



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Δομική και Λειτουργική Οργάνωση των
Διαμεμβρανικών Ελίκων στους Μεταφορείς
Πουρινών της Οικογένειας NAT**

**Καρενά – Ευσταθίου Αικατερίνη
(Μαθηματικός – Μ.Δ.Ε. Βιοτεχνολογίας)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Δομική και Λειτουργική Οργάνωση των
Διαμεμβρανικών Ελίκων στους Μεταφορείς
Πουρινών της Οικογένειας NAT**

Καρενά – Ευσταθίου Αικατερίνη
(Μαθηματικός – Μ.Δ.Ε. Βιοτεχνολογίας)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Ιωάννινα 2014

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

Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» της κ. Καρενά –Ευσταθίου Αικατερίνη: 15-4-2008

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 15-4-2008 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία».

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Φριλίγγος Ευστάθιος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων επιβλέπων

Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

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

Ορισμός Θέματος: 15-4-2008

«Δομική και Λειτουργική οργάνωση των διαμεμβρανικών ελίκων στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: 11-7-2014

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Διαλλινάς Γεώργιος	Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκκου Άννα –Ειρήνη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-8-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Φωτόπουλος Ανδρέας

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος της Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην «Βιοτεχνολογία». Η έρευνα αυτή έχει συγχρηματοδοτηθεί από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ερευνητικό χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II).

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ της συντονιστικής επιτροπής του ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία», που μου έδωσαν την ευκαιρία της συμμετοχής μου στο πρόγραμμα, αλλά και όλους τους διδάσκοντες του προγράμματος για την πολύτιμη βοήθειά τους. Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής και ιδιαίτερα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Διαλλινά και την Αν. Καθηγήτρια κ. Αναστασία Πολίτου για την αποτελεσματική συνεργασία τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με καθοδήγησε στην πρακτική και θεωρητική κατάρτισή μου στο αντικείμενο της μελέτης του με αμείωτο ενδιαφέρον από την αρχή της παρουσίας μου εκεί μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας μου. Η υπομονή και η αδιάκοπη βοήθειά του ήταν καθοριστική για την εισαγωγή μου σε μία νέα για μένα επιστήμη, ενώ οι συνεχείς υποδείξεις του ήταν αυτές που με οδήγησαν ερευνητικά προς την σωστή κατεύθυνση αρχικά στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου ειδίκευσης και έπειτα για την υλοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής. Σημαντική ήταν για μένα και η ενθάρρυνση του στην απόφασή μου να φοιτήσω ταυτόχρονα με την υλοποίηση της διδακτορικής μου έρευνας στο τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την περαιτέρω κατάρτισή μου και τον ευχαριστώ γι αυτό.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας και των υπόλοιπων ερευνητικών ομάδων που συναναστράφηκα στο χώρο του πανεπιστημίου. Πολύ σημαντική και πολύτιμη ήταν η συνεργασία μου με όλους τους υπόλοιπους ερευνητές του εργαστηρίου που εργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια, όπως με τους διδάκτορες κ. Γ. Μερμελέκα και κ. Κων. Παπακώστα, αλλά και η εποικοδομητική εργασία

μου με την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Αικ. Τατσάκη για την εκπόνηση της πτυχιακής και της μεταπτυχιακής της διατριβής. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτορα κ. Αικ. Γεωργοπούλου, η οποία με τις πολύτιμες συμβουλές της συνέβαλε αποτελεσματικά στην αρχική προσαρμογή μου στο εργαστήριο καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία Μπότου για την μοναδική καθημερινή βοήθειά της, με την οποία συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της δουλειάς μου.

Θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου γιατί είναι αυτοί που μου έμαθαν από νωρίς να αναζητώ την γνώση και με πείσμα και υπομονή να μην εγκαταλείπω την προσπάθεια προς την κατάκτησή της έχοντας ως αρωγό όχι μόνο την αγάπη τους αλλά και την ουσιαστική στήριξή τους και στην αδερφή μου που είναι κοντά μου όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Τέλος ευχαριστώ όλους όσους με το αμείωτο ενδιαφέρον και την αγάπη τους ενθαρρύνουν τις επιλογές μου με τρόπο μοναδικό και αναντικατάστατο, ώστε να τους θεωρώ πολύτιμους στην ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή	
1.1	Η σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων	21
1.1.1	Ο βιολογικός ρόλος των νουκλεοτιδικών βάσεων	21
1.1.2	Η χρήση των νουκλεοτιδικών βάσεων στην φαρμακολογία	24
1.1.3	Ο μεταβολισμός των νουκλεοτιδικών βάσεων	27
1.1.3.1	Οι πορείες μεταβολισμού πουρινικών βάσεων	27
1.1.3.2	Αξιοποίηση των πουρινών σε βακτηριακά συστήματα	31
1.2	Πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων	34
1.2.1	Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων	35
1.2.2	Δομικά πρότυπα μεταφορέων δευτερογενούς τύπου	39
1.2.2.1	Η περμεάση λακτόζης LacY ως δομικό πρότυπο	39
1.2.2.2	Δομικό πρότυπο στην οικογένεια NCS1	42
1.2.2.3	Η πρώτη κρυσταλλική δομή στην οικογένεια NCS2	44
1.3	Η περμεάση ξανθίνης XanQ του εντεροβακτηρίου <i>E.coli</i>	50
1.3.1	Μελέτη ολόκληρων διαμεμβρανικών τμημάτων	50
1.3.2	Χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας που έχουν μελετηθεί λειτουργικά	53
1.3.3	Χαρτογράφηση καταλοίπων για τον προσδιορισμό της τοπολογικής οργάνωσης της περμεάσης XanQ	57
1.4	Πολικά και ιοντιζόμενα κατάλοιπα αμινοξέων σε διαμεμβρανικά τμήματα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς	59
1.5	Τρόποι μελέτης φυσικών γειτνιασέων σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς	64
1.5.1	Δημιουργία κέντρων συντονισμού με δισθενή ιόντα	64
1.5.2	Σταυρωτή αλληλοσύνδεση (cross-linking) καταλοίπων κυστεϊνών	65
1.5.2.1	Σταυρωτή αλληλοσύνδεση δομικώς αυτοτελών περιοχών αλληλουχίας	66
1.5.2.2	Εισαγωγή αλληλουχιών αναγνώρισης πρωτεασών	67
1.5.2.3	Ειδική πρωτεόλυση με βρωμιούχο κυάνιο	68
1.5.2.4	Πρωτεολυτική πέψη με χρήση θρουψίνης	69
1.6	Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	71

2.	Υλικά και Μέθοδοι	
2.1	Εργαστηριακός εξοπλισμός - Όργανα εργαστηρίου	75
2.2	Χημικά Αναλώσιμα	79
2.3	Διαλύματα	85
2.4	Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	89
2.5	Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	93
2.5.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)	93
2.5.2	Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασύνδεση)	98
2.5.3	Παρασκευή κυττάρων επιδεικτικών μετασχηματισμού	99
2.5.4	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	99
2.6	Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων	101
2.7	Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	102
2.8	Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων	103
2.9	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς	105
2.9.1	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα	105
2.9.2	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα για κινητική ανάλυση	106
2.9.3	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα παρουσία μη σημασμένων αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων	106
2.9.4	Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων	106
2.9.5	Επίδραση διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού σταυρωτής αλληλοσύνδεσης	107
2.9.6	Επίδραση αναγωγικού παράγοντα (DTT)	108
2.9.7	Επίδραση διλειτουργικών αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (απουσία και παρουσία αναγωγικού παράγοντα)	109
2.9.8	Επίδραση χλωριούχου καδμίου (CdCl ₂)	110
2.9.9	Επίδραση διλειτουργικών αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης παρουσία και απουσία χλωριούχου καδμίου (CdCl ₂)	110
2.9.10	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε διάφορα pH	110
2.10	Αναλύσεις πρωτεϊνών	111
2.10.1	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA	111
2.10.2	Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	111
2.10.3	Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	111

2.11	Χημική πρωτεόλυση κλάσματος μεμβρανών με βρωμιούχο κυάνιο (CNBr)	113
2.12	Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών <i>in vivo</i>	114
2.13	Δοκιμασία σταυρωτής αλληλοσύνδεσης κυστεϊνών (cross linking assay)	117
2.13.1	Σταυρωτή αλληλοσύνδεση με διλειτουργικά αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού σε μεμβρανικά κυστίδια	117
2.13.2	Σταυρωτή αλληλοσύνδεση με διλειτουργικά αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού σε συνδυασμό με επίδραση θρυψίνης σε μεμβρανικά κυστίδια	117
2.14	<i>In silico</i> ανάλυση	119
3.	Αποτελέσματα	
3.1	Κατάλοιπα αμινοξέων της περμεάσης XanQ με κομβικό ρόλο σε διαμεμβρανικές α-έλικες	123
3.1.1	Χαρτογράφηση και ανάλυση μεταλλαξιγένεσης των ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα	123
3.1.1.1	Εξελικτική συντήρηση των ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα του XanQ	125
3.1.1.2	Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης των ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα του XanQ	128
3.1.1.3	Μεταλλαξιγένεση επιλεγμένων ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων διαμεμβρανικών τμημάτων του XanQ στο μοριακό υπόβαθρο της XanQ φυσικού τύπου (wild type)	131
3.1.1.4	Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονών κυστεϊνών σε θέσεις ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα του XanQ	133
3.1.1.5	Δοκιμασία αλκυλίωσης της περμεάσης H31C <i>in vivo</i>	137

3.1.1.6 Εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση σε επιλεγμένες θέσεις ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα της XanQ	138
Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.1.1	161
3.1.2 Ο ρόλος του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) της περμεάσης ξανθίνης XanQ	165
3.1.2.1 Στοιχίση των καταλοίπων αμινοξέων του TM3	166
3.1.2.2 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στο TM3 της XanQ	168
3.1.2.3 Εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση καταλοίπων του TM3 της XanQ	174
3.1.2.4 Διπλά μεταλλάγματα σε σημαντικές θέσεις του TM3 και του TM8	179
Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.1.2	181
3.1.3 Μελέτη χαρακτηριστικών μοτίβων αλληλουχίας της περμεάσης XanQ	183
3.1.3.1 Φυλογενετική ανάλυση των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού της οικογένειας NCS2, εξαγωγή χαρακτηριστικών μοτίβων αλληλουχίας, επιλογή θέσεων-στόχων στα μοτίβα αλληλουχίας της περμεάσης XanQ και σχεδιασμοί μεταλλαξιγένεσης	183
3.1.3.2 Μοτίβα στη δομική περιοχή «πυρήνα» (TM1- 4, TM8-11)	189
3.1.3.3 Μοτίβα στη δομική περιοχή «εισόδου» (TM5-7, TM12-14)	201
Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.1.3	218
3.1.4 Αρχικό μοντέλο διευθέτησης των διαμεμβρανικών τμημάτων α – ελίκων της περμεάσης XanQ	221
3.1.4.1 Στοιχίση αλληλουχιών των ομολόγων της περμεάσης XanQ με βαθμό ταυτότητας αλληλουχίας >32% ή >42% και εξαγωγή ενός μοτίβου για κάθε α-έλικα βάσει της συντήρησης και της λειτουργικής σπουδαιότητας των καταλοίπων	223
3.1.4.2 Πιθανή διευθέτηση των προβολών των α-ελίκων στην τριτοταγή δομή της περμεάσης XanQ	225
3.2 Μελέτη σχέσεων εγγύτητας στην περμεάση XanQ	235

3.2.1 Ζεύγη καταλοίπων της XanQ που συντονίζουν δισθενή ιόντα	235
3.2.1.1 Κατασκευή διπλών μεταλλαγμάτων κυστεΐνης στην περμεάση XanQ	236
3.2.1.2 Επίδραση ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών	250
3.2.1.3 Ο ρόλος εγγενών ιστιδινών στην απενεργοποίηση της περμεάσης N430C από δισθενή ιόντα καδμίου	254
3.2.1.4 Επίδραση ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητα του μεταλλάγματος E429C/H257C στο υπόβαθρο ενός χιμαιρικού μεταφορέα NCS2	260
Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.2.1	264
3.2.2 Εντοπισμός πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών θέσεων αμινοξέων της XanQ με λειτουργικά πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης	267
2.1 Λειτουργική επίδραση αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων της XanQ με ζεύγη κυστεϊνών μεταξύ των θέσεων His-247-Glu-429 (TM8-TM14), Ile-89-Ile-343 (TM3-TM11) ή Ile-167-Thr-373 (TM5-TM12)	269
3.2.2.2 Έλεγχος της προσβασιμότητας των θέσεων His-257 και Glu-429 της XanQ στα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS μέσω δοκιμασίας παρεμπόδισης της επίδρασης ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητα του H257C/E429C (TM8-TM14)	273
3.2.2.3 Χαρτογράφηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών θέσεων της XanQ με πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross-linking)	275
Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.2.2	300
4. Συζήτηση	
4.1 Συνεισφορά της διατριβής στη χαρτογράφηση καταλοίπων αμινοξέων με κομβικό ρόλο στην λειτουργία και την εξειδίκευση της περμεάσης XanQ	305

4.1.1	Στρατηγική της ερευνητικής προσέγγισης που εφαρμόζεται για την ανάλυση της XanQ ως προτύπου μελέτης των διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NCS2	305
4.1.2	Συμπεράσματα για τον ρόλο πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων πλευρικών ομάδων της δομικής περιοχής «πυρήνα» της XanQ	306
4.1.3	Συμπεράσματα για τον ρόλο σημαντικών πλευρικών ομάδων αμινοξέων στο TM3 της XanQ	312
4.1.4	Συμπεράσματα για τον ρόλο σημαντικών θέσεων αμινοξέων της δομικής περιοχής «εισόδου» της XanQ	316
4.2	Προσδιορισμός σχέσεων εγγύτητας των α-ελίκων της XanQ	319
4.2.1	Τα απομακρυσμένα TM8 και TM14 διαφορετικών δομικών περιοχών της XanQ «πλησιάζουν» κατά τον μηχανισμό μεταφοράς ξανθίνης	319
4.2.2	Σχόλια για τα προβλήματα εφαρμογής των μεθοδολογιών σταυρωτής διασύνδεσης κυστεϊνών στην περμεάση XanQ	322
5.	Περιλήψεις	
5.1	Περίληψη	329
5.2	Summary	335
6.	Βιβλιογραφικές Αναφορές	341
	Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της Διδακτορικής Διατριβής	
	Δημοσίευση που προέκυψε από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.1 (Karena and Frillingos, 2009)	361
	Δημοσίευση που προέκυψε από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.2 (Karena and Frillingos, 2011)	363
	Παραρτήματα	
	Παράρτημα 1	367
	Παράρτημα 2	379
	Παράρτημα 3	391
	Παράρτημα 4	417

Συντμήσεις

ACN (acetonitril): ακετονιτρίλιο

Å (angstrom): μονάδα μέτρησης μήκους

ATP (adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη

Avidin- HRP: σύζευγμα αβιδίνης - υπεροξειδάσης

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

BAD (biotin acceptor domain): περιοχή δέσμησης βιοτίνης

BSA (Bovine Serum Albumin): Αλβουμίνη ορού βοός

DDM (n-dodecyl-β, D-maltoside): n-δωδεκυλο-β,D-μαλτοπυρανοσίδιο

DMSO (dimethyl sulfoxide): διμεθυλο - σουλφοξείδιο

DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

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

E.coli: εντεροβακτήριο *Escherichia coli*

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

His₁₀ (10-Histidine): αλληλουχία 10 καταλοίπων ιστοιδινών

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

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

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

kDa (kilo Dalton): μονάδα μέτρησης ατομικής μάζας

KPi: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου

LacY- epitope : επίτοπος LacY – αλληλουχία του καρβοξυτελικού

δωδεκαπεπτιδίου της διαπεράσης λακτόζης LacY

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

LB: θρεπτικό υλικό Luria Bertani ή Luria Broth

Ip (loop): θηλειά σύνδεσης διαμεμβρανικών τμημάτων

MTSES (Sodium (2-Sulfonatoethyl) methanethiosulfonate): μεθανο-θειο-σουλφονικό αιθυλσουλφονικό άλας νατρίου

MTSEA⁺ (2-Aminoethyl)methanethiolsulfonate): μεθανο-θειο-σουλφονική αιθυλαμίνη (με υδροβρώμιο)

MTS-linker-MTS: διλειτουργικό αντιδραστήριο μεθανοθειοσουλφονικού με ενδιάμεση υδρογονανθρακική αλυσίδα σύνδεσης (linker) συγκεκριμένου μεγέθους και γεωμετρίας

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

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

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

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

OGM (Oregon Green Maleimide): πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon

PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis): ηλεκτροφόρηση πυκτώματος πολυακρυλαμιδίου

PCR (polymerase chain reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

pH: ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξωνίου [H₃O⁺] ενός διαλύματος

PMS (phenazinemethosulphate): μεθοσουλφονικό φαιναζίνιο

PVDF (polyvinylidene difluoride): διφθοριούχο πολύ-βινυλιδένιο

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

SDS (sodium dodecyl sulphate): θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο

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

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

TM (transmembrane segment): διαμεμβρανικό τμήμα

wt (wild-type): φυσικού τύπου

Αμινοξέα

A ή Ala: αλανίνη

C ή Cys: κυστεΐνη

D ή Asp: ασπαρτικό οξύ

E ή Glu: γλουταμικό οξύ

F ή Phe: φαινυλαλανίνη

G ή Gly: γλυκίνη

H ή His: ιστιδίνη

I ή Ile: ισολευκίνη

K ή Lys: λυσίνη

L ή Leu: λευκίνη

M ή Met: μεθειονίνη

N ή Asn: ασπαραγίνη

P ή Pro: προλίνη

Q ή Gln: γλουταμίνη

R ή Arg: αργινίνη

S ή Ser: σερίνη

T ή Thr: θρεονίνη

V ή Val: βαλίνη

W ή Trp: τρυπτοφάνη

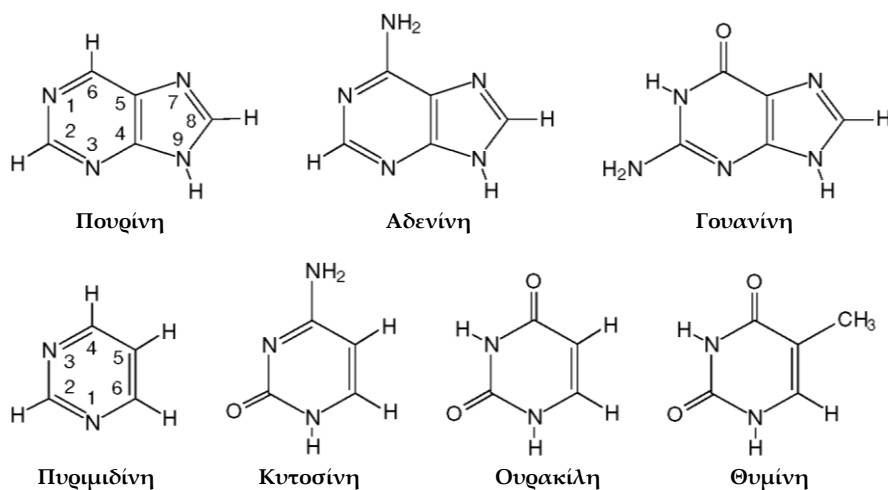
Y ή Tyr: τυροσίνη

1. Εισαγωγή

1.1 Η σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων

1.1.1 Ο βιολογικός ρόλος των νουκλεοτιδικών βάσεων

Το DNA και το RNA είναι γραμμικά πολυμερή μεγάλου μήκους, ονομάζονται νουκλεϊκά οξέα, αποτελούνται από μεγάλο αριθμό συνδεδεμένων νουκλεοτιδίων και μεταφέρουν πληροφορίες που πρέπει να διατηρηθούν από την μία γενιά στην άλλη σε όλους τους οργανισμούς. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζονται από ένα σάκχαρο (ριβόζη ή δεοξυριβόζη), μια φωσφορική ομάδα και μια νουκλεοτιδική βάση, η οποία μπορεί να είναι είτε πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη), είτε πυριμιδίνη (κυτοσίνη, θυμίνη ή ουρακίλη) (Εικόνα 1.1). Η αποθήκευση των γενετικών πληροφοριών οφείλεται στην αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος της αλυσίδας του νουκλεϊκού οξέος και ταυτόχρονα η ιδιαιτερότητα των βάσεων να σχηματίζουν ζεύγη που σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός μοναδικού μηχανισμού αντιγραφής των γενετικών πληροφοριών της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Ωστόσο, εκτός από τον ρόλο τους στην σωστή διεύθυνση των ελίκων του DNA, την αντιγραφή του γονιδιώματος και την μεταγραφή των γενετικών πληροφοριών σε RNA οι νουκλεοτιδικές βάσεις είναι απαραίτητες σε άφθονη ποσότητα για πολλές διεργασίες της ζωής.



Εικόνα 1.1: Η δομή των νουκλεοτιδικών βάσεων.

Απεικόνιση του συντακτικού τύπου των πουρινών (πάνω) και των πυριμιδινών (κάτω). Στο RNA χρησιμοποιείται η ουρακίλη αντί της θυμίνης (Berg M.J, Tymoczko J.L and Stryer L., Biochemistry, W.H. Freeman, 5th edition, 2001).

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το ενεργειακό νόμισμα ελεύθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα, είναι ένα νουκλεοτίδιο που περιέχει την πουρίνη αδενίνη και κατά αντιστοιχία το νουκλεοτίδιο GTP που περιέχει γουανίνη χρησιμοποιείται επίσης ως πηγή ενέργειας για μια πιο επίλεκτη ομάδα βιολογικών διεργασιών (σύνθεση πρωτεϊνών, γλυκογένεση, μεταγωγή σήματος, δράση GTP-ασών). Άλλωστε ένας σημαντικός αριθμός βιομορίων, που χρησιμοποιούνται ως συνένζυμα ή προσθετικές ομάδες μεταβολικών ενζύμων, όπως τα NAD⁺, NADP⁺, και το συνένζυμο A, σχηματίζονται από το ATP. Παράγωγα νουκλεοτιδίων, όπως για παράδειγμα η UDP-γλυκόζη, συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες, όπως είναι ο σχηματισμός του γλυκογόνου. Επίσης, τα νουκλεοτίδια είναι ουσιώδη συστατικά των πορειών μεταγωγής σήματος. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και η κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP) είναι δεύτεροι αγγελιοφόροι που μεταβιβάζουν σήματα τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και μεταξύ διαφορετικών κυττάρων (Berg *et al.*, 2005), και ταυτόχρονα το τελευταίο δρα ως δότης φωσφορικών ομάδων που μεταφέρονται από πρωτεϊνικές κινάσες. Στους φυτικούς οργανισμούς εκτός από την σύνθεση του DNA και του RNA η μεταφορά και η αποθήκευση αζώτου με την μορφή ουρεϊδών (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό) εξαρτάται από την βιοσύνθεση και τον καταβολισμό των νουκλεοτιδικών βάσεων (Boland and Schubert, 1983).

Πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα παράγωγα των νουκλεοτιδικών βάσεων καθώς και οι οξειδωμένες μορφές της γουανίνης και της αδενίνης (ξανθίνη, υποξανθίνη) που δεν ενσωματώνονται στα νουκλεϊκά οξέα. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα παράγωγα κυτοκινίνες, οι οποίες είναι φυτικές ορμόνες που επάγουν την κυτταρική διαίρεση και την διαφοροποίηση για την ρύθμιση της αύξησης και της οργανογένεσης των φυτών (Mok D and Mok M, 2001) και την καφεΐνη, ένα αλκαλοειδές της ξανθίνης το οποίο είναι ψυχοενεργό διεγερτικό ναρκωτικό, βρίσκεται στους κόκκους, στα φύλλα, και στους καρπούς ορισμένων φυτών και δρα ως φυσικό φυτοφάρμακο που παραλύει και σκοτώνει ορισμένα έντομα. Στον άνθρωπο η καφεΐνη όταν καταναλώνεται έχει αντιοξειδωτική και διουρητική δράση (Azam *et al.*, 2003; Maughan and Griffin, 2003), διεγείρει το κεντρικό νευρικό σύστημα του οργανισμού ως ψυχοδραστική ουσία, ενώ πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τον πιθανό ανασταλτικό ρόλο της ουσίας αυτής ως στην ίαση τραυμάτων (Ojeh *et al.*, 2014). Επίσης, η ξανθίνη και η υποξανθίνη μαζί με την αδενίνη και την γουανίνη, μπορούν να αποτελέσουν μοναδική πηγή αζώτου σε αρκετούς μονοκύτταρους οργανισμούς (Vogels and van der Drift, 1976). Στα θηλαστικά η αδενίνη, η γουανίνη και η υποξανθίνη ανακυκλώνονται για την δημιουργία ATP και GTP και νουκλεϊκών οξέων, ή οξειδώνονται καταβολικά σε ξανθίνη, ουρικό οξύ και ουρεΐδες (Fox and Kelley, 1978). Είναι γνωστός ο πολύ

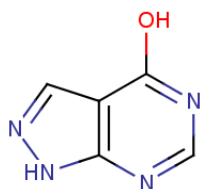
σημαντικός ρόλος του ουρικού οξέος στην φυσιολογία του ανθρώπου τόσο για την ομαλή λειτουργία των νεφρών, όσο και για την δράση του ως αντιοξειδωτικό στον ορό του αίματος (de Konning and Diallinas, 2000; Enomoto *et al.*, 2002).

Η μοναδική φυσιολογική σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων για την επιβίωση των οργανισμών διευρύνεται με την χρήση αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων από την σύγχρονη φαρμακολογία για την εφαρμογή τους στην θεραπεία νοσημάτων. Ο ρόλος αυτός αποτελεί αφορμή για την ενίσχυση των μελετών των συστημάτων μεταφοράς πουρινών και πυριμιδινών σε ποικίλα βιολογικά συστήματα και για αυτό γίνεται ιδιαίτερη αναφορά της φαρμακολογικής τους χρήσης στην παράγραφο που ακολουθεί.

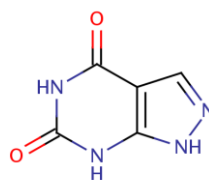
1.1.2 Η χρήση των νουκλεοτιδικών βάσεων στην φαρμακολογία

Με βάση τα παραπάνω δεν είναι τυχαίο ότι πολλά δομικά ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά, αντιϊικά ή αντικαρκινικά φάρμακα. Ο τρόπος δράσης αυτών των φαρμάκων εστιάζεται κυρίως σε αναστολή μηχανισμών που ρυθμίζουν την παρουσία των νουκλεοτιδικών βάσεων σε έναν οργανισμό. Ωστόσο, για το μέλλον η επιστημονική κοινότητα μελετώντας εκτενέστερα τα πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς στοχεύει στον σχεδιασμό φαρμάκων που θα αναστέλλουν στοχευμένα μεταφορείς των βακτηριακών, ιικών και καρκινικών κυττάρων – στόχων στο περιβάλλον του ξενιστή τους (Köse and Schiedel, 2009).

Συγκεκριμένα, σήμερα είναι γνωστή η δράση των ουσιών αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη (Εικόνα 1.2) οι οποίες αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (βλ. 1.1.3, Εικόνα 1.7) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση τελικής σύνθεσης ουρικού οξέος (Spector and Johns, 1970; Pea, 2005; Rajesh *et al.*, 2009). Στηριζόμενοι στον ίδιο μηχανισμό ανάλογα αυτών των φαρμάκων χορηγούνται για την θεραπεία της υπερουριχαιμίας και της ουρικής αρθρίτιδας (Rott and Agutelo, 2003; Bieber and Terkeltaud, 2004; Sclesinger, 2004; Wortmann, 2005).



αλλοπουρινόλη



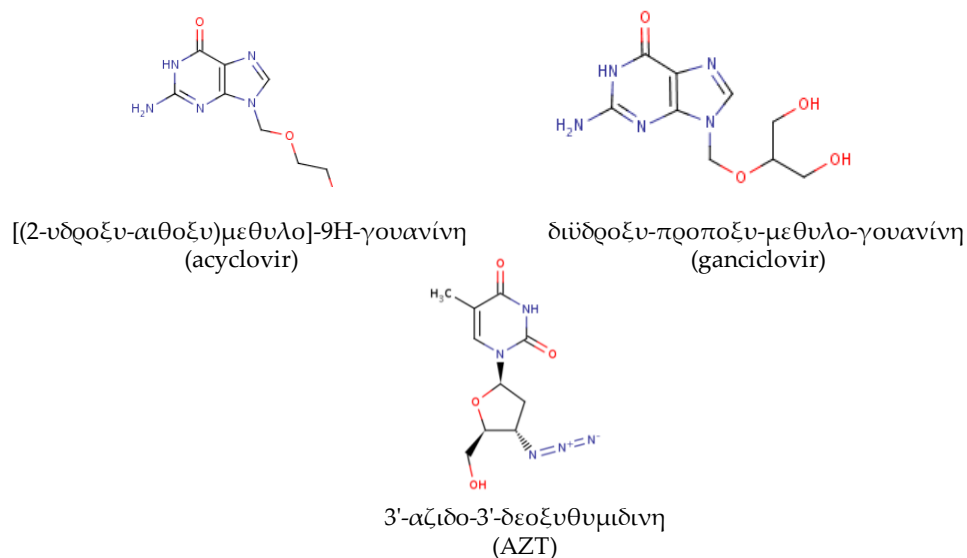
οξυπουρινόλη

Εικόνα 1.2: Παράγωγα νουκλεοτιδικών βάσεων ως αντιουριχαιμικά φάρμακα.

Απεικόνιση του συντακτικού τύπου της αλλοπουρινόλης και οξυπουρινόλης, που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα κατά της ουρικής αρθρίτιδας (<http://www.ebi.ac.uk>).

Επίσης είναι ευρέως διαδεδομένη η χρήση των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (Εικόνα 1.3) acyclovir (9-[(2-υδροξυ-αιθοξυ)μεθυλο]-9H-γουανίνη) (Elion, 1993; Guan *et al.*, 1996; Piret *et al.*, 2011) και ganciclovir (διυδροξυ-προποξυ-μεθυλο-γουανίνη) (Martin *et al.*, 1983; Matthews and Boehme, 1988) εναντίον των ερπητοϊών γιατί αυτά μπορούν να στοχεύσουν και να αναστείλουν την δράση της ιϊκής DNA πολυμεράσης με συνέπεια να εμποδίζεται η σύνθεση του ιϊκού DNA. Υπάρχουν πολλά ακόμη και πολύ γνωστά παραδείγματα, ιδίως αντιϊικών φαρμάκων έναντι ρετροϊών, όπως το

AZT (3'-αζιδο-3'-δεοξυθυμιδίνη) (Khandazhinskaya and Shirokova, 2013) που χρησιμοποιείται κατά του AIDS (αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης), και πολλά άλλα.

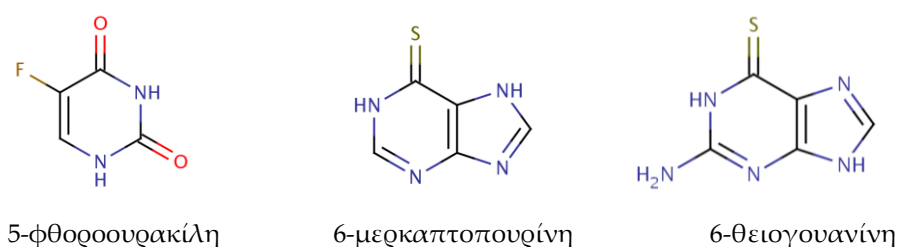


Εικόνα 1.3: Παράγωγα νουκλεοτιδικών βάσεων ως αντιϊικά φάρμακα.

Απεικόνιση του συντακτικού τύπου της 9-[(2-υδροξυ-αιθοξυ)μεθυλο]-9H-γουανίνης (acyclovir), διϋδροξυ-προποξυ-μεθυλο-γουανίνης (ganciclovir) και 3'-αζιδο-3'-δεοξυθυμιδίνης (AZT), που χρησιμοποιούνται ως αντιϊικά φάρμακα (<http://www.ebi.ac.uk>).

Είναι αυτονόητη η αξία μιας ουσίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί την σημερινή εποχή προληπτικά ή/και κατασταλτικά ως αντικαρκινικό φάρμακο. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα παραγώγων νουκλεοτιδικών βάσεων όπως η 5-φθοροουρακίλη (5-fluorouracil, 5-FU), η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-mercaptopurine) και η 6-θειογουανίνη (6-thioguanine) (Εικόνα 1.4), οι οποίες χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως στον καρκίνο του μαστού, του στομάχου, του εντέρου, του δέρματος αλλά και σε χημειοθεραπείες κατά της λευχαιμίας. Ο μηχανισμός δράσης της 5-φθοροουρακίλης, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα (π.χ. οξυπλατίνη), αφορά στην αναστολή της σύνθεσης του θυμιδικού, και επομένως εμποδίζει την σύνθεση του DNA στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα (Haydon, 2003; Andre *et al.*, 2004; Grothey and Sargent, 2005). Επίσης, η 5-φθοροουρακίλη χρησιμοποιείται και ως «προφάρμακο» στην διαγονιδιακή θεραπεία του καρκίνου σε συνδυασμό με την απαμινάση της κυτοσίνης (Hwangh *et al.*, 2005). Σχετικά με την 6-μερκαπτοπουρίνη και την 6-θειογουανίνη, τα πρώτα ανάλογα πουρινών που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιμεταβολίτες σε χημειοθεραπείες (Elion and Hitchings, 1951), ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την *de novo* σύνθεση των πουρινών (βλ.1.1.3). Συγκεκριμένα η 6-μερκαπτοπουρίνη για να δράσει πρέπει να μετατραπεί στο

αντίστοιχο μονοφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο της. Η μετατροπή αυτή καταλύεται από το ένζυμο φωσφοροριβοζυλική τρανσφεράση υποξανθίνης-γουανίνης, ένα ένζυμο που συμμετέχει στην «οδό περίσωσης» για τις πουρίνες (purine salvage). Το μη φυσιολογικό νουκλεοτίδιο που σχηματίζεται, αναστέλλει με παλίνδρομο μηχανισμό το πρώτο στάδιο της *de novo* βιοσύνθεσης των πουρινών, μιμούμενο το μονοφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο της γουανίνης (GMP). Επίσης, τα ανάλογα του γουανυλικού οξέος που παράγονται από τα μη φυσιολογικά νουκλεοτίδια καθιστούν δυσλειτουργικά το DNA ή/και το RNA στα οποία ενσωματώνονται (Galmarini *et al.*, 2002). Τέλος, η 2-χλωροδεοξαδενοσίνη (2-chlorodeoxyadenosine, Cda) και η φθοροαραβινοσυλοαδενοσίνη (fluoroarabinosyladenosine, F-ara-A) χρησιμοποιούνται εκτενώς σήμερα στην αντιμετώπιση λεμφωμάτων (Iwasaki *et al.*, 1997).



Εικόνα 1.4: Παράγωγα νουκλεοτιδικών βάσεων ως αντικαρκινικά φάρμακα.

Απεικόνιση του συντακτικού τύπου της 5-φθοροουρακίλης, 6-μερκαπτοπουρίνης, 6-θειογουανίνης, που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα (<http://www.ebi.ac.uk>).

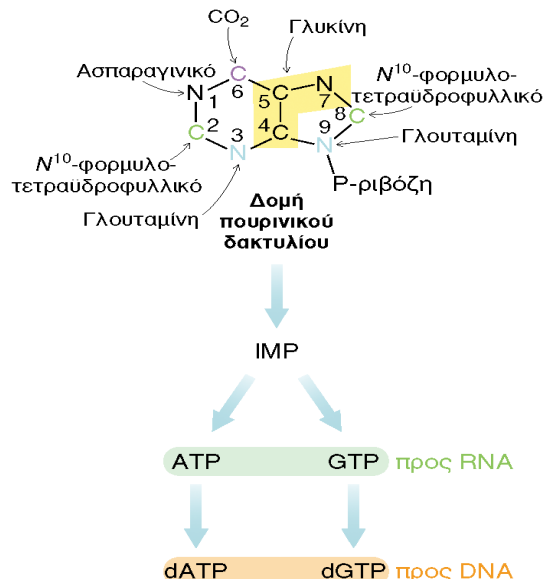
Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι μόνο η εξειδικευμένη γνώση του φυσιολογικού ρόλου και του μηχανισμού μεταφοράς υποστρωμάτων (παράγωγα νουκλεοτιδικών βάσεων) από πρωτεϊνικά συστήματα θα οδηγήσει στην βελτιστοποίηση σχεδιασμού στοχευμένης λειτουργίας φαρμάκων. Η γνώση αυτή απαιτεί αρχικά την λεπτομερή περιγραφή του τρόπου αξιοποίησης των νουκλεοτικών βάσεων (αναβολισμός, καταβολισμός) από τους οργανισμούς, έτσι ώστε να προσδιοριστούν τα βιολογικά μόρια-κλειδιά που ρυθμίζουν τα μονοπάτια του μεταβολισμού συγκρινόμενα εξελικτικά από τους προκαρυώτες στα ανώτερα θηλαστικά.

1.1.3 Ο μεταβολισμός των νουκλεοτιδικών βάσεων

Λόγω της ζωτικής σημασίας τους για τα κύτταρα οι νουκλεοτιδικές βάσεις πρέπει συνεχώς να ανανεώνονται και να είναι άμεσα διαθέσιμες σε επαρκείς ποσότητες. Οι πορείες για την βιοσύνθεσή τους κατατάσσονται σε δύο ομάδες: πορείες *de novo* (εκ νέου) και πορείες περίσωσης (*salvage*). Στις πορείες *de novo* οι νουκλεοτιδικές βάσεις συναρμολογούνται από απλούστερες ενώσεις, ενώ στις πορείες περίσωσης, προσχηματισμένες βάσεις ανακτώνται (από το περιβάλλον ή από την ανακύκλωση νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων) και επανασυνδέονται με μια μονάδα ριβόζης. Οι δύο πορείες οδηγούν στην δημιουργία ριβονουκλεοτιδίων, στα οποία το σάκχαρο της ριβόζης ανάγεται και προκύπτουν τα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Στην συνέχεια δίνεται μια γενική εικόνα του μεταβολισμού των πουρινών, με εστιασμό περισσότερο στους βακτηριακούς οργανισμούς, που αποτελούν αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία.

1.1.3.1 Οι πορείες μεταβολισμού πουρινικών βάσεων

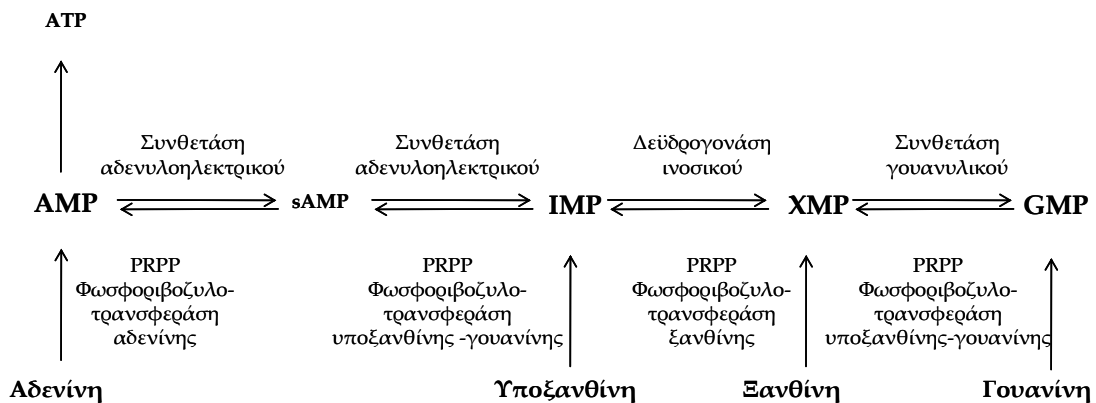
Στην *de novo* πορεία σύνθεσης των πουρινών, το πλαίσιο για μια τέτοια βάση συντίθεται τμηματικά κατευθείαν επάνω σε έναν δακτύλιο ριβόζης αρχίζοντας από απλά συστατικά (Εικόνα 1.5). Συγκεκριμένα, ο πουρινικός δακτύλιος συναρμολογείται από πρόδρομα μόρια όπως γλουταμίνη, γλυκίνη, N10-φορμυλοτετραϋδροφιλικό και διοξειδίο του άνθρακα. Το υποχρεωτικό βήμα σε αυτή την πορεία είναι ο σχηματισμός 5-φωσφοριβοζυλαμίνης από 5-φωσφο-1-πυροφορφορική ριβόζη (PRPP) και γλουταμίνη. Ακολουθούν προσθήκη γλυκίνης, φορμυλίωση, αμίνωση, κλείσιμο του δακτυλίου (σχηματισμός ενδιάμεσου προϊόντος 5-αμινοϊμιδαζολικού ριβονουκλεοτιδίου), προσθήκη του διοξειδίου του άνθρακα, αζώτου (από ασπαραγινικό) και φορμυλικής ομάδας για τον τελικό σχηματισμό μονοφωσφορικής ινοσίνης (IMP), το οποίο θα δώσει μονοφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια αδενίνης (AMP) και γουανίνης (GTP).



Εικόνα 1.5: Βασικά στοιχεία της *de novo* πορείας για την σύνθεση πουρινικών νουκλεοτιδίων.

Απεικόνιση της δομής του πουρινικού δακτυλίου στην οποία σημειώνεται η προέλευση ατόμων του κατά την *de novo* πορεία σύνθεσής του (Berg M.J, Tymoczko J.L and Stryer L., Biochemistry, W.H. Freeman, 5th edition, 2001).

Στη δεύτερη πορεία, της περίσωσης (*salvage*), βάσεις πουρινών που απελευθερώνονται από την υδρολυτική αποικοδόμηση νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων, μπορούν να περισωθούν και να ανακυκλωθούν εξοικονομώντας ενέργεια ή να αποικοδομηθούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου (Εικόνα 1.6). Οι ελεύθερες πουρινικές βάσεις μπορούν να προσαρτηθούν σε PRPP και να σχηματίσουν μονοφωσφορικούς νουκλεοζίτες (IMP).

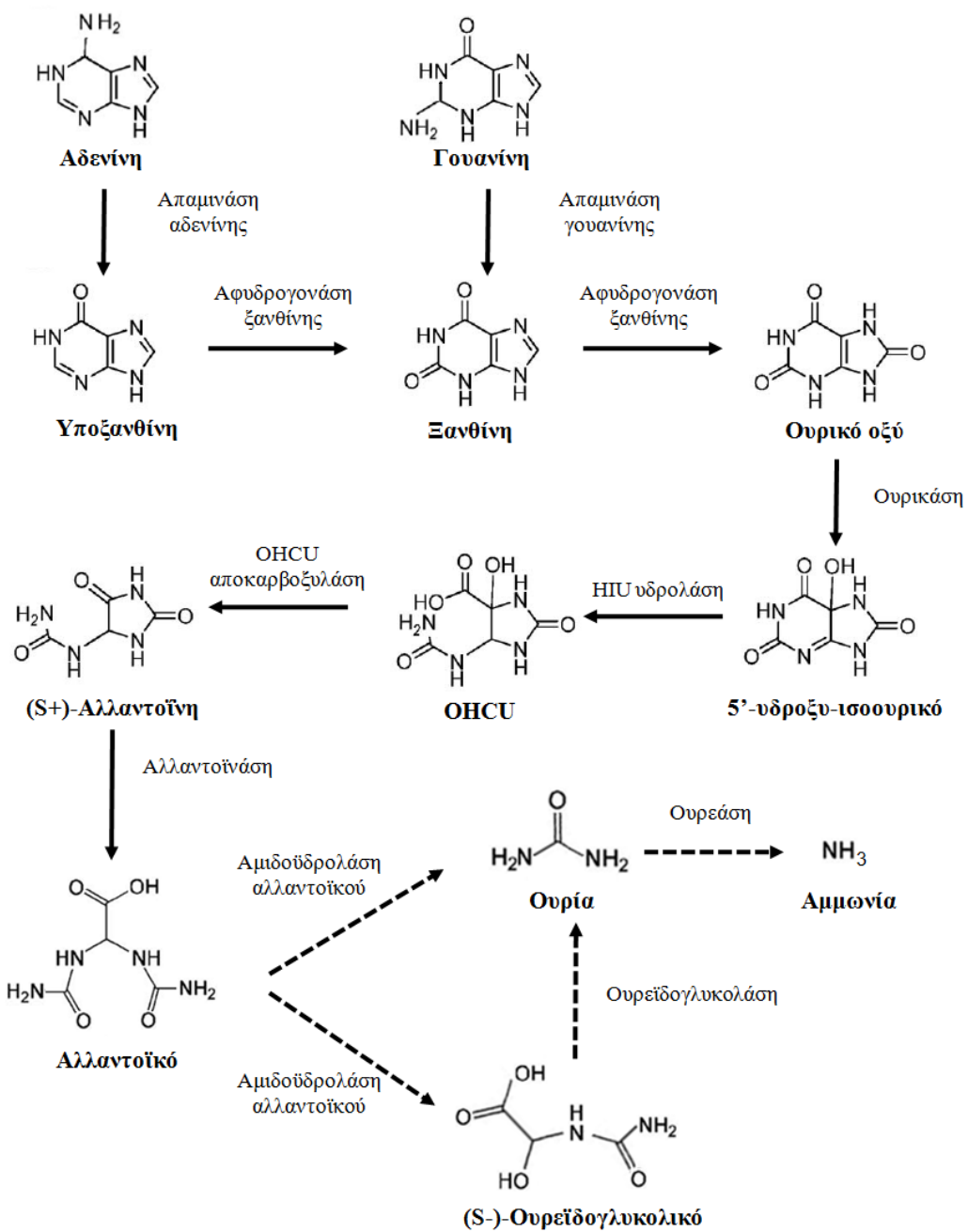


Εικόνα 1.6: Μονοπάτι περίσωσης πουρινών.

Απεικόνιση του μονοπατιού περίσωσης πουρινών με τα ένζυμα κατάλυσης κάθε σταδίου: (PRPP) 5-φωσφοριβοζυλο-πυροφωσφορικό, (AMP) αδενυλικό (μονοφωσφορική αδενοσίνη), (sAMP) αδενυλοηλεκτρικό, (IMP) ινοσινικό (μονοφωσφορική ινοσίνη), (XMP) ξανθυλικό (μονοφωσφορική ξανθοσίνη), (GMP) γουανυλικό (μονοφωσφορική γουανοσίνη).

Στην πορεία καταβολισμού των πουρινών (Εικόνα 1.7), η αδενίνη και η γουανίνη μετατρέπονται με τα κατάλληλα ένζυμα (απαμινάσες) σε υποξανθίνη και ξανθίνη αντίστοιχα. Με το ένζυμο αφυδρογονάση ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και αυτή σε ουρικό οξύ. Αυτό είναι και το καθοριστικό στάδιο του καταβολισμού των πουρινών, καθώς η μετατροπή σε ουρικό οξύ απομακρύνει τις πουρίνες από τα μονοπάτια περίσωσης. Στη συνέχεια, το ουρικό οξύ μετατρέπεται σε αλλαντοΐνη, με μια πορεία της οποίας τα στάδια χαρακτηρίστηκαν σχετικά πρόσφατα (Ramazzina *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013). Κατά την πορεία αυτή, το ουρικό οξύ μετατρέπεται σε 5-υδροξυ-ισουορικό (HIU) με τη δράση της οξειδάσης ουρικού οξέος (ουρικάσης). Το 5-υδροξυ-ισουορικό μπορεί και από μόνο του να μετατραπεί σε αλλαντοΐνη παράγοντας ρακεμικό μείγμα αλλαντοΐνης. Επειδή όμως η αλλαντοΐνάση είναι ειδική για να αναγνωρίζει μόνο S(+)-αλλαντοΐνη, βρέθηκε ότι υπάρχει ένα ενδιάμεσο βήμα στο οποίο το HIU μετατρέπεται ενζυμικά με τη δράση της υδρολάσης του HIU (Lee *et al.*, 2005) σε 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεΐδοϊμιδαζολίνη (OHCU) η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε S(+)-αλλαντοΐνη με τη δράση της αποκαρβοξυλάσης της OHCU (Kwangsoo *et al.*, 2007). Η S(+)-αλλαντοΐνη μέσω της αλλαντοΐνάσης δίνει αλλαντοϊκό και το αλλαντοϊκό με τη σειρά του μπορεί να μετατραπεί μέσω της δράσης της αμιδοϋδρολάσης του αλλαντοϊκού σε ουρεΐδογλυκολικό, αυτό σε ουρία μέσω της ουρεΐδογλυκολάσης και με τη δράση της ουρεάσης σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Από το στάδιο του αλλαντοϊκού και μετά, υπάρχουν αρκετά εναλλακτικά καταβολικά μονοπάτια.

Οι παραπάνω πορείες σύνθεσης πουρινών, που εμφανίστηκαν πολύ νωρίς κατά την εξέλιξη, περιλαμβάνουν έναν σχετικά μικρό αριθμό βασικών αντιδράσεων, που επαναλαμβάνονται με παραλλαγές για να δημιουργήσουν διαφορετικά νουκλεοτίδια. Διαφορές εμφανίζουν οι διάφοροι οργανισμοί στον τρόπο αξιοποίησης των πουρινικών βάσεων που συντίθενται, ανάλογα με τις απαιτήσεις της προσαρμογής τους σε διάφορα περιβάλλοντα. Στην συνέχεια εστιαζόμαστε στον μηχανισμό καταβολισμού πουρινών σε βακτηριακά συστήματα και κυρίως στον οργανισμό *E.coli*, πληροφορίες που αξιοποιήθηκαν κατά την παρούσα μελέτη του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E.coli*.

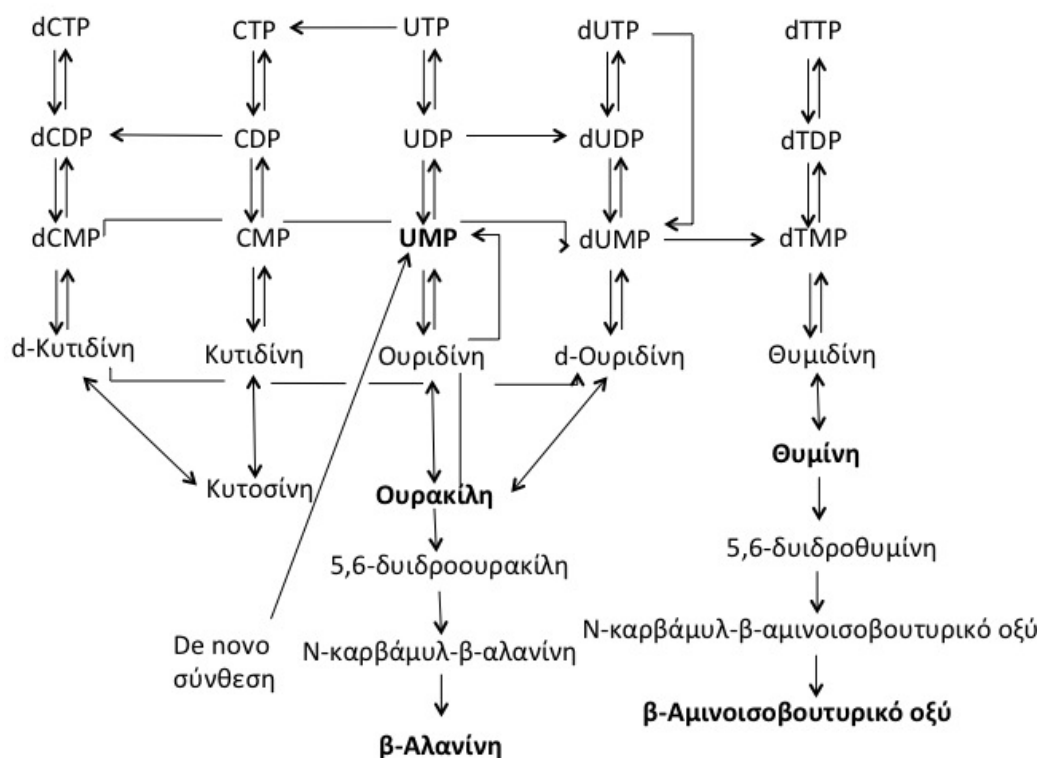


Εικόνα 1.7: Πορεία καταβολισμού των πουρινών.

Γενικό σχήμα που δείχνει τον καταβολισμό των πουρινών καθώς και τα ένζυμα που καταλύουν το κάθε στάδιο καταβολισμού. HIU, 5-υδροξυ-ισοουρικό, OHCU, 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεΐδοϊμιδαζολίνη.

1.1.3.2 Αξιοποίηση των πουρινών σε βακτηριακά συστήματα

Μέχρι σήμερα η γνώση του μεταβολισμού των πουρινών στους βακτηριακούς οργανισμούς είναι περιορισμένη καθώς ελάχιστοι προκαρυώτες έχουν μελετηθεί διεξοδικά σχετικά με αυτόν τον μηχανισμό. Το Gram αρνητικό εντεροβακτήριο *E.coli* (Εικόνα 1.8) δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει άλλες πουρίνες εκτός από την αδενίνη ως μοναδική πηγή αζώτου κάτω από αερόβιες συνθήκες (Xi *et al.*, 2000; Ramazzina *et al.*, 2006), γεγονός που το διαφοροποιεί από άλλα βακτήρια. Μπορεί ωστόσο να χρησιμοποιήσει πουρίνες όπως υποξανθίνη, ξανθίνη και γουανίνη για να ενδυναμώσει την αερόβια ανάπτυξη όταν χρησιμοποιείται αμμώνιο ή ασπαρτικό ως βασική πηγή αζώτου (Xi *et al.*, 2000; Karatza and Frillingos, 2005). Αν και οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι οι εξωγενείς πουρίνες χρησιμοποιούνται μέσω του μονοπατιού περίσωσης για την δημιουργία νουκλεοτιδίων (Zaklin and Nygaard, 1996) είναι γνωστό ότι οι πουρίνες καταβολίζονται προς την παραγωγή αλλαντοΐνης ή/και αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα ενώ γνωρίζουμε ότι η υποξανθίνη και η ξανθίνη μετατρέπεται σε ουρικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου αφυδρογονάση της ξανθίνης, το καταβολικό μονοπάτι της περαιτέρω οξειδωσίας του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη στο συγκεκριμένο βακτήριο είναι ασαφές. Γενικά θεωρείται (Ramazzina *et al.*, 2006) ότι η οξειδωσία του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη πραγματοποιείται σε τρία ενζυμικά βήματα που αφορούν: (α) στην παραγωγή 5-υδροξυ-ισσοουρικού οξέος (HIU) με κατάλυση από την οξειδάση του ουρικού οξέος, (β) στην μετατροπή του 5-υδροξυ-ισσοουρικού σε 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοϊμιδαζολίνη (OHCU), που καταλύεται από την υδρολάση του HIU, και (γ) στην τελική παραγωγή S (+) αλλαντοΐνης η οποία καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση της OHCU. Στην *E.coli* δεν έχει αναφερθεί κανένα ένζυμο με δράση οξειδάσης ουρικού οξέος παρόλο που η υδρολάση HIU καθώς και η αποκαρβοξυλάση HIU έχουν αναφερθεί ως προϊόντα έκφρασης του γονιδίου *yedX* (Papakostas and Frillingos, 2012). Σε αντίθεση με τα περισσότερα ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν για τις υδρολάσες HIU από άλλα βακτήρια, το γονίδιο που εκφράζει την υδρολάση HIU της *E.coli* αλλά και άλλων εντεροβακτηρίων δεν σχετίζεται με το οπερόνιο του μεταβολισμού των πουρινών, αλλά έχει προταθεί ότι κωδικοποιεί για πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στο περίπλασμα και οι οποίες ενδέχεται να μεταβολίζουν το HIU το οποίο πιθανά προέρχεται από τον αυθόρμητο μη ενζυμικό καταβολισμό του ουρικού οξέος δρώντας ως αντιοξειδωτικό στο περίπλασμα (Hennerby *et al.*, 2009).



Εικόνα 1.8: Διαγραμματική απεικόνιση μεταβολισμού των πουρινών της *E.coli*.

Σχετικά με άλλους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, είναι σημαντικό ότι έχει προσδιοριστεί ένα σύστημα που αφορά τη χρήση πουρινών ως πηγή αζώτου στο Gram-θετικό εδαφοβακτήριο *Bacillus subtilis*. Το βακτήριο αυτό έχει αναπτύξει ένα ιδιαίτερα ελεγχόμενο σύστημα για τη χρήση μιας σειράς μικρομοριακών ενώσεων (αδενίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, ουρικό οξύ, αλλαντοΐνη, ουρία) ως πηγές αζώτου, σε συνθήκες ολικής απουσίας άλλων πηγών αζώτου, όπως γλουταμικού και αμμωνίας, από το θρεπτικό μέσο (Nygaard *et al.*, 2000; Johansen, *et al.*, 2003). Μελέτες αερόβιας ανάπτυξης στελεχών του *B. subtilis* υπέδειξαν ότι ο καταβολισμός των πουρινών φτάνει μέχρι την παραγωγή αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα (Christiansen *et al.*, 1997; Nygaard *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2001). Πρόσφατα, εξάλλου, χαρακτηρίστηκε ένα πλήρες γονιδιακό οπερόνιο καταβολισμού πουρινών στα Gram-αρνητικά παθογόνα εντεροβακτήρια *Klebsiella pneumoniae* (de la Riva *et al.*, 2008) και *Klebsiella oxytoca* (Pope *et al.*, 2009), τα οποία περιέχουν ξεχωριστά γονίδια και για τα τρία στάδια οξειδωσης του ουρικού οξέος. Πρόκειται για το γονίδιο *hpxO* (υδρολάση ουρικού οξέος), το *hpxT* (υδρολάση 5-υδροξυ-ισουουρικού οξέος) και το *hpxQ* (αποκαρβοξυλάση 2-οξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοϊμιδαζολίνης). Εκτός από την πρωτεΐνη *ΧpxT* (υδρολάση 5-υδροξυ-ισουουρικού οξέος), η οποία είναι ομόλογη με το αντίστοιχο ένζυμο στην *E.coli* και την *PucM* του *B. subtilis*, η *ΧpxO* εμφανίζει ενεργότητα ως FAD - εξαρτώμενη οξειδάση ουρικού, η οποία διαφοροποιείται από την ουρική που

έχει χαρακτηριστεί στον *B. subtilis* (O'Leary *et al.*, 2009) και σε άλλα είδη που εμφανίζουν ένα πλήρες μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού των πουρινών (Gournas *et al.*, 2011). Τμήματα του οπερονίου hpx της *Klebsiella*, συμπεριλαμβανομένου και του ομολόγου της ουρικάσης $HpxO$, εντοπίζονται και σε άλλα γ-πρωτεοβακτήρια όπως των γενών *Xanthomonas* και *Acinetobacter* (Pope *et al.*, 2009), αλλά όχι στην *E.coli*.

Με όποιον τρόπο και αν αξιοποιεί ένα βακτηριακό σύστημα τις νουκλεοτιδικές βάσεις είναι φανερό ότι η παρουσία αυτών είναι απαραίτητη για την επιβίωση ενός βιολογικού συστήματος. Η ελεγχόμενη πρόσληψη πουρινικών και πυριμιδινικών βάσεων γίνεται με πλήρως εξειδικευμένα πρωτεϊνικά συστήματα, τους μεταφορείς των νουκλεοτιδικών βάσεων.

1.2. Πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων

Η πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων από το εξωκυτταρικό περιβάλλον είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, είτε αυτά ανήκουν σε οργανισμούς στους οποίους η σύνθεση νουκλεοτιδίων στηρίζεται σε μονοπάτια περίσωσης, είτε σε συστήματα όπου οι νουκλεοτιδικές βάσεις χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου και άνθρακα κατά τις καταβολικές διαδικασίες. Ο μηχανισμός εισόδου των νουκλεοτιδικών βάσεων απαιτείται να είναι απόλυτα ελεγχόμενος και αυτό επιτυγχάνεται μέσω υψηλά εξειδικευμένων μεμβρανικών συστημάτων μεταφοράς, που ποικίλλουν σε επίπεδο οργανισμών αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο. Δεδομένα γονιδιωματικής και φυλογενετικής ανάλυσης *in silico*, σε συνδυασμό με σχετικά λίγες αποδείξεις από μοριακά και γενετικά πειράματα, αναδεικνύουν την ύπαρξη πολλών ειδικών συστημάτων μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων σε είδη Βακτηρίων (Andersen *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2003; Karatza and Frillingos, 2005; Papakostas and Frillingos, 2012; Papakostas *et al.*, 2013) και Μυκήτων (Diallinas *et al.*, 1998; Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005, 2006; Kosti *et al.*, 2012; Kryptou *et al.*, 2012, 2014), καθώς και σε Φυτά (Argyrou *et al.*, 2001; Maurino *et al.*, 2006; Mourad *et al.*, 2012), Μετάζωα (Yao *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2010) και Πρώτιστα (de Koning *et al.*, 2005; Landfear, 2004, 2009, 2011). Πολλά από τα συστήματα αυτά έχουν εξελικτική συγγένεια μεταξύ τους, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Έτσι σήμερα οι μεταφορείς κυτταρικής πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων καταγράφονται βιβλιογραφικά ως πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου (**Secondary - TC2 active transporters**), γιατί αξιοποιούν την ενέργεια που προέρχεται από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων H^+ ή Na^+ και επιτελούν ενεργό μεταφορά του υποστρώματος (ion gradient – driven active transporters), το οποίο συσσωρεύεται προς την μία πλευρά της μεμβράνης ακόμη και ενάντια στην διαβάθμιση των συγκεντρώσεων του. Η δευτερογενής ενεργός μεταφορά επιτελείται χάρη στην χαρακτηριστικά πολύ μεγάλη ευελιξία διαμορφώσεων των πρωτεϊνικών μεταφορέων, που διαπερνούν πολλαπλά την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα της μεμβράνης, γεγονός που κάνει την μελέτη αυτών των συστημάτων ιδιαίτερα δύσκολη. Ωστόσο, οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων κατατάχθηκαν σε τέσσερις διακριτές οικογένειες ομολόγων μετά από ανάλυση της αλληλουχίας τους, σύμφωνα με την οποία ομαδοποιήθηκαν μέλη με παρόμοια προφίλ υδροφοβικότητας (παρουσία 10-14 διαμεμβρανικών τμημάτων α -έλικας), με υψηλή ταυτότητα (>21%) και ομοιότητα (>40%) αμινοξέων, και κυρίως με συντηρημένες αλληλουχίες «μοτίβα» (δομικές επικράτειες) σε ομόλογες θέσεις καταλοίπων. Η αναγνώριση μοτίβων καταλοίπων διευκολύνει ιδιαίτερα την ταξινόμηση

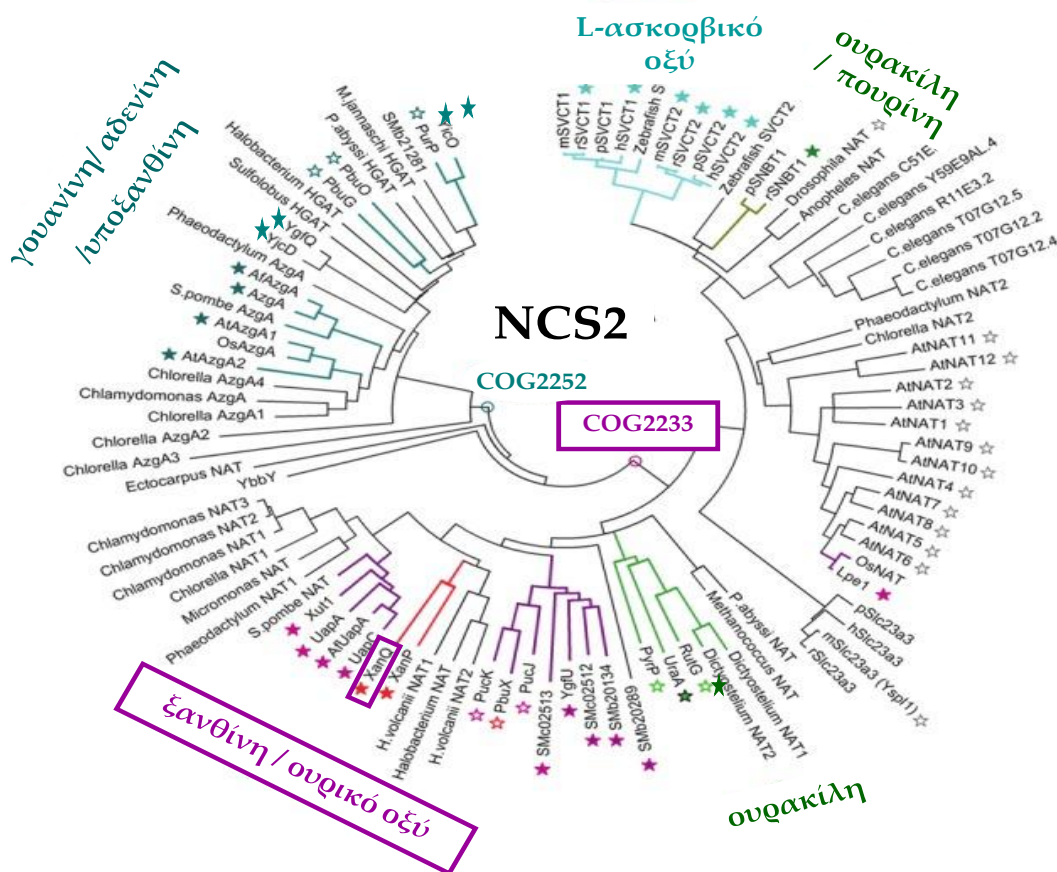
των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες οικογένειες, σχετικά με την ομολογία προς τις αντίστοιχες των χαρακτηρισμένων μελών (De Koning and Diallinas, 2000; Frillingos, 2012), ενώ ταυτόχρονα οι δομικά αυτοτελείς περιοχές που έχουν χαρακτηριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας σε ορισμένα προκαρυωτικά ομόλογα (βλ. στη συνέχεια) μπορούν να χρησιμοποιηθούν, σε συνδυασμό με δομική μοντελοποίηση, για την μελέτη ευκαρυωτικών μελών της ίδιας οικογένειας.

1.2.1 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Δύο από τις τέσσερις γνωστές οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων περιλαμβάνουν ομόλογα μέλη αποκλειστικά στο Φυτικό Βασίλειο (Mohlmann *et al.*, 2010). Πρόκειται για την οικογένεια **UPS/NBUT**, που περιλαμβάνει μεταφορείς ουρεϊδών, ουρακίλης, ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, και την **PUP/POP**, που περιλαμβάνει μεταφορείς αδενίνης, υποξανθίνης, κυτοσίνης, και αναλόγων πουρινών όπως κυτοκινινών (ζεατίνη) και/ή αλκαλοειδών (καφεΐνη, νικοτίνη). Αυτές οι δύο οικογένειες έχουν εξελικτική συγγένεια μεταξύ τους και ταξινομούνται στην υπεροικογένεια μεταφορέων **DMT** (**D**rug/**M**etabolite **T**ransporter **S**uperfamily) με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τον μεταφορέα EmrE (Arkin *et al.*, 1996), για τον οποίο έχει δημοσιευτεί η κρυσταλλική δομή (Pornillos *et al.*, 2006).

Η τρίτη γνωστή οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων, **NCS1** (**N**ucleobase - **C**ation **S**ymporter-**1**), περιλαμβάνει μέλη στα Αρχαία, Βακτήρια, Μύκητες, Φυτά και σε ορισμένα φωτοσυνθετικά Πρώτιστα. Όπως και οι προηγούμενες δύο οικογένειες, δεν έχει καθόλου ομόλογα στα Μετάζωα, επομένως ούτε και στον άνθρωπο ή άλλα θηλαστικά. Η NCS1 περιλαμβάνει μεταφορείς κυτοσίνης, υποξανθίνης, αδενίνης και/ή γουανίνης, ουρακίλης/θυμίνης και/ή ουριδίνης, αλλαντοϊνης/υδαντοϊνης. Ο μεταφορέας Mhp1, αποτελεί χαρακτηριστικό εκπρόσωπο της οικογένειας NCS1, καθώς είναι το μοναδικό ομόλογο του οποίου η δομή έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010) και έχει χαρακτηριστεί ως μεταφορέας ινδολυλ-μεθυλο και βενζυλο-υδαντοϊνών (indolylmethyl- and benzyl-hydantoins). Είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταφορείς NCS1 ανήκουν σε μια ευρύτερη υπεροικογένεια με όμοιο δομικό πρότυπο που περιλαμβάνει επίσης τις οικογένειες μεταφορέων νευροδιαβιβαστών: Na⁺ (NSS), αμινοξέων-πολυαμινών-οργανοκατιόντων (APC), βηταΐνης-χολίνης-καρβινίτης (BTT/BCCT) και διαλυτών ουσιών: Na⁺ (SSS, που περιλαμβάνει και τους συμμεταφορείς γλυκόζης: Na⁺ SGLTs) και χαρακτηρίζεται από την αντίστροφη εσωτερική συμμετρία δύο δεσμίδων των πέντε διαμεμβρανικών α-ελίκων (5+5) οι οποίες λειτουργούν ως δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains) που αλληλοπλέκονται στη δομή του μεταφορέα (Krypotou *et al.*, 2012; Diallinas, 2008; Vangelatos *et al.*, 2009).

Το σύνολο των γνωστών οικογενειών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων συμπληρώνει η οικογένεια NCS2 [Nucleobase - Cation Symporter-2, παλαιότερα γνωστή και ως NAT, (Nucleobase-Ascorbate Transporters)], η οποία είναι ευρύτατα διαδεδομένη κατά την εξέλιξη (υπάρχει σε όλες τις μεγάλες ταξινομικές ομάδες οργανισμών) και περιλαμβάνει περισσότερους από 6000 μεταφορείς, οι οποίοι εμφανίζουν ιδιαίτερα συντηρημένη την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (binding-site architecture) και το γενικό δομικό πρότυπο, αλλά διαφοροποιούνται αισθητά σε σχέση με το υπόστρωμα που μεταφέρουν. Στην οικογένεια αυτή ανήκει ο συμμεταφορέας ξανθίνης: H^+ XanQ της *E. coli*, που μελετάται στην παρούσα διατριβή και γι' αυτό παρουσιάζεται παρακάτω διεξοδικότερα. Οι μεταφορείς της οικογένειας NCS2 κατατάσσονται σε δύο κύριες ομάδες ορθόλογων πρωτεϊνών (**Cluster of Orthologous Groups of proteins, COG**) τις COG2233 και COG2252 (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Φυλογενετικό δέντρο αντιπροσωπευτικών μελών (χαρακτηρισμένων και μη) της οικογένειας NCS2 όπου φαίνονται οι δύο διακριτές ομάδες ομολόγων COG2233 (NAT, σε άλλη ονομασία) και COG2252 (AzgA-like, σε άλλη ονομασία)

Λειτουργικά χαρακτηρισμένα ομόλογα σημειώνονται με χρωματισμένο αστερίσκο κλειστό (δεδομένα από λειτουργικά πειράματα) ή ανοικτό (δεδομένα μόνο από γενετικές αναλύσεις). Με διαφορετικά χρώματα συμβολίζονται οι διαφορετικοί ως προς το βασικό τους υπόστρωμα μεταφορείς: ξανθίνης/ουρικού οξέος (μωβ), ξανθίνης (κόκκινο), σουρακίλης (πράσινο), σουρακίλης/πουρινών (SNBT1, σκούρο πράσινο), L-ασκορβικού (SVCT1 ή SVCT2, τυρκουάζ) και

αδενίνης/ υποξανθίνης/ γουανίνης (σκούρο τυρκουάζ). Με γκρι αστερίσκους σημειώνονται ομόλογα της *Drosophila melanogaster* ή *Arabidopsis thaliana*, που έχουν μελετηθεί αλλά δεν έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Mega 4.1. (από την αναφορά Frillingos, 2012, με μικρές τροποποιήσεις).

Η ομάδα **COG2233** (Εικόνα 1.9) περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, ουρακίλης, αλλά και L-ασκορβικού οξέος (βιταμίνης C, στην ανηγμένη μορφή του), που κατανέμονται μεταξύ οργανισμών όλων των κυρίων ταξινομικών βαθμίδων, εκτός από τα παρασιτικά Πρωτόζωα και τον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Οι σχετικά λίγοι αντιπρόσωποι (ποσοστό περίπου 1%), οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί πειραματικά έως σήμερα, αφορούν κυρίως μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος (Εικόνα 1.9). Μεταξύ αυτών είναι οι μεταφορείς ξανθίνης **XanQ**, **XanP** της *E. coli* (Karatza and Frillingos 2005) και **PbuX** από τον *B. subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997), οι μεταφορείς ουρικού οξέος **UacT** της *E.coli* (Papakostas and Frillingos, 2012), **PucK** και **PucJ** του *B. subtilis* (Schultz *et al.*, 2001) και **SmLL8** του ριζοβακτηρίου *Shinorizobium meliloti* (Μπότου Μ., Φλεμετάκης Ε., Φριλίγγος Ε., αδημοσίευτα αποτελέσματα), οι μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος **UapA** και **UapC** του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998), **AfUapA** του παθογόνου *Aspergillus fumigatus* (Goudela *et al.*, 2008), **Xut1** της *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2005), **AcS4X6** του παθογόνου βακτηρίου *Acinetobacter calcoaceticus* (Λάζου Π, Μεταπτυχιακή εργασία, 2014), **SmLL9** του ριζοβακτηρίου *Shinorizobium meliloti* (Παπακώστας Κ., Διδ. διατριβή, 2011) και **Lpe1** του καλαμποκιού (*Zea mays*) (Argyrou *et al.*, 2001), ο μεταφορέας ουρακίλης **UraA** της *E. coli* (Andersen *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2011), καθώς και δύο μεταφορείς ευρύτερης εξειδίκευσης, ο μεταφορέας ουρακίλης/ θυμίνης/ ξανθίνης **RutG** της *E. coli* (Παπακώστας Κ., Μπότου Μ., Φριλίγγος Ε., αδημοσίευτα αποτελέσματα) (βλ. Kim *et al.*, 2010; Loh *et al.*, 2006) και ο μεταφορέας ουρακίλης/ θυμίνης/ υποξανθίνης/ ξανθίνης/ γουανίνης **rSNBT1** του επίμυος *Rattus norvegicus* (Yamamoto *et al.*, 2010). Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο ομόλογα των μεταφορέων COG2233, οι **hSVCT1** και **hSVCT2**. οι οποίοι αποτελούν αποκλειστικά μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος (Bürzle and Hediger, 2012).

Η υποοικογένεια **COG2252** αποτελεί την δεύτερη ομάδα μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NCS2, στην οποία περιλαμβάνονται μεταφορείς αδενίνης, υποξανθίνης ή/και γουανίνης (δηλαδή πουρινών χωρίς οξυ-ομάδα στη θέση 2 του πουρινικού δακτυλίου, Papakostas *et al.*, 2013) και απαντάται σε Αρχαία, Βακτήρια, Μύκητες, Φυτά και μερικά φωτοσυνθετικά Πρώτιστα. Σε αυτή την ομάδα επίσης έχουν χαρακτηριστεί ελάχιστοι αντιπρόσωποι, μεταξύ των οποίων είναι οι δύο μεταφορείς γουανίνης/ υποξανθίνης **PbuG** και **PbuO** του *B.subtilis* (Saxild *et al.*, 1987; 1988; 2001), οι

μεταφορείς αδενίνης **PurP** (AdeP) και **YicO** (AdeQ) Papakostas *et al.*, 2013), και υποξανθίνης/γουανίνης **YjcD** (GhxP) και **YgfQ** (GhxQ) της *E. coli* (Papakostas *et al.*, 2013; Kozmin *et al.*, 2013). Στα μέλη αυτής της ομάδας συγκαταλέγονται επίσης οι μεταφορείς αδενίνης/ γουανίνης/ υποξανθίνης από μύκητες και φυτά που έχουν χαρακτηριστεί ως AzgA-like (Cecchetto *et al.*, 2004; Pantazopoulou and Diallinas, 2007), με χαρακτηρισμένα τα μέλη **AzgA** του *A.nidulans* (Cecchetto *et al.*, 2004), **AtAzg1** και **AtAzg2** του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Mansfield *et al.*, 2009). Πρόσφατα δεδομένα από συγκριτικές δομικές αναλύσεις μεταξύ των διαφορετικών μεταφορέων πουρινών των δύο διακριτών ομάδων της οικογένειας NCS2 φανερώνουν ότι τα ομόλογα της ομάδας COG2252 έχουν μακρινή συγγένεια με την UraA της COG2233 που χρησιμοποιείται ως κρυσταλλογραφικό πρότυπο (ταυτότητα καταλοίπων 14% έως 19%) αλλά διατηρούν τη βασική δομική και λειτουργική δομή του κέντρου δέσμησης με αμινοξέα τόσο των βακτηριακών (Papakostas *et al.*, 2013) όσο και των μυκητιακών μεταφορέων αδενίνης/ γουανίνης/υποξανθίνης (Kryptou *et al.*, 2014) να έχουν παρόμοιους ρόλους με αυτά των ομόλογων μεταφορέων πουρινών της COG2233 (Frillingos, 2012).

Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταφορείς της οικογένειας NCS2, τόσο της ομάδας COG2233 (NCS2/NAT) όσο και της COG2252 (AzgA-like), οι οποίοι οργανώνονται δομικά σε επαναλήψεις με αντίστροφη εσωτερική συμμετρία δύο δεσμίδων επτά διαμεμβρανικών τμημάτων (7+7) οι οποίες λειτουργούν ως δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains) που αλληλοπλέκονται στη δομή του μεταφορέα, μοιράζονται έναν βαθμό εξελικτικής συγγένειας ακόμη και με την οικογένεια NCS1 (Gournas *et al.*, 2008; Frillingos, 2012), η οποία ανήκει σε διαφορετικό δομικό πρότυπο, όπως αναφέρθηκε. Πρόσφατα, μάλιστα, τόσο η οικογένεια NCS2 όσο και η NCS1 και οι άλλες δομικά ομόλογες της NCS1 οικογένειες (APC, SSS, NSS, BCCT) κατατάχθηκαν σε μία ευρύτερη υπεροικογένεια που ονομάστηκε υπεροικογένεια APC, με βάση γενικά δομικά γνωρίσματα της δομής και της τοπολογίας τους (Vastermark and Saier, 2014; Vastermark *et al.*, 2014).

Στην αλληλουχία των μεταφορέων της οικογένειας NCS2 εντοπίζονται επαναλαμβανόμενες περιοχές (μοτίβα) σε θέσεις με παρόμοιες λειτουργίες, χωρίς όμως να παρατηρείται πάντα ταυτότητα καταλοίπων. Πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την διεξοδική μελέτη των μεταφορέων της *E.coli* XanQ (Frillingos, 2012), YjcD και PurP (Papakostas *et al.*, 2013), απέδειξαν ότι οι διαφορές αυτές αντανακλούν και στην διαφορά των υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν τα μέλη των δύο ομάδων της οικογένειας. Γίνεται λοιπόν κατανοητό πως η αρχική προσέγγιση μελέτης μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφοράς θα μπορούσε να είναι ο εντοπισμός μοτίβων αλληλουχίας και κατ' επέκταση αυτοτελών δομικών περιοχών του μορίου, σε συγκριτική ανάλυση

με ήδη γνωστές δομές μελών της ίδιας ή/και συγγενικών οικογενειών, εφόσον αυτές υπάρχουν. Τέτοιου είδους πληροφορίες πηγάζουν καταρχήν από την δημοσίευση κρυσταλλικών μοντέλων υψηλής ευκρίνειας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικά πρότυπα για εξελικτικά ομόλογους διαμεμβρανικούς μεταφορείς με διαφορετικές εξειδικεύσεις ή λειτουργίες.

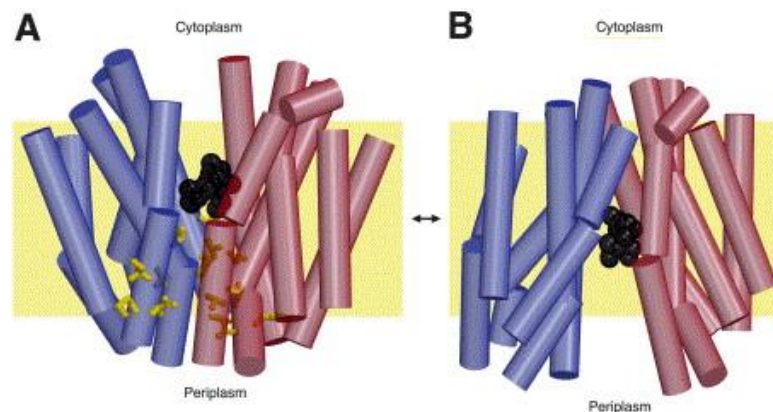
1.2.2 Δομικά πρότυπα μεταφορέων δευτερογενούς τύπου

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς αποτελεί σημείο – κλειδί για την μελέτη τους. Οι δυσκολίες όμως που υπάρχουν για την απομόνωση ενός μεταφορέα σε μεγάλη κλίμακα με την ταυτόχρονη διατήρηση της δομής του σε διαλυτή μορφή είναι πολλές και αφορούν στην πολυπλοκότητα της οργάνωσης αυτών των πρωτεϊνικών συστημάτων, οι οποίες πρέπει να εξαχθούν από την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα χωρίς να αποδιαταχθεί η υδροφοβική και αμφιπαθική τους φύση. Για αυτούς τους λόγους βιβλιογραφικά είναι σχετικά λίγες οι δημοσιεύσεις μεταφορέων δευτερογενούς τύπου όπου να δίνεται η δομική οργάνωση ενός μεταφορέα στηριζόμενη σε δεδομένα μοριακής βιολογίας ή/και σε κρυσταλλογραφικές απεικονίσεις. Όταν όμως τέτοιου είδους πληροφορία δίνεται, το δομικό μοντέλο αποτελεί πρότυπο αρχικής προσέγγισης και μελέτης ομόλογων μεταφορέων της ίδιας οικογένειας, ενώ έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων δομικών μοτίβων στα ορθόλογα μέλη είναι ένδειξη παρόμοιου τρόπου λειτουργίας του μηχανισμού τους.

1.2.2.1 Η περμεάση λακτόζης LacY ως δομικό πρότυπο

Στην πρώτη κατηγορία δομικού προτύπου, όπου εμπίπτουν αρκετές επιλυμένες δομές μεταφορέων δευτερογενούς τύπου από πολλές εξελικτικά συγγενείς οικογένειες, χαρακτηριστικός εκπρόσωπος είναι η περμεάση λακτόζης LacY. Ο μεταφορέας αυτός ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS) και η κρυσταλλική του δομή λύθηκε σε ευκρίνεια 3,5Å αρχικά (Abramson *et al.*, 2003) σε μία μεταλλαγμένη μορφή που ευνοεί τη δομική σταθερότητα του μορίου (LacY-C154G) (Smirnova and Kaback, 2003) παρουσία υποστρώματος (β-D-γαλακτοπυρανοσυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο, TDG) και του φυσικού τύπου (LacY-wt), σε ευκρίνεια 3,6Å, λίγο αργότερα (Guan *et al.*, 2007). Επίσης, έχουν δημοσιευθεί και τρεις ακόμη κρυσταλλικές δομές της LacY, δύο της LacY-C154G χωρίς υπόστρωμα σε όξινο και ουδέτερο pH (Mirza *et al.*, 2006) και μία της LacY-A122C μαζί με τον αναστολέα-υπόστρωμα MTS-γαλακτοσίδιο (Chaptal *et al.*, 2011). Η διαμόρφωση της περμεάσης σε όλες αυτές τις

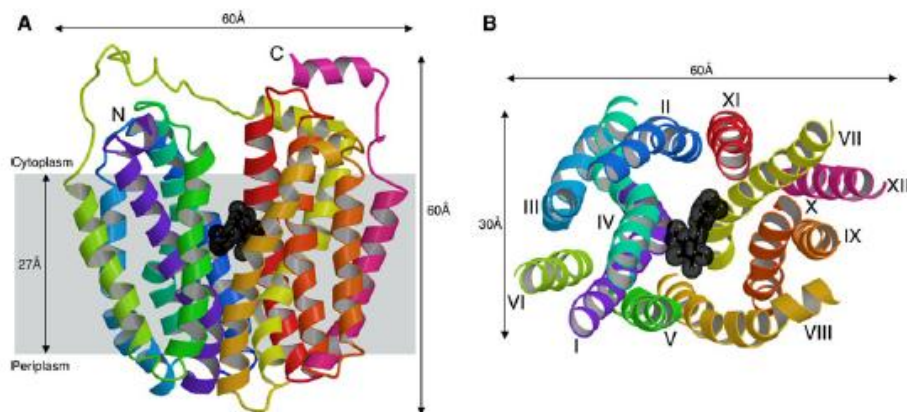
κρυσταλλικές δομές είναι με το κέντρο δέσμησης «ανοικτό» προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος (inward open). Πιο πρόσφατα (Kumar *et al.*, 2014) έχει δημοσιευθεί μία κρυσταλλική δομή της LacY όπου το μόριο είναι σε διαμόρφωση σχεδόν «κλειστή» (occluded state) που προκύπτει με μια μεταλλαγμένη μορφή της περμεάσης (G46F/G262F) η οποία φαίνεται να σταθεροποιεί μία διαμόρφωση με το κέντρο δέσμησης «ανοικτό» προς την πλευρά του περιπλάσματος (outward facing) (Smirnova *et al.*, 2013). Τα κρυσταλλικά αυτά μοντέλα προτείνουν έναν γενικό μηχανισμό μεταφοράς που επιβεβαιώνεται με την λύση κρυσταλλικών δομών και άλλων μελών της ίδιας υποοικογένειας, όπως είναι οι μεταφορείς GlpT (Huang *et al.*, 2003, ευκρίνεια 3,3Å), EmrD (Yin *et al.*, 2006, ευκρίνεια 3,5Å), FucB (Dang *et al.*, 2010, ευκρίνεια 3,1Å), NarU (Yan *et al.*, 2013, ευκρίνεια 3,1Å), NarK (Zheng *et al.*, 2013, ευκρίνεια 2,8Å), XylE (Sun *et al.*, 2012, ευκρίνεια 2,6-2,9Å), GLUT1 (Deng *et al.*, 2014, ευκρίνεια 3,2Å). Το κοινό γνώρισμα των δομών αυτών είναι η ύπαρξη δύο διακριτών ομόλογων δομικών περιοχών που αντιστοιχούν σε δύο δέσμες των έξι διαμεμβρανικών α -ελίκων, που δεν αλληλοπλέκονται αλλά ξεχωρίζουν μεταξύ τους στη δομή, μία N-τελική (N6) και μία C-τελική (C6) (six-helix bundles, N6 and C6 domains). Οι δύο δομικά ομόλογες περιοχές N6-C6 σχηματίζουν ανάμεσά τους το κέντρο δέσμησης ως μία κοιλότητα ανοιχτή προς την περιπλασματική πλευρά με κατάλοιπα αμινοξέων στην βάση αυτής της κοιλότητας, περίπου στο μέσο του μορίου, να εμπλέκονται στη δέσμηση του υποστρώματος (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10: Διαμορφωτικές αλλαγές του μεταφορέα LacY κατά την μεταφορά του υποστρώματος.

Απεικονίσεις των α -ελίκων παράλληλα στην μεμβράνη (με κίτρινο χρώμα). Οι δύο δέσμες των έξι διαμεμβρανικών α -ελίκων, μία N-τελική και μία C-τελική (six-helix bundles, N6-C6 domains) απεικονίζονται με μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα και το υπόστρωμα TDG με σφαίρες μαύρου χρώματος. A: Διαμόρφωση προς τα μέσα (κρυσταλλική δομή Abramson *et al.*, 2003) παράλληλα στην μεμβράνη. B: Υποθετικό μοντέλο της διαμόρφωσης προς τα έξω (με βάση στοιχεία από πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης, Sorgen *et al.*, 2002). (από Abramson *et al.*, 2003)

Σύμφωνα με δεδομένα από λειτουργικά πειράματα που ακολούθησαν τα επόμενα χρόνια στον LacY (βλ. 1.5) το «δέσιμο» του υποστρώματος επάγει τις κατάλληλες διαμορφωτικές αλλαγές (δυναμική κίνηση των περιοχών N6-C6) του μεταφορέα που κλείνει από την περιπλασματική πλευρά και ανοίγει προς την κυτταροπλασματική απελευθερώνοντας έτσι το υπόστρωμα (Smirnova *et al.*, 2011). Αυτός ο μηχανισμός μεταφοράς, γνωστός και ως μοτίβο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων (rocker switch), είναι χαρακτηριστικός, όπως προαναφέρθηκε, για τα μέλη της οικογένειας MFS, η οποία καλύπτει περίπου το 25% των μεταφορέων δευτερογενούς τύπου. Ταυτόχρονα με το ίδιο δομικό-μηχανιστικό μοτίβο μοντελοποιούνται και άλλες πρωτεΐνες, λιγότερο συγγενικές, όπως ο μεταφορέας μελιβιόζης της *E.coli* MelB (Yousef and Guan, 2009; Ethayathulla *et al.*, 2014) και μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters) που μεταφέρουν το υπόστρωμά τους με διευκολυνόμενη διάχυση (στα θηλαστικά) ή με ενεργό μεταφορά εξαρτώμενη από H⁺ (στους μύκητες, τα πρωτόζωα ή τα φυτά) (Parageorgiou *et al.*, 2008; Valdes *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2013).



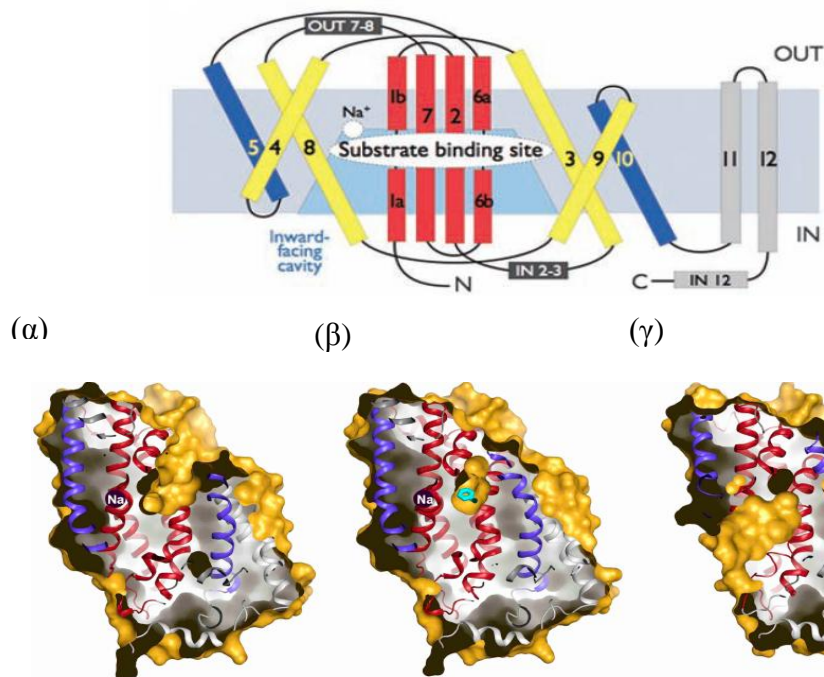
Εικόνα 1.11: Δομικό μοντέλο της περμεάσης LacY

A: όψη παράλληλα στην μεμβράνη (με μωβ χρώμα) και **B:** όψη κάθετα της μεμβράνης από την κυτταροπλασματική πλευρά. Το υπόστρωμα TDG φαίνεται με σφαίρες μαύρου χρώματος (από Kaback *et al.*, 2011).

1.2.2.2 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια NCS1

Δομικό πρότυπο για την οικογένεια NCS1 αποτελεί ο μεταφορέας **Mph1** από το *Microbacterium liquefaciens* (Suzuki and Henderson, 2006), που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα ινδολυλ-μεθυλο και βενζυλο-υδαντοΐνες (indolylmethyl- and benzyl-hydantoins) και έχει κρυσταλλωθεί σε τρεις συνολικά διαφορετικές διαμορφώσεις (Εικόνα 1.12) (Weyand *et al.*, 2008, 2011; Shimamura *et al.*, 2010). Το ίδιο δομικό – μηχανιστικό πρότυπο για την μεταφορά διαφορετικών υποστρωμάτων ακολουθούν μέλη των οικογενειών NSS (Neurotransmitter Sodium Symporters) (Yamashita *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008; Forrest *et al.*, 2008), APC (Amino acid/Polyamine/ Organocation, APC) (Gao *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Shaffer *et al.*, 2009) και των οικογενειών SSS (Solute:Sodium Symporters) (Faham *et al.*, 2008), BCCT (Betaine/Choline/Carnitine Transporters, BCCT), καθώς και άλλων (βλ. Kryptou *et al.*, 2012).

Οι διαφορετικές διαμορφώσεις των μεταφορέων αυτού του τύπου όπως απεικονίζουν οι κρυσταλλικές δομές, μας επιτρέπουν μοντελοποίηση νέων δομικών ομολόγων καθώς και την κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας τους σχετικά με την πρόσδεση και μεταφορά του υποστρώματος (Weyand *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, τα μέλη αυτών των οικογενειών, ανεξάρτητα από τον συνολικό αριθμό των ελίκων τους έχουν δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις των πέντε διαμεμβρανικών ελίκων η κάθε μία (5+5 fold), οι οποίες είναι συνυφασμένες με τρόπο ώστε να δημιουργείται η περιστρεφόμενη κοιλότητα μεταφοράς από τέσσερις συνήθως έλικες δηλ. το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος (rocking bundle). Οι υπόλοιπες έλικες (έξι συνήθως) επικαλύπτουν το κέντρο δέσμευσης σχηματίζοντας διασταυρούμενα μοτίβα σχήματος V προς το εξωτερικό της μεμβράνης, που κινούνται ελάχιστα (scaffold). Επίσης, συγκεκριμένα κατάλοιπα λειτουργούν ως «πύλες», επιτρέποντας μόνο τα κατάλληλα υποστρώματα να εισέλθουν (Forrest *et al.*, 2008; 2009; 2011).



Εικόνα 1.12: Ο μεταφορέας Mph1 (οικογένεια NCS1).

Επάνω: Σχηματική τοπολογία και δευτεροταγής δομή του μεταφορέα Mph1. Με κόκκινο χρώμα διακρίνονται οι διαμεμβρανικές έλικες που συμμετέχουν στο σχηματισμό της δομικής περιοχής «πυρήνα» και με κίτρινο οι έλικες που παραμένουν σχετικά σταθερές κατά την εναλλαγή διαμορφώσεων (scaffold). Με μπλε χρώμα είναι οι δύο έλικες 5 και 10 που φαίνεται να συμμετέχουν εναλλάξ στον αποκλεισμό ή απελευθέρωση της πρόσβασης στο υπόστρωμα (Shimamura *et al.*, 2010).

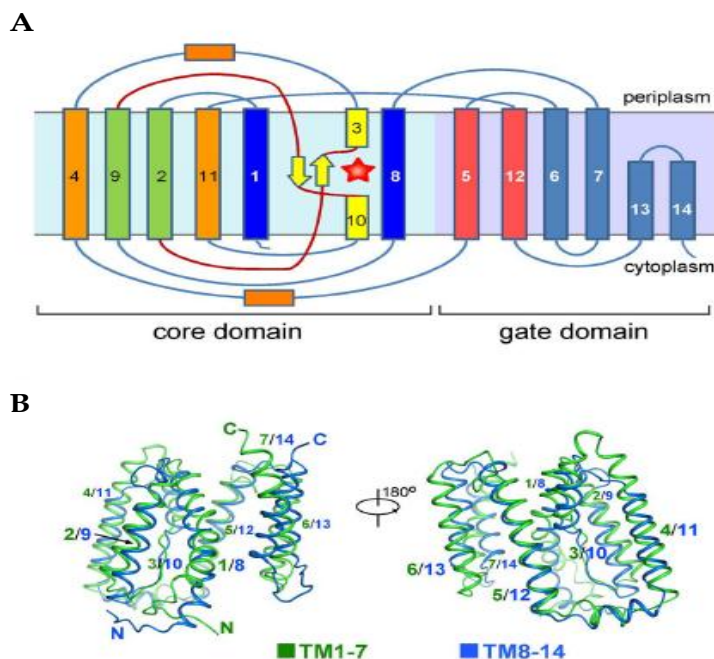
Κάτω: Οι τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις του Mph1 που εμφανίζονται στις κρυσταλλικές δομές. **(α)** Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα Mph1 ελεύθερου υποστρώματος με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό και **(β)** με το υπόστρωμα σε σχετικά «κλειστή» διαμόρφωση (occluded state) (Weyand *et al.*, 2008). **(γ)** Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα Mph1 ελεύθερου υποστρώματος με διαμόρφωση ανοιχτή προς το εσωτερικό με άνοιγμα προς τα μέσα (Shimamura *et al.*, 2010).

1.2.2.3 Η πρώτη κρυσταλλική δομή στην οικογένεια NCS2

Η πρόσφατα δημοσιευμένη κρυσταλλική δομή ενός μέλους της NCS2, δηλαδή της περμεάσης UraA (PDB ID 3QE7), αποτελεί δομικό πρότυπο για τους μεταφορείς της οικογένειας, διαφορετικό από τα ήδη γνωστά δομικά μοτίβα άλλων οικογενειών. Η δομή της περμεάσης ουρακίλης UraA της *E.coli* (Lu *et al.*, 2011) λύθηκε με ευκρίνεια ανάλυσης 2.8 Å και επιτεύχθηκε μετά την σταθεροποίηση της πρωτεΐνης με την δέσμευση του υποστρώματος σε όλη την διάρκεια της κρυστάλλωσης σε συνδυασμό με ένα μόριο β-NG (β-εννεΐλογλυκοσιδίου) στο τελευταίο στάδιο του καθαρισμού.

Η ιδιαιτερότητα της δομής της περμεάσης UraA σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη γνωστή δομή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που έχει αναλυθεί έως σήμερα έγκειται στον τρόπο τοποθέτησης των διαμεμβρανικών της τμημάτων στην μεμβράνη (Εικόνα 1.13). Σύμφωνα με την δομή ο μεταφορέας αποτελείται από δεκατέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα (TM 1-14), τα οποία διακρίνονται σε δύο ανεστραμμένες δομικές επαναλήψεις (TM1-7 και TM8-14) με άξονα συμμετρίας την μεμβράνη αν περιστραφεί η μία προς την άλλη 180° και τα δύο άκρα, αμινοτελικό και καρβοξυτελικό, εντοπίζονται κυτταροπλασματικά. Τα TM13 και TM14 δεν διαπερνούν εξ ολοκλήρου τη μεμβράνη, ενώ τα TM3 και TM10 αποτελούνται από μία α-έλικα, μία μικρή περιοχή β-πτυχωτής επιφάνειας και μια περιοχή σχετικά ελεύθερης διαμόρφωσης το καθένα, σχηματίζοντας στο κέντρο δέσμευσης του μεταφορέα ένα ζεύγος από αντιπαράλληλους β-κλώνους (β-strands), οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στη δομική οργάνωση του μορίου και στην αναγνώριση του υποστρώματος. Κάθε β-πτυχωτή επιφάνεια αποτελεί συνέχεια μιας εκτεταμένης «ελεύθερης» περιοχής που καταλήγει στο TM3 ή TM10. Τέτοιες ασυνεχείς έλικες, έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες δομές πρωτεϊνών μεταφορέων δευτερογενούς τύπου, όπως στους LeuT_{Aa} της οικογένειας NSS, αλλά είναι ιδιαίτερα ασυνήθιστο ένα διαμεμβρανικό τμήμα να αποτελείται κατά το ήμισυ από μη ελικοειδείς περιοχές, ελεύθερης διαμόρφωσης. Επιπλέον η περιοχή του 11-πεπτιδίου, που αντιστοιχεί στο μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NCS2 (βλ. 1.3.2, κατάλοιπα 323-333 στην XanQ) αποτελεί στην λυθείσα δομή την 10^η ενσωματωμένη στην μεμβράνη α-έλικα. Η συγκεκριμένη περιοχή έχει μελετηθεί διεξοδικά στους ομόλογους μεταφορείς XanQ (Karatzas *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010) και UapA (Diallinas *et al.*, 1998; Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005), αλλά η ακριβής δομή της δεν ήταν δυνατό να περιγραφεί από αλγόριθμους τοπολογίας, οι οποίοι προέβλεπαν εκεί μία κυτταροπλασματική ή επανεισερχόμενη «θηλιά» (βλ. Mermelekas *et al.*, 2010). Πρέπει όμως να τονιστεί ότι πειράματα κυστεϊνικής σάρωσης στην περιοχή καταλοίπων 323-329 (βλ.1.3.2) της XanQ υποστήριξαν

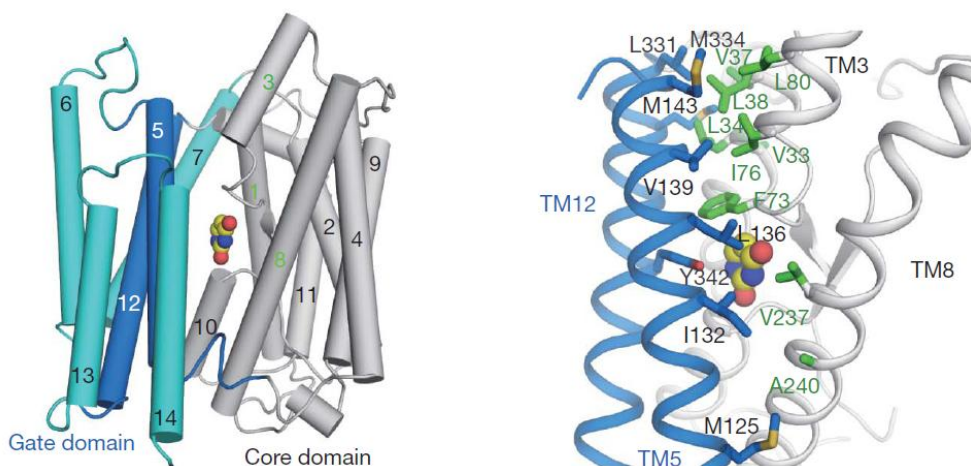
την ύπαρξη α -έλικας, λόγω περιοδικότητας της ευαισθησίας των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης στο αντιδραστήριο NEM (Karatza *et al.*, 2006).



Εικόνα 1.13: Η δομή της περμεάσης UraA της οικογένειας NCS2.

A: Τοπολογικό διάγραμμα της UraA με τα TM διευθετημένα σε δύο δομικές περιοχές, στην δομική περιοχή «πυρήνα» (κίτρινου) και στην δομική περιοχή «εισόδου» (μωβ). Με κόκκινο αστέρι συμβολίζεται το υπόστρωμα. **B:** Διαμόρφωση των δύο ανεστραμμένων δομικών επαναλήψεων των TM της UraA. (Δύο απεικονίσεις με στροφή 180° ως προς τον κατακόρυφο άξονα). (από Lu *et al.*, 2011)

Τα διαμεμβρανικά τμήματα του UraA οργανώνονται στο χώρο σε δύο μη συνεχόμενες δομικές περιοχές, την δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain) και την δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain) (Εικόνα 1.14).

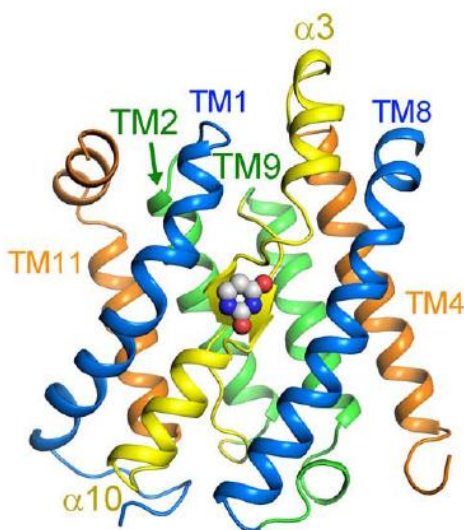


Εικόνα 1.14: Δομική οργάνωση της περμεάσης UraA.

Η περμεάση UraA (εικόνα αριστερά) οργανώνεται σε μία δομική περιοχή «πυρήνα» (γκρι κύλινδροι) και σε μία δομική περιοχή «εισόδου» (κίτρινοι και μπλε κύλινδροι), που συνδέονται

μεταξύ τους με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, μεταξύ πλευριακών ομάδων αμινοξέων οι οποίες εικονίζονται με πράσινες (πυρήνας) και μπλε (είσοδος) ράβδους στην εικόνα δεξιά. (Lu *et al.*, 2011)

Η δομική περιοχή του «πυρήνα» αποτελείται από τα τμήματα 1 έως 4 (TM1-TM4) και 8 έως 11 (TM8-TM11) και όπως περιγράφεται στην συνέχεια αποτελεί την μοριακή βάση για την δέσμευση του υποστρώματος. Από την άλλη πλευρά η δομική περιοχή της «είσοδου» αποτελείται από τα τμήματα 5 έως 7 (TM5-TM7) και 12 έως 14 (TM12-TM14) και σε αυτή θεωρείται ότι υπάρχει μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων για την ορθή λειτουργία του μηχανισμού συμμεταφοράς ουρακίλης: H^+ (βλ. παρακάτω). Εκτός από την υδροφοβική διασύνδεση μεταξύ της περιοχής «πυρήνα» και της περιοχής «είσοδου», αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μέσα στην περιοχή του «πυρήνα» στο κέντρο του μορίου, κυρίως μεταξύ των TM3 και TM10 (Tyr-288 με Ser-71) και των β-πτυχωτών τους επιφανειών τους αλλά και μεταξύ αυτών των τμημάτων με άλλα διαμεμβρανικά τμήματα. Αυτές οι εκτενείς αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν στην σωστή αναδίπλωση της περμεάσης αφού διαμορφώνουν κατάλληλα τα εκτεταμένα «ελεύθερα» τμήματα των TM3 και TM10 και περιφρουρούν τον «πυρήνα» δέσμευσης του υποστρώματος (Lu *et al.*, 2011) (Εικόνα 1.15).

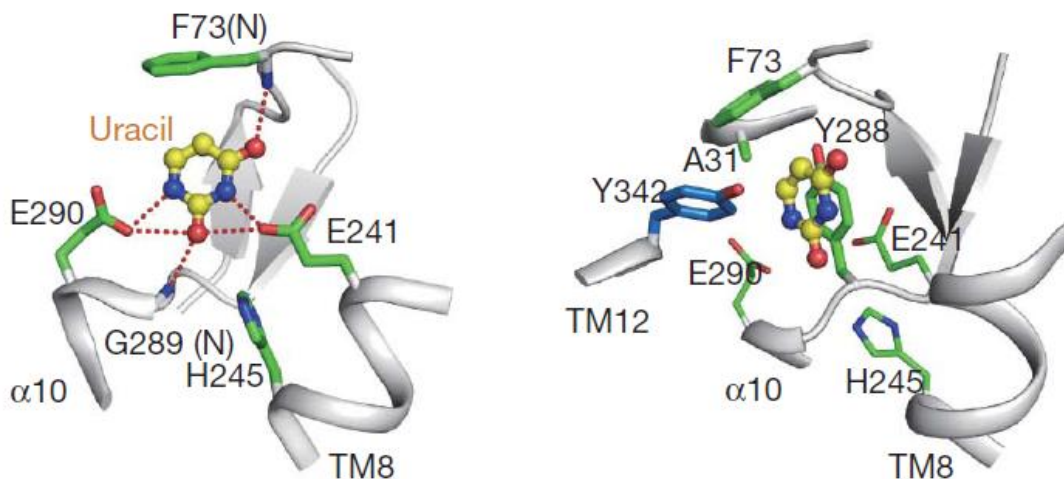


Εικόνα 1.15: Οι αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και οι «θηλιές» ελεύθερης διαμόρφωσης των TM3 και TM10 διαμορφώνουν την επιφάνεια πρόσδεσης του υποστρώματος στην περμεάση ουρακίλης UraA. Η ουρακίλη απεικονίζεται με λευκές σφαίρες. (Lu *et al.*, 2011)

Το υπόστρωμα ουρακίλη εμφανίζεται στην κρυσταλλική δομή της περμεάσης με τον πυριμιδικό της δακτύλιο παράλληλο προς τις β-πτυχωτές επιφάνειες, να βρίσκεται σε μία κοιλότητα που περιβάλλεται από αρνητικά ηλεκτροστατικά δυναμικά. Το κέντρο δέσμευσης διαμορφώνεται από τα TM1,

TM3, TM8, TM10 (περιοχή «πυρήνα») και TM12 (περιοχή «εισόδου») και το υπόστρωμα δεσμεύεται εκεί μέσω: (α) δεσμών υδρογόνου με δύο πολικά διαμεμβρανικά κατάλοιπα γλουταμικού οξέος (Glu-241 και Glu-290 που αντιστοιχούν στα Glu-272 και Gln-324 της περμεάσης ξανθίνης XanQ), (β) δεσμών υδρογόνου με τα άτομα αζώτου των αμιδίων των καταλοίπων Phe-73 και Gly-289 (Phe-94 του TM3 και Ala-323 του TM10 στην XanQ), (γ) αλληλεπιδράσεων van der Waals ανάμεσα στα κατάλοιπα Ala-31, Phe-73, Tyr-288 και Tyr-342 (Pro-38, Phe-94, Phe-322, Phe-376 στην XanQ) (Εικόνα 1.16). Επιπλέον, περιφερικά το κέντρο δέσμευσης σταθεροποιείται μεταξύ άλλων με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στα απόλυτα συντηρημένα στα χαρακτηρισμένα μέλη της NCS2 κατάλοιπα His-24 και Asn-291 (His-31 και Asn-325 στην XanQ). Ταυτόχρονα μια υδροξυλομάδα στο μόριο β-NG (βλ. παραπάνω) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το άζωτο του ιμιδαζολίου της His-245 (Asp-276 στην XanQ) και με το οξυγόνο της κετοομάδας στην θέση 2 της ουρακίλης, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί με την ύπαρξη ενός μορίου νερού στην θέση του β-NG στο πραγματικό περιβάλλον της περμεάσης (Lu *et al.*, 2011).

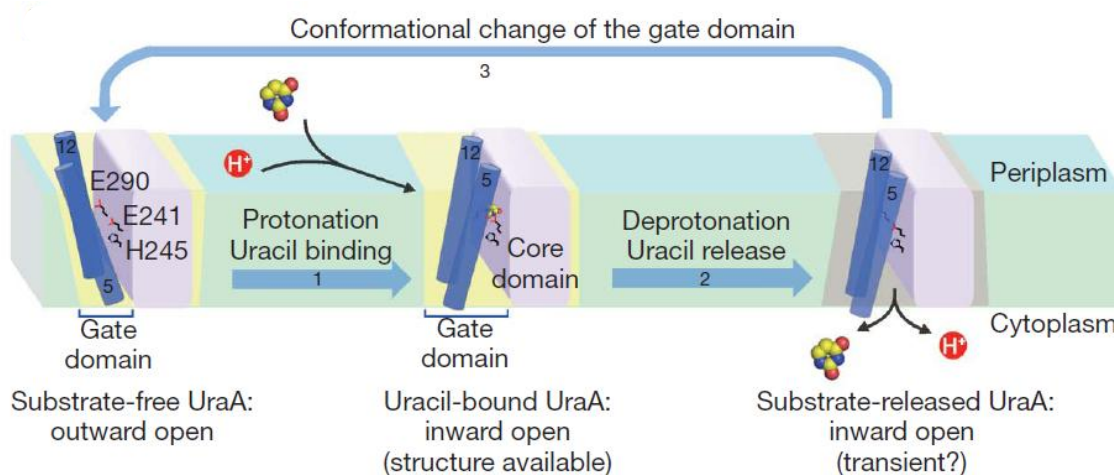
Ο μεταφορέας UraA έχει χαρακτηριστεί συμμεταφορέας H⁺:ουρακίλης και επομένως μέσα στα πλαίσια της σωστής λειτουργίας του μεταφορέα είναι και η δέσμευση του H⁺. Σύμφωνα με το μοντέλο η μετατόπιση του πρωτονίου βασίζεται σε πρωτονίωση και αποπρωτονίωση καταλοίπων που συμμετέχουν στον μηχανισμό δέσμευσης της ουρακίλης και είναι αναντικατάστατα για την ενεργό μεταφορά του υποστρώματος (Glu-241, His-245, Glu-290).



Εικόνα 1.16: Προσανατολισμός της ουρακίλης κατά την δέσμευσή της στην περμεάση UraA.

Το υπόστρωμα ουρακίλη (σφαιρίδια κίτρινου χρώματος) προσανατολίζεται κατάλληλα κατά την δέσμευσή του με την βοήθεια πολικών αλληλεπιδράσεων (αριστερά) και δεσμών van der Waals (δεξιά). (Lu *et al.*, 2011)

Συνοψίζοντας, ο μηχανισμός που προτείνεται από τους Lu *et al.* (2011) για την μεταφορά της ουρακίλης από την περμεάση UraA είναι ο εξής: αρχικά η περμεάση πριν δεσμευτεί το υποστρώμα είναι ανοιχτή προς το περίπλασμα και τα δύο κατάλοιπα γλουταμικού οξέος (Glu-241, Glu-290) είναι αποπρωτονιωμένα και αρνητικά φορτισμένα διατηρώντας την κατάλληλη απόσταση μεταξύ των δύο δομικών περιοχών του «πυρήνα» και της «εισόδου». Με την δέσμευση του υποστρώματος και του H⁺, κάποιο από τα παραπάνω δύο κατάλοιπα γλουταμικού οξέος πρωτονιώνεται επάγοντας διαμορφωτικές αλλαγές του μεταφορέα κυρίως στην περιοχή της «εισόδου» έτσι ώστε να ανοίξει προς την αντίθετη πλευρά (κυτταροπλασματικά). Ταυτόχρονα μέσω μορίων νερού το H⁺ μετατοπίζεται από το Glu στην His-245 για απελευθερωθεί τελικά μαζί με την ουρακίλη στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αποπρωτονιωμένη ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα διαμόρφωση του μεταφορέα γρήγορα μεταβάλλεται για να επανέλθει η περμεάση στην αρχική της κατάσταση (ανοιχτή προς το περίπλασμα). Ο μηχανισμός αυτός βέβαια είναι πολύ απλουστευτικός και δεν μπορεί να στηριχθεί μέχρι στιγμής σε αναλυτικά πειραματικά δεδομένα από βιοχημικές ή βιοφυσικές αναλύσεις ή διεξοδική μεταλλαξιγένεση των αμινοξέων αυτών στην UraA (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17: Προτεινόμενος μηχανισμός για την μεταφορά της ουρακίλης από την περμεάση UraA.

Τα κατάλοιπα Glu-241, His-245 και Glu-290 σημειώνονται στο παραπάνω μοντέλο γιατί διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος και στην μεταφορά του πρωτονίου κατά την συμμεταφορά (βλ. κείμενο). (από Lu *et al.*, 2011)

Όλες οι αλληλεπιδράσεις οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων και συμμετέχουν στην δομή αλλά και λειτουργία της περμεάσης UraA (Lu *et al.*, 2011) σχετίζονται με την ύπαρξη σημαντικών καταλοίπων σε θέσεις οι οποίες είναι ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των

μελών της οικογένειας NCS2 και αφορούν κυρίως σε δυνητικά φορτισμένα, πολικά και αρωματικά αμινοξέα σε διαμεμβρανικά τμήματα. Η κρυσταλλική δομή της περμεάσης UraA ουσιαστικά επιβεβαιώνει την θεώρηση των σχέσεων δομής - λειτουργίας των ομολόγων NCS2 που έχουν μελετηθεί περισσότερο, δηλαδή των XanQ (Frillingos, 2012) και UapA (Kosti *et al.*, 2012), ως προς τον κεντρικό ρόλο σημαντικών καταλοίπων αμινοξέων που φαίνεται να ανήκουν στην περιοχή του κέντρου δέσμησης υποστρώματος. Τα σημαντικά αμινοξέα (είτε αναντικατάστατα για τη λειτουργία, είτε καθοριστικά για την εξειδίκευση) τα οποία μελετήθηκαν πριν και μετά την δημοσίευση της κρυσταλλικής δομής (μεγάλο μέρος αυτών στην παρούσα εργασία) παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης, τόσο στην ομάδα COG2233 (Papakostas and Frillingos, 2012) όσο και στην ομάδα COG2252 (Papakostas *et al.*, 2013), και κυρίως ανήκουν στις έλικες TM3, TM8 και TM10 (Kosti *et al.*, 2012; Karna and Frillingos, 2011; Georgopoulou *et al.*, 2010).

1.3 Η περμεάση ξανθίνης XanQ του εντεροβακτηρίου *E.coli*

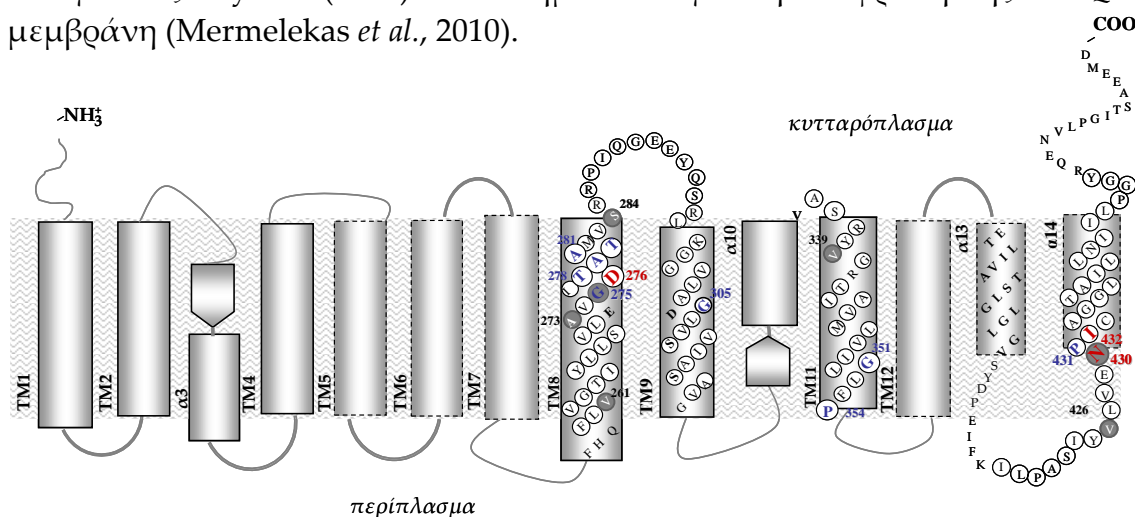
Ο μεταφορέας XanQ, του εντεροβακτηρίου *E. coli*, έχει χαρακτηριστεί (Karatza and Frillingos, 2005) ως συμμεταφορέας ξανθίνης: H⁺ υψηλής συγγένειας (*K_m* 4,6 μM). Ο XanQ χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια ως πρότυπο μοριακό σύστημα για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων της οικογένειας NCS2 (Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006). Το γεγονός της παρουσίας μόνο πέντε εγγενών καταλοίπων κυστεΐνης, τα οποία αντικαταστάθηκαν από κατάλοιπα σερίνης και προέκυψε ένας πλήρως λειτουργικός (*K_m* 5,5 μM) μεταφορέας ξανθίνης (Cys-less XanQ, Karatza and Frillingos, 2005), επέτρεψε τον χαρακτηρισμό του 50% των συνολικά 466 αμινοξέων του μεταφορέα (110 κατάλοιπα στην παρούσα διατριβή) με πειράματα κυστεϊνικής σάρωσης. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη με δεκατέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα με τα δύο άκρα της, αμινο- και καρβοξυ-τελικό, εντοπισμένα κυτταροπλασματικά (βλ. Παράρτημα 2). Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών, όσον αφορά στον χαρακτηρισμό ολόκληρων διαμεμβρανικών τμημάτων, μοτίβων αλληλουχίας αμινοξέων και μεμονωμένων καταλοίπων του XanQ, που προέκυψαν πριν και κατά την διάρκεια υλοποίησης της παρούσας εργασίας από άλλα μέλη του εργαστηρίου μας.

1.3.1 Μελέτη ολόκληρων διαμεμβρανικών τμημάτων

Τα διαμεμβρανικά τμήματα 8, 9 και 11 της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM8, TM9 & TM11)

Πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη (Mermelekas *et al.*, 2010) των συνεχόμενων περιοχών TM8 - TM9 μαζί με την εσωτερική θηλειά σύνδεσής τους (από την Phe-259 μέχρι την Val-314) και μέρους του TM11 (από Thr-342 μέχρι Pro-354) εκτός των καταλοίπων Glu-272, Asp-304 και Arg-431, που αναλύονται στην παρούσα διατριβή (βλ. ενότητα 3.1.1, Εικόνα 3.18) και της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή (από Gly-315 μέχρι Gly-340) (Karatza *et al.*, 2006) που είχε αναλυθεί ξεχωριστά (βλ. παρακάτω, 1.3.2). Τα πειράματα λειτουργικού χαρακτηρισμού των θέσεων αυτών μέσω συστηματικής μεταλλαξιγένεσης ανέδειξαν την καρβοξυλομάδα της πλευρικής ομάδας του καταλοίπου Asp-276 ως αναντικατάστατη για την ενεργότητα και την εξειδίκευση της περμεάσης και μάλιστα ότι το μετάλλαγμα D276E αναγνωρίζει 8-μεθυλοξανθίνη αλλά όχι 2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη και 3-

μεθυλοξανθίνη σε αντίθεση με τον μεταφορέα φυσικού τύπου. Η μελέτη των περιοχών αυτών (Mermelekas *et al.*, 2010) ανέδειξε επίσης τρία μοτίβα αλληλουχίας με υψηλό βαθμό συντήρησης (²⁷³AVGD²⁷⁶, ²⁷⁸TATA²⁸¹, ³⁵¹GLFP³⁵⁴) που περιέχουν πολύ σημαντικά κατάλοιπα, όπως αναλύεται στο επόμενο υποκεφάλαιο (1.3.2). Ταυτόχρονα βρέθηκε ότι τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης V261C, S284C και V339C είναι ευαίσθητα σε απενεργοποίηση από το NEM, ενώ το απόλυτα συντηρημένο κατάλοιπο σε όλα τα μέλη της οικογένειας Gly-305 (TM9) είναι σημαντικό για την έκφραση της XanQ στη μεμβράνη (Mermelekas *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.18: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ με τα αποτελέσματα από την μελέτη ολόκληρων TM.

Το μοντέλο στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011), σε *in silico* τοπολογικές προβλέψεις για την περμεάση XanQ (Π2.1α) και προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου (Π2.1β). Τα τμήματα α-έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περίγραμμα αυτά που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου») (βλ. 1.2.2.3) και β-πτυχωτής επιφάνειας με πεντάγωνα σχήματα σε μορφή βέλους. Με κύκλο σημειώνονται τα κατάλοιπα που μελετήθηκαν εκτενώς στις εργασίες των Mermelekas *et al.* (2010) και Parakostas *et al.*, (2008). Σε μεγέθυνση με κόκκινο (αναντικατάστατα) ή μπλε χρώμα γραμματοσειράς (σημαντικά αλλά όχι αναντικατάστατα) τονίζονται τα κατάλοιπα που βρέθηκαν να είναι σημαντικά για τη λειτουργία ή την εξειδίκευση της XanQ, με γκρι ενιαίο κύκλο οι θέσεις που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση του μεταλλάγματος μονής Cys από το NEM (βλ. 1.3.1).

Το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα (TM14)

Η πλειοψηφία των σημαντικών καταλοίπων που είχαν αναδειχθεί από τη συστηματική σημειακή μεταλλαξιγένεση και μεταλλαξιγένεση κυστεΐνικής σάρωσης της περμεάσης XanQ πριν την παρούσα διατριβή βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα της δομικής περιοχής «πυρήνα» (βλ. 1.2.2.3). Ωστόσο, το TM14 της δομικής περιοχής «εισόδου» έχει αποδειχτεί στον ομόλογο μυκητιακό μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού UraA (Amillis *et al.*, 2001) ότι αλληλεπιδρά με την περιοχή του «μοτίβου υπογραφή» (βλ. 1.3.2) του TM10 της δομικής περιοχής του «πυρήνα». Συγκεκριμένα τα πειράματα αυτά

χαρακτήριζαν το κατάλοιπο Phe-528 στην μέση του TM14 ως μία θέση – φίλτρο, ανεξάρτητη από το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος, που καθορίζει την εξειδίκευση του μεταφορέα UapA. Αργότερα προτάθηκε ότι τον ίδιο ρόλο διαδραματίζει και το κατάλοιπο Thr-526 στο ίδιο διαμεμβρανικό τμήμα (Kosti *et al.*, 2010).

Για να διευκρινιστεί ο ρόλος του TM14 στην περμεάση XanQ εφαρμόστηκαν πειράματα σημειακής μεταλλαξιγένεσης και κυστεϊνικής σάρωσης της περιοχής καταλοίπων 419-450 (TM14) και ανάλυση χιμαιρικών πρωτεϊνών XanQ/UapA (Parakostas *et al.*, 2008; Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή, 2011, Γεωργοπούλου Α., Διδ. Διατριβή, 2011). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανέδειξαν το ρόλο κυρίως δύο καταλοίπων, των Asn-430 και Ile-432 (Thr-526 και Phe-528 στον UapA), τα οποία χωρίς να είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία της XanQ, φαίνεται να προκαλούν συγκεκριμένους στερεοχημικούς περιορισμούς στη δέσμευση ή τη μετακίνηση του υποστρώματος διαμέσου της περμεάσης, οι οποίοι οδηγούν σε μεταλλάγματα με μειωμένη ή μηδενική ενεργότητα και μειωμένη συγγένεια για τη μεταφορά ξανθίνης και την αναγνώριση αναλόγων με ογκώδεις υποκαταστάτες. Τα δύο αυτά κατάλοιπα (Asn-430 και Ile-432), όταν εισήχθησαν στο χιμαιρικό μοριακό υπόβαθρο XanQ/UapA που περιέχει το TM14 από τον UapA και τα άλλα TM από την XanQ (στην θέση των Thr-526 και Phe-528 αντίστοιχα) επανέφεραν την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης του αρχικά ανενεργού χιμαιρικού μεταφορέα (Parakostas *et al.*, 2008). Ο ρόλος των υπόλοιπων καταλοίπων του TM14 που μελετήθηκαν δεν ήταν τόσο καθοριστικός ενώ υπήρχαν κατάλοιπα (π.χ. Pro-431) για τα οποία αποδείχτηκε ότι επηρεάζουν σε μικρότερο βαθμό την ενεργότητα και την εξειδίκευση του χιμαιρικού μεταφορέα (Georgoroulou *et al.*, 2010). Μεταγενέστερα πειράματα απέδειξαν ότι μεγάλη σημασία για την βέλτιστη ενεργότητα του χιμαιρικού μεταφορέα έχει επίσης το μήκος της υδρόφιλης συνδετικής περιοχής αμέσως πριν από το TM14 καθώς και οι Gly-435/436 (Γεωργοπούλου Α., Διδ. Διατριβή, 2011).

Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα πειράματα απέδειξαν ότι το μετάλλαγμα N430C είναι ευαίσθητο στην αλκυλίωση από το NEM, ενώ η απενεργοποίηση του N430C αναστρέφεται παρουσία του αναλόγου του υποστρώματος 2-θειοξανθίνη που αποτελεί ισχυρό προσδέτη για το μετάλλαγμα αυτό (Parakostas *et al.*, 2008). Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011) το TM14 απέχει από το κέντρο δέσμευσης και έτσι το γεγονός ότι η αλκυλίωση του N430C επηρεάζεται από το υπόστρωμα ίσως οφείλεται σε διαμορφωτικές αλληλεπιδράσεις του TM14 με το TM10 ή/και με κάποιο άλλο TM. Η υπόθεση αυτή χρήζει επιβεβαίωσης ή περαιτέρω αξιολόγησης με πειράματα μελέτης φυσικών αλληλεπιδράσεων

(έλεγχοι γειτνίασης) των TM της περμεάσης XanQ, κάτι που αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής.

1.3.2 Χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας που έχουν μελετηθεί λειτουργικά

Η συστηματική σημειακή μεταλλαξιγένεση και μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της περμεάσης XanQ, εφαρμόστηκε και σε ορισμένες συνεχόμενες μικρές περιοχές (χαρακτηριστικά μοτίβα) αλληλουχίας που εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή συντήρηση καταλοίπων στους χαρακτηρισμένους μεταφορείς ουρικού και/ή ξανθίνης της οικογένειας NCS2 (βλ. Frillingos, 2012). Όπως περιγράφεται παρακάτω οι περιοχές-μοτίβα αλληλουχίας που είχαν αναλυθεί πριν την παρούσα διατριβή ήταν ελάχιστες και αφορούσαν μόνο σε τρία διαμεμβρανικά τμήματα της XanQ. Εκτενέστερη μελέτη τέτοιων μοτίβων αλληλουχίας γίνεται μετά από λεπτομερή φυλογενετική ανάλυση όλων των μελών της οικογένειας NCS2 για όλα τα TM του μεταφορέα στην παρούσα διατριβή (βλ. 3.1.3). Τα προηγούμενα πειράματα από τις μελέτες στα TM10, TM8 και TM11 είχαν αναδείξει μερικές σημαντικές περιοχές αλληλουχίας (μοτίβα) που περιέχουν κατάλοιπα κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία της XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένα από τα συντηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων τέτοιων μοτίβων (όπως το Glu-272 του TM8 ή το Asp-304 του TM9) δεν αναφέρονται εδώ γιατί δεν είχαν μελετηθεί στα πλαίσια των προηγούμενων εργασιών αλλά εξετάζονται για πρώτη φορά στην παρούσα διατριβή, στα πλαίσια της ανάλυσης των πολικών καταλοίπων της XanQ που ανήκουν σε διαμεμβρανικές α-έλικες (βλ. 3.1.1).

Το μοτίβο «υπογραφή» NAT στο TM10

Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NCS2/COG2233 (βλ. 1.2, Εικόνα 3.19), ανέδειξε μια 11-πεπτιδική αλληλουχία με υψηλό βαθμό συντήρησης, η οποία περιλαμβάνεται σε μια ευρύτερη περιοχή που αποκαλύφθηκε αρχικά από πειράματα ανάλυσης χμαιοικών πρωτεϊνών UapA/UapC στον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998). Η αλληλουχία αυτή, με αρίθμηση βάσει της περμεάσης XanQ, είναι: $[^{323}(\mathbf{A/G/S})(\mathbf{Q/E/P})\mathbf{N}_x\mathbf{G}_{xxx}\mathbf{T}(\mathbf{R/K/G})^{333}]$ (όπου x, θέσεις που δεν συντηρούν ιδιαίτερα κάποιο αμινοξύ) (Georgopoulou *et al.*, 2010). Η αλληλουχία ονομάζεται **μοτίβο «υπογραφή»** της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων- ασκορβικού (**NAT signature motif**, NAT, nucleobase-

ascorbate transporter, παλαιότερη εναλλακτική ονομασία της NCS2) (Diallinas *et al.*, 1998; de Koning and Diallinas, 2000).

Τα κατάλοιπα του μοτίβου «υπογραφή» (Gln-324, Asn-325, Gly-327, Thr-332 και Gly-333 στην XanQ) που εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης εξετάστηκαν με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και με περαιτέρω διεξοδικές μελέτες σημειακής μεταλλαξιγένεσης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ανάλογες μελέτες μεταλλαξιγένεσης των αντίστοιχων θέσεων στον UapA. Η εικόνα που έδωσε η ανάλυση αυτών των καταλοίπων (Karatza *et al.*, 2006) μοιάζει αρκετά με την γενική εικόνα των αποτελεσμάτων για τα αντίστοιχα κατάλοιπα του UapA (Koukaki *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι: τα κατάλοιπα Gln-324 και Asn-325 είναι απολύτως απαραίτητα (αναντικατάστατα) για τη μεταφορά υποστρώματος (ξανθίνης), η αντικατάσταση της Gln-324 οδηγεί σε δραματική απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης όλων των αναλόγων της ξανθίνης στον μεταφορέα (Karatza *et al.*, 2006) και η δυνατότητα αλκυλίωσης της Asn-325 (N325C) από ειδικά αντιδραστήρια (NEM, MTSES) εμποδίζεται πλήρως παρουσία υποστρώματος (Georgoroulou *et al.*, 2010). Τα κατάλοιπα Thr-332 και Gly-333 δεν είναι αναντικατάστατα ως προς τη λειτουργία της XanQ μιας και η αντικατάστασή τους δεν οδηγεί σε απενεργοποίηση, αλλά προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην εξειδίκευση αναγνώρισης αναλόγων ξανθίνης, ενώ ο ρόλος της Gly-327 φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντικός σε σχέση με την αντίστοιχη Gly του UapA (Karatza *et al.*, 2006).

Επιπλέον, έγινε συστηματική μεταλλαξιγένεση και στις άλλες θέσεις του μοτίβου στην XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Georgoroulou *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα, αν και δε βρέθηκε κάποιο άλλο αμινοξύ με αναντικατάστατο ρόλο στη λειτουργία, πειράματα αναστολής με το ειδικό SH-αντιδραστήριο N-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) απέδειξαν ότι όλες οι θέσεις καταλοίπων στην περιοχή του μοτίβου «υπογραφή» είναι προσβάσιμες από το NEM αλλά και από υδρόφιλα αντιδραστήρια (MTSES) και ορισμένες από αυτές τις θέσεις (Ala-323, Asn-326, Gly-327, Val-328, Ile-329, Thr-332, Gly-333) είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση παρουσία των αντιδραστηρίων, ενώ η ευαισθησία σε απενεργοποίηση αυξάνεται για την θέση Ala-323 (A323C) παρουσία του υποστρώματος, υποδεικνύοντας ότι η θέση αυτή εκτίθεται περισσότερο στο υδρόφιλο περιβάλλον κατά τις αλλαγές διαμόρφωσης που χαρακτηρίζουν τον μηχανισμό λειτουργίας (Georgoroulou *et al.*, 2010).

Το σύνολο αυτών των αποτελεσμάτων υποδεικνύουν την καίρια συμμετοχή των θέσεων του μοτίβου «υπογραφή» στο μηχανισμό λειτουργίας και, μάλιστα, ότι το N-τελικό άκρο του μοτίβου (Ala-323, Gln-324, Asn-325) μπορεί να βρίσκεται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος

(Georgoroulou *et al.*, 2010), κάτι που επιβεβαιώθηκε αργότερα από την κρυσταλλική δομή του ομόλογου UraA (Lu *et al.*, 2011).

Επίσης, έγινε μεταλλαξιγένεση της περμεάσης XanQ και στην ευρύτερη περιοχή του μοτίβου-υπογραφή (που περιλαμβάνει όλη την αλληλουχία από Gly-315 μέχρι Gly-340) (Karatza *et al.*, 2006). Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε επιπρόσθετες σημαντικές θέσεις ανοδικά (Pro-318, Thr-320, Thr-321, Phe-322) και καθοδικά (Ser-336, Val-339, Gly-340) του μοτίβου «υπογραφή», από τις οποίες η Pro-318 είναι αναντικατάστατη (και η Gly-340 σημαντική χωρίς να είναι αναντικατάστατη) για την έκφραση στη μεμβράνη (Karatza *et al.*, 2006) ενώ αντικαταστάσεις των Thr-320, Thr-321 ή Phe-322 οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα ενεργότητας (Karatza *et al.*, 2006), τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης T321C, F322C, S336C, V339C απενεργοποιούνται παρουσία του αντιδραστηρίου NEM και η Ser-336 έχει συνεισφορά στην εξειδίκευση (Georgoroulou *et al.*, 2010).

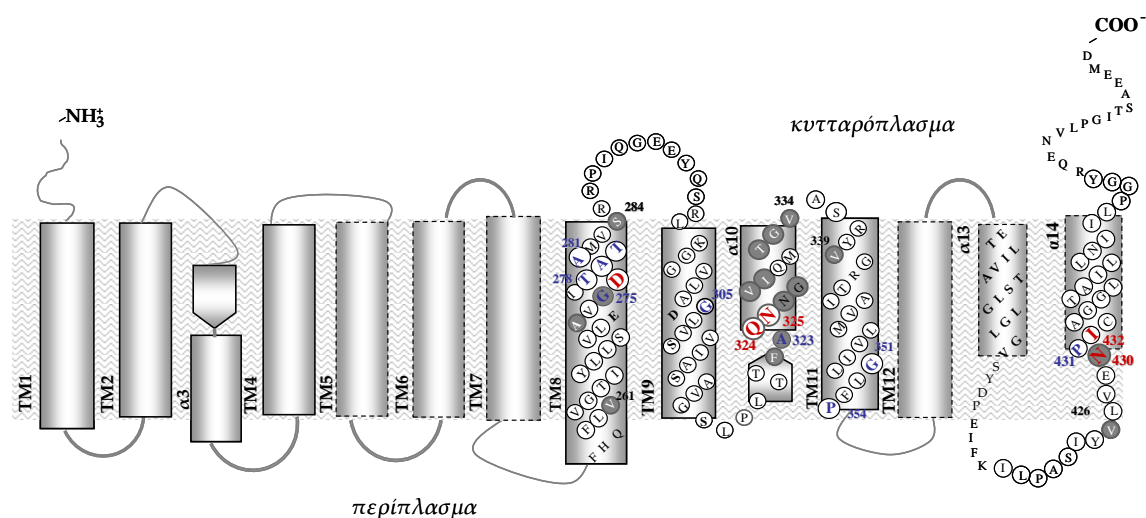
Μοτίβα στα διαμεμβρανικά τμήματα 8 και 11 (TM8 & TM11)

Στο μέσο του TM8 (Εικόνα 3.19) βρίσκεται το συντηρημένο μοτίβο ²⁷³AVGD²⁷⁶, στο οποίο βρέθηκε να υπάρχουν μια σειρά από σημαντικά για τη λειτουργία κατάλοιπα. Αυτά είναι τα Ala-273, Gly-275 (υψηλή ευαισθησία των μεταλλαγμάτων A273C και G275C σε απενεργοποίηση από το αλκυλιωτικό αντιδραστήριο NEM η οποία, στην περίπτωση του G275C, αυξάνεται παρουσία υποστρώματος) και το Asp-276 όπου είναι απαραίτητη για τη λειτουργία η παρουσία μιας καρβοξυλομάδας, ενώ ακόμη και η αντικατάσταση με Glu (D276E) οδηγεί σε δραματική αλλαγή του προφίλ εξειδίκευσης και του προφίλ εξάρτησης από το pH (Mermelekas *et al.*, 2010). Είναι χαρακτηριστικό επίσης ότι στο μοτίβο αυτό περιλαμβάνεται και το Glu-272 (απόλυτα συντηρημένο στους μεταφορείς NCS2/COG2233) το οποίο εξετάστηκε με μεταλλαξιγένεση στην XanQ στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και βρέθηκε ότι είναι λειτουργικά αναντικατάστατο (βλ. 3.1.1). Σύμφωνα με το δομικό μοντέλο του ομόλογου μεταφορέα UraA (Lu *et al.*, 2011) το Glu-272 (TM8) είναι αμινοξύ καθοριστικό για τη δέσμευση του υποστρώματος και το Asp-276 (TM8) είναι πιθανό να συμμετέχει στην συμμεταφορά του πρωτονίου κατά τον μηχανισμό.

Επιπλέον, σε διπλανή περιοχή της αλληλουχίας στο TM8 εντοπίζεται το μοτίβο ²⁷⁸TATA²⁸¹ το οποίο είναι συντηρημένο στα μέλη της NCS2 που μεταφέρουν ξανθίνη και/ή ουρικό οξύ και φαίνεται να είναι σημαντικό κατά τον μηχανισμό αλληλεπιδρώντας με το υπόστρωμα ή με άλλες περιοχές του μορίου με αποτέλεσμα οι αντικαταστάσεις στις θέσεις Ala-279 και Thr-280 στο μοτίβο αυτό με ογκώδη αμινοξέα να επηρεάζουν δραματικά την έκφραση στη μεμβράνη και/ή την ενεργότητα της XanQ (Mermelekas *et al.*, 2010). Οι Ala-279

και Thr-280, που εντοπίζονται στην ίδια όψη α -έλικας του TM8 (βλ. ενότητα 3.1.4) μία και δύο στροφές καθοδικά των αναντικατάστατων Asp-276 και Glu-272, αντίστοιχα, μπορεί να είναι πολύ σημαντικές για τον μηχανισμό μετακίνησης του υποστρώματος από το κέντρο δέσμευσης προς το εσωτερικό του κυττάρου.

Τέλος, ένα συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας $^{351}\text{GLFP}^{354}$ εμπεριέχεται στο περιπλασματικό άκρο του TM11. Σε αυτό το μοτίβο περιέχονται τα κατάλοιπα Gly-351 και Pro-354 που είναι απόλυτα συντηρημένα μεταξύ των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού της NCS2. Αντικατάσταση των δυο αυτών καταλοίπων με Cys, Pro, Gly ή Ala οδηγεί σε μειωμένα ή μηδενικά επίπεδα ενεργότητας της XanQ ως προς την μεταφορά ξανθίνης, αλλά ο ρόλος τους φαίνεται να είναι περισσότερο δομικός αφού οι αντικαταστάσεις της Gly-351 με Cys ή Pro και της Pro-354 με Cys οδηγούν σε μηδενική έκφραση και η αντικατάσταση της Gly-351 με Ala μειώνει στο 30% τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, ενώ μόνο η αντικατάσταση της Pro-354 με Gly (ενεργότητα 10%) διατηρεί υψηλά επίπεδα της περμεάσης στη μεμβράνη (Mermelekas *et al.*, 2010).



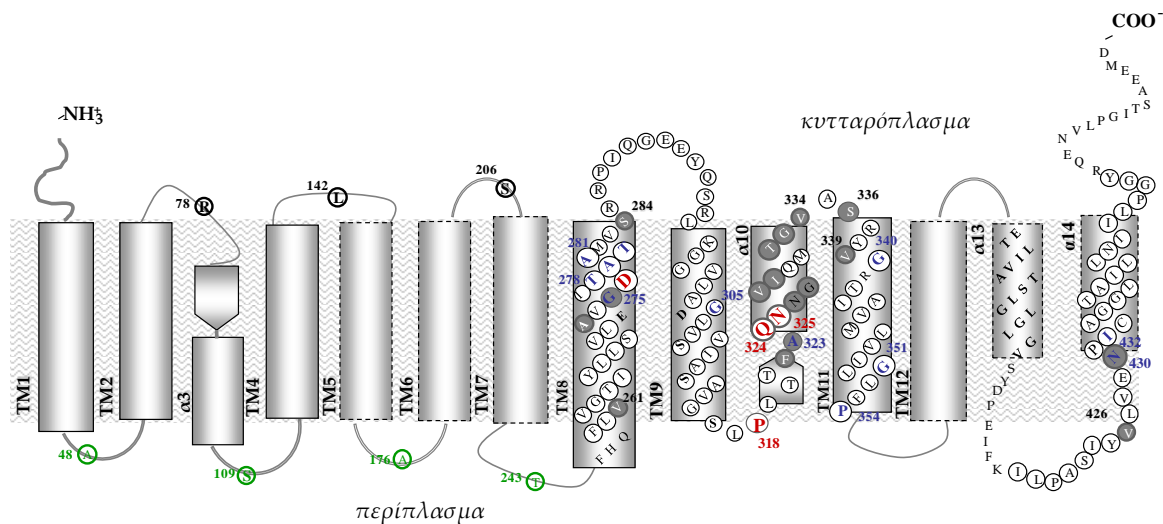
Εικόνα 1.19: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ με τα αποτελέσματα από την μελέτη μοτίβων αλληλουχίας.

Το μοντέλο στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011), σε *in silico* τοπολογικές προβλέψεις για την περμεάση XanQ (Π2.1α) και σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου (Π2.1β). Τα τμήματα α -έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περίγραμμα αυτά που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου») (βλ. 1.2.2.3) και β -πτυχωτής επιφάνειας με πεντάγωνα σχήματα σε μορφή βέλους. Με κύκλο σημειώνονται τα κατάλοιπα που μελετήθηκαν εκτενώς στις εργασίες των Karatza *et al.* (2006), Georgoroulou *et al.* (2010), Mermelekas *et al.* (2010) και Papakostas *et al.* (2008). Σε μεγέθυνση με κόκκινο (αναντικατάστατα) ή μπλε χρώμα γραμματοσειράς (σημαντικά αλλά όχι αναντικατάστατα) τονίζονται τα κατάλοιπα που βρέθηκαν να είναι σημαντικά για τη λειτουργία ή την εξειδίκευση της XanQ, με γκρι ενιαίο κύκλο οι θέσεις που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση του μεταλλάγματος μονής Cys από το NEM (βλ. 1.3.2).

1.3.3 Χαρτογράφηση καταλοίπων για τον προσδιορισμό της τοπολογικής οργάνωσης της περμεάσης XanQ

Στα πλαίσια αρχικής προσέγγισης του τρόπου τοπολογικής οργάνωσης των οχτώ πρώτων διαμεμβρανικών τμημάτων της περμεάσης XanQ κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα μοναδικής κυστεΐνης στις θέσεις Ala-48, Ser-109, Ala-176, Thr-243 (κορυφαίες θέσεις στις συνδετικές θηλειές 1, 3, 5, 7) και Arg-78, Leu-142, Ser-206 (κορυφαίες θέσεις στις συνδετικές θηλειές 2, 4, 6), για τις οποίες οι αλγόριθμοι τοπολογίας προέβλεπαν ότι ανήκουν σε ελεύθερες περιοχές (θηλειές) εκτεθειμένες στο υδρόφιλο περιβάλλον από την πλευρά προς το κυτταρόπλασμα και προς το περίπλασμα, αντίστοιχα (Εικόνα 1.20, βλ. επίσης Παράρτημα 2). Σε σύστημα μεμβρανικών κυστιδίων ορθού προσανατολισμού (Right Side Out Vesicles, RSOs) έγιναν πειράματα αλκυλίωσης μεταλλαγμάτων μονής Cys με το υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES⁻ για τον έλεγχο της προσβασιμότητας των υποκατεστημένων θέσεων κυστεΐνων από το εξωκυτταρικό περιβάλλον (βλ. Georgoroulou *et al.*, 2010).

Τα αποτελέσματα υπέδειξαν μία σαφή εναλλαγή προσβασιμότητας, με τις θέσεις στις θηλειές 1, 3, 5, 7 να είναι προσβάσιμες και στις θηλειές 2, 4, 6 μη προσβάσιμες, κάτι που συμφωνεί με την προβλεπόμενη εναλλαγή των διαμεμβρανικών τμημάτων (Μερμελέκας Γ. Διδ. Διατριβή, 2009). Επίσης, το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για θέσεις στις προβλεπόμενες συνδετικές θηλειές μεταξύ διαμεμβρανικών τμημάτων του C-τελικού ημίσεος του μορίου (Ser-295, Leu-319, Ala-366, Arg-394, Ile-419), όπου βρέθηκε ότι όλα τα αντίστοιχα μεταλλάγματα Cys είναι προσβάσιμα στο υδρόφιλο MTSES⁻ από το εξωκυτταρικό περιβάλλον, υποδεικνύοντας ότι εκτός από τις θέσεις Leu-319, Ala-366 και Ile-419 που προβλέπονται ως προσβάσιμες λόγω του τοπολογικού μοντέλου (θηλειές 9, 11, 13, εκτεθειμένες προς το περίπλασμα) είναι προσβάσιμες και οι θέσεις Ser-295 και Arg-394 (θηλειές 8, 12) που περιμένουμε να είναι εκτεθειμένες από την πλευρά του κυτταροπλάσματος. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με το ότι θέσεις αμινοξέων του μοτίβου «υπογραφή» που είναι προσανατολισμένες προς το κυτταρόπλασμα (όπως Gly-333, Met-331 και Gln-330) είναι επίσης προσβάσιμες από την εξωκυτταρική πλευρά (Georgoroulou *et al.*, 2010), υποδεικνύει ότι ολόκληρη η περιοχή του C-τελικού ημίσεος της XanQ που περιλαμβάνει τα κυτταροπλασματικά όρια των TM9, TM10-TM11 και TM12 διαμορφώνεται δυναμικά κατά τη λειτουργία και περιέχει θέσεις που δεν είναι εκτεθειμένες συνεχώς στο υδρόφιλο περιβάλλον αλλά μπορεί να προσεγγίζουν στην υδρόφιλη κοιλότητα που δημιουργείται κατά τον μηχανισμό της εναλλαγής διαμορφώσεων του κέντρου δέσμευσης (Μερμελέκας Γ. Διδ. Διατριβή, 2009).



