



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΟΥΣ
ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ - ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ
(NAT TRANSPORTERS)

ΚΑΡΑΤΖΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



Επισημαίνεται η έγκριση της Διατριβής στο Πρωτόκολλο 37 του 1992
Συνεδρίου του Ιατρικού Τμήματος 2-10-2002

Ονομασία Υποψήφιας Σχολαστικής Καθίστησης: Ν. 5343/32 σύμφωνα με απόφαση
του Γραφείου Διασύνταξης Διατριβών του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αριθμός του Αποφασιστικού Συμβουλίου: 146/1992
Αναθέτουσα Καθηγήτρια: Ελένη Βαδουλάκη με αριθμό π.α. 14719-10-2002

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΗ ΠΡΟΫΠΟΤΙΤΗΡΗΣΗΣ:

Εισηγώντας: Φρόνιμος Ιωάννης, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βασίλειος Βασιλείου, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Υποστηρικτής: Γεώργιος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Επισημαίνεται η έγκριση της Διατριβής σύμφωνα με απόφαση του Συμβουλίου
Αριθμός του Αποφασιστικού Συμβουλίου: 146/1992
Αναθέτουσα Καθηγήτρια: Ελένη Βαδουλάκη με αριθμό π.α. 14719-10-2002

Ορισμός θέματος: 2-10-2002

ΕΠΙΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Πρόεδρος: Φρόνιμος Ιωάννης, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Αρτέμιος Γεωργίου, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Γεώργιος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Βασίλειος Βασιλείου, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Γεώργιος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Βασίλειος Βασιλείου, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Αρτέμιος Γεωργίου, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καθηγητής: Γεώργιος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Ιστορίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

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



Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία»: 2-10-2002

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 2-10-2002 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία», έγγραφο Επιστημονικού Υπεύθυνου κ. Ιωάννη Λαζαρίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Βιολογίας με αριθμ.πρωτ.197/8-10-2002

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευστάθιος Φριλίγγος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων

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

Αναστασία Πολίτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

Ορισμός θέματος: 2-10-2002

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κωνσταντίνος Δραΐνας, Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ευστάθιος Φριλίγγος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

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

Αναστασία Πολίτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σάββας Χριστοφορίδης, Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Κατάθεση Διδακτορικής Διατριβής: 20-11-2006

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας



ΕΠΙΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

...αποδοτικότητα, αξιοπιστία, ευελιξία, διαφάνεια, διασφάλιση της ποιότητας
...και η δυνατότητα να ανταποκριθείς σε τυχόν αλλαγές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποιότητα
...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.

...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.

...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.

...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...αποτελεί τον κοινό παρονομαστή για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέγεθος
...και τον κλάδο. Η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.
...Κατά συνέπεια, η ποιότητα είναι η βάση για την επιτυχία και την ανάπτυξη.

**Αφιερώνεται
στον άντρα μου
στους γονείς μου
και στη Ρούλα**

**γιατί χωρίς αυτούς δεν θα υπήρχε
ούτε αρχή ούτε τέλος**



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιοτεχνολογία». Χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Ηράκλειτος» του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων μέσω του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Πολλοί είναι οι άνθρωποι που συνεισέφεραν με το δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Επίκ. Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω δίπλα του και μου προσέφερε απλόχερα όλες τις γνώσεις του. Ήταν αυτός που με καθοδήγησε από την αρχή μέχρι το τέλος, τόσο πειραματικά όσο και θεωρητικά, με ουσιαστικές υποδείξεις και αμείωτο ενδιαφέρον. Παρά τη διαφορά του χαρακτήρα μας υπήρξε πάνω και από εμένα πρόθυμος, ώστε να δημιουργηθεί ένα κλίμα συνεργασίας που να αποδώσει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Επίκ. Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά και Επίκ. Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου, για τις γνώσεις που μου προσέφεραν στα θέματα της ειδικότητάς τους, ο μεν κ. Διαλλινάς για τα συστήματα μεταφοράς στον ασκομύκητα *Aspergillus*, η δε κα. Πολίτου για θέματα δομικής ανάλυσης πρωτεϊνών.

Ευχαριστώ, επίσης, την Ερευνήτρια Α Βασιλική Σοφianoπούλου του Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος» που μας παραχώρησε το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης sGFP και τον Λέκτορα Σάββα Χριστοφορίδη που μας παραχώρησε δείγματα καθαρισμένης GFP καθώς και αντισώματα anti-GFP για τις αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης.

Αν και από μακριά, σημαντική ήταν επίσης η συμβολή του H. Ronald Kaback (University of California Los Angeles), ο οποίος μας διέθεσε γενναιόδωρα τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του επιτόπου της LacY καθώς και μία σειρά κατασκευών DNA για έκφραση της LacY, που χρησιμοποιήσαμε στις αρχικές αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης. Επίσης, ευχαριστούμε τον Gary Rudnick (Yale University), ο οποίος μας έστειλε δύο από τις πιο πρόσφατες εργασίες της ομάδας του για τον μεταφορέα SERT, πριν από την δημοσίευσή τους: μία από τις εργασίες αυτές χρησιμοποιήσαμε στη Συζήτηση (Mao *et al.*, 2006).



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. Ευχαριστώ, επίσης, τον Επίκ. Καθηγητή Περικλή Παππά και τα άλλα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής, καθώς και τον δρ. Άρη Καλλιμάνη και τα άλλα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος, που διευκόλυναν την εργασία αυτή, επιτρέποντας πρόθυμα πάντοτε πρόσβαση στον Μετρητή Σωματιδίων β του εργαστηρίου τους, όποτε χρειάστηκε.

Κατά τη διάρκεια περάτωσης της διατριβής μου είχα τη χαρά να συνεργαστώ με τον Παναγιώτη Πάνο, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής του διατριβής και με την Κατερίνα Γεωργοπούλου, στα πλαίσια της πτυχιακής της διατριβής. Και οι δύο συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της δουλειάς αυτής με ιδιαίτερο ενθουσιασμό. Τους ευχαριστώ θερμά για την εποικοδομητική συνεργασία, αλλά κυρίως γιατί απέκτησα δύο καινούργιους και πολύτιμους φίλους.

Στην δρ. Σωτηρία Ταβουλάρη θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη φιλία της και την καθοριστική συμβολή της σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, αλλά πάνω από όλα να την ευχαριστήσω για το ότι έχει καταφέρει παρόλο που βρίσκεται πολύ μακριά να είναι πάντα δίπλα μου.

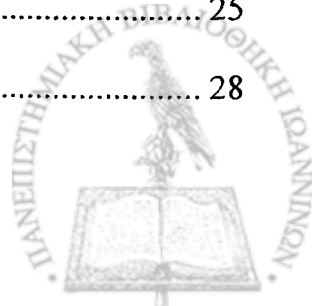
Τέλος, απέραντη αγάπη οφείλω να εκφράσω στους γονείς μου που μου έμαθαν να παλεύω στη ζωή για τους στόχους μου με αξιοπρέπεια και επιμονή και στα αδέρφια μου που ήταν πάντα κοντά μου.

Τέλος, ευχαριστώ τον σημαντικότερο άνθρωπο της ζωής μου, τον Παύλο, που με αγαπά και με στηρίζει ουσιαστικά τα τελευταία δέκα χρόνια.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Πρωτεΐνες μεταφορείς	3
1.1.1 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς	3
1.1.2 Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς	5
1.2 Μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας και κρυσταλλογραφικά δεδομένα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς	9
1.2.1 Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας με τεχνικές <i>in vitro</i> μεταλλαξιγένεσης	9
1.2.2 Ο μεταφορέας λακτόζης LacY της <i>E. coli</i> ως πρότυπο μελέτης των πρωτεϊνών δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς.....	10
1.2.3 Κρυσταλλικές δομές άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου	16
1.2.3.1 Μεταφορέας GlpT.....	16
1.2.3.2 Μεταφορέας AcrB	16
1.2.3.3 Μεταφορέας Glp _T _H	17
1.2.3.4 Μεταφορέας LeuT _{Aa}	17
1.2.3.5 Αντιμεταφορέας ATP/ADP	18
1.3 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων	21
1.3.1 Σημασία της μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων.....	21
1.3.1.1 Ρόλος των νουκλεοτιδικών βάσεων στην επιβίωση των οργανισμών.....	21
1.3.1.2 Ιατρική και φαρμακολογική σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων.....	24
1.3.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων.....	25
1.3.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2	28



1.3.4	Ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα <i>A. nidulans</i> και το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2.....	33
1.4	Πρόσληψη και μεταβολισμός πουρινών σε Βακτηριακά συστήματα.....	37
1.5	Σκοπός της εργασίας	43

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....45

2.1	Όργανα.....	47
2.2	Χημικά Αναλώσιμα	49
2.3	Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	51
2.4	Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	55
2.4.1	Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA	55
2.4.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR).....	55
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension).....	56
2.4.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλών επικαλύψεων (multiple-overlap PCR)	61
2.4.5	Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA	65
2.4.6	Μετασχηματισμός της <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	65
2.4.7	Απομόνωση DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα και προσδιορισμός αλληλουχίας.....	66
2.4.8	Απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου <i>ygfO</i> (knock out).....	67
2.5	Ανάπτυξη κυττάρων	71
2.6	Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport Assay).....	73
2.7	Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	77
2.8	Αναλύσεις πρωτεϊνών.....	79
2.8.1	Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	79



2.8.2	Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	80
2.8.3	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	81
2.9	Δοκιμασία σήμανσης κυστεϊνών <i>in vivo</i>	83
2.10	<i>In silico</i> αναλύσεις.....	85

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 87

3.1	Ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 στην <i>Escherichia coli</i>	89
3.2	Υπερέκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των YgfO και YicE	91
3.2.1	Οι YgfO και YicE λειτουργούν ως μεταφορείς ξανθίνης υψηλής συγγένειας.....	91
3.2.2	Οι YgfO και YicE είναι συμμεταφορείς ξανθίνης:H ⁺	93
3.2.3	Οι YgfO και YicE είναι ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης και δεν αναγνωρίζουν ουρικό οξύ ή ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις 7 και 8.....	95
3.2.4	Ρόλος των γονιδίων ygfO και yicE ως προς την ανάπτυξη της <i>E. coli</i> K-12 <i>in vivo</i> σε πηγές αζώτου.....	99
3.3	Προετοιμασία των YgfO και YicE για αναλύσεις των σχέσεων δομής-λειτουργίας	105
3.3.1	Εισαγωγή C-τελικών αλληλουχιών για ανοσοαποτύπωση και απομόνωση των YgfO και YicE	105
3.3.1.1	Σήμανση με την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και τον επίτοπο της LacY .	105
3.3.1.2	Σήμανση με την αλληλουχία των 10 ιστιδινών	111
3.3.1.3	Σήμανση με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)	115
3.3.2	Αντικατάσταση των ενδογενών καταλοίπων Cys των YgfO και YicE	117
3.3.3	Διαπεράσεις ελεύθερες κυστεϊνών (Cys-less).....	123



3.4	Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στην αλληλουχία 315-340 της διαπεράσης YgfO	131
3.4.1	Αρχικός λειτουργικός έλεγχος των μεταλλαγμάτων κυστεϊνών	131
3.4.1.1	Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης της YgfO ..	131
3.4.1.2	Έκφραση και ενεργότητα των διαπερασών μοναδικής Cys μετά από εισαγωγή του σήματος His ₁₀ στο καρβοξυτελικό τους άκρο	136
3.4.1.3	Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων Cys μετά από επαναφορά του υποστρώματος των 5 εγγενών κυστεϊνών	139
3.4.2	Ανάλυση της ευαισθησίας των θέσεων Cys στο <i>N</i> -αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM)	141
3.4.2.1	Επίδραση στην ενεργότητα: ενδείξεις ότι η αλληλουχία I329-V339 αποτελεί α-έλικα	141
3.4.2.2	Έκταση αλκυλίωσης <i>in vivo</i>	145
3.4.3	Αρχική διερεύνηση του ρόλου των συντηρημένων καταλοίπων στο μοτίβο NAT147	
3.4.3.1	Η Gln324 απαιτείται για την πρόσληψη ξανθίνης με υψηλή συγγένεια	147
3.4.3.2	Η Asn325 είναι αναντικατάστατη για τη μεταφορά ξανθίνης	150
3.4.3.3	Η Gly327 και η Thr332 μπορούν να αντικατασταθούν με διατήρηση υψηλής ενεργότητας αλλά η Thr332 επηρεάζει την εξειδίκευση.....	152
3.4.3.4	Η Gly333 είναι σημαντική για την εξειδίκευση.....	155
3.4.4	Οι Pro318 και Gly340 είναι σημαντικές για την έκφραση της YgfO στη μεμβράνη.....	161
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	163
4.1	Σύγκριση της εξειδίκευσης υποστρωμάτων μεταξύ βακτηριακών και μυκητιακών μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2.....	165



4.2	Δημιουργία μεταφορέων NAT ελεύθερων κυστεϊνών στο σύστημα της <i>E. coli</i> K-12	171
4.3	Το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2	173
4.4	Νέα δεδομένα και προοπτικές για τη μελέτη των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2).....	181
5	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	185
6	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	193



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- AMP:** μονοφωσφορική αδενοσίνη (adenosine monophosphate)
- ATP:** τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
- Avidin-HRP:** σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης
- BAD:** τομέας δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain)
- BSA:** αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)
- CCCP:** καρβονυλο-κυανιδο-χλωροφαινυλο-υδραζόνη (carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazine)
- DDM:** *n*-δωδεκυλο-β-D-μαλτοπυρανοσίδιο (*n*-dodecyl-β,D-maltoside)
- DMSO:** διμεθυλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)
- DTT:** διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)
- EDTA:** αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid)
- GFP:** πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein)
- GMP:** μονοφωσφορική γουανοσίνη (guanosine monophosphate)
- His₁₀:** αλληλουχία 10 καταλοίπων ιστοιδινών
- HRP-protein A:** πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με υπεροξειδάση ραπανιού (horseradish peroxidase-protein A)
- IPTG:** ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (isopropyl-β-D-thiogalactoside)
- KP_i:** Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου
- LacY-epitope:** αλληλουχία του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της διαπεράσης λακτόζης LacY (επίτοπος LacY)
- lacZ p/o:** υποκινητής/χειριστής του οπερονίου της λακτόζης (promoter/operator)
- LB:** Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (ή Luria Broth)
- NAT:** Οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (Nucleobase – Ascorbate Transporters)
- NCS2:** Οικογένεια-2 συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – κατιόντων (Nucleobase – Cation Symporters-2)
- NEM:** (*N*-ethylmaleimide), *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο
- OGM:** πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide)
- PCR:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
- PMS:** μεθοσουλφονικό φαιναζίνιο (phenazinemethosulphate)



PRPP: 5-φωσφοριβοζυλο-1-πυροφωσφορικό (5-phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphate)

PVDF: διφθοριούχο πολυ-βινυλιδένιο (polyvinylidene difluoride)

SDS: θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate)

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

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

TDG: β-D-γαλακτοπυρανοσίλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο

TMP: μονοφωσφορική θυμιδίνη (thymine monophosphate)

M9: Ελάχιστο θρεπτικό υλικό που περιέχει γλυκόζη ως πηγή άνθρακα

Αμινοξέα:

A ή Ala: αλανίνη

C ή Cys: κυστεΐνη

D ή Asp: ασπαρτικό

E ή Glu: γλουταμικό

F ή Phe: φαινυλαλανίνη

G ή Gly: γλυκίνη

H ή His: ιστοιδίνη

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



Νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα:

- X: ξανθίνη
- U: ουρικό οξύ
- H: υποξανθίνη
- Ur: ουρακίλη
- A: αδενίνη
- T: θυμίνη
- C: κυτοσίνη
- G: γουανίνη
- Th: θεοφυλλίνη
- Cf: καφεΐνη
- Ap: αλλοπουρινόλη
- Op: οξυπουρινόλη
- 1: 1-μεθυλοξανθίνη
- 3: 3-μεθυλοξανθίνη
- 7: 7-μεθυλοξανθίνη
- 8: 8-μεθυλοξανθίνη
- 9: 9-μεθυλοξανθίνη
- 2: 2-θειοξανθίνη
- 6: 6-θειοξανθίνη
- 8z: 8-αζαξανθίνη
- 9d: 9-δεαζαξανθίνη
- 7d: 7-δεαζαξανθίνη
- F: φθοροουρακίλη
- Al: αλλαντοΐνη
- Im: ιμιδαζόλιο



Αναφέρεται στην μελέτη των οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών που επικρατούν στην Ελλάδα, με στόχο την κατανόηση των αιτιών των οικονομικών προβλημάτων και την πρόταση λύσεων. Η μελέτη βασίζεται σε θεωρητικές και εμπειρικές μεθόδους, με την επένδυση στην έρευνα να αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της οικονομίας.

Η μελέτη των οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών στην Ελλάδα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των αιτιών των οικονομικών προβλημάτων και την πρόταση λύσεων. Η μελέτη βασίζεται σε θεωρητικές και εμπειρικές μεθόδους, με την επένδυση στην έρευνα να αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της οικονομίας.

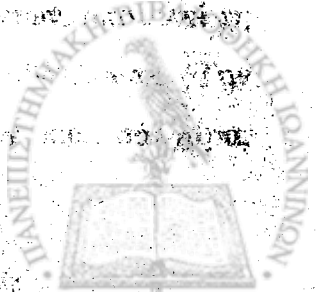
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη των οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών στην Ελλάδα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των αιτιών των οικονομικών προβλημάτων και την πρόταση λύσεων. Η μελέτη βασίζεται σε θεωρητικές και εμπειρικές μεθόδους, με την επένδυση στην έρευνα να αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της οικονομίας.

Η μελέτη των οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών στην Ελλάδα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των αιτιών των οικονομικών προβλημάτων και την πρόταση λύσεων. Η μελέτη βασίζεται σε θεωρητικές και εμπειρικές μεθόδους, με την επένδυση στην έρευνα να αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της οικονομίας.

Η μελέτη των οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών στην Ελλάδα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των αιτιών των οικονομικών προβλημάτων και την πρόταση λύσεων. Η μελέτη βασίζεται σε θεωρητικές και εμπειρικές μεθόδους, με την επένδυση στην έρευνα να αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της οικονομίας.

Η μελέτη των οικονομικών και κοινωνικών συνθηκών στην Ελλάδα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των αιτιών των οικονομικών προβλημάτων και την πρόταση λύσεων. Η μελέτη βασίζεται σε θεωρητικές και εμπειρικές μεθόδους, με την επένδυση στην έρευνα να αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της οικονομίας.



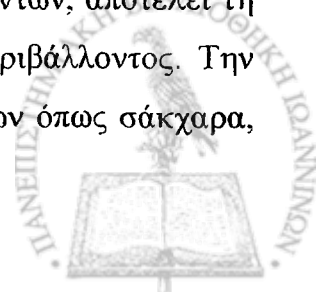
1.1 Πρωτεΐνες μεταφορείς

1.1.1 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς

Η κυτταρική μεμβράνη είναι απόλυτα αναγκαία για τη ζωή του κυττάρου καθώς περικλείει και προστατεύει το κύτταρο, ορίζει τα όρια μεταξύ του ενδοκυτταρικού και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, ενώ οι μεμβράνες των οργανιδίων εξασφαλίζουν την διαμερισματοποίηση των βιολογικών διεργασιών, που είναι απαραίτητη για την πολύπλοκη οργάνωση και ρύθμιση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Εκτός αυτού, όμως, η μεμβράνη είναι ένας ελεγχόμενος φραγμός διαπερατότητας που ρυθμίζει την διακίνηση των διαφορετικών βιομορίων. Διαθέτει οργανωμένα πρωτεϊνικά συστήματα που (α) ρυθμίζουν την διακίνηση ιόντων, θρεπτικών ουσιών και τοξινών από και προς το εσωτερικό του κυττάρου (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς), (β) λειτουργούν ως οξειδοαναγωγικά ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα ή (γ) ως υποδοχείς σημάτων σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος, (δ) έχουν κεντρικό ρόλο στην επικοινωνία και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και περιβάλλοντος, μεταξύ διαφορετικών κυττάρων του ίδιου οργανισμού ή μεταξύ διαφορετικών οργανιδίων του ίδιου κυττάρου (Alberts *et al.*, 2000, Berg *et al.*, 2005).

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ανάλογα με τον τρόπο που συνδέονται με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα διακρίνονται σε ενσωματωμένες (integral) και περιφερειακές (peripheral). Έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα εμφανίζουν οι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες, των οποίων ένα ή περισσότερα τμήματα εισχωρούν εντός της μεμβράνης όπου συγκρατούνται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, οι περιφερειακές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν έμμεσα, είτε με τα υδρόφιλα τμήματα των άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών είτε με τις υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων, χωρίς να εισχωρούν στο υδρόφοβο περιβάλλον της μεμβράνης (White and Wimley, 1999). Από την συστηματική ανάλυση των γονιδιωμάτων τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών προκύπτει ότι, κατά μέσο όρο, 30% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Από τις πρωτεΐνες αυτές, το μεγαλύτερο μέρος (5-15% του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων, ανάλογα με το είδος οργανισμού) είναι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς (Ren *et al.*, 2004) (<http://www.membranetransport.org>).

Η μεταφορά μορίων, και κυρίως απλών οργανικών ενώσεων και ιόντων, αποτελεί τη βάση της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος. Την ανάγκη ακριβώς της πρόσληψης και ανακατανομής στον οργανισμό μορίων όπως σάκχαρα,



αμινοξέα, νουκλεοτιδικές βάσεις, ιόντα, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές κ.α., εξυπηρετούν οι πολλοί διαφορετικοί εξειδικευμένοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς. Συνολικά, οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών εξασφαλίζουν την αξιοποίηση των θρεπτικών πηγών άνθρακα, αζώτου, θείου, φωσφόρου (Diallinas *et al.*, 1998, Abramson *et al.*, 2003), τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης μεταβολιτών (Lemieux *et al.*, 2004, Yernool *et al.*, 2004), τον έλεγχο της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης (Rebay-Peyroula *et al.*, 2003), του pH, και των συνθηκών λειτουργίας ενζυμικών ή άλλων μηχανισμών του κυττάρου, τη ρύθμιση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος και του κύκλου λειτουργίας των νευροδιαβιβαστών, των ορμονών και άλλων διακυτταρικών σημάτων (Yamashita *et al.*, 2005) και την άμυνα ή προστασία του οργανισμού μέσω της ενεργού εκροής φαρμάκων, αντιβιοτικών, αντιϊικών παραγόντων και τοξινών (Murakami and Yamaguchi, 2003) ή ανακατανομής αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι το ασκορβικό και το ουρικό οξύ (Tsukaguchi *et al.*, 1999, Diallinas *et al.*, 1998).

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς είναι σημαντικές και από κλινική άποψη. Για παράδειγμα, λειτουργική ανεπάρκεια του μεταφορέα γλουταμικού (EAAT2) στο κεντρικό νευρικό σύστημα συνδέεται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) (Ferrarese *et al.*, 2001, Vanoni *et al.*, 2004) ή η νόσος Huntington (Lievens *et al.*, 2001, Behrens *et al.*, 2002), υπέρμετρη ενεργότητα του μεταφορέα σεροτονίνης (SERT) συνδέεται με νευροψυχιατρικά σύνδρομα μανιοκατάθλιψης (Murphy *et al.*, 1998, Kilic *et al.*, 2003, Zhang and Rudnick, 2005), ανεπάρκεια του μεταφορέα γλυκόζης/νατρίου (SGLT1) του εντερικού επιθηλίου ευθύνεται για το σύνδρομο δυσαπορρόφησης γλυκόζης-γαλακτόζης (Turk *et al.*, 1991, Wright *et al.*, 2002), οι πρωτεΐνες «πολυφαρμακευτικής αντίστασης» (multidrug resistance) MDR1 και MDR2 συνδέονται με φαινόμενα ανοχής έναντι φαρμάκων που αξιολογούνται στην χημειοθεραπεία (Rybczynska *et al.*, 2001).

Παρά τη σπουδαιότητα τους, λίγες σχετικά είναι οι πρωτεΐνες μεταφοράς, αλλά και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες γενικότερα, που έχουν μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις όπου γνωρίζουμε αναλυτικά το ενεργό κέντρο, τις σημαντικές θέσεις αμινοξέων, την δυναμική των δομικών διαμορφώσεων και τον μηχανισμό λειτουργίας μιας τέτοιας πρωτεΐνης. Για να εξετάσουμε τα ερωτήματα αυτά, είναι απαραίτητη η ύπαρξη υψηλής ευκρίνειας δομικών πληροφοριών που προέρχονται από κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Εντούτοις, η υδρόφοβη φύση, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης και η μεγάλη ευελιξία διαμορφώσεων που παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες μεταφοράς είναι ο σημαντικότερος λόγος που

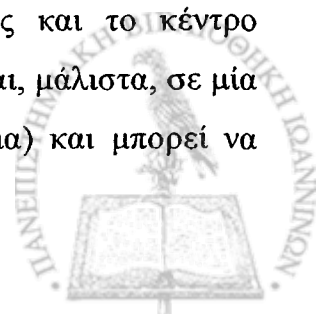


καθιστούν δύσχηστα τα μόρια αυτά για κρυσταλλογραφικές ή άλλες αναλυτικές βιοφυσικές τεχνικές.

1.1.2 Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς

Για τις πρωτεΐνες μεταφοράς έχει ήδη καθιερωθεί ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας, ανάλογο με αυτό που ισχύει για τα ένζυμα (Transport Commission, TC system, Νοέμβριος 1999) (<http://www.tcdb.org>) (Saier, 2000, Busch and Saier, 2002, Chang *et al.*, 2004). Κατά το σύστημα αυτό (**Εικόνα 1.1**), οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς διακρίνονται σε **διαύλους (TC1, Channels)** και **μεταφορείς (TC2, TC3, TC4, Carriers)**. Οι διαυλοι επιτελούν πάντοτε διευκολυνόμενη διάχυση δηλαδή δεν συσσωρεύουν αλλά απλώς εξισορροπούν ταχύτατα τις συγκεντρώσεις ενός ιόντος ή μικρομορίου εκατέρωθεν της μεμβράνης [διάυλος K^+ (Doyle *et al.*, 1998, Jiang *et al.*, 2003) και ο διάυλος ύδατος (υδροπορίνη, aquaporine), Engel *et al.*, 2000]. Λειτουργούν με απλό τρόπο, εναλλάσσοντας δύο διαμορφώσεις, μία ανοικτή και μία κλειστή. Η αλλαγή μεταξύ ανοικτής διαμόρφωσης (που επιτρέπει δίοδο του ιόντος ή άλλου υποστρώματος) και κλειστής διαμόρφωσης (που δεν επιτρέπει την δίοδο) γίνεται με την ανταπόκριση είτε σε ειδικά χημικά σήματα (μόρια που δεσμεύονται στον διάυλο και προκαλούν αλλαγή της διαμόρφωσής του) είτε σε διαφορά δυναμικού της μεμβράνης, το οποίο επίσης μπορεί να προκαλέσει αλλαγή της διαμόρφωσης μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων με σημαντικά κατάλοιπα αμινοξέων.

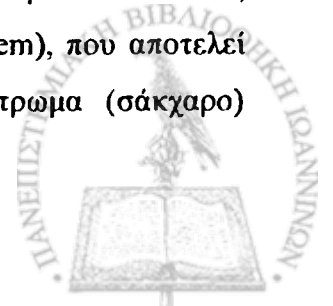
Οι μεταφορείς, από την άλλη πλευρά, λειτουργούν συνήθως με ενεργό μεταφορά και όχι διευκολυνόμενη διάχυση και έχουν πολύ μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων. Συγκεκριμένα, εναλλάσσουν κατά την λειτουργία τους έξι διακριτές διαμορφώσεις (**Εικόνα 1.2**). Κατά τον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς, οι μεταφορείς θα πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθούν, είτε δεσμεύοντας μία φωσφορική ομάδα από υδρόλυση του ATP είτε δεσμεύοντας ένα ιόν νατρίου ή υδρογόνου (**στάδιο 1**) και στη συνέχεια να δεσμεύσουν το ειδικό υπόστρωμα που πρόκειται να μεταφερθεί (**στάδιο 2**): το στάδιο 1 προετοιμάζει δηλ. τον μεταφορέα ώστε να μπορεί να δεσμεύει το υπόστρωμα πιο αποτελεσματικά (με μεγαλύτερη συγγένεια). Η δέσμευση υποστρώματος (στάδιο 2) οδηγεί σε έντονες αλλαγές διαμόρφωσης με συνέπεια να έχουμε «αναστροφή» της διαμόρφωσης και το κέντρο δέσμευσης να «βλέπει» πλέον προς την εσωτερική πλευρά του κυττάρου και, μάλιστα, σε μία διαμόρφωση όπου το υπόστρωμα συνδέεται χαλαρά (με μικρή συγγένεια) και μπορεί να



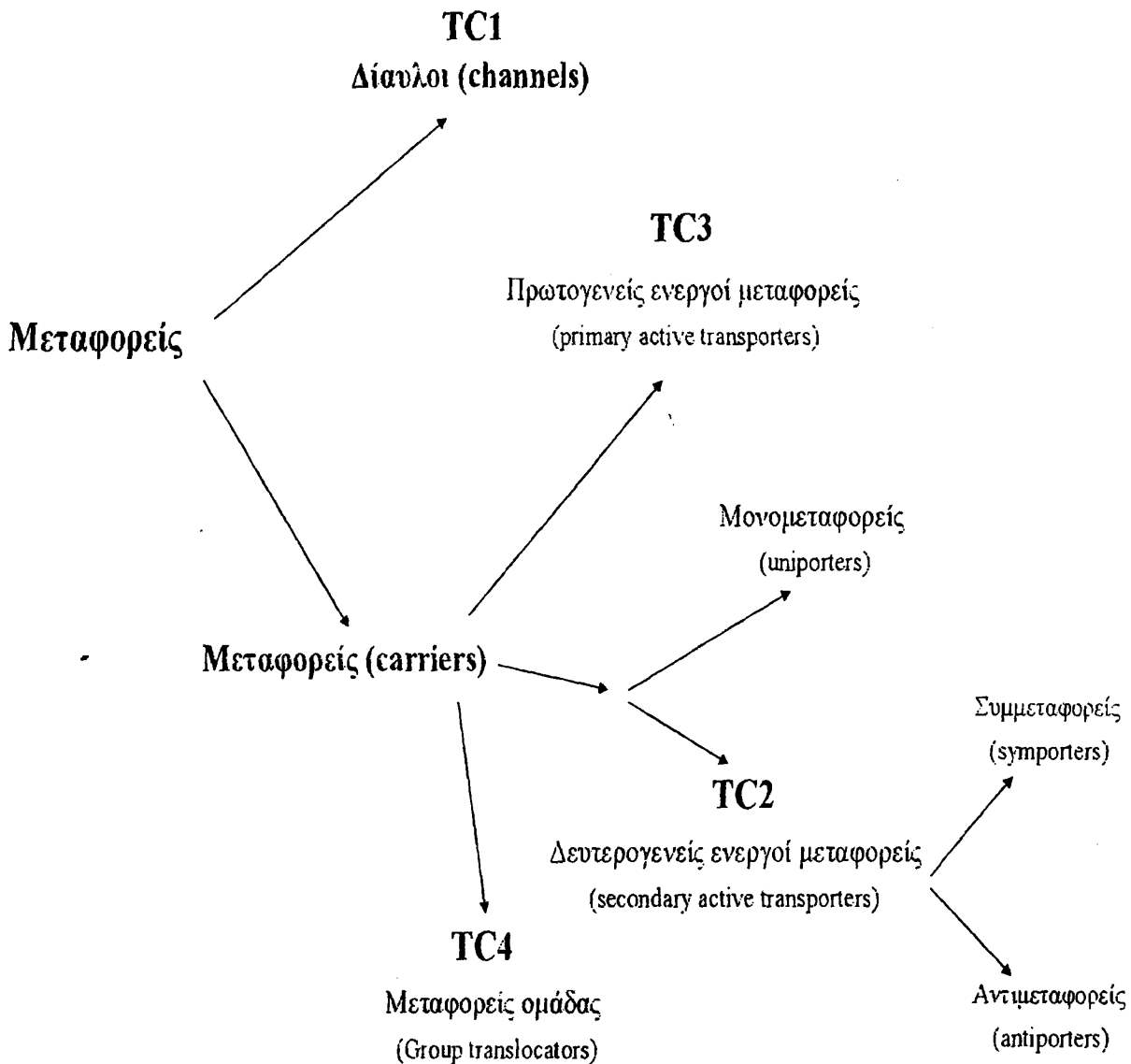
αποσύνδεθεί με ευχέρεια (στάδιο 3). Το στάδιο 3 ακολουθεί η αποσύνδεση του υποστρώματος, το οποίο απελευθερώνεται πλέον στο εσωτερικό του κυττάρου (στάδιο 4), αποσύνδεση του ιόντος ή της φωσφορικής ομάδας (στάδιο 5) και, τέλος, επαναφορά στην αρχική διαμόρφωση η οποία «βλέπει» προς το εξωτερικό του κυττάρου (στάδιο 6), για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος λειτουργίας (Kaback, 1997, Mizra *et al.*, 2006).

Για τις αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς είναι απαραίτητη η αξιοποίηση κάποιας μορφής ενέργειας. Η ενέργεια μπορεί να παρέχεται άμεσα από μία “πρωτογενή” πηγή (συνήθως υδρόλυση του ATP), οπότε οι μεταφορείς ονομάζονται **πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς πρωτογενούς τύπου** [TC3, Primary active transporters, π.χ. αντλία εκροής πολυφαρμάκων LmrP (multidrug efflux pump) του *Lactococcus lactis*, Bolhuis *et al.*, 1995], ή έμμεσα από μια “δευτερογενή” πηγή ενέργειας (ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων), οπότε οι μεταφορείς ονομάζονται **πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου** (TC2, Secondary active transporters, π.χ. μεταφορέας λακτόζης LacY της *E. coli*, Newman *et al.*, 1981, Viitanen *et al.*, 1986) (Εικόνα 1.1).

Οι μεταφορείς που επιτελούν ενεργό μεταφορά δευτερογενούς τύπου μπορούν να διακριθούν σε **συμμεταφορείς** που καταλύουν την μεταφορά δύο μορίων προς την ίδια κατεύθυνση διαμέσου της μεμβράνης (symporters, π.χ. συμμεταφορέας γλυκόζης/νατρίου SGLT1, Huntley *et al.*, 2006) και **αντιμεταφορείς** που καταλύουν την μεταφορά δύο μορίων προς αντίθετες κατευθύνσεις (antiporters, π.χ. αντιμεταφορέας ATP/ADP του βοός, Pebay-Reygoula *et al.*, 2003). Οι μεταφορείς που καταλύουν τη μεταφορά ενός μόνο είδους μορίου διαμέσου της μεμβράνης ονομάζονται **μονομεταφορείς** [uniporters, π.χ. μονομεταφορέας γλυκερόλης GlpF της *E. coli* (Sweet *et al.*, 1990) και μονομεταφορέας γλυκόζης GLUT1 του ανθρώπου (Gould and Holman, 1993)] και επιτελούν παθητική μεταφορά (Εικόνα 1.1). Πολλοί μεταφορείς μπορούν να καταλύουν περισσότερες από μια αντιδράσεις (δηλ. συμμεταφορά και μονομεταφορά), καθώς επίσης σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να μετατρέψουν συμμεταφορείς ή αντιμεταφορείς σε μονομεταφορείς (Franco and Brooker, 1994, Lolkema and Poolman, 1995, Schroers *et al.*, 1997). Τέλος, μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς που εντοπίζονται μόνο στα βακτήρια (Barabote and Saier, 2005) και ονομάζονται μεταφορείς ομάδας (TC4, Group translocators) τροποποιούν τα υποστρώματα τους κατά τη διαμεμβρανική μεταφορά. Στο σύστημα φωσφοτρανσφεράσης της *E. coli* (Μεταφορείς ομάδας με δράση φωσφοτρανσφεράσης, εξαρτώμενοι από PEP, PEP-dependent, phosphoryl transfer-driven group translocators, PTS system), που αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο σύστημα της ομάδας αυτής, το υπόστρωμα (σάκχαρο)



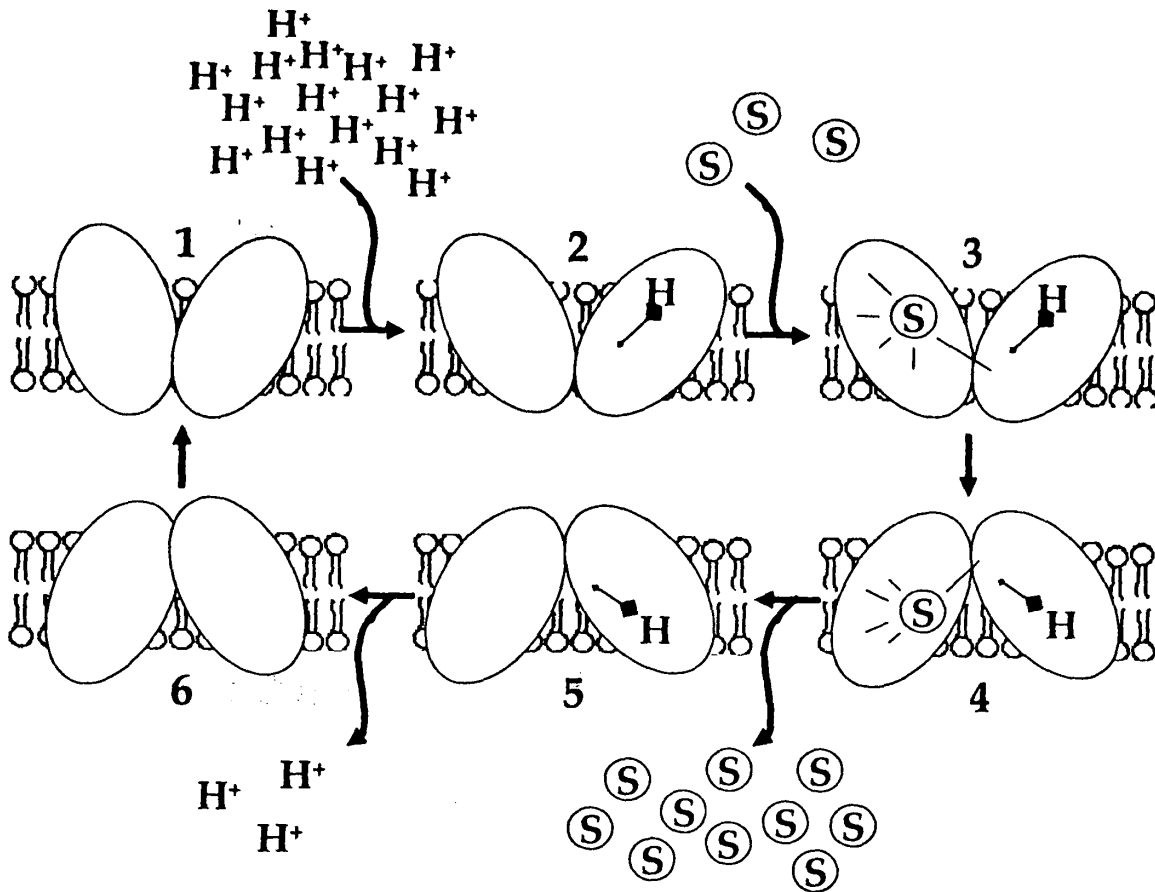
φωσφορυλιώνεται χρησιμοποιώντας το φωσφοενολοπυρουβικό (PEP) ως δότη φωσφορικής ομάδας. Το σάκχαρο (π.χ. γλυκόζη) προσλαμβάνεται από το εξωκυτταρικό περιβάλλον και, μέσω του συστήματος PTS, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα ως φωσφορυλιωμένο σάκχαρο (π.χ. 6-φωσφορική γλυκόζη) (Tchieu *et al.*, 2001, Saier *et al.*, 2005).



Εικόνα 1.1: Ταξινομικές ομάδες των πρωτεϊνών μεταφοράς με βάση το διεθνές σύστημα ταξινόμησης και ονοματολογίας TC

(<http://www.tcdb.org>)





Εικόνα 1.2: Μηχανισμός ενεργού μεταφοράς

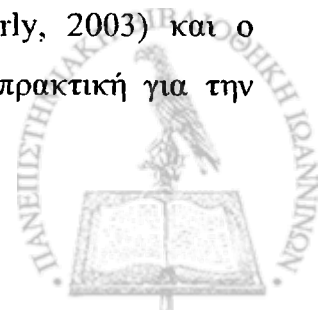
Έξι στάδια διαμορφωτικών αλλαγών ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα που εκτελεί ενεργό μεταφορά, εξαρτώμενη από τη διαβάθμιση πρωτονίων (S, υπόστρωμα, H⁺, πρωτόνιο)

1.2 Μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας και κρυσταλλογραφικά δεδομένα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς

1.2.1 Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας με τεχνικές *in vitro* μεταλλαξιγένεσης

Η χρήση μοριακών βιολογικών τεχνικών για την ανάλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς σε συνδυασμό με βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες, μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και τον μηχανισμό λειτουργίας. Η ανάλυση των σχέσεων δομής – λειτουργίας, βάσει *in vitro* μεταλλαξιγένεσης και μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis) στους διαμεμβρανικούς μεταφορείς, μπορεί να δώσει πολύτιμα πειραματικά στοιχεία για την τοπολογία, το κέντρο δέσμευσης και τις διαμορφώσεις της πρωτεΐνης, έστω και σε χαμηλή δομική ευκρίνεια (low resolution). Τα στοιχεία αυτά μπορούν να επιτρέψουν την ανάπτυξη αρχικών μοντέλων για τη δομή και τον μηχανισμό, που αναμένεται να επιβεβαιωθούν και να ενισχυθούν από κρυσταλλογραφικά ή άλλα δεδομένα ανάλυσης της δομής σε υψηλή ευκρίνεια (high resolution). Ακόμη μπορούν να προσδώσουν συμπληρωματική πληροφορία που είναι απαραίτητη για την ερμηνεία του μηχανισμού, ακόμη και μετά την παρουσίαση αναλυτικών τρισδιάστατων δομών από κρυσταλλογραφία, όπως στο χαρακτηριστικό παράδειγμα της περμεάσης λακτόζης της *E. coli* (Frillingos *et al.*, 1998, Sahin-Toth *et al.*, 2000a, Kaback *et al.*, 2001, Sorgen *et al.*, 2002, Abramson *et al.*, 2003, Mizra *et al.*, 2006).

Η πειραματική προσέγγιση για την δομική-λειτουργική ανάλυση των διαμεμβρανικών μεταφορέων που στηρίζεται στην στρατηγική της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης και σε τεχνικές σημειακής στόχευσης (site-directed) έχει εφαρμοσθεί με ιδιαίτερα αποδοτικό τρόπο τόσο σε προκαρυωτικές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς, όπως είναι ο μεταφορέας λακτόζης LacY της *E. coli* (Frillingos *et al.*, 1998, Kaback *et al.*, 2001), ο μεταφορέας τετρακυκλίνης TetA της *E. coli* (Tamura *et al.*, 2001), ο μεταφορέας γλουταμικού GltT του *Bacillus stearothermophilus* (Slotboom *et al.*, 2001), ο μεταφορέας οξαλικού/μυρμηκικού OxlT του *Oxalobacter formigenes* (Ye and Maloney, 2002), ή ο μεταφορέας τοξινών MdfA της *E. coli* (Adler and Bibi, 2004) όσο και σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς, όπως είναι ο μεταφορέας σεροτονίνης SERT (Sato *et al.*, 2004), ο μεταφορέας φυλλικού οξέος RFC (folate transporter) (Flintoff *et al.*, 2003, Cao and Matherly, 2003) και ο συμμεταφορέας γλυκόζης:Na⁺ SGLT1 (Huntley *et al.*, 2006). Συνήθης πρακτική για την



εφαρμογή αυτών των τεχνικών είναι όλες οι εγγενείς κυστεΐνες (native Cys residues) του πρωτεϊνικού μορίου να αντικαθίστανται με Ser, Ala, ή, σπανιότερα, Val, Leu, ή άλλη πλευρική ομάδα αμινοξέος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεταφορέα ελεύθερου κυστεϊνών (Cys-less). Στη συνέχεια, εφόσον επιτευχθεί η δημιουργία ενός λειτουργικού Cys-less μεταφορέα, εισάγονται νέα κατάλοιπα κυστεϊνών σε επιλεγμένες θέσεις. Ακολουθεί λειτουργικός έλεγχος των νέων μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεΐνης και μελέτες αλκυλίωσης των κυστεϊνών των επιλεγμένων μεταλλαγμάτων με ειδικά SH-αντιδραστήρια. Οι μελέτες της επίδρασης SH-αντιδραστηρίων επί συγκεκριμένων θέσεων οδηγούν σε συμπεράσματα για τον ρόλο των συγκεκριμένων καταλοίπων στον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων και στην ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων δομής – λειτουργίας.

1.2.2 Ο μεταφορέας λακτόζης LacY της *E. coli* ως πρότυπο μελέτης των πρωτεϊνών δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς

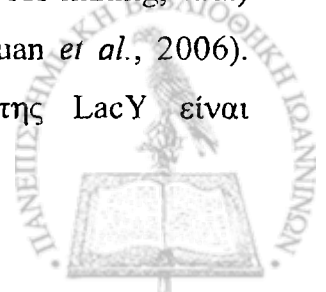
Κλασικό υπόδειγμα μελέτης για τις πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς, αποτελεί η διαπεράση λακτόζης LacY της *E. coli*, στην οποία η εφαρμογή των τεχνικών μεταλλαξιγένεσης επί σειρά ετών, οδήγησε σε πολύ ικανοποιητικά μοντέλα δομής-λειτουργίας που δεν απέχουν από όσα απεκάλυψαν, πρόσφατα, οι κρυσταλλικές της δομές (Frillingos *et al.*, 1998, Sahin-Toth *et al.*, 2000a, Kaback *et al.*, 2001, Sorgen *et al.*, 2002, Abramson *et al.*, 2003, Mizra *et al.*, 2006). Η διαπεράση LacY αποτελεί το κλασικό και καλύτερα μελετημένο μοριακό μοντέλο μηχανισμού ενεργού μεταφοράς και, πιο συγκεκριμένα, συμμεταφοράς μικρομορίου:ιόντος. Πρόκειται για το προϊόν του δεύτερου δομικού γονιδίου (*lacY*) του οπερονίου (συνεργειώματος) της λακτόζης (*lac* operon) και αποτελεί ιστορικά το πρώτο γονίδιο διαμεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφοράς που κλωνοποιήθηκε σε ανασυνδυασμένη μορφή, υπερεκφράσθηκε (Teather *et al.*, 1978) και προσδιορίστηκε ως προς την αλληλουχία του (Buchel *et al.*, 1980). Επίσης, έχει δειχθεί ότι μπορεί να λειτουργεί ως μονομερές, δομικά και λειτουργικά ανεξάρτητο στη μεμβράνη των κυττάρων (Sahin-Toth *et al.*, 1994, Guan *et al.*, 2002). Η LacY ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (MFS, Major Facilitator Superfamily) (Saier, 2000), μια από τις πολυμελέστερες ταξινομικές ομάδες πρωτεϊνών μεταφοράς, που απαντάται σε όλα τα είδη οργανισμών, από τα αρχαία μέχρι και τα θηλαστικά. Ο μεταφορέας LacY χρησιμοποιεί την ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται από την διαμεμβρανική μετακίνηση των πρωτονίων για να οδηγήσει στη συσσώρευση γαλακτοσιδίων ενάντια στη



διαβάθμιση συγκέντρωσης. Αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας που οργανώνονται σε δύο διακριτές δομικές περιοχές (domains), οι οποίες συγκροτούνται από τις έξι (6) πρώτες διαμεμβρανικές α-έλικες (N_6 domain) και τις έξι (6) τελευταίες διαμεμβρανικές α-έλικες (C_6 domain), αντίστοιχα. Οι δύο αυτές περιοχές (domains) συνδέονται μεταξύ τους με μια εκτενή υδρόφιλη κυτταροπλασματική αλληλουχία 50 περίπου καταλοίπων. Τόσο το αμινοτελικό άκρο όσο και το καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζονται κυτταροπλασματικά (Calamia and Manoil, 1990, Wolin and Kaback, 1999, 2001).

Πρόσφατα, δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή με ανάλυση 3.5 Å της LacY, συμπλεγμένης με το υπόστρωμα (β-D-γαλακτοπυρανοσύλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο, TDG), χρησιμοποιώντας μια μεταλλαγμένη μορφή της, την LacY-C154G (Εικόνα 1.3A) (Abramson *et al.*, 2003). Η μεταλλαγμένη αυτή μορφή της LacY επιλέχθηκε με βάση προηγούμενες μοριακές και βιοχημικές μελέτες λόγω του ότι δεσμεύει το υπόστρωμα (λακτόζη ή άλλο γαλακτοσίδιο) με υψηλή συγγένεια, αλλά έχει αμελητέα ικανότητα να το μεταφέρει, ενώ, επιπλέον, δεν υπόκειται σε σημαντικές αλλαγές διαμόρφωσης κατά την δέσμευση του υποστρώματος, είναι θερμοσταθερή και παρουσιάζει μικρή τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων (Smirnova and Kaback, 2003). Η κρυσταλλική δομή του μορίου εμφανίζει δύο περιοχές (domains), κάθε μια των οποίων περιέχει έξι υδρόφοβες α-έλικες προσανατολισμένες προς αντίθετες κατευθύνσεις μεταξύ τους. Η δομή αυτή δείχνει, ότι η πρωτεΐνη LacY μπορεί να λειτουργήσει ως μονομέρες, κάτι που είχε αναφερθεί και από προηγούμενες μελέτες (Sahin-Toth *et al.*, 1994). Οι τρισδιάστατες δομές των δύο αυτών περιοχών φαίνεται να είναι όμοιες, παρά το ότι δεν παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία αμινοξέων τους. Σε όψη παράλληλη προς το επίπεδο της μεμβράνης, η πρωτεΐνη εμφανίζει μια εσωτερική υδρόφιλη κοιλότητα, ανοικτή προς την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Μέσα σε αυτή την κοιλότητα βρίσκεται προσδεμένο το υπόστρωμα TDG, σε ίση απόσταση και προς τις δύο πλευρές της μεμβράνης (Abramson *et al.*, 2003). Η διαμόρφωση αυτή αντιστοιχεί στο στάδιο 4 (Εικόνα 1.2) ή D (Εικόνα 1.4) του μηχανισμού λειτουργίας.

Η δομή των Abramson *et al.*, (2003) επιβεβαιώνει συμπεράσματα προηγούμενων ετών που προήλθαν από πειράματα μεταλλαξιγένεσης στοχευμένης θέσης σε συνδυασμό με βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες (μεταλλαξιγένεση σάρωσης κυστεϊνών, κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, φθορισμομετρία, διασταυρούμενη σύνδεση κυστεϊνών/cross-linking, κ.α.) (Frillingos *et al.*, 1998, Kaback *et al.*, 2001, Guan and Kaback, 2006, Guan *et al.*, 2006). Μόνο έξι (6) κατάλοιπα από το σύνολο των 417 καταλοίπων της LacY είναι



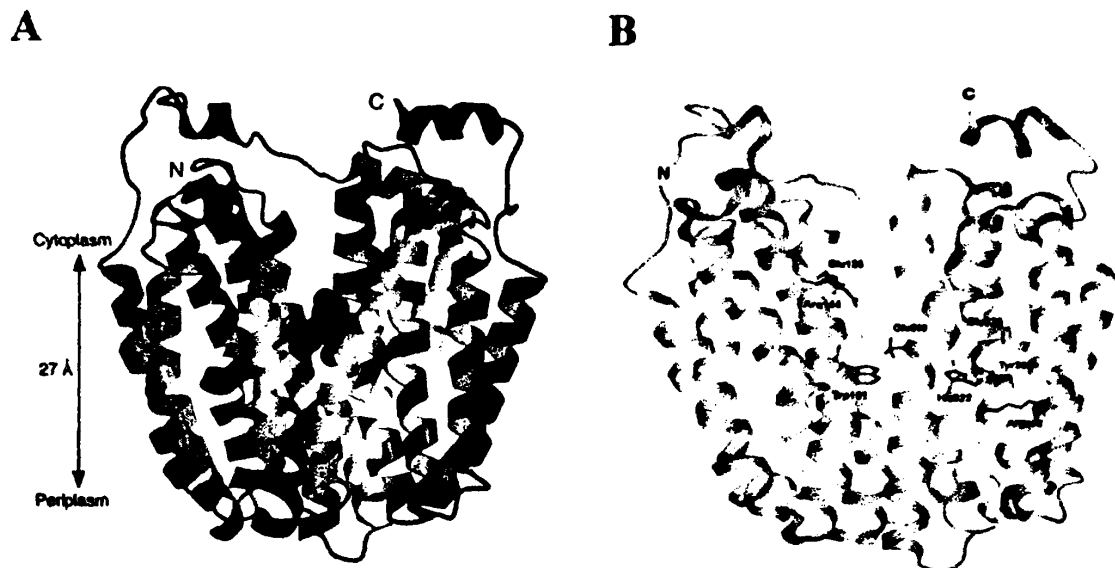
αναντικατάστατα για την πρόσδεση του υποστρώματος [Glu126 (έλικα 4), Arg144 (έλικα 5)] και/ή για την μετακίνηση του H^+ [Glu269 (έλικα 8), Arg302 (έλικα 9), His322 (έλικα 10) και Glu325 (έλικα 10)] (Frillingos *et al.*, 1998). Από την κρυσταλλική δομή, επιβεβαιώθηκε ότι η Arg144 στην έλικα 5 δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου στις θέσεις 3 και 4 του γαλακτοπυρανοσυλικού δακτυλίου, επιβεβαιώνοντας τον αναντικατάστατο ρόλο του καταλοίπου αυτού στην αναγνώριση και πρόσδεση υποστρώματος (Venkatesan and Kaback, 1998, Sahin-Toth *et al.*, 1999, Abramson *et al.*, 2003). Το Glu126 της έλικας 4, ένα ακόμη αναντικατάστατο κατάλοιπο αμινοξέος, είναι γειτονικό με την Arg144 στην τριτοταγή δομή και πιθανώς αλληλεπιδρά με τα άτομα οξυγόνου στις θέσεις 4, 5 ή 6 του γαλακτοπυρανοσυλικού δακτυλίου. Άμεση αλληλεπίδραση της Arg144 και του Glu126 δεν φαίνεται από την συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή (που αντιστοιχεί στη διαμόρφωση 4 ή (Εικόνα 1.2) ή D (Εικόνα 1.4) στον κύκλο μεταφοράς), ωστόσο τα δύο αυτά κατάλοιπα έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν μέσω σχηματισμού ιοντικής γέφυρας από βιοχημικές-βιοφυσικές αναλύσεις (Frillingos *et al.*, 1997b, Venkatesan and Kaback, 1998, Zhao *et al.*, 1999a, b). Η Trp151 της έλικας 5, ένα κατάλοιπο σημαντικό για την πρόσδεση του υποστρώματος (Guan *et al.*, 2003, Vazquez-Ibar *et al.*, 2003, 2004), δημιουργεί αλληλεπίδραση επισώρευσης (stacking) με τον γαλακτοπυρανοσυλικό δακτύλιο. Το Glu269 της έλικας 8, το οποίο είναι σημαντικό τόσο για την πρόσδεση του υποστρώματος όσο και για την μεταφορά του H^+ , πιθανώς αλληλεπιδρά με το άτομο οξυγόνου στη θέση 3 του γαλακτοπυρανοσυλικού δακτυλίου (Weinglass *et al.*, 2003), δημιουργεί ιοντική γέφυρα με την Arg144, καθώς και δεσμούς υδρογόνου με την Trp151 της έλικας 5 (Vazquez-Ibar *et al.*, 2004). Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι, οι επαφές του Glu269 της καρβοξυ-τελικής περιοχής με την Arg144 και την Trp151 της αμινο-τελικής περιοχής είναι πιθανόν κομβικής σημασίας για τη σύζευξη (coupling) μεταξύ της δέσμευσης του γαλακτοσιδικού υποστρώματος και της συμμεταφοράς H^+ .

Τα κατάλοιπα His322, Glu325 και Arg302, τα οποία είναι αναντικατάστατα για την ενεργότητα της LacY (Roeppe and Kaback, 1989, Frillingos *et al.*, 1998), φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην μετακίνηση του πρωτονίου (Kaback *et al.*, 2001, Guan and Kaback, 2006). Η His322 είναι πιθανόν ο δότης H^+ στο Glu325 και η Arg302 αλληλεπιδρά πιθανόν με το Glu325 οδηγώντας το σε αποπρωτονίωση (Kaback *et al.*, 2001, Sahin-Toth and Kaback, 2001). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη δομή (Abramson *et al.*, 2003) με προσδεμένο το υπόστρωμα, δεν μπορεί να φανεί καμιά άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των His322, Glu325 και Arg302.



