $\alpha 10$ σημειώνονται με λαδί, κόκκινο, πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα.

4.4 Αναθεώρηση της τοπολογίας και νέα στοιχεία για το ρόλο του C-τελικού TM στη λειτουργία του μεταφορέα XanQ

Το C-τελικό διαμεμβρανικό τμήμα του XanQ θεωρήθηκε αρχικά ότι μπορεί να βρίσκεται κοντά στο χώρο με το κέντρο δέσμησης και το μοτίβο-υπογραφή λόγω της ιδιότητας του N430C να προστατεύεται από απενεργοποίηση με το NEM παρουσία της 2-θειοξανθίνης, ενός αναλόγου που προσδένεται στο μετάλλαγμα αυτό με υψηλή συγγένεια (Papakostas *et al.*, 2008), καθώς και της λειτουργικής αλληλεπίδρασης που δείχνουν οι μελέτες με διπλά μεταλλάγματα σε θέσεις των δύο περιοχών (Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009). Επίσης, η εκτενής μεταλλαξιγένεση των θέσεων Asn-430 και Ile-432 είχε δείξει ότι τα κατάλοιπα αυτά θα πρέπει να εμπλέκονται με τη ρύθμιση της εξειδίκευσης για την αναγνώριση πουρινών και να συμμετέχουν σε ένα είδος μοριακού φίλτρου που εμποδίζει την πρόσβαση των μη ειδικών αναλόγων του υποστρώματος (Papakostas *et al.*, 2008). Παρόμοια ήταν και τα συμπεράσματα για τις αντίστοιχες θέσεις του ομόλογου μεταφορέα UapA του *A. nidulans* δηλ. Phe-528 (Vlanti *et al.*, 2006) και Thr-526 (Papageorgiou *et al.*, 2008; Kostí *et al.*, 2010). Σήμερα, η μοντελοποίηση της δομής των μεταφορέων αυτών με βάση το ομόλογο UraA δείχνει ότι το C-τελικό διαμεμβρανικό τμήμα (TM) βρίσκεται μακριά από το κέντρο δέσμησης και η πιθανή λειτουργική αλληλεπίδρασή του με κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή θα πρέπει να είναι έμμεση (Εικόνα 4.5). Από την άλλη πλευρά, το C-τελικό TM ανήκει στη δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain) του UraA η οποία προτείνεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην εναλλαγή των διαμορφώσεων του ενεργού κέντρου και επομένως μπορεί να υπάρχει μια πιο σύνθετη, δυναμική αλληλεπίδρασή του με την περιοχή «πυρήνα» (core domain) και με το μοτίβο-υπογραφή κατά τον μηχανισμό λειτουργίας (Lu *et al.*, 2011).

Η αναθεώρηση της τοπολογίας στην περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (Εικόνα 4.1) καθώς και της συνολικής δομικής οργάνωσης του XanQ (Εικόνα 4.4) δικαιολογεί σε μεγάλο βαθμό και τα αρχικά μας αποτελέσματα με τους χημεικούς μεταφορείς XanQ/UapA που κατασκευάστηκαν (Αποτελέσματα, κεφάλαιο 3.2.2), αφού στις περισσότερες περιπτώσεις έγιναν ανταλλαγές τμημάτων σε θέσεις που δημιουργούν ασυνέχειες στην κρίσιμη περιοχή του «πυρήνα» (κόκκινα βέλη στην Εικόνα 4.4Γ) με

αποτέλεσμα τη μηδενική έκφρασή τους στη μεμβράνη. Η μόνη περίπτωση που πήραμε ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη ήταν αυτή του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$ όπου η διακοπή της συνέχειας της αλληλουχίας γίνεται στη δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain), και μάλιστα σε μια θέση του μορίου με σχετικά ελεύθερη διαμόρφωση (**Εικόνα 4.4Γ**, πράσινο βέλος).

Εκ των υστέρων, με βάση τη δομή του UraA, το γεγονός ότι όλες οι υπόλοιπες χιμαιρικές κατασκευές δεν εκφράζονται δεν είναι κάτι που προξενεί έκπληξη. Πράγματι, οι αλλαγές σε τόσο εκτεταμένες περιοχές αλληλουχίας είναι πιθανό να οδηγούν σε αλλαγές σε κρίσιμες περιοχές του μορίου που δεν του επιτρέπουν τη σωστή αναδίπλωση και εν τέλει την έκφρασή του. Η άποψη αυτή ενισχύεται περισσότερο παρατηρώντας την κρυσταλλική δομή του UraA. Οι δύο διακριτές περιοχές που εμφανίζονται στη δομή, η περιοχή της «εισόδου» (gate domain) και η περιοχή του «πυρήνα» (core domain), αποτελούνται από συνδυασμό διαμεμβρανικών τμημάτων που δεν ακολουθούν τη σειρά που αυτά απεικονίζονται και αριθμούνται σε ένα τοπολογικό μοντέλο (**Εικόνα 4.4Γ**). Με αυτή τη λογική, και λαμβάνοντας υπ' όψιν τη διευθέτηση των διαμεμβρανικών ελίκων για τον XanQ όπως αυτή προκύπτει από την μοντελοποίηση της δομής του, οι αντικαταστάσεις εκτεταμένων περιοχών αλληλουχίας του μορίου με τις αντίστοιχες από τον μεταφορέα UarA είναι πιθανό να διαταράσσουν κάποια κρίσιμη αλληλεπίδραση των περιοχών αυτών οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση της γενικότερης δομής. Αντίθετα, σε περιπτώσεις κατασκευής χιμαιρικών πρωτεϊνών μεταξύ ομόλογων μεταφορέων που ακολουθούν το δομικό πρότυπο της LacY με δύο δομικές περιοχές που είναι συνεχόμενες και διακριτές στην αλληλουχία (N6-C6), δεν παρουσιάζονται συχνά τέτοια προβλήματα (βλ. Tavoulari and Frillingos, 2008).

Όσον αφορά στο χιμαιρικό μεταφορέα $N_{11}C_1$, είναι ενδιαφέρον ότι η ανταλλαγή των αλληλουχιών γίνεται σε μια θέση με πολύ πιο εκτεταμένη ελεύθερη διαμόρφωση από ό,τι προβλεπόταν αρχικά (**Εικόνα 4.5A-B**). Η δομή του UraA δείχνει ότι τα δύο τελευταία TMs των μεταφορέων NAT αντιστοιχούν ουσιαστικά σε δύο μικρές α -έλικες (α_{13} και α_{14}) που δεν διαπερνούν ολόκληρη τη μεμβράνη αλλά συνδέονται με μια εκτενή ελεύθερη περιοχή (22 αμινοξέων). Η ανταλλαγή των τμημάτων για τη χίμαιρα $N_{11}C_1$ γίνεται ακριβώς στο μέσο της ελεύθερης αυτής περιοχής, ενώ η αλλαγή αυτή προσθέτει 11 ακόμη αμινοξέα ελεύθερης διαμόρφωσης που προέρχονται από την αλληλουχία του UarA (βλ. Εικόνα 3.14).

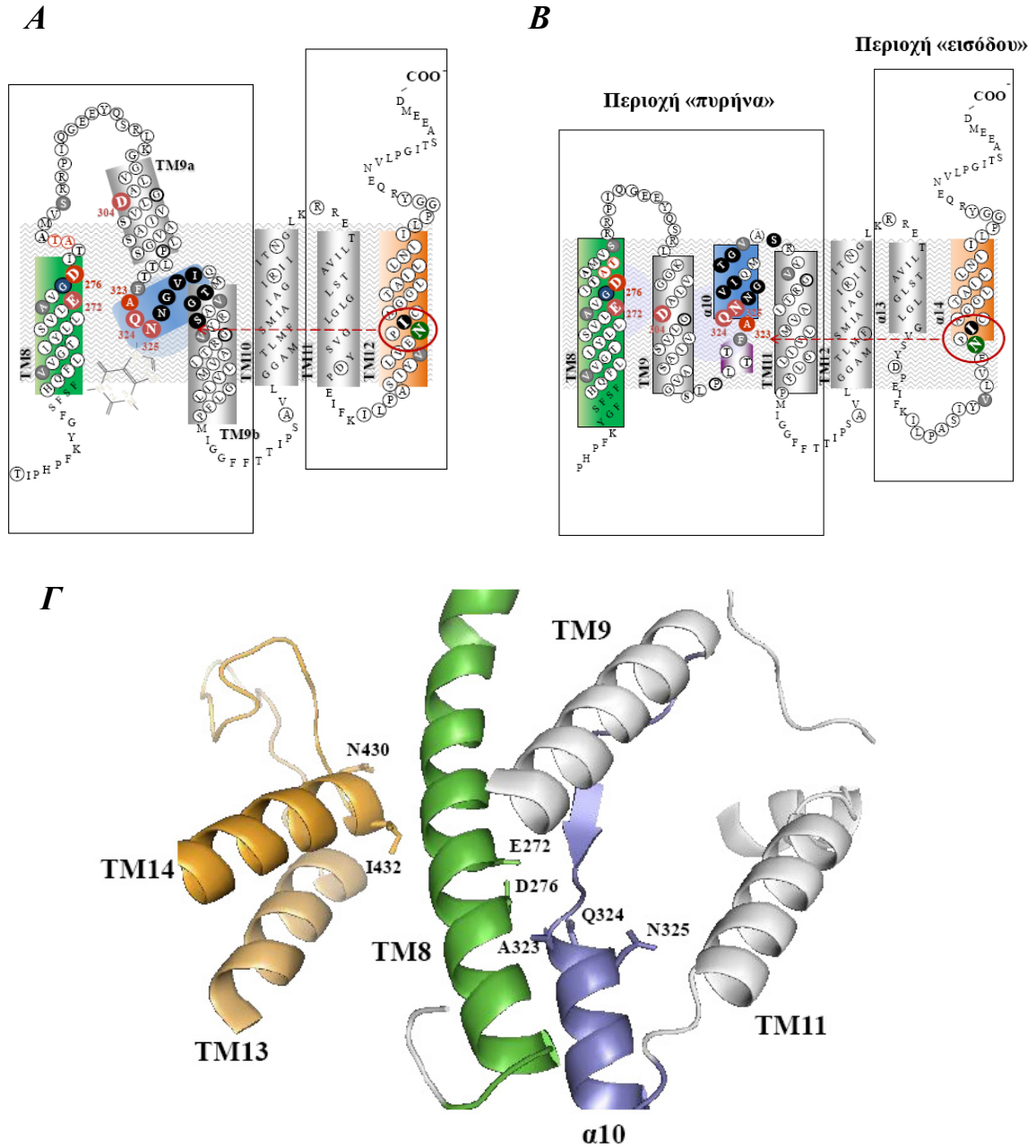
Η επαναφορά των Asn-430 και Ile-432 στον χιμαιρικό μεταφορέα $N_{11}C_1$ είναι ικανές και αναγκαίες συνθήκες για την κανονική έκφρασή του στη μεμβράνη

Παρόλο που ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1$ δεν έχει άλλες αλλαγές σε σχέση με τον XanQ(wt) παρά μόνο την αντικατάσταση του τελευταίου TM με την αλληλουχία του UapA, η έκφρασή του στη μεμβράνη είναι πολύ χαμηλή και τα επίπεδα ενεργότητάς του είναι μηδενικά. Αν και το C-τελικό TM δεν παρουσιάζει υψηλή συντήρηση στους μεταφορείς NAT, είναι αξιοσημείωτο ότι στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας, στη θέση του Asn-430 συντηρείται ένα αμινοξύ με δυνατότητα για δεσμούς υδρογόνου (Asn, Thr ή Ser) και στη θέση του Ile-432 συντηρείται ένα υδρόφοβο αμινοξύ (Ile, Phe ή Met), ενώ ανάμεσα στις 2 θέσεις παρεμβάλλεται πάντοτε Gly ή Pro. Αυτές οι δύο θέσεις καταλοίπων ήταν και οι μόνες όπου αντικαταστάσεις τους εμφανίζουν σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία και/ή εξειδίκευση σύμφωνα με τη μελέτη κυστεϊνικής σάρωσης της περιοχής αυτής του XanQ (Papakostas *et al.*, 2008). Στην αλληλουχία του μυκητιακού ομολόγου UapA, στις αντίστοιχες θέσεις των Ile-432 και Asn-430 υπάρχουν τα Phe-528 και Thr-526. Η επαναφορά των Asn-430 και Ile-432 στο υπόβαθρο του $N_{11}C_1$ οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης, η οποία και μεγιστοποιείται με την ταυτόχρονη εισαγωγή και των δύο καταλοίπων στο υπόβαθρο του χιμαιρικού μεταφορέα [$N_{11}C_1(NI)$]. Ειδικά όταν επαναφέρεται και το παρεμβαλλόμενο κατάλοιπο (Pro στον XanQ), ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1(NPI)$ παρουσιάζει επίπεδα έκφρασης που «αγγίζουν» αυτά του XanQ φυσικού τύπου. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι ο μεταφορέας $N_{11}C_1(NI)$ εμφανίζει χαμηλά επίπεδα ενεργότητας ενώ μετά την επαναφορά και των τριών καταλοίπων επιτυγχάνεται και κάποια αύξηση στα επίπεδα αυτά.