Εικόνα 1.20: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XapQ με όλα τα αποτελέσματα που ήταν γνωστά πριν ή δεν αναφέρονται στην παρούσα διατριβή.

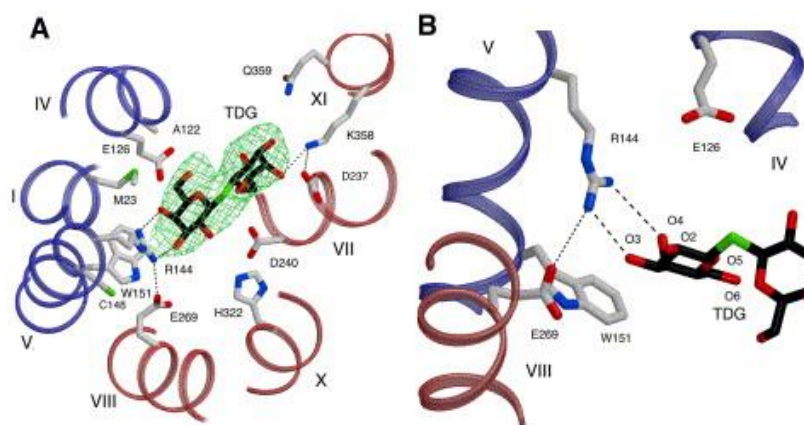
Το μοντέλο στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011), σε *in silico* τοπολογικές προβλέψεις για την περμεάση XapQ (Π2.1α) και σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου (Π2.1β). Τα τμήματα α-έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περιγράμμα αυτά που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου») (βλ. 1.2.2.3) και β-πτυχωτής επιφάνειας με πεντάγωνα σχήματα σε μορφή βέλους. Με κύκλο σημειώνονται τα κατάλοιπα που μελετήθηκαν εκτενώς στις εργασίες των Karatza *et al.* (2006), Georgoroulou *et al.* (2010), Mermelekas *et al.* (2010), Papakostas *et al.* (2008) και Διδ. διατριβή Γ. Μερμελέκα (2009). Σε μεγέθυνση με κόκκινο (αναντικατάστατα) ή μπλε χρώμα γραμματοσειράς (σημαντικά αλλά όχι αναντικατάστατα) τονίζονται τα κατάλοιπα που βρέθηκαν να είναι σημαντικά για την έκφραση στη μεμβράνη, τη λειτουργία ή την εξειδίκευση της XapQ, με γκρι ενιαίο κύκλο οι θέσεις που είναι ευαίσθητες σε απενεργοποίηση του μεταλλάγματος μονής Cys από το NEM και με πράσινο οι θέσεις που βρέθηκαν να είναι προσβάσιμες στο MTSES⁻ (βλ. 1.3.3).

Για την συμπλήρωση των πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης ή αξιολόγηση υποθέσεων που προκύπτουν από τα παραπάνω αποτελέσματα στην περμεάση XapQ καθώς και για τον εντοπισμό φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών διαμεμβρανικών τμημάτων είναι απαραίτητη μια πιο διεξοδική μελέτη καταλοίπων (για παράδειγμα, για όλα τα πολικά και δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα σε διαμεμβρανικά τμήματα, ή αμινοξέα σε χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας) σε όλα τα TM της περμεάσης σε συνδυασμό με την εφαρμογή πιο εξειδικευμένων μεθοδολογιών (λειτουργική ανάλυση μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών σε διαφορετικές θέσεις του μορίου και πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης), όπως περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους.

1.4 Πολικά και ιοντιζόμενα κατάλοιπα αμινοξέων σε διαμεμβρανικά τμήματα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς

Η παρουσία ισχυρά πολικών (Gln, Asn) και δυνητικά φορτισμένων (Asp, Glu, His, Lys, Arg) αμινοξέων σε κατάλοιπα διαμεμβρανικών τμημάτων δεν ευνοείται ενεργειακά λόγω της χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς του ενδομεμβρανικού περιβάλλοντος. Ωστόσο, τέτοιες ομάδες απαντώνται σε αρκετές περιπτώσεις σε διαμεμβρανικά τμήματα και, στις περιπτώσεις αυτές, τα ιοντιζόμενα διαμεμβρανικά κατάλοιπα έχουν σημαντικούς ρόλους για την δομή ή λειτουργία του μακρομορίου. Σε μεμβρανικές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς, θετικά ή αρνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα μπορεί να σταθεροποιούν τη λειτουργική δομή ή την διαμόρφωση του κέντρου δέσμευσης μέσω δημιουργίας γεφυρών άλατος (salt bridges) μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ομάδων, ή μπορεί να συμμετέχουν άμεσα σε αλληλεπιδράσεις με το μόριο υποστρώματος κατά την δέσμευση και/ή διαμεμβρανική μεταφορά του, διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στον μηχανισμό.

Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της περμεάσης λακτόζης LacY της *E. coli* της οποίας η διεξοδική μεταλλαξιγένεση (Frillingos *et al.*, 1998; Abramson *et al.*, 2003; Kaback *et al.*, 2007) απέδειξε ότι μόνο έξι (6) από τα κατάλοιπα αμινοξέων της (συνολικά 417) είναι αναντικατάστατα στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς, και αυτά είναι κατάλοιπα ιοντιζόμενων ομάδων αμινοξέων σε διαμεμβρανικές έλικες του μορίου. Συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα Arg-144 (έλικα V) και Glu-126 (έλικα IV) είναι αναντικατάστατα για τη δέσμευση της λακτόζης, τα His-322 (έλικα X), Glu-325 (έλικα X) και Arg-302 (έλικα IX) είναι αναντικατάστατα για την συμμεταφορά του πρωτονίου, ενώ το Glu-269 (έλικα VIII) είναι αναντικατάστατο τόσο για τη δέσμευση της λακτόζης όσο και για την συμμεταφορά H⁺:λακτόζης. Επίσης, δύο ακόμη ζεύγη ιοντιζόμενων διαμεμβρανικών καταλοίπων έχουν κρίσιμο ρόλο, αν και όχι αναντικατάστατο, για τον μηχανισμό (Asp-240 και Lys-319) ή για την διατήρηση της δομής (Asp-237 και Lys-358) του LacY. Εκτενής μεταλλαξιγένεση αλλά και πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (βλ. 1.5) στην περμεάση λακτόζης ανέδειξαν επίσης το κατάλοιπο Asn-245 (έλικα VII), το οποίο χαρακτηρίστηκε ότι μέσω κατάλληλων αλληλεπιδράσεων με άλλα αμινοξέα (Ile-40 και Cys-148) καθορίζει την διαμόρφωση της κοιλότητας δέσμευσης του υποστρώματος αρχικά προς την περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης (Zhou *et al.*, 2009), ενώ πιο πρόσφατα βρέθηκε ότι σημαντικό ρόλο για τον καθορισμό του τρόπου αναγνώρισης της λακτόζης στο κέντρο δέσμευσης έχει και η Asn-272 (έλικα VIII) (Jiang *et al.*, 2014).



Εικόνα 1.21: Το ενεργό κέντρο δέσμευσης στην περμεάση LacY.

Πιθανοί δεσμοί υδρογόνου και γέφυρες άλατος φαίνονται με διακεκομμένες μαύρες γραμμές. Διαμεμβρανικά τμήματα των περιοχών N- και C-τελικού ημίσεος (N6, C6) είναι χρωματισμένα με μπλε και κόκκινο αντίστοιχα. (λευκό: άτομα άνθρακα σε πλευρική αλυσίδα, μαύρο: άτομα άνθρακα στο υπόστρωμα TDG, μπλε: άζωτο, κόκκινο: οξυγόνο, πράσινο: θείο) (από Abramson *et al.*, 2003)

Βιβλιογραφικά υποστηρίζεται ότι ιοντιζόμενα αμινοξέα που ανήκουν σε διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα του μεταφορέα σχηματίζοντας μεταξύ τους ιοντικά ζεύγη ή γέφυρες άλατος μπορούν να είναι περισσότερο σταθερά από ό,τι ως ανεξάρτητα ιονισμένα κατάλοιπα σε χαμηλά διηλεκτρικά μέσα (Lee *et al.*, 1992, 1993; Sahin-Toth *et al.*, 1992; Dunten *et al.*, 1993; Frillingos *et al.*, 1995; Frillingos and Kaback, 1996). Έχει προταθεί ότι, ενώ απαιτούνται περίπου 10 kcal/mol για την εισαγωγή ενός φορτισμένου αμινοξέος σε μια περιοχή χαμηλού διηλεκτρικού, μία γέφυρα άλατος απαιτεί μόνο περί το 1kcal/mol και με την παρουσία επιπλέον ομοιοπολικών δεσμών η γέφυρα άλατος μπορεί να είναι εξαιρετικά σταθερή ακόμη και σε ιδιαίτερα υδρόφοβο περιβάλλον (Honig and Hubbell, 1984). Είναι, επίσης, πιθανό πολλά φορτισμένα κατάλοιπα σε υδρόφοβες περιοχές να εξουδετερώνονται από γειτονικά κατάλοιπα αντίθετου φορτίου (Frillingos and Kaback, 1996; Honig and Hubbell, 1984).

Οι γέφυρες άλατος, λοιπόν, μπορούν να έχουν ενεργειακά τουλάχιστον δύο διαφορετικές λειτουργίες στις μεμβρανικές πρωτεΐνες-μεταφορείς. Η πρώτη πιθανή λειτουργία είναι δομικού χαρακτήρα: η γέφυρα άλατος συμβάλλει στη σωστή τοποθέτηση των α-ελίκων στον χώρο, στο «δέσιμό» τους σε συγκεκριμένη αναδίπλωση για την κατάλληλη είσοδο της πρωτεΐνης στην μεμβράνη (insertion) και κατ' επέκταση για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας του μεταφορέα (Dunten *et al.*, 1993; Sahin-Toth *et al.*, 1992, Sahin-Toth and Kaback, 1993; Frillingos *et al.*, 1995; Frillingos and Kaback, 1996). Η

δεύτερη πιθανή λειτουργία έχει τον χαρακτήρα της άμεσης και καθοριστικής συμμετοχής στον μηχανισμό: η γέφυρα άλατος μπορεί να συμβάλλει στην βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων στο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος ώστε να επιτρέπει την πρόσδεση του υποστρώματος με την κατάλληλη υψηλή συγγένεια δέσμευσης (binding affinity) (Frillingos *et al.*, 1997; Venkatesan and Kaback, 1998) ή να επηρεάσει θετικά την μεταφορά του πρωτονίου, που συµμεταφέρεται, μέσω ενός κύκλου πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης των καρβοξυλομάδων ή αμινομάδων που συµμετέχουν (Kaback, 1997; Frillingos *et al.*, 1998; Sahin-Toth *et al.*, 2000; Kaback *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2011).

Αρκετά και χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα ιοντιζόμενων διαμεμβρανικών καταλοίπων που έχει αποδειχθεί, με μεθόδους στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης, ότι είτε σχηματίζουν γέφυρες άλατος, είτε συµμετέχουν σε άλλες σημαντικές πολικές ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις και παίζουν κρίσιμο ρόλο στον μηχανισμό, σε πολλές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς (King *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 1993, 1995; He *et al.*, 1997; He and Kaback, 1997; Brocke *et al.*, 2002; Zomot *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2011). Στην βακτηριοροδοψίνη (bacteriorhodopsin, bR), για παράδειγμα, μεταξύ των ζευγών καταλοίπων Asp-85 με Arg-82 και Asp-96 με Arg-227 σχηματίζονται γέφυρες άλατος και μάλιστα θεωρείται ότι τα δύο κατάλοιπα ασπαρτικού (Asp-85, Asp-96) εμπλέκονται άμεσα στην μεταφορά πρωτονίου (Khorana, 1988; Stern and Khorana, 1989). Ομοίως, το ιοντικό ζεύγος Glu-219 και His-245 στην υπομονάδα α της FoF₁-ΑΤΡάσης (Cain and Simoni, 1988), σε συνδυασμό με το κατάλοιπο Asp-61, η πρωτονίωση-αποπρωτονίωση του οποίου επιτρέπει την περιστροφή του δακτυλίου c (Miller *et al.*, 1990; Sambongi *et al.*, 1999), συµβάλλουν στην μετακίνηση του πρωτονίου διά μέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Berg *et al.*, 2005).

Παραδείγματα άμεσης και έμμεσης αλληλεπίδρασης ισχυρά πολικών και δυνητικά φορτισμένων αμινοξέων με κρίσιμο ρόλο στην λειτουργία του μεταφορέα, που έχουμε ήδη παρουσιάσει (βλ. 1.2.2.3), βρίσκουμε και στον συµμεταφορέα Η⁺:ουρακίλης (περμεάση ουρακίλης) UraA (Lu *et al.*, 2011). Συνοπτικά, στην UraA σημαντική είναι η παρουσία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των απόλυτα συντηρημένων στα γνωστά μέλη της NCS2 His-24 (TM1) και Asn-291 (TM10) για την σταθεροποίηση της λειτουργικής δομής περιφερικά του κέντρου δέσμευσης καθώς και μεταξύ της His-245 (TM8) και υδροξυλίων του β-NG τα οποία αλληλεπιδρούν στο κέντρο δέσμευσης με το υπόστρωμα (ουρακίλη) και θεωρείται ότι παίζουν το ρόλο των υδροξυλίων ενδιάμεσων μορίων νερού στην πραγματική δομή (βλ. Lu *et al.*, 2011). Το κέντρο δέσμευσης ουρακίλης διαμορφώνεται επίσης μεταξύ άλλων λόγω των καθοριστικών αλληλεπιδράσεων δύο πολικών ενδομεμβρανικών καταλοίπων γλουταμικού οξέος (Glu-241 και Glu-290) τα οποία δεσμεύουν απευθείας το υπόστρωμα (ουρακίλη) μέσω δύο δεσμών υδρογόνου το καθένα, ενώ σύμφωνα με το

προτεινόμενο μοντέλο για τον μηχανισμό λειτουργίας (βλ. 1.2, Εικόνα 1.17) η μετατόπιση του πρωτονίου που συµμεταφέρεται βασίζεται στην πρωτονίωση και αποπρωτονίωση καταλοίπων µε δυνητικά ιοντιζόµενες πλευρικές οµάδες στις διαµεµβρανικές έλικες TM8 και TM10 (Glu-241, His-245, Glu-290).

Επιπλέον για τις γέφυρες άλατος έχει προταθεί ότι συµβάλλουν στον µηχανισµό µιας µεγάλης σειράς µεταφορέων ιόντων, για παράδειγµα στην πρωτεΐνη αποσύζευξης των µιτοχονδρίων (UCP-1) (Kliiingenberg, 1988), στον τασεο-εξαρτώµενο δίαυλο Na⁺ (voltage-gated Na⁺ channel) (Catterall, 1988), στην Na⁺/K⁺-ΑΤΡάση (Goldshleger *et al.*, 1992; Shainskaya *et al.*, 2000), στην πρωτεΐνη UncE σε διάφορους µικροοργανισµούς (Senior, 1983) και στον µεταφορέα ανιόντων των ερυθροκυττάρων (NHE3) (Macara and Cantley, 1981). Κλασικό είναι, τέλος, και το παράδειγµα των πέντε διαµεµβρανικών ιοντικών ζευγών της περµεάσης λακτόζης LacY, που εκτέθηκε αναλυτικά παραπάνω (Frillingos *et al.*, 1998; Abramson *et al.*, 2003; Kaback *et al.*, 2007).

Πολύ σηµαντικό είναι να σηµειωθεί ότι ιοντιζόµενα διαµεµβρανικά κατάλοιπα που φαίνεται να διαδραµατίζουν καθοριστικό ρόλο στην δοµή και στην λειτουργία ενός µεταφορέα εµφανίζονται µε συστηµατικά υψηλά ποσοστά συντήρησης ανάµεσα στα µέλη της οικογένειας στην οποία ανήκει η πρωτεΐνη. Ενδεικτικά, µπορεί να αναφερθεί η περίπτωση της απόλυτης συντήρησης µεταξύ των µελών της οικογένειας µεταφορέων νιτρικού (nitrate transporters) δύο καταλοίπων αργινίνης (Arg-87 στο TM2 και Arg-368 στο TM8), που θεωρείται ότι συµµετέχουν στο κέντρο δέσµευσης υποστρώµατος (Unkles *et al.*, 2004). Επίσης, η περίπτωση ενός ιδιαίτερα συντηρηµένου διαµεµβρανικού καταλοίπου αργινίνης (Arg-282 στο TM7) του µεταφορέα διπεπτιδίων και τριπεπτιδίων, PepT1 (proton-coupled di- and tri-peptide transporter), των θηλαστικών, που έχει αποδειχθεί ότι είναι αναντικατάστατο για την λειτουργία της πρωτεΐνης (Meredith, 2004), αλλά και οι περιπτώσεις, που ήδη έχουν αναφερθεί, των καταλοίπων Glu-126 και Arg-144 της LacY, καταλοίπων µε υψηλό βαθµό συντήρησης σε όλα τα µέλη της υπεροικογένειας MFS (Venkatesan and Kaback, 1998; Kasho *et al.*, 2006) και των His-24, Glu-241 και Asn-291 του UraA, που είναι απόλυτα συντηρηµένα στους µεταφορείς της οικογένειας NCS2/COG2233. Στην τελευταία αυτή περίπτωση, συγκλίνοντα πειραµατικά δεδοµένα από τη µελέτη διαφορετικών οµολόγων υποδηλώνουν ότι η φυλογενετική συντήρηση των θέσεων αυτών εξυπηρετεί έναν παρόµοιο ρόλο κατά τη λειτουργία (βλ. Papakostas and Frillingos, 2013). Για παράδειγµα, συγκρίνοντας τον ρόλο που διαδραµατίζει η απόλυτα συντηρηµένη Asn-291/325/409 (TM10) σε τρεις διαφορετικούς µεταφορείς (UraA/XanQ/UapA αντίστοιχα) της ίδιας οικογένειας (NCS2), παρατηρούµε ότι το ίδιο κατάλοιπο που φαίνεται να ευνοείται εξελικτικά, είναι αναντικατάστατο για το «δέσιµο» υποστρωµάτων πουρίνης (ξανθίνη/ουρικού

οξέος) τόσο σε ένα βακτηριακό (*E.coli*) όσο και σε ένα μυκητιακό (*A.nidulans*) σύστημα, ενώ στην περμεάση ουρακίλης της *E.coli* μετέχει σε σταθεροποίηση της λειτουργικής δομής περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης (Georgorouliou *et al.*, 2010; Koukaki *et al.*, 2005). Συμπερασματικά, λοιπόν, μια μελέτη εντοπισμού σημαντικών θέσεων για τις αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση του υποστρώματος ενός μεμβρανικού μεταφορέα είναι σημαντικό να στηρίζεται και ίσως να ξεκινάει από μια φυλογενετική ανάλυση της συντήρησης των ισχυρά πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων που εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα.

1.5 Τρόποι μελέτης φυσικών γειτνιασέων σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς

Στην μελέτη των διαμεμβρανικών μεταφορέων, όπως αναφέρθηκε (1.2), υπάρχουν βιβλιογραφικά «κενά» όσον αφορά την κρυσταλλογραφική ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών και την απεικόνισή τους σε δομικά μοντέλα υψηλής ευκρίνειας. Ταυτόχρονα όμως η εικόνα ενός δομικού μοντέλου που προέρχεται από κρυσταλλογραφία, ενώ αποτελεί σημαντική πηγή πληροφοριών για την δομή, την τοπολογία και την διευθέτηση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μεταφορέα σε σχέση με το ενεργό του κέντρο, δεν αποκαλύπτει σε καμία περίπτωση τον τρόπο των φυσικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις διάφορες περιοχές της περμεάσης (γειτνιασείς) κατά την δυναμική κίνηση του μεταφορέα στον μηχανισμό λειτουργίας. Εξάλλου, σε πολλές περιπτώσεις, όπως και στην οικογένεια NCS2 που μας απασχολεί στην παρούσα διατριβή (1.3), τα δομικά μοντέλα που μπορούν να κατασκευασθούν βασίζονται στην κρυσταλλογραφική ανάλυση ενός μόνο σχετικά μακρινού ομολόγου που απεικονίζει μία μόνο διαμόρφωση του μεταφορέα. Με σκοπό, λοιπόν, τον προσδιορισμό των διαμορφωτικών αλλαγών των μορίων των περμεασών κατά τον μηχανισμό δέσμωσης-μεταφοράς του υποστρώματος έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες ερευνητικές μεθοδολογίες χαρτογράφησης φυσικών γειτνιασέων μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα. Η εφαρμογή των πρωτοκόλλων αυτών προϋποθέτει μια αρχική τροποποίηση της αλληλουχίας της περμεάσης, σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, ώστε να παραχθεί το κατάλληλο μοριακό υπόβαθρο ανάλογα με την μέθοδο.

1.5.1 Δημιουργία κέντρων συντονισμού με δισθενή ιόντα

Μία διαδεδομένη μεθοδολογική προσέγγιση που έχει εφαρμοσθεί σε διάφορους διαμεμβρανικούς μεταφορείς είναι η ανίχνευση ζεύγους προσβάσιμων καταλοίπων κυστεΐνης, ιστιδίνης, ή ασπαρτικού/γλουταμικού οξέος, με δραστικές πλευρικές ομάδες (σουλφυδρίλιο, ιμιδαζόλιο, ή καρβοξυλομάδα, αντίστοιχα), που ανήκουν σε διαφορετικές δομικές περιοχές μιας περμεάσης αλλά γειτνιάζουν στην τριτοταγή της δομή, μέσω της δημιουργίας κέντρου συντονισμού (coordination) για δισθενή ιόντα καδμίου ή ψευδαργύρου (Alberts *et al.*, 1998). Η αλληλεπίδραση αυτή, που είναι εφικτή μόνο κατά την κατάλληλη γειτνίαση των υπό εξέταση θέσεων αμινοξέων, έχει ως συνέπεια τον περιορισμό των κινήσεων του μορίου της περμεάσης κατά την μεταφορά του υποστρώματος και, εφόσον οι κινήσεις που παρεμποδίζονται είναι κρίσιμες για τη λειτουργία, οδηγεί σε ανιχνεύσιμη

αναστολή της ενεργότητας. Η παραπάνω μεθοδολογία έχει εφαρμοστεί ευρέως σε μεταφορείς νευροδιαβιβαστών του ανθρώπου, όπως στους μεταφορείς ντοπαμίνης (hDAT), γλουταμικού οξέος (GLUT-1), γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GAT-1), σεροτονίνης (SERT) [Norregaard *et al.*, 1998; Brocke *et al.*, 2002; Zomot *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006]. Τα πειράματα αυτά οδήγησαν στον εντοπισμό ζεύγους θέσεων, στις οποίες τα εγγενή αμινοξέα είχαν αντικατασταθεί με κυστεΐνες, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας θέσεις δέσμησης δισθενών ιόντων ψευδαργύρου (hDAT) ή καδμίου (GLUT-1, GAT-1, SERT), με ανιχνεύσιμη συνέπεια την πτώση της ενεργότητας του μεταφορέα. Στα πλαίσια της ίδιας μεθοδολογίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά οξειδωτικοί χημικοί παράγοντες [1,10-φαινανθρολίνη χαλκού (II)] και αναγωγικοί χημικοί παράγοντες [διθειοθρεϊτόλη] για να διαπιστωθεί αν η ανίχνευση επίδρασης στον μηχανισμό μεταφοράς της περμεάσης οφείλεται όντως στην παρουσία των δισθενών ιόντων ή σε δημιουργία ενδομοριακών ή/και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Ταυτόχρονα, η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση καταλοίπων με άλλες δραστικές πλευρικές ομάδες (Glu, His) σε μόρια περμεάσης με ζεύγη κυστεϊνών μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για την εγγύτητα και την συμβολή των υπό μελέτη θέσεων στην δημιουργία κέντρου συντονισμού για τα δισθενή ιόντα (Loland *et al.*, 1999).

1.5.2 Σταυρωτή αλληλοσύνδεση (cross-linking) καταλοίπων κυστεϊνών

Για την μελέτη σχέσεων γειτνίασης εφαρμόζονται συστηματικά πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross-linking), τα οποία έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να δώσουν μία προσεγγιστική εικόνα της διευθέτησης των διαμεμβρανικών α-ελίκων ενός μεταφορέα στην τριτοταγή δομή, σε χαμηλή βέβαια ευκρίνεια ανάλυσης, χωρίς να είναι απαραίτητο να «προστρέξουμε» σε μια πιθανή λυμένη κρυσταλλική δομή (Sorgen *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009). Στις μεθοδολογίες αυτές χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια (διλειτουργικά αντιδραστήρια με παράγωγα μηλεϊμιδίου ή μεθανοθειοσουλφονικού (MTS) ως λειτουργικές ομάδες) μεταβλητού μήκους (Loo and Clarke, 2001), τα οποία μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα στις θειολικές ομάδες δύο καταλοίπων κυστεΐνης, που επιλεκτικά εισάγονται κατά ζεύγη στις θέσεις που μελετούνται, όταν βέβαια οι θέσεις αυτές είναι προσβάσιμες για τα αντιδραστήρια και γειτνιάζουν στην τριτοταγή δομή του μορίου. Ο υπολογισμός των αποστάσεων μεταξύ των καταλοίπων που διασυνδέονται από τα αντιδραστήρια μπορεί να γίνει μέσω λειτουργικών δοκιμασιών ανίχνευσης μεταβολής της ενεργότητας της περμεάσης παρουσία και απουσία των διλειτουργικών αντιδραστηρίων σε συνδυασμό με πειράματα ανοσοαποτύπωσης των πεπτιδικών θραυσμάτων της πρωτεΐνης ύστερα από

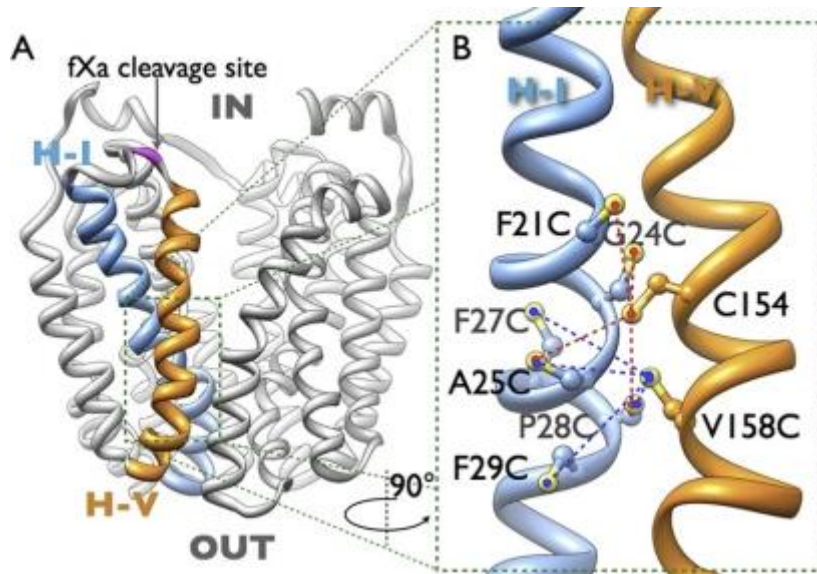
πρωτεολυτική πέψη ώστε να αποδειχθεί η ομοιοπολική διασύνδεση των θέσεων που εξετάζονται. Η εφαρμογή της μεθοδολογίας της σταυρωτής αλληλοσύνδεσης κυστεϊνών μπορεί να υλοποιηθεί με διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, που απαιτούν διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο τροποποιημένου μεταφορέα η κάθε μία. Τέσσερις χαρακτηριστικές προσεγγίσεις αυτού του τύπου αναφέρονται στη συνέχεια.

1.5.2.1 Σταυρωτή αλληλοσύνδεση μεταξύ δομικά αυτοτελών περιοχών αλληλουχίας

Η μεθοδολογία αυτή έχει εφαρμοστεί εκτενώς στην περμεάση λακτόζης (LacY) της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS), τα διαμεμβρανικά τμήματα της οποίας, σύμφωνα με εικόνες από κρυσταλλικά μοντέλα (Abramson *et al.*, 2003; Mirza *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2006) σε συνδυασμό με βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες (Ermolova *et al.*, 2003 Kaback *et al.*, 2007), οργανώνονται σε δύο διακριτές δομικές περιοχές (six-helix bundles, N6-C6 domains) μεταξύ των οποίων σχηματίζεται το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος (βλ. Εικόνα 1.10). Μια τέτοια δομή επιτρέπει την τροποποίηση του πρωτεϊνικού μεταφορέα σε δύο ξεχωριστές κωδικοποιούσες περιοχές, οι οποίες μπορούν να εκφραστούν από διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς ως ανεξάρτητα πολυπεπτίδια και να ελεγχθεί κατά πόσον μπορούν να αναπληρώσουν, με ετεροδιμερισμό, τη λειτουργία του μεταφορέα (Bibi and Kaback, 1990). Μια τέτοια λειτουργική ανασύσταση έχει επιτευχθεί στην περμεάση LacY (split permeases) και αντανάκλα την ύπαρξη δομικά αυτοτελών περιοχών αλληλουχίας (domains) που αφορούν στις περιοχές N6 και C6 (Wu and Kaback 1994; Wu *et al.*, 1995). Η μέθοδος στην συνέχεια εφαρμόστηκε σε πρωτόκολλα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (Wu and Kaback, 1996) τα οποία προσφέρουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτείται κάποιο στάδιο ειδικής πρωτεόλυσης, όπως απαιτείται σε άλλα πρωτόκολλα (βλ. 1.5.2.2). Τα αποτελέσματα έχουν δώσει σαφή εικόνα για την γειτνίαση των διαμεμβρανικών ελίκων της περμεάσης που ανήκουν στην ίδια ή σε διαφορετική δομική περιοχή κατά την μεταφορά του υποστρώματος. Το πειραματικό αυτό πρωτόκολλο επεκτάθηκε και σε άλλους συνδυασμούς περιοχών του μορίου της περμεάσης και συνέβαλε σημαντικά στην εξαγωγή ενός πρώτου μοντέλου διευθέτησης των α -ελίκων για την περμεάση αυτή (Sorgen *et al.*, 2002) το οποίο δεν διαφέρει στα βασικά του στοιχεία από το μοντέλο που δημοσιεύθηκε λίγο αργότερα με βάση την κρυσταλλική δομή της LacY (Abramson *et al.*, 2003).

1.5.2.2 Εισαγωγή αλληλουχιών αναγνώρισης ειδικών πρωτεασών

Η πειραματική αυτή προσέγγιση αφορά στην μεταλλαξιγένεση της αλληλουχίας του πρωτεϊνικού μεταφορέα, ώστε να εισαχθούν σε κατάλληλες θέσεις (ενδιάμεσες του υπό μελέτη ζεύγους κυστεϊνών) αλληλουχίες αναγνώρισης ειδικών πρωτεασών (π.χ. η αλληλουχία Ile-Glu-Gly-Arg, που αναγνωρίζει ο παράγοντας Χα) (Sahin-Toth *et al.*, 1995). Το πειραματικό αυτό πρωτόκολλο επίσης έχει εφαρμοστεί στην περμεάση λακτόζης LacY (MFS), για την οποία όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν εικόνες από κρυσταλλικά μοντέλα (Abramson *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2007), οι οποίες όμως δεν μπορούν να αποδώσουν την δυναμική κίνηση του μεταφορέα και την δέσμευση H⁺: σακχάρου από την περιπλασματική πλευρά πριν την μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης με χρήση παραλλαγών της περμεάσης LacY όπου είχαν εισαχθεί θέσεις αναγνώρισης του Χα έγιναν είτε σε μεμβρανικά κυστίδια (Zhou *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010), είτε σε μεμβρανικά κλάσματα (Wolin and Kaback, 2000; Guan *et al.*, 2002) και απέδειξαν ομοιοπολική σύνδεση (cross-linking) πρωτεολυτικών θραυσμάτων μέσω διαφορετικών ζευγών Cys-Cys ανάμεσα σε διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα, παρουσία διλειτουργικών αντιδραστηρίων συγκεκριμένου μήκους. Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν συγκεκριμένες αποδείξεις για το ότι η μεταφορά του υποστρώματος μέσω της LacY γίνεται μέσω της δυναμικής κίνησης (άνοιγμα – κλείσιμο) μιας μεγάλης κοιλότητας που σχηματίζεται προς το περίπλασμα, διευκολύνοντας έτσι την πρόσδεση και την μεταφορά του υποστρώματος, γεγονός που δεν ήταν δυνατόν να φανεί από τα κρυσταλλογραφικά μοντέλα. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας την παραπάνω μεθοδολογία αποδείχθηκε η στιγμιαία αναστρέψιμη εγγύτητα καταλοίπων του πρώτου και του πέμπτου διαμεμβρανικού τμήματος, η οποία αντιστοιχεί σε μία κίνηση «ψαλιδιού» όπως χαρακτηρίζεται (Εικόνα 1.22) και συμμετέχει στην έναρξη των διαμορφωτικών αλλαγών της LacY αμέσως μετά την δέσμευση του υποστρώματος (Zhou *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.22: Μέρος της δομής της περμεάσης LacY με βάση το κρυσταλλογραφικό μοντέλο, που εστιάζει στις διαμεμβρανικές έλικες 1 και 5.

A. Στο μοντέλο σημειώνονται τα διαμεμβρανικά τμήματα TM1 (μπλε) και TM5 (πορτοκαλί) καθώς και η θέση αναγνώρισης από την πρωτεάση-παράγοντα Χα (μωβ). **B.** Μεγέθυνση της περιοχής καταλοίπων που αντικαταστάθηκαν με κυστεΐνες ανά ζεύγη και απεικόνιση των σταυρωτών αλληλοσυνδέσεων (cross linking) που εξετάστηκαν (από Zhou *et al.*, 2011).

1.5.2.3 Ειδική πρωτεόλυση με βρωμιούχο κυάνιο

Το βρωμιούχο κυάνιο (CNBr) χρησιμοποιείται συχνά για στοχευμένη υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών στην καρβοξυτελική πλευρά καταλοίπων μεθειονίνης (Met), με σκοπό την δημιουργία πεπτιδικών θραυσμάτων μικρού μήκους που μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω φασματομετρίας μάζας (MS). Εκτός από την εφαρμογή αυτή (βλ. Weinglass *et al.*, 2003), σε πρωτεΐνες μεταφορείς μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρωτεόλυση από CNBr σε συνδυασμό με πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross linking) έπειτα από κατάλληλη προετοιμασία του μορίου (βλ. Tao *et al.*, 2009). Η αλληλουχία της υπό μελέτη περμεάσης τροποποιείται, ώστε να περιορισθεί ο αριθμός των εγγενών καταλοίπων μεθειονίνης, εφαρμόζεται πρωτόκολλο σταυρωτής διασύνδεσης για ζεύγη κυστεϊνών (Cys-Cys) μεταξύ της περιοχής τμημάτων των οποίων εξετάζεται η εγγύτητα και μελετάται η κινητικότητα των πεπτιδικών θραυσμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Πλεονεκτήματα της προσέγγισης αυτής είναι η ελαχιστοποίηση της λειτουργικής τροποποίησης του μορίου και η αποφυγή της ενζυματικής αντίδρασης πρωτεόλυσης (βλ. 1.5.2.2). Στους μεταφορείς σεροτονίνης (SERT) και γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GAT-1) της οικογένειας

συμμεταφορέων Na^+ :νευροδιαβιβαστών (SLC6) χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της εγγύτητας διαφορετικών διαμεμβρανικών τμημάτων (Tao *et al.*, 2009; Zomot *et al.*, 2005). Έγιναν πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης στηριζόμενα σε δομικά μοντέλα από την κρυσταλλογραφική ανάλυση ενός βακτηριακού ομολόγου (LeuT) της ίδιας οικογένειας (Sigh *et al.*, 2008), τα οποία όμως και σε αυτή την περίπτωση αδυνατούσαν να δώσουν μια ολοκληρωμένη εικόνα της δυναμικής του πρωτεϊνικού μορίου κατά την λειτουργία. Η σταυρωτή αλληλοσύνδεση των κυστεϊνών στις περιπτώσεις αυτές έγινε με (1,10-φαινανθρολίνη)₃ χαλκού (II) [CuPh₃], ακολούθησε η ανάλυση των διαφορετικών πρωτεολυτικών τμημάτων που δίνει το CNBr με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση, ενώ πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το πειραματικό πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στην συνέχεια παρουσία διαφορετικών υποστρωμάτων (π.χ. κοκαΐνης στον SERT), για τα οποία χαρτογραφήθηκαν οι αλλαγές που επιφέρουν στην δυναμική του κέντρου δέσμησης (Tao *et al.*, 2009).

1.5.2.4 Πρωτεολυτική πέψη με χρήση θρυψίνης

Η πειραματική δοκιμασία μιας άλλης μεθόδου στηρίζεται σε πρωτεολυτική πέψη σε θέσεις καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης (Arg, Lys), οι οποίες είναι εκτεθειμένες στην περιπλαστική όψη της υπό μελέτη περμεάσης, με χρήση θρυψίνης. Η μέθοδος αυτή δεν έχει εφαρμοστεί εκτενώς για την μελέτη εγγύτητας διαμεμβρανικών τμημάτων, αλλά έχει εφαρμοστεί σε σημαντικό βαθμό για την ανάλυση της τοπολογίας των διαμεμβρανικών μεταφορέων σε σχέση με τη μεμβράνη (βλ. παρακάτω), Εξάλλου, η θρυψίνη αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο πειραματικό «εργαλείο» για την παραγωγή πεπτιδικών θραυσμάτων μικρού μήκους τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών ή άλλες ειδικότερες μελέτες στην πρωτεωμική ανάλυση με χρήση φασματομετρίας μάζας (MS). Στην περίπτωση της περμεάσης λακτόζης LacY, μεθοδολογία πρωτεόλυσης με θρυψίνη εφαρμόστηκε στις αρχικές μελέτες δομικής ανάλυσης για την επιβεβαίωση της πρόβλεψης ότι πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με το κέντρο δέσμησης στο εσωτερικό της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας και ότι η τοπολογία του περιλαμβάνει 12 διαμεμβρανικά τμήματα συνδεδεμένα με υδρόφιλες περιοχές εκτεθειμένες εναλλάξ προς το κυτταρόπλασμα και προς το περίπλασμα (Goldkorn *et al.*, 1983). Το πειραματικό πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε μεμβρανικά κυστίδια της *E. coli* ορθού ή αντίστροφου προσανατολισμού (RSO, right-side-out, ISO, inside-out. membrane vesicles) και εξετάστηκε η ικανότητα της θρυψίνης να πρωτεολύει τις πλευρικές ομάδες καταλοίπων Arg ή/και Lys (στον πεπτιδικό δεσμό του καρβοξυτελικού άκρου των αμινοξέων

αυτών), που βρίσκονται εκτεθειμένες είτε προς το κυτταρόπλασμα (ISO vesicles) είτε προς το περίπλασμα (RSO vesicles), και πώς αυτή επηρεάζει την ενεργό μεταφορά του υποστρώματος από την περμεάση.

Πρόσφατα έχουν δημοσιευθεί ποικίλα δεδομένα όσον αφορά στην προσβασιμότητα των καταλοίπων Arg ή Lys μιας πρωτεΐνης από την θρυψίνη και κυρίως κάποιοι «κανόνες», γνωστοί ως «κανόνες του Keil», που καταγράφουν χημικούς περιορισμούς αποτελεσματικής πρωτεολυτικής πέψης με θρυψίνη ανάλογα με την θέση των καταλοίπων-στόχων στην αλληλουχία (Keil, 1992). Σύμφωνα με αυτούς δεν είναι δυνατή η πέψη όταν (α) κατάλοιπα Arg/Lys προηγούνται προλίνης (Olsen *et al.*, 2004), (β) αρκετά κατάλοιπα Asp/Glu βρίσκονται κοντά στον στόχο Arg/Lys-x (Siepen *et al.*, 2007; Thiede *et al.*, 2000; Yen *et al.* 2006) και (γ) βρίσκονται πολύ κοντά στον στόχο Arg/Lys-x θετικά φορτισμένα κατάλοιπα (Fannes *et al.*, 2013). Ωστόσο, οι παραπάνω κανόνες διέπονται από επιπλέον περιορισμούς καθώς πολύ συχνό είναι το φαινόμενο της μερικής πέψης μιας πρωτεΐνης από θρυψίνη και σπάνια τα αποτελέσματα που προκύπτουν δίνουν την εικόνα ολικής πέψης ή καθολική απουσία πέψης σε μία θέση στόχο: άλλες θέσεις πρωτεολύονται σχεδόν πάντα, άλλες σχεδόν ποτέ, άλλες με σχετικά μικρή πιθανότητα πέψης σε κάθε προσπάθεια ενώ περίπου το 10% των πεπτιδικών προϊόντων δεν μπορεί να ερμηνευτεί ικανοποιητικά. Τέτοιου είδους προβλήματα αντιμετωπίζονται στην πρωτεωμική ανάλυση (ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μαζών MS/MS) με την χρήση αλγορίθμων *in silico* που προβλέπουν στατιστικά την πιθανότητα πρωτεόλυσης των θέσεων-στόχων Arg/Lys από θρυψίνη (υπολογισμός πιθανότητας επαναληψιμότητας της πέψης) με βάση την πρωτεϊνική αλληλουχία (Fannes *et al.*, 2013) (Cleavage Prediction with Decision Trees, CP-DT), οι οποίοι δεν στηρίζονται στους «κανόνες του Keil». Ο CP-DT συγκεντρώνει πειραματικά δεδομένα για τον τρόπο πρωτεολυτικής πέψης με θρυψίνη, που έχουν καταχωρηθεί σε βάση δεδομένων (PRIDE server), και κατασκευάζει «δέντρα» (decision trees) πιθανότητας πέψης από την θρυψίνη για τις διαφορετικές θέσεις καταλοίπων Arg/Lys της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

1.6 Σκοπός της διαδακτορικής διατριβής

Στο εργαστήριό μας γίνεται μια ευρύτερη προσπάθεια για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NCS2, μιας σημαντικής, εξελικτικά συντηρημένης οικογένειας μεμβρανικών πρωτεϊνών-μεταφορέων, που χρησιμοποιούν ως υποστρώματα πολλά δομικά ανάλογα φαρμάκων και για την οποία διαθέτουμε έως σήμερα μόνο ένα μοντέλο δομής/μηχανισμού σε υψηλή ευκρίνεια (από την περμεάση ουρακίλης UraA). Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια για μια διαφορετικού τύπου συστηματική ανάλυση της περμεάσης Ξανθίνης XanQ, ενός προτύπου μελέτης αυτής της οικογένειας, που ήδη έχουμε χαρακτηρίσει και εξετάσει σε σημαντικό βαθμό με μεταλλαξιγένεση. Αντικείμενο της διατριβής είναι η μελέτη του ρόλου και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ σημαντικών θέσεων αμινοξέων από διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα της περμεάσης XanQ και η ανάπτυξη ενός δομικού-λειτουργικού μοντέλου για την περμεάση αυτή με βάση πειραματικά και φυλογενετικά δεδομένα.

Ειδικότερα οι άμεσοι στόχοι μας ήταν:

1. Ο εντοπισμός καταλοίπων που χαρτογραφούνται στο κέντρο δέσμευσης, ή σε θέσεις-«αισθητήρες» για τις αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση του υποστρώματος
2. Ο σχεδιασμός ενός πειραματικού μοντέλου διευθέτησης των διαμεμβρανικών τμημάτων (α -ελίκων) στην τριτοταγή δομή της XanQ
3. Η χαρτογράφηση φυσικών γειτνιάσεων μεταξύ διαφορετικών τμημάτων της περμεάσης XanQ και η διαμόρφωση των αλληλεπιδράσεων αυτών κατά τον μηχανισμό δέσμευσης/μεταφοράς Ξανθίνης
4. Η εξαγωγή ενός γενικότερου μοντέλου δομικής και λειτουργικής οργάνωσης για τους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NCS2, βάσει των ανωτέρω και της εξελικτικής συντήρησης μεταξύ ομόλογων μεταφορέων που έχουν χαρακτηρησθεί λειτουργικά

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός - Όργανα εργαστηρίου

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω εργαστηριακά όργανα ή [με αστερίσκο] συνοδευτικά αναλώσιμα (σε αλφαβητική σειρά), στα ερευνητικά εργαστήρια του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που αναφέρονται:

Αναδευτήρας ενσωματωμένος σε θερμό θάλαμο (Incubator Shaker Series Innova 42)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415 D)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

[*] Ηθμοί διήθησης για κατακράτηση κυτταρικού κλάσματος (Whatman GF/C, 25 mm-circle, diameter 1.2 μ m)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

[*] Λάμπα UV (UV transilluminator, Canon, Europe)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

[*] Μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (Polyvinylidene difluoride - PVDF, Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

[*] Σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων (Microliter Syringes, Hamilton, Bonaduz, Switzerland)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA (Horizontal Gel electrophoresis apparatus, Life Technologies)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Συσκευή υπερήχων (Digital sonifier model 250-D, Branson Ultrasonics, Danbery, Connecticut)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Υπερφυγόκεντρος (Beckmann coulter Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge, Beckmann Instruments, Palo Alto, California)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

Φωτόμετρο (Ultraspec-2001 Biochrom, Cambridge, England)

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

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

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας

***Αυτόματος Αναλυτής Αλληλουχίας μεθόδου F. Sanger (Applied Biosystems, MWG-Biotech, Ebersberg, Germany)**

2.2 Χημικά Αναλώσιμα

Για την υλοποίηση των πειραματικών πρωτοκόλλων αναλώθηκαν τα παρακάτω χημικά υλικά (σε αλφαβητική σειρά):

Αναγωγικά αντιδραστήρια

διθειοθρεϊτόλη (DTT, Invitrogen)

Αναστολείς πρωτεασών

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

Αντιδραστήρια αλκυλίωσης (thiol-reactive dyes)

δिलειτουργικά αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού

για πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης

1,3-προπανοδιωλ δι-μεθανο-θειο-σουλφονικό
(1,3-Propanediyl Bismethanethiosulfonate, **MTS-3-MTS: 5Å**)

1,6-εξανοδιωλ δι-μεθανο-θειο-σουλφονικό
(1,6-Hexanediyl Bismethanethiosulfonate, **MTS-6-MTS: 9Å**)

3,6-διοξαοκτανο-1,8-διωλ- δι-μεθανο-θειο-σουλφονικό
(3,6-Dioxaoctane-1,8-diyl Bismethanethiosulfonate, **MTS-8-O2-MTS: 11Å**)

3,6,9-τριοξαενδεκανο-1,11- διωλ- δι-μεθανο-θειο-σουλφονικό
(3,6,9-Trioxaundecane-1,11-diyl-bismethanethiosulfonate, **MTS-11-O3-MTS: 15Å**)

3,6,9,12-τετραοξατετραδεκανο-1,14-διωλ-δι-μεθανο-θειο-σουλφονικό
(3,6,9,12-Tetraoxatetradecane-1,14-diyl-bis-methanethiosulfonate,
MTS-14-O4-MTS: 17Å)

3,6,9,12,15-πενταοξαδεκαεπτανο-1,17-διωλ-δι-μεθανο-θειο-σουλφονικό
(3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecane-1,17-diyl-bis-methanethiosulfonate,
MTS-17-O5-MTS: 22Å)

(cross-linking reagents, Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada)
(Εικόνα 2.1)

μεθανο-θειο-σουλφονική αιθυλαμίνη (με υδροβρώμιο)

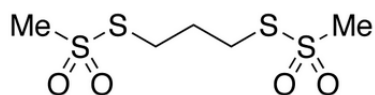
(2-Aminoethyl Methanethiosulfonate – **MTSEA-Bromide**, Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) (Εικόνα 2.2)

μεθανο-θειο-σουλφονικό αιθυλσουλφονικό άλας νατρίου [Sodium (2-Sulfonatoethyl) methanethiosulfonate - **MTSES**; Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) (Εικόνα 2.2)

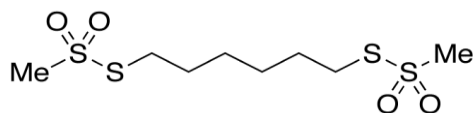
N-αιθυλμηλεϊμίδιο (*N*-Ethylmaleimide -**NEM**, Sigma- Aldrich) (Εικόνα 2.2)

πράσινο μηλεϊμήδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide, **OGM**, Invitrogen, Εικόνα 2.2)

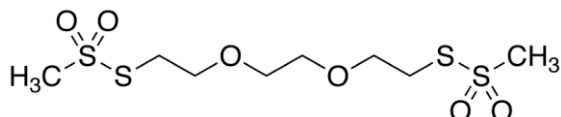
1,3-Propanediyl Bismethanethiosulfonate



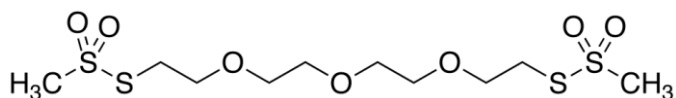
1,6-Hexanediyl Bismethanethiosulfonate



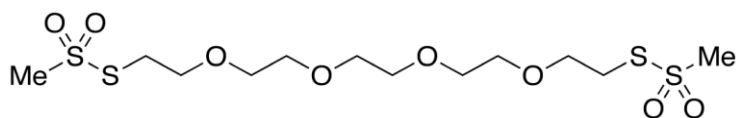
3,6-Dioxaoctane-1,8-diyl Bismethanethiosulfonate



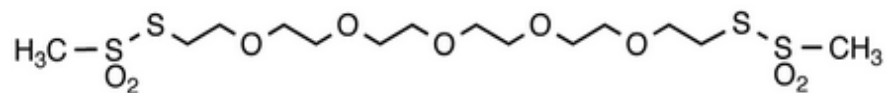
3,6,9-Trioxaundecane-1,11-diyl-bismethanethiosulfonate



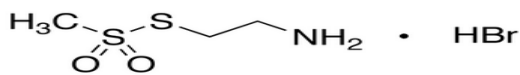
3,6,9,12-Tetraoxatetradecane-1,14-diyl-bis-methanethiosulfonate



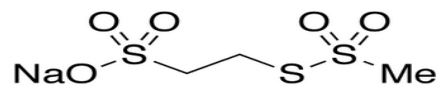
3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecane-1,17-diyl Bis-methanethiosulfonate



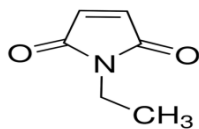
Εικόνα 2.1: Ο συντακτικός τύπος των διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού (MTS-MTS cross linking reagents, Toronto Research Chemicals)



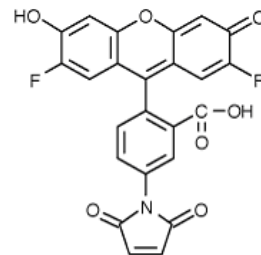
μεθανο-θειο-σουλφονική
αιθυλαμίνη υδροβρωμίου



μεθανο-θειο-σουλφονικό
αιθυλσουλφονικό νάτριο



N-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM)



πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon
(OGM)

Εικόνα 2.2: Δομή αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων

Αντισώματα (antibodies) και συζεύγματα για ανοσοαποτύπωση

αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας ιστιδινών (anti-PentaHis-IgG, Qiagen, West Sussex, UK)

αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (Molecular Probes, Eugene, Oregon)

πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase (HRP)-labeled protein A, Amersham Pharmacia BioTech (Uppsala, Sweden)

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

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

Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών (markers)

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

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

Πρωτεΐνες δείκτες: Φωσφορυλάση B (104.44 kDa), Αλβουμίνη ορού βοός (83.24 kDa), Ωολευκωματίνη (49.27 kDa), Καρβονική Ανυδράση (36.87 kDa), Αναστολέας θρυψίνης σόγιας (28.93 kDa), Λυσοζύμη (19.82 kDa)

Ένζυμα (enzymes)

αλκαλική φωσφατάση

alkaline phosphatase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany)

θρυψίνη

trypsin from bovine pancreas (Sigma-Aldrich, USA)

DNA πολυμεράση

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

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

Platinum Pfx (Invitrogen, Groningen, Netherlands)

περιοριστικές ενδονουκλεάσες

ApaI, BamHI, EcoRV (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) και (Takara, BIO INC., Japan)

DNA λιγάση (συνδετάση) του βακτηριοφάγου T4

T4 DNA ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany)

Νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών (nucleobases and analogs)

αδενίνη, αλλοπουρινόλη, γουανίνη, 1-μεθυλο-ξανθίνη, 2-θειο-ξανθίνη, 6-θειο-ξανθίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, 3-μεθυλο-ξανθίνη, 7-μεθυλο-ξανθίνη, 8-μεθυλο-ξανθίνη, 9-μεθυλο-ξανθίνη, ξανθίνη, οξυπουρινόλη, ουρακίλη, ουρικό οξύ, υποξανθίνη (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, εικόνα 2.3)

Ολιγο-δεοξυριβονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers)

BioSpring GmbH, Frankfurt, Germany

Οργανικοί διαλύτες (organic solvents)

αιθανόλη (ethanol absolute, Sigma Aldrich)

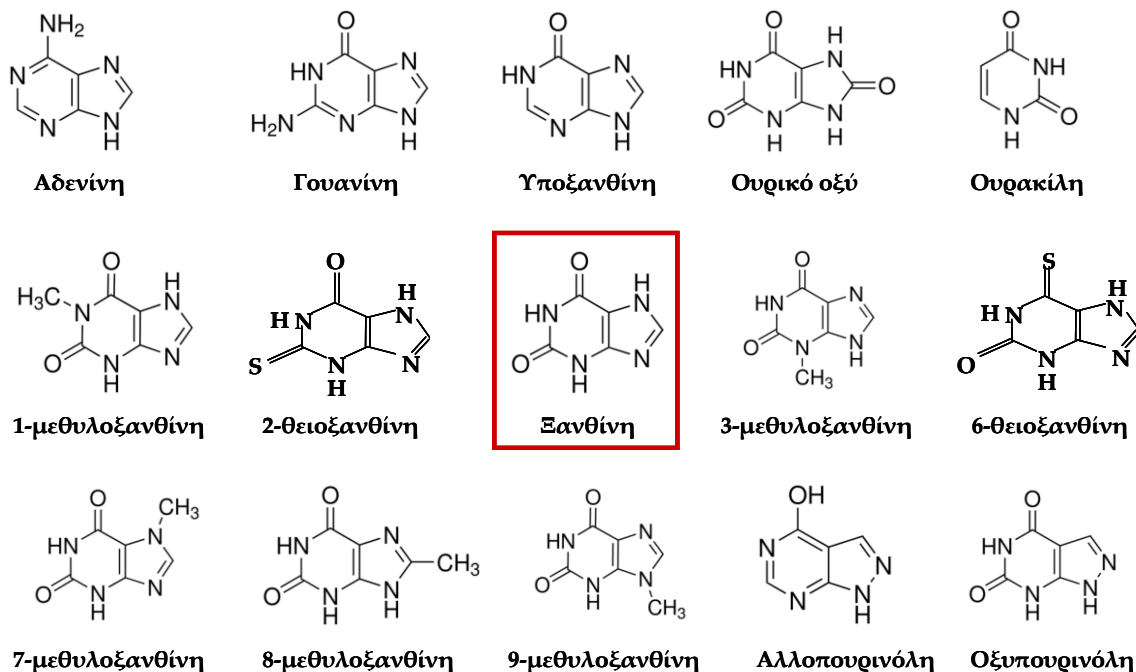
ακετονιτρίλιο (acetronitril, Merck)

βενζόλιο (benzene, Panreac)

διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide-DMSO, Fluka)

μεθανόλη (methanol, Sigma Aldrich)

φορμικό οξύ (formic acid, Riedel de Haen/Carlo Erba reagents)



Εικόνα 2.3: Ο συντακτικός τύπος νουκλεοτιδικών βάσεων και ανάλογα αυτών.

Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η Ξανθίνη, που αποτελεί υπόστρωμα του μεταφορέα XanQ που μελετάται στην παρούσα εργασία (Toronto Research Chemicals)

Πακέτα υλικών (kits)

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

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

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

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

πακέτο υλικών καθαρισμού DNA
(Nucleospin Extract II Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Ραδιενεργά Υπόστρωμα (radioactive substrates)

[8-³H] Γουανίνη (21.2 Ci/mmol, Moravek Biochemicals, Brea, California)

[8-³H] Ξανθίνη (22.8 Ci/mmol, Moravek Biochemicals, Brea, California)

[8-¹⁴C] Ουρικό οξύ (57.8 mCi/mmol, Moravek Biochemicals, Brea, California)

Σφαιρίδια νικελίου (Ni²⁺ beads)

Ni-IDA beads (ProBond™ Resin Invitrogen, Groningen, Netherlands)

Χημικές ενώσεις

Ακετονιτρίλιο –ACN (acetonitrile, Sigma-Aldrich)

Βρωμιούχο κυάνιο-CNBr (cyanogen bromide, Sigma-Aldrich)

Χλωριούχο κάδμιο- CdCl₂ (cadmium chloride, Sigma Aldrich)

DDM n-δωδεκυλο-β-D-μαλτοπυρανοσίδιο

(n-dodecyl-β,D-maltopyranoside, Sigma Aldrich)

EDTA αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ

(ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma Aldrich)

Τα υπόλοιπα χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαφόρων διαλυμάτων (βλ. 2.3) ήταν της υψηλότερης απαιτούμενης καθαρότητας.

2.3 Διαλύματα

Τα παρακάτω διαλύματα, κατ' αλφαβητική σειρά, χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές μεθόδους οι οποίες αναγράφονται σε κάθε περίπτωση:

Διάλυμα Αποκλεισμού (Blocking buffer)

5% BSA σε TBST 1x

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)(2.10.3)

Διάλυμα [8-³H] Γουανίνης (0.1μM):

[8-³H] γουανίνης (21.2 Ci/mmol) 53.2 μL, 46.8 μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (2.9)

Διάλυμα Διαχωρισμού (Separation buffer), pH 8.8:

Tris 1.5M, SDS 0.4% (w/v)

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (2.10.2)

Διάλυμα Επαναιώρησης (Resuspension buffer):

Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 100mM, Na₂EDTA 1mM

Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών (2.7)

Διάλυμα Επαναιώρησης TB, pH 6.7:

Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250 mM, αποστείρωση

Μέθοδος: Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων (2.5.3)

Διάλυμα Επιστοιβάξης (Stacking buffer), pH 6.8:

Tris 0.5M, SDS 0.4% (w/v)

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (2.10.2)

Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης:

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

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (2.10.2)

Διάλυμα Μεταφοράς:

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) (2.10.3)

Διάλυμα [8-³H] Ξανθίνης (25μM):

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

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (2.9)

Διάλυμα [8-¹⁴C] Ουρικού οξέος (80μM):

[8-¹⁴C] ουρικού οξύ (57.8 mCi/mmol) 10μL, 70 μL μη-ραδιενεργού ουρικού οξέος 2 mM, 40 μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (2.9)

Διάλυμα Σακχαρόζης (Sucrose buffer):

Tris-HCl 25 mM, pH 8, σακχαρόζη 45% (w/v), Na₂EDTA 1mM

Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών (2.7)

Tris-HCl 30 mM, pH 8, σακχαρόζη 30% (w/v), Na₂EDTA 10mM

Μέθοδος: Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών *in vivo* (2.12)

Διάλυμα TBST 10x:

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) (2.10.3)

Διάλυμα Τερματισμού:

KPi 0.1M pH 5.5 (βλ. Πίνακας 2.2), LiCl 0,1M pH 5.5

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (2.9)

Διάλυμα Tris-HCl, pH 8.0 1M, 30% σουκρόζη

Μέθοδος: Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (2.8)

Διάλυμα Tris-NaCl, pH 7.5:

Tris 15 mM, NaCl 150 mM

Μέθοδος: Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών *in vivo* (2.12)

Διάλυμα Υγρού Σπινθηρισμού (Scintillation fluid):

Τολουόλιο 66%(v/v), Triton X-100 33%(v/v), 2,5-διφαινυλο-οξαζόλη (PPO) 4% (w/v), 1,4-δισ(5-φαινυλοξαζολο-2-υλο)βενζόλιο (POPOP) 0.04%(w/v)

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (2.9)

Διάλυμα Υπερθειϊκού Αμμωνίου (APS):

APS 10% (w/v)

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (2.10.2)

Διάλυμα Φόρτωσης 4x (Loading buffer):

Tris pH 6.8 250mM, SDS 9.2% (w/v), DTT 100mM, Γλυκερόλη 40% (v/v), Μπλε της βρωμοφαινόλης 0.2% (w/v)

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (2.10.2)

Θρεπτικό Υλικό SOB, pH 7.5:

Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Τρυπτόνη 2%(w/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, αποστείρωση

Μέθοδος: Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων (2.5.3)

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth), pH 7.2:

Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Πεπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), αποστείρωση

Μέθοδος: Δημιουργία επιδεικτικών κυττάρων (βλ. 2.5.3) και Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων *E.coli* (βλ. 2.6)

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth) και άγαρ:

Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Πεπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), άγαρ 1.5% αποστείρωση

Μέθοδος: Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA (2.5.4)

Ρυθμιστικά Διαλύματα πειράματος pH

Για το πείραμα εξάρτησης από το pH (2.9.10) παρασκευάστηκαν δεκαπέντε ρυθμιστικά διαλύματα, ως εξής:

Για pH από 3.8 μέχρι 4.8 χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M οξικών (τελικού όγκου 10 mL), που προκύπτει από ανάμιξη κατάλληλων όγκων οξικού οξέος CH₃COOH (0.2M) και οξικού καλίου CH₃COOK (0.2M) σύμφωνα με τον Πίνακα 2.1:

Πίνακας 2.1: Στον πίνακα αυτό δίνεται η αναλογία των όγκων διαλύματος CH₃COOH (0.2M) (5.71 mL και προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 500 mL) και διαλύματος CH₃COOK (0.2M) (49 g στα 500 mL ddH₂O) (Θεοδώρου, 2006, Stenesh, 1984) για την παρασκευή τριών ρυθμιστικών διαλυμάτων οξικών (0.1M) με τιμές pH 3.8, 4.2 και 4.8.

Ρυθμιστικά διαλύματα οξικών 0.1M			
pH	CH ₃ COOH(0.2M)	CH ₃ COOK(0.2M)	dH ₂ O
3.8	4.4mL	0.6mL	5mL
4.2	3.675mL	1.324mL	5mL
4.8	2.05mL	2.95mL	5mL

Για pH από 5.2 μέχρι 8.0 χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M φωσφορικών (KPi, τελικού όγκου 10 mL), που προκύπτει από ανάμιξη κατάλληλων όγκων μονοβασικού φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 (1M) και διβασικού φωσφορικού καλίου K_2HPO_4 (1M) σύμφωνα με τον Πίνακα 2.2 :

Πίνακας 2.2: Στον πίνακα αυτό δίνεται η αναλογία των όγκων διαλύματος KH_2PO_4 (1M) (68.045 g στα 500 mL ddH₂O) και διαλύματος K_2HPO_4 (1M) (87.09 g στα 500 mL ddH₂O) για την παρασκευή οκτώ ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών (0.1M) με τιμές pH 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.3, 7.5 και 8.2.

Ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών KPi 0.1M			
pH	KH_2PO_4 (1M)	K_2HPO_4 (1M)	dH ₂ O
5.2	0.98mL	0.02mL	9mL
5.6	0.945mL	0.055mL	9mL
6.0	0.86mL	0.14mL	9mL
6.4	0.75mL	0.25mL	9mL
6.8	0.5mL	0.5mL	9mL
7.3	0.27mL	0.73mL	9mL
7.5	0.2mL	0.8mL	9mL
8.2	0.03mL	0.97mL	9mL

Για pH από 8.5 μέχρι 10.0 χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M βορικών που προκύπτει από ανάμιξη κατάλληλων όγκων χλωριούχου καλίου KCl με H_3BO_3 (0.2M) και καυστικού καλίου KOH (0.2M) σύμφωνα με τον Πίνακα 2.3:

Πίνακας 2.3: Στον πίνακα αυτό δίνεται η αναλογία των όγκων διαλύματος KCl + H_3BO_3 (0.2M) (KCl 7.456 g και H_3BO_3 6.185 g σε 500 mL ddH₂O) (Θεοδώρου, 2006) και διαλύματος KOH (0.2M) (2.24 g KOH σε 200 mL ddH₂O) για την παρασκευή τεσσάρων ρυθμιστικών διαλυμάτων οξικών (0.1M) με τιμές pH 8.6, 9.0, 9.5 και 10.0.

Ρυθμιστικά διαλύματα βορικών 0.1M			
pH	KCl + H_3BO_3 (0.2M)	KOH(0.2M)	dH ₂ O
8.6	5mL	1.5mL	3.5mL
9.0	5mL	2.3mL	2.7mL
9.5	5mL	3.67mL	1.36mL
10.0	4.5mL	5.5mL	-

2.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

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

E. coli **TOP10F'** (F' {*lacI^q*, *Tn10(Tet^R)*} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mrcBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG*) (Invitrogen): χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα λόγω του μεγάλου βαθμού επιδεκτικότητας (competence efficiency) που διαθέτει.*

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

E. coli **Δ purP** (*F⁻*, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787(:rrnB-3)*, λ^- , *rph-1*, Δ *purP745::kan*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*) (Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης μεταλλαγμάτων της περμεάσης XanQ εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ(p/o)*, υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο- β ,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* Δ *purP* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς αδενίνης και υποξανθίνης (Papakostas *et al.*, 2013).

E. coli **Δ yjcD** (*F⁻*, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787(:rrnB-3)*, λ^- , *rph-1*, , Δ (*rhaD-rhaB*)568, Δ *yjcDP758::kan hsdR514*) (Baba *et al.*, 2006). Σε *E. coli* Δ *yjcD* γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς γουανίνης (Papakostas *et al.*, 2013).

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

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

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

κατάλοιπα κυστεϊνών σε σερίνες (Cys-less), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ* p/o, και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (biotin-acceptor domain, BAD) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991; Dimroth, 1997) ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*xanQ*-His₁₀ (Karatza and Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) της περμεάσης XanQ φυσικού τύπου (wt), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ* p/o, και αλληλουχία δέκα συνεχόμενων ιστιδινών (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003) στο C-τελικό άκρο.

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

pT7-5/*lacY*-C154G-His₁₀ (Smirnova and Kaback, 2003, Abramson *et al.*, 2003a): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*lacY*) της περμεάσης λακτόζης (LacY) της *E. coli* με αλλαγμένη την κυστεϊνη στη θέση 154 σε γλυκίνη (όπως είχε χρησιμοποιηθεί για την αρχική κρυστάλλωση της LacY) και με την C-τελική αλληλουχία δέκα καταλοίπων ιστιδινών (His₁₀).

pT7-5/*xanQ*-X#C-BAD (παρούσα μελέτη), ανασυνδυασμένα pT7-5 που φέρουν το γονίδιο της XanQ με αλλαγμένα τα πέντε εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών σε σερίνες (Cys-less), ένα επιπλέον εγγενές κατάλοιπο (X) στη θέση # αλλαγμένο σε κυστεϊνη (Cys) (δηλ. single-Cys mutants) και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της LacY 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), και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*uacT*-BAD (Papakostas and Frillingos, 2012): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*uacT*) του μεταφορέα ουρικού UacT φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

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

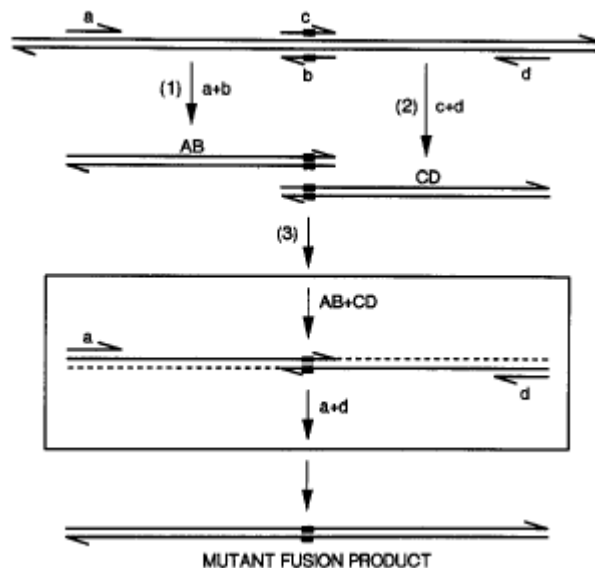
2.5 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Οι τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA (τεχνικές κλωνοποίησης DNA ή γενετικής μηχανικής) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων από επιλεγόμενα τμήματα DNA μέσω μιας διαδοχικής σειράς *in vitro* και *in vivo* σταδίων, δηλ. παραγωγή πολλών κλώνων DNA (DNA cloning) και ανασυνδυασμό τμημάτων DNA που μας ενδιαφέρουν να μελετήσουμε με την τελική εισαγωγή τους σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς (DNA recombination). Το σύνολο των σχετικών τεχνικών περιγράφεται συχνά ως μία τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA technology) που χρησιμοποιεί ιδιαίτερα μοριακά εργαλεία και μεθόδους.

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

Η PCR δύο ή περισσότερων σταδίων (Ho *et al.*, 1989, Frillingos *et al.*, 1994, Karatza *et al.*, 2006) χρησιμοποιεί κατάλληλα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) για να παραγάγει (ενισχύσει) από τα γονίδια-στόχους συγκεκριμένα τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα μεταξύ τους άκρα (στάδιο 1). Τα προϊόντα του σταδίου 1 συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα (template) σε επόμενες αντιδράσεις PCR, όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και, με τη χρήση των ίδιων εξωτερικών ολιγονουκλεοτιδίων όπως στο στάδιο 1, επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από την συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία (contig) όλων των προηγούμενων τμημάτων (στάδιο 2). Εφόσον το πρωτόκολλο το απαιτεί, τα νέα αυτά προϊόντα, του σταδίου 2, μπορούν και πάλι να συνδυασθούν και να υποβληθούν σε νέα αντίδραση PCR (στάδιο 3), και ούτω καθ' εξής (Sahin-Toth *et al.*, 2000).

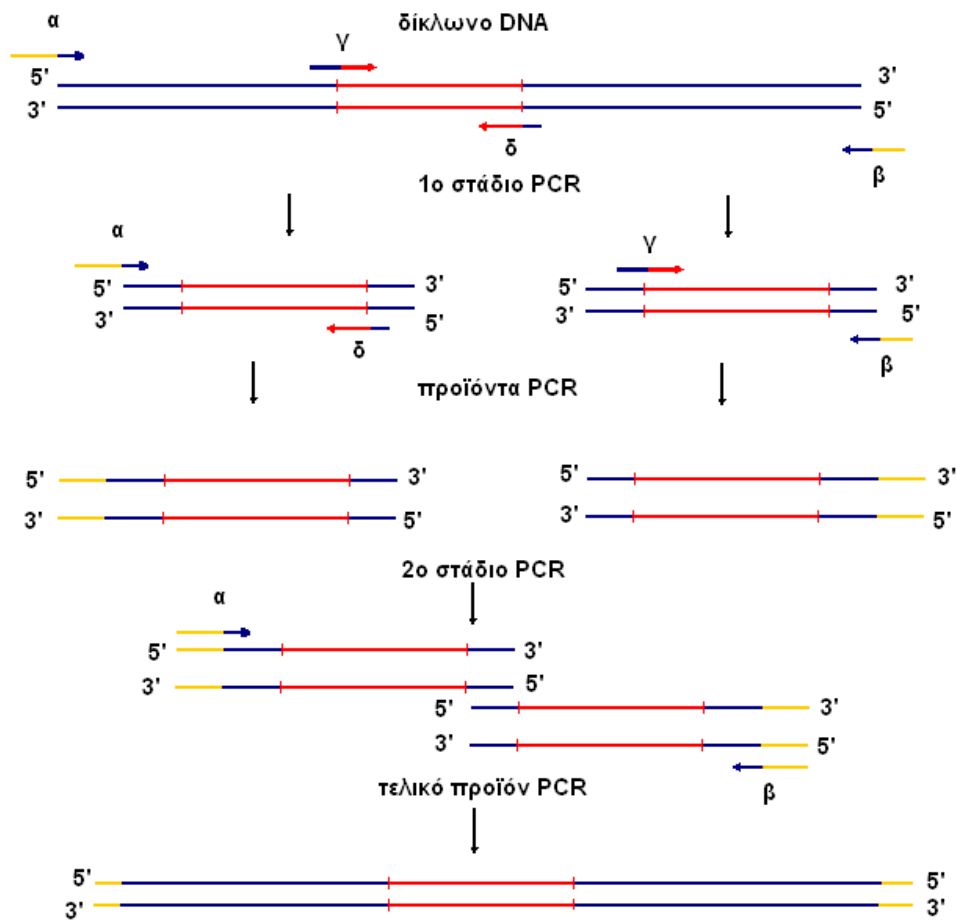
Η ανωτέρω μεθοδολογία, που περιγράφεται συνήθως ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension) (Ho *et al.*, 1989) αποτελεί μέθοδο εκλογής, μεταξύ των άλλων, για την κατασκευή χιμαιρικών γονιδίων, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και δημιουργία γονιδίων χωρίς κωδικόνια Cys (C-less) με συνδυαστική μεταλλαξιγένεση σε πολλές θέσεις (Frillingos *et al.*, 1994, Sahin-Toth *et al.*, 2000, Frillingos and Kaback, 2001, Karatza *et al.*, 2006). Στο τέλος κάθε σταδίου τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (1%) και ανακτώνται με τη βοήθεια πακέτου υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).



Εικόνα 2.4: Σχηματικό διάγραμμα της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension). Το DNA και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια απεικονίζονται με γραμμές- βέλη με κατεύθυνση από το 5'- στο 3'-. Η θέση εισαγωγής της μετάλλαξης σημειώνεται με μαύρο μικρό ορθογώνιο παραλληλόγραμμο και οι εκκινητές μαζί με τα αντίστοιχα προϊόντα της αντίδρασης που προκύπτουν από αυτούς, σημειώνονται με τα ίδια γράμματα σε πεζά και κεφαλαίους χαρακτήρες. Το μεγεθυμένο ορθογώνιο δείχνει ενδεικτικά ενδιάμεσα βήματα κατά το στάδιο 3 (βλ.2.5.1), ενώ η επιμήκυνση των αποδιατεταγμένων τμημάτων από την DNA πολυμεράση συμβολίζεται με διακεκομμένη γραμμή. Οι a και d είναι οι «εξωτερικοί» εκκινητές συμπληρωματικοί στα άκρα του DNA, ενώ οι c και b είναι οι «εσωτερικοί» εκκινητές συμπληρωματικοί στην περιοχή εισαγωγής της μετάλλαξης (Ho *et al.*, 1989).

Αναλυτικά, σε κάθε στάδιο PCR στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή αντίστοιχες ποσότητες προϊόντων PCR μετά από καθαρισμό
- 10 μM από κάθε εκκινητή
- 10x ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης και 50nM MgSO₄ ή 10x ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει MgCl₂
- 2.5 mM από κάθε δεόξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
- 1 U/μl DNA πολυμεράση
- Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη Millipore μέχρι τελικό όγκο 100 μL.



Εικόνα 2.5: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου PCR δύο σταδίων (Καρενά Αικ., Μεταπτυχιακή εργασία 2007)

- α → εξωτερικός εκκινητής νοηματικού κλώνου
- γ → εσωτερικός εκκινητής νοηματικού κλώνου
- β → εξωτερικός εκκινητής μη νοηματικού κλώνου
- δ → εσωτερικός εκκινητής μη νοηματικού κλώνου

Η PCR εφαρμόστηκε σε 30 κύκλους αλλαγής θερμοκρασιών ως εξής:

Για το πρώτο στάδιο	94° για 05:00	
	
	94° για 01:00	(αποδιάταξη του δίκλωνου DNA)
	50° για 01:00	(πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων)
	72° για 01:30	(επιμήκυνση του DNA)
.....		
	72° για 07:00	

Για το δεύτερο στάδιο	94° για 05:00	
	
	94° για 01:00	(αποδιάταξη του δίκλωνου DNA)
	50° για 02:00	(πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων)
	72° για 02:00	(επιμήκυνση του DNA)
.....		
	72° για 07:00	

(με μικρές τροποποιήσεις στη θερμοκρασία πρόσδεσης-annealing ή χρόνους πρόσδεσης ή επιμήκυνσης-elongation ανάλογα με την περίπτωση)

Οι τρεις εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις κατασκευές στις αντιδράσεις PCR είναι οι *lacZ(p/o)sense*, *lacZ50 sense* και *Υ_k(pT7-5)- His₁₀ antisense*:

lacZ(p/o)sense

5'- ATGATTACGGATTCACCTGGCCGTC-3'

lacZ50 sense

5'- GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3'

Υ_k(pT7-5)- His₁₀ antisense

5'-GACGGGGAGTCAGGCAACTATGG-3'

Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις κατασκευές για την αντίστοιχη αντίδραση PCR καθώς και τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης δίνονται στους Πίνακες Π1.1 – Π1.11 στο Παράρτημα 1.

Μέθοδος εισαγωγής διπλής μετάλλαξης

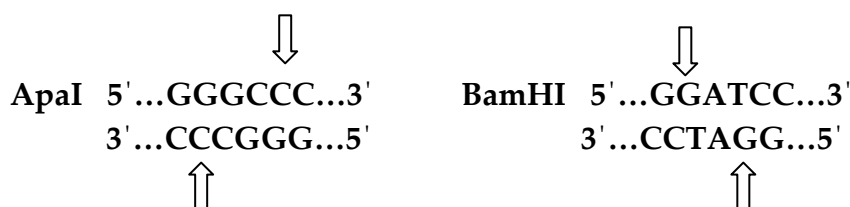
Στην περίπτωση της κατασκευής των περμεασών με διπλή μετάλλαξη, αντικατάσταση δηλαδή δύο αμινοξέων στην ίδια περμεάση XanQ, [με κυστεΐνη (double-Cys mutants) ή με κυστεΐνη και αλανίνη ή με θρεονίνη και μεθειονίνη ή με ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ] χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με DNA της XanQ με μετάλλαξη σε μία από τις δύο θέσεις (~1 µg/µL), προϊόν προηγούμενης αντίδρασης PCR, και οι εσωτερικοί εκκινητές για την εισαγωγή της αντικατάστασης στην δεύτερη θέση. Κατ' εξαίρεση, η περμεάση XanQ με την διπλή μετάλλαξη E186C/H187C, που φέρει αντικαταστάσεις σε δύο διαδοχικά κατάλοιπα αμινοξέων, προέκυψε κατευθείαν με αντίδραση PCR με κατάλληλους εσωτερικούς εκκινητές σε υπόστρωμα pT7-5/xanQ-Cys-less-His₁₀. Οι εσωτερικοί εκκινητές και το υπόστρωμα των αντιδράσεων PCR καθώς και τα αντίστοιχα προϊόντα δίνονται στους πίνακες Π1.8 και Π1.11.

Μέθοδος εισαγωγής πολλαπλής μετάλλαξης

Για την αντικατάσταση επιλεγμένων καταλοίπων μεθειονινών χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με DNA του XanQ με μετάλλαξη σε μία από τις δύο θέσεις (~1 µg/µL), προϊόν προηγούμενης αντίδρασης PCR pT7-5/xanQ(Cys-less/M282V)-His₁₀, και οι εσωτερικοί εκκινητές για την εισαγωγή της αντικατάστασης στην δεύτερη θέση. Σε επόμενο στάδιο στην αντίστοιχη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με DNA της XanQ με μετάλλαξη σε μία από τις δύο θέσεις (~1 µg/µL), προϊόν προηγούμενης αντίδρασης PCR pT7-5/xanQ(Cys-less/M282V/M331V)-His₁₀, και οι εσωτερικοί εκκινητές για την εισαγωγή της αντικατάστασης στην τρίτη θέση κ.ο.κ. Οι εσωτερικοί εκκινητές και το υπόστρωμα των αντιδράσεων PCR καθώς και τα αντίστοιχα προϊόντα δίνονται στον πίνακα Π1.9.

2.5.2 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη-ανασύνδεση)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, επωάστηκαν μέχρι πλήρους πέψης ο πλασμιδιακός φορέας pT7-5/*melY*-BAD (από μεγάλης κλίμακας παρασκευάσμα – maxi prep, 1 μg/μL) και τα προς ένθεση (insert) προϊόντα DNA, που είχαν προκύψει από τις αντιδράσεις PCR, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI* (Εικόνα 2.6). Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις τόσο στον φορέα pT7-5/*melY*-BAD όσο και στα PCR προϊόντα που δημιουργούνται με εκμαγείο τα pT7-5/*xanQ*-Cys-less-His₁₀, pT7-5/*xanQ*-His₁₀ (Karatza and Frillingos, 2005, Karatza *et al.*, 2006) ή pT7-5/*xanQ*-X#C-BAD, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (ενότητα 2.5.1).



Εικόνα 2.6: Αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων *ApaI* και *BamHI*.

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

Ειδικά στις περιπτώσεις των περμεασών με επίτοπο ουρά δέκα ιστιδινών ως φορέας υποκλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/*lacY*-C154G-His₁₀ και ως ένθεμα (insert) πλασμιδιακό DNA *xanQ*-X#C-BAD, που ήταν διαθέσιμο από την αρχική κατασκευή του αντίστοιχου *XanQ*(X#C)-BAD.

2.5.3 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού

Κύτταρα *E. coli* TOP10F' ή T184 προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των Inoue *et al.* (1990). Συγκεκριμένα, γίνεται πλήρης καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB (10 mL) στους 37 °C, για 16 ώρες (βλ. 2.3). Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα SOB (βλ. 2.3) μέχρι τελικού όγκου 250 mL. Η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους T184 γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL). Ακολουθεί ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση στον επωαστήρα του θερμού θαλάμου μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει στην τιμή 0.6. Μετά από επώαση στον πάγο για 10 min, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm (10 min, 4°C) και αναδιαλύονται σε 80 mL ψυχρού διαλύματος TB (βλ.2.3). Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας επαναλαμβάνεται με επαναιώρηση σε 20 mL ψυχρού TB που περιέχει 7% (v/v) διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) και τα κύτταρα χαρακτηρίζονται πλέον ως επιδεκτικά, έτοιμα για μετασχηματισμό με τα κατάλληλα πλασμίδια (plasmid DNA prep) ή προϊόντα της αντίδρασης ανασύνδεσης (ligation products). Τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

2.5.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA (από ligation product) προστίθεται σε επιδεκτικά TOP10F' και γίνεται επώαση σε πάγο, 5 min. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε προθερμασμένα στους 37 °C τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ (βλ. 2.3) που περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/mL). Οι αποικίες επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητά τους σε αμπικιλίνη και στη συνέχεια πραγματοποιείται απομόνωση του DNA σε μικρή κλίμακα με βάση πρωτόκολλο πακέτου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (βλ. 2.2). Σε κάθε περίπτωση, γίνεται επιβεβαίωση της αλληλουχίας του DNA ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *Bam*HI και *Apa*I, σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech). Ακολουθεί εκ νέου μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, *E. coli* T184, με το (επιβεβαιωμένο, πλέον, και καθαρισμένο) πλασμιδιακό DNA και αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε LB που περιέχει γλυκερόλη (30%), στους -80°C.

2.6 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων

Ανάπτυξη σε μικρή κλίμακα (10 mL)

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

Ανάπτυξη σε μεγάλη κλίμακα (1 L)

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

2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

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

Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων *E. coli* T184 από 10 mL καλλιέργειας (βλ. 2.6), τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (διάλυμα Tris-NaCl-EDTA, 2.3) και φυγοκεντρώνται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης και φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται μία φορά, με αναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL διαλύματος επαναιώρησης. Το εναιώρημα (1 mL) μεταφέρεται σε μικροσωληνάκια τύπου eppendorf, φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο eppendorf (13000 rpm, 2 min) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος σακχαρόζης (βλ. 2.3).

Το κυτταρικό εναιώρημα αφήνεται να επωασθεί στο διάλυμα σακχαρόζης στους 4 °C για 20 min. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται εκ νέου (13000 rpm, 1 min) και το κυτταρικό ίζημα (pellet) επαναιωρείται σε 0.8 mL ddH₂O και αφήνεται για 10 min στους 4 °C. Στη συνέχεια, προστίθεται λυσοζύμη (τελική συγκέντρωση 0.125 mg/mL) και το εναιώρημα επωάζεται στους 4 °C για 30 λεπτά. Ακολουθεί αμέσως θραύση των κυττάρων σε συσκευή υπέρηχων (sonication) (2 ώσεις των 15 sec, σε ένταση 40%, στην συσκευή Branson 250-D) και, μετά από σύντομη φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση των άθραυστων κυττάρων και υπολειμμάτων (cell debris) (13000 rpm, 2 min), τα υπερκείμενα υποβάλλονται σε υπερφυγοκέντρωση (Optima Ultracentrifuge, 90000 rpm, 10 min, 4 °C). Το ίζημα των μεμβρανών διαλυτοποιείται σε 40 μL ddH₂O και τα δείγματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση και περαιτέρω αναλύσεις (βλ 2.10) είτε αμέσως είτε μετά από 12-24 ώρες αφού ενδιάμεσα φυλαχθούν στους 4 °C.

2.8 Παρασκευή μεμβρανικών κυστιδίων (RSO membrane vesicles)

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 χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας αποτελεί προσαρμογή γνωστών πρωτοκόλλων απομόνωσης κυστιδίων (Frillingos and Kaback, 1996), όπως παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω (βλ. και Γ. Μερμελέκας, 2009, Διδακτορική διατριβή).

Αρχικά γίνεται ανάπτυξη κυττάρων *E.coli*, των στελεχών T184 σε μεγάλη κλίμακα (βλ.2.6.2). Στη συνέχεια συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4°C, Beckmann JA-14) και γίνεται έκπλυση με διάλυμα 0.1 M KPi pH 6.6. 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 µg/ mL και K₂EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM, ακολουθεί αργή ανάδευση για 1 ώρα. 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 KPi pH 6.6, 20 mM MgSO₄, 30% σακχαρόζη, 30 µg/mL DNAase. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε 1000 mL προθερμασμένου (37°C) 50 mM KPi pH 6.6 και επωάζεται υπό ανάδευση για 15 min στους 37 °C. Γίνεται προσθήκη K₂EDTA pH 7.0 σε τελική συγκέντρωση 10 mM συνεχίζεται η επώαση για άλλα 15 min και στη συνέχεια προστίθεται MgSO₄ σε τελική συγκέντρωση 15 mM για ακόμη 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (8500 rpm, 1 h, 4 °C, Beckmann JA-14) και επαναιώρηση του ιζήματος σε 88 mL παγωμένου διαλύματος 0,1 M KPi pH 6.6, 10 mM K₂EDTA. 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 KPi pH 6.6, 10 mM K₂EDTA 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 KPi pH 7.5, 10

mM MgSO₄ και νέα φυγοκέντρηση (15000 rpm, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-20). Το τελικό ίζημα των κυστιδίων διαλυτοποιείται σε 500 μL διαλύματος 0.1 M KPi pH 7.5, 10 mM MgSO₄ και φυλάσσονται στους -80 °C αφού πρώτα καταψυχθούν σε υγρό άζωτο.

2.9 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)

2.9.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα

Η πειραματική αυτή διαδικασία ξεκινάει με την ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* T184 (ή *ΔyjcD*, σε περίπτωση ελέγχου της διαμεμβρανικής μεταφοράς γουανίνης, βλ. 2.4) που είχαν μετασχηματισθεί με το πλασμιδιακό DNA της προς μελέτη περμεάσης. Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων από 10 mL καλλιέργειας (βλ. 2.6), τα κύτταρα επαναϊωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3), και φυγοκεντρώνονται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης σε KPi και φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται δύο φορές, με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 1 mL KPi, pH 7.5 0.1M. Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών δειγμάτων ισορροπούνται με φωτομέτρηση στα 420 nm και προσθήκη κατάλληλου όγκου KPi, pH 7.5 0.1M, έτσι ώστε η τελική τιμή οπτικής πυκνότητας να είναι $OD_{420nm} = 10$, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL, σύμφωνα με αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994). Τα κυτταρικά δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για την εφαρμογή της δοκιμασίας σε σταθερή θερμοκρασία (25 ή 37 °C στην παρούσα εργασία).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3H] ξανθίνης (21.8 Ci/mmol), [3H] γουανίνης (21.2 Ci/mmol) και [^{14}C] ουρικού οξέος (57.8 mCi/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μ M, 0.1 μ M και 80 μ M αντίστοιχα) σε 50 μ L κυττάρων για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 10 min, Karatza and Frillingos, 2005). Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με 2 x 3 mL διαλύματος τερματισμού (βλ. 2.3) με ταχεία διήθηση υπό κενό (rapid filtration), σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μ m (Frillingos *et al.*, 1994). Μετά την επώαση, ο ηθμός μεταφέρεται σε κατάλληλα σωληνάκια σπινθηρισμού (scintillation vials) και επωάζεται με 2 x 4 mL υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid) (βλ. 2.3) για 24 ώρες. Τα δείγματα 3H και ^{14}C μετρώνται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter) (βλ. 2.1).

2.9.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα για κινητική ανάλυση

Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης πρόσληψης [³H]ξανθίνης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης υποστρώματος μετρήθηκε στα 5 και 10 sec ή 10 και 20 sec και οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 2.5μM έως 1mM (αρχική συγκέντρωση, διάλυμα εργασίας) για τελική συγκέντρωση ραδιενεργού υποστρώματος από 0.1μM έως 40μM.

Οι σταθερές V_{max} και K_m εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 5* (<http://www.graphpad.com>).

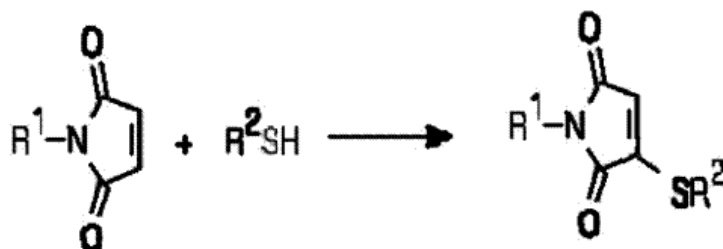
2.9.3 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε ακέραια κύτταρα παρουσία μη σημασμένων αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων

Στα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [³H]ξανθίνης από άλλες πουρίνες ή ανάλογα πουρινών, πραγματοποιήθηκε προεπάση των κυττάρων με μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (0.1μM έως 1mM, Εικόνα 2.3) για 5 min και στην συνέχεια ακολούθησε δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς με [8-³H] ξανθίνη (1μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 και 10 sec ή 10 και 20 sec, και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 5*. Οι τιμές K_i που δίνονται προκύπτουν από την εφαρμογή του τύπου των Cheng and Prusoff (1973) [$K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$], όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [8-³H] ξανθίνης.

2.9.4 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών SH-αντιδραστηρίων, προηγείται επάση με το αντίστοιχο αντιδραστήριο (NEM, MTSEA⁺, ή MTSES⁻) σε τελική συγκέντρωση 1-2 mM για 10-30 min, στους 25 °C. Για το N-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM, Εικόνα 2.2) χρησιμοποιείται συγκέντρωση 2 mM (Karatza *et al.*, 2006) και ο χρόνος προεπάσης είναι 10 min, ενώ για το μεθανο-θειο-σουλφονικό αιθυλοσουλφονικό (MTSES⁻) και την μεθανο-θειο-σουλφονική αιθυλαμίνη (MTSEA⁺) (Εικόνα 2.2), χρησιμοποιείται 1 mM και ο χρόνος προεπάσης είναι 30 λεπτά (Dunten *et al.*, 1993, Frillingos and Kaback, 1996). Τερματισμός των αντιδράσεων γίνεται με διθειοθρεϊτόλη (DTT) (σε μοριακή περίσσεια 10x έναντι του SH-αντιδραστηρίου) και η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ξανθίνης γίνεται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για

την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994).



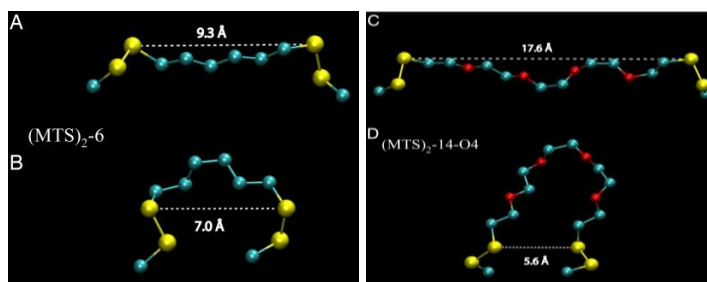
Εικόνα 2.7: Αντίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμίδιου (NEM) με τις SH-ομάδες των κυστεϊνών (από Molecular Probes, www.probes.invitrogen.com)

2.9.5 Επίδραση διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού σταυρωτής αλληλοσύνδεσης

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού MTS-linker-MTS σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (Εικόνα 2.1), προηγείται επώαση με το αντίστοιχο αντιδραστήριο σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM για 10 λεπτά, στους 25 °C, παρουσία υποστρώματος (ξανθίνης) τελικής συγκέντρωσης 1mM (Zhou *et al.*, 2008). Γίνεται μεταφορά των δειγμάτων σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3), και συλλέγονται με φυγοκέντρηση. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 1mL KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3) και φυγοκεντρώνονται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης σε KPi, και της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές, με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 600 μ L KPi, pH 7.5 0.1M.

Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών δειγμάτων ρυθμίζονται με προσθήκη κατάλληλου όγκου KPi, pH 7.5, μετά από φωτομέτρηση στα 420 nm, έτσι ώστε η τελική τιμή οπτικής πυκνότητας να είναι $OD_{420nm} = 10$, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL, σύμφωνα με αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (21.8 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μ M) σε 50 μ L κυττάρων για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 20 sec), παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994).

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα ειδικά διλειτουργικά αντιδραστήρια σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) παρουσιάζουν ευελιξία διαμορφώσεων (Εικόνα 2.8) και έτσι κατά την σύνδεσή τους με τις πλευρικές ομάδες κυστεϊνών εμφανίζουν ένα κατώτερο και ένα ανώτερο όριο απόστασης ανάμεσα στις θέσεις σύνδεσής τους, που με προσομοιώσεις μέσω μεθόδων μοριακής δυναμικής έχουν προσδιοριστεί (MTS-3-MTS: 3-6Å, MTS-6-MTS: 5-10Å, MTS-14-O4-MTS: 3-19Å, MTS-17-O5-MTS: 3-22Å, Zhou *et al.*, 2008).



Εικόνα 2.8: Προσομοιώσεις των ανοιχτών (A, C) και κλειστών (B, D) διαμορφώσεων των αντιδραστηρίων MTS-6-MTS και MTS-14-O4-MTS (Zhou *et al.*, 2007).

2.9.6 Επίδραση αναγωγικού παράγοντα (DTT)

Για τα πειράματα της επίδρασης του αναγωγικού παράγοντα διθειοθρεϊτόλης (DTT), για κάθε περμεάση που εφαρμόζεται το πρωτόκολλο της δοκιμασίας ενεργού μεταφοράς τοποθετούνται δύο δείγματα. Η διαδικασία εφαρμόζεται μέχρι την πρώτη ισορρόπηση των συγκεντρώσεων των κυτταρικών δειγμάτων σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL. Στην συνέχεια στα μισά δείγματα προστίθεται διθειοθρεϊτόλη (DTT) σε μοριακή περίσσεια 10x για 30 λεπτά, στους 25 °C. Τα συνολικά δείγματα μεταφέρονται σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3), και συλλέγονται με φυγοκέντρηση. Ακολουθεί επαναϊώρηση του ιζήματος σε 1mL KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3) και φυγοκεντρώνονται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναϊώρησης σε KPi και της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 600 μL KPi, pH 7.5 0.1M.

Οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών δειγμάτων ισορροπούνται εκ νέου με φωτομέτρηση στα 420 nm και προσθήκη κατάλληλου όγκου KPi, pH 7.5 0.1M, έτσι ώστε η τελική τιμή οπτικής πυκνότητας να είναι $OD_{420nm} = 10$, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL, σύμφωνα με αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3H] ξανθίνης (21.8 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μM) σε 50 μL κυττάρων για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 20 sec), παρουσία μεθοσουλφονικού

φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994).

2.9.7 Επίδραση διλειτουργικών αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (απουσία και παρουσία αναγωγικού παράγοντα)

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού MTS-linker-MTS σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (Εικόνα 2.1) απουσία και παρουσία αναγωγικού παράγοντα (DTT), γίνεται συνδυασμός των πρωτοκόλλων 2.7.5 και 2.7.6. Συγκεκριμένα, προηγείται επώαση των δειγμάτων με το αντίστοιχο αντιδραστήριο σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM για 10 λεπτά, στους 25 °C, παρουσία υποστρώματος ξανθίνης τελικής συγκέντρωσης 1mM (Zhou *et al.*, 2008). Γίνεται μεταφορά των δειγμάτων σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3), και συλλέγονται με φυγοκέντρωση. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 1mL KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3) και φυγοκεντρώνονται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης σε KPi και της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά τα κύτταρα των μισών δειγμάτων αναδιαλύονται σε 600 μ L KPi, pH 7.5 0.1M και των υπόλοιπων δειγμάτων σε 1mL KPi, pH 7.5 0.1M. Στα δείγματα όγκου 1mL προστίθεται διθειοθρεϊτόλη (DTT) σε μοριακή περίσσεια 10x έναντι του MTS-MTS αντιδραστηρίου (Zhou *et al.*, 2008) για 30 λεπτά, στους 25 °C. Αυτά μεταφέρονται σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3), και συλλέγονται με φυγοκέντρωση. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 1mL KPi, pH 7.5 0.1M (βλ. 2.3) και φυγοκεντρώνονται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης σε KPi και της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και την τελευταία φορά τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 600 μ L KPi, pH 7.5 0.1M, όπως και τα υπόλοιπα δείγματα.

Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών δειγμάτων ισορροπούνται με φωτομέτρηση στα 420 nm και προσθήκη κατάλληλου όγκου KPi, pH 7.5, έτσι ώστε η τελική τιμή οπτικής πυκνότητας να είναι $OD_{420nm} = 10$, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL, σύμφωνα με αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης (21.8 Ci/mmol) γίνεται με επώαση με το ραδιενεργό υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 1 μ M) σε 50 μ L κυττάρων για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 20 sec) γίνεται παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994).

2.9.8 Επίδραση χλωριούχου καδμίου (CdCl₂)

Για τα πειράματα της επίδρασης του χλωριούχου καδμίου (CdCl₂), γίνεται προεπάση των 50 μl κυτταρικού δείγματος (μετά την ισορρόπηση των κυτταρικών δειγμάτων σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL) με την αντίστοιχη συγκέντρωση CdCl₂ στους 25 °C, 10 min, και ακολουθεί η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς, όπως περιγράφεται ανωτέρω. Το CdCl₂ χρησιμοποιείται στην περιοχή συγκεντρώσεων από 10 μM έως 20 mM (Brocke *et al.*, 2002) και τα αποτελέσματα αναλύονται με το πρόγραμμα *Prism5*.

2.9.9 Επίδραση διλειτουργικών αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης παρουσία και απουσία χλωριούχου καδμίου (CdCl₂)

Στα πειράματα ελέγχου της επίδρασης ειδικών διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού MTS-linker-MTS σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (Εικόνα 2.1) παρουσία και απουσία χλωριούχου καδμίου (CdCl₂) ακολουθείται η διαδικασία όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.5 μέχρι την δεύτερη ισορρόπηση των συγκεντρώσεων των κυτταρικών δειγμάτων σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL. Στην συνέχεια γίνεται προεπάση των 50 μl κυτταρικού δείγματος με την αντίστοιχη συγκέντρωση CdCl₂ στους 25 °C, 10 min, και ακολουθεί η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς, για διάφορους χρόνους (από 5 sec έως 20 sec) παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazine methosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM), για την ηλεκτρονιοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994). Το CdCl₂ χρησιμοποιείται στην περιοχή συγκεντρώσεων από 10 μM έως 20 mM (Brocke *et al.*, 2002) και τα αποτελέσματα αναλύονται με το πρόγραμμα *Prism5*.

2.9.10 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε διάφορα pH

Στα πειράματα όπου εξετάζεται η επίπτωση του pH, δείγμα 200 μL κυττάρων (OD_{420nm} 10) μεταφέρεται σε μικροσωληνάκια τύπου erpendorf, φυγοκεντρείται σύντομα στις 13000 rpm (2 min) και επαναιωρείται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος του αντίστοιχου pH (βλ. 2.3). Μετά από 2 φυγοκεντρικές εκπλύσεις, τα κύτταρα συλλέγονται, αναδιαλύονται σε 200 μL του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος και ακολουθεί η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς (Frillingos *et al.*, 1997; He and Kaback, 1997; He *et al.*, 1997)

2.10 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.10.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA

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

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

Στα μεμβρανικά δείγματα προστίθεται κατάλληλος όγκος διπλά αποσταγμένου νερού μέχρι την ισορρόπηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων στα 100 μg πρωτεΐνης ανά 50 μL . Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer, βλ. 2.3) σε αναλογία 4:1 (δείγμα: διάλυμα φόρτωσης) και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου (12%) – δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, **SDS-PAGE**) (Laemmli, 1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πήγμα διαχωρισμού 12% και πήγμα επιστοίβαξης 5% (Πίνακας 2.4):

Πίνακας 2.4: Πρωτόκολλο για την παρασκευή πήγματος διαχωρισμού και πήγματος επιστοίβαξης [Μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)]

Πίνακας 2.4						
Πήγμα	30% ακρυλαμίδιο	10% SDS	10% APS	TEMED	Διάλυμα	απεστ. νερό
Πήγμα διαχωρισμού (100 mL)	42mL	1mL	1mL	0.05mL	Διαχωρισμού 25mL (βλ. 2.3)	32mL
Πήγμα επιστοίβαξης (30 mL)	4.5mL	0.3mL	0.3mL	0.03mL	Επιστοίβαξης 7.5mL (βλ. 2.3)	17.4mL

2.10.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρονται με ηλεκτροφορητική μεταφορά (4 ώρες, 400 mA) σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (PVDF) (βλ. 2.2), σε διάλυμα μεταφοράς

(διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιέχει 20% μεθανόλη) (βλ. 2.3). Στη συνέχεια, η μεμβράνη PVDF επωάζεται για τουλάχιστον 16 ώρες σε διάλυμα TBST που περιέχει 5% BSA (blocking buffer) (βλ. 2.3). Ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων και συζευγμάτων ενζύμου-αντισώματος.

Για τις βιοτινυλιωμένες περμεάσες (XanQ-BAD) χρησιμοποιείται το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης ή στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP ή streptavidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 σε TBST-5%BSA (blocking buffer, βλ. 2.3) για μία ώρα και ακολουθούν οχτώ πλύσεις με TBST πριν την ανίχνευση του σήματος.

Για τις περμεάσες με την ουρά των ιστιδινών (XanQ-His₁₀) χρησιμοποιείται σύζευγμα αντισώματος έναντι των ιστιδινών (anti-PentaHis-HRP) σε αραιώση 1: 5000 για μία ώρα και ακολουθούν πέντε πλύσεις με TBST πριν την ανίχνευση του σήματος.

Στην περίπτωση της δοκιμασίας σήμανσης κυστεϊνών *in vivo* (βλ. παρακάτω, παρ. 2.10), μετά την ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι των ιστιδινών (anti-PentaHis -HRP), εκπλένεται η περίσσεια συζεύγματος και αντιδραστηρίων (Sambrook *et al.*, 1989), η μεμβράνη παραμένει για 16 ώρες σε TBST-5%BSA (blocking buffer) και έπειτα προστίθεται αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (anti-OGM) σε αραιώση 1:3.000 για 2 ώρες, σε TBST-5%BSA, ακολουθούν οχτώ πλύσεις με TBST, και επώαση με σύζευγμα πρωτεΐνης A-υπεροξειδάσης (HRP-labeled protein A) ως δεύτερο αντίσωμα, σε αραιώση 1:50000 για 1 ώρα, σε TBST-5%BSA. Τέλος, ακολουθούν πέντε πλύσεις με TBST πριν την ανίχνευση του σήματος OGM.

Σε όλες τις περιπτώσεις, για την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος (ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του σήματος) χρησιμοποιείται η αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, βλ. 2.2).

2.11 Χημική πρωτεόλυση κλάσματος μεμβρανών με βρωμιούχο κυάνιο (CNBr)

Μετά την παρασκευή κλασμάτων μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη της *E. coli* με τη μέθοδο συνδυασμού οσμωτικού shock, επώασης με EDTA και λυσοζύμη και θραύσης με υπέρηχους (βλ. 2.8), γίνεται προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA (βλ. 2.9.1) ώστε σε κάθε δείγμα 100 μg πρωτεΐνης να περιέχονται σε υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 88% (Tao *et al.*, 2009). Στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου κυανίου (CNBr διαλυμένο σε ακετονιτρίλιο-ACN) τελικής συγκέντρωσης 100 mg/mL και τα δείγματα επωάζονται σε συνθήκες έλλειψης φωτός για τέσσερις ώρες στους 25 $^{\circ}\text{C}$. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500 μL βενζολίου και ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (speedVac). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά και τελικά τα δείγματα επαναδιαλύονται σε νερό όγκου 50 μL . Ακολουθεί η ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blotting) όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.10.2 και 2.10.3.

2.12 Δοκιμασία προσβασιμότητας κυστεϊνών *in vivo*

Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιείται έλεγχος προσβασιμότητας των κυστεϊνών από ειδικά αντιδραστήρια προσβολής σουλφυδρυλομάδων σε ακέραια κύτταρα (*in vivo* Cys-labeling assay). Η μέθοδος αποτελεί προσαρμογή άλλων πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούν φθορίζοντα SH-αντιδραστήρια (Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005, Nie *et al.*, 2007) και έχει ήδη εφαρμοσθεί με επιτυχία σε προηγούμενες αναλύσεις κυστεϊνικής στόχευσης του XanQ (Karatzas *et al.*, 2006).

Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος (ανάλυση προσβασιμότητας της περιελάσης H31C, βλ. 3.1.1.5) χρησιμοποιούνται κύτταρα *E. coli* του στελέχους T184, τα οποία αναπτύσσονται όπως και προηγουμένως (βλ. παρ. 2.8). Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων από 10 mL καλλιέργειας (βλ. 2.6), τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-NaCl (βλ. 2.3) και η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων εξισορροπείται σε $OD_{420nm} = 10$ (βλ. 2.7). Δείγματα (1 mL) μεταφέρονται σε μικροσωληνάκια τύπου erpendorf, φυγοκεντρώνονται (13000 rpm, 1 min) και το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα Tris-NaCl (1 mL). Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και επαναιώρησης επαναλαμβάνεται 1 φορά, με αναδιάλυση των κυττάρων σε 0.2 mL διαλύματος Tris-NaCl.

Ακολουθεί επώαση του κυτταρικού δείγματος (0.2 mL) παρουσία ή απουσία 1 mM NEM ή MTSES (εικόνα 2.2), για 10 min, στους 25 °C. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται (13000 rpm, 1 min) και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος Tris-NaCl. Η ίδια διαδικασία φυγοκέντρωσης – επαναιώρησης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, έπειτα τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 µL διαλύματος σακχαρόζης (βλ. 2.3), που περιέχει λυσοζύμη (50 µg/mL) και τελικά επωάζονται για 30 λεπτά στους 37 °C. Μετά τα πρώτα 15 λεπτά της επώασης, προστίθενται στο εναίωρημα και 0.6 mL διαλύματος MgSO₄ 15 mM.

Μετά τις επωάσεις, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο (14000 rpm, 5 min, 4 °C), αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 µL διαλύματος Tris-NaCl που περιέχει 0.8% (w/v) n-δωδεκυλο-β-D-μαλτοπυρανοσιδίου (DDM) και επωάζεται υπό ελαφρά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, για τη λύση των μεμβρανών και εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Wu *et al.*, 1994, Wu and Kaback, 1994). Σε κάθε δείγμα μεμβρανικού εκχυλίσματος προστίθενται 300 µL διαλύματος Tris-NaCl, το οποίο περιέχει 30 mM ιμιδαζολίου και 0.08% (w/v) DDM, καθώς και 50 µL προ-εξισορροπημένων σφαιριδίων Ni-IDA (Probond) και το μίγμα εκχυλίσματος-σφαιριδίων αναδεύεται επί 1 ώρα σε θερμοκρασία

δωματίου. Μετά την πρόσδεση των πρωτεϊνών XanQ-His₁₀, τα σφαιρίδια Ni-IDA πλένονται με 1 mL διαλύματος αποδιάταξης (denaturation buffer, βλ. 2.3), επαναιωρούνται σε 0.1 mL του ίδιου διαλύματος που περιέχει 200 μM πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide, Εικόνα 2.2) και αναδεύονται για άλλα 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον τερματισμό της αντίδρασης OGM και την έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, τα σφαιρίδια Ni-IDA επωάζονται με προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης (300 μL) που περιέχει 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη (3 min) και, στη συνέχεια, με 28 μL διαλύματος φόρτωσης (1x loading buffer) που περιέχει 0.07 M Na₂EDTA, pH 8, για 10 λεπτά, στους 30 °C. Ακολουθεί ένα μικρό *spin* και συλλέγονται προσεκτικά τα υπερκείμενα τα οποία αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (κεφάλαιο 2.10).

Σημείωση: Η προ-εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni-IDA γίνεται με δύο διαδοχικές πλύσεις σε δις απεσταγμένο νερό, τέσσερις πλύσεις με διάλυμα Tris-NaCl (βλ. 2.3) και, τέλος, μία πλύση σε διάλυμα Tris-NaCl που περιέχει 0.08% DDM και 30 mM ιμιδαζολίου (διάλυμα εξισορρόπησης).

2.13 Δοκιμασία σταυρωτής αλληλοσύνδεσης κυστεϊνών (cross linking assay)

2.13.1 Σταυρωτή αλληλοσύνδεση με διλειτουργικά αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού σε μεμβρανικά κυστίδια

Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού RSO (βλ. 2.8) διαλύονται σε κατάλληλο όγκο KPi (0.1 M) pH 7.5 με MgSO₄ (10 mM) (βλ. 2.3) ώστε η τελική συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης να είναι 2 mg/mL (μέθοδος BCA, βλ. 2.9.1). Στην συνέχεια στα δείγματα προσίθενται, παρουσία υποστρώματος ξανθίνης τελικής συγκέντρωσης 1 mM, διλειτουργικά αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS, MTS-MTS cross linking reagents, Εικόνες 2.1, 2.8) διαλυμένα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM και επωάζονται για δέκα λεπτά στους 25 °C (Zhou *et al.*, 2008). Ακολουθούν τρεις πλύσεις και συλλογή των κυστιδίων με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 3 min) με διάλυμα KPi (0.1 M) pH 7.5 (βλ. 2.3) δεκαπλάσιου σε σχέση με το δείγμα όγκου. Τελικά τα δείγματα επαναιωρούνται σε 50 µL διαλύματος KPi (0.1 M) pH 7.5. Στην συνέχεια στα δείγματα που εξετάζεται πως επηρεάζει η παρουσία αναγωγικού παράγοντα προστίθεται διθειοθρεϊτόλη (DTT) σε μοριακή περίσσεια 10x για 30 λεπτά, στους 25 °C. Τα συνολικά δείγματα μεταφέρονται σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi (0.1M) pH 7.5 (βλ. 2.3), και συλλέγονται με φυγοκέντρηση. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 1mL KPi (0.1M) pH 7.5 (βλ. 2.3) και φυγοκεντρούνται εκ νέου. Η διαδικασία της επαναιώρησης σε KPi και της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 50 µL KPi (0.1M) pH 7.5. Τελικά γίνεται ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blotting) όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.10.2 και 2.10.3.

2.13.2 Σταυρωτή αλληλοσύνδεση με διλειτουργικά αντιδραστήρια μεθανοθειοσουλφονικού σε συνδυασμό με επίδραση θρυψίνης σε μεμβρανικά κυστίδια

Μεμβρανικά κυστίδια RSO (βλ. 2.8) σε τελική συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης 2 mg/mL (μέθοδος BCA, βλ. 2.9.1) επωάζονται παρουσία διλειτουργικών αντιδραστηρίων μεθανοθειοσουλφονικού σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS, MTS-MTS cross linking reagents, Εικόνες 2.1, 2.8) διαλυμένα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM για δέκα λεπτά στους 25 °C (Zhou *et al.*, 2008). Στην συνέχεια προστίθεται στα δείγματα υδατικό διάλυμα θρυψίνης τελικής συγκέντρωσης 0.2 mg/mL (~6 units/µg) και γίνεται επώαση των δειγμάτων για τέσσερις ώρες

στους 25 °C (Goldkorn *et al.*, 1983). Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη υδατικού διαλύματος refabloc (4- 2-αμινοαιθυλο βενζολ-σουλφονικό φθόριο υδροχλωρίου) τελικής συγκέντρωσης 1 mM και ακολουθούν δύο πλύσεις και συλλογή των κυστιδίων με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 3 min) με διάλυμα KPi pH 7.5 50 mM που περιέχει refabloc 0.2 mM (βλ. 2.3). Τελικά τα δείγματα επαναιωρούνται σε 50 µL διαλύματος KPi 50 mM pH 7.5 χωρίς refabloc και ακολουθεί η ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blotting) όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.10.2 και 2.10.3.

2.14 *In silico* ανάλυση

Η αλληλουχία DNA του XanQ, των άλλων ομολόγων μεταφορέων καθώς και οι αντίστοιχες αλληλουχίες αμινοξέων (Karatzá and Frillingos, 2005) εξήχθησαν από βάσεις δεδομένων που καταγράφουν την πλήρη αλληλουχία γονιδιώματος της *E.coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997) με τις πιο πρόσφατες ενημερώσεις (The EcoGene database of *E. coli* sequence and function, www.ecogene.org).

Η ανάλυση των γονιδιωμάτων για την ύπαρξη ομολόγων που ανήκουν στην οικογένεια 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>).

Η ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών των ομολόγων μεταφορέων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

Η προσέγγιση του τοπολογικού μοντέλου της πρωτεΐνης (βλ. Παράρτημα 2) έγινε με έξι διαφορετικές βάσεις δεδομένων που στηρίζονται σε διαφορετικούς προγνωστικούς αλγορίθμους. Οι βάσεις δεδομένων καθώς και η ηλεκτρονική διεύθυνση των ιστοσελίδων στις οποίες είναι διαθέσιμες έχουν ως εξής:

TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>) Center for Biological Sequence Analysis Technical University of Denmark

HMM-TM (<http://biophysics.biol.uoa.gr>) Χαμόδρακας Σ.Ι., Βάγγος Π.Γ., Λιακόπουλος Θ.Δ Τομέας Βιολογίας κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 15701 Αθήνα

SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui_frameO.html) Mitaku Group Department of Applied Physics Nagoya University

TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) TMpred - Prediction of Transmembrane Regions and Orientation ch. EMBnet.org

DAS (<http://sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>) M. Cserzo, E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson: Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method

PRED-CLASS (<http://02.biol.uoa.gr/PRED-CLASS>) Pasquier, C., Promponas, V. and Hamodrakas, S.J. Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων των γονιδίων NCS2 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **MEGA 6-Beta2** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net>).

Η εξαγωγή των μοτίβων αλληλουχίας (βλ. Ενότητα 3.1.3) βασίστηκε στο πρόγραμμα MEME, ExPasy Bioinformatics Resource Portal (SWISSPROT, <http://www.expasy.org>).

Δομική μοντελοποίηση της περμεάσης XanQ έγινε με το πρόγραμμα SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) και απεικόνιση και επεξεργασία του μοντέλου με το πρόγραμμα PyMOL (The **PyMOL** Molecular Graphics System, v1.5.0.4 Schrodinger, LLC).

Οι σταθερές V_{max} και K_m των πειραμάτων κινητικής ανάλυσης εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα **Prism 5** (<http://www.graphpad.com>).

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των περμεασών στη μεμβράνη από τις ηλεκτροφορητικές εικόνες western έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα **Quantity One** version 4.6.6 (www.bio-rad.com/softwaredownloads).

Ο αλγόριθμος πρόβλεψης χημικά ευνοϊκών θέσεων πέψης από την θρυψίνη (Fannes *et al.*, 2013) δίνεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα **CP-DT** (Cleavage Prediction with Decision Trees, <http://dtai.cs.kuleuven.be/trypsin>).

Η στατιστική ανάλυση πειραματικών δεδομένων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα **IBM SPSS Statistics 20** (<http://www.ibm.com/software/analytics/spss>).

Η πλειοψηφία των αναφορών των δημοσιεύσεων όπως καταγράφονται στην ενότητα της βιβλιογραφίας είναι από την βάση δεδομένων Pubmed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων (γραφικές παραστάσεις διασποράς, ραβδογράμματα, εικόνες ανοσοαποτύπωσης) καθώς και τα κείμενα της εργασίας υλοποιήθηκαν με την βοήθεια των υπολογιστικών προγραμμάτων Microsoft Office 2003 ή 2010 σε περιβάλλον Windows XP ή Vista Professional αντίστοιχα.

3. Αποτελέσματα

3.1 Κατάλοιπα αμινοξέων της περμεάσης XanQ με κομβικό ρόλο σε διαμεμβρανικές α -έλικες

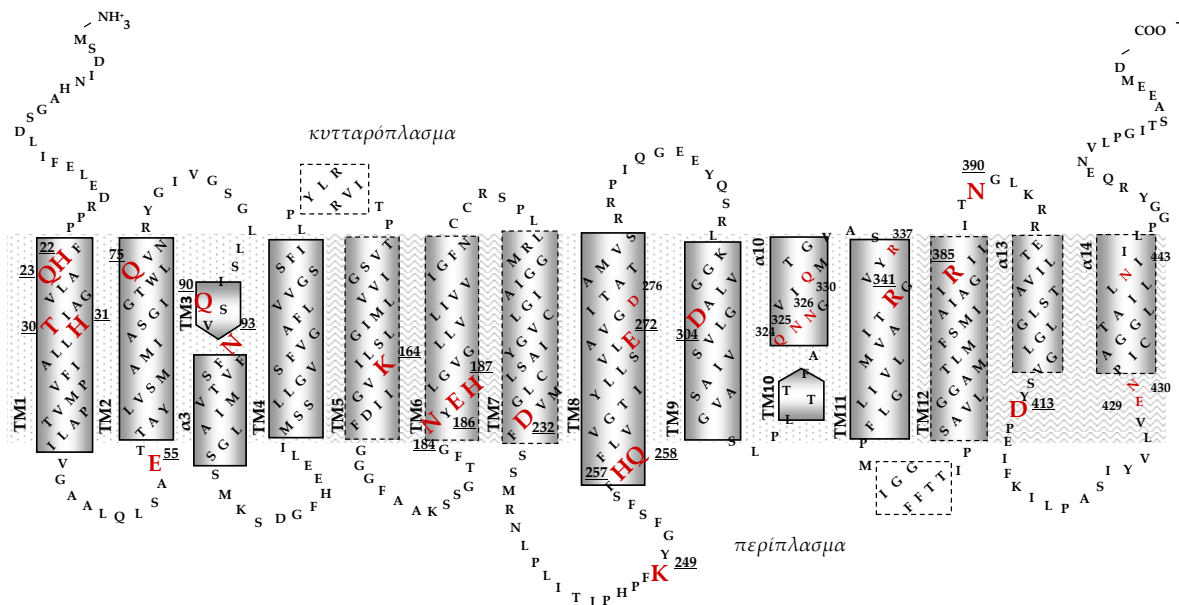
3.1.1 Χαρτογράφηση και ανάλυση μεταλλαξιγένεσης των ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα

Με την έναρξη της παρούσας εργασίας (Μάιος 2009) απουσίαζαν από την διεθνή βιβλιογραφία τρισδιάστατες δομές υψηλής ευκρίνειας δομικών ομολόγων της οικογένειας NCS2. Για τον λόγο αυτό σημαντικός για την ανάλυση της μεμβρανικής πρωτεΐνης XanQ ήταν αρχικά ο προσδιορισμός ενός κατά το δυνατόν ακριβέστερου τοπολογικού μοντέλου που να περιγράφει τον αριθμό των διαμεμβρανικών τμημάτων (TM) και τα όρια της πρωτεΐνης σε σχέση με την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα. Ξεκινώντας από ένα τέτοιο μοντέλο της περμεάσης XanQ, που σχεδιάστηκε συνδυάζοντας (α) θεωρητικές τοπολογικές προβλέψεις και (β) πειραματικές παρατηρήσεις (βλ. Παράρτημα 2), εξετάστηκε καταρχήν η λειτουργική σημασία των ισχυρά πολικών καταλοίπων (Gln, Asn), δηλαδή αμινοξέων με καρβονυλικές ομάδες στις πλευρικές τους αλυσίδες και συνεπώς με δυνατότητα δημιουργίας δύο δεσμών υδρογόνου (Baldwin, 1993), και δυνητικά ιοντιζόμενων (Asp, Glu, His, Lys, Arg) καταλοίπων που προβλέπονταν ότι ανήκουν σε διαμεμβρανικά τμήματα. Τέτοια κατάλοιπα με πολικές και/ή ιοντιζόμενες ομάδες τοποθετημένα μέσα στο έντονα υδρόφοβο περιβάλλον ενός διαμεμβρανικού τμήματος αναμένεται να είναι στραμμένα σε υδρόφιλα τμήματα της πρωτεΐνης ή/και να ανήκουν στο προσβάσιμο από το εξωτερικό περιβάλλον κέντρο δέσμευσης του μεταφορέα, διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο στην δέσμευση του υποστρώματος και γενικά στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς (βλ. Εισαγωγή, 1.4).

Ο συνδυασμός *in silico* ανάλυσης (βλ. Παράρτημα 2.1α) και προηγούμενων πειραματικών αποτελεσμάτων του εργαστηρίου μας (βλ. Π2.1β) συνέκλινε την συγκεκριμένη χρονική στιγμή στην αποδοχή ενός μοντέλου, που προέβλεπε δώδεκα (12) διαμεμβρανικά τμήματα, μία ευρεία κυτταροπλασματική περιοχή μεταξύ TM8 και TM9 και το C-τελικό άκρο του μεταφορέα με διευθέτηση προς το κυτταρόπλασμα (Εικόνα Π2.4). Τα κοινά διαμεμβρανικά κατάλοιπα των μοντέλων, που έδιναν οι επικρατέστεροι αλγόριθμοι πρόβλεψης (βλ. Π2.2γ), ήταν His-31, Glu-55, Gln-90, Asn-93, Lys-164, His-187, Asp-232, His-257, Gln-258, Glu-272, Asp-304, Arg-341, Arg-385, Glu-429, Asn-430 και Asn-443. Επεκτείνοντας ανάλογα και τα πιθανά όρια των διαμεμβρανικών τμημάτων και συμπεριλαμβάνοντας την πιθανότητα παρουσίας μιας αμφιπαθούς περιοχής α -έλικας μεταξύ TM8 και TM9 με κατάλοιπα υψηλής συντήρησης (Karatzas *et al.*, 2006), εξετάστηκαν και οι θέσεις

His-22, Gln-23, Asn-184, Glu-186, Lys-249, Asp-276, Gln-324, Asn-325, Asn-326, Gln-330, Arg-337, Asn-390 και Asp-413 ως πιθανές θέσεις σημαντικών για την λειτουργία καταλοίπων. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, από τα παραπάνω αναφερόμενα, έγινε συστηματική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης των είκοσι ενός (21) καταλοίπων, όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο (Karena and Frillingos, 2009), συμπεριλαμβανομένης της θέσης Thr-30, η οποία συντηρείται ως Gln στα υπόλοιπα μέλη του κλάδου COG2233 της οικογένειας NCS2 (μεταφορείς 2-οξυ πουρινών, βλ. 1.2), και εξαιρουμένων των θέσεων καταλοίπων Asp-276, Gln-324, Asn-325, Asn-326, Gln-330, Arg-337, Glu-429, Asn-430 και Asn-443 τα οποία είχαν ήδη χαρακτηριστεί ή/και βρισκόνταν υπό μελέτη στο εργαστήριό μας την ίδια χρονική περίοδο (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Mermelekas *et al.*, 2010).

Η πρόσφατη δημοσίευση της πρώτης κρυσταλλικής δομής ενός δομικά ομόλογου μεταφορέα της οικογένειας NCS2 (της περιμεάσης ουρακίλης UraA, Lu *et al.*, 2011) υποδεικνύει ένα τροποποιημένο μοντέλο τοπολογικής οργάνωσης για τους μεταφορείς NCS2 (βλ. 1.2.2.3). Η τοπολογική οργάνωση του μεταφορέα XapQ που μπορεί να προβλεφθεί σύμφωνα με αυτό το νεότερο μοντέλο δεν αναιρεί την τοποθέτηση στο εσωτερικό διαμεμβρανικών τμημάτων των καταλοίπων του μεταφορέα που είχαν ήδη επιλεγεί ως στόχοι μεταλλαξιγένεσης και είχαν εν τω μεταξύ μελετηθεί πειραματικά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, με τέσσερις μόνο εξαιρέσεις αμινοξέων που προβλέπεται τελικά ότι βρίσκονται σε υδρόφιλες συνδετικές περιοχές του μορίου και όχι σε διαμεμβρανικά τμήματα (Glu-55, Lys-249, Asn-390, Asp-413). Ακολουθώντας το νέο αυτό μοντέλο των δεκατεσσάρων (14) διαμεμβρανικών τμημάτων η μελέτη των πολικών (Gln, Asn) και δυνητικά ιοντιζόμενων (Asp, Glu, His, Lys, Arg) καταλοίπων συμπληρώθηκε με τον χαρακτηρισμό και της θέσης Gln-75, με στόχο τον σχεδιασμό ενός αρχικού μοντέλου διευθέτησης των α -ελίκων στον χώρο (Εικόνα 3.1.1).



Εικόνα 3.1.1: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το μοντέλο στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011), σε *in silico* τοπολογικές προβλέψεις για την XanQ (βλ. Π2.1α) και σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου (βλ. Π2.1β). Τα τμήματα α-έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περίγραμμα αυτά που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου») και της β-πτυχωτής επιφάνειας με πεντάγωνα σχήματα σε μορφή βέλους. Σε μεγέθυνση με κόκκινο χρώμα γραμματοσειράς και υπογραμμισμένη αρίθμηση τονίζονται τα πολικά και δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, ενώ με μικρότερου μεγέθους κόκκινα αριθμημένα γράμματα σημειώνονται οι θέσεις πολικών/ιοντιζόμενων καταλοίπων που είχαν ήδη μελετηθεί στο εργαστήριο.

3.1.1.1 Εξελικτική συντήρηση των ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα του XanQ

Βάσει των ανωτέρω, εντοπίστηκαν συνολικά τριάντα ένα (31) ισχυρά πολικά ή δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα του XanQ που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα (σε περιοχές α – ελίκων, β-πτυχωτών φύλλων ή περιοχές ελεύθερης διαμόρφωσης). Αυτά είναι τα: His-22, Gln-23, Thr-30, His-31 (TM1), Glu-55, Gln-75 (TM2), Gln-90 (TM3), Asn-93 (α3), Lys-164 (TM5), Asn-184, Glu-186, His-187 (TM6), Asp-232 (TM7), Lys-249, His-257, Gln-258, Glu-272, Asp-276 (TM8), Asp-304 (TM9), Gln-324, Asn-325, Asn-326, Gln-330 (α10), Arg-337, Arg-341 (TM11), Arg-385, Asn-390 (TM12), Asp-413 (α13), Glu-429, Asn-430, Asn-443 (α14).

	TM1				TM2			$\alpha 3$		TM5			TM6																							
	22	23	28	30	31	33	55	69	75	90	93	94	158	159	164	184	186	187																		
XanQ	P	F	H	Q	A	L	V	G	A	I	T	H	L	L	A	E	...	G	L	Q	I	Q	S	V	N	F	S	I	G	...	K	N	Y	E	H	
XanP	P	L	P	Q	T	L	F	A	A	C	Q	H	L	L	A	Q	...	G	...	I	Q	I	Q	G	T	S	F	N	I	G	...	Q	A	P	K	N
PbuX	G	-	-	K	T	L	S	L	G	I	Q	H	V	L	V	E	...	G	...	L	Q	V	L	G	C	T	F	T	I	G	...	P	D	L	S	N
PucK	N	A	L	Q	L	M	M	L	G	L	Q	H	M	L	A	G	...	G	...	L	Q	V	L	G	C	T	F	T	I	G	...	P	S	L	D	N
PucJ	F	-	-	K	V	F	T	L	S	L	Q	H	V	L	T	E	...	G	...	L	Q	M	L	G	S	S	F	V	I	G	...	P	S	L	E	N
UacT	S	P	G	K	L	I	I	L	G	L	Q	H	V	L	K	E	...	G	...	L	Q	I	M	S	V	T	F	A	I	G	...	Q	N	P	V	Y
SmLL8	P	I	G	R	L	A	T	L	G	I	Q	H	V	L	P	E	...	G	...	L	Q	M	M	G	V	T	F	A	I	G	...	R	E	P	G	H
SmLL9	G	I	G	A	N	L	A	Y	G	L	Q	H	V	L	S	G	...	G	...	I	Q	V	Q	G	V	S	F	S	I	G	...	P	S	P	A	N
AcS4X6	G	I	S	K	S	F	A	Y	G	L	Q	H	V	L	S	A	...	G	...	I	Q	V	Q	G	V	S	F	A	I	G	...	P	S	V	E	N
AfUapA	P	V	L	L	A	F	I	L	G	L	Q	H	A	L	D	A	...	G	...	V	Q	V	V	G	T	S	F	S	I	G	...	E	S	A	E	F
UapA	P	V	L	L	A	F	I	L	G	L	Q	H	A	L	S	D	...	G	...	V	Q	V	M	G	V	S	F	S	I	G	...	G	S	P	E	F
UapC	P	V	L	L	A	L	L	G	L	Q	H	A	L	S	A	D	...	G	...	V	Q	V	V	G	T	S	F	A	I	G	...	G	S	A	E	F
Xut1	P	I	L	L	A	F	I	L	G	L	Q	H	A	L	V	E	...	G	...	I	Q	V	V	G	T	S	F	A	I	G	...	E	D	A	K	F
UraA	P	L	L	Q	T	I	P	L	S	L	Q	H	L	F	-	-	...	G	...	L	Y	Y	L	G	S	S	F	A	I	G	...	G	D	S	K	T

	TM7		EL4		TM8			TM9			$\alpha 10$ - $\beta 10$																			
	221	232	249	257	258	272	276	279	304	322	324	325	326	327	330	332														
XanQ	G	...	D	K	...	F	H	Q	F	...	E	A	V	G	D	...	A	D	F	A	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	
XanP	G	...	P	Y	...	W	S	L	L	...	E	T	I	G	D	...	A	N	F	G	Q	N	N	G	V	I	Q	L	T	
PbuX	G	...	Q	F	...	A	A	P	I	...	E	S	T	G	V	...	A	E	F	S	Q	N	N	V	G	L	V	Q	L	T
PucK	G	...	D	F	...	L	P	A	V	...	E	S	T	G	V	...	A	E	F	S	Q	N	N	V	G	I	V	Q	L	T
PucJ	G	...	S	F	...	I	G	P	I	...	E	S	T	G	V	...	A	E	F	S	Q	N	N	A	G	L	L	Q	L	T
UacT	G	...	N	F	...	P	V	S	I	...	E	S	M	G	M	...	A	D	F	S	Q	N	V	G	L	V	S	V	T	
SmLL8	G	...	H	F	...	P	V	L	I	...	E	S	T	G	M	...	A	D	F	S	Q	N	V	G	L	V	G	V	T	
SmLL9	G	...	D	F	...	V	A	A	I	...	E	T	S	A	D	...	A	D	F	A	Q	N	N	V	G	L	V	A	V	T
AcS4X6	G	...	D	F	...	L	S	A	I	...	E	T	T	A	D	...	A	D	F	A	Q	N	N	V	G	L	V	A	I	T
AfUapA	G	...	D	T	...	A	P	L	I	...	E	S	I	G	D	...	A	N	F	A	Q	N	N	N	G	V	I	A	L	T
UapA	G	...	S	T	...	G	P	M	V	...	E	C	I	G	D	...	A	D	F	A	Q	N	N	N	G	V	I	A	L	T
UapC	G	...	D	T	...	A	P	L	I	...	E	S	I	G	D	...	A	N	F	A	Q	N	N	N	G	V	I	A	L	T
Xut1	G	...	S	T	...	G	P	V	V	...	E	C	I	G	D	...	A	D	F	A	Q	N	N	N	G	V	I	S	I	T
UraA	G	...	D	L	...	W	F	A	I	...	E	H	V	G	H	...	V	N	Y	G	E	N	I	G	V	M	A	I	T	

	TM11		TM12		IL6		$\alpha 13$ EL7			$\alpha 14$											
	337	341	351	383	385	390	407	413	429	430	442	443									
XanQ	R	Y	V	G	R	...	G	G	I	R	N	...	G	D	...	E	N	...	L	N	
XanP	R	Y	V	G	F	...	G	G	V	R	E	...	G	Q	...	S	S	...	L	N	
PbuX	N	A	V	I	V	...	G	G	I	K	I	...	G	V	...	T	N	...	L	N	
PucK	V	N	V	I	A	...	G	G	I	K	V	...	G	V	...	G	S	...	L	H	
PucJ	R	N	I	V	V	...	G	G	V	K	A	...	G	A	...	S	D	...	L	N	
UacT	R	W	V	C	I	...	G	G	I	R	C	...	G	S	...	H	S	...	L	N	
SmLL8	R	Y	V	C	V	...	G	G	V	R	V	...	G	A	...	E	S	...	L	N	
SmLL9	R	Y	V	V	A	...	G	G	I	R	V	...	G	S	...	H	S	...	L	N	
AcS4X6	R	F	V	V	A	...	G	G	I	R	I	...	G	N	...	H	S	...	L	N	
AfUapA	R	K	A	G	Y	...	G	G	I	R	I	...	G	V	...	E	N	...	L	N	
UapA	R	W	A	G	Y	...	G	G	Q	A	A	...	G	V	...	E	T	...	L	N	
UapC	R	K	A	G	Y	...	G	G	V	R	V	...	G	V	...	A	N	...	L	N	
Xut1	R	K	V	G	Y	...	G	G	I	K	T	...	G	L	...	E	S	...	L	N	
UraA	T	W	V	I	G	...	S	G	I	R	S	...	G	V	...	L	K	...	L	N	

E. coli

E. coli

B. subtilis

B. subtilis

B. subtilis

E. coli

S. meliloti

S. meliloti

A. calcoaceticus

A. fumigatus

A. nidulans

A. nidulans

C. albicans

E. coli

ξανθίνη

σουρικό οξύ

ξανθίνη/
σουρικό οξύ

σουρακίλη

COG2233

Εικόνα 3.1.2 : Στοιχίση αλληλουχιών των χαρακτηρισμένων μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού που είναι μέλη της NCS2 (κλάδος COG2233).

Η στοιχίση αφορά τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς 2-οξυ πουρινών (ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος) της οικογένειας NCS2 (τμήμα κλάδου COG2233) με εξαίρεση τον μεταφορέα ουρακίλης UraA (*E.coli*, γνωστή κρυσταλλική δομή, κλάδος COG2233), που διαχωρίζεται με γκρι γραμμή. Παρουσιάζονται τμήματα όλων των διαμεμβρανικών ελίκων. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalW. Στο σχήμα τονίζονται με κόκκινο φόντο οι απόλυτα συντηρημένες θέσεις όπου συντηρείται κάποιο ιοντιζόμενο ή ισχυρά πολικό κατάλοιπο, με πορτοκαλί άλλες απόλυτα συντηρημένες θέσεις που δεν ανήκουν στην ομάδα των πολικών ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων και με γαλάζιο οι θέσεις που συντηρούν τον χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας χωρίς να εμφανίζουν απόλυτη συντήρηση. Σημειώνονται τα ονόματα των TM και τονίζονται τα κατάλοιπα που μελετήθηκαν στην παρούσα παράγραφο καθώς και ο οργανισμός όπου ανήκει ο κάθε μεταφορέας μαζί με το κύριο υπόστρωμα που μεταφέρει. Μεταφορείς είναι: **XanQ**, **XanP** και **UacT** της *Escherichia coli*, **PbuX**, **PucK** και **PucJ** του *Bacillus subtilis*, **SmLL8** και **SmLL9** του *Sinorhizobium meliloti*, **AsC4x6** του *Acinetobacter calcoaceticus*, **Xut1** της *Candida albicans*, **UapA** και **UapC** του *Aspergillus nidulans*, **AfUapA** του *Aspergillus fumigatus*.

Ανάλυση στοιχίσης (*alignment*) των αλληλουχιών δεκατριών (13) χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NCS2 που αντιστοιχούν σε μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού του κλάδου COG2233 κατέδειξε ότι (Εικόνα 3.1.2): **(I)** τα κατάλοιπα His-31, Gln-75, Glu-272, Asn-443 και τα Gln-324, Asn-325 (κατάλοιπα μοτίβου «υπογραφή», βλ. 1.3) εντοπίζονται σε θέσεις απόλυτα συντηρημένες, ενώ η Thr-30 εμφανίζεται αποκλειστικά στην περμεάση XanQ σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη για τα οποία στην θέση αυτή υπάρχει Gln, **(II)** στις θέσεις Asn-93 ($\alpha 3$) και Asp-304 (TM9) συντηρούνται στα μέλη της οικογένειας ο πολικός και/ή όξινος χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος αφού στις αντίστοιχες θέσεις σε άλλους ομόλογους μεταφορείς υπάρχει Asn, Ser ή Thr (θέση 93) και Asp, Glu ή Asn (θέση 304), **(III)** τα κατάλοιπα His-22, Gln-23, Gln-90, Lys-164, Asp-232, His-257, Gln-258, Asp-276, Asn-326, Gln-330, Arg-337, Arg-341 και Arg-385 απαντώνται στο ίδιο TM ή σε απόσταση μικρότερη των δέκα καταλοίπων αμινοξέων από θέσεις που εμφανίζουν απόλυτη ή σχεδόν απόλυτη συντήρηση πλευρικής ομάδας, και **(IV)** τα υπόλοιπα κατάλοιπα (Glu-55, Asn-184, Glu-186, His-187, Lys-249, Asn-390, Asp-413, Glu-429, Asn-430) δεν εμφανίζονται σε περιοχές υψηλής συντήρησης.

Τα είκοσι δύο (22) κατάλοιπα ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων πλευρικών ομάδων που δεν είχαν ήδη μελετηθεί από την ερευνητική μας ομάδα σε προηγούμενες μελέτες αναλύθηκαν λειτουργικά με μεταλλαξιγένεση και πειραματική μελέτη των μεταλλαγμάτων ως προς την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, την εξειδίκευση αναγνώρισης πιθανών συγγενικών υποστρωμάτων (ουρικό, ουρακίλη, και συνθετικά ανάλογα πουρινών) και την προσβασιμότητα από το υδρόφιλο ή υδρόφοβο περιβάλλον

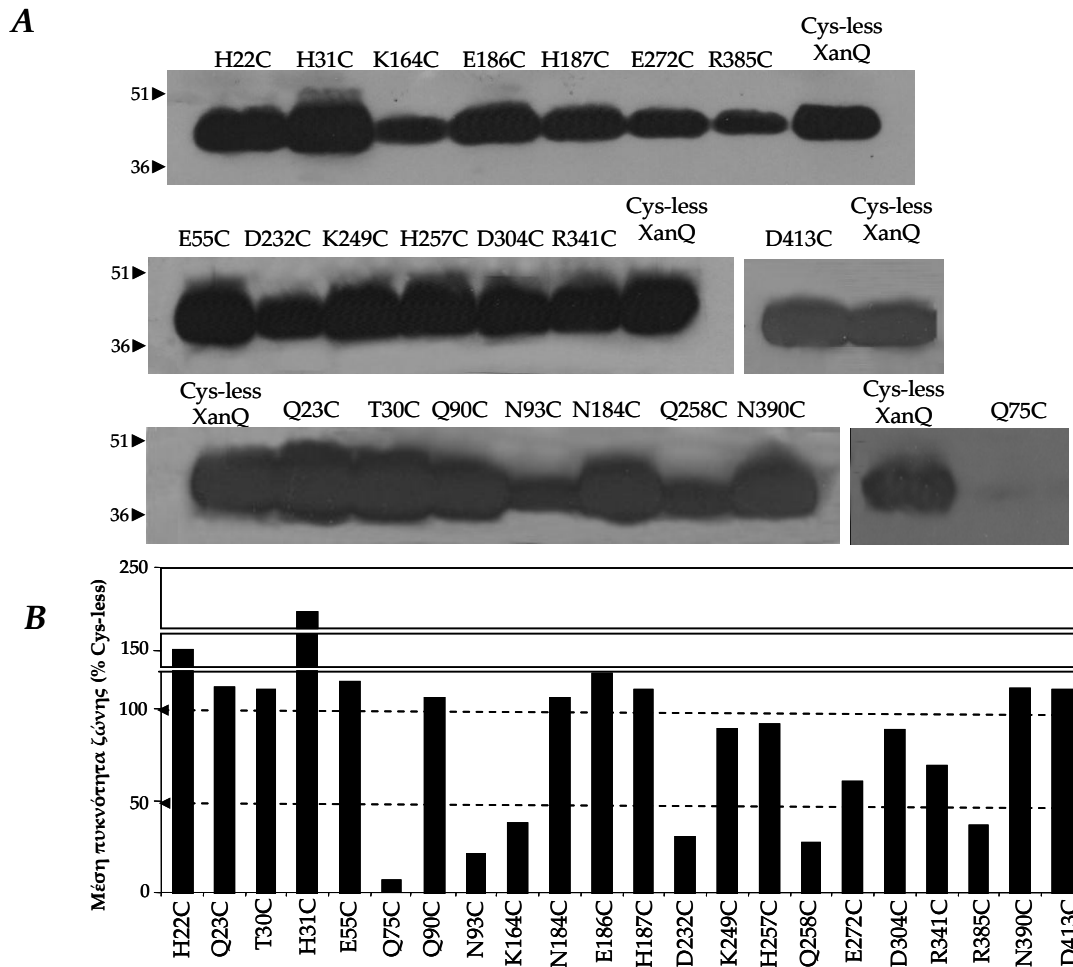
με ανάλυση αλκυλίωσης από ειδικά SH-αντιδραστήρια, παρουσία ή απουσία υποστρώματος. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών μας οδήγησαν τελικά στην χαρτογράφηση σημαντικών καταλοίπων και σημαντικών δυνητικών θέσεων αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του μορίου.

3.1.1.2 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης των ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι εντοπίζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα του XanQ

Χρησιμοποιώντας ως μοριακό υπόβαθρο μία περμεάση χωρίς εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών (*Cys-less XanQ*) (Karatza *et al.*, 2006), κατασκευάστηκαν είκοσι δύο (22) μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (*single-Cys mutants*): H22C, Q23C, T30C, H31C, E55C, Q75C, Q90C, N93C, K164C, N184C, E186C, H187C, D232C, K249C, H257C, Q258C, E272C, D304C, R341C, R385C, N390C, D413C (βλ. 2.5). Στις κατασκευές αυτές προστέθηκαν κατάλληλα σήματα C-τελικών αλληλουχιών, δηλ. το C-τελικό 12πεπτίδιο της LacY (*LacY-epitope*) και μία περιοχή δέσμησης βιοτίνης από την αποκαρβοξυλάση οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (biotin-acceptor domain, BAD) (Karatza & Frillingos, 2005). Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας τους (*MWG-Biotech, dsDNA sequencing*), τα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (*single-Cys*) εκφράστηκαν μέσω IPTG-επαγόμενων, πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* [K-12] (T184) και ελέγχθηκαν αρχικά τα επίπεδα έκφρασης και η ενεργότητα των μεταλλαγμένων μεταφορέων.

Τα επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη

Ανάλυση και ποσοτικοποίηση της ανοσοαποτύπωσης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεϊνης με βάση την αλληλεπίδραση της HRP-αβιδίνης με την C-τελική περιοχή δέσμησης βιοτίνης (*biotin-acceptor domain, BAD*) αποκάλυψε ότι δεκαπέντε (15) από τις είκοσι δύο (22) περμεάσες, οι H22C, Q23C, T30C, H31C, E55C, Q90C, N184C, E186C, H187C, K249C, H257C, D304C, R341C, N390C, D413C, εκφράζονται στη μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της ελεύθερης κυστεϊνών (*Cys-less*) XanQ (Εικόνα 3.1.3). Από τις υπόλοιπες, η E272C εμφανίζει επίπεδα έκφρασης περί το 60% αυτών της *Cys-less*-XanQ, πέντε (5) περμεάσες, οι N93C, K164C, D232C, Q258C και R385C εμφανίζουν επίπεδα έκφρασης στο 22-45% της XanQ-*Cys-less* και, τέλος, η Q75C δεν εκφράζεται στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.3).



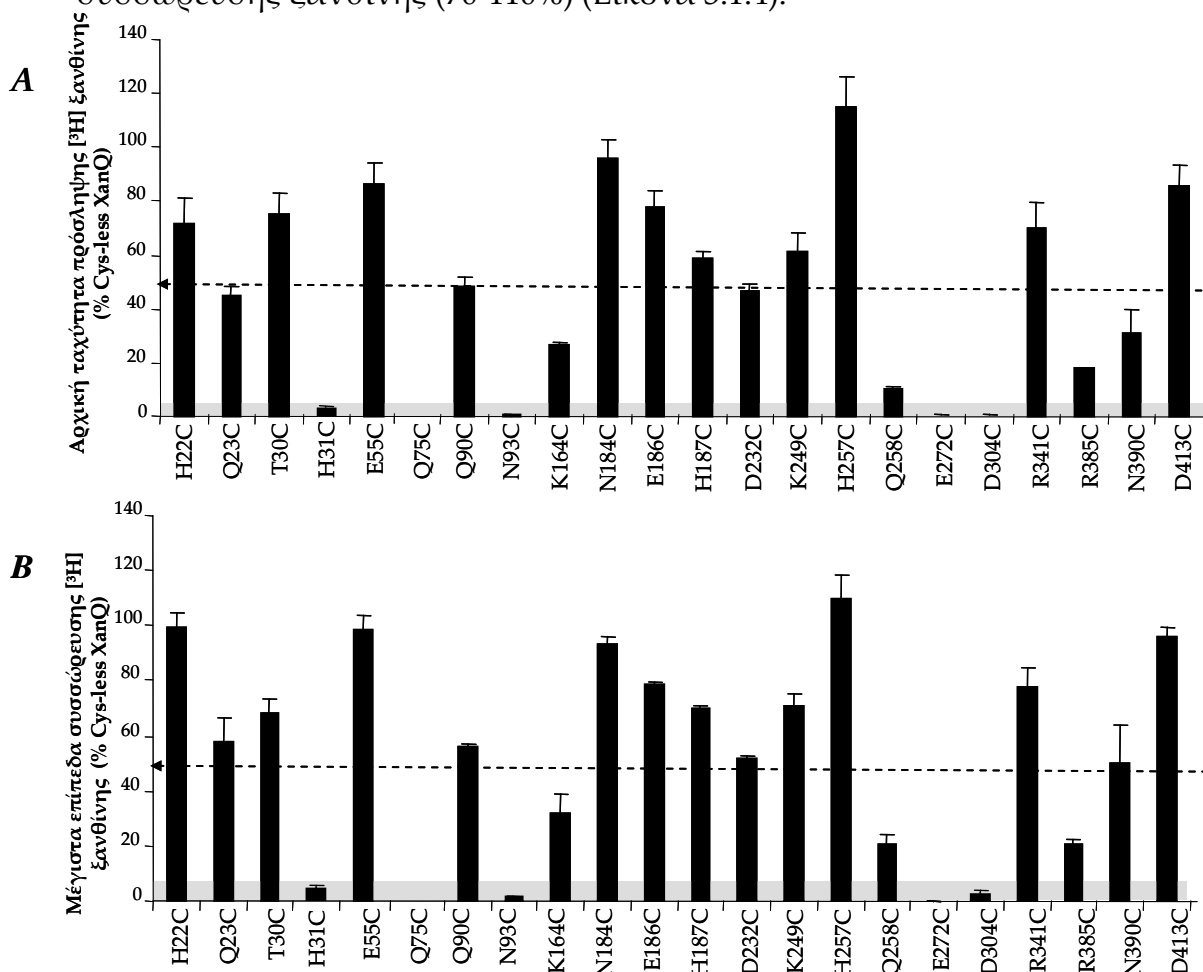
Εικόνα 3.1.3: Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε θέσεις ισχυρά πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων σε διαμεμβρανικές α-έλικες.

A. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και έγινε αποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως εκατοστιαίο ποσοστό της έκφρασης του XanQ Cys-less-BAD με το πρόγραμμα Quantity One (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης

Στη συνέχεια τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης μελετήθηκαν με δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς για να εξετασθεί η ικανότητά τους να μεταφέρουν [³H] ξανθίνη. Από την πειραματική διαδικασία βρέθηκε ότι δώδεκα (12) περμεάσες, οι H22C, Q23C, T30C, E55C, Q90C, N184C, E186C, H187C, K249C, H257C, R341C, και D413C, παρουσιάζουν πολύ υψηλές αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (45-110% αυτής της Cys-less) και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (70-110%) (Εικόνα 3.1.4).



Εικόνα 3.1.4: Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε θέσεις ισχυρά πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων σε διαμεμβρανικές α-έλικες.

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL), υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά επί των αντίστοιχων τιμών της ΧανQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Η τιμή του αρνητικού μάρτυρα αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. **A.** Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec) **B.** Τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min).

Από τις υπόλοιπες, η N390C παρουσιάζει αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης στο 31% της Cys-less XanQ και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης του υποστρώματος στο 50% της Cys-less XanQ, οι K164C, D232C, Q258C και R385C εμφανίζουν χαμηλή ενεργότητα (αρχικές ταχύτητες, 20-40%, μέγιστα επίπεδα, 20-50%), η H31C κυμαίνεται σε πολύ χαμηλές τιμές ($\leq 5\%$), ενώ οι Q75C, N93C, E272C και D304C έχουν τιμές αρχικής ταχύτητας σε αμελητέα (μηδενικά) επίπεδα (Εικόνα 3.1.4). Τα χαμηλά επίπεδα ενεργότητας των Q75C, N93C, K164C, D232C, Q258C και R385C σχετίζονται με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3.1.3) των μεταλλαγμάτων αυτών στην μεμβράνη. Αντίθετα, τα ανενεργά μεταλλάγματα H31C, E272C και D304C εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (Εικόνα 3.1.3).

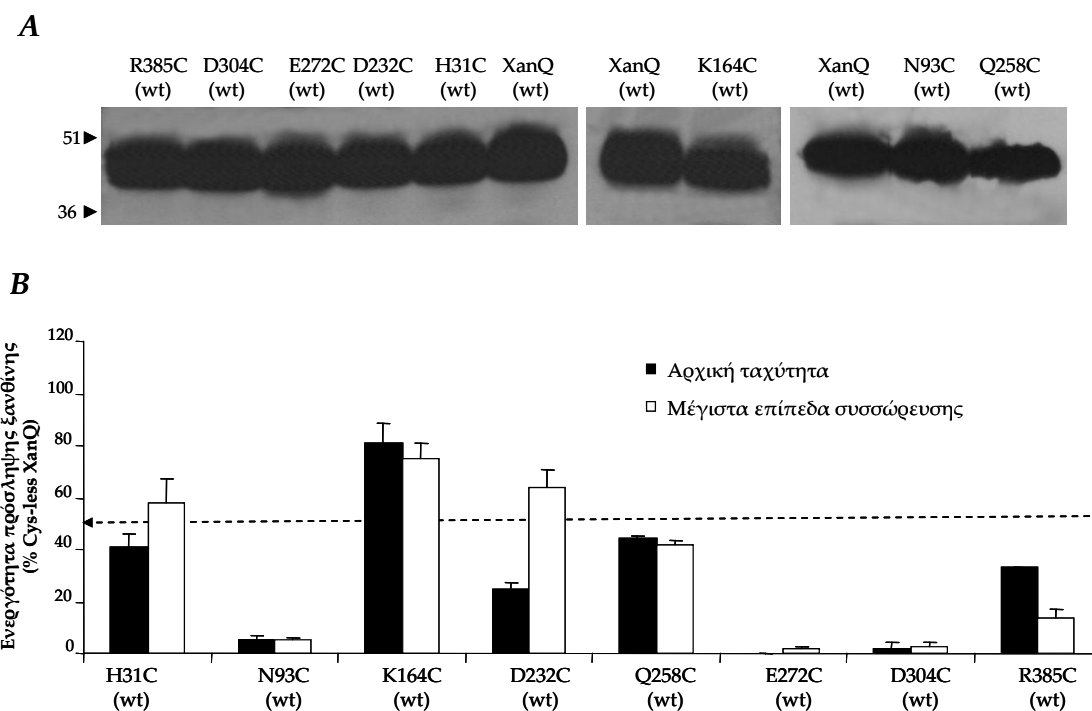
3.1.1.3 Μεταλλαξιγένεση επιλεγμένων ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων διαμεμβρανικών τμημάτων του XanQ στο μοριακό υπόβαθρο της XanQ φυσικού τύπου (wild type)

Συνοπτικά, ο λειτουργικός έλεγχος των είκοσι δύο (22) μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης έδειξε ότι τρία από αυτά, H31C, E272C, και D304C, εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη αλλά έχουν αμελητέα ενεργότητα, ενώ έξι (6) άλλα, Q75C, N93C, K164C, D232C, Q258C και R385C, εκφράζονται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα και έχουν αντίστοιχα πολύ χαμηλές τιμές ενεργότητας (Εικόνες 3.1.3 & 3.1.4). Για να εξετάσουμε κατά πόσον αυτά τα αποτελέσματα συνδέονται με την έλλειψη των πέντε (5) εγγενών κυστεϊνών από το μόριο του XanQ(Cys-less) που χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως υπόβαθρο, τα ανωτέρω μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης (εκτός του Q75C) μεταφέρθηκαν στο υπόβαθρο του μεταφορέα φυσικού τύπου, XanQ(wt)-BAD, ώστε να κατασκευασθούν τα μεταλλάγματα H31C(wt), N93C(wt), K164C(wt), D232C(wt), Q258C(wt), E272C(wt), D304C(wt), R385C(wt), και να ελεγχθούν ως προς τα επίπεδα στη μεμβράνη και την ενεργότητα μεταφοράς [^3H]ξανθίνης.

Τα επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη και η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης

Και τα οκτώ ανωτέρω μεταλλάγματα εκφράζονται στη μεμβράνη των *E.coli* T184 σε υψηλά επίπεδα, που είναι παρόμοια με αυτά της περμεάσης XanQ(wt) για τα H31C(wt), N93C(wt), D232C(wt), E272C(wt), D304C(wt), R385C(wt) και K164C(wt), και ελαφρώς μειωμένα για το Q258C(wt) (Εικόνα 3.1.5A). Το μετάλλαγμα K164C(wt) παρουσιάζει υψηλές τιμές ενεργότητας (80% σε σχέση με την φυσικού τύπου περμεάση) και τα H31C(wt), D232C(wt), Q258C(wt), και R385C(wt) εμφανίζουν σημαντική, αν και χαμηλή, ενεργότητα

μεταφοράς ξανθίνης (25-40% αρχική ταχύτητα, 30-50% μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης) σε σχέση με την φυσικού τύπου περιμεάση. Η ενεργότητα του N93C(wt) κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (<5% του XanQ(wt)), ενώ τα μεταλλάγματα E272C(wt) και D304C(wt) έχουν αμελητέα ενεργότητα (Εικόνα 3.1.5B).



Εικόνα 3.1.5: Έκφραση και ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε μοριακό υπόβαθρο φυσικού τύπου.

A. Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) κυττάρων *E. coli* T184 που φέρουν πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και γίνεται αποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

B. Τα ίδια μεταλλάγματα σε ακέραια κύτταρα *E. coli* T184 (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Με μαύρες στήλες οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec) και με άσπρες τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min) ως % ποσοστά των τιμών της XanQ (wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Η τιμή του αρνητικού μάρτυρα έχει αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

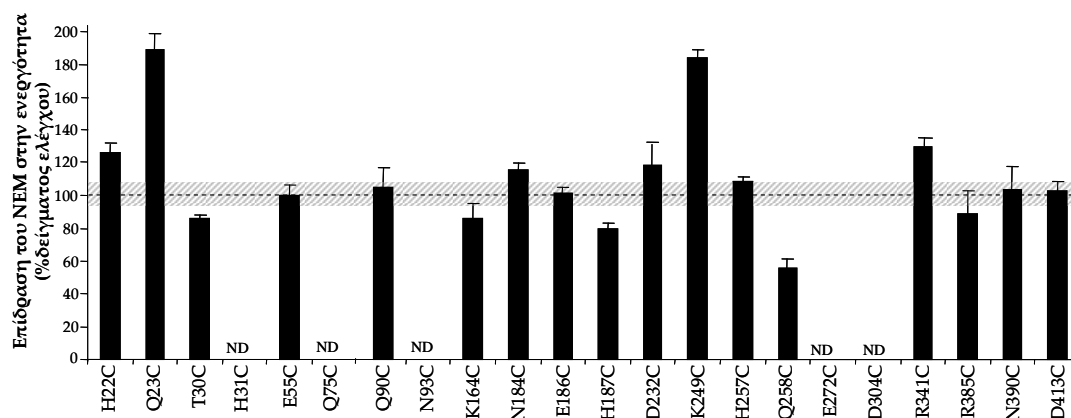
3.1.1.4 Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονών κυστεϊνών σε θέσεις ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα του XanQ

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την επίδραση ειδικών SH-αντιδραστηρίων [του σχετικά υδρόφοβου *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM), και δύο ισχυρά υδρόφιλων παραγώγων του μεθανο-θειο-σουλφονικού οξέος (MTS), δηλ. του αρνητικά φορτισμένου MTS-αιθυλοσουλφονικού (MTSES⁻), και του θετικά φορτισμένου MTS-αιθυλοαμμωνίου (MTSEA⁺)] επί της ενεργότητας των 16 μεταλλαγμάτων μονής κυστεϊνης (βλ. 2.9.4). Τα αλκυλιωτικά αυτά SH-αντιδραστήρια αντιδρούν επιλεκτικά ή ειδικά, υπό κατάλληλες συνθήκες, με τις σουλφυδρυλικές ομάδες των θειολών (Cys) της πρωτεΐνης και δίνουν σουλφίδια ως προϊόντα (Smyth, 1964; Akabas *et al*, 1992). Ως εκ τούτου, ανάλογα με την προσβασιμότητα της κάθε θέσης κυστεϊνικού καταλοίπου και με τις χημικές ιδιότητες του κάθε SH-αντιδραστηρίου (υδρόφοβο, υδρόφιλο, σταθερότητα και ταχύτητα αντίδρασης με την SH-ομάδα στο αντίστοιχο ρυθμιστικό περιβάλλον), τα αποτελέσματα μπορούν να δώσουν μία εικόνα για την σπουδαιότητα των θέσεων της πρωτεΐνης XanQ που εξετάζουμε. Στις περιπτώσεις π.χ. όπου η επώαση με το αντιδραστήριο οδηγεί σε πτώση της ενεργότητας, υποδεικνύεται ότι η αντίστοιχη θέση με την μονή κυστεϊνη συμμετέχει σε μία σημαντική αλληλεπίδραση κατά τον μηχανισμό δέσμευσης και μεταφοράς υποστρώματος, η οποία παρεμποδίζεται από την ομοιοπολική δέσμευση του SH-αντιδραστηρίου (αλκυλίωση). Επίσης, σε περιπτώσεις που αποδεικνύεται αλκυλίωση από ένα πολικό, υδρόφιλο αντιδραστήριο (όπως το MTSES⁻), η αντίστοιχη θέση με την μονή κυστεϊνη μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι προσβάσιμη από το υδρόφιλο, εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Επίδραση του αντιδραστηρίου NEM στην ενεργότητα των περμεασών

Αρχικά, ελέγχθηκε η επίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην ενεργότητα των δεκαεπτά (17) περμεασών μονής κυστεϊνης, που εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα ενεργότητας (αρχική ταχύτητα >20%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης υποστρώματος >40%) (H22C, Q23C, T30C, E55C, Q90C, K164C, N184C, E186C, H187C, D232C, K249C, H257C, Q258C, R341C, R385C, N390C, D413C). Το NEM είναι ένα μικρό, σχετικά υδρόφοβο SH-αντιδραστήριο που μπορεί να διαπερνά τη μεμβράνη και να έχει πρόσβαση τόσο σε περιπλασμικές, όσο και σε κυτταροπλασματικές ή και ενδομεμβρανικές θέσεις μιας πολυτοπικής μεμβρανικής πρωτεΐνης (Frillingos *et al.*, 1998). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν (Εικόνα 3.1.6) ότι μόνο η ενεργότητα της περμεάσης Q258C αναστέλλεται σημαντικά (κατά 50%) μετά από την

προεπώαση με NEM (2 mM). Αύξηση της ενεργότητας, η οποία επαναφέρει την ενεργότητα στα επίπεδα του XanQ φυσικού τύπου παρατηρείται για τις περμεάσες Q23C (αύξηση x1,9) και K249C (αύξηση x1,8), ενώ για τις υπόλοιπες 14 περμεάσες η παρουσία του αντιδραστηρίου NEM δεν επηρεάζει την ενεργότητά τους (ελάχιστη μείωση ή αύξηση, μικρότερη από 1,2 φορές)(Εικόνα 3.1.6).



Εικόνα 3.1.6: Επίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM, 2 mM) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε θέσεις πολικών και ιοντιζόμενων καταλοίπων σε διαμεμβρανικές α -έλικες.

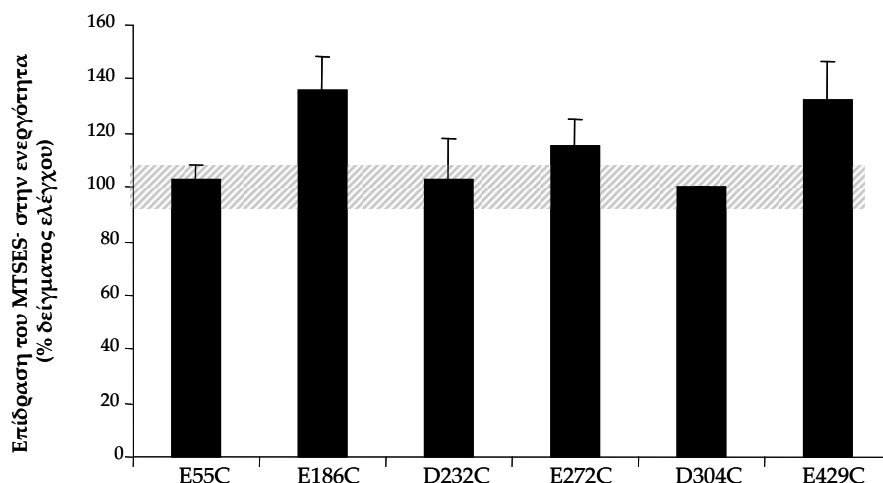
Κύτταρα *E. coli* T184 που φέρουν πλασμίδια pT7-5/ *xanQ* Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25° C, παρουσία NEM (2 mM), 10 min, 25°C (βλ. 2.9.4). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec), ως % ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία NEM για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στον μέσο όρο των αντίστοιχων τιμών της XanQ Cys-less-BAD, όπως μετρήθηκε σε παράλληλα πειράματα ως δείγμα ελέγχου. Για τα μεταλλάγματα που έχουν μηδενική αρχική ταχύτητα δεν έγινε προσδιορισμός (ND).

Επίδραση ιοντικών SH-αντιδραστηρίων (MTSES⁻, MTSEA⁺) στην ενεργότητα των περμεασών

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση ιοντικών SH-αντιδραστηρίων, που δεν μπορούν να διαπερνούν τη μεμβράνη (Akabas *et al.*, 1992; Dunten *et al.*, 1993; Frillingos & Kaback, 1996; Kwaw *et al.*, 2001), δηλ. του MTS-αιθυλοσουλφονικού (MTSES⁻) και του MTS-αιθυλοαμμωνίου (MTSEA⁺) τα οποία φέρουν αρνητικό και θετικό ηλεκτρικό φορτίο, αντίστοιχα. Το MTSES⁻ εξετάστηκε για τα επτά (7) μεταλλάγματα μονής Cys σε θέσεις όπου το εγγενές κατάλοιπο είναι πιθανώς αρνητικά φορτισμένο (E55C, E186C, D232C, E272C, D304C, D413C, E429C) (Εικόνα 3.1.7), ενώ το MTSEA⁺ για τα εννιά μεταλλάγματα single-Cys σε θέσεις όπου το εγγενές κατάλοιπο είναι πιθανώς

θετικά φορτισμένο (H22C, H31C, K164C, H187C, K249C, H257C, R337C, R341C, R385C) (Εικόνα 3.1.8).

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το SH-αντιδραστήριο MTSES⁻ δεν αναστέλλει καμία από τις περμεάσες E55C, E186C, D232C ή E429C ούτε διασώζει έστω και μικρή ενεργότητα για τις ανενεργές E272C ή D304C, αλλά αυξάνει οριακά (x1,3-1,4) την ενεργότητα των E186C και E429C (Εικόνα 3.1.7).

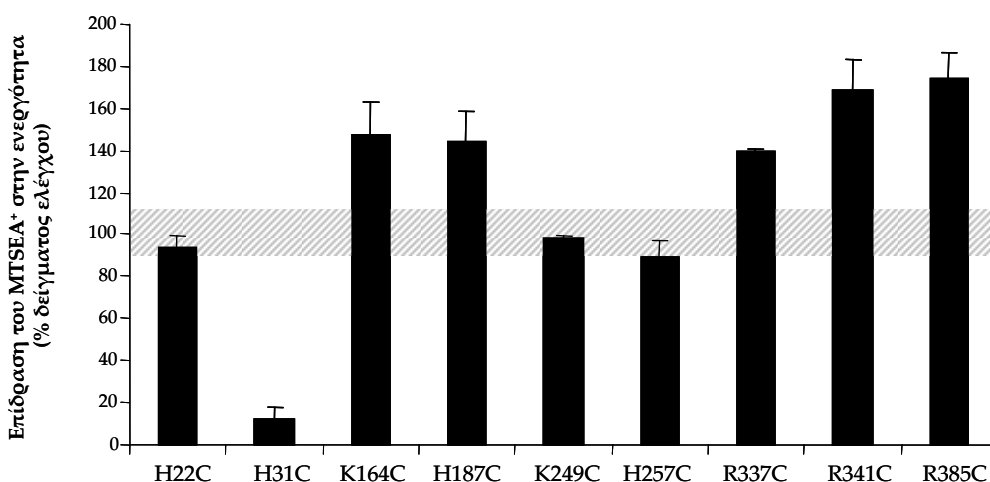


Εικόνα 3.1.7: Επίδραση του MTSES⁻ στην ενεργότητα των E55C, E186C, D232C, E272C, D304C και E429C.

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.6, αλλά για επώαση με MTSES⁻ (1 mM, 30 min, 25 °C) (βλ. 2.9.4). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (5-10 sec), ως % ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία MTSES⁻ για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.). Η γκρίζα οριζόντια ζώνη αντιστοιχεί στον μέσο όρο και τυπική απόκλιση των αντίστοιχων τιμών της XanQ Cys-less -BAD (δείγμα ελέγχου), όπως μετρήθηκε σε παράλληλα πειράματα.

Το SH-αντιδραστήριο MTSEA⁺ δεν αναστέλλει καμία από τις περμεάσες H22C, K164C, H187C, K249C, H257C, R337C, R341C ή R385C, αλλά αναστέλλει πλήρως την μικρή ενεργότητα της H31C (Εικόνα 3.1.8) και αυξάνει (x1,4-1,6) την ενεργότητα των K164C, H187C, R337C, R341C και R385C (Εικόνα 3.1.8). Η αναστολή της H31C και η μικρή αύξηση ενεργότητας των περμεασών K164C, H187C, R337C, R341C, R385C, E186C και E429C υποδεικνύει ότι οι θέσεις αυτές είναι προσβάσιμες από τα αντίστοιχα αντιδραστήρια MTS. Επίσης, οι μικρές αυξήσεις ενεργότητας, οι οποίες επαναφέρουν την αρχική ταχύτητα των μεταλλαγμάτων σε επίπεδα παρόμοια ή προσεγγίζοντα αυτά της XanQ-Cys-less, υποδεικνύουν ότι η παρουσία θετικού φορτίου στις θέσεις 164, 187, 337, 341 και 385 ή, αντίστοιχα, αρνητικού φορτίου στις θέσεις 186 και 429

εξασφαλίζει την μέγιστη δυνατή ενεργότητα, χωρίς όμως να είναι αναντικατάστατη στη λειτουργία της ενεργού μεταφοράς. Τέλος, η πλήρης απενεργοποίηση της H31C (εικόνα 3.1.8) υποδεικνύει ότι η θέση αυτή είναι πολύ σημαντική στον μηχανισμό και δεν επιδέχεται την ύπαρξη θετικού φορτίου (κατά συνέπεια, και η εγγενής His-31 της XanQ είναι πιθανόν αποπρωτονιωμένη, χωρίς θετικό φορτίο, σε pH 7,5).

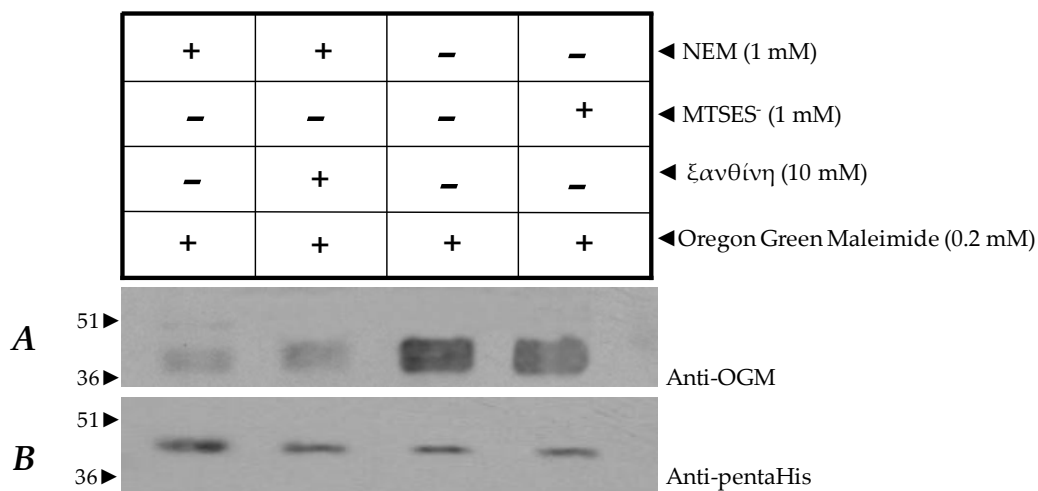


Εικόνα 3.1.8: Επίδραση του MTSEA⁺ στην ενεργότητα των H22C, H31C, K164C, H187C, K249C, H257C, R337C, R341C και R385C.

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.6, αλλά για επώαση με MTSEA⁺ (1 mM, 30 min, 25 °C) (βλ. 2.9.4). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (5-10 sec), ως % ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία MTSEA⁺ για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.). Η γκριζα οριζόντια ζώνη αντιστοιχεί στον μέσο όρο και τυπική απόκλιση των αντίστοιχων τιμών της XanQ Cys-less -BAD (δείγμα ελέγχου), όπως μετρήθηκε σε παράλληλα πειράματα.

3.1.1.5 Δοκιμασία αλκυλίωσης της περμεάσης H31C *in vivo*

Η His-31 απαντάται στο μέσον του TM1 (Εικόνα 3.1.1) και είναι απόλυτα συντηρημένη στους μεταφορείς της οικογένειας NCS2 (Εικόνα 3.1.2). Από τα έως τώρα πειραματικά μας δεδομένα, η πολύ μικρή ενεργότητα της H31C (Εικόνα 3.1.3) καθώς και η πλήρης απενεργοποίησή της από το αντιδραστήριο MTSEA⁺ (Εικόνα 3.1.7) υποδεικνύουν ότι το κατάλοιπο αυτό είναι σημαντικό για τη λειτουργία της περμεάσης XanQ. Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της H31C, κατασκευάσαμε καταρχήν την H31C-His₁₀, μεταφέροντας την μετάλλαξη από το υπόβαθρο της Cys-less XanQ-BAD σε αυτό της Cys-less XanQ-His₁₀, και εξετάσαμε το μετάλλαγμα σε δοκιμασίες αλκυλίωσης με NEM και MTSES⁻, παρουσία ή απουσία ξανθίνης, *in vivo* (Εικόνα 3.1.9). Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η H31C είναι προσβάσιμη τόσο στο NEM όσο και στο MTSES⁻, επιβεβαιώνοντας την προσβασιμότητά της από το υδρόφιλο, εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επίσης, η παρουσία υποστρώματος (ξανθίνης) δεν προστατεύει σημαντικά την H31C από την σήμανση με NEM, υποδεικνύοντας ότι στην His-31 κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δεν υπάρχει άμεση στερεοχημική παρεμπόδιση από το υπόστρωμα.



Εικόνα 3.1.9: Αλκυλίωση της περμεάσης H31C-His₁₀ από τα αντιδραστήρια NEM και MTSES⁻ *in vivo*. Κύτταρα *E. coli* T184 επάγονται με IPTG για την έκφραση της Cys-less/H31C XanQ-His₁₀ από το πλασμίδιο pT7-5/xanQ(H31C)-His₁₀ και έπειτα επωάζονται με NEM (1 mM, 10 min, 25 °C) ή MTSES⁻ (1 mM, 10 min, 25 °C), παρουσία ή απουσία ξανθίνης (10 mM) και μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, ακολουθείται η πειραματική δοκιμασία παρασκευής μεμβρανών σε μικρή κλίμακα, εκχύλισης των μεμβρανικών πρωτεϊνών, απομόνωσης της H31C-His₁₀ XanQ μέσω χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου, σήμανσης των μή αλκυλιωμένων κυστεϊνών με Oregon Green Maleimide (OGM), ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης (βλ. 2.12). **A.** Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του Oregon Green Maleimide (OGM) για τον έλεγχο του ποσοστού σήμανσης **B.** Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα Anti-pentaHis για τον έλεγχο της ολικής ποσότητας Cys-less/H31C XanQ-His₁₀ που εκλύεται από τη στήλη νικελίου.

3.1.1.6 Εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση σε επιλεγμένες θέσεις ισχυρά πολικών και/ή δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα της XanQ

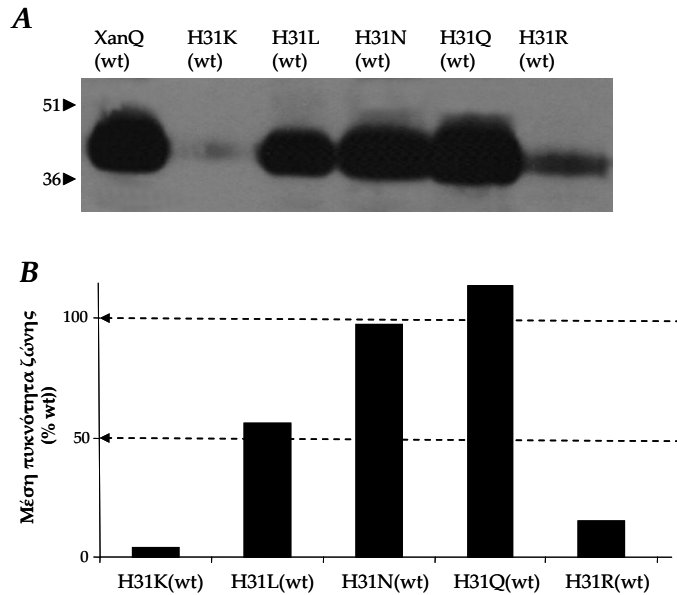
Η αρχική ανάλυση κυστεϊνικής στόχευσης (βλ. 3.1.1.2) έδειξε ότι η αντικατάσταση με κυστεΐνη εννέα θέσεων της XanQ (31, 75, 93, 164, 232, 258, 272, 304, 385) οδηγεί σε χαμηλή έως αμελητέα ενεργότητα, η οποία συνδέεται (α) είτε με χαμηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (Q75C, D232C, Q258C, R385C), (β) είτε με την παρουσία των πέντε καταλοίπων σερίνης στις αντίστοιχες θέσεις των εγγενών κυστεϊνών της Cys-less XanQ (H31C, K164C), (γ) είτε με έναν σημαντικό λειτουργικό ρόλο των εγγενών καταλοίπων που δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να υποκατασταθεί από την κυστεΐνη (N93C, E272C, D304C) (Εικόνες 3.1.3-3.1.5). Είναι ενδιαφέρον, επίσης, ότι τα αντίστοιχα εγγενή κατάλοιπα στις συγκεκριμένες θέσεις αλληλουχίας εμφανίζουν πολύ υψηλό βαθμό συντήρησης (απόλυτη συντήρηση του αμινοξέος, ή συντήρηση του χαρακτήρα της πλευρικής του ομάδας) μεταξύ των μελών της οικογένειας NCS2 (His-31, Gln-75, Asn-93, Glu272, Asp304) ή γειτνιάζουν με θέσεις άλλων υψηλά συντηρημένων καταλοίπων (Lys-164, Asp-232, Gln-258, Arg-385) (Εικόνα 3.1.2).

Οι εννέα (9) θέσεις της XanQ υποβλήθηκαν σε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης (site-directed mutagenesis), αντικαθιστώντας καταρχήν με τα «συγγενέστερα» αμινοξέα (Arg αντί Lys, Lys αντί Arg, Lys ή Arg αντί His, Glu ή Asn αντί Asp ή Gln, Asp ή Gln αντί Glu) και, στη συνέχεια, με άλλες ομάδες αμινοξέων, στις περιπτώσεις όπου η συντηρητικότερη μεταλλαγή έδινε ελάχιστα επίπεδα ενεργότητας. Τα μεταλλάγματα που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά (μέτρηση ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης, έκφραση στην μεμβράνη), και στις περιπτώσεις όπου η αλλαγή επανέφερε υψηλά επίπεδα ενεργότητας έγινε πλήρης κινητική ανάλυση και μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων (υπολογισμός K_m και V_{max} , πειράματα ανταγωνισμού με άλλα υποστρώματα, μέτρηση ενεργότητας ραδιενεργά σημασμένων υποστρωμάτων). Σε δυνητικά ιοντιζόμενες θέσεις αμινοξέων, όπου το εγγενές κατάλοιπο είναι αναντικατάστατο για την ενεργότητα, εξετάστηκε επίσης η εξάρτηση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης από το pH.

3.1.1.6.1 Η ιστιδίνη στην θέση 31 (His-31) στο TM1 της XanQ: Ένα υδρόφιλο, μη φορτισμένο αμινοξύ σε αυτή τη θέση είναι απαραίτητο για την υψηλή συγγένεια αναγνώρισης ξανθίνης

Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης και έκφραση στην μεμβράνη

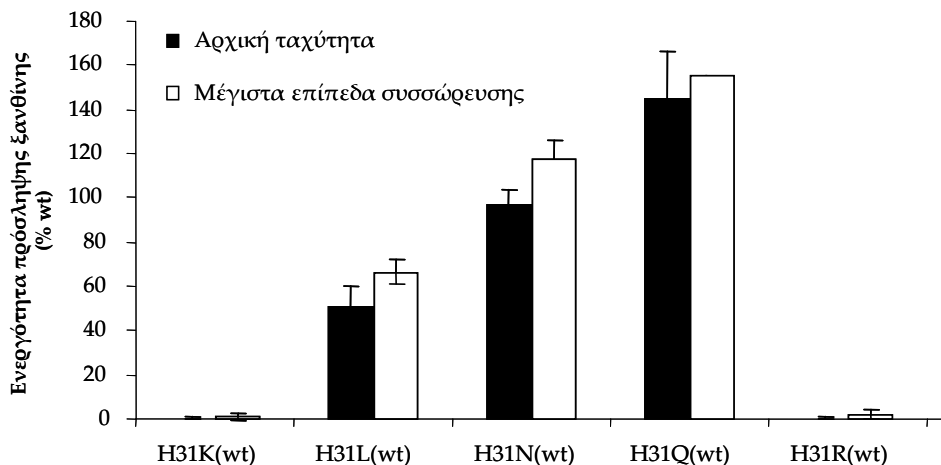
Η His-31 είναι απόλυτα συντηρημένη στην οικογένεια μεταφορέων NCS2 και βρίσκεται περίπου στο μέσον του TM1 (Εικόνα 3.1.2). Αντικατάσταση της His-31 της XanQ με πιθανώς θετικά φορτισμένα κατάλοιπα (Lys, Arg) οδηγεί σε ελάχιστη έως αμελητέα έκφραση στη μεμβράνη (Εικόνα 3.1.10) και μηδενική ενεργότητα [μεταλλάγματα H31K(wt), H31R(wt)] (Εικόνα 3.1.11). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την προηγούμενή μας υπόθεση ότι η θέση της His-31 είναι μεν προσβάσιμη από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον αλλά δεν μπορεί να δεχθεί την ύπαρξη θετικού φορτίου (βλ. 3.1.1.4 και 3.1.1.5). Στη συνέχεια κατασκευάζονται και μελετώνται τα μεταλλάγματα H31N(wt), H31Q(wt) και H31L(wt). Τα μεταλλάγματα αυτά, όπως και το H31C(wt) που είχε ήδη ελεγχθεί (Εικόνα 3.1.5), εμφανίζουν σημαντική ενεργότητα, που είναι ανάλογη με τα επίπεδα έκφρασής τους στη μεμβράνη (Εικόνα 3.1.10 και 3.1.11). Ως εκατοστιαία ποσοστά επί αυτών της XanQ(wt), οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης είναι 40%, 50%, 90%, 140% και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης 50%, 60%, 110%, 150%, για τα μεταλλάγματα H31C(wt), H31L(wt), H31N(wt), H31Q(wt), αντίστοιχα (Εικόνα 3.1.11). Τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη είναι 70% για το μετάλλαγμα H31C(wt), 60% για το H31L(wt), 100% για το H31N(wt) και 120% για το H31Q(wt) σε σχέση με την XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.10).



Εικόνα 3.1.10: Έκφραση των μεταλλαγμάτων στη θέση 31 της XanQ(wt).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.3.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως % ποσοστό της έκφρασης του XanQ(wt) (Quantity One). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).



Εικόνα 3.1.11: Τιμές ενεργότητας μεταφοράς Ξανθίνης των μεταλλαγμάτων στη θέση 31 της XanQ(wt).

Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]Ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις,, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.4. Με μαύρες στήλες απεικονίζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (10-30 sec) και με άσπρες τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης Ξανθίνης (1-10 min). Οι τιμές εκφράζονται ως % ποσοστά επί των αντίστοιχων τιμών της XanQ (wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Λειτουργική κινητική ανάλυση

Για τις αλλαγές στην θέση 31 οι οποίες παρουσιάζουν ενεργότητα είτε 40–60% [H31C(wt), H31L(wt)] είτε >90% [H31N(wt) και H31Q(wt)] έγινε κινητική ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης. Από την ανάλυση αυτή φαίνεται ότι η παρουσία ασπαραγίνης ή γλουταμίνης (Asn, Gln) στην θέση 31 (Πίνακας 3.1.1) έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της τιμής της K_m στα επίπεδα της περμεάσης XanQ(wt) και αύξηση κατά 2-3 φορές της τιμής της V_{max} . Στην περίπτωση των μεταλλαγμάτων H31C(wt) και H31L(wt) μειώνεται σημαντικά η συγγένεια των περμεασών για το υπόστρωμα (αύξηση K_m 10 και 5 φορές, αντίστοιχα) με ταυτόχρονη σημαντική αύξηση (4 και 5 φορές, αντίστοιχα) της V_{max} (Πίνακας 3.1.1).

Πίνακας 3.1.1: Τιμές K_m και V_{max} περμεασών με μεταλλαγές στην θέση His-31 της XanQ.

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (0,1–100μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) αφαιρούνται από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων. Οι τιμές K_m και V_{max} εξαγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
XanQ (Cys-less)	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.9	1858
H31C(wt)	47.4 ± 6.4	33.9 ± 2.7	715
H31L(wt)	26.1 ± 2.0	23.9 ± 0.8	919
H31N(wt)	2.7 ± 0.5	16.2 ± 0.8	5945
H31Q(wt)	3.4 ± 0.5	12.1 ± 0.5	3558

Μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης

Για να γίνει κατανοητός ο ρόλος της His-31 στην εξειδικευμένη αναγνώριση της ξανθίνης και άλλων υποστρωμάτων ή προσδετών (ανάλογα πουρινών, πυριμιδίνες) από την XanQ, έγιναν πειράματα πρόσληψης [³H]ξανθίνης παρουσία ή απουσία μοριακής περίσσειας άλλων προσδετών στα μεταλλάγματα που εμφάνιζαν σημαντική ενεργότητα [H31C(wt), H31L(wt), H31N(wt), H31Q(wt)]. Από τα αποτελέσματα φαίνεται (Πίνακας 3.1.2) ότι τα H31C(wt) και H31L(wt) παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα αναγνώρισης για οποιοδήποτε από τα ανάλογα που χρησιμοποιούνται σε ανταγωνισμό με την ξανθίνη, ενώ και από την κινητική ανάλυση είχε διαφανεί ότι τα δύο αυτά μεταλλάγματα έχουν χαμηλή συγγένεια (υψηλές τιμές K_m) για τη ξανθίνη. Η περμεάση H31N(wt) εμφανίζει παρόμοιο προφίλ με την XanQ(wt) με εξαίρεση τα υποστρώματα 8-μεθυλοξανθίνη και ουρικό οξύ, τα οποία φαίνεται να αναγνωρίζει σε σημαντικό βαθμό (Πίνακας 3.1.2). Τέλος, η H31Q(wt) εμφανίζει διεύρυνση της εξειδίκευσης, καθώς φαίνεται να αναγνωρίζει περισσότερες πουρίνες και ανάλογα πουρινών σε σχέση με την XanQ(wt) (για παράδειγμα, αναγνωρίζει ουρικό οξύ, γουανίνη, ουρακίλη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη).

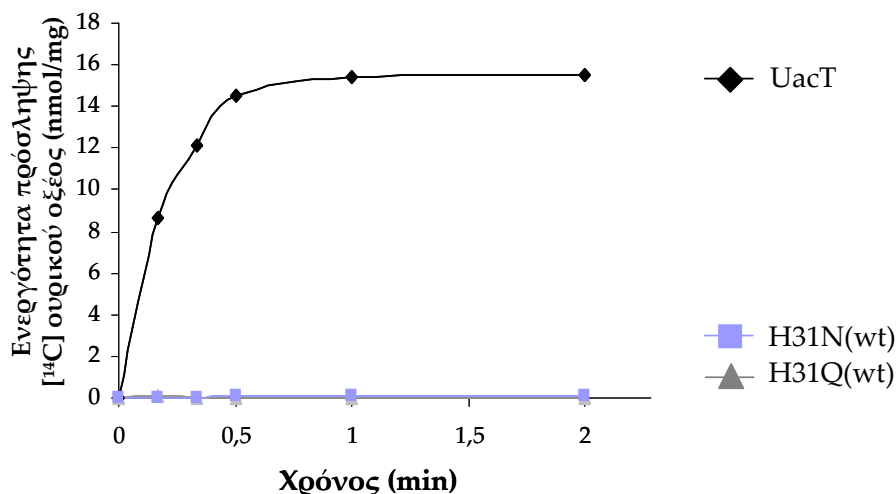
Πίνακας 3.1.2: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων στη θέση 31 (TM1) της XanQ.

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3). Από τις αρχικές ταχύτητες (5-20 sec) αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) και παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες (μέσοι όροι τριών πειραμάτων με S.D. <15%). Οι σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με την XanQ(wt) τονίζονται με έντονη γραφή.

Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης που διατηρείται				
	XanQ(wt)	H31C(wt)	H31L(wt)	H31N(wt)	H31Q(wt)
-	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	98	99	61	52
Υποξανθίνη	96	88	89	88	99
Αδενίνη	96	120	133	95	89
Γουανίνη	94	102	91	68	46
Ουρακίλη	101	99	98	97	48
1-Μεθυλοξανθίνη	19	117	113	75	66
2-Θειοξανθίνη	13	91	91	4	3
3-Μεθυλοξανθίνη	25	63	70	19	16
6-Θειοξανθίνη	20	102	123	24	4
7-Μεθυλοξανθίνη	105	84	162	76	42
8-Μεθυλοξανθίνη	96	84	87	33	25
9-Μεθυλοξανθίνη	13	126	120	126	79
Αλλοπουρινόλη	106	84	80	91	98
Οξυπουρινόλη	31	74	82	5	4

Ενεργότητα πρόσληψης ουρικού οξέος

Από τα πειράματα ανταγωνισμού προκύπτει μια ένδειξη ότι τόσο η H31N(wt) όσο και η H31Q(wt) αναγνωρίζουν σε μικρό βαθμό ως υπόστρωμα το ουρικό οξύ. Έτσι έγιναν πειράματα δοκιμασίας ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένου ουρικού οξέος [uric acid (8-¹⁴C)] σε συγκέντρωση 80 μM για τα δύο αυτά μεταλλάγματα. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.1.12) κατέδειξαν ότι καμία από τις δύο περμεάσες δεν μεταφέρει ουρικό οξύ καθώς και οι δύο εμφανίζουν πρακτικά μηδενικές τιμές αρχικής ταχύτητας μεταφοράς του υποστρώματος σε σχέση με τον μεταφορέα ουρικού οξέος UacT που χρησιμοποιείται ως δείγμα θετικού ελέγχου (βλ. 1.2).



Εικόνα 3.1.12: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^{14}\text{C}]$ ουρικού οξέος από τα μεταλλάγματα H31N(wt) και H31Q(wt).

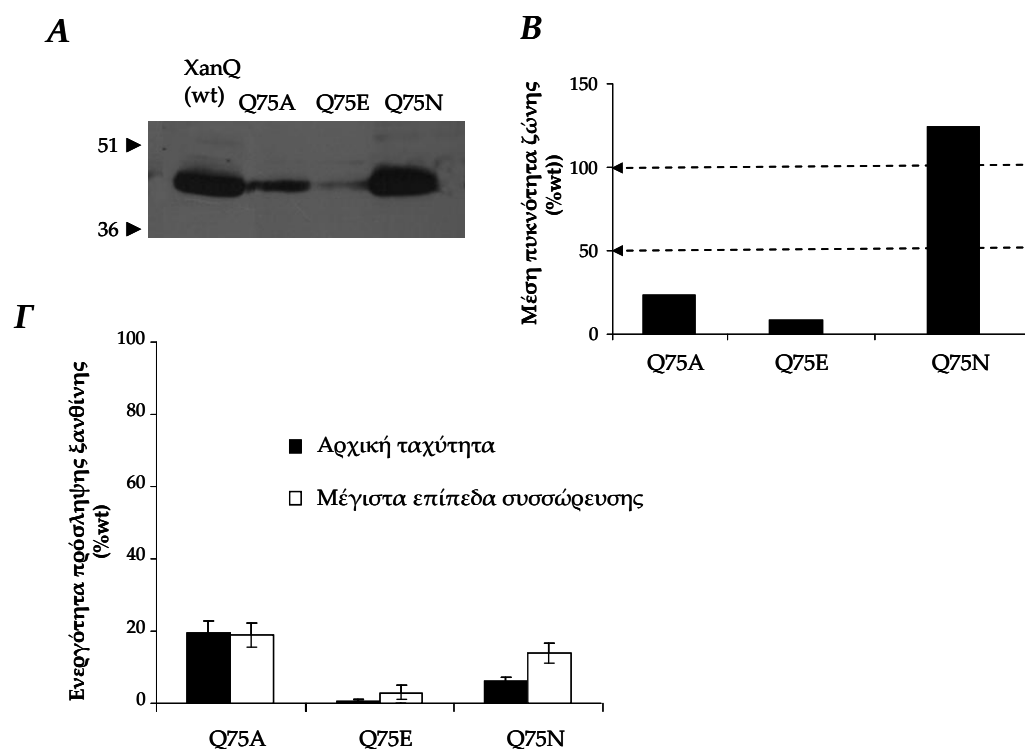
Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/*xanQ(wt)*-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^{14}\text{C}]$ ουρικού οξέος (80 μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές ενεργότητας εκφράζονται σε nmol ουρικού οξέος που προσλαμβάνεται ανά mg πρωτεΐνης των κυττάρων. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

3.1.1.6.2 Η γλουταμίνη στην θέση 75 (Gln-75) στο TM2 του XanQ: Αναντικατάστατη για τη λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης

Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης και έκφραση στην μεμβράνη

Στο δεύτερο διαμεμβρανικό τμήμα (TM2) του XanQ βρίσκεται η γλουταμίνη στην θέση 75 (Gln-75), η οποία είναι απόλυτα συντηρημένη στους μεταφορείς 2-οξυ πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος) (κλάδος COG2233) της οικογένειας NCS2. Από την μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής στόχευσης είδαμε ότι η αντικατάσταση της γλουταμίνης σε κυστεΐνη (μετάλλαγμα Q75C) στην ελεύθερη κυστεϊνών περμεάση XanQ έχει ως αποτέλεσμα η περμεάση να μην εκφράζεται στην μεμβράνη των κυττάρων *E. coli* και κατ' επέκταση να έχει μηδενικές τιμές ενεργότητας (Εικόνες 3.1.3 και 3.1.4). Κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα με τις συντηρητικότερες δυνατές αντικαταστάσεις για την θέση Gln-75, που διατηρούν την καρβοξυλομάδα (Glu) ή εισάγουν μία καρβονυλομάδα με αντίστοιχου μεγέθους πλευρική αλυσίδα (Asn), καθώς και το μετάλλαγμα με εισαγωγή ενός μικρότερου και μη πολικού αμινοξέος (Ala) στην θέση του Gln-75. Οι δύο συντηρητικές αντικαταστάσεις (Glu ή Asn) δίνουν περμεάσες με μηδενικές [Q75E(wt)] ή ελάχιστες [Q75N(wt)] τιμές ενεργότητας μεταφοράς $[^3\text{H}]$ ξανθίνης (Εικόνα 3.1.13), οι οποίες για το

μετάλλαγμα Q75E(wt) σχετίζονται με μικρές τιμές επιπέδων έκφρασης στην μεμβράνη [$<10\%$ της XanQ(wt)], ενώ, αντίθετα, το Q75N(wt) εκφράζεται κανονικά στη μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια της XanQ(wt). Η περιμεάση Q75A(wt) εκφράζεται σε ποσοστό 23% της XanQ(wt) και έχει αντίστοιχα χαμηλή αλλά καθαρά ανιχνεύσιμη ενεργότητα μεταφοράς Ξανθίνης [αρχική ταχύτητα 18% , μέγιστα επίπεδα 20% της XanQ(wt)].



Εικόνα 3.1.13: Έκφραση και τιμές ενεργότητας των μεταλλαγμάτων στη θέση 75 της XanQ(wt).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.3.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων % XanQ(wt) (Quantity One, βλ. Εικόνα 3.1.3).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]Ξανθίνης ($1 \mu\text{M}$) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.4.

Κινητική ανάλυση και μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης

Για το μετάλλαγμα Q75A (Εικόνα 3.1.13) προχωρήσαμε σε κινητική ανάλυση και πειράματα ανταγωνισμού ξανθίνης με άλλα υποστρώματα για τον προσδιορισμό του προφίλ εξειδίκευσης του μεταλλάγματος. Τα πειράματα υποδεικνύουν ότι η παρουσία αλανίνης (Ala) στην θέση 75 οδηγεί σε μείωση κατά 2 και 2,5 φορές των τιμών των K_m και V_{max} αντίστοιχα (Πίνακας 3.1.3). Επίσης, το μετάλλαγμα Q75A εμφανίζει παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης με την XanQ(wt), με εξαίρεση το ότι φαίνεται να αναγνωρίζει σε μικρό βαθμό τις 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη και γουανίνη, οι οποίες δεν αναγνωρίζονται από την φυσικού τύπου περμεάση (Πίνακας 3.1.4).

Πίνακας 3.1.3: Τιμές K_m και V_{max} περμεασιών με μεταλλαγές στην θέση Gln-75 του XanQ.

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (0,1–100 μ M, βλ. Πίνακα 3.1.1). Δεν έγινε κινητική ανάλυση για τα Q75E(wt) και Q75N(wt) λόγω μηδενικών ή σχεδόν μηδενικών τιμών ενεργότητας.

Περμεάση	K_m (μ M)	V_{max} (nmol min $^{-1}$ mg $^{-1}$)	V_{max}/K_m (μ L min $^{-1}$ mg $^{-1}$)
XanQ(wt)	4.6 \pm 0.3	6.4 \pm 0.5	1391
XanQ (Cys-less)	5.5 \pm 0.5	10.2 \pm 0.9	1858
Q75A(wt)	2.2 \pm 0.9	2.5 \pm 0.3	1136

Πίνακας 3.1.4: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων στη θέση 75 (TM2) του XanQ.

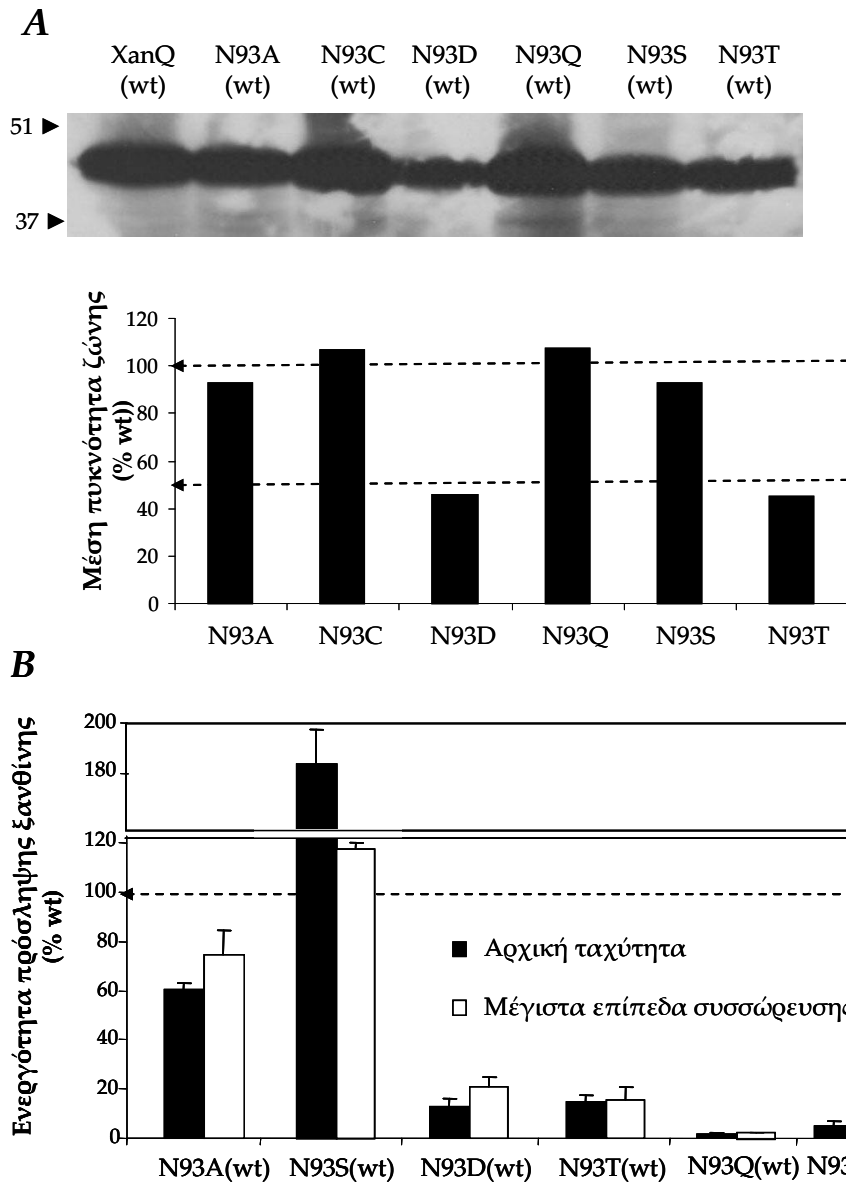
Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1 μ M, 25 $^{\circ}$ C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3, Πίνακα 3.1.2). Δεν έγινε ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης για τα Q75E(wt) και Q75N(wt) λόγω μηδενικών ή σχεδόν μηδενικών τιμών ενεργότητας.

Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [3 H] ξανθίνης που διατηρείται	
	XanQ(wt)	Q75A(wt)
–	100	100
Ουρικό οξύ	97	70
Υποξανθίνη	96	115
Αδενίνη	96	150
Γουανίνη	94	60
Ουρακίλη	101	94
2-Θειοξανθίνη	13	2
3-Μεθυλοξανθίνη	25	24
6-Θειοξανθίνη	20	7
7-Μεθυλοξανθίνη	105	75
8-Μεθυλοξανθίνη	96	44
Αλλοπουρινόλη	106	106
Οξυπουρινόλη	31	6

3.1.1.6.3 Η ασπαραγίνη στην θέση 93 (Asn-93) στο TM3 του XanQ: Πολύ σημαντική για την εξειδίκευση της επιλογής της ξανθίνης έναντι του ουρικού ή άλλων υποστρωμάτων με τροποποιήσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο

Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης και έκφραση στην μεμβράνη

Το κατάλοιπο Asn-93 βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης της β-πτυχωτής επιφάνειας ($\beta 3$) και της α -έλικας ($\alpha 3$) του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος (Εικόνα 3.1.1), το οποίο σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο του ομόλογου μεταφορέα UraA (βλ. 1.2.2.3) είναι πιθανό να συμμετέχει άμεσα στην πρόσδεση του υποστρώματος. Οι αντικαταστάσεις της Asn-93 με αμινοξέα είτε εξίσου ισχυρά πολικού χαρακτήρα (Gln), είτε που εμφανίζονται στην ίδια θέση στα άλλα μέλη της οικογένειας NCS2 [Ser και Thr (κλάδος COG2233), Ala, Asp) δίνουν μεταλλάγματα που εκφράζονται στην μεμβράνη σε επίπεδα >90% του XanQ(wt) [N93A(wt), N93S(wt), N93Q(wt) Εικόνα 3.1.14A] ή σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα (>40%) σε σχέση με αυτά του XanQ(wt) [N93D(wt), N93T(wt), Εικόνα 3.1.14B]. Οι τιμές της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης (Εικόνα 3.1.14B) εμφανίζονται σε υψηλά επίπεδα [αρχική ταχύτητα πρόσληψης: 180%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης: 120% της XanQ(wt)] για το μετάλλαγμα N93S(wt) και σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα για το N93A(wt) [αρχική ταχύτητα πρόσληψης: 60%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης: 70% της XanQ(wt)]. Τα N93D(wt) και N93T(wt) παρουσιάζουν χαμηλές τιμές ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης [10–20% σε σχέση με την XanQ(wt)], που συμβαδίζουν εν μέρει με το χαμηλότερο ποσοστό έκφρασής τους στην μεμβράνη, ενώ το μετάλλαγμα N93Q εμφανίζει μηδενικές τιμές ενεργότητας αν και εκφράζεται στην μεμβράνη στα επίπεδα του XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.14A) Στην εικόνα παρουσιάζεται σε επανάληψη (βλ. Εικόνα 3.1.5) και το μετάλλαγμα N93C(wt) που όπως σχολιάστηκε παραπάνω έχει αμελητέες τιμές ενεργότητας και κανονική έκφραση στην μεμβράνη.



Εικόνα 3.1.14: Έκφραση και τιμές ενεργότητας των μεταλλαγμάτων στη θέση 93 της XanQ(wt).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.3. και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων % XanQ(wt) (βλ Εικόνα 3.1.3).

B. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.4.

Κινητική ανάλυση

Για τα τέσσερα ενεργά μεταλλάγματα με αντικαταστάσεις στην θέση 93 [N93A(wt), N93S(wt), N93D(wt), N93T(wt)] έγιναν πειράματα κινητικής ανάλυσης της μεταφοράς ξανθίνης. Τα αποτελέσματα (Πίνακας 3.1.5) υποδεικνύουν ότι η αντικατάσταση της ασπαραγίνης στην θέση 93 (*Asn-93*) με αλανίνη ή σερίνη δίνει μεταλλάγματα [N93A(wt), N93S(wt)] με μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμα σε σύγκριση με την περμεάση φυσικού τύπου (μείωση του K_m στο ήμισυ) και με τιμές της V_{max} στα επίπεδα της *XanQ*(wt) για το μετάλλαγμα N93A(wt) και αυξημένες [2,5 φορές σε σχέση με την *XanQ*(wt)] για το N93S(wt). Οι χαμηλές τιμές ενεργότητας των N93D(wt) και N93T(wt) (Εικόνα 3.1.14) σχετίζονται με μειωμένη συγγένεια (2 φορές αύξηση της K_m) για το N93T και μειωμένη καταλυτική ισχύ (10 φορές μείωση της V_{max}) για το N93D σε σχέση με την περμεάση φυσικού τύπου (Πίνακας 3.1.5).

Πίνακας 3.1.5: Τιμές K_m και V_{max} περμεασών με μεταλλαγές στην θέση *Asn-93* του *XanQ*.

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (0,1–100 μM , βλ. Πίνακα 3.1.1).

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
<i>XanQ</i> (wt)	4.6 \pm 0.3	6.4 \pm 0.5	1391
<i>XanQ</i> (Cys-less)	5.5 \pm 0.5	10.2 \pm 0.9	1858
N93A(wt)	2.4 \pm 0.7	5.0 \pm 0.4	2083
N93S(wt)	2.1 \pm 0.9	16.7 \pm 1.8	7952
N93T(wt)	11.6 \pm 2.9	5.0 \pm 0.4	431
N93D(wt)	2.3 \pm 0.3	0.5 \pm 0.1	217

Μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης

Για να εξετασθεί η συνεισφορά της *Asn-93* στο προφίλ εξειδίκευσης έγιναν πειράματα πρόσληψης [^3H] ξανθίνης σε ανταγωνισμό με άλλα δυνητικά υποστρώματα/προσδέτες (βλ. 2.9.3) για τα μεταλλάγματα N93A(wt), N93S(wt), N93D(wt) και N93T(wt). Οι αντικαταστάσεις στην θέση αυτή βρέθηκε είτε ότι μειώνουν την συγγένεια της περμεάσης *XanQ* για όλα σχεδόν τα ανάλογα ξανθίνης [N93T(wt)] είτε ότι επιτρέπουν την αναγνώριση αναλόγων που δεν αναγνωρίζονται από την περμεάση φυσικού τύπου και δομικά διαφέρουν από την ξανθίνη μόνο στην πλευρά του ιμιδαζολικού δακτυλίου (7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, ουρικό οξύ) (Πίνακας 3.1.6). Τα N93A(wt), N93S(wt) επιτρέπουν την αναγνώριση 8-μεθυλοξανθίνης με

υψηλή συγγένεια (K_i 32 μ M και 48 μ M αντίστοιχα) ενώ το N93D(wt) αναγνωρίζει τόσο την 7-μεθυλοξανθίνη όσο και την 8-μεθυλοξανθίνη, αν και με σχετικά χαμηλή συγγένεια (K_i 366 μ M και 292 μ M αντίστοιχα) (Πίνακας 3.1.7). Επιπλέον, το μετάλλαγμα N93S(wt) και σε μικρότερο βαθμό το N93A(wt) εμφανίζουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν το ουρικό οξύ (8-οξυ-ξανθίνη) αν και με μικρή συγγένεια (K_i 678 μ M και 900 μ M αντίστοιχα). Πρέπει να σημειωθεί ότι η ικανότητα αναγνώρισης ουρικού οξέος είναι μια ιδιότητα που συναντάται σπάνια ανάμεσα στα μεταλλάγματα που έχουν κατασκευαστεί στο εργαστήριό μας σε θέσεις που καλύπτουν πάνω από 70% της περμεάσης XanQ. Συγκεκριμένα, δοκιμασίες ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης από διάφορα ανάλογα πουρινών σε περισσότερα από σαράντα (40) μεταλλάγματα αναδεικνύουν ότι μόνο πέντε (5) από αυτά αναγνωρίζουν ουρικό οξύ, συμπεριλαμβανομένων των H31Q(wt), N93S(wt) και Q258N(wt) που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή [τα άλλα δύο είναι τα G333R(wt) και V334C(wt) στην έλικα α 10, (Karatza *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010)].

Πίνακας 3.1.6: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων στη θέση 93 (TM3) του XanQ.

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1 μ M, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3, Πίνακα 3.1.2).

% Ρυθμός πρόσληψης [3 H] ξανθίνης που διατηρείται					
Ανταγωνιστής	XanQ(wt)	N93A(wt)	N93S(wt)	N93T(wt)	N93D(wt)
–	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	60	49	115	73
Υποξανθίνη	96	112	88	104	85
Αδενίνη	96	128	89	113	116
Γουανίνη	94	67	65	65	80
Ουρακίλη	101	95	95	120	85
2-Θειοξανθίνη	13	16	7	43	12
3-Μεθυλοξανθίνη	25	41	16	49	38
6-Θειοξανθίνη	20	24	11	84	23
7-Μεθυλοξανθίνη	105	62	54	121	26
8-Μεθυλοξανθίνη	96	10	9	69	25
Αλλοπουρινόλη	106	110	84	161	132
Οξυπουρινόλη	31	2	16	13	1

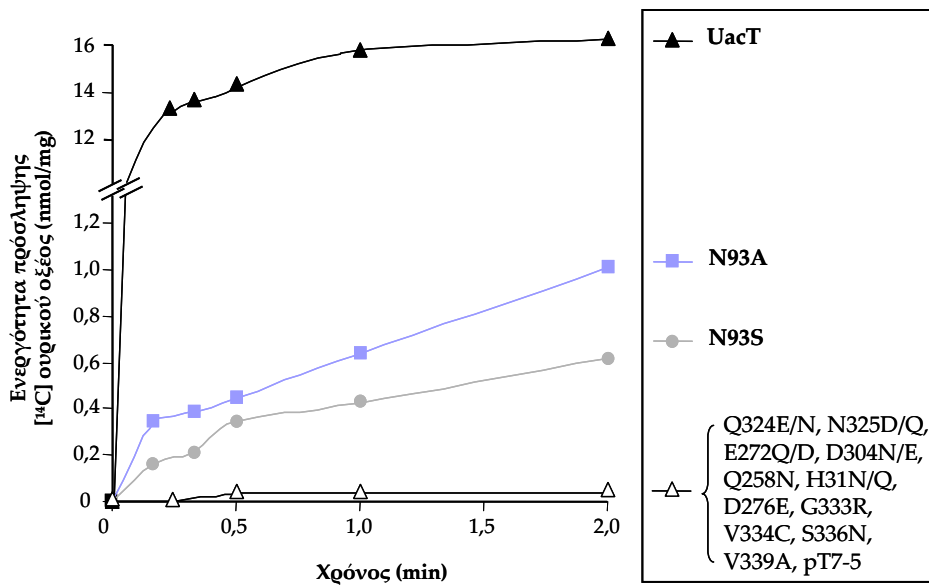
Πίνακας 3.1.7: Τιμές Ki μεταλλαγμάτων στη θέση Asn-93 της XanQ.

Η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στον Πίνακα 3.1.2 για δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1 μM, 25 °C) αλλά μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες συγκεντρώσεων 0.1μM έως 1mM, 5min (βλ. 2.9.3) υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀ με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 5*. Οι τιμές Ki υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prussof, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [³H] Ξανθίνης.

Ανταγωνιστής	K _i (μM)				
	XanQ(wt)	N93A(wt)	N93S(wt)	N93T(wt)	N93D(wt)
Ουρικό οξύ	>1000	~900	~678	>1000	>1000
2-Θειοξανθίνη	90	145	28	~875	72
3-Μεθυλοξανθίνη	72	40	36	~920	355
6-Θειοξανθίνη	40	24	11	84	23
7-Μεθυλοξανθίνη	>1000	~950	~813	>1000	292
8-Μεθυλοξανθίνη	>1000	32	48	>1000	366

Ενεργότητα πρόσληψης ουρικού οξέος

Τα μεταλλάγματα N93S(wt) και N93A(wt), που παρουσιάζουν χαμηλές τιμές ενεργότητας μεταφοράς Ξανθίνης (Εικόνα 3.1.14) και αναγνωρίζουν τόσο το ουρικό οξύ όσο και την 8-μεθυλοξανθίνη σε πειράματα ανταγωνισμού (Πίνακας 3.1.6), υποβλήθηκαν σε πειραματική δοκιμασία μεταφοράς ραδιενεργού ουρικού οξέος [*uric acid* (8-¹⁴C)] σε συγκέντρωση 80 μM. Τα πειράματα (Εικόνα 3.1.15) αποκαλύπτουν ότι και τα δύο αυτά μεταλλάγματα έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν [¹⁴C]ουρικό οξύ, με μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης τουλάχιστον 4% [N93S(wt)] και 7% [N93A(wt)] σε σχέση με την περμεάση θετικού ελέγχου (την περμεάση ουρικού οξέος UacT της *E. coli*), κάτι που δεν έχει παρατηρηθεί για κανένα άλλο μετάλλαγμα με παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης σε πειράματα ανταγωνισμού (προηγούμενη παράγραφος).



Εικόνα 3.1.15: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^{14}\text{C}]$ ουρικού οξέος από τα μεταλλάγματα N93A(wt) και N93S(wt).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/*xanQ(wt)*-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς $[^{14}\text{C}]$ ουρικού οξέος (80 μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές εκφράζονται σε nmoi/mg πρωτεΐνης. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Για λόγους σύγκρισης, παρουσιάζονται επίσης οι αντίστοιχες τιμές πρόσληψης ουρικού οξέος από πειράματα σε άλλα μεταλλάγματα της *XanQ* (με παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης σε πειράματα ανταγωνισμού), που υλοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία [E272Q/N, D304N/E, Q258N, H31N/Q] ή σε άλλες μελέτες του εργαστηρίου

3.1.1.6.4 Τα κατάλοιπα Glu-272 (TM8) και Asp-304 (TM9): Αναντικατάστατα για τη λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης

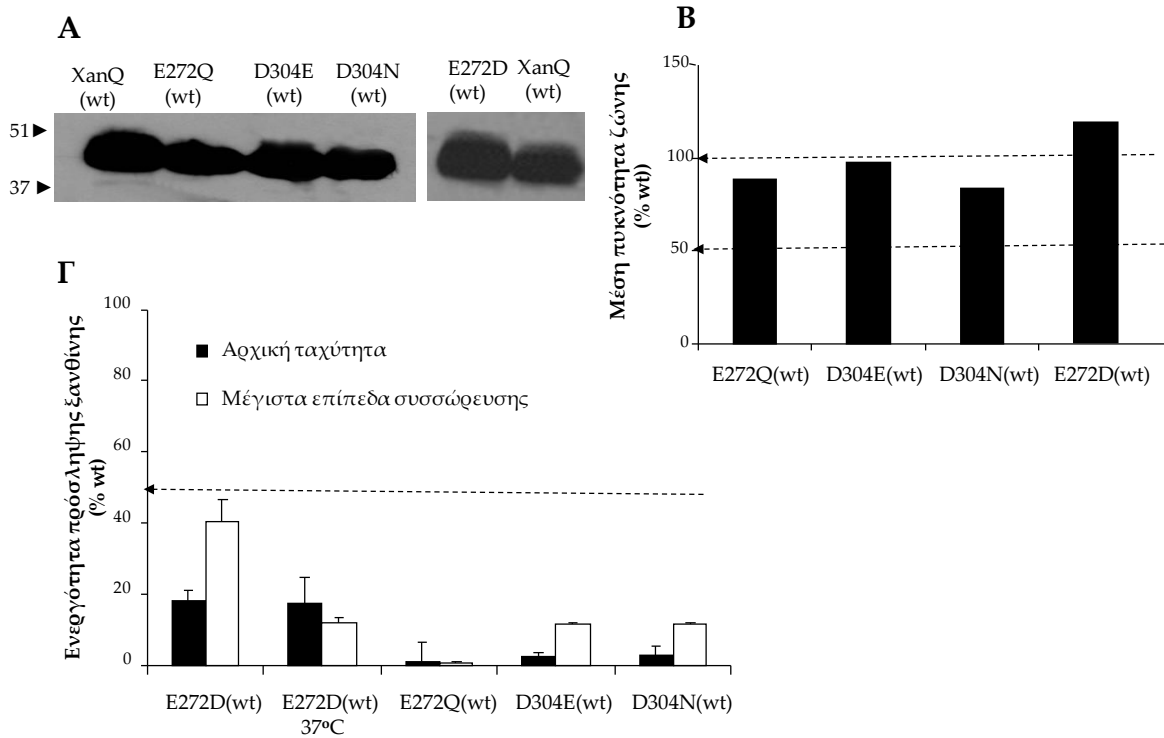
Τα επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη και η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης

Τα κατάλοιπα Glu-272 και Asp-304 είναι ιδιαίτερα συντηρημένα στην οικογένεια NCS2/COG2233 (Εικόνα 3.1.2) και βρίσκονται περίπου στο μέσο του όγδου και του ένατου διαμεμβρανικού τμήματος, αντίστοιχα (Εικόνα 3.1.1). Κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα με τις συντηρητικότερες δυνατές αντικαταστάσεις για τις θέσεις Glu-272 και Asp-304, δηλαδή αντικαταστάσεις που διατηρούν την καρβοξυλομάδα (Glu, Asp) ή εισάγουν μία καρβονυλομάδα με αντίστοιχου μεγέθους πλευρική αλυσίδα (Asn, Gln). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι αυτά τα μεταλλάγματα εκφράζονται στη μεμβράνη της *E. coli* σε επίπεδα παρόμοια [E272D(wt)] ή λίγο χαμηλότερα [E272Q(wt), D304E(wt), D304N(wt)] από τα επίπεδα της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.16 A, B). Ωστόσο, τα μεταλλάγματα E272Q(wt), D304E(wt) και D304N(wt) εμφανίζουν αμελητέες τιμές αρχικής ταχύτητας ($\leq 2\%$) και πολύ χαμηλά ($< 10\%$) [D304E(wt), D304N(wt)] έως μηδενικά [E272Q(wt)] επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (Εικόνα 3.1.16Γ), ενώ και το E272D(wt) εμφανίζει πολύ μικρές, αν και στατιστικά σημαντικές τιμές ενεργότητας [αρχική ταχύτητα 5%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης 30% της XanQ(wt), Εικόνα 3.1.16Γ], οι οποίες δεν επηρεάζονται όταν η θερμοκρασία του πειράματος είναι 37 °C (Εικόνα 3.1.16Γ). Τα τέσσερα αυτά μεταλλάγματα [E272D(wt), E272Q(wt), D304E(wt) και D304N(wt)] υποβλήθηκαν επίσης σε πειραματική δοκιμασία μεταφοράς ραδιενεργού ουρικού οξέος [*uric acid* ($8\text{-}^{14}\text{C}$)] σε συγκέντρωση 80 μM και τα πειράματα απέδειξαν ότι κανένα από αυτά τα μεταλλάγματα δεν μεταφέρει [^{14}C]ουρικό οξύ (Εικόνα 3.1.15).

Εξάρτηση της ενεργότητας των E272D και D304E από το pH

Για να εκτιμηθεί κατά πόσον η καρβοξυλομάδα στη θέση Glu-272 ή στη θέση Asp-304 επηρεάζει το pK_a ή συνδέεται με την λειτουργική εξάρτηση του μεταφορέα XanQ από το pH, εξετάσαμε την ενεργότητα μεταφοράς υποστρώματος [$8\text{-}^3\text{H}$] ξανθίνης για τους μεταφορείς XanQ(wt), XanQ-E272D(wt) και XanQ-D304E(wt) σε ένα εύρος διαφορετικών τιμών pH, από 3.8 έως 10.0 (Εικόνα 3.1.17). Η περμεάση φυσικού τύπου, XanQ(wt), έχει υψηλές τιμές ενεργότητας, ιδιαίτερα στην περιοχή pH 6.8 έως 8.2, με το μέγιστο σε pH 7.5. Αντίθετα, οι XanQ-E272D(wt) και XanQ-D304E(wt) έχουν πολύ μικρές τιμές ενεργότητας (αρχικής ταχύτητας μεταφοράς ξανθίνης) σε όλο το εύρος των

pH, με σχετικά μεγαλύτερες τιμές στο pH 7.5 - 8.0, οι οποίες, ωστόσο, είναι ελάχιστες (<5%) σε σχέση με την περμεάση φυσικού τύπου XanQ(wt).

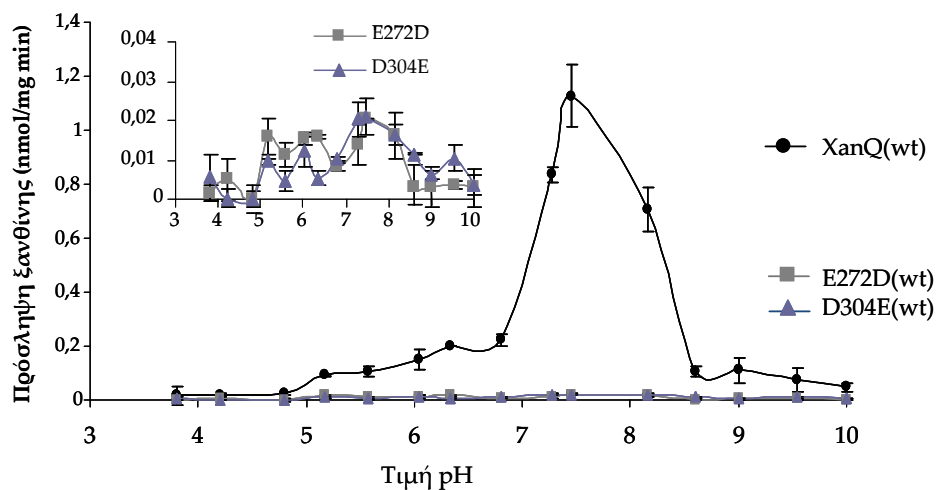


Εικόνα 3.1.16: Έκφραση και τιμές ενεργότητας των μεταλλαγμάτων στις θέσεις 272 και 304 της XanQ(wt).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.3.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων % XanQ(wt) (βλ Εικόνα 3.1.3).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.4.



Εικόνα 3.1.17: Εξάρτηση της ενεργότητας μεταφοράς [³H] ξανθίνης από το pH για την περμεάση XanQ(wt)-BAD και τα μεταλλάγματα XanQ-E272D(wt)-BAD και XanQ-D304E(wt)-BAD.

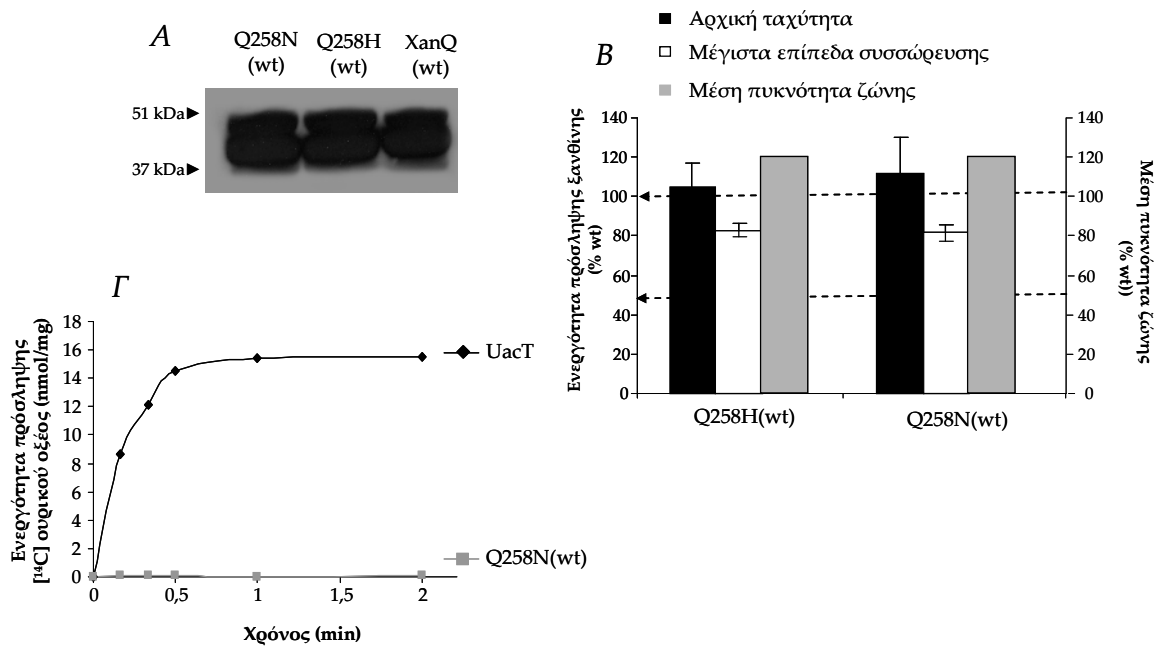
Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1μM), όπως μετρήθηκαν σε pH 3.8, 4.2, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.33, 6.8, 7.3, 7.45, 8.2, 8.6, 9.0, 9.5, 10.0. Οι τιμές αρχικής ταχύτητας μετρήθηκαν σε χρόνους 10-30 sec, με κάθετες γραμμές κύμανσης που αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Το διάγραμμα που φαίνεται σε ένθετο παρουσιάζει σε μεγέθυνση τα αποτελέσματα για τις περμεάσες XanQ-E272D(wt)-BAD και XanQ-D304E(wt)-BAD.

3.1.1.6.5 Η γλουταμίνη 258 (Gln-258) στο TM8 του XanQ: Αντικατάσταση με ασπαραγίνη επηρεάζει την εξειδίκευση

Λειτουργικός χαρακτηρισμός (έκφραση, ενεργότητα, κινητική ανάλυση, προφίλ εξειδίκευσης, ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος)

Η γλουταμίνη 258 (Gln-258) δεν συντηρείται σημαντικά στην οικογένεια NCS2, αλλά βρίσκεται στο TM8 του XanQ (Εικόνα 3.1.1), στο οποίο υπάρχουν κατάλοιπα με σημαντικό λειτουργικό ρόλο και υψηλής συντήρησης (Glu-272, Asp-276), ενώ παράλληλα το μετάλλαγμα Q258C είναι το μοναδικό από την εξεταζόμενη ομάδα μεταλλαγμάτων (Εικόνα 3.1.6) που η ενεργότητα του αναστέλλεται σημαντικά (κατά 50%) μετά την προεπάση με NEM (2 mM). Για εκτενέστερη κατανόηση του ρόλου της Gln-258, κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα Q258H και Q258N και βρέθηκε ότι εκφράζονται στη μεμβράνη της *E. coli* σε επίπεδα ελαφρώς μεγαλύτερα (120%) από αυτά της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.18A, B) και εμφανίζουν υψηλές τιμές ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης [82-112% της XanQ(wt), Εικόνα 3.1.18Γ].

Στη συνέχεια έγιναν πειράματα κινητικής ανάλυσης και μελετήθηκε το προφίλ εξειδίκευσης των δύο μεταλλαγμάτων. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι τα Q258H και Q258N μεταφέρουν ξανθίνη με τιμές K_m και V_{max} στα επίπεδα του XanQ(wt) (Πίνακας 3.1.8). Τα πειράματα ανταγωνισμού από μια σειρά άλλων πουρινών και δομικών αναλόγων ξανθίνης φανερώνουν ότι το μετάλλαγμα Q258H εμφανίζει το ίδιο προφίλ εξειδίκευσης με αυτό της XanQ(wt), ενώ το Q258N διαφοροποιείται στα υποστρώματα ουρικού οξέος και γουανίνης που φαίνεται να τα αναγνωρίζει (Πίνακας 3.1.9). Ωστόσο, πειράματα μέτρησης της ενεργότητας [14 C]ουρικού οξέος σε συγκέντρωση 80μM δίνουν μηδενικές τιμές και για το μετάλλαγμα Q258N (Εικόνα 3.1.18Γ).



Εικόνα 3.1.18: Έκφραση και τιμές ενεργότητας των μεταλλαγμάτων στις θέσεις 272 και 304 της XanQ(wt).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.3.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων % XanQ(wt) (βλ Εικόνα 3.1.3) και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς έγινε σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.4.

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος (80 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν την κατασκευή Q258N από πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Q258N)-BAD, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.12.

Πίνακας 3.1.8: Τιμές K_m και V_{max} περμεασιών με μεταλλαγές στην θέση Asn-258 του XanQ. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (0,1–100μM, βλ. Πίνακα 3.1.1).

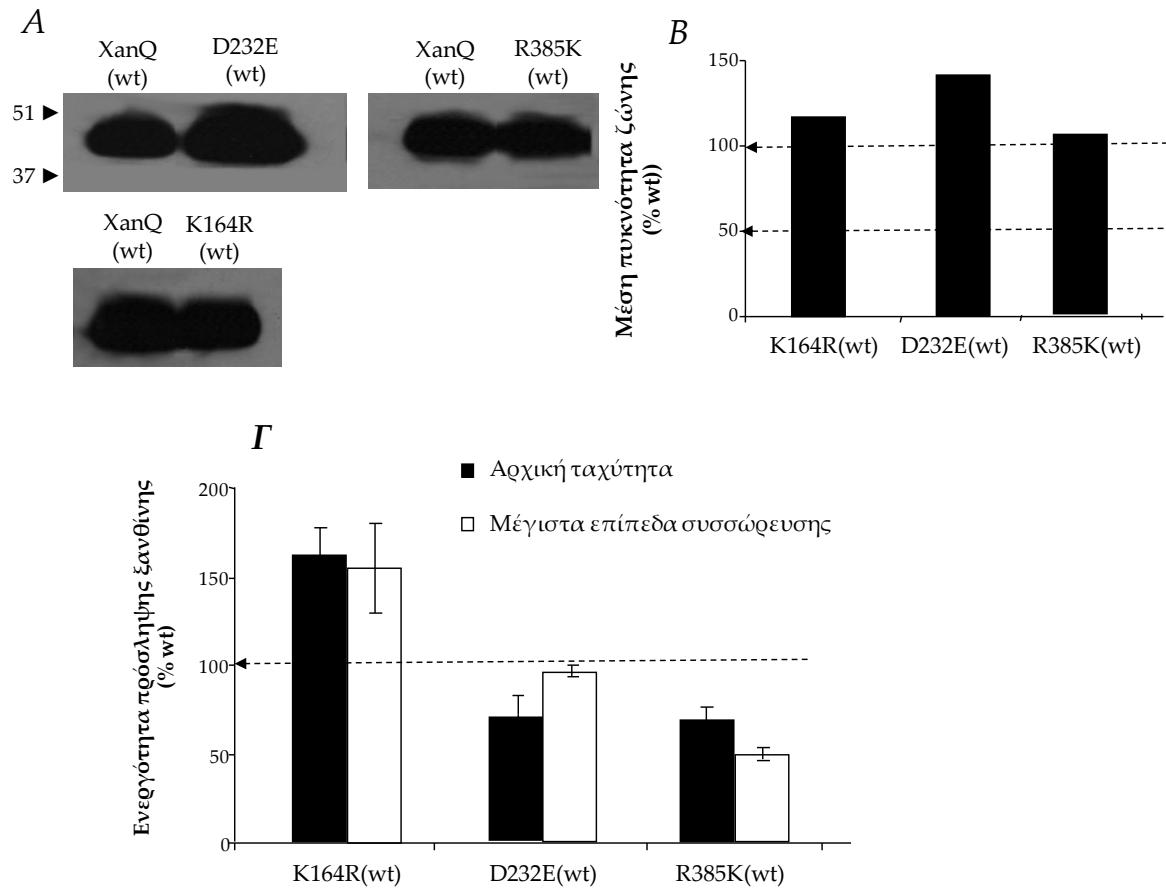
Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
Q258N(wt)	2.7 ± 1.5	4.8 ± 0.7	1778
Q258H(wt)	2.5 ± 1.1	4.7 ± 0.8	1880

Πίνακας 3.1.9: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων στη θέση 258 (TM8) του XanQ. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3, Πίνακα 3.1.2).

Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης που διατηρείται		
	XanQ(wt)	Q258N(wt)	Q258H(wt)
–	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	26	94
Υποξανθίνη	96	67	78
Αδενίνη	96	95	90
Γουανίνη	94	33	67
Ουρακίλη	101	85	87
1-Μεθυλοξανθίνη	45	42	48
2-Θειοξανθίνη	13	6	15
3-Μεθυλοξανθίνη	25	39	44
6-Θειοξανθίνη	20	10	15
7-Μεθυλοξανθίνη	105	116	124
8-Μεθυλοξανθίνη	96	69	97
Αλλοπουρινόλη	106	113	147
Οξυπουρινόλη	31	14	23

3.1.1.6.6 Τα κατάλοιπα Lys-164 (TM5), Asp-232 (TM7) και Arg-385 (TM12): Οι αντικαταστάσεις τους δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την ενεργότητα

Τα κατάλοιπα Lys-164 (TM5), Asp-232 (TM7) και Arg-385 (TM12) δεν είναι συντηρημένα στην οικογένεια NCS2 αλλά βρίσκονται κοντά σε περιοχές υψηλής συντήρησης (Εικόνα 3.1.2) και τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης παρουσιάζουν τιμές ενεργότητας μικρότερες του 50% του Cys-less XanQ (Εικόνα 3.1.4), που όμως σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.3). Η αντικατάσταση της Lys-164 και της Arg-385 με αμινοξέα που διατηρούν τη δυνατότητα ύπαρξης θετικού ιοντικού φορτίου στις θέσεις αυτές (Arg, Lys) οδήγησε σε περμεάσες που εκφράζονται στη μεμβράνη της *E. coli* σε επίπεδα παρόμοια [R385K(wt)] ή και ελαφρώς μεγαλύτερα [K164R(wt)] από αυτά της φυσικού τύπου XanQ (Εικόνα 3.1.19A,B) και, αντίστοιχα, υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, δηλαδή περίπου 50-60% [R385K(wt)] και 150% [K164R(wt)] σε σχέση με την περμεάση φυσικού τύπου (Εικόνα 3.1.20Γ). Παράλληλα, κατασκευάστηκε το μετάλλαγμα D232E(wt) που μειώνει την πλευρική αλυσίδα αλλά διατηρεί την καρβοξυλομάδα στην θέση αυτή. Η περμεάση D232E(wt) εκφράζεται στη μεμβράνη της *E. coli* σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά της XanQ(wt) στο 140% (Εικόνα 3.1.19A,B) και έχει πολύ υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης [75-80% της XanQ(wt)] (Εικόνα 3.1.19Γ).



Εικόνα 3.1.19: Έκφραση και τιμές ενεργότητας των μεταλλαγμάτων στις θέσεις 164, 232 και 385 της XanQ(wt).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.3.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων % XanQ(wt) (βλ Εικόνα 3.1.3).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]Ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.4.

Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.1.1

Από τα τριάντα ένα (31) ισχυρά πολικά ή δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα της περμεάσης XanQ που εντοπίστηκαν να εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα (σε περιοχές α – ελίκων, β -πτυχωτών φύλλων ή περιοχές ελεύθερης διαμόρφωσης), τα είκοσι δύο (22) που δεν είχαν ήδη μελετηθεί αναλύθηκαν διεξοδικά και χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά [His-22, Gln-23, Thr-30, His-31 (TM1), Glu-55, Gln-75 (TM2), Gln-90 (TM3), Asn-93 (α 3), Lys-164 (TM5), Asn-184, Glu-186, His-187 (TM6), Asp-232 (TM7), Lys-249, His-257, Gln-258, Glu-272 (TM8), Asp-304 (TM9), Arg-341 (TM11), Arg-385, Asn-390 (TM12), Asp-413 (α 13)]. Τα αποτελέσματα και τελικά συμπεράσματα αυτής της ενότητας, που οδήγησαν στην χαρτογράφηση σημαντικών καταλοίπων, δίνονται συνοπτικά παρακάτω.

Κατάλοιπα σημαντικά για την λειτουργία της περμεάσης (Εικόνα 3.1.20) εντοπίζονται στα TM1 (His-31), TM2 (Gln-75), TM3 (Asn-93), TM8 (Glu-272) και TM9 (Asp-304). Συγκεκριμένα:

1. Η απόλυτα συντηρημένη **His-31** (TM1), κατάλοιπο με υδρόφιλο χαρακτήρα, εμφανίζεται πιθανόν χωρίς φορτίο σε pH 7.5 και προσβάσιμη από το υδρόφιλο περιβάλλον (όπως υποστηρίζεται από την μηδενική ή οριακά ανιχνεύσιμη έκφραση και ενεργότητα των H31K και H31R, την προσβασιμότητα της H31C στο MTSES και την απενεργοποίηση που υφίσταται η H31C από το MTSEA⁺). Ο κύριος ρόλος της φαίνεται να είναι η συμμετοχή της σε δεσμό υδρογόνου (με την Asn-325 σύμφωνα με κρυσταλλογραφικό μοντέλο), που είναι καθοριστικός για την υψηλή συγγένεια αναγνώρισης του υποστρώματος (ξανθίνης) αλλά δεν συμμετέχει άμεσα στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος (όπως υποστηρίζεται από την χαμηλή συγγένεια αναγνώρισης της ξανθίνης και αναλόγων ξανθίνης που εμφανίζουν οι H31C και H31L, σε αντίθεση με τις H31N και H31Q που έχουν υψηλή συγγένεια και από την έλλειψη παρεμπόδισης από την ξανθίνη στο πείραμα αλκυλίωσης της H31C *in vivo*).

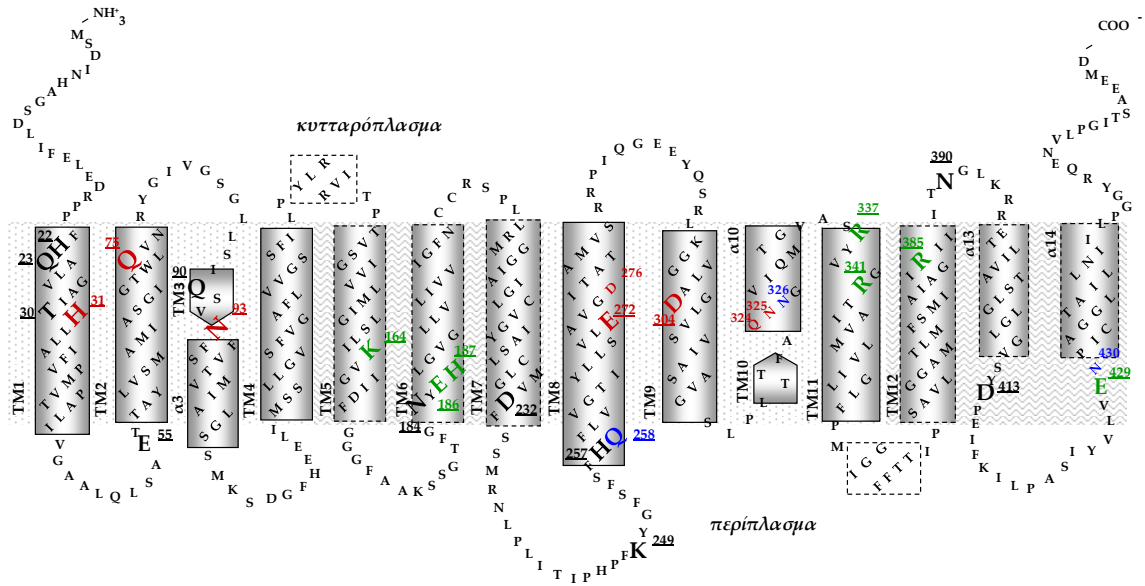
2. Το επίσης απόλυτα συντηρημένο (στον κλάδο NCS2/COG2233) κατάλοιπο **Gln-75** (TM2) της περμεάσης XanQ αποδεικνύεται αναντικατάστατο για την δομική σταθερότητα και/ή λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης, καθώς οι αντικαταστάσεις στη θέση αυτή οδήγησαν είτε σε πολύ χαμηλά (Q75A) έως μηδενικά (Q75E, Q75C) επίπεδα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη είτε σε κανονική έκφραση αλλά σχεδόν μηδενικές τιμές ενεργότητας (Q75N).

3. Ο ρόλος της **Asn-93** (TM3) φαίνεται να είναι καθοριστικός για την επιλεκτικότητα της περμεάσης XanQ για την ξανθίνη έναντι του ουρικού ή άλλων υποστρωμάτων με τροποποιήσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο, όπως

υποστηρίζεται από την αλλαγή εξειδίκευσης και την σημαντική ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος που εμφανίζουν οι N93A και N93S, τις αλλαγές στο προφίλ εξειδίκευσης των N93D και N93T και την δομική μοντελοποίηση που προβλέπει ότι η θέση Asn-93 βρίσκεται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος.

4. Τα **Glu-272** (TM8) και **Asp-304** (TM9) είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης, καθώς τα μεταλλάγματα στις θέσεις αυτές ήταν πλήρως ανενεργά (E272Q/C, D304E/N/C) ή με ελάχιστη ενεργότητα (E272D) και η αναγκαιότητα της παρουσίας των καρβοξυλομάδων στις θέσεις αυτές δεν επηρεάζεται από το pH (E272D και D304E παραμένουν πρακτικά ανενεργά σε pH από 4 έως 10).

Επίσης, από τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης που μελετήθηκαν, μόνο η ενεργότητα του Q258C (TM8) αναστέλλεται σημαντικά (κατά 50%) μετά την αντίδραση αλκυλίωσης με NEM (2 mM, 10 min), ενώ μικρή αύξηση της ενεργότητας εμφανίζουν τα Q23C και K249C. Η επώαση εξάλλου με αλκυλιωτικά αντιδραστήρια αρνητικού ή θετικού φορτίου (MTSES⁻ ή MTSEA⁺) δεν αναστέλλει την ενεργότητα κανενός από τα μεταλλάγματα όπου η κυστεΐνη αντικαθιστά δυνητικά ιοντιζόμενο κατάλοιπο της περμεάσης (E55C, E186C, D232C, E429C, ή H22C, K164C, H187C, K249C, H257C, R337C, R341C, R385C), ενώ η αύξηση στην ενεργότητα των E186C και E429C από το MTSES⁻ και των K164C, H187C, R337C, R341C και R385C παρουσία MTSEA⁺ υποδεικνύει την προσβασιμότητα των θέσεων αυτών από το υδρόφιλο περιβάλλον.



Εικόνα 3.1.20: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το μοντέλο της Εικόνας 3.1.1 τροποποιημένο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Ενότητας 3.1. Σε μεγέθυνση με κόκκινο χρώμα γραμματοσειράς και υπογραμμισμένη αρίθμηση τονίζονται τα σημαντικά ή/και αναντικατάστατα για την λειτουργία της περμεάσης κατάλοιπα, ενώ με μικρότερου μεγέθους επίσης κόκκινα αριθμημένα γράμματα σημειώνονται οι θέσεις που έχουν αποδειχθεί σημαντικές από άλλες μελέτες του εργαστηρίου μας. Με μπλε χρώμα σημειώνονται κατάλοιπα ευαίσθητα στην απενεργοποίηση από το NEM και με πράσινο χέσεις προσβάσιμες από το MTSEA⁺ ή MTSES⁻ (βλ. 3.1.1.4). Τα υπόλοιπα κατάλοιπα που μελετήθηκαν στην Ενότητα 3.1 αλλά δεν ανήκουν σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες σημειώνονται εδώ με μαύρα μεγεθυμένα αριθμημένα γράμματα.

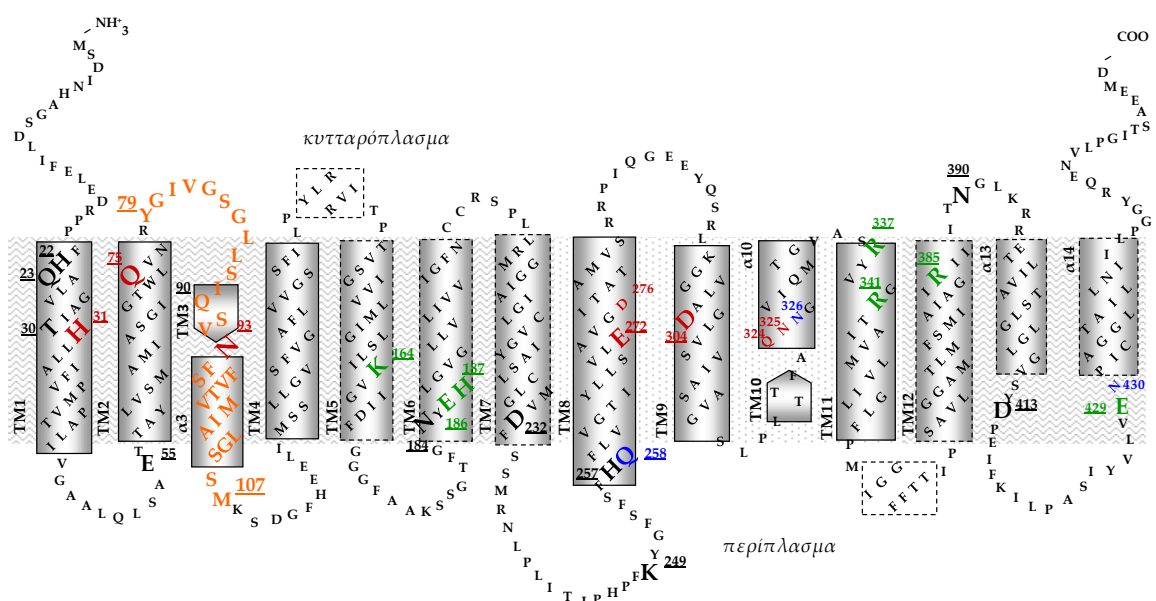
3.1.2 Ο ρόλος του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) της περμεάσης ξανθίνης XanQ

Η μελέτη των πολικών και δυνητικά φορτισμένων καταλοίπων αμινοξέων της περμεάσης XanQ σε διαμεμβρανικές α -έλικες (βλ. 3.1.1) ανέδειξε την Asn-93 στο μέσο του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) της πρωτεΐνης ως πολύ σημαντική για την εξειδικευμένη και υψηλής συγγένειας αναγνώριση του υποστρώματος (ξανθίνης) από τον μεταφορέα. Για να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος του TM3, στην συνέχεια της μελέτης, έγινε συστηματική μεταλλαξιγένεση της XanQ στις θέσεις είκοσι επτά (27) καταλοίπων στην αλληλουχία από την Tyr-79 μέχρι την Met-107 (εκτός των Gln-90 και Asn-93, που έχουν ήδη μελετηθεί - βλ. 3.1.1). Τα πειραματικά αποτελέσματα, που παρουσιάζονται παρακάτω, αναδεικνύουν επιπλέον σημαντικές θέσεις αμινοξέων του TM3 οι οποίες βρίσκονται σε συνεχόμενες περιοχές αλληλουχίας και σχηματίζουν χαρακτηριστικά μοτίβα. Καθώς τα πειράματα της ενότητας αυτής ήταν σε εξέλιξη, παρουσιάστηκε η δημοσίευση της κρυσταλλικής δομής του ομολόγου μεταφορέα UraA, η πρώτη και μοναδική έως σήμερα για έναν μεταφορέα που ανήκει στην οικογένεια NCS2 (Lu *et al.*, 2011), η οποία ενίσχυσε την ορθότητα του σχεδιασμού της πειραματικής μας προσέγγισης. Σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο, το TM3 ανήκει στην δομική περιοχή του «πυρήνα» (βλ. 1.2.2.3), η οποία αποτελείται από διαμεμβρανικά τμήματα δομημένα σε δύο αντίστροφες επαναλήψεις μη συνεχόμενες στην αλληλουχία: TM1-TM4 στο αμινοτελικό και TM8-TM11 στο καρβοξυτελικό ήμισυ της πρωτεΐνης, και περιέχει θέσεις αμινοξέων που συνεισφέρουν στο κέντρο δέσμησης (Lu *et al.*, 2011).

Η δομική μοντελοποίηση των XanQ (Karena and Frillingos, 2011) και UraA (Amillis *et al.*, 2011), στηριζόμενη στο δημοσιευμένο κρυσταλλογραφικό μοντέλο του UraA, υπέδειξε ότι στην δομική περιοχή του «πυρήνα» (TM1-TM4 και TM8-TM11) ανήκουν κατάλοιπα, που από προηγούμενες μελέτες είχε αποδειχθεί ότι είναι αναντικατάστατα για τον μηχανισμό λειτουργίας ή /και για την εξειδικευμένη πρόσδεση των υποστρωμάτων στα αντίστοιχα κέντρα δέσμησης του XanQ (Karena and Frillingos, 2009; Mermelekas *et al.*, 2010; Georgopoulou *et al.*, 2010) ή του UraA (Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008, Kosti *et al.*, 2010). Στο εργαστήριο μας είχαν ήδη μελετηθεί πλήρως όλες οι περιοχές αλληλουχίας που ανήκουν στα διαμεμβρανικά τμήματα του καρβοξυτελικού ημίσεος της περμεάσης XanQ (TM8-TM11) (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009; Mermelekas *et al.*, 2010), ενώ με την παρούσα μελέτη είναι η πρώτη φορά που γίνεται εκτενής ανάλυση ενός διαμεμβρανικού τμήματος του «πυρήνα» προς την αμινοτελική πλευρά (TM3).

3.1.2.1 Στοιχισή των καταλοίπων αμινοξέων του TM3

Στην περιοχή που μελετάμε (Tyr-79 μέχρι Met-107), σύμφωνα πάντα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο (βλ. 1.2.2.3), την υδρόφιλη συνδετική περιοχή ανάμεσα στο δεύτερο και το τρίτο διαμεμβρανικό τμήμα της περμεάσης XanQ (Tyr-79 μέχρι Ser-84) ακολουθεί, διαδοχικά, μία σχετικά υδρόφοβη περιοχή ελεύθερης διαμόρφωσης (Gly-85, Leu-86, Leu-87, Ser-88, Ile-89), μία μικρή β-πτυχωτή επιφάνεια (β_3) (Gln-90, Ser-91, Val-92) αντιπαράλληλη προς την αντίστοιχη του TM10 (β_{10}), μία συνδετική στροφή (Asn-93, Phe-94, Ser-95) και μία περιοχή διαμεμβρανικής α -έλικας [(α_3) Phe-96 μέχρι Met-107] (Εικόνα 3.1.21).



Εικόνα 3.1.21: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ

Το μοντέλο της Εικόνας 3.1.20 στο οποίο εκτός από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.1 τονίζονται με πορτοκαλί γράμματα τα κατάλοιπα της ευρύτερης περιοχής που περιλαμβάνει το TM3 και που μελετώνται σε αυτή την ενότητα. (Υπενθυμίζεται ο συμβολισμός των μεγεθυμένων καταλοίπων: **σημαντικά ή/και αναντικατάστατα για την λειτουργία του μεταφορέα, ευαίσθητα στο NEM, προσβάσιμα από υδρόφιλο SH-αντιδραστήριο**, μελετήθηκαν στην ενότητα 3.1.1)

Η ανάλυση στοιχισής των αλληλουχιών των δέκα τριών χαρακτηρισμένων μελών μεταφορέων ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος της οικογένειας NCS2 (κλάδος COG2233) (Εικόνα 3.1.22) αποκαλύπτει ότι: (α) οι θέσεις Gly-83 και Phe-94 είναι απόλυτα συντηρημένες και (β) οι θέσεις Leu-86 και Val-97 διατηρούν τον υδρόφοβο χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας (λευκίνη, ισολευκίνη ή βαλίνη). Υπενθυμίζεται ότι η θέση 93, που στον μεταφορέα XanQ υπάρχει ως κατάλοιπο ασπαραγίνης, συντηρεί τον πολικό της χαρακτήρα αφού εμφανίζεται ως ασπαραγίνη, σερίνη ή θρεονίνη σε όλους

τους μεταφορείς 2-οξυ-πουρινών που ανήκουν στην οικογένεια NCS2/COG2233.

	H1				β ₃				α ₃				EL2																	
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
XanQ	Y	G	I	V	G	S	G	L	L	S	I	Q	S	V	N	F	S	F	V	T	V	M	I	A	L	G	S	S	M	<i>E. coli</i>
XanP	W	G	P	V	G	S	G	L	L	S	I	Q	G	T	S	F	N	F	V	A	P	L	I	M	G	G	T	A	L	<i>E. coli</i>
PbuX	S	N	R	F	G	I	G	L	P	V	V	L	G	C	T	F	T	A	V	S	P	M	I	A	I	G	-	-	-	<i>B. subtilis</i>
PucK	R	N	R	F	G	I	G	L	P	V	V	L	G	C	T	F	T	A	V	G	P	M	I	S	I	G	-	-	-	<i>B. subtilis</i>
PucJ	R	G	T	I	G	I	G	L	P	V	M	L	G	S	S	F	V	A	V	T	P	M	I	A	I	G	-	-	-	<i>B. subtilis</i>
UacT	I	G	R	M	G	I	R	L	P	V	I	M	S	V	T	F	A	A	V	T	P	M	I	A	I	G	-	M	N	<i>E. coli</i>
SmLL8	L	T	R	I	G	I	R	L	P	V	M	M	G	V	T	F	A	A	V	G	P	M	V	S	M	A	A	M	T	<i>S. meliloti</i>
SmLL9	G	L	P	F	G	S	Q	L	P	L	V	Q	G	V	S	F	S	G	V	A	T	M	I	A	I	S	-	-	-	<i>S. meliloti</i>
AcS4X6	-	-	T	L	G	A	K	L	P	L	V	Q	G	V	S	F	A	G	V	A	T	M	V	A	I	I	-	-	-	<i>A. calcoaceticus</i>
AfUapA	L	R	I	I	G	T	G	L	I	S	V	V	G	T	S	F	S	T	I	T	V	A	S	G	T	F	S	Q	M	<i>A. fumigatus</i>
UapA	F	H	I	I	G	S	G	V	L	S	V	M	G	V	S	F	S	I	I	S	V	A	S	G	A	F	N	Q	M	<i>A. nidulans</i>
UapC	L	H	V	V	G	T	G	L	V	S	V	V	G	T	S	F	A	T	I	T	V	A	T	G	T	F	N	Q	M	<i>A. nidulans</i>
Xut1	F	H	I	I	G	T	G	L	L	S	V	V	G	T	S	F	A	T	I	T	I	V	T	K	A	F	P	M	M	<i>C. albicans</i>
UraA	-	-	-	C	K	G	K	I	P	A	Y	L	G	S	S	F	A	F	I	S	P	V	L	L	L	L	P	L	G	<i>E. coli</i>

ξανθίνη
 ουρικό οξύ
 ξανθίνη/
 ουρικό οξύ
 ουρακίλη
COG2233

Εικόνα 3.1.22: Στοιχισμός των αλληλουχιών του TM3 των χαρακτηρισμένων μεταφορέων-2-οξυ-πουρινών που ανήκουν στην οικογένεια NCS2/COG2233.

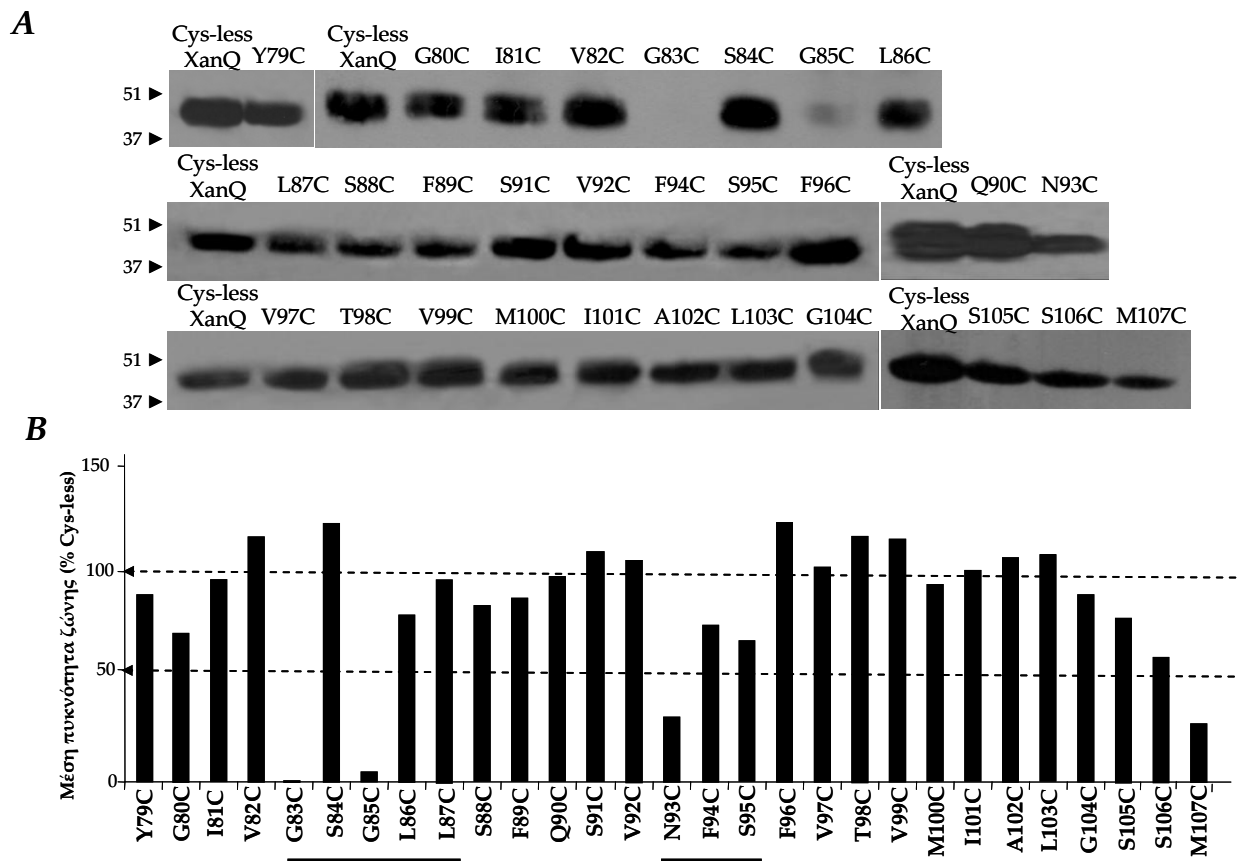
Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalW και στο σχήμα τονίζονται με κόκκινο φόντο οι απόλυτα συντηρημένες θέσεις και με γαλάζιο οι θέσεις που συντηρούν τον χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας αμινοξέος. Ως σύγκριση (παρα-ομάδα) δίνονται οι αντίστοιχες θέσεις στην αλληλουχία της περμεάσης ουρακίλης UraA.

3.1.2.2 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στο TM3 της XanQ

Χρησιμοποιώντας ως μοριακό υπόβαθρο την περμεάση XanQ με αλλαγμένα τα πέντε εγγενή κατάλοιπα Cys σε Ser (Cys-less XanQ) (Karatza *et al.*, 2006), σημασμένη στο C-τελικό της άκρο με το καρβοξυτελικό 12πεπτίδιο της LacY (LacY-epitope) και την δομική περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD) από την αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Karatza and Frillingos, 2005), κατασκευάστηκαν είκοσι επτά (27) μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης (single-Cys mutants) τα: Y79C, G80C, I81C, V82C, G83C, S84C, G85C, L86C, L87C, S88C, I89C, S91C, V92C, F94C, S95C, F96C, V97C, T98C, V99C, M100C, I101C, A102C, L103C, G104C, S105C, S106C, M107C (βλ. 2.5). Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας τους (MWG-Biotech, dsDNA sequencing), τα μεταλλάγματα αυτά εκφράστηκαν μέσω IPTG-επαγόμενων, πλασμιδιακών φορέων σε *E. coli* K-12 (T184) και ελέγχθηκαν καταρχήν ως προς τα επίπεδα έκφρασης και την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης.

Τα επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη των μεταλλαγμάτων μονών Cys στο TM3 της περμεάσης XanQ

Ανάλυση και ποσοτικοποίηση της ανοσοαποτύπωσης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης βάσει της αντίδρασης της αβιδίνης με την C-τελική περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD) έδειξε ότι είκοσι (20) από αυτά, τα Y79C, I81C, V82C, S84C, L86C, L87C, S88C, Q90C (βλ. 3.1.1.2), S91C, V92C, F96C, V97C, T98C, V99C, M100C, I101C, A102C, L103C, G104C, S105C, S106C, εκφράζονται στη μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια ή λίγο μεγαλύτερα (75-120%) από τα επίπεδα της Cys-less XanQ και έξι (6) μεταλλάγματα, G80C, I89C, S88C, F94C, S95C και M107C, εμφανίζουν επίπεδα έκφρασης στο 55-65% των επιπέδων της Cys-less XanQ (Εικόνα 3.1.23). Εξαίρεση στη γενική εικόνα αποτελούν δύο κατάλοιπα γλυκινών (Gly-83 και Gly-85), των οποίων η αντικατάσταση με κυστεΐνη οδηγεί σε μηδενικά (G83C) ή πολύ χαμηλά (G85C, 20% της Cys-less XanQ) επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.23). Υπενθυμίζεται ότι το μετάλλαγμα N93C (κεφάλαιο 3.1.1.2) εμφανίζει επίπεδα έκφρασης στο 25% της XanQ-Cys-less (Εικόνα 3.1.3 & 3.1.23).



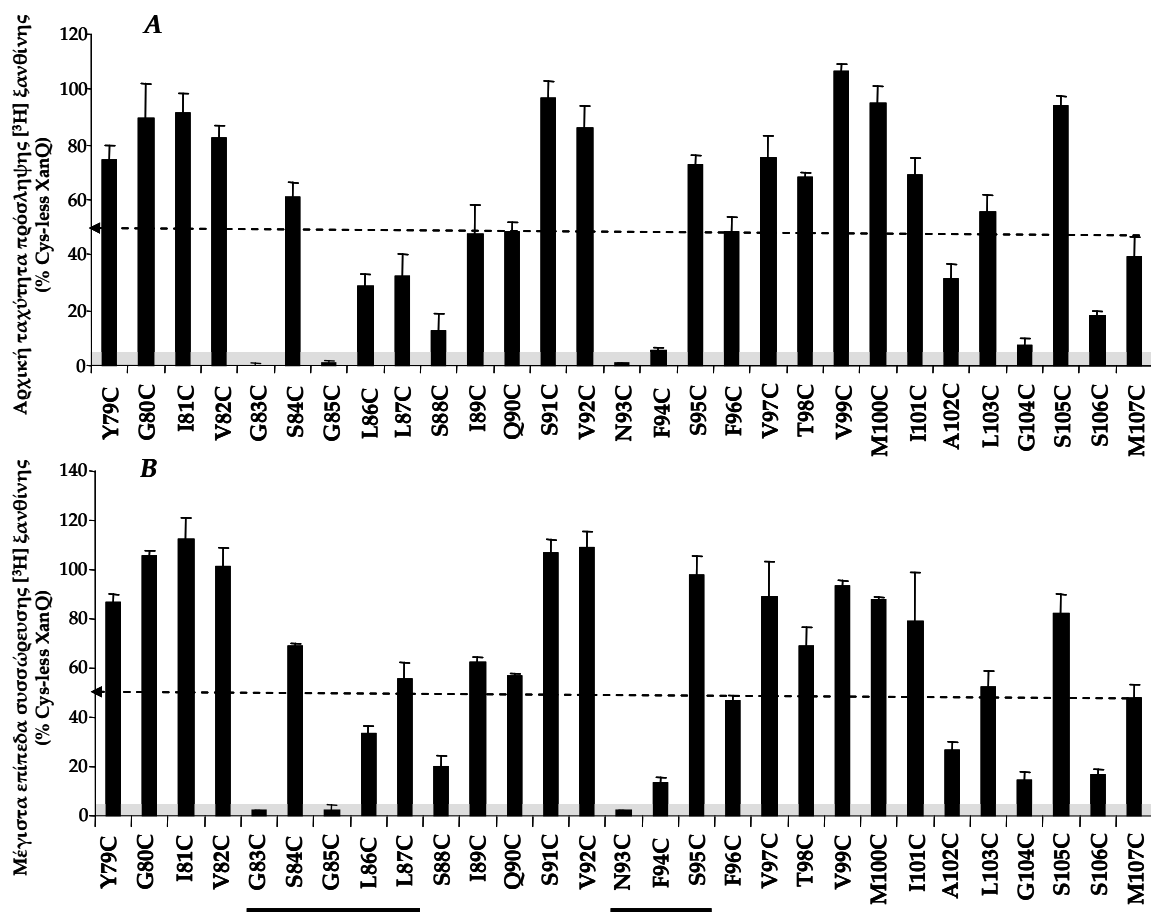
Εικόνα 3.1.23: Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης στην ευρύτερη περιοχή του TM3.

A. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως εκατοστιαίο ποσοστό της έκφρασης του XanQ Cys-less-BAD με το πρόγραμμα Quantity One (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων μονών Cys στο TM3 της περμεάσης XanQ

Στην συνέχεια εξετάσθηκε η ικανότητα των παραπάνω μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης για μεταφορά $[^3\text{H}]$ ξανθίνης, με πειραματική δοκιμασία ενεργού μεταφοράς. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.1.24A) καταδεικνύουν ότι η αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης: (α) για δεκαεννέα (19) μεταλλάγματα [Y79C, G80C, I81C, V82C, S84C, I89C, Q90C (βλ. 3.1.1.3), S91C, V92C, S95C, F96C, V97C, T98C, V99C, M100C, I101C, L103C, S105C, M107C] κυμαίνεται μεταξύ 40% και 105% της Cys-less XanQ, (β) για τρία (3) μεταλλάγματα (L86C, L87C, A102C) είναι περίπου στο 30% της Cys-less XanQ, (γ) για τέσσερα (4) μεταλλάγματα (S88C, F94C, G104C, S106C) είναι σε χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα (5-20% της Cys-less XanQ) και (δ) για τρία (3) μεταλλάγματα [G83C, G85C και N93C] είναι μηδενική, όπως αναμένεται άλλωστε από την μηδενική τους έκφραση στη μεμβράνη. Τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης για τα παραπάνω μεταλλάγματα εμφανίζουν την ίδια γενική εικόνα (Εικόνα 3.1.23B). Είκοσι (20) από αυτά [Y79C, G80C, I81C, V82C, S84C, L87C, I89C, Q90C (κεφ), S91C, V92C, S95C, F96C, V97C, T98C, V99C, M100C, I101C, L103C, S105C, M107C] συσσωρεύουν ξανθίνη σε επίπεδα 40-110% της Cys-less XanQ, έξι (6) μεταλλάγματα (L86C, S88C, F94C, A102C, G104C, S106C) εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα συσσώρευσης υποστρώματος (10-30% της Cys-less XanQ), δύο (2) μεταλλάγματα [G83C, G85C] είναι ανενεργά ως συνέπεια της μηδενικής τους έκφρασης στην μεμβράνη και ένα μετάλλαγμα (1) το N93C είναι ανενεργό με χαμηλά επίπεδα έκφρασης (25% της XanQ-Cys-less) (Εικόνα 3.1.23).

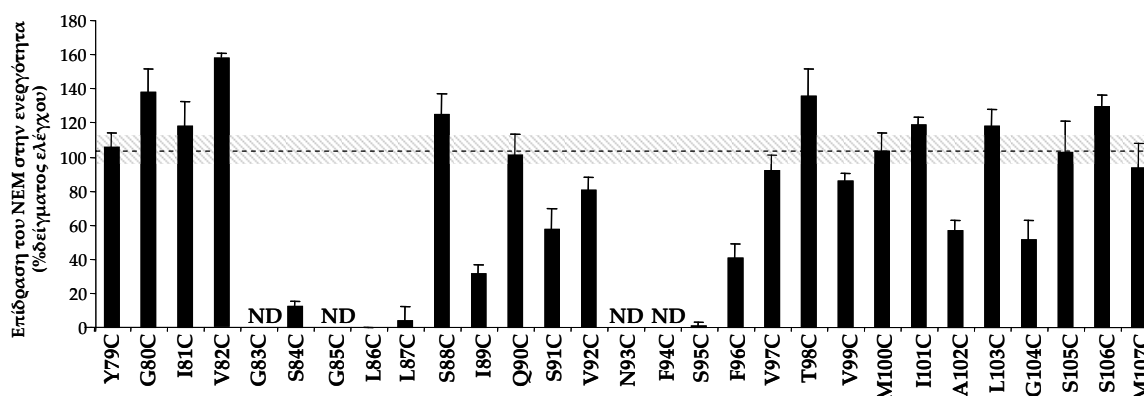


Εικόνα 3.1.24: Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης στην ευρύτερη περιοχή του TM3.

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL), υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά επί των αντίστοιχων τιμών της XanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Η τιμή του αρνητικού μάρτυρα αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. **A.** Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec) **B.** Τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min).

Επίδραση αλκυλιωτικών SH-αντιδραστηρίων στα μεταλλάγματα μονών Cys του TM3 της περμεάσης XanQ: Το μετάλλαγμα Cys στη θέση Leu-86 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε απενεργοποίηση με NEM

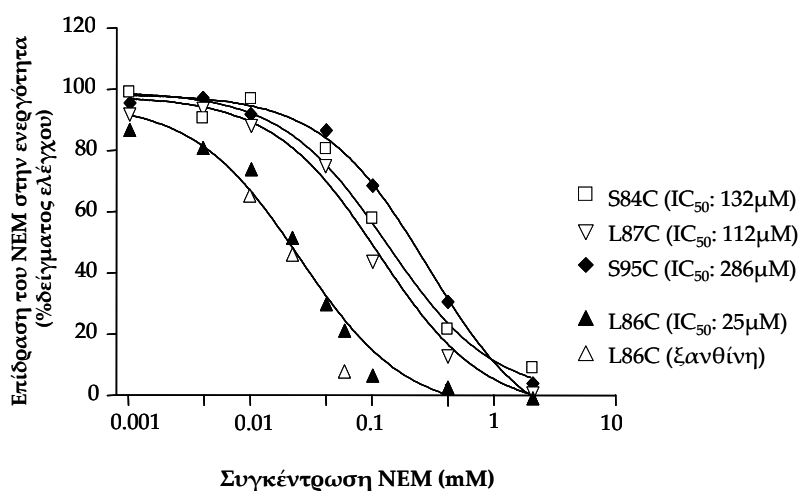
Στην συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην αρχική ταχύτητα των περμεασών μονής κυστεΐνης, που εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα ενεργότητας (αρχική ταχύτητα >20%). Μετά την προεπάση των είκοσι πέντε (25) αυτών περμεασών [Y79C, G80C, I81C, V82C, S84C, L86C, L87C, S88C, I89C, Q90C, S91C, V92C, S95C, F96C, V97C, T98C, V99C, M100C, I101C, A102C, L103C, G104C, S105C, S106C, M107C] με 2 mM NEM (Εικόνα 3.1.25) προέκυψε ότι: (α) για τέσσερα (4) μεταλλάγματα το NEM προκαλεί σχεδόν πλήρη αναστολή της αρχικής τους ταχύτητας (S84C κατά 90%, L87C κατά 98%, S95C κατά 99% και L86C κατά 100%), (β) για πέντε (5) μεταλλάγματα (I89C, S91C, F96C, A102C, G104C) η ενεργότητα αναστέλλεται κατά 40–70% σε σχέση με την αρχική τους ταχύτητα πριν την επάση, (γ) για τα υπόλοιπα δεκαέξι (16) μεταλλάγματα η ενεργότητα δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία του αντιδραστηρίου [μέχρι 1,5 φορές αύξηση ή μείωση της αρχικής ταχύτητας].



Εικόνα 3.1.25: Επίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης στην ευρύτερη περιοχή του TM3.

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/*xanQ* Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25° C, παρουσία NEM (2 mM), 10 min, 25°C (βλ. 2.9.4). Παρουσιάζονται οι ταχύτητες μέγιστης πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec), ως % ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία NEM για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα. Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στον μέσο όρο των τιμών της XanQ Cys-less-BAD (δείγμα ελέγχου) όπως μετρήθηκε σε παράλληλα πειράματα. Για τα μεταλλάγματα που έχουν μηδενική αρχική ταχύτητα δεν έγινε προσδιορισμός (ND).

Για τα μεταλλάγματα S84C, L86C, L87C και S95C, με τις οποίες παρατηρήθηκε η σχεδόν πλήρης αναστολή από το NEM (2 mM), το πείραμα επαναλήφθηκε για εύρος συγκεντρώσεων του αντιδραστηρίου (1 μ M μέχρι 2 mM), και υπολογίστηκε η συγκέντρωση που οδηγεί σε αναστολή της ενεργότητάς τους κατά 50% (IC_{50}), σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας του υποστρώματος (ξανθίνης) σε συγκέντρωση 1 mM. Τα αποτελέσματα έδειξαν (Εικόνα 3.1.26) ότι η ενεργότητα του μεταλλάγματος L86C επηρεάζεται με μεγάλη ευαισθησία από το NEM (IC_{50} , 25 μ M), κάτι που δεν αναιρείται από την παρουσία της ξανθίνης. Η αρχική ταχύτητα των μεταλλαγμάτων L87C, S84C και S95C εμφανίζει 4,5 με 11,5 φορές μικρότερη ευαισθησία στην αναστολή από το NEM (IC_{50} : 112 μ M, 132 μ M και 286 μ M, αντίστοιχα) σε σχέση με το L86C, γεγονός που επίσης δεν επηρεάζεται από την παρουσία του υποστρώματος (Εικόνα 3.1.26).



Εικόνα 3.1.26: Επίδραση του NEM στην ενεργότητα των S84C, L86C, L87C και S95C παρουσία του υποστρώματος.

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.24 για συγκεντρώσεις NEM 1 μ M έως 2 mM παρουσία (για το L86C) ή απουσία ξανθίνης (1mM). Οι πειραματικές τιμές προσαρμόστηκαν στη εξίσωση $y=B+(T-B)/(1+10^{((\log IC_{50}-\log x)h)})$ για δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη (πρόγραμμα Prism5), όπου y οι τιμές ενεργότητας, B (bottom) η ελάχιστη και T (top) η μέγιστη τιμή του y , h η μεταβλητή Hill και IC_{50} οι τιμές της συγκέντρωσης NEM που οδηγούν σε αναστολή ενεργότητας κατά 50%, όπως εξήχθησαν από την εξίσωση και αναγράφονται δίπλα από τα ονόματα.

3.1.2.3 Εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση καταλοίπων του TM3 της XanQ

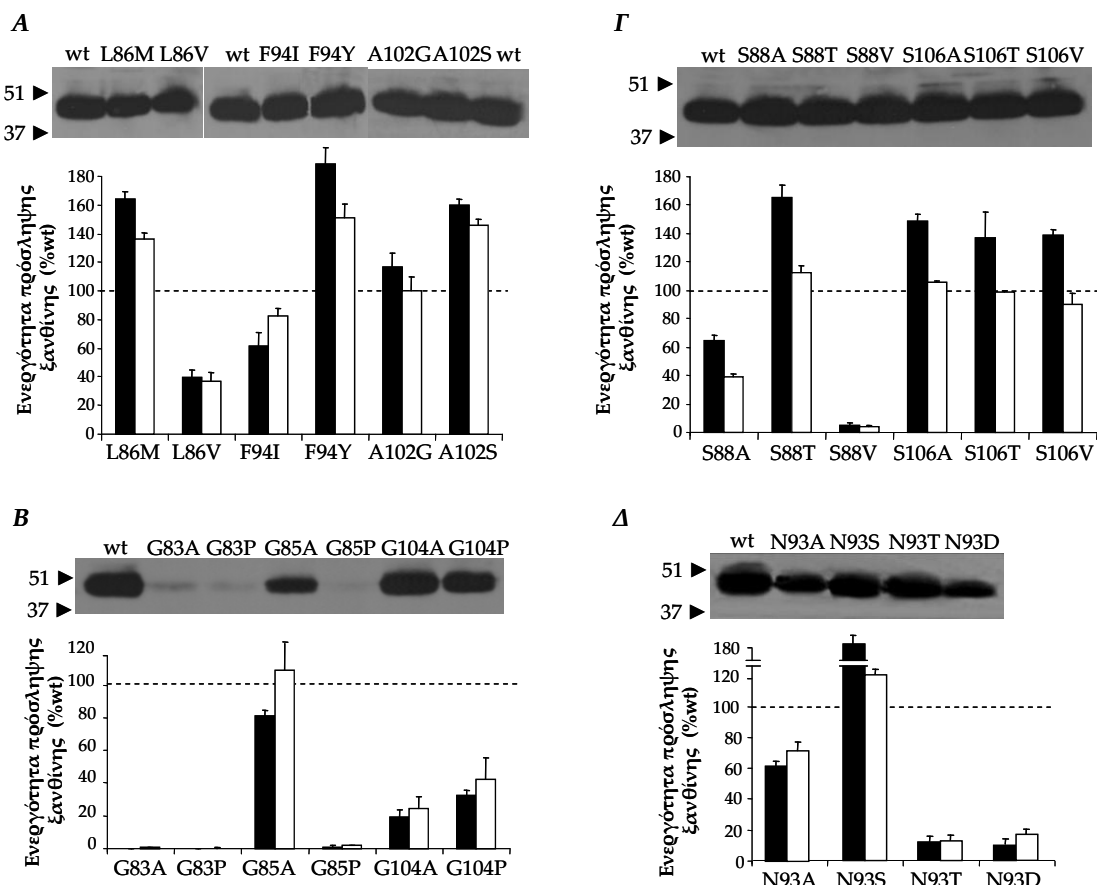
Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης και έκφραση στην μεμβράνη: Αλλαγές της Gly-83 οδηγούν σε απώλεια της έκφρασης στη μεμβράνη

Από την μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης προκύπτουν εννέα (9) θέσεις-κατάλοιπα των οποίων τα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης έχουν χαμηλή (L86C, S88C, F94C, A102C, G104C, S106C) ή μηδενική (G83C, G85C και N93C) ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Αυτές οι θέσεις αναλύθηκαν περαιτέρω κατασκευάζοντας μεταλλάγματα σε υπόβαθρο φυσικού τύπου [XanQ(wt)] που συμπεριλαμβάνουν αντικαταστάσεις με τις πιο συντηρητικές αλλαγές των εγγενών αμινοξέων. Για θέσεις όπου υπάρχει αμινοξύ με υδρόφοβη πλευρική ομάδα (Leu-86, Phe-94, Ala-102), κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα L86M(wt), L86V(wt), F94Y(wt), F94I(wt), A102G(wt) και A102S(wt), τα οποία αποδείχθηκε ότι εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.27A). Παράλληλα, τα ίδια μεταλλάγματα βρέθηκε ότι εμφανίζουν ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης στο 40% (L86V), 70% (F94I), 100% (A102G), 150% (L86M, A102S) και 170% (F94Y) σε σχέση με την XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.27A).

Για τις θέσεις με εγγενές κατάλοιπο γλυκίνης (Gly-83, Gly-85, Gly-104), κατασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά τα G83A(wt), G83P(wt), G85A(wt), G85P(wt), G104A(wt), και G104P(wt). Από αυτά τα μεταλλάγματα, τα G83A(wt), G83P(wt) και G85P(wt) βρέθηκε ότι είναι ανενεργές περμεάσες γεγονός που σχετίζεται με την αμελητέα έκφρασή τους στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.27B). Το G85A(wt) εμφανίζει σημαντικά επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη (αλλά κατά πολύ μειωμένα σε σχέση με την περμεάση φυσικού τύπου) και ενεργότητα σχεδόν στα επίπεδα της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.26B). Τα G104A(wt) και G104P(wt) εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στην μεμβράνη αλλά εμφανίζουν χαμηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης [20-40% της XanQ(wt)] (Εικόνα 3.1.27B).

Για τις θέσεις με εγγενές κατάλοιπο σερίνης (Ser-88, Ser-106), κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα S88A(wt), S88T(wt), S88V(wt), S106A(wt), S106T(wt) και S106V(wt), τα οποία βρέθηκε ότι εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της περμεάσης φυσικού τύπου (Εικόνα 3.1.27Γ). Τα μεταλλάγματα S88T(wt), S106A(wt), S106T(wt) και S106V(wt) εμφανίζουν ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης σε υψηλά επίπεδα (αρχική ταχύτητα 140–160% και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης 100% της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.27Γ). Το μετάλλαγμα S88A(wt) εμφανίζει αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης του υποστρώματος στο 60% και 50% αντίστοιχα της XanQ(wt), ενώ η αντικατάσταση της Ser-88 με βαλίνη δίνει το

μετάλλαγμα S88V(wt) με αμελητέα ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης (2% της ΧανQ(wt)). Στο σημείο αυτό, υπενθυμίζεται ότι η εκτενής μεταλλαξιγένεση της Asn-93 είχε αποκαλύψει ότι η αντικατάσταση της εγγενούς ασπαραγίνης με θρεονίνη ή με ασπαρτικό οδηγεί σε χαμηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης [10–20% του ΧανQ(wt), Εικόνα 3.1.27Δ].



Εικόνα 3.1.27: Έκφραση και ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων σε μοριακό υπόστρωμα αγρίου τύπου στις θέσεις A. 86, 94, 102 B. 83, 85, 104 Γ. 88,106 και Δ. 93.

Στο επάνω μέρος κάθε εικόνας κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) κυττάρων *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

Στο κάτω μέρος κάθε εικόνας, τα ίδια μεταλλάγματα σε κύτταρα *E. coli* T184 (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Με μαύρες στήλες φαίνονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec) και με άσπρες τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min) ως % ποσοστά των τιμών της ΧανQ (wt)-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Κινητική ανάλυση και μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης των F94Y, F94I και S95C: Οι Phe-94 και Ser-95 είναι σημαντικές για την βέλτιστη αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης με αλλαγές στον πυριμιδινικό δακτύλιο

Τα πειραματικά αποτελέσματα που εκτέθηκαν μέχρι αυτό το σημείο από την εκτενή μεταλλαξιγένεση των καταλοίπων του TM3 καταδεικνύουν ότι τα κατάλοιπα με σημαντικό δομικό ή/και λειτουργικό ρόλο, συμπεριλαμβανομένων θέσεων με μερικώς ή ολικώς αναντικατάστατη πλευρική αλυσίδα και/ή ευαίσθητων σε απενεργοποίηση από το αντιδραστήριο NEM, εντοπίζονται σε δύο μικρές και καλά συντηρημένες στην οικογένεια NCS2 αλληλουχίες-μοτίβα (⁸³GxGLxx και ⁹³NFx). Η πρώτη αλληλουχία (⁸³GSGLLS⁸⁸) βρίσκεται στο κυτταροπλασματικό άκρο του TM3, ενώ η δεύτερη (⁹³NFS⁹⁵) εντοπίζεται περίπου στο μέσο του TM3 στην «ελεύθερη» περιοχή σύνδεσης της β-πτυχωτής επιφάνειας (β₃) με το τμήμα α-έλικας (α₃), κοντά στο πιθανό κέντρο δέσμευσης (Εικόνα 3.1.21) και περιέχει το κατάλοιπο Asn-93 που έχει αποδειχθεί ήδη ότι είναι σημαντικό για την εξειδίκευση του μεταφορέα (βλ. 3.1.1). Για την κατανόηση του πιθανού ρόλου των καταλοίπων του δεύτερου μοτίβου (⁹³NFS⁹⁵) στην εξειδικευμένη αναγνώριση του υποστρώματος (ξανθίνης) από την περμεάση XanQ, διενεργήθηκαν πειράματα κινητικής ανάλυσης και ανταγωνισμού της [8-³H] ξανθίνης με μια σειρά αναλόγων πουρίνης (βλ. 2.9.3) για τα ενεργά μεταλλάγματα των Asn-93 (έχει ήδη αναλυθεί βλ. 3.1.1.6.3), Phe-94 και Ser-95.

Η κινητική ανάλυση των F94Y, F94I και S95C αποδεικνύει ότι η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης στην θέση 94 (Phe-94) με ισολευκίνη (Ile) ή τυροσίνη (Tyr) οδηγεί, αντίστοιχα, σε 3 ή 8 φορές μεγαλύτερες τιμές της μέγιστης ταχύτητας πρόσληψης ξανθίνης (V_{max}) σε σύγκριση με την XanQ(wt) και ταυτόχρονη μείωση της συγγένειας (2 φορές αύξηση της K_m) και για τα δύο μεταλλάγματα. Επίσης, η παρουσία κυστεΐνης αντί της εγγενούς σερίνης στην θέση 95 (S95C) προκαλεί αύξηση της V_{max} κατά 3,5 φορές σε σχέση με την Cys-less XanQ χωρίς να επηρεάζεται η K_m (Πίνακας 3.1.10). Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης σε ανταγωνισμό με άλλα υποστρώματα/προσδέτες αποδεικνύουν ότι, σε σχέση με την περμεάση φυσικού τύπου, οι αντικαταστάσεις στην θέση Phe-94 εμποδίζουν την αναγνώριση των αναλόγων 2-θειοξανθίνη και 6-θειοξανθίνη (F94Y) [τιμές K_i 857 μ M και 1000 μ M, αντίστοιχα, έναντι 90 μ M και 40 μ M, αντίστοιχα, για την XanQ(wt)] ή 3-μεθυλοξανθίνη [F94I, K_i 904 μ M, έναντι 72 μ M για την XanQ(wt)], ενώ και το μετάλλαγμα S95C εμφανίζει σημαντικά μειωμένη ικανότητα αναγνώρισης των αναλόγων 2-θειοξανθίνη και 6-θειοξανθίνη [K_i 383 μ M και 294 μ M, αντίστοιχα, έναντι 90 μ M και 40 μ M, αντίστοιχα, για την XanQ(wt)] (Πίνακας 3.1.11).

Πίνακας 3.1.10: Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων στις θέσεις Phe-94 και Ser-95. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (0,1–100μM). Οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται στα 5-20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism6*, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
XanQ (Cys-less)	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.9	1858
F94I(wt)	9.4 ± 1.5	50.2 ± 3.0	5340
F94Y(wt)	9.5 ± 1.7	147.8 ± 9.8	15557
S95C(wt)	5.1 ± 1.6	33.9 ± 2.7	6647

Πίνακας 3.1.11: Προφίλ εξειδίκευσης μεταλλαγμάτων στις θέσεις Phe-94 και Ser-95. Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1 μM, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3). Οι αρχικές ταχύτητες (5-20 sec) από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5) παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες (μέσοι όροι τριών πειραμάτων με S.D. <15%). Οι σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με την περμεάση XanQ(wt) τονίζονται με έντονη γραφή.

% Ρυθμός πρόσληψης [3 H] ξανθίνης που διατηρείται

Ανταγωνιστής	XanQ(wt)	XanQ (C-less)	F94I(wt)	F94Y(wt)	S95C
–	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	101	116	52	99
Υποξανθίνη	96	97	136	93	105
Αδενίνη	96	105	123	89	117
Γουανίνη	94	89	114	96	97
Ουρακίλη	101	102	108	91	101
2-Θειοξανθίνη	13	33	3	40	11
3-Μεθυλοξανθίνη	25	15	53	15	10
6-Θειοξανθίνη	20	33	5	64	25
7-Μεθυλοξανθίνη	105	36	74	78	59
8-Μεθυλοξανθίνη	96	35	64	52	26
Αλλοπουρινόλη	106	93	130	93	97
Οξυπουρινόλη	31	16	17	12	2

Πίνακας 3.1.12: Τιμές K_i μεταλλαγμάτων στις θέσεις Phe-94 και Ser-95 της XanQ.

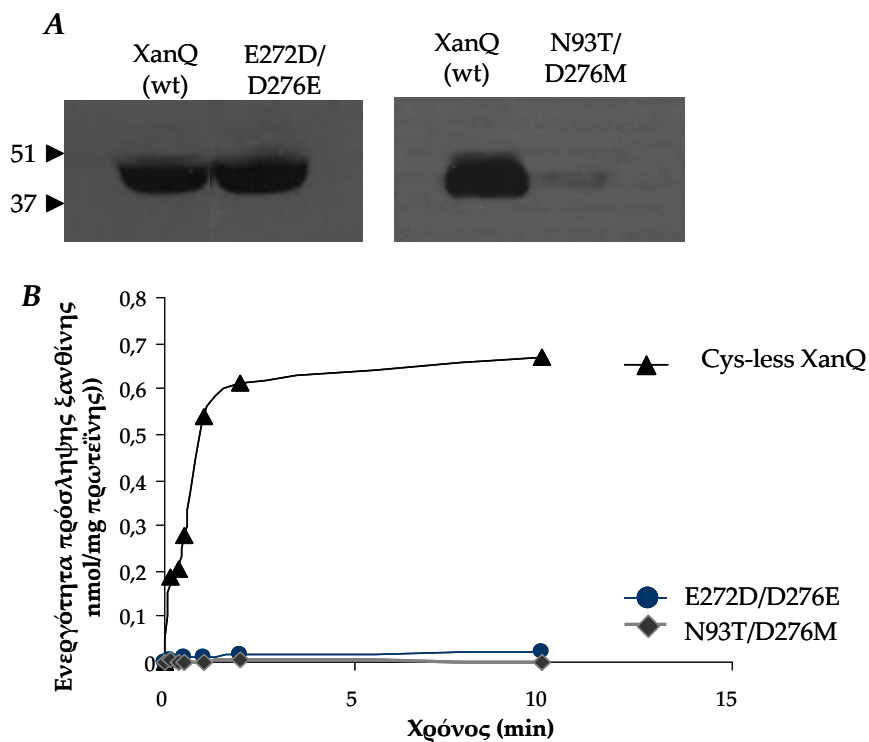
Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στον Πίνακα 3.1.11 για δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ξανθίνης (1 μM , 25 °C) αλλά μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες συγκεντρώσεων 0.1 μM έως 1mM, 5min (βλ. 2.9.3) Από την προσαρμογή των δεδομένων σε κατάλληλη εξίσωση για δόσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη (βλ. Εικόνα 3.1.6) υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος *Prism 5*. Στη συνέχεια, από τις τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν οι τιμές K_i με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης (1 μM). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 μετρήσεων με τυπικές αποκλίσεις <20%.

Ανταγωνιστής	K_i (μM)			
	XanQ(wt)	F94I(wt)	F94Y(wt)	S95C
Ουρικό οξύ	>1000	>1000	>1000	>1000
2-Θειοξανθίνη	90	81	~857	383
3-Μεθυλοξανθίνη	72	~904	101	52
6-Θειοξανθίνη	40	101	~1000	294
7-Μεθυλοξανθίνη	>1000	>1000	>1000	~1000
8-Μεθυλοξανθίνη	>1000	~1000	~905	458

3.1.2.4 Διπλά μεταλλάγματα σε σημαντικές θέσεις του TM3 και του TM8

Από τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των αντικαταστάσεων των 22 ισχυρά πολικών και δυνητικά φορτισμένων εγγενών αμινοξέων των διαμεμβρανικών τμημάτων της περμεάσης XanQ καθώς και των 27 καταλοίπων της περιοχής του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) της XanQ (βλ. 3.1.1 & βλ. 3.1.2), αναδείχθηκαν θέσεις με καθοριστικό ή και αναντικατάστατο ρόλο στην εξειδικευμένη αναγνώριση και μεταφορά του υποστρώματος (ξανθίνης). Από αυτές, ξεχωρίζουν οι θέσεις του λειτουργικά αναντικατάστατου Glu-272 (TM8) και της σημαντικής για την εξειδίκευση ως προς τη θέση 8 της ξανθίνης Asn-93 (TM3), οι οποίες μάλιστα βρίσκονται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης. Εξάλλου, μία στροφή α-έλικας μακριά από το Glu-272 (TM8), στη θέση 276, έχει αποδειχθεί από άλλες μελέτες (Mermelekas *et al.*, 2010) ότι απαιτείται η παρουσία μιας καρβοξυλομάδας (Asp-276 ή Glu, στο μετάλλαγμα D276E) για να υπάρχει σημαντική ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, ενώ η θέση αυτή πιθανόν συμμετέχει τόσο στον καθορισμό της εξειδίκευσης της XanQ (Mermelekas *et al.*, 2010) όσο και στην συμμεταφορά πρωτονίου (Mermelekas *et al.*, 2010, Lu *et al.*, 2011).

Στα πλαίσια μιας προσέγγισης για την κατανόηση των πιθανών λειτουργικών αλληλεπιδράσεων των παραπάνω τριών θέσεων, κατασκευάσαμε τα διπλά μεταλλάγματα N93T/D276M και E272D/D276E συνδυάζοντας στις παραπάνω σημαντικές θέσεις των TM8 και TM3 αντικαταστάσεις με αμινοξέα τα οποία είτε συναντώνται σε άλλα μέλη της οικογένειας NCS2 (π.χ. Thr-93 και Met-276 στον μεταφορέα ουρικού SmLL8), είτε διατηρούν ακέραιο τον χαρακτήρα των πλευρικών ομάδων αλλάζοντας όμως την γεωμετρία τους (Asp-272/Glu-276), με στόχο να εντοπίσουμε πιθανή αποκατάσταση της ενεργότητας ή την εμφάνιση κάποιου εναλλακτικού τρόπου λειτουργίας του μεταφορέα. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός (Εικόνα 3.1.28) απέδειξε ότι το διπλό μετάλλαγμα E272D/D276E μπορεί να διατηρήσει την έκφραση του μεταφορέα στην μεμβράνη αλλά ο εκφραζόμενος μεταφορέας δεν μπορεί να λειτουργήσει ενεργά, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι για τη λειτουργία είναι αναγκαία η παρουσία του γλουταμικού στην θέση 272. Από την άλλη πλευρά, ο συνδυασμός N93T/D276M δεν μπορεί να αποκαταστήσει έναν λειτουργικό μεταφορέα στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.27) καθώς το διπλό αυτό μετάλλαγμα δεν εκφράζεται καθόλου στην μεμβράνη και κατά συνέπεια δεν εμφανίζει ενεργότητα. Τα αποτελέσματα αυτά ισχυροποιούν το συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα Asn-93, Glu-272 και Asp-276 καθώς και ο τρόπος με τον οποίο συνδυάζονται οι πλευρικές τους ομάδες έχουν έναν αναντικατάστατο ρόλο για την σωστή λειτουργία του κέντρου δέσμευσης της περμεάσης XanQ.



Εικόνα 3.1.28: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων E272D/D276E και N93T/D276M.