Δύο ακόμη κρυσταλλικές δομές ελεύθερες υποστρώματος, σε υψηλότερη ανάλυση (2.95 και 3.3 Å για τις δομές σε pH 6.5 και 5.6, αντίστοιχα), της LacY-C154G (**Εικόνα 1.3B**), ήλθαν στη συνέχεια για να δώσουν απαντήσεις σε ερωτήματα που παρέμεναν σχετικά με τον μηχανισμό της συζευγμένης μεταφοράς υποστρώματος: H^+ , προτείνοντας ένα πιο διεξοδικό μοντέλο μηχανισμού της συμμεταφοράς λακτόζη: H^+ από τη συγκριτική ανάλυση των τριών κρυσταλλογραφικών δομών (Mizra *et al.*, 2006). Σύμφωνα με το ολοκληρωμένο αυτό μοντέλο (**Εικόνα 1.4**), απουσία υποστρώματος, η πρωτεΐνη βρίσκεται αρχικά σε μια ασταθή διαμόρφωση ανοικτή προς τον περιπλαστικό χώρο (**A**) και η Glu269 μπορεί να πρωτονιωθεί (**B**). Στη διαμόρφωση αυτή, τα ουσιαστικά κατάλοιπα για την πρόσδεση υποστρώματος (Arg144, Glu126 και Glu269) δεν είναι στην καταλληλότερη θέση για να δεσμεύσουν το υπόστρωμα. Ωστόσο, τα κατάλοιπα Trp151 και Glu269 είναι διευθετημένα σε αντίθετες γειτονικές θέσεις μεταξύ της αμινο-τελικής και καρβοξυ-τελικής περιοχής, στην κορυφή της υδρόφιλης κοιλότητας του μορίου. Η αρχική αναγνώριση του σακχάρου από το κατάλοιπο Trp151 (Guan *et al.*, 2003, Vazquez-Ibar *et al.*, 2003), προσανατολίζει τα κατάλοιπα Arg144 και Glu269 στην κατάλληλη διαμόρφωση για την ειδική δέσμευση του γαλακτοσιδικού υποστρώματος, με υψηλή συγγένεια, και επάγει την αποπρωτονίωση της Glu269 (**C**). Σαν συνέπεια, διασπάται η ιοντική γέφυρα μεταξύ των Arg144 και Glu126 και δημιουργείται μια νέα ιοντική γέφυρα μεταξύ των Arg144 και Glu269. Ο μοριακός αυτός διακόπτης μεταξύ Glu126/Arg144 και Arg144/Glu269, ενεργοποιείται ουσιαστικά από την δέσμευση του υποστρώματος και λειτουργεί ολοκληρώνοντας τον σχηματισμό του κέντρου δέσμευσης. Το πρωτόνιο απελευθερώνεται από το Glu269 και προσλαμβάνεται από την His322, προκαλώντας εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία οδηγείται πλέον σε μια δομή που είναι ανοικτή προς την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, συγκρατώντας το γαλακτοσιδικό υπόστρωμα με χαμηλή συγγένεια (**D**). Στη συνέχεια, το υπόστρωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (**E**) και η ιοντική γέφυρα μεταξύ των Arg144 και Glu269 διασπάται για να ξαναδημιουργηθεί η ιοντική γέφυρα μεταξύ των Arg144 και Glu126. Ακολουθεί η απελευθέρωση του πρωτονίου (**F**), η οποία συνδέεται με μια μείωση του pKa του Glu325, είτε λόγω της προσέγγισης του στην Arg302 (Kaback *et al.*, 2001, Sahin-Toth and Kaback, 2001) είτε λόγω της έκθεσης του στον υδατικό διαλύτη μέσω της υδρόφιλης κοιλότητας του μορίου (το pH του κυτταροπλάσματος είναι στο 7.6) ή και στα δύο. Μετά την απελευθέρωση του πρωτονίου, η πρωτεΐνη επιστρέφει στην αρχική της διαμόρφωση προς την πλευρά του περιπλάσματος (**A**).

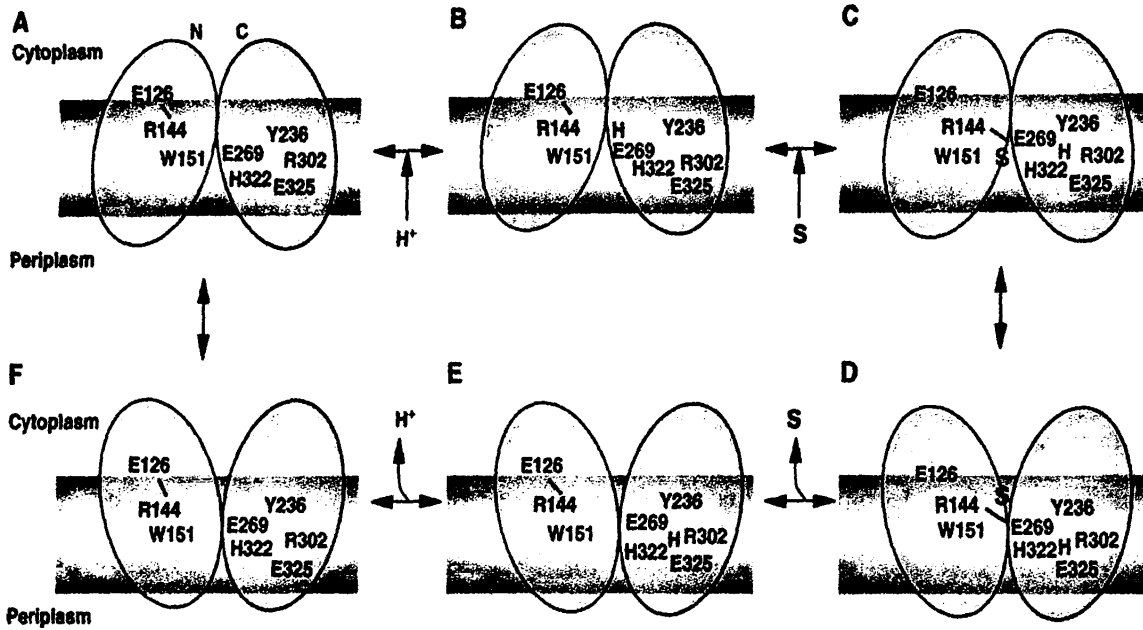




Εικόνα 1.3: Κρυσταλλικές δομές της LacY, όπως έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία

A: Η κρυσταλλική δομή της LacY με το υπόστρωμα, παράλληλα με την μεμβράνη (Abramson *et al.*, 2003). Οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες φαίνονται με διαφορετικό χρώμα η κάθε μια. Το υπόστρωμα TGD φαίνεται προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (με μαύρο χρώμα) το οποίο είναι ανοικτό προς την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης (Διαμόρφωση D, Εικόνα 1.4).

B: Η κρυσταλλική δομή της LacY χωρίς συνδεδεμένο υπόστρωμα, σε όψη παράλληλη προς την μεμβράνη (Mizra *et al.*, 2006). Οι 12 διαμεμβρανικές α-έλικες εμφανίζονται και πάλι οργανωμένες σε δύο ψευδοσυμμετρικές περιοχές. Μεταξύ της αμινο-τελικής και καρβοξυ-τελικής περιοχής α-ελίκων, δημιουργείται μια εσωτερική κοιλότητα ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα. Τα κατάλοιπα που είναι σημαντικά για τη δέσμευση του υποστρώματος (Glu126, Arg144 και Trp151) φαίνονται με κίτρινο χρώμα, ενώ αυτά που εμπλέκονται στη μετακίνηση του H^+ (Tyr236, Arg302, His322 και Glu325) φαίνονται με ροζ χρώμα. Το κατάλοιπο Glu269 που φαίνεται με γαλάζιο χρώμα εμπλέκεται τόσο στη δέσμευση του υποστρώματος όσο και στη μετακίνηση του H^+



Εικόνα 1.4: Πιθανός μηχανισμός συμμεταφοράς λακτόζης: H^+

Η αμινο-τελική και καρβοξύ-τελική περιοχή της LacY φαίνονται με κίτρινα ωσειδή σχήματα. Το H^+ και το γαλακτοσιδικό υπόστρωμα φαίνονται με πράσινο και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Οι ιοντικές γέφυρες μεταξύ αντίθετα φορισμένων καταλοίπων φαίνονται με λεπτές γραμμές

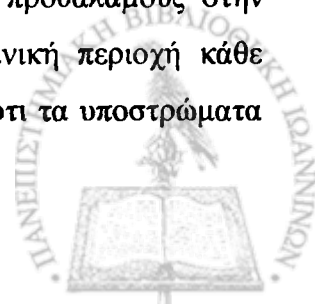
1.2.3 Κρυσταλλικές δομές άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου

1.2.3.1. Μεταφορέας GIpT

Πρόσφατα δημοσιεύθηκε η υψηλής ευκρίνειας κρυσταλλική δομή (3.3 Å) του αντιμεταφορέα τριφωσφορικής γλυκερόλης/ανόργανου φωσφόρου GIpT της *E. coli* (Lemieux *et al.*, 2004), ενός ακόμη μέλους της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (MFS) (Saier, 2000). Η κρυσταλλική δομή (Εικόνα 1.5A) αφορά μια διαμόρφωση όπου η πρωτεΐνη είναι ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα και παρουσιάζει δύο παρόμοιες περιοχές (domains) που συνδέονται μεταξύ τους με ένα μεγάλο υδρόφιλο συνδετικό τμήμα. Οι δύο περιοχές παρουσιάζουν συμμετρία και αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα α-ελίκων η κάθε μία. Στο κέντρο των περιοχών αυτών δημιουργείται το ενεργό κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος. Συνολικά, η δομή της GIpT είναι πολύ παρόμοια με αυτήν της LacY που ανήκει στην ίδια υπεροικογένεια (Abramson *et al.*, 2004)

1.2.3.2. Μεταφορέας AcrB

Ένα ακόμη παράδειγμα μεμβρανικού μεταφορέα που έχει κρυσταλλωθεί με ευκρίνεια 3.5 Å αποτελεί ο μεταφορέας AcrB της *E. coli* (Murakami *et al.*, 2002). Ο μεταφορέας αυτός συνεργαζόμενος με μια ακόμη ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη (AcrA) και με έναν διάυλο της εξωτερικής μεμβράνης (TolC), καταλύει την εκροή μιας μεγάλης ποικιλίας τοξικών ουσιών από το εσωτερικό του κυττάρου κατευθείαν στο θρεπτικό μέσο, παρακάμπτοντας το περίπλασμα (Zgurskaya and Nikaido, 1999, Nikaido, 2000), χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική ενέργεια διαβάθμισης πρωτονίων (Thanassi *et al.*, 1997). Η κρυσταλλική δομή (Εικόνα 1.5B) παρουσιάζει τρία πρωτομερή AcrB που είναι οργανωμένα ως ομοτριμερές εν είδει “μέδουσας”. Κάθε πρωτομερές αποτελείται από μια διαμεμβρανική περιοχή των 50 Å και από ένα προεξέχον “κράνος” των 70 Å. Η κορυφή του κράνους ανοίγει εν είδει χοάνης μέσω της οποίας το TolC ενδέχεται να αγκυροβολεί στην AcrB. Ένας πόρος που δημιουργείται από τρεις α-έλικες συνδέει τη χοάνη αυτή με μια κεντρική κοιλότητα στο βάθος του κράνους. Η κοιλότητα έχει τρεις προθαλάμους στην πλευρά του κράνους που οδηγούν στο περίπλασμα. Στην διαμεμβρανική περιοχή κάθε πρωτομερές έχει 12 διαμεμβρανικές α-έλικες. Η όλη δομή υποδεικνύει ότι τα υποστρώματα



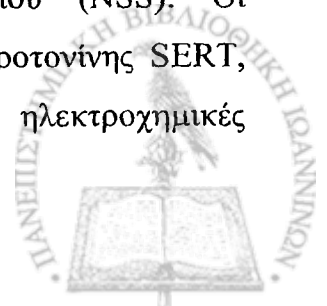
που μεταφέρονται τόσο από το εσωτερικό του κυττάρου διαμέσου της διαμεμβρανικής περιοχής όσο και από το περίπλασμα διαμέσου του προθαλάμου, περισυλλέγονται στην κεντρική κοιλότητα και, στη συνέχεια, μεταφέρονται μέσω του πόρου στον διάυλο του To1C.

1.2.3.3. Μεταφορέας Glt_{PH}

Οι μεταφορείς γλουταμικού είναι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που καταλύουν την πρόσληψη γλουταμικού από τη σύναψη στον ενδοκυτταρικό χώρο χρησιμοποιώντας προϋπάρχουσες διαβαθμίσεις ιόντων (Slotboom *et al.*, 1999). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι μεταφορείς γλουταμικού είναι ουσιώδεις για την φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία και εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως εμφάνιση εμφράγματος, επιληψία και νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή με ευκρίνεια 3.2 Å, ενός ομολόγου των ευκαρυωτικών μεταφορέων γλουταμικού από το υπερθερμόφιλο αρχαίο *Pyrococcus horikoshii* Glt_{PH} (Yemool *et al.*, 2004). Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του Glt_{PH} με πολλαπλές σημειακές μεταλλάξεις και 7 κατάλοιπα ιστιδινών σε μη-συντηρημένες θέσεις των προβλεπόμενων συνδετικών τμημάτων και η οποία μπορεί να εκφραστεί ετερόλογα στη μεμβράνη της *E. coli* K-12 σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η δομή (Εικόνα 1.5Γ) δείχνει ότι ο μεταφορέας Glt_{PH} είναι ένα τριμερές σε μορφή αβαθούς λεκάνης με ένα υδρόφιλο κοίλωμα ανοικτό προς την εξωκυτταρική πλευρά στον υδατικό διαλύτη. Στο κατώτατο όριο του ανοικτού αυτού κοιλώματος δημιουργούνται τρεις ανεξάρτητες θέσεις δέσμευσης υποστρώματος (binding sites), κάθε μια από τις οποίες διαμορφώνεται από δύο φουρκέτες στο μέσον διαμεμβρανικών ελίκων, που προσεγγίζουν από αντίθετες θέσεις της μεμβράνης. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η μεταφορά του γλουταμικού επιτυγχάνεται με κινήσεις των φουρκετών αυτών, οι οποίες επιτρέπουν εναλλακτική προσβασιμότητα του κέντρου δέσμευσης από τις δύο πλευρές της μεμβράνης.

1.2.3.4. Μεταφορέας LeuT_{Aa}

Μια ακόμη κρυσταλλική δομή ενός μεταφορέα δευτερογενούς τύπου αφορά έναν μεταφορέα της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών/νατρίου (NSS). Οι μεταφορείς NSS στον άνθρωπο, όπως για παράδειγμα ο μεταφορέας σεροτονίνης SERT, τερματίζουν την μετάδοση σήματος στη σύναψη χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικές

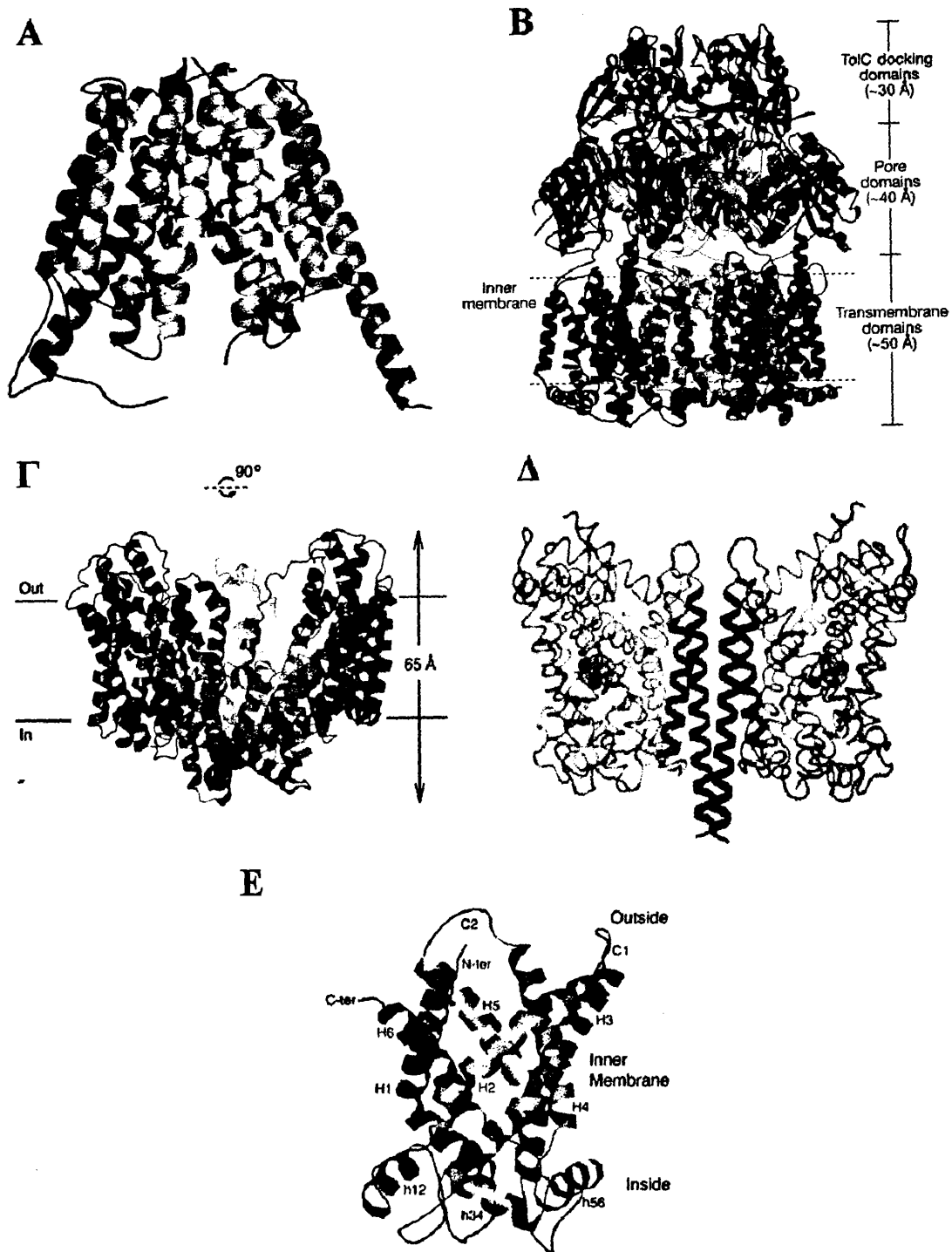


διαβαθμίσεις, με τις οποίες επιτρέπουν την επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών από τη σύναψη στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων και της νευρογλοίας. Οι μεταφορείς αυτοί αποτελούν στόχους πολλών θεραπευτικών και ψυχοτρόπων ουσιών, ενώ η δυσλειτουργία τους έχει συσχετισθεί με πολλές ασθένειες του νευρικού συστήματος. Η κρυσταλλική δομή (Εικόνα 1.5Δ), με εξαιρετικά υψηλή ευκρίνεια (1.9 Å), αφορά ένα βακτηριακό ομόλογο των μεταφορέων αυτών από το θερμοφίλο βακτήριο *Aquifex aeolicus* (LeuT_{La}) σε διαμόρφωση όπου είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο υποστρώματος λευκίνης και δύο ιόντα νατρίου (Yamashita *et al.*, 2005). Ο πυρήνας της πρωτεΐνης αποτελείται από τα δέκα πρώτα διαμεμβρανικά τμήματα, με την περιοχή των τμημάτων 1-5 να εμφανίζει ψευδοσυμμετρία προς αυτή των 6-10 μέσω ενός υποθετικού άξονα συμμετρίας στο επίπεδο της μεμβράνης. Η λευκίνη και τα δύο ιόντα νατρίου εμφανίζονται προσδεδεμένα εντός του πυρήνα της πρωτεΐνης, στο μέσον της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, σε μια αποκλεισμένη θέση δέσμησης όπου απουσιάζουν μόρια ύδατος. Το κρυσταλλωμένο πρωτεϊνικό μόριο εμφανίζεται ως ομοδιμερές, με δύο τέτοιες θέσεις δέσμησης. Οι θέσεις δέσμησης της λευκίνης και των ιόντων καθορίζονται από μερικώς αποδιπλωμένες α-έλικες, με τα άτομα της πεπτιδικής αλυσίδας και τα δίπολα των ελίκων να έχουν κεντρικό ρόλο στην δέσμηση των υποστρωμάτων αυτών.

1.2.3.5. Αντιμεταφορέας ATP/ADP

Τέλος, πρόσφατα έχει δημοσιευθεί η κρυσταλλική δομή (Εικόνα 1.5Ε) του αντιμεταφορέα ATP/ADP του βοός (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003), που ανήκει στην μεγάλη οικογένεια μεταφορέων των μιτοχονδρίων (MCF). Η δομή αυτή δόθηκε σε μεγάλη αναλυτική ευκρίνεια (2.2 Å) χρησιμοποιώντας την μεμβρανική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με έναν ισχυρό αναστολέα, το καρβοξυατρακτυλοσίδιο (carboxyatractyloside), το οποίο παγιδεύει τη διαμόρφωση προς την πλευρά που είναι ανοικτή στον διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο (Berg *et al.*, 2005). Ένα ομοδιμερές από δύο μόρια των έξι διαμεμβρανικών α-ελίκων διαμορφώνει μια συμπαγή διαμεμβρανική περιοχή, η οποία αποκαλύπτει ένα βαθύ κοιλώμα στην επιφάνεια προς τον χώρο μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών. Τα υποστρώματα δεσμεύονται στο κατώτατο όριο του κοιλώματος αυτού, και η μεταφορά τους, κατά τους συγγραφείς, επάγεται από την παροδική μετάπτωση του κοιλώματος σε διάυλο μεταφοράς νουκλεοτιδικών υποστρωμάτων.





Εικόνα 1.5: Κρυσταλλικές δομές των:

A: μεταφορέας GlpT της *E. coli* (Lemieux *et al.*, 2004)

B: μεταφορέας AcrB της *E. coli* (Murakami *et al.*, 2002)

Γ: μεταφορέας Glt_{ph} του *Pyrococcus horikoshii* (Yernool *et al.*, 2004)

Δ: μεταφορέας LeuT_{Aa} του *Aquifex aeolicus* (Yamashita *et al.*, 2005)

E: αντιμεταφορέας ATP/ADP (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003)



1.3 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Η μεταφορά των πουρινών και πυριμιδινών αποτελεί μια βασική βιολογική διαδικασία τόσο για τους προκαρυωτικούς όσο και για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πρόσφατες μελέτες μοριακής γενετικής και φυσιολογίας, αποδεικνύουν 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) και Μυκήτων (Diallinas *et al.*, 1998, Koukaki *et al.*, 2005, Goudela *et al.*, 2005, 2006). Παρόμοια βιολογικά συστήματα μεταφοράς είναι πλέον γνωστό ότι υπάρχουν στα περισσότερα είδη οργανισμών που περιλαμβάνουν είδη Φυτών (Argyrou *et al.*, 2001, Maurino *et al.*, 2006), Μεταζώων (Yao *et al.*, 2002, Kato *et al.*, 2006) και Πρωτίστων (de Koning *et al.*, 2005).

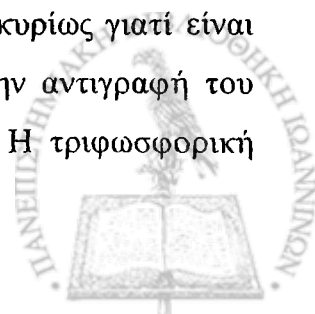
Πολύ λίγα μέλη της ευρύτερης οικογένειας των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί μέχρι σήμερα. Μόνο ένας μικρός αριθμός μικροβιακών γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων έχει κλωνοποιηθεί. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ταξινόμησης (TC system), στην οικογένεια αυτή έχουν καταταχθεί πολλές πιθανές πρωτεΐνες, των οποίων η φυσιολογική λειτουργία παραμένει αδιευκρίνιστη και οι αλληλουχίες τους παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία προς τους γνωστούς μικροβιακούς μεταφορείς.

Στη συνέχεια, θα εξετάσουμε τη σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων για τους οργανισμούς και, κατ' επέκταση, τη σημασία της μελέτης των συστημάτων μεταφοράς των μορίων αυτών στα κύτταρα. Επίσης, θα αναφέρουμε τις οικογένειες των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και θα επεκταθούμε στα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν για την οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2 family), στην οποία ανήκουν και οι μεταφορείς που μελετάμε στην παρούσα διατριβή.

1.3.1 Σημασία της μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

1.3.1.1. Ρόλος των νουκλεοτιδικών βάσεων στην επιβίωση των οργανισμών

Οι νουκλεοτιδικές βάσεις παίζουν ρόλο κλειδί στην επιβίωση όλων των κυττάρων. Εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες της ζωής σε όλους τους οργανισμούς κυρίως γιατί είναι απαραίτητες για τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και συνεπώς, για την αντιγραφή του γονιδιώματος και τη μεταγραφή των γενετικών πληροφοριών σε RNA. Η τριφωσφορική



αδενοσίνη (ATP) που αποτελεί το παγκόσμιο νόμισμα ελεύθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα είναι ένα νουκλεοτίδιο που περιέχει την αζωτούχο βάση αδενίνη. Ένας σημαντικός αριθμός βιομορίων όπως τα NAD^+ , NADP^+ και το συνένζυμο A, σχηματίζονται από ATP. Είναι επίσης γνωστό ότι, παράγωγα νουκλεοτιδίων, όπως η UDP-γλυκόζη, συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες όπως ο σχηματισμός του γλυκογόνου και ότι τα νουκλεοτίδια είναι ουσιώδη συστατικά των μονοπατιών μεταγωγής σημάτων. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως η κυκλική AMP και η κυκλική GMP είναι δεύτεροι αγγελιοφόροι που μεταβιβάζουν σήματα τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και μεταξύ τους (Berg *et al.*, 2005).

Ωστόσο, η φύση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας αποτελεί επιλεκτικό και αποτελεσματικό εμπόδιο στη διέλευση των νουκλεοτιδικών βάσεων. Η διαμεμβρανική μεταφορά των νουκλεοτιδικών βάσεων επιτυγχάνεται με την παρουσία εξειδικευμένων διαμεμβρανικών μεταφορέων. Η μεταφορά των νουκλεοτιδικών βάσεων έχει μελετηθεί κατά κύριο λόγο στα βακτήρια των ειδών *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis* (Andersen *et al.*, 1995, Schultz *et al.*, 2001, Johansen *et al.*, 2003), στους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida albicans* (Goudela *et al.*, 2005, 2006, Paluszynski *et al.*, 2006) και στον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Koukaki *et al.*, 2005, Vlantzi *et al.*, 2006, Pantazopoulou *et al.*, 2006). Στους περισσότερους από αυτούς τους μικροοργανισμούς, η αξιοποίηση των πουρινών και των πυριμιδινών πραγματοποιείται με δύο κύριες λειτουργίες. Η μία αφορά τη χρήση εξωγενών βάσεων για τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και η άλλη είναι καταβολική, όπου οι πουρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως πηγές αζώτου (Vogels and van der Drift 1976, Scazzocchio, 1994). Μελέτες σε φυσιολογικό και γενετικό επίπεδο έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για ειδικούς μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών σε βακτήρια και μύκητες. Επίσης, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα αρχαία μπορούν να προσλαμβάνουν νουκλεοτιδικές βάσεις από το θρεπτικό τους υλικό (Stuer-Lauridsen and Nygaard 1998) και ένας μεγάλος αριθμός αλληλουχιών των αρχαίων με άγνωστη λειτουργία παρουσιάζει ομοιότητες με τους καθιερωμένους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων των βακτηρίων και των μυκήτων.

Η βιοχημεία των πουρινών και των πυριμιδινών παίζει κεντρικό ρόλο στην αύξηση και εξέλιξη των φυτών. Η σύνθεση του DNA και του RNA, στηρίζεται στην σταθερή παραγωγή νέων νουκλεοτιδίων και η ανανέωση των νουκλεϊκών οξέων είναι αποτέλεσμα του καταβολισμού των νουκλεοτιδίων μέσω των μονοπατιών περίσωσης (Ross, 1981). Στα τροπικά όσπρια, η μεταφορά και αποθήκευση του αζώτου με τη μορφή των ουρεΐδων (αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό) εξαρτάται από την βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων αλλά και



από τον καταβολισμό τους (Schubert and Boland, 1990). Επίσης, από τις νουκλεοτιδικές βάσεις παράγονται άλλες ενώσεις όπως κυτοκινίνες, καφεΐνη και αλκαλοειδή. Η αφομοίωση και η μεταφορά πουρινών έχει μελετηθεί στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Οι βάσεις αδερίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη και ουρικό οξύ είναι καλές πηγές αζώτου για την ανάπτυξη του φυτού αυτού. Οι πουρίνες αυτές προσλαμβάνονται μέσω δύο, τουλάχιστον, υψηλής συγγένειας και εξειδίκευσης συστημάτων μεταφοράς (Vogels and van der Drift, 1976). Πρόσφατα, έχουν προσδιοριστεί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων από την *Arabidopsis thaliana* (Gillissen *et al.*, 2000, Maurino *et al.*, 2006) και το καλαμπόκι, *Zea mays* (Argyrou *et al.*, 2001).

Τα παρασιτικά πρωτόζωα τα οποία προκαλούν πολλές από τις πιο σοβαρές και διαδεδομένες ασθένειες στο άνθρωπο όπως την ελονοσία, την λειψμανίαση, την τρυπανοσωμίαση και την τοξοπλάσμάτωση, έχουν απόλυτη ανάγκη για πουρίνες διότι δεν μπορούν να τις συνθέσουν *de novo* (Hammond and Gutteridge, 1984). Επομένως, δεν είναι παράξενο ότι τα πρωτόζωα εμφανίζονται να έχουν πολλαπλά συστήματα μεταφοράς νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων, ικανά να προσλαμβάνουν όλες ή τις περισσότερες πουρίνες από το εξωτερικό τους περιβάλλον. Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων στα πρωτόζωα παρουσιάζουν συνήθως υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα τους και μάλιστα τις περισσότερες φορές πολύ μεγαλύτερες συγγένειες από ό,τι οι αντίστοιχοι μεταφορείς των θηλαστικών, ώστε να μπορούν να προσλαμβάνουν τις νουκλεοτιδικές βάσεις ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις από το αίμα ή το κυτταρόπλασμα των θηλαστικών (de Koning and Jarvis 1997a, b).

Τα κύτταρα των θηλαστικών ζώων διαθέτουν συστήματα τόσο παθητικής όσο και ενεργού μεταφοράς των νουκλεοτιδικών βάσεων τα οποία έχουν χαρακτηριστεί σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και ιστούς. Η αδερίνη, η γουανίνη και η υποξανθίνη οδηγούνται στα μονοπάτια περίσωσης πουρινών για την παραγωγή υψηλής ενέργειας φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως ATP και GTP και για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ή οξειδώνονται καταβολικά σε ξανθίνη, ουρικό οξύ ή ουρεΐδες (Fox and Kelley, 1978). Το ουρικό οξύ, ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, έχει επιπρόσθετη σημασία όχι μόνο για τη φυσιολογική λειτουργία των νεφρών αλλά και λόγω της ιδιότητας του να δρά ως αντιοξειδωτικό μόριο στον ορό του αίματος (Faaland *et al.*, 1998, Tsukaguchi *et al.*, 1999, de Koning and Diallinas 2000).



1.3.1.2. Ιατρική και φαρμακολογική σημασία των νουκλεοτιδικών βάσεων

Πέραν της φυσιολογικής τους σημασίας στους διάφορους οργανισμούς, η μελέτη των νουκλεοτιδικών βάσεων είναι ιδιαίτερα σημαντική εξαιτίας του γεγονότος ότι πολλά δομικά ανάλογα τους χρησιμοποιούνται εκτενώς ως αντιμικροβιακά, αντιϊικά και αντικαρκινικά φάρμακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η 5-φθοροουρακίλη (5-Fluorouracil, 5-FU), ένα από τα πιο συνηθισμένα αντικαρκινικά φάρμακα. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση πολλών τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, του στομάχου, του εντέρου και μερικών τύπων καρκίνου του δέρματος. Η 5-φθοροουρακίλη αναστέλλει τα ένζυμα που απαιτούνται για τη σύνθεση των πυριμιδινών με συνέπεια να εμποδίζεται η σύνθεση DNA. Όπως είναι γνωστό τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ταχύτατα και χρειάζονται μεγάλη ποσότητα νουκλεοτιδίων, όπως του θυμιδυλικού (TMP), για τη σύνθεση του DNA. Η ευπάθεια των κυττάρων αυτών στην αναστολή της σύνθεσης του θυμιδυλικού έχει αξιοποιηθεί στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλλοπουρινόλη (4-υδροξυπυραζολο-3,4-*d*-πυριμιδίνη) η οποία μαζί με τον πρωτογενή μεταβολίτη της, οξυπουρινόλη, χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά φάρμακα. Επιπλέον, η αλλοπουρινόλη χρησιμοποιείται εκτενώς και για την αντιμετώπιση της υπερουριχαιμίας η οποία είναι συναφής με την ουρική αρθρίτιδα και άλλες μεταβολικές νόσους (Rodnan *et al.*, 1975). Οι ουσίες αυτές αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου οξειδάση ξανθίνης (Spector and Johns, 1970) με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η σύνθεση του ουρικού οξέος από την οξείδωση των νουκλεοτιδικών βάσεων υποξανθίνης και ξανθίνης.

Άλλα δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα αποτελούν τα acyclovir (9-{2-υδροξυ-αιθοξυ}μεθυλο}-9H-γουανίνη) (Gnapp *et al.*, 1983, Elion, 1993) και ganciclovir (διϋδροξυ-προποξυ-μεθυλο-γουανίνη) (Martin *et al.*, 1983, Matthews and Boehme, 1988). Πρόκειται για ανάλογα γουανίνης που χρησιμοποιούνται ως αντιϊικά φάρμακα και, συγκεκριμένα, εναντίον των ερπητοϊών: αναστέλλουν την ιϊκή DNA πολυμεράση με συνέπεια να εμποδίζεται η σύνθεση του ιϊκού DNA.

Ωστόσο, η χρήση των αναλόγων νουκλεοτιδικών βάσεων ως φαρμάκων δεν έχει βασιστεί έως σήμερα σε συστηματική μελέτη των μοριακών μηχανισμών πρόσληψης τους από τα κύτταρα στόχους, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μειωμένη αποδοτικότητα κατά την κλινική εφαρμογή τους. Ορισμένες από τις βασικότερες αιτίες της μειωμένης



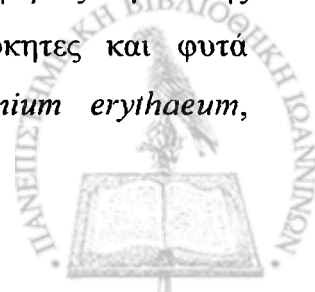
αποδοτικότητας των φαρμάκων αυτών μπορεί να είναι: (α) σοβαρές παρενέργειες λόγω της κυτταροτοξικής δράσης τους σε δευτερογενείς στόχους, (β) μη πρόσληψη τους από τα κύτταρα-στόχους *in vivo*, (γ) ανεπιθύμητη δευτερογενής επαγωγή ανθεκτικότητας στα κύτταρα-στόχους. Είναι σαφές, επομένως, ότι η πλήρης κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αναγνώρισης και πρόσληψης των διαφόρων νουκλεοτιδικών αναλόγων μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση νέων, πιο αποτελεσματικών, πρωτοκόλλων θεραπείας και στο σχεδιασμό νέων καταλληλότερων φαρμάκων.

1.3.2 Οικογένειες μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων

Οι χαρακτηρισμένοι μέχρι σήμερα μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων, καθώς επίσης και οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ομολογία με αυτούς, έχουν ταξινομηθεί σε έξι οικογένειες. Η κατάταξη αυτή έγινε με βάση τρία κυρίως κριτήρια που είναι: (α) η υψηλή ταυτότητα (>21%) και ομοιότητα (>40%) καταλοίπων μεταξύ των αλληλουχιών των μελών, (β) παρόμοια προφίλ υδροφοβικότητας με παρουσία 10-14 διαμεμβρανικών τμημάτων α-έλικας και (γ) συντηρημένες αλληλουχίες «μοτίβα» σε ομόλογες θέσεις αλληλουχίας. Η αναγνώριση τέτοιων αλληλουχιών «μοτίβων» διευκολύνει ιδιαίτερα την ταξινόμηση των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες οικογένειες, ακόμα και όταν οι αλληλουχίες στο σύνολο τους παρουσιάζουν μικρή σχετικά ομολογία με τις αντίστοιχες των χαρακτηρισμένων μελών (De Koning and Diallinas, 2000).

Η πρώτη και πιο διαδεδομένη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων είναι γνωστή ως οικογένεια Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων –Ασκορβικού (Nucleobase – Ascorbate Transporters, NAT) (de Koning and Diallinas, 2000) ή οικογένεια-2 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων – Κατιόντων (Nucleobase – Cation Symporters-2, NCS2) (TC 2.A.40, <http://www.tcdb.org>). Για την οικογένεια αυτή θα μιλήσουμε αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

Η δεύτερη οικογένεια, η οποία αναγνωρίστηκε πρόσφατα, ονομάζεται οικογένεια Μεταφορέων Πουρινών AzgA (Purine Transporters, AzgA) και αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα AzgA (TC 2.A.1.40, <http://www.tcdb.org>) του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* που μεταφέρει τις νουκλεοτιδικές βάσεις αδενίνη-υποξανθίνη-γουανίνη (Cecchetto *et al.*, 2004, Goudela *et al.*, 2006). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μεταφορείς άγνωστης λειτουργίας από διάφορους οργανισμούς όπως αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά (*Neurospora crassa*, *S. pombe*, *A. thaliana*, *P. abyssi*, *Trichodesmium erythraeum*,



Staphylococcus sp., *Pseudomonas sp.*). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο μεταφορέας AzgA δεν παρουσιάζει σημαντικές ομολογίες στην αλληλουχία του με κανένα χαρακτηρισμένο μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων. Ένας ακόμη μεταφορέας που έχει ταξινομηθεί στην οικογένεια αυτή προέρχεται από το Gram-θετικό βακτήριο *B. subtilis* και είναι ο PbuG που μεταφέρει υποξανθίνη και γουανοσίνη (Johansen *et al.*, 2003). Η προβλεπόμενη τοπολογία των μεταφορέων της οικογένειας είναι συμβατή με την ύπαρξη 10-12 διαμεμβρανικών τμημάτων α-έλικας (Cecchetto *et al.*, 2004, Goudela *et al.*, 2006).

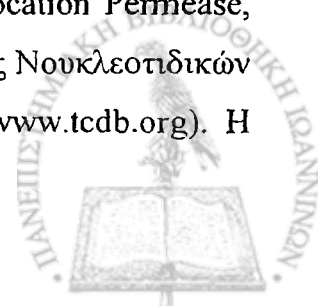
Η τρίτη οικογένεια, γνωστή ως οικογένεια Μεταφορέων Σχετιζόμενων με Πουρίνες (Purine Related Transporters, PRT) (de Koning & Diallinas, 2000) ή οικογένεια-1 Συμμεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων – Κατιόντων (Nucleobase – Cation Symporters-1, NCS1) (TC 2.A.39, <http://www.tcd.org>), αποτελείται από πάνω από διακόσιες πρωτεΐνες προερχόμενες από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, αρχαία και φυτά. Μέλη αυτής της οικογένειας με γνωστή λειτουργία, είναι οι μεταφορείς ουρακίλης Fur4 των *S. cerevisiae* και *S. pombe* (Jund *et al.*, 1988), ο μεταφορέας αλλαντοΐνης Dal4 του *S. cerevisiae* (Yoo *et al.*, 1992) οι μεταφορείς αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης-κυτοσίνης Fcy2 του *S. cerevisiae* (Weber *et al.*, 1990) και Fcy21p του ζυμομύκητα *C. albicans* (Goudela *et al.*, 2006), ο μεταφορέας κυτοσίνης CodB της *E. coli* (Danielsen *et al.*, 1992) και ο μεταφορέας αλλαντοΐνης PucI του *B. subtilis* (Schultz *et al.*, 2001). Αλληλουχίες άγνωστης λειτουργίας που έχουν καταταχθεί στην οικογένεια αυτή έχουν εντοπισθεί σε διάφορους οργανισμούς, όπως *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *E. coli*, *A. nidulans*, *B. subtilis*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *P. abyssi* και *Aeropyrum pernix* (de Koning and Diallinas, 2000). Οι μεταφορείς αυτοί αποτελούνται συνήθως από 10-12 διαμεμβρανικά τμήματα α-ελίκων (Danielsen *et al.*, 1995, De Montigny *et al.*, 1998) και έχει δειχθεί ότι εκτελούν συμμεταφορά του υποστρώματός τους με πρωτόνια (Pinson *et al.*, 1997).

Η τέταρτη οικογένεια, γνωστή ως οικογένεια Μεταφορέων Εξισορρόπησης συγκεντρώσεων Νουκλεοσιδίων (Equilibrative Nucleoside Transporters, ENT) (TC 2.A.57, <http://www.tcd.org>) περιλαμβάνει μεταφορείς που μεταφέρουν νουκλεοσίδια και νουκλεοτιδικές βάσεις. Πολύ καλά μελετημένοι είναι οι ENT μεταφορείς στον άνθρωπο, hENT1, hENT2 (Griffiths *et al.*, 1997a, b), hENT3 (Baldwin *et al.*, 2005) και οι ομόλογοι τους στον επίμυ rENT1 και rENT2 (Yao *et al.*, 1997). Επίσης, έχουν μελετηθεί και οι ομόλογοι ENT μεταφορείς στο ποντίκι, mENT1, mENT2 (Kiss *et al.*, 2000) και mENT3 (Baldwin *et al.*, 2005). Ομόλογα τους υπάρχουν σε μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδεις σκώληκες και άλλα θηλαστικά εκτός του ανθρώπου, του επίμυ και του ποντικού. Πρόκειται



για ευρείας εξειδίκευσης μεταφορείς πουρινικών και πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και των κυτταροτοξικών αναλόγων τους που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα. Ο hENT2 μεταφέρει επιπλέον πουρίνες (υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη) και πυριμιδίνες (θυμίνη και ουρακίλη) και αποτελεί τον πρώτο αναγνωρισμένο μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων στα θηλαστικά (Hyde *et al.*, 2001, Yao *et al.*, 2002) και ο hENT3 μεταφέρει αδενίνη (Baldwin *et al.*, 2005). Ιδιαίτερα καλά μελετημένοι είναι και οι ENT μεταφορείς στα πρωτόζωα *Plasmodium falciparum* (PfNT1, μεταφορέας νουκλεοσιδίων/αναλόγων, αδενίνης, υποξανθίνης) (Carter *et al.*, 2000a) και *Toxoplasma gondii* (TgAT, μεταφορέας αδενοσίνης και πιθανός μεταφορέας υποξανθίνης και γουανίνης) (Chiang *et al.*, 1999). Μεταφορείς νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων έχουν ταυτοποιηθεί και στα πρωτόζωα *Trypanosoma brucei* και *Leishmania donovani*. Πρόκειται για τρεις μεταφορείς στην *L. donovani* (LdNT1.1 και LdNT1.2, μεταφορείς αδενοσίνης και πυριμιδινών και LdNT2, μεταφορέας ινoσίνης και γουανοσίνης) (Vasudevan *et al.*, 1998, Carter *et al.*, 2000b, Liu *et al.*, 2006) οι οποίοι χρησιμοποιούν την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων και κάνουν συμμεταφορά των υποστρωμάτων τους με πρωτόνια (Stein *et al.*, 2003). Πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί και δύο μεταφορείς στη *Leishmania* που μεταφέρουν μόνο νουκλεοτίδια και όχι νουκλεοσίδια. Πρόκειται για τον μεταφορέα υποξανθίνης, ξανθίνης, αδενίνης και γουανίνης LmaNT3 (Sanchez *et al.*, 2004), και τον μεταφορέα ουρακίλης LmU1 (Parageorgiou *et al.*, 2005). Στο *Trypanosoma brucei brucei*, έχουν χαρακτηριστεί, οι μεταφορείς P1 τύπου (TbNT2, μεταφορέας αδενοσίνης, ινoσίνης, γουανοσίνης) και P2 τύπου (TbAT1, μεταφορέας αδενοσίνης και αδενίνης) (Sanchez *et al.*, 1999, Maser *et al.*, 1999, Landfear *et al.*, 2004, de Koning *et al.*, 2005) καθώς επίσης και ο μεταφορέας NBT1 που μεταφέρει νουκλεοτιδικές βάσεις (αδενίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, γουανίνη), νουκλεοσίδια (γουανοσίνη και ινoσίνη) και αλλοπουρινόλη (Burchmore *et al.*, 2003). ENT μεταφορείς έχουν επίσης εντοπισθεί και στα γονιδιώματα των *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* και *A. thaliana* (Vickers *et al.*, 2000). Η τοπολογία τους χαρακτηρίζεται από την παρουσία 10-11 διαμεμβρανικών α-ελίκων με το αμινοτελικό τους άκρο να εντοπίζεται κυτταροπλασματικά και το καρβοξυτελικό τους άκρο περιπλασματικά (Sundaram *et al.*, 2001, Hyde *et al.*, 2001).

Οι δύο επόμενες οικογένειες απαντώνται μόνο στα φυτά. Πρόκειται για τις οικογένειες των Διαπερασών Οργανοκατιόντων των Φυτών (Plant Organocation Permease, POP) (TC 2.A.7.14, <http://www.tcdb.org>) και των Μεταφορέων Πρόσληψης Νουκλεοτιδικών Βάσεων (Nucleobase Uptake Transporters, NBUT) (TC 2.A.7.19, <http://www.tcdb.org>). Η



οικογένεια POP περιλαμβάνει μεταφορείς υποστρωμάτων σχετιζόμενων με πουρίνες. Ο μόνος μεταφορέας της οικογένειας αυτής που έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά είναι ο AIPUP1 της *A. thaliana*, ο οποίος είναι εξειδικευμένος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων (αδενίνη, κυτοσίνη) και κάνει συμεταφορά των υποστρωμάτων του με πρωτόνια (Gillissen *et al.*, 2000). Ανάλογα πουρινών (π.χ. υποξανθίνη), φυτοορμόνες (π.χ. κυτοκινίνες) και αλκαλοειδή (π.χ. καφεΐνη) υποδειχθηκαν ισχυροί αναστολείς της πρόσληψης αδενίνης και κυτοσίνης από τον μεταφορέα, υποστηρίζοντας ότι μπορεί να είναι υποστρώματα του (Gillissen *et al.*, 2000, Burkle *et al.*, 2003). Η οικογένεια αυτή επίσης περιλαμβάνει 15 παράλογα της *A. thaliana* και αρκετές αλληλουχίες από άλλα φυτά.

Η οικογένεια NBUT αποτελείται από μεταφορείς που έχουν ως υποστρώματα ουρεΐδες, κυτοσίνες και άλλα ανάλογα υποστρώματα. Αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας αυτής είναι οι μεταφορείς αλλαντοΐνης A1UPS1 και A1UPS2 της *A. thaliana*. Πρόκειται για τους πρώτους μεταφορείς αλλαντοΐνης που έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά σε φυτά. Μεταφέρουν επίσης ουρικό οξύ και ξανθίνη (Desimone *et al.*, 2002). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι μεταφορείς αυτοί βρέθηκε να μεταφέρουν ουρακίλη και το ανάλογο της 5-φθοροουρακίλη όταν εκφράζονται ετερόλογα σε μύκητες ή ωκότταρα *Xenopus* (Schmidt *et al.*, 2004). Η οικογένεια συγκροτείται από 5 παράλογα της *A. thaliana* τα οποία παρουσιάζουν ταυτότητα καταλοίπων 64-82% και από παρόμοιες αλληλουχίες από άλλα φυτά. Οι A1UPS μεταφορείς αποτελούνται από 10 διαμεμβρανικά τμήματα με μία εκτενή κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή (Desimone *et al.*, 2002). Ένας ακόμη μεταφορέας της οικογένειας αυτής που παρουσιάζει 60-75% ταυτότητα καταλοίπων με τον A1UPS1 της *A. thaliana* ταυτοποιήθηκε πρόσφατα στον φασόλο, *Phaseolus vulgaris*. Πρόκειται για τον μεταφορέα PνUPS1 που έχει ως βασικό υπόστρωμα την αλλαντοΐνη αλλά δεσμεύει και τις οξειδωμένες πουρίνες ουρικό και ξανθίνη (Pelissier *et al.*, 2004).

1.3.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2

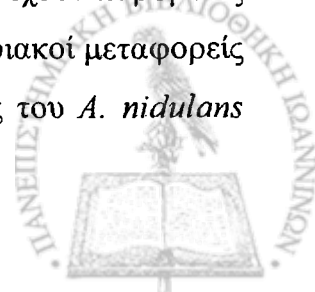
Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 είναι η μεγαλύτερη και πιο συντηρημένη οικογένεια νουκλεοτιδικών βάσεων. Περιλαμβάνει περισσότερα από 500 μέλη από άλλα σχεδόν τα είδη οργανισμών όπως Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά και θηλαστικά, εξαιρουμένων μόνο των εκφυλισμένων γονιδιωμάτων ορισμένων ζυμομυκήτων, παρασιτικών πρωτοζώων και ενδοπαρασιτικών βακτηρίων (de



Koning and Diallinas, 2000). Τα μέλη της οικογένειας αυτής, που προέρχονται από μικροοργανισμούς ή φυτά, είναι ειδικοί μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρινών ή πυριμιδινών) (de Koning and Diallinas, 2000). Ωστόσο, τα αντίστοιχα μέλη της οικογένειας που προέρχονται από θηλαστικά, είναι ειδικοί μεταφορείς L-ασκορβικού (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων των θηλαστικών, όπως για παράδειγμα ο μεταφορέας ουρικού URAT1 (Enomoto *et al.*, 2002), δεν ανήκουν στην οικογένεια αυτή και δεν παρουσιάζουν καμία εμφανή ομολογία με τους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2.

Παρά τον μεγάλο αριθμό μελών που απαρτίζουν την οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2, ελάχιστα μέλη έχουν κλωνοποιηθεί και μελετηθεί σε γενετικό και μοριακό επίπεδο ως σήμερα. Έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά οι μεταφορείς του ασκομύκητα *A. nidulans* UapA (μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης) (Diallinas & Scazzocchio 1989, Gorfinkiel *et al.*, 1993, Diallinas *et al.*, 1995, 1998, Meintanis *et al.*, 2000, Amillis *et al.*, 2001, 2004) και UapC (μεταφορέας πουρινών με ευρύτερη εξειδίκευση) (Diallinas *et al.*, 1995), οι μεταφορείς ουρικού/ξανθίνης Lpe1 της *Zea mays* (Argyrou *et al.*, 2001) και Xut1 του ζυμομύκητα *C. albicans* (Goudela *et al.*, 2005), οι μεταφορείς ξανθίνης PbuX και ουρικού PucJ και PucK του βακτηρίου *B. subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997, Schultz *et al.*, 2001), οι μεταφορείς ουρακίλης UraA της *E. coli* (Andersen *et al.*, 1995) και PyrP του *Lactococcus lactis* (Turner *et al.*, 1994, Martinussen *et al.*, 2001), και οι μεταφορείς ασκορβικού οξέος SVCT1 και SVCT2 των θηλαστικών (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες μεταφορέων ανάλογα με το υπόστρωμα τους. Μεταφορείς οξειδωμένων πουρινών (ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος), μεταφορείς ουρακίλης και μεταφορείς L-ασκορβικού (βιταμίνης C), που συναντάμε μόνο στα θηλαστικά. Εκτός από τους μεταφορείς SVCT1 και SVCT2 που λειτουργούν ως συμμεταφορείς ασκορβικού:Na⁺ (Tsukaguchi *et al.*, 1999), ο μόνος εκτενώς μελετημένος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT, είναι ο UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* (Diallinas *et al.*, 1995, 1998, Meintanis *et al.*, 2000, Amillis *et al.*, 2001, 2004), που λειτουργεί ως συμμεταφορέας ουρικού:H⁺ ή ξανθίνης:H⁺.

Όλες οι υπόλοιπες αλληλουχίες πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια NAT, έχουν αναγνωρισθεί με *in silico* αναλύσεις, με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω και οι λειτουργίες τους παραμένουν άγνωστες. Μεγαλύτερη ομολογία στην αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ των μελών της οικογένειας παρουσιάζεται μεταξύ μεταφορέων που έχουν παρόμοιες εξειδικεύσεις και/ή προέρχονται από σχετιζόμενους οργανισμούς. Οι βακτηριακοί μεταφορείς παρουσιάζουν μεταξύ τους 26-62% ταυτότητα καταλοίπων, οι μεταφορείς του *A. nidulans*



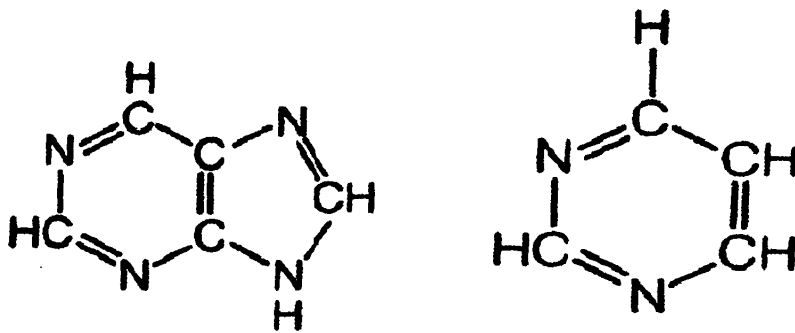
62%, οι φυτικοί μεταφορείς 50-65%, οι μεταφορείς του *C. elegans* 37-65% και οι μεταφορείς των θηλαστικών 33-65%. Οι μικροβιακοί μεταφορείς παρουσιάζουν 23-28% ομοιότητα με τους μεταφορείς των φυτών και των μεταζώων. Οι μεταφορείς των φυτών και των μεταζώων παρουσιάζουν 26-36% ομοιότητα μεταξύ τους. Οι μεταφορείς της *Drosophila* και των θηλαστικών παρουσιάζουν 30-42% ομοιότητα, ενώ των θηλαστικών και των μεταφορέων του *C. elegans* 25-36%. Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) δείχνει την ύπαρξη μιας αρχικής τριχοτόμησης, όπου η μια διακλάδωση περιλαμβάνει τους μεταφορείς των φυτών και των θηλαστικών, η δεύτερη τους μεταφορείς των βακτηριών και του *Aspergillus* και η τρίτη τα ομόλογα των αρχαίων (de Koning and Diallinas, 2000).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην οικογένεια μεταφορέων NAT ανήκουν, με βάση την αλληλουχία τους, και οι μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών. Οι νουκλεοτιδικές βάσεις και το ασκορβικό οξύ δεν παρουσιάζουν καμία δομική ομοιότητα μεταξύ τους (Εικόνα 1.6). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι το ασκορβικό και το ουρικό έχουν παρόμοιες και συμπληρωματικές λειτουργίες στα θηλαστικά. Είναι και οι δύο βασικές αντιοξειδωτικές ουσίες που απαλλάσσουν το πλάσμα του αίματος από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Ames *et al.*, 1981, Frei *et al.*, 1989, Nyssonen *et al.*, 1997). Το ασκορβικό οξύ επιπλέον, είναι απαραίτητο για αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου διατηρεί τα ιόντα μεταλλικών συμπαραγόντων στην ανηγμένη τους μορφή και απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες, προφυλάσσοντας τους ιστούς από οξειδωτική καταστροφή. Επιπλέον, το ουρικό οξύ σταθεροποιεί το ασκορβικό οξύ στα βιολογικά υγρά (Sevanian *et al.*, 1991). Η σπουδαιότητα του ουρικού οξέος ως αντιοξειδωτικού, είναι ιδιαίτερα εμφανής σε είδη που δεν μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό οξύ. Κατά πόσο το γεγονός αυτό είναι σύμπτωση ή έχει παίξει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του μεταφορέα ασκορβικού των θηλαστικών από έναν μεταφορέα ουρικού, παραμένει άγνωστο (Hediger, 2002a, b).

Η προβλεπόμενη τοπολογία στα περισσότερα μέλη της οικογένειας NAT αποτελείται από 12-14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας (TMSs) τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με μικρά υδρόφιλα συνδετικά τμήματα, με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό τους άκρο να εντοπίζονται κυτταροπλασματικά. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TMHMM (Εικόνα 1.7), αναλύσαμε όλους τους λειτουργικά χαρακτηρισμένους μεταφορείς της οικογένειας NAT ως προς την τοπολογία τους και διαπιστώσαμε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το τοπολογικό μοντέλο προβλέπει 12 διαμεμβρανικά τμήματα α-ελίκων αλλά η τοπολογία του C-τελικού ημίσεος (ιδιαίτερα των ελίκων 8-12) δεν είναι σαφής.

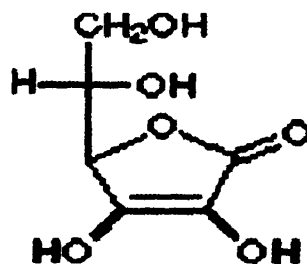


Παρά την σπουδαιότητα των μεταφορέων της οικογένειας αυτής, οι μελέτες που έχουν γίνει για τις σχέσεις δομής – λειτουργίας είναι περιορισμένες. Εκτενέστερα μελετημένη είναι η πρωτεΐνη UapA, ο εξειδικευμένος μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης του *A. nidulans* (Diallinas *et al.*, 1998, Meintanis *et al.*, 2000, Amilis *et al.*, 2001, Koukaki *et al.*, 2005, Vlanti *et al.*, 2006, Pantazopoulou and Diallinas, 2006). Σημαντικά, ωστόσο, ερωτήματα που αφορούν την επακριβή τοπολογία, τριτοταγή δομή, κέντρο δέσμευσης υποστρώματος και μηχανισμό μεταφοράς των υποστρωμάτων των μεταφορέων αυτών, εξακολουθούν να παραμένουν αναπάντητα.