Από την άλλη πλευρά, μια σειρά άλλων αντικαταστάσεων που δοκιμάστηκαν δεν μπορούν να βελτιώσουν την έκφραση της χίμαιρας $N_{11}C_1$ ούτε να διασώσουν έστω και σε ελάχιστο βαθμό την ενεργότητα. Συγκεκριμένα, καμιά βελτίωση στην έκφραση ή ενεργότητα δεν προκύπτει αν στο υπόβαθρο της $N_{11}C_1$ γίνει επαναφορά της Tyr-425 στη θέση του Glu-521 (Y), επαναφορά των Gly-435 και Gly-436 στη θέση των Thr-531 και Ala-532 (G2), περικοπή 11 καταλοίπων από το συνδετικό τμήμα που προηγείται της C-τελικής έλικας (Δ), ή οποιοσδήποτε συνδυασμός τους (Αποτελέσματα, κεφάλαιο 3.2.3).

Είναι εμφανές λοιπόν ότι τα κεντρικά κατάλοιπα του C-τελικού TM, που ουσιαστικά αποτελούν την αρχή της τελευταίας μικρής α -έλικας του μορίου (**Εικόνα**

4.5) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη σωστή διαμόρφωση του μεταφορέα και κατά συνέπεια στην έκφρασή του. Ένας τέτοιος ρόλος ωστόσο μπορεί να αποκαλυφθεί μόνο στο υπόβαθρο του ασταθούς χμιαϊκού μεταφορέα $N_{11}C_1$.



Εικόνα 4.5. Η σχέση του C-τελικού TM με το μοτίβο-υπογραφή στη δομή του XanQ. Α. Αρχικό μοντέλο τοπολογίας του XanQ με βάση αλγορίθμους πρόβλεψης (TMHMM) και βιοχημικά-λειτουργικά δεδομένα (Mermelekas *et al.*, 2010). **Β.** Αναθεωρημένο μοντέλο τοπολογίας (μετά την κρυσταλλική δομή του UraA). Με κόκκινο κύκλο σημειώνονται τα κεντρικά κατάλοιπα του C-τελικού TM που περιέχουν την αλληλουχία $^{430}\text{Asn-Pro-Ile}^{432}$. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει το σχετικό «βάθος» στη μεμβράνη μεταξύ των κεντρικών καταλοίπων του τελευταίου TM και της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή. **Γ.** Δομικό μοντέλο των TM8-11 και TM13-14 του XanQ που στηρίζεται σε μοντελοποίηση βάσει της δομής του UraA (PDB 3QE7). Οι έλικες TM8, $\alpha 10$ (μοτίβο-υπογραφή), $\alpha 13$, και $\alpha 14$ (C-τελικό TM), σημειώνονται με πράσινο, μπλε, σομόν και πορτοκαλί χρώμα, αντίστοιχα.

Η επαναφορά της ενεργότητας του χιμαιρικού μεταφορέα $N_{11}C_1$ απαιτεί μια πιο «σφιχτή» δομή ενώ η εξειδίκευση είναι συνισταμένη περισσότερων παραγόντων

Πέρα από τις αλλαγές σε συγκεκριμένες θέσεις αλληλουχίας, η πιο σημαντική δομική διαφορά της χιμαιρας $N_{11}C_1$ από τον μεταφορέα XanQ είναι το μεγαλύτερο μήκος της ελεύθερης συνδετικής περιοχής μεταξύ των δύο τελευταίων ελίκων $\alpha 13$ και $\alpha 14$ (Εικόνα 4.5Γ) (33 σε σχέση με 22 αμινοξέα). Το μήκος αυτής της περιοχής άλλωστε διαφέρει κατά πολύ ανάμεσα στα διαφορετικά ομόλογα NAT/NCS2 αφού στον UarA, για παράδειγμα, είναι 33 αμινοξέα, στον hSVCT1 28 αμινοξέα, στον XanQ 22 αμινοξέα, ενώ στον UraA, που κρυσταλλώθηκε, μόνο 14 αμινοξέα (Lu *et al.*, 2011). Η περικοπή του υδρόφιλου αυτού συνδετικού τμήματος κατά 11 αμινοξέα από τη χιμαιρα $N_{11}C_1$ διαπιστώσαμε ότι επαναφέρει την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης σε πολύ υψηλά επίπεδα στο υπόβαθρο των χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1(NPI)$ ή $N_{11}C_1Y(NPI)$ οι οποίοι έχουν ελάχιστη έως καθόλου ενεργότητα αλλά κανονική έκφραση.

Σύμφωνα με το αναθεωρημένο δομικό μοντέλο του XanQ (Εικόνα 4.5B,Γ), το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα δεν εμπλέκεται άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος, καθώς δεν αποτελεί μέρος της περιοχής «πυρήνα» (core domain) η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του υποστρώματος, αλλά εντοπίζεται στην περιοχή της «εισόδου» (gate domain), η οποία βοηθά στην απελευθέρωση του υποστρώματος στο κυτταρόπλασμα μετά τη δέσμευσή του (Lu *et al.*, 2011). Ωστόσο, το μήκος της ελεύθερης συνδετικής περιοχής μεταξύ των δύο τελευταίων ελίκων $\alpha 13$ και $\alpha 14$ μπορεί να είναι σημαντικό για τον μηχανισμό της λειτουργίας. Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το πλεόνασμα των 11 καταλοίπων στη συνδετική αυτή περιοχή οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της περιοχής της «εισόδου» (gate domain) η οποία είναι πιθανόν κρίσιμης σημασίας για τη σωστή εναλλαγή των διαμορφώσεων του μεταφορέα που ακολουθούν τη δέσμευση του υποστρώματος με αποτέλεσμα τον δραματικό περιορισμό της ενεργότητας των χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1(NPI)$ ή $N_{11}C_1Y(NPI)$. Έτσι λοιπόν, για την υλοποίηση των κατάλληλων αλληλεπιδράσεων της περιοχής της «εισόδου» με την περιοχή του «πυρήνα» απαιτείται μια πιο «σφιχτή» δομή στο τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα στο υπόβαθρο του χιμαιρικού μεταφορέα και συγκεκριμένα των μεταφορέων $N_{11}C_1(NPI)$ και $N_{11}C_1Y(NPI)$, ώστε να επανέλθει πλήρως η ενεργότητα.

Ο παραπάνω ρυθμιστικός λειτουργικός ρόλος της ελεύθερης περιοχής πριν την έλικα α14 δε γίνεται φανερός παρά μόνο στο χιμαιρικό υπόβαθρο $N_{11}C_1$ και μάλιστα μόνο σε συνδυασμό με την επαναφορά των καταλοίπων Asn-430, Ile-432 και Pro-431 που αυξάνει την έκφραση της χίμαιρας. Είναι χαρακτηριστικό ότι κανένας από τους άλλους συνδυασμούς χιμαιρικών κατασκευών που εξετάσαμε δε μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης. Συγκεκριμένα, καμιά βελτίωση στην ενεργότητα δεν προκύπτει αν η περικοπή των 11 αμινοξέων από τη συνδετική περιοχή α13-14 (Δ) γίνει κατευθείαν στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ ή σε συνδυασμό με επαναφορά της Tyr-425 στη θέση του Glu-521 (Y) ή επαναφορά των Gly-435 και Gly-436 στη θέση των Thr-531 και Ala-532 (G2) χωρίς να έχουν αντικατασταθεί τα τρία αμινοξέα στην αρχή της έλικας α14 (NPI). Μάλιστα, η επαναφορά της Pro-431 φαίνεται να είναι καθοριστική, αφού στο υπόβαθρο της ενεργής χίμαιρας $N_{11}C_1(NI)$ η περικοπή της ελεύθερης περιοχής (Δ) έχει αντίθετο αποτέλεσμα, οδηγώντας σε πλήρη αποσταθεροποίηση και απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη.

Αν και η περικοπή του συνδετικού τμήματος μεταξύ α13 και α14 δίνει τη λύση ως προς την επαναφορά της ενεργότητας, οι προκύπτοντες χιμαιρικοί μεταφορείς [$N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$] εμφανίζουν μεγαλύτερη πλειοτροπικότητα (promiscuity) ως προς το προφίλ εξειδίκευσής τους σε σχέση με τον XanQ φυσικού τύπου. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται διαφοροποιήσεις που αφορούν κυρίως την αναγνώριση αναλόγων με αντικαταστάσεις στις θέσεις 7 και 8 του πουρινικού δακτυλίου, ικανότητα που ο φυσικού τύπου μεταφορέας δεν παρουσιάζει. Ακόμη και οι χιμαιρικοί μεταφορείς $N_{11}C_1(NI)$ και $N_{11}C_1(NPI)$ αν και παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα ενεργότητας μπορούν να αναγνωρίζουν πολύ ισχυρά ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 7 και 8 της πουρίνης. Το ίδιο παρατηρείται και στους υψηλής ενεργότητας μεταφορείς $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$, καθώς και μερική αναγνώριση του ουρικού οξέος από τον $N_{11}C_1\Delta(NPI)$, ένα υπόστρωμα που αποτελεί ένα από τα φυσικά υποστρώματα του UapA και των άλλων μεταφορέων NAT των ασκομυκήτων (Goudela *et al.*, 2005, 2008) και που δεν αναγνωρίζεται καθόλου από τον βακτηριακό XanQ. Συνεπώς παρά την εισαγωγή των κύριων και κρίσιμων καταλοίπων του τελευταίου διαμεμβρανικού τμήματος και την περικοπή του συνδετικού τμήματος, το χιμαιρικό υπόβαθρο $N_{11}C_1$ δεν επιτρέπει την επαναφορά της εξειδίκευσης του XanQ. Πρέπει λοιπόν να υπάρχουν κάποια στοιχεία που θα είναι οι καθοριστές της εξειδίκευσης και τα οποία αναφέρονται στις εναπομείνουσες πιο

«λεπτές» διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των XanQ και UapA στην περιοχή του τελευταίου διαμεμβρανικού τμήματος.

Με βάση την περαιτέρω μεταλλαξιγένεση των χιμαιρικών μεταφορέων που εξετάσαμε, ένα ζεύγος γλυκινών (G2) του XanQ (Gly-435, Gly-436) οι οποίες στον UapA και στις χίμαιρες που κατασκευάστηκαν έως τώρα αντικαθίστανται με Thr και Ala, αντίστοιχα, φαίνεται να αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της εξειδίκευσης της χίμαιρας $N_{11}C_1$. Ένας τέτοιος ρόλος αυτών των κατάλοιπων γλυκίνης δεν είχε αποκαλυφθεί στο υπόβαθρο του φυσικού μεταφορέα XanQ όπου ακόμη και μεγάλες αλλαγές στην πλευρική ομάδα (αντικατάσταση της Gly με Cys) δεν είχαν καμιά λειτουργική επίδραση (Papakostas *et al.*, 2008). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς, κατάλοιπα γλυκινών έχουν βρεθεί ότι είναι σημαντικά για να δίνουν την διαμορφωτική ευελιξία που χρειάζεται για την σωστή διαμόρφωση του κέντρου δέσμευσης ή για την αποδοτική κατάλυση της μεταφοράς συγκεκριμένων υποστρωμάτων (Yernool *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2001; Weinglass and Kaback, 1999; Weinglass *et al.*, 2001, 2002). Ομοίως, ένας αντίστοιχος ρόλος θα μπορούσε να προταθεί και για τον μεταφορέα XanQ, με βάση τη μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης, σε σχέση με δύο άλλα κατάλοιπα γλυκίνης, τη Gly-305 (TM9) (Mermelekas *et al.*, 2010) και τη Gly-104 ($\alpha 3$) (Karena and Frillingos, υπό προετοιμασία), τα οποία σύμφωνα με τη δομή του UraA, βρίσκονται σε περιοχές που εμπλέκονται στο κέντρο δέσμευσης (Εικόνα 4.4). Στην περίπτωση των γλυκινών της τελευταίας διαμεμβρανικής έλικας ($\alpha 14$) που εντοπίζονται μακριά από το κέντρο δέσμευσης, ο ρόλος τους δε φαίνεται να είναι τόσο κρίσιμος για τον φυσικού τύπου μεταφορέα, αλλά γίνεται φανερός μόνο στο υπόβαθρο των χιμαιρικών μεταφορέων $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ και $N_{11}C_1\Delta Y(NPI)$, οι οποίοι είναι λιγότερο εξειδικευμένοι ως προς τα ανάλογα της ξανθίνης που αναγνωρίζονται.