A. Κλάσματα μεμβρανών (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) κυττάρων *E. coli* T184, που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αρραίωση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

B. Τα ίδια μεταλλάγματα σε κύτταρα *E. coli* T184 (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] Ξανθίνης (1 μ M), στους 25 $^{\circ}$ C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.1.2

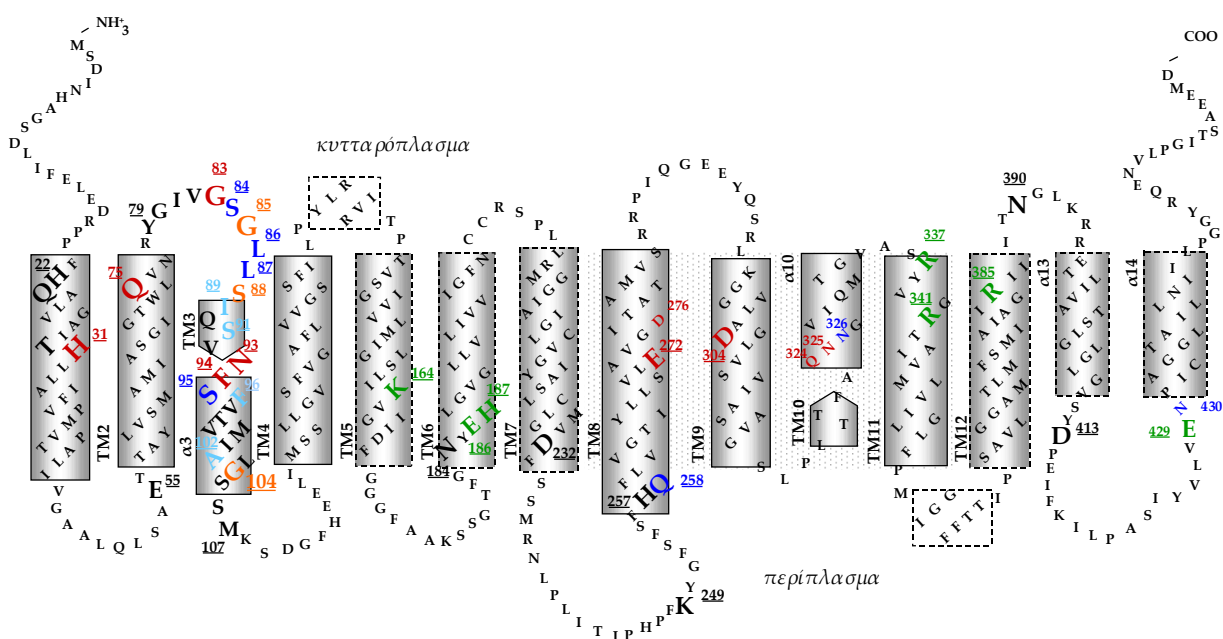
Έγινε για πρώτη φορά συστηματική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης της ευρύτερης περιοχής (Tyr-79 μέχρι Met-107) ενός διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) της δομικής περιοχής «πυρήνα» της περμεάσης XanQ προς την αμινοτελική πλευρά (TM1-TM4). Κατασκευάστηκαν είκοσι επτά (27) μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης (Y79C, G80C, I81C, V82C, G83C, S84C, G85C, L86C, L87C, S88C, I89C, S91C, V92C, F94C, S95C, F96C, V97C, T98C, V99C, M100C, I101C, A102C, L103C, G104C, S105C, S106C, M107C), τα οποία χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά, και σε θέσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο έγινε περαιτέρω εκτενής μεταλλαξιγένεση (το TM3 περιλαμβάνει και τα ισχυρά πολικά κατάλοιπα Gln-90 & Asn-93 τα οποία είχαν ήδη μελετηθεί στα πλαίσια της ενότητας 3.1.1). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τα σημαντικότερα κατάλοιπα του TM3 συγκεντρώνονται σε δύο μοτίβα αλληλουχίας, τα ⁸³GSGLL⁸⁷ και ⁹³NFS⁹⁵:

1. Στο μοτίβο ⁸³GSGLL⁸⁷ η Gly-83 (απόλυτα συντηρημένη στους μεταφορείς πουρινών της NCS2/COG2233) και, σε μικρότερο βαθμό, η Gly-85 (όπου συντηρείται μια πλευρική ομάδα μικρού μεγέθους) έχουν σημαντικό ρόλο για την έκφραση ή σταθερότητα της XanQ στην μεμβράνη, όπως υποστηρίζεται από τα μηδενικά επίπεδα που εμφανίζουν στη μεμβράνη τα μεταλλάγματα G83CA/P/C και G85P/C και τα σημαντικά μειωμένα επίπεδα του G85A, ενώ τα μεταλλάγματα S84C, L86C και L87C απενεργοποιούνται πλήρως από το NEM (και μάλιστα με μεγάλη ευαισθησία, IC₅₀ 132, 25 και 112 μM) χωρίς αυτό να αλλάζει παρουσία υποστρώματος (L86C).
2. Η κινητική ανάλυση και η μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων στις θέσεις **Phe-94** και **Ser-95** απέδειξε ότι τα αμινοξέα αυτά είναι σημαντικά για την βέλτιστη αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης με αλλαγές στον πυριμιδινικό δακτύλιο, ενώ το S95C απενεργοποιείται πλήρως παρουσία NEM (αν και με σχετικά μικρή ευαισθησία, IC₅₀ 286 μM). Τα δεδομένα αυτά μαζί με τα προηγούμενα αποτελέσματα για την **Asn-93** (βλ. 3.1.1.6.3), ότι δηλαδή αυτή η θέση είναι πολύ σημαντική για την εξειδίκευση της επιλογής της ξανθίνης έναντι του ουρικού ή άλλων υποστρωμάτων με τροποποιήσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο, καταδεικνύουν τον αναντικατάστατο ρόλο που φαίνεται να έχει το μοτίβο ⁹³NFS⁹⁵ ιδιαίτερα στον καθορισμό του χαρακτηριστικού προφίλ εξειδίκευσης της περμεάσης XanQ.
3. Με εκτενή μεταλλαξιγένεση μελετήθηκαν και οι θέσεις Ser-88, Ala-102, Gly-104 και Ser-106, των οποίων τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα ενεργότητας και αποδείχτηκε ότι η παρουσία της

Gly-104 όπως και της υδροξυλομάδας στην πλευρική αλυσίδα της **Ser-88** είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση των υψηλών επιπέδων ενεργότητας της XanQ(wt) ως προς την μεταφορά ξανθίνης.

Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι τα μεταλλάγματα I89C, S91C, F96C, A102C και G104C απενεργοποιούνται μερικώς από το NEM. Τέλος τα δεδομένα ότι οι διπλές αλλαγές στις θέσεις των αμινοξέων Asn-93, Glu-272 και Asp-276 οδηγούν είτε στην έκφραση ενός μη λειτουργικού μεταλλάγματος στην μεμβράνη (E272D/D276E) είτε σε μη εκφραζόμενο και πλήρως ανενεργό μετάλλαγμα (N93T/D276M) ισχυροποιούν το συμπέρασμα ότι ο τρόπος συνδυασμού των πλευρικών αυτών ομάδων μεταξύ των TM3 και TM8 έχουν έναν αναντικατάστατο ρόλο για την σωστή λειτουργία του κέντρου δέσμησης της περμεάσης XanQ.

Μετά τα αποτελέσματα και αυτής της ενότητας η χρωματική ομαδοποίηση των υπό μελέτη καταλοίπων στο τοπολογικό μοντέλο δίνεται στην Εικόνα 3.1.29.



Εικόνα 3.1.29: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το μοντέλο της Εικόνας 3.1.21 μετά τα αποτελέσματα των ενοτήτων 3.1.1 & 3.1.2. (Υπενθυμίζεται ο συμβολισμός των μεγεθυμένων καταλοίπων: **σημαντικά ή/και αναντικατάστατα για την λειτουργία του μεταφορέα, αναντικατάστατα ως προς το μέγεθος ή το είδος της πλευρικής ομάδας, ευαίσθητα στο NEM, μερικώς ευαίσθητα στο NEM, προσβάσιμα από υδρόφιλο SH-αντιδραστήριο**, μελετήθηκαν στις 3.1.1 & 3.1.2)

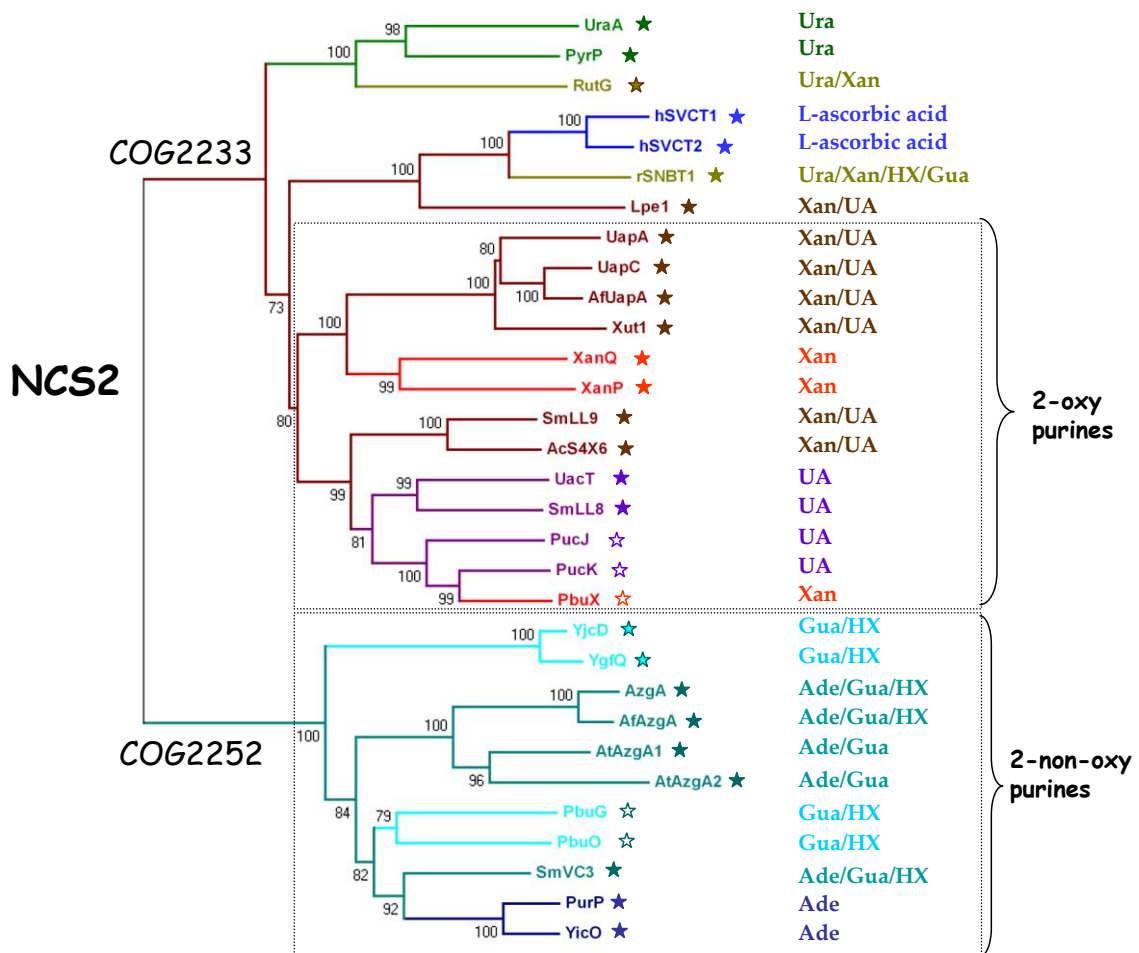
3.1.3 Μελέτη χαρακτηριστικών μοτίβων αλληλουχίας της περμεάσης XanQ

3.1.3.1 Φυλογενετική ανάλυση των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού της οικογένειας NCS2, εξαγωγή χαρακτηριστικών μοτίβων αλληλουχίας, επιλογή θέσεων-στόχων στα μοτίβα αλληλουχίας της περμεάσης XanQ και σχεδιασμοί μεταλλαξιγένεσης

Στο τελικό στάδιο του εντοπισμού σημαντικών θέσεων της περμεάσης XanQ και των ομόλογων μεταφορέων πουρινών του υποκλάδου COG2233 της οικογένειας NCS2 (μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού) προχωρήσαμε στην κατασκευή μιας νέας σειράς μεταλλαγμάτων που αναφέρονται σε αντικαταστάσεις θέσεων σε συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας σε όλα τα διαμεμβρανικά τμήματα. Πρόκειται για θέσεις υψηλής συντήρησης ή σε περιοχές αλληλουχίας υψηλής συντήρησης που δεν έχουν υποβληθεί σε συστηματική μεταλλαξιγένεση στο παρελθόν και πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια επιλογής, όπως αναλύεται στην μεθεπόμενη παράγραφο. Η λειτουργική ανάλυση μιας σειράς μεταλλαγμάτων στις θέσεις αυτές συμπληρώνει το έργο της μεταλλαξιγένεσης του XanQ ως προς την χαρτογράφηση των σημαντικών και συντηρημένων θέσεων, που παίζουν ρόλο στον μηχανισμό ενεργού μεταφοράς και συνεισφέρει μαζί με άλλα δεδομένα (πειράματα μελέτης εγγύτητας καταλοίπων, βλ. 3.2) στην εξαγωγή ενός επεξεργασμένου μοντέλου δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των μεταφορέων NCS2.

Η υπολογιστική διαδικασία για την εξαγωγή των μοτίβων αλληλουχίας περιελάμβανε τα εξής βήματα: (I) εντοπισμός μελών της οικογένειας NCS2 (8000 αλληλουχίες) μέσω της αναζήτησης ομολόγων (BLAST-p) προς τις 13 αλληλουχίες λειτουργικά χαρακτηρισμένων μεταφορέων πουρινών (ξανθίνης/ουρικού) του υποκλάδου COG2233 (Εικόνα 3.1.30), (II) εντοπισμός του υποσυνόλου των μελών που ανήκουν στον υποκλάδο των μεταφορέων πουρινών του COG2233 (3101 αλληλουχίες) με κριτήριο την μεγαλύτερη ομολογία προς γνωστές περμεάσες του υποκλάδου αυτού (XanQ, UapA, UacT) από ό,τι προς γνωστές περμεάσες εκτός του υποκλάδου που μπορούν να θεωρηθούν ως παρα-ομάδες (UraA, Lpe1), (III) περιορισμός των αλληλουχιών του υποσυνόλου (από 3101 σε 523 αλληλουχίες) με αφαίρεση ταυτόσημων αλληλουχιών (από διαφορετικά στελέχη του ίδιου οργανισμού) και, στη συνέχεια, αλληλουχιών που εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ταυτότητας καταλοίπων (>80%) με ήδη υπάρχουσες, μέσω φυλογενετικής ανάλυσης (MEGA 6) και αναλύσεων στοίχισης συγγενικών αλληλουχιών (ClustalW), (IV) φυλογενετική ανάλυση των 523 αλληλουχιών για την διάκριση των δύο σαφώς

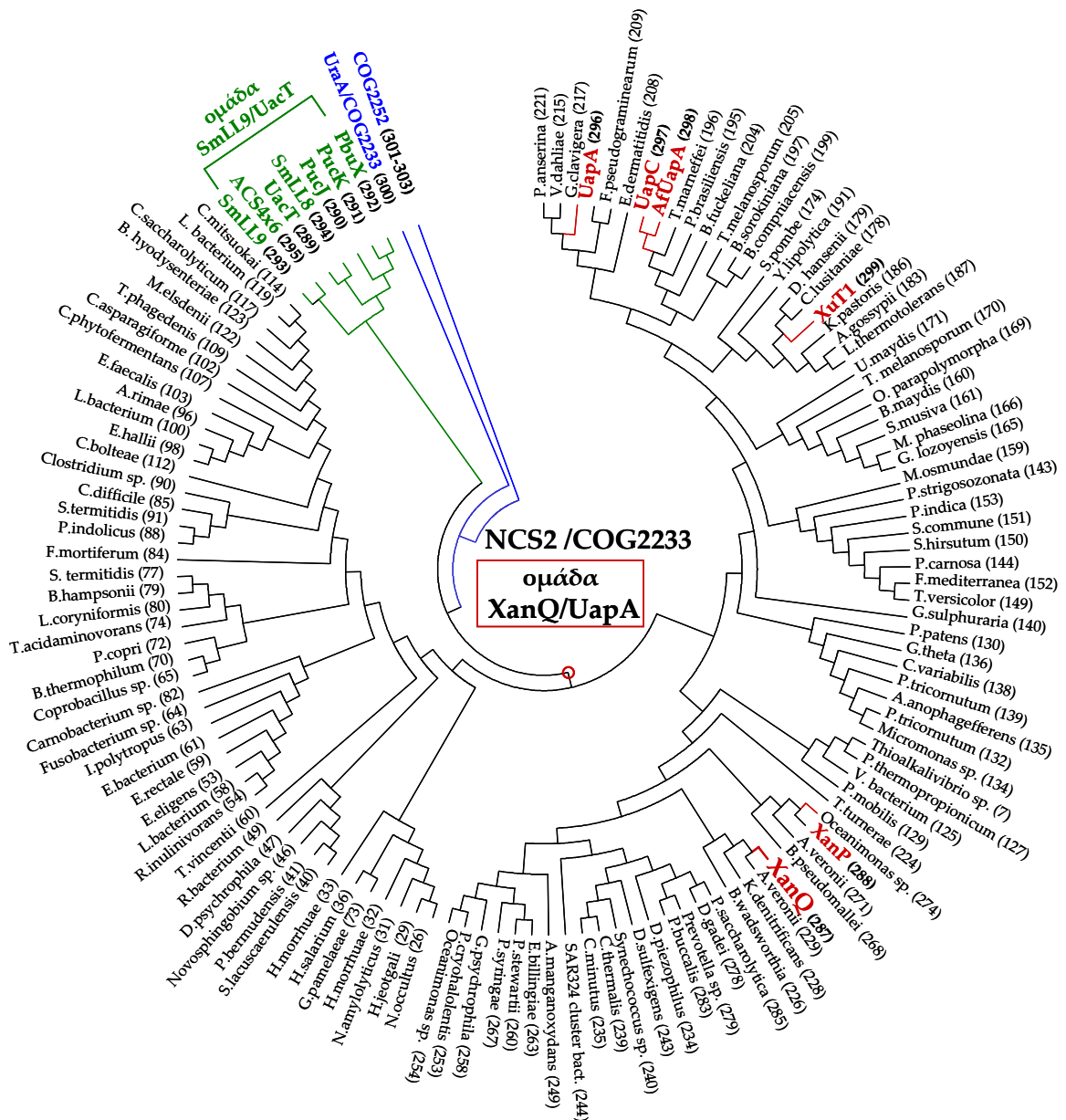
καθορισμένων επιμέρους ομάδων του υποκλάδου, δηλαδή της ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τις περμεάσες XanQ (*E.coli*) και UapA (*A.nidulans*) (περιέχει μεταφορείς ξανθίνης ή ξανθίνης/ουρικού) (292 μέλη) (βλ. Παράρτημα 3, Πίνακας Π3.1) και της ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τις UacT (*E.coli*) και SmLL9 (*S.meliloti*) (περιέχει κυρίως μεταφορείς ουρικού ή ξανθίνης/ουρικού) (231 μέλη), (V) ανάλυση της ομάδας των XanQ/UapA για περαιτέρω περιορισμό των αλληλουχιών (σε 121 μέλη) μέσω επιλογής αντιπροσωπευτικών μελών από κάθε σμήνος συγγενικών ομολόγων που αποκαλύπτει η φυλογενετική ανάλυση (MEGA 6) (Εικόνα 3.1.31), (VI) εντοπισμός μοτίβων αλληλουχίας που συντηρούνται στα 121 αντιπροσωπευτικά μέλη της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού (XanQ/UapA) με χρήση του προγράμματος MEME (βλ. Παράρτημα 3, Πίνακας Π.3.2).



Εικόνα 3.1.30: Φυλογενετικό δέντρο λειτουργικά χαρακτηρισμένων μελών της οικογένειας NCS2.

Μετά από συγκριτική ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών αμινοξέων (ClustalW) κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (MEGA 6). Σημειώνονται τα μέλη που έχουν

χαρακτηριστεί από λειτουργικά πειράματα (γεμάτοι εσωτερικά αστερίσκοι) και τα μέλη των οποίων η λειτουργία υποδηλώνεται από γενετικές ή γονιδιωματικές μελέτες (κενοί εσωτερικά αστερίσκοι). Επίσης, σημειώνονται τα κυριότερα υποστρώματα που μεταφέρονται από τους αντίστοιχους μεταφορείς (Ade, αδενίνη, Gua, γουανίνη, HX, υποξανθίνη, Ura, ουρακίλη, UA, ουρικό, Xan, ξανθίνη) (Papakostas *et al.*, 2013).



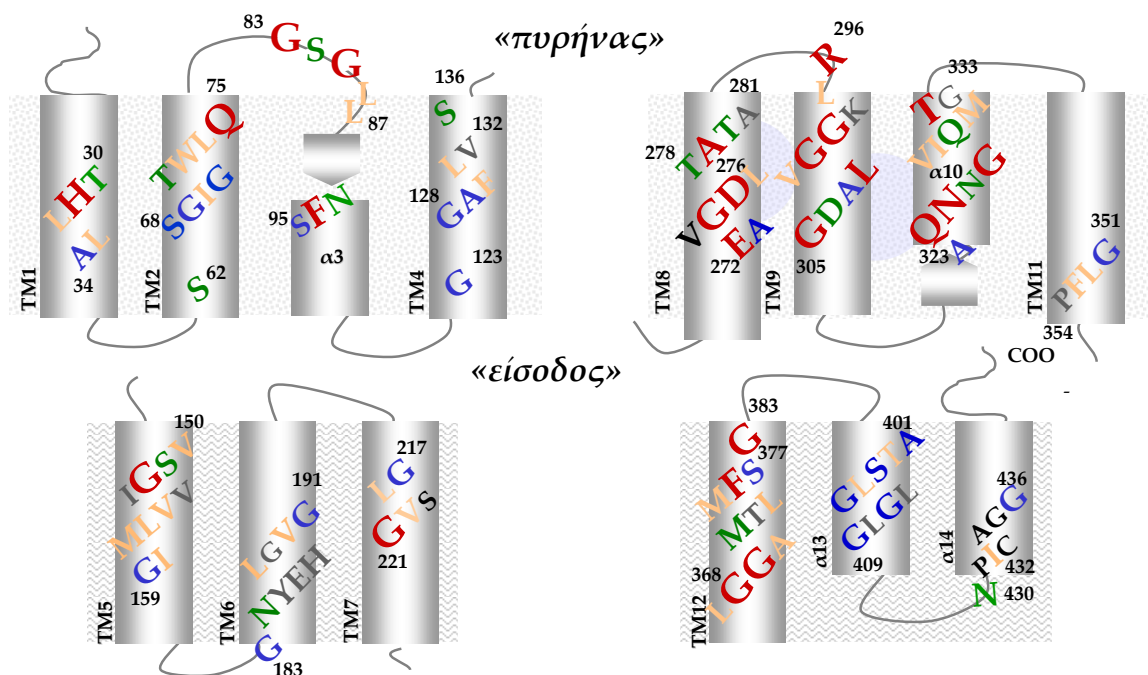
Εικόνα 3.1.31: Φυλογενετικό δέντρο των μελών της οικογένειας NCS2 (κλάδος COG2233) που ανήκουν στην ομάδα των XanQ/UapA. Φυλογενετική ανάλυση (MEGA 6) των μελών (121 αλληλουχίες) της ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τις περμεάσες XanQ (*E.coli*) και UapA (*A.nidulans*) και περιέχει μεταφορείς Ξανθίνης ή Ξανθίνης/ουρικού (292 μέλη) (βλ. Παράρτημα 3, Πίνακας Π3.1). Στο σχήμα τονίζονται με κόκκινο χρώμα τα μέλη της ομάδας (XanQ/UapA), που έχουν χαρακτηριστεί από λειτουργικά πειράματα. Επίσης με πράσινο χρώμα σημειώνονται γνωστές περμεάσες της οικογένειας NCS2 που ανήκουν στην διακριτή ομάδα μεταφορέων (ουρικού ή Ξανθίνης/ουρικού), που αντιπροσωπεύεται από τις περμεάσες UacT (*E.coli*) και SmLL9 (*S.meliloti*) (βλ. Εικόνα 3.1.30) (231 μέλη), και προστέθηκαν στην ανάλυση ως παρα-ομάδες. Τέλος με μπλε χρώμα χρωματίζονται οι κλάδοι με μέλη συγγενικά με την περμεάση UraA (UraA/COG2233) και με μεταφορείς της υποοικογένειας COG2252 (μεταφορείς αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης). Δίπλα από το όνομα κάθε οργανισμού σε παρένθεση αναγράφεται ο αύξων αριθμός όπως αριθμούνται τα μέλη στον Πίνακα Π3.1 .

Στα μοτίβα αλληλουχίας που ανέδειξε η ανάλυση MEME (βλ. Παράρτημα 3, Πίνακας Π.3.2) επιλέχθηκαν ως στόχοι συστηματικής μεταλλαξιγένεσης θέσεις αμινοξέων που ανήκουν σε περιοχές με τουλάχιστον πέντε συνεχόμενα κατάλοιπα όπου περιέχεται ένα τουλάχιστον αμινοξύ υψηλά ή/και απόλυτα συντηρημένο («παράθυρα» στα μοτίβα αλληλουχίας). Πρόκειται για κατάλοιπα που πιθανώς είναι σημαντικά στις περμεάσες ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της οικογένειας NCS2 για την αλληλεπίδραση τους με άλλα τμήματα του μορίου ή με το υδρόφοβο περιβάλλον των λιπιδίων της μεμβράνης ή με το υδρόφιλο κέντρο δέσμευσης και μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: (I) θέσεις όπου συντηρούνται μικρές ή πολικές ομάδες αμινοξέων (G, A, S), (II) θέσεις όπου συντηρούνται ισχυρώς πολικά (Q, N) ή πιθανώς ιοντιζόμενα αμινοξέα (E, D, H, K, R), (III) θέσεις όπου συντηρείται μία υδρόφοβη και ογκώδης πλευρική ομάδα (L, I, V) πιθανόν σε περιοχές επαφής με το λιπιδικό περιβάλλον, (IV) θέσεις που γειτνιάζουν στην αλληλουχία με θέσεις υψηλής συντήρησης αλλά οι ίδιες εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια πλευρικών ομάδων μεταξύ των ομόλογων μεταφορέων. Τέλος, (V) μελετήθηκαν απόλυτα ή σε υψηλό βαθμό συντηρημένα κατάλοιπα γλυκίνης (Gly) και σερίνης (Ser) που βρίσκονται σε απόσταση έως και 6 καταλοίπων από τις συνεχείς περιοχές («παράθυρα») των μοτίβων αλληλουχίας των οποίων εξετάσθηκαν με μεταλλαξιγένεση όλες οι θέσεις αμινοξέων.

Τα «παράθυρα» αλληλουχίας στα μοτίβα της XanQ που ανέδειξε η φυλογενετική ανάλυση και επιλέχθηκαν για μεταλλαξιγένεση με το παραπάνω σκεπτικό είναι (Εικόνα 3.1.31): ³⁰THLLA³⁴ (TM1), ⁶⁸SGIGTWLQ⁷⁵ (TM2), ⁸³GSGLL⁸⁷ και ⁹³NFS⁹⁵ (TM3), ¹²⁸GAFLV¹³² (TM4), ¹⁵⁰VSGIVVLMIG¹⁵⁹ (TM5), ¹⁸³GNYEHLGVG¹⁹¹ (TM6), ²¹⁷GLSVG²²¹ (TM7), ²⁷²EAVGDLTATA²⁸¹ (TM8), ²⁹⁶RLKGGVLADG³⁰⁵ (TM9), ³²³AQNNGVIQMTG³³³ (α 10), ³⁵¹GLFP³⁵⁴ (TM11), ³⁶⁸LGGAMTLMFS³⁷⁷ (TM12), ⁴⁰¹ATSLGLGLG⁴⁰⁹ (TM13), ⁴³⁰NPICAGG⁴³⁶ (TM14) και τα απόλυτα συντηρημένα κατάλοιπα Ser-62 (TM2), Gly-123 και Ser-136 (TM4), Gly-383 (TM12).

Από τα παραπάνω υπάρχουν «παράθυρα» στα μοτίβα (⁸³GSGLL⁸⁷, ⁹³NFS⁹⁵) ή συγκεκριμένα κατάλοιπα στα «παράθυρα» αυτά (Thr-30, His-31, Gln-75, Asn-184, Glu-186, His-187, Glu-272), τα οποία έχουν ήδη μελετηθεί εκτενώς και χαρακτηριστεί λειτουργικά στις προηγούμενες ενότητες της παρούσας μελέτης (3.1.1 & 3.1.2) (Karena & Frillingos, 2009; Karena & Frillingos, 2011). Επίσης, ορισμένα άλλα «παράθυρα» αλληλουχιών (²⁷³AVGDLTATA²⁸¹, ²⁹⁶RLKGGVLADG³⁰⁵, ³²³AQNNGVIQMTG³³³, ³⁵¹GLFP³⁵⁴, ⁴³⁰NPICAGG⁴³⁶) έχουν αναλυθεί με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στα πλαίσια άλλων εργασιών του εργαστηρίου μας (Karatzas *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010) και έχει αποδειχτεί ότι

περιέχουν κατάλοιπα κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία της περμεάσης (βλ. Παράρτημα.3, Εικόνα Π3.1). Στην ενότητα 3.1.3, ασχοληθήκαμε με τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των θέσεων αμινοξέων στα υπόλοιπα «παράθυρα» αλληλουχίας των μοτίβων της XanQ, τα οποία εμπίπτουν σε διαμεμβρανικές α -έλικες των TM1, TM2, TM4, TM5, TM6, TM7, TM12 και TM13.



Εικόνα 3.1.31: Τα διαμεμβρανικά τμήματα (TM) της περμεάσης XanQ.

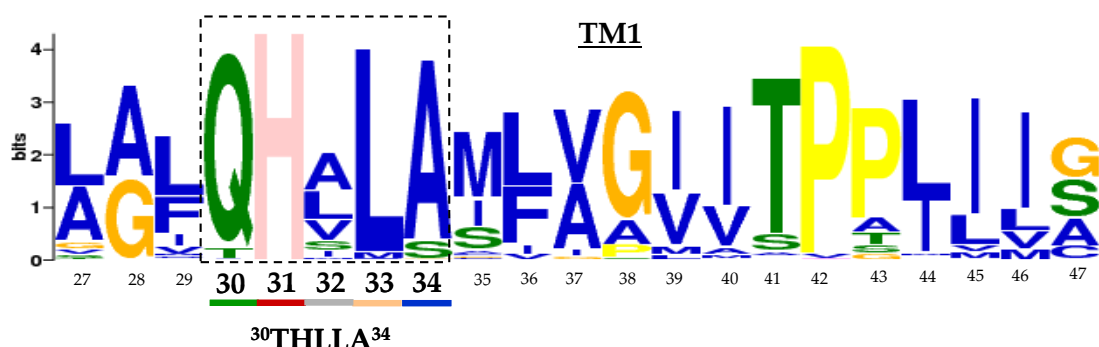
Απεικονίζονται τα TM της περμεάσης ομαδοποιημένα κατά τις δομικές περιοχές «πυρήνα» (core domain) και «είσοδου» (gate domain) (Lu *et al.*, 2011). Σε κάθε TM σημειώνονται τα «παράθυρα» αλληλουχιών σε χαρακτηριστικά συντηρημένα μοτίβα τα οποία εξετάστηκαν με μεταλλαξιγένεση σε αυτήν την ενότητα (TM1-2, TM4, TM5-7, TM12-13), ή στα πλαίσια των προηγούμενων δύο ενότητων και άλλων εργασιών του εργαστηρίου μας (TM3, TM8-11, TM14) και η συντήρηση της πλευρικής ομάδας αμινοξέος σε κάθε θέση στα 121 αντιπροσωπευτικά μέλη των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 (βλ. 3.1.3.1) συμβολίζεται χρωματικά: (α) κόκκινο, απόλυτα συντηρημένα, (β) πράσινο, διατηρούν πολικό χαρακτήρα, (γ) μπλε, συντηρούν μικρό μέγεθος, (δ) ροζ διατηρούν υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα και (ε) γκρι, δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες. Σε όλες τις Εικόνες της ενότητας 3.1.3 ακολουθείται ο ίδιος χρωματικός συμβολισμός.

3.1.3.2 Μοτίβα στη δομική περιοχή «πυρήνα» (TM1- 4, TM8-11)

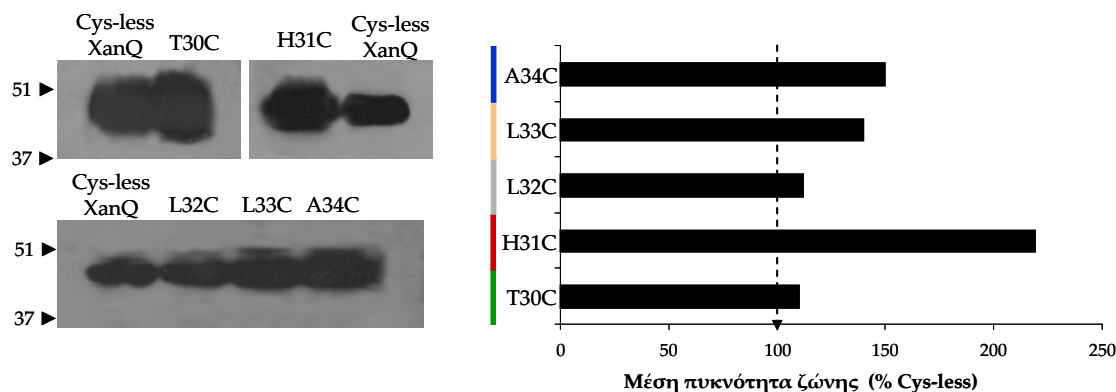
Μοτίβο $^{30}\text{THLLA}^{34}$ (TM1)

Για τις θέσεις Leu-33 (σχεδόν απόλυτα συντηρημένη στην εξεταζόμενη ομάδα μεταφορέων της NCS2/COG2233) Ala-34 (πολύ υψηλά συντηρημένη) και Leu-32 (μη συντηρημένη), που δεν είχαν ήδη μελετηθεί από το «παράθυρο» αλληλουχίας $^{30}\text{THLLA}^{34}$ (στο μοτίβο του TM1, Εικόνα 3.1.32A) τα πειράματα απέδειξαν ότι τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης (Εικόνα 3.1.32B, Γ) εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της XanQ Cys-less ή και υψηλότερα και εμφανίζουν υψηλές (L33C, 85-132% του Cys-less XanQ) ή μέσες τιμές ενεργότητας (L32C και A34C, 21-43% του XanQ Cys-less). Μικρή (1,4 φορές) αύξηση ενεργότητας παρατηρείται για τα τρία αυτά μεταλλάγματα (L32C, L33C, A34C) παρουσία του αντιδραστηρίου NEM (Εικόνα 3.1.33). Οι θέσεις Leu-33 και Ala-34 συντηρούν σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση (Εικόνα 3.1.32A) την υδροφοβή και την μικρού μεγέθους πλευρική αλυσίδα αντίστοιχα, ενώ βρίσκονται δίπλα από τις σημαντικές θέσεις Gln/Thr-30 και His-31 που εμφανίζουν απόλυτη συντήρηση των αντίστοιχων πολικών αμινοξέων και των οποίων η μελέτη (βλ. 3.1.1) κατέδειξε ήδη ότι η His-31 είναι σημαντική για την υψηλή συγγένεια πρόσδεσης της ξανθίνης αλλά χωρίς να αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα στη λειτουργία της περμεάσης XanQ.

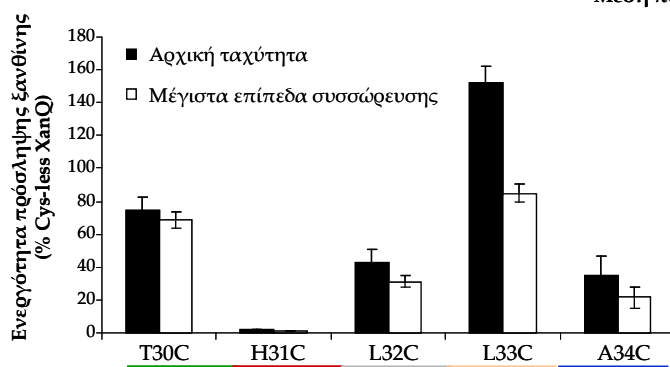
A



B



Γ

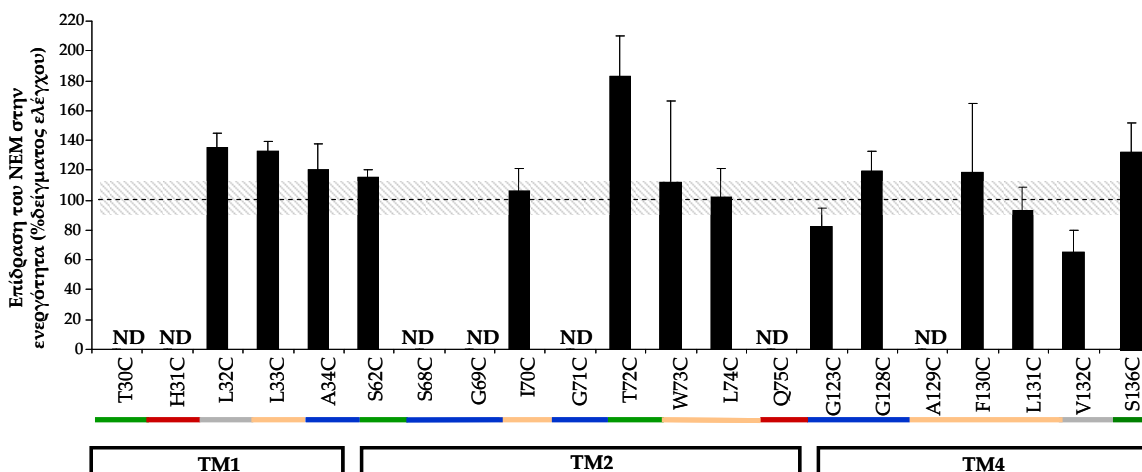


Εικόνα 3.1.32: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης του μοτίβου $^{30}\text{THLLA}^{34}$ (TM1).

A. Συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας στο TM1 της XanQ όπως προέκυψε από ανάλυση των 121 αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value $4.4e^{-1273}$, width 21, Sites 114) (βλ. 3.1.3, Παράρτημα 3). Με διακεκομμένο πλαίσιο σημειώνεται το «παράθυρο» αλληλουχίας στο μοτίβο που αναλύθηκε με μεταλλαξιγένεση, ενώ στο κάτω μέρος υπογραμμίζονται τα κατάλοιπα σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που χρησιμοποιείται στην ενότητα αποτελεσμάτων 3.1.3 με (κόκκινα: απόλυτα συντηρημένα, πράσινα: διατηρούν πολικό χαρακτήρα, μπλε: συντηρούν μικρό μέγεθος, ροζ: διατηρούν υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα και γκρι: δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορία). Κάτω από την χρωματική υπογράμμιση αναφέρεται η αρίθμηση και η αλληλουχία του μοτίβου στην περμεάση XanQ.

B. Κλάσματα μεμβρανών (100 μg ολ. πρωτεΐνης/ διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και

ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa. Οι τιμές ποσοτικοποιήθηκαν (%XanQ Cys-less-BAD, Quantity One). Γ. Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Παρουσιάζονται οι τιμές για τις αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec, μαύρες στήλες) και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min, άσπρες στήλες) ως ποσοστά %XanQ Cys-less-BAD.



Εικόνα 3.1.33: Επίδραση του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε μοτίβα της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM1, 2, 4).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1μM), στους 25° C, παρουσία NEM (2 mM), 10 min, 25°C (βλ. 2.9.4). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec), ως % ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία NEM για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα. Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στον μέσο όρο των τιμών ενεργότητας της XanQ Cys-less -BAD (δείγμα ελέγχου), όπως μετρήθηκαν σε παράλληλα πειράματα. Για τα μεταλλάγματα που έχουν μηδενική αρχική ταχύτητα δεν έγινε προσδιορισμός (ND).

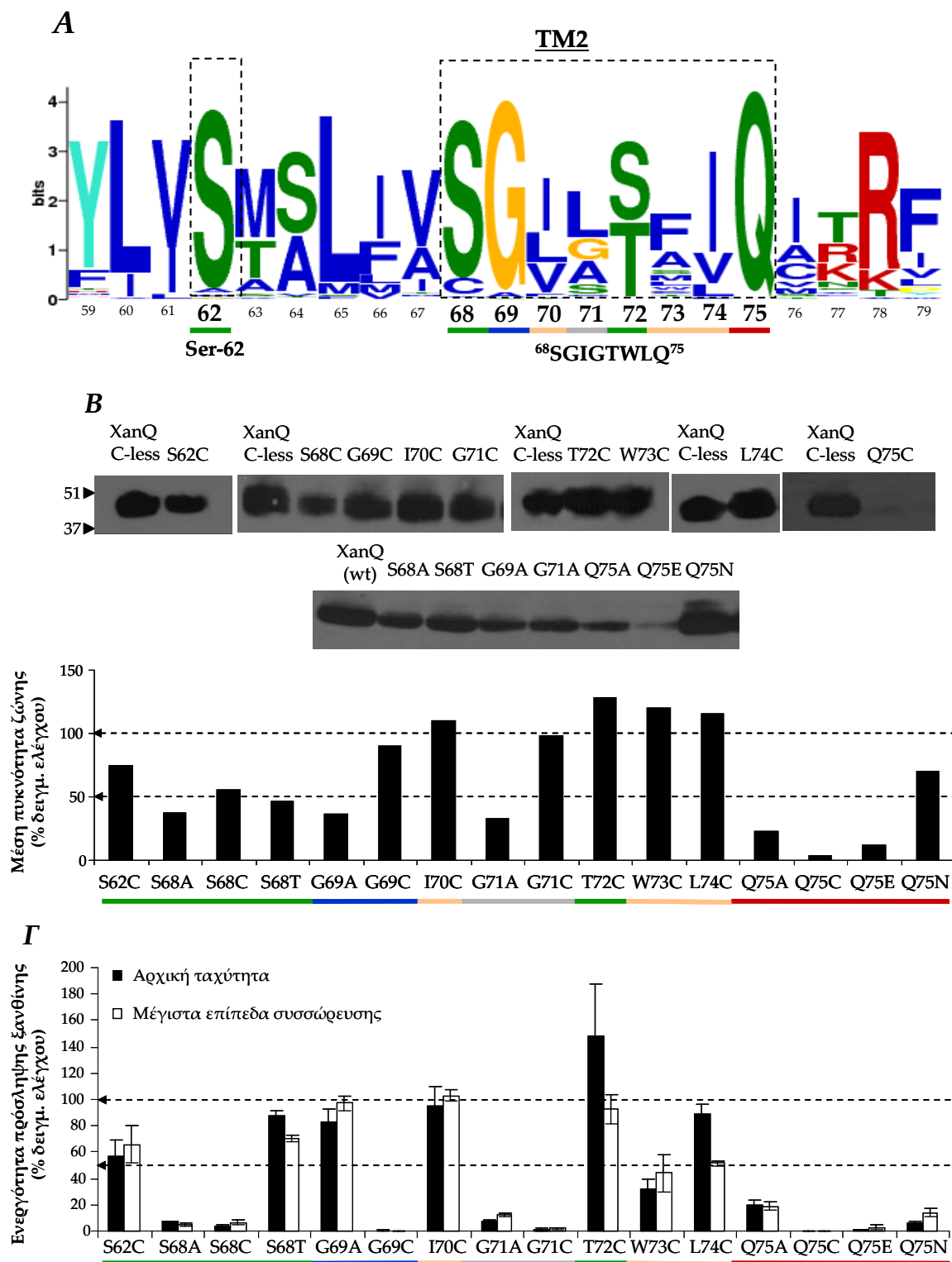
Μοτίβο ⁶⁸SGIGTWLQ⁷⁵ και Ser-62 (TM2)

Στο μοτίβο του TM2 (Εικόνα 3.1.34A) υπάρχει σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση το σχεδόν απόλυτα συντηρημένο κατάλοιπο Ser-62 σε απόσταση 5 θέσεων από το «παράθυρο» υψηλά συντηρημένης αλληλουχίας ⁶⁸SGIGTWLQ⁷⁵ το οποίο περιέχει τις απόλυτα και σχεδόν απόλυτα συντηρημένες Gln-75 και Gly-69 αντίστοιχα, τέσσερις θέσεις όπου συντηρείται μία υδρόφοβη (Ile/Leu/Val-70, Leu/Ile/Val-74), ή μία πολική (Ser-68, Thr/Ser-72) πλευρική ομάδα και μία θέση όπου υπάρχει Gly η οποία δεν συντηρείται στα άλλα ομόλογα (Gly/Leu/Ala-71) (Εικόνα 3.1.34A). Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της XanQ στις θέσεις αυτές κατέδειξε ότι τα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης των 3 από τις 4 θέσεις χαμηλής συντήρησης (70, 73, 74) και των 2 από τις 3 θέσεις με Ser ή Ser/Thr (62, 72) εμφανίζουν είτε υψηλές τιμές ενεργότητας (I70C, T72C και L74C, 89-148% της Cys-less XanQ) σε συνδυασμό με υψηλή έκφραση στην μεμβράνη, είτε μέτριες τιμές ενεργότητας (S62C και W73C, 32-66% της Cys-less XanQ) με υψηλή ή μέτρια (S62C) έκφραση στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.34B,Γ). Αντίθετα, τα μεταλλάγματα S68C, G69C, G71C, Q75C έχουν αμελητέα επίπεδα ενεργότητας για πρόσληψη [³H]ξανθίνης (Εικόνα 3.1.34Γ). Η μηδενική ενεργότητα του Q75C αντιστοιχεί σε μηδενική έκφραση στη μεμβράνη, ενώ τα ανενεργά μεταλλάγματα S68C, G69C και G71C έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη. Από τα ενεργά μεταλλάγματα, σχετικά μικρή (1,8 φορές) αύξηση ενεργότητας παρατηρείται για το T72C μετά από προεπάση με το αντιδραστήριο NEM ενώ η ενεργότητα των S62C, I70C, W73C και L74C πρακτικά δεν επηρεάζεται από το NEM (Εικόνα 3.1.33).

Οι θέσεις Ser-68, Gly-69, Gly-71, Gln-75 που εμφάνισαν ανενεργά μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης μελετήθηκαν επίσης με εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση, στα πλαίσια της οποίας κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα S68A(wt), S68T(wt), G69A(wt), G71A(wt), Q75A(wt), Q75E(wt), Q75N(wt), A129G(wt), A129S(wt). Από αυτά τα μεταλλάγματα, τα S68T(wt) και Q75N(wt) εκφράζονται σε μέτρια επίπεδα στην μεμβράνη [46-70% της XanQ(wt)], τα S68A(wt), G69A(wt), G71A(wt) και Q75A(wt) έχουν χαμηλή έκφραση [23-37% του XanQ(wt)], ενώ το Q75E(wt) έχει σχεδόν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (Εικόνα 3.1.34B). Για τα μεταλλάγματα S68A(wt), G71A(wt), Q75A(wt) μετρήθηκαν χαμηλές τιμές ενεργότητας [7-19% του XanQ(wt)] οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με αντίστοιχα χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη, ενώ τα S68T(wt) και G69A(wt) εμφανίζουν ενεργότητα στα επίπεδα της περμεάσης φυσικού τύπου [70-97% του XanQ(wt)] (Εικόνα 3.1.34Γ). Τέλος το μέταλλαγμα Q75N(wt), παρά τα υψηλά επίπεδα έκφρασης, εμφανίζει πολύ χαμηλές τιμές ενεργότητας [5-10% της

XanQ(wt)] (Εικόνα 3.1.34B,Γ). Σχετικά με τις αντικαταστάσεις στη θέση Gln-75, όλα τα μεταλλάγματα της XanQ εμφανίζουν ελάχιστη (Q75A, Q75N) ή μηδενική ενεργότητα (Q75C, Q75E), υποδεικνύοντας ότι η παρουσία της γλουταμίνης στην θέση 75 του TM2 είναι απαραίτητη στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης.

Η κινητική ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης των S68T(wt), G69A(wt), I70C και Q75A(wt) απέδειξε ότι η αντικατάσταση των Ser-68 ή Ile-70 με Thr ή Cys, αντίστοιχα, δεν οδηγεί σε σημαντική μεταβολή των V_{max} και K_m σε σύγκριση με την XanQ(wt) ή την Cys-less XanQ, αντίστοιχα (Πίνακας 3.1.13), η παρουσία αλανίνης αντί της γλυκίνης στη θέση 69 [G69A(wt)] προκαλεί μικρή μείωση (1,5 φορές) της K_m χωρίς να επηρεάζει την V_{max} σε σχέση με την XanQ(wt) ενώ, αντίθετα, το Q75A(wt) εμφανίζει πολύ σημαντική μείωση της V_{max} (όπως αναμενόταν από τα πολύ χαμηλά επίπεδα ενεργότητας που έχει σε 1 μ M ξανθίνης, Εικόνα 3.1.34Γ) αλλά και της K_m (Πίνακας 3.1.13).



Εικόνα 3.134: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων του μοτίβου $^{68}\text{SGIGTWLQ}^{75}$ (TM2).

A. Συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας στο TM2 της XanQ όπως προέκυψε από ανάλυση αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value 5.7×10^{-1285} , Width 21, Sites 115, βλ. Εικόνα

3.1.32). Με διακεκομμένα πλαίσια σημειώνονται η Ser-62 και το «παράθυρο» αλληλουχίας Ser-68 μέχρι Gln-75 στο μοτίβο που αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση.

B. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32 και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης βάσει του προγράμματος Quantity One.

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, κατά τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32.

Πίνακας 3.1.13: Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Ser-68, Gly-69, Ile-70 και Gln-75 (TM2).

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (0,1–100μM). Οι αρχικές ταχύτητες μετρήθηκαν σε χρόνους 5-20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Περγμείαση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
XanQ (Cys-less)	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.9	1858
S68T(wt)	4.2 ± 0.7	9.6 ± 1.5	2285
G69A(wt)	2.9 ± 0.9	7.2 ± 0.6	2482
I70C	5.9 ± 0.7	9.2 ± 0.4	1559
Q75A(wt)	2.2 ± 0.9	2.5 ± 0.2	1136

Η μελέτη του προφίλ εξειδίκευσης των παραπάνω μεταλλαγμάτων (Πίνακας 3.1.14) υποδεικνύει ότι και τα τέσσερα [S68T(wt), G69A(wt), I70C, Q75A(wt)] ευνοούν την αναγνώριση των αναλόγων 7-μεθυλοξανθίνης και 8-μεθυλοξανθίνης, τα οποία δεν αναγνωρίζονται από την XanQ(wt), δύο από αυτά [S68T(wt) και Q75A(wt)] αναγνωρίζουν σε μικρό βαθμό γουανίνη και ένα [S68T(wt)] αναγνωρίζει επίσης σε μικρό βαθμό το ουρικό οξύ, δηλαδή υποστρώματα που δεν αναγνωρίζονται από την XanQ(wt) ή την Cys-less XanQ. Επίσης, το I70C φαίνεται να μην αναγνωρίζει καθόλου 6-θειοξανθίνη, η οποία αποτελεί υψηλής συγγένειας προσδέτη για την XanQ(wt) και την Cys-less XanQ (Πίνακας 3.1.14). Αναλυτικότερη μελέτη του ανταγωνισμού της πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) από τις 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη, σε εύρος συγκεντρώσεων των ανταγωνιστών (0.1 μM έως 1

mM), κατέδειξε ότι τα μεταλλάγματα S68T(wt), G69A(wt) και I70C επιτρέπουν την αναγνώριση της 8-μεθυλοξανθίνης με σχετικά υψηλή συγγένεια (K_i 294, 358 και 120 μ M, αντίστοιχα), ενώ το I70C αναγνωρίζει ως προσδέτη και την 7-μεθυλοξανθίνη αλλά με χαμηλή συγγένεια (K_i 679 μ M), η οποία είναι σε παρόμοια επίπεδα με αυτήν της Cys-less XanQ (Πίνακας 3.1.15).

Πίνακας 3.1.14: Προφίλ εξειδίκευσης μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Ser-68, Gly-69, Ile-70 και Gln-75 (TM2).

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μ M, 25°C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3). Από τις αρχικές ταχύτητες (όπως μετρήθηκαν σε χρόνους 5-20 sec) έχουν αφαιρεθεί σε κάθε περίπτωση οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες (μέσοι όροι τριών πειραμάτων με S.D. <15%). Οι σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με την XanQ(wt) ή την Cys-less XanQ τονίζονται με έντονη γραφή.

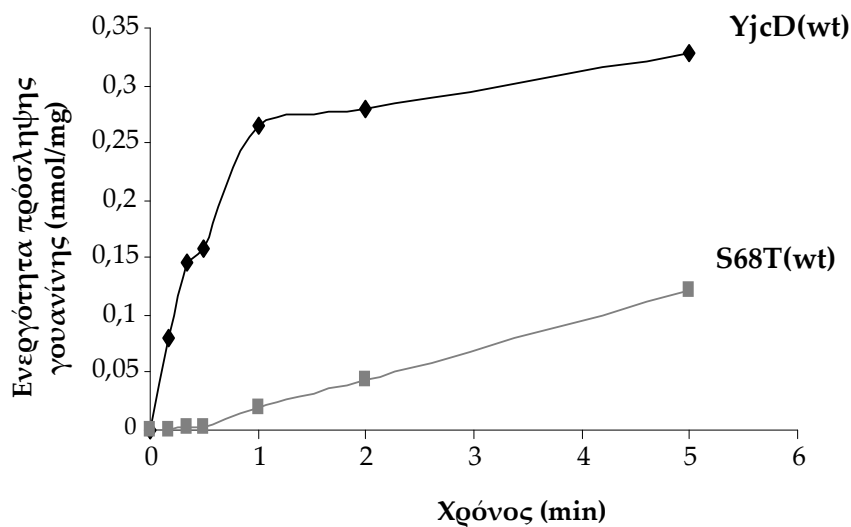
Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης που διατηρείται					
	XanQ(wt)	XanQ (C-less)	S68T(wt)	G69A(wt)	I70C	Q75A(wt)
–	100	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	101	44	90	155	79
Υποξανθίνη	96	97	82	115	122	104
Αδενίνη	96	105	131	155	178	159
Γουανίνη	94	89	65	85	125	48
Ουρακίλη	101	102	84	83	130	70
2-Θειοξανθίνη	13	33	3	1	35	1
3-Μεθυλοξανθίνη	25	15	19	23	29	25
6-Θειοξανθίνη	20	33	9	13	93	7
7-Μεθυλοξανθίνη	105	36	51	71	48	76
8-Μεθυλοξανθίνη	96	35	33	19	19	47
Αλλοπουρινόλη	106	93	96	125	131	103
Οξυπουρινόλη	31	16	5	1	2	5

Πίνακας 3.1.15: Τιμές K_i μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Ser-68, Gly-69 και Ile-70 ως προς τον ανταγωνισμό [^3H]ξανθίνης με 7-/8-μεθυλοξανθίνη.

Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στον Πίνακα 3.1.14 για δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM , 25 $^\circ\text{C}$) αλλά μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες συγκεντρώσεων 0.1 μM έως 1mM, 5min (βλ. 2.9.3). Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη με βάση το πρόγραμμα *Prism 5*. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης (1 μM). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 μετρήσεων με τυπικές αποκλίσεις <20%.

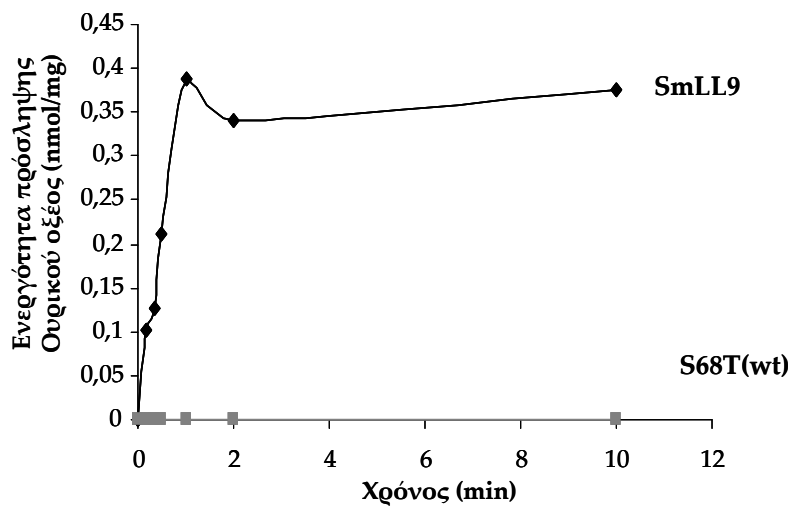
Ανταγωνιστής	K_i (μM)				
	XanQ(wt)	XanQ(C-less)	S68T(wt)	G69A(wt)	I70C
7-Μεθυλοξανθίνη	>1000	800	>1000	>1000	679
8-Μεθυλοξανθίνη	>1000	650	294	358	120

Τέλος, για το μετάλλαγμα S68T(wt) που φάνηκε να αναγνωρίζει την γουανίνη και το ουρικό οξύ από τα πειράματα ανταγωνισμού (Πίνακας 3.1.14) έγιναν πειράματα δοκιμασίας ενεργού μεταφοράς ραδιενεργά σημασμένων ουρικού οξέος [uric acid ($8\text{-}^{14}\text{C}$)] σε συγκέντρωση 10 μM και γουανίνης [guanine ($8\text{-}^3\text{H}$)] σε συγκέντρωση 0,1 μM . Στην περίπτωση του πειράματος μέτρησης ενεργού μεταφοράς [^3H] γουανίνης το μετάλλαγμα S68T(wt) εκφράστηκε μέσω IPTG-επαγόμενων, πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* [JW4025, *yjcD* knock out], που αποτελούν κατάλληλο μοριακό υπόβαθρο (Papakostas *et al.*, 2013). Τα πειράματα αυτά (Εικόνες 3.1.35 & 3.1.36) υποδεικνύουν ότι το S68T(wt): (α) σε αντίθεση με όλα τα άλλα μεταλλάγματα που εξετάστηκαν στα πλαίσια του 3.1.3 (βλ. στη συνέχεια) εμφανίζει πολύ χαμηλά επίπεδα ενεργότητας μεταφοράς γουανίνης τα οποία όμως αυξάνονται σταδιακά και φτάνουν στο 25% τουλάχιστον της περμεάσης γουανίνης *YjcD* η οποία χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου (Papakostas *et al.*, 2013), (β) δεν μεταφέρει ουρικό οξύ καθώς εμφανίζει μηδενικές τιμές αρχικής ταχύτητας μεταφοράς του υποστρώματος σε σχέση με τον μεταφορέα ουρικού οξέος SmLL9 που χρησιμοποιείται ως δείγμα θετικού ελέγχου (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή 2011). Συνολικά, η μελέτη μεταλλαξιγένεσης του μοτίβου του TM2 αναδεικνύει σημαντικούς ή αναντικατάστατους ρόλους συγκεκριμένων καταλοίπων της αλληλουχίας $^{68}\text{SGIGTWLQ}^{75}$ (ιδιαίτερα των Ser-68, Gly-69, Ile-70, Gly-71 και Gln-75) στην λειτουργία και την εξειδίκευση της περμεάσης XanQ.



Εικόνα 3.1.35: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]γουανίνης για το μετάλλαγμα S68T(wt).

Κύτταρα *E. coli* [JW4025, yjcD knock out] (T184) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(wt)/S68T-BAD ή pT7-5/yjcD(wt)-BAD (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0.1μM), στους 25 °C. Οι τιμές εκφράζονται σε nmol/mg πρωτεΐνης. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.



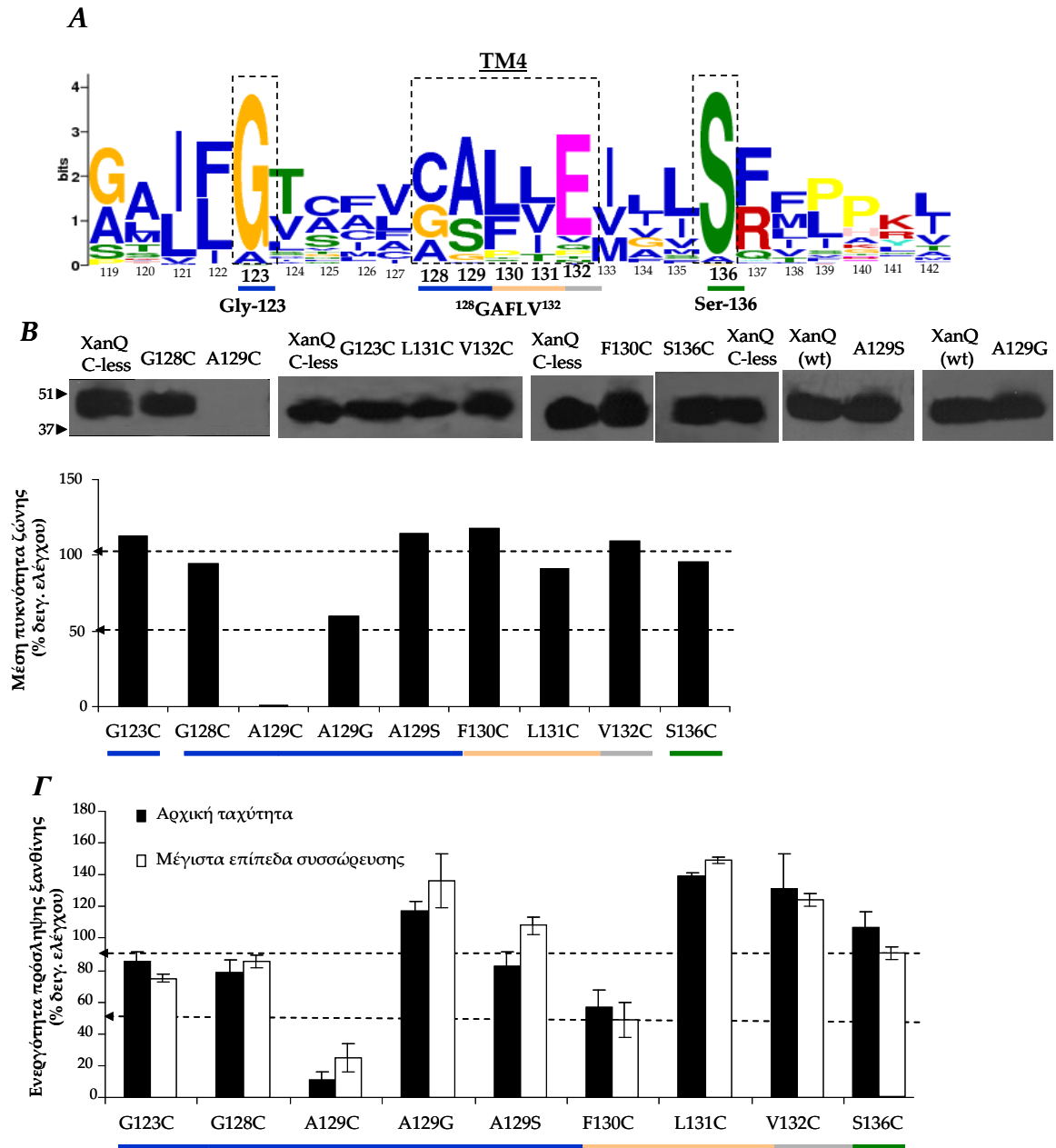
Εικόνα 3.1.36: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος από το μετάλλαγμα S68T(wt).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(wt)/S68T-BAD ή pT7-5/SmLL9(wt)-BAD (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C] ουρικού οξέος (10μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές ενεργότητας εκφράζονται σε nmol ουρικού οξέος που προσλαμβάνεται ανά mg πρωτεΐνης των κυττάρων. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Μοτίβο ¹²⁸GAFLV¹³² Gly-123 και Ser-136 (TM4)

Στο μοτίβο του TM4 (Εικόνα 3.1.36A), σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση, συναντώνται δύο σχεδόν απόλυτα συντηρημένα κατάλοιπα, Gly-123 και Ser-136, σε αποστάσεις 5 και 3 θέσεων, αντίστοιχα, από το «παράθυρο» υψηλά συντηρημένης αλληλουχίας ¹²⁸GAFLV¹³² το οποίο περιέχει δύο θέσεις όπου συντηρείται μία υδροφοβή πλευρική ομάδα (Phe/Leu-130, Leu/Val/Ile-131), δύο θέσεις όπου συντηρείται μία μικρή πλευρική ομάδα (Gly/Ala/Cys-128, Ala/Ser-129) και μία θέση όπου επικρατεί κατά 80% η πλευρική ομάδα του Glu, αλλά η XanQ και τα πιο συγγενικά της ομόλογα έχουν Val (Val-132) (Εικόνα 3.1.35A). Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της XanQ στις θέσεις αυτές κατέδειξε ότι τα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης G123C, G128C, L131C, V132C και S136C παρουσιάζουν πολύ υψηλές αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (78-152% αυτής της Cys-less XanQ) και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (75-149%) σε συνδυασμό με υψηλή έκφραση στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.38B,Γ). Από τα υπόλοιπα δύο μεταλλάγματα, το F130C ανιχνεύεται στη μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα και εμφανίζει τιμές ενεργότητας σε μέσα επίπεδα (49-57%, της Cys-less XanQ), ενώ το A129C εμφανίζει πολύ χαμηλά επίπεδα ενεργότητας (10-20% της Cys-less XanQ) και σχεδόν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη. Η ενεργότητα των μεταλλαγμάτων G123C, G128C, F130C και L131C δεν επηρεάζεται σημαντικά από την προεπώαση με NEM (2mM), μικρή αύξηση εμφανίζει η ενεργότητα του S136C (1,2 φορές), ενώ σημαντική μείωση (κατά 40%) παρατηρείται μετά την προεπώαση με NEM για την ενεργότητα της V132C (Εικόνα 3.1.33).

Η θέση Ala-129 που εμφάνισε ανενεργό και μη ανιχνεύσιμο ως προς την έκφραση μετάλλαγμα μονής κυστεϊνης μελετήθηκε επίσης με εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση στα πλαίσια της οποίας κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα που αντικαθιστούν την Ala-129 σε Ser ή Gly σε υπόβαθρο XanQ φυσικού τύπου. Από αυτά, το μετάλλαγμα A129S(wt) εκφράζεται στην μεμβράνη (Εικόνα 3.1.38B) στα επίπεδα της XanQ(wt) και το A129G(wt) εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα [60% της XanQ(wt)], ενώ και τα δύο [A129S(wt), A129G(wt)] εμφανίζουν τιμές ενεργότητας πρόσληψης ξανθίνης στα επίπεδα της XanQ(wt) [αρχική ταχύτητα: 83-117%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης: 108-136%]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι μία μικρή πλευρική ομάδα στην θέση Ala-129 του TM4 (Ala, Gly, Ser) είναι συμβατή με πλήρη λειτουργικότητα της περμεάσης και το πρόβλημα στην περίπτωση της A129C είναι πιθανό να σχετίζεται με κάποια ειδική αλληλεπίδραση της Cys-129 που αποσταθεροποιεί δομικά την πρωτεΐνη.



Εικόνα 3.1.38: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων του μοτίβου $^{128}\text{GAFLV}^{132}$ και των Gly-123, Ser-136 (TM4).

A. Συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας στο TM4 της XanQ όπως προέκυψε από ανάλυση αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value $3.8e^{-896}$, Width 24, Sites 115, βλ. Εικόνα 3.1.32). Με διακεκομμένα πλαίσια σημειώνονται οι Gly-62, Ser-136 και το «παράθυρο» αλληλουχίας Gly-128 μέχρι Val/Glu-132 στο μοτίβο που αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση.

B. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32 και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης βάσει του προγράμματος Quantity One.

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, κατά τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32.

3.1.3.3 Μοτίβα στη δομική περιοχή «εισόδου» (TM5- 7, TM12-14)

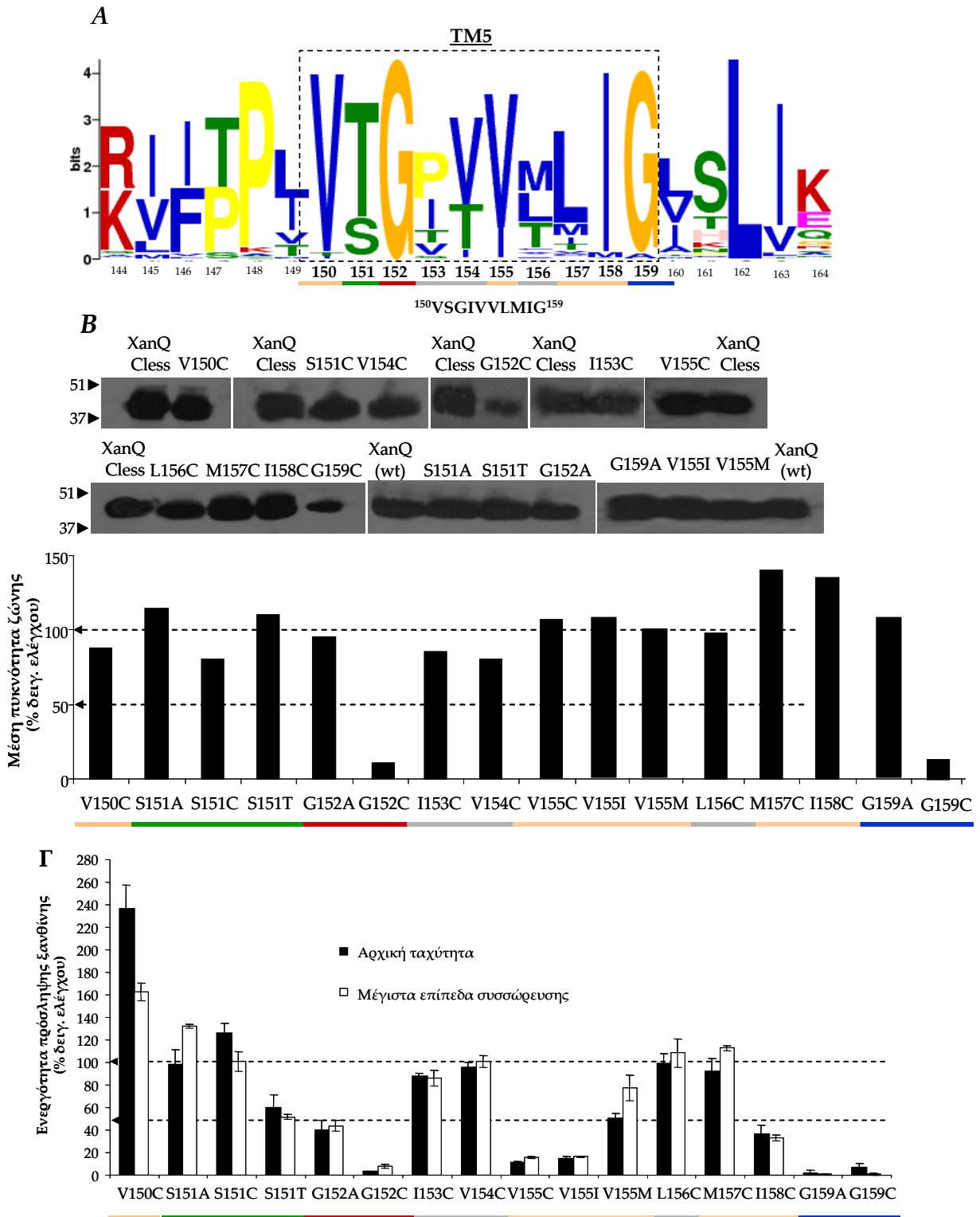
Μοτίβο ¹⁵⁰VSGIVVLMIG¹⁵⁹ (TM5)

Στο «παράθυρο» αλληλουχίας ¹⁵⁰VSGIVVLMIG¹⁵⁹ του μοτίβου του TM5 συναντώνται, σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση, τέσσερις απόλυτα (Gly-152) ή σχεδόν απόλυτα συντηρημένες θέσεις (Val-150, Ile-158, Gly-159), δύο θέσεις όπου συντηρούνται υδρόφοβα αμινοξέα (Val/Ile-155, Leu/Met-157), μία θέση όπου συντηρείται πολικό αμινοξύ (Ser/Thr-151) και δύο θέσεις όπου συντηρείται είτε υδρόφοβο αμινοξύ είτε Thr (Val/Thr-154, Leu/Met/Thr-156) (Εικόνα 3.1.39A). Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της XanQ στις θέσεις αυτές οδήγησε σε έξι μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (V150C, S151C, I153C, V154C, L156C, M157C) με πολύ υψηλές αρχικές ταχύτητες πρόσληψης (87-237% της Cys-less XanQ) και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (86-163% της Cys-less XanQ) και υψηλή έκφραση στην μεμβράνη, ένα μετάλλαγμα (I158C) με υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη αλλά χαμηλή ενεργότητα (30% της Cys-less XanQ), ένα μετάλλαγμα (V155C) με υψηλά επίπεδα αλλά οριακά ανιχνεύσιμη ενεργότητα (αρχική ταχύτητα $\leq 10\%$ της Cys-less XanQ) και δύο μεταλλάγματα στις φυλογενετικά συντηρημένες θέσεις γλυκίνης (G152C, G159C) με πρακτικά μηδενική ενεργότητα και πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης (8-10% σε σχέση με την Cys-less XanQ) (Εικόνα 3.1.39B,Γ).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την επίδραση του ειδικού SH-αντιδραστηρίου NEM στην ενεργότητα των ενεργών μεταλλαγμάτων και τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.1.40) απέδειξαν ότι μόνο η S151C επηρεάζεται σημαντικά από την προεπάση με το NEM (2 mM) και μάλιστα παρατηρείται σημαντική μείωση της ενεργότητας (κατά 60%) για την περμεάση αυτή. Μικρή (1,4 φορές) αύξηση ενεργότητας παρατηρείται για την I153C, ενώ η ενεργότητα των υπόλοιπων μεταλλαγμάτων (V150C, V154C, L156C, M157C, I158C) παραμένει ουσιαστικά στα ίδια επίπεδα (100-120% του δείγματος ελέγχου που δεν είχε προεπωασθεί με NEM).

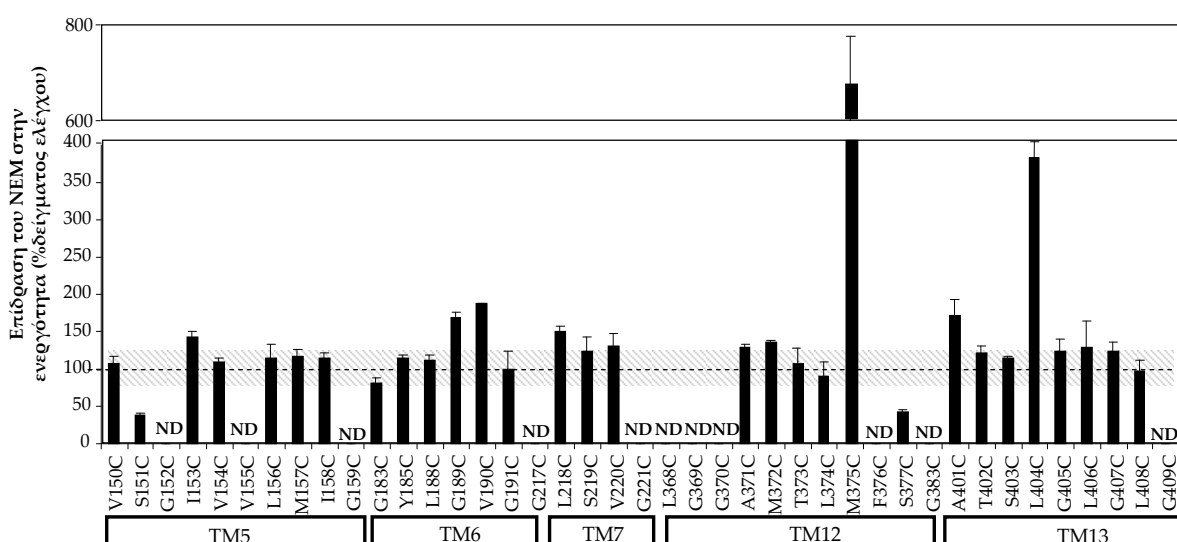
Οι θέσεις Gly-152, Val-155 και Gly-159 που εμφάνισαν ανενεργά μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης και η Ser-151 που εμφάνισε μετάλλαγμα μονής κυστεϊνης ευαίσθητο σε αλκυλίωση από το NEM μελετήθηκαν επίσης με εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση, στα πλαίσια της οποίας κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα S151A(wt), S151T(wt), G152A(wt), V155I(wt), V155M(wt) και G159A(wt) στο υπόβαθρο της περμεάσης φυσικού τύπου. Αυτά τα έξι μεταλλάγματα εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της περμεάσης φυσικού τύπου [95-114% του XanQ(wt), Εικόνα 3.1.39B], αλλά εμφανίζουν ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης σε διάφορα επίπεδα, 98-132% [S151A(wt)],

40-76% [S151T(wt), G152A(wt), V155M(wt)], 15-16% [V155I(wt)] και <3% [G159A(wt)] σε σχέση με την XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.39Γ), υποδεικνύοντας μία σημαντική συνεισφορά στη λειτουργικότητα κυρίως για τη θέση Gly-159.



Εικόνα 3.1.39: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων του μοτίβου ¹⁵⁰VSGIVVLMIG¹⁵⁹ (TM5).

A. Συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας στο TM5 της XanQ όπως προέκυψε από ανάλυση αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value $1.3e^{-1261}$, Width 21, Sites 114, βλ. Εικόνα 3.1.32). Με διακεκομμένο πλαίσιο σημειώνεται το «παράθυρο» αλληλουχίας στο μοτίβο που αναλύθηκε με μεταλλαξιγένεση. **B.** Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32 και ποσοτικοποίηση. **Γ.** Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, κατά τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32.



Εικόνα 3.1.40: Επίδραση του N-αιθυλμηλεϊμιδίου στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε μοτίβα της δομικής περιοχής «εισόδου» (TM5, 6, 7, 12, 13).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25° C, παρουσία NEM (2 mM), 10 min, 25°C (βλ. 2.9.4). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec), ως % ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία NEM για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα. Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στον μέσο όρο των τιμών της XanQ Cys-less-BAD (δείγμα ελέγχου) όπως μετρήθηκαν σε παράλληλα πειράματα. Για τα μεταλλάγματα που έχουν μηδενική αρχική ταχύτητα δεν έγινε προσδιορισμός (ND).

Η κινητική ανάλυση και τα πειράματα προσδιορισμού του προφίλ εξειδίκευσης για μεταλλάγματα των δυνητικά σημαντικών θέσεων 151-155 στο μοτίβο του TM5 [S151A(wt), S151C, S151T(wt), G152A(wt), I153C, V154C, V155M(wt)] κατέδειξαν τα εξής (Πίνακες 3.1.16, 3.1.17, 3.1.18): Η αντικατάσταση της σερίνης στην θέση 151 (Ser-151) με αλανίνη, κυστεΐνη, ή θρεονίνη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της K_m κατά 1,5-2 φορές και της V_{max} κατά 1,5-3,5 φορές σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, XanQ(wt) ή Cys-less XanQ. Οι αλλαγές αυτές προκαλούν αλλαγή του προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με την XanQ(wt) καθώς και τα τρία μεταλλάγματα [S151A(wt), S151C, S151T(wt)] αναγνωρίζουν 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη (αναστολή ενεργότητας σε ανταγωνισμό κατά 65-80%, K_i 543 μ M και 276 μ M, αντίστοιχα, για το S151C), ενώ το S151A(wt) αναγνωρίζει επίσης σε μικρό βαθμό το ουρικό οξύ και το S151C φαίνεται να έχει σημαντικά μειωμένη συγγένεια για την 6-θειοξανθίνη (50% αναστολή ενεργότητας σε ανταγωνισμό έναντι ξανθίνης, έναντι αναστολής κατά 80-90% που παρατηρείται με την XanQ(wt) και τα περισσότερα από τα μεταλλάγματα, Πίνακας 3.1.17).

Οι μεταλλάξεις G152A(wt), I153C, V154C δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τις τιμές K_m και V_{max} , σε σχέση με την περμεάση φυσικού τύπου, ενώ για το μετάλλαγμα V155M(wt) οι τιμές K_m και V_{max} είναι περίπου 3-4 φορές υψηλότερες της XanQ(wt). Και τα 4 αυτά μεταλλάγματα στις θέσεις 152-155 [G152A(wt), I153C, V154C, V155M(wt)] εμφανίζουν μεγαλύτερο εύρος προσδετών σε σχέση με την XanQ(wt) καθώς αναγνωρίζουν σε μικρό βαθμό την γουανίνη καθώς και τα ανάλογα 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη, αν και με σχετικά χαμηλή συγγένεια, όπως φαίνεται ιδιαίτερα για την 8-μεθυλοξανθίνη από τα πειράματα ανταγωνισμού έναντι της μεταφοράς ξανθίνης (K_i 505, 417, 628 και 439 μ M αντίστοιχα, Πίνακας 3.1.18).

Δύο από τα μεταλλάγματα που φαίνεται να αναγνωρίζουν σε μικρό βαθμό γουανίνη [S151C, G152A(wt)] εκφράστηκαν μέσω IPTG-επαγόμενων, πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* [JW4025, yjcD knock out] και εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα ενεργού μεταφοράς [3 H]γουανίνης (Εικόνα 3.1.41). Τα αποτελέσματα φανερώουν ότι οι αντικαταστάσεις των Ser-151 ή Gly-152 με Cys ή Ala, αντίστοιχα, δεν οδηγούν σε ανιχνεύσιμη ενεργότητα μεταφοράς γουανίνης. Επίσης για το μετάλλαγμα S151C έγιναν πειράματα δοκιμασίας ενεργού μεταφοράς ουρικού οξέος [uric acid (8 - 14 C)] σε συγκέντρωση 10 μ M και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν μεταφέρει ουρικό οξύ καθώς εμφανίζει μηδενικές τιμές αρχικής ταχύτητας μεταφοράς του υποστρώματος σε σχέση με τον μεταφορέα ουρικού οξέος SmLL9 που χρησιμοποιείται ως δείγμα θετικού ελέγχου (Εικόνα 3.1.42).

Πίνακας 3.1.16: Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Ser-151, Gly-152, Ile-153, Val-154, Val-155 (TM5).

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (0,1–100μM). Οι αρχικές ταχύτητες μετρήθηκαν σε χρόνους 5-20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism6*, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Περμεάση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
XanQ (Cys-less)	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.9	1858
S151A(wt)	6.0 ± 1.5	21.1 ± 1.7	3516
S151C	11.4 ± 1.2	16.2 ± 1.6	1421
S151T(wt)	6.6 ± 1.2	25.0 ± 1.5	3787
G152A(wt)	6.9 ± 2.5	9.1 ± 1.1	1318
I153C	9.3 ± 0.8	13.5 ± 0.5	1451
V154C	3.7 ± 0.4	9.0 ± 0.3	2432
V155M(wt)	20.2 ± 3.6	28.9 ± 2.2	1430

Πίνακας 3.1.17: Προφίλ εξειδίκευσης μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Ser-151, Gly-152, Ile-153, Val-154 και Val-155 (TM5).

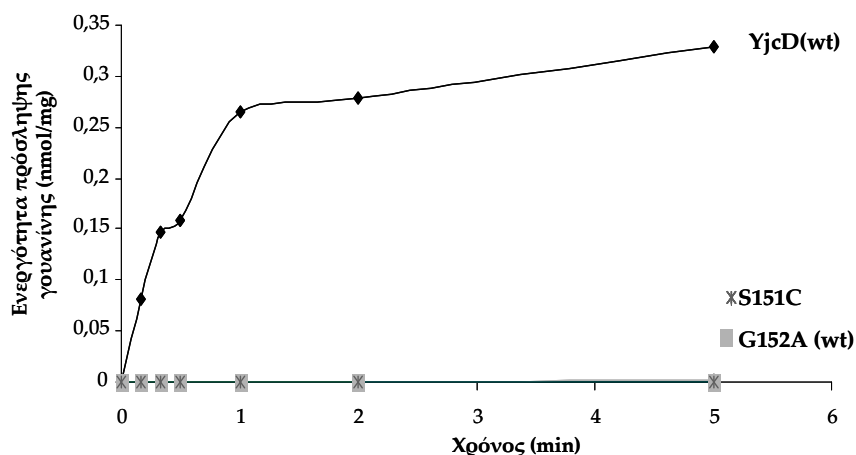
Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min) (βλ. 2.9.3). Από τις αρχικές ταχύτητες (όπως μετρήθηκαν σε 5-20 sec) έχουν αφαιρεθεί σε κάθε περίπτωση οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες (μέσοι όροι τριών πειραμάτων με S.D. <15%). Οι σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με την XanQ(wt) ή την Cys-less XanQ τονίζονται με έντονη γραφή.

% Ρυθμός πρόσληψης [³ H] Ξανθίνης που διατηρείται									
Ανταγωνιστής	XanQ(wt)	XanQ (C-less)	S151A(wt)	S151C	S151T(wt)	G152A(wt)	I153C	V154C	V155M(wt)
–	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	101	56	94	92	81	92	74	83
Υποξανθίνη	96	97	69	86	108	113	86	125	160
Αδενίνη	96	105	78	103	125	119	73	132	140
Γουανίνη	94	89	82	70	72	55	63	60	91
Ουρακίλη	101	102	70	86	104	103	99	100	82
2-Θειοξανθίνη	13	33	4	23	7	2	17	23	17
3-Μεθυλοξανθίνη	25	15	36	19	34	26	14	35	40
6-Θειοξανθίνη	20	33	8	50	13	30	40	50	18
7-Μεθυλοξανθίνη	105	36	53	40	65	61	49	71	39
8-Μεθυλοξανθίνη	96	35	36	20	33	29	20	30	44
Αλλοπουρινόλη	106	93	72	88	119	104	82	132	67
Οξυπουρινόλη	31	16	7	2	6	4	8	19	10

Πίνακας 3.1.18: Τιμές K_i μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Ser-151, Gly-152, Ile-153 και Val-154 ως προς τον ανταγωνισμό [³H]ξανθίνης με 7-/8-μεθυλοξανθίνη

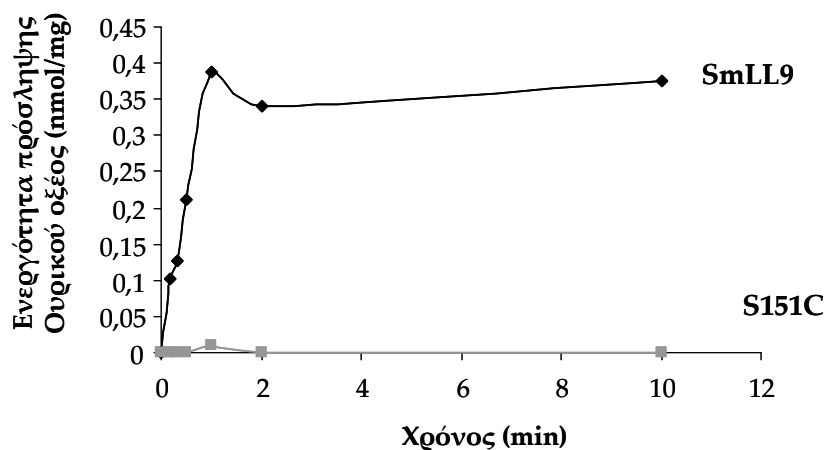
Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στον Πίνακα 3.1.17 για δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1 μM, 25 °C) αλλά μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες συγκεντρώσεων 0.1μM έως 1mM, 5min (βλ. 2.9.3). Τιμές IC₅₀ εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη με βάση το πρόγραμμα Prism 5. 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 συγκέντρωση της [³H] Ξανθίνης (1 μM), και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 μετρήσεων με τυπικές αποκλίσεις <20%.

Ανταγωνιστής	K _i (μM)						
	XanQ(wt)	XanQ(C-less)	S151C	G152A(wt)	I153C	V154C	V155M (wt)
7-Μεθυλοξανθίνη	>1000	800	543	>1000	828	696	533
8-Μεθυλοξανθίνη	>1000	650	276	505	417	628	439



Εικόνα 3.1.41: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]γουανίνης για τα μεταλλάγματα S151C και G152A(wt).

Κύτταρα *E. coli* [JW4025, yjcD knock out] που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)/S151C-BAD, pT7-5/xanQ(wt)/G152A-BAD ή pT7-5/yjcD(wt)-BAD (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]γουανίνης (0.1μM), στους 25 °C. Οι τιμές εκφράζονται σε nmol/mg πρωτεΐνης. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.



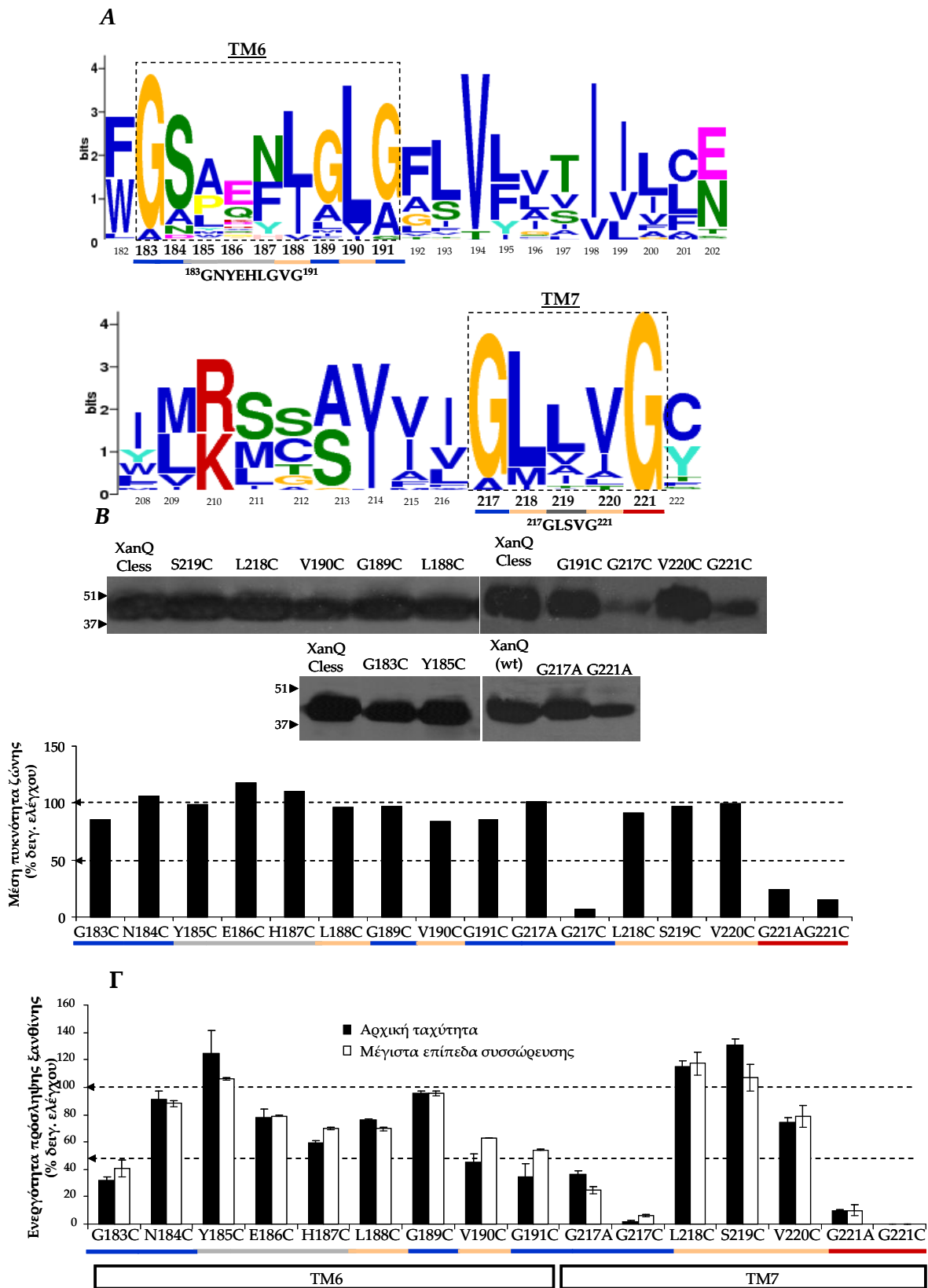
Εικόνα 3.1.42: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C]ουρικού οξέος από το μέταλλο S151C.

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)/S151C-BAD ή pT7-5/SmLL9(wt)-BAD (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [¹⁴C] ουρικού οξέος (10μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές ενεργότητας εκφράζονται σε nmol ουρικού οξέος που προσλαμβάνεται ανά mg πρωτεΐνης των κυττάρων. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Μοτίβα ¹⁸³GNYEHLGVG¹⁹¹ (TM6) και ²¹⁷GLSVG²²¹ (TM7)

Στα «παράθυρα» αλληλουχίας ¹⁸³GNYEHLGVG¹⁹¹ και ²¹⁷GLSVG²²¹ των μοτίβων των TM6 και TM7, αντίστοιχα, συναντώνται, σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση (Εικόνα 3.1.43A), τρεις απόλυτα (Gly-221) ή ισχυρά συντηρημένες θέσεις γλυκίνης (Gly-183, Gly-217), δύο θέσεις όπου συντηρείται κυρίως Gly αλλά και Ala (Gly/Ala-189, Gly/Ala-191), τέσσερις θέσεις όπου συντηρούνται υδρόφοβα αμινοξέα (Leu/Ile-188, Val/Leu-190, Leu/Met-218, Val/Ile-220) και μία θέση όπου συντηρείται πολικό αμινοξύ ή Ala (Asn/Ser/Ala-184) (Εικόνα 3.1.43A). Οι θέσεις Asn-184, Glu-186 και His-187 έχουν ήδη μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χωρίς να φανεί κάποια σημαντική συνεισφορά των καταλοίπων αυτών στον μηχανισμό λειτουργίας (βλ. 3.1.1). Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της XanQ στις υπόλοιπες θέσεις των παραπάνω περιοχών αλληλουχίας (Εικόνα 3.1.43B,Γ) οδήγησε σε τρία μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης από το TM6 (Y185C, L188C, G189C) και τρία από το TM7 (L218C, S219C, V220C) που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη και υψηλές τιμές ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης (70-130% της Cys-less XanQ), τρία μεταλλάγματα από το TM6 (G183C, V190C, G191C) που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη αλλά μέτρια ενεργότητα (αρχικές ταχύτητες 32-45%, μέγιστα επίπεδα, 41-63%), και δύο μεταλλάγματα από το TM7 (G217C, G221C) με πολύ χαμηλά επίπεδα στη μεμβράνη (<10% της Cys-less XanQ) και μηδενική ή σχεδόν μηδενική ενεργότητα (Εικόνα 3.1.43B,Γ). Μικρή (1,3 έως 1,8 φορές) αύξηση ενεργότητας παρατηρείται μετά από προεπώαση με το αντιδραστήριο NEM (2mM) για τα μεταλλάγματα G189C και V190C (TM6), L218C, S219C, V220C (TM7), ενώ η ενεργότητα των G183C, Y185C, L188C, G191C (TM6) δεν επηρεάζεται καθόλου από το NEM (Εικόνα 3.1.40).

Για τις θέσεις Gly-217 και Gly-221 που εμφάνισαν ανενεργά μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη κατασκευάστηκαν επιπλέον και μελετήθηκαν τα μεταλλάγματα G217A(wt), G221A(wt), στο υπόβαθρο της περμεάσης φυσικού τύπου. Η εισαγωγή αλανίνης αντί της γλυκίνης στην θέση 217 [G217A(wt)] επαναφέρει την κανονική έκφραση στην μεμβράνη και ανεβάζει τις τιμές ενεργότητας σε μέτρια επίπεδα [25-36% της XanQ(wt), Εικόνα 3.1.43B,Γ]. Αντίθετα, η εισαγωγή αλανίνης αντί της γλυκίνης στην θέση 221 [G221A(wt)] έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση χαμηλών επιπέδων έκφρασης [25% της XanQ(wt)] και ελάχιστης ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης [περίπου 10% της XanQ(wt), Εικόνα 3.1.43B,Γ], υποδεικνύοντας ότι η Gly-221 (TM7) είναι απαραίτητη για την δομική σταθερότητα της XanQ στο επίπεδο της μεμβράνης.



Εικόνα 3.1.43: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων των μοτίβων $^{183}\text{GNYEHLGVG}^{191}$ (TM6) και $^{217}\text{GLSVG}^{221}$ (TM7).

A. Συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας στο TM6 και στο TM7 της XanQ όπως προέκυψαν από ανάλυση αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value $8.0e^{-976}$ και $2.6e^{-685}$, Width 21 και 15, Sites 115

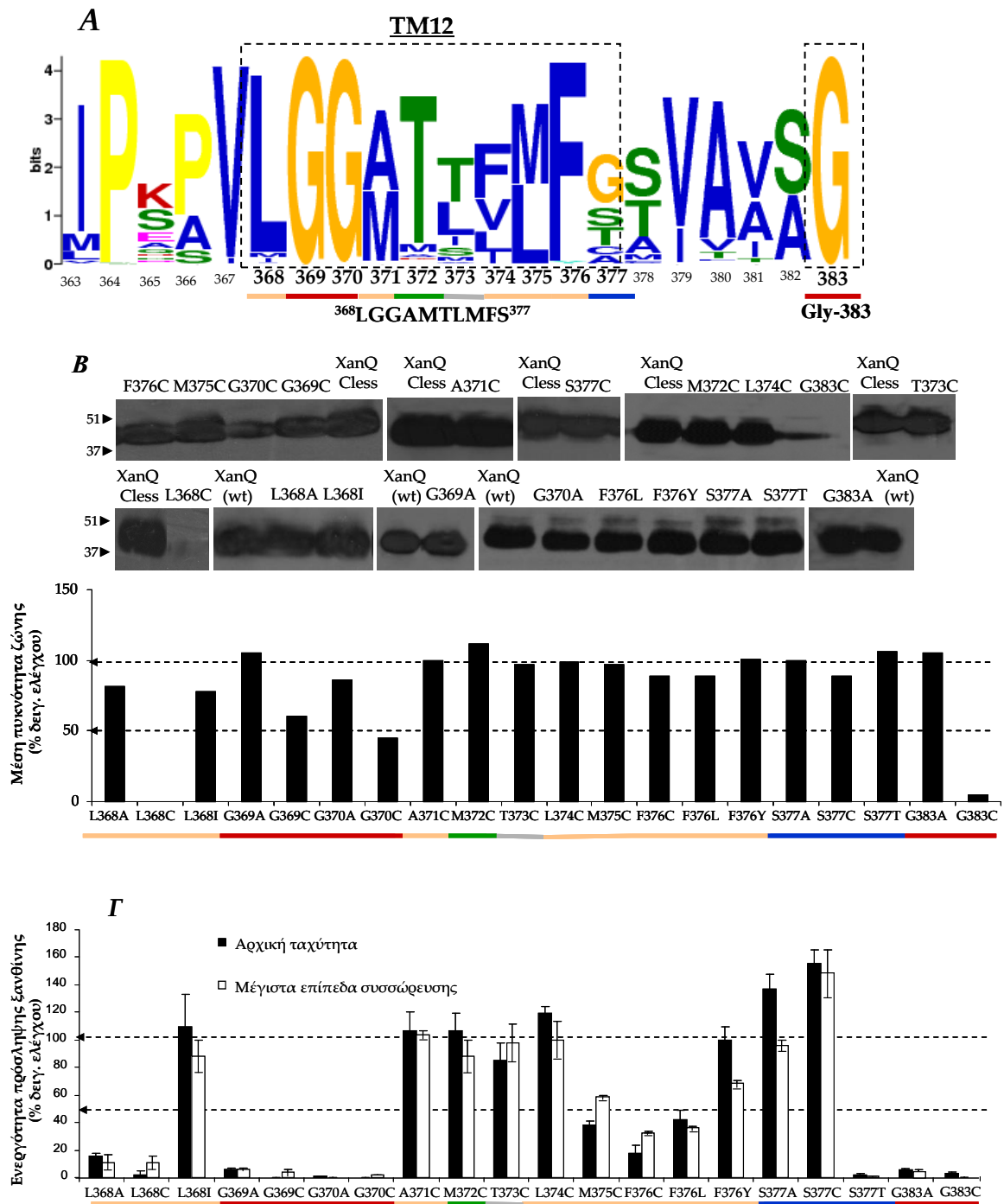
και 114, αντίστοιχα, βλ. Εικόνα 3.1.32). Με διακεκομμένα πλαίσια σημειώνονται «παράθυρα» αλληλουχίας στα μοτίβα που αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση. **Β.** Ανοσοαποτύπωση σε κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία (όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32) και ποσοτικοποίηση (πρόγραμμα Quantity One). **Γ.** Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, κατά τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32.

Μοτίβο ³⁶⁸LGGAMTLMFS³⁷⁷ και Gly-383 (TM12)

Στο μοτίβο του TM12 (Εικόνα 3.1.41A) υπάρχει σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση μία απόλυτα συντηρημένη Gly (Gly-383) σε απόσταση 5 θέσεων καταλοίπων από το «παράθυρο» αλληλουχίας ³⁶⁸LGGAMTLMFS³⁷⁷ που περιέχει επίσης δύο απόλυτα συντηρημένες Gly (Gly-369, Gly-370), καθώς και δύο ακόμη σχεδόν απόλυτα συντηρημένα κατάλοιπα στις θέσεις Leu-368 και Phe-376. Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της XanQ στις θέσεις 368-377 και 383 έδωσε πέντε μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (A371C, M372C, T373C, L374C, S377C) με υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη και πολύ υψηλές τιμές ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης (85-158% της Cys-less XanQ), δύο (M375C, F376C) με υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη αλλά σχετικά χαμηλές ή μέσες τιμές ενεργότητας (αρχικές ταχύτητες 18-38%), και τέσσερα (L368C, G369C, G370C και G383C) με αμελητέα επίπεδα ενεργότητας (αρχικές ταχύτητες ≤5%) εκ των οποίων δύο (L368C, G383C) εμφανίζουν μηδενικά ή σχεδόν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη και δύο (G369C, G370C) εμφανίζουν μειωμένα αλλά σημαντικά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την Cys-less XanQ (60% και 45%, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.1.44B, Γ). Μεταλλάγματα του μοτίβου με ικανοποιητικές τιμές ενεργότητας (αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης >20% σε σχέση με την Cys-less XanQ) εξετάστηκαν ως προς την επίδραση στην ενεργότητα της προεπάσης με το αντιδραστήριο NEM (2mM, 10 min) και βρέθηκε (Εικόνα 3.1.40) ότι μόνο δύο μεταλλάγματα, M375C και S377C, επηρεάζονται σημαντικά. Συγκεκριμένα, η ενεργότητα του S377C μειώνεται κατά 60%, ενώ η ενεργότητα του M375C αυξάνεται σημαντικά (6 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αρχική, γεγονός που σημαίνει ότι φτάνει σε επίπεδα ενεργότητας 2,5 φορές πάνω από αυτά της Cys-less XanQ, αν συνυπολογίσουμε και τα δεδομένα της Εικόνας 3.1.41Γ). Μικρή (1,2-1,4 φορές) αύξηση ενεργότητας παρατηρήθηκε για τα A371C, M372C και T373C ενώ η ενεργότητα του L374C παραμένει στα ίδια επίπεδα (90%, σε σχέση με την αρχική, Εικόνα 3.1.40).

Για τις θέσεις Leu-368, Gly-369, Gly-370 και Gly-383 που εμφάνισαν ανενεργά μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης, τη θέση Phe-376 όπου το

μετάλλαγμα μονής κυστεΐνης είχε μικρή ενεργότητα και τη θέση Ser-377 όπου το μετάλλαγμα μονής κυστεΐνης εμφάνισε ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM έγινε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο της περμεάσης φυσικού τύπου, στα πλαίσια της οποίας κατασκευάστηκαν τα μεταλλάγματα L368A(wt), L368I(wt), G369A(wt), G370A(wt), F376L(wt), F376Y(wt), S377A(wt), S377T(wt), και G383A(wt). Τα μεταλλάγματα αυτά βρέθηκε ότι εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.41B), αλλά εμφανίζουν ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης σε διάφορα επίπεδα, 70-137% [L368I(wt), F376Y(wt), S377A(wt)], 36-42% [F376L(wt)], 11-16% [L368A(wt)] και <7% [G369A(wt), G370A(wt), S377T(wt), G383A(wt)] σε σχέση με την XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.44Γ), υποδεικνύοντας κυρίως ότι οι γλυκίνες στις θέσεις 369, 370 και 383 είναι απαραίτητες για τη λειτουργία και ότι στη θέση 368 απαιτείται ένα ογκώδες υδρόφοβο αμινοξύ (Leu/Ile).

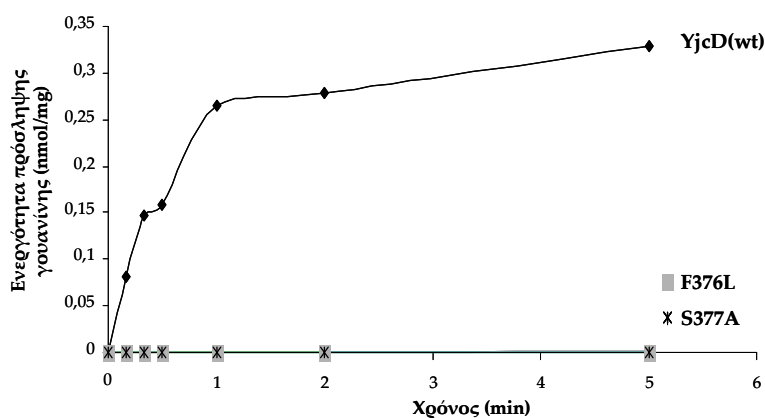


Εικόνα 3.1.44: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα μεταλλαγμάτων στις θέσεις του μοτίβου $^{368}\text{LGGAMTLMFS}^{377}$ και της Gly-383 (TM12).

A. Συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας στο TM12 της XanQ όπως προέκυψε από ανάλυση αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value $4.8e^{-1359}$, Width 21, Sites 114, βλ. Εικόνα 3.1.32). Με διακεκομμένα πλαίσια σημειώνονται η Gly-383 και το «παράθυρο» αλληλουχίας Leu-368 μέχρι Ser-377 στο μοτίβο που αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση. **B.** Ανοσοαποτύπωση σε κλάσματα μεμβρανών κυττάρων *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία

όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32 και ποσοτικοποίηση της έκφρασης με χρήση του προγράμματος Quantity One. Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, κατά τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32.

Η κινητική ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης για τα μεταλλάγματα L368I(wt), M375C, F376C, F376L(wt), F376Y(wt), S377A(wt) και S377C αποκάλυψε ότι η αντικατάσταση των θέσεων Met-375 ή Phe-376 με κυστεΐνη οδηγεί σε σημαντική μείωση της συγγένειας του μεταφορέα για τη ξανθίνη (αύξηση K_m 2-4 φορές) και συγχρόνως μείωση της V_{max} (1,5-2,5 φορές), ενώ τα υπόλοιπα πέντε μεταλλάγματα διατηρούν την υψηλή συγγένεια για τη ξανθίνη [τιμές K_m στα ίδια επίπεδα ή μειωμένες κατά 1,4-2,0 φορές σε σχέση με την XanQ(wt)] με παράλληλη αύξηση της V_{max} κατά 2-3 φορές [L368I(wt), F376L(wt), F376Y(wt), S377C] ή 6 φορές [S377A(wt)] (Πίνακας 3.1.19). Για αυτά τα πέντε μεταλλάγματα [L368I(wt), F376L(wt), F376Y(wt), S377A(wt), S377C] προσδιορίστηκε και το προφίλ εξειδίκευσης σε πειράματα ανταγωνισμού που αποκάλυψε μικρές διαφοροποιήσεις των F376Y(wt) και S377C που αναγνωρίζουν 8-μεθυλοξανθίνη (αναστολή ενεργότητας κατά 60-70%) και των F376L(wt) και S377A(wt) που αναγνωρίζουν σε μικρό βαθμό γουανίνη (αναστολή ενεργότητας κατά 40%), ενώ φαίνεται να έχουν σημαντικά μειωμένη συγγένεια για την 3-μεθυλοξανθίνη σε σχέση με την φυσικού τύπου XanQ (Πίνακας 3.1.20). Πειράματα μέτρησης της ενεργότητας πρόσληψης [³H]γουανίνης (0.1 μM) κατέδειξαν ότι τα μεταλλάγματα F376L(wt) και S377A(wt) δεν έχουν ανιχνεύσιμη ικανότητα μεταφοράς γουανίνης στις συνθήκες που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.1.45).



Εικόνα 3.1.45: Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]γουανίνης για τα μεταλλάγματα F376L(wt) και S377A(wt).

Κύτταρα *E. coli* [JW4025, yjcD knock out] (T184) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(wt)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις ή pT7-5/yjcD(wt)-BAD (0.7mg ολικής πρωτεΐνης/ mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γουανίνης (0.1μM), στους 25 °C. Οι τιμές εκφράζονται σε nmoI/mg πρωτεΐνης. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 3.1.19: Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Leu-368, Met-375, Phe-376, Ser-377 (TM12).

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (0,1–100μM). Οι αρχικές ταχύτητες μετρήθηκαν σε χρόνους 5-20 sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι τιμές K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

Περγαμίαση	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
XanQ(wt)	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1391
XanQ (Cys-less)	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.9	1858
L368I(wt)	2.7 ± 0.4	20.1 ± 0.9	7444
M375C	20.5 ± 4.7	6.8 ± 0.7	332
F376C	13.0 ± 0.7	4.0 ± 0.1	308
F376L(wt)	3.5 ± 0.6	13.2 ± 0.8	3771
F376Y(wt)	3.1 ± 0.4	15.8 ± 0.5	5097
S377A(wt)	4.7 ± 0.3	42.2 ± 0.9	8979
S377C	2.2 ± 0.1	11.2 ± 0.9	5091

Πίνακας 3.1.20: Προφίλ εξειδίκευσης μεταλλαγμάτων της XanQ στις θέσεις Leu-368, Phe-376, Ser-377 (TM12).

Κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM, 25 °C) μετά από επώαση με μη σημασμένους προσδέτες (1mM, 5min). Από τις αρχικές ταχύτητες (μετρήσεις σε 5-20 sec) έχουν αφαιρεθεί σε κάθε περίπτωση οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % ποσοστά των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με τους προσδέτες (μέσοι όροι τριών πειραμάτων με S.D. <15%). Οι σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με την XanQ(wt) ή την Cys-less XanQ τονίζονται με έντονη γραφή.

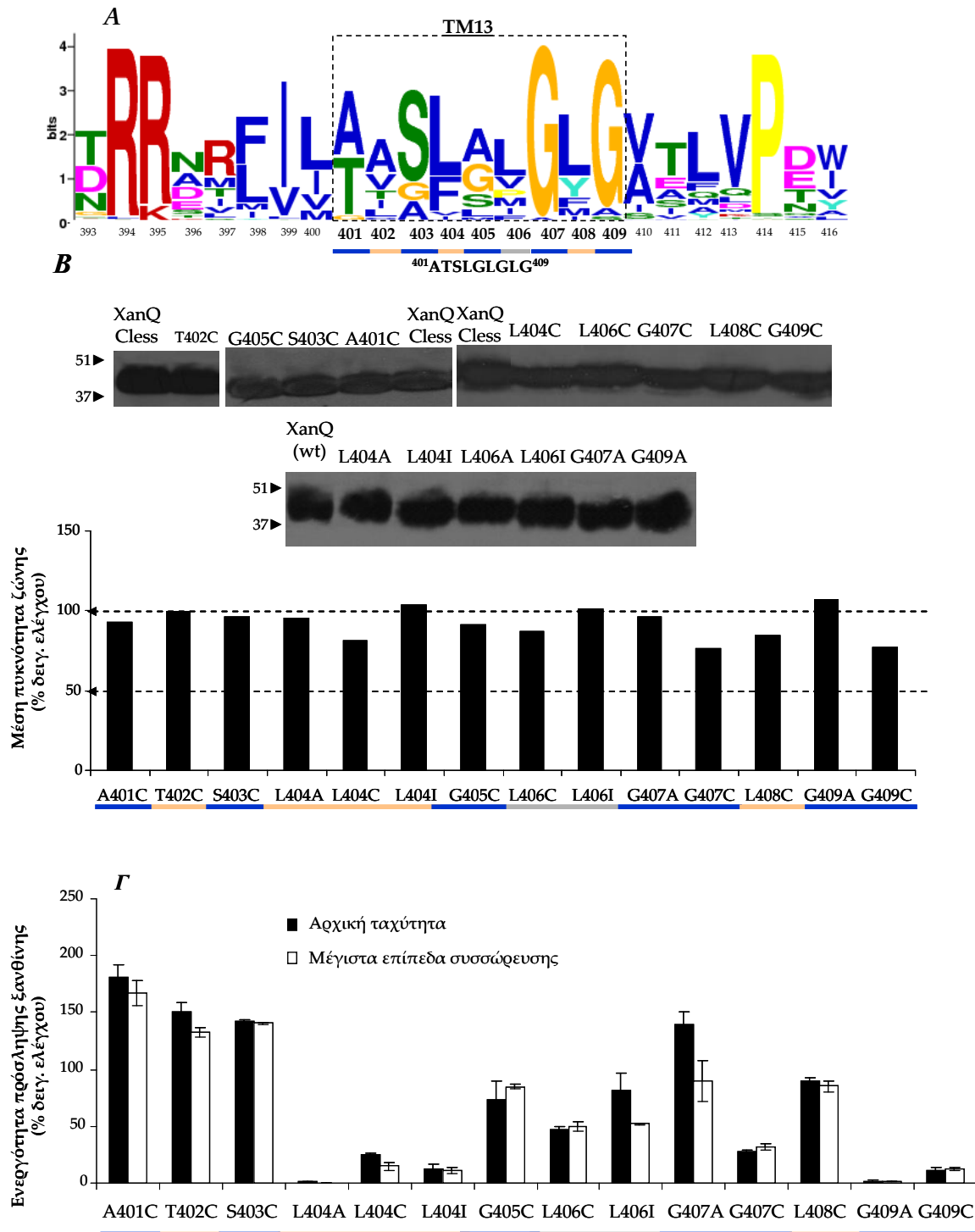
Ανταγωνιστής	% Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης που διατηρείται						
	XanQ(wt)	XanQ (C-less)	L368I(wt)	F376L(wt)	F376Y(wt)	S377A(wt)	S377C
–	100	100	100	100	100	100	100
Ουρικό οξύ	97	101	95	104	86	95	82
Υποξανθίνη	96	97	130	103	98	106	97
Αδενίνη	96	105	138	114	118	172	120
Γουανίνη	94	89	91	64	77	63	75
Ουρακίλη	101	102	116	105	104	96	95
2-Θειοξανθίνη	13	33	6	8	12	9	3
3-Μεθυλοξανθίνη	25	15	25	46	9	50	19
6-Θειοξανθίνη	20	33	19	17	29	21	9
7-Μεθυλοξανθίνη	105	36	106	114	83	132	63
8-Μεθυλοξανθίνη	96	35	48	84	40	62	28
Αλλοπουρινόλη	106	93	138	97	117	101	96
Οξυπουρινόλη	31	16	15	28	14	16	4

Μοτίβο ⁴⁰¹ATSLGLGLG⁴⁰⁹ (TM13)

Στο μοτίβο του TM13 (Εικόνα 3.1.46A), το «παράθυρο» αλληλουχίας ⁴⁰¹ATSLGLGLG⁴⁰⁹ περιέχει δύο θέσεις με σχεδόν απόλυτη φυλογενετική συντήρηση καταλοίπων γλυκίνης (Gly-407, Gly-409), τρεις θέσεις όπου συντηρούνται αλειφατικά ή αρωματικά αμινοξέα (Leu/Phe-404, Leu/Val/Met-406, Leu/Tyr/Phe-408) και δύο θέσεις όπου συντηρούνται πολικά ή μικρά αμινοξέα (Ala/Thr-401, Ser/Gly/Ala-403). Η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στις θέσεις 401-409 οδήγησε σε εννέα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (A401C, T402C, S403C, L404C, G405C, L406C, G407C, L408C και G409C) που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη, παρόμοια με αυτά της Cys-less XanQ (Εικόνα 3.1.46B), από τα οποία πέντε (A401C, T402C, S403C, G405C, L408C) που παρουσιάζουν πολύ υψηλές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (74-150% της Cys-less XanQ), τρία (L404C, L406C, G407C) που εμφανίζουν χαμηλή ενεργότητα (αρχικές ταχύτητες 20-48%) και ένα (G409C) που έχει ελάχιστη ενεργότητα (αρχική ταχύτητα ≤10%). (Εικόνα 3.1.46Γ).

Τα αποτελέσματα επίδρασης του NEM (Εικόνα 3.1.40) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων έδειξαν ότι μόνο το L404C επηρεάζεται σημαντικά από την προεπάση με το αντιδραστήριο NEM (2 mM). Η ενεργότητα του μεταλλάγματος L404C αυξάνεται σημαντικά μετά την προεπάση με NEM (4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αρχική, γεγονός που σημαίνει ότι φτάνει σε επίπεδα ενεργότητας περίπου 80% της Cys-less XanQ, αν συνυπολογίσουμε και τα δεδομένα της Εικόνας 3.1.46Γ). Μικρή (1,2 έως 1,7 φορές) αύξηση ενεργότητας παρατηρείται για τα μεταλλάγματα A401C, T402C, G405C, L406C και G407C, ενώ η ενεργότητα των S403C και L408C παραμένει ουσιαστικά στα ίδια επίπεδα (97-113%, σε σχέση με την αρχική).

Για τις θέσεις Leu-404, Leu-406, Gly-407 και Gly-409 που εμφάνισαν μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης με πολύ χαμηλή έως σχεδόν μηδενική ενεργότητα έγινε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση στο υπόβαθρο της περμεάσης φυσικού τύπου, στα πλαίσια της οποίας κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν τα μεταλλάγματα L404A(wt), L404I(wt), L406A(wt), L406I(wt), G407A(wt) και G409A(wt). Τα μεταλλάγματα αυτά εκφράζονται στην μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια με της XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.46B) και εμφανίζουν ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης σε επίπεδα 70-139% [L406I(wt), G407A(wt)], 11-13% [L404I(wt)] ή <3% [L404A(wt), L406A(wt), G409A(wt)] σε σχέση με την XanQ(wt) (Εικόνα 3.1.46Γ). Συνολικά, τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης στο μοτίβο του TM13 υποδεικνύουν δύο θέσεις όπου μία πλευρική ομάδα Gly (Gly-409) ή Leu (Leu-404) φαίνεται να είναι αναντικατάστατη για τη βέλτιστη λειτουργία της XanQ.



Εικόνα 3.1.46: Συντήρηση καταλοίπων, έκφραση στη μεμβράνη και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων του μοτίβου $^{401}\text{ATSLGLGLG}^{409}$ (TM13).

A. Συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας στο TM13 της XanQ όπως προέκυψε από ανάλυση αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων Ξανθίνης και Ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME (e-value $2.3e^{-1201}$, Width 24, Sites 114, βλ. Εικόνα 3.1.32). Με διακεκομμένο πλαίσιο σημειώνεται το «παράθυρο» αλληλουχίας στο μοτίβο που αναλύθηκε με μεταλλαξιγένεση. **B.** Ανοσοαποτύπωση σε κλάσματα μεμβρανών κυττάρων

E.coli T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, μετά από πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32 και ποσοτικοποίηση βάσει του προγράμματος Quantity One. Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E.coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, κατά τη διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.1.32.

Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.1.3

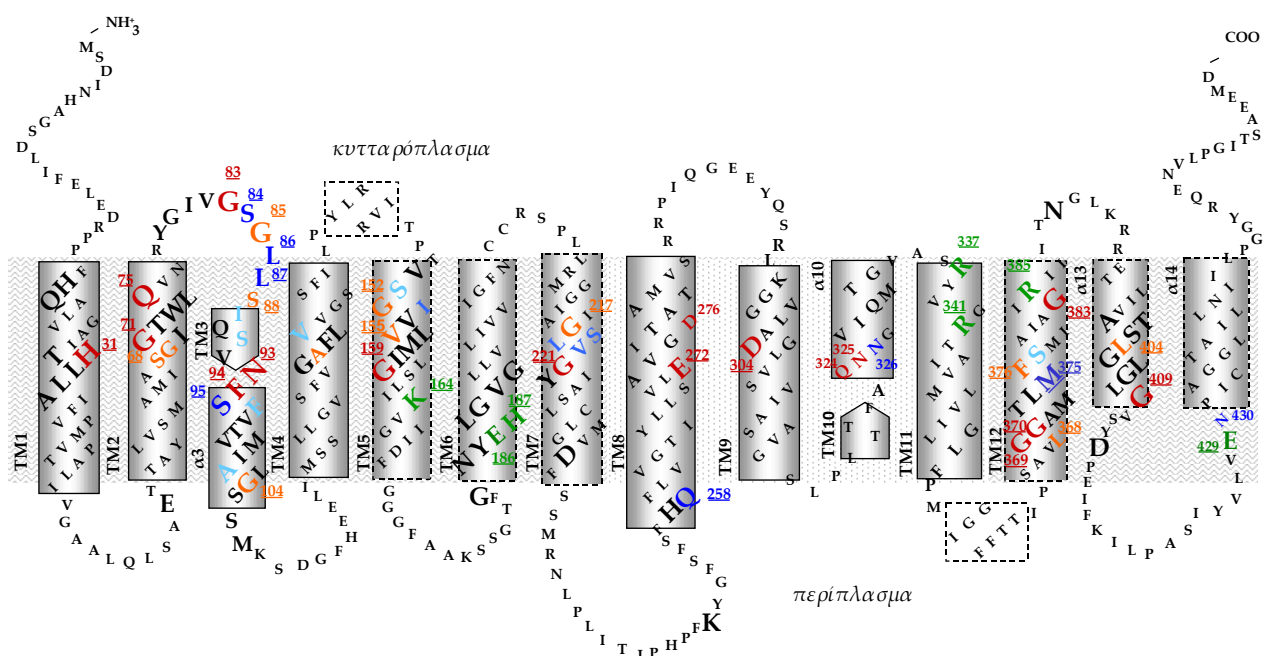
Έγινε για πρώτη φορά συστηματική ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε «παράθυρα» αλληλουχιών υψηλού βαθμού συντήρησης σε όλα τα χαρακτηριστικά μοτίβα της περμεάσης XanQ, όπως αναδείχθηκαν από τη φυλογενετική ανάλυση της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού της οικογένειας NCS2/COG2233. Τέτοια «παράθυρα» αλληλουχιών εντοπίστηκαν σε όλα τα διαμεμβρανικά τμήματα (TM) της περμεάσης. Δεδομένου ότι αρκετά από τα μοτίβα αυτά είχαν μελετηθεί στα πλαίσια προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου μας (TM3, TM8-11, TM14), για να ολοκληρωθεί το σύνολο στην παρούσα ενότητα μελετήθηκαν εκτενέστερα τα εξής: ³⁰THLLA³⁴ (TM1), ⁶⁸SGIGTWLQ⁷⁵ (TM2), ¹²⁸GAFLV¹³² (TM4), ¹⁵⁰VSGIVVLMIG¹⁵⁹ (TM5), ¹⁸³GNYEHLGVG¹⁹¹ (TM6), ²¹⁷GLSVG²²¹ (TM7), ³⁶⁸LGGAMTLMFS³⁷⁷ (TM12) και ⁴⁰¹ATSLGLGLG⁴⁰⁹ (TM13) μαζί με τα απόλυτα συντηρημένα κατάλοιπα Ser-62 (TM2), Gly-123 και Ser-136 (TM4), Gly-159 (TM5), Gly-383 (TM12). Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην χαρτογράφηση ορισμένων νέων σημαντικών καταλοίπων αμινοξέων, καθώς και αντίστοιχων περιοχών διαμεμβρανικών ελίκων της XanQ, των οποίων ο ρόλος δεν είχε αξιολογηθεί στο παρελθόν από άλλες μελέτες, είτε στην XanQ είτε σε συγγενικούς ομόλογους μεταφορείς (όπως στον UapA). Συνοπτικά:

1. Σε μοτίβα της δομικής περιοχής «πυρήνα»: Πέρα από τη σημασία της His-31 (TM1) και της Asn-93 (TM3) για την λειτουργία και εξειδίκευση του κέντρου δέσμευσης της XanQ (βλ. ενότητα 3.1.1), τη συνεισφορά των Phe-94 και Ser-95 (TM3) στον καθορισμό του προφίλ εξειδίκευσης και τον σημαντικό δομικό ρόλο της Gly-83 (TM3) (βλ. ενότητα 3.1.2), που είχαν βρεθεί από τις προηγούμενες μελέτες, τα μοτίβα της N-τελικής πλευράς της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM1-4) περιέχουν επίσης μία περιοχή αλληλουχίας στο κυτταροπλασματικό άκρο του **TM2** που αναδεικνύεται ως σημαντική για την ενεργότητα, με ιδιαίτερα σημαντικά τα κατάλοιπα Ser-68, Gly-69, Ile-70, Gly-71 και Gln-75. Από αυτά, η **Gly-71** και η **Gln-75** φαίνεται να είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία και/ή τη δομική οργάνωση της XanQ (όπως υποστηρίζεται από την έλλειψη ενεργότητας των μεταλλαγμάτων G71C και Q75N και τα πολύ χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα στη μεμβράνη των G71A και Q75A/C/E, βλ. και ενότητα 3.1.1 για την Gln-75) ενώ οι **Ser-68**, **Gly-69** και **Ile-70** φαίνεται να συνεισφέρουν στον καθορισμό του προφίλ εξειδίκευσης (όπως υποστηρίζεται από το ότι το S68T αναγνωρίζει και μεταφέρει σε μικρό βαθμό γουανίνη, το I70C δεν αναγνωρίζει καθόλου την 6-θειοξανθίνη ενώ μεταλλάγματα και στις τρεις αυτές θέσεις, S68T, G69A, I70C, αναγνωρίζουν με σημαντική συγγένεια την 8-μεθυλοξανθίνη). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εν λόγω περιοχή και, ιδιαίτερα, τα αναντικατάστατα κατάλοιπα του TM2

(Gly-71, Gln-75) βρίσκονται κοντά στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της περμεάσης (βλ. και παρακάτω, 3.1.4). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμπληρώνουν τα δεδομένα για τον ρόλο σημαντικών αμινοξέων της δομικής περιοχής «πυρήνα» της XanQ. Σε άλλες μελέτες του εργαστηρίου μας (βλ. και ενότητα 3.1.1) έχει εδραιωθεί επίσης, μεταξύ άλλων, ο αναντικατάστατος λειτουργικός ρόλος του Glu-272, της καρβοξυλομάδας του Asp-276 (TM8), του Asp-304 (TM9), των Gln-324 και Asn-325 (TM10), καθώς και η σημαντική συνεισφορά των Gly-275, Thr-278, Ala-279 (TM8), Ala-323 (TM10), Thr-332, Gly-333, Ser-336 (TM10) και (της σημαντικής για τη δομική σταθερότητα) Pro-318 (TM10), σε θέσεις που βρίσκονται όλες σε μοτίβα της C-τελικής πλευράς της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM8-11).

2. Σε μοτίβα της δομικής περιοχής «εισόδου»: Πέρα από το «παράθυρο» αλληλουχίας του μοτίβου TM14 που είχε μελετηθεί στα πλαίσια της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης του TM14 και είχε αναδείξει ως σημαντικές για την λειτουργική αλληλεπίδραση με θέσεις του TM10 τις Asn-430 και Ile-432 (Parakostas *et al.*, 2008), αλληλουχίες της XanQ που εμπίπτουν στις διαμεμβρανικές έλικες της δομικής περιοχής «εισόδου» (TM5-7, TM12-14) αναλύονται για πρώτη φορά στην παρούσα διατριβή. Στα μοτίβα αλληλουχίας αυτών των TM αναδείχθηκε κυρίως η δομική και/ή λειτουργική σημασία οκτώ (8) απόλυτα ή υψηλά συντηρημένων από φυλογενετική άποψη καταλοίπων γλυκινών οι οποίες βρέθηκε ότι είναι είτε αναντικατάστατες για τη λειτουργία (**Gly-159, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409**) και/ή τη δομική σταθερότητα της περμεάσης στη μεμβράνη (**Gly-221**) είτε σημαντικές ως μικρές πλευρικές ομάδες (Gly/Ala) στις αντίστοιχες θέσεις για τη διατήρηση της λειτουργικότητας και/ή της δομικής σταθερότητας στη μεμβράνη (Gly-152, Gly-217). Επίσης, αναδείχθηκε η σημασία τριών θέσεων με υδρόφοβα κατάλοιπα της XanQ (**Val-155, Leu-368, Leu-404**) όπου για την εξασφάλιση σημαντικής ενεργότητας είναι απαραίτητη η παρουσία υδρόφοβου αμινοξέος παρόμοιου όγκου (Val/Met-155, Leu/Ile-368, Leu/Cys+NEM-404) όπως υποστηρίζεται από τις ιδιότητες των μεταλλαγμάτων V155C/I/M, L368A/C/I και L404A/C/I. Τέλος, σε τρεις θέσεις (**Ser-151, Phe-376, Ser-377**) φάνηκε καθαρά ότι η αύξηση του όγκου της πλευρικής ομάδας ή μικρές αλλαγές στην πλευρική ομάδα αμινοξέος επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα (ευαισθησία των S151C και S377C σε αναστολή ενεργότητας από το NEM, μηδενική ενεργότητα του S377T, μέτρια ενεργότητα των S151T, F376L) ή το προφίλ εξειδίκευσης (αναγνώριση 7-/8-μεθυλοξανθίνης από τα S151A/C/T, αναγνώριση 8-μεθυλοξανθίνης από τα F376Y και S377C, μειωμένη συγγένεια για 3-μεθυλοξανθίνη για τα F376L και S377A). Από το σύνολο αυτών των αποτελεσμάτων, βλέπουμε ότι τα σημαντικότερα κατάλοιπα της δομικής περιοχής «εισόδου» της XanQ συγκεντρώνονται κυρίως στα **TM5** (Ser-151, Gly-

152, Val-155, Gly-159), **TM12** (Leu-368, Gly-369, Gly-370, Phe-376, Ser-377, Gly-383) και **TM13** (Leu-404, Gly-409), αλλά και TM14 (από τις προηγούμενες μελέτες, Asn-430, Ile-432, Gly-435/436). Από αυτές τις περιοχές αλληλουχίας, τα TM5 και TM12 φαίνεται να προσεγγίζουν περισσότερο την περιοχή «πυρήνα» σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο (η Tyr-342(UraA)/Phe-376, μάλιστα, αλληλεπιδρά απευθείας με το υπόστρωμα μέσω δυνάμεων van der Waals στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA) και έχουν προταθεί ως οι πλέον δυναμικές α-έλικες στον μηχανισμό της εναλλαγής διαμορφώσεων σε σχέση με την προσβασιμότητα του ενεργού κέντρου (Lu *et al.*, 2011). Επίσης, τα σημαντικά αμινοξέα των TM13 και TM14 βρίσκονται στην περιπλασματική πλευρά των αντίστοιχων α-ελίκων σε θέσεις που πιθανόν να συνεισφέρουν στον έλεγχο της προσβασιμότητας του υποστρώματος στην διαδρομή του προς το ενεργό κέντρο, όπως έχει προταθεί για τον δομικά ομόλογο μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού UraA (Kosti *et al.*, 2012).



Εικόνα 3.1.47: Τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το μοντέλο της Εικόνας 3.1.21 μετά τα αποτελέσματα των ενοτήτων 3.1.1, 3.1.2 & 3.1.3. (Υπενθυμίζεται ο συμβολισμός των μεγεθυμένων καταλοίπων: **σημαντικά ή/και αναντικατάστατα για την λειτουργία του μεταφορέα, αναντικατάστατα ως προς το μέγεθος ή το είδος της πλευρικής ομάδας, ευαίσθητα στο NEM, μερικώς ευαίσθητα στο NEM, προσβάσιμα από υδρόφιλο SH-αντιδραστήριο**, μελετήθηκαν στις 3.1.1, 3.1.2 & 3.1.3)

3.1.4 Αρχικό μοντέλο διευθέτησης των διαμεμβρανικών τμημάτων α – ελίκων της περμεάσης XanQ

Τα δεδομένα από την λεπτομερή ανάλυση μεταλλαξιγένεσης που παρουσιάστηκε στις ενότητες 3.1.1, 3.1.2 και 3.1.3 χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με μία λεπτομερή συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των πιο συγγενικών ομολόγων της XanQ στην οικογένεια NCS2/COG2233 για να εξαχθεί ένα «μοντέλο εργασίας» για την πιθανή διευθέτηση των διαμεμβρανικών τμημάτων α -ελίκων στην τριτοταγή δομή της XanQ. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάλυση αυτή ξεκίνησε (βλ. Karena and Frillingos 2009) πριν από την παρουσίαση της πρώτης κρυσταλλικής δομής ενός ομολόγου της οικογένειας NCS2 (UraA; Lu *et al.*, 2011), σε μια χρονική περίοδο όπου δεν υπήρχαν άλλα στοιχεία για την πιθανή δομική οργάνωση των μεταφορέων NCS2 εκτός των τοπολογικών προβλέψεων (βλ. και ενότητα 3.1.1). Η ανάλυση της πιθανής δομικής οργάνωσης των α -ελίκων στηρίχθηκε στην αξιολόγηση της κάθε θέσης αμινοξέος ανάλογα με τον βαθμό συντήρησης και τον χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας (από τα συγκριτικά φυλογενετικά δεδομένα, 3.1.4) και τη λειτουργική σημασία που έχει το αντίστοιχο αμινοξύ στην περμεάση XanQ (από τα δεδομένα της μεταλλαξιγένεσης, βλ. 3.1.3) και, στη συνέχεια, στην τοποθέτηση των α -ελίκων με τέτοιο τρόπο ώστε όψεις της κάθε έλικας που περιέχουν πολικά, πολύ συντηρημένα και/ή σημαντικά για τη λειτουργία αμινοξέα να «βλέπουν» προς άλλες α -έλικες ενώ όψεις που περιέχουν υδρόφοβα, μη σημαντικά και/ή μη συντηρημένα αμινοξέα να «βλέπουν» κυρίως μακριά από άλλες α -έλικες (προς το λιπιδιακό μικροπεριβάλλον). Παρόμοιες μελέτες για την εξαγωγή ενός μοντέλου διευθέτησης διαμεμβρανικών α -ελίκων στο χώρο χωρίς να στηρίζεται σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα ή σε αναλύσεις σταυρωτής αλληλοσύνδεσης έχουν γίνει στο παρελθόν και για άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως την βακτηριοροδοψίνη (Baldwin, 1993) και την περμεάση λακτόζης (Frillingos *et al.*, 1998).

Όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια, για την φυλογενετική ανάλυση από όπου πήραμε τα συγκριτικά δεδομένα για τις ομόλογες αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε καταρχήν μία ομάδα με τα συγγενέστερα ομόλογα που εμφανίζουν ταυτότητα καταλοίπων >42% σε σχέση με την XanQ (όριο που εξαιρεί την XanP που είναι το πλησιέστερο παράλογο της XanQ από την *E. coli* K-12) (Παράρτημα 3, Πίνακας Π3.2, εξήντα επτά (67) ομόλογα, όπως προέκυψαν από BLAST search, 4-3-2009, βλ. Karena and Frillingos, 2009, Fig. S2) και, στη συνέχεια, μια ευρύτερη ομάδα με ομόλογα που εμφανίζουν ταυτότητα >32% με την XanQ (όριο που περιλαμβάνει τους περισσότερους δυνητικούς μεταφορείς ξανθίνης, ουρικού και/ή ξανθίνης-ουρικού από

βακτήρια ή αρχαία αλλά εξαιρεί ομόλογα από θερμοφίλους οργανισμούς) (Πίνακας Π3.3, εκατόν ογδόντα εννέα (189) ομόλογα, όπως προέκυψαν από BLAST search, 13-11-2009, βλ. Georgopoulou *et al.*, 2010, Table S2).

Μετά την δημοσίευση του προτύπου της κρυσταλλικής δομής από τον ομόλογο μεταφορέα (περμεάση ουρακίλης) UraA, το αρχικό μοντέλο διευθέτησης προσαρμόσθηκε ανάλογα, κυρίως ως προς το ότι τα δομικά δεδομένα προβλέπουν πλέον 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TM) και όχι 12 όπως ήταν οι αρχικές τοπολογικές προβλέψεις και ότι δύο TM (τα TM3 και TM10) περιλαμβάνουν εκτεταμένες περιοχές ελεύθερης διαμόρφωσης ή β-φύλλου και συγκροτούνται μόνο κατά το ήμισυ από α -έλικες ($\alpha 3$ και $\alpha 10$, αντίστοιχα) (βλ. Karena and Frillingos, 2011).

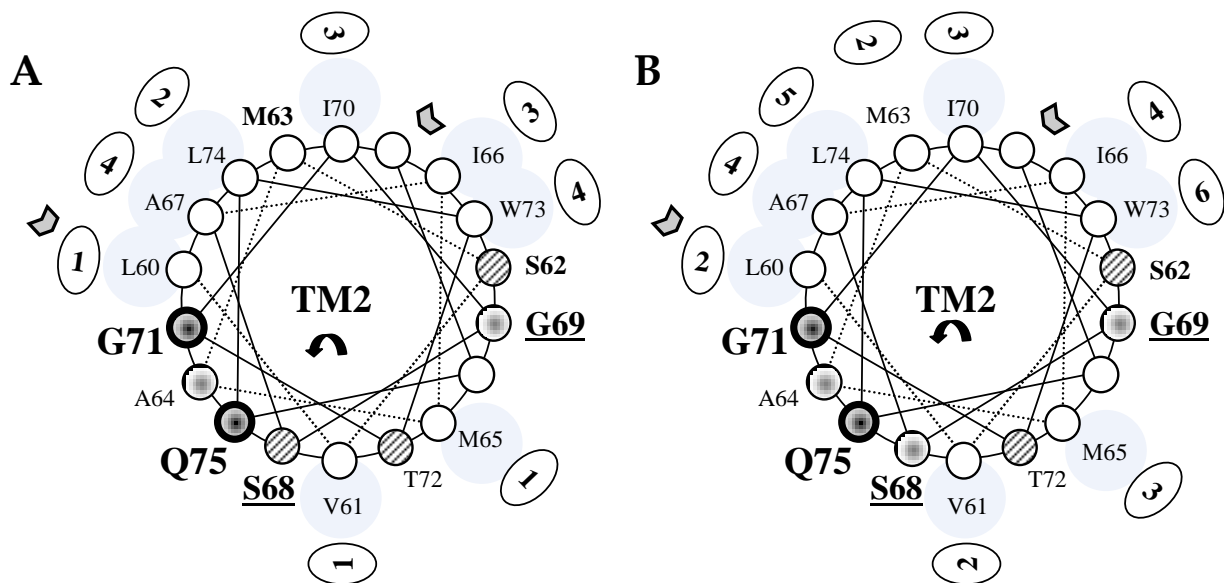
Η πληροφορία από αυτό το τελικό μοντέλο εργασίας για τη δομική οργάνωση των α -ελίκων της XanQ (που παρουσιάζεται στη συνέχεια) χρησιμοποιήθηκε, μαζί με την αναλυτική πληροφορία από την δομική μοντελοποίηση της XanQ με βάση την κρυσταλλική δομή του ομόλογου UraA (Karena and Frillingos, 2011; Frillingos, 2012), για την απεικόνιση της πιο πιθανής διευθέτησης των α -ελίκων βάσει της οποίας επιλέχτηκαν ζεύγη θέσεων καταλοίπων για την κατασκευή μεταλλαγμάτων της XanQ με ζεύγη κυστεϊνών (double-Cys mutants). Αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια της παρούσας μελέτης σε πειράματα προσδιορισμού της εγγύτητας των θέσεων αυτών κατά τις αλλαγές διαμόρφωσης που σχετίζονται με τη λειτουργία του μεταφορέα (βλ. 3.2).

3.1.4.1 Στοίχιση αλληλουχιών των ομολόγων της περμεάσης XapQ με βαθμό ταυτότητας αλληλουχίας >32% ή >42% και εξαγωγή ενός μοτίβου για κάθε α -έλικα βάσει της συντήρησης και της λειτουργικής σπουδαιότητας των καταλοίπων

Από την φυλογενετική ανάλυση (Παράρτημα 3, Π3.3) και τη στοίχιση των αλληλουχιών των 67 (Πίνακας Π3.2, >42% ταυτότητα με την XapQ) ή 189 ομολόγων (Πίνακας Π3.3, >32% ταυτότητα με την XapQ) σημειώθηκαν οι θέσεις της αλληλουχίας όπου συντηρούνται: (α) μικρές ή πολικές ομάδες αμινοξέων (Gly, Ala, Ser, Thr), (β) ισχυρώς πολικά (Gln, Asn) ή πιθανώς ιοντιζόμενα αμινοξέα (Glu, Asp, His, Lys, Arg), (γ) αμινοξέα με αλειφατική πλευρική ομάδα (Leu, Ile, Val), ή (δ) απαντώνται αρκετά διαφορετικά αμινοξέα, κυρίως υδρόφοβα. Οι θέσεις αυτές απεικονίσθηκαν στις προβολές α -έλικας των TM της περμεάσης XapQ και θεωρήθηκε ότι οι θέσεις (α) και (β) (πολικά, μικρά ή ιοντιζόμενα αμινοξέα) είναι πιθανώς σημαντικές για αλληλεπίδραση με άλλα τμήματα του μορίου ή με το υδρόφιλο κέντρο δέσμησης («βλέπουν» προς άλλες α -έλικες ή προς το υπόστρωμα) ενώ οι θέσεις (γ) και (δ) (υδρόφοβα αμινοξέα) είναι κυρίως περιοχές επαφής με το λιπιδικό μικροπεριβάλλον της μεμβράνης («βλέπουν» μακριά από άλλες α -έλικες) ή μπορεί να αλληλεπιδρούν με αντίστοιχες υδρόφοβες περιοχές άλλων α -ελίκων (βλ. παρακάτω, 3.1.4.2).

Συγχρόνως, στην απεικόνιση των α -ελίκων σημειώθηκαν οι θέσεις όπου το αντίστοιχο αμινοξύ της XapQ έχει σημαντικό ρόλο (αναντικατάστατο για τη λειτουργία, επιδέχεται περιορισμένο εύρος αντικαταστάσεων, δεν επιτρέπει αύξηση του μεγέθους μέσω μεταλλαξιγένεσης ή αλκυλίωσης με NEM) ή υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι προσβάσιμο από υδρόφιλα SH-αντιδραστήρια, με βάση τα πειραματικά δεδομένα (βλ. Εικόνα 3.1.47). Κατά κανόνα, οι θέσεις αυτές εμπίπτουν σε όψεις α -έλικας που περιέχουν πολικά και/ή μικρά αμινοξέα [θέσεις των κατηγοριών (α) ή (β)] και «βλέπουν» προς άλλες α -έλικες ή στην υδρόφιλη περιοχή του κέντρου δέσμησης.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι προβολές α -ελίκων που σχεδιάσθηκαν αρχικά (2009, με βάση τους αλγορίθμους πρόβλεψης που προέβλεπαν 12 TM, Παράρτημα 2) προσαρμόστηκαν στη συνέχεια (2011, με βάση την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA, που υποδεικνύει 14 TM με δύο TM να περιέχουν α -έλικες κατά το ήμισυ, $\alpha 3$ και $\alpha 10$) με αντίστοιχες τροποποιήσεις των TM3, TM10 και TM9-14 (Karena and Frillingos, 2011) (βλ. Παράρτημα 3.3). Η τελική απεικόνιση κάθε α -έλικας ξεχωριστά δίνεται στο παράρτημα 3 (Εικόνα Π3.2), ενώ ενδεικτικά εδώ δίνεται η απεικόνιση α -έλικας του TM2 (Εικόνα 3.1.48).



Εικόνα 3.148: Απεικόνιση α -έλικας του TM2 της περμεάσης XanQ όπου φαίνεται η συντήρηση και η λειτουργική σπουδαιότητα των καταλοίπων.

Το κεντρικό τμήμα του TM2 (18 κατάλοιπα, από A58 έως Q75) απεικονίζεται σε προβολή α -έλικας. Κατάλοιπα που εμφανίζουν απόλυτη ή σχεδόν απόλυτη συντήρηση ανάμεσα στα διαφορετικά μέλη-ομόλογα της XanQ αριθμούνται (σύμφωνα με την XanQ) και τονίζονται με έντονα γράμματα (**bold**). Οι θέσεις όπου συντηρείται ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας στα ομόλογα της XanQ αριθμούνται (σύμφωνα με την XanQ) και συμβολίζονται με αμυδρό χρωματικό στόχο (μικρό μέγεθος αμινοξέος), διαγράμμιση (πολικό αμινοξύ) ή με απαλό μπλε φόντο (υδροφόβη πλευρική ομάδα). Δίπλα στα υδροφόβα αμινοξέα υπάρχουν ελλειψοειδείς κύκλοι στους οποίους αναγράφεται το πλήθος των διαφορετικών επιπλέον αμινοξέων που εμφανίζονται σε αυτή την θέση στα διαφορετικά ομόλογα. Με έντονο στόχο σημειώνονται κατάλοιπα της XanQ που έχει βρεθεί ότι είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία ή έχουν καθοριστικό ρόλο για τη συγγένεια πρόσδεσης υποστρώματος ή την εξειδίκευση, με βάση τη μεταλλαξιγένεση (βλ. 3.1.3). Με υπογράμμιση σημειώνονται κατάλοιπα της XanQ που έχει φανεί πειραματικά ότι επιδέχονται περιορισμένο εύρος αντικαταστάσεων, με γκρι αυτά που είναι ευαίσθητα στο NEM (έντονη ευαισθησία, $IC_{50} < 50 \mu M$, με έντονο περίγραμμα) και με επιπλέον σχήμα τριγώνου θέσεις σημαντικές για την έκφραση και την σωστή τοποθέτηση της περμεάσης στην μεμβράνη (οι δύο τελευταίοι συμβολισμοί δεν εμφανίζονται στο TM2 αλλά σε άλλα TM στις Εικόνες 3.149 και 3.150). Το αρχικό και τελικό αμινοξύ της αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε για την προβολή α -έλικας δηλώνονται με βέλη. **A.** Δεδομένα από 67 μέλη με ομολογία (ταυτότητα καταλοίπων) $>42\%$ με XanQ **B.** Δεδομένα από 189 μέλη με ομολογία $>32\%$ με XanQ.

3.1.4.2 Πιθανή διευθέτηση των προβολών των α-ελίκων στην τριτοταγή δομή της περμεάσης XanQ

Η διευθέτηση των α-ελίκων στο τελικό μοντέλο εργασίας για την XanQ διαμορφώθηκε με βάση τις προβολές α-έλικας για κάθε TM ξεχωριστά (Εικόνα 3.1.48 και Εικόνα Π3.2) χρησιμοποιώντας επίσης τις πληροφορίες τόσο από τα πειραματικά μας δεδομένα (βλ. 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3) όσο και από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της UraA (Lu *et al.*, 2011).

3.1.4.2.1 Διευθέτηση α-ελίκων των διαμεμβρανικών τμημάτων της XanQ στη δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain)

Η δομική περιοχή του «πυρήνα» που υποδεικνύει η κρυσταλλική ομόλογη δομή (TM1-TM4 και TM8-TM11) αποτελεί την μοριακή βάση για την δέσμευση του υποστρώματος, συνεπώς τα TM από τα οποία αποτελείται στην XanQ πρέπει να διευθετούνται κατάλληλα ώστε να σχηματίζουν την κοιλότητα «φιλοξενίας» της πουρίνης, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους ή/και με τα υπόλοιπα TM της δομικής περιοχής «εισόδου» περιφερικά της κοιλότητας που περικλείει το κέντρο δέσμευσης. Σύμφωνα με την εικόνα αυτή του ομόλογου UraA (Lu *et al.*, 2011) και τα πειραματικά δεδομένα για την XanQ (βλ. 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3) αυτό επιτυγχάνεται με την παρουσία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ καταλοίπων περιμετρικά της κοιλότητας, που συντηρούν απόλυτα ή σε υψηλό βαθμό τον υδρόφοβο χαρακτήρα τους [Leu-32, Leu-33, Ala-34, Val-40 (TM1), Phe-94, Val-97, Ile-101 (TM3), Ala-129 (TM4), Leu-268, Leu-271 (TM8)] σε συνδυασμό με την ύπαρξη πολλών δεσμών υδρογόνου που «κυκλώνουν» την κοιλότητα γύρω από το υπόστρωμα ανάμεσα κυρίως σε κατάλοιπα των TM3 και TM10, αλλά και με άλλα TM όπως του TM2.