Πουρίνη

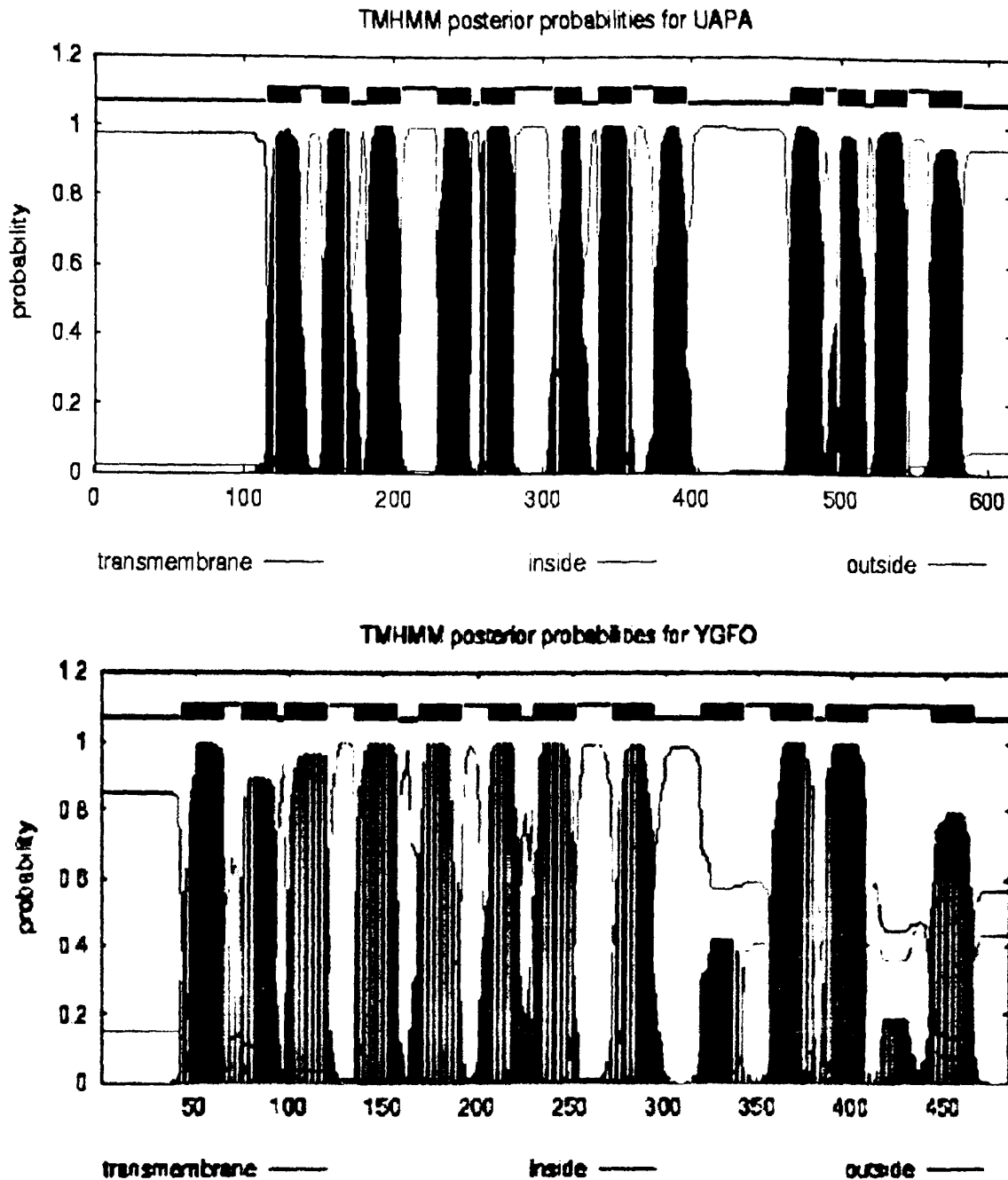
Πυριμιδίνη



Ασκορβικό οξύ

Εικόνα 1.6: Συντακτικός χημικός τύπος πουρίνης, πυριμιδίνης και ασκορβικού οξέος





Εικόνα 1.7: Προβλεπόμενο τοπολογικό μοντέλο των μελών της οικογένειας NAT, YgfO και UapA

Με κόκκινες οριζόντιες μπάρες παρουσιάζονται τα 12 διαμεμβρανικά τμήματα. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι περιοχές που εντοπίζονται κυτταροπλασματικά, ενώ με ροζ χρώμα οι περιοχές που εντοπίζονται περιπλασματικά. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται η πιθανότητα της σωστής πρόβλεψης και στον κάθετο άξονα ο αριθμός των θέσεων αμινοξέων της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>)

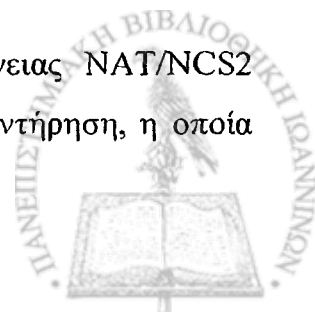


1.3.4 Ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* και το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2

Ο πολυκυτταρικός ασκομύκητας *A. nidulans* είναι ικανός να προσλαμβάνει πουρίνες και πυριμιδίνες από το περιβάλλον του. Στο σύστημα του *Aspergillus*, οι πουρίνες, σε αντίθεση με τις πυριμιδίνες, μπορούν να καταβολιστούν πλήρως και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου. Στον μύκητα αυτό, η πρόσληψη των πουρινών πραγματοποιείται από τρεις πρωτεΐνες μεταφορείς: UapA, UapC και AzgA (Scazzocchio, 1994, Diallinas *et al.*, 1995). Η πρωτεΐνη UapA είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης, καθώς και των αναλόγων τους 2-θειουρικό, 2-θειοξανθίνη, αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη (Diallinas and Scazzocchio, 1989, Gorfinkiel *et al.*, 1993). Η πρωτεΐνη UapC είναι ένας χαμηλής ικανότητας μεταφορέας όλων των πουρινών και των αναλόγων τους (Diallinas *et al.*, 1995). Η πρωτεΐνη AzgA είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας αδεΐνης, γουανίνης και υποξανθίνης (Cecchetto *et al.*, 2004).

Το εκτενέστερα μελετημένο μέλος της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2 family) αποτελεί ο μεταφορέας UapA. Το γονίδιο *uapA* αφού κλωνοποιήθηκε (Diallinas and Scazzocchio, 1989) και προσδιορίστηκε ως προς την αλληλουχία του (Gorfinkiel *et al.*, 1993), μελετήθηκε εκτενώς σε γενετικό και μοριακό επίπεδο με ανάλυση χημικών πρωτεϊνών μεταξύ των UapA και UapC, σε συνδυασμό με πειράματα μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης και καταστολής από μεταλλάξεις δεύτερης θέσης (second-site suppressor) επιλεγμένων μεταλλαγμάτων της UapA (Diallinas *et al.*, 1998, Meintanis *et al.*, 2000, Amilis *et al.*, 2001, Koukaki *et al.*, 2005, Vlanti *et al.*, 2006). Τα πειράματα αυτά υπέδειξαν μια ευρεία περιοχή 70 περίπου καταλοίπων της UapA η οποία θεωρήθηκε κρίσιμη για την αναγνώριση των υποστρωμάτων και την εξειδίκευση των μεταφορέων. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του 8^{ου} και 9^{ου} διαμεμβρανικού τμήματος στο τοπολογικό μοντέλο των 12 διαμεμβρανικών τμημάτων. Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση των χημικών πρωτεϊνών, δημιουργήθηκε μια ακόμη χημική πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από την UapA μετά από αντικατάσταση της περιοχής των 70 αυτών καταλοίπων με τα αντίστοιχα από την UapC. Πράγματι η χημική αυτή πρωτεΐνη συμπεριφέρθηκε λειτουργικά ως μεταφορέας UapC (Diallinas *et al.*, 1998).

Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας μελών της οικογένειας NAT/NCS2 (Εικόνα 1.8), υπέδειξε μια μικρότερη περιοχή αλληλουχίας με υψηλή συντήρηση, η οποία



περιλαμβάνεται στην ευρύτερη περιοχή που ανακαλύφθηκε από τα πειράματα των χιμαιρικών πρωτεϊνών. Η περιοχή αυτή αποτελείται από 10 αμινοξέα [⁴⁰⁸(Q/E/P)NKGXXXXT(K/R/G)⁴¹⁷] (η αρίθμηση αντιστοιχεί στον μεταφορέα UapA, όπου X είναι υδρόφοβο αμινοξύ και με έντονη γραφή είναι τα αμινοξέα που εμφανίζουν υψηλή συντήρηση) και ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (Diallinas *et al.*, 1998, Meintanis *et al.*, 2000). Τα κατάλοιπα N409, G411 και T416 είναι απόλυτα συντηρημένα μεταξύ των μελών της οικογένειας από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Η θέση 409 παρουσιάζει υψηλή συντήρηση μεταξύ των μελών, ως γλουταμίνη (Q) κυρίως στους μεταφορείς πουρινών του *A. nidulans* (UapA, UapC), του *B. subtilis* (PbuX, PucJ), της *C. albicans* (Xut1) και τα ομόλογα της *E. coli* (YgfO, YicE), γλουταμικό (E) στους μεταφορείς ουρακίλης (UraA, PyrP) και στους μεταφορείς πουρινών των φυτών (Lpe1) και προλίνη (P) στους μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών (SVCT1, SVCT2). Όσον αφορά τη θέση 417, και εκεί παρατηρείται υψηλή συντήρηση, ως λυσίνη (K) ή αργινίνη (R) στους μεταφορείς ασκορβικού (SVCT1, SVCT2), ουρακίλης (UraA, PyrP), ουρικού (PucJ), ή ουρικού/ξανθίνης (UapA, UapC, Xut1, Lpe1) και γλυκίνη (G) στους ομόλογους μεταφορείς της *E. coli* (YgfO, YicE) και στον μεταφορέα ξανθίνης του *B. subtilis* (PbuX).

Οι μελέτες σε επίπεδο σχέσεων δομής – λειτουργίας στον μεταφορέα UapA συνεχίστηκαν με μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης στα συντηρημένα κατάλοιπα του μοτίβου «υπογραφή» της οικογένειας. Από δοκιμασίες ανάπτυξης και μοριακές και κινητικές αναλύσεις, διαπιστώθηκε ότι δύο τουλάχιστον θέσεις του μοτίβου «υπογραφή» (Q408 και N409) εμπλέκονται στην πρόσδεση των υποστρωμάτων με τον πουρινικό δακτύλιο, είτε έμμεσα, επηρεάζοντας τις αλλαγές διαμόρφωσης του μεταφορέα κατά τη δέσμευση υποστρώματος, είτε άμεσα, συμμετέχοντας στο κέντρο δέσμευσης (Meintanis *et al.*, 2000, Koukaki *et al.*, 2005). Επίσης, από πειράματα καταστολής από μεταλλάξεις δεύτερης θέσης επιλεγμένων μεταλλαγμάτων της UapA, βρέθηκε ένα αμινοξύ στο μέσον του 12^{ου} διαμεμβρανικού τμήματος (F528) το οποίο φαίνεται ότι δρα ως μοριακό φίλτρο που καθορίζει την αυστηρότητα εξειδίκευσης, στο μονοπάτι μεταφοράς πουρινών (Amilis *et al.*, 2001, Vlanti *et al.*, 2006).



YgfO	³¹⁵ GS-LPLTTFE	QNNQWIQMTG	VASRYVG ³⁴⁰	xanthine
YicE	³⁰⁸ NT-FPNSCFE	QNNQWIQLTG	VASRYVG ³¹³	xanthine
PbuX	³⁸⁴ NA-FPYTAFE	QNWELVQLTG	IKKNAWI ³⁰⁰	xanthine
PucJ	³⁸⁹ NA-FEYNTFA	QNAELLQLTK	VKTRNIV ³¹⁴	uric acid
Xut1	³⁰⁷ TK-TPKSVFA	QNNQWISITK	CANRQVG ³⁰²	uric acid/xanthine
UapA	³⁰⁹ TK-TPKTTFA	QNNQWIALTR	CANRWAG ³⁰⁹	uric acid/xanthine
UapC	³⁰⁶ TI-TPKSVFA	QNNQWIALTR	CANRKAG ³¹⁰	uric acid/xanthine
Lpel	³³¹ TL-TGTAASV	ENACLLAVTR	VGSREVI ³⁶⁰	uric acid/xanthine
UraA	³⁶¹ GS-TPNTTYG	ENIGVMAITR	VYSTWVI ³⁶⁶	uracil
PyrP	³³⁷ GA-EPVTSYG	ENIGVMAITK	IHSIYVI ³⁶⁰	uracil
SVCT1	³⁷⁶ GTGNGSTSSS	ENIGVLGITK	VGSREVV ⁴⁰⁴	L-ascorbic acid
SVCT2	⁴³⁷ GTGNGSTSSS	ENIGVLGITK	VGSREVI ⁴⁰³	L-ascorbic acid
Cons.	...s.p...f.	gN.Gv...T.	v...r.v.	

Εικόνα 1.8: Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας μελών της οικογένειας NAT/NCS2 στην περιοχή του μοτίβου «υπογραφή»

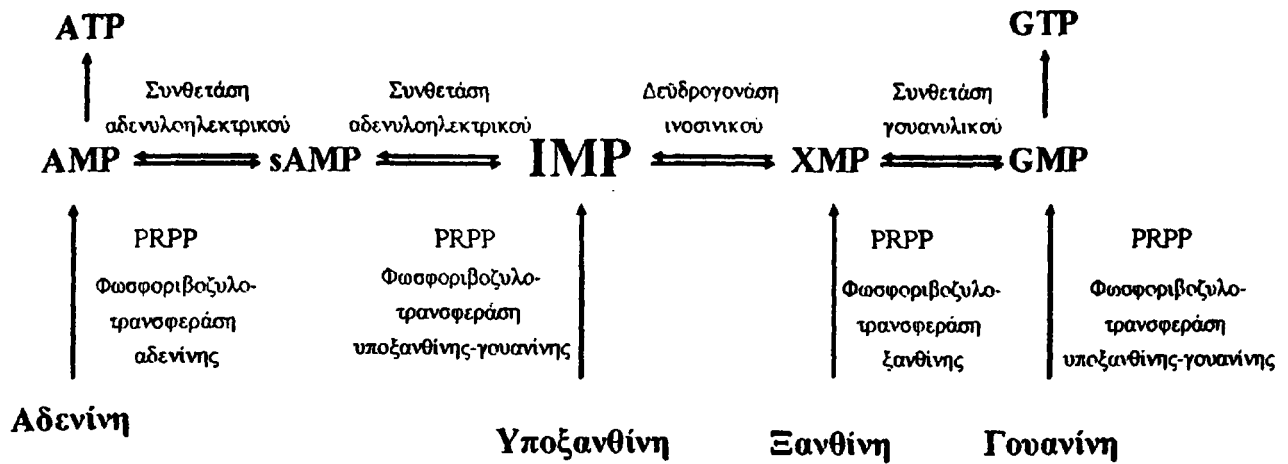


1.4 Πρόσληψη και μεταβολισμός πουρινών σε Βακτηριακά συστήματα

Οι πουρινικές βάσεις μπορούν να συντεθούν *de novo* αρχίζοντας από απλά αρχικά συστατικά όπως 5-φωσφοριβοζυλο-1-πυροφωσφορικό (PRPP), αμινοξέα, CO₂ και όξινο ανθρακικό. Εναλλακτικά, βάσεις πουρινών που απελευθερώνονται από την αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων, μπορούν να περισωθούν και να ανακυκλωθούν με ιδιαίτερη εξοικονόμηση ενέργειας μέσω των μονοπατιών περίσωσης (purine salvage pathways) (Εικόνα 1.9) ή να αποικοδομηθούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου (Εικόνα 1.10). Βασικό στάδιο του καταβολισμού των πουρινών είναι η οξειδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με το ένζυμο οξειδάση ξανθίνης. Ακολούθως πραγματοποιείται περαιτέρω αποικοδόμηση η οποία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών οργανισμών.

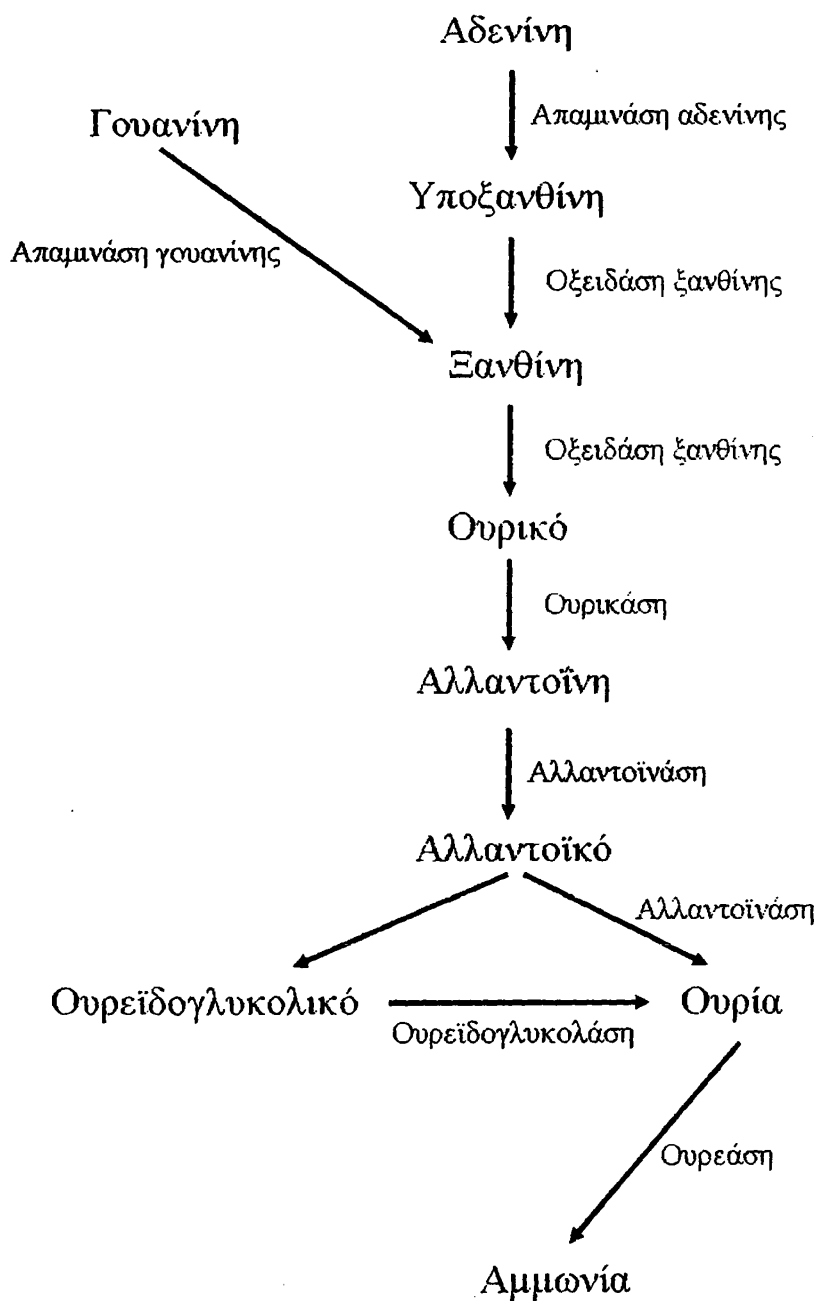
Μερικοί οργανισμοί αποικοδομούν τις πουρίνες πλήρως σε CO₂ και αμμωνία, ενώ άλλοι οργανισμοί διαθέτουν μερικά μόνο στάδια καταβολισμού των πουρινών, με αποτέλεσμα την μερική αποικοδόμηση τους. Στον άνθρωπο, στους πιθήκους, στα πτηνά, στα ερπετά και σε όλα σχεδόν τα έντομα, το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών είναι το ουρικό, λόγω της απουσίας των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τον περαιτέρω καταβολισμό του (ουρικάση, αλλαντοϊνάση, ουρεάση). Ωστόσο, σε άλλα ζώα, όπως στα θαλάσσια ασπόνδυλα και στα μαλάκια, τα ένζυμα αυτά υπάρχουν με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών να είναι η αμμωνία (Fujiwara and Noguchi, 1995). Στα περισσότερα φυτά, τελικά προϊόντα αποικοδόμησης των πουρινών είναι η αμμωνία και το CO₂ (Ashihara and Crozier, 2000). Τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες (Scazzocchio 1994, Schultz *et al.*, 2001) καταβολίζουν τις πουρίνες πλήρως σε ουρία και αμμωνία. Σημαντική εξαίρεση, μεταξύ άλλων, αποτελεί το εντεροβακτήριο *E. coli*, στο οποίο ο καταβολισμός των πουρινών φτάνει μέχρι την παραγωγή αλλαντοΐνης ή αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000).





Εικόνα 1.9: Μονοπάτι περίσωσης πουρινών

Στην Εικόνα φαίνεται το μονοπάτι περίσωσης των πουρινών καθώς επίσης και τα ένζυμα που καταλύουν το κάθε στάδιο. PRPP, 5-φωσφοριβοζυλο-πυροφωσφορικό, AMP, αδενυλικό, sAMP, αδενυλοηλεκτρικό, IMP, ινοσινικό, XMP ξανθυλικό, GMP, γουανυλικό, ATP, τριφωσφορική αδενοσίνη, GTP, τριφωσφορική γουανοσίνη



Εικόνα 1.10: Πορεία καταβολισμού των πουρινών

Στην Εικόνα φαίνεται το συνολικό μονοπάτι καταβολισμού των πουρινών καθώς και τα ένζυμα που καταλύουν το κάθε στάδιο καταβολισμού. Στην *E. coli* K-12, ο καταβολισμός των πουρινών φτάνει μέχρι την παραγωγή αλλαντοΐνης ή αλλαντοϊκού (Χι *et al.*, 2000)



Το Gram-θετικό βακτήριο *B. subtilis* έχει αναπτύξει ένα ιδιαίτερα ελεγχόμενο σύστημα για τη χρήση μιας σειράς μικρομοριακών ενώσεων ως πηγών αζώτου. όταν οι προτιμώμενες πηγές αζώτου, π.χ. γλουταμικό και αμμωνία, εξαντλούνται από το θρεπτικό μέσο. Ένα σύστημα τέτοιου τύπου έχει προσδιορισθεί στο είδος αυτό και για τη χρήση πουρινών ως πηγών αζώτου. Πράγματι, τόσο η αδενίνη, η υποξανθίνη και η ξανθίνη, όσο και το ουρικό, η αλλαντοΐνη και η ουρία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον *B. subtilis* ως πηγές αζώτου (Christiansen *et al.*, 1997, Cruz-Ramos *et al.*, 1997). Μελέτες αερόβιας ανάπτυξης στελεχών του *B. subtilis* υπέδειξαν ότι ο καταβολισμός των πουρινών φτάνει μέχρι την παραγωγή αμμωνίας και CO₂ (Christiansen *et al.*, 1997, Nygaard *et al.*, 2000, Schultz *et al.*, 2001).

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στα είδη των γενών *Bacillus* και *Escherichia*, τα γονιδιώματα των μεταφορέων πυριμιδινών και πουρινών καθώς και τα αντίστοιχα γονίδια καταβολισμού και βιοσύνθεσης νουκλεοτιδικών βάσεων είναι οργανωμένα σε οπερόνια (συνεργειώματα) και ρυθμίζονται σε μεταγραφικό επίπεδο από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων τους στο θρεπτικό μέσο. Συγκεκριμένα, στον *B. subtilis*, ο καταβολισμός της γουανίνης σε ξανθίνη, το πρώτο βήμα αποικοδόμησης της γουανίνης, πραγματοποιείται από το ένζυμο απαμινάση της γουανίνης. Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gde*, επάγεται όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (Nygaard *et al.*, 2000). Επίσης, 14 γονίδια που βρίσκονται σε μια ομάδα (cluster) γονιδίων στο 284-285 min του γονιδιώματος του *B. subtilis*, οργανώνονται σε μικρά οπερόνια, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ή ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι καταβολισμού και μεταφοράς των πουρινών και επάγονται από την παρουσία πουρινών στο θρεπτικό μέσο (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό και ουρικό) (Schultz *et al.*, 2001).

Στην περίπτωση του μεταφορέα ξανθίνης PbuX του *B. subtilis*, η έκφραση των γονιδίων του αντίστοιχου οπερονίου εξαρτάται από τη δράση του μεταγραφικού αναστολέα PurR και από την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων 5-φωσφοριβοζυλο-1-πυροφωσφορικού (PRPP). Ο μεταγραφικός αναστολέας PurR συνδέεται στους υποκινητές των εκάστοτε γονιδίων αναστέλλοντας τη μεταγραφή τους. Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει πουρίνες, αυξάνονται τα επίπεδα του PRPP, το οποίο με τη σειρά του συνδέεται με το μεταγραφικό αναστολέα PurR, εμποδίζοντας τον να συνδεθεί στον υποκινητή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων (Schultz *et al.*, 2001). Στον ίδιο οργανισμό, έχει χαρακτηριστεί και ένας δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκονται με τη μεταφορά (PbuX μεταφορέας



ξανθίνης, PbuG μεταφορέας υποξανθίνης-γουανίνης) και τη σύνθεση των πουρινών (Johansen *et al.*, 2003). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η παρουσία υποξανθίνης και γουανίνης στο θεραπευτικό μέσο, οδηγεί το σχηματισμό πρόωρου σήματος τερματισμού της μεταγραφής, εμποδίζοντας την RNA πολυμεράση να ολοκληρώσει την μεταγραφή, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων, σε σχέση με τα λειτουργικά, μεταγραφημάτων (Christiansen *et al.*, 1997, Johansen *et al.*, 2003). Η μετα-μεταγραφική αυτή ρύθμιση αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς του γενικότερου τύπου ρύθμισης που είναι γνωστός με το όνομα “riboswitches” (Mandal *et al.*, 2003, Mandal and Breaker, 2004).

Το Gram-αρνητικό βακτήριο *E. coli*, σε αντίθεση με τον *B. subtilis* και άλλα βακτήρια, δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει άλλες πουρίνες εκτός από αδερίνη (ή αδενοσίνη) σαν μοναδική πηγή αζώτου στην αερόβια ανάπτυξη της. Μπορεί ωστόσο, να χρησιμοποιήσει πουρίνες όπως υποξανθίνη, γουανίνη (γουανοσίνη) ή ξανθίνη (ξανθοσίνη) για να ενδυναμώσει την αερόβια ανάπτυξη όταν χρησιμοποιείται αμμώνιο ή ασπαρτικό ως βασική πηγή αζώτου (Xi *et al.*, 2000). Αν και οι παρατηρήσεις αυτές υπονοούν ότι οι εξωγενείς πουρίνες χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων διαμέσου των μονοπατιών περίσωσης τους (Zaklin and Nygaard 1996), είναι γνωστό ότι οι πουρίνες καταβολίζονται μερικώς μέχρι την παραγωγή της αλλαντοΐνης ή του αλλαντοϊκού (Xi *et al.*, 2000). Είναι επομένως πιθανόν, οι αντίστοιχοι μεταφορείς και ένζυμα να μην παράγονται ή να μην είναι ενεργά σε επίπεδα επαρκή ώστε να υποστηρίξουν την πλήρη ανάπτυξη, εξαιτίας χαμηλής ικανότητας πρόσληψης ή χαμηλής δραστηριότητας του υποκινητή ή ανεπαρκούς ρύθμισης των αντίστοιχων γονιδίων στο μεταγραφικό επίπεδο (Xi *et al.*, 2000, Reitzer and Schneider 2001).

Ωστόσο, ανάλυση του γονιδιώματος της *E. coli* με υπολογιστικά προγράμματα, υπέδειξε την ύπαρξη πέντε σ^{54} -εξαρτώμενων υποκινητών σε μια ομάδα (cluster) 23 γονιδίων στο 65 min του γονιδιώματος (Xi *et al.*, 2000). Τέτοιοι υποκινητές συνήθως ελέγχουν γονίδια τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αζώτου, όπως η συνθεσία της γλουταμίνης και τα ένζυμα καταβολισμού της αργινίνης (Schneider *et al.*, 1998). Ανάλυση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας (BLAST analysis) των γονιδίων αυτών, υποστηρίζει ότι είναι πιθανόν να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον καταβολισμό και την διαμεμβρανική μεταφορά των πουρινών.



1.5 Σκοπός της εργασίας

Η οικογένεια των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2), παρά την εμφανή σημασία της, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς σε επίπεδο μηχανισμού λειτουργίας και ανάλυσης των δομών των αντίστοιχων μακρομορίων. Στην παρούσα εργασία, κεντρικός στόχος ήταν να αναπτύξουμε ένα εύχρηστο πειραματικό σύστημα για τη μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας στους μεταφορείς NAT/NCS2, χρησιμοποιώντας το βιολογικό σύστημα της *E. coli* K-12 και την τεχνολογία της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης. Αναλυτικότερα, οι άμεσοι στόχοι μας ήταν:

1. Λειτουργικός χαρακτηρισμός των πιθανών μεταφορέων NAT/NCS2 της *E. coli* K-12
2. Κατασκευή εναλλακτικών μορφών των μεταφορέων, με αντικατάσταση των εγγενών κυστεϊνών και εισαγωγή σημάτων ανοσοαποτύπωσης και/ή καθαρισμού, ώστε να αναπτυχθούν κατάλληλα μοριακά εργαλεία μελέτης
3. Συστηματική ανάλυση των καταλοίπων του μοτίβου «υπογραφή» ([Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-T-[R/K/G]) της οικογένειας NAT/NCS2 με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης, στο σύστημα της *E. coli* K-12



27

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την προεπισκόπηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ο αναγνώστης μπορεί να αποκτήσει μια γενική εικόνα του περιεχομένου της, καθώς και να αντιληφθεί τον τρόπο με τον οποίο ο συγγραφέας προσεγγίζει το θέμα που εξετάζει. Η εισαγωγή αποτελεί το πρώτο βήμα της μελέτης, καθώς ορίζει τον σκοπό της, την μεθοδολογία που ακολουθείται, καθώς και τα αποτελέσματα που προκύπτουν. Η διατριβή είναι οργανωμένη σε πέντε κεφάλαια, τα οποία εξετάζουν διαφορετικές πτυχές του θέματος. Το πρώτο κεφάλαιο αφορά στην παρουσίαση του προβλήματος και στην αναφορά της σχετικής βιβλιογραφίας. Το δεύτερο κεφάλαιο περιγράφει τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την έρευνα. Τα επόμενα δύο κεφάλαια αποτελούν το κύριο μέρος της μελέτης, καθώς παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της έρευνας και τα συμπεράσματα που προκύπτουν. Το τελευταίο κεφάλαιο είναι η συζήτηση, όπου ο συγγραφέας αξιολογεί τα αποτελέσματα της έρευνας και τα συγκρίνει με τα αποτελέσματα άλλων μελετών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα μελέτη βασίζεται σε πρωτότυπα δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη μέθοδο της ερωτηματολογικής έρευνας. Η ερωτηματολόγια καταρτίστηκαν με βάση τη θεωρητική προσέγγιση της έρευνας και τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε.



2.1 Όργανα

Κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διδακτορικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα: συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California), φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany), υπερφυγόκεντρος Beckmann Optima™ Ultracentrifuge (Beckmann Instruments, Palo Alto, California) του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών (I.B.E.I), συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Protean II xi Cell και συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Mini Trans-Blot transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, California), μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut) του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος ή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής, συσκευή ταχείας διήθησης (glass filter holder assembly) (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA), φωτόμετρο Ultraspec-2001 (Biochrom, Cambridge, England), φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (SpeedVac concentrator) (Savant Instruments, Hicksville, New York), συσκευή υπερήχων digital sonifier model 250-D (Branson Ultrasonics, Danbery, Connecticut), συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Gene Pulser II Electroporation System (Bio-Rad, California) του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών (I.B.E.I) φυγόκεντρος Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut),



2.2 Χημικά Αναλώσιμα

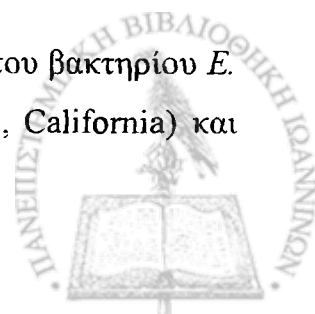
Τα ραδιενεργά υποστρώματα [^3H]ξανθίνη (27.6 Ci/mmol), [^{14}C]ουρικό οξύ (50 mCi/mmol), [^3H]υποξανθίνη (20 Ci/mmol) και [^3H]ουρακίλη (59 Ci/mmol) αγοράστηκαν από την εταιρεία Moravek Biochemicals (Brea, CA), ενώ οι μη σημασμένες νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών ήταν της εταιρείας Sigma (St. Louis, MO) (ξανθίνη, ουρικό οξύ, υποξανθίνη, ουρακίλη, γουανίνη, αδερίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη, 1-μεθυλοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 7-μεθυλοξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη, 5-φλοροουρακίλη, αλλαντοΐνη, ιμιδαζόλιο) ή παραχωρήθηκαν από τους H. De Koning και Γ. Διαλλινά (θεοφυλλίνη, καφεΐνη, 8-αζαξανθίνη, 9-δεαζαξανθίνη, 7-δεαζαξανθίνη).

Το κυτταρικό στέλεχος της *E. coli* BW25113 και τα πλασμιδιακά στελέχη pKD46 και pKD13 που χρησιμοποιήθηκαν για την απενεργοποίηση των ενδογενών γονιδίων παραχωρήθηκαν από το *E. coli* Genetic Stock Center, Department of MCDB, Yale University (New Haven).

Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) συντέθηκαν από την εταιρεία BioSpring GmbH (Frankfurt, Germany). Η επαλήθευση αλληλουχιών DNA έγινε σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech A.G, Ebersberg, Germany). Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε μίγμα Taq και Pfu πολυμεράσης (Expand High Fidelity PCR System) από την εταιρία Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Στις αντιδράσεις ανασύνδεσης χρησιμοποιήθηκε DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 της εταιρείας Invitrogen (Groningen, The Netherlands). Η περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Germany) ενώ οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Hpa*I, *Apa*I και *Hind*III ήταν της εταιρείας New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts). Η αλκαλική φωσφατάση προέρχεται από την εταιρία Amersham Pharmacia BioTech (London, UK).

Το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) ήταν της εταιρείας Sigma (St.Louis, MO). Το πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide) ήταν από την εταιρεία Molecular Probes (Eugene, OR). Τα σφαιρίδια νικελίου (Ni^{2+} -IDA, ProBond resin) ήταν από την εταιρία Invitrogen.

Το αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της LacY του βακτηρίου *E. coli* (Carpasco *et al.*, 1984) συντέθηκε από την εταιρεία BabCo (Richmond, California) και



παραχωρήθηκε ευγενώς από τον H. R. Kaback (Howard Hughes Medical Institute, UCLA). Η πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase (HRP)-labeled protein A) που χρησιμοποιείται σαν δεύτερο αντίσωμα καθώς και το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP) ήταν της εταιρείας Amersham Pharmacia BioTech. Το αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών (anti-PentaHis) ήταν της εταιρείας Qiagen. Το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (anti-GFP) και η καθαρή GFP παραχωρήθηκε από τον Σάββα Χριστοφορίδη (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων). Το αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεΐμιδίου του Oregon ήταν της εταιρείας Molecular Probes.



2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherichia coli* K-12 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- *E. coli* **Top10F'** ($(F' \{lac^F, Tn10(Tet^R)\}) mcrA \Delta (mrr-hsdRMS-mrcBC) \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG$) (Invitrogen), χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα.
- *E. coli* **T184** ($(lacI^+ O^+ ZY(A), prsL, Met^-, Thr^-, recA, hsdM, hsdR/F', lacI^P O^+ Z^{D118}(Y^+ A^+)) (lacZY)$) (Teather *et al.*, 1980) και *E. coli* **DH5 α** ($F', \phi 80dlacZ\Delta M15, \Delta(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk^-, mk^+), phoA, supE44, \lambda^-, thi-1, gyrA96, relA1$) (Gibco-BRL) χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των πλασμιδιακών φορέων και την επαγωγή της έκφρασης των μεταφορέων μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου (συνεργειώματος) της λακτόζης (*lacZ* p/o) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του IPTG. Επίσης, χρωμοσωμικό DNA του στελέχους T184 χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πολλαπλή αντιγραφή των υπό μελέτη γονιδίων.
- *E. coli* **BW25113** ($\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(:rrnB-3), lacI_p-4000(lacI^P), \lambda^-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$) (Datsenko and Wanner, 2000) χρησιμοποιήθηκε για την απαλοιφή (knock out) των ενδογενών γονιδίων από το γονιδίωμα της *E. coli* με ομόλογα ανασυνδυασμό. Παραχωρήθηκαν από το *E. coli* Genetic Stock Center, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University (New Haven).
- *E. coli* **T184, DH5 α , Top10F', BW25113** και **MC1061** (*lacX74, araD139, (ara, leu)7697, galU, galK, hsr, hsm, strA*) (Casadaban and Cohen, 1980) χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανάπτυξης σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- **pT7-5**: χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης και έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου (συνεργειώματος) της λακτόζης (*lacZ* p/o). Ο φορέας περιλαμβάνει επιπλέον και γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Sahin-Toth *et al.*, 1995).
- **pT7-5/melY-BAD**: περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το μεταφορέα μελιβιόζης (MelY) με την καρβοξυτελική αλληλουχία της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης (biotin



acceptor domain, BAD) από την αποκαρβοξυλάση οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* και την αλληλουχία του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της LacY (LSLLRRQVNEVA, LacY-επίτοpe) (Frillingos and Kaback, 2001). Χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πολλαπλή αντιγραφή των καρβοξυτελικών αλληλουχιών του.

- **pT7-5/lacY-C154G-His₁₀**: περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα λακτόζης (LacY) της *E. coli* με αλλαγμένη την κυστεΐνη στη θέση 154 σε γλυκίνη και με την καρβοξυτελική αλληλουχία 10 καταλοίπων ιστιδινών (His₁₀) (Smirnova and Kaback, 2003, Abramson *et al.*, 2003). Χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης για την εισαγωγή της αλληλουχίας των 10 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο των υπό μελέτη γονιδίων
- **prnB-GFP4**: περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (παραχωρήθηκε από την Ερευνήτρια Α Βασιλική Σοφianoπούλου του Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος», Ινστιτούτο Βιολογίας) (Pokorska *et al.*, 2000, Tavouraris *et al.*, 2001). Χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πολλαπλή αντιγραφή την αλληλουχία GFP.
- **pKD46**: περιέχει την ανασυνδυάση Red του φάγου λ η οποία βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή επαγόμενου με αραβινόζη. Η ανασυνδυάση Red του φάγου λ χρησιμοποιήθηκε για την απαλοιφή (knock out) των ενδογενών γονιδίων από το χρωμόσωμα της *E. coli* με ομόλογο ανασυνδυασμό (Datsenko and Wanner, 2000). Παραχωρήθηκε από το *E. coli* Genetic Stock Center, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University (New Haven, CT).
- **pKD13**: περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πολλαπλή αντιγραφή του γονιδίου αυτού (Datsenko and Wanner, 2000). Παραχωρήθηκε από το *E. coli* Genetic Stock Center, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University (New Haven, CT).

Τα στελέχη *E. coli* K-12 που δημιουργήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται στον

Πίνακα 2.1.



Στελέχη <i>E. coli</i> που δημιουργήθηκαν	
T184/pT7-5	Karatza and Frillingos, 2005
T184[pT7-5/ygfO]	Karatza and Frillingos, 2005
T184[pT7-5/ygfO-BAD]	Karatza and Frillingos, 2005
T184[pT7-5/ygfO-His ₁₀]	Κεφάλαιο 2.4.2
T184[pT7-5/ygfO- GFP]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/ygfO-C203S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/ygfO-C204S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/ygfO-C219S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/ygfO-C227S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/ygfO-C433S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/Cys-less ygfO-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.4
T184[pT7-5/Cys-less ygfO-His ₁₀]	Κεφάλαιο 2.4.4
T184[pT7-5/yicE]	Karatza and Frillingos, 2005
T184[pT7-5/yicE-BAD]	Karatza and Frillingos, 2005
T184[pT7-5/yicE-His ₁₀]	Κεφάλαιο 2.4.2
T184[pT7-5/yicE-GFP]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/yicE-C40S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/yicE-C58S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/yicE-C141S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/yicE-C333S-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/Cys-less yicE-BAD]	Κεφάλαιο 2.4.4
DH5α[pT7-5/ygfO]	Karatza and Frillingos, 2005
DH5α[pT7-5/yicE]	Karatza and Frillingos, 2005
BW25113/pKD46	Karatza and Frillingos, 2005
BW25113ΔygfO	Karatza and Frillingos, 2005
T184[pT7-5/Cys-less ygfO-X315-340C-BAD] (n=26)	Κεφάλαιο 2.4.4
T184[pT7-5/Cys-less ygfO-X315-340C- His ₁₀] (n=20)	Κεφάλαιο 2.4.4
T184[pT7-5/ygfO-X315-340C-BAD] (n=4)	Κεφάλαιο 2.4.3
T184[pT7-5/ygfO-X315-340X-BAD] (n=18)	Κεφάλαιο 2.4.3

Πίνακας 2.1: Στελέχη *E. coli* K-12 που δημιουργήθηκαν στην παρούσα εργασία

Ο τρόπος ονομασίας όλων των βακτηριακών στελεχών που ακολουθείται σε όλη την εργασία, πχ T184/ pT7-5/ygfO-C203S, αναφέρεται στο βακτηριακό στέλεχος (T184), στον πλασμιδιακό φορέα (pT7-5), στο γονίδιο (ygfO), στον αριθμό του καταλόγου που υφίσταται την αλλαγή (203), στο κατάλοιπο που υπάρχει φυσιολογικά στη θέση αυτή (C, Cys) και στο κατάλοιπο που εισάγεται (S, Ser)



2.4 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

2.4.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB)

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

Αποστείρωση, pH 7.2

Χρωμοσωμικό DNA απομονώθηκε από τα στελέχη T184 και BW25113*ΔygfO* της *E. coli*, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις PCR. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το πακέτο υλικών DNeasy Tissue της Qiagen μετά από ανάπτυξη των κυτταρικών στελεχών T184 και BW25113*ΔygfO* στους 37°C για 16 h σε πλήρες θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB) που περιείχε στρεπτομυκίνη (τελική συγκέντρωση 10 µg/mL) και καναμυκίνη (τελική συγκέντρωση 50 µg/mL), αντίστοιχα.

2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Για την πολλαπλή αντιγραφή των γονιδίων *ygfO* και *yicE* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με υπόστρωμα χρωμοσωμικό DNA του στελέχους T184 της *E. coli* K-12. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της Expand High Fidelity Taq πολυμεράση που είναι μίγμα των Taq και Pfu πολυμερασών (Roche Molecular Biochemicals) και εκκινήτων οι οποίοι σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να εισάγουν τις θέσεις περιορισμού *Bam*HI και *Hind*III στο 5' και στο 3' άκρο αντίστοιχα της κωδικοποιούσας περιοχής των γονιδίων (Πίνακας 2.2). Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5 (Sahin-Toth *et al.*, 1995).



Ανασυνδρασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητών (primer sequence)
pT7-5/ <i>ygfO</i>	<p>YgfO sense :</p> <p>5'-CGCGGATCCATGTCTGATATAAACCATGCAGGTTCTGACC-3'</p> <p>YgfO antisense :</p> <p>5'-TCCTTTAAGCTTAAATCCATCTCTCCGCTGAGGTAATACCAGGC-3'</p>
pT7-5/ <i>yicE</i>	<p>YicE sense :</p> <p>5'-CGCGGATCCATGTCTGTTTCCACCCTCGAGTCAGAAAATG-3'</p> <p>YicE antisense :</p> <p>5'-CGCCAGAAGCTTACTGTTTTTCTGGTGGGAAAATCAGATTCAGCACG-3'</p>

Πίνακας 2.2: Ανασυνδρασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες των *ygfO* και *yicE* και εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους

Υπογραμμισμένες και με έντονα γράμματα φαίνονται οι αλληλουχίες που εισάγουν τις θέσεις περιορισμού *Bam*HI (GGATCC) και *Hind*III (AAGCCT) στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων

Για την εισαγωγή της αλληλουχίας 10 συνεχόμενων κωδικονίων His (**His₁₀**) στο καρβοξυτελικό άκρο των γονιδίων *ygfO* και *yicE* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση των γονιδίων αυτών με υπόστρωμα τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO* και pT7-5/*yicE*, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας εκκινητές που εισάγουν στο 3' άκρο τους την περιοριστική θέση *Apa*I (Πίνακας 2.3). Ως φορέας κλωνοποίησης για τη δημιουργία των κατασκευών αυτών χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/*lacY*-C154G-His₁₀ (Smirnova and Kaback, 2003, Abramson *et al.*, 2003).

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επικάλυψης/επέκτασης (Ho *et al.*, 1989, Frillingos *et al.*, 1994) χρησιμοποιεί συμπληρωματικούς εκκινητές για να ενισχύσει από τα γονίδια-στόχους δύο τμήματα DNA που φέρουν επικαλυπτόμενα άκρα των 20-25 bp. Τα τμήματα αυτά στη συνέχεια χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα σε επόμενες αντιδράσεις



PCR, όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από τα προηγούμενα τμήματα.

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των αλληλουχιών της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain, **BAD**) της αποκαρβοξυλάσης του οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1993) αμέσως πριν το καρβοξυτελικό δωδεκαπεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA, **LacY-epitope**), και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (**GFP**) (Pokorska *et al.*, 2000, Tavoularis *et al.*, 2001) στο καρβοξυτελικό άκρο των *ygfO* και *yicE*.

Σε ένα πρώτο στάδιο PCR έγιναν δύο αντιδράσεις, κατά τις οποίες αντιγράφηκαν πολλαπλά η αλληλουχία του γονιδίου *ygfO* ή *yicE* μέχρι το κωδικόνιο λήξης, με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA από τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO* ή pT7-5/*yicE* και οι αλληλουχίες του καρβοξυτελικών σημάτων BAD-LacY-epitope με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA από το πλασμίδιο pT7-5/*melY*-BAD (Frillingos and Kaback, 2001). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συμπληρωματικοί και δημιουργούσαν επικαλύψεις βάσεων μεταξύ των τμημάτων DNA (Πίνακας 2.3). Τα προϊόντα PCR των δύο προηγούμενων αντιδράσεων αφού καθαρίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, υποβλήθηκαν σε νέα αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα. Το τελικό προϊόν της δεύτερης αντίδρασης PCR η αλληλουχία του *ygfO* ή του *yicE* στην οποία αμέσως πριν το κωδικόνιο λήξης έχει εισαχθεί με το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης η αλληλουχία του BAD-LacY-epitope. Ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO* και pT7-5/*yicE*.

Με τον ίδιο τρόπο αλλά χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pmB-GFP4 ως υπόστρωμα για την πολλαπλή αντιγραφή την αλληλουχία GFP, δημιουργήθηκαν τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO*-GFP και pT7-5/*yicE*-GFP.



Ανασυνδυσασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητών (primer sequence)
pT7-5/ygfO-BAD	LacZ (p/o) sense 5'-ATGATTACGGATTCACTGGCCGTC-3' YgfO (BAD) sense 5'-GAAGAGATGGATACTGCTGCTGCTCC-3' YgfO (BAD) antisense 5'-GGAGCAGCAGCAGTATCCATCTCTTC-3' C-tail (HindIII) antisense 5'-CATCGATAAGCTTAAGCGACTTCATTCACCTG-3'
pT7-5/yicE-BAD	LacZ (p/o) sense YicE (BAD) sense 5'-CCAGAAAAACAGACTGCTGCTGCTCC-3' YicE (BAD) antisense 5'-GGAGCAGCAGCAGTCTGTTTTTCTGG-3' C-tail (HindIII) antisense
pT7-5/ygfO-His₁₀	LacZ (p/o) sense YgfO (ApaI) antisense 5'-ATCGATGGGCCCTCCATCTCTTC-3'
pT7-5/yicE-His₁₀	LacZ (p/o) sense YicE (ApaI) antisense 5'-ATCGATGGGCCCTGTTTTTCTGGTG-3'
pT7-5/ygfO-GFP	LacZ (p/o) sense YgfO (GFP) sense 5'-CGGAAGAGATGGATGATATCGGAGG-3' YgfO (GFP) antisense 5'-CCTCCGATATCATCCATCTCTTCCG-3' GFP (HindIII) antisense 5'-GCCGCTAAGCTTACTTGTACAGCTC-3'
pT7-5/yicE-GFP	LacZ (p/o) sense YicE (GFP) sense 5'-CCACCAGAAAAACAGGATATGGAGG-3' YicE (GFP) antisense 5'-CCTCCGATATCCTGTTTTTCTGGTGG-3' GFP (HindIII) antisense

Πίνακας 2.3: Ανασυνδυσασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες των *ygfO* και *yicE* με την προσθήκη καρβοξυτελικών σημάτων και εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους



Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε επίσης για την αντικατάσταση των εγγενών κυστεϊνών (Cys) μίας-προς-μία με το κατάλοιπο σερίνη (Ser) στην αλληλουχία των γονιδίων *ygfO* και *yciE*. Ως υπόστρωμα PCR και ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO*-BAD και pT7-5/*yciE*-BAD. Σχεδιάστηκαν δύο εσωτερικοί εκκινητές 20-25 bp για κάθε κατασκευή, οι οποίοι υβριδίζουν με την παρακείμενη με την κυστεΐνη περιοχή. Στην αλληλουχία των εκκινητών αυτών έχει αντικατασταθεί το κωδικόνιο της Cys με ένα κωδικόνιο Ser (Πίνακας 2.4). Οι δύο εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις κατασκευές ήταν οι *lacZ*(p/o)sense και C-tail(*Hind*III)antisense που αναφέρονται στον Πίνακα 2.3.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητών νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)
pT7-5/ <i>ygfO</i> -C203S	5'-CGGCTTTAAC <u>AGCT</u> GTCGCAGTC -3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -C204S	5'- GCTTTAACTGCT <u>TCT</u> CGCAGTCCG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -C219S	5'- CCATTGGGCTAT <u>TCT</u> GTCCGGCTATATC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -C227S	5'- GCATCGTTA <u>TCC</u> CTGGGCATGGG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -C433S	5'- GAAAACCCTATTT <u>TCT</u> GCTGGCGGG-3'
pT7-5/ <i>yciE</i> -C40S	5'-GTTTGCCGCC <u>AGT</u> CAGCATCTG-3'
pT7-5/ <i>yciE</i> -C58S	5'-GCTATTAAT <u>TCCC</u> AGGCGCTGG-3'
pT7-5/ <i>yciE</i> -C141S	5'-CTGGCAAGT <u>TCC</u> ACCGAGATG-3'
pT7-5/ <i>yciE</i> -C333S	5'-CCGAACTCCT <u>TCT</u> TTCCGGGCAAAAC-3'

Πίνακας 2.4: Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες των *ygfO* και *yciE* μετά από αντικατάσταση των εγγενών κυστεϊνών τους με το κατάλοιπο σερίνη και εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους

Υπογραμμισμένη και με έντονα γράμματα φαίνεται η τριπλέτα βάσεων που εισάγει το κατάλοιπο σερίνη στη θέση του καταλοίπου κυστεΐνη. Ο τρόπος ονομασίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που ακολουθείται σε όλη την εργασία, πχ *YgfO*-C203S, αναφέρεται στον αριθμό του καταλοίπου που υφίσταται την αλλαγή (203), στο κατάλοιπο που υπάρχει φυσιολογικά στη θέση αυτή (C, Cys) και στο κατάλοιπο που εισάγεται (S, Ser)



Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επικάλυψης/επέκτασης χρησιμοποιήθηκε και για τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων στην αλληλουχία του *ygf()*. Ως υπόστρωμα για τις αντιδράσεις PCR και ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **pT7-5/*ygfO*-BAD**. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2.5.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)
pT7-5/ <i>ygfO</i> -P318G	5'-GTCGGTTCATTAG GA TTAACCACGTTTGC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -F322C	5'-CATTACACTAACCAC GTGT GCGCAAAATAATG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -Q324C	5'-CCACGTTTGC GTG CAATAATGGG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -Q324N	5'-CCACGTTTGC GAA CAACAATGGG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -Q324E	5'-CCACGTTTGC GAAA AACAATGGG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -Q324A	5'-CCACGTTTGC GCA AATAATGGG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -Q324P	5'-CCACGTTTGC GCCA AATAATGGG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -N325C	5'-CGTTTGC GCAATG CAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -N325Q	5'-CGTTTGC GCAAC AGAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -N325A	5'-CGTTTGC GCAAG CTAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -N325S	5'-CGTTTGC GCAAG CAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -N325T	5'-CGTTTGC GCAAC GCAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -N325D	5'-CGTTTGC GCAAG ACAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -G327A	5'-GCGCAAAACAAT GCCG TTATTCAGATG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -G327P	5'-GCGCAAAACAAT CCGG TTATTCAGATG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -T332A	5'-GGTATTCAAAT GGCT GGTGTTCGCTTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -T332N	5'-GGTATTTCAGAT GAA TGGCGTTCGCTTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -T332D	5'-GGTATTTCAGAT GGAT GGTGTTCGCTTC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -G333R	5'-GTTATTCAGATGACT CGT GTCGCTTCAC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -G333K	5'-GTTATTCAGATGACT AAG GTCGCTTCACG-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -G340C	5'-CACGTTATGTC TGCC GAACCATC-3'
pT7-5/ <i>ygfO</i> -G340A	5'-CACGTTATGTC GCA CGAACCATC-3'

Πίνακας 2.5: Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του *ygfO* με σημειακές μεταλλάξεις και οι εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους

Υπογραμμισμένα και με έντονα γράμματα φαίνεται η τριπλέτα βάσεων που εισάγει την αλλαγή στη θέση του επιλεγέντος αμινοξέος. Ο τρόπος ονομασίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που ακολουθείται σε όλη την εργασία αναφέρεται στο υπόμνημα του Πίνακα 2.4



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

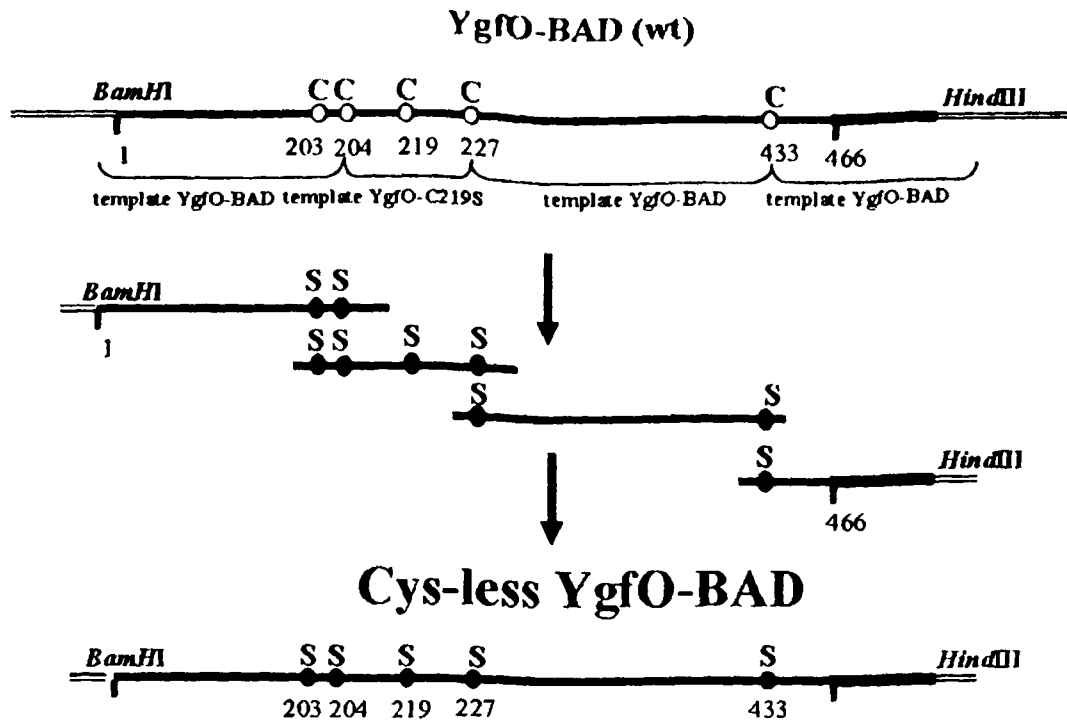
Η αντικατάσταση όλων μαζί των εγγενών κυστεϊνών στην αλληλουχία των γονιδίων *ygfO* και *yicE* πραγματοποιήθηκε με μια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επικάλυψης/επέκτασης. Στην συνέχεια αναφέρεται επιγραμματικά η εφαρμογή της τεχνικής αυτής για τη δημιουργία των πλασμιδίων **pT7-5/Cys-less *ygfO*-BAD** και **pT7-5/Cys-less *yicE*-BAD** (Εικόνα 2.1) και παρουσιάζονται τα προϊόντα των δύο σταδίων PCR μετά από ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικόνα 2.2).

Κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις PCR όπου ενισχύθηκαν τέσσερα τμήματα των γονιδίων *ygfO* (Εικόνα 2.1A) και *yicE* (Εικόνα 2.1B), από το κωδικόνιο έναρξης ως το τέλος του γονιδίου μαζί με τις καρβοξυτελικές αλληλουχίες. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2.4. Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύνδεση των τεσσάρων τμημάτων σε μοριακή αναλογία 1:1:1:1 σε μια αντίδραση PCR, χωρίς να προστεθεί εκ νέου υπόστρωμα. Τα τέσσερα προϊόντα PCR λόγω των συμπληρωματικών τους άκρων υβριδίζουν με αποτέλεσμα να παίρνουμε σαν τελικό προϊόν τα γονίδια *ygfO* και *yicE* με αλλαγμένες όλες τις εγγενείς τους κυστεΐνες σε σερίνες. Τα προϊόντα των δύο σταδίων PCR μετά από ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αγαρόζης 1% παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.2. Ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO*-BAD και pT7-5/*yicE*-BAD. Το πλασμίδιο **pT7-5/Cys-less *ygfO*-His₁₀** δημιουργήθηκε με υποκλωνοποίηση από το πλασμίδιο pT7-5/Cys-less *ygfO*-BAD στο πλασμίδιο pT7-5/*ygfO*-His₁₀.