Μετά την επαναφορά και του ζεύγους των γλυκινών της $\alpha 14$ (G2), οι χιμαιρικοί μεταφορείς, και ιδιαίτερα ο $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$, είναι πλήρως ενεργοί ως προς τη μεταφορά ξανθίνης και ακολουθούν το προφίλ εξειδίκευσης του φυσικού μεταφορέα XanQ στις βασικές γραμμές του (Karatzas and Frillingos, 2005). Είναι χαρακτηριστικό ότι ο μεταφορέας $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$ δεν αναγνωρίζει ανάλογα ξανθίνης με τροποποιήσεις στις θέσεις 7 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου (7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη), ιδιότητα που χαρακτηρίζει τον XanQ(wt), ενώ ακόμη και ο ελεύθερος κυστεϊνών (Cys-less) μεταφορέας XanQ που χρησιμοποιείται ως υπόβαθρο στις αναλύσεις κυστεϊνικής σάρωσης εμφανίζει κάποια μικρή συγγένεια

δέσμευσης για την 8-μεθυλοξανθίνη (Καρατζά, Π., Διδακτορική Διατριβή, 2006). Από την άλλη πλευρά, είναι φανερό ότι μικρές διαφορές στην αλληλουχία του C-τελικού TM μπορεί να επηρεάζουν σημαντικά την εξειδίκευση. Για παράδειγμα, η επαναφορά και της Tyr-425 (Y) στο υπόβαθρο της $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$ οδηγεί σε καλύτερη αναγνώριση 7-μεθυλοξανθίνης, 8-μεθυλοξανθίνης και οξυπουρινόλης, μειώνοντας την εξειδίκευση, ενώ ο συνδυασμός της Tyr-425 με το υπόβαθρο της $N_{11}C_1\Delta(NPI)$ αποτρέπει την αναγνώριση ουρικού βελτιώνοντας σε μικρό βαθμό την εξειδίκευση.

Η βελτίωση στην ενεργότητα και, κυρίως, στην εξειδίκευση που προσφέρει το ζεύγος των γλυκινών (G2) απαιτεί να έχουν προηγηθεί στο χιμαιρικό μόριο τόσο οι αλλαγές των σημαντικών καταλοίπων στην αρχή της έλικας α14 (NPI) όσο και η περικοπή του προηγούμενου συνδετικού τμήματος (Δ). Συγκεκριμένα, βελτίωση στην ενεργότητα και/ή την εξειδίκευση δεν προκύπτει αν η επαναφορά του ζεύγους των γλυκινών (G2) γίνει κατευθείαν στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$ ή μετά την περικοπή του υδρόφιλου τμήματος (Δ) χωρίς να έχει προηγηθεί η επαναφορά των καταλοίπων $^{430}Asn-Pro-Ile^{432}$ (NPI). Το ζεύγος των Gly-435/436, λοιπόν, αποτελεί το σημείο «κλειδί» για τη βελτίωση της εξειδίκευσης του χιμαιρικού μεταφορέα, αλλά αυτή επιτυγχάνεται μόνο μέσω επιπρόσθετων συνδυαστικών αλλαγών στο υπόβαθρο της χίμαιρας $N_{11}C_1$. Ο χιμαιρικός μεταφορέας που προσεγγίζει καλύτερα στις λειτουργικές ιδιότητες του φυσικού μεταφορέα ξανθίνης XanQ [$N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$] εξακολουθεί να έχει αρκετές διαφορές στην αλληλουχία του C-τελικού TM από τον XanQ (**Εικόνα 4.6**). Οι διαφορές αυτές είναι σχεδόν «ουδέτερες» ως προς τον καθορισμό της ενεργότητας και της ειδικότητας του μεταφορέα για τη ξανθίνη, αν και θα μπορούσαν να επηρεάζουν άλλες ιδιότητες του XanQ (π.χ. την αναγνώριση εναλλακτικών υποστρωμάτων που δεν έχουν εξετασθεί), ενώ μία τουλάχιστον από αυτές (η Tyr-425/Glu-521) φαίνεται να συμβάλλει στη διατήρηση της εξειδίκευσης στο χιμαιρικό υπόβαθρο.

Ποιος είναι ο ρόλος του C-τελικού TM στους μεταφορείς NAT/NCS2;

Η εξέταση του C-τελικού διαμεμβρανικού τμήματος (TM) στα πλαίσια της ανάλυσης των χιμαιρικών μεταφορέων μεταξύ των XanQ και UapA και υπό το πρίσμα του καινούριου δομικού μοντέλου (**Εικόνα 4.5**) δίνουν μια πιο σαφή εικόνα για το ρόλο αυτού του TM στο μηχανισμό αναγνώρισης και μεταφοράς ξανθίνης. Το

C-τελικό TM αποτελεί μέρος της περιοχής της «εισόδου» (gate domain), η οποία συμμετέχει σε κρίσιμες αλληλεπιδράσεις με την περιοχή του «πυρήνα» (core domain) έτσι ώστε να ολοκληρώνεται επιτυχώς ο κύκλος της μεταφοράς του υποστρώματος, με την απελευθέρωση της ξανθίνης στο κυτταρόπλασμα.

Στην αρχή της έλικας α14 υπάρχουν δύο κατάλοιπα σημαντικά τόσο για τον XanQ (Papakostas *et al.*, 2008) όσο και για τον UapA (Vlanti *et al.*, 2006; Parageorgiou *et al.*, 2008). Τα κατάλοιπα αυτά (Asn-430/Thr-526, Ile-432/Phe-528) λειτουργούν ως «φίλτρο» για την αναγνώριση των κατάλληλων πουρινών και τον αποκλεισμό των πουρινών που δεν είναι υποστρώματα, χωρίς όμως να αποτελούν άμεσα τμήμα του κέντρου δέσμευσης (Vlanti *et al.*, 2006). Είναι χαρακτηριστικό ότι η αντικατάσταση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης Phe-528 με μια ομάδα μικρού μεγέθους οδηγεί σε δυνατότητα πρόσληψης υποστρωμάτων που κανονικά δε μεταφέρονται από τον UapA, όπως γουανίνη και υποξανθίνη, χωρίς όμως να επηρεάζεται η μεταφορά των φυσιολογικών υποστρωμάτων ουρικού και ξανθίνης (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006). Επίσης, έχει βρεθεί ότι και το κατάλοιπο Thr-526 «χαλαρώνει» την εξειδίκευση του μεταφορέα UapA, αλλά και πάλι χωρίς να επηρεάζεται η υψηλή συγγένεια του UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη (Parageorgiou *et al.*, 2008). Στον XanQ, η συστηματική μεταλλαξιγένεση όλων των καταλοίπων της περιοχής αυτής έδειξε ότι μόνο τα αντίστοιχα κατάλοιπα Asn-430 και Ile-432 μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της εξειδίκευσης για την αναγνώριση πουρινών, με παρόμοιο πιθανώς τρόπο (Papakostas *et al.*, 2008). Αν και δεν αποτελεί μέρος του κέντρου δέσμευσης, η περιοχή των δύο αυτών καταλοίπων (αρχή της έλικας α14) φαίνεται να αλληλεπιδρά λειτουργικά με το κέντρο δέσμευσης και ειδικότερα με το μοτίβο-υπογραφή, βάσει της ανάλυσης μιας σειράς διπλών μεταλλαγμάτων τόσο στον UapA όσο και στον XanQ (Παπακώστας, Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011).

Ωστόσο, στο υπόβαθρο του χιμαιρικού μεταφορέα N₁₁C₁ (παρούσα διατριβή), τόσο η συμμετοχή του C-τελικού TM στον καθορισμό της εξειδίκευσης όσο και η αλληλεπίδρασή του με την περιοχή του «πυρήνα» και του κέντρου δέσμευσης αποκαλύπτεται ότι είναι πιο σύνθετη και εμπλέκει περισσότερους παράγοντες. Συγκεκριμένα, ενώ η επαναφορά των καταλοίπων Asn-430 και Ile-432 κρίνεται απαραίτητη για τη δομική σταθερότητα του μορίου και την κανονική έκφρασή του στη μεμβράνη, η σωστή αλληλεπίδραση της περιοχής του C-τελικού TM με τη δομική περιοχή «πυρήνα» που εξασφαλίζει την ενεργότητα ρυθμίζεται τόσο από το μήκος της υδρόφιλης συνδετικής περιοχής μεταξύ α13 και α14 όσο και από την

παρουσία ή όχι της Pro-431 στην αρχή της έλικας α14. Επίσης, η εξασφάλιση της εξειδίκευσης για τα κατάλληλα ανάλογα της ξανθίνης ρυθμίζεται κυρίως από τις Gly-435 και Gly-436, σε συνδυασμό όμως με όλες τις υπόλοιπες αντικαταστάσεις, ενώ η Tyr-425 (Εικόνα 4.6) φαίνεται να δρα με αντίθετο τρόπο, «χαλαρώνοντας» την εξειδίκευση. Επομένως, το C-τελικό διαμεμβρανικό τμήμα του XanQ φαίνεται ότι περιέχει πολλαπλούς παράγοντες που συνεισφέρουν στην εξειδίκευση για τη ξανθίνη και την αναγνώριση συγκεκριμένων αναλόγων ξανθίνης. Στον UapA, από την άλλη πλευρά, η αντικατάσταση του C-τελικού TM με το αντίστοιχο από τον XanQ οδηγεί σε πολύ χαμηλή ενεργότητα αλλά δεν επηρεάζει σημαντικά ούτε τη στόχευση στη μεμβράνη ούτε την εξειδίκευση (Vlanti *et al.*, 2006), υποδηλώνοντας ότι ο λειτουργικός ρόλος αυτού του TM δεν είναι τόσο καθοριστικός στον UapA όσο στον XanQ όπου η αναγνώριση του υποστρώματος και των αναλόγων του υπόκειται σε περισσότερους στερεοχημικούς περιορισμούς (Goudela *et al.*, 2005).



Εικόνα 4.6. Διαφορές της χίμαιρας N11C1Δ(NPI)G2 από τον φυσικό μεταφορέα XanQ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι διαφορές καταλοίπων που παρατηρούνται στις δύο αλληλουχίες (στην περιοχή του C-τελικού TM) ενώ σε πλαίσιο σημειώνονται τα σημαντικά κατάλοιπα τα οποία έχουμε εισαγάγει στον χιμαιρικό μεταφορέα από τον XanQ.

4.5 Πώς μπορεί να συνέβαλαν διακριτά μοριακά στοιχεία του C-τελικού TM στην εξέλιξη της εξειδίκευσης του XanQ;

Χρησιμοποιώντας ως μοριακό υπόβαθρο τον ανενεργό χιμαιρικό μεταφορέα $N_{11}C_1$, «αναδομήθηκε» ουσιαστικά η λειτουργία του μεταφορέα ξανθίνης XanQ φυσικού τύπου με σταδιακά και μεθοδευμένα βήματα μεταλλαξιγένεσης προς αυτή την κατεύθυνση (Εικόνα 4.7). Ο χιμαιρικός μεταφορέας $N_{11}C_1$ είναι κατάλληλο υπόβαθρο για την κατανόηση της διαφοράς εξειδίκευσης των μεταφορέων XanQ και UapA και την ανάδειξη περιοχών ή καταλοίπων που παίζουν ουσιαστικό ρόλο τόσο στην έκφραση όσο και στη γενικότερη σταθεροποίηση της δομής. Αυτό συμβαίνει γιατί ο $N_{11}C_1$ αποτελεί έναν ανενεργό, ελάχιστα εκφραζόμενο μεταφορέα δίνοντάς μας τη δυνατότητα να τον «αναγεννήσουμε» και να τον επαναφέρουμε σε μια ενεργή και εκφραζόμενη κατάσταση πραγματοποιώντας συγκεκριμένες μεταλλαγές σε αυτό το υπόβαθρο. Πρωτεΐνες με μεγαλύτερη διαμορφωτική αστάθεια και χαμηλότερη εξειδίκευση θεωρούνται πράγματι καλύτερα αρχικά μόρια για την κατανόηση της εξέλιξης συγκεκριμένων λειτουργιών ή εξειδικεύσεων (Tokuriki and Tawfik, 2009; Harms and Thornton, 2010).

Οι κομβικής σημασίας μεταλλαγές της χίμαιρας $N_{11}C_1$ με τη σειρά που εισάγονται είναι:

- ❖ σταδιακή επαναφορά των αμινοξέων Asn-430/Ile-432 (NI), Pro-431 (P), η οποία αποκαθιστά πλήρως την έκφραση στη μεμβράνη των χιμαιρικών μεταφορέων
- ❖ «διόρθωση» του μήκους της συνδετικής περιοχής πριν από το TM12 (Δ), η οποία επαναφέρει την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης σε επίπεδα παρόμοια με του XanQ
- ❖ επαναφορά του ζεύγους των γλυκινών Gly-435/Gly-436 (G2), η οποία ρυθμίζει την εξειδίκευση με το προφίλ του χιμαιρικού μεταφορέα να προσεγγίζει καλύτερα το προφίλ του XanQ.

Οι παραπάνω αλλαγές είναι τα ουσιαστικά σημεία στα οποία διαφέρει η χίμαιρα $N_{11}C_1$ από τον XanQ, οι οποίες ούτως ή άλλως διαφέρουν πολύ λίγο στην αλληλουχία (Εικόνα 4.6). Ωστόσο, υπάρχουν δύο παρατηρήσεις που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από «εξελικτική» άποψη.