Συγκεκριμένα, στο TM2 η αναντικατάστατη (τόσο φυλογενετικά, όσο και λειτουργικά στην XanQ) παρουσία της ισχυρά πολικής **Gln-75**, η συντήρηση της υδροξυλομάδας της **Ser-68** (σημαντική για την εξειδίκευση στην XanQ, 3.1.3.2) και του μικρού μεγέθους των δύο γλυκινών (**Gly-69**, **Gly-71**, εκ των οποίων η Gly-71 είναι λειτουργικά αναντικατάστατη) (βλ. 3.1.3) καταδεικνύει την σημασία της δομικής ευελιξίας και τη συμμετοχή υδρόφιλων πλευρικών ομάδων από την κυτταροπλασματική πλευρά του TM2 (κατάλοιπα στραμμένα προς την κοιλότητα) σε δεσμούς υδρογόνου απαραίτητους για την σταθεροποίηση περιφερικά του κέντρου δέσμευσης. Επιπλέον, η τοποθέτηση του TM4 θέλει την θέση **Val-132** (μία θέση όπου σε άλλα ομόλογα συντηρούνται κυρίως πολικά αμινοξέα, 3.1.3.2) να είναι προσβάσιμη στην κοιλότητα του κέντρου δέσμευσης (V132C: μοναδικό μετάλλαγμα στην

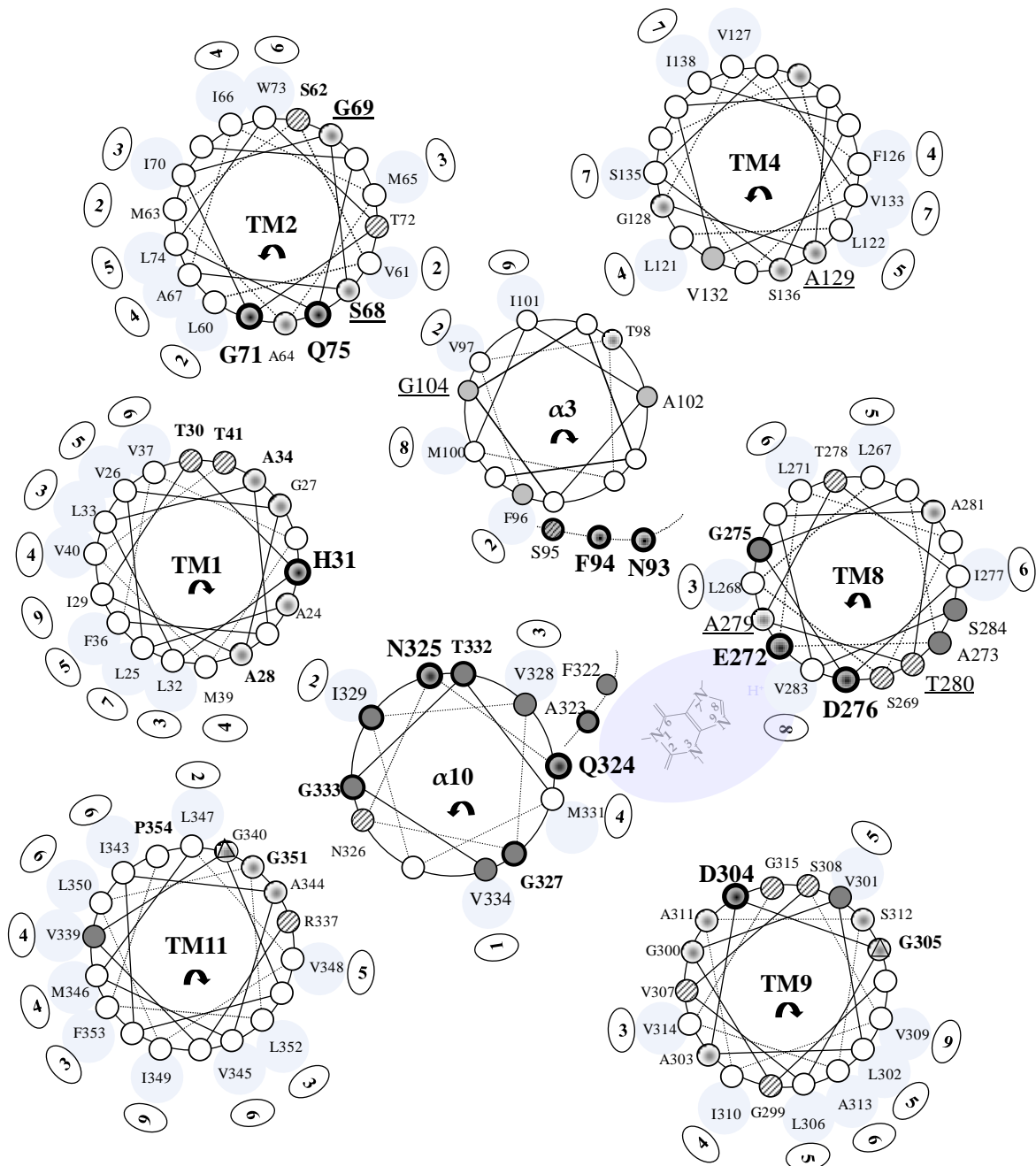
αλληλουχία-μοτίβο του TM4 που είναι ευαίσθητο σε αναστολή από το NEM, Εικόνα 3.1.33).

Επίσης όπως αναφέρθηκε δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται μέσα στην δομική περιοχή «πυρήνα» στο κέντρο του μορίου, μεταξύ των TM3 και TM10, με τοποθέτηση των β-πτυχωτών τους επιφανειών στο κέντρο του μεταφορέα αντιπαράλληλα. Από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.2, τα συντηρημένα κατάλοιπα **Asn-93** (διατηρεί πολικό χαρακτήρα ως Ser/Asn/Thr στους μεταφορείς πουρινών της NCS2/COG2233) και **Phe-94** (απόλυτα συντηρημένο στους μεταφορείς πουρινών της NCS2/COG2233) που βρίσκονται στο σημείο σύνδεσης της β-πτυχωτής επιφάνειας με την α-έλικα στο TM3 αποδείχθηκαν αναντικατάστατα για την εξειδίκευση της περμεάσης XanQ (βλ. 3.1.2) με μοναδικό τρόπο (μεταλλάγματα που εισάγουν Ala ή Ser στη θέση Asn-93 αναγνωρίζουν ουρικό οξύ και άλλα δομικά ανάλογα ξανθίνης με υποκαταστάσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο που δεν αναγνωρίζονται από τον φυσικό τύπο της περμεάσης, μεταλλάγματα που εισάγουν Ile ή Tyr στη θέση Phe-94 εμποδίζουν την αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης με υποκαταστάσεις στον πυριμιδινικό δακτύλιο, Πίνακας 3.1.12). Τα συμπεράσματα αυτά ενισχύουν την άποψη για την διαμόρφωση του απαραίτητου χώρου του κέντρου δέσμευσης του υποστρώματος μέσω αλληλεπιδράσεων της πλευρικής ομάδας του καταλοίπου Asn-93 (τοποθετημένο δίπλα στο κέντρο δέσμευσης) με άλλα κατάλοιπα της περιοχής «πυρήνα». Παράλληλα, με βάση το δομικό μοντέλο, η σταθεροποίηση του υποστρώματος (ξανθίνης) προτείνεται ότι γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων αζώτου των αμιδίων της πεπτιδικής αλυσίδας στις θέσεις **Phe-94** (TM3) και/ή **Ala-323** (TM10) και της ξανθίνης, και αλληλεπιδράσεων van der Waals ανάμεσα στις πλευρικές ομάδες των **Pro-38** (TM1), **Phe-94** (TM3), **Phe-322** (TM10), **Phe-376** (TM12) (με αναντικατάστατο τον αρωματικό δακτύλιο των πλευρικών ομάδων για τις τρεις Phe) και το υπόστρωμα. Άρα οι θέσεις αυτές επίσης πρέπει να τοποθετηθούν προς την κοιλότητα.

Διευθετημένα περιφερικά τοποθετούνται στο μοντέλο και τα απόλυτα συντηρημένα (όχι μόνο στον κλάδο των μεταφορέων πουρινών της NCS2/COG2233 – Εικόνα 3.1.30 – αλλά και σε όλη την οικογένεια NCS2) κατάλοιπα **His-31** (TM1) και **Asn-325** (TM10), για τα οποία αποδείχθηκε στην παρούσα διατριβή (βλ. 3.1.1) και σε προηγούμενες μελέτες (Karatza *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010), αντίστοιχα, ότι είναι απαραίτητα για την εξειδικευμένη αναγνώριση της ξανθίνης με υψηλή συγγένεια, με πιο άμεσο ρόλο να έχει η Asn-325 (αναντικατάστατο για τη λειτουργία, Karatza *et al.*, 2006, ενώ η αλκυλίωση μιας N325C στη θέση αυτή εμποδίζεται από την παρουσία υποστρώματος, Georgopoulou *et al.*, 2010) και καθαρά έμμεσο ρόλο η His-31 (αντικαταστάσεις με υδρόφοβα αμινοξέα μειώνουν δραματικά τη

συγγένεια δέσμευσης και με υδρόφιλα αμινοξέα διευρύνουν την εξειδίκευση, ενώ η αλκυλίωση της H31C δεν παρεμποδίζεται από το υπόστρωμα, βλ. ενότητα 3.1.1). Με βάση και το δομικό μοντέλο, οι πλευρικές ομάδες των His-31 και Asn-325 προτείνεται ότι σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμό υδρογόνου που συμβάλλει στην σταθεροποίηση του κέντρου δέσμευσης. Άρα οι θέσεις αυτές επίσης τοποθετούνται προς την κοιλότητα, με την His-31 περισσότερο προς την περιφέρεια της κοιλότητας και την Asn-325 περισσότερο προς το κέντρο.

Η περιοχή αλληλουχίας των καταλοίπων των TM8-TM11 (His-257 μέχρι Pro-354) περιέχει τα περισσότερα από τα σημαντικά αμινοξέα της δομικής περιοχής «πυρήνα» της XanQ που έχει φανεί πειραματικά ότι είναι αναντικατάστατα για τον μηχανισμό λειτουργίας. Συγκεκριμένα, εκεί εντοπίζονται τα αναντικατάστατα για τη λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης **Glu-272** (TM8) και **Asp-304** (TM9) (βλ. ενότητα 3.1.1), **Gln-324** (TM10) και **Asn-325** (TM10) (Karatzá *et al.*, 2006) καθώς και η θέση **Asp-276** (TM8) όπου είναι αναντικατάστατη η καρβοξυλομάδα με το μετάλλαγμα D276E να έχει διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης και προφίλ εξάρτησης από το pH σε σχέση με την φυσικού τύπου περμεάση (Mermelekas *et al.*, 2010, βλ. 1.3, επίσης ενότητα 3.1.1). Με βάση την ομόλογη δομή της UraA (Lu *et al.*, 2011) ορισμένα από τα αμινοξέα αυτά φαίνεται να δημιουργούν επαφές με το υπόστρωμα μέσω δεσμών υδρογόνου άμεσα (Glu-272 και Gln-324) είτε έμμεσα, μέσω μορίων νερού (Asp-276), όπως προτάθηκε από τους Lu *et al.* (2011) και γίνεται κατανοητό πως διευθετούνται προς το εσωτερικό του κέντρου δέσμευσης (Εικόνα 3.1.49).



Εικόνα 3.149: Πιθανή διεύθυνση των α -ελίκων των TM της δομικής περιοχής του «πυρήνα» (TM1-4 και TM8-11) της περμεάσης XanQ

Το μοντέλο πιθανής διεύθυνσης των προβολών α -ελίκων που παρουσιάζεται στηρίχθηκε στα φυλογενετικά και πειραματικά δεδομένα για την XanQ όπως περιγράφεται στο κείμενο, σε συνδυασμό με τις βασικές δομικές προβλέψεις που προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA. Οι συμβολισμοί που αναφέρονται στην συντήρηση πλευρικής ομάδας και στα πειραματικά δεδομένα για τον ρόλο κάθε αμινοξέος είναι όπως ακριβώς εξηγείται στη λεζάντα της Εικόνας 3.148. Χρησιμοποιήθηκαν τα φυλογενετικά δεδομένα από την ομάδα των 189 ομολόγων που έχουν ταυτότητα καταλοίπων >32% με την XanQ (βλ. κείμενο).

3.1.4.2.2 Διευθέτηση α-ελίκων διαμεμβρανικών τμημάτων της δομικής περιοχής «εισόδου» (gate domain) της XanQ σε σχέση με τη δομική περιοχή «πυρήνα» (core domain)

Από τις α-έλικες της δομικής περιοχής «εισόδου» η ανάλυση μεταλλαξιγένεσης της περμεάσης XanQ ανέδειξε σημαντικά αμινοξέα που συγκεντρώνονται κυρίως στα TM5, TM12, TM13 και TM14 και περιλαμβάνουν οκτώ αναντικατάστατα ή απαραίτητα για το μικρό μέγεθος κατάλοιπα γλυκινών (που είναι σχεδόν απόλυτα συντηρημένες μεταξύ των ομολόγων της XanQ), τρεις θέσεις όπου απαιτείται υδρόφοβο και σχετικά ογκώδες αμινοξύ αλλά και τρεις θέσεις πολικών αμινοξέων ή φαινυλαλανίνης όπου μικρές αλλαγές επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα και το προφίλ εξειδίκευσης (βλ. 3.1.3). Τα σημαντικά αυτά αμινοξέα, που είναι και φυλογενετικά συντηρημένα, μας δίνουν κάποιες ενδείξεις για το πώς θα πρέπει να διευθετούνται οι έλικες της περιοχής «εισόδου» σε σχέση με την υδρόφιλη κοιλότητα που φιλοξενεί το κέντρο δέσμησης και σχηματίζεται κατά βάση από TM της περιοχής «πυρήνα». Τα περισσότερα από τα σημαντικά αυτά αμινοξέα (τρεις λειτουργικά αναντικατάστατες γλυκίνες, **Gly-369**, **Gly-370**, **Gly-383**, δύο θέσεις με περιορισμούς στα μεγέθη πλευρικών ομάδων που μπορούν να δεχθούν και σημαντική συνεισφορά στην εξειδίκευση, **Phe-376**, **Ser-377**, αλλά και δύο θέσεις με υδρόφοβα αμινοξέα, **Leu-368**, **Met-375**, που χρειάζονται υδρόφοβα και ογκώδη πλευρική ομάδα για να έχει η περμεάση σημαντική ενεργότητα) είναι στο **TM12**, το οποίο είναι το μόνο TM της περιοχής «εισόδου» που έχει ένα κατάλοιπο αμινοξέος (**Phe-376**) που προβλέπεται να συμμετέχει άμεσα στην σταθεροποίηση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμησης, με βάση το κρυσταλλογραφικό μοντέλο του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011).

Αρκετές θέσεις των TM της XanQ, πολλές από τις οποίες εμπίπτουν στην δομική περιοχή «εισόδου», δίνουν μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης προσβάσιμα από το NEM, όπως φαίνεται από το ότι το NEM προκαλεί μείωση της ενεργότητας κατά >40% τουλάχιστον [**S84C**, **L86C**, **L87C**, **I89C**, **S91C**, **S95C**, **F96C**, **A102C**, **G104C**, **V132C**, **S151C**, **Q258C**, **V261C**, **A273C**, **G275C**, **S284C**, **Y293C**, **R296C**, **G300C**, **V301C**, **T321C**, **F322C**, **A323C**, **N326C**, **G327C**, **V328C**, **I329C**, **T332C**, **G333C**, **V334C**, **S336C**, **V339C**, **S377C**, **G405C**, **L406C**, **G407C**, **V426C**, **N430C**, **N443C**] (ενότητες 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 και δεδομένα από Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010) ή σε ορισμένες περιπτώσεις αύξηση της ενεργότητας κατά >1.4 φορές τουλάχιστον [**T72C**, **V82C**, **T98C**, **I153C**, **G189C**, **V190C**, **L260C**, **K289C**, **L317C**, **T320C**, **L350C**, **L218C**, **M375C**, **A401C**, **L404C**] (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 και δεδομένα από Karatza *et al.*, 2006; Mermelekas *et al.*, 2010), υποδεικνύοντας ότι αυτά τα

αμινοξέα πιθανόν συμμετέχουν σε σημαντικές αλληλεπιδράσεις με άλλες περιοχές της περμεάσης κατά τον μηχανισμό, οι οποίες μπορεί να απαιτούνται για διαμορφωτική ευελιξία μεταξύ των διαμεμβρανικών α-ελίκων και για να καθορίζουν την πορεία μετακίνησης του υποστρώματος διαμέσου της περμεάσης. Ειδικά η ευαισθησία ορισμένων θέσεων αμινοξέων σε υδρόφιλα αλκυλιωτικά αντιδραστήρια (K164C, E186C, H187C, R337C, R341C, R385C, E429C) (βλ. 3.1.1) υποδεικνύει την προσβασιμότητα των θέσεων αυτών από το υδρόφιλο περιβάλλον (στραμμένες προς υδρόφιλες περιοχές του μορίου). Οι παραπάνω θέσεις αμινοξέων θα πρέπει να σκιαγραφούν σε μεγάλο βαθμό την κοιλότητα που «φιλοξενεί» το κέντρο δέσμησης και την διαδρομή που ακολουθεί το υπόστρωμα (ξανθίνη) διαμέσου της περμεάσης.

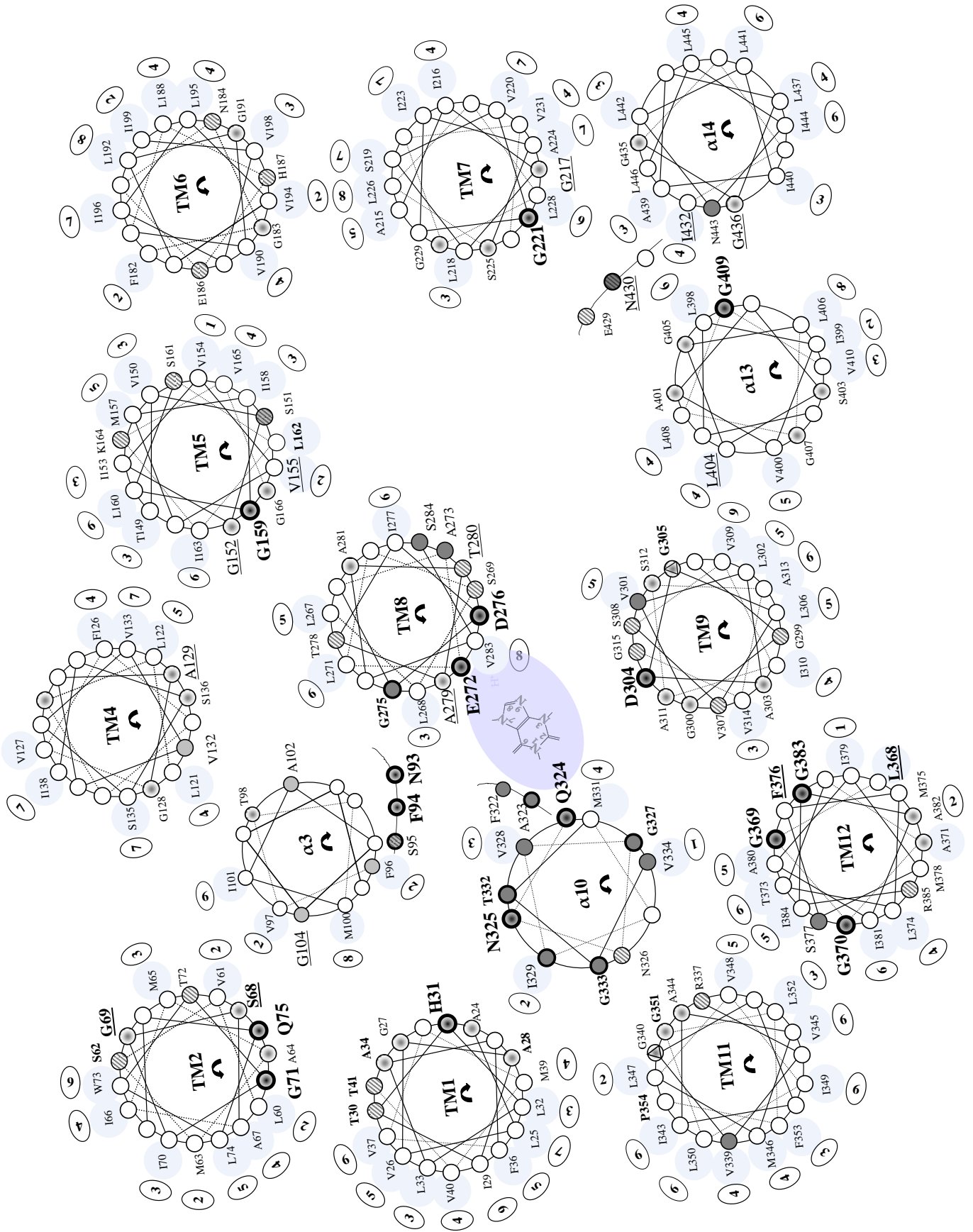
Από τα κατάλοιπα γλυκινών της XanQ που προέκυψαν από την μελέτη σε όλα τα TM να είναι αναντικατάστατες ή πολύ σημαντικές για τη λειτουργία και ισχυρά ή απόλυτα συντηρημένες μεταξύ των ομολόγων (Gly-69, Gly-71, Gly-83, Gly-85, Gly-104, Gly-152, Gly-159, Gly-217, Gly-221, Gly-275, Gly-305, Gly-327, Gly-333, Gly-351, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409, Gly-436) πολλές εμπίπτουν σε TM της περιοχής «εισόδου». Μάλιστα, στην δομική περιοχή «εισόδου» βρίσκονται οι περισσότερες από τις δομικά ή λειτουργικά **αναντικατάστατες** γλυκίνες (Gly-71, Gly-83, Gly-152, Gly-159, Gly-217, Gly-221, Gly-305, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409), ενώ αυτές που έχουν πιο «λεπτό» ρόλο γιατί επιδέχονται περισσότερες αντικαταστάσεις και αφορούν περισσότερο θέσεις ευαισθησίας σε αλκυλίωση από το NEM ή συνεισφέρουν στο προφίλ της εξειδίκευσης βρίσκονται κυρίως στην περιοχή «πυρήνα» (Gly-69, Gly-85, Gly-104, Gly-275, Gly-327, Gly-333, Gly-436) (βλ. ενότητα 3.1.3 και δεδομένα των Karatza *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Τέτοια κατάλοιπα γλυκινών μπορεί να βρίσκονται σε σημεία επαφής μεταξύ των α-ελίκων που χρειάζονται για τη σταθεροποίηση της συνολικής δομής επιτρέποντας προσέγγιση μεταξύ διαφορετικών περιοχών του μορίου και ο ρόλος τους είναι βασικός για τον κατάλληλο προσανατολισμό των ελίκων σε σχέση με το κέντρο δέσμησης χωρίς ωστόσο κάποιο άμεσο ρόλο στην δέσμηση του υποστρώματος (βλ. Weinglass & Kaback, 1999). Χαρακτηρίζονται λοιπόν ως θέσεις δυνητικά διευθετημένες προς την εξωτερική πλευρά των ελίκων σε σχέση με την κοιλότητα δέσμησης αλλά σε σημεία επαφής προς άλλες α-έλικες με όψεις που περιέχουν και άλλα μικρά και/ή υδρόφιλα αμινοξέα. Επίσης, η ευελιξία κινήσεων που επιτρέπουν οι γλυκίνες μπορεί να επιτρέπει σε διπλανές περιοχές της αλληλουχίας να υιοθετούν με έναν δυναμικό τρόπο την πιο κατάλληλη διαμόρφωση για αλληλεπιδράσεις με άλλες έλικες που είναι σημαντικές κατά τον μηχανισμό. Με αυτή τη λογική, είναι χαρακτηριστικό ότι δομικά/λειτουργικά αναντικατάστατες γλυκίνες της XanQ βρίσκονται κοντά στην αλληλουχία με άλλα αμινοξέα που έχουν αποδειχθεί κομβικής σημασίας ή απαραίτητα στον

- 230 -

μηχανισμό ενεργού μεταφοράς (Gly-71 με τη Gln-75, Gly-83 με τη Leu-86, Gly-159 με τη Val-155, Gly-305 με το Asp-304, Gly-369 με τη Phe-376, Gly-409 με τη Leu-404) και το ίδιο συμβαίνει για τις γλυκίνες με πιο «λεπτό» λειτουργικό ρόλο (Gly-275 με το Glu-272, το Asp-276 και την Ala-279, Gly-327 με την Ala-323, τη Gln-324 και την Asn-325, Gly-436 με την Asn-430 και την Ile-432).

Εκτός από το TM12, το άλλο TM της περιοχής «εισόδου» που έχει προταθεί ότι συμμετέχει καθοριστικά στις αλλαγές διαμόρφωσης που επιτυγχάνουν την εναλλασσόμενη πρόσβαση του ενεργού κέντρου στον ομόλογο μεταφορέα UraA είναι το TM5 (Lu *et al.*, 2011). Τόσο το TM12 όσο και το TM5 στην XanQ περιέχουν σημαντικά για τη λειτουργία αμινοξέα που βρίσκονται συνεχόμενα στις αντίστοιχες προβολές α-έλικας (G370, S377, G369, F376, G383 και S151, V155, G159, G152). Τα υπόλοιπα TM της περιοχής «εισόδου» (TM6-TM7, TM13-TM14) τοποθετούνται περιφερικά των TM του «πυρήνα», κυρίως του TM8 που περιέχει το αναντικατάστατο και απόλυτα συντηρημένο φυλογενετικά Glu-272 του κέντρου δέσμευσης, αφού συμβάλλουν στις δυναμικές διαμορφωτικές αλλαγές του μεταφορέα γύρω από ένα σταθερό κέντρο δέσμευσης, σύμφωνα με την υπόθεση των Lu *et al.* (2011). Τα σημαντικά αμινοξέα που βρέθηκαν για αυτές τις έλικες είναι κυρίως κατάλοιπα γλυκινών (G217, G221, G409, G436) και υδρόφοβα με περιορισμούς στον όγκο και στη γεωμετρία της πλευρικής ομάδας (L404, I432) που τοποθετούνται κατάλληλα για αλληλεπιδράσεις με άλλες έλικες, καθώς και η θέση της Asn-430 (Papakostas *et al.*, 2008), στο μεταίχιμο μεταξύ α-έλικας και περιοχής ελεύθερης διαμόρφωσης στο TM14, σε μια περιοχή που φαίνεται να είναι σημαντική ως μοριακό φίλτρο για τον καθορισμό της εξειδίκευσης τόσο στην XanQ (Γεωργοπούλου, Διδακτορική Διατριβή) όσο και στον ομόλογο μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού UarA (Kosti *et al.*, 2012; Diallinas, 2013).

Συνολικά, η πιθανή διεύθυνση των προβολών των α-ελίκων στην τριτοταγή δομή της XanQ φαίνεται στην Εικόνα 3.1.50. Στην εικόνα αυτή ξεχωρίζουν καθαρά οι συνεχείς όψεις α-έλικας στα περισσότερα TM που περιέχουν υδρόφοβα και χαμηλής συντήρησης αμινοξέα τοποθετημένες προς τα έξω του μορίου, υποδεικνύοντας πιθανές θέσεις επαφής με την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα. Τέτοιες **όψεις α-έλικας με υδρόφοβα αμινοξέα** είναι εμφανείς κυρίως στα TM1, TM7 και, κατά δεύτερο λόγο, στα TM4-6, TM9, TM11-12 και, λιγότερο, στα TM2, TM13-14, αλλά δεν υπάρχουν στις έλικες α3, α10 και TM8, οι οποίες έχουν τοποθετηθεί στο κέντρο της δομής του μορίου σε πιο άμεση γειτνίαση με το κέντρο δέσμευσης (Εικόνα 3.1.50).

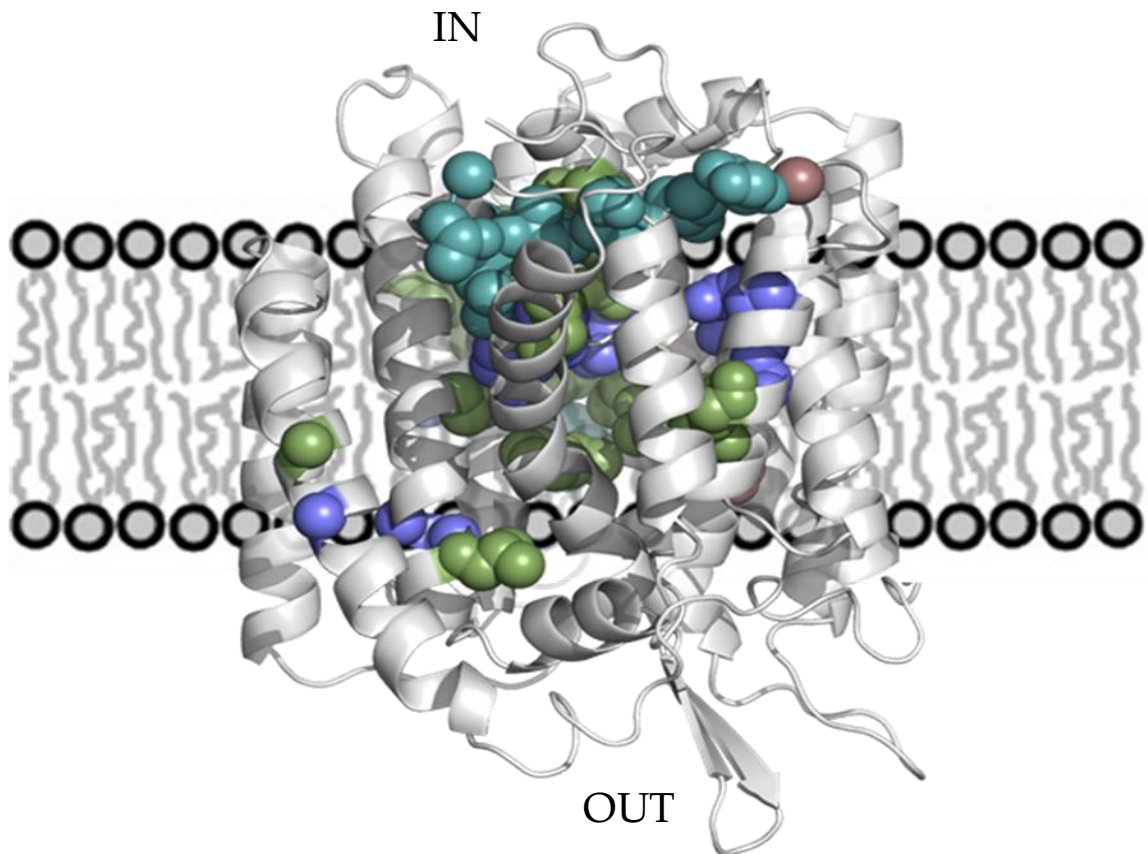


Εικόνα 3.1.50: Πιθανή διευθέτηση των α-ελίκων των TM της δομικής περιοχής «εισόδου» (TM5-7 και TM12-14) σε σχέση με τη δομική περιοχή «πυρήνα» (TM1-4 και TM8-11) της περμεάσης XanQ

Το μοντέλο διευθέτησης των προβολών α-ελίκων που παρουσιάζεται στηρίχθηκε στα φυλογενετικά και πειραματικά δεδομένα για την XanQ όπως περιγράφεται στο κείμενο, σε συνδυασμό με τις βασικές δομικές προβλέψεις που προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA. Οι συμβολισμοί που αναφέρονται στην συντήρηση πλευρικής ομάδας και στα πειραματικά δεδομένα για τον ρόλο κάθε αμινοξέος είναι όπως ακριβώς εξηγείται στη λεζάντα της Εικόνας 3.1.48. Χρησιμοποιήθηκαν τα φυλογενετικά δεδομένα από την ομάδα των 189 ομολόγων που έχουν ταυτότητα >32% με την XanQ (βλ. κείμενο).

3.1.4.2.3 Διευθέτηση των φυλογενετικά συντηρημένων και λειτουργικά σπουδαιότερων αμινοξέων της XanQ στο δομικό μοντέλο των 14 TM που στηρίζεται στην ομόλογη κρυσταλλική δομή του UraA

Μετά την παρουσίαση του δομικού μοντέλου της περμεάσης XanQ με βάση την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011; Karena & Frillingos, 2011), μπορούμε πλέον να τοποθετήσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τα σημαντικά και εξελικτικά συντηρημένα αμινοξέα της XanQ πάνω στην προβλεπόμενη δομή, τουλάχιστον με τη διαμόρφωση που εμφανίζεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο. Η ανάλυση αυτή (Εικόνα 3.1.51) αποκαλύπτει ότι οι θέσεις αμινοξέων που έχουν πλευρικές ομάδες αναντικατάστατες ή υποκείμενες σε περιορισμούς ως προς το εύρος των αντικαταστάσεων που δέχονται (ευαίσθητες σε αλκυλίωση από NEM ή σε μικρή αλλαγή του μεγέθους, της γεωμετρίας ή του χημικού χαρακτήρα τους) σκιαγραφούν μια συνεχόμενη περιοχή στη δομή της περμεάσης που μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελεί τη διαδρομή μετακίνησης του υποστρώματος (ξανθίνης) κατά τον μηχανισμό πρόσβασης, πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο και αποδέσμευσης από το ενεργό κέντρο μέσω των αλλαγών διαμόρφωσης του μορίου. Αυτά τα αμινοξέα εμφανίζουν επίσης σημαντική εξελικτική συντήρηση, καθώς ανήκουν σε «παράθυρα» αλληλουχίας των μοτίβων των TM που εξετάστηκαν στην ενότητα 3.1.3.



Εικόνα 3.1.51: Ανάλυση των θέσεων των σημαντικών αμινοξέων στο πιθανό δομικό μοντέλο της περμεάσης XapQ

Για την κατασκευή του δομικού μοντέλου, η αλληλουχία της XapQ προσαρμόστηκε στην κρυσταλλική δομή του UraA (PDB 3QE7) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SWISS-MODEL και κατασκευάστηκε το δομικό μοντέλο των ελίκων, το οποίο δίνεται απεικονιστικά με το πρόγραμμα PyMOL v1.4. Με βάση τα πειράματα μεταλλαξιγένεσης της XapQ (ενότητες 3.1.1, 3.1.2 και 3.1.3), θέσεις αμινοξέων που είναι δομικά/λειτουργικά αναντικατάστατες φαίνονται σε χωροπληρωτική απεικόνιση με μωβ, θέσεις με σοβαρούς περιορισμούς στο μέγεθος και τις ιδιότητες της πλευρικής ομάδας φαίνονται με πράσινο και θέσεις ευαίσθητες σε απενεργοποίηση από το NEM με πετρώλ.

3.2 Μελέτη σχέσεων εγγύτητας στην περμεάση XanQ

3.2.1 Ζεύγη καταλοίπων της XanQ που συντονίζουν δισθενή ιόντα

Επόμενο βήμα στην παρούσα μελέτη ήταν η προσπάθεια εντοπισμού σχέσεων εγγύτητας στην περμεάση XanQ, μέσω της ανίχνευσης φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ζευγών κυστεϊνών από διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης. Ως πρώτη προσέγγιση, εφαρμόσαμε μία έμμεση πειραματική μεθοδολογία, εξετάζοντας κατά πόσον δύο θέσεις καταλοίπων του XanQ, όπου έχουν εισαχθεί ομάδες κυστεΐνης (Cys), μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας θέσεις δέσμευσης ιόντων καδμίου (II), με ανιχνεύσιμη συνέπεια την αναστολή της ενεργότητας. Η μεθοδολογική αυτή προσέγγιση έχει εφαρμοσθεί και σε άλλους μεταφορείς, ιδιαίτερα σε μεταφορείς νευροδιαβιβαστών ή ομόλογες πρωτεΐνες (Brocke *et al.*, 2002; Zomot *et al.*, 2005) (βλ. 1.5). Στόχος μας ήταν να χαρτογραφηθούν ζεύγη θέσεων καταλοίπων που να καλύπτουν τας εξής κριτήρια: (α) να είναι προσβάσιμα από το υδρόφιλο περιβάλλον (για να μπορούν να προσεγγίζονται από τα ιόντα καδμίου), (β) να δημιουργούν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις (για να μπορούν να σχηματίζουν θέση συντονισμού για το κάδμιο) και (γ) οι αλληλεπιδράσεις αυτές να είναι σημαντικές για τον μηχανισμό λειτουργίας (ώστε η δέσμευση του καδμίου να οδηγεί σε ανιχνεύσιμη πτώση της ενεργότητας).

Τα ιόντα καδμίου (II) είναι γνωστό ότι μπορούν να αντιδρούν με την θειολική πλευρική ομάδα της κυστεΐνης. Η συγγένεια της αλληλεπίδρασης αυτής ενισχύεται σημαντικά, με την ταυτόχρονη δέσμευση και δεύτερης κυστεΐνης ώστε να σχηματισθούν κέντρα συντονισμού για δέσμευση του τύπου Cys-Cd²⁺-Cys (βλ. 1.5). Για την αξιοποίηση αυτής της ιδιότητας των ιόντων καδμίου, στην παρούσα εργασία, κατασκευάσαμε περμεάσες με ζεύγη κυστεϊνών σε επιλεγμένες θέσεις (double-Cys mutants) χρησιμοποιώντας ως υπόβαθρο την ελεύθερη κυστεϊνών περμεάση XanQ (βλ. 2.5) και προχωρήσαμε στον λειτουργικό χαρακτηρισμό τους. Για τις περμεάσες που εμφάνιζαν αρχική ταχύτητα μεταφοράς Ξανθίνης μεγαλύτερη του 50% μελετήσαμε την επίδραση των ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητά τους.

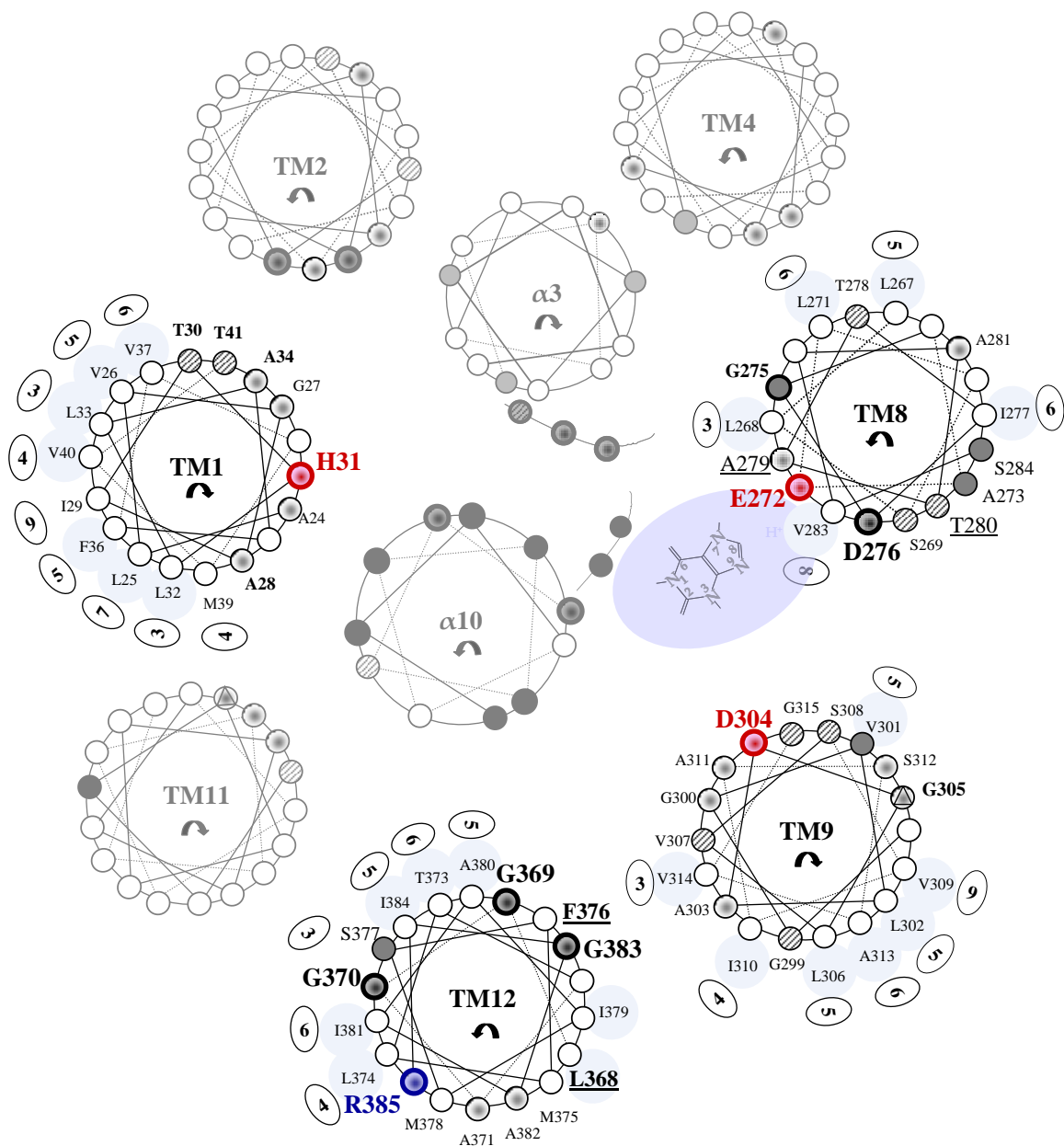
3.2.1.1 Κατασκευή διπλών μεταλλάγματων κυστεΐνης στην περμεάση XanQ

Οι θέσεις που επιλέξαμε να συνδυάσουμε για την εισαγωγή των δύο κυστεϊνών αφορούν είτε κατάλοιπα των οποίων τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης παρουσιάζουν ελάχιστη έως μηδενική ενεργότητα (**Συνδυασμός I**), είτε κατάλοιπα που ανήκουν σε διαφορετικές δομικές περιοχές (μια θέση της περιοχής «πυρήνα» σε συνδυασμό με μια θέση της περιοχής «εισόδου», βλ. 1.2.2.3), οι οποίες έχει προταθεί (Lu *et al.*, 2011) ότι βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους κατά την ενεργό μεταφορά του υποστρώματος (**Συνδυασμός II**), είτε κατάλοιπα που ανήκουν στην ίδια δομική περιοχή (του «πυρήνα» ή της «εισόδου») και απέχουν μεταξύ τους μικρή (<5 Å) ή μεγάλη (>17Å) απόσταση στην προβλεπόμενη τριτοταγή δομή (**Συνδυασμός III**). Η επιλογή των θέσεων στον συνδυασμό I έγινε με βάση τα αποτελέσματα για τον ρόλο των ισχυρά πολικών και δυνητικά φορτισμένων καταλοίπων, που είχαν ήδη χαρακτηριστεί (βλ. 3.1.1), ενώ η επιλογή των θέσεων για τους συνδυασμούς II και III στηρίχθηκαν επιπλέον και σε δεδομένα από την δομική προσομοίωση του XanQ με βάση το κρυσταλλογραφικό μοντέλο του ομόλογου μεταφορέα UraA (βλ. 1.2.2.3).

Περμεάσεις με ζεύγη κυστεϊνών: Συνδυασμός θέσεων I (συνδυασμοί θέσεων με μηδενική ενεργότητα μονών μεταλλάγματων κυστεΐνης)

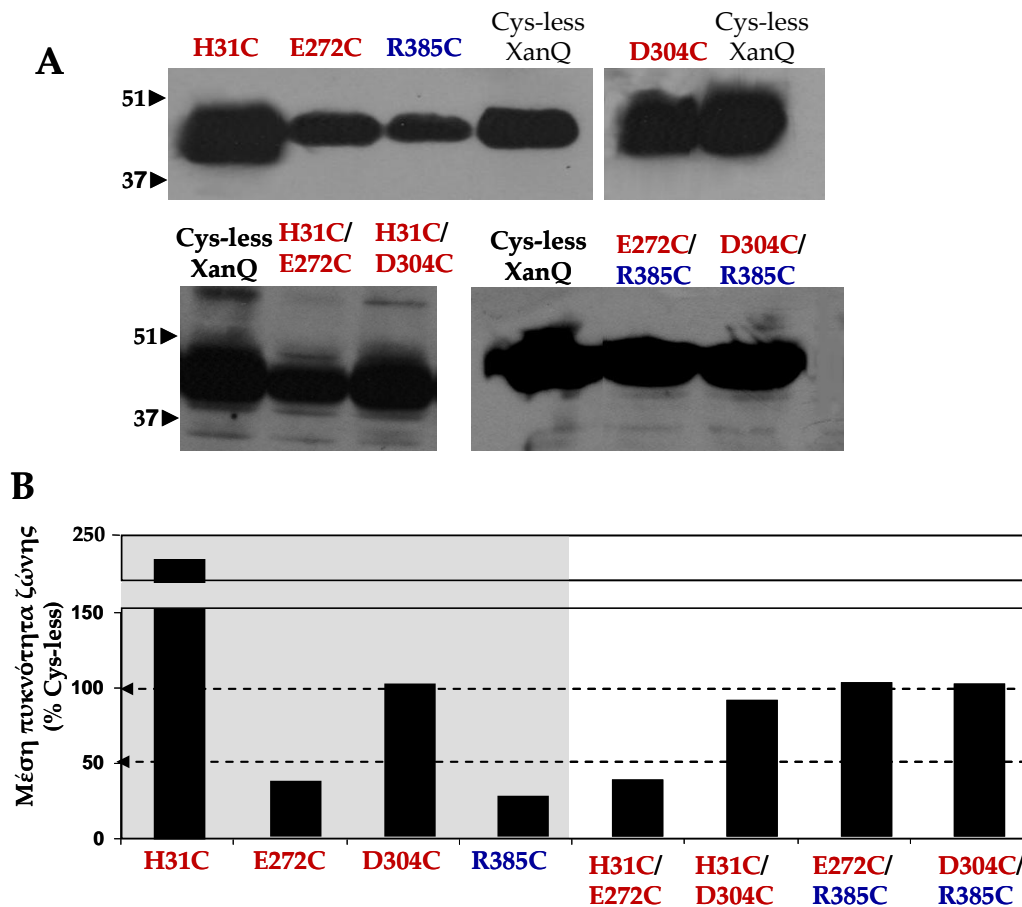
Στον Συνδυασμό I επιδιώξαμε να εντοπίσουμε πιθανά ζεύγη ιοντικών γεφυρών που να μην είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία του μεταφορέα αλλά να επιτρέπουν επαναφορά της κανονικής έκφρασης και/ή της ενεργότητας όταν επανέλθει η ισορροπία διαμεμβρανικών φορτίων, δηλαδή αν δύο ιοντιζόμενα κατάλοιπα αμινοξέων αντίθετου φορτίου που βρίσκονται κοντά το ένα με το άλλο στην τριτοταγή δομή του μορίου αντικατασταθούν ταυτόχρονα με ουδέτερα αμινοξέα. Για τον σκοπό αυτόν, εφαρμόστηκε περαιτέρω μεταλλαξιγένεση κυστεϊνών σε δεύτερες θέσεις σε μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης που είχαν βρεθεί ότι εμφανίζουν χαμηλή ενεργότητα (μηδενική ή πολύ κάτω από 50%, βλ. 3.1.1), στοχεύοντας καταρχήν σε πιθανή αποκατάσταση της ενεργότητας και, σε περίπτωση επαναφοράς σημαντικής ενεργότητας, στην εφαρμογή της δοκιμασίας αναστολής από ιόντα καδμίου που θα μας έδινε μία επιπλέον ισχυρή ένδειξη για την εγγύτητα των δύο θέσεων. Η μεθοδολογική αυτή προσέγγιση έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία σε άλλους μεταφορείς, ιδιαίτερα στην περμεάση λακτόζης και σε ομόλογες πρωτεΐνες της υπεροικογένειας MFS (Sahin-Toth *et al.*, 1992; Duntzen *et al.*, 1993; Frillingos *et al.*, 1995; Frillingos and Kaback, 1996) (βλ. 1.5). Συγκεκριμένα, κατασκευάσαμε και μελετήσαμε τέσσερα (4) μεταλλάγματα της XanQ με

ζεύγη κυστεϊνών (double Cys mutants) σε συνδυασμούς των θέσεων His-31 (TM1), Glu-272 (TM8), Asp-304 (TM9) και Arg-385 (TM12) (Εικόνα 3.2.1). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι από τα τέσσερα μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν (H31C/E272C, H31C/D304C, R385C/E272C και R385C/D304C) (Εικόνα 3.2.2), τα H31C/D304C, R385C/E272C και R385C/D304C εκφράζονται στην μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα (85-100% της Cys-less XanQ), ενώ το H31C/E272C έχει σχετικά μειωμένη έκφραση (35% της Cys-less XanQ) παρόμοια με αυτήν του μονού μεταλλάγματος E272C. Από την άλλη πλευρά, είναι ενδιαφέρον ότι οι συνδυασμοί R385C/E272C και R385C/D304C οδηγούν σε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης σε σχέση με τα χαμηλά επίπεδα που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης R385C (25%) και E272C (35%), υποδεικνύοντας πιθανή δομική αλληλεπίδραση μεταξύ των θέσεων 385 (TM12) και 272 (TM8) ή 304 (TM9). Σε δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς βρέθηκε ότι και τα τέσσερα (4) διπλά μεταλλάγματα εμφανίζουν μηδενικές τιμές ως προς την ικανότητα πρόσληψης [³H]ξανθίνης (Εικόνα 3.2.3). Επομένως, η πολύ μικρή (R385C, H31C) έως μηδενική ενεργότητα (E272C, D304C) των μεταλλαγμάτων μονής κυστεϊνης δεν είναι δυνατόν να αυξηθεί σε στατιστικά σημαντικές τιμές με οποιονδήποτε από τους παραπάνω συνδυασμούς διπλών μεταλλαγμάτων. Κατά συνέπεια, στα ζεύγη αυτά δεν μπορεί να εφαρμοστεί η πειραματική προσέγγιση της λειτουργικής επίδρασης των ιόντων καδμίου.



Εικόνα 3.2.1: Μοντέλο διευθέτησης των διαμεμβρικών τμημάτων (α -έλικες) TM1, TM8, TM9 και TM12.

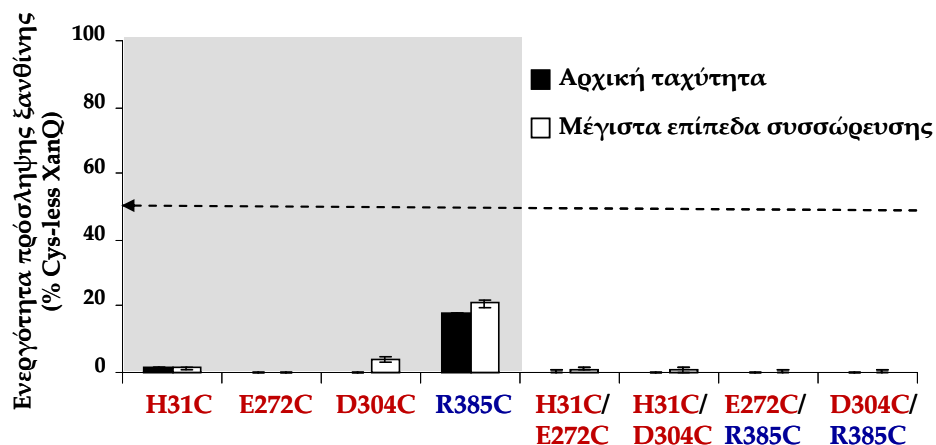
Υποθετική διευθέτηση των TM1, TM8, TM9 και TM12 της περμεάσης XanQ, με όψη από την κυτταροπλασματική πλευρά, σύμφωνα με το αρχικό μοντέλο διευθέτησης (βλ. 3.1.4, Εικόνα 3.1.50). Τα TM απεικονίζονται ως α -έλικες, στις οποίες σημειώνονται οι θέσεις αμινοξέων (στόχοι) που αντικαθίστανται σε κυστεΐνες για την δημιουργία μεταλλαγμάτων διπλής κυστεΐνης (βλ. 3.2.1.1 συνδυασμός I). Με κόκκινο τονίζονται τα κατάλοιπα που ανήκουν σε TM της δομικής περιοχής «πυρήνα» και με μπλε αυτά που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου».



Εικόνα 3.2.2: Έκφραση των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών στις θέσεις His-31 και Arg-385 σε συνδυασμό με τις θέσεις Glu-272 και Asp-304 (Συνδυασμός Ι).

A. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE(12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως εκατοστιαίο ποσοστό της έκφρασης του XanQ Cys-less-BAD, όπως μετρήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%). Με το πλαίσιο σε γκρι φόντο σημειώνονται τα επίπεδα στη μεμβράνη των δειγμάτων ελέγχου, που είναι τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης



Εικόνα 3.2.3: Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών στις θέσεις His-31 και Arg-385 σε συνδυασμό με τις θέσεις Glu-272 και Asp-304 (Συνδυασμός I).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL), υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά επί των αντίστοιχων τιμών της XanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (άσπρες στήλες) μετρώνται σε 10-30 sec και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (μαύρες στήλες) σε 1-10 min. Η τιμή του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχει αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Με το πλαίσιο σε γκρι φόντο σημειώνονται οι ενεργότητες των δειγμάτων ελέγχου, που είναι τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης

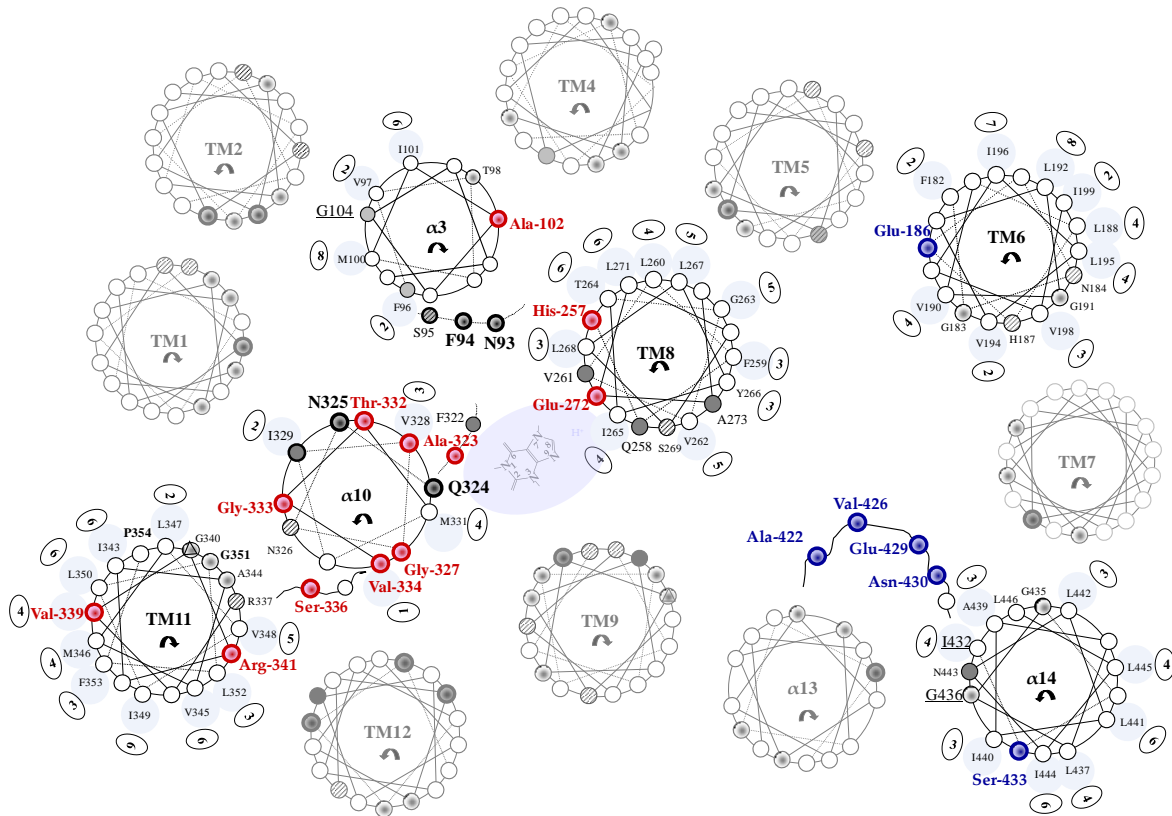
Περμεάσες με ζεύγη κυστεϊνών: Συνδυασμός θέσεων II (συνδυασμοί θέσεων της περιοχής «πυρήνα» με θέσεις της περιοχής «εισόδου»)

Στον Συνδυασμό II, προσπαθώντας να ανιχνεύσουμε ζεύγη θέσεων που να είναι κοντά μεταξύ τους στην τριτοταγή δομή και να μπορούν να συμβάλουν στον σχηματισμό κέντρων δέσμευσης ιόντων καδμίου (II) ο οποίος να οδηγεί σε ανιχνεύσιμη αναστολή της ενεργότητας, εφαρμόστηκε περαιτέρω μεταλλαξιγένεση κυστεϊνών σε δεύτερες θέσεις σε μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης που είχαν βρεθεί ότι εμφανίζουν πολύ υψηλή ενεργότητα (αρχική ταχύτητα >60% της Cys-less XanQ, βλ. 3.1.1), συνδυάζοντας θέσεις διαμεμβρανικών τμημάτων που ανήκουν στην περιοχή του «πυρήνα» με θέσεις διαμεμβρανικών τμημάτων που ανήκουν στην περιοχή της «εισόδου» (Εικόνα 3.2.4). Η περιοχή της «εισόδου» έχει προταθεί ότι παίζει βασικό ρόλο στην εναλλαγή των διαμορφώσεων του ενεργού κέντρου και επομένως μπορεί να υπάρχει μια πιο σύνθετη, δυναμική αλληλεπίδρασή της με την περιοχή του «πυρήνα» (που περιλαμβάνει τις βασικές έλικες που διαμορφώνουν το κέντρο δέσμευσης) κατά τον μηχανισμό λειτουργίας (Lu *et al.*, 2011).

Οι θέσεις που επιλέχθηκαν βρίσκονται σε υψηλά συντηρημένες περιοχές αλληλουχίας που έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές για τον μηχανισμό μεταφοράς στην XanQ βάσει των αρχικών πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης γιατί συνδέονται με περιορισμούς στις πλευρικές ομάδες αμινοξέων που μπορούν να εισαχθούν στις θέσεις αυτές ή με ευαισθησία σε αλκυλίωση από SH-αντιδραστήρια ή με συμβολή στον καθορισμό της εξειδίκευσης, αλλά δεν είναι αναντικατάστατες για τη λειτουργία.

Από την δομική περιοχή του «πυρήνα» (core domain) επιλέχθηκαν οι θέσεις Ala-102 ($\alpha 3$), Lys-249 και His-257 (TM8), Gly-327, Val-328, Thr-332, Gly-333, και Val-334 ($\alpha 10$), Ser-336, Val-339 και Arg-341(TM11). Οι θέσεις αυτές επιλέχθηκαν γιατί: (α) είτε ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή διαμεμβρανικών τμημάτων που προβλέπεται ότι συμμετέχουν άμεσα στο κέντρο δέσμευσης (TM3 και TM8) και επιπλέον φαίνεται να είναι προσβάσιμες από το περίπλασμα λόγω προσβασιμότητας (Lys-249) και/ή ευαισθησίας (Ala-102) των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης σε αλκυλίωση, (β) είτε ανήκουν στο υψηλά συντηρημένο πεπτίδιο $^{323}\text{AQNNGVIQMTG}^{333}$ (μοτίβο «υπογραφή» NCS2 - βλ.1.3) που φαίνεται να συμμετέχει άμεσα στον καθορισμό της λειτουργίας και της εξειδίκευσης τόσο της περμεάσης XanQ (Karatza *et al.*, 2006, Georgopoulou *et al.*, 2010) όσο και της ομόλογης περμεάσης UapA του *Aspergillus nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998, Koukaki *et al.*, 2005) ή σε γειτονικές θέσεις της αλληλουχίας που είναι ευαίσθητες σε αλκυλίωση (Val-334, Ser-336, Val-339), (γ) είτε συνεισφέρουν στην ολοκλήρωση του προφίλ εξειδίκευσης της XanQ ως προς την αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης (Thr-332, Gly-333, Ser-336) (Georgopoulou *et al.*, 2010).

Οι θέσεις αυτές του «πυρήνα» συνδυάζονται με θέσεις διαμεμβρανικών τμημάτων που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου» (gate domain) για την δημιουργία μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών (Εικόνα 3.2.4). Για την περιοχή της «εισόδου» επιλέχθηκαν θέσεις από το TM6 (Glu-186) και κυρίως από το TM14 (Ala-422, Val-426, Glu-429, Asn-430, Ser-433), το οποίο ήταν ήδη εκτενώς μελετημένο με μεταλλαξιγένεση (Papakostas *et al.*, 2008). Πρόκειται για θέσεις που έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά (Papakostas *et al.*, 2008; Karena and Frillingos, 2009), με μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης υψηλής ενεργότητας, πιθανότατα προσβάσιμες από το εξωκυτταρικό περιβάλλον λόγω της τοπολογίας τους (Ala-422 και Glu-429 βρίσκονται στη συνδετική ελεύθερη περιοχή μεταξύ $\alpha 13$ και $\alpha 14$ που βλέπει στο περίπλασμα) και/ή της ευαισθησίας τους σε αλκυλιωτικά αντιδραστήρια (Val-426, Asn-430) και/ή σημαντικές για τη ρύθμιση της εξειδίκευσης της XanQ ως προς το υπόστρωμα (Asn-430).



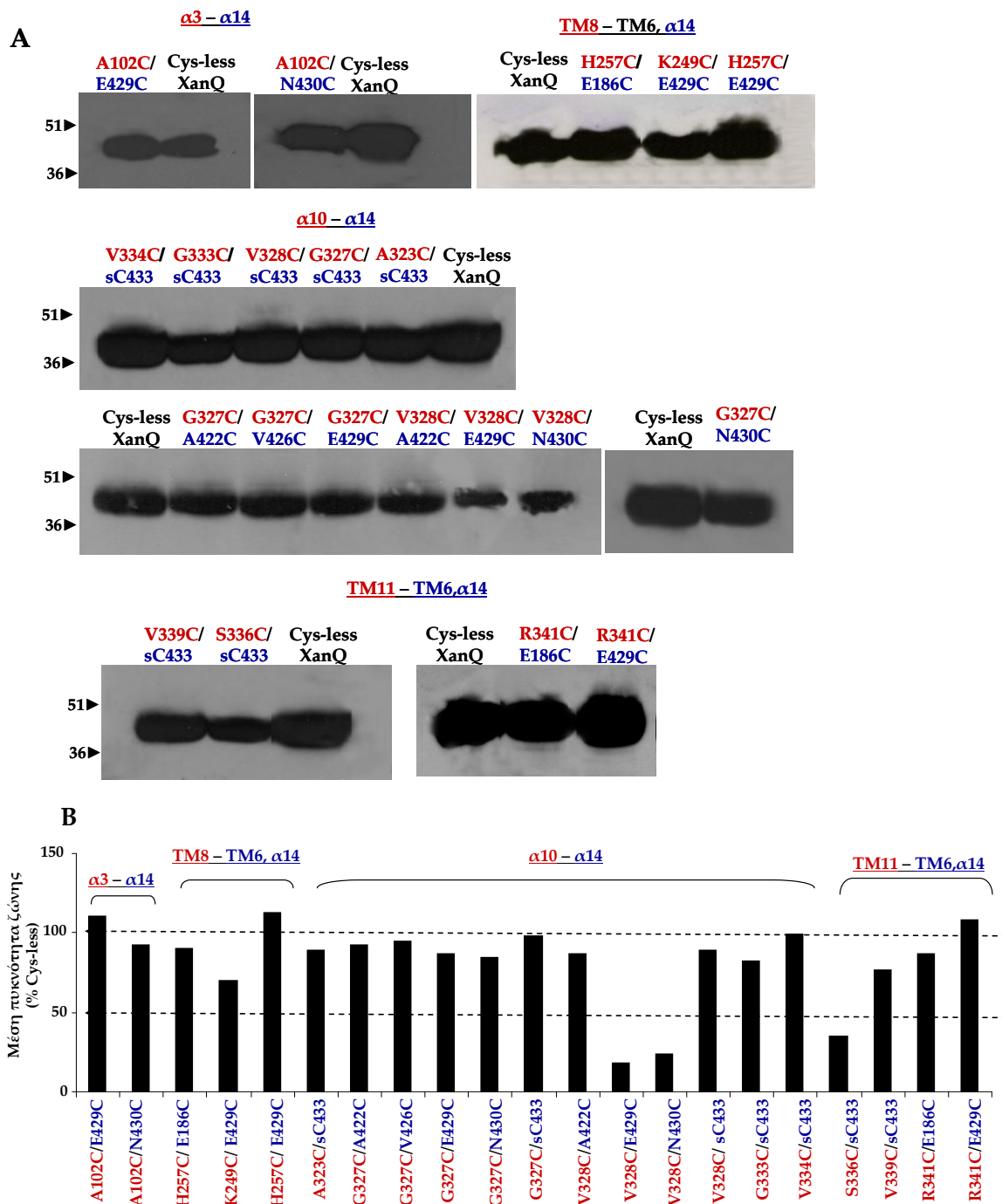
Εικόνα 3.2.4: Μοντέλο διεύθεσης των διαμεμβρανικών τμημάτων (α -ελίκων) $\alpha 3$, TM8, $\alpha 10$, TM11 (περιοχή «πυρήνα») και TM6, $\alpha 14$ (περιοχή «εισόδου») της περμεάσης XanQ.

Υποθετική διεύθεση των $\alpha 3$, TM8, $\alpha 10$, TM11 και TM6, $\alpha 14$ της περμεάσης XanQ, με όψη από την κυτταροπλασματική πλευρά, σύμφωνα με το αρχικό μοντέλο διεύθεσης (βλ. 3.1.4, Εικόνα 3.1.50), στις οποίες τονίζονται οι θέσεις (κόκκινα και μπλε σχήματα στόχων, έντονα μεγεθυμένα) που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή καταλοίπων κυστεϊνών και την δημιουργία μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών (double-Cys mutants, συνδυασμός II).

Ως πρώτο βήμα, εξετάσαμε την έκφραση και την ενεργότητα των είκοσι ενός (21) μεταλλαγμάτων διπλών κυστεϊνών Συνδυασμού II ($\alpha 3$ -TM14: A102C/E429C και A102C/N430C, TM8-TM6,14: H257C/ E186C, K249C/ E429C και H257C/ E429C, $\alpha 10$ -TM14: A323C/sC433, G327C/A422C, G327C/V426C, G327C/E429C, G327C/N430C, G327C/sC433, V328C/A422C, V328C/E429C, V328C/N430C, V328C/sC433, G333C/sC433 και V334C/sC433, TM11-TM6, 14: S336C/sC433, V339C/sC433, R341C/ E186C, R341C/ E429C). Τα μεταλλάγματα A102C/E429C και A102C/N430C ($\alpha 3$ -TM14) εμφανίζουν επίπεδα έκφρασης παρόμοια με αυτά της Cys-less XanQ (110% και 92% αντίστοιχα) (Εικόνα 3.2.5), αλλά η ενεργότητα τους διαφέρει καθώς εμφανίζουν αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης 42% και 13% της Cys-less XanQ και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης 27% και 16% της Cys-less XanQ, αντίστοιχα (Εικόνα 3.2.6). Τα μεταλλάγματα H257C/ E186C, K249C/ E429C και H257C/E429C (TM8-TM6,14) επίσης εκφράζονται στην μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα (70-110% της Cys-less XanQ) (Εικόνα 3.2.5), αλλά μόνο δύο από αυτά (H257C/ E186C, H257C/

E429C) εμφανίζουν ενεργότητα σε υψηλά επίπεδα (αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης 57-65% της Cys-less XanQ), ενώ η ενεργότητα του τρίτου (K249C/ E429C) κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (αρχική ταχύτητα 18%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης 32% της Cys-less XanQ) (Εικόνα 3.2.6). Τα δέκα από τα δώδεκα μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών ανάμεσα στο α10 και στο TM14 (A323C/ sC433, G327C/A422C, G327C/V426C, G327C/E429C, G327C/N430C, G327C/sC433, V328C/A422C, V328C/sC433, G333C/sC433 και V334C/sC433) έχουν επίπεδα έκφρασης παρόμοια με αυτά της Cys-less XanQ (80-100%) (Εικόνα 3.2.5). Τα άλλα δύο μεταλλάγματα (V328C/E429C, V328C/N430C) εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη (18-24% της Cys-less XanQ). Ως προς τις ενεργότητες (Εικόνα 3.2.6): (α) δύο μεταλλάγματα που έχουν κυστεΐνη στην θέση Glu-429 (G327C/E429C, V328C/E429C) εμφανίζουν χαμηλή ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (αρχική ταχύτητα 8-16% και μέγιστα επίπεδα 14-26% της), (β) τα G327C/N430C, G327C/sC433, V328C/A422C και G333C/sC433 εμφανίζουν μέτρια επίπεδα ενεργότητας πρόσληψης ξανθίνης (αρχική ταχύτητα 20-45% και μέγιστα επίπεδα 22-58% της Cys-less XanQ) και (γ) τα A323C /sC433, G327C/A422C, G327C/V426C, V328C/N430C, V328C/ sC433 και V334C/ sC433 έχουν υψηλή ενεργότητα (αρχική ταχύτητα 50-115% και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης 68-113% της Cys-less XanQ). Τα μεταλλάγματα, V339C/sC433, R341C/ E186C, R341C/ E429C (TM11-TM6,14) εκφράζονται σε επίπεδα που προσεγγίζουν αυτά της Cys-less XanQ (75-109%), ενώ το μετάλλαγμα S336C/sC433 (TM11-TM14) εμφανίζει χαμηλές τιμές έκφρασης στη μεμβράνη (35% της Cys-less XanQ). Από αυτά, το S336C/sC433 εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα (αρχική ταχύτητα 27%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης 40% της Cys-less XanQ), το R341C/E186C εμφανίζει μικρές τιμές αρχικής ταχύτητας (32% της Cys-less XanQ) αλλά μέγιστη τιμή ενεργότητας στο 50% της Cys-less XanQ, και τα άλλα δύο (V339C/sC433, R341C/ E429C) εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα (αρχική ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης 50-111% της Cys-less XanQ).

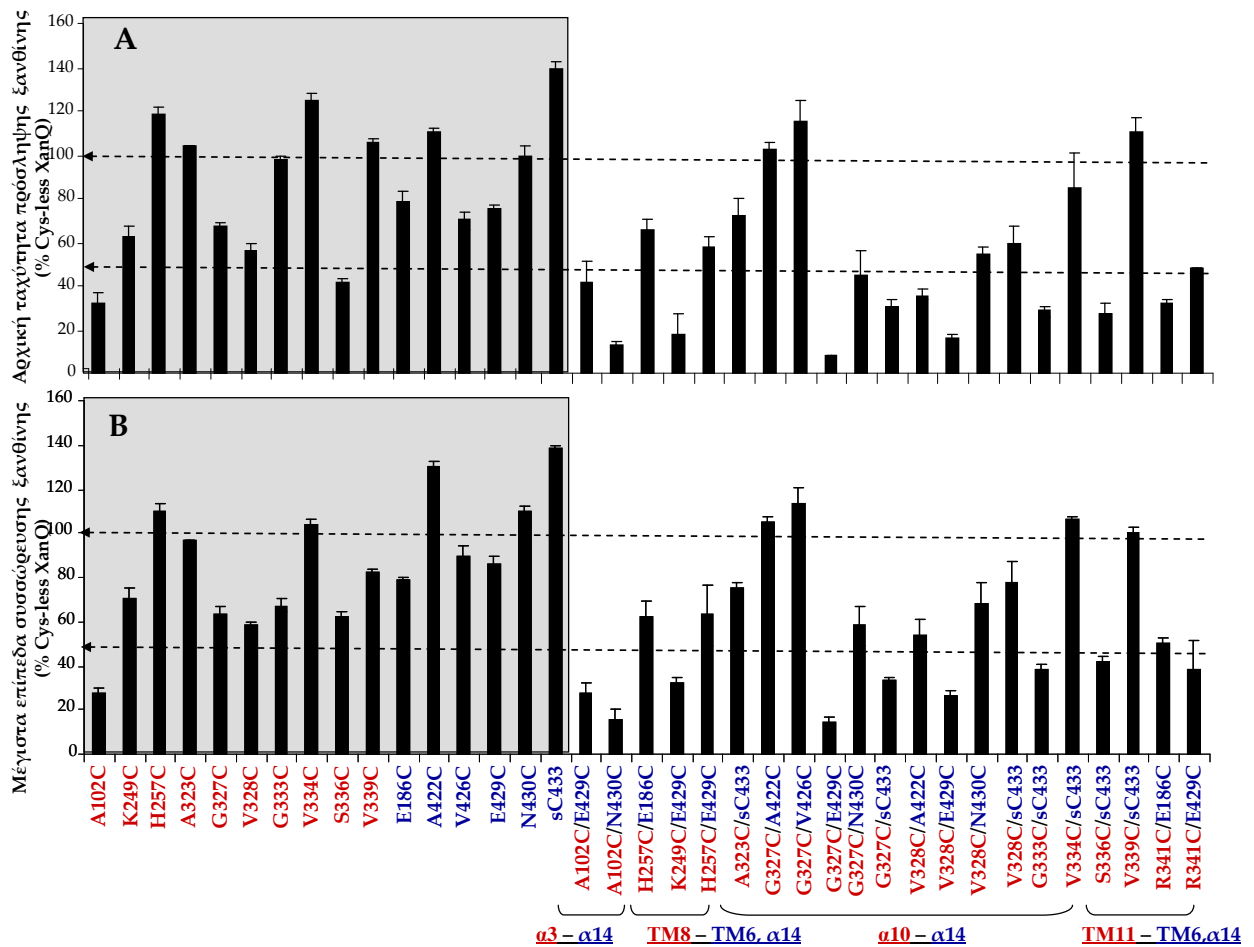
Πρέπει να σημειωθεί ότι από παράλληλη ανεξάρτητη μελέτη (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή 2011) έχουν κατασκευαστεί και τα μεταλλάγματα A323C/ E429C, A323C/ N430C, T332C/E429C, T332C/N430C (α10-TM14), V339C/E429C, V339C/N430C (TM11-TM14), τα οποία έχουν χαρακτηριστεί και έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν υψηλή έκφραση στην μεμβράνη και υψηλή ενεργότητα, εκτός από τα δύο μεταλλάγματα που φέρουν κυστεΐνη στη θέση Thr-332 (T332C/E429C και T332C/N430C) τα οποία εμφανίζουν πολύ μικρή έκφραση και ελάχιστη έως μηδενική ενεργότητα (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή 2011).



Εικόνα 3.2.5: Έκφραση των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών σε θέσεις των $\alpha 3$, TM8, $\alpha 10$ και TM11 σε συνδυασμό με θέσεις των TM6 και TM14 της περμεάσης XanQ (Συνδυασμός II).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP σε κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.2. Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στο αριστερό μέρος μετρώνται σε kDa.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη (Quantity One) (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).



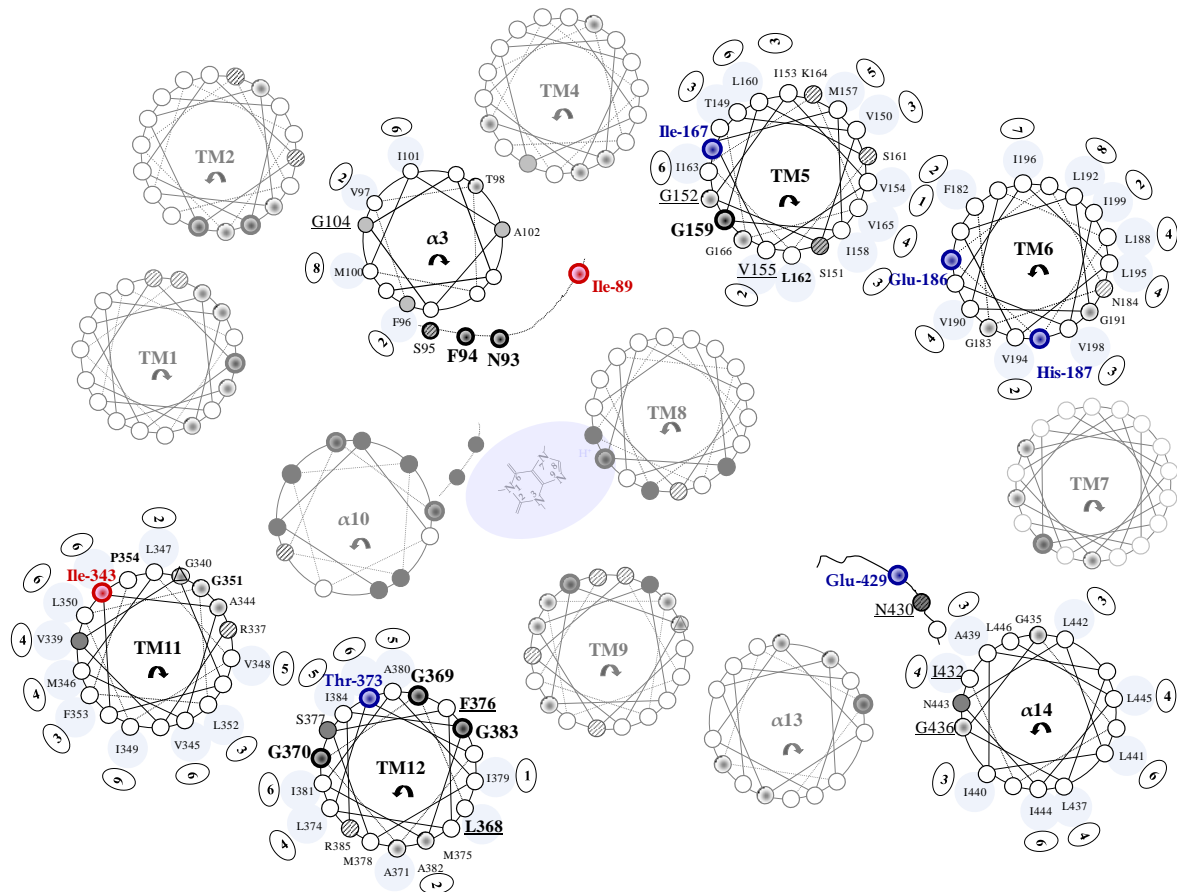
Εικόνα 3.2.6: Ενεργότητες μεταφοράς Ξανθίνης των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών σε θέσεις από διαφορετικές δομικές περιοχές (Συνδυασμός II).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες διπλές μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL), υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] Ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές εκφράζονται ως % των τιμών της XanQ Cys-less-BAD, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. **A.** Αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 10-30 sec) **B.** Μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min). Με πλαίσιο σε γκρι φόντο σημειώνονται οι ενεργότητες των δειγμάτων ελέγχου, που είναι τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης.

Περμεάσες με ζεύγη κυστεϊνών: Συνδυασμός θέσεων III (συνδυασμοί δύο θέσεων στην περιοχή «πυρήνα» ή δύο θέσεων στην περιοχή «εισόδου»)

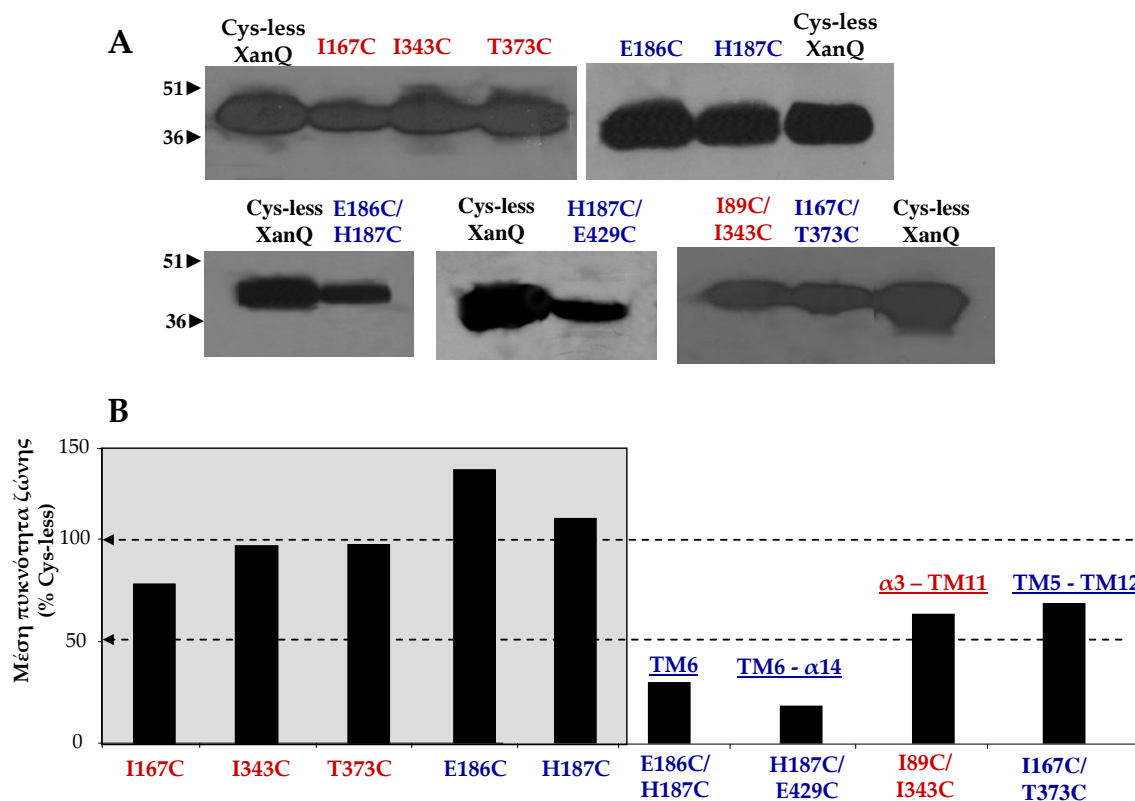
Τέλος, μελετήσαμε ζεύγη κυστεϊνών σε θέσεις που προβλέπεται ότι είναι κοντά μεταξύ τους στην τριτοταγή δομή της XanQ σύμφωνα με το δομικό μοντέλο που βασίζεται στην κρυσταλλική δομή του UraA (Lu *et al.*, 2011), με στόχο αφενός να επιβεβαιώσουμε ή όχι την εγγύτητα των θέσεων και αφετέρου να εξετάσουμε πώς επηρεάζεται η σχετική τους απόσταση με τις αλλαγές διαμόρφωσης που συμβαίνουν στον μηχανισμό λειτουργίας. Επιλέξαμε ζεύγη θέσεων που βρίσκονται και οι δύο είτε στην δομική περιοχή «πυρήνα» [Ile-89 (TM3-β3) και Ile-343 (TM11), που απέχουν (ελάχιστη απόσταση μεταξύ ατόμων C των πλευρικών τους ομάδων) 5 Å στη διαμόρφωση που εμφανίζει το κρυσταλλογραφικό μοντέλο, PyMOL v1.4] είτε στην δομική περιοχή «εισόδου» [Ile-167 (TM5) και Thr-373 (TM12), που απέχουν 4 Å, Glu-186 (TM6) και His-187 (TM6), που είναι διαδοχικές στην αλληλουχία (απόσταση μεταξύ των ατόμων O και N των πλευρικών τους ομάδων 10 Å), His-187 (TM6) και Glu-429 (TM14), που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση (33 Å) στη διαμόρφωση που εμφανίζει το κρυσταλλογραφικό μοντέλο] (Εικόνα 3.2.7).

Για τα μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών που κατασκευάστηκαν, εξετάστηκε η έκφραση στη μεμβράνη και η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης (Εικόνες 3.2.8 και 3.2.9) και βρέθηκε ότι: (α) τα I89C/I343C και I167C/T373C έχουν μέτρια επίπεδα έκφρασης (60-65% της Cys-less XanQ), το E186C/H187C εκφράζεται στην μεμβράνη σε ποσοστό 25% της Cys-less XanQ, το H187C/E429C σε ποσοστό 17% της Cys-less XanQ (Εικόνα 3.2.8B), ενώ όλα τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης εκφράζονται σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της Cys-less XanQ (Εικόνα 3.2.8A), (β) εκτός του H187C/E429C που εμφανίζει ελάχιστη ενεργότητα ($\leq 2\%$ της Cys-less), αλλά και χαμηλά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (Εικόνα 3.2.8B), τα υπόλοιπα μεταλλάγματα έχουν σημαντική ενεργότητα (Εικόνα 3.2.9): το E186C/H187C κυμαίνεται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (13-31% της Cys-less XanQ), ενώ τα I89C/I343C (40%-55%) και I167C/T373C (50-68%) εμφανίζουν σημαντικά υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης. Βάσει των ανωτέρω, για τη δοκιμασία της λειτουργικής επίδρασης των ιόντων καδμίου χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλάγματα I89C/I343C και I167C/T373C.



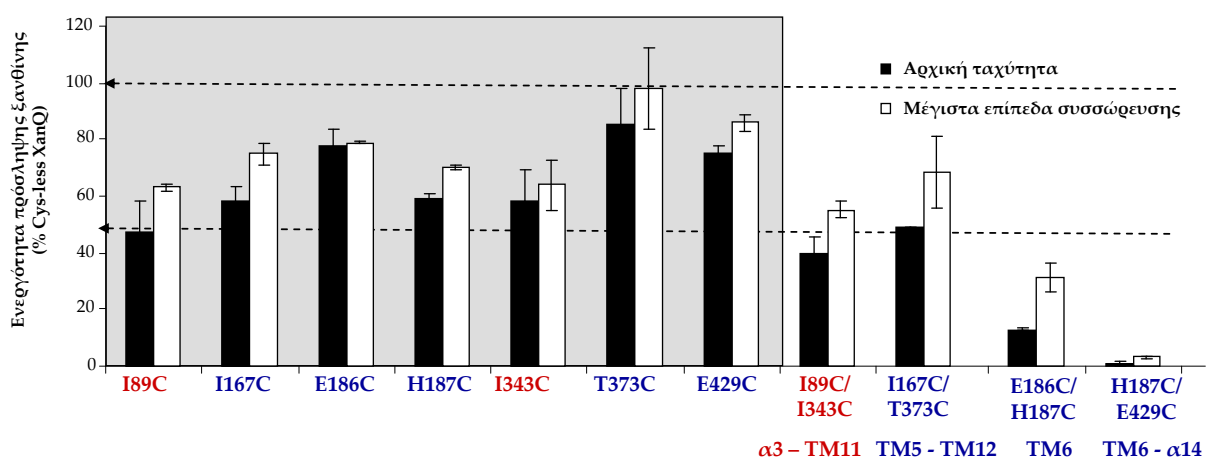
Εικόνα 3.2.7: Μοντέλο διεύθησης των διαμεμβρανικών τμημάτων (α-ελίκων) α3, TM5, TM6, TM11, TM12 και TM14 του XanQ.

Υποθετική διεύθηση των α3, TM5, TM11 και TM6, TM12, α14 της περμεάσης XanQ, με όψη από την κυτταροπλασματική πλευρά, σύμφωνα με το αρχικό μοντέλο διεύθησης (βλ. 3.1.4, Εικόνα 3.1.50), στις οποίες τονίζονται οι θέσεις (κόκκινα και μπλε σχήματα στόχων, έντονα μεγεθυμένα) που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή καταλοίπων κυστεϊνών και την δημιουργία μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών (double-Cys mutants, συνδυασμός III).



Εικόνα 3.2.8: Έκφραση των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών σε θέσεις που ανήκουν σε ίδια δομική περιοχή ($\alpha 3$ -TM11, και TM5/6-TM12) της περμεάσης XanQ (Συνδυασμός III).

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP σε κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.2. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη (Quantity One) (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%). Με πλαίσιο σε γκρι φόντο σημειώνονται τα επίπεδα των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης που εξετάστηκαν παράλληλα ως δείγματα ελέγχου.

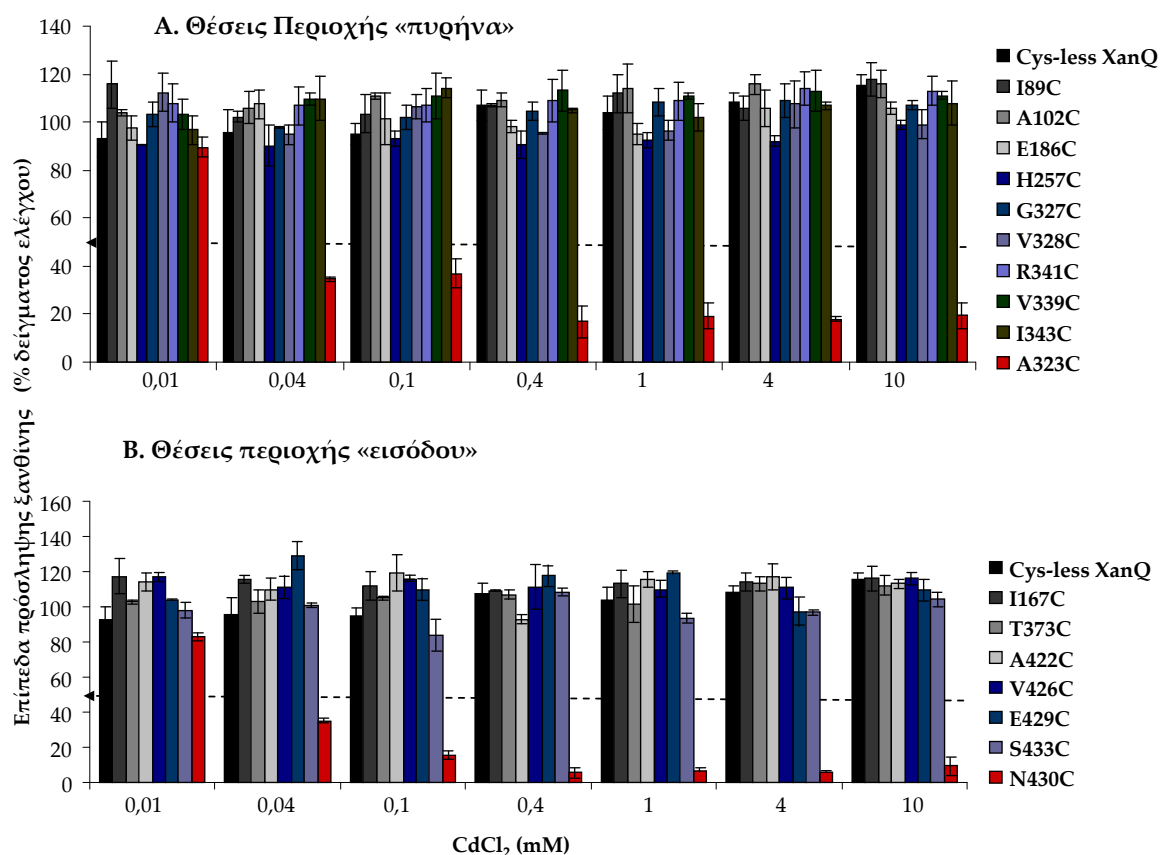


Εικόνα 3.2.9: Ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών σε θέσεις που ανήκουν σε ίδια δομική περιοχή (α3-TM11 και TM5/6-TM12) της περμεάσης XanQ (Συνδυασμός III).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (0,7 mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές αρχικής ταχύτητας (από μετρήσεις σε 10-30 sec, μαύρες στήλες) και μέγιστων επιπέδων συσσώρευσης του υποστρώματος (από μετρήσεις σε 1-10 min, λευκές στήλες) εκφράζονται ως % των τιμών της XanQ Cys-less-BAD, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Με πλαίσιο σε γκρι φόντο σημειώνονται οι ενεργότητες των δειγμάτων ελέγχου, που είναι τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης.

3.2.1.2 Επίδραση ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών

Από τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των είκοσι εννέα (29) διπλών μεταλλαγμάτων κυστεϊνών που παρουσιάστηκε παραπάνω προέκυψαν δεκαπέντε (15) μεταλλάγματα με σημαντική ενεργότητα (αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης πάνω από 50% της Cys-less XanQ) (A102C/E429C, H257C/E186C, H257C/E429C, A323C/sC433, G327C/A422C, G327C/V426C, V328C/A422C V328C/N430C, V328C/sC433, V334C/sC433, V339C/sC433, R341C/E186C, R341C/E429C, I89C/I343C, I167C/T373C). Σε αυτά τα 15 μεταλλάγματα έγιναν πειράματα δοκιμασιών αναστολής της ενεργότητας παρουσία ενός εύρους συγκεντρώσεων CdCl₂ βλ. 2.9.8). Για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα ως προς την πιθανή επίδραση των ιόντων καδμίου (II), έγιναν παράλληλα πειράματα με την ελεύθερη κυστεϊνών περμεάση (Cys-less XanQ) και με όλα τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (I89C, A102C, I167C, K249C, E186C, H257C, A323C, G327C, V328C, V334C, V339C, R341C, I343C, T373C, A422C, V426C, E429C, N430C, sC433) (Εικόνα 3.2.10).



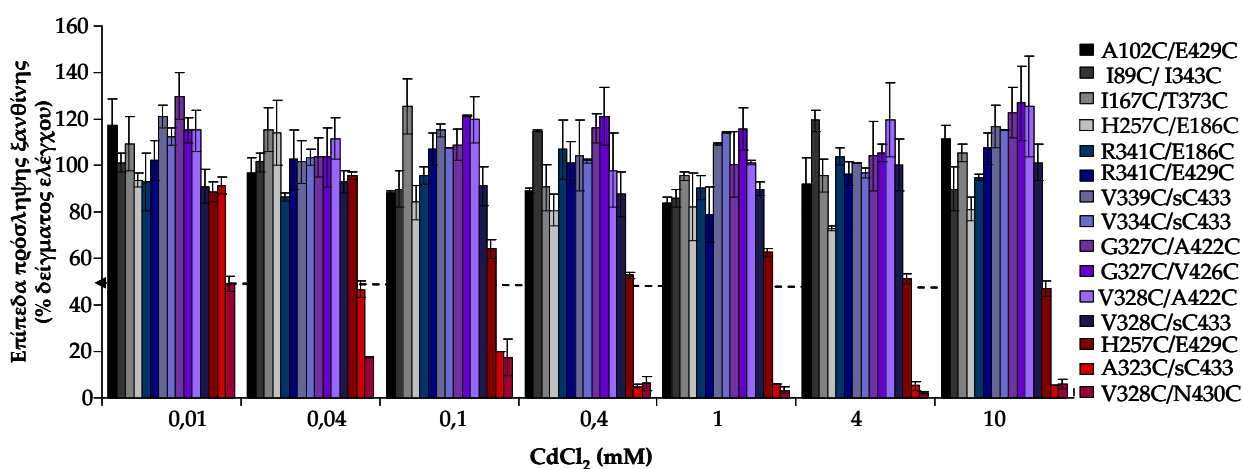
Εικόνα 3.2.10: Επίδραση CdCl₂ στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων μονής κυστεϊνης της περμεάσης XanQ.

Επίδραση δισθενών ιόντων καδμίου σε μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης της XanQ σε θέσεις καταλοίπων (A) της δομικής περιοχής «πυρήνα» και (B) της δομικής περιοχής «εισόδου». Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, μετά από επώαση με CdCl₂ (10μM-20mM, 10 min, 25 °C). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 5-10 sec), ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία CdCl₂ για κάθε μετάλλαγμα (καθώς και για την περμεάση Cys-less XanQ που χρησιμοποιείται ως δείγμα αρνητικού ελέγχου), με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από πέντε πειράματα (n=5).

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι από τα 15 μεταλλάγματα μόνο τρία (H257C/E429C, A323C/sC433, V328C/N430C) εμφανίζουν σημαντική αναστολή ενεργότητας παρουσία των ιόντων καδμίου (Εικόνα 3.2.11). Το μετάλλαγμα H257C/E429C παρουσιάζει αναστολή ενεργότητας στο 50-60% (με 1 mM έως 20 mM CdCl₂), η οποία μπορεί να τιτλοδοτηθεί (με προσαρμογή στις κατάλληλες εξισώσεις με το πρόγραμμα Prism5) και δίνει μία τιμή IC₅₀ περί τα 86 μM (Εικόνα 3.2.12). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι, αφενός, οι θέσεις μονής κυστεΐνης 429 (TM14 – περιοχή «εισόδου») και 257 (TM8 – περιοχή «πυρήνα») είναι πιθανό να γειτνιάζουν στη δομή της XanQ, ώστε να μπορούν να δημιουργούν από κοινού κέντρο συντονισμού για δέσμευση του καδμίου και, αφετέρου, είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον ώστε να μπορούν να δεσμεύουν το κατιόν του καδμίου (II). Τα μεταλλάγματα A323C/sC433 και V328C/N430C εμφανίζουν εντονότερη αναστολή ενεργότητας (~50% με 10 μM CdCl₂) (Εικόνα 3.2.11), με την διαφορά όμως ότι ταυτόχρονα παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας και των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης A323C και N430C [στο 35% με 40μM και 50% με 10μM CdCl₂ αντίστοιχα, Εικόνα 3.2.10]. Η τιτλοδότηση αυτής της αναστολής δίνει τιμές IC₅₀ 35μM και 20μM για τα A323C/sC433 και A323C, αντίστοιχα, και IC₅₀ 6μM και 17μM για τα V328C/N430C και N430C, αντίστοιχα (Εικόνα 3.2.12). Άρα, φαίνεται ότι η επίδραση του καδμίου οφείλεται στην αναστολή των μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης και όχι σε εγγύτητα των αντίστοιχων ζευγών κυστεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι θέσεις A323C και N430C είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον (αντιδρούν με τα δισθενή ιόντα καδμίου) και μπορεί να δεσμεύουν το κάδμιο είτε σε συνεργασία με άλλα αμινοξέα του XanQ, όπως ιστιδίνες (βλ. παρακάτω, 3.2.1.3), είτε, σε περίπτωση σχηματισμού διμερών XanQ, με διαμοριακή αλληλεπίδραση κυστεϊνών μεταξύ δύο μορίων της περμεάσης.

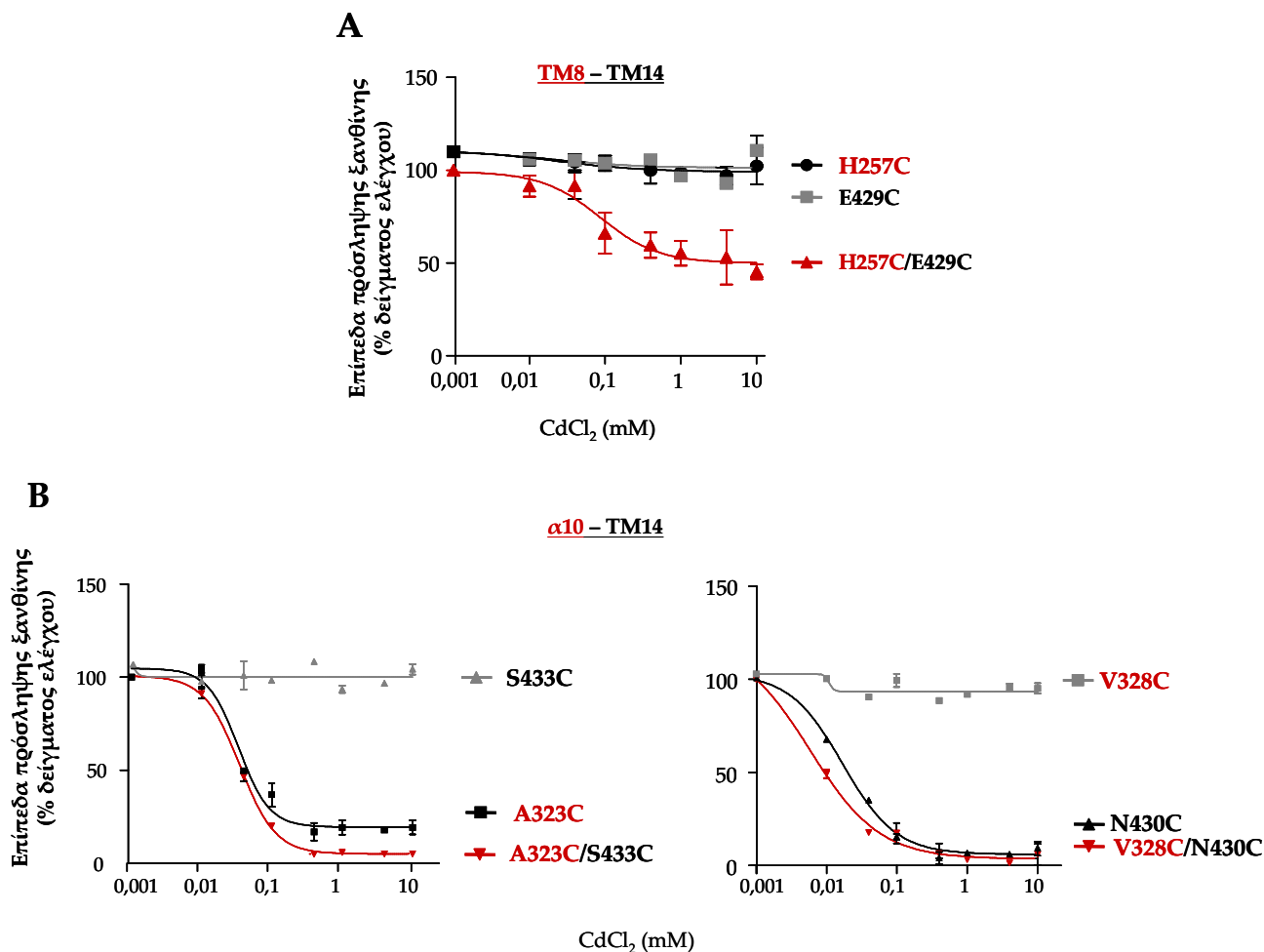
Σε ανεξάρτητη μελέτη του εργαστηρίου μας (Παπακώστας Κ., Διδ. Διατριβή 2011) μελετήθηκε με το ίδιο πρωτόκολλο η λειτουργική επίδραση των ιόντων καδμίου (II) στα μεταλλάγματα A323C/E429C, A323C/N430C, V339C/E429C και V339C/N430C, που περιέχουν ζεύγη κυστεϊνών σε θέσεις του

TM10 (μοτίβο-υπογραφή) και του TM14. Από την εργασία αυτή αποδεικνύεται ότι το μετάλλαγμα V339C/E429C δεν εμφανίζει αξιοσημείωτη ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το κάδμιο, ενώ τα A323C/N430C και V339C/N430C εμφανίζουν αναστολή ενεργότητας (IC_{50} 10 μ M και 2 μ M αντίστοιχα) που αποδίδεται όμως στην αναστολή της ενεργότητας των A323C και N430C (IC_{50} 13 μ M και 10 μ M αντίστοιχα), ενισχύοντας τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας για τις θέσεις A323C και N430C, όπως εκτέθηκαν παραπάνω.



Εικόνα 3.2.11: Επίδραση CdCl₂ στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων της περμεάσης XanQ με ζεύγη κυστεϊνών.

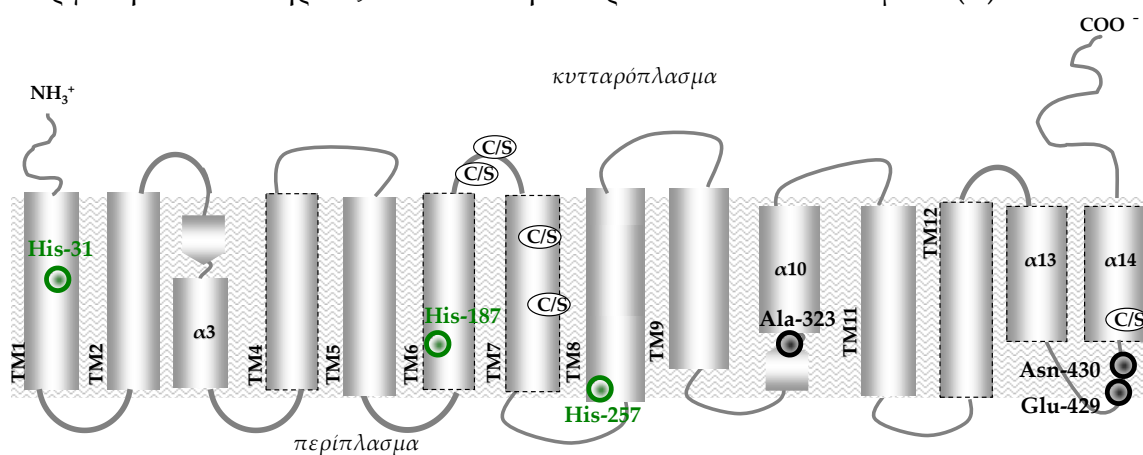
Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]Ξανθίνης (1 μ M), στους 25 °C, μετά από επώαση με CdCl₂ (10 μ M-20mM, 10 min, 25 °C). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 5-10 sec), ως εκατοστιαία ποσοστά επί των τιμών που μετρήθηκαν απουσία CdCl₂ για κάθε μετάλλαγμα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από πέντε πειράματα (n=5). Τα πειράματα αυτά έγιναν παράλληλα με τα πειράματα για την επίδραση των δισθενών ιόντων καδμίου στην Cys-less XanQ και στα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης, τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.10.



Εικόνα 3.2.12: Επίδραση CdCl₂ στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων της περμεάσης XanQ με μονή κυστεΐνη ή ζεύγη κυστεΐνων. Τα δεδομένα για την επίδραση δισθενών ιόντων καδμίου στην ενεργότητα ορισμένων μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης ή μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεΐνων τα οποία εξετάστηκαν (Εικόνες 3.2.10 και 3.2.11) παρουσιάζονται διαγραμματικά, μετά από προσαρμογή των δεδομένων στις κατάλληλες εξισώσεις με χρήση του προγράμματος Prism5. **A.** Καμπύλη δόσοεξάρτησης της επίδρασης χλωριούχου καδμίου στην ενεργότητα του H257C/E429C (TM8-TM14) και των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης. **B.** Καμπύλη δόσοεξάρτησης της επίδρασης χλωριούχου καδμίου στην ενεργότητα των sC433/A323C, N430C/V328C (α10-TM14) και των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης.

3.2.1.3 Ο ρόλος εγγενών ιστιδινών στην απενεργοποίηση της περμεάσης N430C από δισθενή ιόντα καδμίου

Από τη μελέτη της λειτουργικής επίδρασης των ιόντων καδμίου (II) που εκτέθηκε παραπάνω προκύπτει ότι οι θέσεις A323C και N430C αντιδρούν με τα δισθενή ιόντα καδμίου και επηρεάζουν καθοριστικά την ευαισθησία για απενεργοποίηση των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων στα οποία συνδυάζονται οι θέσεις αυτές (Ala-323, Asn-430) με μια δεύτερη κυστεΐνη. Μια ενδεχόμενη ερμηνεία του παραπάνω φαινομένου είναι να συμβαίνει ενδομοριακή αλληλεπίδραση της κυστεΐνης A323C ή N430C με κάποιο από τα εγγενή κατάλοιπα ιστιδίνης της XanQ, ώστε να δημιουργείται κέντρο συντονισμού για δέσμευση καδμίου του τύπου His-Cd²⁺-Cys (Benitah *et al.*, 1996). Για να εξετασθεί αυτό το ενδεχόμενο, αντικαταστήσαμε μία προς μία τις τρεις εγγενείς ιστιδίνες της XanQ που βρίσκονται σε διαμεμβρανικές περιοχές του μορίου, δηλαδή τις His-31 (TM1), His-187 (TM6) και His-257 (TM8), σε αλανίνη (Ala) και συνδυάσαμε αυτές τις αντικαταστάσεις με τις A323C ή N430C, ώστε να δούμε κατά πόσον επηρεάζεται η ευαισθησία στην απενεργοποίηση από το κάδμιο (Εικόνα 3.2.13). Ως κατασκευή αρνητικού ελέγχου, συνδυάσαμε τις αντικαταστάσεις H31A, H187A ή H257A με την E429C, της οποίας η ενεργότητα δεν επηρεάζεται από την παρουσία ιόντων καδμίου (II).

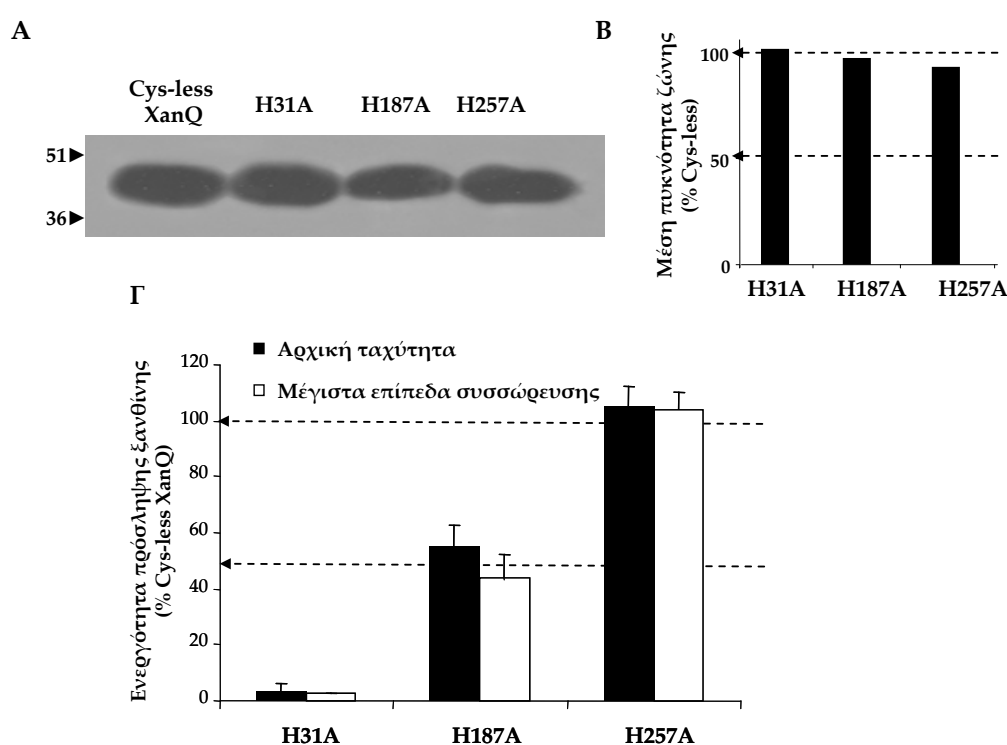


Εικόνα 3.2.13: Απεικόνιση των θέσεων των εγγενών ιστιδινών και των θέσεων εισαγωγής μονής κυστεΐνης στο πιθανό τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το μοντέλο στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011), σε *in silico* τοπολογικές προβλέψεις για την XanQ (Π2.1α) και σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας (Γ. Μερμελέκας, Διδακτορική Διατριβή) (Π2.1β). Τμήματα α-έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περίγραμμα φαίνονται TM της δομικής περιοχής «εισόδου») και τμήματα β-πτυχωτής επιφάνειας απεικονίζονται με πεντάγωνα σε μορφή βέλους. Σε μεγέθυνση με πράσινο και μαύρο χρώμα γραμματοσειράς και σχήμα στόχου τονίζονται οι εγγενείς ιστιδίνες και οι θέσεις εισαγωγής μονής κυστεΐνης, αντίστοιχα. Επίσης, σημειώνονται οι πέντε εγγενείς κυστεΐνες που έχουν αντικατασταθεί με

κατάλοιπα σερινών για την κατασκευή της Cys-less XanQ (Karatza *et al.*, 2006) η οποία χρησιμοποιείται ως μοριακό υπόβαθρο για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων.

Ακολουθώντας τον παραπάνω σχεδιασμό, κατασκευάσαμε αρχικά και ελέγξαμε ως προς τη λειτουργικότητα τα μεταλλάγματα H31A, H187A και H257A (Εικόνα 3.2.14). Αυτά τα τρία μεταλλάγματα εκφράζονται στην μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του Cys-less XanQ (92-105%), αλλά μόνο τα δύο, H187A και H257A, εμφανίζουν σημαντική ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, σε επίπεδα 55% και 105% της Cys-less XanQ, αντίστοιχα. Το μετάλλαγμα H31A έχει ελάχιστη ενεργότητα (3% της Cys-less XanQ) η οποία δεν επιτρέπει περαιτέρω λειτουργική ανάλυση (Εικόνα 3.2.14).



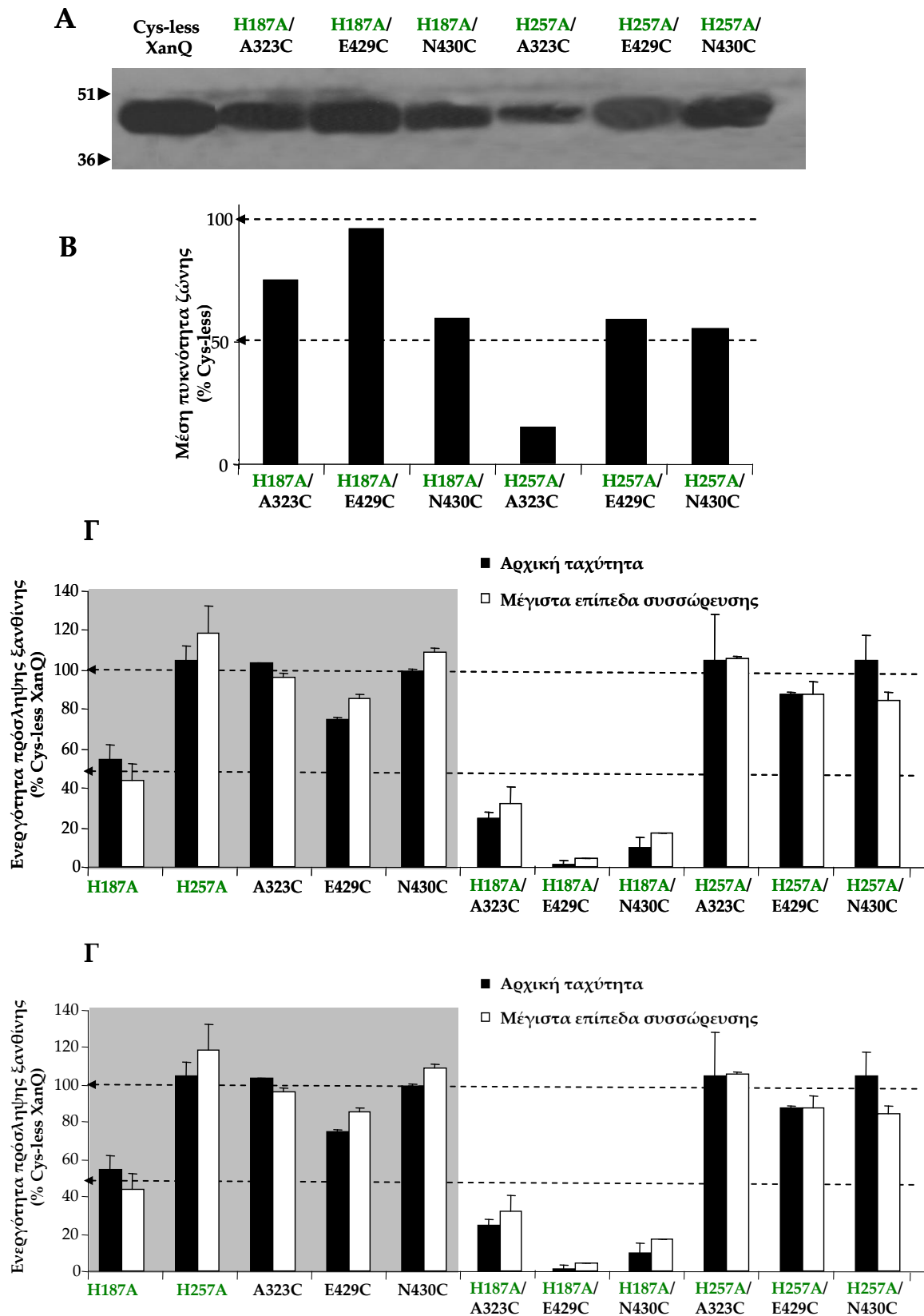
Εικόνα 3.2.14: Επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη και ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης μεταλλαγμάτων της XanQ με αντικατάσταση των εγγενών His με Ala.

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP σε κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.2. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη (Quantity One) (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%). **Γ.** Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1), που έγινε στα παραπάνω κύτταρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.3. Οι τιμές αρχικής ταχύτητας (μετρήσεις σε 10-30 sec, μαύρες στήλες) και μέγιστων επιπέδων συσσώρευσης ξανθίνης (μετρήσεις σε 1-10 min, λευκές στήλες) εκφράζονται ως % των τιμών της XanQ Cys-less-BAD, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184

μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.

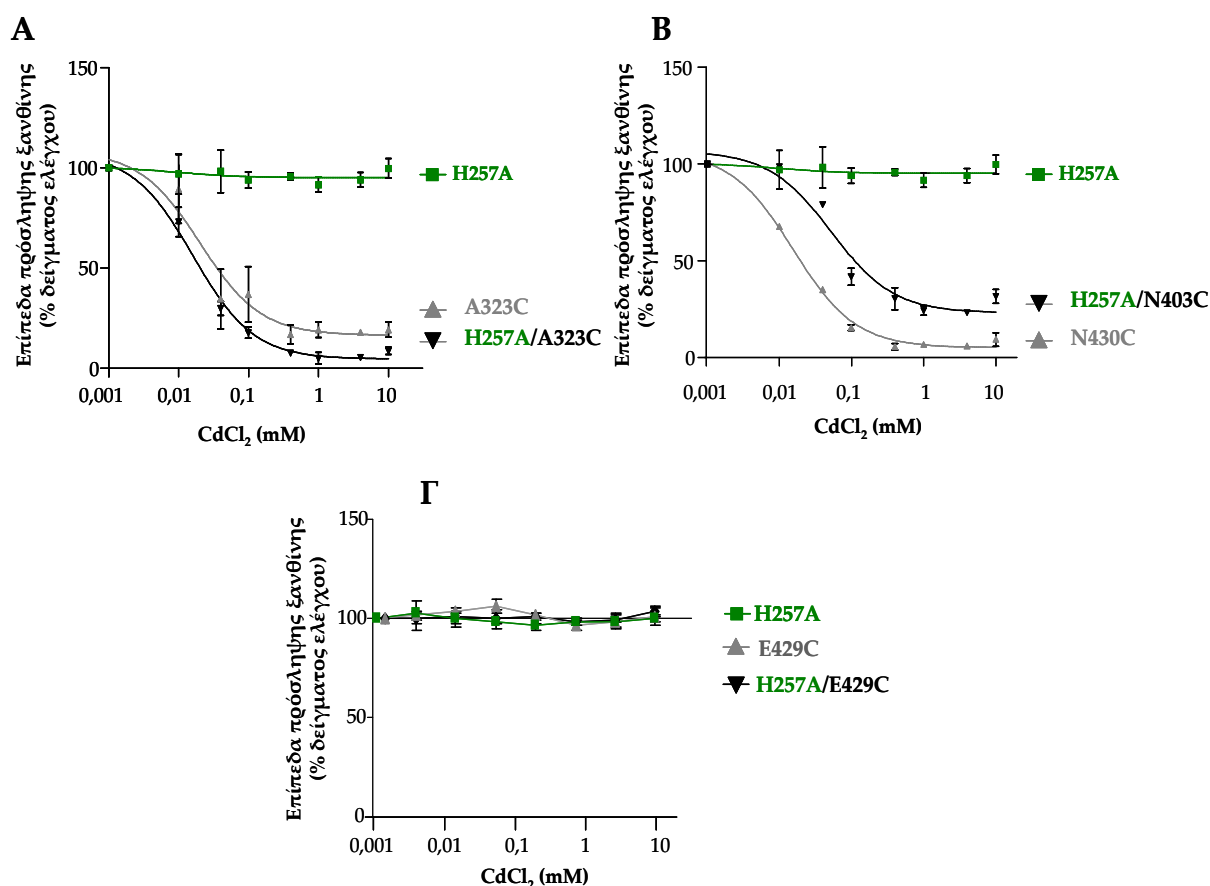
Στη συνέχεια, κατασκευάσαμε έξι (6) διπλά μεταλλάγματα H187A/A323C, H187A/E429C, H187A/N430C, H257A/A323C, H257A/E429C, H257A/N430C και εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη (Εικόνα 3.2.15) και την ενεργότητά τους (Εικόνα 3.2.16). Και τα έξι μεταλλάγματα εκφράζονται στην μεμβράνη, σε μέτρια επίπεδα, 43-47% (H257A/A323C, H257A/E429C, H257A/N430C) ή υψηλά επίπεδα, 73-100% (H187A/A323C, H187A/E429C, H187A/N430C) της Cys-less XanQ. Ως προς την ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης, τα μεταλλάγματα που περιέχουν αντικατάσταση της His-187 (H187A/A323C, H187A/E429C, H187A/N430C) εμφανίζουν πολύ χαμηλή ενεργότητα (αρχική ταχύτητα 1-25% της Cys-less XanQ), ενώ τα μεταλλάγματα που περιέχουν αντικατάσταση της His-257 (H257A/A323C, H257A/E429C, H257A/N430C) εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα, παρόμοια με αυτήν της Cys-less XanQ (88-105%) (Εικόνα 3.2.16).

Στα ενεργά μεταλλάγματα H257A/A323C, H257A/E429C, H257A/N430C εφαρμόσαμε την δοκιμασία μέτρησης ενεργού μεταφοράς παρουσία ιόντων καδμίου (II) (Εικόνα 3.2.17) και παρατηρήσαμε ότι: (α) το μετάλλαγμα H257A/N430C εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το κάδμιο (40% με 100μM, IC₅₀ 52μM) σε σχέση με το μετάλλαγμα μονής κυστεΐνης (N430C, IC₅₀ 17μM), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ευαισθησία του N430C οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε ενδομοριακή αλληλεπίδραση με την His-257 (Εικόνα 3.2.17B), (β) το μετάλλαγμα H257A/A323C εμφανίζει αμελητέα διαφορά στην ευαισθησία από το κάδμιο (30% με 40μM, IC₅₀ 17μM) σε σχέση με το μετάλλαγμα μονής κυστεΐνης (A323C, IC₅₀ 20 μM) (Εικόνα 3.2.17A), (γ) η ενεργότητα του μεταλλάγματος H257A/E429C δεν επηρεάζεται καθόλου από την παρουσία των ιόντων καδμίου (Εικόνα 3.2.17Γ) σε αντίθεση με το μετάλλαγμα H257C/E429C το οποίο είχαμε βρει ότι αναστέλλεται κατά 50% (βλ. Εικόνα 3.2.12).



Εικόνα 3.2.15: Επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη και ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης για μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης της XanQ στο υπόβαθρο των μεταλλαγών εγγενούς His σε Ala.

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP σε κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.2. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη (Quantity One) (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο πειράματα με τυπική απόκλιση <15%. **Γ.** Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1), που έγινε στα παραπάνω κύτταρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.3. Οι τιμές αρχικής ταχύτητας (10-30 sec, μαύρες στήλες) και μέγιστων επιπέδων συσσώρευσης ξανθίνης (1-10 min, λευκές στήλες) εκφράζονται ως % των τιμών της XanQ Cys-less-BAD, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 3.2.17: Επίδραση CdCl₂ στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων μονής κυστεΐνης της XanQ στο υπόβαθρο μεταλλαγών εγγενούς His σε Ala.

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, μετά από επώαση με CdCl₂ (10μM-20mM, 10 min, 25 °C), και τα δεδομένα παρουσιάζονται διαγραμματικά, μετά από προσαρμογή στις κατάλληλες εξισώσεις με χρήση του προγράμματος Prism5, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.12. Οι τιμές αντιστοιχούν σε αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 5-10 sec), ως % των τιμών που μετρήθηκαν απουσία CdCl₂ για κάθε μετάλλαγμα, με αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από πέντε πειράματα (n=5). **A.** Καμπύλη δοσοεξάρτησης της επίδρασης CdCl₂ στην ενεργότητα του H257A/A323C (TM8-α10) και των αντίστοιχων μονών μεταλλαγμάτων. **B.** Καμπύλη δοσοεξάρτησης της επίδρασης CdCl₂ στην ενεργότητα του

H257A/N430C (TM8-TM14) και των αντίστοιχων μονών μεταλλαγμάτων. Γ. Καμπύλη δοσοεξάρτησης της επίδρασης CdCl₂ στην ενεργότητα του H257A/E429C (TM8-TM14) και των αντίστοιχων μονών μεταλλαγμάτων.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της επίδρασης των δισθενών ιόντων καδμίου στα μεταλλάγματα Cys-Cys και His-Cys (Πίνακας 3.2.1) υποδεικνύουν ότι τα κατάλοιπα Asn-430 και Glu-429 που ανήκουν στην δομική περιοχή «εισόδου» (TM14) αλληλεπιδρούν ενδομοριακά με το κατάλοιπο His-257 της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM8), παρόλο που οι θέσεις αυτές απέχουν αρκετά στην τριτοταγή δομή (περίπου 20Å), σύμφωνα με τη διαμόρφωση που εμφανίζεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση μεταξύ των θέσεων αυτών του TM14 και του TM8 είναι εφικτή αν δεχτούμε ότι σε μια ενδιάμεση διαμόρφωση της πρωτεΐνης XanQ κατά τον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς πλησιάζουν αρκετά μεταξύ τους στο χώρο. Η παρατηρούμενη αναστολή ενεργότητας των H257C/E429C και H257A/N430C παρουσία των ιόντων καδμίου υποδηλώνει ότι η πρόσδεση του καδμίου μεταξύ αυτών των θέσεων εμποδίζει την εναλλαγή διαμορφώσεων της XanQ που χρειάζεται στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης.

Πίνακας 3.2.1: Τιμές IC₅₀ μεταλλαγμάτων της XanQ μετά την επίδραση με CdCl₂

Καταγράφονται οι τιμές IC₅₀ που υπολογίστηκαν, μετά από προσαρμογή των δεδομένων της λειτουργικής επίδρασης του χλωριούχου καδμίου (Εικόνες 3.2.10-12, 3.2.17) στις κατάλληλες εξισώσεις (πρόγραμμα Prism5), για μεταλλάγματα της XanQ ευαίσθητα σε αναστολή από τα ιόντα καδμίου, όπως αναφέρονται στην πρώτη στήλη. Στην τρίτη στήλη σημειώνονται τα διαμεμβρανικά τμήματα (TM) στα οποία ανήκουν οι θέσεις αμινοξέων που αντικαταστάθηκαν με μεταλλαξιγένεση.

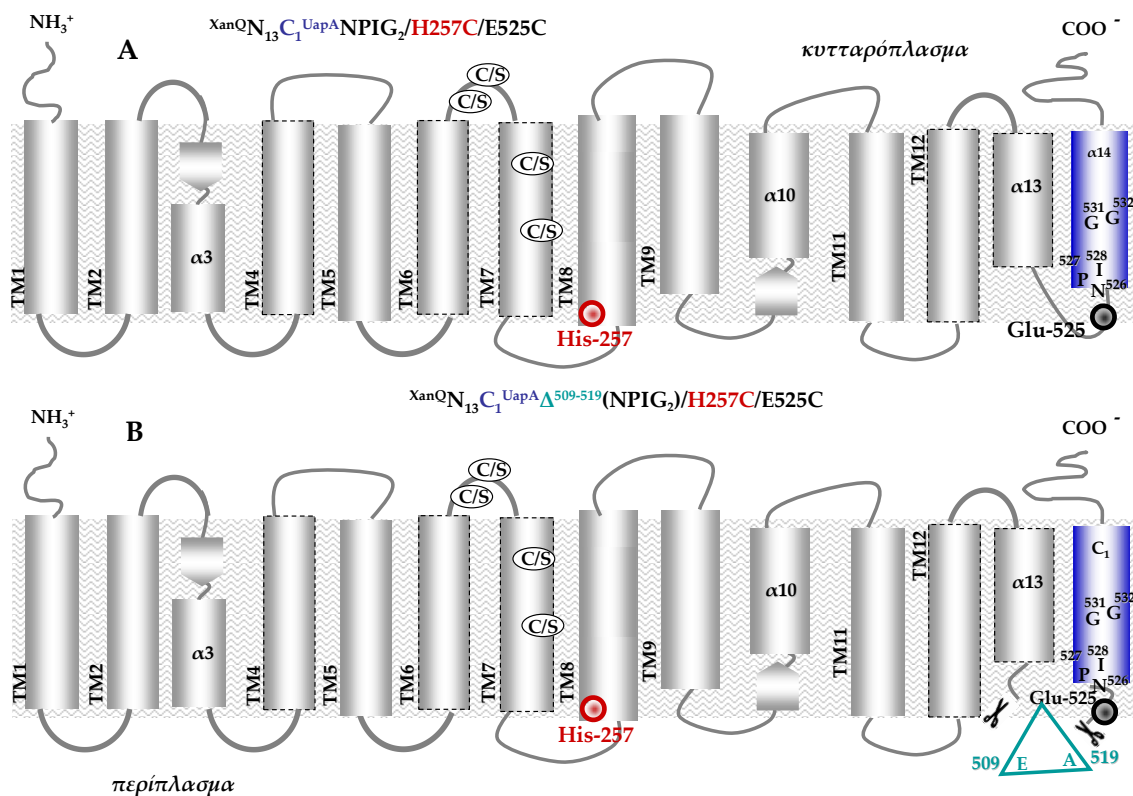
Αναστολή μεταλλαγμάτων XanQ από CdCl₂		
Κατασκευή	IC₅₀ (μM)	TM
A323C	20	α10
H257A/A323C	17	TM8-α10
N430C	17	TM14
H257A/ N430C	52	TM8-TM14
A323C/sC433	35	α10-TM14
V328C/N430C	6	α10-TM14
H257C/E249C	86	TM8-TM14

3.2.1.4 Επίδραση ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητα του μεταλλάγματος E429C/H257C στο υπόβαθρο ενός χιμαιρικού μεταφορέα NCS2

Η κατασκευή και η ανάλυση χιμαιρικών μεταφορέων είναι ένα σημαντικό μοριακό εργαλείο για την κατανόηση των διαφορών στην επιλεκτικότητα υποστρώματος και στην εξειδίκευση συγγενικών περμεασών. Μια τέτοια μελέτη που ήδη έχει πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας (Γεωργοπούλου Αικ., Διδ. Διατριβή 2011), έχει οδηγήσει σε κατασκευές χιμαιρικών περμεασών, στις οποίες έχει αντικατασταθεί το 14^ο διαμεμβρανικό τμήμα (TM14) της XanQ, το οποίο περιέχει θέσεις με καθοριστικό ρόλο για την αναγνώριση και μεταφορά του υποστρώματος (Papakostas *et al.*, 2008), με το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα (TM14) του ομόλογου μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης του ασκομύκητα *A.nidulans* (χιμαιρική περμεάση N₁₃C₁). Στην εργασία αυτή (Γεωργοπούλου Αικ., Διδ. Διατριβή 2011) αποδείχθηκε ότι ο μεταλλαγμένος χιμαιρικός μεταφορέας [^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}Δ509-519(NPIG₂)], που προκύπτει με τις αντικαταστάσεις των καταλοίπων Thr-526, Gly-527, Phe-528, Thr-531, Ala-532 (που προέρχονται από την αλληλουχία TM14 του UraA) σε Asn, Pro, Ile, Gly και Gly, αντίστοιχα, όπως είναι στην XanQ, και την απαλοιφή έντεκα αμινοξέων (Glu-509 μέχρι Ala-519) της συνδετικής περιοχής ανάμεσα στις έλικες α13 και α14 (Εικόνα 3.2.18B) είναι λειτουργικός και εκφράζεται στην μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα. Στο χιμαιρικό αυτό υπόβαθρο και σε κατασκευή όπου όλα τα εγγενή κατάλοιπα κυστεϊνών έχουν αντικατασταθεί με Ser (Karatza *et al.*, 2006), στην παρούσα εργασία, εισαγάγαμε το ζεύγος κυστεϊνών στις θέσεις His-257 (TM8 της XanQ) και Glu-525 (α14 στην αλληλουχία του χιμαιρικού μεταφορέα που προέρχεται από τον UapA) και ελέγξαμε την λειτουργική επίδραση δισθενών ιόντων καδμίου για να ανιχνεύσουμε πιθανή εγγύτητα των περιοχών αυτών στον χιμαιρικό μεταφορέα. Παράλληλα, εισαγάγαμε το ζεύγος κυστεϊνών και στο χιμαιρικό υπόβαθρο ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}(NPIG₂) για να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο της συνδετικής περιοχής ⁵⁰⁹ENRDLEGFENA⁵¹⁹, που απαλείφεται στην προηγούμενη χίμαιρα, ως προς την επίδραση του καδμίου στον μεταφορέα.

Με αυτό το σκεπτικό, κατασκευάσαμε τους χιμαιρικούς μεταφορείς ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}Δ509-519(NPIG₂)/H257C/E525C & ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}(NPIG₂)/H257C/E525C και τους χαρακτηρίσαμε για την ενεργότητα και τα επίπεδα έκφρασής τους στην μεμβράνη. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.2.19) φανερώνουν ότι η εισαγωγή του ζεύγους κυστεϊνών έχει αρνητική επίπτωση στην έκφραση του χιμαιρικού μεταφορέα ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}(NPIG₂)/H257C/E525C [15% του ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}(NPIG₂)] και στην ενεργότητά του [αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης 10%, μέγιστα επίπεδα 0% του ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}(NPIG₂)]. Αντίθετα ο χιμαιρικός μεταφορέας ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}Δ509-519(NPIG₂)/H257C/E525C εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα [45% του ^{XanQ}N₁₃C₁^{UapA}Δ509-519(NPIG₂)] και έχει σημαντική ενεργότητα [αρχική

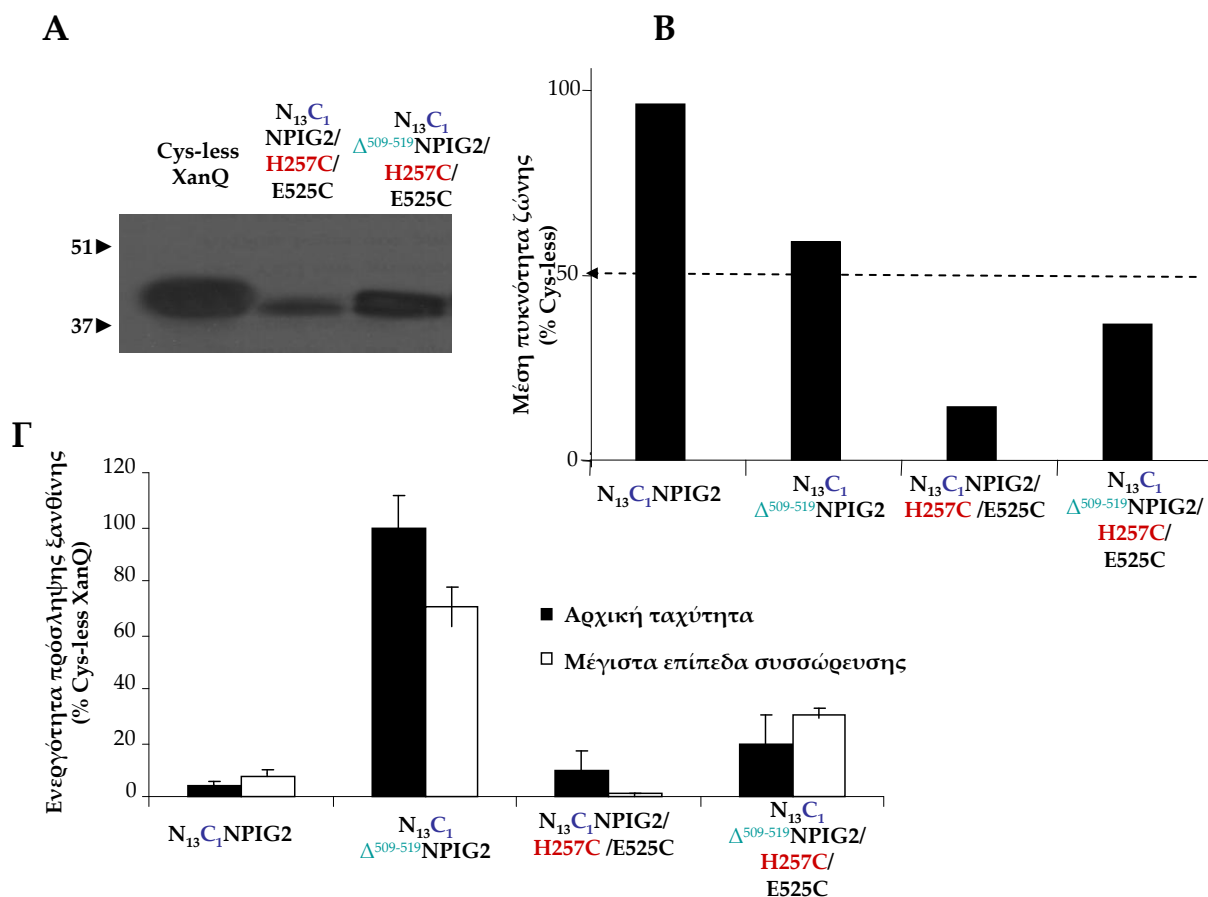
ταχύτητα μεταφοράς Ξανθίνης 19%, μέγιστα επίπεδα 31%] γεγονός που μας επέτρεψε να προχωρήσουμε σε λειτουργικά πειράματα επίδρασης του καδμίου (II). Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά (Εικόνα 3.2.20) αποκάλυψαν πτώση της ενεργότητας παρουσία ιόντων καδμίου, η οποία μπορεί να τιτλοδοτηθεί (με προσαρμογή στις κατάλληλες εξισώσεις με το πρόγραμμα Prism5) και δίνει μία τιμή IC_{50} περί τα 235 μM (Εικόνα 3.2.20). Η αργή αυτή πτώση στην ενεργότητα (IC_{50} 235 μM) διαφέρει από την αντίστοιχη που σημειώνεται για τον μεταφορέα Cys-less /H257C/E429C XanQ (IC_{50} 63 μM) αλλά αποτελεί μια έμμεση επιπλέον ένδειξη για την εγγύτητα των περιοχών TM8 και $\alpha 14$. Επιπλέον, το γεγονός ότι το φαινόμενο της αναστολής της ενεργότητας ως συνέπεια της πρόσδεσης καδμίου μεταξύ των θέσεων 257 (TM8) και 429/525 (TM14) διατηρείται εκτός από την XanQ και σε ένα μοριακό υπόβαθρο χιμαιρικού μεταφορέα XanQ/UapA υποδηλώνει ότι αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των TM8 και TM14 αποτελεί σημαντική συνιστώσα στον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων Ξανθίνης και/ή ουρικού της οικογένειας NCS2 που έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη.



Εικόνα 3.2.18: Σχηματική απεικόνιση των θέσεων His-257 (TM8) και Asp-525/429 (TM14) στο υπόβαθρο των χιμαιρικών μεταφορέων XanQ_{N13}C₁UapA Δ ₅₀₉₋₅₁₉(NPIG₂) και XanQ_{N13}C₁UapA_{NPIG₂} με βάση το πιθανό τοπολογικό μοντέλο της XanQ.

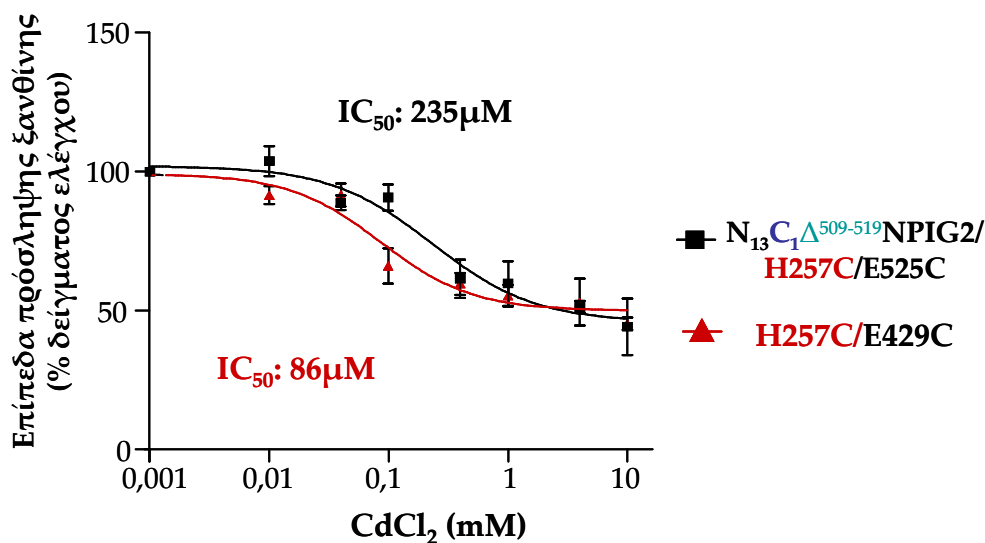
Στο τοπολογικό μοντέλο της XanQ (βλ. Εικόνα 3.2.13) με μπλε σκίαση τονίζεται το τελευταίο διαμεμβρανικό τμήμα (TM14) που έχει αντικατασταθεί με την αντίστοιχη αλληλουχία του μεταφορέα UapA του *A.nidulans* στο χιμαιρικό υπόβαθρο μεταφορέα και με πράσινο τριγωνικό

σχήμα οι θέσεις απαλοιφής στην συνδετική περιοχή των ελίκων $\alpha 13$ με $\alpha 14$ (βλ. 3.2.1.4). Σε μεγέθυνση με κόκκινο και μαύρο χρώμα γραμματοσειράς, αντίστοιχα, και σχήμα στόχου τονίζονται οι θέσεις εισαγωγής των δύο κυστεϊνών (His-257 και Glu-525, η οποία αντιστοιχεί στην Glu-429 της XanQ). Επίσης, σημειώνονται οι τέσσερις εγγενείς κυστεϊνες του τμήματος των 13 πρώτων TM που έχουν αντικατασταθεί με Ser στην Cys-less XanQ (Karatza *et al.*, 2006) η οποία χρησιμοποιείται ως μοριακό υπόβαθρο για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων.



Εικόνα 3.2.19: Επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη και ενεργότητες μεταφοράς ξανθίνης του μεταλλάγματος H257C/E525C στο υπόβαθρο χιμαιρικών μεταφορέων XanQ/UapA.

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP σε κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μ g ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/ xanQ Cys-less-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.2. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη (Quantity One) (βλ. 2.14). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο πειράματα με τυπική απόκλιση <15%. **Γ.** Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ξανθίνης (1 μ M), στους 25 $^{\circ}$ C (βλ. 2.9.1), που έγινε στα παραπάνω κύτταρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.3. Οι τιμές αρχικής ταχύτητας (10-30 sec, μαύρες στήλες) και μέγιστων επιπέδων συσσώρευσης ξανθίνης (1-10 min, λευκές στήλες) εκφράζονται ως % των τιμών της XanQ Cys-less-BAD, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από τρία πειράματα. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 3.2.20: Επίδραση CdCl₂ στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών στις θέσεις His-257 (TM8) και Glu-429/525 (TM14) στο υπόβαθρο του χιμαρικού μεταφορέα (XanQ_{N13C1UapA}Δ⁵⁰⁹⁻⁵¹⁹(NPIG₂)/H257C/E525C) και της περμεάσης XanQ (H257C/E429C).

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, μετά από επώαση με CdCl₂ (10μM-20mM, 10 min, 25 °C), και τα δεδομένα παρουσιάζονται διαγραμματικά, μετά από προσαρμογή στις κατάλληλες εξισώσεις και εξαγωγή των αντίστοιχων τιμών IC₅₀ με χρήση του προγράμματος Prism5, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.12. Οι τιμές αντιστοιχούν σε αρχικές ταχύτητες πρόσληψης Ξανθίνης (από μετρήσεις σε 5-10 sec), ως % των τιμών που μετρήθηκαν απουσία CdCl₂ για κάθε μετάλλαξη. Τα δεδομένα για την περμεάση H257C/E429C είναι από τις Εικόνες 3.2.11 και 3.2.12.

Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.2.1

Έγινε προσπάθεια εντοπισμού σχέσεων εγγύτητας στην περμεάση XanQ, μέσω της ανίχνευσης φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ζευγών κυστεϊνών από δυνητικά σημαντικές θέσεις αμινοξέων σε διαφορετικά TM της πρωτεΐνης, εξετάζοντας κατά πόσον δύο θέσεις καταλοίπων, όπου έχουν εισαχθεί ομάδες κυστεϊνης (Cys), μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας θέσεις δέσμευσης ιόντων καδμίου (II) και οδηγώντας σε αναστολή της ενεργότητας της περμεάσης. Μελετήθηκαν 31 μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών, 29 στο μοριακό υπόβαθρο της Cys-less XanQ και 2 στο υπόβαθρο ενός χιμαιρικού μεταφορέα XanQ/UapA, συνδυάζοντας μεταλλάξεις μονής κυστεϊνης ανάμεσα στις ίδιες ή σε διαφορετικές δομικές περιοχές, σε θέσεις που προβλέπονται να είναι σχετικά κοντά (4-9Å) ή μακριά (20-33Å) στο δομικό μοντέλο με βάση την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA. Από αυτά τα μεταλλάγματα, για τα 15 (που εμφάνιζαν ενεργότητα >50% σε σχέση με την Cys-less XanQ) εξετάστηκε το ενδεχόμενο ανιχνεύσιμης αναστολής της ενεργότητας παρουσία ιόντων καδμίου χρησιμοποιώντας ως δείγματα ελέγχου τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης και βρέθηκαν:

1. Σημαντική αναστολή ενεργότητας παρουσία ιόντων καδμίου ανιχνεύτηκε για τρία μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών: H257C/E429C (TM8-TM14) και sC433/A323C, N430C/V328C (α10-TM14). Ωστόσο, η αναστολή ενεργότητας των sC433/A323C και N430C/V328C συνδέεται με ανάλογη αναστολή ενεργότητας που παρατηρήθηκε και για τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (A323C και N430C).
2. Οι θέσεις Asn-430 και Glu-429 (στην δομική περιοχή «εισόδου», TM14) φαίνεται να αλληλεπιδρούν ενδομοριακά με την His-257 (δομική περιοχή «πυρήνα», TM8), αν και οι θέσεις αυτές απέχουν αρκετά στην τριτοταγή δομή (περίπου 20Å στην διαμόρφωση που υποδεικνύει το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της UraA), όπως υποστηρίζεται από την ευαισθησία σε αναστολή από ιόντα καδμίου που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα H257C/E429C (σε σχέση με τα H257C και E429C) και H257A/N430C (σε σχέση με το N430C). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι δύο θέσεις (257 και 429/430) προσεγγίζουν μεταξύ τους στο χώρο σε κάποια ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η πρωτεΐνη XanQ κατά τον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς της ξανθίνης (βλ. και 3.2.2).
3. Το μετάλλαγμα H257A/N430C εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία σε αναστολή ενεργότητας από το κάδμιο σε σχέση με το μετάλλαγμα μονής κυστεϊνης (N430C), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ευαισθησία που εμφανίζει από μόνο του το N430C οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε ενδομοριακή αλληλεπίδραση με την His-257.

4. Η παρατηρούμενη αναστολή ενεργότητας των H257C/E429C και H257A/N430C παρουσία των ιόντων καδμίου και, μάλιστα, σε μικρές συγκεντρώσεις CdCl₂ (IC₅₀ 86 και 52 μM, αντίστοιχα), υποδηλώνει ότι η πρόσδεση του καδμίου μεταξύ αυτών των θέσεων εμποδίζει την εναλλαγή διαμορφώσεων της XanQ που χρειάζεται στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης.

5. Η αναστολή ενεργότητας που παρατηρείται ως συνέπεια της πρόσδεσης καδμίου μεταξύ των θέσεων His-257 (TM8) και Glu-429 (TM14) διατηρείται σε μεγάλο βαθμό (αν και με μικρότερη ευαισθησία, IC₅₀ 235 μM έναντι 86 μM) και στο μοριακό υπόβαθρο ενός χημειοκινητικού μεταφορέα XanQ/UapA, στον οποίο το TM14 έχει αντικατασταθεί με την αντίστοιχη αλληλουχία του ομολόγου UapA, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των TM8 και TM14 αποτελεί σημαντική συνιστώσα στον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού της οικογένειας NCS2 που έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη.