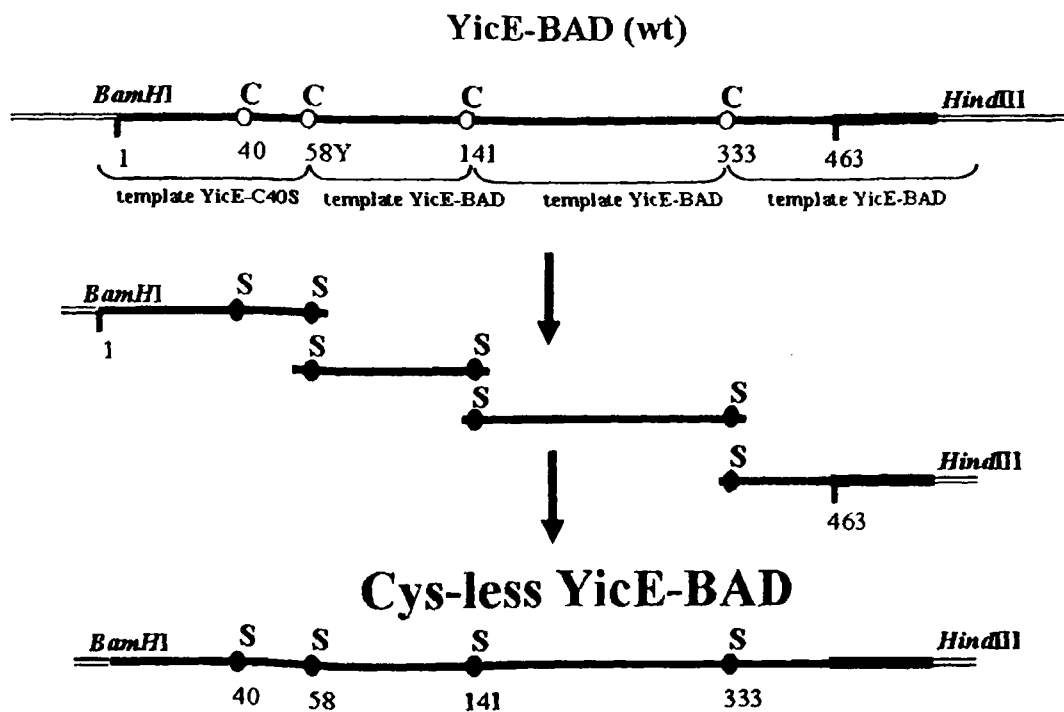
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επικάλυψης/επέκτασης χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταλλαξιγένεση σάρωσης κυστεϊνών των θέσεων 315-340 της αλληλουχίας του *ygfO*. Ως υπόστρωμα για τις αντιδράσεις PCR και ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5/Cys-less *ygfO*-BAD. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2.6. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του *ygfO* με ένα μόνο κατάλοιπο κυστεΐνης κάθε φορά (θέσεις 322-340) μεταφέρθηκαν και στο υπόστρωμα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pT7-5/Cys-less *ygfO*-His₁₀.



A

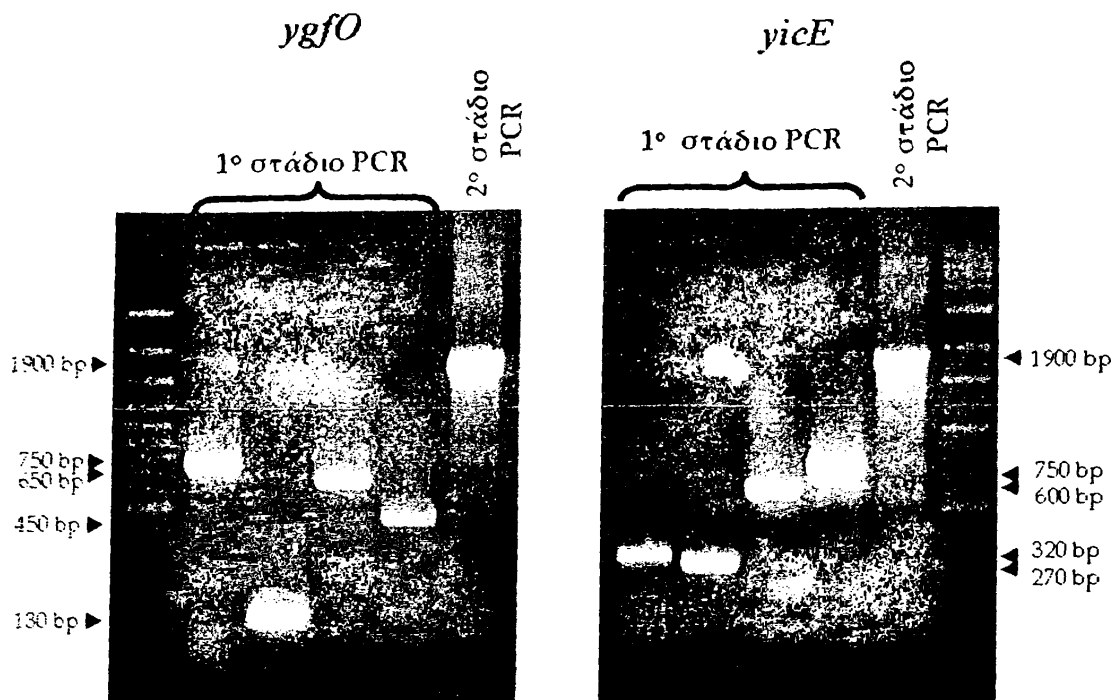


B



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου PCR πολλαπλών επικαλύψεων όπως εφαρμόστηκε για την δημιουργία της Cys-less YgfO-BAD (A) και της Cys-less YicE-BAD (B)





Εικόνα 2.2: Προϊόντα των δύο σταδίων της μεθόδου PCR πολλαπλών επικαλύψεων για τη δημιουργία των *Cys-less ygfO* και *Cys-less yicE*

Ποσότητα (20 μ L) από τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις PCR σε κάθε περίπτωση (1° στάδιο) αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% και αφού ανακτήθηκαν και καθαρίστηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα σε μοριακή αναλογία 1:1:1:1 για μία νέα αντίδραση PCR (2° στάδιο). Για προσδιορισμό του μοριακού βάρους των προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν δείκτες μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder)

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (sense primer sequence)
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -G315C	5'-CCTCCGCTGTCT TG TICATTACCATTAAC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -S316C	5'-GCTGTCGGT TGC TTACCATTAACC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -L317C	5'-GTCGGTTCAT TG TCCATTAACCACG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -P318C	5'-GTCGGTTCATTA TG CCTTAACCACGTTTGC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -L319C	5'-GTTCAATTACCAT TGC ACCACGTTTGC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -T320C	5'-GGTTCATTACCACTA TGC ACGTTTGGC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -T321C	5'-CATTACCACTAACC TGC TTTGCGCAAAAATAATGG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -F322C	5'-CATTACCACTAACCACG TGT GCGCAAAAATAATG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -A323C	5'-CATTACCACTAACCACG TCTGC CAAAAATAATGG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -Q324C	5'-CCACGTTTGC TGC AAATAATGGG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -N325C	5'-CGTTTGC GCAATGC AAATGGGGTTATTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -N326C	5'-GTT TGC GCAAAATGC GGGGTTATTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -G327C	5'-GCGCAAAAATAA CTGC GTGATTCAGATG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -V328C	5'-GCAAAAATAACGG TGT ATCCAGATGAC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -I329C	5'-GCAAAAATAATGGGG TTTGC CAGATGACTG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -Q330C	5'-GGGTTAT TTGC ATGACTGGCGTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -M331C	5'-GGGTTATTCAG TGT ACTGGCGTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -T332C	5'-GTTATTCAGAT TGT TGGCGTCGCTTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -G333C	5'-GTTATTCAGATGACT TGC GTTCGCTTCA-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -V334C	5'-CAGATGACTGG TTGT GCTTCACGTTATG-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -A335C	5'-GATGACTGGCG TTTGT TCACGTTATGTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -S336C	5'-GACTGGCG TTC TTGTCGTTATGTC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -R337C	5'-GTCGCTTCAT TGT TAAATGTTGGGCGAAC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -Y338C	5'-CTTCACG TTTGT GTTGGTTCGAACCATC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -V339C	5'-CTTCACGTTAT TGT GGGCGAACCATC-3'
pT7-5/Single-Cys <i>ygfO</i> -G340C	5'-CACGTTATGT TGC CGAACCATC-3'

Πίνακας 2.6: Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν την αλληλουχία του *ygfO* μετά από αντικατάσταση των εγγενών κυστεϊνών και εισαγωγή νέων καταλοίπων κυστεϊνης σε επιλεγμένες θέσεις και οι εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους

Υπογραμμισμένη και με έντονα γράμματα φαίνεται η τριπλέτα βάσεων που εισάγει την αλλαγή στη θέση του επιλεγέντος αμινοξέος. Ο τρόπος ονομασίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που ακολουθείται σε όλη την εργασία αναφέρεται στο υπόμνημα του Πίνακα 2.4



2.4.5 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA

Οι πλασμιδιακοί φορείς και τα προς ένθεση DNA για τη δημιουργία των πλασμιδίων pT7-5/*ygfO*, pT7-5/*yicE*, pT7-5/*ygfO*-BAD, pT7-5/*yicE*-BAD, pT7-5/*ygfO*-GFP και pT7-5/*yicE*-GFP επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Hind*III, για τη δημιουργία των πλασμιδίων pT7-5/*ygfO*-His₁₀ και pT7-5/*yicE*-His₁₀ με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Apa*I, ενώ για την κατασκευή των υπολοίπων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *Bam*HI και *Hpa*I. Στις αντιδράσεις των πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων με αλκαλική φωσφατάση. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% και ανακτήθηκαν από αυτή με το πακέτο υλικών QIAquick Gel extraction της Qiagen.

Η αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA στους πλασμιδιακούς φορείς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 στους 16 °C σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL με ποσότητες ενθέματος (insert) και φορέα (vector) σε μοριακή αναλογία 3:1 (insert : vector).

2.4.6 Μετασχηματισμός της *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Βλέπε Κεφ. 2.4.1

SOB

Εκχύλισμα ζύμης	0.5% (w/v)
Τρυπτόνη (βακτηριακής προέλευσης)	2% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Αποστείρωση, pH 7.5



TB

Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

Αποστείρωση, pH 6.7

Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων (Κατά Inoue *et al.*, 1990)

Πλήρης καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* Top10F' (10 mL) σε θρεπτικό υλικό LB, αραιώνεται 1/25 (τελικός όγκος 250 mL) σε θρεπτικό υλικό SOB. Ακολουθεί ανάπτυξη στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει 0.6. Τα κύτταρα αφήνονται για 10 min στον πάγο, συλλέγονται με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 10 min, 4 °C) και αραιώνονται σε 80 mL ψυχρού διαλύματος TB. Ακολούθως, αφήνονται εκ νέου σε πάγο για 10 min, φυγοκεντρώνονται όπως ανωτέρω και επαναιωρούνται σε 20 mL διαλύματος TB που περιέχει 7% v/v διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO). Τα επιδεκτικά πλέον κύτταρα είναι έτοιμα να μετασχηματιστούν ή εναλλακτικά να αποθηκευτούν στους -80 °C.

Μετασχηματισμός

Τα επιδεκτικά κύτταρα που λαμβάνονται από τους -80 °C αφήνονται να επανέλθουν αργά σε θερμοκρασία 0-4 °C μέσα σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA προστίθεται σε αυτά και ακολουθεί επώαση για 5 min στον πάγο. Τέλος τα κύτταρα επιστρέφονται σε προθερμασμένα στους 37 °C τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο επιλογής με αμπικιλίνη (τελική συγκέντρωση 100 µg/mL).

2.4.7 Απομόνωση DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα και προσδιορισμός αλληλουχίας

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεγάλης κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα υλικών QiAprep Spin MiniPrep Kit και Plasmid Maxi Kit (Qiagen), αντίστοιχα.

Η πλήρης αλληλουχία DNA των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μεταξύ των θέσεων περιορισμού επιβεβαιώθηκε σε κάθε περίπτωση με αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας DNA sequencer (MWG-Biotech. A.G, Ebersberg, Germany).



2.4.8 Απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου *ygfO* (knock out)

Διαλύματα

SOB

Βλέπε Κεφ. 2.4.6

Για την απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου *ygfO* χρησιμοποιήθηκε μια τεχνική ομόλογου ανασυνδυασμού σύμφωνα κατά την οποία το γονίδιο-στόχος αντικαθίστανται από κατάλληλα PCR προϊόντα με τη βοήθεια της ανασυνδυάσης Red του φάγου λ (Datsenko and Wanner 2000).

Αρχικά δημιουργήθηκαν κατάλληλα προϊόντα PCR χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλασμίδιο pKD13 από το οποίο αντιγράφηκε πολλαπλά το γονίδιο ανθεκτικότητας καναμυκίνη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μήκους 70 βάσεων περίπου και περιελάμβαναν αλληλουχία 50 βάσεων ομόλογη με τα 5' και 3' άκρα των στοχευόμενων γονιδίων και 20 βάσεων ομόλογη με τα 5' και 3' άκρα των γονιδίων ανθεκτικότητας (Πίνακας 2.7). Ακολούθησε πλήρης πέψη των προϊόντων PCR με το περιοριστικό ένζυμο *DpnI* (37 °C, 16 h), ηλεκτροφόρηση και απομόνωση από πηκτή αγαρόζης 1%. Το περιοριστικό ένζυμο *DpnI* (το οποίο κατακερματίζει μεθυλιωμένο DNA) χρησιμοποιήθηκε για την κατακερμάτιση του πλασμιδίου pKD13 και την αποφυγή της απομόνωσης του μαζί με τα προϊόντα PCR.

Το στέλεχος *E. coli* που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου ήταν το BW25113. Ο ανασυνδυασμός πραγματοποιήθηκε με χρήση του πλασμιδίου pKD46 στο οποίο η παραγωγή της ανασυνδυάσης Red του φάγου λ είναι υπό μεταγραφικό έλεγχο υποκινητή επαγόμενου με αραβινόζη (Datsenko and Wanner, 2000). Το πλασμίδιο αυτό είναι θερμοευαίσθητο και δεν αναπαράγεται στους 37 °C.

Ο μετασχηματισμός του κυτταρικού στελέχους BW25113/pKD46 με το ευθύγραμμο DNA έγινε με ηλεκτροδιάτρηση. Τα κύτταρα έγιναν επιδεκτικά με τον εξής τρόπο: πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη τους στο θρεπτικό υλικό SOB στους 30 °C μέχρι την λογαριθμική φάση ανάπτυξης όπου προστέθηκε αραβινόζη σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η ανάπτυξη συνεχίστηκε μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) να φτάσει στα 0.6-0.7. Τα κύτταρα αφού φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm στους 4 °C για 10 min, εκπλύθηκαν με ddH₂O και αφού επαναφυγοκεντρήθηκαν, επαναιωρήθηκαν τελικά σε διάλυμα 10% γλυκερόλης.

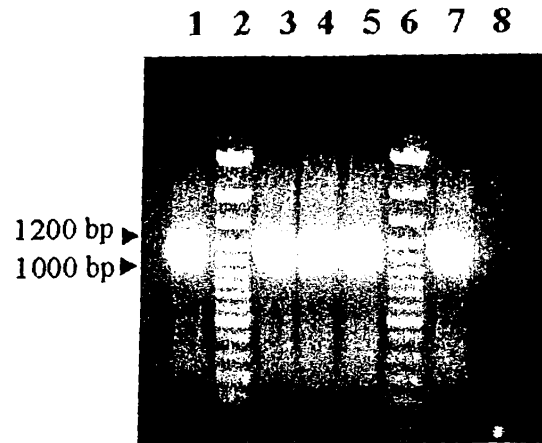


Ο μετασχηματισμός έγινε, σε 50 μ L επιδεκτικών κυττάρων μετά από προσθήκη 100 ng ευθύγραμμου DNA, με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) και τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε ανάρρωση σε διάλυμα SOB για 1 h στους 37 °C. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε προθερμασμένα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (τελική συγκέντρωση 50 μ g/mL) στους 37 °C. Η ανάπτυξη των κυττάρων στους 37 °C οδηγεί σε απομάκρυνση του πλασμιδίου pKD46. Η επιλογή των ορθών κλώνων knock out πραγματοποιήθηκε: α) με επιλογή με το αντιβιοτικό καναμυκίνη (50 μ g/mL) και β) με διαγνωστική PCR μετά από απομόνωση χρωμοσωμικού DNA χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδίζουν με το γονίδιο ανθεκτικότητας (Πίνακας 2.7). Το αναμενόμενο μοριακό βάρος του ορθού προϊόντος PCR ήταν 1158 bp (Εικόνα 2.3).

Αλληλουχία εκκινητών (primer sequence)
<p>YgfO (out) sense: 5'-TCGTACCGCTTTTAACGTGTGTTCTCCTGACATCATTGACTCCTTTACTGGTGTAG GCTGGAGCTGCTTCG -3'</p>
<p>YgfO (out) antisense: 5'-ATAGTGACTGCGAAAATGAGATAAGCCGTTCTCAAGGCGTCCTGCGCCCCCTGT CAAACATGAGAATTAATTCCG -3'</p>
<p>Kan-sense: 5'-GCCACAGTCGATGAATCCAG -3'</p>
<p>Kan-antisense: 5'-TTGTCAAGACCGACCTGTCC -3'</p>

Πίνακας 2.7: Εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου *ygfO* και την επιλογή των ορθών κλώνων knock out





Εικόνα 2.3: Ανάλυση PCR για την επιλογή κλώνων knock out του στελέχους *E. coli* BW25113

Ως υπόστρωμα για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε χρωμοσωμικό DNA του στελέχους BW25113 στο οποίο έγινε προσπάθεια απενεργοποίησης του ενδογενούς γονιδίου *ygfO* με το ζεύγος εκκινητών Kan (sense) και Kan (antisense) (5 διαφορετικοί κλώνοι, Διαδρομές 1,3-5,7). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε χρωμοσωμικό DNA του στελέχους BW25113 (Διαδρομή 8). Ποσότητα (20 μ L) από κάθε αντίδραση αναλύθηκε σε πηκτή αгарόζης 1%. Οι δείκτες μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder) παρουσιάζονται στις διαδρομές 2 και 6 της εικόνας

2.5 Ανάπτυξη κυττάρων

Διαλύματα

Ελάχιστο θρεπτικό υλικό M9

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	50 mM
KH ₂ PO ₄	0.02 mM
NaCl	0.01 mM
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0.1 mM

Αποστείρωση, pH 7.4

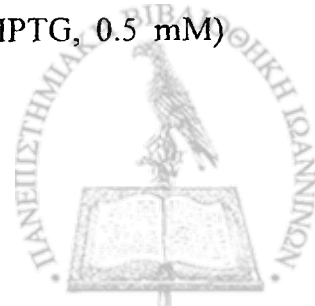
Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Βλέπε Κεφ. 2.4.1

Ανάπτυξη σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό M9

Για τον έλεγχο της ανάπτυξης της *E. coli* σε διάφορες πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκε το ελάχιστο θρεπτικό υλικό M9 που περιέχει 0.4% (w/v) γλυκόζη ως πηγή C. Τα κυτταρικά στελέχη, μετασηματισμένα ή όχι με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pT7-5, pT7-5/ygfO ή pT7-5/yicE που ελέγχθηκαν ήταν τα Top10F', T184, DH5α, BW25113, MC1061. Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χλωριούχο αμμώνιο (17 mM), ασπαρτικό οξύ (8 mM), αδερίνη (8 mM), ξανθίνη (8 mM έως 10 μM), ουρικό οξύ (5 mM έως 0.2 mM), υποξανθίνη (5 mM έως 10 μM), ουρακίλη (1 mM), αλλοπουρινόλη (1 mM έως 0,2 mM) και οξυπουρινόλη (1 mM έως 0,2 mM).

Ο έλεγχος της ανάπτυξης των κυττάρων ξεκινά με μια προκαλλιέργεια σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB παρουσία των απαραίτητων αντιβιοτικών στους 37 °C για 16 h, υπό αερόβιες συνθήκες. Ακολουθεί αραιώση 1/10 σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με διάφορες πηγές αζώτου και καλλιέργεια των κυττάρων για 5 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Μετά το πέρας των 5 ωρών πραγματοποιείται εκ νέου αραιώση 1/25 σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό για την πλήρη έκπλυση του πλήρους θρεπτικού υλικού και έλεγχος της ανάπτυξης της καλλιέργειας μετά από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) κάθε 1 h. Η επαγωγή της έκφρασης των YgfO και YicE επιτυγχάνεται με προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG, 0.5 mM) στο μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης.



Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα ελέγχου τοξικότητας νουκλεοτιδικών αναλόγων (1-, 3-, 7-, 8-, 9-μεθυλοξανθίνη, 2-, 6-θειοξανθίνη, αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη, 8-αζαξανθίνη, 2,8-διθειοξανθίνη) σε συγκεντρώσεις από 0.1 mM έως 5 mM, τόσο σε πλήρες όσο και σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό. Το ελάχιστο θρεπτικό υλικό περιέχει ως βασική πηγή αζώτου NH_4Cl (17 mM) ή ασπαρτικό οξύ (8 mM)

Ανάπτυξη σε πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Για τα πειράματα της δοκιμασίας ενεργού μεταφοράς, της ανοσοαποτύπωσης και της απομόνωσης των πρωτεϊνών, το κυτταρικό στέλεχος της *E. coli* T184 μετασχηματισμένο με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, αναπτύχθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB που περιλαμβάνει τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.01 mg/mL). Η ανάπτυξη των κυττάρων ξεκινά με μια προκαλλιέργεια στο ανωτέρω θρεπτικό υλικό (3 mL) στους 37 °C για 16 h, υπό αερόβιες συνθήκες. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε αραίωση 1/10 στο ίδιο θρεπτικό υλικό και ακολούθησε ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες μέχρι το μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων (2 h). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με προσθήκη IPTG (0.5 mM) και ανάπτυξη για 2 h ακόμη. Τα κύτταρα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν, πλύθηκαν με τα απαραίτητα διαλύματα και χρησιμοποιήθηκαν για δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ή παρασκευή μεμβρανικών κλασμάτων.



2.6 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport Assay)

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Βλέπε Κεφ. 2.4.1

Ρυθμιστικό διάλυμα KP_i (pH 7.5)

KH_2PO_4/K_2HPO_4	0.1 M
---------------------	-------

Διάλυμα τερματισμού (pH 5.5)

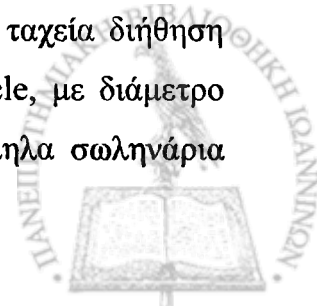
KP_i	0.1 M
LiCl	0.1 M

Υγρό σπινθηρισμού

Τολουόλιο	66% (v/v)
Triton X-100	33% (v/v)
2,5-διφαινυλ-οξαζόλη (PPO)	4% (w/v)
1,4-δισ(5-φαινυλοξαζολ-2- υλ)βενζένιο (POPOP)	0.04% (w/v)

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αφού αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στις συνθήκες που αναφέρονται στο Κεφ. 2.5, εκκλύθηκαν δυο φορές με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος KP_i . Τελική επαναιώρηση των κυττάρων έγινε σε 1mL του ίδιου διαλύματος και ακολούθως οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ομαλοποιήθηκαν με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD_{420}) και προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος έτσι ώστε η τελική τιμή της OD_{420} να είναι 10. Η τιμή αυτή ισοδυναμεί με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL βάσει αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (Frillingos *et al.*, 1994).

Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3H]ξανθίνης (27.6 Ci/mmol), [3H]υποξανθίνης (20 Ci/mmol), [3H]ουρακίλης (59 Ci/mmol), ή [^{14}C]ουρικού οξέος (50 mCi/mmol) (1μM ως 100μM) πραγματοποιήθηκε σε 50 μL κυττάρων, στους 25 °C, για διάφορους χρόνους. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με 2X3 mL διαλύματος τερματισμού με ταχεία διήθηση (rapid filtration) υπό κενό σε ηθμό διήθησης (Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm) (Frillingos *et al.*, 1994). Ο ηθμός μεταφέρθηκε σε κατάλληλα σωληνάρια



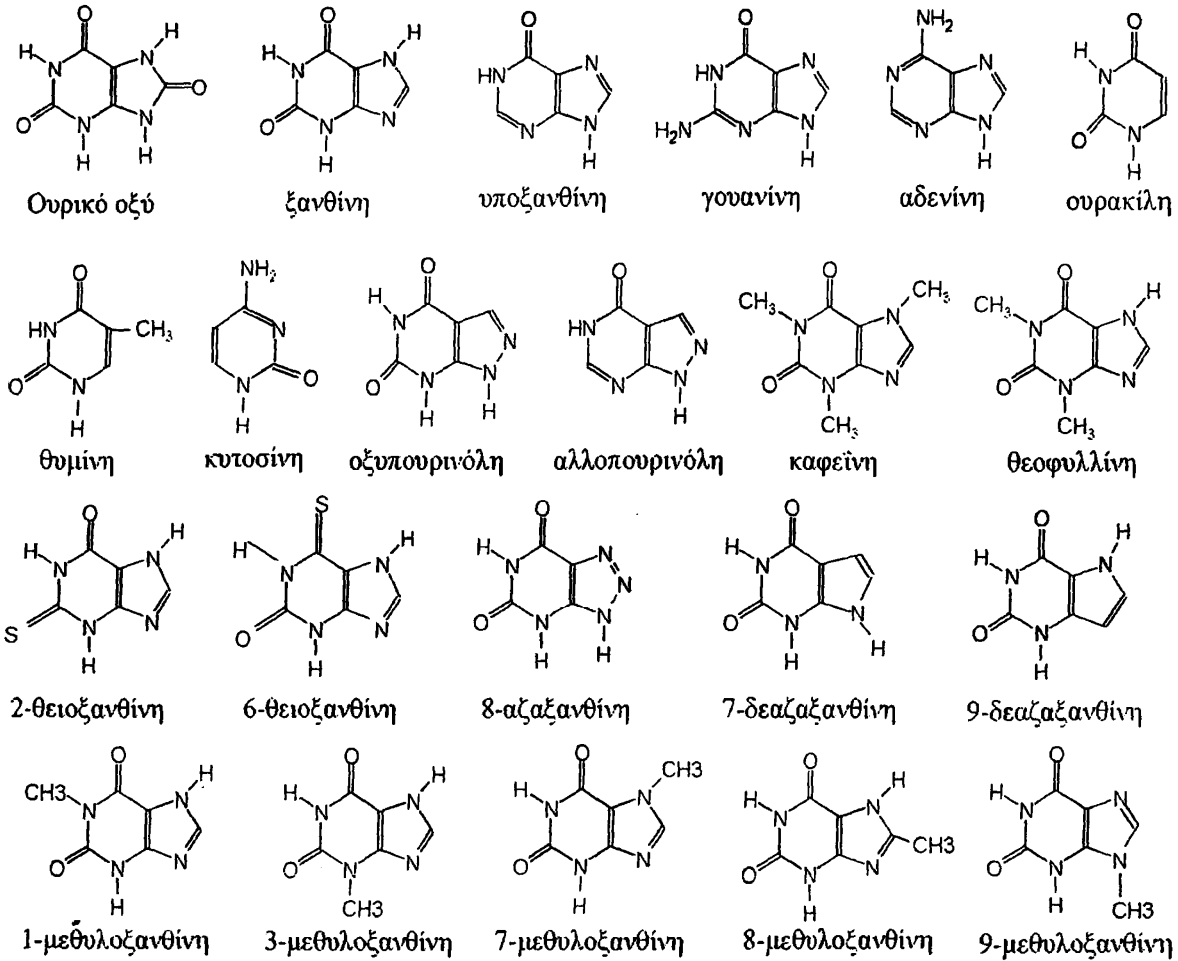
(scintillation vials) και επώαστηκε επί 24ωρου σε υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid), (8 mL), ώστε να απελευθερωθεί στο διάλυμα η παγιδευμένη ραδιενέργεια. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος και του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής).

Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης των υποστρωμάτων μετρήθηκε στα 5 και 10 sec και οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.1 μM έως 100 μM . Οι V_{\max} και K_m εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 4* (<http://www.graphpad.com/>).

Στην περίπτωση των πειραμάτων ανταγωνισμού πρόσληψης ξανθίνης, πραγματοποιήθηκε προεπάση των κυττάρων με μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (0.1 μM έως 1 mM) για 5 min και στη συνέχεια επάση με [^3H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 5 και 10 min και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος που προκαλούν 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα *Prism 4*. Οι τιμές K_i που δίδονται προέκυψαν από την εφαρμογή του τύπου των Cheng and Prusoff (1973) [$K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$], όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H]ξανθίνης. Οι μη σημασμένοι πιθανοί προσδέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν X:ξανθίνη, U:ουρικό οξύ, H:υποξανθίνη, Ur:ουρακίλη, A:αδενίνη, T:θυμίνη, C:κυτοσίνη, G:γουανίνη, Th:θεοφυλλίνη, Cf:καφεΐνη, Ap:αλλοπουρινόλη, Op:οξυπουρινόλη, 1:1-μεθυλοξανθίνη, 3:3-μεθυλοξανθίνη, 7:7-μεθυλοξανθίνη, 8:8-μεθυλοξανθίνη, 9:9-μεθυλοξανθίνη, 2:2-θειοξανθίνη, 6:6-θειοξανθίνη, 8z:8-αζαξανθίνη, 9d:9-δεαζαξανθίνη, 7d:7-δεαζαξανθίνη, F:φθοροουρακίλη, Al:αλλαντοΐνη, Im:ιμιδαζόλιο (Εικόνα 2.4).

Για τα πειράματα της επίδρασης του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου (NEM) στην ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης, τα κυτταρικά δείγματα προεπώαστηκαν με NEM (5 μM έως 2 mM) για χρόνους από 0 έως 10 min στους 25 °C και η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη διθειοθρεϊτόλης (DTT) (σε μοριακή περίσσεια 10X έναντι του μηλεϊμιδίου). Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM) έγινε παρουσία μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (phenazinemethosulphate, PMS) (0.2 mM) και ασκορβικού καλίου (20 mM).





Εικόνα 2.4: Δομές νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων τους

2.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Βλέπε Κεφ. 2.4.1

Διάλυμα επαναιώρησης

Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	100 mM
Na ₂ EDTA	1mM

Διάλυμα σακχαρόζης

Tris-HCl pH 8	25 mM
Σακχαρόζη	45% (w/v)
Na ₂ EDTA	1 mM

Η παρασκευή του κλάσματος εσωτερικών μεμβρανών από κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε με την καθιερωμένη μέθοδο του συνδυασμού οσμωτικού σοκ, επώασης με EDTA/λυσοζύμη και κατεργασίας με υπερήχους (Konings *et al.*, 1971, Frillingos *et al.*, 1994). Αναλυτικότερα, τα κύτταρα αφού αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στις συνθήκες που αναφέρονται στο Κεφ. 2.5, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και εκπλύθηκαν με 10 mL διαλύματος επαναιώρησης. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν τελικά σε 1 mL του ίδιου διαλύματος και μεταφέρθηκαν σε μικροσωληνάρια τύπου erpendorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erpendorf (13000 rpm, 2 min) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL διαλύματος σακχαρόζης. Μετά από επώαση στους 4 °C για 20 min έγινε νέα φυγοκέντρηση (13000 rpm, 1 min), το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 800 µL ddH₂O και επώαστηκε για 10 min στους 4 °C. Ακολούθησε προσθήκη λυσοζύμης (0.13 mg/mL) και επώαση στους 4 °C για 30 min. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε ομοιογενοποίηση σε συσκευή υπερήχων. Εφαρμόσθηκαν 2 ώσεις διάρκειας 15 sec, σε ένταση 40%. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13000 rpm, 2 min) για να απαλλαγούν από τυχόν μη ομοιογενοποιημένα κυτταρικά υλικά (cell debris). Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα, τα οποία υποβλήθηκαν σε υπερφυγοκέντρηση (Beckmann OptimaTM Ultracentrifuge, κεφαλή MLA – 130) (90000 rpm, 10 min, 4 °C). Τα μεμβρανικά δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε 40 µL ddH₂O και προετοιμάστηκαν περαιτέρω για ηλεκτροφορητική ανάλυση και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης.



2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.8.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Απαιτούμενα διαλύματα

Διάλυμα διαχωρισμού pH 8.8

Tris	1.5 M
SDS	0.4% (w/v)

Διάλυμα επιστοίβαξης pH 6.8

Tris	0.5 M
SDS	0.4% (w/v)

30% ακρυλαμίδιο/Bis ακρυλαμίδιο 37.5:1 (Biorad)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

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

Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS)

APS	10% (w/v)
-----	-----------

Διάλυμα φόρτωσης 4x

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

Για την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται από τον Laemmli (1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού 12%.



Πηκτή διαχωρισμού (100 mL)

30% ακρυλαμίδιο	42 mL
Διάλυμα διαχωρισμού	25 mL
dH ₂ O	32 mL
10% SDS	1 mL
10% APS	1 mL
TEMED	0.05 mL

Πηκτή επιστοίβαξης (30 mL)

30% ακρυλαμίδιο	4.5 mL
Διάλυμα επιστοίβαξης	7.5 mL
dH ₂ O	17.4 mL
10% SDS	0.3 mL
10% APS	0.3 mL
TEMED	0.03 mL

Πριν από την ηλεκτροφόρηση προστίθεται στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Ως δείκτης πρότυπων μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range της εταιρείας Bio-Rad Laboratories (Hercules, California).

2.8.2 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)Απαιτούμενα διαλύματα**Διάλυμα μεταφοράς**

Tris-Cl pH 8.3	25 mM
Γλυκίνη	192 mM
Μεθανόλη	20% v/v

TBST 10X

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



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

Στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με τα εξής αντισώματα:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού επιτόπου της LacY (**anti-LacY-epitope**) (Carrasco *et al.*, 1984) σε αραιώση 1:50000 σε TBST-5% BSA. Μετά από δώρη επώαση, το αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλένεται 5 φορές με TBST. Ακολουθεί επώαση με το αντίσωμα πρωτεΐνη A συζευγμένη με υπεροξειδάση (HRP-labeled protein A) (αραιώση 1:50000 σε TBST-5% BSA) για 1 h και 5 εκπλύσεις με TBST.
- Επώαση με αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών συζευγμένη με υπεροξειδάση (**anti-PentaHis-HRP**) σε αραιώση 1:5000 σε TBST-5% BSA για 1 h. Ακολούθησαν 5 εκπλύσεις με TBST
- Επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (**anti-GFP**) σε αραιώση 1:1000 σε TBST-5% BSA για 1 h ακολουθούμενη από επώαση με αντίσωμα anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP σε αραιώση 1:5000 σε TBST-5% BSA για 1 h. Οι εκπλύσεις με TBST πραγματοποιήθηκαν όπως ανωτέρω.

Η ανοσοαποτύπωση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (**avidin-HRP**) σε αραιώση 1:100000 σε TBST-5% BSA για 1 h και ακολούθησαν 8 εκπλύσεις με TBST.

Η ανίχνευση του σήματος σε όλες τις περιπτώσεις έγινε με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Pharmacia BioTech).

2.8.3 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

Ο 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 ένα αλκαλικό περιβάλλον, με την υψηλής ευαισθησίας χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού (Cu^{+1}) (στα 562 nm) χρησιμοποιώντας δικυχονικό οξύ (bicinchoninic acid).



2.9 Δοκιμασία σήμανσης κυστεϊνών *in vivo*

Απαιτούμενα διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό υλικό (LB)

Διάλυμα Tris-NaCl pH 7.5

Tris	15 mM
NaCl	150 mM

Διάλυμα σακχαρόζης

Tris-HCl pH 8	30 mM
Σακχαρόζη	30% (w/v)
Na ₂ EDTA pH 8	10 mM

Διάλυμα αποδιάταξης

Διάλυμα Tris-NaCl που περιέχει 6 M Urea και 0.5% (w/v) SDS

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στις συνθήκες που αναφέρονται στο Κεφ. 2.5. Δείγμα 1 mL κυττάρων συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο (13.000 rpm, 1 min). Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με 1 mL διαλύματος Tris-NaCl. Μετά από επαναφυγοκέντρηση το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε με 200 μ L του ίδιου διαλύματος. Το δείγμα επώαστηκε απουσία ή παρουσία *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου σε τελική συγκέντρωση 1 mM για 10 min στους 25 °C. Τα κύτταρα στη συνέχεια εκπλύθηκαν 2 φορές με 1 mL διαλύματος Tris-NaCl και επαναιωρήθηκαν σε 100 μ L διαλύματος σακχαρόζης που περιέχει 50 μ g/mL λυσοζύμη. Ακολούθησε επώαση για 15 min στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 600 μ L διαλύματος 15 mM MgSO₄ και η επώαση συνεχίστηκε για 15 min στους 37 °C. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο (14.000 rpm, 15 min, 4 °C), και μετά από αφαίρεση του υπερκειμένου επώαστηκε με 100 μ L διαλύματος Tris-NaCl που περιέχει 0.8% (w/v) *n*-δωδεκυλο- β -D-μαλτοπυρανοσιδίου (DDM) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.



Παράλληλα προετοιμάστηκαν τα σφαιρίδια Ni^{2+} -IDA με έκπλυση σε ddH_2O (2X), σε διάλυμα Tris-NaCl (4X) και 1 φορά σε διάλυμα Tris-NaCl που περιέχει 0.08% (w/v) DDM και 30 mM ιμιδαζόλιο. Τα δείγματα επώαστηκαν με 300 μL διαλύματος Tris-NaCl, το οποίο περιείχε 30 mM ιμιδαζόλιου και 50 μL Ni^{2+} -IDA σφαιριδίων, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Μετά την επώαση, τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν 2 φορές με 1 mL διαλύματος αποδιάταξης και στη συνέχεια επώαστηκαν με 100 μL του ίδιου διαλύματος που περιείχε 200 μM πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (Oregon Green Maleimide, OGM) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Η δράση του OGM τερματίστηκε με προσθήκη 300 μL διαλύματος αποδιάταξης που περιείχε 5 mM β -μερκαπτοαιθανόλη (3 min, θερμοκρασία δωματίου).

Η έκλυση των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με την προσθήκη 50 μL 1X διαλύματος φόρτωσης που περιείχε 100 mM DDT και 0.07 M Na_2EDTA , pH 8 και επώαση του για 10 min στους 30 °C. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα SDS-ακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE) και μετά από μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri) πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση με δύο αντισώματα:

- Επώαση με αντίσωμα έναντι του πράσινου μηλεϊμιδίου του Oregon (**anti-OGM**) σε αραιώση 1:3000 σε TBST-5% BSA για 2 h. Το αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλένεται 5 φορές με TBST. Ακολουθεί επώαση με το αντίσωμα πρωτεΐνη A συζευγμένη με υπεροξειδάση (HRP-labeled protein A) (αραιώση 1:50000 σε TBST-5% BSA) για 1 h και 5 εκπλύσεις με TBST
- Επώαση με αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών συζευγμένο με υπεροξειδάση (**anti-PentaHis-HRP**) σε αραιώση 1:5000 σε TBST-5% BSA για 1 h. Ακολούθησαν 5 εκπλύσεις με TBST

Η ανίχνευση του σήματος έγινε με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Pharmacia BioTech).



2.10 *In silico* αναλύσεις

Οι αλληλουχίες DNA και οι προβλεπόμενες αντίστοιχες αλληλουχίες αμινοξέων ανασύρθηκαν από τράπεζες δεδομένων που προέρχονται από την αλληλουχία του πλήρους γονιδιώματος της *E. coli* K-12 [όπως αυτή κατατέθηκε (Blattner *et al.*, 1997) και βάσει πλέον πρόσφατης ενημερωμένης έκδοσης 24 Ιουνίου 2004].

Η ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών των μεταφορέων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Η ανάλυση του γονιδιώματος της *E. coli* K-12 ως προς την ύπαρξη ομολόγων γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 και την κατάταξη τους σε ομάδες ορθολόγων πρωτεϊνών στηρίχθηκε 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 της τοπολογίας των μεταφορέων βασίστηκε στο υπολογιστικό πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



3.1 Ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2 στην *Escherichia coli*

Βάσει *in silico* αναλύσεων, το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 περιλαμβάνει 10 παράλογα που ανήκουν στην οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2 (Blattner *et al.*, 1997) και προβλέπεται ότι μπορεί να λειτουργούν ως μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων. Πρόκειται για τα γονίδια *uraA*, *yicE*, *ygfO*, *ygfU*, *yedG*, *ybbY*, *yjcD*, *yicO*, *yieG* και *ygfQ*. Από τις αντίστοιχες προβλεπόμενες πρωτεΐνες, η UraA έχει χαρακτηριστεί πειραματικά ως ειδικός μεταφορέας ουρακίλης (Andersen *et al.*, 1995), τρεις (YicE, YgfO, YgfU) αναφέρονται ως πιθανοί μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού, μία (YcdG) ως πιθανός μεταφορέας ουρακίλης και οι υπόλοιπες (YbbY, YjcD, YicO, YieG, YgfQ) ως πιθανοί μεταφορείς ξανθίνης ή ουρακίλης (<http://www.membranetransport.org>). Από τη φυλογενετική ταξινόμηση γονιδιακών προϊόντων που κωδικοποιούνται σε πλήρη γονιδιώματα και την κατάταξη τους σε ομάδες ορθόλογων πρωτεϊνών (Clusters of Orthologous Groups of proteins, COGs) 5 από τα 10 παράλογα που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 (YgfO, YicE, YgfU, YcdG, YbbY) τοποθετούνται μαζί με την διαπεράση UraA στην ομάδα COG2233 και 4 παράλογα τοποθετούνται σε διαφορετική ομάδα (YjcD, YgfQ, YicO, Yuen) την COG2252 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

Σύγκριση προς τις αλληλουχίες των λειτουργικά γνωστών μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 δείχνει ότι οι YgfO, YicE, YgfU και YcdG διατηρούν την χαρακτηριστική αλληλουχία του μοτίβου «υπογραφή» [Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-T-[R/K/G] (Diallinas *et al.*, 1998, Amilis *et al.*, 2001) (Εικόνα 3.1). Ανάλυση στοίχισης (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών υποδεικνύει ότι η YcdG είναι συγγενέστερη προς τον μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E. coli* (35% ταυτότητα καταλοίπων, 80% ταυτότητα στο μοτίβο), ενώ οι YgfO και YicE είναι συγγενέστερες προς τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού UapA και UapC του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (30% ταυτότητα καταλοίπων, 70% ταυτότητα στο μοτίβο). Η YgfU εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς τον μεταφορέα ξανθίνης PbuX και τον μεταφορέα ουρικού PucJ του *Bacillus subtilis* (40% ταυτότητα καταλοίπων, 70% ταυτότητα στο μοτίβο).



SVCT1_ <i>R.norvegicus</i>	PNIGVLGITR ³⁰⁰	(ασκορβικό, Tsukaguchi <i>et. al.</i> , 1999)
PyrP_ <i>L.lactis</i>	ENIGVMAITR ³¹⁵	(ουρακίλη, Turner <i>et. al.</i> , 1994)
YcdG_ <i>E.coli</i>	ENIGVMAVTR ³⁴⁰	
UraA_ <i>E.coli</i>	ENIGVMAITR ²⁹⁹	(ουρακίλη, Andersen <i>et. al.</i> , 1995)
LpeI_ <i>Z.mays</i>	ENAGLLAVTR ³⁵⁵	(ουρικό/ξανθίνη, Argyrou <i>et. al.</i> , 2001)
UapA_ <i>A.nidulans</i>	QNNGVIALTR ⁴³⁸	(ουρικό/ξανθίνη, Diallinas and Scazzocchio 1989)
UapC_ <i>A.nidulans</i>	QNNGVIALTR ⁴¹⁶	(ουρικό/ξανθίνη, Diallinas <i>et. al.</i> , 1995)
Xut1_ <i>C.albicans</i>	QNNGVISITR ³⁹⁵	(ουρικό/ξανθίνη, Goudela <i>et. al.</i> , 2005)
YgfO_ <i>E.coli</i>	QNNGVIQMTG ³³³	ξανθίνη
YicE_ <i>E.coli</i>	QNNGVQLTG ³⁴⁵	ξανθίνη
PbuX_ <i>B.subtilis</i>	QNVGLVQLTG ³⁰³	(ξανθίνη, Christiansen <i>et. al.</i> , 1997)
PucJ_ <i>B.subtilis</i>	QNAQLLQLTR ³⁰⁷	(ουρικό, Schultz <i>et. al.</i> , 2001)
YgfU_ <i>E.coli</i>	QNVGLVSVTR ³³⁰	
YbbY_ <i>E.coli</i>	SSIGLLTQTG ³¹⁵	
YgfQ_ <i>E.coli</i>	ESAAGTAAAG ³³⁷	
YjcD_ <i>E.coli</i>	ESAAGTAAAG ³³¹	
YicO_ <i>E.coli</i>	ESTGVAVAG ³⁵⁴	
YieG_ <i>E.coli</i>	LSSTGVSVAG ³²⁷	

Εικόνα 3.1: Σύγκριση της αλληλουχίας μελών της οικογένειας NAT/NCS2

Ανάλυση στοίχισης του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών των 10 παραλόγων της *E. coli* [YgfO (AAC75920, 466 κωδικόνια), YicE (AAC76678, 463 κωδικόνια), YgfU (Q46821, 482 κωδικόνια), YgfQ (AAT48153, 455 κωδικόνια), YcdG (AAC74091, 464 κωδικόνια), YbbY (AAC73615, 435 κωδικόνια), YjcD (AAC77034, 449 κωδικόνια), YicO (AAC76687, 470 κωδικόνια) και YieG (AAC76737, 445 κωδικόνια)] σε σύγκριση με τα λειτουργικά γνωστά μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 (<http://www.tcd.org>). Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW. Στην εικόνα αυτή φαίνεται μόνο η περιοχή αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο μοτίβο «υπογραφή». Όπου έχει γίνει λειτουργικός χαρακτηρισμός, τα υποστρώματα των μεταφορέων δίνονται σε παρένθεση. Οι πρωτεΐνες YgfO και YicE που φαίνονται σε γκρι οριζόντιο πλαίσιο χαρακτηρίστηκαν ως ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης στην παρούσα διατριβή. Οι θέσεις των συντηρημένων αμινοξέων [Q/E/P], N, G, T, και [R/K/G] δίνονται σε σκουρόχρωμες στήλες

3.2 Υπερέκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των YgfO και YicE

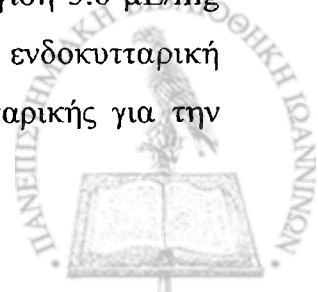
Τα γονίδια *ygfO* και *yicE* (Κεφάλαιο 3.1) κλωνοποιήθηκαν και υπερεκφράστηκαν εξωχρωμοσωμικά μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου (συνεργειώματος) της λακτόζης (*lacZ* p/o) υπό το μεταγραφικό έλεγχο του IPTG. Τα μετασχηματισμένα στελέχη *E. coli* αναλύθηκαν ως προς την δραστικότητα μεταφοράς ξανθίνης, ουρικού οξέος και άλλων συγγενών υποστρωμάτων. Επίσης, για τον έλεγχο της εξωχρωμοσωμικής έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν καρβοξυ-τελικές αλληλουχίες που εισάγουν συγκεκριμένους επιτόπους και σήματα χρωματογραφικού καθαρισμού (Κεφάλαιο 3.3).

3.2.1 Οι YgfO και YicE λειτουργούν ως μεταφορείς ξανθίνης υψηλής συγγένειας

Τα γονίδια *ygfO* και *yicE* κινητοποιήθηκαν από το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 (T184) με PCR και υποκλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5 που επιτρέπει εξωχρωμοσωμική υπερέκφραση μέσω του *lacZ* p/o. Μετά την επιβεβαίωση της πλήρους κωδικεύουσας αλληλουχίας σε αυτόματο αναλυτή (MWG-Biotech. A.G, Edersberg, Germany), τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pT7-5/*ygfO* και pT7-5/*yicE* εισήχθησαν σε κύτταρα *E. coli* T184.

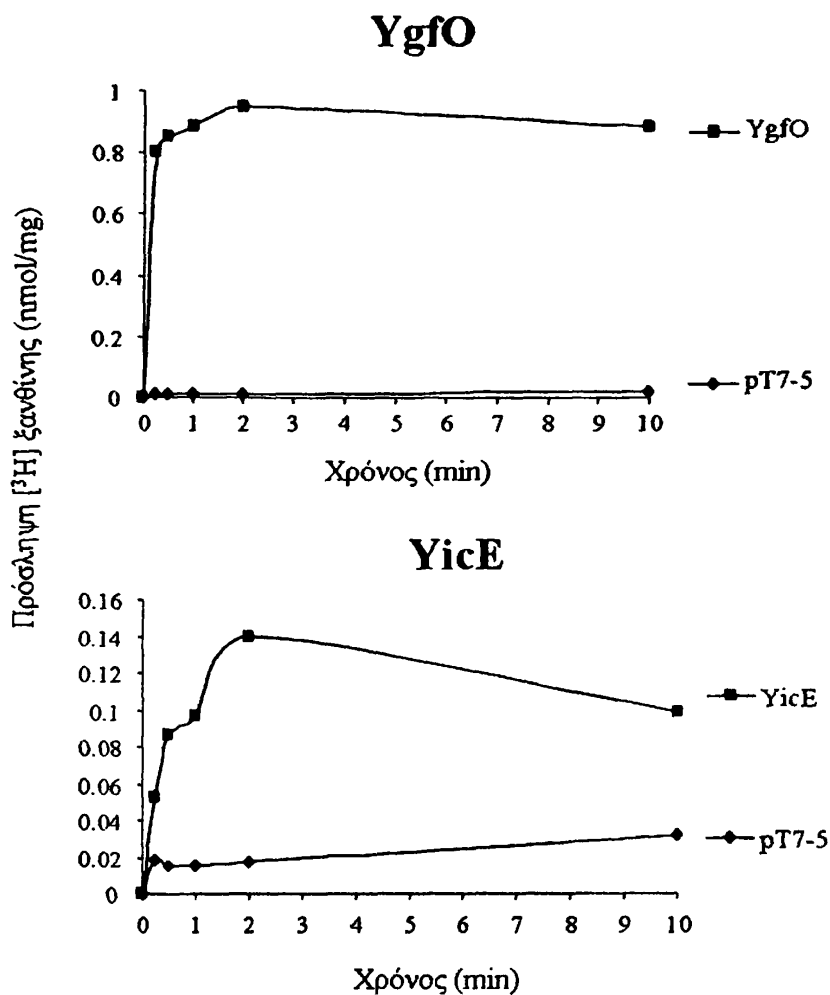
Τα προκύπτοντα στελέχη *E. coli* T184[pT7-5/*ygfO*] και T184[pT7-5/*yicE*] υπεβλήθησαν σε διεξοδικό λειτουργικό χαρακτηρισμό. Αρχικά, έγινε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM) μετά από επαγωγή της έκφρασης των YgfO και YicE από τα αντίστοιχα πλασμίδια (Εικόνα 3.2).

Στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούμε είναι φανερό ότι οι εξωχρωμοσωμικά εκφραζόμενες YgfO και YicE έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ξανθίνη ενώ τα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης μέσω των ενδογενών γονιδίων είναι πολύ χαμηλά έως μηδενικά. Η ταχύτητα πρόσληψης ξανθίνης που μπορεί να υπολογιστεί από τις τιμές των χρονικών σημείων 5-15 sec είναι $1.5 \pm 0.37 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ πρωτεΐνης (n=10) και $0.15 \pm 0.04 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ πρωτεΐνης (n=8) αντίστοιχα, ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (steady state) υπολογίζονται από τις τιμές των χρονικών σημείων 1-10 min και είναι $0.80 \pm 0.18 \text{ nmol/mg}$ (n=10) και $0.08 \pm 0.01 \text{ nmol/mg}$ (n=8), αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο εσωτερικός όγκος των κυττάρων της *E. coli* είναι κατά προσέγγιση 5.8 μL/mg ολικής πρωτεΐνης (Felle *et al.*, 1980), τα επίπεδα αυτά αντιστοιχούν σε ενδοκυτταρική συγκέντρωση υποστρώματος που είναι 310-φορές μεγαλύτερη της εξωκυτταρικής για την



YgfO και 15-φορές για την YicE. Άρα, πρόκειται για πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς που επιτρέπουν συσσώρευση του υποστρώματος αντίθετα προς τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης.

Ακολούθως, προσδιορίστηκαν οι τιμές K_m και V_{max} από δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης στην περιοχή συγκεντρώσεων 0.1 μM έως 100 μM (Πίνακας 3.1). Οι τιμές των K_m και V_{max} υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες YgfO και YicE είναι μεταφορείς ξανθίνης υψηλής συγγένειας και ότι η ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης της YgfO είναι 10 φορές μεγαλύτερη από αυτήν της YicE.



Εικόνα 3.2: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των πρωτεϊνών YgfO και YicE

Σύγκριση της ικανότητας πρόσληψης [^3H]ξανθίνης (1 μM) (27.6 Ci/mmol) κυττάρων *E. coli* T184 που υπερεκφράζουν τις YgfO και YicE σε σχέση με κύτταρα που είναι μετασχηματισμένα με τον αρνητικό μάρτυρα pT7-5. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκπλυση των κυττάρων με KR₂ και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς με ταχεία διήθηση στους 25 °C.



Διαπεράσεις	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
YgfO	4.2 ± 0.7	6.36 ± 0.52	1514
YicE	2.9 ± 0.5	0.59 ± 0.14	203

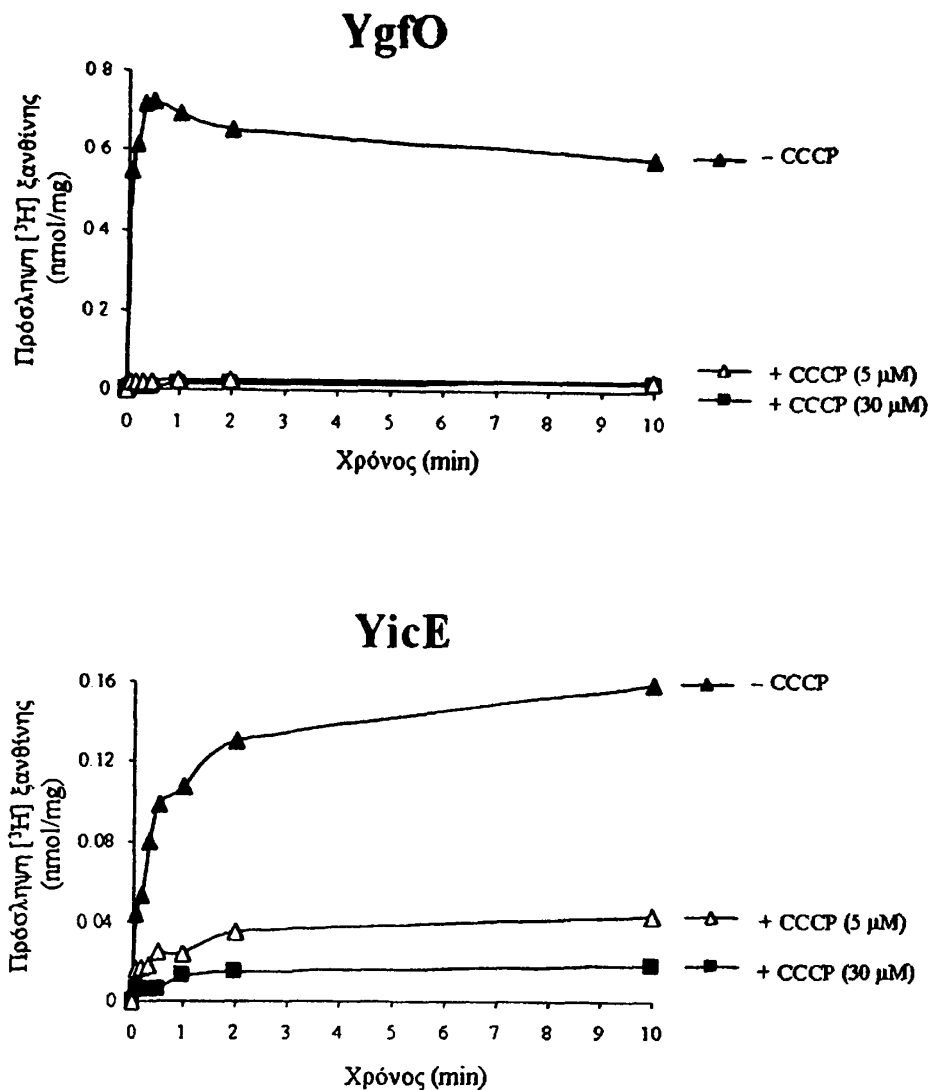
Πίνακας 3.1: Τιμές K_m και V_{\max} των διαπερασών YgfO και YicE

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις διαπεράσεις YgfO και YicE και οι τιμές των K_m και V_{\max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και 100 μM . Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.2. Οι παράμετροι K_m και V_{\max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

3.2.2 Οι YgfO και YicE είναι συμμεταφορείς ξανθίνης: H^+

Οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 αναφέρονται ως πρωτεΐνες δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς βάσει της ταξινόμησης τους από *in silico* αναλύσεις (Saier, 2000). Για να ελέγξουμε πειραματικά αν εξαρτώνται από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων πραγματοποιήσαμε πειράματα ενεργού μεταφοράς ξανθίνης παρουσία ή απουσία του πρωτονιοφόρου CCCP (καρβονυλο-κυαναμιδο-χλωροφαινυλο-υδραζόνιο) (Εικόνα 3.3). Συνεπώς με 30 μM CCCP το οποίο καταργεί την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων (Kaback *et al.*, 1974), αναστέλλει πλήρως την ενεργότητα τόσο της YgfO όσο και της YicE. Άρα πρόκειται για πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου, που εξαρτώνται απόλυτα από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων.