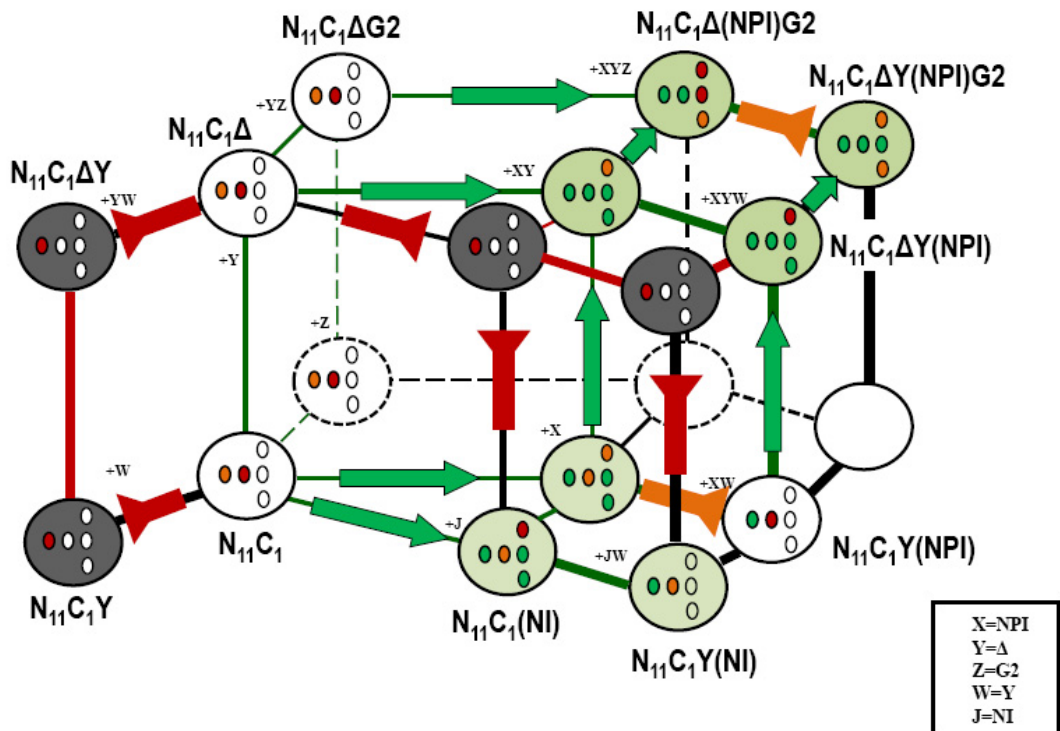
Πρώτον, ορισμένες από τις παραπάνω αλλαγές (που αφορούν τις θέσεις Asn-430/Thr-526 και Ile-432/Phe-528) έχουν διαφορετική επίπτωση στο υπόβαθρο της

χίμαιρας απ' ό,τι στον XanQ ή στον UapA. Στο υπόβαθρο του μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA, η μεταλλαγή T526N οδηγεί σε «χαλάρωση» της εξειδίκευσης, επιτρέποντας καλύτερη αναγνώριση αναλόγων με υποκαταστάσεις στις θέσεις 2, 3, 6 και 8 του πουρινικού δακτυλίου (Parageorgiou *et al.*, 2008) ενώ η αντικατάσταση της F528 με σειρά άλλων αμινοξέων δεν επηρεάζει την έκφραση ή την ενεργότητα αλλά μόνο το προφίλ επιλεκτικότητας διαφορετικών υποστρωμάτων (Vlanti *et al.*, 2006). Στο υπόβαθρο του μεταφορέα ξανθίνης XanQ, οι αντίστροφες μεταλλαγές N430T και I432F οδηγούν σε απενεργοποίηση, διατηρώντας όμως υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, παρόμοια με του φυσικού τύπου (Papakostas *et al.*, 2008). Στο υπόβαθρο του N₁₁C₁, οι αλλαγές T526N και F528I οδηγούν σε σημαντική αύξηση της έκφρασης του μορίου στη μεμβράνη και, συνδυαστικά, εξασφαλίζουν πλήρη έκφραση αλλά και ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Αντίστροφα, οι αλλαγές N526T ή I528F στο υπόβαθρο του N₁₁C₁(NPI) οδηγούν σε απενεργοποίηση και πτώση των επιπέδων έκφρασης. Βλέπουμε λοιπόν ότι οι ίδιες αλλαγές έχουν πιο δραματικές συνέπειες όταν γίνονται στο υπόβαθρο των ελάχιστα ενεργών ή ανενεργών χιμαιρικών μεταφορέων.

Δεύτερον, η σειρά με την οποία πραγματοποιούνται οι αλλαγές στην χίμαιρα N₁₁C₁ έχει καθοριστική σημασία (**Εικόνα 4.7**). Η κάθε μεταλλαγή θα πρέπει να γίνει την κατάλληλη στιγμή (στο κατάλληλο μοριακό υπόβαθρο) ώστε να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα είτε ως προς την έκφραση είτε ως προς τη λειτουργικότητα. Πρέπει δηλαδή να προηγηθούν κάποιες αλλαγές οι οποίες δεν θα δώσουν αυτό καθαυτό το επιθυμητό αποτέλεσμα (π.χ. ενεργότητα, έκφραση, εξειδίκευση) αλλά θα «επιτρέψουν» ή θα προετοιμάσουν το έδαφος για μια πιο καθοριστική αλλαγή που θα δώσει ένα δραστικό αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από τις ιδιότητες του κάθε χιμαιρικού μεταλλάγματος, η βελτίωση για παράδειγμα της ενεργότητας μέσω της αλλαγής Δ απαιτεί να έχει γίνει ήδη η αλλαγή NPI, η βελτίωση της εξειδίκευσης με την αλλαγή G2 απαιτεί να έχει προηγηθεί τόσο η αλλαγή Δ όσο και η αλλαγή NPI, και ούτω καθεξής. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μάλιστα, οι συνέπειες της αντιστροφής στη σειρά των μεταλλαγών είναι δραματικές. Για παράδειγμα, η αλλαγή Δ δε μπορεί να γίνει κατευθείαν στη χίμαιρα N₁₁C₁(NI) χωρίς να έχει προηγηθεί η αλλαγή P (εισαγωγή της Pro στη θέση της Gly-527), γιατί η χίμαιρα που προκύπτει είναι πλήρως ανενεργή και δεν εκφράζεται. Αντίθετα, όταν προηγείται η αλλαγή P, η ενδιάμεση χίμαιρα N₁₁C₁(NPI) είναι πλήρως εκφραζόμενη και ενεργή και μπορεί να

λειτουργήσει ως υπόβαθρο στο οποίο η δεύτερη αλλαγή Δ θα οδηγήσει σε βελτίωση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης (**Εικόνα 4.7**).

Συνολικά, οι παραπάνω παρατηρήσεις μας δείχνουν ότι ο ρόλος ορισμένων καταλοίπων δε μπορεί να γίνει πλήρως κατανοητός με μεταλλαξιγένεση στο φυσικό πρωτεϊνικό μόριο (Dean and Thornton, 2007) και τονίζουν τη σημασία της επίστασης, δηλ. ότι οι ίδιες μεταλλαγές μπορούν να έχουν εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα αν εισαχθούν σε λίγο διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο (Bridgham *et al.*, 2009). Επίσης, σε ένα υποθετικό «εξελικτικό» σενάριο όπου η ξανθίνη θα ήταν απαραίτητη ως πηγή θρέψης για την ανάπτυξη ενός προγονικού οργανισμού (πίεση φυσικής επιλογής), μας δείχνουν ότι μόνο ορισμένες σειρές μεταλλαγών στο τελευταίο TM θα μπορούσαν να εξασφαλίσουν την ενεργότητα και εξειδίκευση του αντίστοιχου μεταφορέα (ενός υποθετικού προδρόμου του XanQ) ενώ οι άλλες θα κατέληγαν σε εξελικτικά αδιέξοδα (**Εικόνα 4.7**).



Εικόνα 4.7. Εξελικτικές διαδρομές από τη χίμαιρα $N_{11}C_1$ μέχρι τη χίμαιρα $N_{11}C_1\Delta(NPI)G2$. Κάθε μεγάλος κύκλος συμβολίζει μία χιμαιρική κατασκευή και οι χίμαιρες που έχουν έστω και μικρή ενεργότητα φαίνονται με ανοικτό πράσινο φόντο (για τις συντμήσεις βλ. κείμενο και Αποτελέσματα, Πίνακας 3.7). Οι διαφορές αλληλουχίας από την αρχική χίμαιρα $N_{11}C_1$ φαίνονται με μετακινήσεις κατά τους άξονες X (αλλαγή NPI), Y (αλλαγή Δ), Z (αλλαγή G2), W (αλλαγή Y) και J (αλλαγή NI). Οι ιδιότητες κάθε χίμαιρας φαίνονται με τους εσωτερικούς μικρούς κύκλους που δείχνουν (από αριστερά προς τα δεξιά) τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (κόκκινο, 0-2%, πορτοκαλί, 5-10%, πράσινο, 45-90%), την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης (κόκκινο, 0-2%, πορτοκαλί, 5-10%, πράσινο 45-110%) και την εξειδίκευση ως προς τις θέσεις 7 και 8 δηλ. (από πάνω προς τα κάτω) την ικανότητα αναγνώρισης ουρικού, 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης (κόκκινο, αναστολή κατά 0-5%, πορτοκαλί, αναστολή κατά 30-60%, πράσινο, αναστολή κατά 70-100%). Τα πράσινα βέλη δείχνουν σημαντικές βελτιώσεις σε σχέση με τις ιδιότητες του XanQ(wt). Τα κόκκινα ανάποδα βέλη δείχνουν σημαντικές αποσταθεροποιήσεις που οδηγούν σε αδυναμία έκφρασης (εξελικτικά αδιέξοδα, μαύρο φόντο). Τα πορτοκαλί ανάποδα βέλη δείχνουν σημαντικές μειώσεις στην ενεργότητα ή στην εξειδίκευση. Οι πράσινες γραμμές συμβολίζουν επιτρεπτές διαδρομές και οι κόκκινες γραμμές διαδρομές που δε μπορούν να γίνουν γιατί παρεμβάλλονται εξελικτικά αδιέξοδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ–ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ (NAT)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ

Η εξελικτικά ευρεία οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT) περιλαμβάνει πάνω από 2000 δυνητικά μέλη με βάση τις αναλύσεις γονιδιωμάτων σε όλες τις ομάδες οργανισμών. Από τα μέλη της οικογένειας, ελάχιστα έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά και μόνο δύο είναι εκτενώς μελετημένα με μεταλλαξιγένεση, ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* και ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ της *Escherichia coli*. Πολύ πρόσφατα, παρουσιάστηκε η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός ομολόγου της οικογένειας, του μεταφορέα ουρακίλης UraA, η οποία «ρίχνει» φως στη δομική οργάνωση των μεταφορέων NAT. Η προσπάθεια κατανόησης των μοριακών μηχανισμών αναγνώρισης και πρόσληψης υποστρωμάτων των μεταφορέων NAT είναι σημαντική τόσο για την κατανόηση της εξέλιξης των διαφορετικών εξειδικεύσεων σε μια τόσο συντηρημένη δομικά οικογένεια όσο και γιατί θα δώσει νέα προοπτική στο σχεδιασμό στοχευμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων καθώς πολλά ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων χρησιμοποιούνται ήδη ως αντικαρκινικά ή αντιϊικά, κυρίως, φάρμακα, αλλά η εφαρμογή τους δεν έχει στηριχτεί μέχρι σήμερα στις διαφορές των συστημάτων πρόσληψης μεταξύ των υγίων κυττάρων του οργανισμού-ξενιστή και των κυττάρων-στόχων.