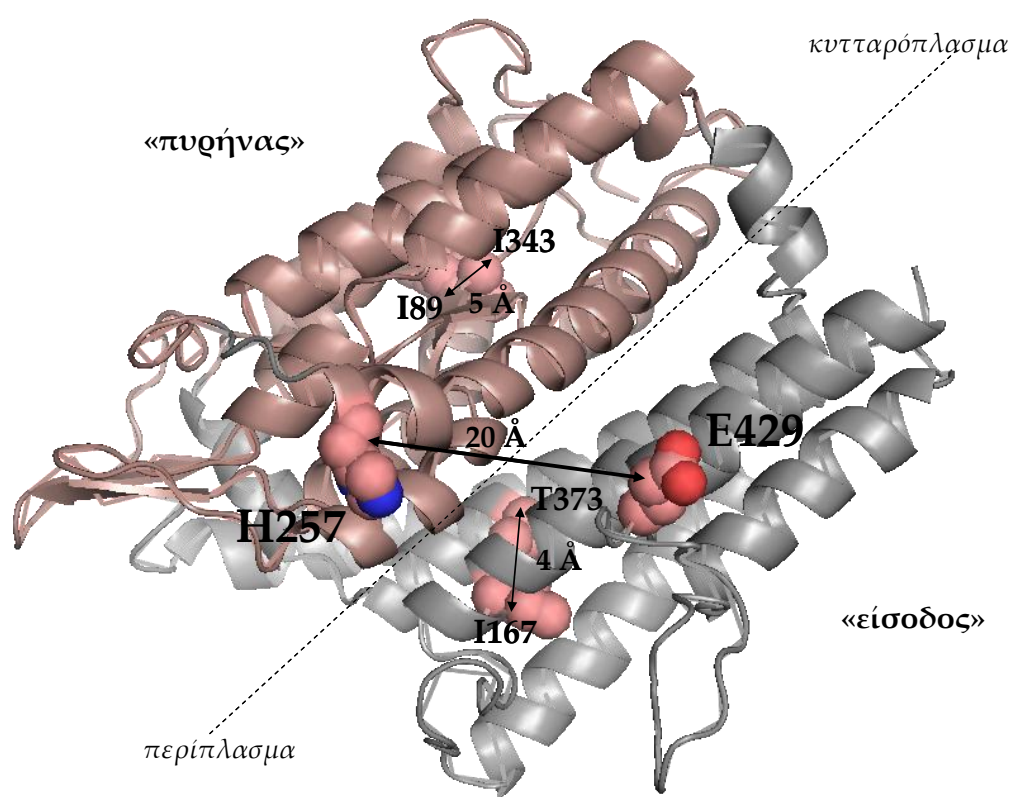
3.2.2 Εντοπισμός πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών θέσεων αμινοξέων της XanQ με λειτουργικά πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης

Η ανίχνευση σχέσεων εγγύτητας στην περμεάση XanQ εξετάστηκε, σε δεύτερη προσέγγιση, με μια πειραματική μεθοδολογία που χρησιμοποιεί «διλειτουργικά» αντιδραστήρια σταυρωτής σύνδεσης (cross linking) με δύο ομάδες μεθανοθειοσουλφονικού (MTS, MethaneThioSulfonate) που μπορούν να αντιδρούν με τις θειολικές ομάδες (SH) κυστεϊνών (Guan *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Χρησιμοποιώντας τέτοιου τύπου αντιδραστήρια (MTS-linker-MTS) που περιέχουν ενδιάμεσες υδρογονανθρακικές αλυσίδες (linkers) διαφορετικών μεγεθών και γεωμετρίας (βλ. 2.2) προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζευγών κυστεϊνών από διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα της περμεάσης XanQ είτε με λειτουργικά πειράματα (μετρώντας την επίπτωση της διασύνδεσης των ζευγών κυστεϊνών στην ενεργότητα) είτε με πειράματα δομικού ελέγχου (εξετάζοντας, μέσω ανοσοαποτύπωσης, την επίπτωση της διασύνδεσης των ζευγών κυστεϊνών στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο που προκύπτει από ελεγχόμενη πρωτεόλυση του μορίου). Για τα πειράματα δομικού ελέγχου, χρειάζεται προετοιμασία του μορίου της περμεάσης με γενετική τροποποίηση *in vitro* ώστε να εισαχθούν ή να αφαιρεθούν, ανάλογα, στην αλληλουχία δυνητικές θέσεις πρωτεόλυσης. Η προετοιμασία αυτή κατέληξε σε πολλές περιπτώσεις, όπως παρουσιάζεται παρακάτω, σε παραλλαγές της XanQ με χαμηλά επίπεδα στη μεμβράνη και/ή μικρή ενεργότητα που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακό υπόβαθρο για τα εν λόγω πειράματα.

Ως προς τα αντιδραστήρια σταυρωτής σύνδεσης, χρησιμοποιήθηκαν έξι αντιδραστήρια MTS-linker-MTS (MTS-3-MTS, MTS-6-MTS, MTS-8-O2-MTS, MTS-11-O3-MTS, MTS-14-O4-MTS, MTS-17-O5-MTS) (βλ. 2.2). Σύμφωνα με την σχετική βιβλιογραφία (Loo and Clarke, 2001; Zhou *et al.*, 2008) τα παραπάνω MTS-linker-MTS (μήκους ~5, 9, 11, 15, 17 και 22 Å αντίστοιχα) μπορούν να λάβουν ευέλικτες διαμορφώσεις και να καθορίσουν ένα κατώτερο και ένα ανώτερο όριο απόστασης ανάμεσα στις δύο θέσεις κυστεϊνών που διασυνδέονται με αυτά (MTS-3-MTS: 3-6Å, MTS-6-MTS: 5-10Å, MTS-14-O4-MTS: 3-19Å, MTS-17-O5-MTS: 3-22Å). Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων λειτουργικής επίδρασης που παρουσιάζονται αμέσως μετά.

Ως προς τη δοκιμασία λειτουργικού ελέγχου της επίδρασης των MTS-linker-MTS σε μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών, η δοκιμασία εφαρμόστηκε: (α) στο μετάλλαγμα H257C/E429C, για το οποίο έχει ήδη υποδειχθεί ότι οι δύο θέσεις, His-257 (TM 8, δομική περιοχή «πυρήνα») και Glu-429 (TM 14, δομική

περιοχή «εισόδου»), αλληλεπιδρούν μέσω σχηματισμού θέσης συντονισμού για δισθενή ιόντα καδμίου κατά τον μηχανισμό λειτουργίας της XanQ (βλ. 3.2.1.2 και 3.2.1.3), (β) στα μεταλλάγματα I89C/I343C (α 3-TM11, δομική περιοχή «πυρήνας») και I167C/T373C (TM5-TM12, δομική περιοχή «εισόδου»), στα οποία τα αντίστοιχα ζεύγη κυστεϊνών φαίνεται να βρίσκονται πολύ κοντά στην τριτοταγή δομή (στη διαμόρφωση που φαίνεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο, Εικόνα 3.2.21) αν και δεν εμφανίζουν ευαισθησία σε απενεργοποίηση από τα δισθενή ιόντα καδμίου (βλ. 3.2.1.2, συνδυασμός III). Για τα τρία παραπάνω μεταλλάγματα εφαρμόστηκε η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H]ξανθίνης (1 μ M) μετά από επώαση με κάθε ένα από τα έξι αντιδραστήρια MTS-linker-MTS παρουσία ξανθίνης (1mM) (βλ. 2.9.5).



Εικόνα 3.2.21: Απεικόνιση των σχετικών θέσεων των Ile-89 (TM3), Ile-343 (TM11), Ile-167 (TM5), Thr-373 (TM12), His-257 (TM8) και Glu-429 (TM14) στο δομικό μοντέλο της XanQ που στηρίζεται στην κρυσταλλική δομή της ομόλογης περμεάσης UraA

Η αλληλουχία της XanQ προσαρμόστηκε στο πρότυπο της κρυσταλλικής δομής της περμεάσης ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SWISS-MODEL και κατασκευάστηκε το παραπάνω δομικό μοντέλο, το οποίο απεικονίζεται με το πρόγραμμα PyMOL v1.4. Σημειώνονται τα κατάλοιπα αμινοξέων που ανά ζεύγη αντικαταστάθηκαν με κυστεΐνες (μαύρα βέλη) για να προκύψουν τα διπλά μεταλλάγματα που μελετήθηκαν με πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης για τον εντοπισμό πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών θέσεων της XanQ (βλ. κείμενο).

3.2.2.1 Λειτουργική επίδραση αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στην ενεργότητα μεταλλαγμάτων της XanQ με ζεύγη κυστεϊνών μεταξύ των θέσεων His-247-Glu-429 (TM8-TM14), Ile-89-Ile-343 (TM3-TM11) ή Ile-167-Thr-373 (TM5-TM12)

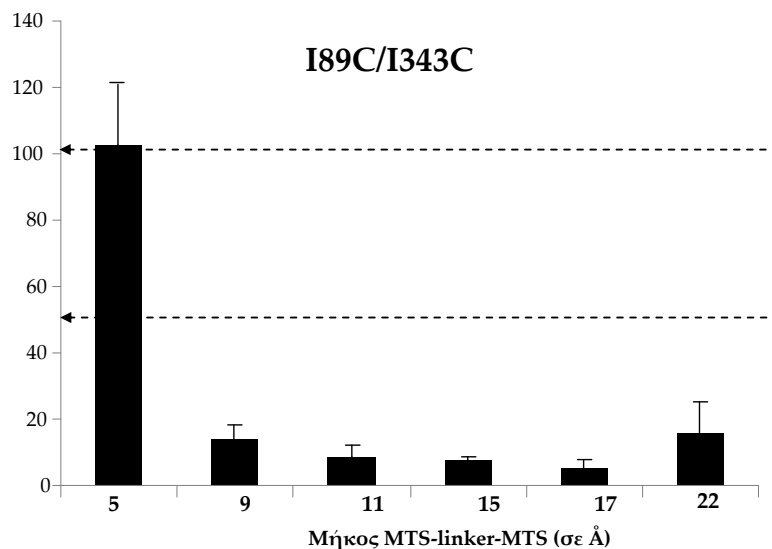
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ελέγχου της λειτουργικής επίδρασης των αντιδραστηρίων MTS-3-MTS, MTS-6-MTS, MTS-8-O2-MTS, MTS-11-O3-MTS, MTS-14-O4-MTS και MTS-17-O5-MTS για το μετάλλαγμα H257C/E429C (Εικόνα 3.2.22A) εμφανίζουν σταδιακή πτώση στην ενεργότητα (αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης) όταν το μήκος του αντιδραστηρίου διασύνδεσης αυξάνεται από 5Å (ενεργότητα 70% σε σχέση με αυτήν του ατροποποιημένου μεταλλάγματος), σε 9Å (ενεργότητα 52%), σε 11Å (ενεργότητα 36%) και σε 15Å (ενεργότητα 24%), αλλά επάνοδο σε πολύ υψηλές τιμές όταν το μήκος του αντιδραστηρίου διασύνδεσης γίνεται 17Å (ενεργότητα 128%) ή 22Å (ενεργότητα 81%). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι κυστεΐνες στις θέσεις Glu-429 (TM14, δομική περιοχή «εισόδου») και His-257 (TM8, δομική περιοχή «πυρήνα») είναι προσβάσιμες για τα μικρότερα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS ($\leq 15\text{\AA}$) και διασυνδέονται από αυτά οδηγώντας σε περιορισμό των σχετικών κινήσεων που μπορούν να κάνουν αυτές οι θέσεις κατά τις αλλαγές διαμόρφωσης της περμεάσης, γεγονός που προκαλεί πτώση της ενεργότητας στον μηχανισμό λειτουργίας, ενώ μπορεί να μην είναι προσβάσιμες για τα μεγαλύτερα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS (17-22Å), αφού στις περιπτώσεις αυτές δεν έχουμε σοβαρή πτώση της ενεργότητας, ή μπορεί τα μεγαλύτερα αντιδραστήρια να διασυνδέονται μεταξύ των κυστεϊνών αλλά να επιτρέπουν τις απαραίτητες κινήσεις που είναι συμβατές με τις αλλαγές διαμόρφωσης της λειτουργικής περμεάσης. Αν δεχτούμε ότι όλα τα αντιδραστήρια έχουν πρόσβαση και διασυνδέονται, προκύπτει ότι για να μπορέσει να λειτουργήσει με βέλτιστο τρόπο ο μηχανισμός ενεργού μεταφοράς οι δύο αυτές θέσεις της XanQ (που απέχουν περίπου $\sim 20\text{\AA}$ στην διαμόρφωση του μορίου στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο) θα πρέπει να βρεθούν σε μέγιστη απόσταση των 19-22 Å (ανώτερο όριο μήκους των MTS-14-O4-MTS και MTS-17-O5-MTS, αντίστοιχα) και ταυτόχρονα να μπορούν να πλησιάσουν μέχρι την ελάχιστη απόσταση των 3Å (κατώτερο όριο μήκους των MTS-14-O4-MTS και MTS-17-O5-MTS). Το ότι πράγματι τα αντιδραστήρια MTS-14-O4-MTS και MTS-17-O5-MTS διασυνδέονται μεταξύ των θέσεων H257C και E429C υποστηρίζεται, όπως θα δούμε παρακάτω, τόσο από την παρεμπόδιση της ανασταλτικής δράσης των ιόντων καδμίου (3.2.2.2) όσο και από την μερική προστασία έναντι της πρωτεολυτικής δράσης της θρυψίνης (3.2.2.3.3). Με διασύνδεση μικρότερου μήκους αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS (9, 11, 15 Å) δεν είναι εφικτή η ιδανική απομάκρυνση (μέχρι 19-22 Å) των δύο θέσεων E429C (TM14) με H257C (TM8) κατά την διάρκεια των διαμορφωτικών αλλαγών ενός λειτουργικού μεταφορέα, γεγονός που θα εξηγούσε την μερική

αναστολή ενεργότητας (Εικόνα 3.2.22Α). Από πειράματα τόσο παρεμπόδισης της ανασταλτικής δράσης των ιόντων καδμίου (3.2.2.2) όσο και αλλαγής του προτύπου πρωτεολυτικής δράσης της θρυψίνης (3.2.2.3.3) προκύπτει, όπως θα δούμε παρακάτω, ότι τα αντιδραστήρια MTS-8-O2-MTS και MTS-11-O3-MTS διασυνδέονται μεταξύ των θέσεων H257C και E429C, ενώ τα MTS-3-MTS και MTS-6-MTS είναι πιθανό να μη διασυνδέονται. Η τελευταία παρατήρηση θα μπορούσε να εξηγήσει τη διατήρηση σημαντικής ενεργότητας της περμεάσης H257C/E429C μετά την προεπώαση με τα αντιδραστήρια μικρού μήκους MTS-3-MTS (3-6Å) και MTS-6-MTS (5-10Å), 70% και 52%, αντίστοιχα, ενώ η σχετικά μικρή μείωση της ενεργότητας μπορεί να αποδοθεί σε πιθανή ανεξάρτητη σύνδεση του αντιδραστήριου διασύνδεσης σε μία από τις δύο ομάδες κυστεϊνών (ή και στις δύο), εφόσον οι αντίστοιχες θέσεις έχει φανεί ότι είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο περιβάλλον (βλ. 3.1.1 και 3.2.1) και ότι η ενεργότητα του E429C επηρεάζεται σημαντικά από το MTSES⁻ (Εικόνα 3.1.7), ένα MTS-αντιδραστήριο παρόμοιου μεγέθους με το MTS-3-MTS.

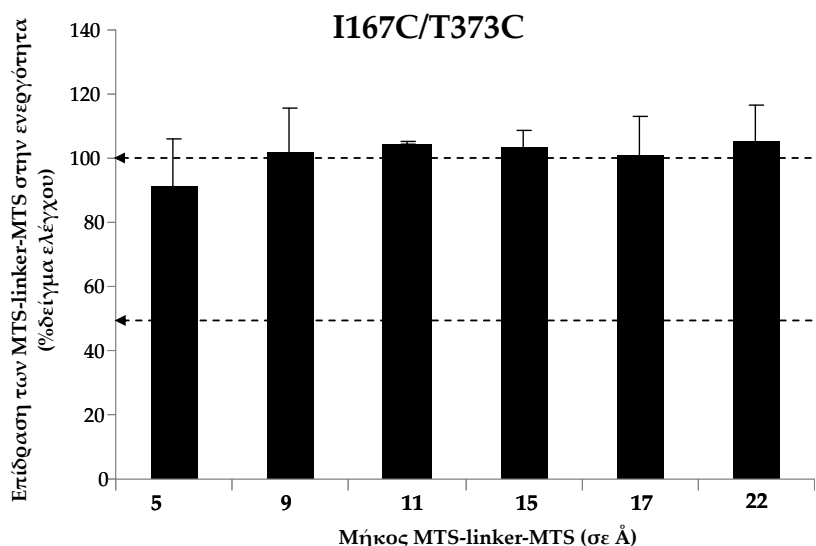
Ως προς την λειτουργική επίδραση των αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στο μετάλλαγμα **I89C/I343C** (Εικόνα 3.2.22B), τα πέντε από τα έξι αντιδραστήρια (μήκους 9, 11, 15, 17 και 22 Å) οδηγούν σε πλήρη σχεδόν απενεργοποίηση της περμεάσης (5-15% των δειγμάτων χωρίς προεπώαση), υποδεικνύοντας καθαρά ότι διασυνδέουν τις κυστεΐνες στις θέσεις Pe-89 (α3, δομική περιοχή «πυρήνα») και Pe-343 (TM11, δομική περιοχή «πυρήνα») και ότι αυτή η διασύνδεση οδηγεί σε παρεμπόδιση των αλλαγών διαμόρφωσης στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει τα ευρήματα για τη σημασία του μοτίβου αλληλουχίας στην κυτταροπλασματική πλευρά του TM3 (βλ. 3.1.2 και 3.1.3). Αντίθετα, το μικρότερο αντιδραστήριο MTS-3-MTS μήκους 5Å δεν επηρεάζει καθόλου την ενεργότητα της περμεάσης I89C/I343C (103% του δείγματος χωρίς προεπώαση), είτε γιατί μπορεί να μην έχει πρόσβαση στις θέσεις αυτές, είτε γιατί μπορεί να συνδέεται μεταξύ των δύο κυστεϊνών αλλά η σχετικά περιορισμένη ευελιξία του (3-6Å) μπορεί να είναι συμβατή με την ενεργότητα γιατί οι δύο θέσεις (απέχουν 5Å στη διαμόρφωση που εμφανίζεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο) δεν απομακρύνονται περισσότερο μεταξύ τους κατά τον μηχανισμό λειτουργίας. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι οποιαδήποτε πιθανή απομάκρυνση των δύο θέσεων σε απόσταση $\geq 6\text{\AA}$ (που επιβάλλεται από τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS μεγαλύτερου μήκους) καταστρέφει την ενδομοριακή αυτή αλληλεπίδραση απενεργοποιώντας τον μεταφορέα.

Ως προς την λειτουργική επίδραση των αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στο μετάλλαγμα **I167C/T373C** (Εικόνα 3.2.22Γ), η ενεργότητα της περμεάσης αυτής δεν επηρεάζεται από κανένα από τα έξι αντιδραστήρια και

έχει τιμές που κυμαίνονται στα επίπεδα του δείγματος ελέγχου (91-105% των δειγμάτων χωρίς προεπάωση). Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι οι θέσεις Ile-167 (TM5, δομική περιοχή «εισόδου») και Thr-373 (TM12, δομική περιοχή «εισόδου») δεν είναι προσβάσιμες από τα αντιδραστήρια σταυρωτής σύνδεσης ενώ μία δεύτερη ερμηνεία θα ήταν ότι γίνεται διασύνδεση αλλά δεν επηρεάζονται οι αλλαγές διαμόρφωσης που είναι σημαντικές για τον μηχανισμό. Ωστόσο, τα δεδομένα μας για τη σημασία των περιοχών των μοτίβων αλληλουχίας των TM5 και TM12 (βλ. 3.1.3) καθώς και η εγγύτητα των δύο θέσεων τόσο μεταξύ τους όσο και με την περιοχή του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος με βάση το κρυσταλλογραφικό μοντέλο (βλ. Lu *et al.*, 2011) συγκλίνουν υπέρ της πρώτης ερμηνείας (μη προσβασιμότητα). Επίσης, η ενεργότητα του I167C/T373C δεν αναστέλλεται από τα δισθενή ιόντα καδμίου (3.2.1.2).



Γ

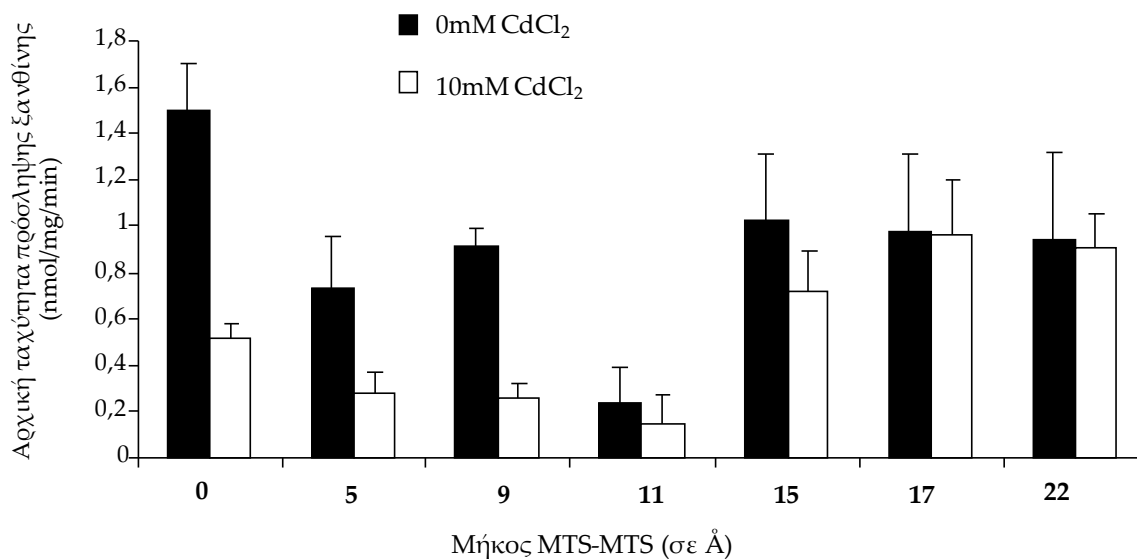


Εικόνα 3.2.22: Επίδραση αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων H257C/E429C, I89C/I343C και I167C/T373C της περμεάσης XanQ.

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ (double-Cys)-BAD που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, μετά από προ-επώαση με διλειτουργικά αντιδραστήρια σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) μήκους 5, 9, 11, 15, 17 και 22 Å (0,2 mM, 10 min, 25 °C). Οι προεπώσεις έγιναν παρουσία ξανθίνης (1mM). Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης ως % δείγματος απουσία του αντιδραστηρίου (όπως μετρήθηκαν σε χρόνους 5 ,10 και 20 sec) με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα.

3.2.2.2 Έλεγχος της προσβασιμότητας των θέσεων His-257 και Glu-429 της XanQ στα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS μέσω δοκιμασίας παρεμπόδισης της επίδρασης ιόντων καδμίου (II) στην ενεργότητα του H257C/E429C (TM8-TM14)

Εκμεταλλευόμενοι το προηγούμενο αποτέλεσμα της διατριβής αυτής ότι οι δύο κυστεΐνες στις θέσεις 257 και 429 του H257C/E429C σχηματίζουν κέντρο συντονισμού για δισθενή ιόντα καδμίου τα οποία αναστέλλουν κατά 50% την ενεργότητα του H257C/E429C (βλ. 3.2.1.2) εξετάσαμε κατά πόσον η προεπάωση με τα αντιδραστήρια σταυρωτής σύνδεσης (MTS-linker-MTS) μπορεί να επηρεάσει το φαινόμενο της αναστολής του H257C/E429C από τα ιόντα καδμίου, ώστε να έχουμε μία σαφέστερη ένδειξη αν οι δύο αυτές θέσεις είναι προσβάσιμες και διασυνδέονται από τα MTS-linker-MTS. Συγκεκριμένα, μετά την επάωση των κυττάρων με τα έξι αντιδραστήρια MTS-linker-MTS και την απομάκρυνση της περίσσειας αντιδραστηρίων και ξανθίνης έγινε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης παρουσία ή απουσία ιόντων καδμίου (II) σε συγκέντρωση 10 mM (βλ. 2.9.9). Σκοπός του συνδυαστικού αυτού πειράματος ήταν να αποδειχτεί έμμεσα ότι οι δύο θέσεις διασυνδέονται ή όχι με κάποιο αντιδραστήριο MTS-linker-MTS από το αν η προεπάωση εμποδίζει την πρόσβαση των ιόντων καδμίου (II) στο ζεύγος κυστεϊνών, δεν δημιουργείται εκεί κέντρο συντονισμού και συνεπώς δεν ανιχνεύεται η αναμενόμενη αναστολή ενεργότητας του H257C/E429C. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.2.23) αποκάλυψαν ότι: (α) Η αναμενόμενη πτώση της ενεργότητας του μεταλλάγματος H257C/E429C παρουσία ιόντων καδμίου (II) (μείωση ενεργότητας κατά 66% στο δείγμα ελέγχου το οποίο δεν προεπάστηκε με κάποιο αντιδραστήριο) διατηρείται όταν το πείραμα γίνεται μετά από προεπάωση με MTS-3-MTS (5 Å) ή MTS-6-MTS (9 Å) (μείωση ενεργότητας κατά 62% ή 72%, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι αυτά τα σχετικά μικρού μήκους αντιδραστήρια ($\leq 9\text{\AA}$) δεν διασυνδέονται μεταξύ των δύο κυστεϊνών 257-429 (TM8-TM14), (β) Η αναμενόμενη πτώση της ενεργότητας (κατά 66%) περιορίζεται σημαντικά όταν το πείραμα γίνεται μετά από προεπάωση με MTS-8-O2-MTS (11 Å) ή MTS-11-O3-MTS (15 Å) (μείωση ενεργότητας κατά 36% ή 30%, αντίστοιχα, $p > 0.05$) και δεν ανιχνεύεται καθόλου όταν γίνεται προεπάωση με MTS-14-O4-MTS (17 Å) ή MTS-17-O5-MTS (22 Å) (98%, 95% του δείγματος απουσία CdCl₂ αντίστοιχα, $p > 0.05$), γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη σταυρωτής αλληλοσύνδεσης των Cys-257 και Cys-429 (TM8-TM14) με αυτά τα μεγαλύτερα αντιδραστήρια ($\geq 11\text{\AA}$).



Εικόνα 3.2.23: Επίδραση της προεπάσης με αντιδραστήρια MTS-linker-MTS στην αναστολή της ενεργότητας του μεταλλάγματος H257C/E429C της XanQ παρουσία ιόντων καδμίου (II)

Κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την περμεάση H257C/E429C από πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες αντικαταστάσεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM), στους 25 °C, απουσία ή παρουσία CdCl₂ (10 mM, 10 min, 25 °C), μετά από προεπάση με διλειτουργικά αντιδραστήρια σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) μήκους 5, 9, 11, 15, 17 και 22 Å (0,2 mM, 10 min, 25 °C). Οι προεπάσεις έγιναν παρουσία ξανθίνης (1mM). Μετά την προεπάση, ακολούθησε απομάκρυνση της περίσσειας αντιδραστηρίου και ξανθίνης μέσω σειράς διαδοχικών εκπλύσεων. Παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης [³H]ξανθίνης σε nmol/mg min⁻¹ (όπως μετρήθηκαν σε 5 και 10 sec) απουσία (μαύρες στήλες) και παρουσία CdCl₂ (άσπρες στήλες) με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από τρία πειράματα. Η στατιστική ανάλυση [t test (paired samples), IBM SPSS Statistics 20] που έγινε για κάθε αντιδραστήριο δίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά για τους μέσους όρους των τιμών των 0μM και 10 mM ($p > \alpha$, $\alpha = 0.05$) για τα αντιδραστήρια των 11 Å ($p = 0.189$), 15 Å ($p = 0.153$), 17 Å ($p = 0.845$) και 22 Å ($p = 0.142$).

3.2.2.3 Χαρτογράφηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών θέσεων της XanQ με πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross-linking)

Η συστηματική εφαρμογή πειραμάτων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross-linking) μεταξύ ζευγών κυστεϊνών τοποθετημένων σε διαφορετικές θέσεις της αλληλουχίας θα μπορούσε να δώσει μια πρώτη σαφή εικόνα της διευθέτησης των διαμεμβρανικών α -ελίκων στην τριτοταγή δομή της XanQ, σε χαμηλή βέβαια ευκρίνεια ανάλυσης, ακόμη και χωρίς να χρειασθεί να «προστρέξουμε» σε μια πιθανή λυμένη κρυσταλλική δομή, όπως έχει αποδειχθεί σε άλλες περιπτώσεις μεταφορέων (Sorgen *et al.*, 2002, βλ. 1.5). Σε κάθε περίπτωση, ο έλεγχος του βαθμού διασύνδεσης των ζευγών κυστεϊνών μέσω κατάλληλων διλειτουργικών αντιδραστηρίων διαφορετικού μήκους και ευκαμψίας (Zhou *et al.*, 2008), όπως αυτών που χρησιμοποιήθηκαν και στα λειτουργικά πειράματα (MTS-linker-MTS, βλ. 3.2.2), βασίζεται στον βαθμό προστασίας του μορίου της περμεάσης έναντι πρωτεόλυσης σε συγκεκριμένες θέσεις (ενδιάμεσες στην αλληλουχία μεταξύ των θέσεων των δύο κυστεϊνών), όπως μπορεί να διαπιστωθεί με ηλεκτροφορητική ανάλυση. Για την εφαρμογή τέτοιων αναλύσεων πειραμάτων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης κυστεϊνών (Cys-Cys cross-linking) σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις κυρίως μέθοδοι στη βιβλιογραφία (βλ. 1.5):

(α) η χημική πρωτεόλυση σε θέσεις Met-x με βρωμιούχο κυάνιο (Weinglass *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2009),

(β) η ενζυμική πρωτεόλυση σε (εισαχθείσες) θέσεις IEGR-x με την ειδική πρωτεάση Χα [παράγοντα ενεργοποίησης της θρομβίνης στον μηχανισμό της πήξης του αίματος] (Sahin-Toth *et al.*, 1995; Sun and Kaback, 1997),

(γ) ο έλεγχος ετεροδιμερισμού δύο ανεξάρτητων πολυπεπτιδίων που αντιστοιχούν σε τμήματα του μορίου της περμεάσης και περιέχουν από μία θέση Cys, σε περιπτώσεις όπου η περμεάση μπορεί να εκφρασθεί σε δύο ανεξάρτητα τμήματα που αλληλοσυμπληρώνονται λειτουργικά (Bibi and Kaback, 1990; Wu and Kaback, 1996).

Η εφαρμογή καθεμιάς από τις παραπάνω μεθόδους απαιτεί συγκεκριμένη γενετική τροποποίηση του μοριακού υποβάθρου της περμεάσης στην οποία εφαρμόζεται. Την κατάλληλη τροποποίηση της περμεάσης ακολουθεί η δράση μιας σειράς αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης που ποικίλλουν ως προς το μήκος, τον όγκο ή την ευκαμψία (Zhou *et al.*, 2008), για να εκτιμηθεί η εγγύτητα και η ευελιξία κινήσεων μεταξύ δομικών περιοχών του μορίου της περμεάσης σε κάθε περίπτωση διαμόρφωσης του.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι, εκτός από τις παραπάνω μεθόδους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο κλασικότερος τρόπος της πέψης με θρυψίνη (1.5.2.4) ή με άλλη σερινοπρωτεάση σχετικά ευρείας εξειδίκευσης (π.χ. η θρυψίνη διασπά σε θέσεις Lys-x ή Arg-x) (Goldkorn *et al.*, 1983), ο οποίος δεν απαιτεί προκαταρκτική γενετική τροποποίηση του μορίου της περμεάσης, αλλά η εφαρμογή του είναι περιορισμένη λόγω της σχετικά μικρής εξειδίκευσης της θέσης πρωτεόλυσης και της παρουσίας αρκετών αντίστοιχων θέσεων στα υπό μελέτη μόρια (βλ. παρακάτω, 3.2.2.3.3).

Από τις πιθανές μεθόδους που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν για την περίπτωση της περμεάσης XanQ, η μέθοδος του ελέγχου ετεροδιμερισμού δύο ανεξάρτητων πολυπεπτιδίων (Bibi and Kaback, 1990) απαιτεί τροποποίηση του μορίου της XanQ (βλ. 1.5) σε δύο ανεξάρτητες κωδικοποιούσες περιοχές (splits). Ωστόσο, η αξιολόγηση των δομικών δεδομένων που προέκυψαν, μετά την έναρξη της παρούσας διατριβής, με βάση την κρυσταλλική δομή του ομόλογου μεταφορέα ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011) αποκάλυψε ότι η XanQ ανήκει σε μια οικογένεια περμεασών που αποτελούνται από δύο διαφορετικές δομικές περιοχές (TM1-4/8-11 και TM5-7/12-14) ασυνεχείς στην αλληλουχία (οικογένεια NCS2, υπεροικογένεια APC, Västermark and Saier, 2014) και δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των μεταφορέων οι οποίοι συγκροτούνται από δύο συνεχείς δομικές περιοχές (N6 και C6) και μπορούν να εκφραστούν λειτουργικά ως διακοπτόμενες (split) περμεάσες (υπεροικογένεια MFS, Reddy *et al.*, 2012). Ως εκ τούτου, η μέθοδος αυτή δεν δοκιμάστηκε καθόλου για την περίπτωση της περμεάσης XanQ. Η δυνατότητα εφαρμογής των άλλων πιθανών μεθοδολογιών (διασύνδεση κυστεϊνών σε συνδυασμό με χημική πρωτεόλυση από CNBr ή ενζυμική πρωτεόλυση από πρωτεάση Χα ή από θρυψίνη) δοκιμάστηκε σε δύο στάδια, όπως περιγράφεται στη συνέχεια:

Στάδιο 1: κατασκευή και έλεγχος των κατάλληλων μοριακών παραλλαγών της XanQ που είναι απαραίτητες για την εφαρμογή της μεθόδου,

Στάδιο 2: εφαρμογή της μεθόδου για την δοκιμασία διασύνδεσης ζευγών Cys, εφόσον το μοριακό υπόβαθρο επέτρεπε κάτι τέτοιο.

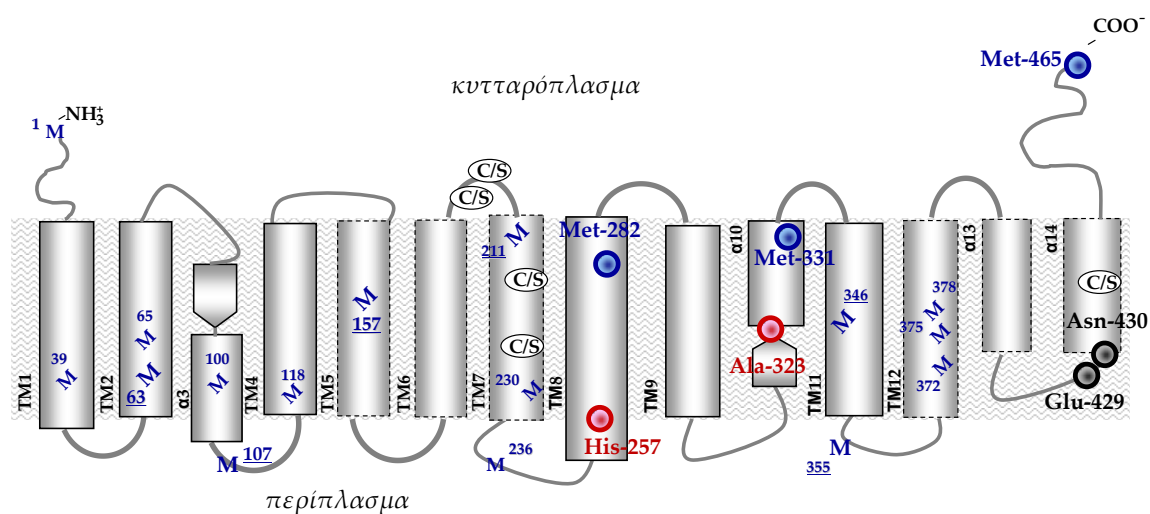
3.2.2.3.1 Προετοιμασία του μοριακού υποβάθρου της XanQ για πειράματα σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross-linking)

Ανάλογα με την μέθοδο που θα μπορούσε να εφαρμοστεί, απαιτείται διαφορετική προετοιμασία του μοριακού υποβάθρου της περμεάσης, όπως αναλύεται στη συνέχεια. Οι αντίστοιχες κατασκευές (παραλλαγές της XanQ με περιορισμό των εγγενών Met ή με εισαγωγή αλληλουχιών αναγνώρισης του παράγοντα Χα) έγιναν τόσο στο υπόβαθρο της ελεύθερης κυστεϊνών περμεάσης (Cys-less XanQ) όσο και στο υπόβαθρο περμεασών που περιέχουν ζεύγη κυστεϊνών σε συγκεκριμένες θέσεις της XanQ για τις οποίες είτε είχε φανεί από τις προηγούμενες μελέτες ότι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (H257C/E429C [3.2.1.2-4, 3.2.2.1-2], H257C/N430C [3.2.1.3], I89C/I343C [3.2.2.1]) είτε δεν υπήρχαν ενδείξεις για πιθανή αλληλεπίδραση (I167C/T373C [3.2.2.1], A323C/E429C, A323C/N430C [3.2.1.2-3], A102C/E429C, A102C/N430C). Τα ζεύγη κυστεϊνών επιλέχθηκαν ώστε να καλύπτουν τόσο συνδυασμούς θέσεων μεταξύ δομικής περιοχής «πυρήνα» και δομικής περιοχής «εισόδου» (α3-TM14, TM8-TM14) όσο και συνδυασμούς θέσεων στην ίδια δομική περιοχή (TM3-TM11, TM5-TM12) (βλ. 3.2.1.1), ανάλογα με την περίπτωση (βλ. παρακάτω, Εικόνες 3.2.24, 3.2.29 και 3.2.32).

Περιορισμός των εγγενών καταλοίπων Met στην XanQ μέσω *in vitro* μεταλλαξιγένεσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιεί χημική πρωτεόλυση της περμεάσης με βρωμιούχο κυάνιο (CNBr) ως τρόπο ελέγχου της δράσης των αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) (βλ. 2.11 και 3.2.2.3) απαιτεί τροποποίηση της περμεάσης XanQ ώστε να περιορισθεί ο αριθμός των εγγενών καταλοίπων Met, που αποτελούν θέσεις-στόχους (Met-x) της ειδικής πρωτεόλυσης από CNBr (Weinglass *et al.*, 2003). Το μόριο της περμεάσης XanQ (Εικόνα 3.2.20) έχει δεκαεννέα (19) εσωτερικά κωδικόνια μεθειονίνης (ATG). Σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό μας η αντικατάσταση μέσω μεταλλαξιγένεσης τριών (3) μόνον εγγενών μεθειονινών (Met-282, Met-331, Met-465) θα επέτρεπε την κατασκευή μεταλλαγμάτων XanQ όπου μπορούν να εφαρμοσθούν πειράματα cross-linking με την μέθοδο του CNBr για ζεύγη κυστεϊνών μεταξύ θέσεων του TM8 (His-257) ή του TM10 (Ala-323) και του TM14 (Glu-429/Asn-430) (βλ. Εικόνα 3.2.24). Αν και απαιτείται πολλαπλή μεταλλαξιγένεση μεθειονινών στο υπόβαθρο της XanQ, τα πλεονεκτήματα μιας τέτοιας προσέγγισης θα ήταν σημαντικά σε σχέση με την μέθοδο της εισαγωγής θέσεων για πρωτεόλυση από Χα (βλ. 3.2.2.3), καθώς επιτρέπεται η

ελαχιστοποίηση της δομικής τροποποίησης του μορίου (πρβλ. Εικόνες 3.2.27-28 με Εικόνα 3.2.30) και η αποφυγή της ενζυμικής αντίδρασης πρωτεόλυσης.



Εικόνα 3.2.24: Απεικόνιση των θέσεων των εγγενών μεθειονινών και των θέσεων εισαγωγής ζευγών κυστεϊνών στο πιθανό τοπολογικό μοντέλο της XanQ.

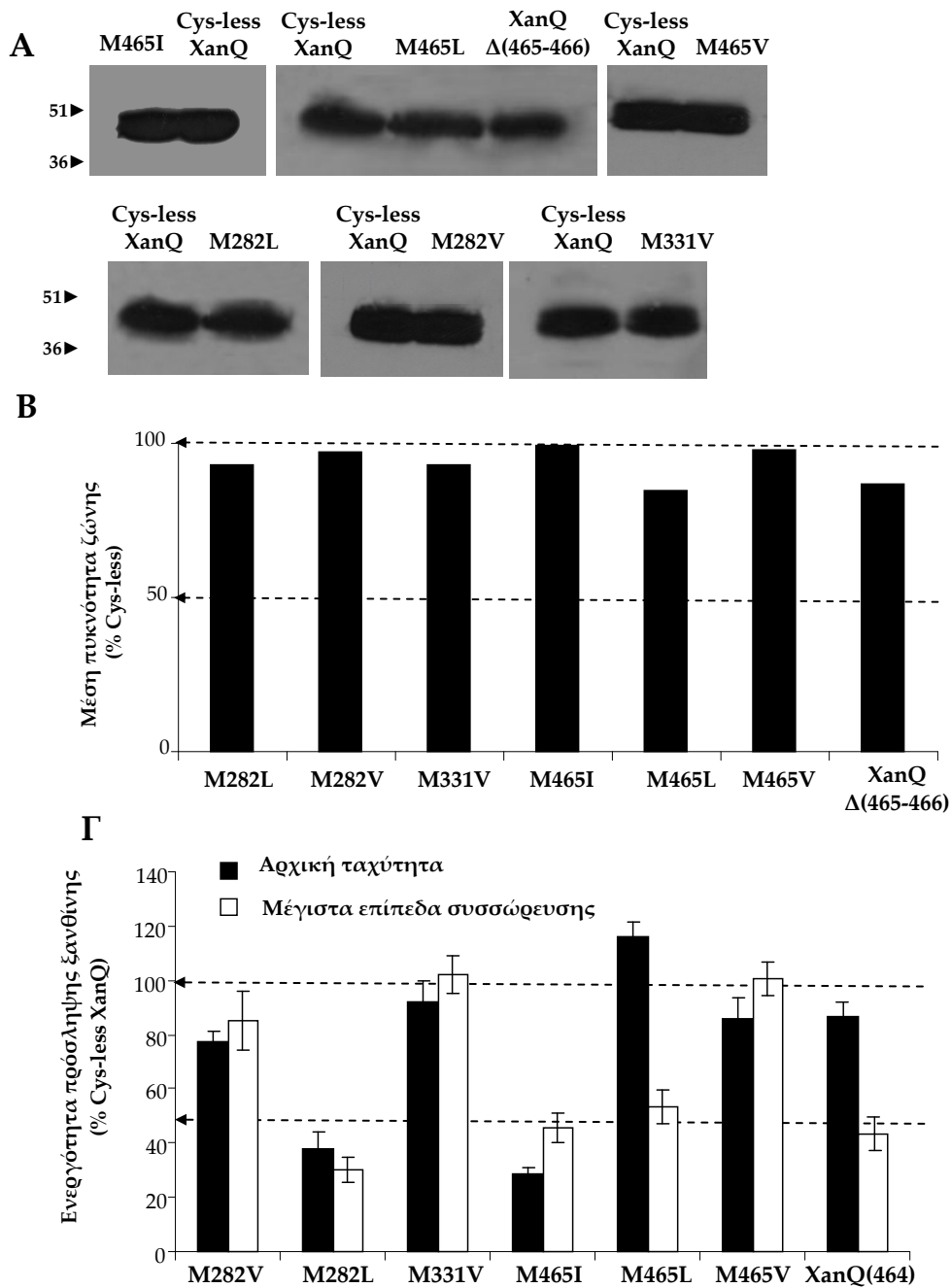
Το μοντέλο στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011), σε *in silico* τοπολογικές προβλέψεις για την XanQ (Π2.1α) και σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας (Γ. Μερμελέκας, Διδακτορική Διατριβή) (Π2.1β). Τμήματα (TM) α-έλικας απεικονίζονται με ορθογώνια σχήματα (με διακεκομμένο περίγραμμα φαίνονται TM της δομικής περιοχής «εισόδου») και τμήματα β-πτυχωτής επιφάνειας απεικονίζονται με πεντάγωνα σε μορφή βέλους. Σε μεγέθυνση με μπλε χρώμα γραμματοσειράς και σχήμα στόχου τονίζονται οι εγγενείς μεθειονίνες, στις οποίες εφαρμόστηκε *in vitro* μεταλλαξιγένεση. Με υπογραμμισμένη αρίθμηση σημειώνονται οι θέσεις εγγενών μεθειονινών που υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι πρωτολύονται χημικά από CNBr (βλ. 3.2.2.3.2) Οι θέσεις εισαγωγής των ζευγών κυστεϊνών απεικονίζονται με κόκκινους (δομική περιοχή «πυρήνα») και μαύρους στόχους (δομική περιοχή «εισόδου»). Επίσης, σημειώνονται οι πέντε εγγενείς κυστεϊνές που έχουν αντικατασταθεί με Ser για την κατασκευή της Cys-less XanQ (Karatza *et al.*, 2006) η οποία χρησιμοποιείται ως μοριακό υπόβαθρο για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων.

Για την μεταλλαξιγένεση των τριών εγγενών μεθειονινών της XanQ, ξεκινήσαμε με αντικατάσταση καθεμιάς από τις τρεις Met (Met-282, Met-331, Met-465) με τα πιο συγγενή δομικά αμινοξέα (Val, Leu, Ile) και/ή απαλοιφή της Met-465 η οποία βρίσκεται ουσιαστικά στο C-τελικό άκρο της περμεάσης (προτελευταίο αμινοξύ στην αλληλουχία). Στη συνέχεια έγινε συνδυασμός των καταλληλότερων μεταλλαγμάτων (υψηλότερων επιπέδων έκφρασης και ενεργότητας) για να επιτευχθεί η κατασκευή ενός τριπλού μεταλλάγματος με αντικατάσταση και των τριών καταλοίπων Met. Οι κατασκευές έγιναν στο υπόβαθρο της XanQ(Cys-less)-His₁₀ το οποίο δεν περιέχει Met στην περιοχή του επιτόπου (His₁₀), ενώ μία από τις κατασκευές (M282V/M331V/M465V, βλ. παρακάτω) μεταφέρθηκε επίσης στο υπόβαθρο της XanQ(Cys-less)-BAD [η οποία περιέχει τρεις επιπλέον Met στην περιοχή BAD, μία αμέσως πριν από

την Lys η οποία αποτελεί τη θέση βιοτινυλίωσης και δύο καθοδικά της Lys, βλ. Dimroth, 1997; Fig. 6] και επιβεβαιώθηκε ότι ο «επίτοπος» BAD (biotin-accceptor domain) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί καθώς η θέση βιοτινυλίωσης αποκόπτεται από το CNBr (και δεν ανιχνεύεται σήμα στο western με αβιδίνη-HRP). Ως προς τις θέσεις των Met της κωδικής αλληλουχίας της XanQ που αντικαθίστανται, η Met-465 αντικαθίσταται για να προστατευθεί ο επίτοπος των δέκα ιστιδινών (His₁₀) από την πρωτεολυτική αποκοπή του με το CNBr ενώ οι Met-282 και Met-331 αντικαθίστανται για να αυξηθεί το μέγεθος των ενδιάμεσων τμημάτων της αλληλουχίας της XanQ που περιμένουμε να προστατευθούν από την πιθανή διασύνδεση μεταξύ H257C ή A323C και E249C/N430C (βλ. παρακάτω, Εικόνα 3.2.31).

Ακολουθώντας τον παραπάνω σχεδιασμό, κατασκευάσαμε καταρχήν τέσσερα μεταλλάγματα της XanQ(Cys-less)-His₁₀ στα οποία η μεθειονίνη του C-τελικού άκρου (Met-465) αντικαταστάθηκε με Ile, Leu ή Val (M465I, M465L, M465V) ή απαλείφθηκε εντελώς με απαλοιφή των δύο τελευταίων αμινοξέων (Met-465, Asp-466) από την κωδική αλληλουχία της XanQ [Δ (465-466)]. Αυτά τα τέσσερα μεταλλάγματα εκφράζονται στη μεμβράνη σε κανονικά επίπεδα (80-100% της Cys-less XanQ) και, με εξαίρεση το M465I που έχει μέτριες τιμές ενεργότητας (30-45% της Cys-less), εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης (αρχικές ταχύτητες 87-118%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης 102% για την M465V και 43-53% για τις Δ (465-466) και M465L) (Εικόνα 3.2.25). Στη συνέχεια, οι άλλες δύο μεθειονίνες-στόχοι αντικαταστάθηκαν με Val ή Leu και προέκυψαν τρία μεταλλάγματα (M282L, M282V, M331V) τα οποία εκφράζονται σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της Cys-less XanQ και έχουν υψηλές (M282V, M331V) ή μέσες (M282L) τιμές ενεργότητας. Συνολικά, από τις 7 περμεάσες με αλλαγές μεθειονινών, όλες εκφράζονται στην μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια της Cys-less (Εικόνα 3.2.25A,B) ενώ οι αντικαταστάσεις με Val (M282V, M331V, M465V) είναι οι μόνες που οδηγούν σε σχεδόν πλήρη ενεργότητα, τόσο ως προς την αρχική ταχύτητα (77-87%) όσο και ως προς τα μέγιστα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης (85-102%) (Εικόνα 3.2.21Γ).

Σε δεύτερο στάδιο, οι μεταλλαγές των δύο ή και των τριών παραπάνω εγγενών μεθειονινών της XanQ(Cys-less)-His₁₀ σε Val συνδυάστηκαν στο ίδιο μοριακό υπόβαθρο (M282V/M465V ή M282V/M331V/M465V, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.2.26). Για τα μεταλλάγματα που προέκυψαν βρέθηκε ότι εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της Cys-less XanQ (80-90%) και έχουν υψηλές τιμές ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης (αρχική ταχύτητα 134% και 84%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης 128% και 99% της Cys-less XanQ αντίστοιχα).

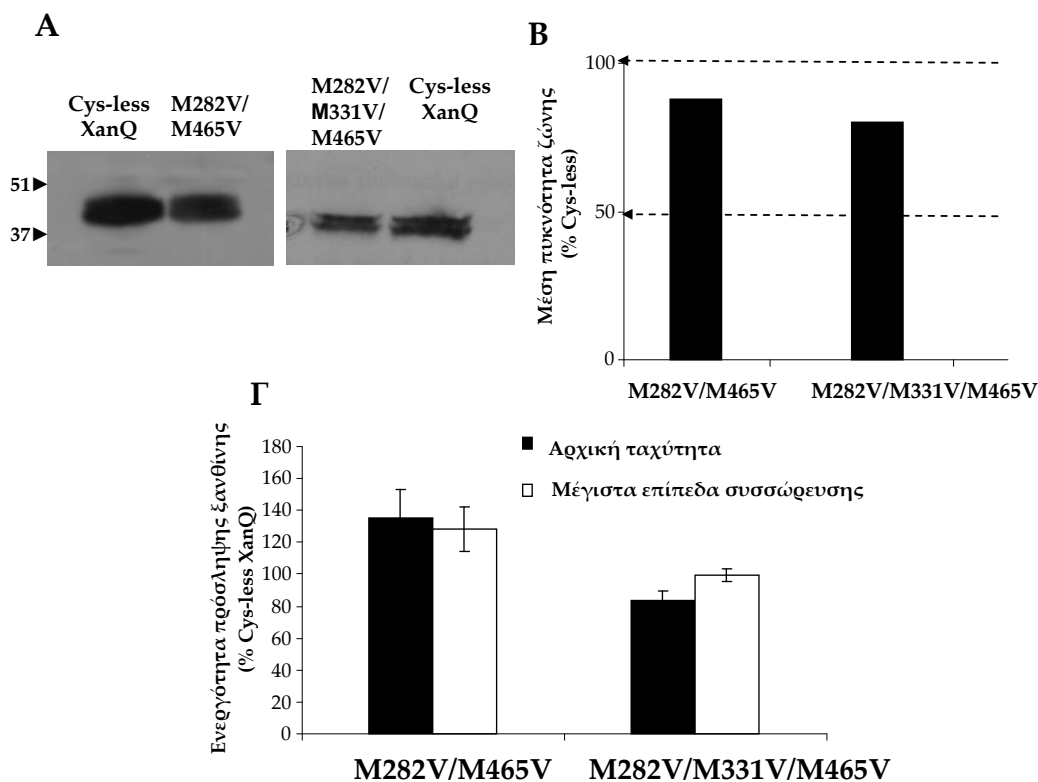


Εικόνα 3.2.25: Έκφραση και ενεργότητα μεταλλαγμάτων της XanQ με αντικατάσταση στις θέσεις Met-282, Met-331 ή Met-465

A. Κλάσματα μεμβρανών (100 µg ολικής πρωτεΐνης/ διαδρομή) κυττάρων *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της αλληλουχίας ιστιδινών (anti-PentaHis-IgG) σε αραιώση 1:5000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη που δίνονται με αριθμούς στα αριστερά της εικόνας μετρώνται σε kDa.

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη ως % ποσοστό της έκφρασης της XanQ(Cys-less)-His₁₀ (Quantity One). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Γ. Κύτταρα *E. coli* T184 (0.7mg ολικής πρωτεΐνης ανά mL) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM), στους 25 °C (βλ. 2.9.1). Οι τιμές αρχικής ταχύτητας (από μετρήσεις σε 10-30 sec, μαύρες στήλες) και μέγιστων επιπέδων συσσώρευσης ξανθίνης (από μετρήσεις σε 1-10 min, λευκές στήλες) εκφράζονται ως % των τιμών της XanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση.



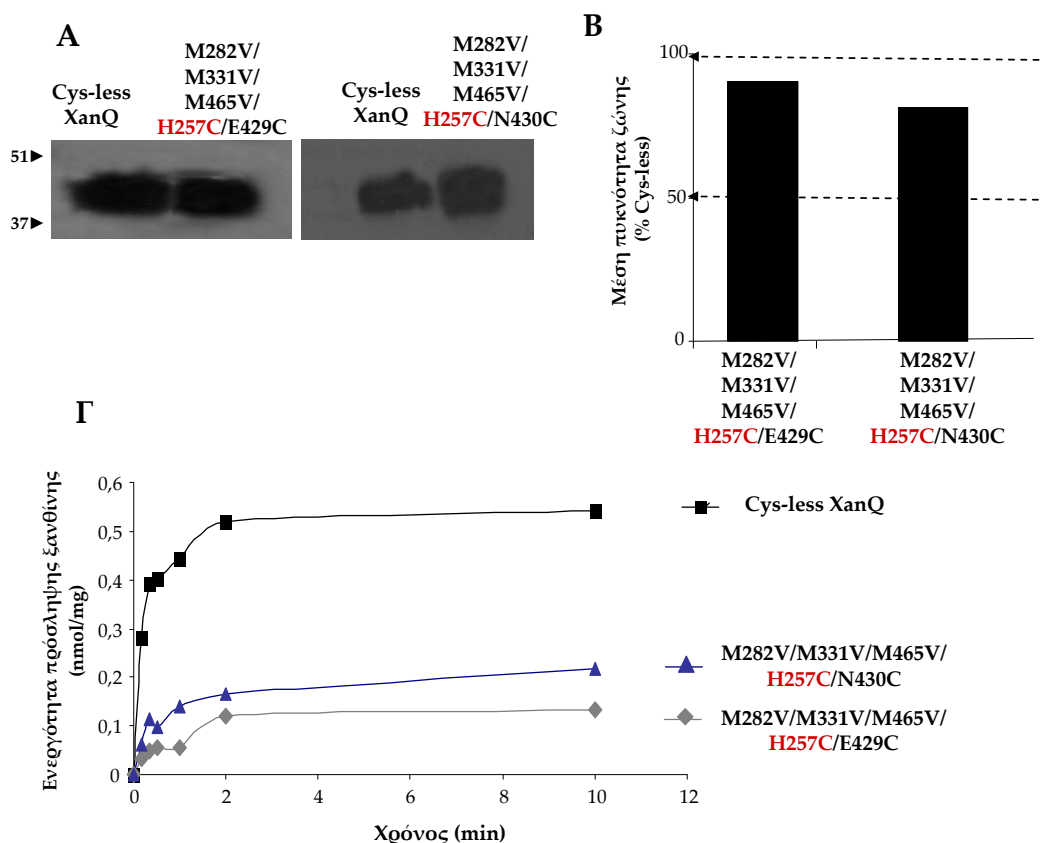
Εικόνα 3.2.26: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων M282V/M465V και M282V/M331V/M465V της περμεάσης XanQ

Α. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με anti-PentaHis-IgG για κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.21)

Β. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στην μεμβράνη (Quantity One, βλ Εικόνα 3.2.21). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.2.25.

Σε τρίτο στάδιο, εισήχθησαν στο μοριακό υπόβαθρο της περμεάσης XanQ(Cys-less/M282V/M465V/M331V)-His₁₀ τα ζεύγη κυστεϊνών H257C-E429C (TM8-TM14), H257C-N430C (TM8-TM14) (Εικόνα 3.2.27), A323C/E429C ή A323C/N430C (TM8-TM14) (Εικόνα 3.2.28). Τα τέσσερα μεταλλάγματα της XanQ που προέκυψαν [A323C/E429C(M282V/M331V/M465V), A323C/N430C (M282V/M331V/M465V), H257C/E429C(M282V/M331V/M465V), H257C/N430 (M282V/M331V/M465V)] εκφράζονται στην μεμβράνη στα επίπεδα της Cys-less XanQ και εμφανίζουν μέτριες τιμές ενεργότητας (αρχική ταχύτητα μεταφοράς ξανθίνης 13-25%, μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης 24-40% σε σχέση με την Cys-less XanQ) (Εικόνες 3.2.27 και 3.2.28). Κατά συνέπεια, τα μεταλλάγματα της XanQ(Cys-less/M282V/M465V/M331V)-His₁₀ με ζεύγη κυστεϊνών H257C-E429C/N430C ή A323C-E429C/N430C θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για πειράματα cross linking με την μέθοδο του CNBr.

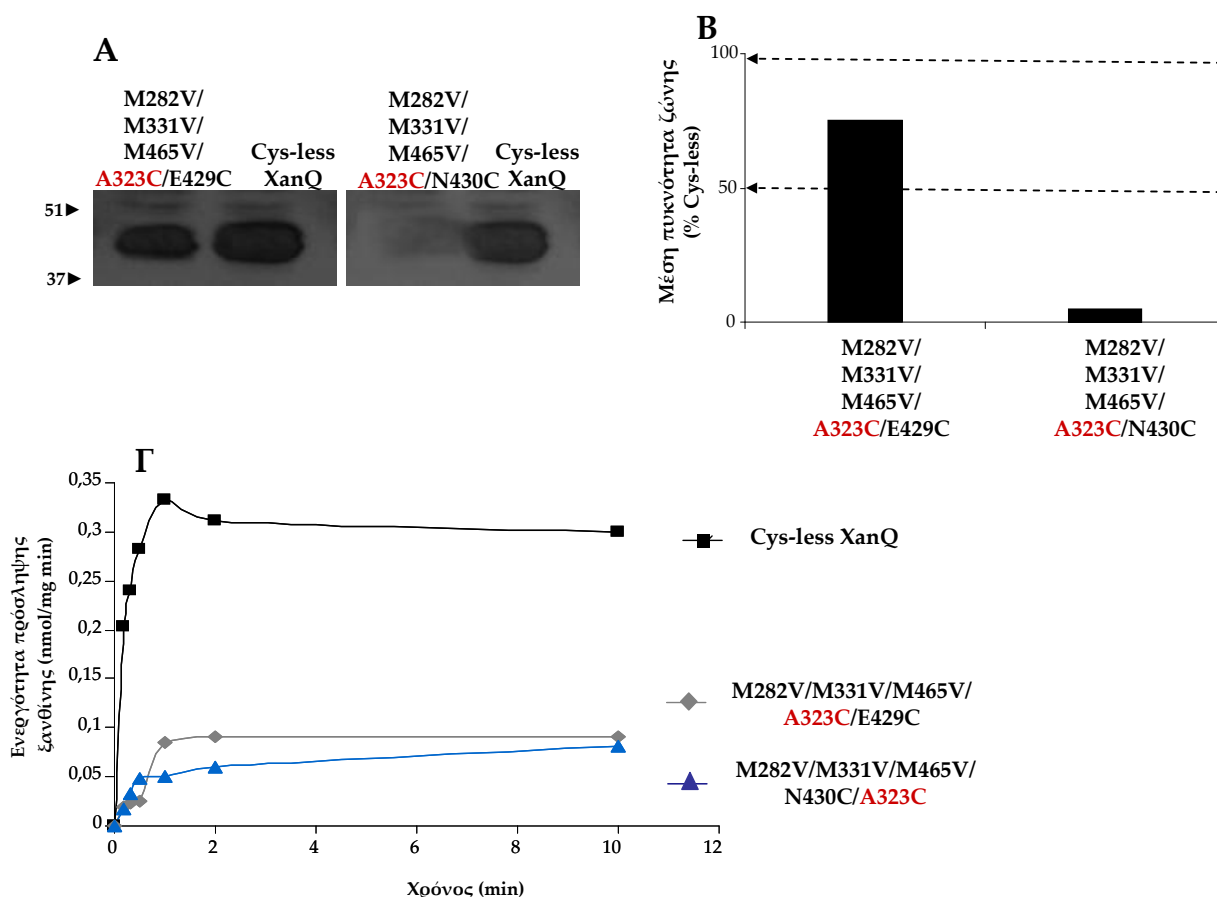


Εικόνα 3.2.27: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων H257C/E429C (M282V/M331V/M465V) και H257C/N430C(M282V/M331V/M465V) της περμεάσης XanQ

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με anti-PentaHis-IgG για κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.25)

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στη μεμβράνη (Quantity One, βλ Εικόνα 3.2.25). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.25) σε διάγραμμα χρονικής προόδου της αντίδρασης (time course).



Εικόνα 3.2.28: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων A323C/E429C (M282V/M331V/M465V) και A323C/N430C(M282V/M331V/M465V) της περμεάσης XanQ

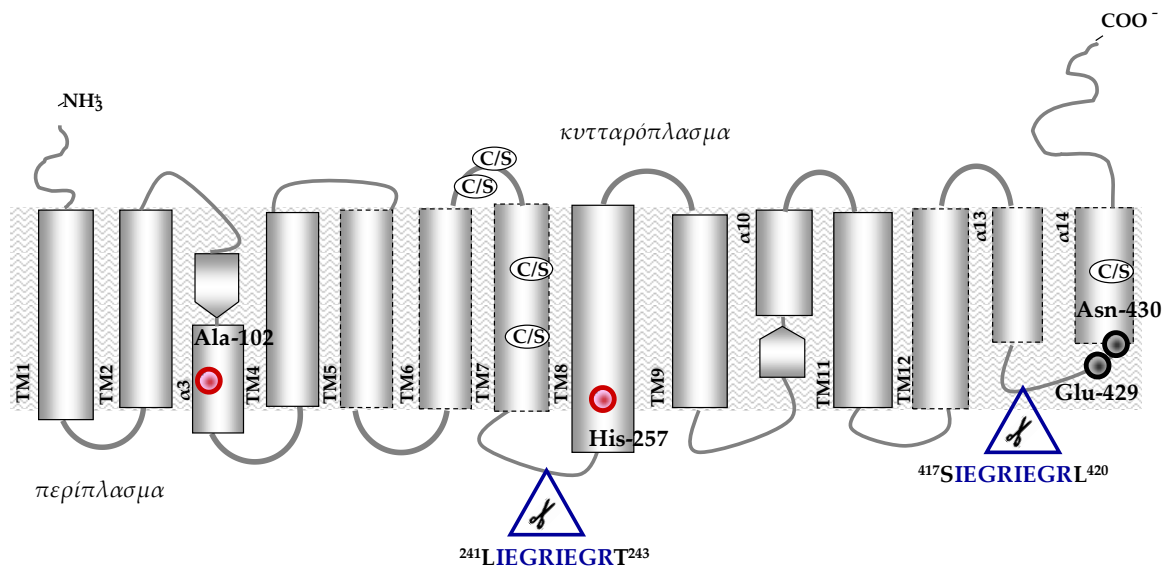
A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με anti-PentaHis-IgG για κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 μg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.25)

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στη μεμβράνη (Quantity One, βλ Εικόνα 3.2.25). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) σε κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.25) σε διάγραμμα χρονικής προόδου της αντίδρασης.

Εισαγωγή αλληλουχιών αναγνώρισης ειδικών πρωτεασών (αλληλουχίας αναγνώρισης του παράγοντα Xa) σε κατάλληλες θέσεις της XanQ

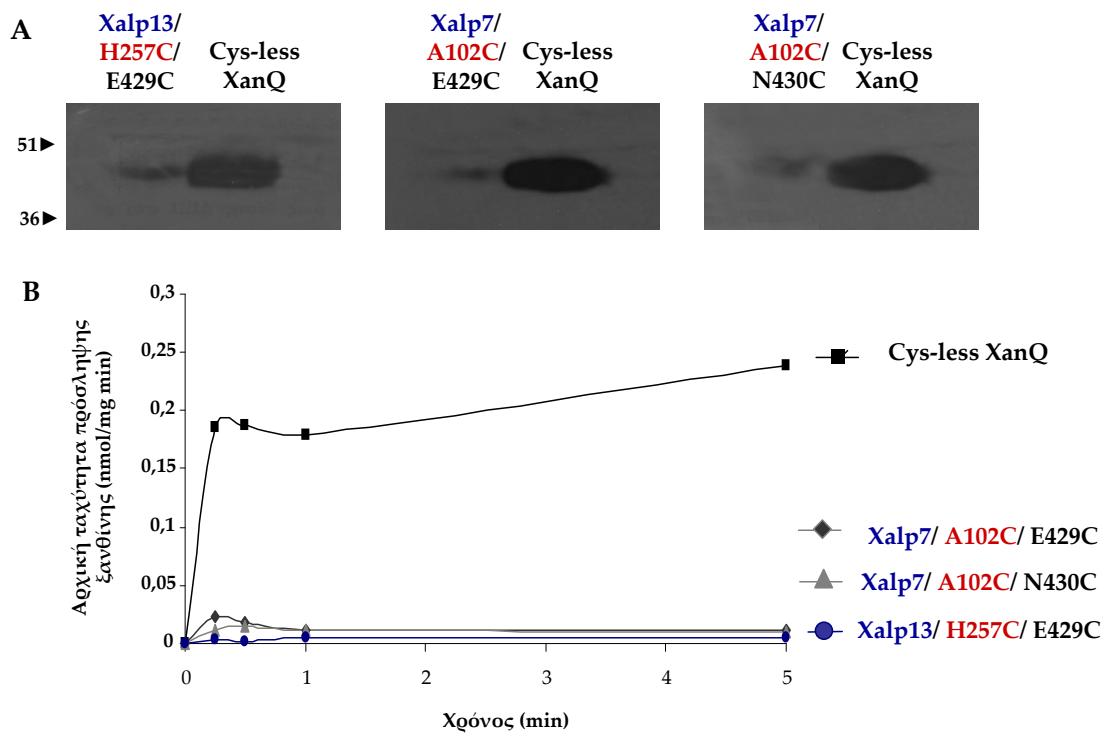
Για την μέθοδο που χρησιμοποιεί ενζυμική πρωτεόλυση με την ειδική πρωτεάση Xa ως τρόπο ελέγχου της δράσης των αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) (βλ. 2.5 και 3.2.2.3) απαιτείται τροποποίηση της XanQ με μεταλλαξιγένεση, ώστε να εισαχθούν σε κατάλληλη θέση (ενδιάμεση του υπό μελέτη ζεύγους Cys) μία ή περισσότερες αλληλουχίες αναγνώρισης του παράγοντα Xa (Sahin-Toth *et al.*, 1995; Wolin and Kaback, 2000). Η αλληλουχία που αναγνωρίζει ο Xa είναι η (Ile-Glu-Gly-)Arg-x (διασπά τον δεσμό Arg-x). Έχει αποδειχθεί από προηγούμενες έρευνες με άλλες περμεάσες (LacY) ότι η εισαγωγή δύο τέτοιων αλληλουχιών στη σειρά σε υδρόφιλες συνδετικές περιοχές προσβάσιμες από την πρωτεάση αυξάνει θεαματικά την επιτυχία της πρωτεολυτικής αντίδρασης του Xa (Sahin-Toth *et al.*, 1995). Στην παρούσα εργασία, εισήχθησαν στο υπόβαθρο της XanQ (Cys-less-BAD) δύο αλληλουχίες αναγνώρισης του Xa στη σειρά είτε στην υδρόφιλη συνδετική περιοχή μεταξύ TM7 και TM8 (Xalp7) είτε στη συνδετική περιοχή μεταξύ α 13 και α 14 (Xalp13), δηλαδή στις δύο μεγαλύτερες σε μήκος συνδετικές περιοχές που αναμένεται να είναι προσβάσιμες στην πρωτεάση από το περίπλασμα (Εικόνα 3.2.29). Οι αλληλουχίες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή της μεθόδου ενζυμικής πρωτεόλυσης (Xa) για ζεύγη κυστεϊνών μεταξύ θέσεων των TM1-7 και των TM8-14 ή των TM1-13 και του TM14, αντίστοιχα, όπως μεταξύ A102C (α 3) ή His-257 (TM8) (δομική περιοχή «πυρήνα») και E429C ή N430C (TM14, δομική περιοχή «εισόδου»).



Εικόνα 3.2.29: Απεικόνιση των θέσεων εισαγωγής αλληλουχιών αναγνώρισης του παράγοντα Χα στο πιθανό τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το τοπολογικό μοντέλο της XanQ στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση UraA και σε προηγούμενα θεωρητικά και πειραματικά δεδομένα για την XanQ (βλ. Εικόνα 3.2.21). Σημειώνονται με μπλε τρίγωνα οι θέσεις εισαγωγής αλληλουχιών αναγνώρισης του παράγοντα Χα (**Ile-Glu-Gly-Arg-Ile-Glu-Gly-Arg-x**). Οι θέσεις εισαγωγής των ζευγών κυστεϊνών για τα οποία θα μπορούσε να εφαρμοσθεί η μέθοδος διασύνδεσης με χρήση πρωτεόλυσης από Χα απεικονίζονται με κόκκινους (δομική περιοχή «πυρήνα») και μαύρους στόχους (δομική περιοχή «εισόδου»). Επίσης, σημειώνονται οι πέντε εγγενείς κυστεϊνες που έχουν αντικατασταθεί με Ser για την κατασκευή της Cys-less XanQ (Karatza *et al.*, 2006), η οποία χρησιμοποιείται ως μοριακό υπόβαθρο για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων.

Με το παραπάνω σκεπτικό, κατασκευάστηκαν τρία (3) μεταλλάγματα της περμεάσης XanQ(Cys-less)-BAD, Xalp7/A102C/E429C, Xalp7/A102C/N430C και Xalp13/H257C/E429C (Εικόνα 3.2.30). Τα μεταλλάγματα αυτά βρέθηκε ότι εκφράζονται σε πολύ χαμηλά, σχεδόν μηδενικά επίπεδα στη μεμβράνη (2-8% των επιπέδων της Cys-less XanQ) και έχουν πρακτικά αμελητέες τιμές ενεργότητας μεταφοράς Ξανθίνης (1-7% των επιπέδων της Cys-less XanQ). Επομένως, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η δομή του διαμεμβρανικού μεταφορέα δεν «επιτρέπει» την εισαγωγή επιπλέον καταλοίπων σε αυτές τις συνδετικές περιοχές (Irp7, Irp13) και ότι οι τροποποιήσεις στις περιοχές αυτές (Εικόνα 3.2.29) είναι καταστρεπτικές για τη δομή και/ή λειτουργία της XanQ. Κατ' επέκταση, οι εν λόγω κατασκευές δεν μπορούν να εφαρμοστούν για πειράματα cross linking με εφαρμογή της μεθόδου πρωτεόλυσης με Χα.



Εικόνα 3.2.30: Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων Xalp7/A102C/E429C, Xalp7/A102C/N430C και Xalp13/H257C/E429C της περμεάσης XanQ

A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη-HRP για κλάσματα μεμβρανών *E. coli* T184 (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.25)

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταλλαγμάτων στη μεμβράνη (Quantity One, βλ Εικόνα 3.2.25). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα με μικρή τυπική απόκλιση των τιμών (<15%).

Γ. Δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 µM) σε κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (βλ. Εικόνα 3.2.25) σε διάγραμμα χρονικής προόδου της αντίδρασης.

3.2.2.3.2 Αρχικά πειράματα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των His-257 (TM8) και Glu-429 (TM14) μέσω σταυρωτής αλληλοσύνδεσης με χρήση του πρωτοκόλλου χημικής πρωτεόλυσης με βρωμιούχο κυάνιο

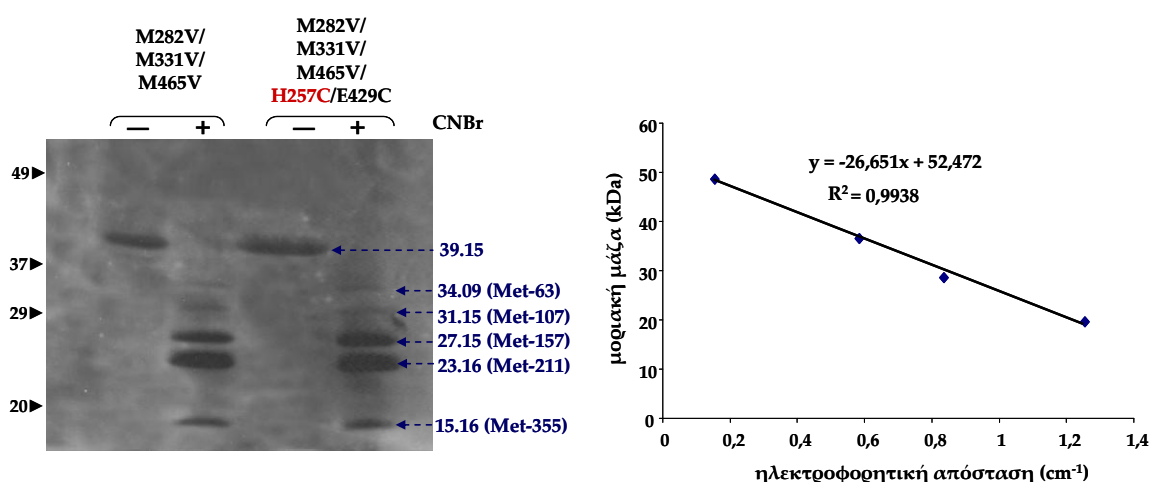
Στα μεταλλάγματα της XanQ(Cys-less)-His₁₀ M282V/M331V/M465V και H257C/E429C(M282V/M331V/M465V) (βλ. 3.2.4.1) εφαρμόστηκε αρχικά το πρωτόκολλο της χημικής πρωτεόλυσης με βρωμιούχο κυάνιο (CNBr) έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι θέσεις μεθειονίνης (Met-x) οι οποίες είναι προσβάσιμες σε πρωτεόλυση από το CNBr και να ανιχνευτούν τα πεπτίδια που προκύπτουν μέσω ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης με το αντίσωμα έναντι των ιστιδινών (βλ. 2.11). Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.2.31) υπέδειξαν ότι το CNBr προκαλεί και στις δύο περιπτώσεις:

(α) εκτεταμένη πέψη της πρωτεΐνης, λόγω απουσίας ζώνης στη θέση των **39,15 kDa** (που αντιστοιχεί στην ανέπαφη περμεάση XanQ(Cys-less)-His₁₀, της οποίας η μάζα υπολογίζεται με βάση την αλληλουχία στα 52,57 kDa) μετά την επώαση με CNBr σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου,

(β) την μερική υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών σε αρκετές θέσεις Met-x του μορίου, μεταξύ των οποίων κυρίως στις θέσεις των **Met-157** (TM5), **Met-211** (TM7), **Met-346/355** (TM11/lp11) και κατά δεύτερο λόγο στις θέσεις **Met-63/65** (TM2) και **Met-107** (α3/lp3) (πρβλ. Εικόνα 3.2.24), καθώς ανιχνεύονται με το αντίσωμα anti-pentaHis πέντε πεπτίδια-θραύσματα (που περιέχουν τον C-τελικό επίτοπο His₁₀), τα δύο εντονότερα, στα ηλεκτροφορητικά μεγέθη των **27,15 kDa** [αν διορθώσουμε για έναν συντελεστή ταχύτερης κινητικότητας ανάλογο με αυτόν του ανέπαφου μορίου, $52,57/39,15 = 1,34x$, αντιστοιχεί σε μοριακή μάζα 36,11 kDa, δηλ. αυτήν του πολυπεπτιδίου XanQ(158-466)-His₁₀, η οποία υπολογίζεται θεωρητικά στα 36,08 kDa] και **23,16 kDa** [με τη διόρθωση για τον συντελεστή ταχύτερης κινητικότητας αντιστοιχεί σε μάζα 30,80 kDa, δηλ. αυτήν του XanQ(212-466)-His₁₀, η οποία υπολογίζεται στα 30,47 kDa], ένα λιγότερο έντονο στα **15,16 kDa** [αντιστοιχεί στη μάζα που υπολογίζεται για το πεπτίδιο XanQ(356-466)-His₁₀, 15,35 kDa, ή το XanQ(347-466)-His₁₀, 16,33 kDa] και δύο πολύ αμυδρά, στα **34,09 kDa** [με τη διόρθωση για τον συντελεστή κινητικότητας, αντιστοιχεί σε 45,33 kDa, δηλ. τη μάζα του XanQ(66-466)-His₁₀, 45,80 kDa, ή του XanQ(64-466)-His₁₀, 46,00 kDa] και **31,15 kDa** [με τη διόρθωση για τον συντελεστή κινητικότητας, αντιστοιχεί σε 41,43 kDa, δηλ. τη μάζα του XanQ(108-466)-His₁₀, 41,45 kDa].

Είναι φανερό ότι η παραπάνω ανάλυση για τα μεγέθη των πεπτιδικών θραυσμάτων είναι προσεγγιστική (Εικόνα 3.2.31). Αποκαλύπτεται, πάντως, ότι

το CNBr προκαλεί μερική πρωτεόλυση σε πολλές θέσεις Met-x και δίνει ένα σύνθετο πρότυπο πέψης. Από τα πεπτιδικά τμήματα που προκύπτουν αυτά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ένδειξη προστασίας ή όχι κατά την διασύνδεση ζευγών κυστεϊνών είναι μόνο το μικρού μεγέθους (15,16 kDa) για την περίπτωση των H257C/E429C ή A323C/E429C (πρβλ. Εικόνα 3.2.24), ενώ για την περίπτωση του A102C/E429C (στην οποία, πάντως, δεν έχουμε άλλες ενδείξεις αλληλεπίδρασης, βλ. 3.2.1.2) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επίσης τα θραύσματα των 23,16 και 27,15 kDa, καθώς και το αμυδρό θραύσμα των 31,15 kDa.



Εικόνα 3.2.31: Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της πρωτεόλυσης από CNBr των μεταλλαγμάτων M282V/M331V/M465V και H257C/E429C(M282V/M331V/M465V) της περμεάσης XanQ.

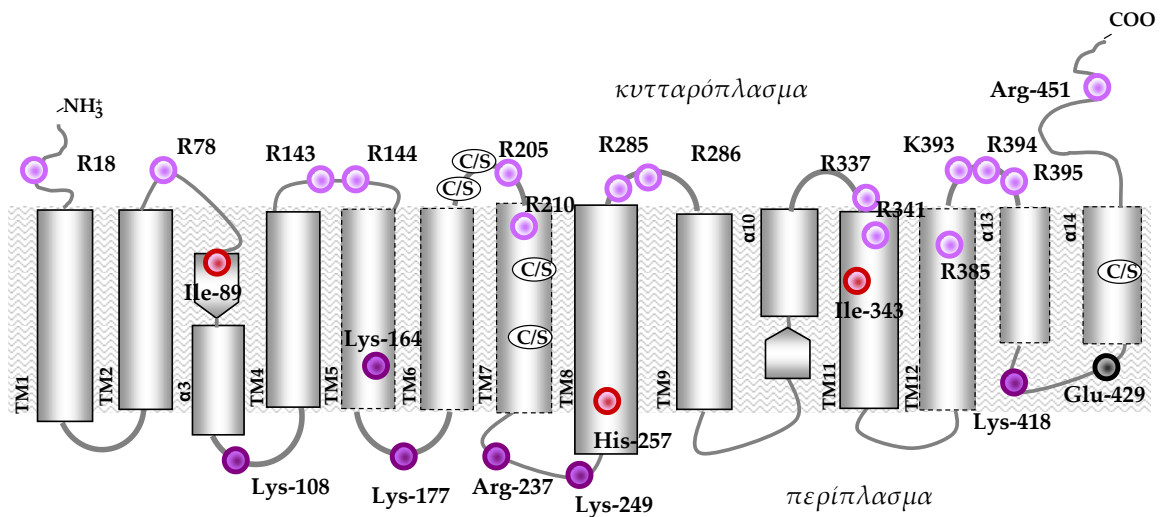
Κλάσματα μεμβρανών από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές από πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) επώασθησαν με CNBr (100 mg/mL, 4h, 25 °C) και μετά την απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών της αντίδρασης (βλ. 2.11), αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της αλληλουχίας ιστιδινών (anti-PentaHis-IgG), σε αρραίωση 1:5000 (βλ. και Εικόνα 3.2.25). Τα πρότυπα μοριακά βάρη (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range) που δίνονται στα αριστερά της εικόνας μετρώνται σε kDa. Στα δεξιά της εικόνας του πηκτώματος δίνονται τα προσεγγιστικά μεγέθη κάθε ζώνης σε kDa όπως προκύπτουν από την μαθηματική σχέση εξάρτησης των μεγεθών από την ηλεκτροφορητική απόσταση (που έχει εξαχθεί βάσει των πρωτεϊνών των πρότυπων μοριακών μαζών) και φαίνεται στο διάγραμμα στα δεξιά. Επίσης, σε παρένθεση δίνονται οι αντίστοιχες πιθανές θέσεις Met-x στις οποίες υδρολύει την περμεάση το CNBr για κάθε ζώνη (βλ. κείμενο και Εικόνα 3.2.24).

Το πειραματικό πρωτόκολλο της πέψης με CNBr εφαρμόστηκε στη συνέχεια στο μετάλλαγμα H257C/E429C(M282V/M331V/M465V) της XanQ(Cys-less)-His₁₀ μετά από επώαση με αντιδραστήρια MTS-linker-MTS διαφορετικού μήκους και ευκαμψίας (βλ. 3.2.2.1) για να μελετηθεί αν αυτή επηρεάζει το πρότυπο χημικής πρωτεόλυσης από το CNBr: αλληλοσύνδεση των κυστεϊνών μεταξύ των θέσεων H257C και E429C μέσω αντιδραστηρίου MTS-linker-MTS θα οδηγούσε σε μείωση ή/και απουσία της ζώνης των 15,16 kDa όπως εξηγήθηκε προηγουμένως (βλ. Εικόνα 3.2.27). Ωστόσο, η εφαρμογή της μεθόδου δεν έδωσε σαφή ηλεκτροφορητική εικόνα των πρωτεολυτικών θραυσμάτων σε κάθε περίπτωση και φαίνεται ότι ο συνδυασμός της αντίδρασης του CNBr (που απαιτεί οργανικούς διαλύτες) και της προεπάσης με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS που απαιτεί έκπλυση της περίσσειας αντιδραστηρίων και ξανθίνης μέσω διαδοχικών φυγοκεντρήσεων (βλ. 2.13) (η οποία αυξάνει κατά πολύ τον χρόνο έκθεσης των μεμβρανικών κλασμάτων και της περμεάσης σε υδατικούς διαλύτες σημαντικής ιοντικής ισχύος) επιδρά αρνητικά στην σταθερότητα της περμεάσης στη μεμβράνη και/ή την ομαλή ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεολυτικών τμημάτων (Παράρτημα 4). Αν και έγινε διεξοδική εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε ευρύ φάσμα συνθηκών με τροποποιήσεις τόσο ως προς το σκέλος της αντίδρασης με MTS-linker-MTS όσο και ως προς την αντίδραση του CNBr (βλ. Παράρτημα 4), δεν πήραμε αποτελέσματα που να επιτρέπουν την εξαγωγή βάσιμων συμπερασμάτων.

Τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα αποδίδονται είτε σε μη ειδική πρωτεολυτική διάσπαση της περμεάσης στις συνθήκες των επώασεων είτε σε πιθανή παρεμπόδιση της ομαλής ηλεκτροφορητικής κίνησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων από τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται, σε συνδυασμό με το σύνθετο ηλεκτροφορητικό πρότυπο λόγω πολλαπλής μερικής πέψης σε διαφορετικές εγγενείς θέσεις Met-x της XanQ: είναι γεγονός ότι το μοριακό υπόβαθρο M282V/M331V/M465V που χρησιμοποιείται αφήνει δέκα έξι (16) ακόμη εγγενή κατάλοιπα μεθειονίνης στο μόριο της XanQ (Εικόνα 3.2.20), αλλά η δομική και λειτουργική ανάλυση των μεταλλαγμάτων που χρησιμοποιούνται (Εικόνα 3.2.24) υποδηλώνει ότι περαιτέρω γενετική τροποποίηση των μεθειονινών της XanQ θα οδηγούσε από μόνη της σε απώλεια ενεργότητας και δομική αστάθεια στη μεμβράνη.

3.2.2.3.3 Μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θέσεων His-247-Glu-429 (TM8-TM14) και Ile-89-Ile-343 (TM3-TM11) της περμεάσης XanQ μέσω σταυρωτής αλληλοσύνδεσης, με χρήση του πρωτοκόλλου ενζυμικής πρωτεόλυσης με θρυψίνη

Λόγω των δυσχερειών υλοποίησης πρωτοκόλλων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης που προϋποθέτουν πολλαπλή γενετική τροποποίηση του μορίου του XanQ (βλ. 3.2.2.3.1 και 3.2.2.3.2), στραφήκαμε και σε μια άλλη, απλούστερη μέθοδο που δεν απαιτεί γενετική τροποποίηση του μοριακού υποβάθρου (μέθοδος πέψης με θρυψίνη). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε πρωτεολυτική πέψη σε θέσεις (Arg-x, Lys-x), οι οποίες είναι εκτεθειμένες στην περιπλασματική όψη του μορίου, με χρήση θρυψίνης, η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί σε μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (right-side-out membrane vesicles) ή σφαιροπλάστες της *E. coli* (sphaeroplasts) που είναι απαλλαγμένοι από την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και το κυτταρικό τοίχωμα (Goldkorn *et al.*, 1983). Η XanQ (Εικόνα 3.2.32) έχει στα υδρόφιλα συνδετικά τμήματα προς την περιπλασματική πλευρά τέσσερα εγγενή κατάλοιπα λυσινών (Lys-108, 177, 249, 418) και ένα αργινίνης (Arg-237), καθώς και ένα κατάλοιπο λυσίνης στο περιπλασματικό άκρο του TM5 (Lys-164, βλ. 3.1.1.6.6), τα οποία από *in silico* ανάλυση προβλέπονται με μεγάλες πιθανότητες (95-97%) ως χημικά ευνοϊκές θέσεις πέψης από την θρυψίνη (Πίνακας 3.2.2). Για να ελεγχθεί η εφαρμογή πειραμάτων cross-linking (βλ. 2.13) σε συνδυασμό με πρωτεολυτική πέψη από θρυψίνη στις θέσεις αυτές, χρησιμοποιήσαμε δύο μεταλλάγματα της XanQ(Cys-less)-BAD με ζεύγη κυστεϊνών για τα οποία είχαμε ήδη ενδείξεις αλληλεπίδρασης από τα λειτουργικά πειράματα (βλ. 3.2.2.1 και 3.2.2.2), συγκεκριμένα H257C/E429C (TM8-TM14) και I89C/I343C (α3-TM11).



Εικόνα 3.2.32: Απεικόνιση των θέσεων των εγγενών λυσινών και αργινινών στο πιθανό τοπολογικό μοντέλο της περμεάσης XanQ.

Το τοπολογικό μοντέλο της XanQ στηρίζεται στην δομικά ομόλογη περμεάση UraA και σε προηγούμενα θεωρητικά και πειραματικά δεδομένα για την XanQ (βλ. Εικόνα 3.2.20). Σημειώνονται σε σχήμα στόχου οι θέσεις των εγγενών Lys και Arg που είναι προσανατολισμένες προς την κυτταροπλασματική πλευρά (ανοιχτό μωβ) ή προς την περιπλασματική πλευρά της XanQ (σκούρο μωβ). Οι θέσεις εισαγωγής των ζευγών κυστεϊνών για τα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος διασύνδεσης με χρήση πρωτεόλυσης από θρυψίνη απεικονίζονται με κόκκινους (δομική περιοχή «πυρήνα») και μαύρους στόχους (δομική περιοχή «εισόδου»). Επίσης, σημειώνονται οι πέντε εγγενείς κυστεΐνες που έχουν αντικατασταθεί με Ser για την κατασκευή της Cys-less XanQ (Karatzas *et al.*, 2006), η οποία χρησιμοποιείται ως μοριακό υπόβαθρο για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων.

Πίνακας 3.2.2: *In silico* ανάλυση εντοπισμού των χημικά ευνοϊκών θέσεων Lys-x και Arg-x της αλληλουχίας της XanQ για πέψη με θρυψίνη

Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα CP-DT (Cleavage Prediction with Decision Trees) (βλ. 2.14). Αναφέρονται τα ονόματα των καταλοίπων Lys ή Arg της XanQ, η θέση τους ως προς την κυτταροπλασματική ή την περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης και η θεωρητική πιθανότητα πέψης από την θρυψίνη σε κάθε θέση (Fannes *et al.*, 2013).

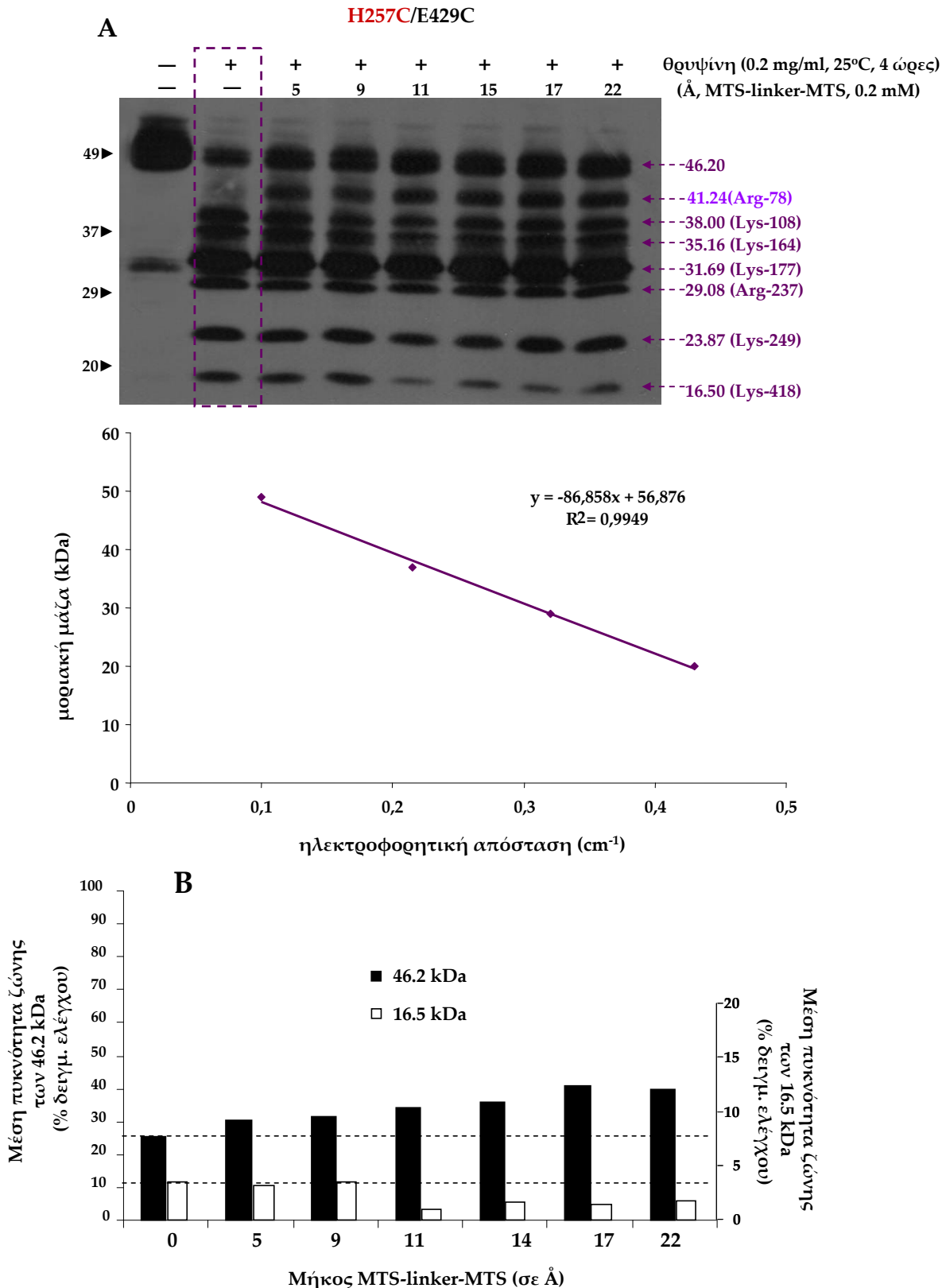
Κατάλοιπο	Θέση	Πιθανότητα
Arg-18	προς το κυτταρόπλασμα	0,20
Arg-78	προς το κυτταρόπλασμα	0,99
Lys-108	προς το περίπλασμα	0,95
Arg-143	προς το κυτταρόπλασμα	0,97
Arg-144	προς το κυτταρόπλασμα	0,90
Lys-164	προς το περίπλασμα	0,99
Lys-177	προς το περίπλασμα	0,98
Arg-205	προς το κυτταρόπλασμα	0,95
Arg-210	προς το κυτταρόπλασμα	0,96
Arg-237	προς το περίπλασμα	0,98
Lys-249	προς το περίπλασμα	0,98
Arg-285	προς το κυτταρόπλασμα	0,95
Arg-286	προς το κυτταρόπλασμα	0,17
Arg-337	προς το κυτταρόπλασμα	0,98
Arg-341	προς το κυτταρόπλασμα	0,98
Arg-385	προς το κυτταρόπλασμα	0,97
Lys-393	προς το κυτταρόπλασμα	0,86
Arg-394	προς το κυτταρόπλασμα	0,84
Arg-395	προς το κυτταρόπλασμα	0,85
Lys-418	προς το περίπλασμα	0,99
Arg-451	προς το κυτταρόπλασμα	0,99

Για το μετάλλαγμα H257C/E429C (Εικόνα 3.2.33) τα αποτελέσματα της εφαρμογής του πρωτοκόλλου αυτού υποδεικνύουν ότι η δράση της θρουψίνης στο δείγμα ελέγχου (χωρίς προεπάση με αντιδραστήρια MTS-linker-MTS) προκαλεί μερική πέψη του μορίου σε τουλάχιστον έξι θέσεις απελευθερώνοντας έξι πεπτιδικά θραύσματα που περιέχουν τον επίτοπο BAD (και ανιχνεύονται στην ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη), τα οποία αντιστοιχούν κατά προσέγγιση σε μεγέθη 38 kDa, 35 kDa, 31.5 kDa, 29 kDa, 24 kDa και 16,5 kDa (Εικόνα 3.2.33A). Αν για τα μεγαλύτερα πεπτίδια (>20 kDa) συνυπολογίσουμε και έναν συντελεστή διόρθωσης που προκύπτει από την αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυτοπικών μεμβρανικών πρωτεϊνών στην SDS-PAGE [βάσει της θέσης της ανέπαφης XanQ(Cys-less)-BAD της οποίας η μάζα υπολογίζεται από την αλληλουχία στα 59,46 kDa αλλά μεταναστεύει στα **46,02 kDa**, ο συντελεστής διόρθωσης είναι $59,46/46,02 = 1,29x$] τα μεγέθη των θραυσμάτων μπορούν να συσχετισθούν με τις προβλεπόμενες *in silico* θέσεις πρωτεολυτικής πέψης, ως εξής: το ηλεκτροφορητικό μέγεθος **38,00 kDa** αντιστοιχεί σε μοριακή μάζα 49,04 kDa, που προσεγγίζει αυτήν του πολυπεπτιδίου XanQ(109-466)-BAD (από πρωτεόλυση στη θέση Lys-108) η οποία υπολογίζεται θεωρητικά στα 48,10 kDa, το μέγεθος **35,16 kDa** αντιστοιχεί σε μάζα 45,36 kDa, που πλησιάζει αυτήν του XanQ(165-466)-BAD (από πρωτεόλυση στη θέση Lys-164) η οποία υπολογίζεται θεωρητικά στα 42,24 kDa, το μέγεθος **31,69 kDa** αντιστοιχεί σε μάζα 40,88 kDa, δηλ. περίπου αυτήν του XanQ(178-466)-BAD (από πρωτεόλυση στη θέση Lys-177) η οποία υπολογίζεται θεωρητικά στα 40,90 kDa, το **29,08 kDa** αντιστοιχεί σε μάζα 37,51 kDa, που πλησιάζει αυτήν του XanQ(238-466)-BAD (από πρωτεόλυση στη θέση Arg-237) η οποία υπολογίζεται στα 34,67 kDa, το **23,87 kDa** αντιστοιχεί σε μάζα 30,79 kDa, που πλησιάζει αυτήν του XanQ(250-466)-BAD (από πρωτεόλυση στη θέση Lys-249) η οποία υπολογίζεται στα 33,27 kDa, ενώ το μέγεθος **16,48 kDa** πλησιάζει την μοριακή μάζα του XanQ(419-466)-BAD (από πρωτεόλυση στη θέση Lys-418) η οποία υπολογίζεται στα 15,43 kDa (βλ. Εικόνα 3.2.33A).

Κατά συνέπεια, η πέψη με θρουψίνη δίνει ένα σύνθετο ηλεκτροφορητικό πρότυπο πρωτεόλυσης της XanQ, που μπορούμε να υποθέσουμε ότι περιλαμβάνει μερική πέψη σε όλες τις θέσεις Lys-x ή Arg-x που είναι εκτεθειμένες προς το περίπλασμα (K108, K164, K177, R237, K249, K418) αλλά και διατήρηση σημαντικού μέρους (σε ποσοστό περίπου 15%) της ανέπαφης (μη πρωτεολυμένης) XanQ (ζώνη στα 46,02 kDa) (Εικόνα 3.2.29A,B). Η προεπάση με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS διαφορετικού μήκους και ευκαμψίας, MTS-3-MTS (5Å), MTS-6-MTS (9Å), MTS-8-O2-MTS (11Å), MTS-11-O3-MTS (15Å), MTS-14-O4-MTS (17Å) και MTS-17-O5-MTS (22Å) (βλ. 3.2.2.1), φαίνεται να επηρεάζει το ηλεκτροφορητικό πρότυπο πρωτεόλυσης σε τρία κυρίως σημεία: (I) αυξάνει την ένταση του σήματος της ζώνης των 46,02 kDa

(ανέπαφη XanQ), υποδηλώνοντας μερική προστασία από την πρωτεόλυση με τη θρυψίνη ή από την απελευθέρωση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων, (II) προκαλεί την εμφάνιση μιας επιπλέον ζώνης στα 41,24 kDa (ή 53,20 kDa, με βάση τον συντελεστή διόρθωσης $59,46/46,02 = 1,29x$) η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί σε μεταβολή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας της XanQ μετά από ομοιοπολική σύνδεση των θέσεων H257C και E429C μέσω των MTS-linker-MTS, ή ίσως αποκάλυψη μιας «κρυπτικής» θέσης πρωτεόλυσης στη θέση Arg-78 (TM2) που είναι εντοπισμένη προς το κυτταρόπλασμα αλλά πιθανόν να εκτίθεται στη δράση της θρυψίνης λόγω της αλλαγής διαμόρφωσης όταν οι κυστεΐνες στις θέσεις 257-429 είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους [η μοριακή μάζα του πολυπεπτιδίου XanQ(79-466)-BAD προβλέπεται με βάση την αλληλουχία στα 51,32 kDa], (III) στα δείγματα που έχουν προεπωασθεί με MTS-linker-MTS μήκους 11-22Å, μειώνει κατά 50-70% την ένταση του σήματος της ζώνης των 16,48 kDa (πεπτίδιο της XanQ-BAD που απομένει μετά από πρωτεόλυση στη θέση Lys-418), υποδηλώνοντας μερική προστασία από την απελευθέρωση του τμήματος XanQ(419-466)-BAD από την πρωτεόλυση με θρυψίνη.

Συνοπτικά, αν και το πρότυπο μερικής πρωτεόλυσης της XanQ από τη θρυψίνη δεν επιτρέπει ασφαλή συμπεράσματα, τα αποτελέσματα δίνουν μια ισχυρή ένδειξη ότι οι θέσεις H257C-E429C αλληλοσυνδέονται πράγματι μέσω των αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS, ιδιαίτερα με τα αντιδραστήρια μήκους 11-22Å, δηλ. MTS-8-O2-MTS (11Å), MTS-11-O3-MTS (15Å), MTS-14-O4-MTS (17Å) και MTS-17-O5-MTS (22Å) (βλ. Εικόνα 3.2.29 και σημεία I-III, παραπάνω).



Εικόνα 3.2.33: Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της επίδρασης αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στο πρότυπο πρωτεόλυσης της περμεάσης XanQ (H257C/ E429C) από θρουψίνη

A. Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSOs, βλ. 2.8) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την αντίστοιχη κατασκευή από πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις

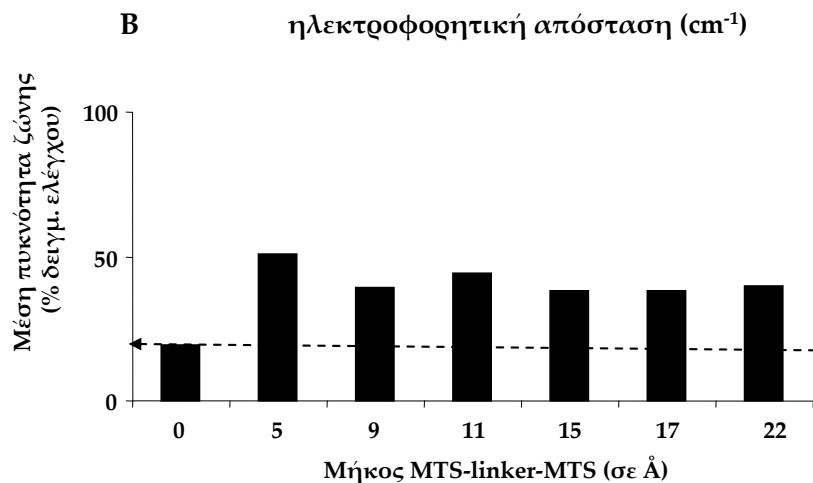
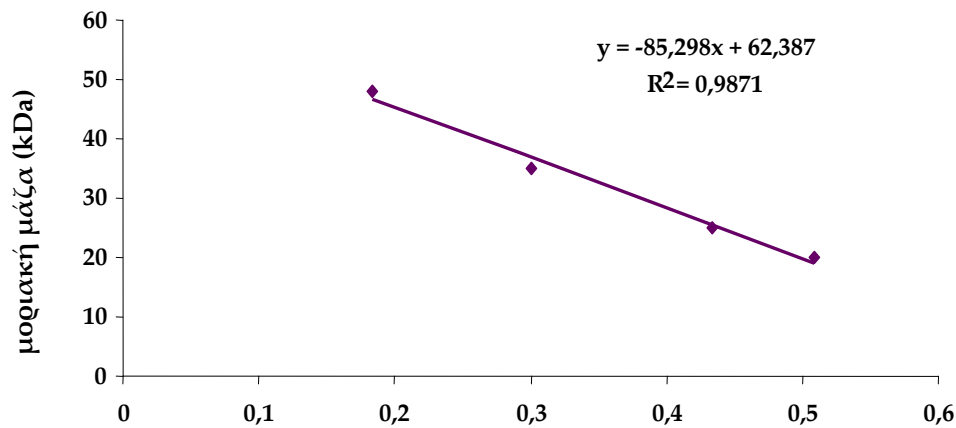
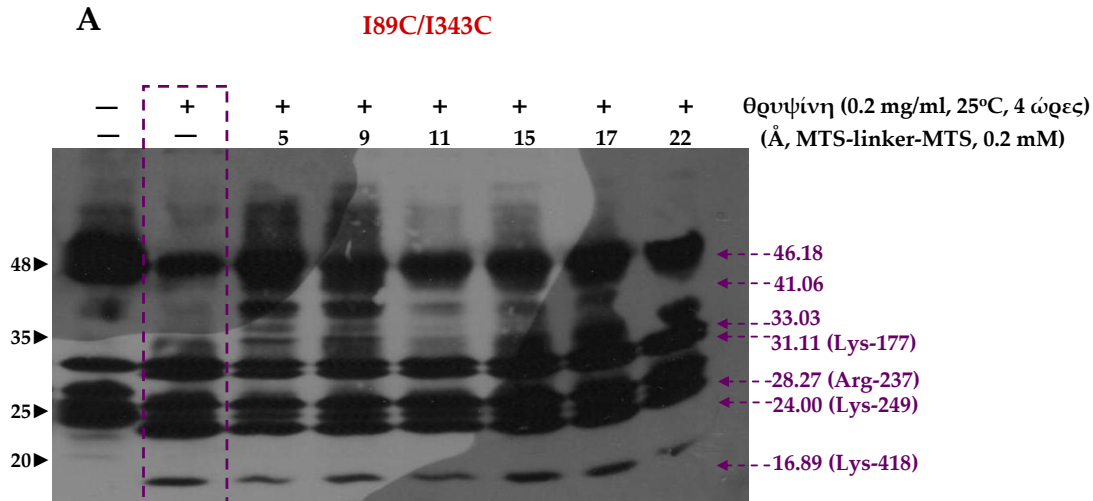
αντικαταστάσεις H257C/E429C (2 mg/mL) επώασθησαν με τα αντιδραστήρια σταυρωτής σύνδεσης (MTS-linker-MTS, 0,2 mM) (βλ. 2.13) και, στη συνέχεια, με θρυψίνη (0,2 mg/mL, 4 h, 25 °C) (βλ. 2.13.2) και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) (100 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range) που δίνονται στα αριστερά της εικόνας μετρώνται σε kDa. Στα δεξιά της εικόνας του πηκτώματος δίνονται τα προσεγγιστικά μεγέθη κάθε ζώνης σε kDa όπως προκύπτουν από την μαθηματική σχέση εξάρτησης των μεγεθών από την ηλεκτροφορητική απόσταση (που έχει εξαχθεί βάσει των πρωτεϊνών των πρότυπων μοριακών μαζών και φαίνεται στο διάγραμμα από κάτω). Επίσης, σε παρένθεση δίνονται οι αντίστοιχες πιθανές θέσεις Lys-x ή Arg-x στις οποίες υδρολύει την περμεάση η θρυψίνη για κάθε ζώνη (βλ. κείμενο και Εικόνα 3.2.32).

B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ζώνης των 46 kDa (μαύρες στήλες) και της ζώνης των 16 kDa (άσπρες στήλες), σε συνάρτηση με το μήκος των αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS που χρησιμοποιήθηκαν, ως % της έκφρασης του δείγματος προτύπου πέψης της θρυψίνης απουσία αντιδραστηρίων cross linking (μωβ διακεκομμένο πλαίσιο), όπως υπολογίσθηκε με το πρόγραμμα Quantity One (βλ. 2.14).

Για το μετάλλαγμα I89C/I343C (Εικόνα 3.2.34) τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η δράση της θρυψίνης στο δείγμα ελέγχου (χωρίς προεπάση με MTS-linker-MTS) προκαλεί μερική πέψη του μορίου σε τουλάχιστον πέντε θέσεις απελευθερώνοντας πέντε πεπτιδικά θραύσματα που περιέχουν BAD (και ανιχνεύονται στην ανοσοαποτύπωση με αβιδίνη), με μεγέθη που αντιστοιχούν κατά προσέγγιση σε 31-33 kDa (δύο θραύσματα), 24-28 kDa (δύο θραύσματα) και 16,8 kDa (Εικόνα 3.2.34A). Η εμφάνιση επιπλέον ζώνης στην περιοχή των 25 kDa και απουσία θραυσμάτων σε μεγέθη 38 kDa και 35 kDa, τα οποία είχαν ανιχνευθεί στο δείγμα ελέγχου του προηγούμενου πειράματος (Εικόνα 3.2.33A), μπορούν να αποδοθούν σε μη ειδική πρωτεόλυση της XanQ(I89C/I343C) που φαίνεται και στο αρχικό δείγμα ελέγχου χωρίς τη δράση της θρυψίνης (Εικόνα 3.2.34, πρώτη διαδρομή από αριστερά). Η εμφάνιση ζωνών που μπορεί να οφείλονται τόσο στη δράση της θρυψίνης όσο και σε μη ειδική πρωτεόλυση, στην περίπτωση αυτή, δυσχεραίνει την ερμηνεία της ηλεκτροφορητικής εικόνας όταν προηγείται προεπάση με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS. Με βάση την ανάλυση των ηλεκτροφορητικών μεγεθών που παρουσιάσαμε για την Εικόνα 3.2.33, η ενδεχόμενη διασύνδεση των κυστεϊνών στις θέσεις I89C-I343C (TM3-TM11) θα περιμέναμε να οδηγεί σε μείωση της έντασης των ζωνών των μεγεθών 31-33 kDa και 24-28 kDa (προστασία από την απελευθέρωση των τμημάτων από πρωτεόλυση στις θέσεις K177-x/R237-x και K249-x, αντίστοιχα, οι οποίες είναι ενδιάμεσες μεταξύ I89C και I343C), αύξηση του σήματος της ζώνης της ανέπαφης XanQ (στα 46 kDa), λόγω της προστασίας από την απελευθέρωση των ενδιάμεσων τμημάτων, ενώ δεν θα επηρεαζόταν το σήμα στο μικρού μεγέθους πρωτεολυτικό θραύσμα (16,5 kDa), καθώς η αντίστοιχη θέση πρωτεόλυσης (K418-x) είναι μετά την I343C (βλ. και Εικόνα 3.2.32). Η ανάλυση των

μεταβολών της έντασης της ζώνης των 46 kDa (ανέπαφη XanQ) υποδεικνύει πράγματι μία αύξηση κατά 2x έως 2,5x με όλα τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS που χρησιμοποιούνται (Εικόνα 3.2.34B), ενώ δεν μπορούν να εκτιμηθούν οι πιθανές μεταβολές στην ένταση των ζωνών των 31-33 kDa και 24-28 kDa λόγω της παρουσίας μη ειδικών πρωτεολυτικών θραυσμάτων στις θέσεις αυτές, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.2.34 δεν είναι σαφή, αλλά δίνουν μια ένδειξη ότι οι θέσεις I89C-I343C πράγματι αλληλοσυνδέονται μέσω των MTS-linker-MTS, σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξαρτήτως του μήκους των αντιδραστηρίων διασύνδεσης (5-22Å). Εφόσον ισχύει κάτι τέτοιο, τα λειτουργικά αποτελέσματα της επίδρασης των αντιδραστηρίων αυτών στην ενεργότητα του μεταλλάγματος I89C/I343C (βλ. Εικόνα 3.2.22B) μπορούν να εξηγηθούν ως εξής: Για τα πέντε αντιδραστήρια σχετικά μεγάλου μήκους (9-22Å), αυτά διασυνδέονται και προκαλούν απενεργοποίηση της περμεάσης γιατί απομακρύνουν τις δύο θέσεις I89C-I343C σε απόσταση $\geq 6\text{\AA}$ (βλ. 3.2.2.1) πράγμα που παρεμποδίζει τις αλλαγές διαμόρφωσης στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης. Το μικρότερο αντιδραστήριο, MTS-3-MTS (5Å), διασυνδέεται αλλά δεν επηρεάζει καθόλου την ενεργότητα της περμεάσης (Εικόνα 3.2.22B) γιατί η σχετικά περιορισμένη ευελιξία του (3-6Å) διατηρεί τις δύο θέσεις I89C-I343C σε μικρή απόσταση (απέχουν 5Å στη διαμόρφωση που εμφανίζεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο), πράγμα που φαίνεται να χρειάζεται στον μηχανισμό λειτουργίας για την πλήρη ενεργότητα της XanQ.



Εικόνα 3.2.34: Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της επίδρασης αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS στο πρότυπο πρωτεόλυσης της περμεάσης XanQ(I89C/I343C) από θρουψίνη

A. Μεμβρανικά κυστίδια ορθού προσανατολισμού (RSOs, βλ. 2.8) από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την αντίστοιχη κατασκευή από πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD με τις αντικαταστάσεις I89C/I343C (2 mg/mL) επώασθησαν με τα αντιδραστήρια σταυρωτής σύνδεσης (MTS-linker-MTS, 0.2 mM) (βλ. 2.13) και, στη συνέχεια, με θρουψίνη (0.2 mg/mL, 4 h, 25 °C) (βλ. 2.13.2) και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) (100 μg ολικής πρωτεΐνης

ανά διαδρομή) και ανοσοαποτύπωση με χρήση αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000 (βλ. 2.10). Τα πρότυπα μοριακά βάρη (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range) που δίνονται στα αριστερά της εικόνας μετρώνται σε kDa. Στα δεξιά της εικόνας του πηκτώματος δίνονται τα προσεγγιστικά μεγέθη κάθε ζώνης σε kDa όπως προκύπτουν από την μαθηματική σχέση εξάρτησης των μεγεθών από την ηλεκτροφορητική απόσταση (που έχει εξαχθεί βάσει των πρωτεϊνών των πρότυπων μοριακών μαζών και φαίνεται στο διάγραμμα από κάτω). Σε παρένθεση δίνονται αντίστοιχες πιθανές θέσεις Lys-x ή Arg-x στις οποίες υδρολύει την περμεάση η θρυψίνη (βλ. κείμενο και Εικόνα 3.2.32).

B. Ποσοτικοποίηση της ζώνης των 46 kDa (μη πρωτεολυμένη, ανέπαφη XanQ) σε συνάρτηση με το μήκος των αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS, ως % της έκφρασης του δείγματος προτύπου πέψης της θρυψίνης απουσία αντιδραστηρίων cross linking (μωβ διακεκομμένο πλαίσιο), όπως υπολογίσθηκε με το πρόγραμμα Quantity One (βλ. 2.14).

Σύνοψη των κυριότερων αποτελεσμάτων της ενότητας 3.2.2

Σε αυτή την ενότητα έγινε μελέτη για την ανίχνευση σχέσεων εγγύτητας μεταξύ διαφορετικών θέσεων αμινοξέων στην περμεάση XanQ που βασίστηκε στην ανίχνευση φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ζευγών κυστεϊνών από διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης παρουσία μιας σειράς διλειτουργικών αντιδραστηρίων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS), με διαφορετικό μήκος και ευκαμψία (3-22Å), η σύνδεση των οποίων στις πλευρικές ομάδες των δύο κυστεϊνών μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην ενεργότητα του μεταφορέα και προσδιορίζει τα όρια στην απαραίτητη απόσταση που πρέπει να υπάρχει μεταξύ τους για την σωστή διαμόρφωση μιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Τα λειτουργικά αυτά πειράματα εφαρμόστηκαν για τρία μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών (H257C/E429C, I89C/I343C, I167C/T373C) της XanQ, όπου μετρήθηκε η επίπτωση της προεπάσης με έξι διαφορετικά αντιδραστήρια (MTS-3-MTS, MTS-6-MTS, MTS-8-O2-MTS, MTS-11-O3-MTS, MTS-14-O4-MTS, MTS-17-O5-MTS) στην ενεργότητα (για όλα τα μεταλλάγματα) αλλά και στην ανασταλτική επίδραση των ιόντων δισθενούς καδμίου (για το H257C/E429C, βλ. 3.2.1.2). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι:

1. Στην περίπτωση του H257C/E429C, όπου το ζεύγος κυστεϊνών εισάγεται σε απομακρυσμένες θέσεις της XanQ (απέχουν περίπου 20Å στη διαμόρφωση που προβλέπει το κρυσταλλογραφικό μοντέλο) ανάμεσα στις δομικές περιοχές του «πυρήνα» (Cys-257, TM8) και της «εισόδου» (Cys-429, TM14), η ενεργότητα αναστέλλεται σημαντικά από αντιδραστήρια διασύνδεσης σχετικά μικρού μήκους (5-15Å) ενώ τα αντιδραστήρια MTS-14-O4-MTS (17Å) και MTS-17-O5-MTS (22Å) διατηρούν υψηλή ενεργότητα, υποδεικνύοντας την απαίτηση για μεγάλη ευελιξία κινήσεων στις θέσεις αυτές (μέγιστη απομάκρυνση 17-22Å και ελάχιστη εγγύτητα 3Å) ώστε να μπορεί να λειτουργεί αποτελεσματικά ο μηχανισμός ενεργού μεταφοράς στην XanQ. Με εξαίρεση τα δύο πιο μικρά αντιδραστήρια, MTS-3-MTS (5Å) και MTS-6-MTS (9Å), που είναι πιθανόν να μην διασυνδέονται ανάμεσα στις δύο θέσεις αλλά να επηρεάζουν την ενεργότητα με σύνδεση σε κάθε θέση ξεχωριστά, τα άλλα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS (11-22Å) βρέθηκε ότι μπορούν να καταργήσουν την ανασταλτική επίδραση των ιόντων καδμίου στην ενεργότητα της περμεάσης, παρέχοντας μια έμμεση απόδειξη ότι πράγματι διασυνδέονται ανάμεσα στις δύο θέσεις H257C-E429C (TM8-TM14).

2. Στην περίπτωση I89C/I343C, όπου εξετάζονται δύο θέσεις της XanQ στην ίδια δομική περιοχή, του «πυρήνα» (Cys-89, α3, με Cys-343, TM11), οι οποίες απέχουν μόνο 5Å στη διαμόρφωση που εμφανίζεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο με βάση τη δομή του ομολόγου UraA, η προεπάση με όλα τα αντιδραστήρια διασύνδεσης εκτός του μικρότερου

(MTS-3-MTS) οδηγεί σε απενεργοποίηση της περμεάσης, ενώ το αντιδραστήριο MTS-3-MTS (5Å) επιτρέπει τη διατήρηση πλήρους ενεργότητας, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει αυστηρός περιορισμός στις μεταβολές της απόστασης μεταξύ των δύο θέσεων: η σχετικά περιορισμένη ευελιξία του MTS-3-MTS (3-6Å) επιτρέπει στις δύο θέσεις να μην απομακρύνονται μεταξύ τους, πράγμα που φαίνεται να χρειάζεται κατά τον μηχανισμό λειτουργίας, αλλά η διασύνδεση με τα άλλα αντιδραστήρια (9-22Å) απενεργοποιεί γιατί απομακρύνει τις θέσεις I89C-I343C σε απόσταση $\geq 6\text{\AA}$, πράγμα που εμποδίζει τις αλλαγές διαμόρφωσης στον μηχανισμό λειτουργίας.

3. Για το μετάλλαγμα I167C/T373C, η ενεργότητα δεν επηρεάζεται από κανένα από τα έξι αντιδραστήρια διασύνδεσης, υποδεικνύοντας ότι οι δύο κυστεΐνες που βρίσκονται σε θέσεις της δομικής περιοχής «εισόδου» (Cys-167, TM5, με Cys-373, TM12) μπορεί να μην είναι προσβάσιμες από τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS.

Στην συνέχεια εξετάσθηκε η εφαρμογή πειραμάτων σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (cross linking) μέσω των αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS, χρησιμοποιώντας κυρίως τα μεταλλάγματα H257C/E429C και I89C/I343C της XanQ, σε συνδυασμό με τέσσερις πιθανές πειραματικές μεθοδολογίες για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων (πέψη με CNBr μετά από μεταλλαξιγένεση μεθειονινών, πέψη με Χα μετά από εισαγωγή θέσεων αναγνώρισης του Χα, πέψη με θρυψίνη, έκφραση της περμεάσης σε δύο αλληλοσυμπληρούμενα ξεχωριστά τμήματα μετά από γενετική τροποποίηση):

1. Η μέθοδος της πρωτεόλυσης με θρυψίνη ήταν η μόνη που τελικά εφαρμόστηκε με σχετική επιτυχία και τα αποτελέσματα ενίσχυσαν τις ενδείξεις των λειτουργικών πειραμάτων για παρουσία σταυρωτής αλληλοσύνδεσης των ζευγών H257C (TM8) με E429C (TM14) και I89C ($\alpha 3$) με I343C (TM11) με όλα τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS που χρησιμοποιήθηκαν. Πιθανή εξαίρεση αποτελούν οι περιπτώσεις των MTS-3-MTS και MTS-6-MTS με το H257C/E429C για τις οποίες δεν ανιχνεύθηκε προστασία από την απελευθέρωση ενός πεπτιδίου 16,5 kDa (από πρωτεόλυση στη θέση K418-x) που αποτελεί έναν από τους δείκτες για τη διασύνδεση μεταξύ των δύο αυτών κυστεϊνών. Πάντως, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ήταν προσεγγιστική, λόγω του σύνθετου προτύπου της πρωτεόλυσης από τη θρυψίνη, όπως αποτυπώθηκε στην ηλεκτροφόρηση, το οποίο υποδεικνύει μερική πέψη της περμεάσης στις έξι τουλάχιστον θέσεις Lys-x ή Arg-x που είναι εκτεθειμένες προς το περίπλασμα.

2. Η μέθοδος της πέψης με ειδική πρωτεάση (παράγοντας Χα) δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί γιατί η εισαγωγή αλληλουχιών αναγνώρισης της πρωτεάσης Χα σε μία από τις δύο μεγάλες ελεύθερες συνδετικές περιοχές του μορίου (I_p7 και I_p13, Εικόνα 3.2.25) προκάλεσε απενεργοποίηση και μείωση στο

ελάχιστο των επιπέδων έκφρασης της XanQ στη μεμβράνη, υποδεικνύοντας ότι οι δύο αυτές συνδετικές περιοχές είναι σημαντικές για την δομική σταθερότητα της πρωτεΐνης στην μεμβράνη.

3. Η μέθοδος της χημικής πρωτεόλυσης με CNBr δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί αποτελεσματικά, λόγω τεχνικών προβλημάτων του συνδυασμού της αντίδρασης του CNBr και της προεπάσης με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS, καθώς και της πολλαπλής μεταλλαξιγένεσης της XanQ σε κατάλοιπα μεθειονινών, όπως απαιτείται, η οποία μειώνει σημαντικά την έκφραση και/ή την ενεργότητα (Εικόνα 3.2.24). Ως αποτέλεσμα μπορεί να καταγραφεί η εικόνα του τρόπου πρωτεόλυσης της XanQ από CNBr παρουσία δεκαέξι (16) εγγενών καταλοίπων Met στην αλληλουχία (μετά την αντικατάσταση τριών από τις εγγενείς Met, M282V/M331V/M465V) η οποία υποδεικνύει μερική πρωτεόλυση σε πέντε συνολικά θέσεις Met-x που φαίνεται να είναι εκτεθειμένες στη δράση του CNBr (Εικόνα 3.2.27).

4. Η μέθοδος του ελέγχου ετεροδιμερισμού δύο ανεξάρτητων πολυπεπτιδίων, δηλαδή της έκφρασης της περμεάσης σε δύο αλληλοσυμπληρούμενα ξεχωριστά τμήματα μετά από γενετική τροποποίηση σε δύο ανεξάρτητες κωδικοποιούσες περιοχές (splits), θεωρήθηκε, έπειτα από αξιολόγηση των νεότερων δεδομένων από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο του UraA (Lu *et al.*, 2011), ότι δεν μπορεί να εφαρμοστεί για την XanQ καθώς η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο ασυνεχείς διαφορετικές δομικές περιοχές (TM1-4/8-11, ή περιοχή «πυρήνα» και TM5-7/12-14, περιοχή «εισόδου») και δεν εμπίπτει στην κατηγορία των περμεασών που μπορούν να εκφραστούν λειτουργικά ως διακοπτόμενες (split) περμεάσες (υπεροικογένεια MFS).

4. Συζήτηση

4.1 Συνεισφορά της διατριβής στη χαρτογράφηση καταλοίπων αμινοξέων με κομβικό ρόλο στην λειτουργία και την εξειδίκευση της περμεάσης XanQ

4.1.1 Στρατηγική της ερευνητικής προσέγγισης που εφαρμόζεται για την ανάλυση της XanQ

Η πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων από το εξωκυτταρικό περιβάλλον είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, είτε αυτά ανήκουν σε οργανισμούς όπου η σύνθεση νουκλεοτιδίων στηρίζεται σε μονοπάτια περίσωσης, είτε σε συστήματα όπου αυτές χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου και άνθρακα κατά τις καταβολικές διεργασίες. Ο μηχανισμός εισόδου των νουκλεοτιδικών βάσεων στο κύτταρο απαιτείται να είναι απόλυτα ελεγχόμενος και αυτό επιτυγχάνεται μέσω υψηλά εξειδικευμένων μεμβρανικών συστημάτων μεταφοράς, που ποικίλουν σε επίπεδο οργανισμών αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο. Στο σύνολο των οικογενειών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων ανήκει και η οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-κατιόντων αριθμός 2 (NCS2), η οποία είναι ευρύτατα διαδεδομένη κατά την εξέλιξη και περιλαμβάνει, με βάση τις γονιδιωματικές αναλύσεις, περισσότερους από 6000 δυνητικούς μεταφορείς, οι οποίοι εμφανίζουν ιδιαίτερα συντηρημένη την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (binding-site architecture), αλλά διαφοροποιούνται αισθητά σε σχέση με το υπόστρωμα που μεταφέρουν. Μέχρι σήμερα ελάχιστα μέλη της οικογένειας έχουν χαρακτηριστεί αναλυτικά, μόνο δύο έχουν μελετηθεί συστηματικά (UapA, XanQ) και υπάρχει δημοσιευμένη μόνο μία κρυσταλλική δομή του ομολόγου μέλους της οικογένειας UraA (Lu *et al.*, 2011). Στην οικογένεια αυτή ανήκει και ο συμμεταφορέας H⁺: Ξανθίνης (περμεάση Ξανθίνης) XanQ της *Escherichia coli*, ο οποίος χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας ως πρότυπο μελέτης των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NCS2 (Frillingos, 2012). Τα αποτελέσματα τέτοιων εργασιών συνεισφέρουν αφενός στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την λειτουργία του ενεργού κέντρου και την εξέλιξη των διαφορετικών εξειδικεύσεων και αφετέρου στην δυνατότητα εφαρμογής τους για τον σχεδιασμό ειδικών αντιμικροβιακών φαρμάκων (ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων).

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε με μεθόδους κυστεϊνικής σάρωσης και στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης ο λειτουργικός χαρακτηρισμός 110 καταλοίπων της περμεάσης XanQ και, στη συνέχεια, χαρακτηρισμός μεταλλαγμάτων με ζεύγη κυστεϊνών για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών περιοχών της XanQ κατά το μηχανισμό της μεταφοράς. Η μελέτη αυτή συμπληρώνει και ολοκληρώνει μια σειρά εργασιών, που είχαν

προηγηθεί (Karatza and Frillingos, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Mermelekas *et al.*, 2010; Georgopoulou *et al.*, 2010) για την λειτουργική ανάλυση του μεγαλύτερου μέρους της αλληλουχίας καταλοίπων του μεταφορέα (>60% του συνόλου 466 καταλοίπων), με τελικό στόχο την κατανόηση της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των διαμεμβρανικών τμημάτων της XanQ και της σημασίας που έχει κάθε εξεταζόμενη θέση αμινοξέος στον μηχανισμό λειτουργίας τόσο της XanQ όσο και, κατ' επέκταση, σε μια πρώτη προσέγγιση, όλων των συγγενικών μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NCS2.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι να εντοπισθούν αρχικά στην ευρύτερη περιοχή των πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων (α) ισχυρά πολικά και δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα και (β) χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας συντηρημένα σε υψηλό βαθμό μεταξύ των ομολόγων μεταφορέων πουρινών, τα οποία μελετώνται συστηματικά με μεταλλαξιγένεση, ενώ γίνεται για πρώτη φορά διεξοδική μελέτη ενός ολόκληρου διαμεμβρανικού τμήματος (TM3), που φαίνεται να συμμετέχει καθοριστικά στον μηχανισμό της εξειδικευμένης μεταφοράς ξανθίνης, από την πλευρά του αμινοτελικού ημίσεος του μορίου της περμεάσης. Στην συνέχεια αξιολογώντας τα αποτελέσματα σύμφωνα με τη δομή του κρυσταλλικού μοντέλου του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011) και με λεπτομερή φυλογενετική ανάλυση των συγγενέστερων ομολόγων (βλ. 3.1.4), τα πειραματικά δεδομένα συνδυάζονται σε ένα αρχικό μοντέλο διεύθεσης των α-ελίκων της XanQ, εστιασμένο στο κέντρο δέσμησης του μεταφορέα. Με βάση το μοντέλο αυτό έγινε μια πρώτη προσπάθεια εντοπισμού σχέσεων εγγύτητας στην περμεάση XanQ, μέσω της ανίχνευσης φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ζευγών κυστεϊνών από διαφορετικά διαμεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης και της λειτουργικής επίπτωσης που έχει η παρεμπόδιση τέτοιων αλληλεπιδράσεων σε διάφορες πειραματικές συνθήκες. Εφαρμόστηκαν μια σειρά πειραματικών μεθοδολογιών με στόχο να εκτιμηθούν οι αποστάσεις μεταξύ διαφορετικών θέσεων καταλοίπων της περμεάσης και η δυναμική των αλλαγών αυτών των αποστάσεων κατά τον μηχανισμό λειτουργίας.

4.1.2 Συμπεράσματα για τον ρόλο πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων πλευρικών ομάδων της δομικής περιοχής «πυρήνα» της XanQ

Ιοντιζόμενα κατάλοιπα σε διαμεμβρανικά τμήματα πολλών πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς που απαντώνται σε εξελικτικά συντηρημένες θέσεις της αλληλουχίας μεταφορέων έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικά είτε για τη σταθεροποίηση της λειτουργικής δομής μέσω σχηματισμού ιοντικών γεφυρών άλατος είτε ως αναντικατάστατες συνιστώσες του κέντρου δέσμησης και

μεταφοράς υποστρώματος (Macara and Cantley, 1981; Senior, 1983; Cain and Simoni, 1988; Catterall, 1988; Klingenberg, 1988; Stern and Khorana, 1989; Miller *et al.*, 1990; Frillingos *et al.*, 1998; Sambongi *et al.*, 1999; Abramson *et al.*, 2003, Kaback *et al.*, 2007). Από τα τριάντα ένα (31) ισχυρά πολικά ή δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα της πρωτεΐνης XanQ που εντοπίστηκαν να εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα (σε περιοχές α -ελίκων, β -πτυχωτών φύλλων ή ελεύθερης διαμόρφωσης), τα είκοσι δύο (22) που δεν είχαν ήδη μελετηθεί στις προηγούμενες μελέτες (Karatza *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008; Mermelekas *et al.*, 2010) αναλύθηκαν διεξοδικά και χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά στην παρούσα διατριβή [His-22, Gln-23, Thr-30, His-31 (TM1), Glu-55, Gln-75 (TM2), Gln-90 (TM3), Asn-93 (α 3), Lys-164 (TM5), Asn-184, Glu-186, His-187 (TM6), Asp-232 (TM7), Lys-249, His-257, Gln-258, Glu-272 (TM8), Asp-304 (TM9), Arg-341 (TM11), Arg-385, Asn-390 (TM12), Asp-413 (α 13)].

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν κατάλοιπα αναντικατάστατα ή/και πολύ σημαντικά για την λειτουργία της περμεάσης XanQ που εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε διαμεμβρανικά τμήματα της δομικής περιοχής «πυρήνα». Αρχικά οι καρβοξυλομάδες των υψηλά συντηρημένων καταλοίπων **Glu-272** (TM8) και **Asp-304** (TM9) της XanQ, που εντοπίζονται ανοδικά της περιοχής του μοτίβου-υπογραφή (Karatza *et al.*, 2006), είναι αναντικατάστατες στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς και η αναγκαιότητα της παρουσίας τους δεν επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία ή το pH (βλ. 3.1.1). Περαιτέρω, ακόμη και συντηρητικότερες αντικαταστάσεις στις θέσεις Glu-272 και Asp-304, με διατήρηση της καρβοξυλομάδας και αυξομείωση της πλευρικής της αλυσίδας κατά μία μεθυλενομάδα (Asp σε Glu ή Glu σε Asp) ή εισαγωγή μίας καρβονυλομάδας με πλευρική αλυσίδα αντίστοιχου μεγέθους (Asn, Gln) οδηγούν σε απώλεια ενεργότητας. Επομένως, η ύπαρξη αυτή καθαυτή της καρβοξυλομάδας αλλά και η γεωμετρία της πλευρικής αλυσίδας στις θέσεις αυτές είναι πολύ σημαντικές για τη λειτουργία. Τα αντίστοιχα κατάλοιπα στον ομόλογο μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Glu-356 και Asp-388) έχει επίσης αποδειχτεί ότι είναι σημαντικά για την πρόσληψη ξανθίνης/ουρικού οξέος από τον μεταφορέα (Parageorgiou *et al.*, 2008). Τα κατάλοιπα Glu-272 και Asp-304 του XanQ ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή των TM8-TM11 (His-257 μέχρι Pro-354), η οποία, αν συνυπολογίσουμε και δεδομένα των άλλων μελετών για το TM8 (Asp-276, Mermelekas *et al.*, 2010) και το TM10 (Gln-324, Asn-325, Karatza *et al.*, 2006; Georgoroulou *et al.*, 2010), όπως αναφέρονται παρακάτω, χαρακτηρίζεται κείρας σημασίας αφού περιέχει τα περισσότερα από τα σημαντικά κατάλοιπα της δομικής περιοχής «πυρήνα».

Στις έλικες TM8-TM11 (καρβοξυτελικό ήμισυ της δομικής περιοχής «πυρήνα») εκτός από τα Glu-272 και Asp-304 εντοπίζονται επίσης τα

αναντικατάστατα για τη λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης Gln-324, Asn-325 και Asp-276 (αναντικατάστατη καρβοξυλομάδα) (Karatza *et al.*, 2006; Mermelekas *et al.*, 2010). Τρία από τα κατάλοιπα αυτά, στην ομόλογη περμεάση UraA προτείνεται (από τους Lu *et al.*, 2011) ότι δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με το υπόστρωμα είτε άμεσα (Glu-272/Glu-241 και Gln-324/Glu-290) είτε μέσω μορίων νερού (Asp-276/His-245). Αποκατάσταση μιας πιθανής διαμεμβρανικής ισορροπίας φορτίων στην δομή της XanQ, με μεταλλάγματα ζευγών Cys μεταξύ Asp-304/Glu-272 και His-31 ή Arg-385, ή πιθανή επαναφορά ενός αρνητικού φορτίου στις θέσεις των Asp-304/Glu-272 με τροποποίηση της E272C ή της D304C με το αντιδραστήριο MTSES, δεν διασώζει την μηδενική ενεργότητα των μεταλλαγμάτων E272C και D304C (βλ. 3.1.1). Άρα, δεν φαίνεται εδώ να υπάρχει η περίπτωση ιοντικών ζευγών, όπως των Asp240-Lys319 ή Asp237-Lys358 της LacY (βλ. Sahin-Toth *et al.*, 1992; Frillingos *et al.*, 1995), όπου αναντικατάστατα δεν είναι τα ίδια τα κατάλοιπα αλλά η ύπαρξη θετικού ή αρνητικού φορτίου στις αντίστοιχες θέσεις ή η ισορροπία φορτίων του διαμεμβρανικού ζεύγους (Sahin-Toth *et al.*, 1992; Abramson *et al.*, 2003). Τα δεδομένα αυτά συντείνουν επίσης σε έναν πιο κεντρικό, αναντικατάστατο ρόλο των Glu-272 και Asp-304 στην λειτουργία της περμεάσης XanQ.

Στο αμινοτελικό ήμισυ της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM1-TM4) εντοπίστηκαν επίσης πολύ σημαντικά κατάλοιπα για τη λειτουργία της XanQ από τα ισχυρά πολικά ή ιοντιζόμενα κατάλοιπα που μελετήθηκαν (βλ. 3.1.1). Πρόκειται για την His-31 (TM1), την Gln-75 (TM2) και την Asn-93 (TM3). Η απόλυτα συντηρημένη **His-31** βρίσκεται στο μέσον του TM1, δίπλα στο πολικό κατάλοιπο Thr-30, το οποίο εμφανίζεται ως Gln σε όλους τους υπόλοιπους γνωστούς μεταφορείς της οικογένειας NCS2. Είναι ένα κατάλοιπο προσβάσιμο από το υδροφίλο περιβάλλον (όπως φαίνεται από την επίδραση που έχουν στην περμεάση H31C τα αντιδραστήρια NEM και MTSEA⁺), που εμφανίζεται να επηρεάζει αρνητικά την συγγένεια αναγνώρισης της ξανθίνης και αναλόγων ξανθίνης καθώς και την μεταφορά του υποστρώματος όταν δεν εξασφαλίζονται οι συνθήκες αποπρωτονίωσης του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πλευρικής της ομάδας (ερμηνεία που εξηγεί τις χαμηλές συγγένειες αναγνώρισης αναλόγων του υποστρώματος και μεγάλες τιμές K_m για μεταφορά ξανθίνης που εμφανίζουν οι περμεάσες H31C και H31L). Συνοπτικά, φαίνεται ότι η His-31 συμμετέχει σε κάποια υδροφίλη, αλλά μη ιοντικού χαρακτήρα, αλληλεπίδραση που έχει σημαντικό ρόλο, στην υψηλής συγγένειας εξειδικευμένη δέσμευση της ξανθίνης. Είναι ενδιαφέρον ότι στον ομόλογο μεταφορέα UraA του *A. nidulans* μεταλλαγές στο αντίστοιχο κατάλοιπο His-86 του TM1 οδηγούν σε μειωμένη έκφραση στο επίπεδο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθώς και ανεπιτυχή στόχευση, με παραμονή της πρωτεΐνης είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο (H86D) είτε στα

- 308 -

χυμοτόπια (H86A, H86K) (Pantazopoulou and Diallinas, 2006). Εκτενέστερες μελέτες στον ίδιο μεταφορέα UapA (Amillis *et al.*, 2011) αλλά και στους ομόλογους μεταφορείς L-ασκορβικού στον άνθρωπο hSVCT1 και hSVCT2 (Varma *et al.*, 2008; Ormazabal *et al.*, 2010) απέδειξαν την απαραίτητη συμμετοχή της ιστιδίνης του TM1 σε δεσμό υδρογόνου που χρειάζεται για την σωστή διαμόρφωση της περμεάσης στην μεμβράνη και/ή την υψηλής συγγένειας αναγνώριση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμησης. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα δεδομένα από το κρυσταλλικό μοντέλο του ομόλογου UraA (Lu *et al.*, 2011) μπορούν να ερμηνευθούν ειδικότερα με το ότι στην XanQ η His-31 (TM1) συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου με την Asn-325 (α 10), ένα απόλυτα συντηρημένο και αναντικατάστατο για την λειτουργία της XanQ κατάλοιπο του μοτίβου «υπογραφή» της οικογένειας NCS2, η οποία έχει προταθεί ότι συμμετέχει στο μονοπάτι μεταφοράς υποστρώματος και στον καθορισμό της εξειδίκευσης αναγνώρισης πουρινών, τόσο στην περμεάση ξανθίνης XanQ (Karatza *et al.*, 2006; Georgopoulou *et al.*, 2010) όσο και στην περμεάση ουρικού/ξανθίνης UapA του *A. nidulans* (Koukaki *et al.*, 2005; Kosti *et al.*, 2012). Για το σχεδόν απόλυτα συντηρημένο μοτίβο QH (TH στην XanQ) του TM1, στο οποίο ανήκει το κατάλοιπο της ιστιδίνης His-31, έχει επίσης αποδειχτεί στους μεταφορείς UapA και hSVCT1 (Pantazopoulou and Diallinas, 2006; Varma *et al.*, 2008) ότι το κατάλοιπο της γλουταμίνης είναι εξίσου σημαντικό για την σωστή μεταφορά του υποστρώματος, κάτι ωστόσο που δεν προέκυψε από την παρούσα εργασία για την Thr-30 της περμεάσης XanQ.

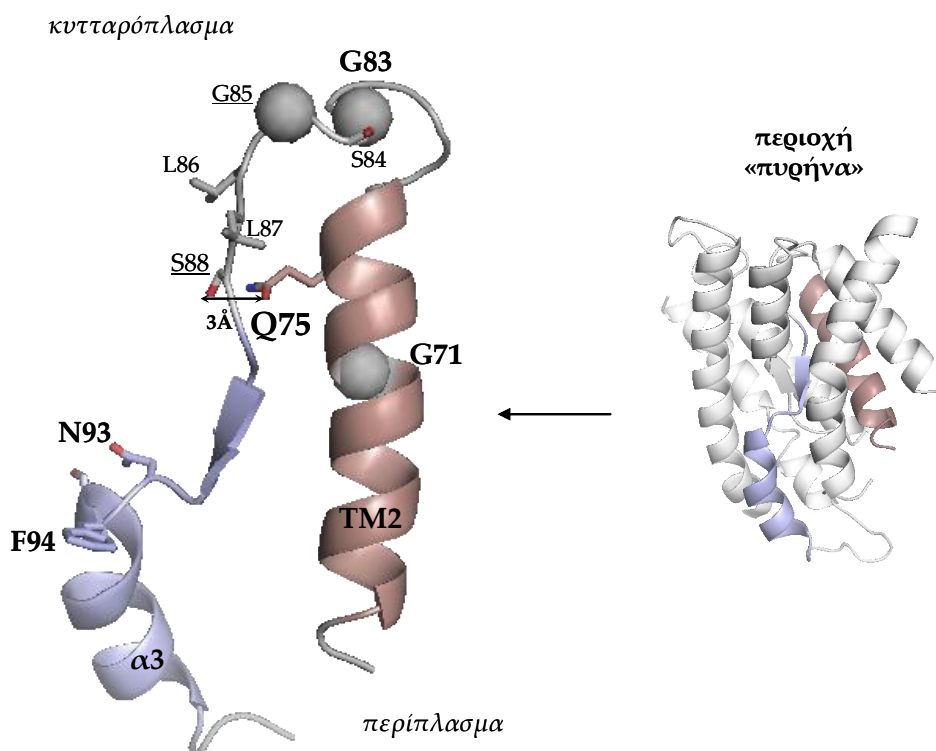
Πολύ σημαντικός αποδείχτηκε ο ρόλος και της **Asn-93** (TM3) η οποία φαίνεται να καθορίζει την προτίμηση της περμεάσης XanQ για ξανθίνη έναντι του ουρικού ή άλλων υποστρωμάτων/προσδετών με τροποποιήσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο (8-μεθυλοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη). Η Asn-93 βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης της β -πτυχωτής επιφάνειας (β 3) και της α -έλικας (α 3) του TM3, η οποία σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο είναι σε άμεση γειτνίαση με το κέντρο δέσμησης στον ομόλογο μεταφορέα UraA (Karena and Frillingos, 2011). Ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας NCS2/COG2233 στην συγκεκριμένη θέση εντοπίζονται σχεδόν πάντα κατάλοιπα πολικού χαρακτήρα (Ser, Thr, Asn) αλλά και αλανίνη (Ala) στους μεταφορείς L-ασκορβικού SVCT1/2 των θηλαστικών, ενώ τα ομόλογα της NCS2/COG2252 έχουν στη θέση αυτή Ala ή Gly (Papakostas *et al.*, 2013). Οι αντικαταστάσεις της Asn-93 της XanQ με άλλα αμινοξέα που συντηρούνται στην ίδια θέση στα υπόλοιπα ομόλογα (Ser, Thr, Ala, Asp), έδειξαν ότι μόνο η διατήρηση του μικρού μεγέθους και του πολικού (Ser) ή υδρόφοβου (Ala) χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας του καταλοίπου (μεταλλάγματα N93S και N93A) μπορούν να δώσουν περμεάσεις με υψηλή ενεργότητα. Οι περμεάσεις αυτές όμως έχουν διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης από την περμεάση

φυσικού τύπου, καθώς αναγνωρίζουν ανάλογα που δεν δεσμεύονται από την XanQ και δομικά διαφέρουν από την ξανθίνη, στην πλευρά του ιμιδαζολικού δακτυλίου (7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, ουρικό οξύ), ενώ ταυτόχρονα οι περμεάσες αυτές (N93S, N93A) μεταφέρουν με χαμηλή συγγένεια [¹⁴C] ουρικό οξύ. Η διαφοροποίηση της εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων σε συνάρτηση με το αμινοξύ που θα βρεθεί στην αντίστοιχη θέση 93 μπορεί να συγκριθεί και να συσχετιστεί με τον τρόπο συντήρησης του καταλοίπου στους μεταφορείς διαφορετικών υποστρωμάτων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Αντικατάσταση της Asn-93 με Ser, όπως συντηρείται σε ομόλογους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος από μύκητες ή φυτά (Xut1, UapA, UapC, AfUapA, Lpe1), οδηγεί σε μετάλλαγμα της XanQ με προφίλ εξειδίκευσης παραπλήσιο με αυτό των παραπάνω μεταφορέων (δυνατότητα αναγνώρισης και μεταφοράς και των δύο υποστρωμάτων, τόσο ξανθίνης όσο και ουρικού). Επίσης, μεταγενέστερα πειράματα μεταλλαξιγένεσης που έγιναν σε άλλους ομόλογους μεταφορείς, όπως την περμεάση ουρικού UacT (Papakostas and Frillingos, 2012), την περμεάση ξανθίνης/ουρικού SmLL9 (Botou and Frillingos, unpublished) και την περμεάση ξανθίνης/ουρικού UapA (Amillis *et al.*, 2011), υποστηρίζουν ανεξάρτητα την καθοριστική συμβολή της θέσης αυτής στο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με την προτίμηση μεταξύ ξανθίνης και ουρικού ως υποστρωμάτων (βλ. επίσης Frillingos, 2012). Τα δεδομένα αυτά ενίσχυσαν την υπόθεση για άμεση συμμετοχή του καταλοίπου Asn-93 στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος η οποία υλοποιείται πιθανώς μέσω της αλληλεπίδρασης της Asn-93 με το αναντικατάστατο Glu-272 που συμμετέχει άμεσα στην δέσμευση υποστρώματος (Karena and Frillingos, 2011; Frillingos, 2012) και έδωσαν το έναυσμα για διεξοδικότερη μελέτη της ευρύτερης περιοχής του TM3 στην παρούσα διατριβή (βλ. 4.1.3).

Επίσης, στο TM2 της δομικής περιοχής «πυρήνα» της XanQ εντοπίστηκε το απόλυτα συντηρημένο (NCS2/COG2233) κατάλοιπο **Gln-75**, το οποίο αποδείχθηκε αναντικατάστατο για την δομική σταθερότητα και/ή λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης, καθώς οι αντικαταστάσεις στην θέση αυτή οδήγησαν είτε σε πολύ χαμηλά (Q75A) έως μηδενικά (Q75E, Q75C) επίπεδα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη είτε σε κανονική έκφραση αλλά σχεδόν μηδενικές τιμές ενεργότητας (Q75N). Η αντίστοιχη θέση δεν έχει εξετασθεί με μεταλλαξιγένεση μέχρι σήμερα σε άλλους ομόλογους μεταφορείς. Φαίνεται, ωστόσο, ότι μία ολόκληρη όψη α -έλικας στην κυτταροπλασματική πλευρά της TM2 είναι κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία της XanQ αφού εκτός της Gln-75 (3.1.1) περιέχει ακόμη ένα αναντικατάστατο κατάλοιπο (Gly-71) καθώς και μία θέση (Ser-68) σημαντική για την εξειδίκευση και ευαίσθητη σε αλκυλίωση από το NEM (βλ. 3.1.3 και Εικόνα 3.1.48). Είναι επίσης σημαντικό ότι η εν λόγω περιοχή του TM2 και, ιδιαίτερα, τα αναντικατάστατα κατάλοιπα Gly-71 και Gln-75 βρίσκονται κοντά στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης σύμφωνα με το

- 310 -

κρυσταλλογραφικό μοντέλο της περμεάσης (Frillingos, 2012). Ειδικά η Gln-75, η οποία διατηρείται ως Gln σε όλους τους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NCS2/COG2233 (βλ. Εικόνα 3.1.34) αλλά όχι και στους ομόλογους μεταφορείς ουρακίλης ή στους μεταφορείς πουρινών της ομάδας NCS2/COG2252 όπου αλλάζει σε Phe/Tyr ή Met, αντίστοιχα (Papakostas *et al.*, 2013), μπορεί να έχει έναν καθοριστικό ρόλο στον μηχανισμό συμμετέχοντας σε δεσμούς υδρογόνου απαραίτητους για την σταθεροποίηση της δομής ή την δυναμική της μετακίνησης του υποστρώματος περιφερικά του κέντρου δέσμευσης ξανθίνης και/ή ουρικού. Σύμφωνα με το δομικό μοντέλο (βλ. 3.1.4, Εικόνα 3.1.51) τέτοιες σημαντικές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου θα μπορούσαν να αναπτύσσονται μεταξύ της Gln-75 και της Ser-84 ή Ser-88 στην κυτταροπλασματική πλευρά του TM3 (βλ. 3.1.2 και Εικόνα 3.1.29). Εξάλλου, ο δομικά και/ή λειτουργικά σημαντικός ρόλος των Gly-83 και Gly-85 του TM3 (βλ. παρακάτω, μοτίβο ⁸³GSGLL⁸⁷) είναι πιθανό να σχετίζεται με την αναντικατάστατη Gly-71 του TM2 επιτρέποντας την απαραίτητη προσέγγιση των δύο περιοχών για την βέλτιστη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ Gln-75 και Ser-84/88 κατά τον μηχανισμό λειτουργίας (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση των σχετικών θέσεων των καταλοίπων της δομικής περιοχής του πυρήνα Gln-75 και Gly-71 του TM2 και σημαντικών καταλοίπων της ευρύτερης περιοχής του TM3 στο δομικό μοντέλο της XanQ

Η αλληλουχία της XanQ προσαρμόστηκε στο πρότυπο της κρυσταλλικής δομής της περμεάσης ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SWISS-MODEL και κατασκευάστηκε το παραπάνω δομικό μοντέλο, το οποίο απεικονίζεται με το πρόγραμμα PyMOL v1.4.. Σημειώνονται τα κατάλοιπα που αποδείχθηκαν είτε αναντικατάστατα για την λειτουργία και την εξειδίκευση της περμεάσης XanQ (μεγενθυμένα έντονα Gln-75, Gly-71, Gly-83, Asn-93, Phe-94), είτε αναντικατάστατα ως προς το μέγεθος ή

το είδος της πλευρικής ομάδας (υπογραμμισμένα Gly-85, Ser-88), είτε ευαίσθητα σε αλκυλίωση από το NEM (Ser-84, Leu-86, Leu-87) (βλ. κείμενο).