Εικόνα 3.3: Επίδραση του πρωτονιοφόρου CCCP στην ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των διαπερασών YgfO και YicE

Κύτταρα *E. coli* T184 που είναι μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO, pT7-5/yicE και pT7-5 υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM) παρουσία (■ 30μM, Δ 5μM) ή απουσία (▲) CCCP. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.2. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα είναι ίδιες με τις τιμές των YgfO ή YicE μετά από επώαση με 30 μM CCCP

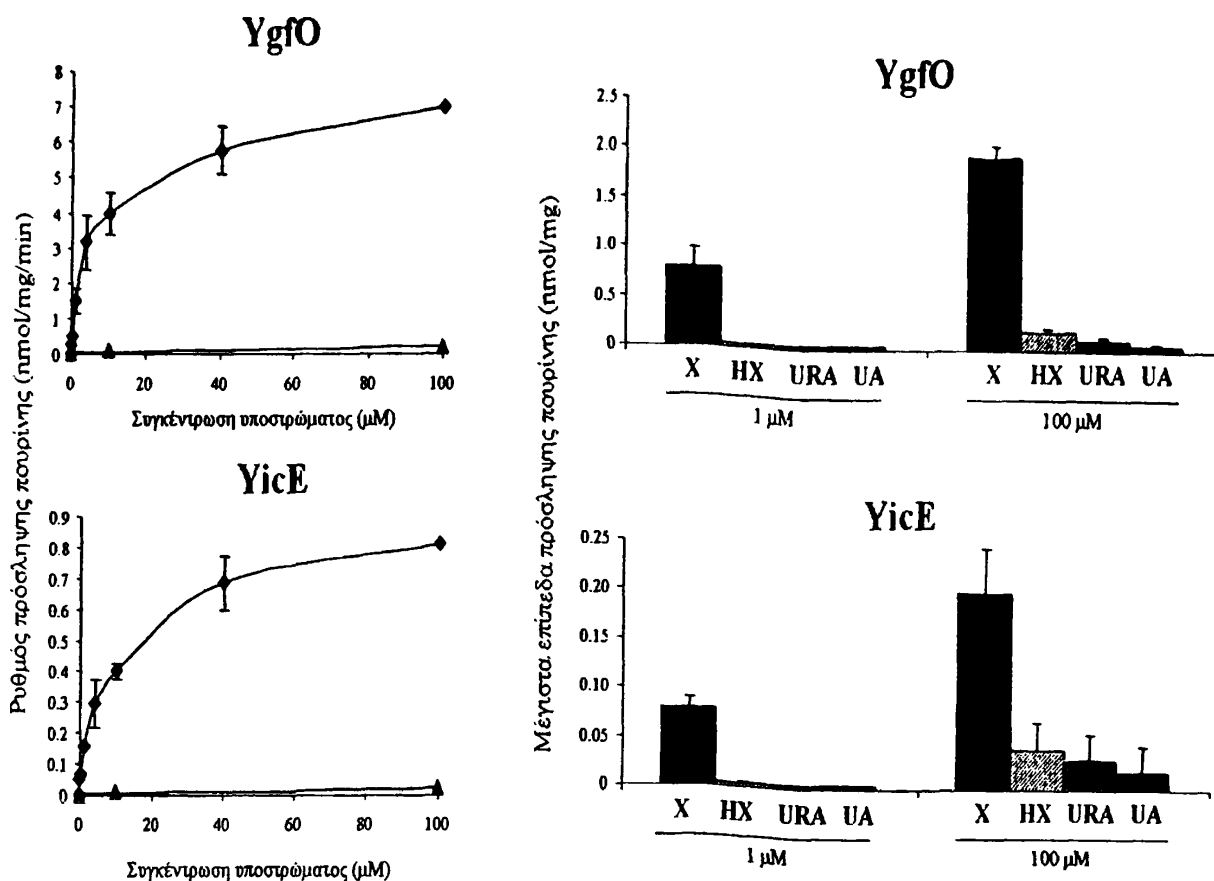
3.2.3 Οι YgfO και YicE είναι ειδικοί μεταφορείς ξανθίνης και δεν αναγνωρίζουν ουρικό οξύ ή ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις 7 και 8

Ακολούθησε ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα ή προσδέτες και άλλες φυσικές πουρίνες εκτός της ξανθίνης ή πυριμιδίνες καθώς και ανάλογα αυτών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς με [³H]υποξανθίνη, [³H]ουρακίλη και [¹⁴C]ουρικό οξύ (1 μM - 100 μM) (Εικόνα 3.4). Καμία από τις δύο διαπεράσεις δεν μεταφέρει υποξανθίνη, ουρακίλη ή ουρικό οξύ.

Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) χρησιμοποιώντας σε μη ραδιενεργή μορφή μια σειρά (n=25) από φυσικές πουρίνες ή πυριμιδίνες και ανάλογα αυτών σε περίσσεια συγκέντρωσης (1 mM) (Εικόνα 3.5). Οι νουκλεοτιδικές βάσεις ουρικό οξύ, υποξανθίνη, ουρακίλη, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη δεν μπορούν να ανταγωνιστούν την πρόσληψη της ξανθίνης. Η πρόσληψη ξανθίνης αναστέλλεται ισχυρά από τα συνθετικά ανάλογα 1-, 3-, 9-μεθυλοξανθίνη, 2-, 6-θειοξανθίνη, ενώ δεν επηρεάζεται καθόλου από συνθετικά ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 7 και 8 του πουρινικού δακτυλίου τόσο για την διαπεράση YgfO όσο και για την YicE.

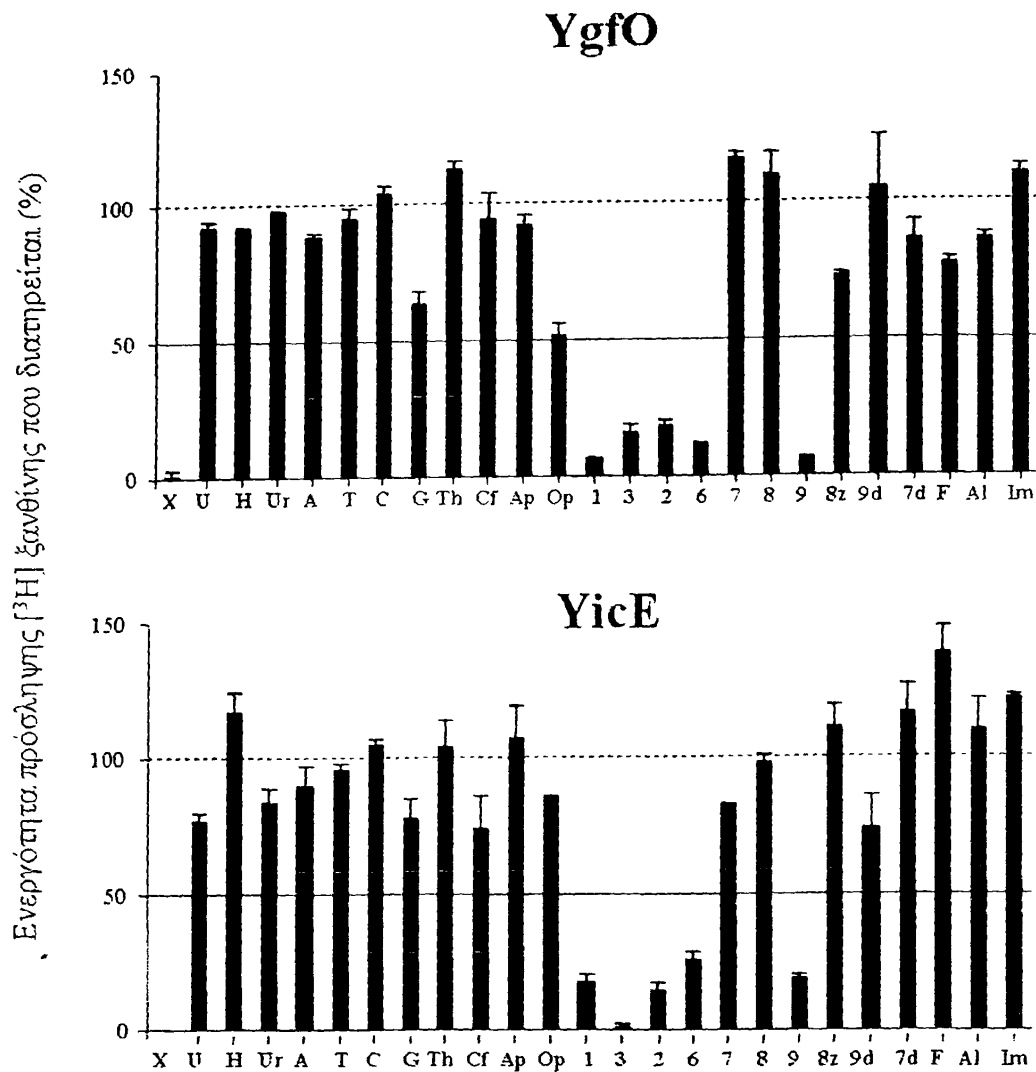
Μετά την εξέταση της επίδρασης των πιθανών προσδετών σε συγκέντρωση 1 mM, έγιναν πειράματα δοσοεξάρτησης του ανταγωνισμού σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.1 μM έως 1 mM (Πίνακας 3.2) ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} και εξ αυτών οι τιμές K_i . Οι τιμές K_i δηλώνουν τις σταθερές ανταγωνισμού για κάθε πιθανό προσδέτη ή υπόστρωμα και δίνουν ένα πρώτο μέτρο της συγγένειας δέσμευσης: όσο πιο μικρή η K_i τόσο πιο μεγάλη η φαινόμενη συγγένεια δέσμευσης του προσδέτη στο μεταφορέα. Τόσο η διαπεράση YgfO όσο και η YicE εμφανίζουν υψηλές συγγένειες δέσμευσης για τους προσδέτες ξανθίνη, 1-, 3-, 9-μεθυλοξανθίνη και 2-, 6-θειοξανθίνη, ενώ δεν εμφανίζουν υψηλές συγγένειες δέσμευσης για τους προσδέτες ουρικό, υποξανθίνη, γουανίνη, ουρακίλη, 7-, 8-μεθυλοξανθίνη, 7-, 9-δεαζαξανθίνη και αλλοπουρινόλη. Οι μόνες σημαντικές διαφορές μεταξύ των YgfO και YicE, είναι ότι η YgfO παρουσιάζει ημίσεια τιμή K_i για την 6-θειοξανθίνη και διπλάσια τιμή K_i για την 3-μεθυλοξανθίνη σε σχέση με την YicE.





Εικόνα 3.4: Εξειδίκευση μεταφοράς υποστρωμάτων των YgfO και YicE

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO, pT7-5/yicE και pT7-5 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ως προς [³H]ξανθίνη (27.6 Ci/mmol) (♦ αριστερή εικόνα, X:δεξιά εικόνα), [¹⁴C]ουρικό οξύ (50 mCi/mmol) (▲ αριστερή εικόνα, UA:δεξιά εικόνα), [³H]υποξανθίνη (20 Ci/mmol) (HX:δεξιά εικόνα) ή [³H]ουρακίλη (59 Ci/mmol) (URA:δεξιά εικόνα) σε συγκεντρώσεις 1-100 μM. Ο ρυθμός πρόσληψης των υποστρωμάτων προσδιορίστηκε μετά από 5 και 10 sec επώασης και τα μέγιστα επίπεδα πρόσληψης μετά από 1-20 min επώασης. Οι τιμές που προκύπτουν παρουσιάζονται μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5 (μέγιστα επίπεδα 0.01 nmol/mg και 0.2 nmol/mg για τα 1 μM και 100 μM, αντίστοιχα). Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται



Εικόνα 3.5: Προφίλ εξειδίκευσης των YgfO και YicE

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO, pT7-5/yicE ή pT7-5 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h ελέγχονται με δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης μετά από προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό επί των τιμών κυττάρων που δεν έχουν προεπωαστεί με τους μη σημασμένους προσδέτες. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται. Οι νουκλεοτιδικές βάσεις και τα ανάλογα αυτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: X:ξανθίνη, U:ουρικό οξύ, H:υποξανθίνη, Ur:ουρακίλη, A:αδενίνη, T:θυμίνη, C:κυτοσίνη, G:γουανίνη, Th:θεοφυλλίνη, Cf:καφεΐνη, Ap:αλλοπουρινόλη, Op:οξυπουρινόλη, 1:1-μεθυλοξανθίνη, 3:3-μεθυλοξανθίνη, 2:2-θειοξανθίνη, 6:6-θειοξανθίνη, 7:7-μεθυλοξανθίνη, 8:8-μεθυλοξανθίνη, 9:9-μεθυλοξανθίνη, 8z:8-αζαξανθίνη, 9d:9-δεαζαξανθίνη, 7d:7-δεαζαξανθίνη, F:5-φλοροουρακίλη, Al:αλλαντοΐνη, Im:ιμιδαζόλιο



Ανταγωνιστές	K_i (μM)	
	YgfO	YicE
Ουρικό οξύ	>1000	>1000
Υποξανθίνη	>1000	>1000
Γουανίνη	>1000	>1000
Ουρακίλη	>1000	>1000
1-μεθυλοξανθίνη	36	50
2-θειοξανθίνη	91	145
3-μεθυλοξανθίνη	72	34
6-θειοξανθίνη	41	87
7-μεθυλοξανθίνη	>1000	>1000
7-δεαζαξανθίνη	>1000	>1000
8-μεθυλοξανθίνη	>1000	>1000
8-αζαξανθίνη	>1000	>1000
9-μεθυλοξανθίνη	53	89
9-δεαζαξανθίνη	>1000	>1000
Αλλοπουρινόλη	>1000	>1000

Πίνακας 3.2: Τιμές K_i για τις διαπεράσεις YgfO και YicE

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO, pT7-5/yicE ή pT7-5 και η δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM) πραγματοποιήθηκε μετά την προεπάση των κυττάρων με τους μη σημασμένους προσδέτες σε συγκεντρώσεις από 0.1 μM – 1 mM. Η πειραματική διαδικασία φαίνεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.5. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης. Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των YgfO και YicE παρουσιάζονται με έντονα γράμματα

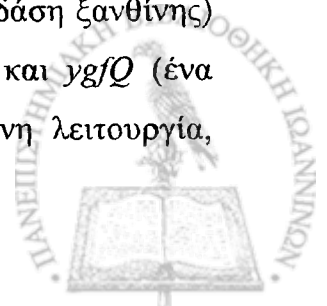


3.2.4 Ρόλος των γονιδίων *ygfO* και *yicE* ως προς την ανάπτυξη της *E. coli* K-12 *in vivo* σε πηγές αζώτου

Μια σειρά κυτταρικών στελεχών *E. coli* K-12 (DH5α, BW25113, Top10F⁺, MC1061, or T184) ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με διάφορες μοναδικές πηγές αζώτου (ξανθίνη, υποξανθίνη, ουρικό οξύ, αδενίνη, χλωριούχο αμμώνιο, ασπαρτικό οξύ). Διαπιστώθηκε ότι όλα τα ανωτέρω στελέχη της *E. coli* μπορούν να αναπτυχθούν με μοναδικές πηγές αζώτου την αδενίνη, το ασπαρτικό και το αμμώνιο. Στις υπόλοιπες πηγές δεν παρουσιάζεται ανάπτυξη, κάτι που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα από την εργασία του Xi *et al.*, 2000 η οποία αναφέρει ότι στελέχη της *E. coli* μπορούν να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως μοναδικές πηγές αζώτου ασπαρτικό, αδενίνη ή αμμώνιο αλλά όχι υποξανθίνη, ξανθοσίνη, ινοσίνη ή αλλαντοΐνη.

Για να ελεγχθεί κατά πόσο θα μπορούσαν να ωφελήσουν άλλες νουκλεοτιδικές βάσεις επικουρικά την ανάπτυξη στελεχών *E. coli* (DH5α, T184) μετασχηματισμένων ή όχι με τα πλασμίδια pT7-5, pT7-5/*ygfO* ή pT7-5/*yicE*, χρησιμοποιήθηκε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με βασικές πηγές αζώτου το ασπαρτικό οξύ ή το χλωριούχο αμμώνιο και επιπρόσθετες πηγές την ξανθίνη (Εικόνα 3.6), την υποξανθίνη, το ουρικό, την ουρακίλη, την αλλοπουρινόλη ή την οξυπούρινόλη (Πίνακας 3.3). Τόσο η ξανθίνη όσο και η υποξανθίνη (50 μM έως 5 mM) όχι όμως το ουρικό οξύ, μπορούν να συνεισφέρουν συμπληρωματικά στην ανάπτυξη του στελέχους DH5α όταν προστίθενται ως επιπλέον πηγές αζώτου σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με βασική πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο (17 mM) ή το ασπαρτικό οξύ (8 mM). Αυτό υποδεικνύει ότι η ξανθίνη και η υποξανθίνη είναι χρησιμοποιήσιμες πηγές αζώτου (μέσω του μονοπατιού περίσωσης των πουρινών ή του καταβολισμού) αλλά δεν μπορούν να προσφέρουν από μόνες τους την απαραίτητη ποσότητα αζώτου που χρειάζεται για την ανάπτυξη. Παρατηρήσαμε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης δεν υφίσταται καμία σημαντική αλλαγή στις περιπτώσεις που έχουμε εξωχρωμοσωμική υπερέκφραση των διαπερασών *YgfO* ή *YicE* (Εικόνα 3.6).

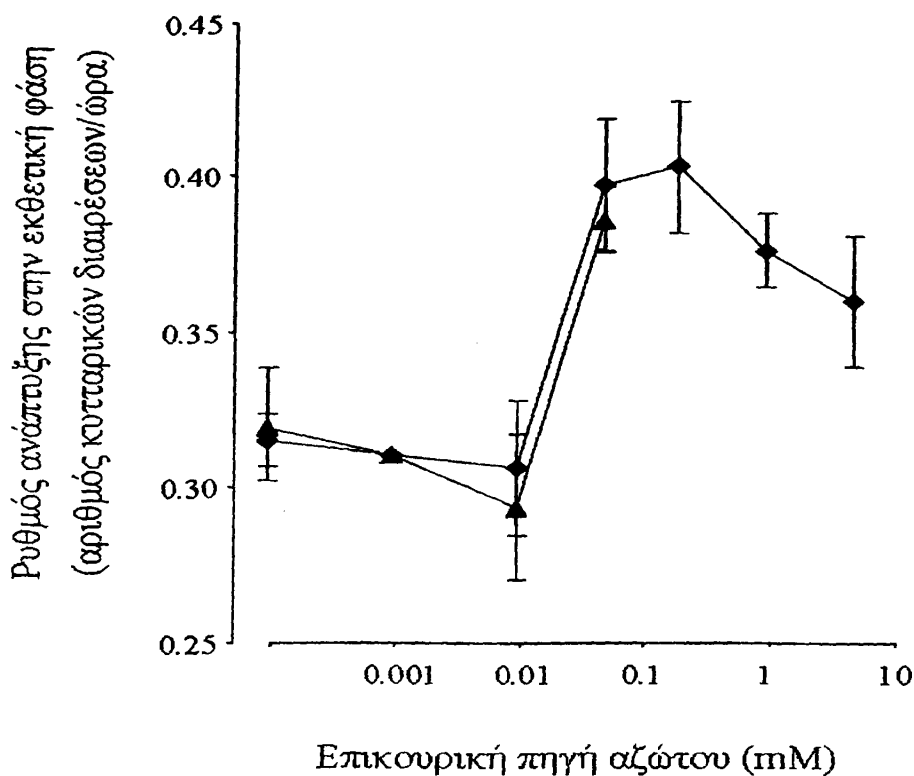
Το γονίδιο *ygfO* ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων στο *min* 65 του γονιδιώματος της *E. coli* όπου εντοπίζονται οπερόνια τα οποία είναι πιθανόν να εμπλέκονται στον καταβολισμό και τη μεταφορά των πουρινών (Xi *et al.*, 2000). Πιο συγκεκριμένα, το *ygfO* βρίσκεται αμέσως μετά το γονίδιο *xdhD* (γονίδιο που πιθανόν κωδικοποιεί για μια οξειδάση ξανθίνης) και αμέσως πριν από τα γονίδια *ygfP* (αμιδοϋδρολάση του αλλαντοϊκού) και *ygfQ* (ένα παράλογο γονίδιο της οικογένειας NAT/NCS2 χωρίς εμφανή προβλεπόμενη λειτουργία,



Εικόνα 3.1), σε ένα πιθανό οπερόνιο που ελέγχεται από δύο σ^{54} -υποκινητές (Reitzer and Schneider, 2001). Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσον η ενδογενής έκφραση της διαπεράσης YgfO εμπλέκεται με την ανάπτυξη της *E. coli* K-12 σε πηγές αζώτου, έγινε απαλοιφή (knock out) του γονιδίου *ygfO* από το γονιδίωμα του στελέχους BW25113 με τη μεθοδολογία ομόλογου ανασυνδυασμού των Datsenko and Wanner (2000). Το στέλεχος **BW25113:Δ*ygfO*** που δημιουργήθηκε, συγκρίθηκε με το αντίστοιχο φυσικού τύπου στέλεχος ως προς την ικανότητα επικουρικής χρησιμοποίησης ξανθίνης, αλλά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στον αντίστοιχο φαινότυπο (**Πίνακας 3.3**).

Τέλος, καμία από τις φυσικές πουρίνες ή τα ανάλογα πουρινών (1-, 3-, 7-, 8- ή 9-μεθυλοξανθίνη, 2- ή 6-θειοξανθίνη, 2,8-θειοξανθίνη, 8-αζαξανθίνη, αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη) που ελέγχθηκαν δεν παρουσίασαν τοξική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων *E. coli* DH5α ή T184 μετασχηματισμένων ή όχι με τα πλασμίδια pT7-5, pT7-5/*ygfO* ή pT7-5/*yicE* όταν προστέθηκαν σε πλήρες (**Πίνακας 3.4**) ή ελάχιστο θρεπτικό υλικό (**Πίνακας 3.3**) σε συγκεντρώσεις από 0.1 mM έως 5 mM.





Εικόνα 3.6: Επίδραση της ξανθίνης στην ανάπτυξη της *E. coli* K-12

Κύτταρα *E. coli* DH5α μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pT7-5/*ygfO* αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό M9 που περιέχει χλωριούχο αμμώνιο (18.7 mM) σαν βασική πηγή αζώτου και ξανθίνη σαν συμπληρωματική πηγή σε συγκεντρώσεις από 1 μ M έως 5 mM. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C ως την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και στη συνέχεια ακολούθησε επαγωγή (♦) ή όχι (▲) με IPTG (0.5 mM) για 2h. Η ανάπτυξη συνεχίστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm κάθε 1 h. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται. Τα ίδια αποτελέσματα έχουμε και στην περίπτωση κυττάρων DH5α που είναι μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/*yciE* ή pT7-5.

Βακτηριακό στέλεχος	Πηγές αζώτου σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό (M9+γλυκόζη)	Αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων/ώρα
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺	0.33 ± 0.02 (n=7)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 5 mM Ξανθίνη	0.35 ± 0.01 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1 mM Ξανθίνη	0.37 ± 0.01 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.2 mM Ξανθίνη	0.40 ± 0.02 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 50 μM Ξανθίνη	0.41 ± 0.01 (n=3)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 10 μM Ξανθίνη	0.34 ± 0.02 (n=3)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 5 mM Υποξανθίνη	0.35 ± 0.02 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1 mM Υποξανθίνη	0.34 ± 0.01 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.2 mM Υποξανθίνη	0.38 ± 0.02 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 50 μM Υποξανθίνη	0.39 ± 0.02 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 10 μM Υποξανθίνη	0.33 ± 0.01 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 5 mM Ουρικό	0.27 ± 0.01 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1 mM Ουρικό	0.32 ± 0.01 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.2 mM Ουρικό	0.34 ± 0.02 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1mM Ουρακίλη	0.35 ± 0.02 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1 mM Αλλοπουρινόλη	0.34 ± 0.02 (n=3)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.2 mM Αλλοπουρινόλη	0.37 ± 0.03 (n=2)
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1 mM Οξυπουρινόλη	0.36
DH5α[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.2 mM Οξυπουρινόλη	0.37
DH5α[pT7-5/ygfO]	Ασπαρτικό οξύ	0.25
DH5α[pT7-5/ygfO]	Ασπαρτικό οξύ + 5 mM Ξανθίνη	0.34
DH5α[pT7-5/ygfO]	Ασπαρτικό οξύ + 5 mM Υποξανθίνη	0.35
DH5α[pT7-5/ygfO]	Ασπαρτικό οξύ + 5 mM Ουρικό	0.26
DH5α[pT7-5/ygfO]	Ασπαρτικό οξύ + 1 mM Αλλοπουρινόλη	0.25
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺	0.51
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 5 mM Ξανθίνη	0.51
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 1 mM Ξανθίνη	0.51
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.5 mM Ξανθίνη	0.51
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.2 mM Ξανθίνη	0.51
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 0.1 mM Ξανθίνη	0.51
T184[pT7-5/ygfO]	NH ₄ ⁺ + 50 μM Ξανθίνη	0.51
BW25113 ή BW25113ΔygfO	NH ₄ ⁺	0.49
BW25113 ή BW25113ΔygfO	NH ₄ ⁺ + 50 μM Ξανθίνη	0.50
BW25113 ή BW25113ΔygfO	NH ₄ ⁺ + 10 μM Ξανθίνη	0.48



Πίνακας 3.3: Επίδραση νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων τους στην ανάπτυξη στελεχών της *E. coli* σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό

Κύτταρα *E. coli* DH5α μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pT7-5/ygfO αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό M9 (0.4% (w/v) γλυκόζη ως πηγή C) που περιέχει χλωριούχο αμμώνιο (18.7 mM) ή ασπαρτικό Οξύ (8 mM) ως βασική πηγή αζώτου παρουσία ή απουσία νουκλεοτιδικών βάσεων ή αναλόγων τους ως συμπληρωματικών πηγών σε συγκεντρώσεις από 10 μ M έως 5 mM. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C ως την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή ή όχι με IPTG (0.5 mM). Η ανάπτυξη των κυττάρων παρακολουθήθηκε με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm ανά 1h, επί συνολικής διάρκειας 6-7h. Τα δεδομένα μεταφέρθηκαν σε διάγραμμα χρονικής προόδου της κυτταρικής αύξησης και προσαρμόστηκαν σε εκθετική εξίσωση ($R^2 > 0.99$) με χρήση του προγράμματος Excel: από την εξίσωση αυτή υπολογίσθηκε ο ρυθμός κυτταρικής αύξησης (αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων ανά h). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στα βακτηριακά στελέχη DH5α, DH5α/pT7-5, DH5α/pT7-5/ygfO, DH5α/pT7-5/yicE και τα αποτελέσματα ήταν ίδια με αυτά που παρουσιάζονται για το στέλεχος DH5α/pT7-5/ygfO, εκτός της περίπτωσης της οξυπουρινόλης (0.2 mM ή 1 mM) όπου στο στέλεχος DH5α/pT7-5 η εκθετική ανάπτυξη των κυττάρων ήταν περιορισμένη και σταματούσε εντελώς στις 4-5h. Σε όλες τις περιπτώσεις των μετασχηματισμένων κυττάρων με τα πλασμίδια pT7-5 ή pT7-5/ygfO ή pT7-5/yicE τα πειράματα έγιναν παρουσία ή απουσία IPTG 0.5 mM

Κύτταρα *E. coli* BW25113 και BW25113ΔygfO αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό M9 που περιέχει χλωριούχο αμμώνιο (18.7 mM) ως βασική πηγή αζώτου παρουσία ή απουσία ξανθίνης (10 μ M και 50 μ M) σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C. Οι τιμές που δίνονται προέκυψαν με τον τρόπο που αναφέρεται ανωτέρω.



Βακτηριακό στέλεχος	Παρουσία αναλόγου ξανθίνης στο θρεπτικό μέσο (0.1 mM)	Αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων/ώρα
DH5α	-	0.86
DH5α	1-μεθυλοξανθίνη	0.83
DH5α	3-μεθυλοξανθίνη	0.84
DH5α	7-μεθυλοξανθίνη	0.83
DH5α	8-μεθυλοξανθίνη	0.82
DH5α	9-μεθυλοξανθίνη	0.83
DH5α	2-θειοξανθίνη	0.80
DH5α	6-θειοξανθίνη	0.83
DH5α	2,8-θειοξανθίνη	0.80
DH5α	8-αζαξανθίνη	0.83
DH5α	αλλοπουρινόλη	0.83

Πίνακας 3.4: Επίδραση αναλόγων πουρινών στην ανάπτυξη στελεχών της *E. coli* σε πλήρες θρεπτικό υλικό

Κύτταρα *E. coli* DH5α ή T184 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB παρουσία 0.1 mM αναλόγων πουρινών. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C ως την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή ή όχι με IPTG (0.5 mM). Η ανάπτυξη των κυττάρων παρακολούθηθηκε με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600 nm ανά 1h, επί συνολικής διάρκειας 6-7h. Τα δεδομένα μεταφέρθηκαν σε διάγραμμα χρονικής προόδου της κυτταρικής αύξησης και προσαρμόστηκαν σε εκθετική εξίσωση ($R^2 > 0.99$) με χρήση του προγράμματος Excel: από την εξίσωση αυτή υπολογίστηκε ο ρυθμός κυτταρικής αύξησης (αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων ανά h). Τα ίδια αποτελέσματα έχουμε και στην περίπτωση κυττάρων DH5α ή T184 που είναι μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/γg/O ή pT7-5 μετά από επαγωγή με 0.1 mM IPTG



3.3 Προετοιμασία των YgfO και YicE για αναλύσεις των σχέσεων δομής-λειτουργίας

3.3.1 Εισαγωγή C-τελικών αλληλουχιών για ανοσοαποτύπωση και απομόνωση των YgfO και YicE

Για να επιτευχθεί η δυνατότητα παρακολούθησης των επιπέδων έκφρασης των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση και η απομόνωση τους με χρωματογραφία συγγένειας, δημιουργήθηκαν εναλλακτικές κατασκευές με εισαγωγή κατάλληλων αλληλουχιών στο C-τελικό άκρο των YgfO και YicE. Οι αλληλουχίες αυτές ήταν η περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (biotin acceptor domain, **BAD**) της αποκαρβοξυλάσης του οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1993), το καρβοξυτελικό δωδεκαπεπτιδίο της LacY (LSLLRRQVNEVA, **LacY-epitope**), η αλληλουχία 10 συνεχόμενων κωδικονίων ιστιδινών (**His₁₀**) και η αλληλουχία της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (**GFP**).

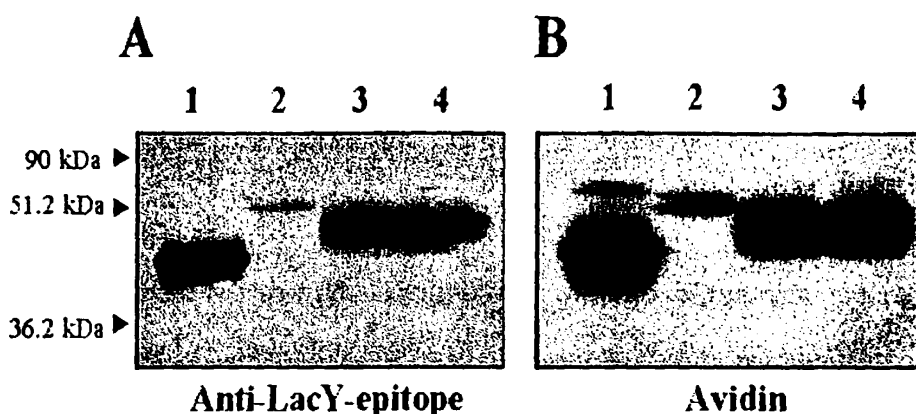
3.3.1.1. Σήμανση με την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και τον επίτοπο της LacY

Δημιουργήθηκαν και ελέγχθηκαν τα νέα στελέχη T184[pT7-5/ygfO-BAD] και T184[pT7-5/yicE-BAD]. Τα στελέχη αυτά εκτός του ότι εκφράζουν τις διαπεράσεις σημασμένες με έναν γνωστό επίτοπο της LacY, επιτρέπουν βιοτινυλίωση της διαπεράσης YgfO-BAD ή YicE-BAD *in vivo*, μέσω βιοτινυλίωσης της περιοχής δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και της ενεργού Lys, όταν αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει βιοτίνη (Consler *et al.*, 1993). Επομένως, ανοσοαποτύπωση μπορεί να γίνει τόσο με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της LacY (**anti-LacY-epitope**) όσο και με τη χρήση συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (**avidin-HRP**) (Εικόνα 3.7). Η υπερέκφραση των YgfO και YicE είναι εμφανής και με τα δύο πρωτόκολλα και μάλιστα, η πρωτεΐνη YgfO εκφράζεται στη μεμβράνη των κυττάρων πολύ εντονότερα από την πρωτεΐνη YicE. Η μικρότερη έκφραση της YicE είναι συμβατή με την κατά 10 φορές μικρότερη V_{max} που παρουσιάζει η διαπεράση αυτή ως προς την ικανότητα πρόσληψης ξανθίνης σε σχέση με την YgfO (Πίνακας 3.1). Σε έλεγχο δοσοεξάρτησης της έκφρασης της YgfO-BAD μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) (Εικόνα 3.8) διαπιστώθηκε ότι η έκφραση και η ενεργότητα της



YgfO είναι αυστηρά εξαρτώμενη από το IPTG. Στον χρόνο 0 (δηλ. αμέσως μετά την προσθήκη του IPTG) η έκφραση είναι μηδενική και η ενεργότητα αμελητέα. Στον χρόνο 60 min μετά την προσθήκη IPTG, τόσο η έκφραση όσο και η ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης φθάνει στα μέγιστα επίπεδα. Τα επίπεδα αυτά διατηρούνται και στα 90-150 min.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των διαπερασών YgfO-BAD και YicE-BAD σε σύγκριση με τις αντίστοιχες διαπεράσεις YgfO και YicE έδειξε τα εξής: όπως δείχνει τόσο η σύγκριση των ενεργοτήτων πρόσληψης ξανθίνης στο 1 μM (Εικόνα 3.9) όσο και η σύγκριση των τιμών K_m και V_{max} (Πίνακας 3.5) με τις αντίστοιχες διαπεράσεις φυσικού τύπου, οι επιπρόσθετες C-τελικές αλληλουχίες δεν επηρεάζουν την ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης των YgfO και YicE. Επιπλέον, η προσθήκη των C-τελικών αλληλουχιών δεν επηρεάζει το προφίλ εξειδίκευσης της διαπεράσης YgfO (Πίνακας 3.6).



Εικόνα 3.7: Έλεγχος της έκφρασης των YgfO-BAD και YicE-BAD

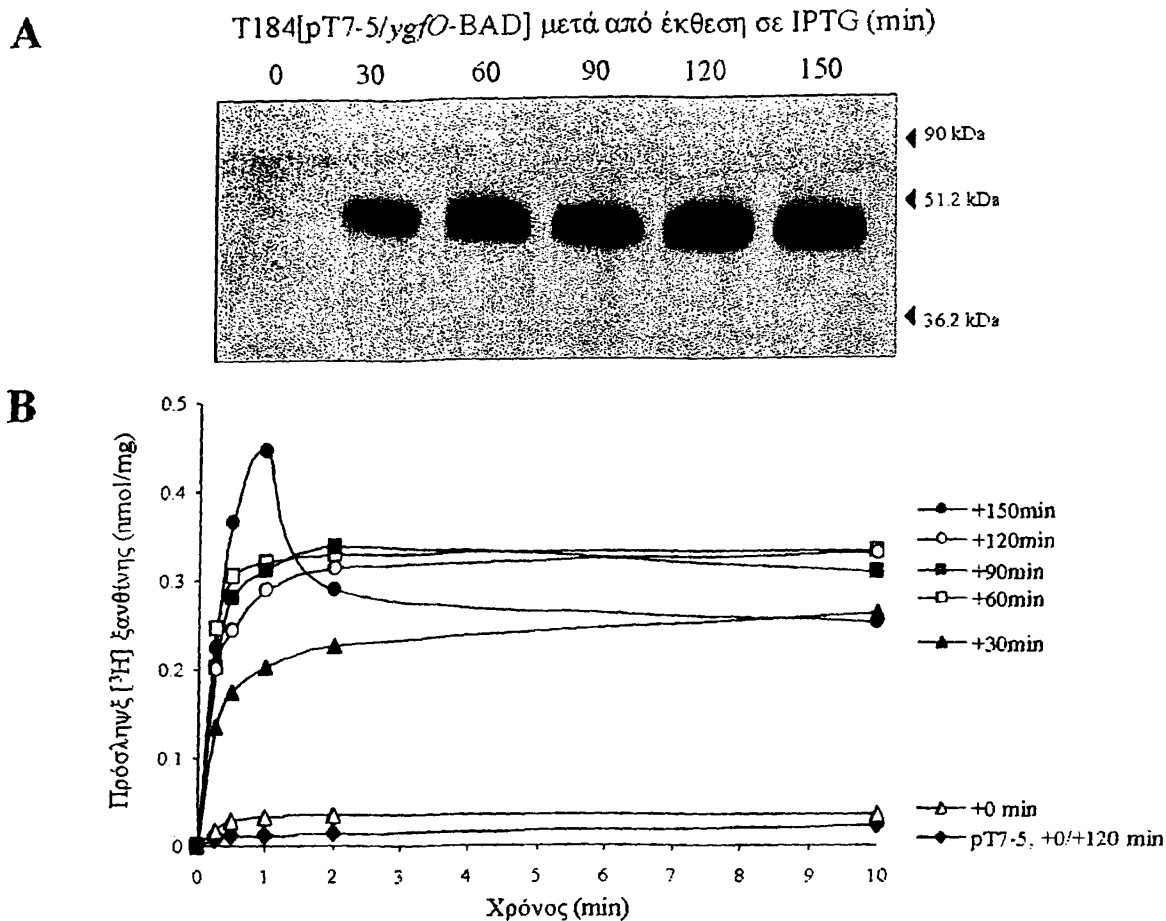
Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD (Διαδρομές 3-4, 100 μg), pT7-5/yicE-BAD (Διαδρομή 2, 100 μg), pT7-5/melY-BAD (Διαδρομή 1, 20 μg) αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mlM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση

A: Ανοσοαποτύπωση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της LacY (**anti-LacY-epitope**)

B: Ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (**avidin-HRP**)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



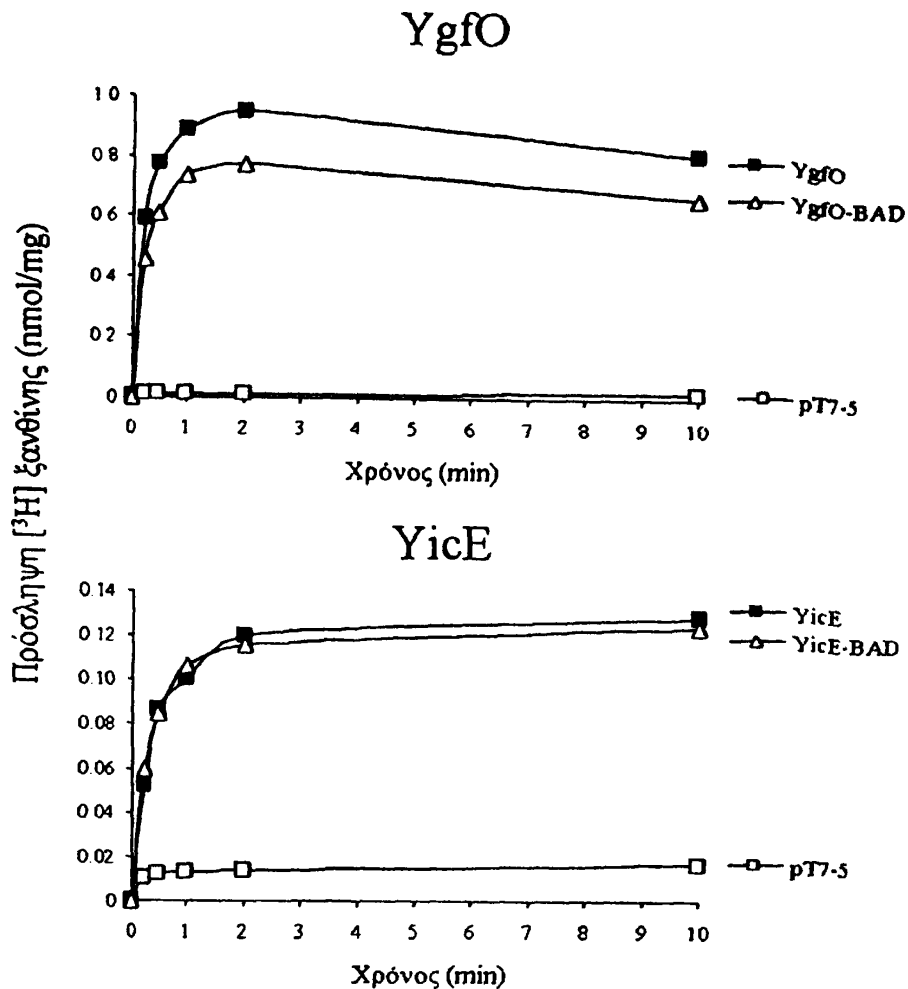


Εικόνα 3.8: Έλεγχος χρονοεξάρτησης της έκφρασης και της ενεργότητας της YgfO μετά από επαγωγή από το πλασμίδιο pT7-5/ygfO-BAD με IPTG

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 0, 30, 60, 90, 120 και 150 min.

A: Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

B: Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM)



Εικόνα 3.9: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των YgfO-BAD και YicE-BAD

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO (■), pT7-5/yicE (■), pT7-5/ygfO-BAD (△), pT7-5/yicE-BAD (△) και pT7-5 (□) αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκπλυση των κυττάρων με KP_i και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM)

Διαπεράσεις	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
YgfO	4.2 ± 0.7	6.36 ± 0.52	1514
YgfO-BAD	4.6 ± 0.3	6.34 ± 0.56	1378
YicE	2.9 ± 0.5	0.59 ± 0.14	203
YicE-BAD	3.8 ± 0.6	0.85 ± 0.06	224

Πίνακας 3.5: Τιμές K_m και V_{max} των YgfO-BAD και YicE-BAD

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις διαπεράσεις YgfO-BAD και YicE-BAD και οι τιμές των K_m και V_{max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και 100 μM και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές των φυσικού τύπου διαπερασών. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.9. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται



Ανταγωνιστές	Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης (%)	
	YgfO	YgfO-BAD
–	100	100
Ξανθίνη	1	0
Ουρικό οξύ	92	97
Υποξανθίνη	91	96
Ουρακίλη	97	101
Αδενίνη	88	96
Θυμίνη	95	97
Κυτοσίνη	104	101
Γουανίνη	65	94
Αλλοπουρινόλη	92	106
Οξυπουρινόλη	51	31
1-μεθυλοξανθίνη	6	19
3-μεθυλοξανθίνη	16	25
7-μεθυλοξανθίνη	116	101
8-μεθυλοξανθίνη	110	88
9-μεθυλοξανθίνη	6	13
2-θειοξανθίνη	18	13
6-θειοξανθίνη	19	21
8-αζαξανθίνη	72	102

Πίνακας 3.6: Προφίλ εξειδίκευσης της YgfO-BAD

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD και pT7-5 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h υπόκεινται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % ποσοστό των τιμών που προέρχονται από κύτταρα που δεν έχουν προεπαστεί με τους μη σημασμένους προσδέτες και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα που υπάρχουν για την διαπεράση φυσικού τύπου YgfO



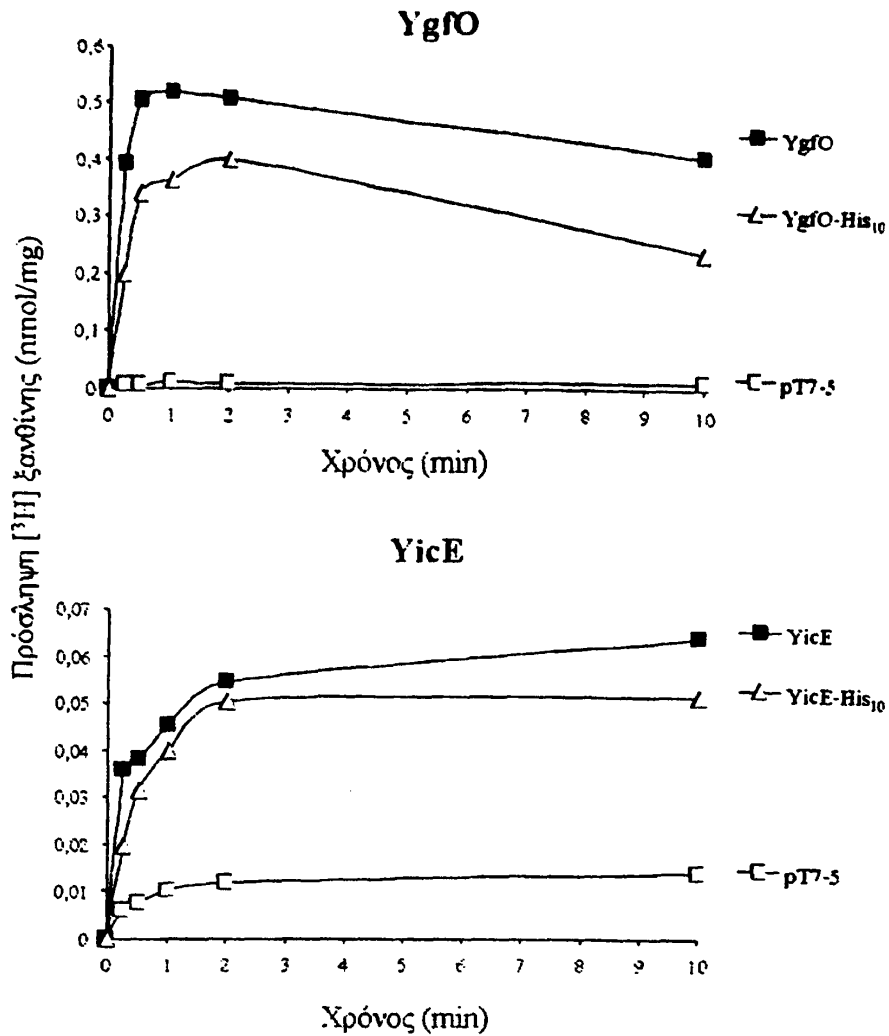
3.3.1.2. Σήμανση με την αλληλουχία των 10 ιστιδινών

Δημιουργήθηκαν και ελέγχθηκαν τα νέα στελέχη T184[pT7-5/ygfO-His₁₀] και T184[pT7-5/yicE-His₁₀]. Τα στελέχη αυτά επιτρέπουν ανοσοαποτύπωση και χρωματογραφικό καθαρισμό της διαπεράσης YgfO ή YicE μέσω αντισωμάτων έναντι της αλληλουχίας των 10 ιστιδινών ή δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με δισθενή μέταλλα (Ni²⁺, Co²⁺). Το υπόστρωμα της ουράς των His₁₀ χρησιμοποιήθηκε επίσης στα πειράματα αλκυλίωσης κυστεϊνών που περιγράφονται κατωτέρω στο Κεφάλαιο 3.4 (Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης).

Η λειτουργική ανάλυση (Εικόνα 3.10) και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (Εικόνα 3.11) των στελεχών T184[pT7-5/ygfO-His₁₀] και T184[pT7-5/yicE-His₁₀] έδειξαν αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω για τα στελέχη T184[pT7-5/ygfO-BAD] και T184[pT7-5/yicE-BAD].

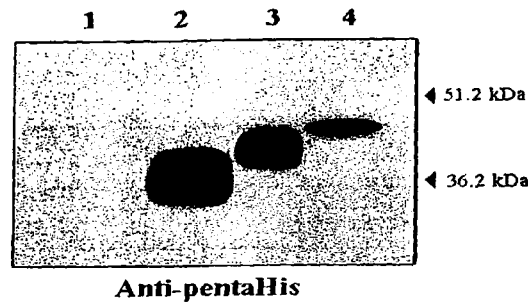
Περαιτέρω λειτουργικός χαρακτηρισμός της YgfO-His₁₀ έδειξε ότι η διαπεράση YgfO-His₁₀ έχει ίδια K_m και ελαφρά μεγαλύτερη V_{max} από ότι η YgfO(wt) (Πίνακας 3.7), ενώ το προφίλ εξειδίκευσης δεν διαφοροποιείται σημαντικά από αυτό της YgfO(wt) (Πίνακας 3.8).





Εικόνα 3.10: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των YgfO-His₁₀ και YicE-His₁₀

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO (■), pT7-5/ygfO-His₁₀ (Δ), pT7-5/yicE (■), pT7-5/yicE-His₁₀ (Δ) και pT7-5 (□) αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP₁ και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM)



Εικόνα 3.11: Έλεγχος της έκφρασης των YgfO-His₁₀ και YicE-His₁₀

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5 (Διαδρομή 1, 100μg), pT7-5/lacY(C154G)-His₁₀ (Διαδρομή 2, 20μg), pT7-5/ygfO-His₁₀ (Διαδρομή 3, 100μg), pT7-5/yicE-His₁₀ (Διαδρομή 4, 100μg) αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας 5 συνεχόμενων κωδικονίων His (anti-pentaHis).

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

Διαπεράσεις	K_m (μM)	V_{max} (nmol min^{-1} $\text{mg}^{-1} \text{protein}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
YgfO	4.2 ± 0.7	6.36 ± 0.52	1514
YgfO-His ₁₀	4.1 ± 0.6	9.91 ± 0.82	2417

Πίνακας 3.7: Τιμές K_m και V_{max} της YgfO-His₁₀

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την διαπεράση YgfO-His₁₀ και οι τιμές των K_m και V_{max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και 100 μM και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές της φυσικού τύπου διαπεράσης. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.10. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται



Ανταγωνιστές	Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης (%)	
	YgfO	YgfO-His ₁₀
-	100	100
Ξανθίνη	1	0
Ουρικό οξύ	92	54
Υποξανθίνη	91	100
Ουρακίλη	97	100
Αδενίνη	88	111
Θυμίνη	95	90
Κυτοσίνη	104	58
Γουανίνη	65	97
Αλλοπουρινόλη	92	98
Οξυπουρινόλη	51	54
1-μεθυλοξανθίνη	6	9
3-μεθυλοξανθίνη	16	14
7-μεθυλοξανθίνη	116	45
8-μεθυλοξανθίνη	110	48
9-μεθυλοξανθίνη	6	9
2-θειοξανθίνη	18	18
6-θειοξανθίνη	19	21
8-αζαξανθίνη	72	87

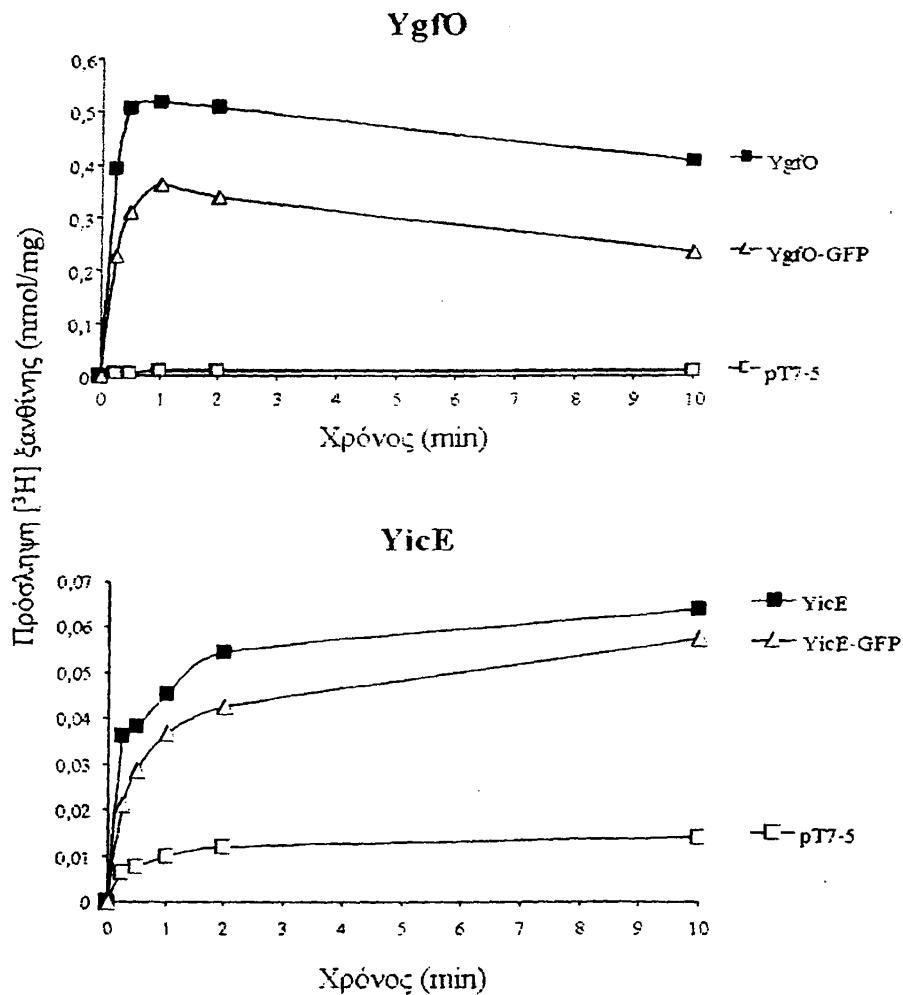
Πίνακας 3.8: Προφίλ εξειδίκευσης της YgfO-His₁₀

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-His₁₀ και pT7-5 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h υπόκεινται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % ποσοστό των τιμών που προέρχονται από κύτταρα που δεν έχουν προεπωαστεί με τους μη σημασμένους προσδέτες και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα που υπάρχουν για την διαπεράση φυσικού τύπου YgfO.



3.3.1.3. Σήμανση με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)

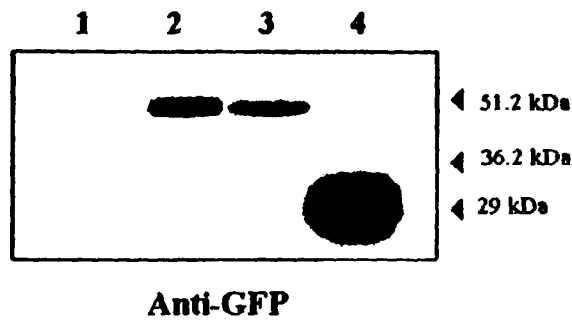
Δημιουργήθηκαν και ελέγχθηκαν τα νέα στελέχη T184[pT7-5/*ygfO*-GFP] και T184[pT7-5/*yicE*-GFP]. Τα στελέχη αυτά επιτρέπουν ανοσοαποτύπωση αλλά και παρακολούθηση των εκφραζόμενων διαπερασών *in vivo* με συνεστιακή μικροσκοπία σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η λειτουργική ανάλυση (Εικόνα 3.12) και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (Εικόνα 3.13) έδειξαν αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω για τα στελέχη T184[pT7-5/*ygfO*-BAD] και T184[pT7-5/*yicE*-BAD].



Εικόνα 3.12: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των YgfO-GFP και YicE-GFP

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO* (■), pT7-5/*ygfO*-GFP (△), pT7-5/*yicE* (■), pT7-5/*yicE*-GFP (△) και pT7-5 (□) αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP, και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM).





Εικόνα 3.13: Έλεγχος της έκφρασης των YgfO-GFP και YicE-GFP

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5 (Διαδρομή 1, 100μg), pT7-5/ygfO-GFP (Διαδρομή 2, 100μg), pT7-5/yicE-GFP (Διαδρομή 3, 100μg), καθαρή 29-kDa GFP (Διαδρομή 4, 1 μg) αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (**anti-GFP**).

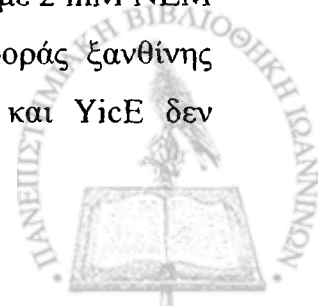
Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

3.3.2 Αντικατάσταση των ενδογενών καταλοίπων Cys των YgfO και YicE

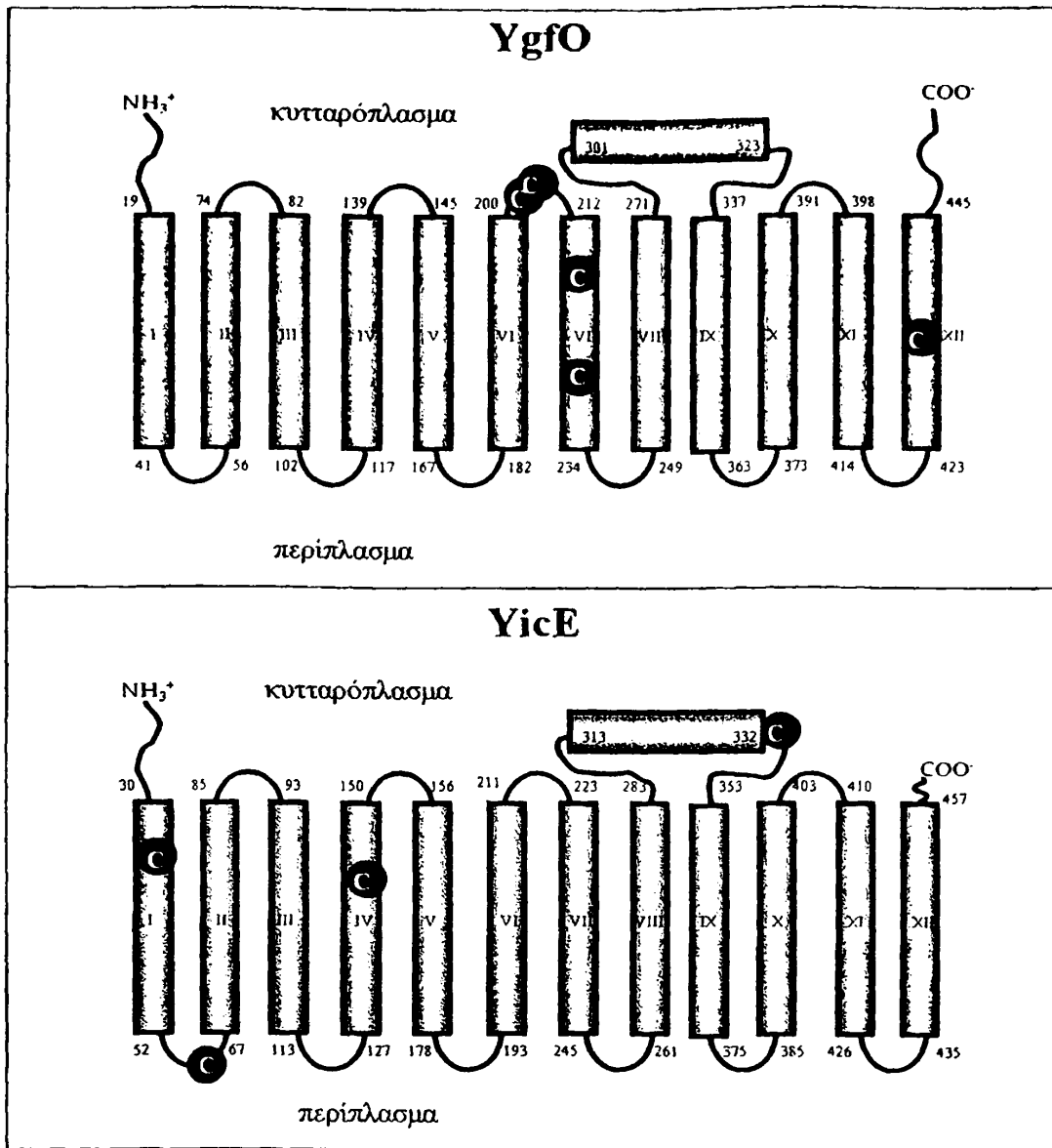
Κεντρικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να αναπτυχθεί ένα αποδοτικό σύστημα μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2) στην *E. coli* K-12 που να επιτρέπει εφαρμογή των τεχνολογιών της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης (Cys-scanning mutagenesis). Προς αυτή την κατεύθυνση, επιχειρήθηκε καταρχήν η αντικατάσταση των εγγενών Cys των διαπερασών YgfO και YicE ώστε να δημιουργηθούν μόρια μεταφορέων ελεύθερα κυστεϊνών (Cys-less) (Frillingos *et al.*, 1998).