Ως μοριακό εργαλείο στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος συμμεταφορέας ξανθίνης: H^+ , XanQ. Από προηγούμενες μελέτες, με την κατασκευή ενός μεταφορέα XanQ ελεύθερου κυστεϊνών (C-less) έγινε δυνατή στο εργαστήριο η εφαρμογή της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης, η οποία σε συνδυασμό με εκτεταμένες σημειακές αντικαταστάσεις και με αναλύσεις επίδρασης αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων έχει αναδείξει θέσεις καταλοίπων σημαντικές για τη

λειτουργία του μεταφορέα. Η παρούσα διατριβή εξετάζει διεξοδικότερα ορισμένες από αυτές τις θέσεις που φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος ώστε να συνδράμει στην κατανόηση του μηχανισμού αλλά και της μοριακής εξέλιξης του ενεργού κέντρου των μεταφορέων NAT.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής μελετήθηκε το μοτίβο-υπογραφή, μια αλληλουχία ιδιαίτερα συντηρημένη και κρίσιμη για τη λειτουργία των μεταφορέων NAT. Πραγματοποιήθηκε αλκυλίωση όλων των θέσεων του μοτίβου-υπογραφή του μεταφορέα XanQ και παρακείμενων περιοχών με *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM), χρησιμοποιώντας ως βάση τα μεταλλάγματα μονών κυστεϊνών που υπήρχαν ήδη, και μελετήθηκε η επίδραση του υποστρώματος (ξανθίνη). Τα πειράματα υποδεικνύουν ότι δύο τουλάχιστον από τις θέσεις του μοτίβου-υπογραφή βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με το κέντρο δέσμευσης. Τα δεδομένα είναι ότι παρουσία ξανθίνης η Asn-325 προστατεύεται πλήρως από αλκυλίωση με το NEM ενώ η γειτονική Ala-323 αντιδρά με μια μικρή διαμορφωτική αλλαγή που οδηγεί όμως σε αυξημένη ευαισθησία σε απενεργοποίηση. Η Gln-324 που παρεμβάλλεται στην αλληλουχία είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα άμεσα γιατί είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της ξανθίνης ή αναλόγων της με υψηλή συγγένεια. Επιπρόσθετα, η παρακείμενη περιοχή (κατάλοιπα 326-329) καθώς και τα κατάλοιπα 332, 333 και 336 φαίνεται να εμπλέκονται στο σχηματισμό του μονοπατιού διόδου της πουρίνης, αφού η αλκυλίωση των κυστεϊνών στις παραπάνω θέσεις οδηγεί σε απενεργοποίηση, πιθανόν λόγω παρεμπόδισης της απελευθέρωσης του υποστρώματος από το κέντρο δέσμευσης. Στην ίδια περιοχή εντοπίστηκαν σημαντικοί καθοριστές της εξειδίκευσης. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση της Gly-333 ή της Ser-336 οδηγεί σε μεταλλάγματα που διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση από τον XanQ φυσικού τύπου εμφανίζοντας ιδιότητες που υπενθυμίζουν το προφίλ εξειδίκευσης του μυκητιακού ομολόγου UraA αλλά και επιπρόσθετες διαφοροποιήσεις. Η μοντελοποίηση της πιθανής δομής του XanQ βάσει της κρυσταλλικής δομής του UraA επιβεβαιώνει ότι η περιοχή του μοτίβου-υπογραφή έχει άμεση σχέση με το κέντρο δέσμευσης. Ειδικότερα, τα κατάλοιπα Ala-323, Gln-324 και Asn-325 (TM10) βρίσκονται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης μαζί με συγκεκριμένα κατάλοιπα από τα TM1, TM3 και TM8 που επίσης έχουν αναδειχτεί ως σημαντικά από άλλες μελέτες του εργαστηρίου μας.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής μελετήθηκε ο ρόλος του τελευταίου διαμεμβρανικού τμήματος (C-τελικού TM) του XanQ, το οποίο αρχικά είχε θεωρηθεί ότι μπορεί να βρίσκεται κοντά στο χώρο με το κέντρο δέσμευσης και το μοτίβο-

υπογραφή. Η αναθεώρηση της πιθανής δομής του XanQ, από την κρυσταλλική δομή του UraA, έδειξε ότι το C-τελικό TM βρίσκεται μακριά από το κέντρο δέσμευσης και η πιθανή λειτουργική αλληλεπίδρασή του με κατάλοιπα του μοτίβου-υπογραφή θα πρέπει να είναι έμμεση. Στην παρούσα διατριβή, η κατασκευή της χίμαιρας N₁₁C₁ (ανενεργού και ελάχιστα εκφραζόμενου μεταλλάγματος του XanQ όπου το C-τελικό TM προερχόταν από το UarA) και η ορθολογιστική «αναγέννησή» της μέσω στοχευμένων μεταλλαγών, ανέδειξε τη σημασία στοιχείων του C-τελικού TM για τη λειτουργία και την εξέλιξη του XanQ που οι προηγούμενες μελέτες δεν ήταν σε θέση να αποκαλύψουν. Συγκεκριμένα, τα κεντρικά κατάλοιπα του C-τελικού TM Asn-430 και Ile-432, που ουσιαστικά αποτελούν την αρχή της τελευταίας μικρής α-έλικας του μορίου (α₁₄) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη σωστή διαμόρφωση και κανονική έκφραση του μεταφορέα στη μεμβράνη αφού μόνο μετά την επαναφορά τους η χίμαιρα N₁₁C₁ μπορεί να εκφραστεί σε επίπεδα παρόμοια με του XanQ φυσικού τύπου, αλλά με πολύ μικρή ενεργότητα. Το μήκος της ελεύθερης συνδετικής περιοχής μεταξύ των δύο τελευταίων ελίκων α₁₃ και α₁₄ είναι σημαντικό για την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης και η περικοπή αυτής της αλληλουχίας κατά 11 κατάλοιπα είναι απαραίτητη για να επανέλθει πλήρως η ενεργότητα της χίμαιρας N₁₁C₁. Με βάση και το δομικό μοντέλο, φαίνεται ότι το πλεόνασμα των 11 καταλοίπων στη συνδετική αυτή αλληλουχία μπορεί να αποσταθεροποιεί τη δομική περιοχή της «εισόδου» (gate domain) η οποία είναι κρίσιμης σημασίας για τη σωστή εναλλαγή των διαμορφώσεων που ακολουθούν τη δέσμευση του υποστρώματος με αποτέλεσμα τον δραματικό περιορισμό της ενεργότητας. Ωστόσο, για να αποκατασταθεί και η εξειδίκευση του XanQ, ιδιαίτερα όσο αφορά την αδυναμία αναγνώρισης ουρικού, 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης, είναι απαραίτητη η επαναφορά δύο γλυκινών στις θέσεις 435 και 436, στο υπόβαθρο όλων των προηγούμενων αλλαγών του χιμαιρικού μεταφορέα. Η παραπάνω σειρά μεταλλαγών οδηγεί ουσιαστικά στην «αναδόμηση» μιας χίμαιρας που είναι λειτουργικά ισοδύναμη με τον πλήρως ενεργό και εξειδικευμένο μεταφορέα XanQ. Αυτά τα δεδομένα παρουσιάζουν και εξελικτικό ενδιαφέρον, αφού οι παραπάνω αλλαγές έχουν διαφορετική επίπτωση ανάλογα με το υπόβαθρο όπου πραγματοποιούνται (της χίμαιρας, του XanQ ή του UarA) ενώ η σειρά τους έχει καθοριστική σημασία αφού η κάθε μεταλλαγή θα πρέπει να γίνει την κατάλληλη στιγμή (στο κατάλληλο μοριακό υπόβαθρο) ώστε να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα είτε ως προς την έκφραση είτε ως προς τη λειτουργικότητα του χιμαιρικού μεταφορέα.

SUMMARY

MAPPING THE PURINE BINDING SITE OF THE NUCLEOBASE-ASCORBATE TRANSPORTERS (NAT)

DOCTORATE THESIS

GEORGOPOULOU EKATERINI

The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family is an evolutionarily broad family of nucleobase-ascorbate transporters with more than 2000 putative members based on genome programs from all organisms. Only few members of this family have been characterized and only two of them, the specific xanthine transporter XanQ from *E. coli* and the uric acid/xanthine transporter UapA from *Aspergillus nidulans*, have been studied extensively at the molecular level. Lately, the x-ray structure of another member of this family, the uracil transporter UraA, has been solved at high resolution, providing a model of how all transporters from this family are structurally organized. Understanding the molecular mechanisms of substrate recognition in NAT transporters will be valuable not only to understand the evolution of different specificities in this conserved family but also to reinforce the design of targeted antimicrobial purine-related drugs taking into account the differences between microbial and host uptake systems.

As a study model in this thesis we use the recently cloned and functionally characterized XanQ transporter from *E. coli* K12, a specific, high-affinity xanthine: H⁺ symporter. Previous studies in our laboratory, based on the engineering of a permease devoid of Cys residues, have applied Cys-scanning mutagenesis, extensive site-directed mutagenesis and alkylation to reveal a number of functionally important residues. In the present thesis, we analyze the role of some of these important residues with respect to their putative direct or indirect involvement with the substrate binding site of XanQ.

In the first part of the thesis, we studied systematically the NAT motif region, a region highly conserved and crucial for the activity of NAT transporters. We performed site-directed alkylation and functional assays of single-Cys mutants of the NAT motif and flanking regions, in the presence or absence of substrate (xanthine).

The experiments indicate that at least two of the NAT motif residues interact directly with the xanthine binding site. Our data are that Asn-325 is fully protected in the presence of substrate from alkylation with *N*-ethylmaleimide (NEM) while the neighboring Ala-323 responds with a small conformational change which causes an increased sensitivity to inactivation. The intervening Gln-324 probably interacts directly with substrate, since it is essential for high-affinity binding of xanthine. Moreover, the neighboring sequence (residues 326-329) and residues at positions 332, 333 and 336 appear to participate in the purine permeation pathway, since alkylation of these single-Cys mutants leads to inactivation, probably due to obstruction of the substrate release from the binding site. This region also contains crucial specificity determinants, since replacement of Gly-333 or Ser-336 leads to mutants with specific alterations in the ligand recognition profile with respect to wild type XanQ. These differences reverse in part the key specificity elements differentiating the xanthine-specific XanQ from the fungal uric acid-transporting homologue UapA. However, the replacements have additional effects, which are not found in either the bacterial or the fungal wild types. Homology modeling of XanQ on the recently released structure of UraA confirms that the NAT motif region is involved in the binding site. In particular, Ala-323, Gln-324 and Asn-325 (TM10) are at the binding site region and appear to interact with residues of TM1, TM3 and TM8 which have been delineated as important from other studies in our laboratory.

In the second part of the thesis, we studied the role of the last transmembrane segment (C-terminal TM) of XanQ. Initially, the C-terminal TM had been proposed to interact with the NAT motif and be located at the vicinity of the binding site. The revised model of XanQ based on the crystal structure of UraA shows that the C-terminal TM is distant from the binding site and its interaction with the NAT motif should be indirect. In the present thesis, engineering of chimera N₁₁C₁ (an inactive and poorly expressed XanQ mutant in which the C-terminal TM comes from UapA) and its “resurrection” through rational mutagenesis steps has revealed important elements for the function and evolution of XanQ which were not discernible in the previous studies. In particular, Asn-430 and Ile-432, located at the middle of this TM at the beginning of the last small alpha helix (α 14), are crucial for the right conformation and expression of the transporter in the membrane, since they are needed and sufficient to achieve wild-type expression levels in the chimeric N₁₁C₁ background, albeit with very low activity. The length of the extended unstructured

loop between the last two alpha helices ($\alpha 13$ and $\alpha 14$) is crucial for high xanthine uptake activity since deletion of 11 residues from this sequence is needed to restore full uptake activity in chimera N₁₁C₁. Based on the structure model, the additional 11 residues may destabilize the gate domain that is crucial for the correct conformational changes of the transporter that accompany turnover. Restoration of the correct XanQ specificity, especially with respect to the non-recognition of uric acid, 7-methylxanthine and 8-methylxanthine, requires the additional re-introduction of two glycines, Gly-435 and Gly-436, in the middle of $\alpha 14$, while any combination of the other mutations lead to chimeras with high promiscuity for recognition of these non-XanQ ligands. The above series of mutations leads to the rebuilt of a chimera which is functionally equivalent to wild-type XanQ in terms of activity and specificity. In addition, these data are interesting from an evolutionary point of view, since the above mutations have different effects on different molecular backgrounds (XanQ, UapA, or the chimeras) and their order of appearance is crucial to achieve the optimal result with respect to the expression and functionality of the chimeric transporter.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Abramson, J. and E. Wright (2009). "Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats." *Curr Opin Struct Biol* 19: 425-432.
2. Abramson, J., H. R. Kaback and S. Iwata (2004). "Structural comparison of lactose permease and the glycerol-3-phosphate antiporter: members of the major facilitator superfamily." *Curr Opin Struct Biol* 14, 413-419.
3. Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback and S. Iwata (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*." *Science* 301: 610-615.
4. Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter (2000). "Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell". Garland Publishing, Inc, New York and London
5. Altaner, C. (2008). "Prodrug cancer gene therapy." *Cancer Lett* 270: 191-201.
6. Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6858-6862.
7. 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 in press*
8. Amillis, S., Hamari Z., Roumelioti K., Scazzocchio C., Diallinas G. (2007). "Regulation of Expression and Kinetic Modeling of Substrate Interactions of a Uracil Transporter in *Aspergillus nidulans*." *Mol Membr Biol* 24: 206-214.
9. Amillis, S., G. Cecchetto, V. Sophianopoulou, M. Koukaki, C. Scazzocchio and G. Diallinas (2004). "Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia." *Mol Microbiol* 52: 205-216.
10. Amillis, S., M. Koukaki and G. Diallinas (2001). "Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes." *J Mol Biol* 313: 765-774.
11. Andersen, P. S., D. Frees, R. Fast and B. Mygind (1995). "Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene." *J Bacteriol* 177: 2008-2013.
12. Argyrou, E., V. Sophianopoulou, N. Schultes and G. Diallinas (2001). "Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*." *Plant Cell* 13: 953-964.
13. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997). "Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance." *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 4155-4160.
14. Bakhiya, A., A. Bahn, G. Burckhardt and N. Wolff (2003). "Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux." *Cell Physiol Biochem* 13: 249-256.
15. Baldwin, S. A., G. A. McConkey, C. E. Cass and J. D. Young (2007). "Nucleoside transport as a potential target for chemotherapy in malaria." *Curr Pharm Des* 13: 569-580.
16. Baldwin, S. A., S. Y. Yao, R. J. Hyde, A. M. Ng, S. Foppolo, K. Barnes, M. W. Ritzel, C. E. Cass and J. D. Young (2005). "Functional characterization of

- novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes." *J Biol Chem* 280: 15880-15887.
17. Barabote, R. D. and M. H. Saier, Jr. (2005). "Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system." *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 608-634.
 18. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2005) *Biochemistry*, 5th edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco
 19. Berhe, A., R. Zvyagilskaya, J. O. Lagerstedt, J. R. Pratt and B. L. Persson (2001). "Properties of the cysteine-less Pho84 phosphate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 837-842.
 20. Boudker, O. and Verdon G. (2010). "Structural perspectives on secondary active transporters" *Trends in Pharmacological Sciences* Vol.31 No.9: 418-426.
 21. Boussau, B., Daubin V. (2010). "Genomes as Documents of Evolutionary History". *Trends Ecol Evol* 25: 224-232.
 22. Bridgham, J.T., Carroll, S.M., and Thornton, J.W. (2006). "Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation." *Science* 312(5770):97-101.
 23. Bridgham, J.T., Ortlund, E.A., and Thornton, J.W. (2009). "An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution." *Nature* 461(7263):515-9.
 24. Brocke, L., A. Bendaham, M. Grunewald, B. I. Kanner (2002). "Proximity of Two Oppositely Oriented Reentrant Loops in the Glutamate Transporter GLT-1 Identified by Paired Cysteine Mutagenesis". *J Biol Chem* 277: 3985-3992.
 25. Burkle, L., A. Cedzich, C. Dopke, H. Stransky, S. Okumoto, B. Gillissen, C. Kuhn and W. B. Frommer (2003). "Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*." *Plant J* 34: 13-26.
 26. Busch, W., and Saier, M.H. Jr. (2002). "The transporter classification (TC) system, 2002." *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 5:287-337.
 27. Caprile, T., K. Salazar, A. Astuya, P. Cisternas, C. Silva-Alvarez, H. Montecinos, C. Millan, M. de los Angeles Garcia and F. Nualart (2009). "The Na⁺ dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids." *J Neurochem* 108: 563-577.
 28. Carrasco, N., Herzlinger, D., Mitchell, R., DeChiara, S., Danho, W., Gabriel, T.F. and Kaback, H.R. (1984). "Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15:4672-6.
 29. Carter, N. S., C. Ben Mamoun, W. Liu, E. O. Silva, S. M. Landfear, D. E. Goldberg and B. Ullman (2000). "Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* 275: 10683-10691.
 30. Caulfield, M. J., P. B. Munroe, D. O'Neill, K. Witkowska, F. J. Charchar, M. Doblado, S. Evans, S. Eyheramendy, A. Onipinla, P. Howard, S. Shaw-Hawkins, R. J. Dobson, C. Wallace, S. J. Newhouse, M. Brown, J. M. Connell, A. Dominiczak, M. Farrall, G. M. Lathrop, N. J. Samani, M. Kumari, M. Marmot, E. Brunner, J. Chambers, P. Elliott, J. Kooner, M. Laan, E. Org, G. Veldre, M. Viigimaa, F. P. Cappuccio, C. Ji, R. Iacone, P. Strazzullo, K. H.

- Moley and C. Cheeseman (2008). "SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans". *PLoS Medicine* 5: 1509-1523.
31. Chang, A. B., R. Lin, W. Keith Studley, C. V. Tran and M. H. Saier, Jr. (2004). "Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins." *Mol Membr Biol* 21: 171-181.
 32. 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 (I₅₀) of an enzymatic reaction." *Biochem Pharmacol.* 23:3099-108.
 33. Cecchetto, G., S. Amillis, G. Diallinas, C. Scazzocchio and C. Drevet (2004). "The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster." *J Biol Chem* 279: 3132-3141.
 34. Christiansen, L. C., S. Schou, P. Nygaard and H. H. Saxild (1997). "Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism." *J Bacteriol* 179: 2540-2550.
 35. Claros, M. G. and G. von Heijne (1994). "TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions." *Comput Appl Biosci* 10: 685-686.
 36. Cochu, A., D. Roy, K. Vaillancourt, J. D. Lemay, I. Casabon, M. Frenette, S. Moineau and C. Vadeboncoeur (2005). "The doubly phosphorylated form of HPr, HPr(Ser~P)(His-P), is abundant in exponentially growing cells of *Streptococcus thermophilus* and phosphorylates the lactose transporter LacS as efficiently as HPr(His~P)." *Appl Environ Microbiol* 71: 1364-1372.
 37. Conde, A., G. Diallinas, F. Claumont, M. Chaves, H. Gerós (2010). "Transporters, Channels, or Simple Diffusion? Dogmas, Atypical Roles and Complexity in Transport Systems», *Int J Bioch Cell Biol* 42: 857-868.
 38. Consler, T. G., B. L. Persson, H. Jung, K. H. Zen, K. Jung, G. G. Privé, G. E. Verner and H. R. Kaback (1993). "Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6934-6938.
 39. Dang S., L. Sun, Y. Huang, F. Lu, Y. Liu, H. Gong, J. Wang, N. Yan (2010). "Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation". *Nature* 467: 734-739.
 40. Dean, A.M., and Thornton, J.W. (2007). "Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis." *Nat Rev Genet.* 9:675-88.
 41. de Koning, H. and G. Diallinas (2000). "Nucleobase transporters." *Mol Membr Biol* 17: 75-94.
 42. de Koning, H. P., D. J. Bridges and R. J. Burchmore (2005). "Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy." *FEMS Microbiol Rev* 29: 987-1020.
 43. Desimone, M., E. Catoni, U. Ludewig, M. Hilpert, A. Schneider, R. Kunze, M. Tegeder, W. B. Frommer and K. Schumacher (2002). "A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 14: 847-856.
 44. Diallinas, G. (2008). "Biochemistry. An Almost-Complete Movie". *Science* 322: 1644-1645.
 45. Diallinas, G. and C. Gournas (2008). "Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems." *Channels (Austin)* 2: 363-372.

46. Diallinas, G., J. Valdez, V. Sophianopoulou, A. Rosa and C. Scazzocchio (1998). "Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues." *EMBO J* 17: 3827-3837.
47. Diallinas, G., L. Gorfinkiel, H. N. Arst, Jr., G. Cecchetto and C. Scazzocchio (1995). "Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes." *J Biol Chem* 270: 8610-8622.
48. Diallinas, G., and Scazzocchio, C. (1989). "A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation." *Genetics*. 2:341-50.
49. Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." *Science* 280: 69-77.
50. Elion, G. B. (1993). "Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity." *J Med Virol Suppl* 1: 2-6.
51. Enomoto, A., H. Kimura, A. Chairoungdua, Y. Shigeta, P. Jutabha, S. H. Cha, M. Hosoyamada, M. Takeda, T. Sekine, T. Igarashi, H. Matsuo, Y. Kikuchi, T. Oda, K. Ichida, T. Hosoya, K. Shimokata, T. Niwa, Y. Kanai and H. Endou (2002). "Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels." *Nature* 417: 447-452.
52. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright and J. Abramson (2008). "The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport." *Science* 321: 810-814.
53. Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, and C. Miller (2009). "Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution". *Nature* 460: 1040-1043.
54. Fiedler, S., Broecker, J., and Keller, S. (2010). "Protein folding in membranes." *Cell Mol Life Sci*. 67(11):1779-98.
55. Forrest, L. R. and G. Rudnick (2009). "The Rocking Bundle: A Mechanism for Ion-Coupled Solute Flux by Symmetrical Transporters". *Physiology* 24:377-386.
56. Forrest, L. R., Y. W. Zhang, M. T. Jacobs, J. Gesmonde, L. Xie, B. H. Honig and G. Rudnick (2008). "Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters." *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10338-10343.
57. Forrest, L. R., S. Tavoulari, Y. W. Zhang, G. Rudnick and B. Honig (2007). "Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻-dependent transporters." *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12761-12766.
58. Forrest, L. R., R. Krämer, C. Ziegler (2011). "The structural basis of secondary active transport mechanisms". *Biochim Biophys Acta* 187: 167-188.
59. Franco, P. J. and R. J. Brooker (1994). "Functional roles of Glu-269 and Glu-325 within the lactose permease of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 269: 7379-7386.
60. Freeman, C. D., D. P. Nicolau, P. P. Belliveau and C. H. Nightingale (1993). "Lomefloxacin clinical pharmacokinetics." *Clin Pharmacokinet* 25: 6-19.
61. Frei, B., L. England and B. N. Ames (1989). "Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma." *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6377-6381.

62. Frillingos, S., M. Sahin-Toth, J. Wu and H. R. Kaback (1998). "Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins." *FASEB J* 12: 1281-1299.
63. Frillingos, S. and H. R. Kaback (1997). "The role of helix VIII in the lactose permease of *Escherichia coli*: II. Site-directed alkylation." *Protein Sci* 6: 438-443.
64. Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang, Y. Shi (2009). "Structure and Mechanism of an Amino Acid Antiporter". *Science* 324: 1565-1568.
65. Georgopoulou, E., G. Mermelekas, E. Karena, S. Frillingos (2010). "Purine Substrate Recognition by the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in the YgfO Xanthine Permease". *J Biol Chem* 285: 19422-19433.
66. Gibbs, P., D. Handolias, S. McLaughlin, M. Chapman, J. Johns and I. Faragher (2008). "Single-institution experience of adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy for stage III colon cancer." *Intern Med J* 38: 265-269.
67. Gillissen, B., L. Burkle, B. Andre, C. Kuhn, D. Rentsch, B. Brandl and W. B. Frommer (2000). "A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 12: 291-300.
68. Gnann, J. W., Jr., N. H. Barton and R. J. Whitley (1983). "Acyclovir: mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications." *Pharmacotherapy* 3: 275-283.
69. Gorfinkiel, L., G. Diallinas and C. Scazzocchio (1993). "Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*." *J Biol Chem* 268: 23376-23381
70. Goudela, S., U. Reichard, S. Amillis and G. Diallinas (2008). "Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*." *Fungal Genet Biol* 45: 459-472.
71. Goudela, S., H. Tsilivi and G. Diallinas (2006). "Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families." *Mol Membr Biol* 23: 291-303.
72. Goudela, S., P. Karatza, M. Koukaki, S. Frillingos and G. Diallinas (2005). "Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family." *Mol Membr Biol* 22: 263-275.
73. Gournas, C., I. Papageorgiou and G. Diallinas (2008). "The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role." *Mol Biosyst* 4: 404-416.
74. Granseth, E., D. O. Daley, M. Rapp, K. Melen and G. von Heijne (2005). "Experimentally constrained topology models for 51,208 bacterial inner membrane proteins." *J Mol Biol* 352: 489-494.
75. Griesser, H. W., B. Müller-Hill and P. Overath (1983). "Characterization of beta-galactosidase-lactose-permease chimeras of *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 137: 567-572.
76. Griffiths, M., N. Beaumont, S. Y. Yao, M. Sundaram, C. E. Boumah, A. Davies, F. Y. Kwong, I. Coe, C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (1997a). "Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs." *Nature Med* 3: 89-93.
77. Griffiths, M., S. Y. Yao, F. Abidi, S. E. Phillips, C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (1997b). "Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta." *Biochem J* 328: 739-743.

78. Guan, L. and H. R. Kaback (2006). "Lessons from lactose permease." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 67-91.
79. Guan, L., O. Mirza, G. Verner, S. Iwata and H. R. Kaback (2007). "Structural determination of wild-type lactose permease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15294-15298.
80. Hamari, Z., S. Amillis, C. Drevet, A. Apostolaki, C. Vagvolgyi, G. Diallinas, and C. Scazzocchio (2009). "Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*." *Mol. Microbiol.* 73, 43-57.
81. Harms, M.J., and Thornton, J.W. (2010). "Analysing protein structure and function using ancestral gene reconstruction." *Curr Opin Struct Biol.* 3:360-6.
82. Hatanaka, T., Y. Kihira, Y. Shinohara, E. Majima and H. Terada (2001). "Characterization of loops of the yeast mitochondrial ATP/ADP carrier facing the cytosol by site-directed mutagenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 286: 936-942.
83. Hediger, M. A. (2002a). "Kidney function: gateway to a long life?" *Nature* 417: 393-395.
84. Hediger, M. A. (2002b). "New view at C." *Nature Med* 8: 445-446.
85. Henry, L.K., Field, J.R., Adkins, E.M., Parnas, M.L., Vaughan, R.A., Zou, M.F., Newman, A.H., Blakely, R.D (2006). "Tyr-95 and Ile-172 in Transmembrane Segments 1 and 3 of Human Serotonin Transporters Interact to Establish High Affinity Recognition of Antidepressants". *J Biol Chem* 281: 2012-2023.
86. 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.* 1:51-9
87. Huang, Y., M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer and D. N. Wang (2003). "Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*." *Science* 301: 616-620.
88. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996). "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J.Molec. Graphics*, 14: 33-38.
89. Hunte, C., E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimon, E. Padan, H. Michel (2005). "Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH". *Nature* 435: 1197-1202.
90. Huntley, S. A., D. Krofchick and M. Silverman (2006). "A glutamine to glutamate mutation at position 170 (Q170E) in the rabbit Na^+ /glucose cotransporter, rSGLT1, enhances binding affinity for Na^+ ." *Biochemistry* 45: 4653-4663.
91. Huntley, S. A., D. Krofchick and M. Silverman (2004). "Position 170 of rabbit Na^+ /glucose cotransporter (rSGLT1) lies in the Na^+ pathway; modulation of polarity/charge at this position regulates charge transfer and carrier turnover." *Biophys J* 87: 295-310.
92. Hwang, J. T., J. Ha and O. J. Park (2005). "Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways." *Biochem Biophys Res Commun* 332: 433-440.
93. Hyde, R. J., C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (2001). "The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms." *Mol Membr Biol* 18: 53-63.

94. Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96: 23-28.
95. James, L.C., and Tawfik, D.S. (2003). "The specificity of cross - reactivity: Promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness." *Protein Sci.* 10:2183-93.
96. Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee and R. MacKinnon (2003). "The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* 423: 42-48.
97. Johansen, L. E., P. Nygaard, C. Lassen, Y. Agerso and H. H. Saxild (2003). "Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL)." *J Bacteriol* 185: 5200-5209.
98. Joost, H. G. and B. Thorens (2001). "The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members." *Mol Membr Biol* 18: 247-256.
99. Jormakka, M., S. Tornroth, B. Byrne, S. Iwata (2002). "Molecular Basis of Proton Motive Force Generation: Structure of Formate Dehydrogenase-N". *Science* 295: 1863-181868.
100. Kaback, H. R., I. Smirnova, V. Kasho, Y. Nie, Y. Zhou (2011). "The Alternating Access Transport Mechanism in LacY". *J Membr Biol* *In press*.
101. Kaback, H.R., Dunten, R., Frillingos, S., Venkatesan P., Kwaw I., Zhang W., Ermolova N. (2007). "Site-directed Alkylation and the Alternating Access Model for LacY". *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 491-494.
102. Kafasla, P., D. Bouzarelou, S. Frillingos and V. Sophianopoulou (2007). "The proline permease of *Aspergillus nidulans*: functional replacement of the native cysteine residues and properties of a cystein-less transporter." *Fungal Genet Biol* 44: 615-626.
103. Karatza, P. and S. Frillingos (2005). "Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*." *Mol Membr Biol* 22: 251-261.
104. Karatza, P., P. Panos, E. Georgopoulou and S. Frillingos (2006). "Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix." *J Biol Chem* 281: 39881-39890.
105. Karena, E. and S. Frillingos (2009). "Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: His-31 and Asn-93 are crucial for affinity and specificity, Asp-304 and Glu-272 are irreplaceable." *J Biol Chem* 284, 24257-24268.
106. Kato, R., T. Maeda, T. Akaike and I. Tamai (2006). "Characterization of novel Na⁺-dependent nucleobase transport systems at the blood-testis barrier." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E968-975.
107. Kavanaugh, M. P. (2004) "Accessing a transporter structure". *Nature* 431 752-753.
108. Khersonsky, O., Roodveldt, C., and Tawfik, D.S. (2006). "Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects." *Curr Opin Chem Biol.* 5:498-508.
109. Kiss, A., K. Farah, J. Kim, R. J. Garriock, T. A. Drysdale and J. R. Hammond (2000). "Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain." *Biochem J* 352: 363-372.

110. Kong, W., K. Engel and J. Wang (2004). "Mammalian nucleoside transporters." *Curr Drug Metab* 5: 63-84.
111. 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.
112. Kosti, V., I. Papageorgiou, G. Diallinas (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: 1132-1143.
113. Koukaki, M., A. Vlanti, S. Goudela, A. Pantazopoulou, H. Gioule, S. Tournaviti and G. Diallinas (2005). "The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway." *J Mol Biol* 350: 499-513.
114. Kumar, S., Dudley, J., Nei, M. and Tamura, K. (2008). "MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences." *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
115. Landfear, S.M. (2009). "Transporters for Drug Delivery and as Drug Targets in Parasitic Protozoa". *Clin Pharmacol Ther* 87: 122-125.
116. Landfear, S. M. (2010). "Transporters for drug delivery and as drug targets in parasitic protozoa." *Clin Pharmacol Ther*. 1:122-5
117. Landfear, S. M., B. Ullman, N. S. Carter and M. A. Sanchez (2004). "Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa." *Eukaryot Cell* 3: 245-254.
118. Lemieux, M. J., Y. Huang and D. N. Wang (2004). "The structural basis of substrate translocation by the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily." *Curr Opin Struct Biol* 14: 405-412.
119. Liu, W., J. M. Boitz, J. Galazka, C. S. Arendt, N. S. Carter and B. Ullman (2006). "Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*." *Mol Biochem Parasitol* 150: 300-307.
120. Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh and P. Matsudaira (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco
121. Loh, K. D., P. Gyaneshwar, E. Markenscoff-Papadimitriou, R. Fong, K.-S. Kim, R. Parales, Z. Zhou, W. Inwood and S. Kustu (2006). "A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism". *Proc. atl. Acad. Sci. USA* 103: 5114-5119.
122. Lolkema, J. S. and B. Poolman (1995). "Uncoupling in secondary transport proteins. A mechanistic explanation for mutants of lac permease with an uncoupled phenotype." *J Biol Chem* 270: 12670-12676.
123. Loo, T. W. and D. M. Clarke (1995). "Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein." *J Biol Chem* 270: 843-848.
124. Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Deng, D., Dang, S., Zhang, X., Wang, J., and Yan, N. (2011). "Structure and mechanism of the uracil transporter UraA." *Nature*. 472(7342):243-6.
125. Mansfield, T. A., N. P. Schultes and G. S. Mourad (2009). "AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*." *FEBS Lett* 583: 481-486.

126. Markowitz, V. M., E. Szeto, K. Palaniappan, Y. Grechkin, K. Chu, I.-M. A. Chen, I. Dubchak, I. Anderson, A. Lykidis, K. Mavromatis, N. N. Ivanova and N. C. Kyrpides (2008). "The integrated microbial genomes (IMG) system in 2007: data content and analysis tools extensions." *Nucleic Acids Res* 36: D528-D533.
127. Martinussen, J., J. Schallert, B. Andersen and K. Hammer (2001). "The pyrimidine operon pyrRPB-carA from *Lactococcus lactis*." *J Bacteriol* 183: 2785-2794.
128. Maser, P., C. Sutterlin, A. Kralli and R. Kaminsky (1999). "A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance." *Science* 285: 242-244.
129. Matthews, T. and R. Boehme (1988). "Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir." *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3: S490-494.
130. Maurino, V. G., E. Grube, J. Zielinski, A. Schild, K. Fischer and U. I. Flugge (2006). "Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* 47: 1381-1393.
131. Maynes, J.T., Yuan, R.G., Snyder, F.F (2000). "Identification, Expression, and Characterization of *Escherichia coli* Guanine Deaminase". *J Bacteriol* 182: 4658-4660.
132. Meintanis, C., A. D. Karagouni and G. Diallinas (2000). "Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family." *Mol Membr Biol* 17: 47-57.
133. Mermelekas, G., E. Georgopoulou, A. Kallis, M. Botou, V. Vlantos, S. Frillingos (2010). "Cysteine-scanning Analysis of Helices TM8, TM9a, and TM9b and Intervening Loops in the YgfO Xanthine Permease". *J Biol Chem* 285: 35011-35020.
134. Mesnil, M. and H. Yamasaki (2000). "Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication." *Cancer Res* 60: 3989-3999.
135. Mirza, O., L. Guan, G. Verner, S. Iwata and H. R. Kaback (2006). "Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY." *EMBO J* 25: 1177-1183.
136. Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." *Nature* 450: 1043-1049.
137. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto and A. Yamaguchi (2006). "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." *Nature* 443: 173-179.
138. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." *Nature* 419: 587-593.
139. Muralidhara, B.K., Sun, L., Negi, S., and Halpert, J.R. (2008). "Thermodynamic fidelity of the mammalian cytochrome P450 2B4 active site in binding substrates and inhibitors." *J Mol Biol.* 377(1):232-45.
140. Newman, M. J., D. L. Foster, T. H. Wilson and H. R. Kaback (1981). "Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 256: 11804-11808.

141. Nicholas, L. M., A. L. Ford, S. M. Esposito, R. D. Ekstrom and R. N. Golden (2003). "The effects of mirtazapine on plasma lipid profiles in healthy subjects." *J Clin Psychiatry* 64: 883-889.
142. Nie, Y., Y. Zhou and H. R. Kaback (2009). "Clogging the periplasmic pathway in LacY." *Biochemistry* 48: 738-743.
143. Nikaido, H. (2000). "How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells?" *Trends Microbiol* 8: 481-483.
144. Nygaard, P., S. M. Bested, K. A. Andersen and H. H. Saxild (2000). "Bacillus subtilis guanine deaminase is encoded by the yknA gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source." *Microbiology* 146: 3061-3069.
145. Nyyssonen, K., E. Porkkala-Sarataho, J. Kaikkonen and J. T. Salonen (1997). "Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men." *Atherosclerosis* 130: 223-233.
146. Ortiz, D., M. A. Sanchez, H. P. Koch, H. P. Larsson and S. M. Landfear (2009). "An acid-activated nucleobase transporter from *Leishmania major*." *J Biol Chem* 284: 16164-16169.
147. Ortiz, D., M. A. Sanchez, S. Pierce, T. Herrmann, N. Kimblin, H. G. Archie Bouwer and S. M. Landfear (2007). "Molecular genetic analysis of purine nucleobase transport in *Leishmania major*." *Mol Microbiol* 64: 1228-1243.
148. 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(5844):1544-8.
149. Pantazopoulou, A. and G. Diallinas (2007). "Fungal nucleobase transporters." *FEMS Microbiol Rev* 31: 657-675.
150. Pantazopoulou, A. and G. Diallinas (2006). "The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport." *Mol Membr Biol* 23: 337-348.
151. Papageorgiou, I., C. Gournas, A. Vlanti, S. Amillis, A. Pantazopoulou and G. Diallinas (2008). "Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers." *J Mol Biol* 382: 1121-1135.
152. Papageorgiou, I. G., H. P. De Koning, K. Soteriadou, G. Diallinas (2008). "Kinetic and mutational analysis of the *Trypanosoma brucei* NBT1 nucleobase transporter expressed in *Saccharomyces cerevisiae* reveals structural similarities between ENT and MFS transporters". *Parasitology* 38: 641-653.
153. Papageorgiou, I. G., L. Yakob, M. I. Al Salabi, G. Diallinas, K. P. Soteriadou and H. P. De Koning (2005). "Identification of the first pyrimidine nucleobase transporter in *Leishmania*: similarities with the *Trypanosoma brucei* U1 transporter and antileishmanial activity of uracil analogues." *Parasitology* 130: 275-283.
154. Papakostas, K., Georgopoulou E., Frillingos S. (2008). "Cysteine-Scanning Analysis of Putative Helix XII in the YgfO Xanthine Permease: Ile-432 and Asn-430 are Important". *J Biol Chem* 283: 13666-13678.
155. Pea, F. (2005). "Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions." *Contrib Nephrol* 147: 35-46.
156. Pebay-Peyroula, E., C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trezeguet, G. J. Lauquin and G. Brandolin (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." *Nature* 426: 39-44.