4.1.3 Συμπεράσματα για τον ρόλο σημαντικών πλευρικών ομάδων αμινοξέων στο TM3 της XanQ

Στην παρούσα διατριβή, έγινε για πρώτη φορά εκτενής ανάλυση μεταλλαξιγένεσης για ένα διαμεμβρανικό τμήμα (TM3) της δομικής περιοχής «πυρήνα» (core domain) της περμεάσης XanQ που ανήκει στο αμινοτελικό ήμισυ της περιοχής αυτής (TM1-4). Τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας (βλ. 3.1.2) απέδειξαν ότι τα σημαντικότερα κατάλοιπα του TM3 συγκεντρώνονται σε δύο μοτίβα αλληλουχίας, το ⁸³GSGLL⁸⁷ στην ελεύθερη περιοχή ανοδικά της β-πτυχωτής επιφάνειας (β3) και το ⁹³NFS⁹⁵ στην περιοχή σύνδεσης της β3 και της α-έλικας (α3) του TM3.

Στο μοτίβο ⁹³NFS⁹⁵ ήδη είχε μελετηθεί το κατάλοιπο Asn-93, που όπως σχολιάστηκε παραπάνω είναι σημαντικό για την εξειδίκευση της XanQ για ξανθίνη έναντι του ουρικού ή άλλων υποστρωμάτων με τροποποιήσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο και αυτός ο ρόλος στον καθορισμό της εξειδίκευσης είναι πιθανότατα σημαντικός και στους άλλους ομόλογους μεταφορείς πουρινών της NCS2 (Frillingos, 2012; Amillis *et al.*, 2011; Karena and Frillingos, 2011; Papakostas and Frillingos, 2012; Papakostas *et al.*, 2013; Botou and Frillingos, unpublished). Επιπλέον, προέκυψε αφενός για το κατάλοιπο **Phe-94** και αφετέρου σε μικρότερο βαθμό για το **Ser-95** ότι είναι σημαντικά για την αναγνώριση υποστρωμάτων/προσδετών που διαφέρουν από την ξανθίνη στην πλευρά του πυριμιδινικού δακτυλίου (2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη), εφόσον οι αντικαταστάσεις στις θέσεις αυτές μειώνουν δραματικά τις συγγένειες πρόσδεσης είτε για την 3-μεθυλο (F94I) είτε για τις 2-θειο και 6-θειοξανθίνη (F94Y, S95C) (3.1.2.3, Πίνακας 3.1.12), και ταυτόχρονα ότι το μετάλλαγμα S95C απενεργοποιείται πλήρως παρουσία του αλκυλιωτικού αντιδραστηρίου NEM (3.1.2.2, Εικόνα 3.1.26). Τα δεδομένα αυτά μαζί με τα προηγούμενα αποτελέσματα για την **Asn-93** καταδεικνύουν τον αναντικατάστατο ρόλο του μοτίβου ⁹³NFS⁹⁵.

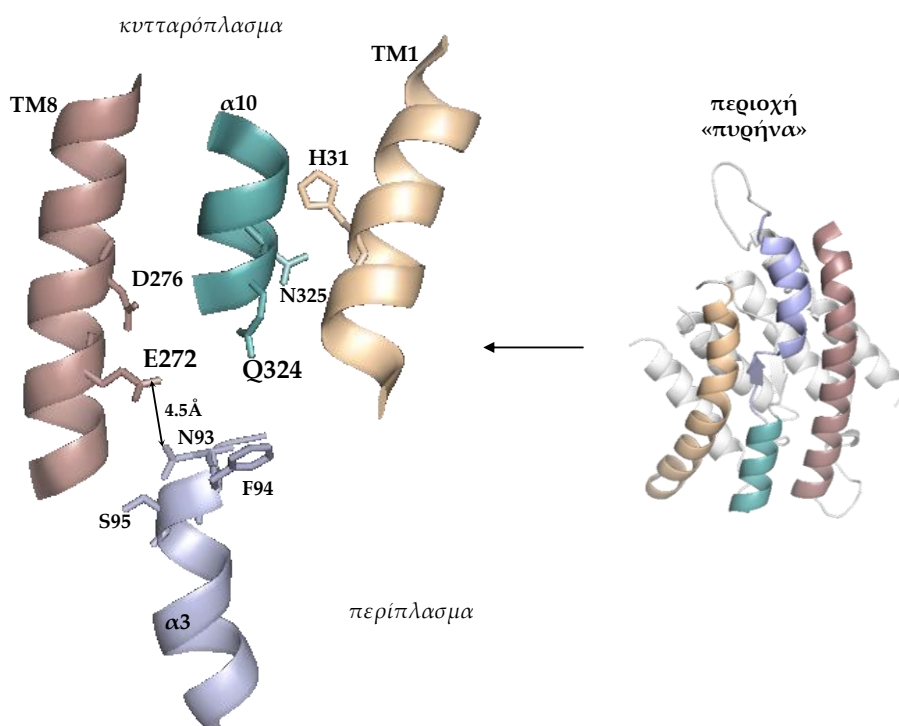
Το μοτίβο ⁸³GSGLL⁸⁷ αποτελείται από δύο κατάλοιπα γλυκινών, την Gly-83 και την Gly-85 (απόλυτα συντηρημένα ως κατάλοιπα γλυκινών στους μεταφορείς πουρινών της ομάδας XanQ/UapA της οικογένειας NCS2/COG2233, πρβλ. Παράρτημα 3, Εικόνα Π3.2) που αποδείχτηκε ότι είναι σημαντικά για την έκφραση της περμεάσης XanQ στην μεμβράνη. Συγκεκριμένα, ο σημαντικός αυτός ρόλος φαίνεται από τα μηδενικά επίπεδα που εμφανίζουν στη μεμβράνη τα μεταλλάγματα G83CA/P/C και G85P/C και τα σημαντικά

μειωμένα επίπεδα του μεταλλάγματος G85A (Εικόνα 3.1.27). Το μοτίβο αυτό στην κυτταροπλασματική πλευρά του TM3 βρίσκεται περιφερικά αλλά όχι σε άμεση γειτνίαση με το προβλεπόμενο κέντρο δέσμησης και η ευελιξία των απαραίτητων εκεί γλυκινών (Gly-83, Gly-85) ίσως να συμβάλλει στην σωστή αναδίπλωση και διαμόρφωση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη, μέσω της σωστής τοποθέτησης του TM3 στην τριτοταγή δομή, ή στην προσέγγιση με άλλες περιοχές του μορίου για βελτιστοποίηση σημαντικών αλληλεπιδράσεων (για παράδειγμα με το TM2, βλ. παραπάνω). Επιπλέον, για τις υπόλοιπες τρεις θέσεις του μοτίβου τα μεταλλάγματα S84C, L86C και L87C απενεργοποιούνται πλήρως από το NEM χωρίς αυτό να αλλάζει παρουσία υποστρώματος (L86C). Το μέγεθος της ευαισθησίας του μεταλλάγματος L86C από το NEM (IC₅₀ 25 μM) είναι από τα πιο υψηλά που έχουν ανιχνευθεί στην XanQ (Karena and Frillingos, 2011), ενώ η ευαισθησία των θέσεων του μοτίβου σε αλκυλίωση αναδεικνύει την συμμετοχή της κυτταροπλασματικής πλευράς του TM3 σε αλληλεπιδράσεις με άλλες περιοχές περιφερικά του κέντρου δέσμησης κατά τον μηχανισμό μεταφοράς (για παράδειγμα με σημαντικές θέσεις του TM2, βλ. παραπάνω). Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικές κατά τη λειτουργία, όπως έχει αποδειχτεί σε άλλες περμεάσες (LacY, MelY) (Kaback *et al.*, 2007; Tavoulari and Frillingos, 2008; Jiang *et al.*, 2011).

Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αντίθεση με την αλληλουχία καταλοίπων της ευρύτερης περιοχής του TM3 που δεν εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης ως σύνολο ανάμεσα στα μέλη της NCS2 (Papakostas *et al.*, 2013), ο συνδυασμός των καταλοίπων των δύο μοτίβων που προαναφέρθηκαν διατηρείται σε σημαντικό βαθμό, αντανακλώντας πιθανόν έναν παρόμοιο λειτουργικό και δομικό ρόλο στον μηχανισμό όλων των ομόλογων μεταφορέων πουρινών. Συγκεκριμένα, στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NCS2/COG2233 συντηρούνται απόλυτα τα κατάλοιπα Gly-83 και Phe-94 σε συνδυασμό με την παρουσία υδρόφοβου αμινοξέος παρόμοιου μεγέθους στη θέση 86 (Leu, Ile, Met, Val), Gly, Arg ή Lys στη θέση 85 (αλλά μόνο Gly στον κλάδο των συγγενέστερων ομολόγων των XanQ/UapA), πολικού (Ser, Thr, Asn) και πολικού ή μικρού αμινοξέος (Ala, Ser, Asn, Thr) στις θέσεις 93 και 95 αντίστοιχα (βλ. Εικόνα 3.1.22 και Εικόνα Π3.2).

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής επίσης αναλύθηκε η πιθανή διευθέτηση του TM3 σε σχέση με τα υπόλοιπα TM της δομικής περιοχής «πυρήνα» (Εικόνα 3.1.49) στα οποία εντοπίζονται τα πιο σημαντικά κατάλοιπα της XanQ (TM1, TM2, TM8, TM9, TM10). Η ανάλυση της πιθανής διευθέτησης των προβολών α -ελίκων της XanQ που στηρίχθηκε τόσο σε λεπτομερή φυλογενετική ανάλυση (βλ. 3.1.4) όσο και στα δεδομένα από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο του ομολόγου UraA και στα πειραματικά αποτελέσματα για την XanQ (3.1.1 ως 3.1.3) φανερώνει ότι το TM3

τοποθετείται κεντρικά στην δομική περιοχή «πυρήνα» και έχει γειτνίαση κυρίως με διαμεμβρανικά τμήματα της περιοχής αυτής (TM1, TM2, TM4, TM8, TM10) αλλά όχι και με TM της δομικής περιοχής «εισόδου» (Εικόνες 3.1.50 και 3.1.51, Karena and Frillingos, 2011). Το μοτίβο $^{93}\text{NFS}^{95}$ είναι τοποθετημένο στο κέντρο του προβλεπόμενου κέντρου δέσμησης (Εικόνα 4.2) κοντά στα κατάλοιπα Glu-272 (TM8) και Gln-324 (TM10) τα οποία αντιστοιχούν στις βασικές θέσεις δέσμησης του υποστρώματος στην UraA (Glu-241, Glu-290) μέσω δεσμών υδρογόνου (Lu *et al.*, 2011). Από το TM3, η Phe-94 (αντίστοιχη της Phe-73 στην UraA) φαίνεται να συμμετέχει στην σωστή διεύθυνση του υποστρώματος στο κέντρο δέσμησης μέσω δεσμών van der Waals αλλά και δεσμών υδρογόνου με το αμιδικό άζωτο του πολυπεπτιδικού σκελετού, ενώ η Asn-93 (Ser-72 στην UraA) φαίνεται να προσεγγίζει το Glu-272 του κέντρου δέσμησης με το οποίο μπορεί να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου, κάτι που δεν είναι εφικτό σε ομόλογες περμεάσες ουρικού/ξανθίνης (UapA, SmLL9) ή μεταλλάγματα της XanQ με διευρυμένη εξειδίκευση (N93S, N93A) στη θέση αυτή, ενώ η Ser-95 (Ala-74 στην UraA) είναι προσανατολισμένη περιφερικά (Karena and Frillingos, 2011; Frillingos, 2012).



Εικόνα 4.2: Απεικόνιση των TM1, $\alpha 3$, TM8 και $\alpha 10$ στο δομικό μοντέλο της XanQ που στηρίζεται στην κρυσταλλική δομή της ομόλογης περμεάσης UraA

Η αλληλουχία της XanQ προσαρμόστηκε στο πρότυπο της κρυσταλλικής δομής της περμεάσης ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SWISS-MODEL και κατασκευάστηκε το παραπάνω δομικό μοντέλο, το οποίο απεικονίζεται με το πρόγραμμα PyMOL v1.4.. Για μεγαλύτερη ευκρίνεια απεικονίζονται μέρη των TM1, $\alpha 3$, TM8 και $\alpha 10$ ενώ έχουν αφαιρεθεί οι β -πτυχωτές επιφάνειες των $\alpha 3$ και $\alpha 10$. Σημειώνονται οι πλευρικές ομάδες των λειτουργικά σημαντικών καταλοίπων της περμεάσης XanQ (βλ. κείμενο).

Η διάταξη αυτή του μοτίβου ⁹³NFS⁹⁵ σε σχέση με το πιθανό κέντρο δέσμησης δικαιολογεί πλήρως τον πολύ σημαντικό ρόλο που βρέθηκε ότι έχουν τα αντίστοιχα κατάλοιπα της XanQ στην εξειδίκευση της περμεάσης για την ξανθίνη (σωστή αναγνώριση του ιμιδαζολικού και πυριμιδινικού δακτυλίου, αντίστοιχα, για τα Asn-93 και Phe-94/Ser-95, με πιο καθοριστικό τον ρόλο της Asn-93 και λιγότερο εμφανή τον ρόλο της Ser-95, βλ. Πίνακα 3.1.12). Ιδιαίτερα, ο ρόλος της Asn-93 (Ser στους μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού, Thr στον μεταφορέα ουρικού UacT) φαίνεται να συντηρείται σε πολλές περμεάσες της οικογένειας NCS2/COG2233 όπως αναφέρθηκε παραπάνω (4.1.2), αλλά ακόμη και σε περμεάσες πουρινών της ομάδας NCS2/COG2252 στις αντίστοιχες θέσεις (Papakostas *et al.*, 2013; Frillingos, 2012). Οι διπλές αλλαγές στις θέσεις των Asn-93, Glu-272 και Asp-276 που εξετάστηκαν (βλ. 3.1.2.4) οδηγούν είτε στην έκφραση ενός μη λειτουργικού μεταλλάγματος στην μεμβράνη (E272D/D276E) είτε σε μη εκφραζόμενο και πλήρως ανενεργό μετάλλαγμα (N93T/D276M). Τα αποτελέσματα αυτά ισχυροποιούν το συμπέρασμα ότι ο τρόπος συνδυασμού των πλευρικών ομάδων αυτών των καταλοίπων μεταξύ των ελίκων TM3 και TM8 έχουν έναν αναντικατάστατο ρόλο για την σωστή λειτουργία του κέντρου δέσμησης της περμεάσης XanQ.

Διερεύνηση του ρόλου συγκεκριμένων αμινοξέων του TM3 στον ομόλογο μεταφορέα UapA (Amillis *et al.*, 2011) ανέδειξε και στο σύστημα του ασκομύκητα τον καίριο ρόλο του καταλοίπου Ser-154 (Asn-93 στην XanQ) τόσο για την λειτουργία του μεταφορέα όσο και για την εξειδίκευσή του. Τα μεταλλάγματα S154A και S154N παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ εξειδίκευσης από αυτό του UapA φυσικού τύπου με τις κυριότερες διαφορές να εντοπίζονται στην καλύτερη αναγνώριση της ξανθίνης (η αντικατάσταση S154N οδηγεί σε 5 φορές υψηλότερη συγγένεια), στην μείωση της συγγένειας αναγνώρισης ουρικού οξέος (η S154A οδηγεί σε 7 φορές χαμηλότερη συγγένεια) και στην αναγνώριση της 9-μεθυλοξανθίνης και από τα δύο αυτά μεταλλάγματα. Αν και τα δεδομένα για τον UapA του *Aspergillus nidulans* δεν υποδεικνύουν έναν τόσο καθοριστικό ρόλο, υποστηρίζουν και αυτά μια σημαντική συνεισφορά της θέσης Ser-154 (TM3) στην εξειδίκευση ως προς το προφίλ προτίμησης ξανθίνης έναντι ουρικού.

4.1.4 Συμπεράσματα για τον ρόλο σημαντικών θέσεων αμινοξέων της δομικής περιοχής «εισόδου» της XanQ

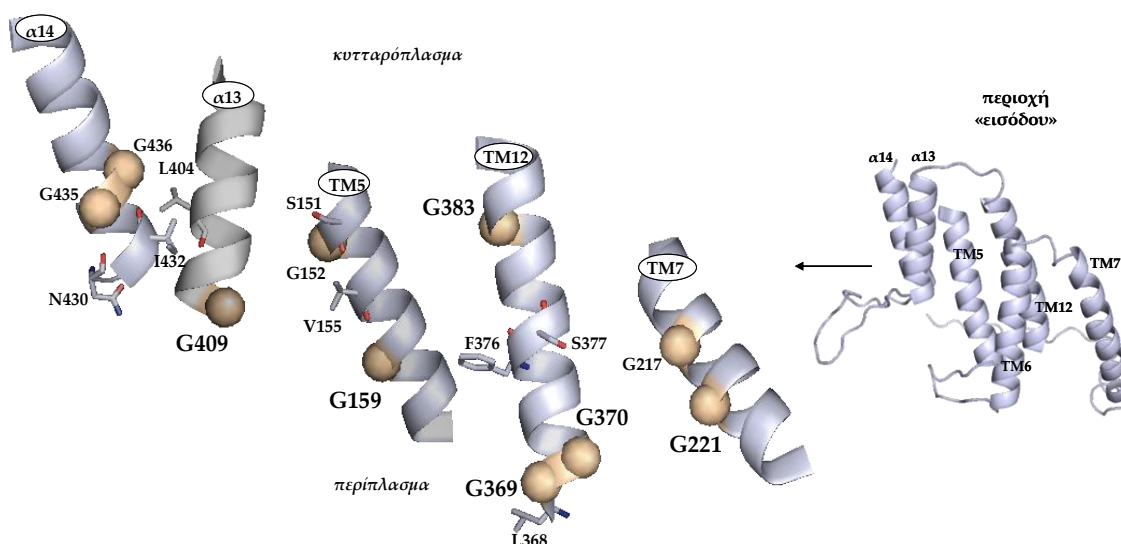
Στο τελικό στάδιο χαρτογράφησης σημαντικών και συντηρημένων θέσεων της περμεάσης XanQ και των ομόλογων μεταφορέων πουρινών του κλάδου COG2233 της οικογένειας NCS2 (μεταφορείς ξανθίνης και/ή ουρικού) προχωρήσαμε στην κατασκευή μιας νέας σειράς μεταλλαγμάτων που αναφέρονται σε θέσεις ή περιοχές αλληλουχίας υψηλής συντήρησης που δεν είχαν υποβληθεί σε μεταλλαξιγένεση στο παρελθόν (Frillingos, 2012). Η λειτουργική αυτή ανάλυση συμπλήρωσε το έργο της μεταλλαξιγένεσης της περμεάσης XanQ με τον εντοπισμό θέσεων που παίζουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της μεταφοράς και συνδυάστηκε μαζί με τα προηγούμενα δεδομένα για την εξαγωγή ενός αρχικού μοντέλου δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των α -ελίκων της XanQ (3.1.3 και 3.1.4). Τα συμπεράσματα αυτά μπορούν προσεκτικά να επεκταθούν και να δώσουν μια γενικευμένη εικόνα της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των διαμεμβρανικών α -ελίκων των μεταφορέων της NCS2, κυρίως στα αντιπροσωπευτικά μέλη της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού (XanQ/UapA) στα οποία στηρίχτηκε η φυλογενετική ανάλυση των μοτίβων.

Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης που αποδεικνύουν τον αναντικατάστατο ρόλο απόλυτα ή υψηλά συντηρημένων φυλογενετικά καταλοίπων γλυκινών σε **TM της δομικής περιοχής «εισόδου»** (TM5, TM7, TM12 και TM13). Πρόκειται για κατάλοιπα απόλυτα ή υψηλά συντηρημένων φυλογενετικά γλυκινών οι οποίες αποδείχθηκαν είτε αναντικατάστατες για τη λειτουργία (**Gly-159, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409**) και/ή τη δομική σταθερότητα της περμεάσης στη μεμβράνη (**Gly-221**) είτε σημαντικές ως μικρές πλευρικές ομάδες (Gly/Ala) στις αντίστοιχες θέσεις για τη διατήρηση της λειτουργικότητας και/ή της δομικής σταθερότητας στη μεμβράνη (Gly-152, Gly-217). Αυτά τα κατάλοιπα γλυκινών φαίνεται να βρίσκονται σε περιοχές επαφών με άλλες διαμεμβρανικές έλικες (Εικόνα 3.1.50) και μπορεί να έχουν έναν σημαντικό δομικό/λειτουργικό ρόλο στην εναλλαγή διαμορφώσεων της περμεάσης κατά τη λειτουργία της. Τέτοια σημαντικά κατάλοιπα γλυκινών έχουν εντοπιστεί και σε άλλες περμεάσες όπως στην περμεάση LacY, της οποίας η μεγάλη διαμορφωτική ευελιξία κατά τον μηχανισμό μεταφοράς του υποστρώματος οφείλεται στο σχήμα και τον σχετικό προσανατολισμό των διαμεμβρανικών α -ελίκων στην δομή της, που καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία συνολικά 36 καταλοίπων γλυκινών και 12 προλίνης (Consler *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 1995). Διευκρινίζοντας περαιτέρω τον ρόλο των υψηλά συντηρημένων αυτών καταλοίπων στα μέλη της οικογένειας MFS, όπου ανήκει ο μεταφορέας, σε συνδυασμό με εικόνες από τα κρυσταλλικά μοντέλα της LacY (Abramson *et*

al., 2003; Guan *et al.*, 2007), αποδείχτηκε ότι: υπάρχουν τέσσερις απόλυτα συντηρημένες γλυκίνες (Gly-46, 159, 262, και 370 στις έλικες 2, 5, 8, και 11 αντίστοιχα) που βρίσκονται στο σημείο εγγύτητας των δύο αυτοτελών δομικών περιοχών N6 και C6 της περμεάσης που σχηματίζεται προς την περιπλασματική πλευρά κατά το στάδιο μεταφοράς και απελευθέρωσης του υποστρώματος στο κυτταρόπλασμα και είναι αναντικατάστατες για τον ρόλο αυτό (Smirnova *et al.*, 2013). Μάλιστα αντικατάσταση αυτών των γλυκινών με ογκώδη κατάλοιπα (Trp) έχει ως συνέπεια την αποσταθεροποίηση της συνήθως ενεργειακά ευνοούμενης διαμόρφωσης με το κέντρο δέσμευσης «ανοικτό» προς το κυτταρόπλασμα (inward open) (βλ. 1.2.2) και την εμφάνιση μιας διαφορετικής ενεργειακά ευνοούμενης διαμόρφωσης με το κέντρο δέσμευσης προς την πλευρά του περιπλάσματος αλλά σχεδόν «κλειστή» προς το υδρόφιλο περιβάλλον (outward facing, occluded) (Kumar *et al.*, 2014).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ανέδειξαν ορισμένες άλλες θέσεις της XanQ στην δομική περιοχή «εισόδου» (3.1.3), όπου για την εξασφάλιση σημαντικής ενεργότητας και εξειδίκευσης είναι απαραίτητη είτε η παρουσία υδρόφοβου αμινοξέος παρόμοιου όγκου (**Val-155, Leu-368, Leu-404**) είτε η διατήρηση πλευρικής ομάδας σε περιορισμένο σχετικά όγκο ή γεωμετρία της αλυσίδας (**Ser-151, Phe-376, Ser-377**). Στην δεύτερη κατηγορία (περιορισμένο εύρος αντικαταστάσεων της πλευρικής ομάδας) ανήκουν και ορισμένα αμινοξέα του TM14 (Asn-430, Ile-432, Gly-436) που είχαν αναδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Papakostas *et al.*, 2008, Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή, 2011). Από το σύνολο αυτών των αποτελεσμάτων, φαίνεται ότι τα σημαντικά κατάλοιπα της δομικής περιοχής «εισόδου» της XanQ συγκεντρώνονται κυρίως στα **TM5** (Ser-151, Gly-152, Val-155, Gly-159), **TM12** (Leu-368, Gly-369, Gly-370, Phe-376, Ser-377, Gly-383), **TM13** (Leu-404, Gly-409) και **TM14** (Asn-430, Ile-432, Gly-435/436). Από αυτές τις περιοχές αλληλουχίας, τα TM5 και TM12 προσεγγίζουν περισσότερο στην δομική περιοχή «πυρήνα» (βλ. Εικόνες 3.1.50 και 3.1.51) (η Tyr-342(UraA)/Phe-376, μάλιστα, αλληλεπιδρά απευθείας με το υπόστρωμα μέσω δυνάμεων van der Waals στην δομικά ομόλογη περμεάση ουρακίλης UraA, σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο) και έχουν προταθεί ως οι πλέον δυναμικές α-έλικες στον μηχανισμό της εναλλαγής διαμορφώσεων σε σχέση με την προσβασιμότητα του ενεργού κέντρου (Lu *et al.*, 2011). Επίσης, σημαντικά αμινοξέα των TM13 και TM14 βρίσκονται στην περιπλασματική πλευρά των αντίστοιχων α-ελίκων σε θέσεις που πιθανόν συνεισφέρουν στον έλεγχο της προσβασιμότητας του υποστρώματος στην διαδρομή του προς το ενεργό κέντρο, όπως έχει προταθεί για τον ομόλογο μεταφορέα ξανθίνης/ουρικού UraA (Kosti *et al.*, 2012).

Οι θέσεις σημαντικών καταλοίπων της δομικής περιοχής «εισόδου» της XanQ που αναδείχθηκαν στην παρούσα διατριβή φαίνονται εποπτικά στην Εικόνα 4.3. Μπορούμε να πούμε με δυο λόγια ότι ενώ τα πολύ σημαντικά ή αναντικατάστατα κατάλοιπα της XanQ με ισχυρά πολικό ή δυνητικά ιοντιζόμενο χαρακτήρα (3.1.1) ανήκουν στις έλικες TM1-3 και TM8-10 της δομικής περιοχής «πυρήνα» (His-31, Asn-93, Gln-75, Glu-272, Asp-276, Asp-304, Gln-324, Asn-325), στις οποίες επίσης ανήκουν οι περισσότερες θέσεις που εμφανίζουν ισχυρή ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το NEM (βλ. Εικόνες 3.1.47 και 3.1.50), τα σημαντικά κατάλοιπα στις έλικες TM5, TM7 και TM12-14 της δομικής περιοχής «εισόδου» (3.1.3) είναι κυρίως κατάλοιπα γλυκινών (Gly-152, Gly-159, Gly-217, Gly-221, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409, Gly-436) ή άλλα αμινοξέα με περιορισμό στο εύρος αντικαταστάσεων που μπορούν να δεχθούν (Ser-151, Val-155, Leu-368, Phe-376, Ser-377, Asn-430, Ile-432), τα οποία πιθανόν να συνεισφέρουν περισσότερο στην δομική οργάνωση και στην εναλλαγή διαμορφώσεων κατά τον μηχανισμό λειτουργίας και λιγότερο στον καθορισμό των ιδιοτήτων του κέντρου δέσμευσης. Τέτοιου τύπου θέσεις αμινοξέων υπάρχουν επίσης στις έλικες TM2-3 και TM8-10 της περιοχής «πυρήνα» (Ser-68, Gly-71, Gly-83, Gly-85, Leu-87, Gly-275, Ala-279, Thr-280, Gly-305, Pro-318, Asn-326, Thr-332, Gly-333, Ser-336). Από τις παραπάνω θέσεις, αμινοξέα που βρέθηκε ότι συνεισφέρουν στο προφίλ εξειδίκευσης εντοπίζονται τόσο στη δομική περιοχή «πυρήνα» (Ser-68, Thr-332, Gly-333, Ser-336) όσο και στην περιοχή «εισόδου» (Ser-151, Ser-377, Asn-430).



Εικόνα 4.3: Απεικόνιση των σχετικών θέσεων των σημαντικών καταλοίπων της δομικής περιοχής εισόδου στο δομικό μοντέλο της XanQ

Η αλληλουχία της XanQ προσαρμόστηκε στο πρότυπο της κρυσταλλικής δομής της περμεάσης ουρακίλης UraA (Lu *et al.*, 2011) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SWISS-MODEL και κατασκευάστηκε το παραπάνω δομικό μοντέλο, το οποίο απεικονίζεται με το πρόγραμμα PyMOL v1.4.. Σημειώνονται τα κατάλοιπα γλυκινών (χρυσές σφαίρες Gly-159, 369, 370, 383,

409) που αποδείχθηκαν αναντικατάστατα για την λειτουργία ή την δομική σταθερότητα (Gly-221) της περμεάσης καθώς και θέσεις για τις οποίες η εξασφάλιση σημαντικής ενεργότητας και εξειδίκευσης απαιτεί περιορισμένο εύρος αντικαταστάσεων της πλευρικής ομάδας (βλ. κείμενο).

4.2 Προσδιορισμός σχέσεων εγγύτητας των α -ελίκων της XanQ

Μετά την χαρτογράφηση σημαντικών καταλοίπων της περμεάσης XanQ και τον προσδιορισμό της διευθέτησής τους σε ένα αρχικό μοντέλο των προβολών α -ελίκων καθώς και την προσαρμογή τους σε ένα δομικό μοντέλο με βάση την κρυσταλλογραφική ανάλυση του ομολόγου UraA (βλ. 3.1.4), έγινε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας με την παρούσα διατριβή προσπάθεια για την προσέγγιση της εικόνας της δυναμικής κίνησης της περμεάσης κατά τον μηχανισμό λειτουργίας μέσω εξειδικευμένων πειραματικών μεθοδολογιών (βλ. 1.5, 3.2). Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως στόχο την ανίχνευση φυσικών γειτνιασέων μεταξύ των διαφορετικών διαμεμβρανικών τμημάτων της περμεάσης XanQ και την πιθανή αναδιαμόρφωση τέτοιων αλληλεπιδράσεων κατά τον μηχανισμό λειτουργίας. Παρόμοιες μεθοδολογίες δεν έχουν εφαρμοστεί έως σήμερα σε μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (1.2), αν και έχουν εφαρμοστεί εκτενώς σε άλλους διαμεμβρανικούς μεταφορείς, οι οποίοι όμως ανήκουν σε διαφορετικά δομικά πρότυπα οικογενειών (LacY, hDAT, GLUT-1, GAT-1, SERT) (Norregaard *et al.*, 1998; Brocke *et al.*, 2002; Zomot *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008, 2009). Εδώ έγινε προσπάθεια εφαρμογής τους σε μεταλλάγματα της XanQ με ζεύγη κυστεϊνών, όπου τα δύο κατάλοιπα κυστεϊνών εισάγονται σε έναν μεγάλο αριθμό συνδυασμών θέσεων ανάμεσα στα διαφορετικά TM της περμεάσης είτε μεταξύ των δύο δομικών περιοχών («πυρήνα» και «εισόδου») είτε στην ίδια δομική περιοχή του μορίου (βλ. 3.2.1).

4.2.1 Τα απομακρυσμένα TM8 και TM14 διαφορετικών δομικών περιοχών της XanQ «πλησιάζουν» κατά τον μηχανισμό μεταφοράς ξανθίνης

Ανάμεσα σε 31 μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών στην ίδια ή σε διαφορετικές δομικές περιοχές της XanQ που μελετήθηκαν, είτε για ζεύγη που προβλέπονται κοντά (4-9Å) είτε μακριά μεταξύ τους (≥ 20 Å) στην διαμόρφωση που υποδεικνύει η κρυσταλλική δομή (3.2.1, βλ. επίσης Εικόνα 3.2.21), μόνο τα 15 εμφάνισαν υψηλή ενεργότητα (>50% σε σχέση με την Cys-less XanQ). Σε αυτά τα διπλά μεταλλάγματα εξετάστηκε το ενδεχόμενο ανιχνεύσιμης αναστολής της ενεργότητας μεταφοράς ξανθίνης παρουσία ιόντων καδμίου (3.2.1.2) και, σε επιλεγμένες περιπτώσεις, μετά από επώαση με διλειτουργικά αντιδραστήρια σταυρωτής διασύνδεσης (3.2.2.1 και 3.2.2.2). Η λογική του

σχεδιασμού ήταν ότι ενδεχόμενη λειτουργική επίπτωση στις θέσεις αυτές που μπορεί να αποδοθεί σε σύνδεση των δύο κυστεϊνών είτε μέσω ομοιοπολικών δεσμών (3.2.2) είτε μέσω συντονισμού δισθενούς κατιόντος (3.2.1) υποδηλώνει κάποια φυσική αλληλεπίδραση που είναι σημαντική στον μηχανισμό λειτουργίας και αίρεται με τον περιορισμό των διαμορφωτικών κινήσεων στις αντίστοιχες περιοχές του μορίου της περμεάσης.

Από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.2.1, είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο για τρία διπλά μεταλλάγματα [H257C/E429C (TM8-TM14) και sC433/A323C, N430C/V328C (α10-TM14)] ανιχνεύτηκε αναστολή ενεργότητας παρουσία ιόντων καδμίου, η οποία για δύο από αυτά [sC433/A323C, N430C/V328C] δεν οδηγεί σε ασφαλές συμπέρασμα για αλληλεπίδραση των δύο θέσεων καθώς συνδέεται με αναστολή ενεργότητας και για τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (A323C, N430C). Το μετάλλαγμα H257C/E429C αναστέλλεται από το κάδμιο (II) κατά 50% (με IC_{50} 86 μ M), χωρίς αυτή η αναστολή να παρατηρείται για κάποιο από τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μονής κυστεϊνης (Εικόνα 3.2.12). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι, αφενός, οι θέσεις μονής κυστεϊνης 429 (TM14 – περιοχή «εισόδου») και 257 (TM8 – περιοχή «πυρήνα») είναι πιθανό να πλησιάζουν μεταξύ τους κατά τον μηχανισμό λειτουργίας στη δομή της XanQ, ώστε να μπορούν να δημιουργούν από κοινού κέντρο συντονισμού για δέσμευση του καδμίου και, αφετέρου, είναι προσβάσιμες από το υδρόφιλο εξωκυτταρικό περιβάλλον ώστε να μπορούν να δεσμεύουν το κατιόν του καδμίου (II). Η παρατηρούμενη αναστολή ενεργότητας υποδηλώνει ότι η πρόσδεση του καδμίου μεταξύ αυτών των θέσεων εμποδίζει την εναλλαγή διαμορφώσεων της XanQ που χρειάζεται στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης χωρίς όμως να απενεργοποιεί πλήρως την περμεάση.

Εξάλλου, διερευνήσαμε κατά πόσον η μεγάλη ευαισθησία σε απενεργοποίηση των μονών μεταλλαγμάτων N430C ή A323C (βλ. παραπάνω) μπορεί να οφείλεται σε συνεργατική δέσμευση του καδμίου (II) μαζί με άλλες πλευρικές ομάδες, όπως His, καθώς αύξηση του αριθμού των πλευρικών ομάδων (Cys, His, Glu/Asp) που συντονίζονται στο σύμπλοκο με τα δισθενή κατιόντα συνεπάγεται μεγαλύτερη σταθερότητα του κέντρου συντονισμού (Alberts *et al.*, 1998; Loland *et al.*, 1999; Benitah *et al.*, 1996). Από αυτήν την ανάλυση (3.2.1.3) προέκυψε ότι το μετάλλαγμα H257A/N430C εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία σε αναστολή ενεργότητας από το κάδμιο σε σχέση με το μετάλλαγμα μονής κυστεϊνης (N430C) (IC_{50} 52 μ M έναντι 17 μ M, Πίνακας 3.2.1), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ευαισθησία που εμφανίζει από μόνο του το N430C οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε ενδομοριακή αλληλεπίδραση με την His-257.

Συνολικά, η ευαισθησία σε αναστολή από ιόντα καδμίου που εμφανίζουν τα μεταλλάγματα H257C/E429C (σε σχέση με τα H257C και E429C) και H257A/N430C (σε σχέση με το N430C) υποδεικνύει ότι οι θέσεις **Asn-430** και **Glu-429** (στην δομική περιοχή «εισόδου», TM14) αλληλεπιδρούν ενδομοριακά με την **His-257** (δομική περιοχή «πυρήνα», TM8), αν και απέχουν αρκετά από αυτήν στην τριτοταγή δομή (περίπου 20Å στην διαμόρφωση που υποδεικνύει το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της UraA), που σημαίνει ότι οι δύο θέσεις (257 και 429/430) πρέπει να προσεγγίζουν μεταξύ τους στο χώρο σε κάποια ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η XanQ κατά τον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.2.2 όπου αποδεικνύεται ότι η ενεργότητα του H257C/E429C αναστέλλεται σημαντικά από την διασύνδεση των κυστεϊνών με αντιδραστήρια σχετικά μικρού μήκους (5-15Å) ενώ με τα MTS-14-O4-MTS (17Å) και MTS-17-O5-MTS (22Å) διατηρείται υψηλή ενεργότητα, υποδεικνύοντας την απαίτηση για μεγάλη ευελιξία κινήσεων στις θέσεις αυτές (μέγιστη απομάκρυνση 19-22Å και ελάχιστη εγγύτητα 3Å) ώστε να μπορεί να λειτουργεί αποτελεσματικά ο μηχανισμός ενεργού μεταφοράς στην XanQ.

Η αναστολή ενεργότητας που παρατηρείται ως συνέπεια της πρόσδεσης καδμίου μεταξύ των θέσεων His-257 (TM8) και Glu-429 (TM14) διατηρείται (αν και με μικρότερη ευαισθησία, IC₅₀ 235 μM έναντι 86 μM) και στο μοριακό υπόβαθρο ενός χημειοκινητικού μεταφορέα XanQ/UapA, στον οποίο το TM14 έχει αντικατασταθεί με την αντίστοιχη αλληλουχία του ομολόγου UapA (Εικόνα 3.2.20), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των TM8 και TM14 αποτελεί σημαντική συνιστώσα στον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού της οικογένειας NCS2 που έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη. Μέχρι σήμερα, έμμεσες ενδείξεις για κάποια τέτοια αλληλεπίδραση μεταξύ του TM14 και τμημάτων του C-τελικού ημίσεος της δομικής περιοχής «πυρήνα» που είναι σημαντικά για την πρόσδεση υποστρώματος (TM8, TM10) υπήρχαν μόνο από λειτουργικά πειράματα με συνδυασμούς μεταλλαγμάτων τόσο στην XanQ (Papakostas *et al.*, 2008; Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή, 2011) όσο και στον UapA (Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, στην XanQ συνδυασμός αλλαγών στις θέσεις Ile-432 και Gln-324 (I432S/Q324E) οδηγούσε σε διπλά μεταλλάγματα με νέο προφίλ εξειδίκευσης και μεγαλύτερο εύρος προσδετών σε σχέση με τις μονές αντικαταστάσεις (Papakostas *et al.*, 2008) ενώ αντίστοιχες παρατηρήσεις με παρόμοια διπλά μεταλλάγματα έχουν γίνει στον UapA (Vlanti *et al.*, 2006; Amillis *et al.*, 2001). Επίσης, από τις αναλύσεις στο υπόβαθρο ενός χημειοκινητικού μεταφορέα ^{XanQ}N₁₃-C₁^{UapA} όπου εφαρμόστηκε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στις θέσεις Ile-432/Phe-528 και Asn-430/Thr-526 (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή, 2011) φάνηκε ότι η κεντρική περιοχή του TM14 (στο άκρο της α-έλικας α14

προς την πλευρά του περιπλάσματος) είναι καθοριστική για την επαναφορά σημαντικής ενεργότητας και εμπλέκεται στον καθορισμό της εξειδίκευσης. Πρόσφατα, μια ανάλυση μοριακής δυναμικής προσομοίωσης του μονοπατιού μετακίνησης της ξανθίνης διαμέσου του UapA (Kosti *et al.*, 2012) υπέδειξε ότι οι αντίστοιχες θέσεις του UapA (Thr-526, Phe-528) αποτελούν μέρος μιας πιθανής «πύλης εισόδου» της ξανθίνης από το εξωκυτταρικό περιβάλλον η οποία μπορεί να λειτουργεί ως φίλτρο επιλογής υποστρωμάτων με βάση τα προηγούμενα λειτουργικά πειράματα (Vlanti *et al.*, 2006; Parageorgiou *et al.*, 2008). Η τελευταία παρατήρηση ενισχύεται από τα βιοχημικά ευρήματα στην XanQ για το ότι η θέση N430C είναι ευαίσθητη σε αλκυλίωση από το NEM αλλά η αλκυλίωσή της παρεμποδίζεται παρουσία υποστρώματος (Papakostas *et al.*, 2008). Βλέπουμε λοιπόν, συνολικά, ότι υπάρχει μια κρίσιμη περιοχή του TM14 (Asn-430, Glu-429, Ile-432) που αλληλεπιδρά λειτουργικά με την περιοχή του ενεργού κέντρου (TM8, TM10) και με την παρούσα διατριβή δίνονται για πρώτη φορά σαφείς ενδείξεις ότι πράγματι αμινοξέα από τις δύο διαφορετικές περιοχές (TM14, TM8) αλληλεπιδρούν με φυσικό τρόπο στην τριτοταγή δομή της XanQ και άλλων μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NCS2/COG2233.

4.2.2 Σχόλια για τα προβλήματα εφαρμογής των μεθοδολογιών σταυρωτής διασύνδεσης κυστεϊνών στην περμεάση XanQ

Εκτός από τις δοκιμασίες αναστολής της ενεργότητας από τα ιόντα καδμίου (II), ενδείξεις για την εγγύτητα μεταξύ διαφορετικών περιοχών του μορίου της περμεάσης προέκυψαν επίσης από δοκιμασίες αναστολής της ενεργότητας μετά από εφαρμογή μιας σειράς αντιδραστηρίων σταυρωτής διασύνδεσης ποικίλου μήκους και ευελιξίας (3.2.2.1 και 2). Τα λειτουργικά αυτά πειράματα έδωσαν σαφείς ενδείξεις αλληλεπίδρασης για μία ακόμη περίπτωση εκτός της H257C/E429C (που αναφέρθηκε στο 4.2.1). Στην δεύτερη αυτή περίπτωση, όπου εξετάζονται δύο θέσεις της XanQ στην ίδια δομική περιοχή, του «πυρήνα», (I89C/I343C, TM3-TM11) που απέχουν μόνο 5Å στη διαμόρφωση που εμφανίζεται στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο, η προεπάση με όλα τα αντιδραστήρια διασύνδεσης εκτός του μικρότερου (MTS-3-MTS) οδηγεί σε απενεργοποίηση της περμεάσης, ενώ το MTS-3-MTS (5Å) επιτρέπει τη διατήρηση πλήρους ενεργότητας, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει αυστηρός περιορισμός στις μεταβολές της απόστασης μεταξύ των δύο θέσεων: η περιορισμένη ευελιξία του MTS-3-MTS (3-6Å) επιτρέπει στις δύο θέσεις να μην απομακρύνονται μεταξύ τους, πράγμα που φαίνεται να χρειάζεται κατά τον μηχανισμό λειτουργίας, αλλά η διασύνδεση με τα άλλα αντιδραστήρια (9-22Å) απενεργοποιεί γιατί απομακρύνει τις θέσεις I89C-I343C σε απόσταση $\geq 6\text{\AA}$, πράγμα που εμποδίζει τις αλλαγές διαμόρφωσης στον μηχανισμό

λειτουργίας. Οι παρατηρήσεις αυτές για δύο θέσεις που ανήκουν σε διαφορετικά ημίσεια της δομικής περιοχής «πυρήνα» (βλ. Εικόνα 3.1.49 και Εικόνα 4.3) υποδεικνύουν πιθανόν μια γενικότερη διατήρηση μιας σχετικά σφικτής διαμόρφωσης μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων της περιοχής «πυρήνα» η οποία σχετίζεται με την διατήρηση της λειτουργικής δομής του ενεργού κέντρου, όπως έχει προταθεί σε άλλα ομόλογα NCS2 από μελέτες κρυσταλλογραφίας (Lu *et al.*, 2011) και μοριακής προσομοίωσης (Kosti *et al.*, 2012). Η εικόνα αυτή των I89C/I343C (TM3-TM11) αντιδιαστέλλεται έντονα με αυτήν των H257C/E429C (TM8-TM14) όπου φαίνεται η μεγάλη ευελιξία κινήσεων που χρειάζεται ανάμεσα σε διαφορετικά τμήματα της δομικής περιοχής «εισόδου» και της δομικής περιοχής «πυρήνα» για τον μηχανισμό λειτουργίας (4.2.1).

Τόσο στην περίπτωση του H257C/E429C όσο και σε αυτήν του I89C/I343C η επιβεβαίωση της παρουσίας ομοιοπολικής διασύνδεσης του ζεύγους κυστεϊνών που χρειάστηκε για να υποστηριχθούν τα συμπεράσματα των λειτουργικών πειραμάτων έγινε με την μέθοδο σταυρωτής διασύνδεσης σε συνδυασμό με πρωτεόλυση με **θρυψίνη**, η οποία ήταν η μόνη μέθοδος που εφαρμόστηκε με σχετική επιτυχία από τέσσερις εναλλακτικές προσεγγίσεις που αξιολογήθηκαν ή δοκιμάστηκαν πειραματικά (βλ. 3.2.2.3). Τα προβλήματα που αντιμετώπιστηκαν στην εφαρμογή των άλλων μεθοδολογιών σταυρωτής διασύνδεσης σχετίζονταν σε μεγάλο βαθμό σε εγγενείς δυσχέρειες τροποποίησης του μοριακού υποβάθρου της περμεάσης λόγω περιορισμών δομής και τοπολογίας όπου προσέκρουε η πολλαπλή μεταλλαξιγένεση (βλ. 3.2.2.3.1).

Συγκεκριμένα, μία από τις συνηθέστερες μεθοδολογίες πειραμάτων σταυρωτής διασύνδεσης κυστεϊνών που έχουν εφαρμοστεί πολλαπλώς σε άλλους διαμεμβρανικούς μεταφορείς, όπως στην περμεάση LacY (Zhou *et al.*, 2009, 2011; Liu *et al.*, 2010; Wolin and Kaback, 2000; Guan *et al.*, 2002), είναι με την ανοσοαποτύπωση πεπτιδικών θραυσμάτων μετά από την στοχευμένη δράση ειδικής πρωτεάσης (παράγοντας Χα) της οποίας οι θέσεις αναγνώρισης έχουν εισαχθεί με τεχνικές ανασυνδυασμού DNA στις επιθυμητές θέσεις αλληλουχίας του μορίου. Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος της πέψης με ειδική πρωτεάση (παράγοντας Χα) δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί γιατί η εισαγωγή αλληλουχιών αναγνώρισης της πρωτεάσης Χα σε οποιαδήποτε από τις δύο μεγάλες ελεύθερες συνδετικές περιοχές του μορίου (Ip7 και Ip13, Εικόνα 3.2.25) προκάλεσε απενεργοποίηση και μείωση στο ελάχιστο των επιπέδων έκφρασης της ΧαnQ στη μεμβράνη, υποδεικνύοντας ότι οι δύο αυτές συνδετικές περιοχές είναι σημαντικές για την δομική σταθερότητα της πρωτεΐνης στην μεμβράνη. Είναι σχετικό ότι οι δύο συνδετικές περιοχές αποτελούν συνέχεια πολύ σημαντικών περιοχών της περμεάσης (TM8, που

δημιουργεί μέρος του κέντρου δέσμησης, βλ. 4.1.2, και TM14, που συμμετέχει σε λειτουργικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τα TM8 και TM10, βλ. 4.2.1) και μπορεί η έστω και μικρή αύξηση του μήκους τους με την εισαγωγή επιπλέον αλληλουχιών να αποδιοργανώνει την λειτουργική δομή. Ειδικά για την συνδετική περιοχή μεταξύ TM13 και TM14 (Ip13) έχει φανεί και από άλλα πειράματα, με χιμαιρικούς μεταφορείς (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή 2011), ότι αύξηση του μήκους της συνδετικής περιοχής μειώνει δραματικά την ενεργότητα ενώ η επαναφορά του αρχικού μήκους με μεταλλαξιγένεση απάλειψης (deletion mutagenesis) στο υπόβαθρο του χιμαιρικού μεταφορέα αποκαθιστά τόσο την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης όσο και την δυνατότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των TM8 και TM14 (βλ. 3.2.1, Εικόνα 3.2.20). Είναι φανερό ότι, σε αντίθεση με άλλες περμεάσες (όπως του δομικού τύπου της LacY) οι περμεάσες της οικογένειας NCS2 είναι πολύ πιο δύσκολο να τροποποιηθούν με εισαγωγή αλληλουχιών σε συνδετικές θηλειές(βλ. Frillingos, 2013).

Επίσης, πριν τη δημοσίευση της δομής του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011), είχε προταθεί η μέθοδος του ελέγχου ετεροδιμερισμού δύο ανεξάρτητων πολυπεπτιδίων, δηλαδή της εφαρμογής πειραμάτων διασύνδεσης σε συνδυασμό με την έκφραση της περμεάσης σε δύο αλληλοσυμπληρούμενα ξεχωριστά τμήματα μετά από γενετική τροποποίηση σε δύο ανεξάρτητες κωδικοποιούσες περιοχές (splits). Η μέθοδος αυτή είχε εφαρμοστεί εκτενώς στην περμεάση LacY και ορισμένες άλλες περμεάσες της υπεροικογένειας MFS οι οποίες μπορούν να εκφραστούν ως δύο ανεξάρτητα πολυπεπτίδια N6-C6 που αντιστοιχούν σε δύο συνεχείς δομικές περιοχές του μορίου (Wu and Kaback, 1996; Abramson *et al.*, 2003). Ωστόσο, έπειτα από αξιολόγηση των νεότερων δεδομένων από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο θεωρήθηκε ότι η ανωτέρω μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί για την XanQ ή άλλες περμεάσες NCS2 καθώς οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από δύο ασυνεχείς διαφορετικές δομικές περιοχές (TM1-4/8-11, περιοχή «πυρήνα» και TM5-7/12-14, περιοχή «εισόδου») και δεν εμπίπτει στην κατηγορία των περμεασών που μπορούν να εκφραστούν λειτουργικά ως διακοπτόμενες (split) περμεάσες.

Τέλος, ως μία μέθοδος που μειώνει την ανάγκη εισαγωγής εκτενούς τροποποίησης του μορίου σε συγκεκριμένες θέσεις επιλέχθηκε η μέθοδος της χημικής πρωτεόλυσης με CNBr, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις, αν και πιο πολύ σε συνδυασμό με αναλύσεις φασματομετρίας μαζών (Weinglass *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2009). Η μέθοδος αυτή δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί αποτελεσματικά, λόγω τεχνικών προβλημάτων του συνδυασμού της αντίδρασης του CNBr και της προεπάσης με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS, καθώς και της πολλαπλής μεταλλαξιγένεσης της XanQ σε κατάλοιπα μεθειονινών, όπως απαιτείται, η οποία μειώνει σημαντικά την

έκφραση και/ή την ενεργότητα (βλ. Εικόνα 3.2.24). Περαιτέρω πειραματική διερεύνηση απαιτείται πιθανόν για την βελτιστοποίηση της εφαρμογής αυτής της μεθόδου στην περμεάση *XanQ* (βλ. Παράρτημα 4). Πάντως, ανάλογες τεχνικές δυσχέρειες είχε η εφαρμογή του συνδυασμού πέψης με CNBr με πειράματα σταυρωτής διασύνδεσης κυστεϊνών και σε άλλες περιπτώσεις (κυρίως μεταφορείς νευροδιαβιβαστών, Tao *et al.*, 2009, Zomot *et al.*, 2005).

5. Περιλήψεις

Περίληψη

«Δομική και λειτουργική οργάνωση των διαμεμβρανικών ελίκων στους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT»

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αναλύθηκε με τεχνικές κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning) και λειτουργικών πειραμάτων διασύνδεσης ζευγών κυστεϊνών η δομική και λειτουργική οργάνωση ενός τυπικού μεταφορέα πουρινών της οικογένειας NCS2 (nucleobase-cation symporters-2, εναλλακτική παλαιότερη ονομασία nucleobase-asorbate transporters, NAT), της περμεάσης Ξανθίνης XanQ, η οποία έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά και χρησιμοποιείται ως πρότυπο μελέτης της οικογένειας NCS2 στο εργαστήριό μας. Στόχος της διατριβής ήταν να δοθεί ένα πειραματικό μοντέλο οργάνωσης των διαμεμβρανικών τμημάτων (α -ελίκων) στην τριτοταγή δομή της περμεάσης XanQ, να καταγραφούν αλλαγές διαμόρφωσης που χαρακτηρίζουν τον μηχανισμό δέσμευσης/μεταφοράς Ξανθίνης, να εντοπισθούν σημαντικά κατάλοιπα αμινοξέων πλησίον του κέντρου δέσμευσης ή σε θέσεις-«αισθητήρες» για τις αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση υποστρώματος, και, βάσει των ανωτέρω, να εξαχθεί ένα γενικότερο μοντέλο για τους μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NCS2. Πρόκειται για την πρώτη συστηματική ανάλυση αυτού του τύπου σε μια σημαντική, εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών που αναγνωρίζει ως υποστρώματα πολλά δομικά ανάλογα φαρμάκων και για την οποία δεν διαθέτουμε έως σήμερα παρά μόνο ένα μοντέλο δομής σε υψηλή ευκρίνεια από την κρυσταλλογραφία ενός σχετικά μακρινού ομολόγου των μεταφορέων πουρινών NCS2 που εμφανίστηκε στη βιβλιογραφία πρόσφατα (2011), ενώ η παρούσα διατριβή ήταν σε εξέλιξη.

Αρχικά με σκοπό να χαρτογραφηθούν σημαντικά κατάλοιπα για τις αλλαγές διαμόρφωσης που επάγει η δέσμευση του υποστρώματος της περμεάσης XanQ στο κέντρο δέσμευσης, ή σε σημαντικά για τον μηχανισμό λειτουργίας κατάλοιπα, έγινε εκτενής σημειακή μεταλλαξιγένεση σε θέσεις: (α) ισχυρά πολικών (Q, N) και δυνητικά ιοντιζόμενων (D, E, H, K, R) καταλοίπων αμινοξέων που προβλέπεται ότι βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα (α -έλικες) της περμεάσης, (β) της συνολικής περιοχής (Tyr-79 μέχρι Met-107) ενός σημαντικού διαμεμβρανικού τμήματος (TM3) που ανήκει στη δομική περιοχή «πυρήνα» της περμεάσης και (γ) σε «παράθυρα» αλληλουχιών με υψηλό βαθμό συντήρησης σε χαρακτηριστικά μοτίβα της περμεάσης XanQ τα οποία αποκαλύφθηκαν από λεπτομερή φυλογενετική ανάλυση ανάμεσα στους ομόλογους μεταφορείς Ξανθίνης και Ξανθίνης/ουρικού της οικογένειας NCS2/COG2233. Η λειτουργική ανάλυση των μεταλλαγμάτων ως προς την ενεργότητα μεταφοράς Ξανθίνης, την εξειδίκευση αναγνώρισης συγγενών

υποστρώματων (άλλες φυσικές πουρίνες, ουρικό, ουρακίλη, συνθετικά ανάλογα πουρινών) και την προσβασιμότητα από το υδρόφιλο ή υδρόφοβο περιβάλλον με ανάλυση αλκυλίωσης υποκατεστημένων καταλοίπων Cys από ειδικά SH-αντιδραστήρια, παρουσία ή απουσία υποστρώματος, κατέδειξε σημαντικά κατάλοιπα καθώς και αντίστοιχες περιοχές διαμεμβρανικών ελίκων της XanQ, των οποίων ο ρόλος δεν είχε αξιολογηθεί στο παρελθόν από άλλες μελέτες, είτε στην XanQ είτε σε συγγενικούς ομόλογους μεταφορείς (όπως στον μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UraA).

Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η απόλυτα συντηρημένη His-31 (TM1) είναι προσβάσιμη από το υδρόφιλο περιβάλλον και πιθανόν μη πρωτονιωμένη στην XanQ σε pH 7.5 (όπως φαίνεται από την μηδενική ή οριακά ανιχνεύσιμη έκφραση και ενεργότητα των H31K και H31R, την προσβασιμότητα της H31C στο MTSES και απενεργοποίησή της από το MTSEA⁺). Ο κύριος ρόλος της His-31 (TM1) μπορεί να είναι η συμμετοχή της σε δεσμό υδρογόνου με την Asn-325 (TM10), μέσω του οποίου καθορίζεται η υψηλή συγγένεια αναγνώρισης του υποστρώματος (ξανθίνης) χωρίς όμως να υπάρχει άμεση συμμετοχή στο κέντρο δέσμευσης (όπως φαίνεται από την χαμηλή συγγένεια αναγνώρισης ξανθίνης και αναλόγων της από τις περμεάσες H31C και H31L, την υψηλή συγγένεια των H31N και H31Q και έλλειψη παρεμπόδισης της αλκυλίωσης της H31C σε πείραμα *in vivo* από την ξανθίνη). Η αλληλεπίδραση μεταξύ His-31 και Asn-325, ένα επίσης απόλυτα συντηρημένο (και αναντικατάστατο λειτουργικά) αμινοξύ στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης, υποστηρίζεται από το δομικό μοντέλο της περμεάσης με βάση την κρυσταλλική δομή του ομολόγου UraA και από προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου για την Asn-325.

Στην N-τελική πλευρά της δομικής περιοχής «πυρήνα» (TM1-4) αναδείχθηκε επίσης μία σημαντική για την ενεργότητα περιοχή αλληλουχίας στο κυτταροπλασματικό άκρο του TM2. Ειδικά τα κατάλοιπα Gly-71 και Gln-75, θέσεις κοντά στο προβλεπόμενο κέντρο δέσμευσης σύμφωνα με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο, αποδεικνύονται αναντικατάστατα για τη λειτουργία και/ή τη δομική οργάνωση της XanQ (όπως υποστηρίζεται από την έλλειψη ενεργότητας των μεταλλαγμάτων G71C και Q75N και τα πολύ χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη των G71A και Q75A/C/E), ενώ οι θέσεις Ser-68, Gly-69 και Ile-70 φαίνεται να συνεισφέρουν στον καθορισμό του προφίλ εξειδίκευσης (το S68T αναγνωρίζει και μεταφέρει σε μικρό βαθμό γουανίνη, το I70C δεν αναγνωρίζει καθόλου την 6-θειοξανθίνη ενώ τα S68T, G69A και I70C αναγνωρίζουν με σημαντική συγγένεια την 8-μεθυλοξανθίνη). Η Gln-75 μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στον μηχανισμό συμμετέχοντας σε δεσμούς υδρογόνου απαραίτητους για την σταθεροποίηση της δομής ή την δυναμική της μετακίνησης του υποστρώματος

περιφερικά του κέντρου δέσμευσης ξανθίνης και τέτοιοι δεσμοί υδρογόνου, όπως φαίνεται από το δομικό μοντέλο, είναι πιθανό να δημιουργούνται με τις Ser-84 ή 88 του TM3.

Τα σημαντικότερα κατάλοιπα του TM3 συγκεντρώνονται σε δύο μοτίβα αλληλουχίας, τα ⁸³GSGLL⁸⁷ και ⁹³NFS⁹⁵. Στο ⁸³GSGLL⁸⁷ οι υψηλά συντηρημένες Gly-83, και Gly-85 έχουν σημαντικό ρόλο για την έκφραση ή σταθερότητα της XanQ στην μεμβράνη, ενώ τα μεταλλάγματα S84C, L86C και L87C απενεργοποιούνται πλήρως από το NEM με μεγάλη ευαισθησία (IC₅₀ 132, 25 και 112 μM), χωρίς αυτό να αλλάζει παρουσία υποστρώματος (L86C). Στο μοτίβο ⁹³NFS⁹⁵ ο ρόλος της Asp-93, για την οποία η δομική μοντελοποίηση προβλέπει ότι βρίσκεται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος, αποδείχθηκε καθοριστικός για την επιλεκτικότητα της περμεάσης XanQ για την ξανθίνη έναντι του ουρικού ή άλλων υποστρωμάτων με τροποποιήσεις στον ιμιδαζολικό δακτύλιο. Επιπλέον, οι θέσεις Phe-94 και Ser-95 είναι σημαντικές για την βέλτιστη αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης με αλλαγές στον πυριμιδινικό δακτύλιο, ενώ το S95C απενεργοποιείται πλήρως παρουσία του αντιδραστηρίου NEM. Τα παραπάνω κατέδειξαν τον αναντικατάστατο ρόλο που φαίνεται να έχει το μοτίβο ⁹³NFS⁹⁵ ιδιαίτερα στον καθορισμό του χαρακτηριστικού προφίλ εξειδίκευσης της περμεάσης XanQ.

Τα δεδομένα για τον ρόλο σημαντικών αμινοξέων της δομικής περιοχής «πυρήνα» της XanQ συμπληρώνονται με τα κατάλοιπα Glu-272 (TM8) και Asp-304 (TM9), που είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία της μεταφοράς ξανθίνης ως προς την παρουσία και την γεωμετρία των καρβοξυλομάδων στις θέσεις αυτές, και ως προς τον τρόπο συνδυασμού των πλευρικών αυτών ομάδων καθώς και της Asp-276 (TM8) σε σχέση με την Asp-93 στο TM3, για τη σωστή λειτουργία του κέντρου δέσμευσης της περμεάσης XanQ. Από τα δύο αυτά κατάλοιπα δυνητικά ιοντιζόμενων αμινοξέων, η Glu-272 που εμφανίζει απόλυτη συντήρηση στην οικογένεια NCS2/COG2233 (και επίσης συντηρείται ως Asp στον άλλο κλάδο της οικογένειας NCS2/COG2252 που περιλαμβάνει ομόλογα με μακρινή εξελικτική συντήρηση) αποτελεί καθοριστικό αμινοξύ του κέντρου δέσμευσης υποστρώματος.

Παράλληλα, η ανάλυση των μοτίβων αλληλουχίας στις διαμεμβρανικές έλικες της δομικής περιοχής «εισόδου» (TM5-7, TM12-14) ανέδειξε την δομική και/ή λειτουργική σημασία οκτώ (8) απόλυτα ή υψηλά συντηρημένων από φυλογενετική άποψη καταλοίπων γλυκινών οι οποίες βρέθηκε ότι είναι είτε αναντικατάστατες για τη λειτουργία (Gly-159, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409) και/ή τη δομική σταθερότητα της περμεάσης στη μεμβράνη (Gly-221) είτε σημαντικές ως μικρές πλευρικές ομάδες (Gly/Ala) στις αντίστοιχες θέσεις για τη διατήρηση της λειτουργικότητας και/ή της δομικής σταθερότητας στη

μεμβράνη (Gly-152, Gly-217). Επίσης, αναδείχθηκε η σημασία τριών θέσεων με υδροφοβα κατάλοιπα (Val-155, Leu-368, Leu-404) όπου για την εξασφάλιση σημαντικής ενεργότητας είναι απαραίτητη η παρουσία υδροφοβου αμινοξέος παρόμοιου όγκου, καθώς και τριών θέσεων (Ser-151, Phe-376, Ser-377) όπου αύξηση του όγκου ή μικρές αλλαγές της πλευρικής ομάδας επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα. Έτσι τα σημαντικότερα κατάλοιπα της δομικής περιοχής «εισόδου» της XanQ συγκεντρώνονται κυρίως στα TM5 (Ser-151, Gly-152, Val-155, Gly-159), TM12 (Leu-368, Gly-369, Gly-370, Phe-376, Ser-377, Gly-383) και TM13 (Leu-404, Gly-409), αλλά και TM14 (από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν αναδειχθεί ως σημαντικά τα Asn-430, Ile-432 και Gly-435/436).

Για τον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων σημαντικών για τον μηχανισμό λειτουργίας εφαρμόστηκαν πειράματα επίδρασης δισθενών κατιόντων καδμίου και σταυρωτής διασύνδεσης κυστεϊνών, έπειτα από εισαγωγή ζευγών κυστεϊνών σε δυνητικά σημαντικές θέσεις αμινοξέων σε διαφορετικά TM της πρωτεΐνης XanQ, οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για τη λειτουργία και είναι προσβάσιμες από το περίπλασμα. Τα μεταλλάγματα με ζεύγη κυστεϊνών εξετάστηκαν ως προς την ενεργότητα παρουσία ή όχι χλωριούχου καδμίου ώστε να ελεγχθεί εάν τα επιλεγμένα ζεύγη κυστεϊνών διαμορφώνουν κέντρο συντονισμού για το κάδμιο που εμποδίζει τον μηχανισμό μεταφοράς. Εξετάστηκε επίσης η επίδραση ευέλικτων διλειτουργικών αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS τόσο στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων όσο και στην δυνατότητα σχηματισμού ομοιοπολικής διασύνδεσης μεταξύ των δύο κυστεϊνών, σε συνδυασμό με πρωτεολυτική πέψη της XanQ με θρυψίνη σε μεμβρανικά κυστίδια. Βρέθηκε ότι οι θέσεις H257C (TM8, περιοχή «πυρήνα») και E429C (TM14, περιοχή «εισόδου») μπορούν να συνδεθούν σταυρωτά μεταξύ τους μέσω αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS μήκους 9-22Å, τα οποία δεν επηρεάζουν δραματικά την ενεργότητα του H257C/E429C. Ωστόσο, η ενεργότητα του διπλού μεταλλάγματος είναι ευαίσθητη σε αναστολή από ιόντα καδμίου, υποδηλώνοντας την πιθανή προσέγγιση των μακρινών αυτών θέσεων στο χώρο (περίπου 20Å στην διαμόρφωση που υποδεικνύει το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της UraA) σε κάποια ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η πρωτεΐνη XanQ κατά τον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς της ξανθίνης. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αναστολή ενεργότητας που παρατηρείται ως συνέπεια της πρόσδεσης καδμίου μεταξύ των δύο θέσεων στα TM8 και TM14 διατηρείται και στο μοριακό υπόβαθρο ενός χμιαϊκού μεταφορέα XanQ/UraA, στον οποίο το TM14 έχει αντικατασταθεί με την αντίστοιχη αλληλουχία του ομολόγου UraA, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση αυτή αποτελεί σημαντική συνιστώσα στον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων ξανθίνης και/ή ουρικού της οικογένειας NCS2 που έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη.

Παράλληλα, οι θέσεις I89C (TM3, περιοχή «πυρήνα») και I343C (TM11, περιοχή «πυρήνα») παραμένουν κοντά μεταξύ τους κατά τον μηχανισμό ενεργού μεταφοράς, αφού τα δεδομένα υπέδειξαν ότι αυτές οι δύο θέσεις είναι δυνατόν να αλληλοσυνδεθούν χωρίς απώλεια ενεργότητας μέσω αντιδραστηρίου MTS-3-MTS (3-5Å), ενώ αντιδραστήρια MTS-linker-MTS μεγαλύτερου μήκους απενεργοποιούν πλήρως την περμεάση I89C/I343C. Αντίθετα, η ενεργότητα του I167C/T373C δεν επηρεάζεται από την παρουσία ιόντων καδμίου ή αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS, υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση των θέσεων 167 (TM5, περιοχή «εισόδου») και 373 (TM12, περιοχή «εισόδου») δεν είναι σημαντική στον μηχανισμό. Από την μελέτη αυτή επίσης σημειώθηκε αναστολή ενεργότητας παρουσία ιόντων καδμίου για τα μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης A323C και N430C, η οποία για το N430C αποδείχθηκε ότι οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε ενδομοριακή αλληλεπίδραση με την His-257.

Summary

“Structural and functional arrangement of transmembrane helices of purine transporters of the NAT family”

Using Cys-scanning mutagenesis and functional cross-linking experiments in double-Cys mutants, we analyzed the structural and functional arrangement of transmembrane helices of the xanthine permease XanQ, a typical purine transporter of family NCS2 (nucleobase-cation symporters-2, alternative older name: nucleobase-ascorbate transporters, NAT). Our aim was to give an experimental model of the arrangement of transmembrane segments (α -helices) in the tertiary structure of XanQ, to report conformational changes that characterize the mechanism of xanthine binding and transport, to delineate important amino acid residues in the binding site region or in sites “sensors” for the substrate-induced conformational changes, and to deduce a more general model for the purine transporters of family NCS2. Our study is the first systematic approach of this type in an important, ubiquitous family of transmembrane proteins that recognize as substrates several pharmaceutically relevant compounds or analogs and for which there exists only one high-resolution structural model from the recent crystallography of a relatively distant NCS2 homolog (2011).

In order to map residues important for the conformational changes of XanQ during substrate binding and turnover we applied extensive site-directed mutagenesis: (a) in polar (Q, N) and potentially charged (D, E, H, K, R) amino acid residues predicted to be in transmembrane segments (α -helices), (b) in the broader region (Tyr-79 to Met-107) of an important transmembrane segment (TM3) in the “core” domain and (c) in highly conserved amino acid “windows” of characteristic sequence motifs of XanQ, as revealed by extensive phylogenetic analysis of the homologous xanthine and xanthine/uric acid transporters of family NCS2/COG2233.

The functional analysis of mutants for xanthine active transport, affinity of recognition of a range of similar compounds (other purines, uric acid, uracil, synthetic purine analogs) and accessibility of the substituted Cys from the hydrophilic or hydrophobic environment using specific SH-reagents in the presence or absence of substrate revealed important residues as well as corresponding regions of transmembrane helices of XanQ, which had not been studied previously in either XanQ or other related homologs (as in the uric acid/xanthine permease UapA).

At first, it was proved that His-31 (TM1) of XanQ, which is absolutely conserved in NCS2 family, is accessible from the hydrophilic environment and likely not charged at pH 7.5 (as implied from the negligible or marginally detected membrane protein levels and lack of activity of mutants H31K and H31R, the

experimentally shown accessibility of H31C to MTSES⁻ and inactivation of H31C by MTSEA⁺). A major role of His-31 (TM1) might be to hydrogen bond with Asn-325 (TM10), which appears to be critical for the high-affinity recognition of substrate (xanthine), but without involving direct participation of His-31 in the binding site (as indicated from the low affinities of mutants H31C and H31L for xanthine or analogs in sharp contrast with the high affinities seen with H31N and H31Q and the inability of xanthine to block the alkylation of H31C by NEM in the *in vivo* experiment). The possible hydrogen bonding interaction of His-31 with Asn-325, which is also absolutely conserved in NCS2 family (and functionally irreplaceable in XanQ), is supported by the structural model of XanQ permease built on the crystal structure of homolog UraA and by previous experimental data on Asn-325 from our laboratory.

In the N-terminal side of the “core” domain (TM1-4) we discovered also another important sequence region, in the cytoplasmic two α -helical turns of TM2. Specifically, residues Gly-71 and Gln-75, located in the vicinity of the predicted substrate binding site of XanQ, were found to be irreplaceable for function and/or structural stability of the permease (as supported by the lack of activity of mutants G71C and Q75N and the very low or negligible levels in the membrane of G71A and Q75A/C/E), while residues Ser-68, Gly-69 and Ile-70 appear to contribute in determining the substrate recognition profile of XanQ (mutant S68T recognizes and transports to low levels guanine, mutant I70C fails to recognize 6-thioxanthine while S68T, G69A and I70C recognize with high affinity the non-wild-type ligand 8-methylxanthine). In particular, Gln-75 may play a crucial role at the periphery of the binding site by participating in essential hydrogen bonds (possibly with Ser-84 or Ser-88 in TM3) required for the stabilization of the permease structure or for substrate translocation in the transport mechanism.

The majority of the important residues of TM3 are assembled in two sequence motifs, ⁸³GSGLL⁸⁷ and ⁹³NFS⁹⁵. In motif ⁸³GSGLL⁸⁷, the highly conserved Gly-83 and Gly-85 are important for the expression or stability of XanQ in the membrane, while mutants S84C, L86C and L87C are highly sensitive to inactivation by NEM (IC₅₀ 132, 25 and 112 μ M), without changes in sensitivity seen in the presence of substrate (L86C). In motif ⁹³NFS⁹⁵ a particularly crucial role was noted for residue Asn-93. Asn-93 (TM3), predicted by structural modeling to be in the region of the binding site, appears to have a decisive role for determining the permease selectivity for xanthine and counter-selectivity against uric acid or other analogs with modifications at the imidazole ring. Moreover, Phe-94 and Ser-95 were found important for the optimal recognition of xanthine analogs with changes at the pyrimidine ring, while S95C is inactivated in the presence of NEM. These data highlight the irreplaceable role of motif ⁹³NFS⁹⁵ particularly in the determination of the characteristic substrate recognition profile of permease XanQ.

The results on the role of important amino acids of the “core” domain of XanQ are complemented with residues Glu-272 (TM8) and Asp-304 (TM9), found to be irreplaceable for the permease function with respect to the presence, geometry and combination of carboxyl groups at these positions, as well as with respect to the combination of carboxyl groups with residues Asp-276 (TM8) and Asn-93 in TM3. Of the above acidic amino acids, Glu-272 is absolutely conserved in family NCS2/COG2233 (and also conserved as an Asp in the other branch of the family, NCS2/COG2252, including homologs with distant evolutionary conservation) and appears to be a fundamental determinant of the substrate binding site.

In parallel, the analysis of sequence motifs in the transmembrane helices of the “gate” domain (TM5-7, TM12-14) revealed the structural and functional importance of eight (8) phylogenetically absolutely or highly conserved glycine residues, which were proved to be irreplaceable for function (Gly-159, Gly-369, Gly-370, Gly-383, Gly-409) or for the structural stability of the permease in the membrane (Gly-221) or important as small side-chain groups (Gly/Ala) at the corresponding positions (Gly-152, Gly-217). Also, the results revealed the importance of three hydrophobic residues (Val-155, Leu-368, Leu-404), where the presence of a similar-volume hydrophobic amino acid is essential for activity, as well as three other residues (Ser-151, Phe-376, Ser-377) where an increase in the volume or small changes of side chain influence the activity considerably. Thus, the most important residues of the “gate” domain of XanQ are assembled mainly in TM5 (Ser-151, Gly-152, Val-155, Gly-159), TM12 (Leu-368, Gly-369, Gly-370, Phe-376, Ser-377, Gly-383), TM13 (Leu-404, Gly-409), as well as TM14 (Asn-430, Ile-432 and Gly-435/436 had been delineated as important from previous studies in our laboratory).

To search for interactions that are crucial in the transport mechanism we used cadmium-sensitivity and Cys-Cys cross-linking functional assays. As targets for double-Cys replacements we selected residues that are functionally replaceable and accessible from the periplasm. Active mutants were assayed in the presence of cadmium chloride to determine whether each selected Cys-Cys pair forms a coordination site for cadmium which would block the permease turnover. We also assayed the effect of flexible homobifunctional MTS-MTS reagents on active transport and cross-linking of double-Cys mutants, which were exposed to trypsin digestion in right-side-out membrane vesicles. We found that H257C (TM8; core domain) and E429C (TM14; gate domain) can be cross-linked by reagents ranging in length from 9-22Å with retention of high transport activity, implying a long-distance interaction between these positions (approximately 20Å in the conformation shown in the crystal structure-based model of UraA). However, mutant H257C/E429C activity is sensitive to inhibition by cadmium, indicating the need for conformational flexibility at these positions which might come closer to each other in an intermediate conformation assumed by XanQ in the mechanism

of active transport. It is remarkable that the inactivation of the double-Cys mutant H257C/E429C (two Cys between TM8 and TM14) in the presence of cadmium ions is also observed in the molecular background of a chimeric XanQ/UapA transporter, in which the TM14 of XanQ has been replaced with the corresponding sequence of the homologous UapA, implying that this TM8-TM14 interaction constitutes an important component in the mechanism of xanthine and uric acid transport of NCS2 permeases that has been conserved during evolution.

It was also found that I89C (TM3; core domain) and I343C (TM11; core domain) can be cross-linked by MTS-3-MTS (linker 3-5Å) without loss of activity but I89C/I343C is highly sensitive to inactivation with cross-linkers longer than 5Å, suggesting that these positions remain close together during turnover. On the other hand, the activity of a double-Cys mutant with I167C (TM5, gate domain) and T373C (TM12; gate domain) is insensitive to inhibition by either cadmium or MTS-MTS reagents, implying that their potential interaction is not crucial for turnover. Our study also showed that single-Cys mutants A323C and N430C are sensitive to inactivation by cadmium and that the sensitivity of N430C was due to involvement of His-257 implying a dynamic physical interaction between these two sites (TM8-TM14).

6. Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610-615
- Akabas, M.H., Stauffer, D.A., Xu, M., and Karlin, A. (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-310
- Alberts IL, Nadassy K, Wodak SJ. (1998) Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci.* **7**(8), 1700-1716
- Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* **272**(20), 5101-5109
- Amillis, S., Kosti, V, Panatazopoulou, A., Mikros, E., and Diallinas, G. (2011) Mutational analysis and modelling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J. Mol. Biol.* **411**(3), 567-580
- Amillis, S., Koukaki, M., and Diallinas, G. (2001) Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J. Mol. Biol.* **313**, 765-774
- Andersen, P. S., Frees, D., Fast, R., and Mygind, B. (1995) Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J. Bacteriol.* **177**, 2008-2013
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* **350** (23), 2343-2351
- Argyrou E, Sophianopoulou V, Schultes N, Diallinas G. (2001) Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell.* **13** (4), 953-964
- Arkin IT, Russ WP, Lebendiker M, Schuldiner S. (1996) Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle. *Biochemistry* **35**(22), 7233-7238
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. (2003) Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit.* **9**(9), BR325-330
- Baba T, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner, H. Mori. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* **2**, 1-11
- Baldwin, J. M. (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**, 1693-1703
- Bénitah, J.P., Tomaselli G.F., and Marban E. (1996) Adjacent pore-lining residues within sodium channels identified by paired cysteine mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7392-7396

- Berg, M. J., Tymoczko, L. J. and Stryer, L. (2005) *Biochemistry*, 5th edition, W.H Freeman and Company, San Francisco
- Bibi E, Kaback H R (1990) *In vivo* expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(11): 4325–4329
- Bieber JD, and Terkeltaub RA. (2004) Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum.* **50**(8), 2400-2414
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474
- Boland MJ, Schubert KR. (1982) Purine biosynthesis and catabolism in soybean root nodules: incorporation of ¹⁴C from ¹⁴CO₂ into xanthine. *Arch Biochem Biophysics* **213**(2), 486-491
- Botou, M., Papakostas, K., Kalliampakou, K., I., Fliemetakis, E., and Frillingos, S. (2012) Structure function analysis of purine uptake in nitrogen – fixing rhizobacteria. *Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology*, 63rd Panhellenic Congress, The Book of Abstracts, 202
- Brocke L., Bendahan A., Grunewald M., and Kanner I. B. (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
- Bürzle M, Hediger MA. (2012) Functional and physiological role of vitamin C transporters. *Curr Top Membr.* **70**, 357-75
- Cain, B. D., and Simoni, R. D. (1988) Interaction between Glu-219 and His-245 within the a subunit of F1F0-ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* **263**, 6606-6612
- Carrasco, N., Herzlinger, D., Mitchell R. DeChiara S., Danho, W., Gabriel, T.F., and Kaback, H.R. (1984) Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4672-4676
- Catterall, W. A. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**, 50-61
- Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004). The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*: characterisation of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* **279**, 3132-3141
- Chaptal V, Kwon S, Sawaya MR, Guan L, Kaback HR, Abramson J. (2011) Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(23), 9361-9366
- Cheng Y, Prusoff WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* **22**(23), 3099-3108

- Christiansen LC, Schou S, Nygaard P, Saxild HH. (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**(8), 2540-2550
- Consler TG, Tsolas O, Kaback HR (1991) Role of proline residues in the structure and function of a membrane transport protein. *Biochemistry* **30**(5), 1291–1298
- Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., and von Heijne, G. (2005) Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* **308**, 1321–1323
- 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
- Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. (2014) Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **510** (7503), 121-125
- Diallinas, G. (2008) Biochemistry. An Almost-Complete Movie. *Science* **322**, 1644-1645
- Diallinas G. (2013) Allopurinol and xanthine use different translocation mechanisms and trajectories in the fungal UapA transporter. *Biochimie*, 1755-1764.
- Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A., and Scazzocchio, C. (1998) Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J.* **17**, 3827-3837
- Dimroth P. (1997) Primary sodium ion translocating enzymes *Biochim Biophys Acta.* **1318**(1-2), 11-51
- De Koning, H. P., Bridges, D. J. and Burchmore, R. J. (2005) Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 987-1020
- De Koning, H., and Diallinas, G. (2000) Nucleobase transporters. *Mol. Membr. Biol.*, **17**, 75-94
- De la Riva L, Badia J, Aguilar J, Bender RA, Baldoma L. (2008) The hpx genetic system for hypoxanthine assimilation as a nitrogen source in *Klebsiella pneumoniae*: gene organization and transcriptional regulation. *J Bacteriol.* **190**(24), 7892-7903.
- Dunten RL, Sahin-Tóth M, Kaback HR. (1993). (1993a) Role of the charge pair aspartic acid-237-lysine-358 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 3139-3145
- Dunten RL, Sahin-Tóth M, Kaback HR. (1993b) Cysteine scanning mutagenesis of putative helix XI in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **32**(47),12644-12650
- Elion GB. (1993) Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol.* Suppl **1**, 2-6
- Elion Gb, and Hitchings Gh. (1951) Antagonists of nucleic acid derivatives. V. Pteridines. *J Biol Chem.* **188**(2), 611-621

- Enomoto A1, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417** (6887), 447- 452
- Ermolova N., Guan L., Kaback H. R. (2003) Intermolecular thiol cross-linking via loops in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(18): 10187–10192
- Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. (2014) Structure-based mechanism for Na(+)/melibiose symport by MelB. *Nat Commun*. **5**, 3009-3014
- 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
- 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
- Fannes T, Vandermarliere E, Schietgat L, Degroeve S, Martens L, Ramon J. (2013) Predicting tryptic cleavage from proteomics data using decision tree ensembles. *J Proteome Res*. **12**(5), 2253-2259
- Feilmeier, B.J, Iseminger, G., Schroeder, D., Webber H., Phillips G.J. (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 4068-4076
- 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
- Forrest, L. R., R. Krämer, C. Ziegler (2011) The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **187**, 167-188
- Forrest, L. R. and G. Rudnick (2009) The Rocking Bundle: A Mechanism for Ion-Coupled Solute Flux by Symmetrical Transporters. *Physiology* **24**, 377-386
- Fox IH, and Kelley WN. (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. **47**, 655-86
- Frillingos S. (2013) Using Cys-Scanning Analysis Data in the Study of Membrane Transport Proteins in *Genetic Manipulation of DNA and protein, Examples from current research* (ed. D. Figurski) Intech, pp 333-360
- Frillingos S. (2012) Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol*. **3**(3), 250-272
- Frillingos, S., Gonzalez, A., and Kaback, H. R. (1997) Cysteine-scanning mutagenesis of helix IV and the adjoining loops in the lactose permease of *Escherichia coli*: Glu126 and Arg144 are essential. *Biochemistry* **36**, 14284-14290

- Frillingos, S., and Kaback, H. R. (1996) Chemical rescue of Asp237→Ala and Lys358→Ala mutants in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 13363-13367
- Frillingos, S., and Kaback, H. R. (2001) Altering sugar transport specificity of a bacterial oligosaccharide -H⁺ symporter (OHS) by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **268**, 223-226
- Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Persson, B., and Kaback, H. R. (1994) Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 8074-8081
- Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Wu, J., and Kaback, H. R. (1998) Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure-function relationships in membrane proteins. *FASEB J.* **12**, 1281-1299
- Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Wu, J., Lengeler, W. J., and Kaback, H. R. (1995) Helix packing in the sucrose permease of *Escherichia coli*: Properties of engineered charge pairs between helices VII and XI. *Biochemistry* **34**, 9368-9373
- Galmarini CM1, Mackey JR, Dumontet C. (2002) Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment *Lancet Oncol.* **3**(7), 415-424
- 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
- Georgopoulou, E., Mermelekas G., Karena E., Frillingos S. (2010) Purine Substrate Recognition by the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in the YgfO Xanthine Permease. *J Biol Chem* **285**, 19422-19433
- Goldkorn, T., Rimon, G. & Kaback, H.R. (1983). Topology of the lac carrier protein in the membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, Vol.80, No.11, (June 1983), 3322-3326
- Goldshleger, R., Tal, D. M., Moorman, J., Stein, W. D., and Karlsh, S. J. (1992) Chemical modification of Glu-953 of the alpha chain of Na⁺K⁺-ATPase associated with inactivation of cation occlusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6911-6915
- Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S., and Diallinas, G. (2005) Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT family. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 263-275
- Goudela S, Tsilivi H, Diallinas G. (2006) Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Mol Membr Biol.* **23**(4), 291-303
- 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.
- Gournas C, Oestreicher N, Amillis S, Diallinas G, Scazzocchio C. (2011) Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **48**, 840-848.

- 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
- Granseth, E., Daley, DO, Rapp, M., Melen, K., von Heijne, G. (2005) Experimentally constrained topology models for 51,208 bacterial inner membrane proteins. *J. Mol. Biol.* **352**, 489-494
- Grothey A, and Sargent D. (2005) Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *J Clin Oncol.* **23**(36), 9441-9442
- Guan M, Zhang RD, Wu B, Henderson EE. (1996) Infection of primary CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by Epstein-Barr virus enhances human immunodeficiency virus expression. *J Virol.* **70**(10), 7341-7346
- Guan, L., and Kaback, H. R. (2006) Lessons from lactose permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 67-91
- Guan, L., Mizra, O., Verner, G., Iwata, S., and Kaback, H. R. (2007) Structural determination of wild-type lactose permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 15294-15298
- Guan L1, Murphy FD, Kaback HR. (2002) Surface-exposed positions in the transmembrane helices of the lactose permease of *Escherichia coli* determined by intermolecular thiol cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(6), 3475-3480
- H**aydon A. (2003) Adjuvant chemotherapy in colon cancer: what is the evidence? *Intern Med J.* **33**(3), 119-124
- He, M. M., and Kaback, H. R. (1997) Interaction between residues Glu269 (helix VIII) and His322 (helix X) of the lactose permease of *Escherichia coli* is essential for substrate binding. *Biochemistry* **36**, 13688-13692
- He, M. M., Voss, J., Hubbell, W. L., and Kaback, H. R. (1997) Arginine 302 (helix IX) in the lactose permease of *Escherichia coli* is in close proximity to glutamate 269 (helix VIII) as well as glutamate 325. *Biochemistry* **36**, 13682-13687
- Hennebry SC. (2009) Evolutionary changes to transthyretin: structure and function of a transthyretin-like ancestral protein. *FEBS J.* **276** (19), 5367- 5379.
- 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
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59
- Honig, B. H., and Hubbel, W. L. (1984) Stability of "salt bridges" in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5412-5416

- 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.
- Hwang JY, Jang BK, Kwon KM, Chung WJ, Park KS, Cho KB, Hwang JS, Ahn SH, Kim GC, Kim YH, Choi JS, Kwon JH (2005) Efficacy of hepatic arterial infusion therapy for advanced hepatocellular carcinoma using 5-fluorouracil, epirubicin and mitomycin-C *Korean J Gastroenterol.* **45**(2), 118-124
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96** (1), 23-28
- Iwasaki H1, Huang P, Keating MJ, Plunkett W. (1997) Differential incorporation of ara-C, gemcitabine, and fludarabine into replicating and repairing DNA in proliferating human leukemia cells. *Blood* **90**(1), 270-278
- Jiang X, Nie Y, Kaback HR (2011) Site-directed alkylation studies with LacY provide evidence for the alternating access model of transport *Biochemistry* **50**(10), 1634-1640
- Jiang X, Villafuerte MK, Andersson M, White SH, Kaback HR (2014) Galactoside-binding site in LacY. *Biochemistry* **53**(9):1536-1543
- Jung, K., Jung, H., Wu, J., Privé, G. G., and Kaback, H. R. (1993) Use of site-directed fluorescence labeling to study proximity relationships in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**, 12273-12278
- Jung. K., Voss, J., He, M., Hubbell, W. L., and Kaback, H. R. (1995) Engineering a metal binding site within a polytopic membrane protein, the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 6272-6277
- Johansen LE, Nygaard P, Lassen C, Agersø Y, Saxild HH. (2003) Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). *J Bacteriol.* **185**(17), 5200-5209.
- Kaback, H. R, Dunten, R., Frillingos, S., Venkatesan, P., Kwaw, I., Zhang, W., and Ermolova, N. (2007) Site-directed alkylation and the alternating access model for LacY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 491-494
- Kaback HR, Sahin-Tóth M, Weinglass AB (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**(8), :610-620
- Kaback, H. R., Reeves, J. P., Short, S. A., and Lombardi, F. J. (1974) Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles: XVIII. The mechanism of action of carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone. *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 215-222
- Kaiser, R., and Metzka, L., (1998) Enhancement of cyanogen bromide cleavage Yields for methionyl-serine and methionyl-treonine peptide bonds. *Analytical Biochemistry* **266**, 1-8
- Karatza, P., and Frillingos, S. (2005) Cloning and functional characterization of 2 bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 251-261

Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E., and Frillingos, S. (2006) Cysteine-scanning analysis of the Nucleobase-Ascorbate transporter signature motif YgfO permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 39881-39890

Karena E, and Frillingos S (2009) Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. *J Biol Chem.* **284**(36), 24257-24268

Karena E., and Frillingos S. (2011) The Role of Transmembrane Segment TM3 in the Xanthine Permease XanQ of *Escherichia coli* *J Biol Chem.* **286** (45), 39595–39605

Kasho V. N, Smirnova I. N, Kaback H. R. (2006) Sequence alignment and homology threading reveals prokaryotic and eukaryotic proteins similar to lactose permease. *J. Mol. Biol.* **358**, 1060-1070

Kato R, Maeda T, Akaike T, Tamai I.(2006) Characterization of novel Na⁺-dependent nucleobase transport systems at the blood-testis barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **290**(5), 968-975

Keil, B. (1992) Specificity of Proteolysis. *Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, NewYork*, 335-341

Khandazhinskaya CA, Shirokova EA. (2013) AZT 5'-Phosphonates: Achievements and Trends in the Treatment and Prevention of HIV Infection.*Acta Naturae* **5**(3), 54-61

Khorana, H. G. (1988) Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons. *J. Biol. Chem.* **263**, 7439-7442

Kim, K.S., Pelton J.G., Inwood W.B., Andersen U., Kustu S., Wemmer D.E. (2010) The Rut Pathway for Pyrimidine Degradation: Novel Chemistry and Toxicity Problems. *J Bacteriol* **192**, 4089-40102

King C. S., Hansen L. C., and Wilson T. H. (1991) The interaction between aspartic acid 237 and lysine 358 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 177-186

Klingenberg, M. (1988) Nucleotide binding to uncoupling protein. Mechanism of control by protonation. *Biochemistry* **27**, 781-791

Konings WN, Barnes EM Jr, Kaback HR. (1971) Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. 2. The coupling of reduced phenazine methosulfate to the concentrative uptake of beta-galactosides and amino acids. *J Biol Chem.* **246**(19), 5857-5861

Köse M, Schiedel AC (2009) Nucleoside/nucleobase transporters: drug targets of the future? *Future Med Chem.***1**(2):303-326

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

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

- Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S., and Diallinas, G. (2005) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **350**, 499-513
- Kozmin SG, Stepchenkova EI, Chow SC, Schaaper RM. (2013) A critical role for the putative NCS2 nucleobase permease YjcD in the sensitivity of *Escherichia coli* to cytotoxic and mutagenic purine analogs. *MBio.* **4**(6), 661-673
- Kryptou E, Diallinas G. (2014) Transport assays in filamentous fungi: kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* **63**, 1-8
- Kryptou E, Kosti V, Amillis S, Myriantopoulos V, Mikros E, Diallinas G. (2012) Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 transporter *J Biol Chem.* **287**(44), 36792-36803
- Kryptou E, Lambrinidis G, Evangelidis T, Mikros E, Diallinas G. (2014) Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Mol Microbiol.* **93**(1), 129-135
- Kumar H, Kasho V, Smirnova I, Finer-Moore JS, Kaback HR, Stroud RM. (2014) Structure of sugar-bound LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**(5), 1784-1788
- Kwangsoo Kim, Jinseo Park, and Sangkee Rhee (2007). Structural and Functional Basis for (S)-Allantoin Formation in the Ureide Pathway. *J Biol Chem.* **282** (32), 23457-23464.
- Kwaw, I., Zen, K. C., Hu, Y, and Kaback, H. R. (2001) Site-directed sulfhydryl labeling of the lactose permease of *Escherichia coli*: helices IV and V that contain the major determinants for substrate binding. *Biochemistry* **40**, 10491-10499
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Landfear, S.M. (2009) Transporters for Drug Delivery and as Drug Targets in Parasitic Protozoa. *Clin Pharmacol Ther* **87**, 122-125.
- Landfear SM. (2011) Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryot Cell.* **10**(4), 483-493
- 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.
- Lee, J.I., Hwang, P. P., Hansen, C., and Wilson, T. H. (1992) Possible salt bridges between transmembrane α -Helices of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *The journal of Biological Chemistry* **267**, 20758-20764
- Lee, J.I., Hwang P. P., and Wilson T. H. (1993) Lysine 319 interacts both Glutamic acid 269 and Aspartic acid 240 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 20007-20015
- Lee, Y., D. H. Lee, C. W. Kho, A. Y. Lee, M. Jang, S. Choc, C. H. Lee, J. S. Lee, P. K. Myung, B. C. Park, S. G. Park (2005). Transthyretin-related proteins function to facilitate the

hydrolysis of 5- hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. *FEBS letters* **579**, 4769-4774

Lee IR, Yang L, Sebetso G, Allen R, Doan TH, Blundell R, Lui EY, Morrow CA, Fraser JA. (2013) Characterization of the complete uric acid degradation pathway in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* **8**(5), e64292

Liu Z., Madej M. G., Kaback H. R. (2010) Helix dynamics in LacY: helices II/IV *J Mol Biol.* **396** (3), 617–626

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A.C., Krieger M., Scott P.M., Zipursky S. L. and Darnell J. (2004) *Molecular Cell Biology*, W.H Freeman and Company, New York

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

Loland CJ, Norregaard L, Gether U. (1999) Defining proximity relationships in the tertiary structure of the dopamine transporter. Identification of a conserved glutamic acid as a third coordinate in the endogenous Zn(2+)-binding site. *J Biol Chem.* **274**(52), 36928-36934

Loo TW, Clarke DM. (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem.* **276**(40), 36877-36880

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

Macara, I. G., and Cantley, L. C. (1981) Mechanism of anion exchange across the red cell membrane by band 3: interactions between stilbenedisulfonate and NAP- taurine binding sites. *Biochemistry* **20**, 5695-5701

Mansfield T. A., Schultes N. P., Mourad G. S. (2009) AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis. *FEBS Lett.* **583**, 481–486

Martin JC, Dvorak CA, Smee DF, Matthews TR, Verheyden JP. (1983) 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent. *J Med Chem.* **26**(5), 759-761

Matthews T1, Boehme R (1988) Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis. Suppl* **3**, S490–494

Maughan R. J. and Griffin J. (2003) Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **16**, 411–420

Maurino VG1, Grube E, Zielinski J, Schild A, Fischer K, Flügge UI (2006) Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **47**(10):1381-1393

Meintanis, C., Karagouni, A. D., and Diallinas, G. (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

- Meredith, D. (2004) Site-directed mutation of arginine 282 to glutamate uncouples the movement of peptides and protons by the rabbit proton-peptide cotransporter PepT1. *J. Biol. Chem.* **279**, 15795-15798
- 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
- Michaelis S, Hunt J F, Beckwith J (1986) Effects of signal sequence mutations on the kinetics of alkaline phosphatase export to the periplasm in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **167**(1), 160-167
- Miller, M. J., Oldenburg, M., and Fillingame, R. H. (1990) The essential carboxyl group in subunit c of F₁F₀ ATP-synthase can be moved and H⁺-translocating function retained. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 4900-4904
- Mizra, O., Guan, L., Verner, G., Iwata, S., and Kaback, H. R. (2006) Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. *EMBO J.* **25**, 1177-1183
- Möhlmann T, Bernard C, Hach S, Ekkehard Neuhaus H. (2010) Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biol (Stuttg)* **12** Suppl 1, 26-34
- Mok WS David and Mok C Machteld (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118
- Mourad GS, Tippmann-Crosby J, Hunt KA, Gicheru Y, Bade K, Mansfield TA, Schultes NP. (2012) Genetic and molecular characterization reveals a unique nucleobase cation symporter 1 in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **586** (9), 1370-1378
- Nie, Y., Ermolova, N., and Kaback, H. R. (2007) Site-directed alkylation of LacY: Effect of the proton electrochemical gradient. *J. Mol. Biol* **374**(2), 356-364
- Norregaard L1, Frederiksen D, Nielsen EO, Gether U. (1998) Delineation of an endogenous zinc-binding site in the human dopamine transporter. *EMBO J.* **17**(15), 4266-4273
- Nygaard P, Basted SM, Andersen KA, Saxild HH. (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.
- Ojeh N, Stojadinovic O, Pastar I, Sawaya A, Yin N, Tomic-Canic M.(2014) The effects of caffeine on wound healing. *Int Wound J.*, ISSN 1742-4801
- O'Leary, S. E., K. A. Hicks, S. E. Ealick, T. P. Begley (2009) Biochemical Characterization of the HpxO Enzyme from *Klebsiella pneumoniae*, a Novel FAD-Dependent Urate Oxidase. *Biochemistry* **48**, 3033-3035
- Olsen, J. V.; Ong, S.; Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively c terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell Proteomics* **3**(6), 608-614
- Ormazabal, V., Zuniga F.A., Escobar E., Aylwin C., Salas-Burgos A., Godoy A., Reyes A.M., Vera J.C., Rivas C.L. (2010) Histidine Residues in the Na⁺-coupled Ascorbic Acid Transporter-2 (SVCT2) are Central Regulators of SVCT2 Function, Modulating pH

Sensitivity, Transporter Kinetics, Na⁺ Cooperativity, Conformational Stability, and Subcellular Localization. *J Biol Chem* **285**, 36471-36485

Pantazopoulou A, and Diallinas G. (2006) The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 337-348

Pantazopoulou, A., and Diallinas, G. (2007) Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol. Reviews* **31**, 657-675

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

Papakostas K, Botou M, Frillingos S. (2013) Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* **288**(52), 36827-36840.

Papakostas K, Frillingos S. (2012). Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **287** (19), 15684-15695.

Papakostas K, Georgopoulou E, Frillingos S. (2008) Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. *J Biol Chem.* **283**(20), 13666-13678

Pope SD, Chen LL, Stewart V. (2009) Purine utilization by *Klebsiella oxytoca* M5al: genes for ring-oxidizing and -opening enzymes *J Bacteriol.* **191** (3), 1006-1017.

Pea F. Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions (2005) *Contrib Nephrol.* **147**, 35-46

Piret J1, Boivin G. (2011) Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(2), 459-472

Pornillos O, Chen YJ, Chen AP, Chang G. (2006) X-ray structure of the EmrE multidrug transporter in complex with a substrate. *Science* **310**(5756), 1950-1953

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Patel V, Haskó G, Szabó C, Mabley JG, Liaudet L, Pacher P. (2009) Xanthine oxidase inhibitor allopurinol attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med.* **13**(8B), 2330-2341

Ramazzina I, Folli C, Secchi A, Berni R, Percudani R. (2006) Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nat Chem Biol.* **2**(3), 144-148.

Rapp M., Drew D., Daley O. D., Nilsson J., Carvalho T., Melén K., De Gier J.-W., Von Heijne G. (2004) Experimentally based topology models for *E. coli* inner membrane proteins. *Protein Sci.* **13**(4), 937–945

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

Rodriguez J, Gupta N, Smith RD, Pevzner PA (2008) Does trypsin cut before proline? *J Proteome Res.* **7**(1), 300-305

- Rott KT, and Agudelo CA. Gout (2003) *JAMA* **289**(21), 2857-2860
- Russel Lee I, Liting Yang, Gaseene Sebetso, Rebecca Allen, Thi H. N. Doan, Ross Blundell, Edmund Y. L. Lui, Carl A. Morrow, James A. Fraser. (2013) Characterization of the Complete Uric Acid Degradation Pathway in the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*. **8**(5), e64292
- Sahin-Tóth M, Kaback HR. (1993) Properties of interacting aspartic acid and lysine residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**(38), 10027-10035
- Sahin-Tóth, M., Dunten, R. L., Gonzalez, A., and Kaback, H. R. (1992) Functional interactions between putative intramembrane charged residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10547-10551
- Sahin-Tóth M, Dunten RL, Kaback HR. (1995) Design of a membrane protein for site-specific proteolysis: properties of engineered factor Xa protease sites in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **34**(4), 1107-1112
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lawrence, M. C., and Kaback, H. R. (2000) The sucrose permease of *Escherichia coli*: Functional significance of cysteine residues and properties of cysteine-less transporter. *Biochemistry* **39**, 6164-6169
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lengeler, J. W., and Kaback, H. R. (1995) Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **208**, 1116-1123
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., and Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* **286**, 1722-1724
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Saxild HH, Brunstedt K, Nielsen KI, Jarmer H, Nygaard P. (2001) Definition of the *Bacillus subtilis* PurR operator using genetic and bioinformatic tools and expansion of the PurR regulon with *glyA*, *guaC*, *pbuG*, *xpt-pbuX*, *yqhZ-fold*, and *pbuO*. *J Bacteriol.* **183**(21), 6175-6183
- Saxild HH, Nygaard P. (1987) Genetic and physiological characterization of *Bacillus subtilis* mutants resistant to purine analogs. *J Bacteriol.* **169**(7), 2977-2983
- Saxild HH, Nygaard P. (1988) Gene-enzyme relationships of the purine biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* **211**(1), 160-167
- Schlesinger N. (2004) Management of acute and chronic gouty arthritis: present state-of-the-art. *Drugs.* **64**(21), 2399-2416
- Schultz AC, Nygaard P, Saxild HH. (2001) Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J Bacteriol.* **183**(11), 3293-3302
- Senior, A. E. (1983) Secondary and tertiary structure of membrane proteins involved in proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **726**, 81-95

- Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, E. Gouaux (2009) Structure and Mechanism of a Na⁺-Independent Amino Acid Transporter. *Science* **325**, 1010-1014
- Shainskaya, A., Schneeberger, A., Apell, H. J., and Karlisch, S. J. (2000) Entrance port for Na⁺ and K⁺ ions on Na⁺,K⁺-ATPase in the cytoplasmic loop between transmembrane segments M6 and M7 of the alpha subunit. Proximity of the cytoplasmic segment of the beta subunit. *J. Biol. Chem.* **275**, 2019-2028
- 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
- Siepen, J. A.; Keevil, E.; Knight, D.; Hubbard, S. J. (2007) Prediction of missed cleavage sites in tryptic peptides aids protein identification in proteomics. *J. Proteome Res.*, **6**(1), 399-408.
- 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
- Smirnova, I., and Kaback, H. R. (2003). A mutation in the lactose permease of *Escherichia coli* that decreases conformational flexibility and increases protein stability. *Biochemistry* **42**, 3025-3031.
- Smirnova I1, Kasho V, Kaback HR. (2011) Lactose permease and the alternating access mechanism. *Biochemistry* **50** (45), 9684-9693
- Smirnova I1, Kasho V, Sugihara J, Kaback HR (2013) Trp replacements for tightly interacting Gly-Gly pairs in LacY stabilize an outward-facing conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(22), 8876-8881
- Smyth, D. G., Blumenfeld, O.O., and Komingsberg, W. (1964) Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem. J.* **91**, 589-595
- Sorgen PL, Hu Y, Guan L, Kaback HR, Girvin ME. (2002) An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**(22), 14037-14040
- Spector T, and Johns DG. (1970) 4-Hydroxypyrazolo (3,4-d) pyrimidine as a substrate for xanthine oxidase: loss of conventional substrate activity with catalytic cycling of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* **38**(4), 583-589
- Stenesh J. (1984) Experimental Biochemistry *University Western Michigan*
- Stern, L. J., and Khorana, H. G. (1989) Structure-function studies on bacteriorhodopsin X. Individual substitutions of arginine residues by glutamine affect chromophore formation, photocycle, and proton translocation. *J. Biol. Chem.* **264**, 14202-14208
- Sun L, Zeng X, Yan C, Sun X, Gong X, Rao Y, Yan N. (2012) Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* **490**(7420), 361-366
- Suzuki S, Henderson P. (2006) The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *J Bacteriol* **188** (9), 3329-3336

- Tao Z, Zhang YW, Agyiri A, Rudnick G. (2009) Ligand effects on cross-linking support a conformational mechanism for serotonin transport. *J Biol Chem.* 284(49):33807-33814
- Tavoulari, S and Frillingos, S. (2008) Substrate selectivity of the melibiose permease (Mely) from *Enterobacter cloacae*. *J. Mol. Biol.* **376**, 681-693
- Teather, R. M., Muller-Hill, B., Abrutsch, U., Aichele, G., and Overath, P. (1978) Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Mol. Gen. Genet* **159**, 239-248
- Thiede, B.; Lamer, S.; Mattow, J.; Siejak, F.; Dimmler, C.; Rudel, T.; Jungblut, P. R. (2000) Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and n-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (6), 496-502
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F., and Hediger, M. A. (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**, 70-75
- Unkles, S. E., Rouch, D. A., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D., and Kinghorn, J. R. (2004) Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17549-17554
- 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
- Vangelatos I, Vlachakis D, Sophianopoulou V, Diallinas G. (2009) Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters. *Mol Membr Biol.* **26**(5), 356-370
- 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
- Västermark Å, Saier MH Jr. (2014) Evolutionary relationship between 5+5 and 7+7 inverted repeat folds within the amino acid-polyamine-organocation superfamily. *Proteins* **82**(2), 336-346
- Vastermark A, Wollwage S, Houle ME, Rio R, Saier MH. (2014) Expansion of the APC superfamily of secondary carriers. *Proteins* 0.1002/prot.24643
- Venkatesan, P., and Kaback, H. R. (1998) The substrate-binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9802-9807
- Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M., and Diallinas, G. (2006) A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.* **357**, 808-818
- Vogels GD, Van der Drift C. (1976). "Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms." *Bacteriol Rev* ; **40**(2), 403-468
- Weinglass AB, Kaback HR. (1999) Conformational flexibility at the substrate binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20), 11178-11182

Weinglass AB, Whitelegge JP, Hu Y, Verner GE, Faull KF, Kaback HR. (2003) Elucidation of substrate binding interactions in a membrane transport protein by mass spectrometry. *EMBO J.* **22**(7), 1467-1477

Weyand S, Shimamura T, Beckstein O, Sansom MS, Iwata S, Henderson PJ, Cameron AD. (2011) The alternating access mechanism of transport as observed in the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *J Synchrotron Radiat.* **18**(1), 20-33

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.

Wolin CD, Kaback HR. (2000) Thiol cross-linking of transmembrane domains IV and V in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2000 **39**(20), 6130-6315

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

Wu, J., Frillingos, S., and Kaback, H. R. (1995) Dynamics of lactose permease of *Escherichia coli* determined by site-directed chemical labeling and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 8257-8263

Wu, J., Frillingos, S., Voss, J., and Kaback, H. R. (1994) Ligand-induced conformational changes in the lactose permease of *Escherichia coli*: evidence for two binding sites. *Protein Science* **3**, 2294-2301

Wu, J., and Kaback, H.R. (1994) Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 2. Site-directed fluorescence studies. *Biochemistry* **33**, 12166-12171

Wu, J, and Kaback, H. R. (1996) A general method for determining helix packing in membrane proteins *in situ*: helices I and II are close to helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14498-14502

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

Yagur-Kroll S1, Amster-Choder O (2005) Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* beta-glucoside transporter BglF. *J Biol Chem.* **280**(19), 19306-19318.

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

Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻ dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **437**, 215-223

- Yan H, Huang W, Yan C, Gong X, Jiang S, Zhao Y, Wang J, Shi Y. (2013) Structure and mechanism of a nitrate transporter. *Cell Rep.* **3**(3), 716-723
- Yagur-Kroll, S., and Amster-Choder, O. (2005) Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* beta-glucoside transporter BgIF. *J. Biol. Chem.* **280**, 19306-19318
- 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.
- Yen, C.; Russell, S.; Mendoza, A. M.; Meyer-Arendt, K.; Sun, S.; Cios, K. J.; Ahn, N. G.; Resing, K. A (2006). Improving sensitivity in shotgun proteomics using a peptide-centric database with reduced complexity: protease cleavage and scx elution rules from data mining of ms/ms spectra. *Anal. Chem.*, **78** (4), 1071-1084
- Yin, Y., He X., Szewczyk P., Nguyen T., Chang G (2006) Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* **312**, 741-743
- Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med.* **34**(2-3), 529-547
- Yousef MS1, 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.* **106** (36), 15291-15296
- Zalkin, H., Nygaard, P. (1996). Biosynthesis of purine nucleosides. in. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. 2nd edn. Washington, DC American Society for Microbiology, 561-579
- Zheng H, Wisedchaisri G, Gonen T. (2013) Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature* **497**(7451), 647-651
- Zhou Y, Guan L, Freitas JA, Kaback HR (2008) Opening and closing of the periplasmic gate in lactose permease *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(10),3774-3778
- Zhou Y, Madej MG, Guan L, Nie Y, Kaback HR. (2011) An early event in the transport mechanism of LacY protein: interaction between helices V and I. *J Biol Chem.* **286**(35), 30415-30422
- Zhou Y, Nie Y, Kaback HR. (2009) Residues gating the periplasmic pathway of LacY. *J Mol Biol.* **394**(2), 219-225
- Zomot E., Zhou Y., and Kanner I. (2005) Proximity of transmembrane domains 1 and 3 of the γ -aminobutyric acid transporter GAT-1 inferred from paired Cysteine mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 25512-25516
- Γεωργοπούλου, Α. (2011). Χαρτογράφηση του κέντρου δέσμευσης και μεταφοράς των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων- ασκορβικού (NAT). Διδακτορική διατριβή,, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

- Γκουντέλα, Σ. (2006) Μόρια-κλειδιά στην συστηματική αντιμετώπιση της *Candida*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Θεοδώρου, Ι. Λ. (2006) Μελέτες επί του μηχανισμού δράσης κυστεϊνοπρωτεϊνών. Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Καρατζά, Π. (2006) Ανάπτυξη ενός πρότυπου βακτηριακού συστήματος για τη μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT Transporters) Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Καρενά, Α. (2007). Ο ρόλος των διαμεμβρανικών καταλοίπων Arg, Asp, Glu, His, Lys στον μεταφορέα ξανθίνης YgfO. Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Βιοτεχνολογία", Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Λάζου, Π. (2014) Αναζήτηση αναλόγων πουρινών με στοχευμένη αντιβακτηριακή δράση βάσει της ανάλυσης διαμεμβρανικών μεταφορέων από παθογόνους μικροοργανισμούς: Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων των *Acinetobacter calcoaceticus* και *Aeromonas veronii*. Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Μερμελέκας, Γ. (2009). Υπερεκφραση-καθαρισμός και μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων NAT σε πρότυπο βακτηριακό σύστημα. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Πάνος, Π. (2005) Συστηματική ανάλυση του «μοτίβου» υπογραφή της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2. Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Παπακώστας, Κ. (2011) Διερεύνηση του μηχανισμού πρόσληψης πουρινών στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων- ασκορβικού (NAT). Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τα
αποτελέσματα της Διδακτορικής Διατριβής**

**Δημοσίευση που προέκυψε από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.1
(Karena and Frilingos, 2009)**

**Δημοσίευση που προέκυψε από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.2
(Karena and Frilingos, 2011)**

Παραρτήματα

Παράρτημα 1

Στο παρόν παράρτημα παρουσιάζονται οργανωμένα σε πίνακες οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών νοηματικού ή μη νοηματικού κλώνου που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν ή/και χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή στο κατάλληλο μοριακό υπόβαθρο, όπως αναφέρεται, με την αντίστοιχη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Επίσης, σημειώνονται σε ξεχωριστή στήλη τα αντίστοιχα για τον κάθε εκκινητή τελικά προϊόντα του ανασυνδυασμού (βλ. 2.5). Σε όλους τους πίνακες (Πίνακες Π1.1 έως Π1.11) στη στήλη των εκκινητών επισημαίνονται με έντονα γράμματα οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων (κωδικονίων) του μοριακού υποβάθρου και με υπογράμμιση οι σιωπηλές αντικαταστάσεις, που χρησιμοποιούνται για βελτιστοποίηση των παραμέτρων (μήκος, GC%, θερμοκρασία Tm) στον σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών. Στα τελικά προϊόντα επίσης απεικονίζονται με έντονα γράμματα τα αμινοξέα που εισάγονται στην θέση των εγγενών καταλοίπων.

Π1.1 Μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης σε θέσεις πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων αμινοξέων της περμεάσης XanQ

Πίνακας Π1.1: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στις κατασκευές **μονής κυστεΐνης** σε θέσεις πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων αμινοξέων της XanQ για την αντίστοιχη PCR. Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα κάθε κατασκευής (ανασυνδυασμένα πλασμίδια, που φαίνονται στην στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή, μέσω πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού (BamHI-ApaI) και ανασύνδεσης (T4 DNA ligase), του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5), που χρησιμοποιήθηκε ως ένθεμα (insert), με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας (vector).

Πίνακας Π1.1	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/xanQ(Cys-less)-H22C-BAD	5'-CT/CCC/TTT/TGT/CAG/GCT/CTC/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-Q23C-BAD	5'-CCC/TTT/CAT/TGC/GCT/CTC/GTT/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-T30C-BAD	5'-GGT/GCC/ATT/TGC/CAC/CTG/TTG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-H31C-BAD	5'-GT/GCC/ATT/ACC/TGC/CTG/TTG/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-E55C-BAD	5'-G/CTT/TCC/GCT/TGC/ACA/ACT/GC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-Q75C-BAD	5'-GT/ACC/TGG/CTA/TGC/GTA/AAC/CG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-Q90C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TTC/TCG/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-N93C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TTC/TCG/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-K164C-BAD	5'-C/CTG/ATT/TGC/GTC/GGC/ATT/ATC/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-N184C-BAD	5'-GT/ACG/TTC/GGC/TGC/TAC/GAA/CAT/C-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-E186C-BAD	5'-G/TTC/GGC/AAT/TAC/TGC/CAT/CTC/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-H187C-BAD	5'-C/AAT/TAC/GAA/TGC/CTC/GGC/GTT/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-D232C-BAD	5'-GC/ATG/GTG/TGC/TTC/AGC/AGT/ATG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-K249C-BAD	5'-CAT/CCG/TTC/TGC/TAC/GGC/TTT/AG-3'

Πίνακας Π1.1 (συνέχεια)	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-H257C-BAD	5'-C/TTT/AGT/TT <u>C</u> /AGC/TTC/TGC/CAG/TTC/CTG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-Q258C-BAD	5'-GC/TTC/CAT/TGC/TTC/CTG/GTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-E272C-BAD	5'-CTT/AGC/GTG/CTT <u>T</u> /TGT/GCA/GTC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-D304C-BAD	5'-G/CTG/GCA/TGT/GGT/CTG/GTT/TC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-R341C-BAD	5'-GT/TAT/GTC/GGG/TGC/ACC/ATC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-R385C-BAD	5'-GCA/GGG/AT <u>C</u> /TGC/ATC/ATC/ATC/ACC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-N390C-BAD	5'-C/ATC/ATC/ACC/TGC/GGT/TTA/AAG/CG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-D413C-BAD	5'-C/TCC/TAC/TGT/CCC/GAG/AT <u>C</u> /TTC/AAA/ATA/TTG/C-3'

Π1.2 Εκτενής μεταλλαξιγένεση σε θέσεις πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων αμινοξέων της *XanQ*(wt)

Πίνακας Π1.2: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την αντικατάσταση των εγγενών πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων αμινοξέων σε επιλεγμένες θέσεις της *XanQ* με **διαφορετικά αμινοξέα**. Οι αντιδράσεις PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/*xanQ*(wt)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/*xanQ*(wt)-BAD.

Πίνακας Π1.2	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-H31C-BAD	5'-GT/GCC/ATT/ACC/TGC/CTG/TTG/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-H31K-BAD	5'-GGT/GCC/ATT/ACC/AAA/CTG/TTG/GC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-H31L-BAD	5'-GTG/CCA/TTA/CCC/TGC/TGT/TGG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-H31N-BAD	5'-GT/GCC/ATT/ACC/AAC/CTG/TTG/GC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-H31Q-BAD	5'-GTG/CCA/TTA/CCC/AAC/TGT/TGG/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-H31R-BAD	5'-GT/GCC/ATT/ACC/CGT/CTG/TTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q75A-BAD	5'-GT/ACC/TGG/TTA/GCC/GTA/AAC/CG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q75E-BAD	5'-GGT/ACC/TGG/ <u>CTA</u> /GAA/GTA/AAC/CGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q75N-BAD	5'-GGT/ACC/TGG/ <u>CTA</u> /AAC/GTA/AAC/CGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-N93A-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/GCG/TT <u>C</u> /TCA/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-N93C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TT <u>C</u> /TCG/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-N93D-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/GAC/TT <u>C</u> /TCG/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-N93Q-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/CAG/TT <u>C</u> /TCG/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-N93S-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/AGC/TT <u>C</u> /TCG/TTT/GTT/ACG -3'

Πίνακας Π1.2 (συνέχεια)	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-N93T-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/ACG/TTC/TCG/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-K164C-BAD	5'-C/CTG/ATT/TGC/GTC/GGC/ATT/ATC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-K164R-BAD	5'-C/CTG/ATT/CGC/GTC/GGC/ATT/ATC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-D232C-BAD	5'-GC/ATG/GTG/TGC/TTC/AGC/AGT/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-D232E-BAD	5'-GC/ATG/GTG/GAG/TTC/AGC/AGT/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q258C-BAD	5'-GC/TTC/CAT/TGC/TTC/CTG/GTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q258H-BAD	5'-GC/TTC/CAT/CAC/TTC/CTG/GTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-Q258N-BAD	5'-GC/TTC/CAC/AAC/TTC/CTG/GTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-E272C-BAD	5'-CTT/AGC/GTG/CTT/TGT/GCA/GTC/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-E272D-BAD	5'-CTT/AGC/GTG/CTT/GAT/GCA/GTC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-E272Q-BAD	5'-CTT/AGC/GTG/CTT/CAA/GCA/GTC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-D304C-BAD	5'-G/CTG/GCA/TGT/GGT/CTG/GTT/TC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-D304E-BAD	5'-G/CTG/GCA/GAA/GGT/CTG/GTT/TC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-D304N-BAD	5'-G/CTG/GCA/AAC/GGT/CTG/GTT/TC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-R385C-BAD	5'-GCA/GGG/ATC/TGC/ATC/ATC/ATC/ACC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)-R385K-BAD	5'-C/ATC/GCA/GGG/ATT/AAG/ATC/ATC/ATC/ACC -3'

Π1.3 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του TM3 της περμεάσης XanQ

Πίνακας Π1.3: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την παραγωγή μεταλλαγμάτων **μονής κυστεϊνής** στην μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του TM3 της περμεάσης XanQ (Cys-less). Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD.

Πίνακας Π1.3	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/xanQ(Cys-less)- Y79C-BAD	5'-GTA/AAC/CGC/TGT/GGC/ATC/GTC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- G80C-BAD	5'-GTA/AAC/CGC/TAC/TGC/ATC/GTC/GGT/TC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- I81C-BAD	5'-GTA/AAC/CGT/TAT/GGT/TGT/GTC/GGT/TCT/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- V82C-BAD	5'-C/TAC/GGC/ATT/TGT/GGT/TCT/GGC/CTA/C-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- G83C-BAD	5'-C/TAC/GGC/ATC/GTT/TGT/TCT/GGC/CTA/C-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- S84C-BAD	5'-C/ATC/GTC/GGT/TGT/GGT/CTA/CTC/TC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- G85C-BAD	5'-GTC/GGT/TCT/TGC/CTA/CTC/TCA/ATT/CAG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- L86C-BAD	5'-GGT/TCT/GGC/TGC/CTC/TCA/ATT/C-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- L87C-BAD	5'-GT/TCT/GGC/CTG/TGC/TCA/ATT/CAG/TC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- S88C-BAD	5'-CT/GGC/CTA/CTC/TGC/ATT/CAG/TCA/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- I89C-BAD	5'-C/CTA/CTC/TCA/TGC/CAG/TCA/GTC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- Q90C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TTC/TCG/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- S91C-BAD	5'-CTC/TCA/ATC/CAG/TGC/GTC/AAC/TTC/TCA/TTT/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)- V92C-BAD	5'-CA/ATT/CAG/TCC/TGC/AAC/TTC/TCC/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-N93C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TTC/TCG/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-F94C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/AAC/TGC/TCC/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-S95C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/AAC/TTC/TGC/TTT/GTT/ACG/GTC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-F96C-BAD	5'-GTC/AAT/TTC/TCC/TGC/GTT/ACG/GTC/ATG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-V97C-BAD	5'-GTC/AAT/TTT/TCC/TTC/TGC/ACG/GTC/ATG/ATT/GC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-T98C-BAD	5'-GTC/AAT/TTT/TCC/TTC/GTC/TGC/GTC/ATG/ATT/GC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-V99C-BAD	5'-CA/TTT/GTT/ACG/TGC/ATG/ATT/GCG/CTG/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-M100C-BAD	5'-CA/TTT/GTT/ACG/GTC/TGT/ATT/GCG/CTG/G-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-I101C-BAD	5'-GTT/ACG/GTT/ATG/TGT/GCT/CTG/GGC/AG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-A102C-BAD	5'-GTC/ATG/ATT/TGT/CTG/GGC/AGC/AG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-L103C-BAD	5'-C/ATG/ATT/GCG/TGT/GGC/AGC/AG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-G104C-BAD	5'-G/ATT/GCG/CTG/TGT/AGC/AGC/ATG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-S105C-BAD	5'-G/ATT/GCG/CTG/GGT/TGT/AGC/ATG/AAA/AG-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-S106C-BAD	5'-G/CTG/GGC/AGC/TGT/ATG/AAA/AGC-3'
pT7-5/xanQ(Cys-less)-M107C-BAD	5'-GC/AGC/AGC/TGT/AAA/AGC/GAC/G-3'

Π1.4 Εκτενής μεταλλαξιγένεση καταλοίπων του TM3 της περμεάσης XanQ

Πίνακας Π1.4: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για **συντηρητικές αλλαγές** επιλεγμένων καταλοίπων αμινοξέων του TM3 της XanQ. Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/*xanQ*(wt)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/*xanQ*(wt)-BAD.

Πίνακας Π1.4	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G83A-BAD	5' - C/TAC/GGC/AT T /G T /GCA/TCT/GGC/CTA/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G83P-BAD	5' - C/TAC/GGC/AT T /G T /CCT/TCT/GGC/CTA/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G85A-BAD	5' - GTC/GGT/TCT/G C A/CTA/CTC/TCA/ATT/CAG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- G85P-BAD	5' - GTC/GGT/TCT/C C T/CTA/CTC/TCA/ATT/CAG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- L86M-BAD	5' - C/GGT/TCT/GGC/AT G /CTC/TCA/ATT/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- L86V-BAD	5' - GGT/TCT/GGC/G T C/CTC/TCA/ATT/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S88A-BAD	5' - CT/GGC/CTA/CTC/G C A/ATT/CAG/TCA/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S88T-BAD	5' - CT/GGC/CTA/CTC/ A CG/ATT/CAG/TCA/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S88V-BAD	5' - CT/GGC/CTA/CTC/G T C/ATT/CAG/TCA/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- F94I-BAD	5' - CAG/TCA/GTC/A A C/ATC/T C C/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- F94Y-BAD	5' - CAG/TCA/GTC/A A C/T A C/T C C/TTT/GTT/ACG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- A102G-BAD	5' - GTC/ATG/ATT/G G T/CT T /GGC/AGC/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- A102S-BAD	5' - GTC/ATG/ATT/T C A/CTG/GGC/AGC/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S104A-BAD	5' - G/ATT/GCG/CT T /G C A/AGC/AGC/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S104P-BAD	5' - G/ATT/GCG/CT T /C C T/AGC/AGC/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S106A-BAD	5' - G/ATT/GCG/CT A /G G T/AGC/G C A/ATG/AAA/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S106T-BAD	5' - G/CTG/GGC/AGC/ A CT/ATG/AAA/AGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (wt)- S106V-BAD	5' - G/CTG/GGC/AGC/G T T/ATG/AAA/AGC -3'

Π1.5 Μεταλλάγματα μονής κυστεΐνης σε θέσεις αμινοξέων που ανήκουν σε συντηρημένα «παράθυρα» αλληλουχιών σε χαρακτηριστικά μοτίβα της *XanQ*

Πίνακας Π1.5: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου (σχεδιασμός Καρενά Αικ. και Τατσάκη Αικ.) που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την παραγωγή μεταλλαγμάτων **μονής κυστεΐνης** σε αλληλουχίες-μοτίβα της περμεάσης *XanQ*. Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/*xanQ*(Cys-less)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/*xanQ*(Cys-less)-BAD.

Πίνακας Π1.5	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L32C-BAD	5' - GCC/ATT/ACC/CAT/TGC/CTG/GCA/ATT/TTC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L33C-BAD	5' - C/ATT/ACC/CAC/CTG/TGC/GCA/ATT/TTC/ GTT/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-A34C-BAD	5' - CC/CAT/CTG/TTG/TGC/ATC/TTC/GTT/CC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S62C-BAD	5' - GCC/TAT/CTT/GTG/TGC/ATG/GCG/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S68C-BAD	5' -GTA/AAC/CGC/TGT/GGC/ATC/GTC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G69C-BAD	5' -GTA/AAC/CGC/TAC/TGC/ATC/GTC/GGT/TC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-I70C-BAD	5' -GTA/AAC/CGT/TAT/GGT/TGT/GTC/GGT/TCT/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G71C-BAD	5' -C/TAC/GGC/ATT/TGT/GGT/TCT/GGC/CTA/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-T72C-BAD	5' - CC/TCT/GGT/ATT/GGC/TGC/TGG/TTA/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-W73C-BAD	5' - GT/ATT/GGT/ACC/TGC/TTG/CAA/GTA/AAC/ CG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L74C-BAD	5' - GGT/ACC/TGG/TGT/CAA/GTA/AAC/CG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-Q75C-BAD	5' -C/TAC/GGC/ATC/GTT/TGT/TCT/GGC/CTA/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G123C-BAD	5' - G/TCG/TCG/CTT/CTT/TGT/GTC/TCC/TTC/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G128C-BAD	5' -C/ATC/GTC/GGT/TGT/GGT/CTA/CTC/TC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-A129C-BAD	5' -GTC/GGT/TCT/TGC/CTA/CTC/TCA/ATT/CAG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-F130C-BAD	5' - C/TTC/GTT/GGA/GCA/TGT/CTG/GTT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L131C-BAD	5' - C/GTT/GGC/GCA/TTT/TGT/GTT/GTC/GG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-V132C-BAD	5' - C/GCA/TTT/CTG/TGC/GTC/GGA/TCT/TC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S136C-BAD	5' - GTC/GGA/TCT/TGC/TTT/ATC/TTG/CC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-V150C-BAD	5' - G/CCT/ACC/TGT/AGC/GGT/ATT/GTG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S151C-BAD	5' -GGT/TCT/GGC/TGC/CTC/TCA/ATT/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G152C-BAD	5' -GT/TCT/GGC/CTG/TGC/TCA/ATT/CAG/TC-3'

Πίνακας Π1.5 (συνέχεια)	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-I153C-BAD	5'-CT/GGC/CTA/CTC/TGC/ATT/CAG/TCA/G-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-V154C-BAD	5'-C/CTA/CTC/TCA/TGC/CAG/TCA/GTC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-V155C-BAD	5'- GC/GGT/ATT/GTG/TGT/CTA/ATG/ATC/GGC/TTA/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L156C-BAD	5'- GC/GGT/ATT/GTG/GTA/TGT/ATG/ATC/GGC/TTA/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-M157C-BAD	5'- GTG/GTA/CTG/TGC/ATC/GGC/TTA/AGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-I158C-BAD	5'- G/GTA/CTG/ATG/TGT/GGC/TTA/AGC/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G159C-BAD	5'- G/GTA/CTG/ATG/ATC/TGC/TG/AGC/CTG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G183C-BAD	5'- C/GGT/ACG/TTC/TGC/AAC/TAC/GAA/C -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-Y185C-BA	5'- CG/TTC/GGC/AAT/TGC/GAA/CAT/CTC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L188C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TTC/TCC/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G189C-BAD	5'- CTC/TCA/ATC/CAG/TGC/GTC/AAC/TTC/TCA/TTT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-V190C-BAD	5'- CA/ATT/CAG/TCC/TGC/AAC/TTC/TCC/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G191C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/TGC/TTC/TCC/TTT/GTT/ACG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G217C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/AAC/TGC/TCC/TTT/GTT/ACG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L218C-BAD	5'-CAG/TCA/GTC/AAC/TTC/TGC/TTT/GTT/ACG/GTC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S219C-BAD	5'-GTC/AAT/TTC/TCC/TGC/GTT/ACG/GTC/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-V220C-BAD	5'-GTC/AAT/TTT/TCC/TTC/TGC/ACG/GTC/ATG/ATT/GC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G221C-BAD	5'-GTC/AAT/TTT/TCC/TTC/GTC/TGC/GTC/ATG/ATT/GC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L368C-BAD	5'-CA/TTT/GTT/ACG/TGC/ATG/ATT/GCG/CTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G369 C-BAD	5'-CA/TTT/GTT/ACG/GTC/TGT/ATT/GCG/CTG/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G370C-BAD	5'-GTT/ACG/GTT/ATG/TGT/GCT/CTG/GGC/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-A371C-BAD	5'-GTC/ATG/ATT/TGT/CTG/GGC/AGC/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-M372C-BAD	5'-GGA/GGC/GCA/TGT/ACG/TTG/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L374C-BAD	5'-C/GCA/ATG/ACG/TGT/ATG/TTT/TCC/ATG/ATT/GCC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-M375C-BAD	5'-C/ATG/ATT/GCG/TGT/GGC/AGC/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-F376C-BAD	5'-G/ATT/GCG/CTG/TGT/AGC/AGC/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S377C-BAD	5'-G/ATT/GCG/CTG/GGT/TGT/AGC/ATG/AAA/AG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G383C-BAD	5'-GCC/ATC/GCA/TGC/ATT/CGC/ATC/ATC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-A401C-BAD	5'-G/CTG/GGC/AGC/TGT/ATG/AAA/AGC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-T402C-BAD	5'-GC/AGC/AGC/TGT/AAA/AGC/GAC/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-S403C-BAD	5'-GTC/GCC/ACT/TGC/TTA/GGT/TTA/GG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L404C-BAD	5'-GTC/GCC/ACT/TCT/TGT/GGT/TTA/GG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G405C-BAD	5'-CC/ACT/TCT/TTG/TGC/TTA/GGG/CTT/GG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L406C-BAD	5'-CT/TCT/TTA/GGT/TGT/GGG/CTT/GGC/GTC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G407C-BAD	5'-CT/TTA/GGT/TTG/TGC/CTT/GGC/GTC/TCC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-L408C-BAD	5'-GT/TTA/GGG/TGT/GGT/GTC/TCC/TAC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-G409C-BAD	5'-GT/TTA/GGG/CTT/TGC/GTC/TCC/TAC/G -3'

Π1.6 Εκτενής μεταλλαξιγένεση σε θέσεις αμινοξέων που ανήκουν σε συντηρημένα «παράθυρα» αλληλουχιών σε χαρακτηριστικά μοτίβα της περμεάσης XanQ

Πίνακας Π1.6: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου (σχεδιασμός Καρενά Αικ. και Τατσάκη Αικ.) που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για σχετικά **συντηρητικές αλλαγές** επιλεγμένων καταλοίπων σε αλληλουχίες-μοτίβα της περμεάσης XanQ. Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμιδίο pT7-5/xanQ(wt)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(wt)-BAD.

Πίνακας Π1.6	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ xanQ (wt)-S68A-BAD	5'-CG/ATG/ATC/GCT/GCT/GGT/ATT/GGT/AC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-S68T-BAD	5'-CG/ATG/ATC/GCT/ACC/GGT/ATT/GGT/AC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G69A-BAD	5'-G/ATC/GCC/TCT/GCT/ATT/GGT/ACC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G71A-BAD	5'-C/TCT/GGT/ATT/GCC/ACC/TGG/TTA/C -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-A129G-BAD	5'-C/TTC/GTT/GCC/GGT/TTT/CTG/GTT/G -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-A129S-BAD	5'-C/TTC/GTT/GGC/TCC/TTT/CTG/GTT/G -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-S151A-BAD	5'-CCT/ACC/GTC/GCA/GGT/ATT/GTG -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-S151T-BAD	5'-CCT/ACC/GTC/ACG/GGT/ATT/GTG-3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G152A-BAD	5'-CT/ACC/GTC/AGC/GCA/ATT/GTG/GTA/C -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-V155I-BAD	5'- GC/GGT/ATT/GTG/ATT/CTG/ATG/ATC/GGC/TTA/AG-3'
pT7-5/ xanQ (wt)-V155M-BAD	5'- GC/GGT/ATT/GTG/ATG/CTA/ATG/ATC/GGC/TTA/AG-3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G159A-BAD	5'- G/GTA/CTG/ATG/ATC/GCG/TTA/AGC/CTG-3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G217A-BAD	5'-G/ATC/GCC/ATT/GCA/CTA/TCT/GTC/G -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G221A-BAD	5'-G/CTA/TCT/GTC/GCA/TAC/ATC/GCA/TCG -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-L368A-BAD	5'-G/GCA/GTT/GCA/GGA/GGA/GCA/ATG/ACG/TTG/ATG -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-L368I-BAD	5'-G/GCA/GTT/ATT/GGA/GGC/GCA/ATG/AC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G369A-BAD	5'-CA/GTT/CTG/GCA/GGA/GCA/ATG/AC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G370A-BAD	5'-CA/GTT/CTG/GGA/GCA/GCA/ATG/ACG/TTG -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-F376L-BAD	5'-G/ACG/TTG/ATG/TTG/TCC/ATG/ATT/GC/ATC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-F376Y-BAD	5'-G/ACG/TTG/ATG/TAC/TCC/ATG/ATT/GCC/ATC -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-S377A-BAD	5'-CG/TTG/ATG/TTT/GCC/ATG/ATT/GCC/ATC/G -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-S377T-BAD	5'-CG/TTG/ATG/TTT/ACG/ATG/ATT/GCC/ATC/G -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-G383A-BAD	5'-GCC/ATC/GCA/GCT/ATT/CGC/ATC/ATC-3'
pT7-5/ xanQ (wt)-L404A-BAD	5'-CTT/ATT/GTC/GCC/ACT/TCT/GCA/GGT/TTA/GG -3'
pT7-5/ xanQ (wt)-L404I-BAD	5'-GTC/GCC/ACT/TCT/ATC/GGT/TTA/GG -3'

Π1.7 Αντικατάσταση επιλεγμένων καταλοίπων ιστιδινών της περμεάσης XanQ με αλανίνη

Πίνακας Π1.7: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την αντικατάσταση επιλεγμένων καταλοίπων **ιστιδίνης** της περμεάσης XanQ με **αλανίνη**. Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD.

Πίνακας Π1.7	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ xanQ (Cys-less)-H31A-BAD	5'-GT/GCC/ATT/ACC/GCT/CTG/TTG/G-3'
pT7-5/ xanQ (Cys-less)-H187A-BAD	5'-C/AAT/TAC/GAA/GCA/CTC/GGC/GTT/G-3'
pT7-5/ xanQ (Cys-less)-H257A-BAD	5'-C/TTT/AGT/TTT/AGC/TTC/GCA/CAG/TTC/CTG-3'

Π1.8 Ζεύγη κυστεϊνών και συνδυασμοί κυστεϊνης-αλανίνης σε επιλεγμένες θέσεις αμινοξέων της XanQ σε διαφορετικά μοριακά υπόβαθρα

Πίνακας Π1.8: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την εισαγωγή κυστεϊνης σε επιλεγμένες θέσεις καταλοίπων της περμεάσης XanQ. Οι PCR έγιναν με υποστρώματα (εκμαγεία) τα πλασμίδια pT7-5/xanQ(single-Cys)-His₁₀, pT7-5/xanQ(Cys-less/H187A)-His₁₀ και pT7-5/xanQ(Cys-less/H257A)-His₁₀ (βλ. Π1.7), pT7-5/xanQ_{N13}-C₁^{uapA}/T526N/G527P/F528I/T531G/A532G-BAD (Μπότου Μ., αδημοσίευτα αποτελέσματα), pT7-5/xanQ_{N13}-Δ509-519(EL7)-C₁^{uapA}/T526N/G527P/F528I/T531G/A532G-BAD (Γεωργοπούλου Αικ., Διδακτορική Διατριβή, 2011), ανάλογα με την περίπτωση. Τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD. Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία αλλά έχουν σχεδιαστεί και παρασκευασθεί συνθετικά στα πλαίσια προηγούμενων μελετών στο εργαστήριο είναι: A323C, G327C, V328C, G333C, V334C, S336C, V339C (Karatza *et al.*, 2006) A422C, E429C, N430C, sC433 (Papakostas *et al.*, 2008) και I343C (Mermelekas *et al.*, 2010).

Πίνακας Π1.8

Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-A323C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H187A)-A323C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H257A)-A323C-BAD	5'-CA/TTA/CCA/CTA/ACC/ACG/TTC/TGC/CAA/ AAT/AAT/GG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-G327C-BAD	5'-GCG/CAA/AAT/AAC/TGC/GTG/ATT/CAG/ATG -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-V328C-BAD	5'-G/CAA/AAT/AAC/GGG/TGT/ATC/CAG/ATG/AC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-G333C-BAD	5'-GTT/ATT/CAG/ATG/ACT/TGC/GTC/GCT/TCA -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-V334C-BAD	5'-CAG/ATG/ACT/GGT/TGT/GCT/TCA/CGT/TAT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-S336C-BAD	5'-G/ACT/GGC/GTT/GCT/TGT/CGT/TAT/GTC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/sC433)-V339C-BAD	5'-CT/TCA/CGT/TAT/TGT/GGG/CGA/ACC/ATC -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/A323C)-E429C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H257C)-E429C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/G327C)-E429C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/V328C)-E429C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H187A)-E429C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H257A)-E429C-BAD	5'-GTA/TTA/GTT/TGC/AAC/CCG/ATC/TCT/GCT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/A323C)-N430C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/G327C)-N430C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/V328C)-N430C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H187A)-N430C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/H257A)-N430C-BAD	5'-GTA/TTA/GTT/GAA/TGC/CCG/ATC/TCT/GCT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/G327C)-A422C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/V328C)-A422C-BAD	5'-C/GAA/ATT/TTC/AAG/ATC/CTG/CCG/TGC/TCT/ ATT/TAT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less/V328C)-V426C-BAD	5'-CC/TCT/ATT/TAC/TGC/CTG/GTC/GAA/AAC/C-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-I167C-BAD	5'-C/CTG/ATT/AAG/GTC/GGC/TGC/ATC/GAT/TTT/G -3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-I343C-BAD	5'-GGG/CGA/ACT/TGT/GCG/GTA/ATG-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (Cys-less)-T373C-BAD	5'-GGA/GGC/GCA/ATG/TGT/TTG/ATG/TTT/TCC-3'
pT7-5/ <i>xanQ</i> (N ₁₃ -C ₁ ^{uapA} /T526N/ G527P/ F528I/T531G/ A532G)-H257C/E525C-BAD pT7-5/ <i>xanQ</i> [N ₁₃ -Δ509-519 (EL7)- C ₁ ^{uapA} /T526N/G527P/F528I/T531G/ A532G]- H257C/E525C-BAD	5'-GAA/GCA/GTT/GGC/GAA/ATC/ACC/GC-3'

Π1.9 Εκτενής μεταλλαξιγένεση επιλεγμένων καταλοίπων μεθειονινών της περμεάσης XanQ

Πίνακας Π1.9: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού ή μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την αντικατάσταση επιλεγμένων καταλοίπων μεθειονινών της περμεάσης XanQ(Cys-less)-His₁₀. Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) τα πλασμίδια pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀, pT7-5/xanQ(Cys-less/M282V)-His₁₀ ή pT7-5/xanQ(Cys-less/M282V/M331V)-His₁₀. Τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος PCR (για τις αλλαγές της Met-465) ή του δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀.

Πίνακας Π1.9	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού/μη νοηματικού κλώνου
pT7-5/xanQ (Cys-less)-M282L-His ₁₀	5'-C/GAT/ATC/ACT/GCA/ACT/GCA/CTT/GTT/TCC/C-3' (sense primer)
pT7-5/xanQ (Cys-less)- M282V-His ₁₀	5'-C/GAT/ATC/ACT/GCA/ACT/GCA/GTT/GTT/TCC/C-3' (sense primer)
pT7-5/xanQ (Cys-less)-M331V-His ₁₀ pT7-5/xanQ(Cys-less/M282V) - M331V-His ₁₀	5'-G/GTT/ATT/CAG/GTT/ACT/GGC/GTC/G-3' (sense primer)
pT7-5/xanQ(Cys-less)-M465I-His ₁₀	5'-TA/AAG/CGG/GCC/CTC/AAT/CTC/TTC-3' (antisense primer)
pT7-5/xanQ(Cys-less)- M465L-His ₁₀	5'-ATA/AAG/CGG/GCC/CTC/TAA/CTC/TTC/C-3' (antisense primer)
pT7-5/xanQ(Cys-less)-M465V-His ₁₀ pT7-5/xanQ(Cys-less/M282V/M331V)-M465V-His ₁₀	5'-ATA/AAG/CGG/GCC/CTC/AAC/CTC/TTC/C-3' (antisense primer)
pT7-5/ xanQ(Cys-less/464)-His ₁₀	5'-ATA/AAG/CGG/GCC/CTC/TTC/AGC/TGA/AGT/AAT/AC-3' (antisense primer)

Π1.10 Εισαγωγή θέσεων αναγνώρισης της πρωτεάσης Χα στην αλληλουχία της XanQ

Πίνακας Π1.10: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την εισαγωγή θέσεων αναγνώρισης της πρωτεάσης-παράγοντα Χα (-IEGRIEGR-) στις εξωτερικές υδρόφιλες συνδετικές περιοχές (Extracellular Loop) μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων TM7 – TM8 (XaEL4) και TM13 – TM14 (XaEL7) της περμεάσης XanQ (Cys-less). Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) το πλασμίδιο pT7-5/xanQ(Cys-less)-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD.

Πίνακας Π1.10	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ xanQ(Cys-less)- 242I(EGRIEGR)T ²⁴³ -BAD	5'-C/AAT/TTG/CCG/TTA/ATC/GAA/GGT/CGT/ATT/ GAA/GGT/CGC/ACC/ATC/CC-3'
pT7-5/ xanQ(Cys-less)- 419I(EGRIEGR)L ⁴²⁰ -BAD	5'-C/GAA/ATT/TTT/ATC/GAA/GGT/CGC/ATT/GAA/GGT/ CGA/TTG/CCA/GCC/TC-3'

Π1.11 Ζεύγη αντικαταστάσεων σε επιλεγμένες θέσεις αμινοξέων της περμεάσης XanQ

Πίνακας Π1.11: Οι εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιούνται στην αντίστοιχη PCR για την εισαγωγή αντικαταστάσεων σε επιλεγμένες θέσεις καταλοίπων της περμεάσης XanQ(wt). Οι PCR έγιναν με υπόστρωμα (εκμαγείο) τα πλασμίδια pT7-5/xanQ(wt)/N93T-His₁₀ ή pT7-5/xanQ(wt)/E272D-His₁₀ και τα τελικά προϊόντα ανασυνδυασμού (στήλη αριστερά) προέκυψαν από ανταλλαγή του προϊόντος δεύτερου σταδίου PCR (βλ. 2.5) με το ομόλογο τμήμα του πλασμιδίου pT7-5/xanQ(Cys-less)-BAD. Οι εκκινητές αυτοί (D276E και D276M) είχαν σχεδιαστεί και παρασκευασθεί συνθετικά στα πλαίσια προηγούμενης εργασίας στο εργαστήριο (Mermelekas *et al.*, 2010).