Οι διαπεράσεις YgfO και YicE έχουν 5 και 4 εγγενή κατάλοιπα Cys, αντίστοιχα (Εικόνα 3.14). Τα κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν με Ser. Αρχικά δημιουργήθηκαν κατασκευές στις οποίες αντικαθίστανται μία-προς-μία οι εγγενείς Cys με Ser στο υπόστρωμα των pT7-5/ygfO-BAD και pT7-5/yicE-BAD. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν ελέγχθηκαν λειτουργικά ως προς την έκφραση και την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.15 και 3.16). Όλα τα μεταλλάγματα της YgfO (C203S, C204S, C219S, C227S, C433S) ή της YicE (C40S, C58S, C141S, C333S) εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων σε παρόμοια επίπεδα με τις αντίστοιχες φυσικού τύπου διαπεράσεις. Η ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης όλων των μεταλλαγμάτων δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή των φυσικού τύπου διαπερασών, με εξαίρεση τα μεταλλάγματα YgfO-C204S και YgfO-C433S όπου εμφανίζουν 5 ή 6 φορές αυξημένο ρυθμό πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.15) και YicE-C333S που εμφανίζει 2 φορές αυξημένο ρυθμό πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.16). Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m και V_{max} των YgfO μεταλλαγμάτων έδειξε ότι οι συγγένειες δέσμευσης δεν διαφέρουν από αυτή της YgfO-BAD, με εξαίρεση την διαπεράση YgfO-C219S όπου έχουμε 2 φορές μεγαλύτερο K_m , αλλά όλα τα μεταλλάγματα παρουσιάζουν αυξημένες αρχικές ταχύτητες, με τις πιο έντονες διαφορές να εντοπίζονται στα μεταλλάγματα YgfO-C204S (4 φορές αυξημένη V_{max}) και YgfO-C433S (13 φορές αυξημένη V_{max}) (Πίνακας 3.9).

Για να εξεταστεί κατά πόσον οι εγγενείς Cys των διαπερασών YgfO και YicE είναι ευαίσθητες σε αλκυλίωση από αντιδραστήρια που αυξάνουν τον όγκο της πλευρικής ομάδας, χρησιμοποιήθηκε το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM), ένας σχετικά υδρόφοβος αλκυλιωτικός παράγοντας που αντιδρά ειδικά με τη σουλφυδρυλομάδα των κυστεϊνών (Smyth *et al.*, 1964). Κύτταρα T184 που εκφράζουν την YgfO(wt) ή την YicE(wt) προεπωάστηκαν με 2 mM NEM για 10 min και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς ξανθίνης (Εικόνα 3.17). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενεργότητα των YgfO και YicE δεν

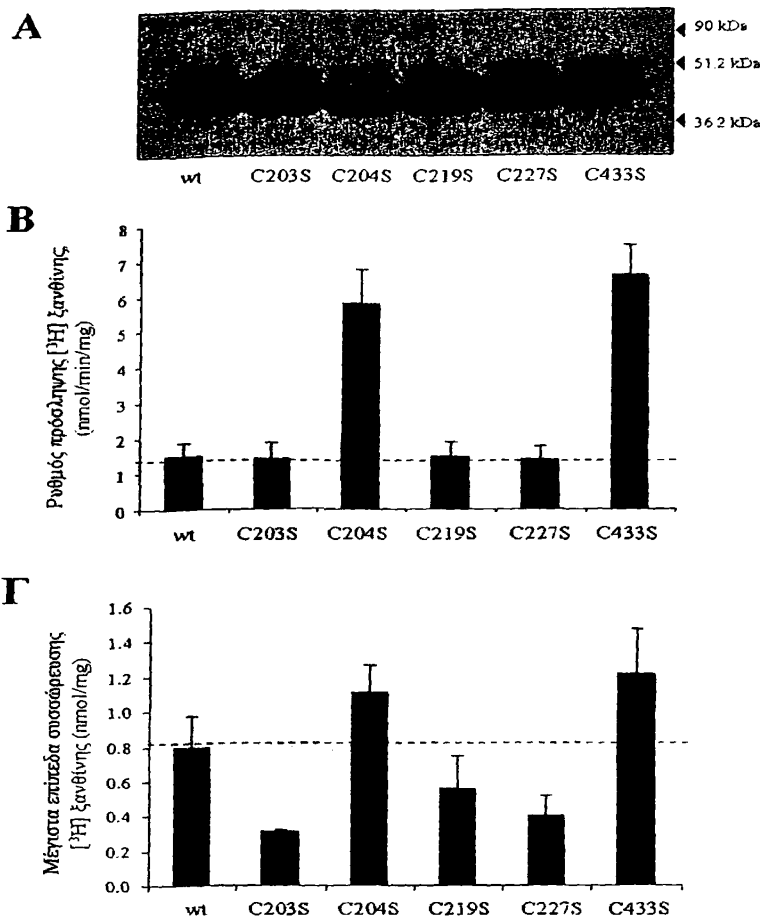


επηρεάζεται από το NEM. Η διατήρηση της ενεργότητας των διαπερασών μπορεί να σημαίνει είτε ότι οι κυστεΐνες δεν είναι προσβάσιμες είτε ότι όλες ή ορισμένες μπορεί να αλκυλιώνονται από το NEM αλλά χωρίς η αλκυλίωση να επηρεάζει την ενεργότητα.



Εικόνα 3.14: Πιθανά τοπολογικά μοντέλα των YgfO και YicE

Τόσο η YgfO όσο και η YicE προβλέπεται ότι αποτελούνται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα (ορθογώνια πλαίσια) με το αμινοτελικό (-NH₂) και το καρβοξυτελικό άκρο (-COOH) εντός των κυτάρων. Στα μοντέλα απεικονίζονται οι πιθανές θέσεις των εγγενών καταλοίπων κυστεΐνης. Τα τοπολογικά μοντέλα έχουν προέλθει από το υπολογιστικό πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>)



Εικόνα 3.15: Έκφραση και ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης μεταλλαγμάτων YgfO που αντικαθιστούν τις εγγενείς Cys

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-C203S, pT7-5/ygfO-C204S, pT7-5/ygfO-C219S, pT7-5/ygfO-C227S, pT7-5/ygfO-C433S ή pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h.

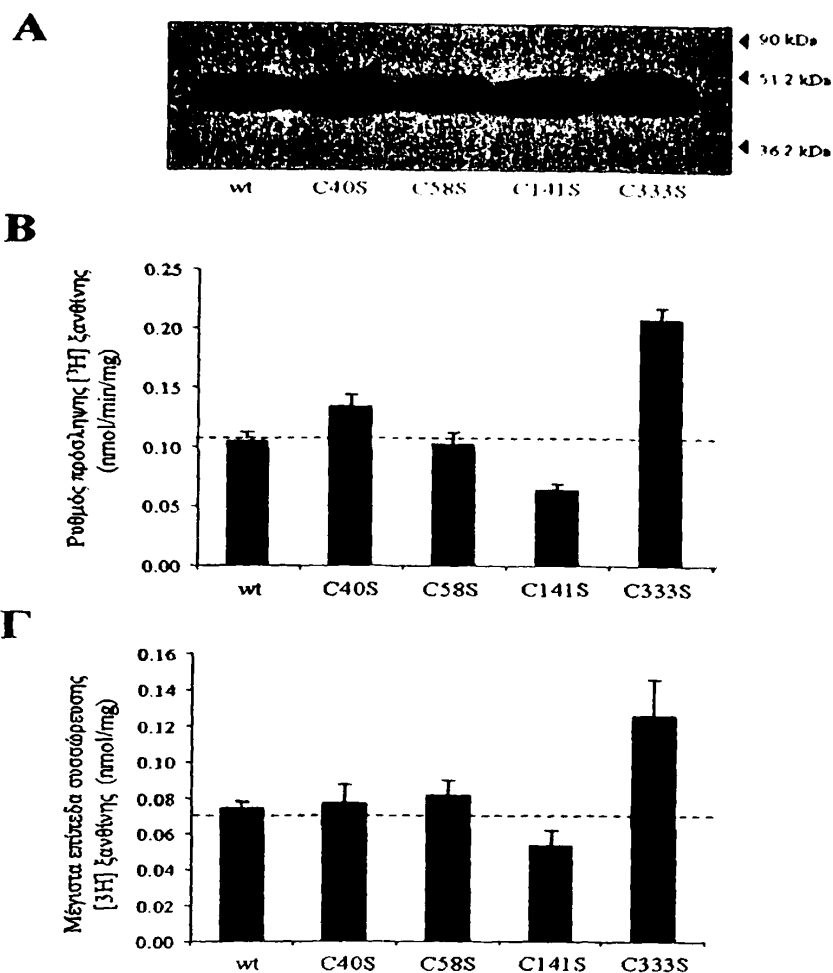
A: Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP) Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

B: Αρχικές ταχύτητες πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) των διαπερασών YgfO-C204S, YgfO-C205S, YgfO-C219S, YgfO-C227S, YgfO-C433S σε σύγκριση με την YgfO-BAD, που μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 10 sec

Γ: Μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης [³H]ξανθίνης (1 μM) των διαπερασών YgfO-C204S, YgfO-C205S, YgfO-C219S, YgfO-C227S, YgfO-C433S σε σύγκριση με την YgfO-BAD, που μετρήθηκαν σε χρόνους 1-10 min

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται. Ο μέσος όρος και οι τυπικές αποκλίσεις της YgfO(wt) δίνονται με διακεκομμένες γραμμές και γκρι οριζόντιες μπάρες, αντίστοιχα





Εικόνα 3.16: Έκφραση και ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης μεταλλαγμάτων YicE που αντικαθιστούν τις εγγενείς Cys

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/yicE-BAD, pT7-5/yicE-C40S, pT7-5/yicE-C58S, pT7-5/yicE-C141S, pT7-5/yicE-C333S ή pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h.

A: Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμίδιου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

B: Αρχικές ταχύτητες πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) των διαπερασών YicE-C40S, YicE-C58S, YicE-C141S, YicE-C333S σε σύγκριση με την YicE-BAD), που μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 10 sec

Γ: Μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης [³H]ξανθίνης (1 μM) των διαπερασών YicE-C40S, YicE-C58S, YicE-C141S, YicE-C333S σε σύγκριση με την YicE-BAD, που μετρήθηκαν σε χρόνους 1-10 min

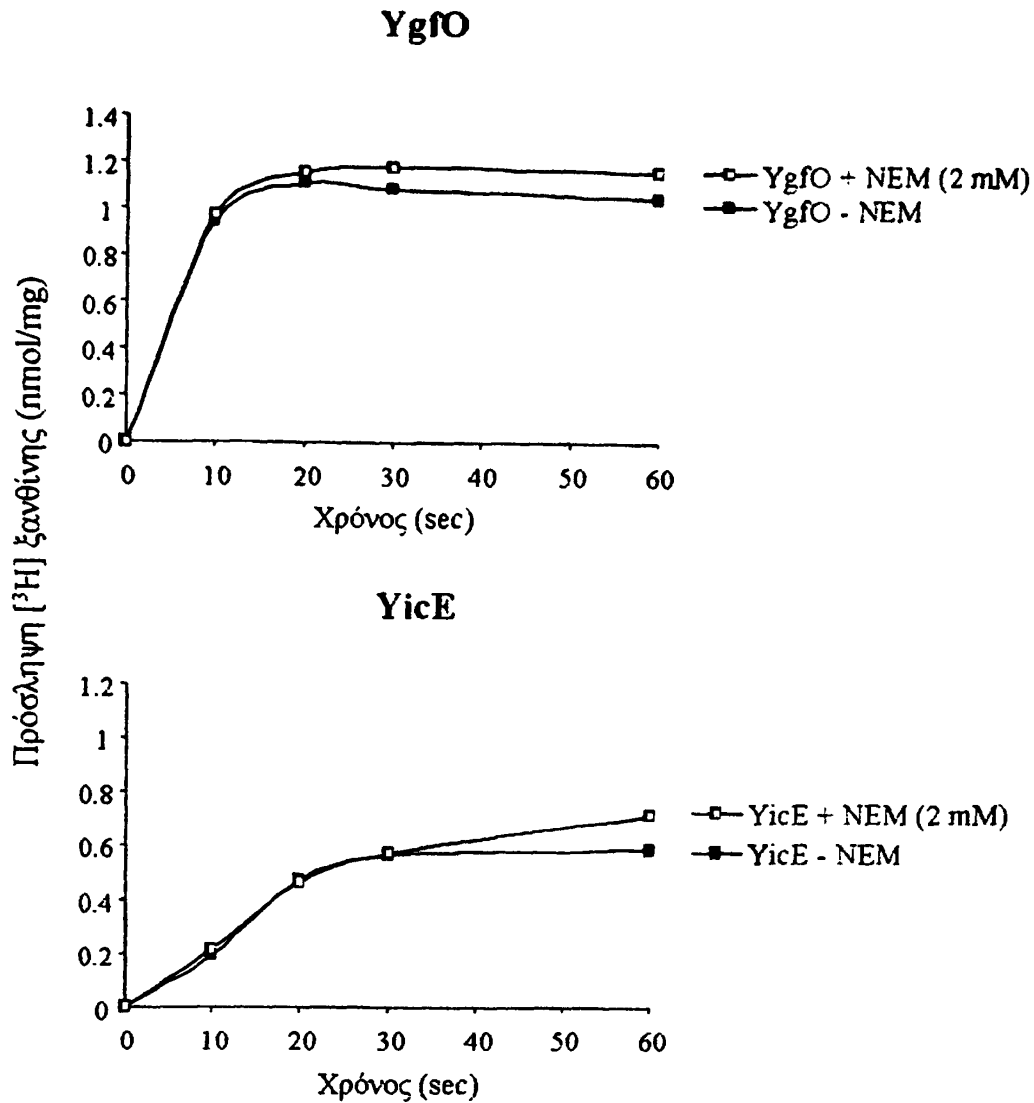
Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται. Ο μέσος όρος και οι τυπικές αποκλίσεις της YgfO(wt) δίνονται με διακεκομμένες γραμμές και γκρι οριζόντιες μπάρες, αντίστοιχα

Διαπεράσεις	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
YgfO-BAD	4.6 ± 0.3	6.34 ± 0.56	1378
YgfO-C203S	5.1 ± 0.8	10.49 ± 1.37	2057
YgfO-C204S	6.1 ± 0.7	23.51 ± 0.48	3854
YgfO-C219S	8.3 ± 0.7	12.85 ± 0.21	1548
YgfO-C227S	6.3 ± 1.1	13.50 ± 0.41	2143
YgfO-C433S	5.1 ± 0.8	88.98 ± 2.19	17447

Πίνακας 3.9: Τιμές K_m και V_{max} μεταλλαγμάτων YgfO που αντικαθιστούν τις εγγενείς Cys

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις διαπεράσεις YgfO-C203S, YgfO-C204S, YgfO-C219S, YgfO-C227S ή YgfO-C433S και οι τιμές των K_m και V_{max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και 100 μM και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές της φυσικού τύπου διαπεράσης YgfO-BAD. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.12. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυλικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται





Εικόνα 3.17: Επίδραση του NEM στην ενεργότητα των διαπερασών YgfO και YicE

Κύτταρα *E. coli* T184 που έχουν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO και pT7-5/yicE και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KPI και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM) μετά από προεπάση παρουσία (□) ή απουσία (■) NEM (2 mM, 10 min, 25 °C). Οι τιμές που παρουσιάζονται έχουν προέλθει μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5

3.3.3 Διαπεράσεις ελεύθερες κυστεϊνών (Cys-less)

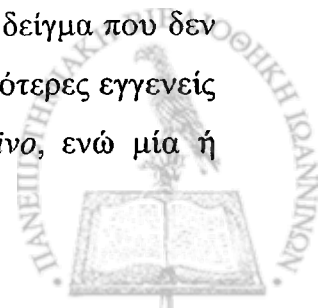
Συνδυάζοντας όλες τις αντικαταστάσεις των εγγενών Cys προς Ser στο ίδιο πρωτεϊνικό μόριο, δημιουργήθηκαν τα πλασμίδια **pT7-5/Cys-less ygfO-BAD** και **pT7-5/Cys-less yicE-BAD** με χρήση PCR πολλαπλών επικαλύψεων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). *E. coli* T184 που εκφράζουν Cys-less YgfO ή Cys-less YicE από τα πλασμίδια αυτά, ελέγχθηκαν αρχικά ως προς την έκφραση (Εικόνα 3.18) και την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.19). Τόσο τα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη όσο και η ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των Cys-less διαπερασών είναι παρόμοια με αυτά των αντίστοιχων διαπερασών φυσικού τύπου.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι τιμές K_m και V_{max} (Πίνακας 3.10) της Cys-less YgfO-BAD και συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες της YgfO-BAD διαπιστώθηκε ότι παρατηρείται μια αύξηση της V_{max} κατά 1.5 φορές ενώ το K_m δεν αλλάζει. Επίσης, το προφίλ εξειδίκευσης της διαπεράσης Cys-less YgfO-BAD (Πίνακας 3.11) είναι παρόμοιο με αυτό της YgfO-BAD με την διαφορά ότι η Cys-less YgfO-BAD είναι ικανή να αναγνωρίζει 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη.

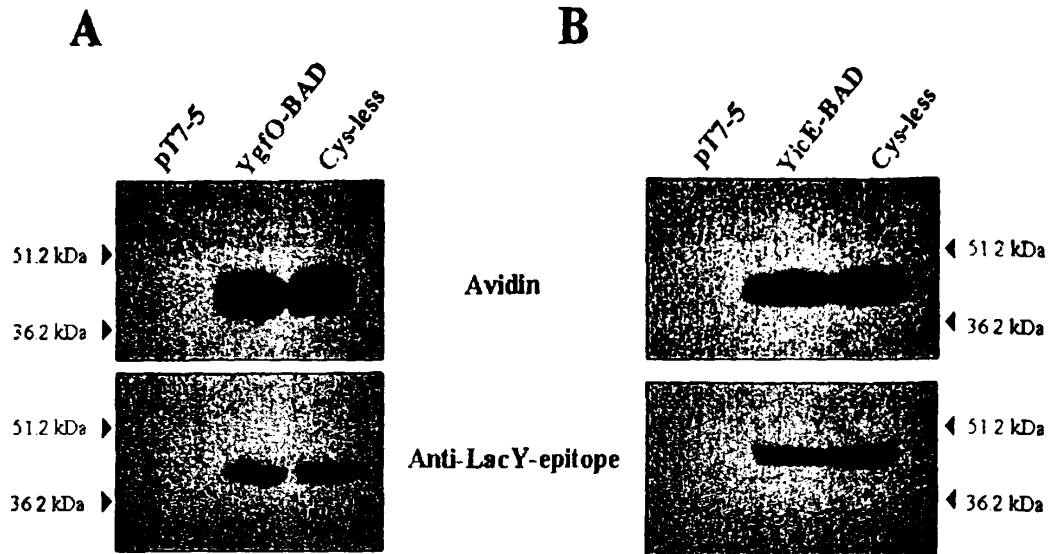
Η Cys-less YgfO υποκλωνοποιήθηκε επίσης στο υπόστρωμα των 10 ιστιδινών ώστε να δημιουργηθεί το βακτηριακό στέλεχος **T184[pT7-5/Cys-less ygfO-His₁₀]**. Η Cys-less YgfO-His₁₀ ελέγχθηκε ως προς την έκφραση και την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.20) και βρέθηκε ότι εκφράζεται στη μεμβράνη σε ικανοποιητικά επίπεδα και διατηρεί ενεργότητα παρόμοια με αυτή της YgfO-His₁₀.

Πειράματα αλκυλίωσης με *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) *in vivo* (Εικόνα 3.21) έδειξαν ότι:

- Οι συνθήκες του πειράματος δεν επιτρέπουν μη ειδική σήμανση άλλων αμινοξέων εκτός της Cys (Smyth *et al.*, 1964) ούτε με το NEM (1 mM) *in vivo*, ούτε με το πράσινο μηλεϊμίδιο του Oregon (OGM) (0.2 mM) μετά από απομόνωση και αποδιάταξη της πρωτεΐνης, εφόσον δεν εμφανίζεται σήμα από το αντίσωμα έναντι του OGM στην περίπτωση της Cys-less YgfO-His₁₀.
- Εμφανίζεται μερική σήμανση με το NEM (1 mM) στην περίπτωση της YgfO-His₁₀ καθώς το ειδικό σήμα που λαμβάνουμε από το αντίσωμα έναντι του OGM στο δείγμα που έχει επωασθεί με NEM (+) είναι σαφώς μειωμένο σε σχέση με το δείγμα που δεν έχει επωασθεί με NEM (-) αλλά όχι μηδενικό. Επομένως, μία ή περισσότερες εγγενείς κυστεΐνες της διαπεράσης YgfO είναι προσβάσιμες στο NEM *in vivo*, ενώ μία ή



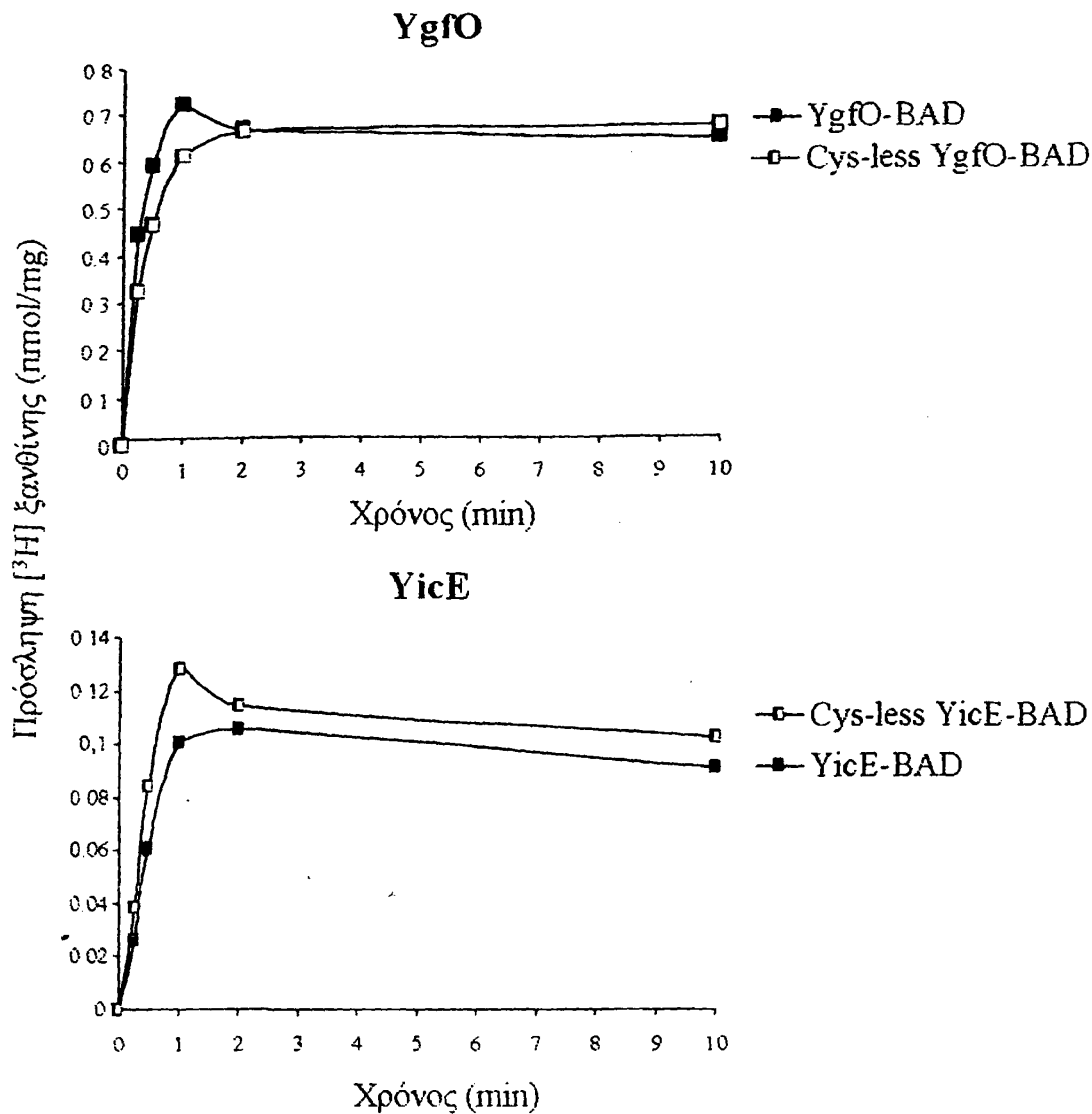
περισσότερες, επίσης, θα πρέπει να μην είναι προσβάσιμες ή να αντιδρούν με μικρή ταχύτητα με το NEM, στις συνθήκες του πειράματος.



Εικόνα 3.18: Επίπεδα έκφρασης των Cys-less YgfO-BAD και Cys-less YicE-BAD

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/Cys-less ygfO-BAD, pT7-5/yicE-BAD, pT7-5/Cys-less yicE-BAD και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100 µg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP, πάνω εικόνες) και με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της LacY (anti-LacY-epitope, κάτω εικόνες)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



Εικόνα 3.19: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των Cys-less YgfO-BAD και Cys-less YicE-BAD

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/*ygfO*-BAD (■), pT7-5/Cys-less *ygfO*-BAD (□), pT7-5/*yicE*-BAD (■), pT7-5/Cys-less *yicE*-BAD (□) και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυσση των κυττάρων με KPI και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM). Οι τιμές που παρουσιάζονται έχουν προέλθει μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5

Διαπεράσεις	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
YgfO	4.2 ± 0.7	6.36 ± 0.52	1514
YgfO-BAD	4.6 ± 0.3	6.34 ± 0.56	1378
Cys-less YgfO-BAD	5.5 ± 0.5	10.22 ± 0.14	1858

Πίνακας 3.10: Τιμές K_m και V_{max} της Cys-less YgfO-BAD

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν την διαπεράση Cys-less YgfO-BAD και οι τιμές των K_m και V_{max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και 100 μM και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές των φυσικού τύπου διαπερασών YgfO και YgfO-BAD. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.12. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

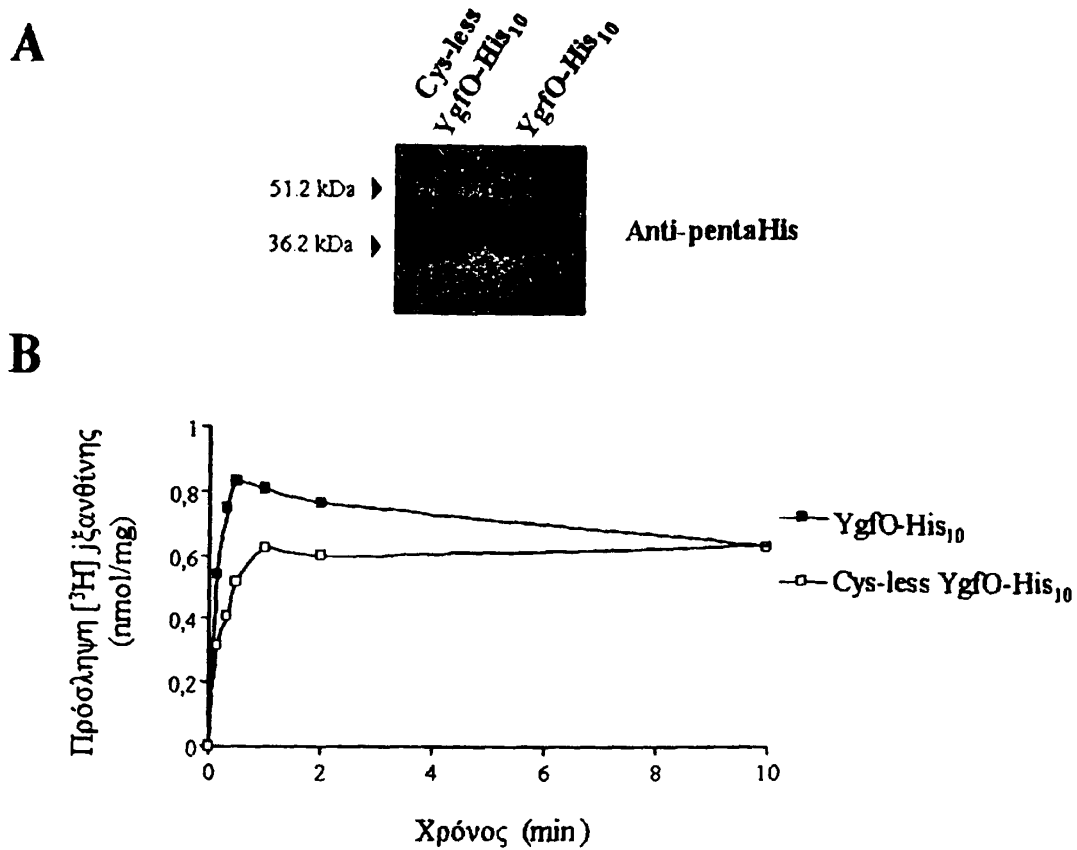


Ανταγωνιστές	Ρυθμός πρόσληψης [³ H] ξανθίνης (%)	
	YgfO-BAD	Cys-less YgfO-BAD
-	100	100
Ξανθίνη	0	1
Ουρικό οξύ	97	101
Υποξανθίνη	96	97
Ουρακίλη	101	102
Αδενίνη	96	105
Θυμίνη	97	83
Κυτοσίνη	101	101
Γουανίνη	95	89
Αλλοπουρινόλη	106	93
Οξυπουρινόλη	31	16
1-μεθυλοξανθίνη	19	31
3-μεθυλοξανθίνη	25	15
7-μεθυλοξανθίνη	101	36
8-μεθυλοξανθίνη	88	35
9-μεθυλοξανθίνη	13	19
2-θειοξανθίνη	13	33
6-θειοξανθίνη	21	33
8-αζαξανθίνη	102	92

Πίνακας 3.11: Προφίλ εξειδίκευσης της Cys-less YgfO-BAD

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/Cys-less ygfO-BAD και pT7-5 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h υπόκεινται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης προσδιορίστηκαν στα 5 και 10 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % ποσοστό των τιμών που προέρχονται από κύτταρα που δεν έχουν προεπωαστεί με τους μη σημασμένους προσδέτες και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα που υπάρχουν για την διαπεράση YgfO-BAD. Με έντονα γράμματα εντοπίζονται οι διαφορές μεταξύ των διαπερασών



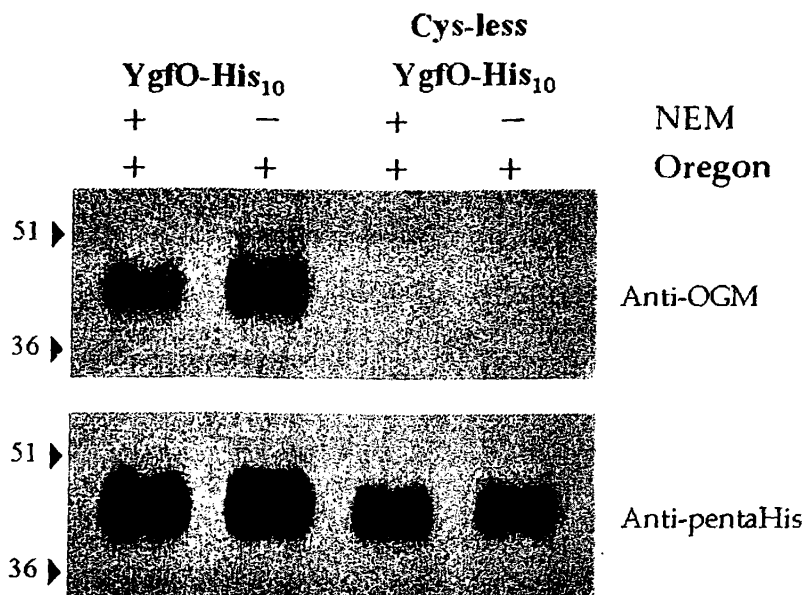


Εικόνα 3.20: Επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας πρόσληψης ξανθίνης της Cys-less YgfO-His₁₀

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-His₁₀, pT7-5/Cys-less ygfO-His₁₀ και pT7-5 αναπτύχθηκαν πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0,5 mM) για 2h.

A: Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος έναντι της αλληλουχίας των ιστιδινών (anti-penta-His). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

B: Σύγκριση της ενεργότητας πρόσληψης [³H]ξανθίνης (1 μM) των YgfO-His₁₀ (■) και Cys-less YgfO-His₁₀ (□). Οι τιμές που παρουσιάζονται έχουν προέλθει μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5



Εικόνα 3.21: Έλεγχος του ποσοστού σήμανσης των SH-ομάδων των διαπερασών YgfO-His₁₀ και Cys-less YgfO-His₁₀ μετά την επίδραση του αλκυλιωτικού αντιδραστηρίου NEM *in vitro*

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα τα πλασμιδια pT7-5/ygfO-His₁₀ και pT7-5/Cys-less ygfO-His₁₀ και pT7-5 αναπτύχθηκαν πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0,5 mM) για 2h. Τα κυτταρικά δείγματα (1 ml) επώαστηκαν παρουσία (+, 1 mM, 10 min, 25 °C) ή απουσία (-) NEM και στη συνέχεια ακολούθησε λύση των κυττάρων και εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με DDM (0.8% w/v). Η απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών έγινε με χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (Ni-IDA σφαιρίδια) και ακολούθησε η σήμανση των εναπομεινοσών κυστεϊνών με το αντιδραστήριο OGM (200 μM, 20 min). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF με ηλεκτροφορητική μεταφορά. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι του OGM (anti-OGM) και στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι των ιστιδινών (anti-pentaHis)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωτάγειας (ECL, Amersham Life Science)

3.4 Μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης στην αλληλουχία 315-340 της διαπεράσης YgfO

Χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα της ελεύθερης κυστεϊνών YgfO, επιχειρήθηκε συστηματική ανάλυση της αλληλουχίας ³¹⁵GSIPITTFQNNGVIQMTGVASRYVG³⁴⁰ η οποία περιλαμβάνει το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2 (κατάλοιπα 324-333), με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης. Η πιθανή τοπολογική οργάνωση καθώς και η συναινετική αλληλουχία (consensus) του μοτίβου NAT μεταξύ όλων των λειτουργικά γνωστών μεταφορέων NAT/NCS2 παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.22**.

3.4.1 Αρχικός λειτουργικός έλεγχος των μεταλλαγμάτων κυστεϊνών

3.4.1.1 Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης της YgfO

Κατασκευάστηκαν και ελέγχθηκαν 26 διαπεράσεις μοναδικής κυστεϊνης (single-Cys) στο υπόστρωμα του μεταφορέα ελεύθερου κυστεϊνών (Cys-less YgfO) που φέρει τις καρβοξυτελικές αλληλουχίες, το καρβοξυτελικό δωδεκαπεπτίδιο της LacY (**LacY-epitope**) και την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (**BAD**). Τα επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας των μεταλλαγμάτων αυτών (από G315C ως G340C) φαίνονται στις **Εικόνες 3.23** και **3.24**.

Είκοσι μία (21) από τις είκοσι έξι (26) διαπεράσεις μοναδικής κυστεϊνης εκφράζονται στη μεμβράνη σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της Cys-less YgfO-BAD. Τρεις (L317C, I329C, T332C) παρουσιάζουν επίπεδα έκφρασης που είναι περίπου 50% της Cys-less YgfO-BAD, ενώ οι διαπεράσεις P318C και G340C εκφράζονται σε πολύ χαμηλά έως αμελητέα επίπεδα (**Εικόνα 3.23**).

Δεκαέξι (16) από τις είκοσι έξι (26) διαπεράσεις μοναδικής κυστεϊνης (G315C, S316C, L317C, L319C, A323C, G327C, V328C, Q330C, M331C, G333C, V334C, A335C, S336C, R337C, Y338C και V339C) εμφανίζουν αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης μεγαλύτερα του 50% σε σχέση με την Cys-less YgfO. Οι υπόλοιπες δέκα (10) διαπεράσεις εμφανίζουν αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης μικρότερα του 30% σε σχέση με τον Cys-less μεταφορέα. Από αυτές, τέσσερις (T320C, T321C, I329C και T332C) έχουν ενεργότητα από 10% έως 30%, ενώ οι διαπεράσεις P318C, F322C, Q324C, N325C, N326C και G340C εμφανίζουν αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης



ξανθίνης σε επίπεδα όμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα pT7-5 (Εικόνα 3.24). Η ενεργότητα των P318C και G340C συνδέεται προφανώς με τα αμελητέα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών (Εικόνα 3.23).

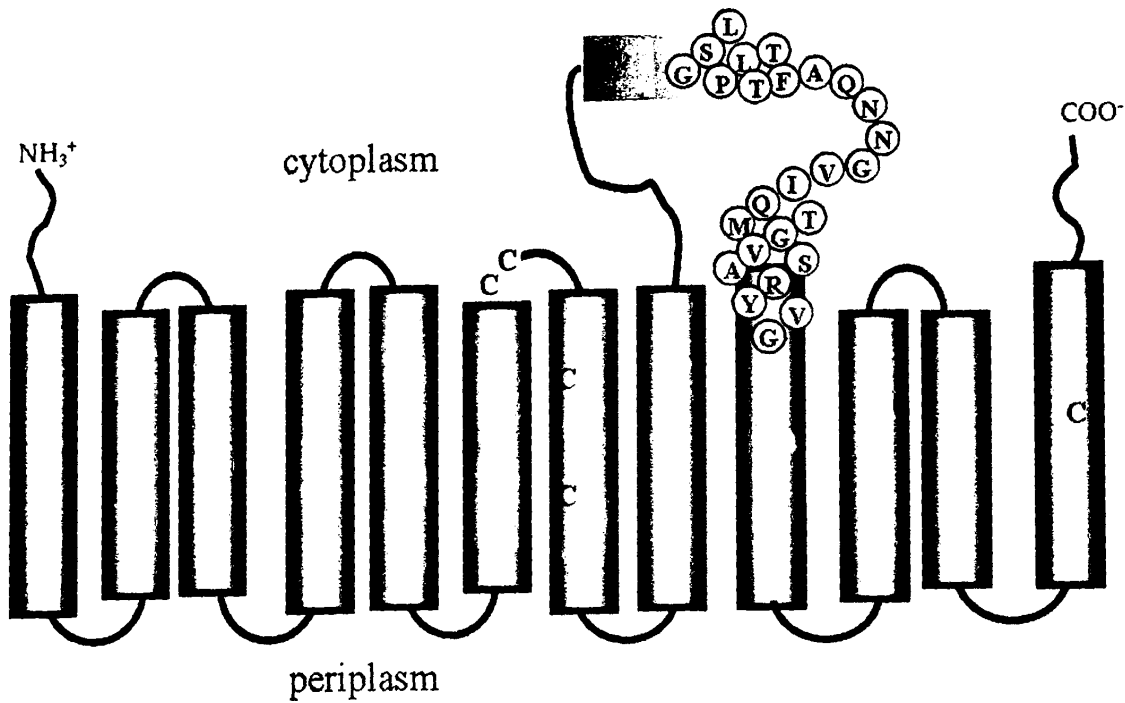
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανιχνευτών P318C και G340C, έδειξε ότι η ενεργότητα των ανιχνευτών αυτών είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών είναι αμελητέα. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανιχνευτών P318C και G340C, τα οποία έδειξαν ότι η ενεργότητα των ανιχνευτών αυτών είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών είναι αμελητέα.

Εικόνα 3.23: Αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανιχνευτών P318C και G340C. Η ενεργότητα των ανιχνευτών αυτών είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών είναι αμελητέα. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανιχνευτών P318C και G340C, τα οποία έδειξαν ότι η ενεργότητα των ανιχνευτών αυτών είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών είναι αμελητέα.

Εικόνα 3.24: Αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανιχνευτών P318C και G340C. Η ενεργότητα των ανιχνευτών αυτών είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών είναι αμελητέα. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανιχνευτών P318C και G340C, τα οποία έδειξαν ότι η ενεργότητα των ανιχνευτών αυτών είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμάτων αυτών είναι αμελητέα.



Εικόνα 3.23
Εικόνα 3.24
Εικόνα 3.25
Εικόνα 3.26
Εικόνα 3.27
Εικόνα 3.28
Εικόνα 3.29
Εικόνα 3.30
Εικόνα 3.31
Εικόνα 3.32
Εικόνα 3.33
Εικόνα 3.34
Εικόνα 3.35
Εικόνα 3.36
Εικόνα 3.37
Εικόνα 3.38
Εικόνα 3.39
Εικόνα 3.40
Εικόνα 3.41
Εικόνα 3.42
Εικόνα 3.43
Εικόνα 3.44
Εικόνα 3.45
Εικόνα 3.46
Εικόνα 3.47
Εικόνα 3.48
Εικόνα 3.49
Εικόνα 3.50
Εικόνα 3.51
Εικόνα 3.52
Εικόνα 3.53
Εικόνα 3.54
Εικόνα 3.55
Εικόνα 3.56
Εικόνα 3.57
Εικόνα 3.58
Εικόνα 3.59
Εικόνα 3.60
Εικόνα 3.61
Εικόνα 3.62
Εικόνα 3.63
Εικόνα 3.64
Εικόνα 3.65
Εικόνα 3.66
Εικόνα 3.67
Εικόνα 3.68
Εικόνα 3.69
Εικόνα 3.70
Εικόνα 3.71
Εικόνα 3.72
Εικόνα 3.73
Εικόνα 3.74
Εικόνα 3.75
Εικόνα 3.76
Εικόνα 3.77
Εικόνα 3.78
Εικόνα 3.79
Εικόνα 3.80
Εικόνα 3.81
Εικόνα 3.82
Εικόνα 3.83
Εικόνα 3.84
Εικόνα 3.85
Εικόνα 3.86
Εικόνα 3.87
Εικόνα 3.88
Εικόνα 3.89
Εικόνα 3.90
Εικόνα 3.91
Εικόνα 3.92
Εικόνα 3.93
Εικόνα 3.94
Εικόνα 3.95
Εικόνα 3.96
Εικόνα 3.97
Εικόνα 3.98
Εικόνα 3.99
Εικόνα 3.100



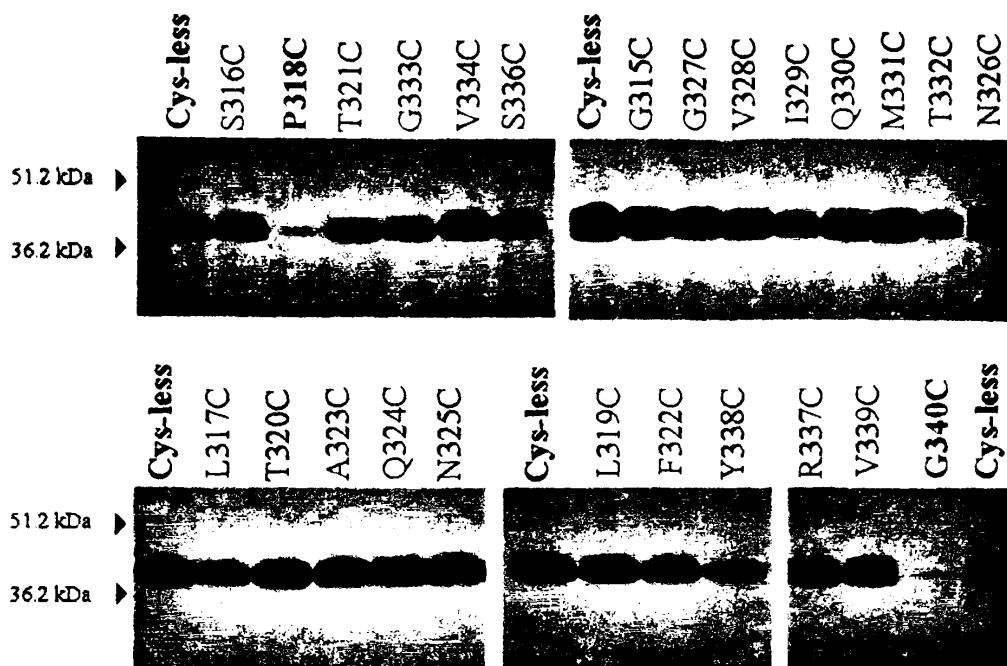
YgfO	³¹ GS-LPLTIFA	QNRGVYOMTG	VASRIVG	⁵⁴	xanthine
YicE	³² NT-EPNSCFE	QNRGVYQITG	VASRIVG	⁵¹	xanthine
PbuX	¹⁶⁴ NA-EPDTAFE	QNRGLVQITG	IKKNFVI	¹⁷⁹	xanthine
PucJ	¹⁶³ NA-EPDITFA	QNRGLLDLTK	VKTRNIV	¹⁷⁴	uric acid
Xut1	³³⁷ TM-TPMSEFA	QNRGVISITK	CANRIVG	⁴²²	uric acid/xanthine
UapA	³³⁰ TM-TPMTTFA	QNRGVIALTR	CANRIVG	⁴¹⁴	uric acid/xanthine
UapC	³²⁶ TI-TPMSEFA	QNRGVIALTR	CANRIVG	⁴¹³	uric acid/xanthine
Lpe1	³³⁷ TL-TGTAASV	ENRGLLAVTR	VGRSFTI	⁴²²	uric acid/xanthine
UraA	²⁸¹ GS-TPNTTYG	ENIGVMAITK	VYSTNVI	³⁷⁶	uracil
PyrP	²⁹¹ GA-EPVTSYG	ENIGVMAITK	IHSLYVI	³⁷⁷	uracil
SVCT1	³³⁸ GTGNGSTSSS	ENIGVLGITK	VGRSFTI	⁴¹⁴	L-ascorbic acid
SVCT2	³³⁷ GTGNGSTSSS	ENIGVLGITK	VGRSFTI	⁴¹³	L-ascorbic acid
Cons.	***..-p...f. qN.Gv...T. v..r.v.				

Εικόνα 3.22: Πιθανό τοπολογικό μοντέλο της διαπεράσης YgfO με βάση *in silico* αναλύσεις και σύγκριση της αλληλουχία μελών της οικογένειας NAT/NCS2

Τοπολογικό μοντέλο (επάνω σχήμα) 12 διαμεμβρανικών τμημάτων (ορθογώνια πλαίσια) βασισμένο στο πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>). Εντοπίζονται οι θέσεις των 5 εγγενών κυστεϊνών και η αλληλουχία καταλοίπων 315-340 όπου εφαρμόστηκε μεταλλαξιγένεση σάρωσης κυστεϊνών. Ανάλυση στοιχίσης (κάτω σχήμα) του πλήρους κωδικεύοντος τμήματος των αλληλουχιών της ευρύτερης περιοχής του μοτίβου NAT, 12 χαρακτηρισμένων NAT/NCS2 μεταφορέων [*E. coli* YgfO (AAC75920), YicE (AAC76678) and UraA (AAC75550), *B. subtilis* PbuX (CAB14123) and PucJ (CAB15233), *L. lactis* PyrP (AAK05701), *A. nidulans* UapA (X71807) and UapC (P487777), *C. albicans* Xut1 (AAX2221), *Z. mays* Lpe1 (AAB17501), *H. sapiens* SVCT1 (AAH50261) και SVCT2 (CAC16126). Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW. Οι θέσεις των συντηρημένων αμινοξέων δίνονται σε σκουρόχρωμες στήλες



Avidin-HRP

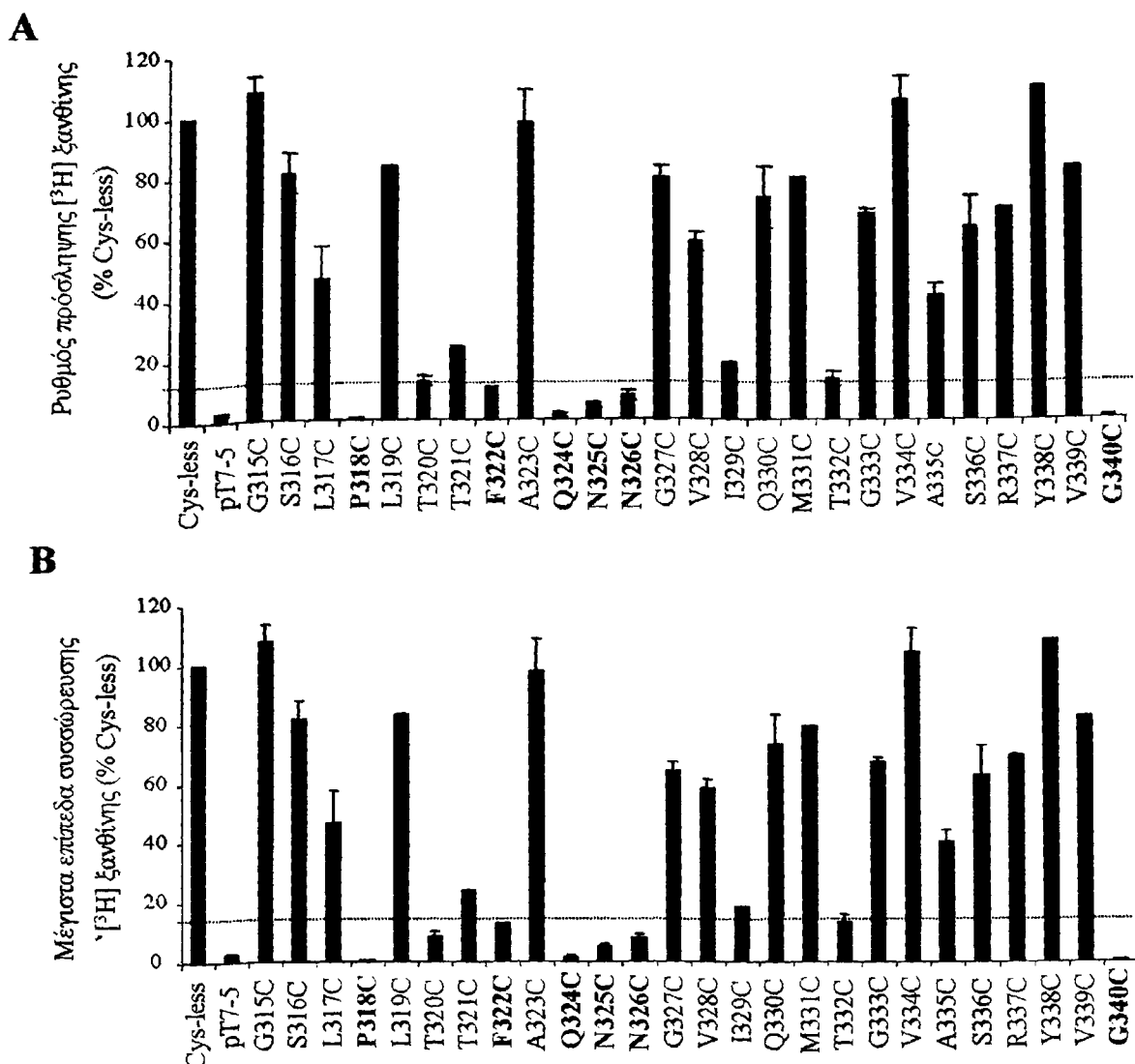
**Εικόνα 3.23: Επίπεδα έκφρασης των 26 single-Cys διαπερασών**

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h. Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (**avidin-HRP**). Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στην περίπτωση ανοσοαποτύπωσης με χρήση του αντισώματος **anti-LacY-epitope**

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



Εικόνα
Κύτταρα
στους
πρωτεΐ
και δοκ
Α: Οι α
τιμή για
pI 7-5 η
ποσοστά
B: Για μέ
για την C
πρωτ 0.0
ακτιστογ
Με μέγε
έχουν ενε
Οι πρέσ π



Εικόνα 3.24: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των 26 single-Cys διαπερασών

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυσση των κυττάρων με KP_i και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM).

A: Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec. Η τιμή για την Cys-less YgfO-BAD ήταν $2.06 \pm 0.57 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (n=6) ενώ η τιμή για τον αρνητικό μάρτυρα pT7-5 ήταν $0.04 \pm 0.02 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (n=6). Οι τιμές για τις single-Cys διαπεράσεις εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της Cys-less YgfO-BAD

B: Τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 1-10 min. Η τιμή για την Cys-less YgfO-BAD ήταν $0.95 \pm 0.04 \text{ nmol mg}^{-1}$ (n=6) ενώ η τιμή για τον αρνητικό μάρτυρα pT7-5 ήταν $0.02 \pm 0.01 \text{ nmol mg}^{-1}$ (n=6). Οι τιμές για τις single Cys διαπεράσεις εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της Cys-less YgfO-BAD

Με μπλε χρώμα φαίνονται οι διαπεράσεις που έχουν μηδενική ενεργότητα, ενώ με κόκκινο χρώμα αυτές που έχουν ενεργότητα κάτω του 10% της Cys-less

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται



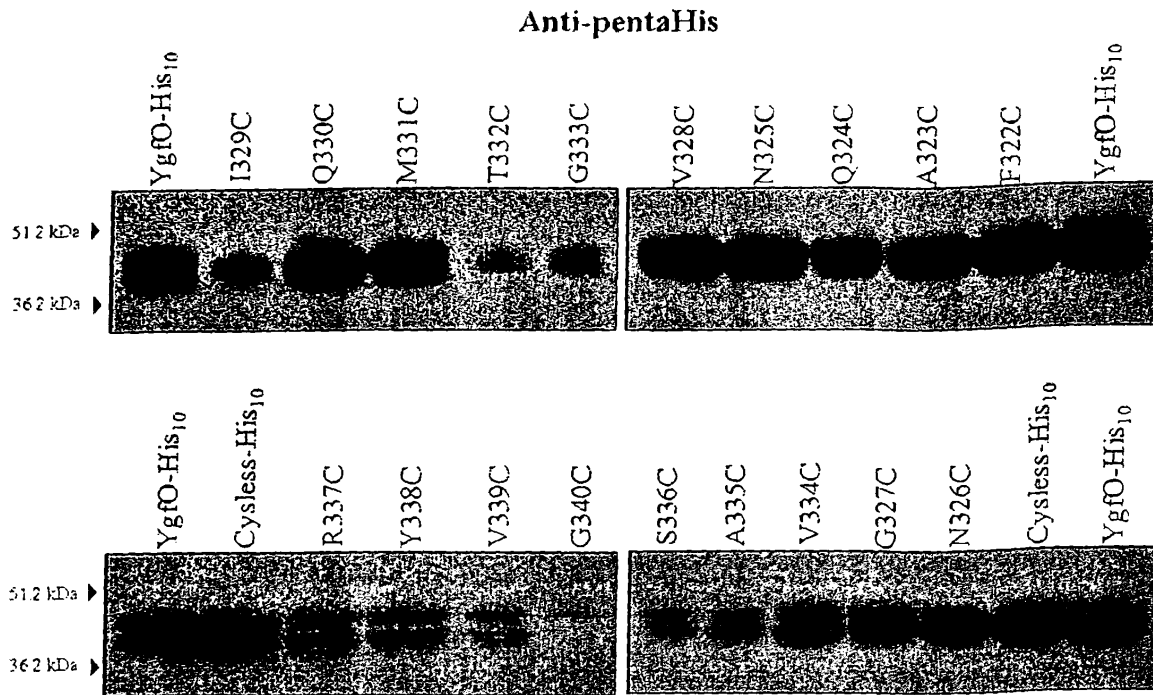
3.4.1.2. Έκφραση και ενεργότητα των διαπερασών μοναδικής Cys μετά από εισαγωγή του σήματος His₁₀ στο καρβοξυτελικό τους άκρο

Οι διαπεράσεις μοναδικής Cys των θέσεων 322-340 υποκλωνοποιήθηκαν στο υπόστρωμα της Cys-less YgfO-His₁₀ με αποτέλεσμα τη δημιουργία δεκαεννέα (19) single-Cys YgfOs-His₁₀ διαπερασών. Τα επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας των μεταλλαγμάτων αυτών (από F322C ως G340C) φαίνονται στις **Εικόνες 3.25** και **3.26**.

Παρατηρούμε ότι οι διαπεράσεις μοναδικής κυστεΐνης που φέρουν την C-τελική αλληλουχία His₁₀ παρουσιάζουν επίπεδα έκφρασης παρόμοια με αυτά των αντίστοιχων διαπερασών μοναδικής κυστεΐνης που φέρουν την C-τελική αλληλουχία BAD. Πιο συγκεκριμένα δεκατρείς (13) από τις δεκαεννέα (19) διαπεράσεις μοναδικής κυστεΐνης παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά της Cys-less YgfO-His₁₀, πέντε (5) (I329C-His₁₀, T332C-His₁₀, G333C-His₁₀, A335C-His₁₀, S336C-His₁₀) παρουσιάζουν μειωμένα αλλά ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την Cys-less YgfO-His₁₀, ενώ η G340C-His₁₀ εμφανίζει μηδενικά επίπεδα έκφρασης.

Από τον έλεγχο της ενεργότητας των δεκαεννέα (19) διαπερασών μοναδικής κυστεΐνης που φέρουν την C-τελική αλληλουχία His₁₀ διαπιστώσαμε ότι και εδώ παρατηρείται παρόμοια εικόνα σε σχέση με τις αντίστοιχες BAD διαπεράσεις. Συγκεκριμένα, εννέα (9) (A323C, G327C, V328C, M331C, V334C, A335C, R337C, Y338C, V339C) παρουσιάζουν αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης >60% της Cys-less YgfO-His₁₀, τρεις (3) (Q330C, G333C, S336C), παρουσιάζουν αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης περί το 40% της Cys-less YgfO-His₁₀ (**Εικόνα 3.26**). Από αυτές, οι δύο (2) (G333C και S336C), εμφανίζουν και αρκετά χαμηλή έκφραση (**Εικόνα 3.25**). Έξι (6) διαπεράσεις (F322C, Q324C, N325C, N326C, I329C και T332C) εμφανίζουν αρχική ταχύτητα και μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης σε επίπεδα ίδια με τον αρνητικό μάρτυρα (5-10% της Cys-less YgfO-His₁₀) (**Εικόνα 3.26**). Δύο (2) εξ αυτών (I329C και T332C) παρουσιάζουν και χαμηλά επίπεδα έκφρασης (**Εικόνα 3.25**). Τέλος η G340C παρουσιάζει μηδενικές τιμές ενεργότητας, κάτι που αναμένεται εφόσον εμφανίζει και μηδενικά επίπεδα έκφρασης (**Εικόνα 3.25**).