157. Perez-Garcia, M.T., N. Chiamvimonvat, E. Marban, G.F. Tomaselli (1996). "Structure of the Sodium Channel Pore Revealed by Serial Cysteine Mutagenesis". *Physiology* 93: 300-304.
158. Poolman, B., E. R. Geerstma, and D. J. Slotboom (2007). "Biochemistry: a missing link in protein evolution". *Science* 315: 1229-1231.
159. Raunser, S., M. Appel, C. Ganea, U. Geldmacher-Kaufer, K. Fendler and W. Kuhlbrandt (2006). "Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshii*." *Biochemistry* 45: 12796-12805.
160. Ren, Q., K. H. Kang and I. T. Paulsen (2004). "TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems." *Nucleic Acids Res* 32: D284-288.
161. Ressler, S., A. C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vonrhein, V. Ott and C. Ziegler (2009). "Molecular basis of transport and regulation in the Na(+)/betaine symporter BetP." *Nature* 458: 47-52.
162. Shinoda, T., H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima (2009). "Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution." *Nature* 459: 446-450.
163. Rudnick, G. (2006). "What is an antidepressant binding site doing in a bacterial transporter?". *ACS Chem Biol* 2, 606-609.
164. Ryan, R. M., E. L. Compton and J. A. Mindell (2009). "Functional characterization of a Na⁺-dependent aspartate transporter from *Pyrococcus horikoshii*." *J Biol Chem* 284: 17540-17548.
165. Sahin-Tóth, M., S. Frillingos, J. W. Lengeler and H. R. Kaback (1995b). "Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12." *Biochem Biophys Res Commun* 208: 1116-1123.
166. Saier, M. H., R. N. Hvorup and R. D. Barabote (2005). "Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators." *Biochem Soc Trans* 33: 220-224.
167. Saier, M. H., Jr. (2000). "Families of transmembrane sugar transport proteins." *Mol Microbiol* 35: 699-710.
168. Saier, M. H., Jr., C. V. Tran and R. D. Barabote (2006). "TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information." *Nucleic Acids Res* 34: D181-186.
169. Saier, M. H., Yen, M. R., Noto K., Tamang T.G., Elkan C. (2009). "The Transporter Classification Database: recent advances" *Nucleic Acids Res* 37: D274-278.
- Santos, C.X.C., E.I. Anjos, O. Augusto (1999). "Uric Acid Oxidation by Peroxynitrite: Multiple Reactions, Free Radical Formation, and Amplification of Lipid Oxidation". *Arch Biochem Biophys* 372: 285-294.
170. Sato, Y., Y. W. Zhang, A. Androutsellis-Theotokis and G. Rudnick (2004). "Analysis of transmembrane domain 2 of rat serotonin transporter by cysteine scanning mutagenesis." *J Biol Chem* 279: 22926-22933.
171. Scazzocchio, C. (1994). "The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation." *Prog Ind Microbiol* 29: 221-257.
172. Schroers, A., R. Kramer and H. Wohlrab (1997). "The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine." *J Biol Chem* 272: 10558-10564.
173. Schultz, A. C., P. Nygaard and H. H. Saxild (2001). "Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and

- evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator." *J Bacteriol* 183: 3293-3302.
174. Seok, Y. J., M. Sondej, P. Badawi, M. S. Lewis, M. C. Briggs, H. Jaffe and A. Peterkofsky (1997). "High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr." *J Biol Chem* 272: 26511-26521.
 175. Sevanian, A., K. J. Davies and P. Hochstein (1991). "Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid." *Am J Clin Nutr* 54: 1129S-1134S.
 176. Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, E. Gouaux (2009). "Structure and Mechanism of a Na⁺-Independent Amino Acid Transporter". *Science* 325:1010-1014.
 177. Shimamura, T., S. Weyand, O. Beckstein, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, D. Sharples, M. S. P. Sansom, S. Iwata, P. J. F. Henderson, A. D. Cameron (2010). "Molecular Basis of Alternating Access Membrane Transport by the Sodium-Hydantoin Transporter Mhp1". *Science* 328: 470-473
 178. Singh, S. K. (2008). "LeuT: a prokaryotic stepping stone on the way to a eukaryotic neurotransmitter structure." *Channels (Austin)* 2: 380-389.
 179. Singh, S. K., C. L. Piscitelli, A. Yamashita and E. Gouaux (2008). "A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation." *Science* 322: 1655-1661.
 180. Singh, S. K., A. Yamashita and E. Gouaux (2007). "Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters." *Nature* 448: 952-956.
 181. Skopalik, J., Anzenbacher, P., and Otyepka, M. (2008). "Flexibility of human cytochromes P450: molecular dynamics reveals differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which correlate with their substrate preferences." *J Phys Chem B*. 112(27):8165-73.
 182. Slotboom, D. J., W. N. Konings and J. S. Lolkema (1999). "Structural features of the glutamate transporter family." *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 293-307.
 183. Smirnova, I. N. and H. R. Kaback (2003). "A mutation in the lactose permease of *Escherichia coli* that decreases conformational flexibility and increases protein stability." *Biochemistry* 42: 3025-3031.
 184. Sondej, M., A. B. Weinglass, A. Peterkofsky and H. R. Kaback (2002). "Binding of enzyme IIAGlc, a component of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system, to the *Escherichia coli* lactose permease." *Biochemistry* 41: 5556-5565.
 185. Sondej, M., J. Sun, Y. J. Seok, H. R. Kaback and A. Peterkofsky (1999). "Deduction of consensus binding sequences on proteins that bind IIAGlc of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by cysteine scanning mutagenesis of *Escherichia coli* lactose permease." *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3525-3530.
 186. Sorgen, P.L., Hu Y., Kaback H.R., Girvin M.E. (2002). "An Approach to Membrane Protein Structure Without Crystals". *Proc Natl Acad Sci USA* 22: 14037-14040.
 187. Stroud, R. M., S. Choe, J. Holton, H. R. Kaback, W. Kwiatkowski, D. L. Minor, R. Riek, A. Sali, H. Stahlberg and W. Harries (2009). "Annual progress report synopsis of the Center for Structures of Membrane Proteins." *J Struct Funct Genomics* 10: 193-208.
 188. Tamura, N., S. Konishi, S. Iwaki, T. Kimura-Someya, S. Nada and A. Yamaguchi (2001). "Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-

- directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter." *J Biol Chem* **276**: 20330-20339.
189. Tavoulari, S. and S. Frilingos (2008). "Substrate selectivity of the melibiose permease (MelY) from *Enterobacter cloacae*." *J Mol Biol* **76**: 681–693
 190. Tavoulari, S., L. Forrest and G. Rudnick (2009). "Fluoxetine (Prozac) binding to serotonin transporter is modulated by chloride and conformational changes." *J Neurochem* **29**:9635-9643.
 191. Tavoulari, S., A. N. Rizwan, L. R. Forrest, G. Rudnick (2011). "Reconstructing a Chloride Binding site in a Bacterial Neurotransmitter Transporter Homologue". *J Biol Chem* **286**: 2834-2842.
 192. Tchieu, J. H., V. Norris, J. S. Edwards and M. H. Saier, Jr. (2001). "The complete phosphotranferase system in *Escherichia coli*." *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 329-346.
 193. Thanassi, D. G., L. W. Cheng and H. Nikaido (1997). "Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **179**: 2512-2518.
 194. Thornton, J.,W. (2004). "Resurrecting ancient genes: experimental analysis of extinct molecules." *Nat Rev Genet.* (5):366-75.
 195. Tokuriki, N., and Tawfik, D.S. (2009). "Protein dynamism and evolvability" *Science* **324**(5924):203-7
 196. Traxler, B., D. Boyd and J. Beckwith (1993). "The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins." *J Membr Biol* **132**: 1-11.
 197. Tsukaguchi, H., T. Tokui, B. Mackenzie, U. V. Berger, X. Z. Chen, Y. Wang, R. F. Brubaker and M. A. Hediger (1999). "A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters." *Nature* **399**: 70-75.
 198. Unkles, S. E., D. A. Rouch, Y. Wang, M. Y. Siddiqi, M. Okamoto, R. M. Stephenson, J. R. Kinghorn and A. D. Glass (2005). "Determination of the essentiality of the eight cysteine residues of the NrtA protein for high-affinity nitrate transport and the generation of a functional cysteine-less transporter." *Biochemistry* **44**: 5471-5477.
 199. Valdes, R., S. Arastu-Kapur, S. M. Landfear, U. Shinde (2009). "An *ab Initio* Structural Model of a Nucleoside Permease Predicts Functionally Important Residues". *J Biol Chem* **284**: 19067-19076.
 200. van Geest, M. and J. S. Lolkema (2000). "Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 13-33
 201. van Iwaarden, P. R., J. C. Pastore, W. N. Konings and H. R. Kaback (1991). "Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues." *Biochemistry* **30**: 9595-9600.
 202. Varma, S., C. E. Campbell and S.-M. Kuo (2008). "Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters." *Biochemistry* **47**: 2952-2960.
 203. Viitanen, P., M. J. Newman, D. L. Foster, T. H. Wilson and H. R. Kaback (1986). "Purification, reconstitution, and characterization of the lac permease of *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* **125**: 429-452.
 204. Vlanti, A., and Diallinas G. (2008). " The *Aspergillus nidulans* FcyB Cytosine-purine Scavenger is Highly Expressed During Germination and in Reproductive Compartments and is Downregulated by Endocytosis". *Mol Microbiol* **68**: 959-977.

205. Vlanti, A., S. Amillis, M. Koukaki and G. Diallinas (2006). "A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter." *J Mol Biol* 357: 808-819.
206. Weber, E., C. Rodriguez, M. R. Chevallier and R. Jund (1990). "The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product." *Mol Microbiol* 4: 585-596.
207. Weinglass AB, Sondej M, Kaback HR. (2002). "Manipulating conformational equilibria in the lactose permease of *Escherichia coli*." *J Mol Biol.* 4:561-71.
208. Weinglass, A.B., Smirnova, I.N., Kaback, H.R. (2001). "Engineering conformational flexibility in the lactose permease of *Escherichia coli*: use of glycine-scanning mutagenesis to rescue mutant Glu325-->Asp." *Biochemistry.* 3:769-76.
209. Weinglass, A.B., and Kaback, H.R. (1999). "Conformational flexibility at the substrate binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20:11178-82.
210. Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E. P. Carpenter, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, J. O'Reilly, P. Ma, M. Saidijam, S. G. Patching, R. J. Hope, H. T. Norbertczak, P. C. Roach, S. Iwata, P. J. Henderson and A. D. Cameron (2008). "Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter." *Science* 322: 709-713.
211. White, S.H., and Wimley, W.C. (1999). "Membrane protein folding and stability: physical principles." *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 28:319-65.
212. Wright, E. M., B. A. Hirayama and D. F. Loo (2007). "Active sugar transport in health and disease." *J Intern Med* 261: 32-43.
213. Xi, H., B. L. Schneider and L. Reitzer (2000). "Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage." *J Bacteriol* 182: 5332-5341.
214. Yagur-Kroll, S. and O. Amster-Choder (2005). "Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* beta-glucoside transporter BglF." *J Biol Chem* 280: 19306-19318.
215. Yamamoto, S., Inoue K., Murata T., Kamigaso S., Yasujima T., Maeda J.Y., Yoshida Y., Ohta K.Y., 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.
216. Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin and E. Gouaux (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters." *Nature* 437: 215-223.
217. Yao, S. Y., A. M. Ng, M. F. Vickers, M. Sundaram, C. E. Cass, S. A. Baldwin and J. D. Young (2002). "Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation." *J Biol Chem* 277: 24938-24948.
218. Yao, S. Y., A. M. Ng, W. R. Muzyka, M. Griffiths, C. E. Cass, S. A. Baldwin and J. D. Young (1997). "Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei)

- equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues." *J Biol Chem* 272: 28423-28430.
219. Ye, L., Z. Jia, T. Jung and P. C. Maloney (2001). "Topology of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, determined by site-directed fluorescence labeling." *J Bacteriol* 183: 2490-2496.
 220. Yernool, D., O. Boudker, Y. Jin and E. Gouaux (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." *Nature* 431: 811-818.
 221. Yin, Y., He X., Szewczyk P., Nguyen T., Chang G (2006). "Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*". *Science* **312**: 741-743.
 222. Yousef, M.S., and Guan, L. (2009). "A 3D structure model of the melibiose permease of *Escherichia coli* represents a distinctive fold for Na⁺ symporters." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 36:15291-6.
 223. Zampighi, G., J. Kyte and W. Freytag (1984). "Structural organization of (Na⁺ + K⁺)-ATPase in purified membranes." *J Cell Biol* 98: 1851-1864.
 224. Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (1999). "Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7190-7195.
 225. Zhao, F. Q. and A. F. Keating (2007). "Functional properties and genomics of glucose transporters." *Curr Genomics* **8**: 113-128
 226. Zhou, Y., L. Guan, J. A. Freitas and H. R. Kaback (2008). "Opening and closing of the periplasmic gate in lactose permease." *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3774-3778.
 227. Zhou, Z., J. Zhen, N. K. Karpowich, C. J. Law, M. E. Reith, and D. N. Wang (2009). "Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT-SSRI structures." *Nature Struct Mol Biol* 16: 652-657.
 228. Zhou, Z., J. Zhen, N. K. Karpowich, R. M. Goetz, C. J. Law, M. E. Reith, and D. N. Wang (2007). "LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake." *Science* 317: 1390-1393.
 229. Zomot, E., Zhou Y., Kanner B.I.(2005)" Proximity of Transmembrane Domains 1 and 3 of the Gamma-aminobutyric Acid Transporter GAT-1 Inferred From Paired Cysteine Mutagenesis". *J Biol Chem* 280: 25512-25516.
 230. Zomot, E., A. Bendahan, M. Quick, Y. Zhao, J. A. Javitch and B. I. Kanner (2007). "Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters." *Nature* 449: 726-730.
 231. Καρατζά, Π. (2006). Ανάπτυξη ενός πρότυπου βακτηριακού συστήματος για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT transporters). Διδακτορική διατριβή, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Βιοτεχνολογία", Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 232. Καρενά, Α. (2007). Ο ρόλος των διαμεμβρανικών καταλοίπων Arg, Asp, Glu, His, Lys στον μεταφορέα ξανθίνης YgfO. Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Βιοτεχνολογία", Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
 233. Καρλετίδης, Γ. (2010). Εξελικτικές συσχετίσεις Στην οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (NAT). Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
 234. Μερμελέκας, Γ. (2009). Υπερέκφραση-καθαρισμός και μελέτη σχέσεων δομής- λειτουργίας των μεταφορέων NAT σε πρότυπο βακτηριακό σύστημα.

Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

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