Πίνακας Π1.11: Διπλές μεταλλάξεις	
Προϊόν ανασυνδυασμού DNA	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου
pT7-5/ xanQ(wt/N93T)/D276M-BAD	5'-GAA/GCA/GTT/GGC/ATG/ATC/ACC/GC-3'
pT7-5/ xanQ(wt/E272D)/D276E-BAD	5'-GAA/GCA/GTT/GGC/GAA/ATC/ACC/GC-3'

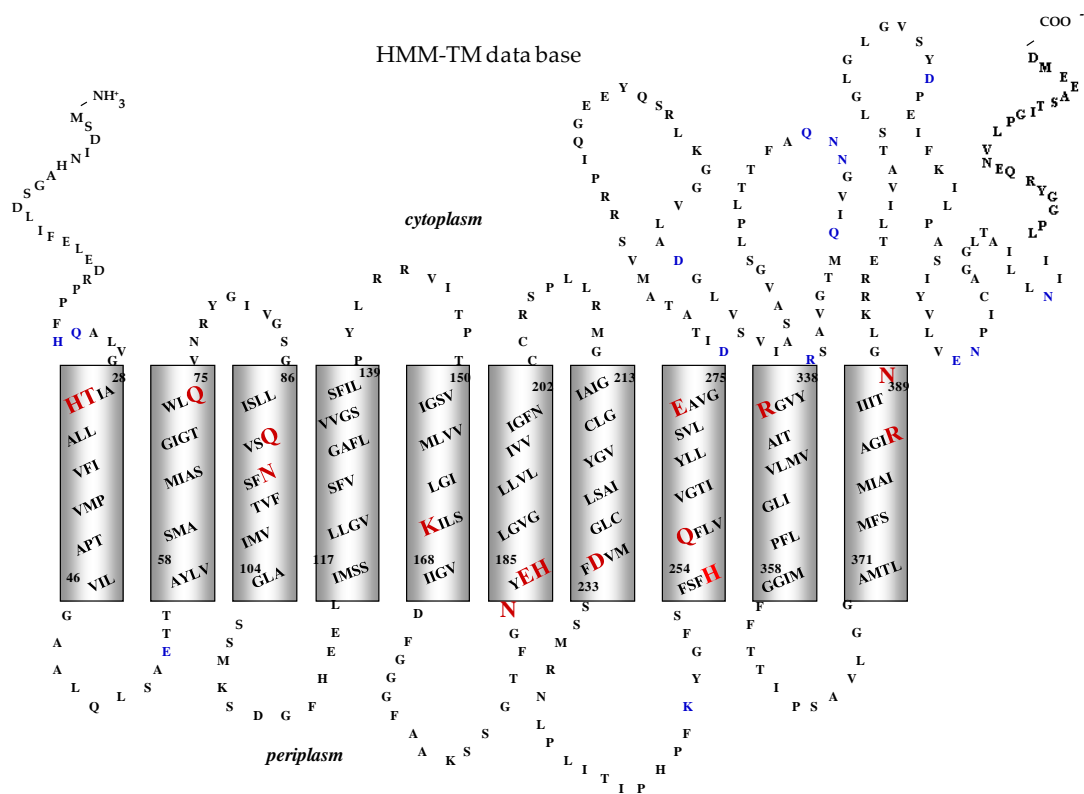
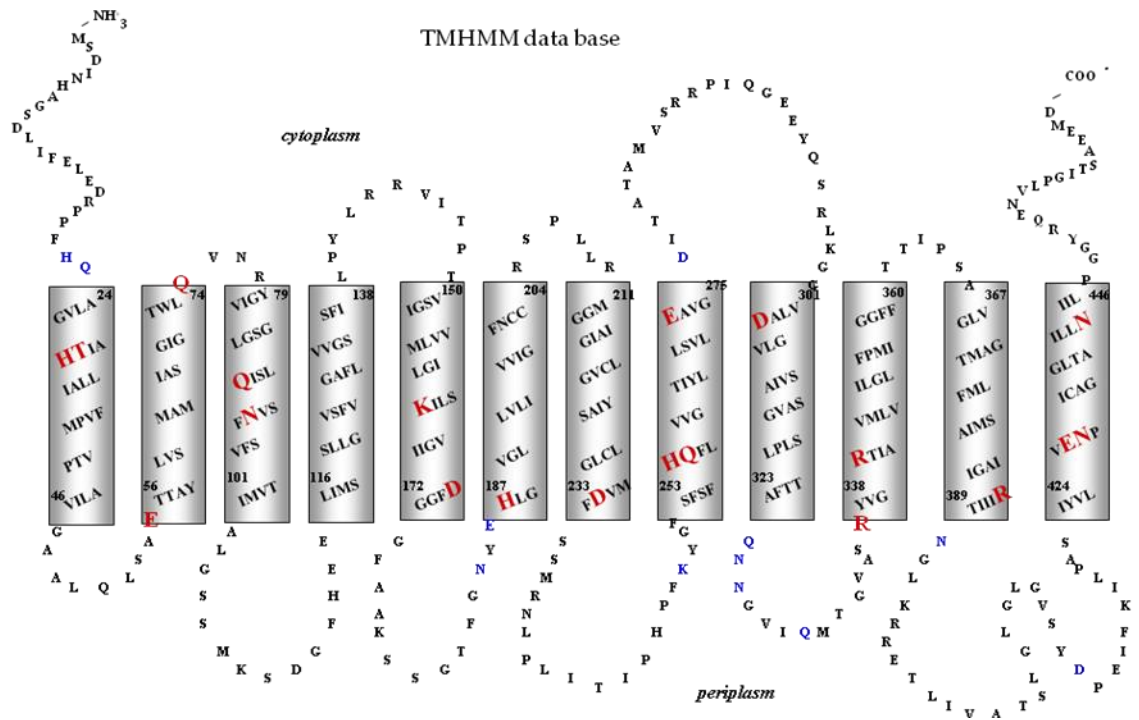
Παράρτημα 2

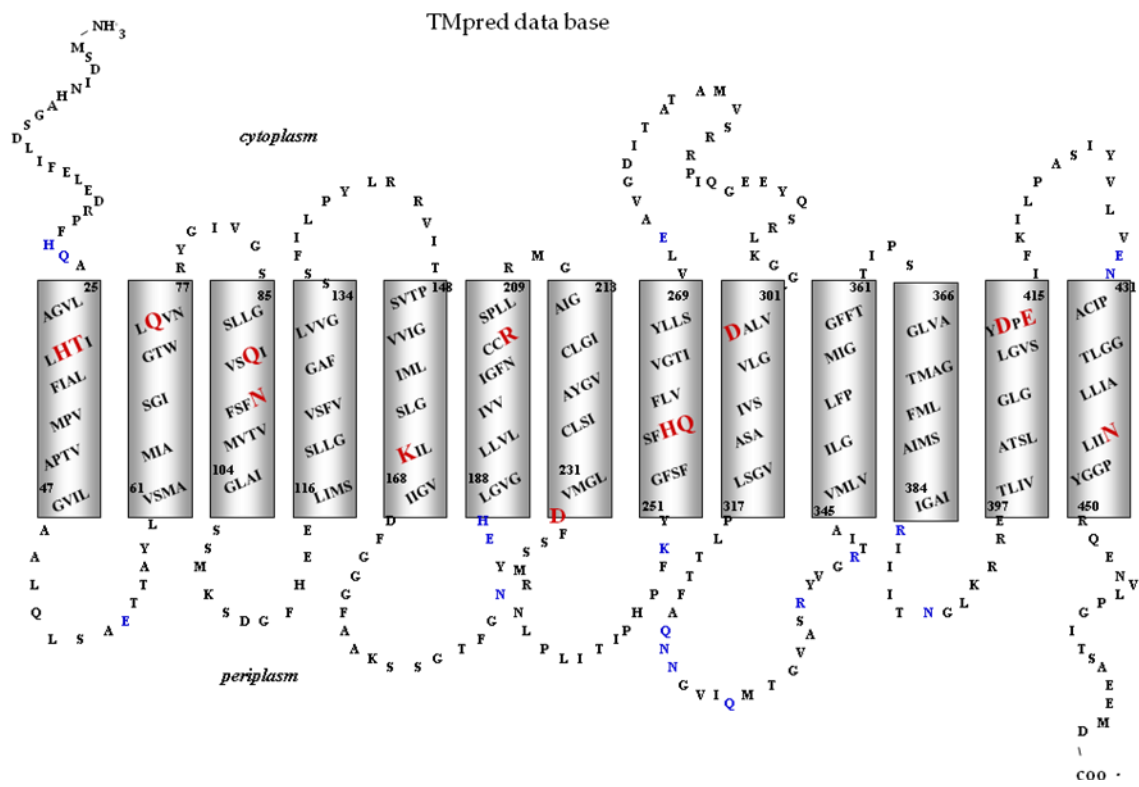
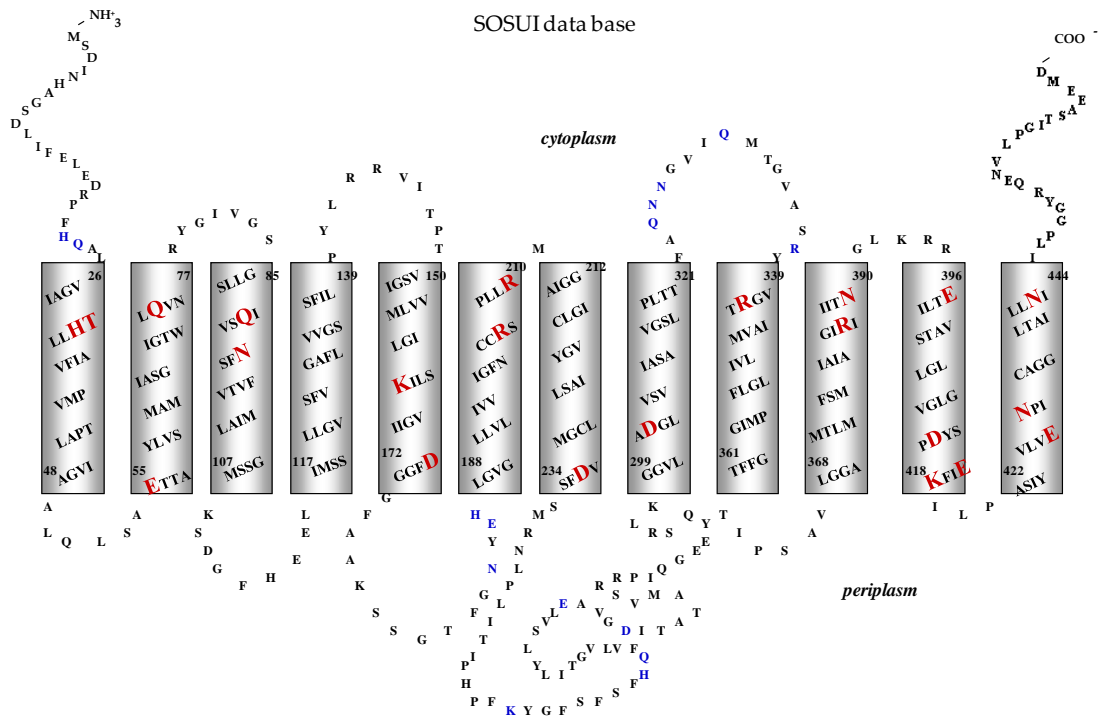
Όταν απουσιάζουν τρισδιάστατες δομές υψηλής ευκρίνειας (όπως συνέβαινε και με την περμεάση XanQ ή οποιοδήποτε ομόλογό της κατά την περίοδο έναρξης της παρούσας διατριβής, τον Μάιο του 2009), είναι σημαντικό για την ανάλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών ένα κατά το δυνατόν ακριβέστερο τοπολογικό μοντέλο. Ένα μοντέλο αυτού του τύπου περιγράφει τον αριθμό των διαμεμβρανικών τμημάτων και τα όρια της πρωτεΐνης σε σχέση με την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα (όρια αλληλουχιών σε κυτταροπλασματικές, περιπλασματικές και διαμεμβρανικές περιοχές του μορίου), βασιζόμενο σε *in silico* πρόβλεψη από την αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης και σε κατάλληλες πειραματικές προσεγγίσεις (Rapp *et al.*, 2004). Ειδικότερα, στα πλαίσια της ενότητας 1.1 της παρούσας διατριβής, ένα τέτοιο τοπολογικό μοντέλο ήταν πολύ χρήσιμο καθώς χρειάστηκε να εξετάσουμε την πιθανή παρουσία δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων αμινοξέων (Asp, Glu, Lys, Arg, His), καθώς και ισχυρά πολικών αμινοξέων (Gln, Asn) σε διαμεμβρανικά τμήματα της περμεάσης XanQ. Η ανάλυση αυτή έγινε συνδυάζοντας (α) θεωρητικές τοπολογικές προβλέψεις και (β) υπάρχουσες έως τότε (2009) πειραματικές παρατηρήσεις.

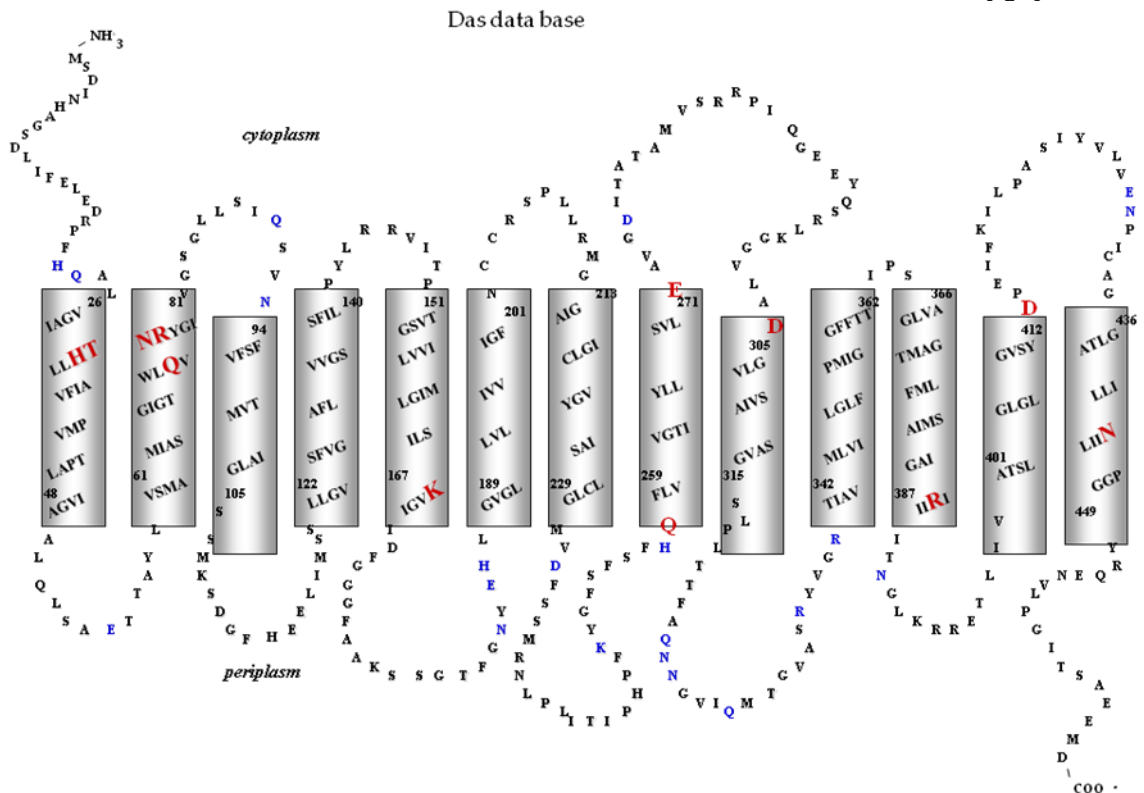
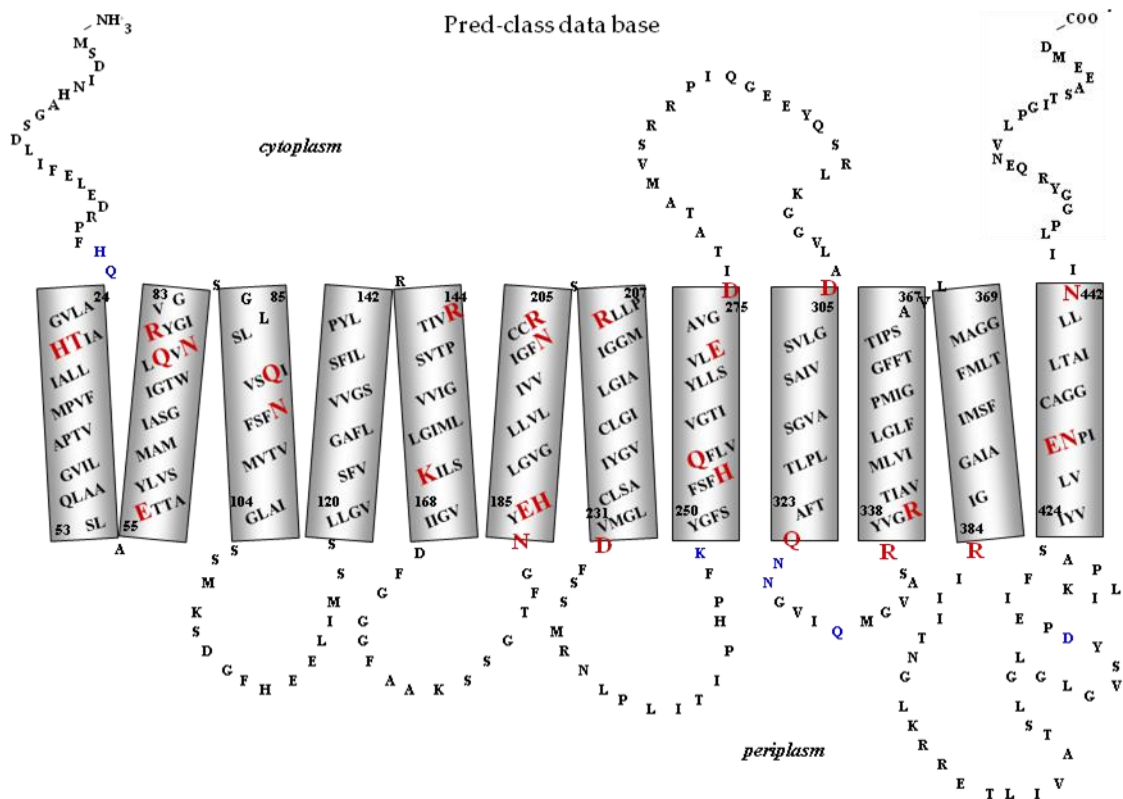
Π2.1 Σχεδίαση ενός τοπολογικού μοντέλου εργασίας για την περμεάση XanQ

(α) *In silico* πρόβλεψη της τοπολογικής οργάνωσης

Χρησιμοποιήσαμε βάσεις δεδομένων που βασίζονται σε μία σειρά από διαφορετικούς προγνωστικούς αλγορίθμους (TMHMM, HMM-TM, PRED-CLASS, TMPRED, SOSUI, DAS) και δίνουν το πιθανό τοπολογικό μοντέλο της πρωτεΐνης XanQ βάσει της προβλεπόμενης τοπολογικής της οργάνωσης σε διαμεμβρανικά τμήματα (TM). Συγκεκριμένα, μας ενδιέφερε ο εντοπισμός των δυνητικά ιοντιζόμενων και ισχυρά πολικών αμινοξέων, που η κάθε βάση δεδομένων προβλέπει ως κατάλοιπα που ανήκουν σε διαμεμβρανικά τμήματα (Εικόνα Π2.1), η σύγκριση των αποτελεσμάτων των διαφορετικών βάσεων δεδομένων και ο καθορισμός κοινών αποτελεσμάτων.







Εικόνα Π2.1: Διαγραμματική απεικόνιση του πιθανού τοπολογικού μοντέλου της περμεάσης XanQ σύμφωνα με βάσεις δεδομένων ανάλυσης τοπολογικών μοντέλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Χρησιμοποιήθηκαν βάσεις δεδομένων που βασίζονται σε μία σειρά από διαφορετικούς προγνωστικούς αλγόριθμους:

TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIVTMHMM>),

HMM-TM (<http://biophysics.biol.uoa.gr>),

SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/frameO.html>),

TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html),

PRED-CLASS (<http://biol.uoa.gr/PRED-CLASS>),

DAS (<http://sbc.su.se/miklos/DAS/maindas.html>).

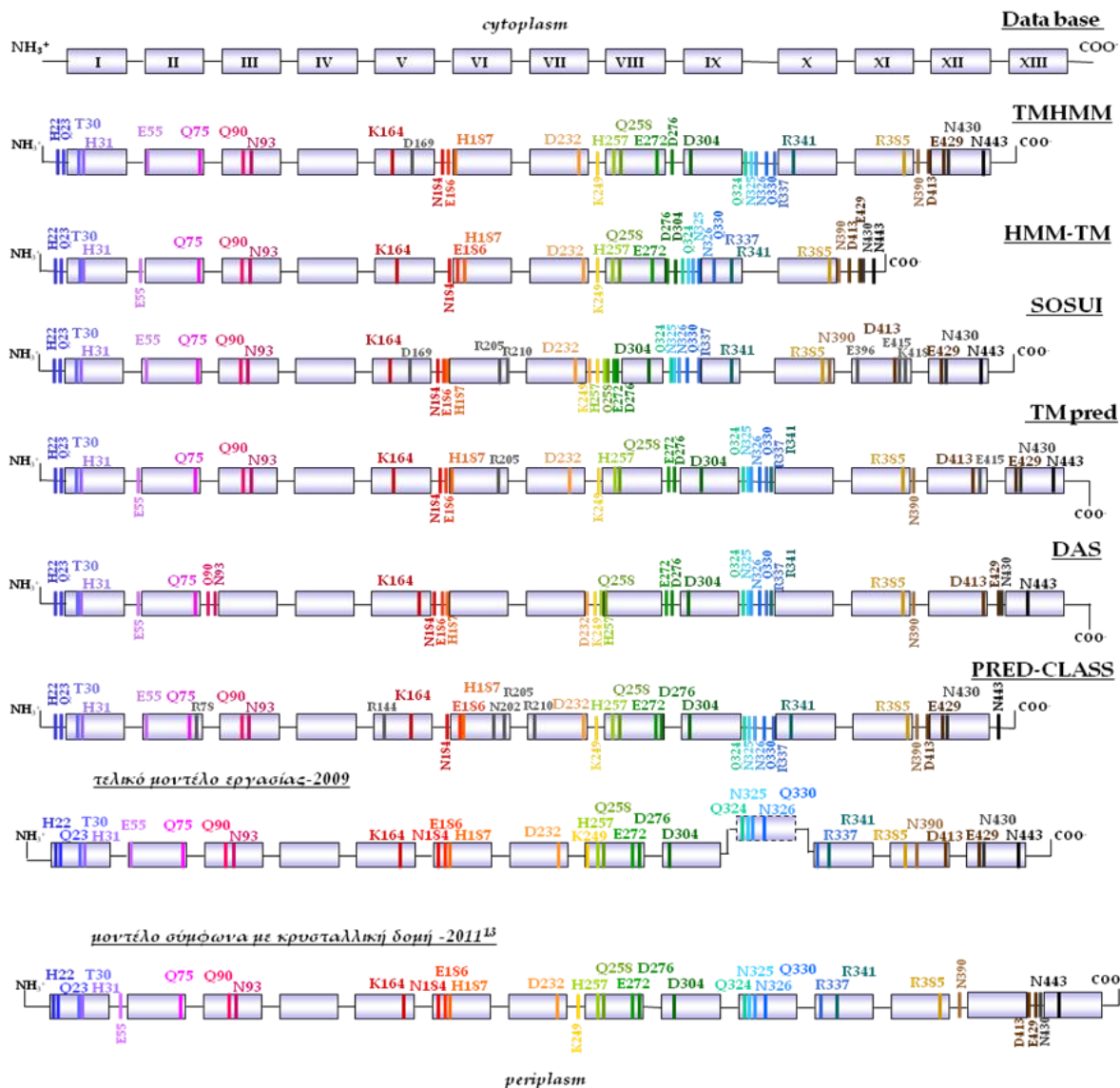
Με ορθογώνια απεικονίζονται τα προβλεπόμενα από κάθε βάση δεδομένων διαμεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης στα οποία τα δυνητικά ιοντιζόμενα κατάλοιπα (D, E, H, K, R) και κατάλοιπα με ισχυρά πολικό χαρακτήρα (Q, N) σημειώνονται μεγεθυμένα με κόκκινο χρώμα. Με μπλε χρώμα τονίζονται σε κάθε τοπολογικό μοντέλο τα δυνητικά ιοντιζόμενα και πολικά αμινοξέα που τελικά μελετήθηκαν στο εργαστήριό μας, αλλά προβλέπονται σε μη ενδομεμβρανική θέση από τον αντίστοιχο αλγόριθμο.

Όπως παρατηρείται από την απεικόνιση των τοπολογικών μοντέλων, που δίνουν οι διάφοροι αλγόριθμοι (Εικόνα Π2.1) εκτός από την ακριβή θέση των καταλοίπων υπάρχει διαφορετική πρόβλεψη ως προς τον αριθμό των διαμεμβρανικών τμημάτων α -ελίκων και την θέση του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης (προς το περίπλασμα ή προς το κυτταρόπλασμα). Ο αριθμός των πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων που δίνουν τρεις (3) βάσεις δεδομένων (TMHMM, SOSUI, PRED-CLASS) είναι δώδεκα (12), δύο (2) βάσεις (TMPRED, DAS) δίνουν δεκατρία (13) διαμεμβρανικά τμήματα και μία (1) βάση (HMM-TM) καταλήγει σε δέκα (10) διαμεμβρανικά τμήματα.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TMHMM είχαν ήδη αναλυθεί όλοι οι λειτουργικά χαρακτηρισμένοι μεταφορείς της οικογένειας NCS2 ως προς την τοπολογία τους (Karatza *et al.*, 2006) και είχε διαπιστωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το τοπολογικό μοντέλο προβλέπει δώδεκα (12) διαμεμβρανικά τμήματα α -ελίκων, γεγονός που αντικρούει τα μοντέλα των δέκα (10) και των δεκατριών (13) διαμεμβρανικών τμημάτων. Ωστόσο, τα δεδομένα της παραπάνω *in silico* ανάλυσης και της εφαρμογής του κάθε αλγόριθμου σε διαφορετικά ομόλογα μεταφορέων (Μερμελέκας Γ., Διδ. Διατριβή 2009) δεν έδιναν σαφή εικόνα για την τοπολογία του C-τελικού ημίσεος και ιδιαίτερα των ελίκων 8-12, γεγονός που τόνιζε την ανάγκη πειραματικών δεδομένων (βλ. παρακάτω) καθώς την συγκεκριμένη χρονική περίοδο (2009) απουσίαζε κάποια κρυσταλλική δομή οποιουδήποτε μεταφορέα της οικογένειας NCS2.

Η αναλυτική σύγκριση των παραπάνω τοπολογικών μοντέλων συνοψίζεται στην παρούσα μελέτη σχηματικά (Εικόνα Π2.2) και ταυτόχρονα

απεικονίζεται το μοντέλο εργασίας που χρησιμοποιήθηκε τελικά για την μελέτη του ρόλου των ισχυρά πολικών και δυνητικά ιοντιζόμενων καταλοίπων που εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα, κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής (Μάιος 2009). Τέλος, στο ίδιο σχήμα δίνεται και το τοπολογικό μοντέλο (14 διαμεμβρανικών τμημάτων) που έχει προκύψει μετά την ανακοίνωση της κρυσταλλικής δομής του ομολόγου μεταφορέα UraA δύο χρόνια μετά (Lu *et al.*, 2011) με σημειωμένα τα κατάλοιπα που έχουν ήδη μελετηθεί. Από το παραπάνω σχήμα προκύπτει πως τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα είναι και για τις έξι βάσεις δεδομένων τα Thr-30, His-31, Gln-75, Lys-164 και Arg-385, για πέντε βάσεις τα Gln-90, Asn-93, Asp-232, Gln-258, Asp-304 και Glu-429, για τέσσερις βάσεις τα His-187, His-257, Arg-341, Glu-429, Asn-430 και Asn-443, για τρεις βάσεις τα κατάλοιπα Glu-55, Glu-272, Asp-304 και Arg-205, για δύο βάσεις τα Glu-186, Asp-169, Arg-210, και Glu-415, για μία βάση τα κατάλοιπα Arg-78, Arg-144, Asp-276, Arg-337, Asn-390, Glu-396 και Lys-418 και οριακά κοντά σε διαμεμβρανικό τμήμα προβλέπονται από τις έξι βάσεις τα κατάλοιπα Asn-184 και Lys-249. Η μοντελοποίηση της περμεάσης XanQ σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του UraA δεν αναιρεί την τοποθέτηση των παραπάνω καταλοίπων που δίνουν οι βάσεις δεδομένων (αλγόριθμοι πρόβλεψης) στο εσωτερικό διαμεμβρανικών τμημάτων εκτός έξι εξαιρέσεων (Glu-55, Lys-249, Asn-390, Asp-413, Glu-429, Asn-430).



Εικόνα Π2.2: Απεικόνιση της συγκριτικής ανάλυσης των θέσεων δυνητικά ιοντιζόμενων και ισχυρά πολικών καταλοίπων που είναι πιθανό να εμπίπτουν σε διαμεμβρανικά τμήματα της περμεάσης XanQ.

Με ορθογώνια συμβολίζονται τα προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα και πάνω δεξιά από κάθε μοντέλο σημειώνεται υπογραμμισμένο το όνομα του αλγορίθμου που χρησιμοποιείται (TMHMM, HMM-TM, PRED-CLASS, TMPRED, SOSUI, DAS), ενώ σημειώνεται χαρακτηριστικά η θέση των αμινο- και καρβοξυ- τελικού άκρου (αν είναι προς το κυτταρόπλασμα ή προς το περίπλασμα). Κάθε δυνητικά ιοντιζόμενο ή ισχυρά πολικό κατάλοιπο που εμπίπτει σε διαμεμβρανικό τμήμα συμβολίζεται με το ίδιο (μοναδικό για κάθε αμινοξύ) χρώμα σε όλα τα μοντέλα. Στο κάτω μέρος εικονίζονται το τελικό μοντέλο εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή της παρούσας διατριβής (Μάιος 2009), στο οποίο σημειώνεται με ορθογώνιο διακεκομμένου περιγράμματος η πιθανή αμφιπαθής περιοχή (βλ. Π2.1β), και το τοπολογικό μοντέλο που στηρίζεται στην κρυσταλλική δομή του UraA (Απρίλιος 2011). Τα δυνητικά ιοντιζόμενα και πολικά κατάλοιπα που μελετήθηκαν στο εργαστήριό μας αλλά προβλέπονται από κάποιο αλγόριθμο σε μη ενδομεμβρανική θέση αναγράφονται σε κάθετη διάταξη με μικρότερο μέγεθος γραμματοσειράς πάνω ή κάτω από τη σειρά των διαμεμβρανικών τμημάτων (ανάλογα με το αν προβλέπονται από τον αλγόριθμο να εμπίπτουν σε συνδετική περιοχή εκτεθειμένη προς το κυτταρόπλασμα ή προς το περίπλασμα).

(β) Πειραματικές παρατηρήσεις

Η θέση του καρβοξυτελικού άκρου: Η τοπολογική προσέγγιση μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά όταν συνδυασθεί με πειραματικά δεδομένα, όπως δεδομένα για την θέση του C-τελικού άκρου. Συγκεκριμένα, στις μεμβρανικές πρωτεΐνες της *E. coli*, πειραματικές ενδείξεις προέκυψαν μέσω της χρήσης τοπολογικών πρωτεϊνικών δεικτών (*topology reporter proteins*) όπως είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) και η αλκαλική φωσφατάση (PhoA). Η πρώτη (GFP) παίρνει την σωστή διαμόρφωση και φθορίζει μόνο όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Feilmeier *et al.*, 2000) και η δεύτερη (PhoA) είναι ενεργός μόνο όταν βρίσκεται στο περίπλασμα (Michaelis, 1986). Έτσι, μετά από πειράματα σήμανσης του C-τελικού άκρου της περμεάσης XanQ με την GFP, που έγιναν για πρώτη φορά από την ομάδα του Gunnar von Heijne (Granseth *et al.*, 2005) στα πλαίσια μιας σφαιρικής τοπολογικής ανάλυσης του πρωτεώματος της εσωτερικής μεμβράνης της *E. coli* K-12 (Daley *et al.*, 2005), βρέθηκε ότι ο σημασμένος μεταφορέας εκφράζεται στην μεμβράνη και φθορίζει, άρα έχει το C-τελικό άκρο του διευθετημένο προς το κυτταρόπλασμα. Εξάλλου, αποτελέσματα του εργαστηρίου μας απέδειξαν ότι μετά από σήμανση του C-τελικού άκρου με GFP, η περμεάση XanQ διατηρεί πλήρη ενεργότητα, εκφράζεται στη μεμβράνη σε υψηλά επίπεδα και φθορίζει *in vivo*, επιβεβαιώνοντας το παραπάνω συμπέρασμα (Karatza and Frillingos, 2005; Mermelekas, Georgoroulou, Karatza, and Frillingos, unpublished). Επομένως, θεωρούμε ότι το C-τελικό άκρο βρίσκεται προς το κυτταρόπλασμα, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα μοντέλα που δίνουν οι βάσεις TMPRED και DAS (Π2.1α, Εικόνα Π2.1).

Η τοπολογία των διαμεμβρανικών τμημάτων 8-12 και ενδείξεις για την πιθανή παρουσία ενός τουλάχιστον επιπλέον διαμεμβρανικού τμήματος πριν την ανακοίνωση της κρυσταλλικής δομής του UraA.

Κατασκευάστηκαν περμεάσες μονής κυστεΐνης σε θέσεις που προβλέπεται (TMHMM) ότι βρίσκονται σε υδρόφιλες θηλειές στην περιοχή ανάμεσα στο 8^ο και στο (προβλεπόμενο ως) 12^ο διαμεμβρανικό τμήμα (S295C, L319C, M331C, A366C, R394C, I419C) και ο λειτουργικός έλεγχος απέδειξε ότι τα μεταλλάγματα αυτά είναι ενεργά ως προς την πρόσληψη υποστρώματος και εκφράζονται κανονικά στην μεμβράνη. Στην συνέχεια, όμως, έλεγχος της προσβασιμότητας του υδρόφιλου αντιδραστήριου MTSES στα κυστεϊνικά αυτά μεταλλάγματα (Scanning Cysteine Accessibility Method, SCAM) (Akabas & Karlin, 1992) από την περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης δεν υπέδειξε ένα μοτίβο εναλλασσόμενης προσβασιμότητας του αντιδραστήριου στις θέσεις αυτές όπως θα περίμενε κανείς με βάση την τοπολογική πρόβλεψη

(Georgoroulou *et al.*, 2010; Mermelekas *et al.*, 2010). Αντίθετα, όλες οι αντίστοιχες θέσεις φάνηκε να είναι προσβάσιμες στο MTSES· υποδηλώνοντας ότι πιθανόν η πραγματική διάταξη των διαμεμβρανικών τμημάτων του C-τελικού ημίσεος του μορίου είναι διαφορετική από την προβλεπόμενη. Παρόμοιος έλεγχος προσβασιμότητας έγινε και σε μεμβρανικά κλάσματα και επιβεβαίωσε την πρόσβαση του υδρόφιλου αντιδραστηρίου από τον εξωμεμβρανικό χώρο σε όλες τις περιπτώσεις και κατ' επέκταση τον εντοπισμό των αντίστοιχων καταλοίπων (S295C, L319C, M331C, A366C, R394C, I419C) σε υδρόφιλες θηλιές που βλέπουν είτε προς το κυτταρόπλασμα είτε προς το περίπλασμα (Μερμελέκας Γ., Διδ. Διατριβή 2009). Εξάλλου, έντονη προσβασιμότητα στο υδρόφιλο αντιδραστήριο MTSES· από την πλευρά του περιπλάσματος αποδείχθηκε ότι εμφανίζουν πολλά κατάλοιπα μιας συνεχόμενης περιοχής αλληλουχίας (μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NAT/NCS2, βλ. 1.3) (Georgoroulou *et al.*, 2010) την οποία οι περισσότεροι αλγόριθμοι προέβλεπαν είτε ως κυτταροπλασματική (HMM-TM, TMPRED, SOSUI, DAS) και ορισμένοι ως περιπλασματική (TMHMM, PRED-CLASS). Η περιοχή αυτή ήταν ήδη γνωστό από πειραματικά δεδομένα ότι πιθανόν να μην μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια ως προς την τοπολογία γιατί περιέχει κατάλοιπα με ισχυρά πολικό χαρακτήρα που είναι σημαντικά ή και αναντικατάστατα για τη λειτουργία (βλ. 1.4) τόσο στην XanQ όσο και στον UapA και θα μπορούσαν να συμμετέχουν άμεσα στο κέντρο δέσμευσης (Koukaki *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006; Georgoroulou *et al.*, 2010). Επομένως, εκτός των 12 TM όπου συνέκλιναν οι περισσότεροι αλγόριθμοι πρόβλεψης (Koukaki *et al.*, 2005; Karatza *et al.*, 2006), χαρακτηριστική ήταν η πιθανή παρουσία μιας ακόμη αμφιπαθούς περιοχής α-έλικας (πιθανόν διαμεμβρανική ή προσανατολισμένη προς το κυτταρόπλασμα) που συγκροτείται από την συντηρημένη ακολουθία των καταλοίπων 324-333 (μοτίβο-υπογραφή της οικογένειας NAT/NCS2) και την ακολουθία 329-339 που είχε υποστηριχθεί πειραματικά, βάσει του προτύπου εναλλαγής της ευαισθησίας σε αναστολή από το NEM, ότι έχει δομή α-έλικας (Karatza *et al.*, 2006). Το επιπλέον αυτό τμήμα αμφιπαθούς περιοχής υποτέθηκε τότε ότι υφίσταται είτε ως αυτοτελές διαμεμβρανικό τμήμα (υπόθεση που είχε το μειονέκτημα ότι κατέρριπτε το επικρατές μοντέλο των 12 TM) είτε ως μέρος ενός μεγαλύτερου διαμεμβρανικού τμήματος TM9 (το μέρος αυτό ονομάστηκε TM9b για να διακριθεί από το TM9a, στο οποίο ανήκει το D304 και το οποίο προέβλεπαν ως διαμεμβρανικό όλοι σχεδόν οι αλγόριθμοι) (Mermelekas *et al.*, 2010).

Η τοπολογική οργάνωση της περμεάσης XapQ σύμφωνα με την πρώτη κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα της οικογένειας NCS2

Η δημοσίευση της πρώτης κρυσταλλικής δομής ενός δομικά ομόλογου μεταφορέα της οικογένειας NCS2 (της περμεάσης ουρακίλης UraA, Lu *et al.*, 2011) παρουσιάζει το μοντέλο των δεκατεσσάρων (14) διαμεμβρανικών τμημάτων, τα οποία χωρίζονται σε δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις με το αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο να εντοπίζονται κυτταροπλασματικά (βλ. 1.2). Η μοντελοποίηση της περμεάσης XapQ σύμφωνα με το νέο μοντέλο του UraA (εικόνα Π2.2), τοποθετεί στο εσωτερικό διαμεμβρανικών τμημάτων της XapQ τα δυνητικά ιοντιζόμενα ή ισχυρά πολικά κατάλοιπα His-22, Gln-23, Thr-30, His-31 (TM1), Gln-75 (TM2), Gln-90 (TM3), Asn-93 (α 3), Lys-164 (TM5), Asn-184, Glu-186, His-187 (TM6), Asp-232 (TM7), His-257, Gln-258, Glu-272, Asp-276 (TM8), Asp-304 (TM9), Gln-324, Asn-325, Asn-326, Gln-330 (α 10), Arg-337, Arg-341 (TM11), Arg-385, Asn-443 (α 14).

(γ) Το τελικό τοπολογικό μοντέλο

Ο συνδυασμός της *in silico* ανάλυσης (α) και των πειραματικών αποτελεσμάτων (β) τον Μάιο 2009 με την έναρξη της παρούσας εργασίας συνέκλιναν στην αποδοχή ενός μοντέλου με δώδεκα (12) διαμεμβρανικά τμήματα, μία ευρεία κυτταροπλασματική περιοχή μεταξύ των TMS8 και TMS9 (Karena and Frillingos, 2009; Papageorgiou *et al.*, 2008) και το C-τελικό άκρο προσανατολισμένο προς το κυτταρόπλασμα. Έτσι, σύμφωνα με το σχήμα της Εικόνας Π2.2, τα κοινά διαμεμβρανικά κατάλοιπα των μοντέλων που δίνουν οι αλγόριθμοι TMHMM, SOSUI και PRED-CLASS (οι οποίοι συναινούν με τα κριτήρια του τελικού μοντέλου) είναι His-31, Glu-55, Gln-90, Asn-93, Lys-164, Asn-184, Asp-232, Asp-304, Arg-337, Arg-341, Arg-385 και Glu-429. Σε αυτό το σημείο, συσχετίσαμε τα αποτελέσματα του εντοπισμού με τη συντήρηση καταλοίπων στα συγγενικά ομόλογα του κλάδου COG2233 της οικογένειας NCS2 (μεταφορείς 2-οξυ πουρινών), η οποία έδειξε ότι τα κατάλοιπα His-31, Glu-272 και Asp-304 (Asp, Glu ή Asn) είναι συντηρημένα σε πολύ υψηλό βαθμό, τα κατάλοιπα His-22, Lys-164, His-257, Arg-337, Arg-341 και Arg-385 βρίσκονται κοντά σε περιοχές υψηλής συντήρησης και το κατάλοιπο Thr-30 συντηρείται ως Gln σε όλους τους γνωστούς μεταφορείς NCS2/COG2233 εκτός από την XapQ (βλ. Εικόνα 3.1.2). Επεκτείναμε ανάλογα και τα πιθανά όρια των διαμεμβρανικών τμημάτων (His-22, Glu-186, His-187, Lys-249, His-257, Glu-272, Asp-413) συμπεριλαμβάνοντας την πιθανότητα παρουσίας της αμφιπαθούς περιοχής α -έλικας μεταξύ TMS8 και TMS9 και καθώς τα κατάλοιπα Asp-276, Gln-324, Asn-325, Asn-326, Gln-330, Arg-337, Glu-429, Asn-430 και Asn-443 είχαν ήδη χαρακτηριστεί ως προς τον λειτουργικό τους ρόλο ή/και βρίσκονταν υπό μελέτη στο εργαστήριό μας την ίδια χρονική περίοδο

Παράρτημα 3

Π3.1 Φυλογενετική ανάλυση για τον προσδιορισμό της ομάδας ομολόγων που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των χαρακτηριστικών μοτίβων αλληλουχίας τα οποία αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση στην XanQ

Η υπολογιστική διαδικασία για την εξαγωγή των μοτίβων αλληλουχίας περιελάμβανε τα εξής βήματα: (I) εντοπισμός μελών της οικογένειας NCS2 (8000 αλληλουχίες) μέσω της αναζήτησης ομολόγων (BLAST-p search, 04/2013) προς τις 13 αλληλουχίες αμινοξέων των λειτουργικά χαρακτηρισμένων μεταφορέων πουρινών (ξανθίνης/ουρικού) του υποκλάδου COG2233 οι οποίες υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST ως σύνολο (Query Sequences) (Εικόνα 3.1.30), (II) εντοπισμός του υποσυνόλου των μελών που ανήκουν στον υποκλάδο των μεταφορέων πουρινών του COG2233 (3101 αλληλουχίες) με κριτήριο την μεγαλύτερη ομολογία προς γνωστές περμεάσες του υποκλάδου αυτού (XanQ, UapA, UacT) από ό,τι προς γνωστές περμεάσες εκτός του υποκλάδου που μπορούν να θεωρηθούν ως παρα-ομάδες (UraA, Lpe1) (βλ. 3.1.3), (III) περιορισμός των αλληλουχιών του υποσυνόλου (από 3101 σε 523 αλληλουχίες) με αφαίρεση ταυτόσημων αλληλουχιών (από διαφορετικά στελέχη του ίδιου οργανισμού) και, στη συνέχεια, αλληλουχιών που εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ταυτότητας καταλοίπων (>80%) με ήδη υπάρχουσες, μέσω φυλογενετικής ανάλυσης (MEGA 6) και αναλύσεων στοίχισης συγγενικών αλληλουχιών (ClustalW), (IV) φυλογενετική ανάλυση των 523 αλληλουχιών για την διάκριση των δύο σαφώς καθορισμένων επιμέρους ομάδων του υποκλάδου, δηλαδή της ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τις περμεάσες XanQ (*E.coli*) και UapA (*A.nidulans*) (περιέχει μεταφορείς ξανθίνης ή ξανθίνης/ουρικού) (292 μέλη) (βλ. Πίνακας Π3.1) και της ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τις UacT (*E.coli*) και SmLL9 (*S.meliloti*) (περιέχει κυρίως μεταφορείς ουρικού ή ξανθίνης/ουρικού) (231 μέλη), (V) ανάλυση της ομάδας των XanQ/UapA για περαιτέρω περιορισμό των αλληλουχιών (σε 121 μέλη) μέσω επιλογής αντιπροσωπευτικών μελών από κάθε σμήνος συγγενικών ομολόγων που αποκαλύπτει η φυλογενετική ανάλυση (MEGA 6) (Εικόνα Π3.1), (VI) εντοπισμός μοτίβων αλληλουχίας που συντηρούνται στα 121 αντιπροσωπευτικά μέλη της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού (XanQ/UapA) με χρήση του προγράμματος MEME (βλ. Πίνακα Π.3.2).

Πίνακας Π3.1: Τα 292 μέλη της οικογένειας NCS2/COG2233 που χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική ανάλυση εντοπισμού μοτίβων αλληλουχίας

Πρόκειται για μέλη της επιμέρους ομάδας που αντιπροσωπεύεται από τις περμεάσες XanQ (*E.coli*) και UapA (*A.nidulans*) (περιέχει μεταφορείς ξανθίνης ή ξανθίνης/ουρικού) και τα οποία έδωσαν το τελικό φυλογενετικό δέντρο (βλ. 3.1.3). Στον πίνακα, αναφέρονται αναλυτικά ο κωδικός (gene ID) των ομολόγων και το είδος (στις περισσότερες περιπτώσεις και το στέλεχος) οργανισμού όπου ανήκουν (species) και στο τέλος του Πίνακα τονίζονται τα ονόματα των λειτουργικά χαρακτηρισμένων μελών της NCS2 που συμπεριλήφθηκαν στην φυλογενετική ανάλυση είτε ως μέλη της υπό μελέτη ομάδας (287-288, 296-299) είτε ως παρα-ομάδες (289-294, 300-303). Η αύξουσα αρίθμηση των μελών αντιστοιχίζει το κάθε μέλος με έναν μοναδικό αριθμό ο οποίος χρησιμοποιείται δίπλα από το όνομα του οργανισμού στα φυλογενετικά δέντρα (Εικόνες 3.1.30 και Π3.1).

	Species	Gene ID
1.	<i>Thermococcus</i> sp. CL1	YP_006424210.1
2.	<i>Pyrococcus</i> <i>gaganosii</i> CH	YP_004623938.1
3.	<i>Methanococcus</i> <i>voltae</i> A3	YP_003707299.1
4.	<i>Dethiobacter</i> <i>alkaliphilus</i> AHT 1	ZP_03728158.1
5.	<i>Thermovirga</i> <i>lienii</i> DSM 17291	YP_004932620.1
6.	<i>Desulfonatronospira</i> <i>thiodismutans</i>	ZP_07016799.1
7.	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix	YP_003461025.1
8.	<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	ZP_01168987.1
9.	<i>Leuconostoc</i> <i>carnosum</i> JB16	YP_006795763.1
10.	<i>Coprococcus</i> sp. ART55/1	CBK82429.1
11.	<i>Bifidobacterium</i> <i>angulatum</i> DSM 20098	ZP_04448160.1
12.	<i>Clostridium</i> <i>sporogenes</i> ATCC 15579	ZP_02995645.1
13.	<i>Desulfovibrio</i> <i>alaskensis</i> G20	YP_387197.1
14.	<i>Vibrio</i> sp. N418	ZP_08753143.1
15.	<i>Paenibacillus</i> <i>alvei</i> DSM 29	ZP_10863794.1
16.	<i>Mesorhizobium</i> <i>australicum</i>	YP_007304006.1
17.	<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	YP_004489482.1
18.	<i>Lactobacillus</i> <i>hilgardii</i> ATCC 8290	ZP_03955054.1
19.	<i>Lactobacillus</i> <i>sanfranciscensis</i>	YP_004841606.1
20.	<i>Enterococcus</i> <i>gallinarum</i> EG2	ZP_05648246.1
21.	<i>Anaeroglobus</i> <i>geminatus</i> F0357	ZP_09380638.1
22.	<i>Paenibacillus</i> sp.	YP_003241174.1
23.	<i>Lysinibacillus</i> <i>fusiformis</i> ZC1	ZP_07051709.1
24.	<i>Haloterrigena</i> <i>thermotolerans</i> DSM 11522	ZP_21561004.1
25.	<i>Natronorubrum</i> <i>bangense</i> JCM 10635	ZP_21497437.1
26.	<i>Natronococcus</i> <i>occultus</i> SP4	YP_007309547.1
27.	<i>Haloferax</i> <i>mediterranei</i> ATCC 33500	YP_006349969.1
28.	<i>Natronococcus</i> <i>occultus</i> SP4	YP_007310668.1
29.	<i>Halalkalicoccus</i> <i>jeotgali</i> B3	YP_003738367.1
30.	<i>Haloterrigena</i> <i>turkmenica</i> DSM 5511	YP_003405456.1
31.	<i>Natronococcus</i> <i>amylolyticus</i> DSM 10524	ZP_21511815.1
32.	<i>Halococcus</i> <i>morrhuae</i> DSM 1307	ZP_21710353.1

33.	<i>Halococcus morrhuae</i> DSM 1307	ZP_21708964.1
34.	<i>Haloquadratum walsbyi</i> C23	YP_005839883.1
35.	<i>Halobacterium</i> sp. DL1	ZP_09028835.1
36.	<i>Halogramma salarium</i> B-1	ZP_10770196.1
37.	<i>Halobiforma lacisalsi</i> AJ5	ZP_09946613.1
38.	<i>Natrialba chahannaensis</i> JCM 10990	ZP_21545542.1
39.	<i>Natronomonas moolapensis</i>	YP_007488430.1
40.	<i>Silicibacter lacuscaerulensis</i> ITI-1157	ZP_05785114.1
41.	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601	ZP_01441874.1
42.	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	ZP_05054857.1
43.	<i>Oceanicola</i> sp. S124	ZP_09517875.1
44.	<i>Nitratireductor aquibiodomus</i> RA22	ZP_10235239.1
45.	<i>Parovularcula bermudensis</i> HTCC2503	YP_003855505.1
46.	<i>Novosphingobium</i> sp. Rr 2-17	ZP_10359484.1
47.	<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54	YP_065148.1
48.	<i>Puniceispirillum marinum</i> IMCC1322	YP_003551699.1
49.	<i>Rhodobacteriales bacterium</i> HTCC2255	ZP_01447596.1
50.	<i>Clostridium ultunense</i> Esp.	ZP_23194306.1
51.	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> M21/2	ZP_02092376.1
52.	<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	ZP_08077091.1
53.	<i>Eubacterium eligens</i> ATCC 27750	YP_002930941.1
54.	<i>Roseburia inulinivorans</i> DSM 16841	ZP_03754640.1
55.	<i>Blautia hydrogenotrophica</i> DSM 10507	ZP_03781339.1
56.	<i>Subdoligranulum variabile</i> DSM 15176	ZP_05981109.2
57.	<i>Anaerostipes</i> sp.	ZP_07932188.1
58.	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	ZP_08332767.1
59.	<i>Eubacterium rectale</i> DSM 17629	CBK89782.1
60.	<i>Treponema vincentii</i> ATCC 35580	ZP_05622260.1
61.	<i>Erysipelotrichaceae bacterium</i>	ZP_06646323.1
62.	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	YP_001318352.1
63.	<i>Ilyobacter polytropus</i> DSM 2926	YP_003966267.1
64.	<i>Fusobacterium</i> sp.	ZP_09587774.1
65.	<i>Coprobacillus</i> sp.	ZP_09372835.1
66.	<i>Eggerthella</i> sp.	ZP_07947509.1
67.	<i>Slackia piriformis</i> YIT 12062	ZP_11042367.1
68.	<i>Parascardovia denticolens</i> F0305	ZP_06752096.1
69.	<i>Scardovia wiggsiae</i> F0424	ZP_17326741.1
70.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i> RBL67	YP_007593659.1
71.	<i>Fibrobacter succinogenes</i> subsp.	YP_003249739.1
72.	<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	ZP_06252103.1
73.	<i>Gordonibacter pamelaiae</i>	CBL03353.1
74.	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	YP_003316945.1
75.	<i>Eubacterium</i> sp. AS15	ZP_10828036.1
76.	<i>Peptoniphilus indolicus</i> ATCC 29427	ZP_08935691.1
77.	<i>Sebaldella termitidis</i> ATCC 33386	YP_003308457.1
78.	<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	ZP_02039775.1
79.	<i>Brachyspira hampsonii</i>	ZP_21375004.1
80.	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp.	ZP_08477871.1
81.	<i>Planococcus antarcticus</i> DSM 14505	ZP_10208919.1
82.	<i>Carnobacterium</i> sp. AT7	ZP_02185297.1

83.	<i>Clostridium difficile</i>	ZP_17071379.1
84.	<i>Fusobacterium mortiferum</i> ATCC 9817	ZP_08688212.1
85.	<i>Clostridium difficile</i> QCD-23m63	ZP_05401471.1
86.	<i>Finegoldia magna</i> ACS-171-V-Col3	ZP_07268728.1
87.	<i>Anaerococcus vaginalis</i> ATCC 51170	ZP_05473073.1
88.	<i>Peptoniphilus indolicus</i> ATCC 29427	ZP_08934671.1
89.	<i>Olsenella</i> sp. oral taxon 809 str. F0356	ZP_09044203.1
90.	<i>Clostridium</i> sp. M62/1	ZP_06345132.1
91.	<i>Sebaldella termitidis</i> ATCC 33386	YP_003308456.1
92.	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	YP_001318490.1
93.	<i>Oceanimonas</i> sp. GK1	YP_005092918.1
94.	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	YP_003899341.1
95.	<i>Collinsella aerofaciens</i> ATCC 25986	ZP_01772117.1
96.	<i>Atopobium rimae</i> ATCC 49626	ZP_03568814.1
97.	<i>Clostridium</i> sp. SY8519	YP_004707471.1
98.	<i>Eubacterium hallii</i> DSM 3353	ZP_03716919.1
99.	<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799	ZP_02035835.1
100.	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium	ZP_09532033.1
101.	<i>Synergistes</i> sp.	ZP_09360873.1
102.	<i>Clostridium asparagiforme</i> DSM 15981	ZP_03759850.1
103.	<i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF	YP_005709011.1
104.	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp.	ZP_08573592.1
105.	<i>Tetragenococcus halophilus</i> NBRC 12172	YP_004886127.1
106.	<i>Eubacterium</i> sp. AS15	ZP_10828065.1
107.	<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	YP_001558611.1
108.	<i>Anaerococcus tetradius</i> ATCC 35098	ZP_03931344.1
109.	<i>Treponema phagedenis</i> F0421	ZP_08037288.1
110.	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium	ZP_08150642.1
111.	<i>Oribacterium sinus</i> F0268	ZP_03992653.1
112.	<i>Clostridium bolteae</i> ATCC BAA-613	ZP_02085244.1
113.	<i>Ruminococcus torques</i> L2-14	CBL26909.1
114.	<i>Catenibacterium mitsuokai</i> DSM 15897	ZP_03681490.1
115.	<i>Coprococcus catus</i> GD/7	CBK79522.1
116.	<i>Dorea formicigenerans</i>	ZP_08850567.1
117.	<i>Clostridium saccharolyticum</i> WM1	YP_003821269.1
118.	<i>Ruminococcus obeum</i> A2-162	CBL23553.1
119.	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium	ZP_08617030.1
120.	<i>Clostridiales</i> bacterium OBRC5-5	ZP_11019351.1
121.	<i>Clostridium hathewayi</i> WAL-18680	ZP_09151233.1
122.	<i>Megasphaera elsdenii</i> DSM 20460	YP_004765647.1
123.	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	ABS50207.1
124.	<i>Opitutaceae</i> bacterium TAV5	ZP_09594442.1
125.	<i>Verrucomicrobiae</i> bacterium DG1235	ZP_05057378.1
126.	<i>Desulfarculus baarsii</i> DSM 2075	YP_003808805.1
127.	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	YP_001212821.1
128.	<i>Halobacteroides halobius</i> DSM 5150	YP_007315096.1
129.	<i>Petrogoga mobilis</i> SJ95	YP_001568742.1
130.	<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001784133.1
131.	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335	XP_002295239.1
132.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1055/1	XP_002184514.1

133.	<i>Bathycoccus prasinus</i>	CCO17356.1
134.	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	XP_002507867.1
135.	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	EGB03628.1
136.	<i>Guillardia theta</i> CCMP2712	EKX39438.1
137.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001702481.1
138.	<i>Chlorella variabilis</i>	EFN55989.1
139.	<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> CCAP 1055/1	XP_002185427.1
140.	<i>Galdieria sulphuraria</i>	EME25759.1
141.	<i>Rhizopus delemar</i> RA 99-880	EIE78716.1
142.	<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM22506.1
143.	<i>Punctularia strigosozonata</i> HHB-11173	EIN11090.1
144.	<i>Phanerochaete carnosus</i> HHB-10118-sp	EKM51797.1
145.	<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	EIW76423.1
146.	<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGN94967.1
147.	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> B	EMD40274.1
148.	<i>Fibroporia radiculosa</i>	CCL99902.1
149.	<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	EIW61252.1
150.	<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM87965.1
151.	<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003036378.1
152.	<i>Fomitiporia mediterranea</i> MF3/22	EJD01748.1
153.	<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA69120.1
154.	<i>Dacryopinax</i> sp. DJM-731 SS1	EJT97062.1
155.	<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD43542.1
156.	<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001876899.1
157.	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7130	XP_001839088.2
158.	<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2	CBQ67459.1
159.	<i>Mixia osmundae</i> IAM 14324	GAA99127.1
160.	<i>Bipolaris maydis</i> C5	EMD94199.1
161.	<i>Sphaerulina musiva</i> SO2202	EMF13914.1
162.	<i>Cordyceps militaris</i> CM01	EGX93669.1
163.	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	XP_002485827.1
164.	<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	GAA92995.1
165.	<i>Glarea lozoyensis</i> 74030	EHK96587.1
166.	<i>Macrophomina phaseolina</i> MS6	EKG11627.1
167.	<i>Zymoseptoria tritici</i> IPO323	XP_003853577.1
168.	<i>Sphaerulina musiva</i> SO2202	EMF16898.1
169.	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	EFW97589.1
170.	<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	XP_002837872.1
171.	<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_759837.1
172.	<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>asahii</i> CBS 8904	EKD03605.1
173.	<i>Cryptococcus gattii</i>	AEG78606.1
174.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593513.1
175.	<i>Candida albicans</i>	AAX22221.1
176.	<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL	XP_001523117.1
177.	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	XP_001387704.2
178.	<i>Clavispora lusitaniae</i> ATCC 42720	XP_002616575.1
179.	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	XP_457127.2
180.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATCC 6260	XP_001485449.1
181.	<i>Millerozyma farinosa</i> CBS 7064	XP_004204530.1
182.	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	CCH45245.1

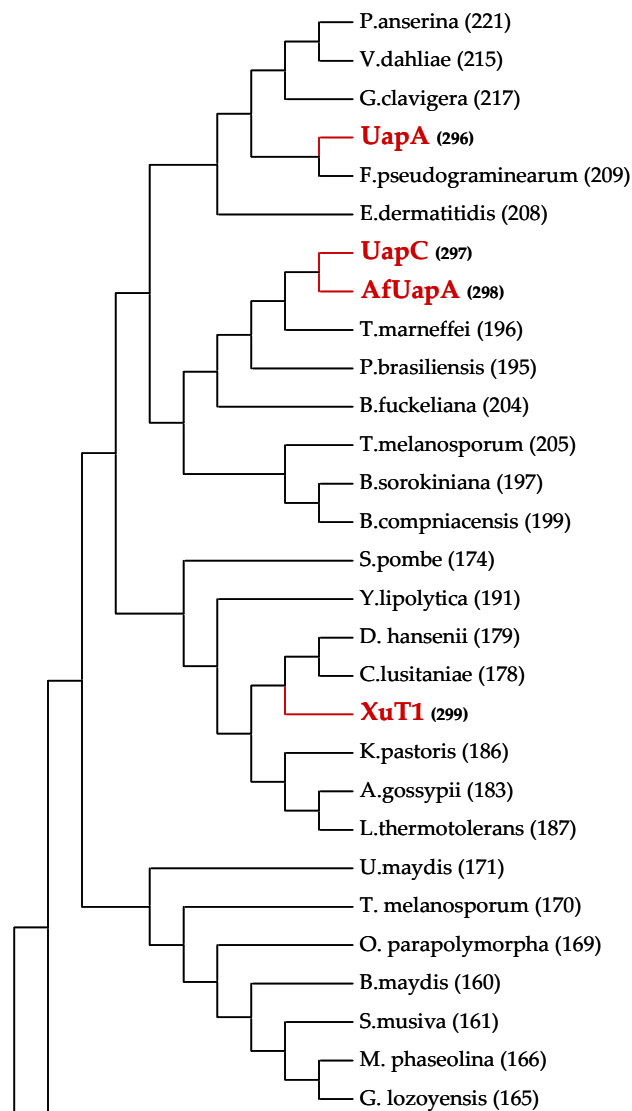
183.	<i>Ashbya gossypii</i> ATCC 10895	NP_986169.1
184.	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	EFW97155.1
185.	<i>Dekkera bruxellensis</i> AWRI1499	EIF49072.1
186.	<i>Komagataella pastoris</i> GS115	XP_002490650.1
187.	<i>Lachancea thermotolerans</i>	XP_002556260.1
188.	<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1140	XP_453256.1
189.	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	XP_002499064.1
190.	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	XP_003679888.1
191.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	XP_504485.1
192.	<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	GAA86071.1
193.	<i>Penicillium digitatum</i> PHI26	EKV05076.1
194.	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	XP_001261538.1
195.	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	EEH47125.1
196.	<i>Talaromyces marneffeii</i> ATCC 18224	XP_002152129.1
197.	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ND90Pr	EMD64839.1
198.	<i>Zymoseptoria tritici</i> IPO323	XP_003852250.1
199.	<i>Baudoinia compniacensis</i> UAMH 10762	EMC93459.1
200.	<i>Dothistroma septosporum</i> NZE10	EME44069.1
201.	<i>Pseudocercospora fijiensis</i> CIRAD86	EME79007.1
202.	<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY58867.1
203.	<i>Arthrotrichum oligospora</i> ATCC 24927	EGX49144.1
204.	<i>Botryotinia fuckeliana</i> T4	CCD55344.1
205.	<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	XP_002836291.1
206.	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	XP_664536.1
207.	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> 20631-21	ELR07285.1
208.	<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY57935.1
209.	<i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096	EKJ68615.1
210.	<i>Claviceps purpurea</i>	CCE29957.1
211.	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 23	EFY97639.1
212.	<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	EHK40086.1
213.	<i>Cordyceps militaris</i> CM01	EGX91884.1
214.	<i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001	EFQ31977.1
215.	<i>Verticillium dahliae</i> VdLs.17	EGY15573.1
216.	<i>Eutypa lata</i> UCREL1	EMR65933.1
217.	<i>Grosmannia clavigera</i> kw1407	EFX05242.1
218.	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	EJT80946.1
219.	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	XP_003715008.1
220.	<i>Neurospora tetrasperma</i> FGSC 2508	EGO55144.1
221.	<i>Podospora anserina</i> S mat+	XP_001904636.1
222.	<i>Chaetomium thermophilum</i> DSM 1495	EGS22245.1
223.	<i>Myceliophthora thermophila</i> ATCC 42464	XP_003665130.1
224.	<i>Teredinibacter turnerae</i> T7901	YP_003073493.1
225.	<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4	YP_001673599.1
226.	<i>Bilophila wadsworthia</i>	ZP_07943107.1
227.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ZP_06128831.1
228.	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 33394	ZP_08133500.1
229.	<i>Aeromonas veronii</i> AMC35	ZP_11084380.1
230.	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> 9_2_54FAA	ZP_07952682.1
231.	<i>Morganella morganii</i> KT	YP_007506569.1
232.	<i>Escherichia hermannii</i> NBRC 105704	ZP_09806225.1

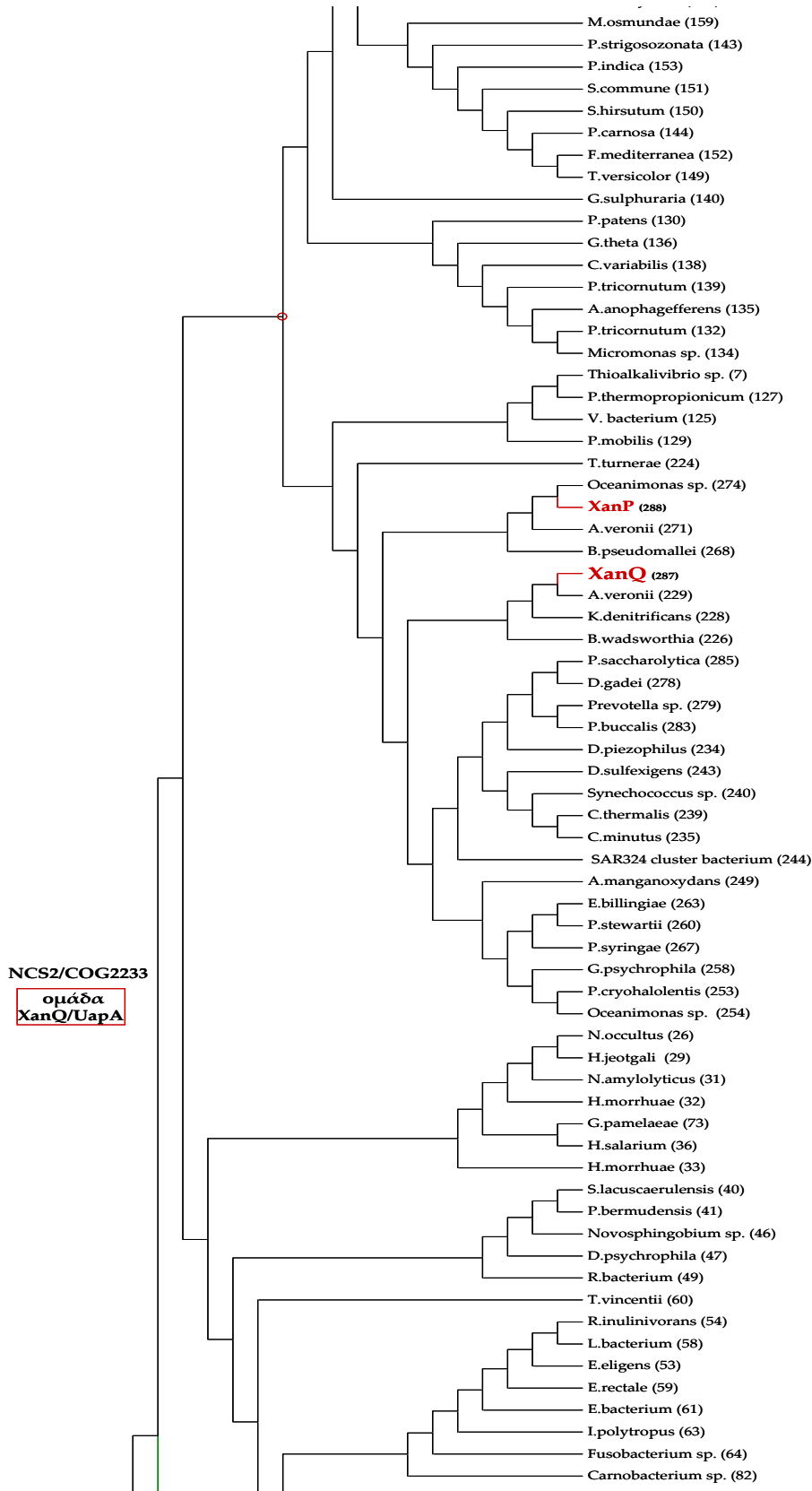
233.	<i>Spirochaeta smaragdinae</i> DSM 11293	YP_003804650.1
234.	<i>Desulfovibrio piezophilus</i> C1TLV30	YP_007493568.1
235.	<i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605	YP_007095671.1
236.	<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506	ZP_07113329.1
237.	<i>Oscillatoriales cyanobacterium</i> JSC-12	ZP_11388793.1
238.	<i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 7428	YP_007130326.1
239.	<i>Chroococciopsis thermalis</i> PCC 7203	YP_007090338.1
240.	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	ZP_05037609.1
241.	<i>Dactylococopsis salina</i> PCC 8305	YP_007170552.1
242.	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7305	ZP_21053094.1
243.	<i>Desulfocapsa sulfexigens</i> DSM 10523	YP_007467528.1
244.	SAR324 cluster bacterium	ZP_10756423.1
245.	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	YP_661795.1
246.	<i>Alteromonas</i> sp. SN2	YP_004467479.1
247.	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	YP_573836.1
248.	<i>Celeribacter baekdonensis</i> B30	ZP_11133238.1
249.	<i>Aurantimonas manganoxydans</i> SI85-9A1	ZP_01228413.1
250.	<i>Citreicella</i> sp. SE45	ZP_05781098.1
251.	<i>Pseudomonas</i> sp. GM33	ZP_10674938.1
252.	<i>Pseudomonas mendocina</i> DLHK	ZP_15950481.1
253.	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	YP_581174.1
254.	<i>Oceanimonas</i> sp. GK1	YP_005091302.1
255.	<i>Marinomonas</i> sp. MED121	ZP_01074135.1
256.	<i>Vibrio shilonii</i> AK1	ZP_01868178.1
257.	<i>Capitella teleta</i>	ELU02197.1
258.	<i>Glaciecola psychrophila</i> 170	ZP_11325274.1
259.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	ZP_14289424.1
260.	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> DC283	ZP_09830070.1
261.	<i>Rahnella aquatilis</i> HX2	YP_005400246.1
262.	<i>Pantoea</i> sp. At-9b	YP_004115844.1
263.	<i>Erwinia billingiae</i> Eb661	YP_003739402.1
264.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KOS6	ZP_16057292.1
265.	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	YP_002800111.1
266.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MPAO1/P2	ZP_13154227.1
267.	<i>Pseudomonas syringae</i>	ZP_16709455.1
268.	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	YP_107757.1
269.	<i>Bartonella tamiae</i>	ZP_10466576.1
270.	<i>Acinetobacter baumannii</i> WC-323	ZP_18864615.1
271.	<i>Aeromonas veronii</i> AMC34	ZP_17192290.1
272.	<i>Vibrio cholerae</i> AM-19226	ZP_04960863.1
273.	<i>Grimontia</i> sp. AK16	ZP_21177949.1
274.	<i>Oceanimonas</i> sp. GK1	YP_005093564.1
275.	<i>Campylobacter lari</i> RM2100	YP_002575123.1
276.	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> KT	ZP_15940363.1
277.	<i>Bacteroides coprosuis</i> DSM 18011	ZP_08458834.1
278.	<i>Dysgonomonas gadei</i> ATCC BAA-286	ZP_08475145.1
279.	<i>Prevotella</i> sp. MSX73	ZP_10825717.1
280.	<i>Bacteroides coprophilus</i> DSM 18228	ZP_03643519.1
281.	<i>Alistipes indistinctus</i> YIT 12060	ZP_09022303.1
282.	<i>Succinatimonas hippei</i> YIT 12066	ZP_08077753.1

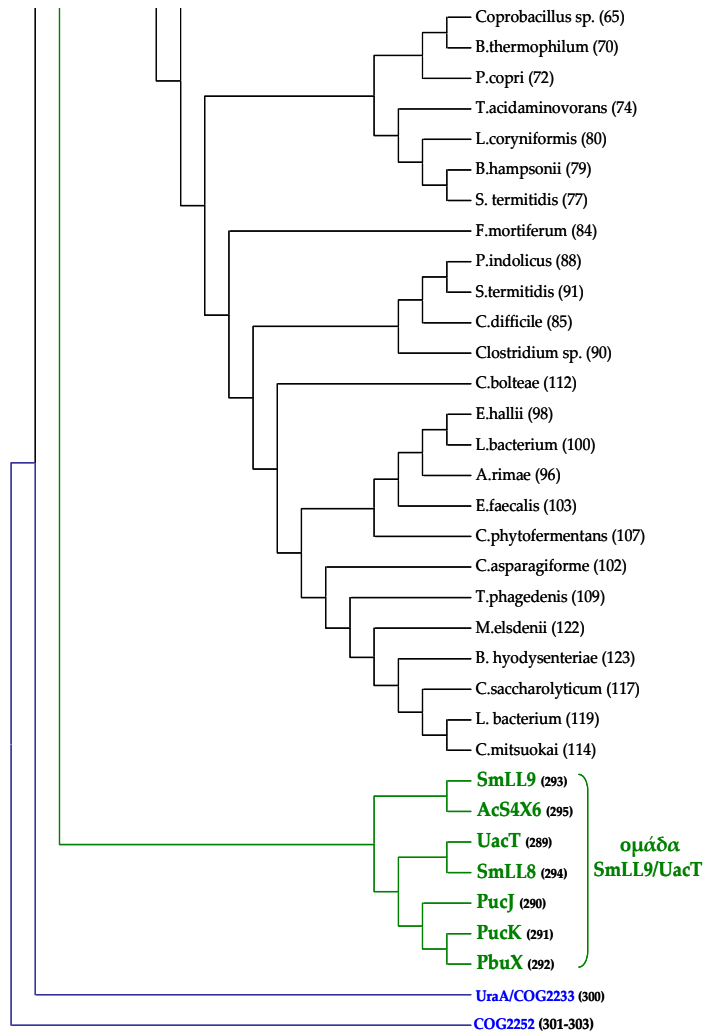
283.	<i>Prevotella buccalis</i> ATCC 35310	ZP_06286788.1
284.	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	NP_906202.1
285.	<i>Prevotella saccharolytica</i> F0055	ZP_19273825.1
286.	<i>Bacteroides</i> sp.	ZP_05287215.1
287.	<i>Escherichia coli</i> (XanQ)	P67444
288.	<i>Escherichia coli</i> (XanP)	P0AGM9
289.	<i>Escherichia coli</i> (UacT)	Q46821
290.	<i>Bacillus subtilis</i> (PucJ)	O32139
291.	<i>Bacillus subtilis</i> (PucK)	O32140
292.	<i>Bacillus subtilis</i> (PucX)	P42086
293.	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (SmLL9)	CAC47601
294.	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (SmLL8)	CAC47602
295.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (AcS4X6)	WP_003654128
296.	<i>Aspergillus nidulans</i> (UapA)	Q07307
297.	<i>Aspergillus nidulans</i> (UapC)	P48777
298.	<i>Aspergillus fumigatus</i> (AfUapA)	XP748919
299.	<i>Candida albicans</i> (XuT1)	AAX2222.1
300.	<i>Escherichia coli</i> (UraA)	Q46817
301.	<i>Escherichia coli</i> (PurP)	P31466
302.	<i>Escherichia coli</i> (YicO)	P31440
303.	<i>Escherichia coli</i> (YjcD)	P0AF52

Εικόνα Π3.1: Φυλογενετικό δέντρο των μελών της ομάδας των XanQ/UapA του κλάδου COG2233 της οικογένειας NCS2

Φυλογενετική ανάλυση (MEGA 6) αντιπροσωπευτικών μελών (121 αλληλουχίες) της ομάδας που εκπροσωπείται από τις καλά μελετημένες περμεάσες XanQ (*E. coli*) και UapA (*A. nidulans*) και περιέχει μεταφορείς ξανθίνης ή ξανθίνης/ουρικού (292 μέλη συνολικά, όπως δίνονται στον Πίνακα Π3.1). Στο σχήμα τονίζονται με κόκκινο χρώμα τα μέλη της ομάδας των XanQ/UapA που έχουν χαρακτηριστεί από λειτουργικά πειράματα. επίσης, με πράσινο χρώμα σημειώνονται γνωστές περμεάσες της οικογένειας NCS2 που ανήκουν στην συγγενική ομάδα μεταφορέων πουρινών (ουρικού ή ξανθίνης/ουρικού), η οποία εκπροσωπείται από τις πρόσφατα χαρακτηρισμένες περμεάσες UacT (*E. coli*) και SmLL9 (*S. meliloti*) (βλ. Εικόνα 3.1.30) (231 μέλη συνολικά), και προστέθηκαν στην ανάλυση ως παρα-ομάδες. Τέλος με μπλε χρώμα φαίνονται οι κλάδοι (παρα-ομάδες) που περιέχουν μέλη συγγενικά με την περμεάση UraA (μεταφορείς ουρακίλης ή ουρακίλης/πουρινών που ανήκουν στην COG2233) ή με μεταφορείς του κλάδου COG2252 (μεταφορείς αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης).







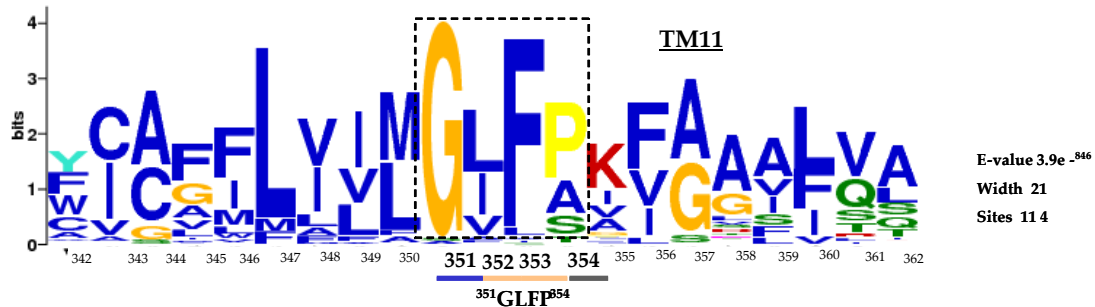
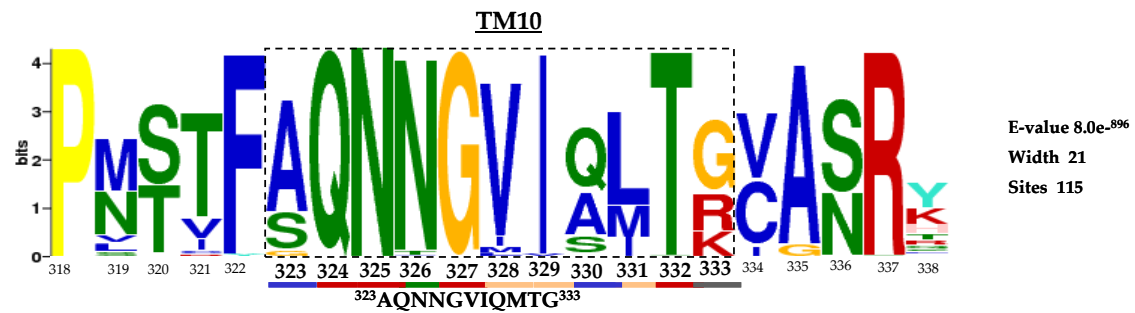
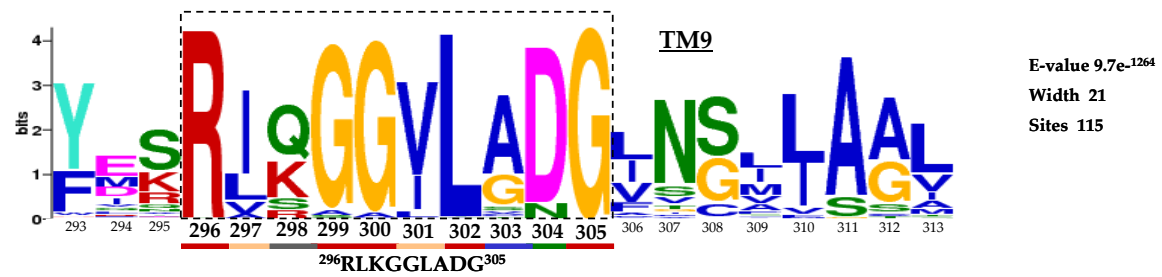
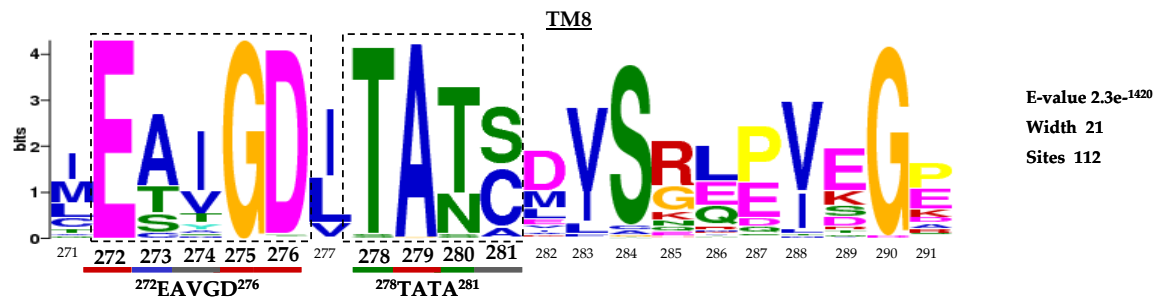
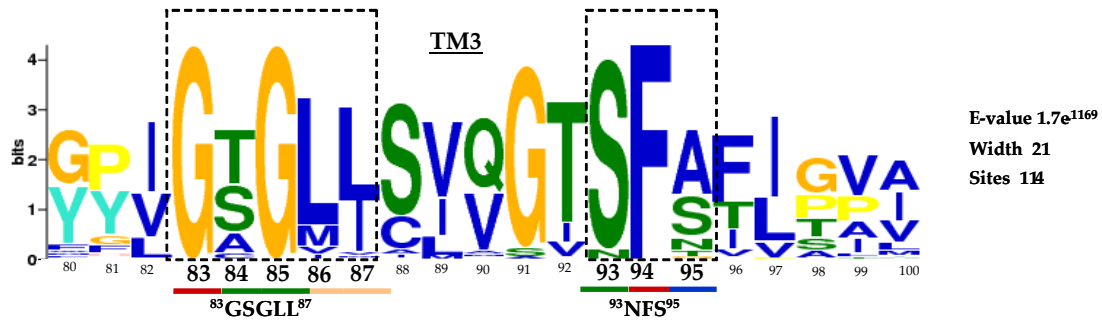
Π3.2 Εξαγωγή των χαρακτηριστικών μοτίβων αλληλουχίας τα οποία αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση στην περμεάση XanQ

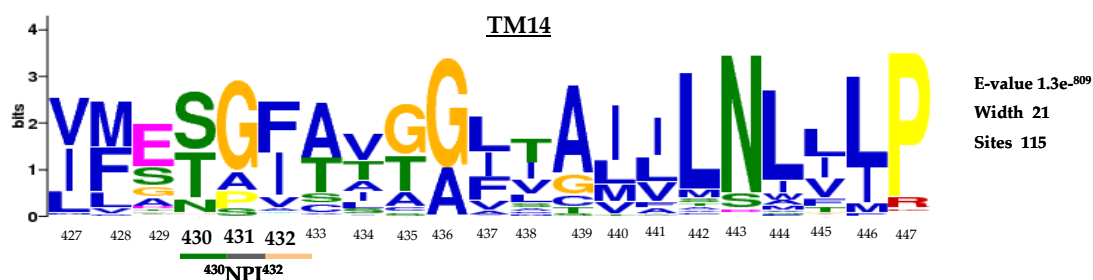
Μετά την ανάλυση της ομάδας XanQ/UapA για περαιτέρω περιορισμό των αλληλουχιών (σε 121 αντιπροσωπευτικά μέλη, Εικόνα Π3.1), έγινε ο εντοπισμός των μοτίβων αλληλουχίας (motif discovery) που συντηρούνται στα 121 μέλη της ομάδας των XanQ/UapA με χρήση του προγράμματος MEME (Πίνακας Π3.2). Στα μοτίβα αλληλουχίας που ανέδειξε η ανάλυση MEME επιλέχθηκαν ως στόχοι συστηματικής μεταλλαξιγένεσης θέσεις αμινοξέων που ανήκουν σε περιοχές με τουλάχιστον πέντε συνεχόμενα κατάλοιπα όπου περιέχεται ένα τουλάχιστον αμινοξύ υψηλά ή/και απόλυτα συντηρημένο («παράθυρα» στα μοτίβα αλληλουχίας). Στον Πίνακα Π3.2 δίνονται τα «παράθυρα» των μοτίβων αλληλουχίας που εντοπίστηκαν στα **TM 3, 8, 9, 10, 11, 14** και δεν αναλύονται στην ενότητα 3.1.3 αφού είχαν ήδη μελετηθεί σε άλλες ερευνητικές εργασίες (Εικόνα Π.3.2) καθώς και τα «παράθυρα» των μοτίβων αλληλουχίας των TM 1, 2, 4, 5, 6, 7, 12, 13 που μελετώνται στην παρούσα διατριβή (βλ. ενότητα 3.1.3, Εικόνες 3.1.32/34/38/40/43/44/46).

Πίνακας Π3.2: Τα μοτίβα αλληλουχίας της περμεάσης XanQ μετά την ανάλυση των 121 αντιπροσωπευτικών μελών της ομάδας XanQ/UapA.

Καταγράφονται τα δεδομένα της ανάλυσης των 121 αντιπροσωπευτικών μελών της ομάδας των μεταφορέων ξανθίνης και ξανθίνης/ουρικού (XanQ/UapA) με χρήση του προγράμματος MEME. Στην πρώτη στήλη του πίνακα εμφανίζονται τα TM όπου ανήκουν τα συντηρημένα μοτίβα με την σειρά προτεραιότητας (από μεγαλύτερη σε μικρότερη εξελικτική συντήρηση) όπως προέκυψαν από το πρόγραμμα. Στην δεύτερη στήλη αναγράφονται αριθμημένα τα αντίστοιχα «παράθυρα» αλληλουχίας των μοτίβων (όπως είναι στην αλληλουχία της XanQ) που εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (βλ. 3.1.3) και στην τρίτη στήλη οι στατιστικές πιθανότητες λάθους (τιμές e -value), το μήκος του μοτίβου σε αριθμό αμινοξέων (width) και ο αριθμός θέσεων (ομολόγων των XanQ/UapA) που στοιχήθηκαν (sites).

Διαμεμβρανικό τμήμα (TM)	«Παράθυρο» μοτίβου αλληλουχίας	e -value/ μήκος/ θέσεις
TM10	323AQNNGVIQMTG ³³³	8.0e ⁻¹⁹⁰⁶ / 21/ 115
TM8	272EAVGD ²⁷⁶ & 278TATA ²⁸¹	2.3e ⁻¹⁴²⁰ / 21/ 112
TM12	368LGGAMTLMFS ³⁷⁷ & Gly-383	4.8e ⁻¹³⁵⁹ / 21/ 114
TM2	Ser-62 & 68SGIGTWLQ ⁷⁵	5.7e ⁻¹²⁸⁵ / 21/ 115
TM5	150VSGIVVLMIG ¹⁵⁹	1.3e ⁻¹²⁶¹ / 21/ 114
TM1	30THLLA ³⁴	4.4e ⁻¹²⁷³ / 21/ 114
TM3	83GSGLL ⁸⁷ & 93NFS ⁹⁵	1.7e ⁻¹¹⁶⁹ / 21/ 114
TM9	296RLKGGLADG ³⁰⁵	9.7e ⁻¹²⁶⁴ / 21/ 115
TM7	217GLSVG ²²¹	2.6e ⁻⁶⁸⁵ / 15/ 115
TM13	401ATSLGLGLG ⁴⁰⁹	2.3e ⁻¹²⁰¹ / 24/ 114
TM6	183GNYEHLGVG ¹⁹¹	8.8e ⁻⁹⁷⁶ / 21/ 114
TM14	430NPI ⁴³²	1.3e ⁻⁸⁰⁹ / 21/ 112
TM4	Gly-123 & 128GAFLV ¹³² & Ser-136	3.8e ⁻⁸⁹⁶ / 24/ 115
TM11	351GLFP ³⁵⁴	3.9e ⁻⁸⁴⁶ / 21/ 114





Εικόνα Π3.2: Συντήρηση καταλοίπων στα χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας των TM 3, 8, 9, 10, 11, 14 της περμεάσης XanQ.

Συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας στα TM 3, 8, 9, 10, 11, 14 της XanQ όπως προέκυψαν από ανάλυση των 121 αντιπροσωπευτικών ομολόγων των μεταφορέων Ξανθίνης και Ξανθίνης/ουρικού της NCS2/COG2233 με το πρόγραμμα MEME. Με διακεκομμένο πλαίσιο σημειώνεται το «παράθυρο» αλληλουχίας που αναλύθηκε με μεταλλαξιγένεση στο κάθε μοτίβο, ενώ στο κάτω μέρος υπογραμμίζονται τα κατάλοιπα σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που χρησιμοποιείται και στην ενότητα αποτελεσμάτων 3.1.3 (κόκκινο: απόλυτα συντηρημένα, πράσινο: διατηρούν πολικό χαρακτήρα, μπλε: συντηρούν μικρό μέγεθος, ροζ: διατηρούν υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα και γκρι: δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες). Κάτω από την χρωματική υπογράμμιση αναφέρεται η αρίθμηση και η αλληλουχία του αντίστοιχου «παράθυρου» αλληλουχίας του κάθε μοτίβου στην περμεάση XanQ. Δεξιά σημειώνονται οι στατιστικές πιθανότητες λάθους (τιμές e-value), το μήκος του μοτίβου σε αριθμό αμινοξέων (width) και ο αριθμός θέσεων (ομολόγων των XanQ/UapA) που στοιχήθηκαν (sites).

Π3.3 Στοιχίση αλληλουχιών μελών της NCS2 με ομολογία (ταυτότητα) άνω του 32% (ή του 42%) σε σχέση με την περμεάση XanQ και καταγραφή της εξελικτικής συντήρησης των καταλοίπων

Τα δεδομένα από τις αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με μία λεπτομερή συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των πιο συγγενικών ομολόγων της XanQ στην οικογένεια NCS2/COG2233 για να εξαχθεί ένα «μοντέλο εργασίας» για την διευθέτηση των διαμεμβρανικών τμημάτων α -ελίκων στην τριτοταγή δομή της XanQ (βλ. 3.1.4). Οι αναλύσεις αυτές ξεκίνησαν το 2009, πριν από τη δημοσίευση της κρυσταλλικής δομής του ομολόγου UraA και στηρίχτηκαν σε φυλογενετική ανάλυση της ομάδας με τα συγγενέστερα ομόλογα NCS2 που εμφανίζουν ταυτότητα καταλοίπων >42% (BLAST-p search, 4-3-2009) ή >32% με την XanQ (BLAST-p search, 13-11-2009). Οι κωδικοί όλων των ομολόγων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στους Πίνακες Π3.2 (ομόλογα με ταυτότητα >42%) και Π3.3 (ομόλογα με ταυτότητα >32%). Συγκεκριμένα, αρχικά έγινε ο εντοπισμός μελών της οικογένειας NCS2 (6000 αλληλουχίες) μέσω αναζήτησης ομολόγων της περμεάσης XanQ (Query Sequence) με το πρόγραμμα BLAST-p (Altschul *et al.*, 2005). Στη συνέχεια, λεπτομερής φυλογενετική ανάλυση (πρβλ. Π3.1) και αφαίρεση ταυτόσημων αλληλουχιών από διαφορετικά στελέχη ίδιων οργανισμών μετά από στοίχιση των ακολουθιών ανά ζεύγη (ClustalW) οδήγησε σε καταγραφή του αριθμού μελών με υψηλή ταυτότητα καταλοίπων σε σχέση με την XanQ. Ο αριθμός των ομολόγων που εξήχθησαν τελικά ήταν εξήντα επτά (67) με ταυτότητα >42% (Πίνακας Π3.2) και εκατόν ογδόντα εννέα (189) με ταυτότητα >32% (Πίνακας Π3.3).

Μετά από αναλύσεις στοίχισης των παραπάνω ομολόγων (ClustalW) και επισημείωση της κάθε θέσης αμινοξέος ανάλογα με το βαθμό και το πρότυπο συντήρησης της πλευρικής ομάδας (και, όπου υπήρχε πληροφορία, την λειτουργική συνεισφορά της στην περμεάση XanQ) **σχεδιάστηκαν προβολές α -έλικας για κάθε πιθανό TM της XanQ** (Εικόνα Π3.2). Όπως εξηγείται στην ενότητα 3.1.4, οι περιοχές α -έλικας ορισμένων TM (TM3, TM10, TM13-14) αναθεωρήθηκαν μετά την παρουσίαση της κρυσταλλικής δομής του ομολόγου UraA (Lu *et al.*, 2011) και παρουσιάζονται στην τελική, αναθεωρημένη τους μορφή (Εικόνα Π3.2). Η ανάλυση της πιθανής δομικής οργάνωσης των α -ελίκων της XanQ στηρίχθηκε στην αξιολόγηση της κάθε θέσης αμινοξέος ανάλογα με τον βαθμό συντήρησης και τον χαρακτήρα της πλευρικής ομάδας (από τα συγκριτικά φυλογενετικά δεδομένα) και τον λειτουργικό ρόλο κάθε αμινοξέος στην περμεάση XanQ (από τα δεδομένα της μεταλλαξιγένεσης, βλ. 3.1) και, στη συνέχεια, στην τοποθέτηση των α -ελίκων με τέτοιο τρόπο ώστε όψεις της κάθε έλικας που περιέχουν πολικά, πολύ συντηρημένα και/ή σημαντικά για τη λειτουργία αμινοξέα να «βλέπουν» προς άλλες α -έλικες ενώ όψεις που περιέχουν υδρόφοβα, μη σημαντικά και/ή μη συντηρημένα αμινοξέα να «βλέπουν» μακριά από άλλες α -έλικες (προς το λιπιδιακό μικροπεριβάλλον), όπως αναλύεται στην ενότητα 3.1.4 (βλ. Εικόνες 3.1.49 και 3.1.50).

ΠίνακαςΠ3.2: Κατάλογος 67 ομολόγων που εμφανίζουν ομολογία (ταυτότητα καταλοίπων) >42% με την περμεάση XanQ

Αναζήτηση ομολόγων της XanQ (EcoGENE: EG13065) έγινε με το πρόγραμμα BLAST-p (BLAST search, 4-3-2009, βλ. Karena and Frillingos, 2009, Fig. S2). Στον Πίνακα αναφέρονται για το κάθε ομόλογο ο κωδικός πρόσβασης (gene ID), ο οργανισμός όπου ανήκει (species), το μήκος της αλληλουχίας του και σε παρένθεση το μήκος αλληλουχίας της XanQ που χρησιμοποιήθηκε στη σύγκριση [length (residues)] και τα ποσοστά ταυτότητας (identity) και ομοιότητας (similarity) με την XanQ.

Species	gene ID	length (residues)	identity (%)	similarity (%)
<i>Escherichia coli</i> E110019	gb EDV86589.1	466 / 466	99	100
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4489991 AHA_2174	505 / 453	79	89
<i>Neisseria meningitidis</i>	5796016 NMCC_0873	463 / 446	68	85
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6448612 NGK_0853	354 / 341	65	83
<i>Shewanella halifaxensis</i>	5906894 Sha1_1373	482 / 449	45	70
<i>Bacteroides caccae</i>	gb EDM19330.1	438 / 440	49	68
<i>Bacteroides ovatus</i>	gb EDO09419.1	437 / 440	49	68
<i>Bacteroides finegoldii</i>	gb EEB30391.1	440 / 442	48	66
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1073275 BT_4473	436 / 440	48	68
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3475991 pbuX	479 / 439	47	67
<i>Bacteroides fragilis</i>	3084661 BF3579	441 / 450	46	66
<i>Vibrio vulnificus</i>	2623005 VV0238	467 / 446	46	67
<i>Parabacteroides merdae</i>	gb EDN84543.1	456 / 440	47	66
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	gb EEC95775.1	456 / 440	48	65
<i>Vibrio campbellii</i>	gb EDP58876.1	463 / 454	44	66
<i>Vibrio sp.</i>	6656531 VEx25_0100	462 / 453	44	66
<i>Vibrio cholerae</i>	6825406 A33_2644	478 / 466	43	65
<i>Vibrio alginolyticus</i>	gb EAS76508.1	462 / 453	44	66
<i>Providencia rettgeri</i>	gb EEF71211.1	490 / 444	46	66
<i>Synechococcus sp.</i>	gb EDX86344.1	470 / 443	47	67
<i>Proteus mirabilis</i>	6802211 PMI2868	463 / 443	46	65
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3714116 Pfl01_2573	488 / 450	46	67
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	emb CAR67200.1	461 / 445	45	66
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	6300561 yicE	462 / 440	46	66
<i>Bordetella avium</i>	6267260 BAV0446	467 / 445	46	65
<i>Pseudomonas mendocina</i>	5110159 Pmen_3698	458 / 464	44	65
<i>Enterobacter sp.</i>	5113241 Ent638_0073	464 / 448	44	66
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	gb EDM59592.1	463 / 452	44	66
<i>Providencia alcalifaciens</i>	gb EEB45223.1	462 / 441	46	66
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4715290 YE0041	461 / 440	46	66
<i>Parabacteroides distasonis</i>	5306656 BDI_1503	441 / 440	49	66
<i>Photobacterium sp.</i>	gb EAR53794.1	467 / 447	44	66
<i>Pseudomonas mendocina</i>	5107558 Pmen_2762	500 / 439	46	66
<i>Yersinia pestis</i>	4119596 YPA_3508	472 / 440	46	66
<i>Vibrio harveyi</i>	5554738 VIBHAR_00623	463 / 437	44	66
<i>Pseudomonas syringae</i>	3366154 Psyr_0676	465 / 458	44	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4383566 PA14_02070	468 / 447	45	65
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	6089204 YPK_4182	472 / 440	46	66
<i>Vibrio fischeri</i>	6806769 VFMJ11_0114	463 / 446	44	65
<i>Yersinia bercovieri</i>	ref ZP_00820293.1	461 / 440	46	66

<i>Yersinia intermedia</i>	ref ZP_00832209.1	461 / 440	46	66
<i>Yersinia mollaretii</i>	ref ZP_00825839.1	461 / 440	46	66
<i>Providencia stuartii</i>	gb EDU61732.1	460 / 443	45	66
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	2885523 ECA0035	462 / 440	46	66
<i>Providencia rustigianii</i>	gb EEB39568.1	462 / 444	44	65
<i>Yersinia frederiksenii</i>	ref ZP_00827982.1	461 / 440	46	66
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	gb EEA13123.1	463 / 444	44	65
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	gb ABR79398.1	463 / 444	45	65
<i>Salmonella enterica</i>	5760685 SARI_03893	466 / 444	45	65
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	6710564 BCPG_03505	462 / 446	44	65
<i>Salmonella enterica</i>	ref NP_458181.1	463 / 441	44	65
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2552380 PG2148	445 / 441	47	65
<i>Burkholderia thailandensis</i>	3849193 BTH_I1007	462 / 446	44	66
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	4172375 Patl_2223	486 / 459	42	64
<i>Burkholderia sp.</i>	3753853 Bcep18194_B2088	462 / 446	44	65
<i>Marinomonas sp.</i>	gb EAQ67136.1	482 / 460	44	64
<i>Aurantimonas sp.</i>	gb EAS48987.1	464 / 441	45	66
<i>Bacteroides stercoris</i>	gb EDS15751.1	439 / 442	46	66
<i>Photorhabdus luminescens</i>	2800196 plu0247	461 / 444	44	67
<i>Campylobacter lari</i>	7411098 Cla_0538	453 / 446	42	65
<i>Enterobacter sakazakii</i>	5551335 ESA_04066	468 / 448	44	65
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	4034304 Pcryo_1913	468 / 453	43	66
<i>Citrobacter koseri</i>	5585106 CKO_05111	468 / 441	44	65
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4996271 ASA_1259	465 / 443	45	66
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	6766360 yicE	462 / 446	43	66
<i>Pseudomonas syringae</i>	gb EEB59600.1	465 / 449	45	64

Πίνακας Π3.3: Κατάλογος 189 ομολόγων που εμφανίζουν ομολογία (ταυτότητα καταλοίπων) >32% με την περμεάση XanQ

Αναζήτηση ομολόγων της XanQ (EcoGENE: EG13065) έγινε με το πρόγραμμα BLAST-p (BLAST search, 13-11-2009, βλ. Georgoroulou *et al.*, 2010, Table S2). Στον Πίνακα αναφέρονται για το κάθε ομόλογο ο κωδικός πρόσβασης (gene ID), ο οργανισμός όπου ανήκει (species), το μήκος της αλληλουχίας του και σε παρένθεση το μήκος αλληλουχίας της XanQ που χρησιμοποιήθηκε στη σύγκριση [length (residues)], τα ποσοστά ταυτότητας (identity) και ομοιότητας (similarity) με την XanQ καθώς και τα κενά στην στοίχιση των αλληλουχιών (gaps).

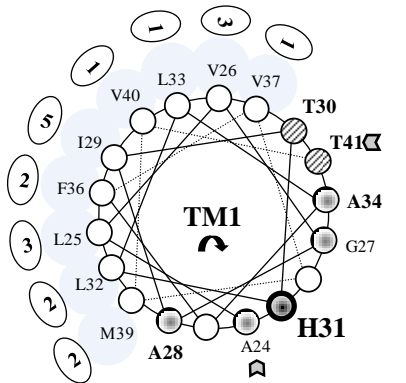
Species	gene ID	length (residues)	identity (%)	similarity(%)	gaps(%)
<i>Escherichia coli str. K-12</i>	XANQ_ECOLI	466/466	100	100	0
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	C5BEY4_EDWI9	472/469	82	90	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AERHH A0KK97	505/453	79	89	0
<i>Neisseria flavescens</i>	C5TJD9_NEIFL	463/438	69	86	0
<i>Neisseria meningitidis</i>	C6SF50_NEIME	463/438	69	86	0
<i>Neisseria sicca</i>	C6M9W3_NEISI	463/438	69	87	0
<i>Eikenella corrodens</i>	C0DRV2_EIKCO	458/441	67	83	0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	B4RL43_NEIG2	354/341	65	83	1
<i>Bacteroides caccae</i>	A5ZL53_9BACE	438/440	49	68	2
<i>Bacteroides ovatus</i>	A7M586_BACOV	437/440	49	68	2
<i>Parabacteroides distasonis</i>	A6LC44_PARD8	441/440	49	65	2
<i>Bacteroides sp.</i>	C6IL21_9BACE	436/440	48	68	2
<i>Bacteroides thetaiot.</i>	Q89ZA4_BACTN	436/440	48	68	2
<i>Parabacteroides johnsi</i>	B7BCR2_9PORP	456/440	48	65	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	C3KAR9_PSEFS	475/439	48	68	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	Q64QA9_BACFR	441/442	47	66	3
<i>Bacteroides plebeius</i>	B5CUV5_9BACE	444/436	47	65	2
<i>Parabacteroides merdae</i>	A7AKM1_9PORP	456/440	47	66	2
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Q7MT43_PORGI	445/441	47	65	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Q3KD41_PSEPF	488/439	47	68	0
<i>Synechococcus sp.</i>	B4WIL3_9SYNE	470/463	47	67	0
<i>Azotobacter vinelandii</i>	C1DM49_AZOVD	434/413	46	65	0
<i>Bacteroides dorei</i>	B6W3N9_9BACE	443/445	46	65	2
<i>Bacteroides sp.</i>	C3R636_9BACE	443/445	46	65	2
<i>Bacteroides stercoris</i>	B0NNN1_BACSE	439/439	46	66	2
<i>Bacteroides vulgatus</i>	A6L3C4_BACV8	443/445	46	65	2
<i>Bordetella avium</i>	Q2KYY5_BORA1	467/438	46	66	0
<i>Dickeya dadantii</i>	C8QTQ0_DICDA	462/445	46	66	0
<i>Dickeya zeae</i>	C6CQ69_DICZE	462/442	46	66	0
<i>Erwinia carotovora</i>	Q6DB65_ERWCT	462/440	46	66	0
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	B2VFB1_ERWT9	462/445	46	66	0
<i>Moritella sp.</i>	A6FAB8_9GAMM	423/408	46	66	1
<i>Proteus mirabilis</i>	B4EZA8_PROMH	463/440	46	66	0
<i>Providencia alcalifaciens</i>	B6XH30_9ENTR	462/441	46	66	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B7V283_PSEA8	468/439	46	66	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Q4KIR0_PSEF5	479/439	46	66	0
<i>Pseudomonas mendocina</i>	A4XW01_PSEMY	500/439	46	66	0
<i>Pseudomonas putida</i>	B1JBD2_PSEPW	459/446	46	66	4
<i>Vibrio vulnificus</i>	Q8DDV0_VIBVU	467/439	46	68	0

<i>Yersinia bercovieri</i>	C4S0H2_YERBE	461/440	46	66	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	A1JHV2_YERE8	461/440	46	66	0
<i>Yersinia frederiksenii</i>	C4SRZ9_YERFR	461/440	46	66	0
<i>Yersinia intermedia</i>	C4T5T9_YERIN	461/440	46	66	0
<i>Yersinia kristensenii</i>	C4TZT3_YERKR	461/440	46	66	0
<i>Yersinia mollaretii</i>	C4SDP3_YERMO	472/440	46	66	0
<i>Yersinia pestis</i>	Q0WKQ8_YERPE	461/440	46	66	0
<i>Yersinia pseudot.</i>	Q66GF1_YERPS	461/440	4	66	0
<i>Yersinia ruckeri</i>	C4UL97_YERRU	479/440	46	66	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	A4SKE4_AERS4	465/441	45	66	0
<i>Aurantimonas</i>	gblEAS48987.1	464/441	45	66	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	B4EG80_BURCJ	429/424	45	66	0
<i>Citrobacter koseri</i>	A8ARP1_CITK8	468/440	45	66	0
<i>Dickeya dadantii</i>	C6C697_DICDC	462/442	45	66	0
<i>Enterobacter canc.</i>	B6FFT6_9ENTR	463/440	45	66	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	A7MQC0_ENTS8	468/440	45	65	0
<i>Escherichia albertii</i>	B1EHY8_9ESCH	463/440	45	65	0
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	YICE_ECO57	463/440	45	65	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	B7LVL7_ESCF3	463/440	45	65	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B5XTD2_KLEP3	463/442	45	66	0
<i>Manganese-oxid. bacter.</i>	Q1YFI6_MOBAS	464/441	45	66	0
<i>Pantoea sp.</i>	C8QC53_9ENTR	459/442	45	66	0
<i>Pectobacterium carot.</i>	C6DJC9_PECCP	462/440	45	66	0
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	C6NCY9_9ENTR	462/440	45	66	0
<i>Photorhabdus asymb.</i>	C7BGV4_9ENTR	461/440	45	67	0
<i>Prevotella melaninog.</i>	C5VGX0_9BACT	447/438	45	65	0
<i>Providencia stuartii</i>	B2PUP3_PROST	460/443	45	66	1
<i>Pseudomonas entom.</i>	Q1IBC2_PSEE4	459/439	45	66	0
<i>Pseudomonas mend.</i>	A4XYN0_PSEMY	458/439	45	66	0
<i>Pseudomonas putida</i>	B0KLW0_PSEPG	459/444	45	66	0
<i>Pseudomonas syringae</i>	Q48D16_PSE14	465/458	45	65	0
<i>Salmonella arizonae</i>	A9MKL8_SALAR	466/440	45	66	0
<i>Serratia proteamaculans</i>	A8GLH5_SERP5	466/440	45	66	0
<i>Shewanella halifaxensis</i>	B0TLJ0_SHEHH	482/449	45	70	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	B3WW71_SHIDY	463/440	45	65	0
<i>Vibrio campbellii</i>	A8T6H7_9VIBR	463/443	45	67	0
<i>Vibrio cholerae</i>	A2PTP7_VIBCH	468/446	45	67	0
<i>Yersinia aldovae</i>	C4UBZ6_YERAL	461/440	45	65	0
<i>Yersinia rohdei</i>	C4UTL8_YERRO	461/440	45	66	0
<i>Acinetobacter radior.</i>	C6RL26_ACIRA	456/452	44	66	1
<i>Acinetobacter sp.</i>	Q6FE95_ACIAD	457/438	44	66	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	A0KHR3_AERHH	465/441	44	65	0
<i>Burkholderia ambifaria</i>	Q0BA61_BURCM	462/438	44	65	0
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Q1BMA6_BURCA	462/446	44	65	0
<i>Burkholderia multivorans</i>	A9ALZ0_BURM1	462/446	44	65	0
<i>Burkholderia sp.</i>	Q394B7_BURS3	462/446	44	65	0
<i>Burkholderia thailand.</i>	Q2SZT8_BURTA	462/445	44	66	0
<i>Citrobacter sp.</i>	C1MDV6_9ENTR	463/440	44	65	0
<i>Citrobacter youngae</i>	C2AXS6_9ENTR	468/440	44	65	0
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	C5B9A8_EDWI9	481/441	44	65	0

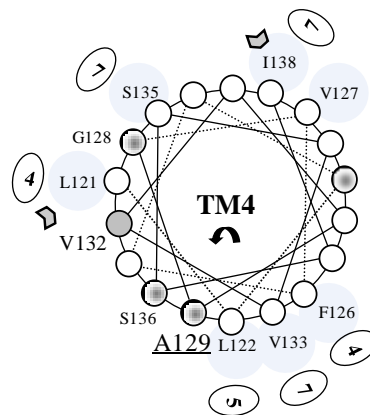
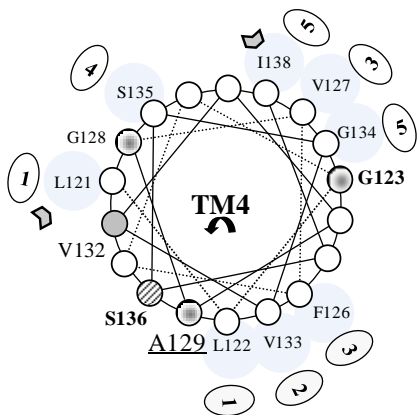
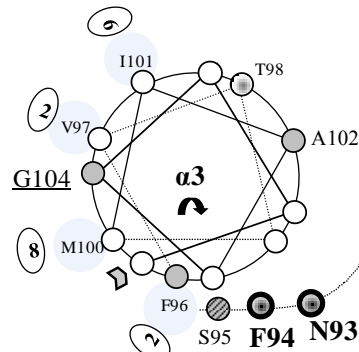
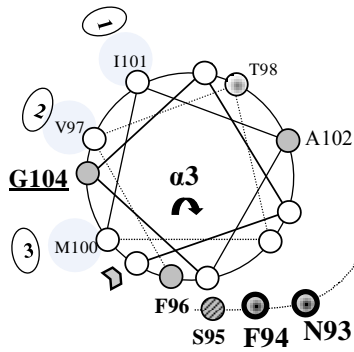
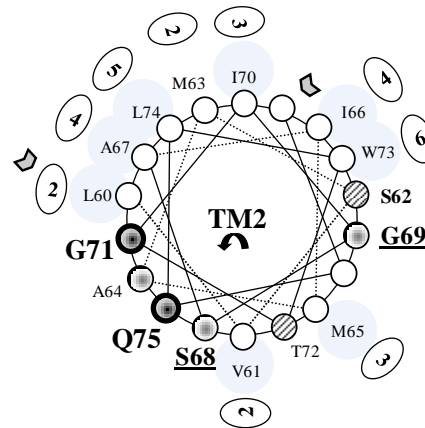
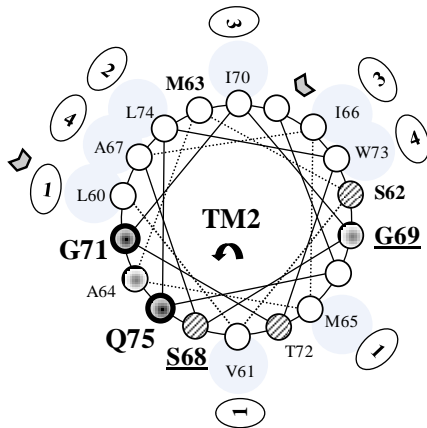
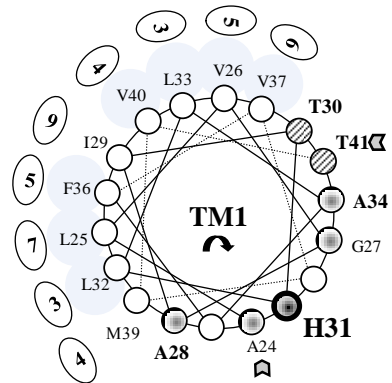
<i>Enterobacter sp.</i>	A4W4Y3_ENT38	464/448	44	66	0
<i>Escher. coli SMS-3-5</i>	B1LK91_ECOSM	463/440	44	65	0
<i>Marinomonas sp.</i>	A3Y6S5_9GAMM	482/460	44	64	1
<i>Photobacterium profun.</i>	Q1Z2L2_PHOPR	459/439	44	65	0
<i>Photobacterium sp.</i>	Q2BYF9_9GAMM	467/447	44	66	0
<i>Photorhabdus luminesc.</i>	Q7N9R7_PHOLL	461/442	4	67	0
<i>Pseudomonas syringae</i>	Q4ZYM6_PSEU2	465/457	44	64	0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Q57I85_SALCH	463/440	44	66	0
<i>Salmonella enterica</i>	B5NDY7_SALET	463/440	44	66	0
<i>Salmonella typhi</i>	Q8XF42_SALTI	463/440	44	66	0
<i>Shigella boydii</i>	B2TTY4_SHIB3	463/440	44	65	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Q1VAN3_VIBAL	462/453	44	66	0
<i>Vibrio cholerae</i>	C2C5Q8_VIBCH	478/456	44	66	0
<i>Vibrio fischeri</i>	Q5E8N5_VIBF1	463/439	44	66	0
<i>Vibrio harveyi</i>	A6AR91_VIBHA	463/448	44	67	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Q87TB4_VIBPA	470/452	44	66	0
<i>Vibrio sp.</i>	A7K0Y9_9VIBR	462/453	44	66	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	B7I870_ACIB5	452/438	43	66	0
<i>Burkholderia glumae</i>	C5AKR9_BURGB	56/438	43	65	0
<i>Burkholderia mallei</i>	Q62II2_BURMA	462/446	43	66	0
<i>Burkholderia pseudomali</i>	Q63VV9_BURPS	462/446	43	66	0
<i>Campylobacter lari</i>	B9KFN7_CAMLR	453/439	43	66	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B6D1N5_KLEPN	459/448	43	64	2
<i>Photobacterium profund.</i>	Q6LVQ0_PHOPR	459/439	4	65	0
<i>Pseudoalteromonas atl.</i>	Q15TP7_PSEA6	486/450	43	65	1
<i>Psychrobacter cryohalol.</i>	Q1Q9G3_PSYCK	468/453	43	66	0
<i>Chromohalobacter salex.</i>	Q1QWM1_CHRSD	484/460	42	62	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	B5B0J7_KLEOX	460/447	42	62	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C8T9U9_KLEPR	465/452	42	63	2
<i>Pantoea sp.</i>	C8Q9J9_9ENTR	458/454	42	63	1
<i>Vibrio shilonii</i>	A6D2E9_9VIBR	460/438	42	65	0
<i>Alteromonas macleodii</i>	B4RSN4_ALTMD	517/445	41	64	0
<i>Sagittula stellata</i>	A3JYA4_9RHOB	470/464	40	62	0
<i>Petrogona mobilis</i>	A9BIT1_PETMO	452/447	39	63	2
<i>Actinobacillus succinog.</i>	A6VQK4_ACTSZ	435/437	37	57	3
<i>Ralstonia eutropha</i>	Q0K146_RALEH	443/439	37	57	3
<i>Teredinibacter turnerae</i>	C5BIN9_TERTT	470/434	37	58	0
<i>Comamonas testosteroni</i>	B7WUD5_COMTE	450/439	36	56	3
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	B3RAE8_CUPTR	443/439	36	57	3
<i>Haloarcula marismortui</i>	Q5V695_HALMA	468/442	36	58	3
<i>Mannheimia haemolyt.</i>	A7JUF6_PASHA	439/437	36	56	3
<i>Natrialba magadii</i>	B9ZGA8_NATMA	470/450	36	55	1
<i>Shewanella benthica</i>	A9D3H0_9GAMM	465/436	36	59	3
<i>uncultured haloarchaeon</i>	A5YS00_9EURY	491/444	36	59	3
<i>Acidaminococcus sp.</i>	C0WAN0_9FIRM	439/447	35	53	3
<i>Actinobacillus minor</i>	C8KZ21_9PAST	430/437	35	57	3
<i>Actinobacillus pleuropn.</i>	A3N185_ACTP2	430/438	35	57	3
<i>Clostridium botulinum</i>	C6DXR0_CLOBO	447/445	35	54	4
<i>Clostridium butyricum</i>	C4IFT3_CLOBU	440/437	35	58	3
<i>Colwellia psychrerythr.</i>	Q481N1_COLP3	449/440	35	57	3

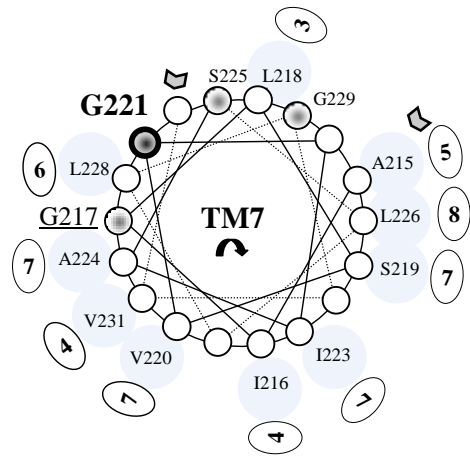
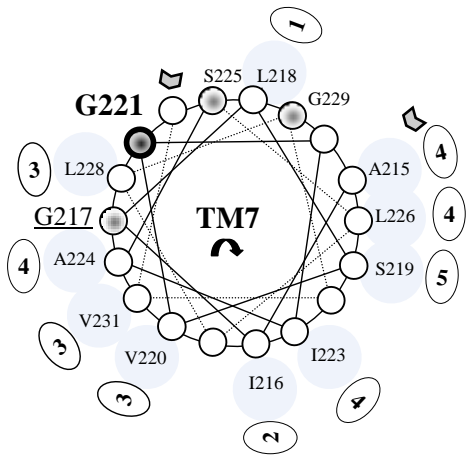
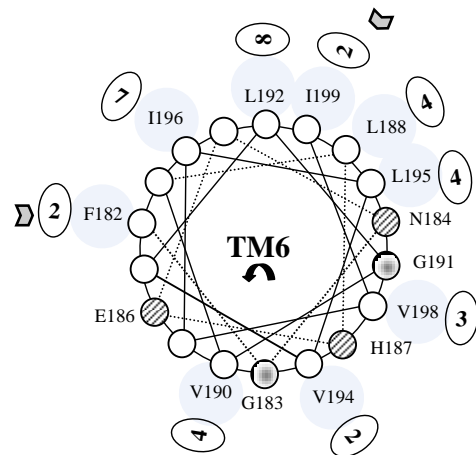
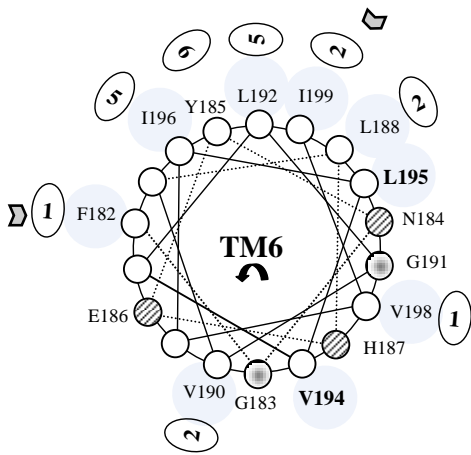
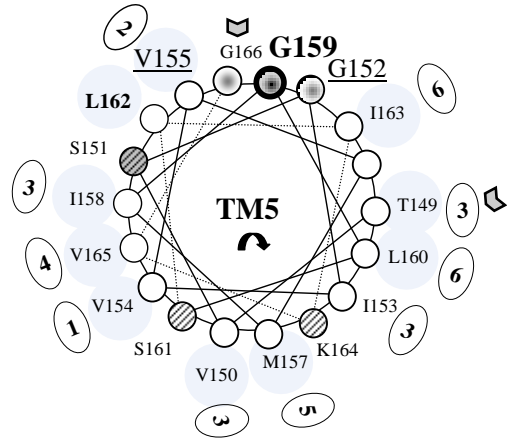
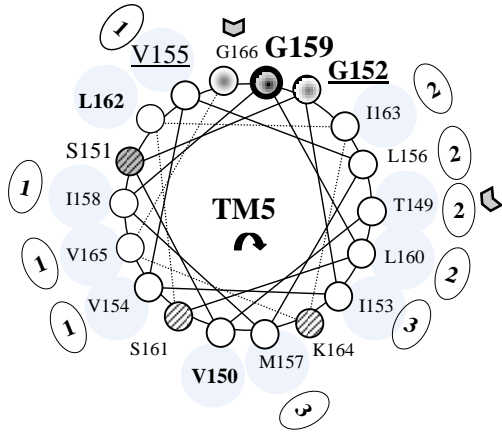
<i>Delftia acidovorans</i>	A9BY97_DELAS	438/439	35	56	3
<i>Fusobacterium varium</i>	C6JK26_FUSVA	450/448	35	58	2
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Q7VKR1_HAEDU	430/438	35	57	3
<i>Laribacter hongkongensis</i>	C1D7Z5_LARHH	435/438	35	56	3
<i>Mannheimia succinici.</i>	Q65V28_MANSM	435/446	35	56	3
<i>Marinobacter algicola</i>	A6EZ23_9ALTE	468/431	35	54	4
<i>Ralstonia metallidurans</i>	Q1LGX9_RALME	445/438	35	56	3
<i>Sebaldella termitidis</i>	C4BV69_9FUSO	450/445	35	54	3
<i>Thermanaerovibrio acid.</i>	C4ESW5_9BACT	451/439	35	56	3
<i>Verrucomicrobiae bacter.</i>	B5JCP5_9BACT	425/427	35	57	3
<i>Clostridium acetobut.</i>	Q97KP5_CLOAB	435/437	34	57	3
<i>Photobacterium profund.</i>	Q6LQU1_PHOPR	493/436	34	56	3
<i>Shewanella halifaxensis</i>	B0TSQ8_SHEHH	468/436	34	58	3
<i>Vibrio shilonii</i>	A6CVS4_9VIBR	467/454	34	57	4
<i>Alkaliphilus metallired.</i>	A6TKW3_ALKMQ	451/445	33	53	4
<i>Anaerococcus prevotii</i>	C7RE35_ANAPD	449/454	33	53	5
<i>Bacillus coagulans</i>	C1PF47_BACCO	437/435	33	54	4
<i>Bacillus licheniformis</i>	Q65I87_BACLD	438/420	33	52	4
<i>Bacillus subtilis</i>	PBUX_BACSU	438/430	33	52	4
<i>Bacteroides pectinophil.</i>	B7AS73_9BACE	457/447	33	54	3
<i>Clostridium botulinum</i>	B2V3D4_CLOBA	454/441	33	56	4
<i>Clostridium sp.</i>	C1I4U8_9CLOT	454/439	33	55	3
<i>Desulfotalea psychroph.</i>	Q6AND3_DESPS	457/431	33	54	3
<i>Eubacterium bifforme</i>	B7CE72_9FIRM	435/438	33	55	3
<i>Eubacterium ventriosum</i>	A5Z9F2_9FIRM	453/447	33	54	4
<i>Exiguobacterium sibiric.</i>	B1YHS2_EXIS2	435/417	33	52	4
<i>Exiguobacterium sp.</i>	C4L0T8_EXISA	434/437	33	52	5
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	C5ULK6_FIBSU	434/440	33	53	3
<i>Geobacillus sp.</i>	B3K4T7_9BACI	453/451	33	50	4
<i>Geobacillus thermodenit.</i>	A4IN64_GEOTN	435/435	33	54	5
<i>Jannaschia sp.</i>	Q28P39_JANSC	478/444	33	51	6
<i>Labrenzia aggregata</i>	A0NUV6_9RHOB	478/440	33	53	4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	C8UT52_LACRH	442/417	33	51	4
<i>Marinomonas sp.</i>	A3Y821_9GAMM	442/439	33	56	3
<i>Octadecabacter antarct.</i>	B5J964_9RHOB	473/443	33	52	3
<i>Oenococcus oeni</i>	A0NJH6_OENOE	472/428	33	53	4
<i>Parvularcula bermuden.</i>	A3VU88_9PROT	442/438	33	54	5
<i>Rhodobacteraceae bact.</i>	B9NQ91_9RHOB	475/446	33	52	4
<i>Rhodobacterales bact.</i>	B6B3B5_9RHOB	442/434	33	52	4
<i>Roseobacter sp.</i>	A4ENL1_9RHOB	477/442	33	53	4
<i>Roseobacter sp.</i>	B7RKQ6_9RHOB	474/440	33	53	4
<i>Ruegeria sp.</i>	B7QQ92_9RHOB	475/458	33	52	4
<i>Shuttleworthia satelles</i>	C4GB19_9FIRM	443/451	33	53	3
<i>Silicibacter pomeroyi</i>	Q5LV28_SILPO	470/440	33	54	4
<i>Silicibacter sp.</i>	Q1GLM1_SILST	479/458	33	53	4
<i>Sulfitobacter sp.</i>	A3STN0_9RHOB	480/447	33	53	4
<i>Treponema vincentii</i>	C8PPS8_9SPIO	452/442	33	54	2
<i>Vibrio shilonii</i>	A6CZ45_9VIBR	469/443	33	54	3
<i>Vibrio splendidus</i>	A3UQN7_VIBSP	483/443	33	56	3

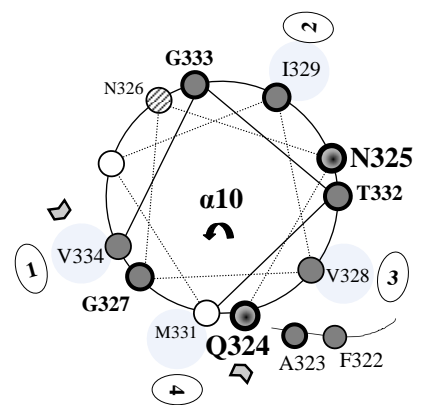
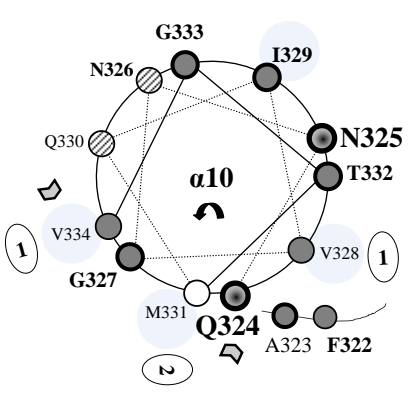
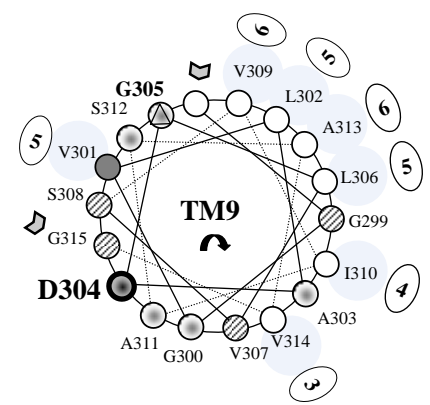
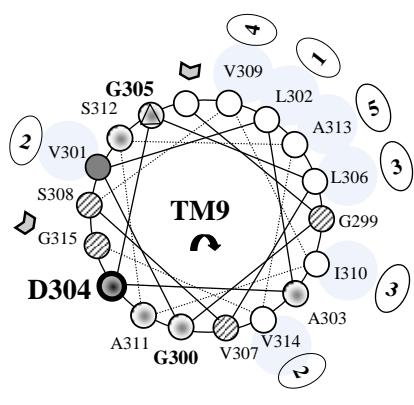
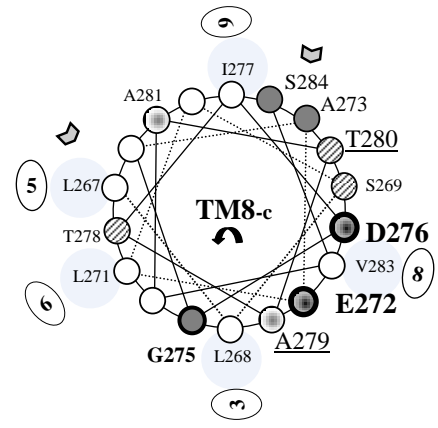
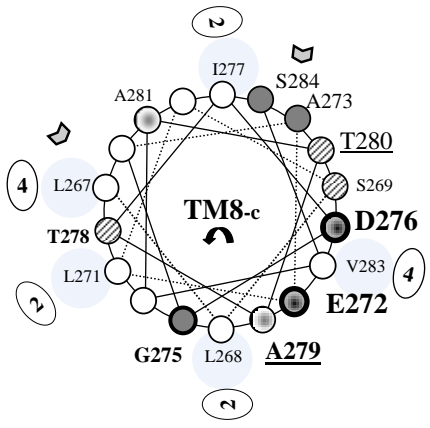
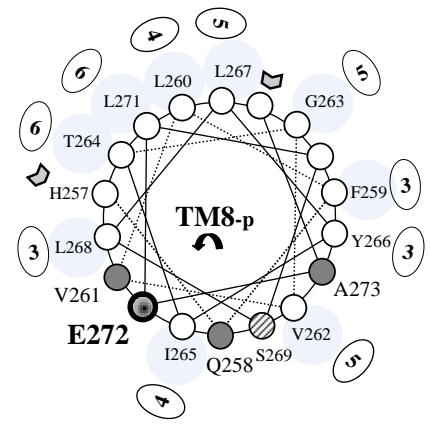
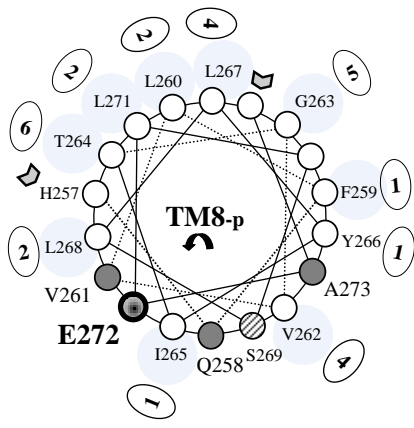
A. ομολογία >42%
(67 μέλη)

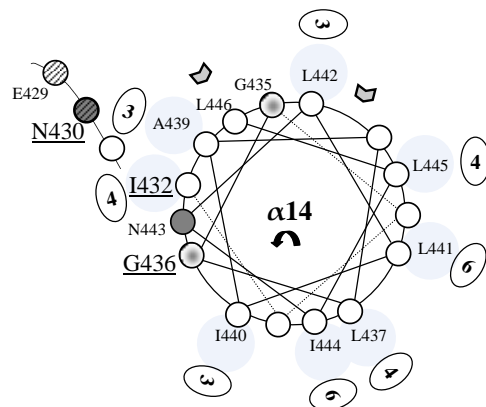
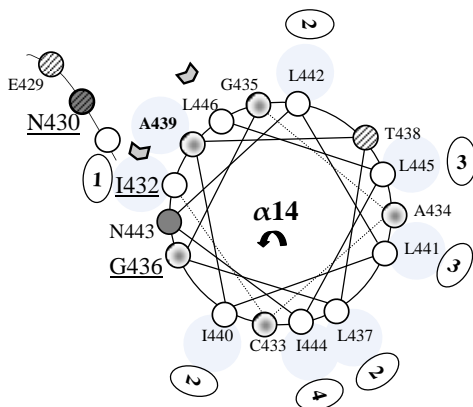
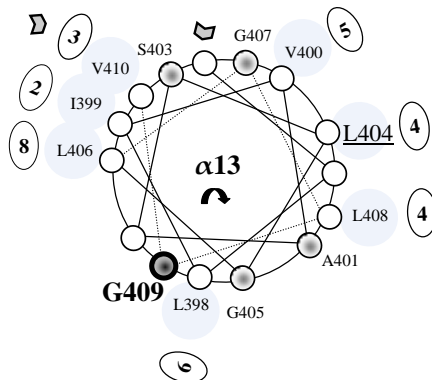
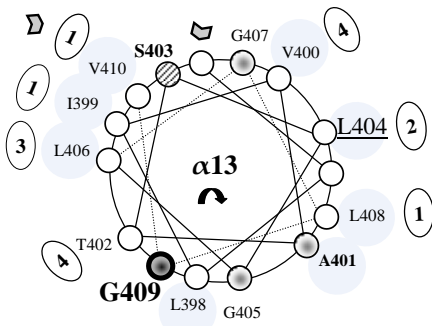
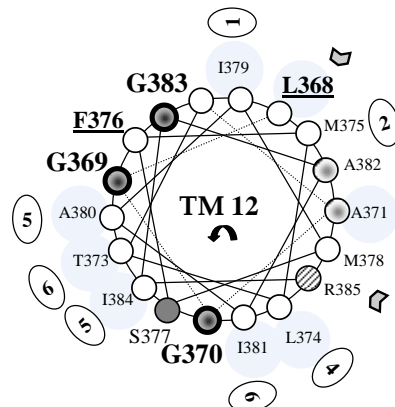
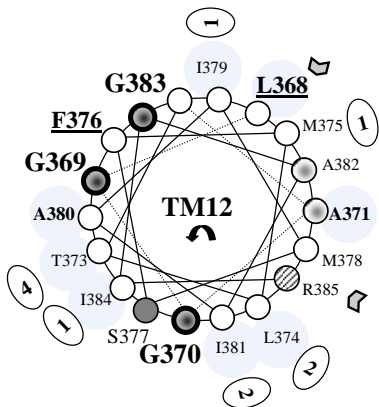
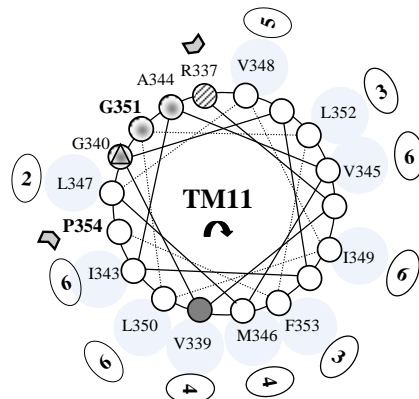
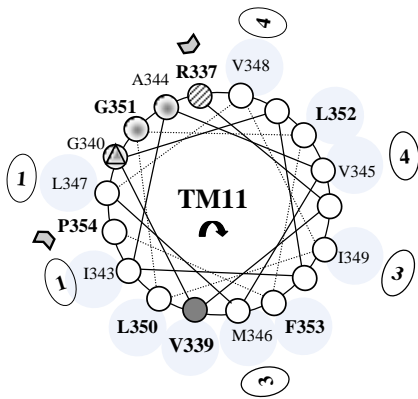


B. ομολογία >32%
(189 μέλη)









Εικόνα Π3.2: Απεικόνιση προβολών α-έλικας των TM1-TM14 της περμεάσης XapQ όπου φαίνεται η συντήρηση και η λειτουργική σπουδαιότητα των καταλοίπων.

Το κεντρικό τμήμα των TM (περίπου 18 κατάλοιπα) απεικονίζεται σε προβολή α-έλικας. Κατάλοιπα που εμφανίζουν απόλυτη ή σχεδόν απόλυτη συντήρηση ανάμεσα στα διαφορετικά μέλη-ομόλογα της XapQ αριθμούνται (σύμφωνα με την XapQ) και τονίζονται με έντονα γράμματα (**bold**). Οι θέσεις όπου συντηρείται ο χαρακτήρας της πλευρικής ομάδας στα ομόλογα της XapQ αριθμούνται (σύμφωνα με την XapQ) και συμβολίζονται με αμυδρό χρωματικά στόχο (μικρό μέγεθος αμινοξέος), διαγράμμιση (πολικό αμινοξύ) ή με απαλό μπλε φόντο (υδροφοβή πλευρική ομάδα). Δίπλα στα υδροφοβα αμινοξέα υπάρχουν ελλειψοειδείς κύκλοι στους οποίους αναγράφεται το πλήθος των διαφορετικών επιπλέον αμινοξέων που εμφανίζονται σε αυτή την θέση στα διαφορετικά ομόλογα. Με έντονο στόχο σημειώνονται κατάλοιπα της XapQ που έχει βρεθεί ότι είναι αναντικατάστατα για τη λειτουργία ή έχουν καθοριστικό ρόλο για τη συγγένεια πρόσδεσης υποστρώματος ή την εξειδίκευση, με βάση τη μεταλλαξιγένεση (βλ. 3.1.3). Με υπογράμμιση σημειώνονται κατάλοιπα της XapQ που έχει φανεί πειραματικά ότι επιδέχονται περιορισμένο εύρος αντικαταστάσεων, με γκρι αυτά που είναι ευαίσθητα στο αντιδραστήριο NEM (έντονη ευαισθησία, $IC_{50} < 50 \mu M$, με έντονο περίγραμμα) και με επιπλέον σχήμα τριγώνου θέσεις σημαντικές για την έκφραση και την σωστή τοποθέτηση της περμεάσης στην μεμβράνη. Το αρχικό και τελικό αμινοξύ της αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε για την προβολή α-έλικας δηλώνονται με βέλη. **A.** Δεδομένα από 67 μέλη με ομολογία (ταυτότητα καταλοίπων) >42% με XapQ **B.** Δεδομένα από 189 μέλη με ομολογία >32% με XapQ.

Παράρτημα 4

Στα πλαίσια της μελέτης αλληλεπιδράσεων των TM8 και TM14 (βλ. 3.2.4.2) με πειράματα σταυρωτής σύνδεσης (Zhou *et al.*, 2008) σε συνδυασμό με χημική πρωτεόλυση με βρωμιούχο κυάνιο (Tao *et al.*, 2009) εφαρμόστηκε το παρακάτω πρωτόκολλο. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός (cross linking reagents – CNBr) βιβλιογραφικά δεν έχει εφαρμοστεί ξανά. Ωστόσο, η μη καθαρή εικόνα της τελικής ανοσοαποτύπωσης, μετά το στάδιο της προσθήκης του βρωμιούχου κυανίου (βλ. παρακάτω), και η αδυναμία κατά συνέπεια της εξαγωγής συμπερασμάτων οδήγησε στην εκτενή μελέτη του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου για μεγάλο χρονικό διάστημα, τροποποιώντας τις συνθήκες (συγκεντρώσεις, διαλύτες) και απομονώνοντας στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Παρακάτω περιγράφεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε με όλες τις τροποποιήσεις του.

Σταυρωτή αλληλοσύνδεση κυστεϊνών με διλειτουργικά αντιδραστήρια σε συνδυασμό με πρωτεόλυση από CNBr

Αρχικά το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε κλάσματα μεμβρανών. Μετά την παρασκευή κλασμάτων μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη της *E. coli* με τη μέθοδο συνδυασμού ωσμωτικού σοκ, επώασης με EDTA και λυσοζύμη και θραύσης με υπερήχους (βλ. 2.8), τα μεμβρανικά δείγματα επαναιωρούνται σε 40 μL Tris HCl (20 mM) pH 7.4 (Tao *et al.*, 2009). Στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA (βλ. 2.9.1) και ρύθμιση των συγκεντρώσεων ώστε σε κάθε δείγμα όγκου 50 μL να περιέχεται πρωτεΐνη συγκέντρωσης 2 - 4 mg/mL (δοκιμάστηκαν και οι δύο συγκεντρώσεις). Έπειτα τα μεμβρανικά δείγματα παρουσία υποστρώματος ξανθίνης τελικής συγκέντρωσης 1 mM επωάζονται με τα διλειτουργικά αντιδραστήρια σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) (Εικόνες 2.1, 2.8) διαλυμένα σε διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO), τελικής συγκέντρωσης 0.2 ή 0.5 mM για δέκα λεπτά στους 25 °C (Zhou *et al.*, 2008). Ακολουθούν προσθήκη απιονισμένου νερού δεκαπλάσιου όγκου σε σχέση με τον όγκο του δείγματος, συλλογή των μεμβρανικών κλασμάτων με υπερφυγοκέντρηση (Optima Ultracentrifuge, 90000 rpm, 15 min, 4 °C), διαδικασία που επαναλαμβάνεται δύο φορές και τελική επαναιώρηση των δειγμάτων σε απιονισμένο νερό όγκου 30 μL . Γίνεται προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA (βλ. 2.9.1) ώστε σε κάθε δείγμα να περιέχονται 100 μg πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 70-88% [επίσης δοκιμάστηκε διαφορετική περιεκτικότητα σε φορμικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό ότι επηρεάζει την πρωτεολυτική απόδοση του CNBr (Kaiser and Metzka, 1998)]. Στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου κυανίου

(CNBr διαλυμένο σε ακετονιτρίλιο-ACN ή σε διάλυμα HCl 0.1N/ ουρία 7M ή HCl 1M) τελικής συγκέντρωσης 100 mg/mL και τα δείγματα επωάζονται σε συνθήκες έλλειψης φωτός για τέσσερις ώρες στους 25 °C. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500 μ L βενζολίου και ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (SpeedVac concentrator). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά και τελικά τα δείγματα αναδιαλύονται σε νερό όγκου 50 μ L. Ακολουθεί η ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blotting) όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.9.2 και 2.9.3.

Το παραπάνω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε και σε μεμβρανικά κυστίδια RSO (βλ. 2.8) κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος KPi (100 mM) pH 7.5 με MgSO₄ (10 mM) (βλ. 2.3) ώστε η τελική συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης να είναι 2 mg/mL (μέθοδος BCA, βλ. 2.9.1). Στα δείγματα προστίθενται, παρουσία υποστρώματος ξανθίνης τελικής συγκέντρωσης 1 mM, διλειτουργικά αντιδραστήρια σταυρωτής αλληλοσύνδεσης (MTS-linker-MTS) (Εικόνες 2.1, 2.8) διαλυμένα σε διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM και επωάζονται για δέκα λεπτά στους 25 °C (Zhou *et al.*, 2008). Ακολουθούν τρεις πλύσεις και συλλογή των κυστιδίων με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 3 min) σε ρυθμιστικό διάλυμα KPi (100 mM) pH 7.5 (βλ. 2.3) δεκαπλάσιου όγκου. Τελικά τα δείγματα επαναιωρούνται σε διάλυμα KPi (100 mM) pH 7.5, 88% φορμικού οξέος, συνολικού όγκου 100 μ L. Ακολουθεί η διαδικασία χημικής πρωτεόλυσης με CNBr και τελικής ανάλυσης των πρωτεϊνών όπως περιγράφεται παραπάνω. Ακολουθεί ο συνοπτικός πίνακας Π4.1 με όλες τις παραλλαγές των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν.

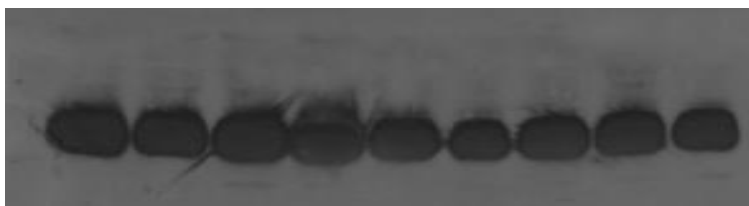
Πίνακας Π4.1: Καταγραφή διαφορετικών πειραματικών συνθηκών του πρωτοκόλλου σταυρωτής αλληλοσύνδεσης κυστεϊνών με διλειτουργικά αντιδραστήρια σε συνδυασμό με πρωτεόλυση από CNBr

1ο στάδιο				2ο στάδιο			
Δείγματα	διαλύτης	ξανθίνη	διλειτουργικά αντιδραστήρια (MTS-linker-MTS)	φορμικό οξύ	*CNBr	διαλύτης CNBr	προσθήκη βενζολίου και speed vac
μεμβρανικά κλάσματα 2 mg/mL	Tris HCl (20 mM) pH 7.4	1 mM	συγκέντρωση 0.05 mM σε DMSO	70%	100 mg/mL	ακετονιτρίλιο	ναί/όχι
			συγκέντρωση 0.2 mM σε DMSO	30%		ακετονιτρίλιο	ναί/όχι
				70%		HCl 1M	ναί/όχι
				88%		HCl 0.1N/ ουσία 7M	ναί/όχι
συγκέντρωση 0.5 mM σε DMSO	70%	ακετονιτρίλιο	ναί/όχι				
μεμβρανικά κλάσματα 4 mg/mL	Tris HCl (20 mM) pH 7.4	1 mM	συγκέντρωση 0.2 mM σε DMSO	70%	100 mg/mL	ακετονιτρίλιο	ναί
μεμβρανικά κυστίδια RSO 2 mg/mL	KPi (100 mM) pH 7.5 MgSO ₄ (10 mM)	1 mM	συγκέντρωση 0.2 mM σε DMSO	70%	100 mg/mL	ακετονιτρίλιο	ναί
μεμβρανικά κυστίδια RSO 4 mg/mL	KPi (100 mM) pH 7.5 MgSO ₄ (10 mM)	1 mM	συγκέντρωση 0.5 mM σε DMSO	88%	100 mg/mL	ακετονιτρίλιο	ναί

*έχει χρησιμοποιηθεί αρχικά και η συγκέντρωση CNBr 50 mg/mL

Το τεχνικό πρόβλημα της μη καθαρής οπτικοποίησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων (ενδεικτικά Εικόνα Π4.2) εντοπίζεται, όπως σχολιάζεται και στα αποτελέσματα (βλ. 3.2.2), σε πιθανή παρεμπόδιση της ομαλής ηλεκτροφορητικής κίνησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων από τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση του CNBr (στάδιο 2 Π4.1). Σε αυτό το συμπέρασμα συντείνει και το αποτέλεσμα πειράματος στο οποίο η πειραματική διαδικασία τερματίζεται στο τέλος του σταδίου 1 (Π 4.1) και τα δείγματα υποβάλλονται αμέσως σε ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση (βλ. 2.13.1). Η Εικόνα Π4.1 αποκαλύπτει ότι παρουσία των διλειτουργικών αντιδραστηρίων MTS-linker-MTS (α) δεν δημιουργούνται πρωτεϊνικά διμερή (διαμοριακές αλληλεπιδράσεις κυστεϊνών) και (β) μέχρι αυτό το στάδιο δεν υπάρχει κάποιο τεχνικό σφάλμα που να οδηγεί σε προβληματική ηλεκτροφορητική κινητικότητα ή τυχαία πρωτεόλυση των δειγμάτων.

		M282V/M331V/M465V/H257C/E429C								
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	DTT (2 mM, 30 min, 25°C)
-	-	5	9	9	11	15	17	22	-	Å (MTS-linker-MTS, 0.2 mM, 10 min, 25°C)

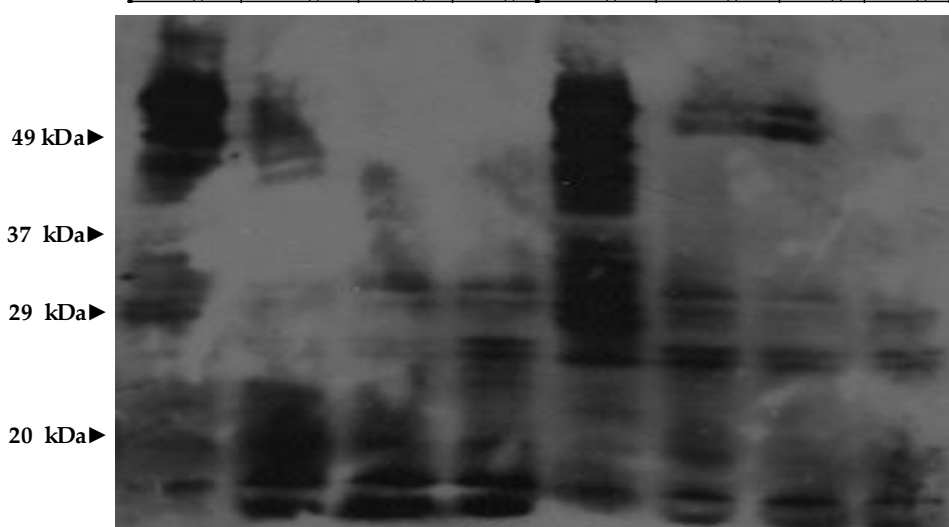


Εικόνα Π4.1: Σταθερότητα της περμεάσης XanQ(M282V/M331V/M465V/H257C/E429C)-His₁₀ κατά την επώαση με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS

Κλάσματα μεμβρανών από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την περμεάση από πλασμίδια pT7-5/Cys-less xanQ-His₁₀ που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (100 µg ολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή) αφού επωαστούν με το αντίστοιχο αντιδραστήριο MTS-linker-MTS (0.2 mM, 10 min, 25°C) και/ή τον αναγωγικό παράγοντα DTT (2 mM, 30 min, 25°C), όπως φαίνεται στην εικόνα, αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της ουράς των ιστιδινών, σε αραιώση 1:5000. Οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών δίνονται στα αριστερά της εικόνας (βλ. πειρ. διαδικασία 2.13.1)

M282V/M331V/M465V/H257C/E429C

	Δείγματα	μεμβρανικά κυστίδια RSO 4 mg/mL				μεμβρανικά κυστίδια RSO 2 mg/mL			
1ο στάδιο	διαλύτης	Kpi (100 mM), pH 7.5, MgSO ₄ (10 mM)				KPi (100 mM), pH 7.5, MgSO ₄ (10 mM)			
	ξανθίνη	H ₂ O		1 mM		H ₂ O		1 mM	
	MTS-linker-MTS	0 Mm σε DMSO	0 Mm σε DMSO	0.5 mM σε DMSO	0.05 mM σε DMSO	0 Mm σε DMSO	0.5 mM σε DMSO	0.05 mM σε DMSO	
2ο στάδιο	προσθήκη βενζολίου και speed vac	ναι				ναι			
	φορμικό οξύ	70%				70%			
	CNBr	0 mg/mL σε ACN	100 mg/mL σε ACN			0 mg/mL σε ACN	100 mg/mL σε ACN		
		1ο δείγμα	2ο δείγμα	3ο δείγμα	4ο δείγμα	5ο δείγμα	6ο δείγμα	7ο δείγμα	8ο δείγμα



Εικόνα Π4.2: Αστάθεια της περμεάσης XanQ(M282V/M331V/M465V/H257C/E429C) κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου πέψης από CNBr έπειτα από προεπώαση με τα αντιδραστήρια MTS-linker-MTS

Μεμβρανικά κυστίδια από κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την περμεάση από πλασμίδια pT7-5/Cys-less xanQ-His₁₀ που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις (100 μg ή 50 μg ολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή) αφού επωαστούν με το αντίστοιχο αντιδραστήριο MTS-linker-MTS (0.05-0.5 mM, 10 min, 25°C), υποβάλλονται σε πέψη με CNBr (στις συνθήκες που φαίνονται στην εικόνα και αποτελούν μία περίπτωση συνθηκών από αυτές που δίνονται στον Πίνακα Π4.1) και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της ουράς των ιστιδινών, σε αραιώση 1:5000. Οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών δίνονται στα αριστερά της εικόνας (βλ. πειρ. διαδικασία 2.13.1).