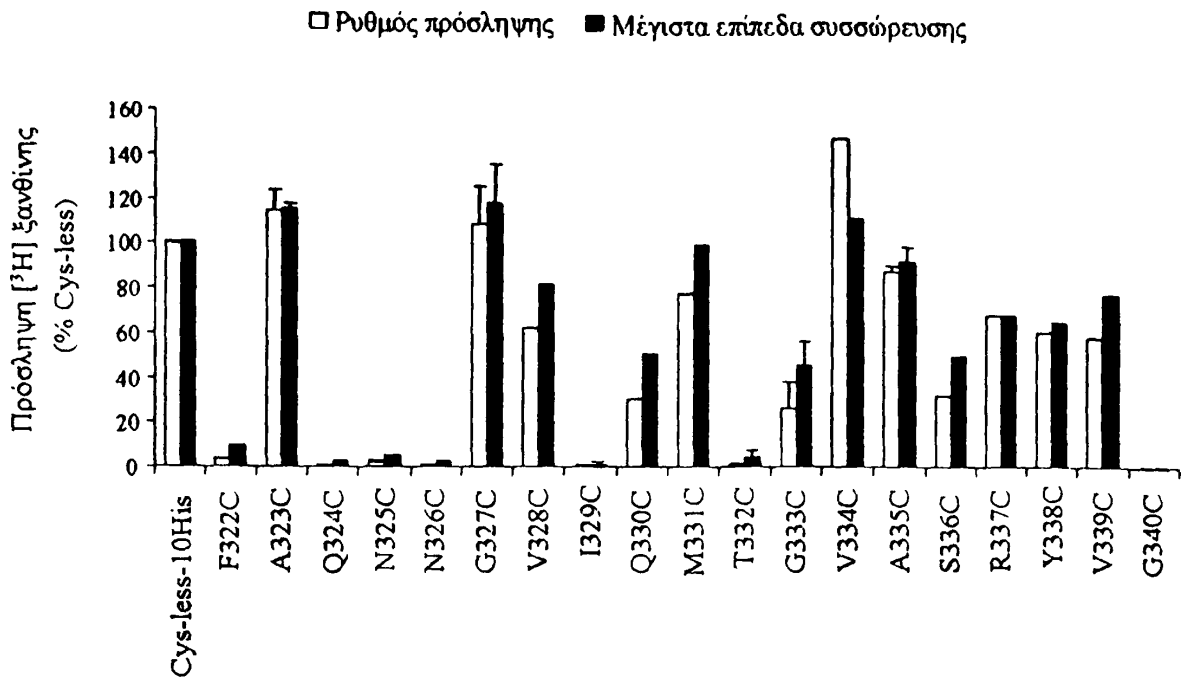




Εικόνα 3.25: Επίπεδα έκφρασης των 19 single-Cys His₁₀ διαπερασών

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h. Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πήγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος έναντι των ιστιδινών (**anti-penta-His**).

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



Εικόνα 3.26: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των 19 single-Cys His₁₀ διαπερασών

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP, και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec (λευκές μπάρες), ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε χρόνους 1-10 min (μαύρες μπάρες). Οι τιμές για τις single Cys διαπεράσεις εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της Cys-less YgfO-His₁₀ μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5.

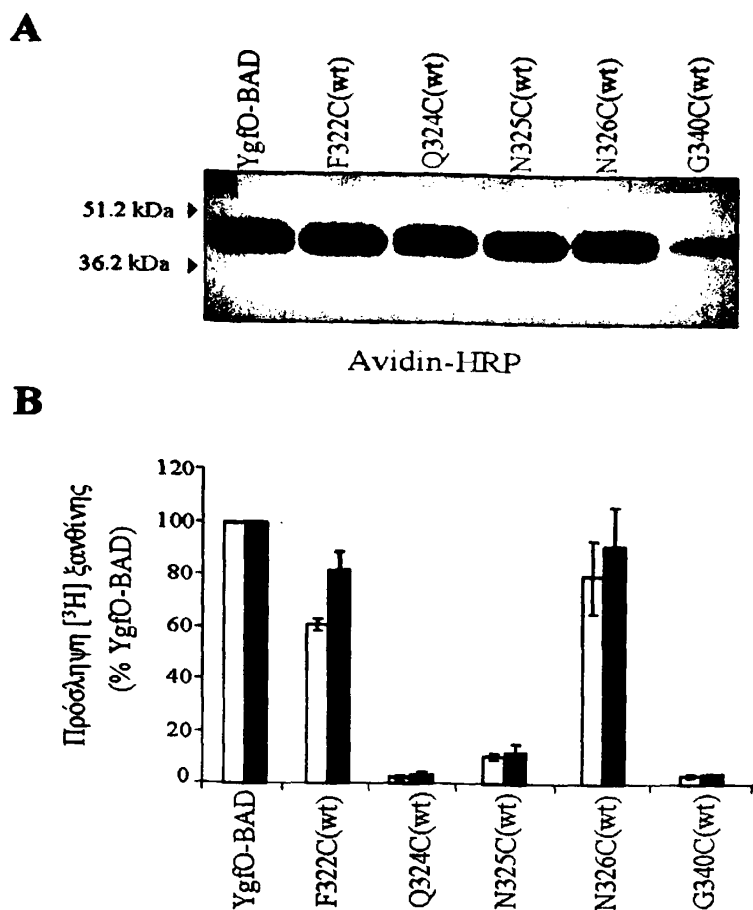
Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

3.4.1.3. Έκφραση και ενεργότητα των μεταλλαγμάτων Cys μετά από επαναφορά του υποστρώματος των 5 εγγενών κυστεϊνών

Για να διαπιστώσουμε αν η μειωμένη ενεργότητα των διαπερασών μοναδικής Cys στις θέσεις 322, 324, 325, 326, 340 μπορεί να σχετίζεται με την συνδυαστική απουσία των εγγενών κυστεϊνών, τα αντίστοιχα μεταλλάγματα μεταφέρθηκαν στο υπόστρωμα της φυσικού τύπου διαπεράσης YgfO-BAD. Οι διαπεράσεις που δημιουργήθηκαν [F322C(wt), Q324C(wt), N325C(wt), N326C(wt), G340C(wt)] ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση και την ενεργότητα (Εικόνα 3.27).

Όλες οι διαπεράσεις εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων σε ίδια επίπεδα με την φυσικού τύπου διαπεράση, εκτός από την G340C(wt) η οποία παρουσιάζει ελάχιστα επίπεδα έκφρασης. Όσον αφορά την ενεργότητα τους, παρατηρούμε ότι οι F322C(wt) και N326C(wt) παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα (60%-80% της φυσικού τύπου), η Q324C(wt) παρουσιάζει ενεργότητα παρόμοια με αυτή του αρνητικού μάρτυρα, ενώ η N325C(wt) παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα ενεργότητας περί το 10%. Η G340C(wt) παρουσιάζει ενεργότητα παρόμοια με αυτή του αρνητικού μάρτυρα, κάτι που συνδέεται με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της.





Εικόνα 3.27: Έκφραση και ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 322, 324, 325, 326, 340

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-F322C(wt), pT7-5/ygfO-Q324C(wt), pT7-5/ygfO-N325C(wt), pT7-5/ygfO-N326C(wt), pT7-5/ygfO-G340C(wt) και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h.

A: Πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)

B: Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης (λευκές μπάρες) μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec. Η τιμή για την YgfO-BAD ήταν 1.61 ± 0.55 nmol mg⁻¹ min⁻¹ (n=3). Τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης (μαύρες μπάρες) όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 1-10 min. Η τιμή για την YgfO-BAD ήταν 0.68 ± 0.05 nmol mg⁻¹ (n=3). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης και τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης ξανθίνης εκφράζονται ως % ποσοστά της YgfO-BAD μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται



3.4.2 Ανάλυση της ευαισθησίας των θέσεων Cys στο *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM)

Έχοντας διαμορφώσει μια πρώτη εικόνα για τις θέσεις 315-340 της διαπεράσης YgfO από τον έλεγχο της έκφρασης και της ενεργότητας των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων κυστεϊνών, προχωρήσαμε στην περαιτέρω μελέτη του ρόλου των θέσεων αυτών με πειράματα αλκυλίωσης. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) ένας σχετικά υδρόφοβος αλκυλιωτικός παράγοντας που αντιδρά ειδικά με τη σουλφυδρυλομάδα των κυστεϊνών (Smyth *et al.*, 1964). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο στις διαπεράσεις μοναδικής κυστεϊνης όσο και σε αυτές που δημιουργήθηκαν στο φυσικού τύπου υπόστρωμα, γνωρίζοντας ότι η ενεργότητα της YgfO φυσικού τύπου δεν επηρεάζεται από την παρουσία του NEM παρά την παρουσία των 5 εγγενών κυστεϊνών (Εικόνα 3.17).

3.4.2.1. Επίδραση στην ενεργότητα: ενδείξεις ότι η αλληλουχία I329-V339 αποτελεί α-έλικα

Η επίδραση του NEM στην ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης όλων των μεταλλαγμάτων έγινε αρχικά με 2 mM NEM για 10 min στους 25 °C σε αέραια κύτταρα (Εικόνα 3.28). Η ενεργότητα των διαπερασών στις θέσεις 322-329, 332-334, 336 και 339 αναστέλλεται σε ποσοστό >80%, της T321C σε ποσοστό 50%, ενώ η ενεργότητα των υπολοίπων (315-321, 330-331, 335, 337-338) δεν επηρεάζεται σημαντικά.

Ακολούθησαν πειράματα αναστολής με ένα εύρος συγκεντρώσεων NEM από 5 μ M έως 2 mM για όσες διαπεράσεις είχαν ενεργότητα <50% στις ακραίες συνθήκες αναστολής, ώστε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του NEM που απαιτείται για να έχουμε αναστολή της ενεργότητας κατά 50% (IC₅₀) (Εικόνα 3.29). Για τις διαπεράσεις που δεν εξετάστηκαν λόγω της μικρής αναστολής στις εξαντλητικές συνθήκες επώασης, η IC₅₀ δίδεται ως >2 mM.

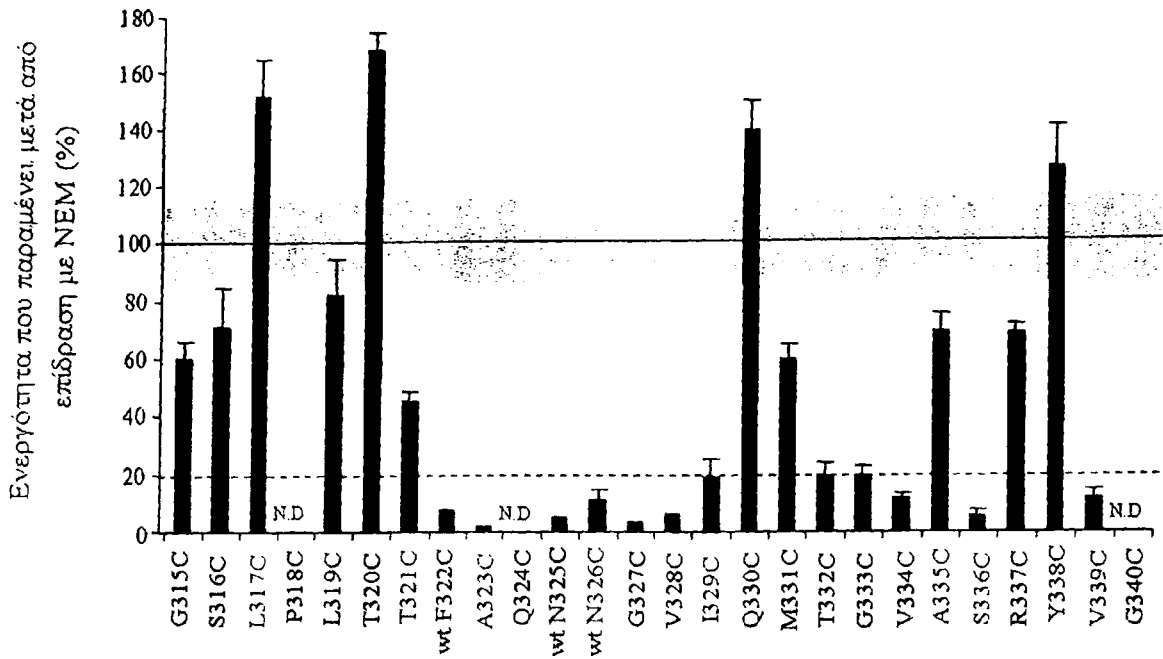
Παρατηρούμε ότι υπάρχουν τρεις διαδοχικές περιοχές αλληλουχίας με διαφορετικό προφίλ ευαισθησίας στο NEM:

- Η πρώτη περιοχή αφορά την αλληλουχία από το κατάλοιπο 315 έως το 322, η οποία δεν επηρεάζεται από το NEM, καθώς τα IC₅₀s που υπολογίστηκαν είναι από 0.4 mM (F322C(wt)) έως \geq 2 mM (G315C, S316C, L317C, L319C, T320C, T321C).



- Η δεύτερη περιοχή αφορά την αλληλουχία από το κατάλοιπο 323 έως το 329, η οποία είναι πολύ ευαίσθητη στη δράση του NEM, καθώς τα IC_{50} s που υπολογίστηκαν είναι από 15 μ M έως 80 μ M (A323C, N325C(wt), N326C(wt), G327C, V328C, I329C).
- Η τρίτη περιοχή αφορά την αλληλουχία από το κατάλοιπο 330 έως το 340, η οποία ακολουθεί μια περιοδικότητα εναλλασσόμενης ευαισθησίας στο NEM. Στην περιοχή αυτή παρατηρούνται διαπεράσεις που τα IC_{50} s τους είναι ≤ 40 μ M (T332C, G333C, S336C), 0.4 mM (V334C, V339C) ή ≥ 2 mM (Q330C, M331C, A335C, R337C, Y338C). Η περιοδικότητα της περιοχής αυτής καταλοίπων υποδεικνύει διαμόρφωση α -έλικας.

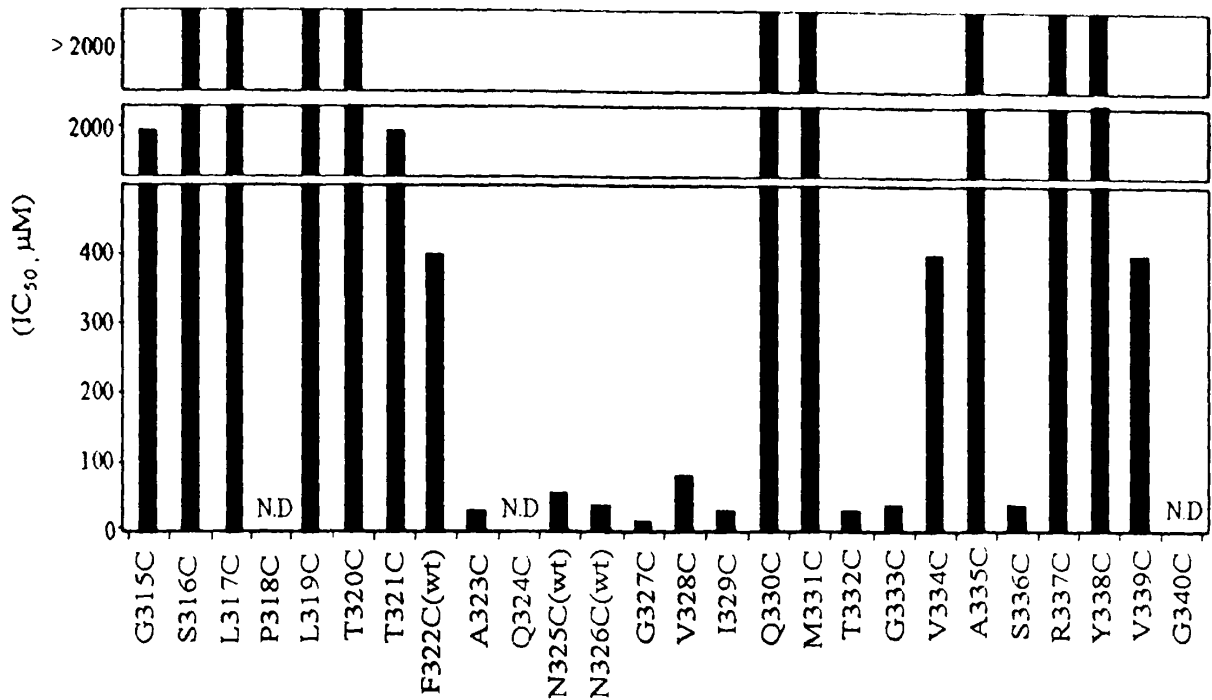




Εικόνα 3.28: Επίδραση 2 mM NEM στην ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των διαπερασών

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, όπου πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM) έγινε παρουσία 0.2 mM μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) και 20 mM ασκορβικού καλίου, μετά από προεπάση των κυττάρων παρουσία ή απουσία 2 mM NEM για 10 min στους 25 °C. Οι αρχικές ταχύτητες με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται μετρήθηκαν από τις τιμές σε χρόνους 5 και 10 sec τριών διαφορετικών πειραμάτων και παρουσιάζονται ως % ποσοστά των αρχικών ταχυτήτων που μετρήθηκαν από κύτταρα που δεν επώαστηκαν με NEM. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που υπερεκφράζουν τις διαπεράσεις Cys-less YgfO-BAD και YgfO(wt)-BAD οι αρχικές ταχύτητες και οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) των οποίων φαίνονται με τη συνεχή οριζόντια γραμμή (100% ενεργότητα) και την γκρι οριζόντια μπάρα, αντίστοιχα.

N.D.: not determined (Δεν έγινε προσδιορισμός λόγω μηδενικών τιμών αρχικής ταχύτητας πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.24))



Εικόνα 3.29: Τιμές IC₅₀ για κάθε διαπεράση

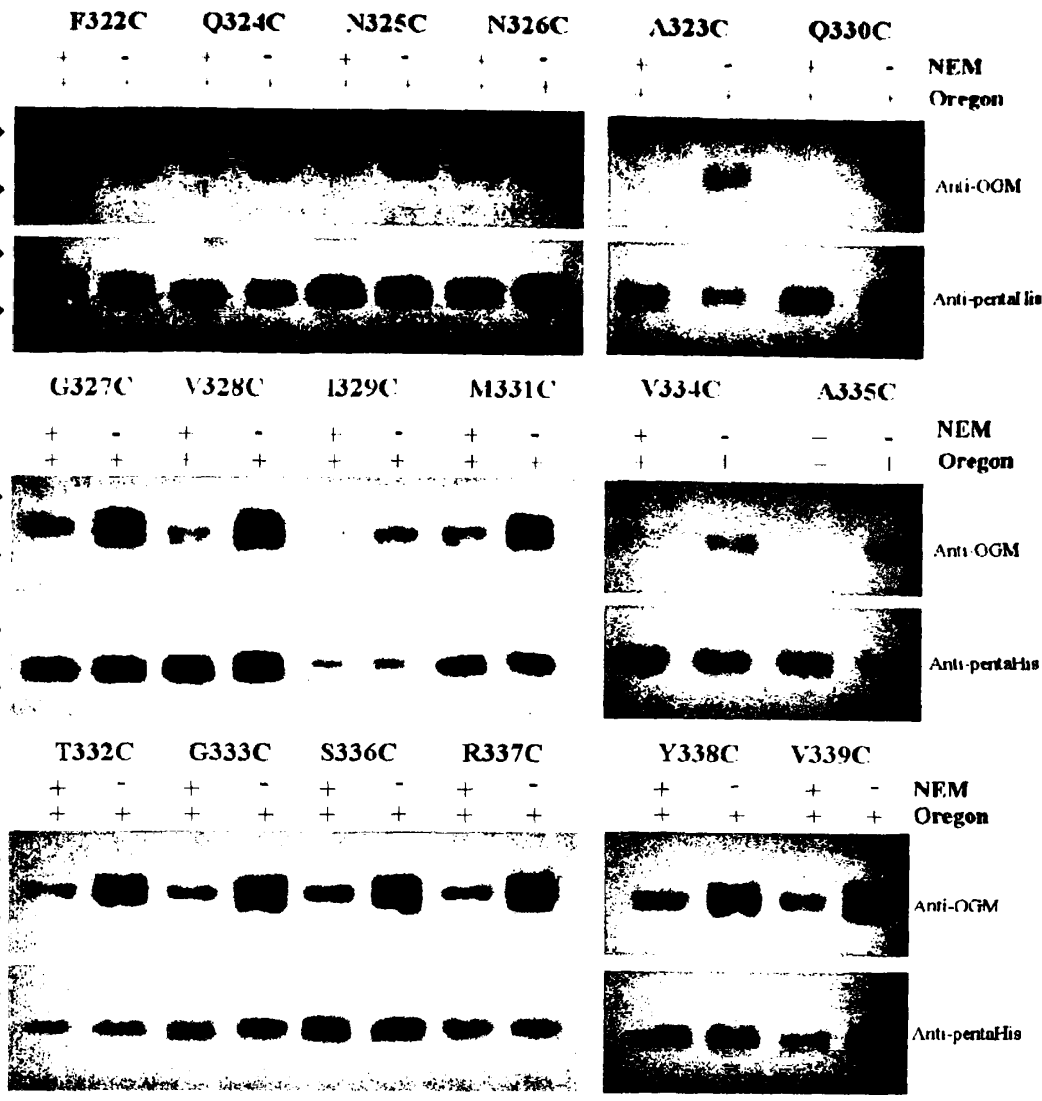
Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. όπου πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h. Η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM) έγινε παρουσία 0.2 mM μεθοσουλφονικού φαιναζινίου (PMS) και 20 mM ασκορβικού καλίου. μετά από προεπάση των κυττάρων παρουσία ή απουσία 5μM, 10μM, 20μM, 40μM, 0.1mM, 0.4mM, 1mM NEM για 10 min στους 25 °C. Οι τιμές IC₅₀ υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Prism 4 N.D.: not determined (Δεν έγινε προσδιορισμός λόγω μηδενικών τιμών αρχικής ταχύτητας πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.24))

3.4.2.2. Έκταση αλκυλίωσης *in vivo*

Έχοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα της επίδρασης του *N*-αιθυλμηλεϊμιδίου στις θέσεις 315-340 της αλληλουχίας της διαπεράσης YgfO σε επίπεδο ενεργότητας, συνεχίσαμε με πειράματα αλκυλίωσης *in vivo* με NEM μετά από απομόνωση των διαπερασών μοναδικής κυστεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας νικελίου για να εξετάσουμε την προσβασιμότητα των θέσεων αυτών (*in vivo* Cys-labeling assay). Ο έλεγχος έγινε στις δεκαεννέα (19) διαπεράσεις μοναδικής κυστεΐνης που φέρουν την C-τελική αλληλουχία His₁₀ διαπεράσεις (από 322 ως 340) και τα αποτελέσματα φαίνονται στην **Εικόνα 3.30**.

Το γενικό συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι όλες οι κυστεΐνες των δεκαεννέα (19) διαπερασών μοναδικής κυστεΐνης αλληλεπιδρούν με NEM, άρα οι αντίστοιχες θέσεις είναι προσβάσιμες στο αντιδραστήριο αυτό. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την επίδραση του NEM ήταν ειδικές (εφόσον στις ίδιες συνθήκες, δεν σημαίνεται η Cys-less διαπεράση, **Εικόνα 3.21**).





3.30: Έλεγχος του ποσοστού σήμανσης των SH-ομάδων των single-Cys
ών (θέσεις 322 – 340) μετά την επίδραση του NEM *in vivo*

E. coli T184 μετασχηματισμένα τα υπό μελέτη πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και ακολούθησε επαγωγή με IPTG (0.5 mM) κυτταρικά δείγματα (1 ml) επώαστηκαν παρουσία (+, 1 mM, 10 min, 25 °C) ή απουσία (-) NEM και ακολούθησε λύση των κυττάρων και εκχύλιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με DDM (0.8% w/v). Η σήμανση των επιθυμητών πρωτεϊνών έγινε με χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (Ni-IDA σφαιρίδια) και η σήμανση των εναπομεινουσών κυστεϊνών με το αντιδραστήριο OGM (200 μM, 20 min). Τα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE) και μεταφέρθηκαν σε PVDF με ηλεκτροφορητική μεταφορά. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι anti-OGM) και στη συνέχεια με αντισωμα έναντι των ιστιδινών (anti-pentaHis) δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η ποσοτική ανάλυση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life

Q
E
με
3.4.
μετα
εμφ
κανόν
Χρησ
YefO
σημα
κυττάρ
ιδιότη
δυσπερά
ανεργόπ
περίπου
της Q324
YefO ουσε



3.4.3 Αρχική διερεύνηση του ρόλου των συντηρημένων καταλοίπων στο μοτίβο NAT

Δείξαμε (Κεφάλαια 3.4.1 και 3.4.2) ότι, από τα κατάλοιπα του μοτίβου «υπογραφή»³²⁴ [Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-T-[R/K/G]³³³ της διαπεράσης YgfO, τα Q324, N325 και T332 αντιστοιχούν σε θέσεις μεταλλαγμάτων Cys με ελάχιστα ή μηδενικά επίπεδα ενεργότητας και/ή ιδιαίτερη ευαισθησία σε απενεργοποίηση από το αντιδραστήριο NEM. Στη συνέχεια, για να μελετήσαμε διεξοδικότερα το ρόλο των καταλοίπων αυτών, καθώς και των καταλοίπων G327 και G333 που είναι απόλυτα συντηρημένα μεταξύ των μελών της οικογένειας NAT/NCS2, εφαρμόσαμε εκτενέστερη μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης στις θέσεις αυτές, στο υπόστρωμα της YgfO(wt)-BAD. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε επιπρόσθετα και ελέγξαμε λειτουργικά τις εξής σημειακώς μεταλλαγμένες YgfOs: **Q324N, Q324P, Q324E, Q324A, N325Q, N325A, N325S, N325D, N325T, G327A, G327P, T332A, T332N, T332D, G333R, G333K**. Τα αποτελέσματα του λειτουργικού ελέγχου όλων των μεταλλαγμάτων παρουσιάζονται κατωτέρω.

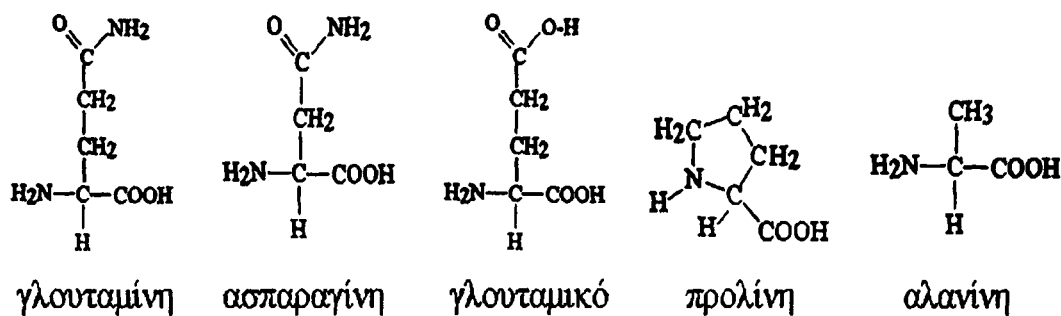
3.4.3.1. Η Gln324 απαιτείται για την πρόσληψη ξανθίνης με υψηλή συγγένεια

Η θέση 324 είναι μια υψηλά συντηρημένη θέση στο μοτίβο «υπογραφή» των μεταφορέων NAT/NCS2. Στη θέση αυτή εμφανίζεται Gln (κατά κανόνα, στους μεταφορείς ουρικού και/ή ξανθίνης), Glu (κατά κανόνα, στους μεταφορείς ουρακίλης) ή Pro (κατά κανόνα, στους μεταφορείς ασκορβικού). Στην αλληλουχία της YgfO υπάρχει Gln. Χρησιμοποιώντας *in vitro* μεταλλαξιγένεση στη θέση αυτή, αντικαταστήσαμε την Gln324 της YgfO με Cys (κεφάλαιο 3.4.1), Asn, Glu, Pro ή Ala (Εικόνα 3.31). Όλες οι διαπεράσεις με σημειακώς μεταλλαγμένη την Gln324 εκφράζονται ικανοποιητικά στη μεμβράνη των κυττάρων (Εικόνα 3.32) ενώ η ενεργότητα τους είναι μηδενική (Q324P, Q324C, Q324A) ή ιδιαίτερα χαμηλή (Q324N, Q324E) (Εικόνα 3.33).

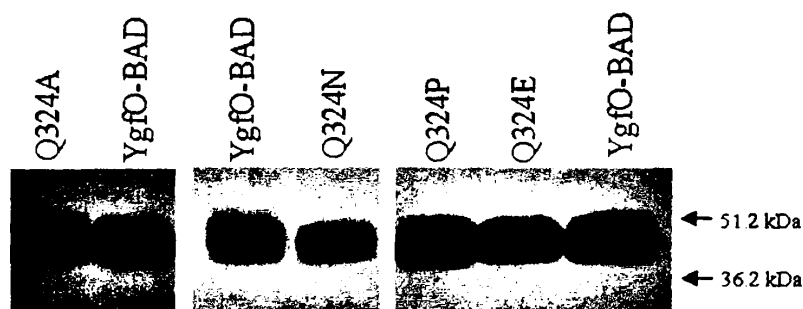
Για τη θέση 324, κινητική ανάλυση (Πίνακας 3.12) πραγματοποιήθηκε στις διαπεράσεις Q324N και Q324E (οι διαπεράσεις Q324P και G324A παρουσιάζουν μηδενική ενεργότητα) και παρατηρούμε ότι και στις δύο η K_m ως προς την μεταφορά ξανθίνης είναι περίπου 15 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την διαπεράση φυσικού τύπου. Επίσης η V_{max} για την Q324N είναι 6-7 φορές μεγαλύτερη ενώ για την Q324E είναι διπλάσια από αυτήν της YgfO φυσικού τύπου.



Μετά από έλεγχο του προφίλ εξειδίκευσης σε πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ξανθίνης (1 μM) με μη σημασμένες νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών (1 mM) (Πίνακας 3.13) διαπιστώσαμε ότι, σε αντιδιαστολή με την φυσικού τύπου YgfO, οι Q324N και Q324E δεν αναγνωρίζουν τα ανάλογα 1-μεθυλοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη και 6-θειοξανθίνη. Συνολικά, οι Q324N και Q324E εμφανίζουν ελάχιστη έως μηδενική ικανότητα δέσμευσης για μία σειρά 15 νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων ξανθίνης που ελέγχθηκαν (Πίνακας 3.13), κάτι που συνάδει και με την χαμηλή συγγένεια μεταφοράς ξανθίνης (υψηλή K_m) των διαπερασών αυτών (Πίνακας 3.12).



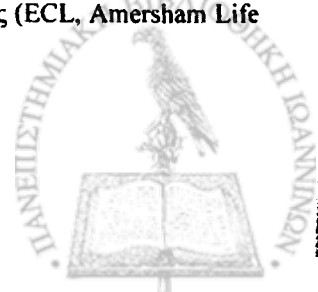
Εικόνα 3.31: Συντακτικός χημικός τύπος των αμινοξέων γλουταμίνη, ασπαραγίνη, γλουταμικό οξύ, προλίνη και αλανίνη

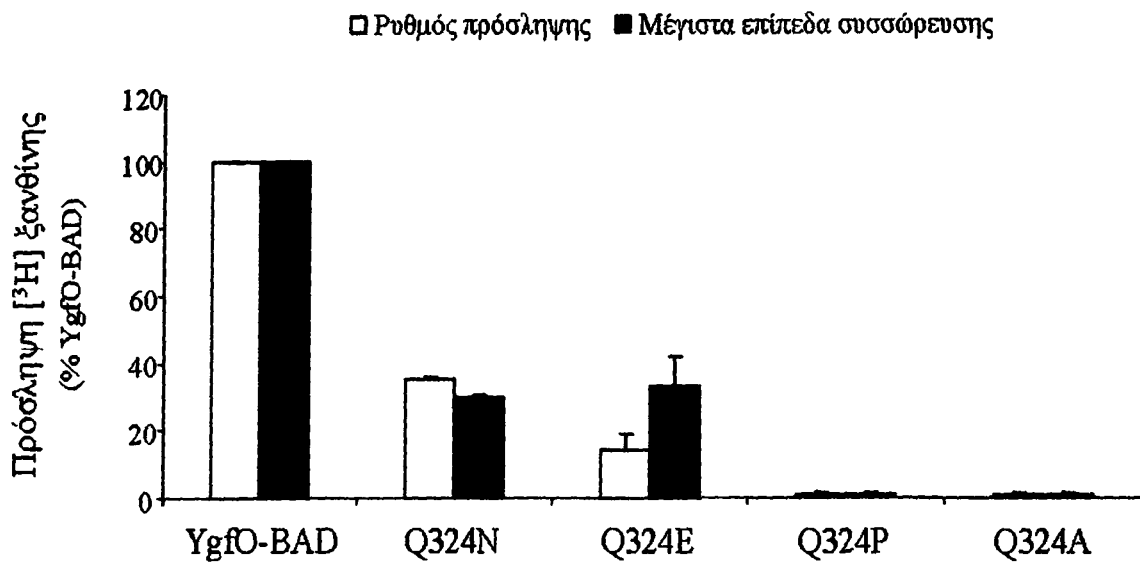


Εικόνα 3.32: Έκφραση των μεταλλαγμάτων της YgfO στη θέση 324

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-Q324N, pT7-5/ygfO-Q324E, pT7-5/ygfO-Q324A, pT7-5/ygfO-Q324P αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100 μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)





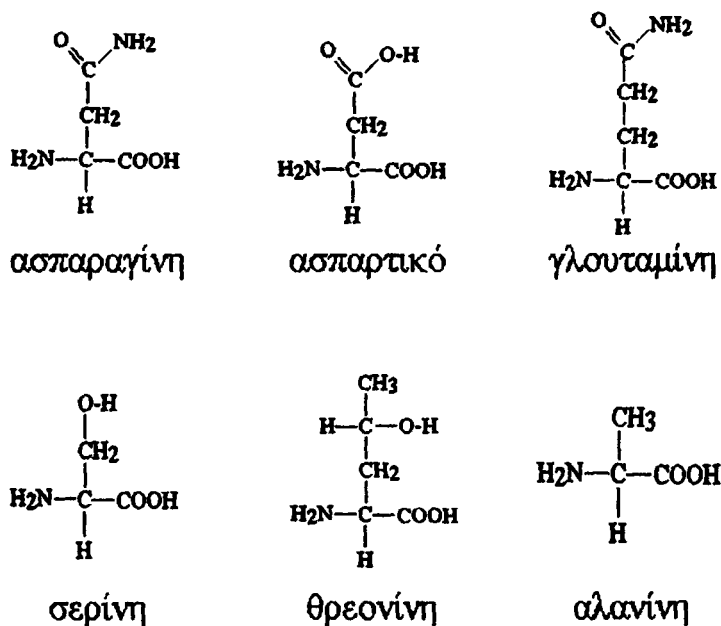
Εικόνα 3.33: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των μεταλλαγμάτων της YgfO στη θέση 324

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-Q324N, pT7-5/ygfO-Q324E, pT7-5/ygfO-Q324A, pT7-5/ygfO-Q324P και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP_i και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec (λευκές μπάρες), ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε χρόνους 1-10 min (μαύρες μπάρες). Οι τιμές των μεταλλαγμάτων εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της YgfO-BAD μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5.

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

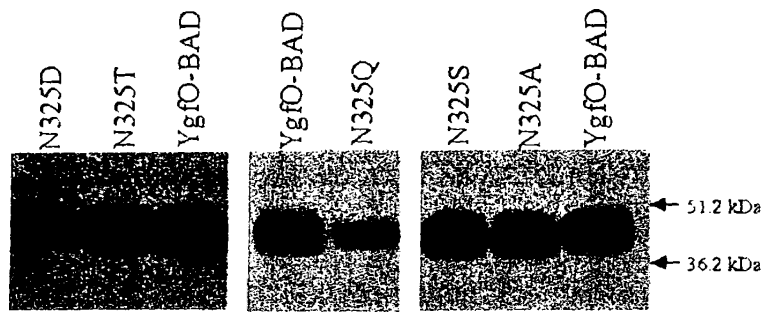
3.4.3.2. Η Asn325 είναι αναντικατάστατη για τη μεταφορά ξανθίνης

Η Asn325 είναι απόλυτα συντηρημένη μεταξύ όλων των μελών της οικογένειας NAT/NCS2. Χρησιμοποιώντας *in vitro* μεταλλαξιγένεση στη θέση αυτή, αντικαταστήσαμε την Asn325 της YgfO με Cys (Κεφάλαιο 3.4.1) Asp, Gln, Ser, Thr ή Ala (Εικόνα 3.34). Όλες αυτές οι διαπεράσεις εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα, τα οποία είναι είτε παραπλήσια με αυτά της YgfO(wt)-BAD (N325S, N325T, N325A, N325C), είτε μειωμένα κατά 50% περίπου (N325D, N325Q) (Εικόνα 3.35). Αντίθετα, όλες οι διαπεράσεις με σημειακώς μεταλλαγμένη την Asn325 παρουσιάζουν ελάχιστα έως αμελητέα επίπεδα ενεργότητας (Εικόνα 3.36). Επίσης, λόγω των πολύ μικρών τιμών ενεργότητας ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός τιμών K_m και V_{max} (Πίνακας 3.12).



Εικόνα 3.34: Συντακτικός χημικός τύπος των αμινοξέων ασπαραγίνη, ασπαρτικό, γλουταμίνη, σερίνη, θρεονίνη και αλανίνη

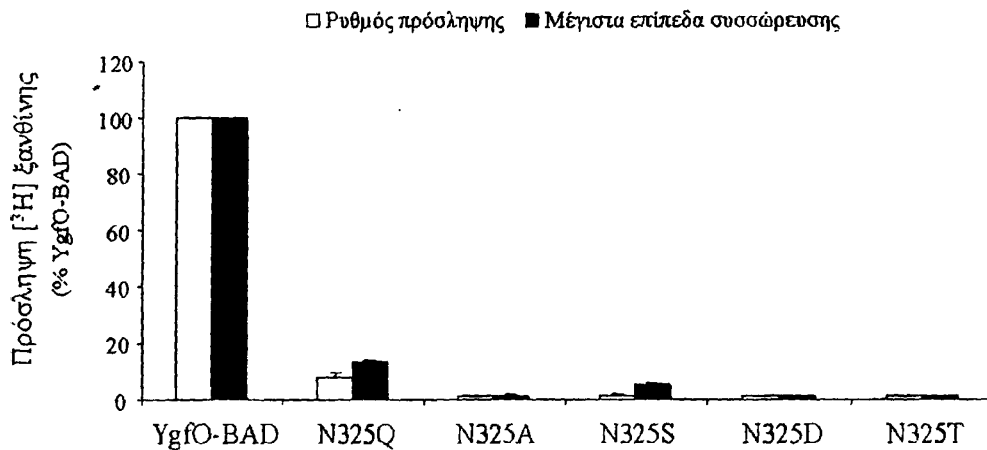




Εικόνα 3.35: Έκφραση των μεταλλαγμάτων της YgfO στη θέση 325

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-N325Q, pT7-5/ygfO-N325A, pT7-5/ygfO-N325S, pT7-5/ygfO-N325D, pT7-5/ygfO-N325T αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h. πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100 µg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (*avidin-HRP*)

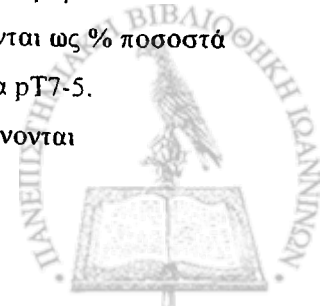
Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



Εικόνα 3.36: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των μεταλλαγμάτων της YgfO στη θέση 325

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-N325Q, pT7-5/ygfO-N325A, pT7-5/ygfO-N325S, pT7-5/ygfO-N325D, pT7-5/ygfO-N325T και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP, και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 µM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec (λευκές μπάρες), ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε χρόνους 1-10 min (μαύρες μπάρες). Οι τιμές των μεταλλαγμάτων εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της YgfO-BAD μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5.

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

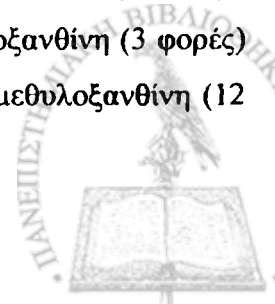


3.4.3.3. Η Gly327 και η Thr332 μπορούν να αντικατασταθούν με διατήρηση υψηλής ενεργότητας αλλά η Thr332 επηρεάζει την εξειδίκευση

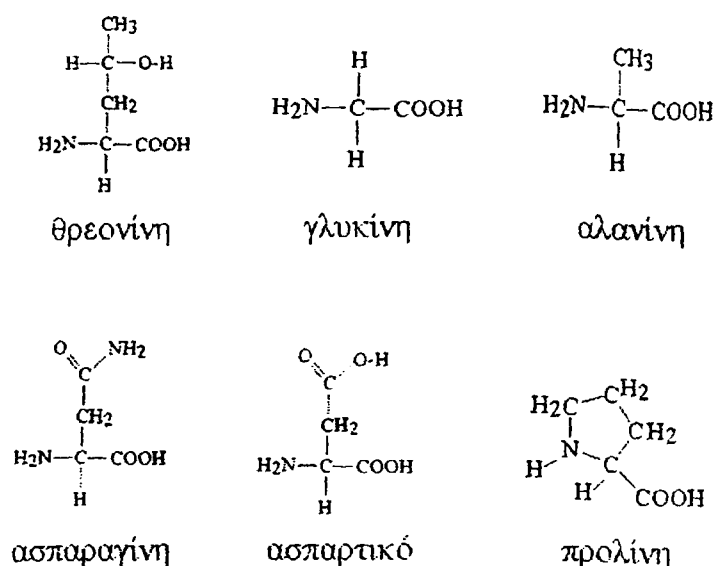
Τα κατάλοιπα Gly327 και Thr332 είναι και αυτά απολύτως συντηρημένα μεταξύ όλων των μελών της οικογένειας NAT/NCS2 στο μοτίβο «υπογραφή». Χρησιμοποιώντας *in vitro* μεταλλαξιγένεση στις θέσεις αυτές, αντικαταστήσαμε την Gly327 της YgfO με Cys (Κεφάλαιο 3.4.1), Pro ή Ala και την Thr332 με Cys (κεφάλαιο 3.4.1), Ala, Asn ή Asp (Εικόνα 3.37). Όλες αυτές οι διαπεράσεις εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα, τα οποία είναι παραπλήσια με αυτά της YgfO(wt)-BAD, με μειωμένα κατά 50% τα επίπεδα της T332A (Εικόνα 3.38). Η ενεργότητα των διαπερασών με σημειακά μεταλλαγμένη την Gly327 παρουσιάζεται σε υψηλότερα επίπεδα (σε ποσοστά από 100% έως 200%) από αυτά της διαπεράσης φυσικού τύπου. Αντίθετα, η ενεργότητα των διαπερασών με σημειακά μεταλλαγμένη την Thr332, παρουσιάζεται είτε μειωμένη στο 20-40% (T332A, T332D, T332C) είτε αυξημένη κατά 1.8-2.0 φορές (T332N) σε σχέση με την YgfO(wt)-BAD (Εικόνα 3.39).

Η κινητική ανάλυση στα μεταλλάγματα της θέσης 327 (Πίνακας 3.12) έδειξε παραπλήσιες τιμές K_m και αυξημένες V_{max} (2 έως 5 φορές) σε σχέση με την φυσικού τύπου διαπεράση, κάτι που συνάδει και με την αυξημένη ενεργότητα των G327A και G327P που παρατηρήσαμε στα αρχικά πειράματα πρόσληψης ξανθίνης (Εικόνα 3.39). Ως προς τη θέση 332 (Πίνακας 3.12), η διαπεράση T332N παρουσιάζει μειωμένη κατά το ήμισυ τιμή K_m και οριακά αυξημένη V_{max} (1.5 X) σε σχέση με τη φυσικού τύπου διαπεράση. Η αντικατάσταση της Thr με Ala οδηγεί σε υποτριπλάσια V_{max} με ίδια τιμή K_m , ενώ οι αντικαταστάσεις με Asp ή Cys οδηγούν σε μείωση της K_m κατά το ήμισυ και, κυρίως, καθολική σχεδόν μείωση της V_{max} , η οποία διατηρείται σε επίπεδα μόλις 10-15% σε σχέση με την φυσικού τύπου διαπεράση.

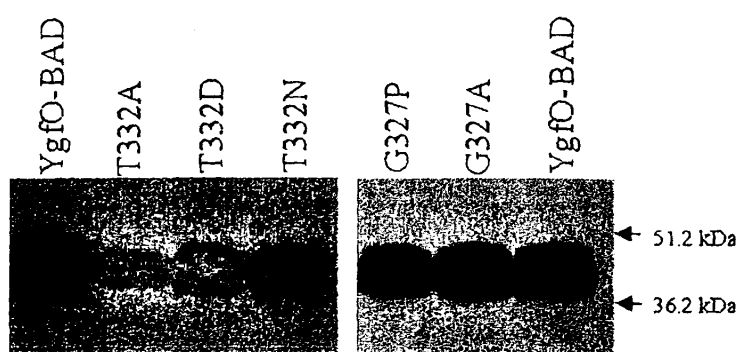
Τα πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης ξανθίνης (1 μ M) από μη ραδιοενεργές νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών (1 μ M έως 1 mM), έδειξαν ότι το προφίλ εξειδίκευσης υποστρωμάτων για τις διαπεράσεις G327A και G327P είναι όμοιο με αυτό της φυσικού τύπου YgfO. Αντίθετα, για τις διαπεράσεις T332A και T332N, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην αναγνώριση των αναλόγων οξυπουρινόλη, 1-, 3-, 8-, 9-μεθυλοξανθίνη, 2- και 6-θειοξανθίνη (Πίνακας 3.13). Συγκεκριμένα, η T332N παρουσιάζει υψηλότερη τιμή K , για τα ανάλογα 1-μεθυλοξανθίνη (13 φορές) και 6-θειοξανθίνη (3 φορές) και χαμηλότερη τιμή K , για τα ανάλογα 2-θειοξανθίνη (2 φορές) και 3-μεθυλοξανθίνη (12



φορές) (Πίνακας 3.14). Επίσης, σε αντιδιαστολή με την φυσικού τύπου διαπεράση, η T332N είναι ικανή να αναγνωρίζει την 8-μεθυλοξανθίνη και, μάλιστα, με σημαντική συγγένεια ($K_i=196 \mu\text{M}$, έναντι $>1000 \mu\text{M}$ για την YgfO(wt)-BAD).



Εικόνα 3.37: Συντακτικός χημικός τύπος των αμινοξέων θρεονίνη, γλυκίνη, αλανίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό και προλίνη

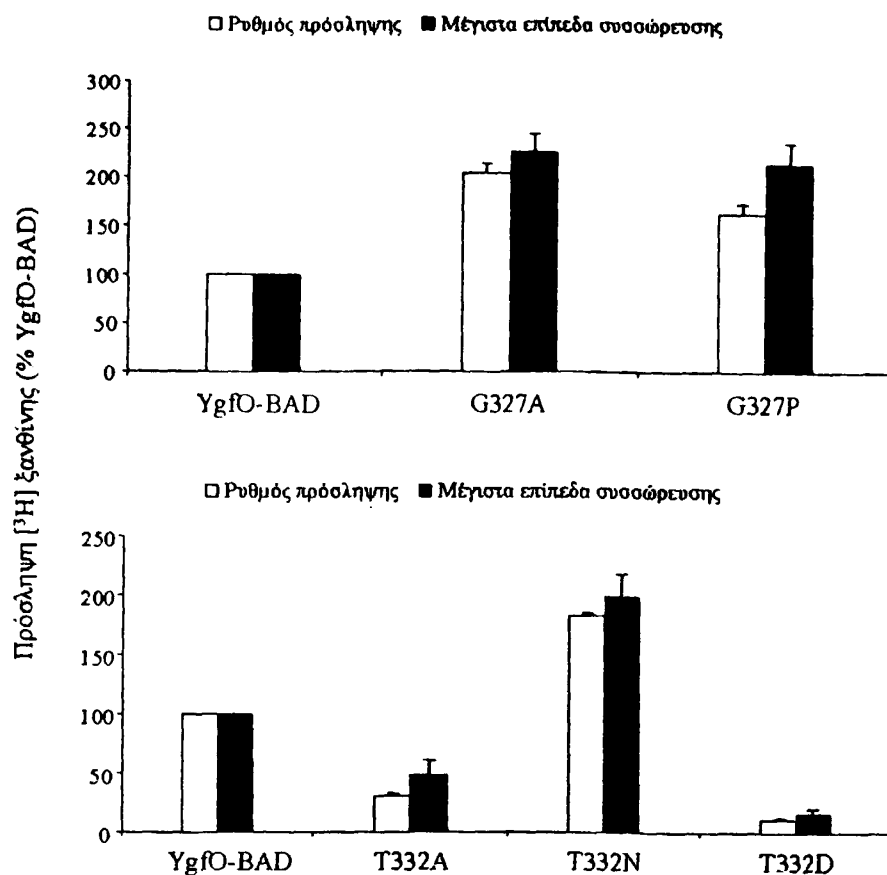


Εικόνα 3.38: Έκφραση των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 327, 332

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-G327P, pT7-5/ygfO-G327A, pT7-5/ygfO-T332A, pT7-5/ygfO-T332D, pT7-5/ygfO-T332N αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37°C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων $100 \mu\text{g}$ ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμίδιου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)





Εικόνα 3.39: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 327, 332

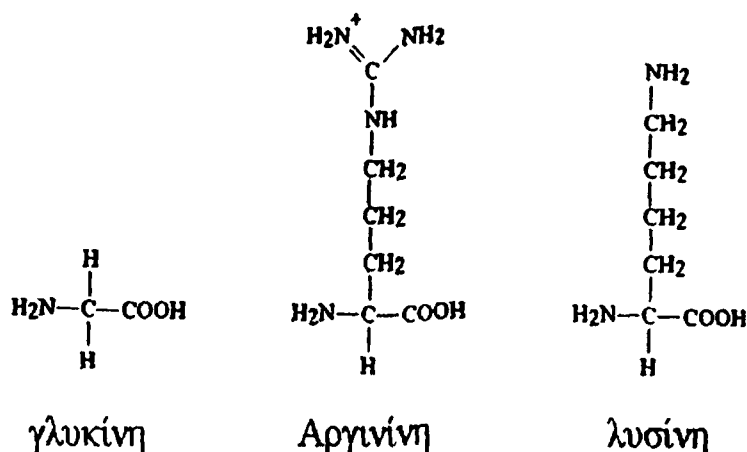
Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-G327P, pT7-5/ygfO-G327A, pT7-5/ygfO-T332A, pT7-5/ygfO-T332D, pT7-5/ygfO-T332N και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με ΚΡ, και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec (λευκές μπάρες), ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε χρόνους 1-10 min (μαύρες μπάρες). Οι τιμές των μεταλλαγμάτων εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της YgfO-BAD μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

3.4.3.4. Η Gly333 είναι σημαντική για την εξειδίκευση

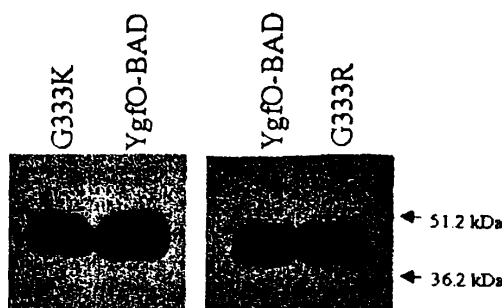
Μια ακόμη υψηλά συντηρημένη θέση στο μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2 είναι η θέση 333. Στη θέση αυτή εμφανίζεται Gly (κατά κανόνα, στους μεταφορείς ξανθίνης), Arg (κατά κανόνα, στους μεταφορείς ουρικού και ξανθίνης) ή Lys (κατά κανόνα, στους μεταφορείς ουρικού). Στη διαπεράση YgfO στη θέση αυτή υπάρχει Gly. Χρησιμοποιώντας *in vitro* μεταλλαξιγένεση στη θέση αυτή, αντικαταστήσαμε την Gly333 της YgfO με Cys (κεφάλαιο 3.4.1), Arg ή Lys (**Εικόνα 3.40**). Όλες οι διαπεράσεις εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων σε σχέση με την YgfO(wt)-BAD (**Εικόνα 3.41**). Η ενεργότητα των διαπερασών με σημειακώς μεταλλαγμένη την Gly333 παρουσιάζεται είτε παραπλήσια (G333C) είτε μειωμένη κατά το ήμισυ (G333R) είτε αμελητέα (G333K) σε σχέση με την YgfO(wt)-BAD (**Εικόνα 3.42**). Επιπλέον, οι διαπεράσεις G333R και G333K παρουσιάζουν τιμές V_{max} 3 με 5 φορές μειωμένες, σε σχέση με την φυσικού τύπου διαπεράση, ενώ οι τιμές K_m δεν επηρεάζονται σημαντικά (**Πίνακας 3.12**).

Πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης ξανθίνης (1 μM) με μη σημασμένες νουκλεοτιδικές βάσεις και ανάλογα αυτών (1 μM έως 1 mM) πραγματοποιήθηκαν για την διαπεράση G333R, η οποία παρουσίαζε τα υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας μεταξύ των διαπερασών με σημειακώς μεταλλαγμένη την Gly333. Αλλαγές στο προφίλ εξειδίκευσης της G333R παρατηρούνται στην αναγνώριση του ουρικού, της 3-μεθυλοξανθίνης, της 7-μεθυλοξανθίνης και της 8-μεθυλοξανθίνης (**Πίνακας 3.13**). Αναλυτικότερα, η πιο σημαντική διαφορά είναι ότι η G333R αναγνωρίζει τα ανάλογα 7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη με K_i s 107 μM και 409 μM , αντίστοιχα, ενώ η φυσικού τύπου YgfO δεν τα αναγνωρίζει καθόλου ($K_i > 1000 \mu\text{M}$). Επίσης, η G333R παρουσιάζει μία μικρή ικανότητα να αναγνωρίζει ουρικό (K_i 737 μM) η οποία δεν απαντάται στην φυσικού τύπου διαπεράση, ενώ εμφανίζει μικρότερη συγγένεια για την 6-θειοξανθίνη (τριπλάσια τιμή K_i) και μεγαλύτερη συγγένεια για την 3-μεθυλοξανθίνη (πενταπλάσια K_i) (**Πίνακας 3.14**).





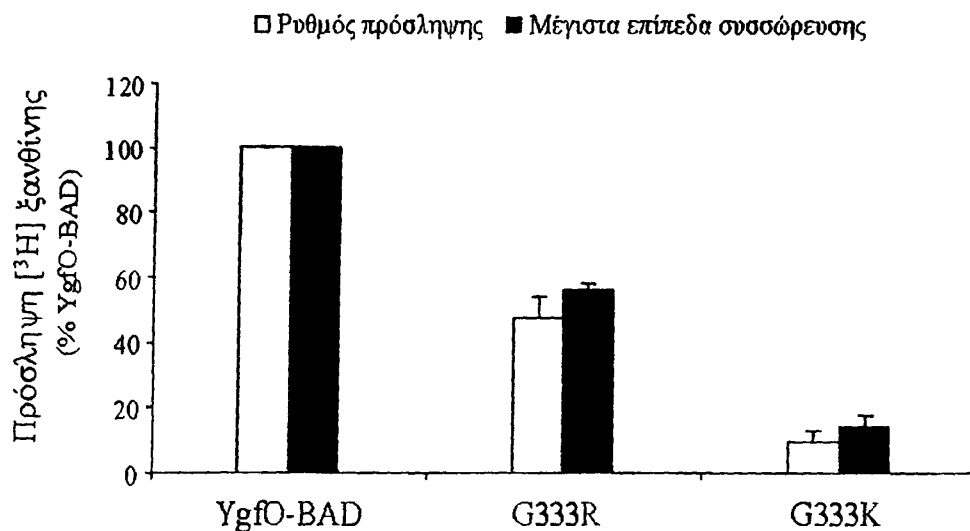
Εικόνα 3.40: Συντακτικός χημικός τύπος των αμινοξέων γλυκίνη, αργινίνη και λυσίνη



Εικόνα 3.41: Έκφραση των μεταλλαγμάτων της YgfO στη θέση 333

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-G333K, pT7-5/ygfO-G333R αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100 μg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



Εικόνα 3.42: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των μεταλλαγμάτων της YgfO στη θέση 333

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-G333K, pT7-5/ygfO-G333R και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP_i και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 μM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec (λευκές μπάρες), ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε χρόνους 1-10 min (μαύρες μπάρες). Οι τιμές των μεταλλαγμάτων εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της YgfO-BAD μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5.

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται

Διαπεράσεις	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L min}^{-1}$ mg^{-1})
YgfO-BAD	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	1378
Cys-less YgfO-BAD	5.5 ± 0.5	10.2 ± 0.2	1858
Q324N(wt)	76.0 ± 19.1	44.5 ± 4.7	586
Q324E(wt)	71.2 ± 12.2	12.6 ± 0.4	177
N325Q(wt)	nd ²	nd	
N325C	nd	nd	
G327A(wt)	3.4 ± 0.3	28.9 ± 6.6	8500
G327P(wt)	3.9 ± 0.1	28.1 ± 4.0	7205
G327C	3.2 ± 0.2	20.1 ± 5.1	6281
T332A(wt)	4.8 ± 1.2	1.9 ± 0.4	396
T332D(wt)	1.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	529
T332N(wt)	2.2 ± 0.3	10.5 ± 2.2	4772
T332C	3.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	333
G333R(wt)	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.2	857
G333K(wt)	5.2 ± 1.2	1.1 ± 0.1	211

Πίνακας 3.12: Τιμές K_m και V_{max} των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 324, 325, 327, 332 και 333

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις αντίστοιχες διαπεράσεις και οι τιμές των K_m και V_{max} υπολογίστηκαν από μετρήσεις σε χρόνους 5 και 10 sec με συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος 0.1 μM , 0.4 μM , 1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM και 100 μM και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές της YgfO-BAD.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο υπόμνημα της Εικόνας 3.42. Οι παράμετροι K_m και V_{max} εξήχθησαν από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4.

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται.

N.D.: not determined (δεν υπολογίστηκαν λόγω χαμηλών αρχικών ταχυτήτων πρόσληψης ξανθίνης)

N.D.²: (επιχειρήθηκαν αλλά δεν προσδιορίστηκαν λόγω χαμηλών αρχικών ταχυτήτων πρόσληψης ξανθίνης)



Ρυθμός πρόσληψης [³H] ξανθίνης (%)

Ανταγωνιστές	YgfO-BAD	Q324N	Q324E	G327A	G327P	T332A	T332N	G333R
-	100	100	100	100	100	100	100	100
Ξανθίνη	0	1	1	1	1	1	1	2
Ουρικό οξύ	97	143	123	82	87	68	73	54
Υποξανθίνη	96	126	77	106	94	80	85	71
Ουρακίλη	101	128	98	104	92	74	81	101
Αδενίνη	96	90	124	113	100	132	110	78
Γουανίνη	94	102	60	77	92	78	67	97
Αλλοπουρινόλη	106	106	124	83	99	74	60	61
Οξυπουρινόλη	31	70	62	8	9	1	4	10
1-μεθυλοξανθίνη	19	91	94	23	33	11	5	5
3-μεθυλοξανθίνη	25	77	85	18	28	3	8	0
7-μεθυλοξανθίνη	105	67	112	72	89	76	66	21
8-μεθυλοξανθίνη	96	54	75	42	52	30	36	18
9-μεθυλοξανθίνη	13	118	92	6	7	1	2	7
2-θειοξανθίνη	13	123	113	8	10	1	2	10
6-θειοξανθίνη	20	61	50	1	1	1	1	10

Πίνακας 3.13: Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 324, 327, 332 και 333

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-Q324N, pT7-5/ygfO-Q324E, pT7-5/ygfO-G327A, pT7-5/ygfO-G327P, pT7-5/ygfO-T332A, pT7-5/ygfO-T332N, pT7-5/ygfO-G333R και pT7-5 αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h υπόκεινται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνης μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες (1 mM) για 5 min. Οι ρυθμοί πρόσληψης ξανθίνης μετρήθηκαν στα 5 και 10 sec μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % ποσοστό των τιμών που προέρχονται από κύτταρα που δεν έχουν προεπωαστεί με τους μη σημασμένους προσδέτες και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα που υπάρχουν για την διαπεράση YgfO-BAD. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι διαφορές των μεταλλαγμάτων της YgfO σε σχέση με τη φυσικού τύπου διαπεράση



Ανταγωνιστές	K_i (μM)		
	YgfO-BAD	T332N	G333R
Ουρικό οξύ	>1000	>1000	737
1-μεθυλοξανθίνη	36	489	46
3-μεθυλοξανθίνη	72	6	14
7-μεθυλοξανθίνη	>1000	>1000	107
8-μεθυλοξανθίνη	>1000	196	409
9-μεθυλοξανθίνη	53	36	54
2-θειοξανθίνη	91	40	80
6-θειοξανθίνη	41	112	121

Πίνακας 3.14: Τιμές K_i για τις διαπεράσεις YgfO-T332N, YgfO-G333R και YgfO-BAD

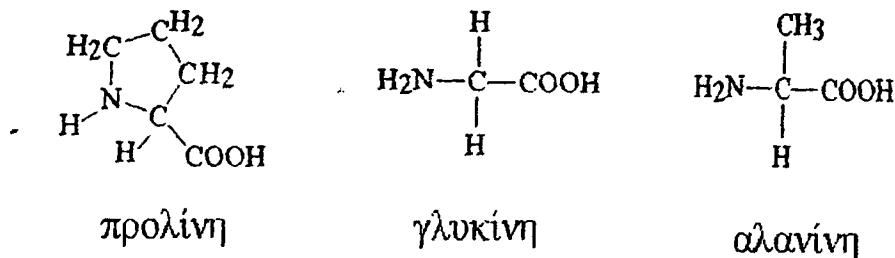
Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* T184 που εκφράζουν τις διαπεράσεις YgfO-BAD, YgfO-T332N, YgfO-G333R και η δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H]ξανθίνης (1 μM) πραγματοποιήθηκε μετά την προελώση των κυττάρων με τους μη σημασμένους πιθανούς προσδέτες σε συγκεντρώσεις από 0.1 μM – 1 mM. Η πειραματική διαδικασία φαίνεται στο υπόμνημα του Πίνακα 3.13. Οι τιμές IC_{50} εξήχθησαν με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 4. Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο των Cheng και Prusoff, $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] ξανθίνης. Οι διαφορές μεταξύ των YgfO-T332N και YgfO-G333R σε σχέση με τη φυσικού τύπου διαπεράση παρουσιάζονται με έντονα γράμματα



3.4.4 Οι Pro318 και Gly340 είναι σημαντικές για την έκφραση της YgfO στη μεμβράνη

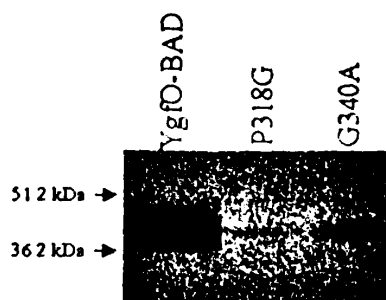
Από τις διαπεράσεις μοναδικής κυστεΐνης που δημιουργήθηκαν στις θέσεις 315-340 της αμινοξικής αλληλουχίας της YgfO, οι θέσεις Pro318 και Gly340 ήταν οι μόνες που παρουσίαζαν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη των κυττάρων. Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω τις θέσεις αυτές, κατασκευάσαμε με μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης στο υπόστρωμα της YgfO(wt)-BAD τις διαπεράσεις P318G και G340A (Εικόνα 3.43).

Τα επίπεδα έκφρασης των P318G και G340A στη μεμβράνη των κυττάρων είναι σχεδόν μηδενικά ή εξαιρετικά χαμηλά, αντίστοιχα (Εικόνα 3.44). Ως προς την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης, η ενεργότητα της P318G είναι αμελητέα, ενώ η G340A εμφανίζει ενεργότητα σε επίπεδα 50-60% σε σχέση με αυτά της YgfO(wt)-BAD (Εικόνα 3.45).



Εικόνα 3.43: Συντακτικός χημικός τύπος των αμινοξέων προλίνη, γλυκίνη και αλανίνη

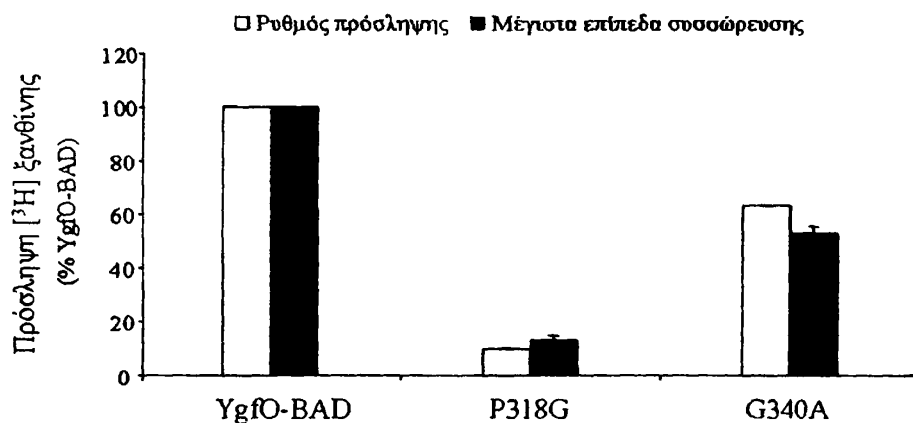




Εικόνα 3.44: Έκφραση των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 318 και 340

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-P318G, pT7-5/ygfO-G340A αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και μετά από επαγωγή με IPTG (0.5 mM) για 2h, πραγματοποιήθηκε παρασκευή κλάσματος μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 100 µg ολικής πρωτεΐνης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% (SDS-PAGE), μεταφορά των πρωτεϊνών του πηγματος σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP)

Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών βαρών (Bio-Rad Low range). Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημιοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science)



Εικόνα 3.45: Ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης των μεταλλαγμάτων της YgfO στις θέσεις 318 και 340

Κύτταρα *E. coli* T184 μετασχηματισμένα με πλασμίδια pT7-5/ygfO-BAD, pT7-5/ygfO-P318G, pT7-5/ygfO-G340A και pT7-5 αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες μέχρι την αρχή της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης με IPTG (0.5 mM) για 2h, συλλογή, έκλυση των κυττάρων με KP, και δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H]ξανθίνη (1 µM). Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης ξανθίνης όλων των διαπερασών μετρήθηκαν σε χρόνους 5 και 15 sec (λευκές μπάρες), ενώ τα μέγιστα επίπεδα συσσώρευσης σε χρόνους 1-10 min (μαύρες μπάρες). Οι τιμές των μεταλλαγμάτων εκφράζονται ως % ποσοστά των αντίστοιχων τιμών της YgfO-BAD μετά από αφαίρεση των τιμών του αρνητικού μάρτυρα pT7-5.

Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις (S.D.) που φαίνονται



Α. 5. Διότι πάλι, η γλώσσα του κειμένου είναι πολύ διαφορετική από την προηγούμενη και...

...και η σύνταξη είναι πολύ διαφορετική από την προηγούμενη και...

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

...και η σύνταξη είναι πολύ διαφορετική από την προηγούμενη και...

...και η σύνταξη είναι πολύ διαφορετική από την προηγούμενη και...

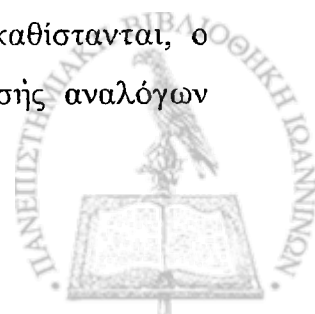


4.1 Σύγκριση της εξειδίκευσης υποστρωμάτων μεταξύ βακτηριακών και μυκητιακών μεταφορέων πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2

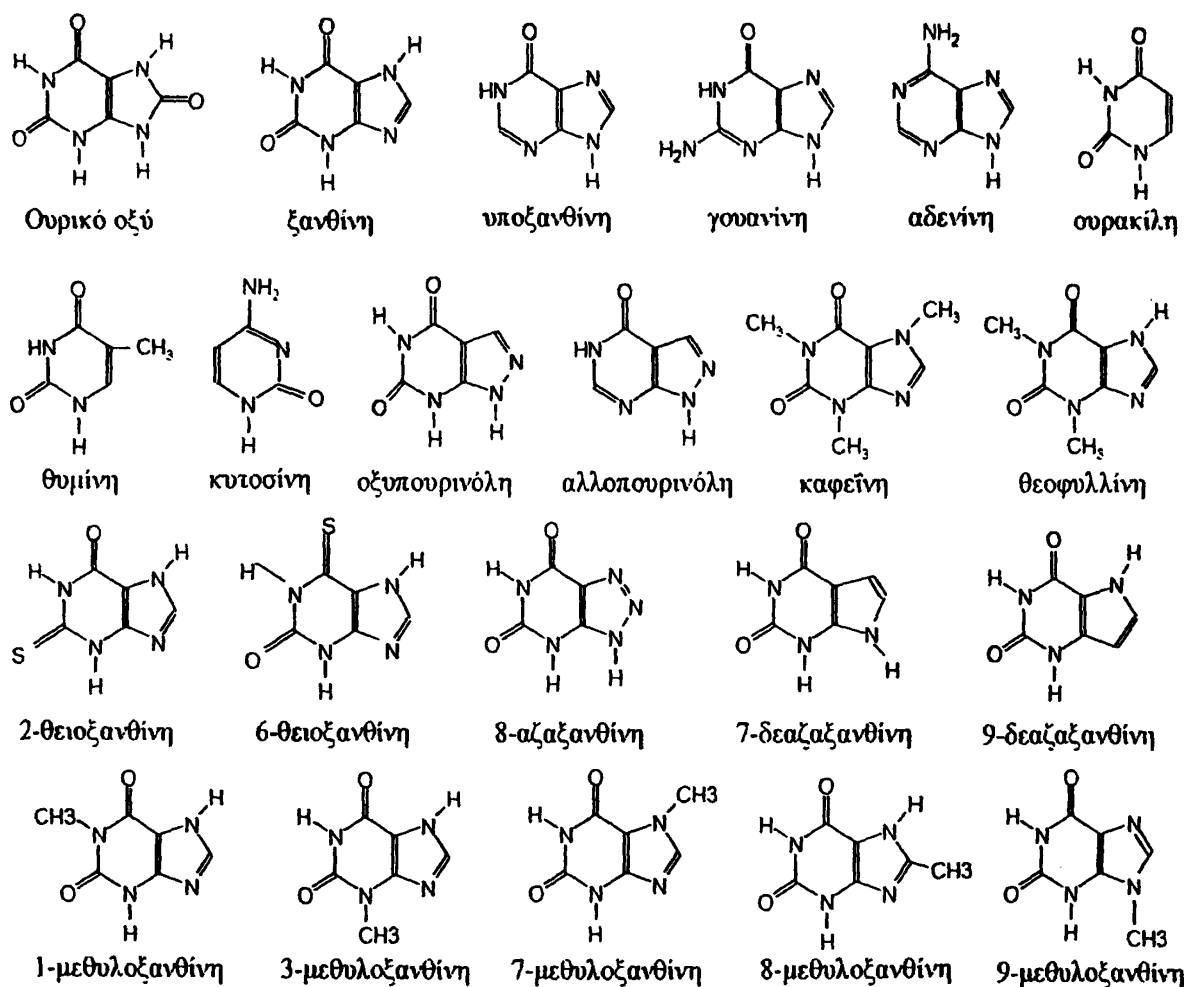
Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, μελετήθηκαν δύο βακτηριακά ομόλογα, από *E. coli* K-12, της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2) (Saier, 2000), που παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τον μεταφορέα ξανθίνης-ουρικού UapA του ασκομύκητα *A. nidulans* (30% ταυτότητα καταλοίπων). Πρόκειται για τις πρωτεΐνες YgfO και YicE που δείξαμε ότι λειτουργούν ως εξειδικευμένοι, υψηλής συγγένειας (K_m 2-5 μ M) συμμεταφορείς ξανθίνης: H^+ (Karatza and Frillingos, 2005). Η υψηλή ομολογία τους με τον μεταφορέα UapA επιτρέπει να αξιοποιήσουμε δεδομένα από την έρευνα του UapA (Diallinas *et al.*, 1998, Meintanis *et al.*, 2000, Amillis *et al.*, 2001, Goudela *et al.*, 2005, Koukaki *et al.*, 2005, Vlanti *et al.*, 2006, Pantazourou and Diallinas, 2006) για τη μελέτη των μεταφορέων ξανθίνης YgfO και YicE αλλά και, γενικότερα, να αντιπαραβάλλουμε τους διαφορετικούς μεταφορείς NAT, με σημαντική αξιοπιστία.

Η διερεύνηση του προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων YgfO και YicE με πειράματα διαμεμβρανικής ενεργού μεταφοράς [^{14}C]ουρικού οξέος, [3H]υποξανθίνης και [3H]ουρακίλης, έδειξε ότι καμιά από τις δύο διαπεράσεις δεν μπορεί να μεταφέρει τα υποστρώματα αυτά (Karatza and Frillingos, 2005). Επιπλέον, πουρίνες και πυριμιδίνες (ουρικό οξύ, υποξανθίνη, ουρακίλη, αδενίνη, θυμίνη ή κυτοσίνη) δεν μπορούν να ανταγωνιστούν την πρόσληψη [3H]ξανθίνης σε πειράματα ανταγωνισμού ακόμη και σε μοριακή περίσσεια 1000X (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela *et al.*, 2005). Σε παρόμοια πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [3H]ξανθίνης από δομικώς συγγενή φάρμακα ή ανάλογα ξανθίνης (Εικόνα 4.1), δείξαμε ότι οι διαπεράσεις YgfO και YicE αναστέλλονται έντονα ως προς τη πρόσληψη ξανθίνης από ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 1, 2, 3, 6 ή 9 (1-μεθυλοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη, 9-μεθυλοξανθίνη). Αντίθετα, ανάλογα ξανθίνης που διαφέρουν στις θέσεις 7 ή 8 αναστέλλουν ελάχιστα (οξυπουρινόλη) ή καθόλου (7- ή 8-μεθυλοξανθίνη, 7-δεαζαξανθίνη, αλλοπουρινόλη) την πρόσληψη ξανθίνης ακόμη και σε μοριακή περίσσεια 1000X (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela *et al.*, 2005).

Η απόλυτη εξειδίκευση αναγνώρισης ως προς τις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πουρίνης υποδεικνύει είτε ότι οι θέσεις αυτές είναι απόλυτα σημαντικές για την δέσμευση του υποστρώματος είτε ότι εμποδίζεται σοβαρά, όταν αντικαθίστανται, ο σχηματισμός άλλων κρίσιμων αλληλεπιδράσεων. Η μη ικανότητα δέσμευσης αναλόγων



τροποποιημένων στη θέση 8, συνάδει με το γεγονός ότι το ουρικό οξύ (8-οξυ-ξανθίνη) δεν αναγνωρίζεται σαν υπόστρωμα ούτε από την YgfO ούτε από την YicE και σαφώς διακρίνει τους βακτηριακούς μεταφορείς από τους μυκητιακούς UarA και Xut1 που έχουν μεγαλύτερη ευελιξία και μπορούν να αναγνωρίζουν ουρικό, 8-μεθυλοξανθίνη ή 8-αζαξανθίνη, 2,8-διθειουρικό, οξυπουρινόλη και άλλα ανάλογα ξανθίνης ή ουρικού τροποποιημένα στη θέση 8 (Diallinas *et al.*, 1998, Meintanis *et al.*, 2000, Amillis *et al.*, 2001, Goudela *et al.*, 2005, Koukaki *et al.*, 2005, Pantazoulou and Diallinas, 2006).



Εικόνα 4.1: Δομές νουκλεοτιδικών βάσεων και αναλόγων τους

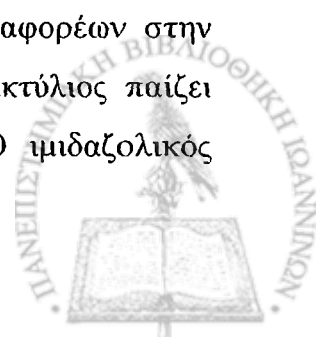
Οι βακτηριακοί μεταφορείς δεσμεύουν διαφορετικά τον πυριμιδινικό δακτύλιο των πουρινών από τους μυκητιακούς μεταφορείς

Η λεπτομερής ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα YgfO οδήγησε στο σχεδιασμό βιοχημικών μοντέλων αλληλεπιδράσεων της βακτηριακής διαπεράσης με το υπόστρωμα της. Αντίστοιχα μοντέλα έχουν σχεδιαστεί πρόσφατα και για τους μεταφορείς UapA του *A. nidulans* και Xut1 της *C. albicans* (Goudela *et al.*, 2005). Το γεγονός αυτό επέτρεψε την άμεση σύγκριση των μοντέλων αλληλεπιδράσεων των τριών οργανισμών. Ο πυριμιδινικός δακτύλιος μπορεί να συμμετέχει σε τέσσερις επαφές μέσω των ατόμων οξυγόνου των θέσεων 2 και 6 (=O2 και =O6) και των ατόμων υδρογόνου των θέσεων 1 και 3 (N1-H και N3-H). Οι συνεισφορές των διαφορετικών θέσεων του πυριμιδινικού δακτυλίου μεταξύ των μυκητιακών και βακτηριακών ομολόγων φαίνεται ότι είναι διαφορετικές (Εικόνα 4.2), παρά το ότι και οι τρεις μεταφορείς YgfO, UapA και Xut1 έχουν παραπλήσιες συγγένειες δέσμευσης για την ξανθίνη (1.5, 8 και 4 μM).

Συγκεκριμένα, στον μεταφορέα YgfO, ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 2 και 3 παρουσιάζουν μειωμένη συγγένεια δέσμευσης (K_s 91 μM και 72 μM) με τον μεταφορέα σε σχέση με αντίστοιχα ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 1 και 6 (K_s 36 μM και 41 μM) (Goudela *et al.*, 2005). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το βακτηριακό ομόλογο αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με τις θέσεις 2 και 3 και λιγότερο ισχυρά με τις θέσεις 1 και 6. Αντίθετα, στους μυκητιακούς μεταφορείς UapA και Xut1, η σύγκριση των σταθερών ανταγωνισμού μεταξύ της ξανθίνης και των αναλόγων της έδειξε ότι η σημαντικότερη συμβολή στη δέσμευση του πυριμιδινικού δακτυλίου στις διαπεράσεις αυτές πρέπει να προέρχεται από δεσμούς υδρογόνου με τις θέσεις 1 και 6 και λιγότερο με τη θέση 2. Η θέση 3 φαίνεται να μην συμμετέχει καθόλου σε επαφές (Goudela *et al.*, 2005). Έτσι, ενώ η συμβολή των διαφορετικών θέσεων στους βακτηριακούς μεταφορείς ακολουθεί τη σειρά N3>N1 και O2>O6, στους μυκητιακούς μεταφορείς η σειρά αντιστρέφεται σε N1>N3 και O6>O2 (Εικόνα 4.2).

Αλληλεπιδράσεις με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο των πουρινών

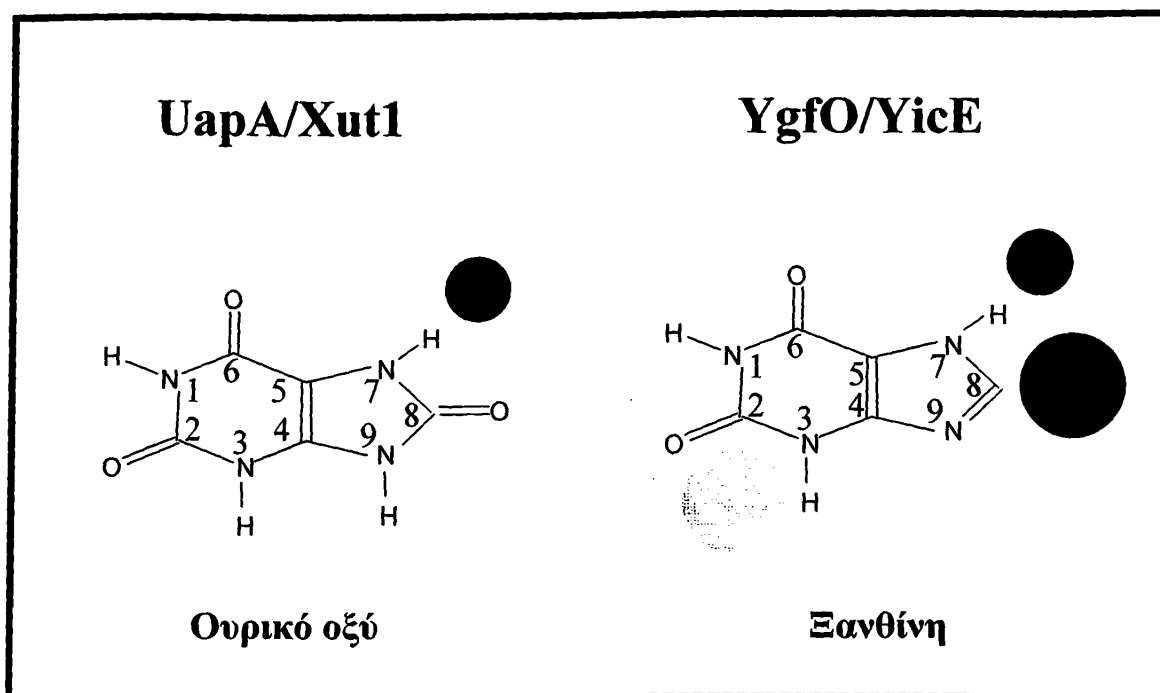
Η επιλεκτική προτίμηση των βακτηριακών και των μυκητιακών μεταφορέων στην μεταφορά πουρινών έναντι πυριμιδινών υποδηλώνει ότι ο ιμιδαζολικός δακτύλιος παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και δέσμευση των υποστρωμάτων. Ο ιμιδαζολικός



δακτύλιος μπορεί να συμμετέχει σε τρεις επαφές μέσω των θέσεων 7, 8 ή 9 ανάλογα με το υπόστρωμα. Η δέσμευση του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ξανθίνης θα μπορούσε να περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με τη θέση 7 ή/και τη θέση 9. Η ανικανότητα των βακτηριακών διαπερασών YgfO και YicE αλλά και των μυκητιακών UarA και Xut1 να αναγνωρίζουν 7-δεαζαξανθίνη ή 9-δεαζαξανθίνη (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela *et al.*, 2005), δύο ανάλογα απαλλαγμένα από οποιαδήποτε μη-πρωτονιωμένο άτομο N (Εικόνα 4.1), υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο απαιτεί ένα σημαντικό δέκτη Η. Για την ξανθίνη δέκτης Η είναι το μη-πρωτονιωμένο N στη θέση 9. Επιπλέον, η αναγνώριση του αναλόγου 9-μεθυλοξανθίνη με υψηλή συγγένεια δέσμευσης (K_s 50-200 μ M) από όλες τις διαπεράσεις ενισχύει τη συνεισφορά της θέσης 9 στην αναγνώριση της ξανθίνης (Goudela *et al.*, 2005). Ωστόσο, το γεγονός ότι όλοι οι μεταφορείς δεσμεύουν την 9-μεθυλοξανθίνη με μικρότερες συγγένειες από ότι με την ξανθίνη υποδεικνύει ότι στη δέσμευση μπορεί να συμβάλλει και το μη-πρωτονιωμένο άτομο N στη θέση 7 του αναλόγου αυτού (Goudela *et al.*, 2005).

Η αναγνώριση του ουρικού οξέος αντανακλά την πιο σημαντική διαφορά στη φυσιολογία μεταξύ των μυκητιακών και βακτηριακών ομολόγων της οικογένειας NAT. Το γεγονός ότι οι διαπεράσεις YgfO και YicE δεν αναγνωρίζουν ουρικό ή ανάλογα ξανθίνης τροποποιημένα στη θέση 8 (8-μεθυλοξανθίνη, 8-αζαξανθίνη) ακόμη και σε μοριακή περίσσεια 1000X, ενώ έχουν παρόμοιες συγγένειες δέσμευσης για την ξανθίνη με τις διαπεράσεις UarA και Xut1, υποδεικνύει ότι οι μυκητιακές διαπεράσεις πιθανόν να δεσμεύουν το ουρικό χρησιμοποιώντας διαφορετικές αλληλεπιδράσεις από αυτές που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση της ξανθίνης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης των συστημάτων μεταφοράς στις μυκητιακές διαπεράσεις UarA και Xut1 υπέδειξαν ότι η UarA χρησιμοποιεί διαφορετικές επαφές για το ουρικό από ότι η Xut1 (Goudela *et al.*, 2005).





Εικόνα 4.2: Υποθετικά μοντέλα αλληλεπιδράσεων των YgfO/YicE και UapA/Xut1 με τα υποστρώματά τους

Φαίνονται οι πιθανές θέσεις αλληλεπιδράσεων του πυριμιδινικού και μιδαζολικού δακτυλίου των υποστρωμάτων ουρικό και ξανθίνη με τους μυκητιακούς μεταφορείς UapA και Xut1 (δεξιά) και τους βακτηριακούς μεταφορείς YgfO και YicE (αριστερά), αντίστοιχα. Με γκρι κύκλο υποδεικνύονται οι θέσεις του πυριμιδινικού δακτυλίου που έχουν πρωτεύοντα αλλά όχι αναντικατάστατο ρόλο στη δέσμευση του υποστρώματος. Με μαύρο κύκλο υποδεικνύονται οι θέσεις του μιδαζολικού δακτυλίου που είναι απόλυτα σημαντικές για τη δέσμευση του υποστρώματος, δηλ. δεν επιδέχονται καμία τροποποίηση (βλ. κείμενο)

4.2 Δημιουργία μεταφορέων NAT ελεύθερων κυστεϊνών στο σύστημα της *E. coli* K-12

Η στρατηγική της μεταλλαξιγένεσης σάρωσης κυστεϊνών έχει εφαρμοστεί στη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας πολλών πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς. Όπως φαίνεται καθαρά στο κλασικό παράδειγμα της διαπεράσης λακτόζης, η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης μπορεί να εφαρμοστεί με πολύ αποδοτικό τρόπο και να οδηγήσει σε χρήσιμα μοντέλα δομής-λειτουργίας (Frillingos *et al.*, 1998, Sahin-Toth *et al.*, 2000, Kaback *et al.*, 2001), που παραμένουν ικανοποιητικά ακόμα και μετά τις πιο πρόσφατες αναλύσεις των κρυσταλλικών δομών του μορίου (Abramson *et al.*, 2003, Mizra *et al.*, 2006). Η βέλτιστη εφαρμογή της μεθόδου αυτής απαιτεί ως υπόστρωμα τη δημιουργία λειτουργικών διαπερασών ελεύθερων κυστεϊνών (Cys-less) (Frillingos *et al.*, 1998). Έχει επίσης αναφερθεί εφαρμογή της μεταλλαξιγένεσης σάρωσης κυστεϊνών με υπόστρωμα διαπεράσεις που έχουν απαλλαχθεί από ορισμένες μόνο και όχι όλες τις εγγενείς (native) κυστεϊνες (διαπεράσεις απεμπλουτισμένες κυστεϊνών, Cys-depleted) ιδιαίτερα για ευκαρυωτικούς μεταφορείς, που περιέχουν πολλά κατάλοιπα κυστεϊνών, όπως ο συμμεταφορέας γλυκόζης:νατρίου SGLT1 (Huntley *et al.*, 2004) και ο μεταφορέας σεροτονίνης SERT (Sato *et al.*, 2004). Τα συστήματα όμως αυτά υστερούν, καθώς η ακριβής ερμηνεία των δεδομένων από πειράματα τροποποίησης κυστεϊνών δυσχεραίνεται από την παρουσία των εγγενών κυστεϊνών.

Δύο βασικά πλεονεκτήματα του συστήματος της *E. coli* K-12 είναι η ευχέρεια χειρισμού των βακτηριακών κυττάρων για την υπερέκφραση και τον καθαρισμό μεμβρανικών πρωτεϊνών και η παρουσία ελάχιστου αριθμού κυστεϊνικών καταλοίπων στο αντίστοιχο πρωτεϊνικό μόριο (5 στην YgfO και 4 στην YicE, έναντι πολύ περισσότερων στα ευκαρυωτικά ομόλογα, π.χ. 18 στην UapA) και, μάλιστα, σε θέσεις όπου δεν εμφανίζεται εξελικτική συντήρηση (Diallinas *et al.*, 1998, De Koning and Diallinas, 2000, Amillis *et al.*, 2001). Στα πλαίσια της δημιουργίας ενός πρότυπου βακτηριακού συστήματος για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας στους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2), τα δύο αυτά στοιχεία επέτρεψαν την κατασκευή δύο πλήρως λειτουργικών μεταφορέων ελεύθερων κυστεϊνών (Cys-less YgfO και Cys-less YicE). Οι μεταφορείς αυτοί αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για μελέτη με τη στρατηγική της μεταλλαξιγένεσης σάρωσης κυστεϊνών. Επίσης, δημιουργήθηκαν εναλλακτικές μορφές των μεταφορέων YgfO και YicE με καρβοξυτελικές αλληλουχίες (BAD, His₁₀, GFP) που επιτρέπουν



παρακολούθηση της έκφρασης με ανοσοαποτύπωση ή *in vivo* με μικροσκοπία φθορισμού και καθαρισμό των πρωτεϊνικών μορίων για μελέτη με βιοχημικές ή βιοφυσικές μεθόδους (βλ. Voss *et al.*, 1997, Frillingos and Kaback, 1996, Wu *et al.*, 1995) ή ακόμη και για κρυσταλλογραφικές δοκιμασίες (βλ. Abramson *et al.*, 2003, Smirnova and Kaback, 2003, Weinglass *et al.*, 2003). Η παρούσα μελέτη μας χρησιμοποιεί, για πρώτη φορά, μόρια διαπερασών ελεύθερα κυστεϊνών από την οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2) και αναμένεται να δώσει σημαντικά στοιχεία για τις σχέσεις δομής – λειτουργίας των μορίων NAT, δεδομένου ότι κανένα μέλος της οικογένειας δεν έχει μελετηθεί συστηματικά στο παρελθόν σε μεγάλη μοριακή ανάλυση και δεν υπάρχουν δομές υψηλής ευκρίνειας ή αναλυτικά μοντέλα δομής-λειτουργίας.

Ως προς τον ρόλο των εγγενών κυστεϊνών, τα δεδομένα που έχουμε, από την πορεία *in vitro* μεταλλαξιγένεσης για τη δημιουργία των διαπερασών ελεύθερων κυστεϊνών, δείχνουν ότι καμιά από τις εγγενείς κυστεϊνες των YgfO και YicE δεν διαδραματίζει άμεσο ρόλο στο μηχανισμό συμμεταφοράς ξανθίνης/ H^+ στην *E. coli*, εφόσον όλα τα μεταλλάγματα είναι ενεργά. Επιπλέον, οι διαπεράσεις φυσικού τύπου αλκυλιώνονται αλλά δεν απενεργοποιούνται από το NEM, δείχνοντας ότι μία ή περισσότερες θέσεις των εγγενών κυστεϊνών μπορούν να αντικατασταθούν όχι μόνο από μικρότερες (Ser) αλλά και από πιο ογκώδεις πλευρικές ομάδες [S-(1-αιθυλο-2,5-διοξυ-πυρρολιδινο-3-υλ)-Cys]. Δύο από τα μεταλλάγματα της YgfO (YgfO-C204S, YgfO-C433S), οδηγούν σε καλύτερη ικανότητα μεταφοράς της ξανθίνης σε σχέση με τη φυσικού τύπου διαπεράση, ενώ τα άλλα τρία (YgfO-C203S, YgfO-C219S, YgfO-C227S) ή η Cys-less YgfO, οδηγούν σε ελαφρώς υψηλότερες ικανότητες μεταφοράς. Η ανάλυση αναγνώρισης υποστρωμάτων της Cys-less YgfO αποκαλύπτει οριακές αλλαγές στο προφίλ εξειδίκευσης που εντοπίζονται κυρίως στην αναγνώριση αναλόγων ξανθίνης που είναι τροποποιημένα στον ιμιδαζολικό δακτύλιο (7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη). Φαίνεται λοιπόν ότι, η αυξημένη ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης συνοδεύεται από μικρότερη αυστηρότητα εξειδίκευσης στις θέσεις 7 και 8 και οι αντικαταστάσεις των 5 Cys σε Ser επιτρέπουν δέσμευση αναλόγων που δεν αναγνωρίζονται από τη φυσικού τύπου διαπεράση (7-μεθυλοξανθίνη και 8-μεθυλοξανθίνη).



4.3 Το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2

Ως αρχικός στόχος *in vitro* μεταλλαξιγένεσης της YgfO επιλέχθηκε μια αλληλουχία 26 καταλοίπων που περιλαμβάνει το μοτίβο «υπογραφή» (³²⁴[Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-T-[R/K/G]³³³) της οικογένειας NAT/NCS2 (Εικόνα 4.3). Το βακτηριακό μοτίβο NAT περιέχει καθοριστικούς παράγοντες για τον μηχανισμό μεταφοράς της ξανθίνης και την εξειδίκευση υποστρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, από τα 10 κατάλοιπα του μοτίβου, τα πρώτα δύο, Gln324 και Asn325, είναι αναντικατάστατα ως προς την ενεργό μεταφορά ξανθίνης, ενώ τα δύο τελευταία, Thr332 και Gly333, είναι σημαντικά για τον καθορισμό της εξειδίκευσης έναντι διαφόρων αναλόγων ξανθίνης. Το πέμπτο συντηρημένο κατάλοιπο του μοτίβου, Gly327, δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό μεταφοράς ή στην εξειδίκευση της YgfO, αλλά αντικατάσταση του με Ala, Pro ή Cys ενισχύει σημαντικά την ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης.

Μια παρόμοια μελέτη μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης πραγματοποιήθηκε πρόσφατα και στο μυκητιακό μοτίβο NAT του μεταφορέα ξανθίνης-ουρικού UapA, το οποίο επίσης περιέχει τα συντηρημένα κατάλοιπα Gln408(324), Asn409(325), Gly411(327), Thr416(332) και Gly417(333) (Koukaki *et al.*, 2005). Η συγκριτική ανάλυση των δύο σειρών δεδομένων δείχνει ότι και στα δύο συστήματα μεταφοράς τα κατάλοιπα Gln324 και Asn325 είναι απολύτως ουσιαστικά για την ενεργότητα των μεταφορέων NAT, ενώ τα Thr332 και Gly333 έχουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της εξειδίκευσης. Ως προς την Gly327, φαίνεται ότι δεν είναι κρίσιμο κατάλοιπο για τον μεταφορέα ξανθίνης YgfO, αλλά αποκτά μεγαλύτερη σημασία στον καθορισμό των κινητικών και της εξειδίκευσης του μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA, πιθανώς επειδή η τοπική ευελιξία που παρέχεται από την Gly327 στην αλληλουχία QNNG απαιτείται για τη βέλτιστη αναγνώριση του ουρικού οξέος ή για κάποια άλλη αλληλεπίδραση της UapA (Koukaki *et al.*, 2005).

Τα αναντικατάστατα κατάλοιπα Q324 και N325 του μοτίβου NAT/NCS2

Όσον αφορά τα αναντικατάστατα κατάλοιπα του μοτίβου, η Gln324 είναι απαραίτητη για την μεταφορά της ξανθίνης με υψηλή συγγένεια και για την αναγνώριση όλων των προσδετών που δεσμεύει ο μεταφορέας YgfO, ενώ η Asn325 είναι πλήρως αναντικατάστατη στο μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης. Στη θέση 324, όλες οι αντικαταστάσεις δημιούργησαν μεταλλάγματα που εκφράζονται ικανοποιητικά στη μεμβράνη των κυττάρων



αλλά παρουσιάζουν χαμηλή (Glu, Asn) ή αμελητέα ενεργότητα (Pro, Ala ή Cys). Τα μόνα μεταλλάγματα με ανιχνεύσιμα επίπεδα ενεργότητας (Q324N και Q324E), παρουσιάζουν ιδιαίτερα μικρή συγγένεια μεταφοράς ξανθίνης (15 φορές υψηλότερη K_m από την φυσικού τύπου διαπεράση) και εξασθενημένη ικανότητα πρόσδεσης για οποιοδήποτε ανάλογο της ξανθίνης. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η πρόσδεση του υποστρώματος με υψηλή συγγένεια απαιτεί όχι μόνο την παρουσία αλλά και την κατάλληλη “γεωμετρική” διεύθυνση της καρβονυλικής ομάδας στη θέση 324 της YgfO. Ανάλογα στοιχεία προέκυψαν και στην UarA με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις Q408N, Q408A, Q408P και Q408S (Koukaki *et al.*, 2005). Σημαντική διαφορά ωστόσο, παρουσιάζει στη UarA, η Q408E (Amilis *et al.*, 2001, Koukaki *et al.*, 2005), η οποία εμφανίζεται να δεσμεύει και άλλα μόρια πουρινών, όπως υποξανθίνη, γουανίνη και 7-δεαζαξανθίνη. Με βάση τις δομές των τριών αυτών νουκλεοτιδικών βάσεων και την προφανή σημασία της θέσης 9 του ιμιδαζολικού δακτυλίου για τις αλληλεπιδράσεις της UarA με τα υποστρώματα της (Goudela *et al.*, 2005), υποστηρίχθηκε ότι το κατάλοιπο στη θέση 408 αλληλεπιδρά με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο μέσω της θέσης 9 και ότι η παρουσία του μη-πρωτονιωμένου καρβονυλίου της Gln επιτρέπει τη δημιουργία ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της UarA και της πρωτονιομένης θέσης N9-H (Koukaki *et al.*, 2005). Αν και δεν προέκυψαν παρόμοια στοιχεία για τη θέση αυτή στον μεταφορέα YgfO, είναι εμφανές ότι το κατάλοιπο Gln στη θέση 324 έχει κρίσιμο ρόλο ως προς τη δέσμευση του υποστρώματος τόσο στο βακτηριακό όσο και στο μυκητιακό σύστημα.

Στη θέση N325, όλα τα μεταλλάγματα της YgfO (Asp, Gln, Ser, Thr, Cys ή Ala) παρουσιάζουν υψηλή έκφραση αλλά μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα ξανθίνης, υποδεικνύοντας ότι η Asn325 είναι αυστηρά αναντικατάστατη στο μηχανισμό μεταφοράς του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν λίγο από τα αντίστοιχα που υπάρχουν για τη UarA (Koukaki *et al.*, 2005), όπου η N409 φαίνεται να είναι αναντικατάστατη για τη μεταφορά ή την ανάπτυξη του μύκητα σε ουρικό, στους 25 °C, αλλά, αντίθετα, μπορεί να αντικατασταθεί (με Gln ή Ser, αλλά ακόμη και με Ala) χωρίς σημαντικές αλλαγές στην ικανότητα πρόσδεσης ή στην εξειδίκευση υποστρωμάτων, όταν η ανάπτυξη γίνεται στους 37 °C. Προτάθηκε ότι η N409 έχει έμμεσο, διαμορφωτικό ρόλο στην κατάλυση της μεταφοράς ουρικού ή ξανθίνης από την UarA, χωρίς να αλληλεπιδρά άμεσα με το μεταφερόμενο υπόστρωμα (Koukaki *et al.*, 2005).

Συνολικά, τα κατάλοιπα Q324 και N325 της YgfO φαίνεται ότι έχουν ένα σημαντικό και αναντικατάστατο ρόλο στο μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς ξανθίνης που είναι δυνατόν να συνδέεται άμεσα με τη δέσμευση του υποστρώματος αλλά μπορεί και να



αναφέρεται σε κάποιο άλλο βήμα του κύκλου της συµµεταφοράς ξανθίνης: H^+ (βλ. Εισαγωγή Εικόνα 1.2). Για παράδειγμα, είναι χαρακτηριστικό ότι, σε πρόσφατη µελέτη από άλλους ερευνητές (οµάδα G. Rudnick, Yale University) για ένα παρόµοιο µοτίβο (QNGG) που αποτελεί µέρος του 1^{ου} περιπλασµικού συνδετικού τµήµατος (Yamashita *et al.*, 2005) του µεταφορέα σεροτονίνης SERT, δείχθηκε ότι η αντικατάσταση των καταλοίπων Gln και Asp του µοτίβου µε Cys µειώνει σηµαντικά την ενεργότητα των µεταλλαγµάτων σε σχέση µε τον φυσικού τύπου µεταφορέα, σαν αποτέλεσµα της αύξησης της K_m : χωρίς αυτό να συνοδεύεται από µείωση της συγγένειας δέσµευσης της σεροτονίνης (Mao *et al.*, in press). Η τροποποίηση των κυστεϊνών στη συνέχεια µε MTS αντιδραστήρια επαναφέρει την ενεργότητα στα επίπεδα της φυσικού τύπου διαπεράσης. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι τα κατάλοιπα Gln και Asp δεν είναι απαραίτητα για την πρόσδεση του υποστρώµατος αλλά συµµετέχουν σε επακόλουθα στάδια στον κύκλο µεταφοράς.

Για να διαπιστωθεί κατά πόσον ο αναντικατάστατος ρόλος των Q324 και N325 στην YgfO συνδέεται µε το στάδιο δέσµευσης της ξανθίνης ή µε άλλα στάδια του µηχανισµού (βλ. Εισαγωγή Εικόνα 1.2), απαιτείται διεξοδικότερη πειραµατική διερεύνηση µε δοκιµασίες αλκυλίωσης των Cys στα µεταλλάγµατα των θέσεων αυτών παρουσία ή απουσία ξανθίνης ή αναλόγων της και πειράµατα ελέγχου της συγγένειας δέσµευσης προσδετών καθώς και επιµέρους αντιδράσεων µεταφοράς όπως εκροής (efflux) ή ανταλλαγής ραδιενεργού-µη ραδιενεργού ξανθίνης (exchange) σε µεµβρανικά κυστίδια (Kaback, 1997, Frillingos and Kaback, 1996, Frillingos *et al.*, 1997a). Πειράµατα αυτού του τύπου είναι υπό εξέλιξη στο εργαστήριό µας (Georgoroulou, Mermekas and Frillingos, υπό προετοιµασία).

Τα κατάλοιπα T332 και G333 είναι σηµαντικά για την εξειδίκευση του µεταφορέα YgfO ως προς την αναγνώριση προσδετών

Όσον αφορά τα κατάλοιπα που καθορίζουν την εξειδίκευση, η εισαγωγή µιας Arg αντί του εγγενούς καταλοίπου Gly στη θέση 333 της YgfO, µειώνει την ταχύτητα µεταφοράς ξανθίνης και τροποποιεί τη συγγένεια στη θέση 8 του ιµιδαζολικού δακτυλίου, καθώς προσδίδει τη δυνατότητα αναγνώρισης 8-µεθυλοξανθίνης. Αντίστοιχα, στη διαπεράση UarA, η ύπαρξη της Gly στη θέση της εγγενούς Arg417, προσδίδει µεγαλύτερη ταχύτητα µεταφοράς αλλά µειωµένη ικανότητα δέσµευσης για το ουρικό (Koukaki *et al.*, 2005). Φαίνεται λοιπόν ότι η ύπαρξη Gly στη θέση 333, ενώ προσδίδει πρόσθετη ευελιξία στο πρωτεϊνικό µόριο που πιθανόν συνδέεται µε την αυξηµένη V_{max} , οδηγεί σε απώλεια µιας σηµαντικής



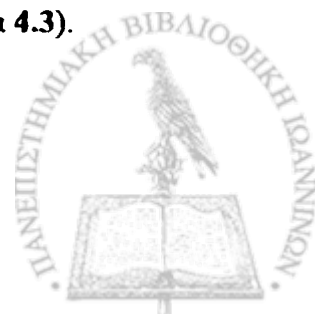
αλληλεπίδρασης για το ουρικό οξύ στη διαπεράση UapA. Επιπλέον, η G333R εμφανίζει και μια νέα ιδιότητα, την ικανότητα δέσμευσης 7-μεθυλοξανθίνης, ενός αναλόγου που δεν αναγνωρίζεται από καμιά φυσικού τύπου βακτηριακή ή μυκητιακή διαπεράση NAT (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela *et al.*, 2005).

Η αντικατάσταση της Thr στη θέση 332 με Asp έχει εκτενέστερη επίδραση στην εξειδίκευση της YgfO, δηλ. οδηγεί σε σημαντικά μειωμένη συγγένεια για την 1-μεθυλοξανθίνη, αυξημένη συγγένεια για την 3-μεθυλοξανθίνη, καθώς και σε δυνατότητα αναγνώρισης της 8-μεθυλοξανθίνης. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το κατάλοιπο Thr332 αντιστρέφει τα στοιχεία αλληλεπιδράσεων που διαφοροποιούν τα βακτηριακά YgfO και YicE (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela *et al.*, 2005) από τα μυκητιακά ομόλογα UapA και Xut1, ως προς την εξειδίκευση αναγνώρισης θέσεων στον πυριμιδινικό δακτύλιο (Goudela *et al.*, 2005), δηλ. αντιστρέφει τη σειρά των δεσμευτικών συνεισφορών των θέσεων του δακτυλίου πουρίνης, από N3>N1 και =O2>=O6 σε N1>N3 και =O6>=O2 (βλ. **Εικόνα 4.2**).

Συνολικά, φαίνεται ότι οι αντικαταστάσεις της Thr332 ή της Gly333 επηρεάζουν την εξειδίκευση, αλλά η επίδραση των καταλοίπων αυτών στην πρόσδεση υποστρωμάτων είναι πιθανόν έμμεση. Κάτι αντίστοιχο φαίνεται να ισχύει και για τα κατάλοιπα Thr416 και Arg417 στην UapA (Koukaki *et al.*, 2005).

Η αλληλουχία I329-V339 της διαπεράσης YgfO εμφανίζει δομή α-έλικας

Βάσει *in silico* αναλύσεων (Koukaki *et al.*, 2005), το πρώτο τετραπεπίδιο του NAT μοτίβου (QNNG) προβλέπεται ότι διαμορφώνει μια συνδετική περιοχή, ενδεχομένως μια στροφή, μεταξύ υδροφοβικών α-ελίκων ή β-πτυχωτών επιφανειών. Η μεταλλαξιγένεση σάρωσης κυστεϊνών που παρουσιάζεται στην εργασία αυτή παρέχει πειραματικά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα κατάλοιπα 329-339 αμέσως μετά από την συνδετική αυτή περιοχή στην διαπεράση YgfO, διατάσσονται σε τρεις στροφές α-έλικας, με τα ευαίσθητα σε αλκυλίωση κατάλοιπα Ile329, Thr332, Gly333, Ser336 και Val339 να απαρτίζουν μια πλευρά της έλικας 9 (**Εικόνα 4.3**). Με βάση αυτά τα στοιχεία, προτείνουμε ότι η διαμεμβρανική α-έλικα 9, η οποία προβλέπεται από όλους τους διαθέσιμους αλγορίθμους (TMHMM, HMM-TM, PRED-TMR2, PRED-CLASS, TOPPRED, TMPRED, SOSUI, DAS) ότι ξεκινά από το κατάλοιπο Arg337 και τελειώνει στο κατάλοιπο Ile363, θα πρέπει να εκτείνεται κατά δύο τουλάχιστον επιπρόσθετες στροφές α-έλικας, δηλ. ξεκινά από την Val328/Ile329 (**Εικόνα 4.3**).



Από τα αποτελέσματα του ελέγχου αλκυλίωσης των κυστεϊνών με αλκυλιωτικούς παράγοντες, διαπιστώθηκε ότι η αλληλουχία 315-340 περιέχει καθοριστικούς παράγοντες για τη λειτουργική ακεραιότητα του μονοπατιού μεταφοράς της πουρίνης. Συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα Ala323, Asn326, Gly327, Val328, Ile329, Thr332, Gly333, Ser336 και Val339 μπορούν να αντικατασταθούν με Cys χωρίς απώλεια την ενεργότητας, αλλά η περαιτέρω τροποποίηση των Cys στις θέσεις αυτές από *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) οδηγεί σε απενεργοποίηση του μορίου ($IC_{50s} < 50 \mu M$). Το εύρημα ότι όλα τα μεταλλάγματα μοναδικής κυστεϊνης, τόσο αυτά που αναστέλλονται από το NEM όσο και αυτά που δεν αναστέλλονται, είναι προσβάσιμα στο αντιδραστήριο αυτό κάτω από τις ίδιες συνθήκες *in vivo*, δείχνει ότι η επιλεκτική ευαισθησία της μίας πλευράς α-έλικας σε απενεργοποίηση οφείλεται σε εμπλοκή του μηλεϊμιδικού προσδέματος, στις θέσεις αυτές, με παρεμπόδιση του μηχανισμού της μεταφοράς ξανθίνης. Η πιο απλή ερμηνεία είναι ότι αυτά τα κατάλοιπα έχουν συμμετοχή στις αλλαγές διαμόρφωσης του μορίου που συμβαίνουν κατά τη μεταφορά υποστρώματος και η ομοιοπολική σύνδεση του μηλεϊμιδίου στις θέσεις αυτές εμποδίζει στερεοχημικά τις αλληλεπιδράσεις που είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση του κύκλου λειτουργίας.

Κατάλοιπα που είναι ευαίσθητα στην αναστολή από αλκυλιωτικά αντιδραστήρια, έχει δείχθει, σε άλλους μεταφορείς, ότι συνήθως βρίσκονται σε πλευρές διαμεμβρανικών ελίκων που εμπλέκονται με τις αλλαγές διαμόρφωσης και συνδιαμορφώνουν το μονοπάτι μεταφοράς του υποστρώματος, όπως στην περίπτωση της διαπεράσης λακτόζης LacY (Frillingos *et al.*, 1998) και του αντιμεταφορέα τετρακυκλίνης: H^+ TetA (Tamura *et al.*, 2001). Κατ' αναλογία, στην περίπτωση της διαπεράσης YgfO, προτείνουμε ότι μέρος του μονοπατιού μεταφοράς ξανθίνης διαμορφώνεται από την ευαίσθητη σε αλκυλίωση πλευρά της διαμεμβρανικής έλικας 9 (Εικόνα 4.3).

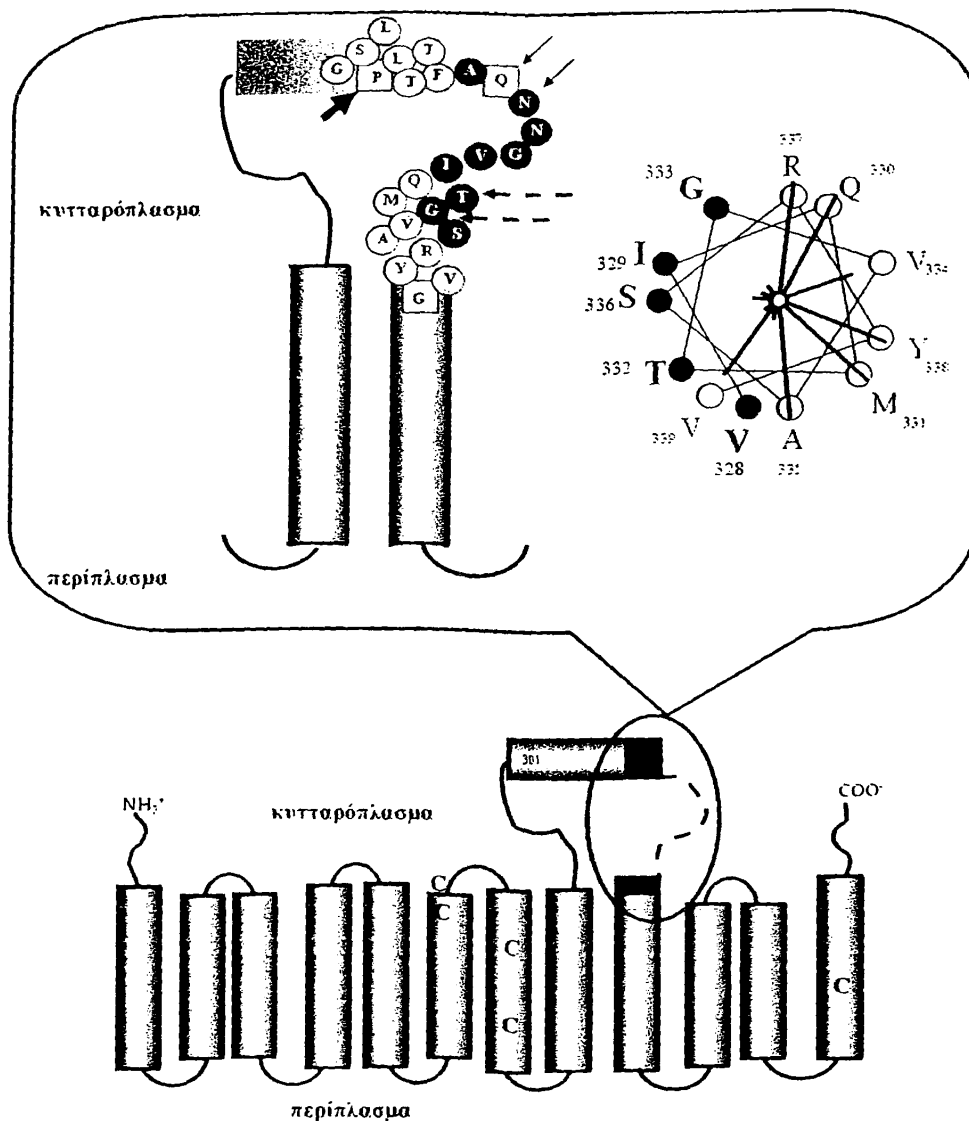
Τα κατάλοιπα P318 και G340 είναι απαραίτητα για την έκφραση της YgfO στη μεμβράνη

Οι περιοχές αλληλουχίας που πλαισιώνουν το μοτίβο NAT φαίνεται ότι περιέχουν καθοριστικούς παράγοντες, κρίσιμους για τη δομική ακεραιότητα του μεταφορέα YgfO. Συγκεκριμένα, η Pro318, έξι κατάλοιπα πριν από την αρχή του μοτίβου, και η Gly340, επτά κατάλοιπα μετά το τέλος του μοτίβου, είναι ουσιαστικές για τη σωστή διαμόρφωση και έκφραση της διαπεράσης YgfO στη μεμβράνη. Η Pro318, η οποία εντοπίζεται στη στροφή ενός προβλεπόμενου τμήματος α-έλικας, που προηγείται του μοτίβου NAT και εισάγει τοπική



ακαμψία στο πρωτεϊνικό μόριο (Εικόνα 4.3), είναι πιθανόν να ελέγχει τη λειτουργική ενσωμάτωση (insertion) ή/και την δομική σταθερότητα του μορίου στη μεμβράνη, επηρεάζοντας καταλυτικά την αρχιτεκτονική της κρίσιμης περιοχής του μοτίβου NAT. Ακόμη και η παρουσία μιας Gly στη θέση αυτή (P318G), που επιτρέπει ευελιξία, αδυνατεί να αναπληρώσει τον ρόλο της Pro και οδηγεί σε αποτυχία έκφρασης ενός δομικά ευσταθούς μορίου. Αντιθέτως, στη θέση 340 της προβλεπόμενης διαμεμβρανικής α-έλικας 9, φαίνεται ότι απαιτείται η ευελιξία, αφού ακόμη και η αντικατάσταση της Gly340 με Ala οδηγεί σε πολύ χαμηλή έκφραση πρωτεΐνης. Η ευελιξία στη διαμόρφωση που προσδίδει το κατάλοιπο Gly σε διαμεμβρανικές α-έλικες (Weinglass and Kaback, 1999, Abramson *et al.*, 2003) ή σε επανεισαγόμενες συνδετικές περιοχές (reentrant loops) (Yernool *et al.*, 2004), σε άλλους διαμεμβρανικούς μεταφορείς ενεργού μεταφοράς, έχει συνδεθεί με την αποδοτική δέσμευση υποστρώματος και αποτελεσματική κατάλυση της μεταφοράς.





Εικόνα 4.3: Θέση του μοτίβου NAT στο τοπολογικό μοντέλο της διαπεράσης YgfO

Στο τοπολογικό μοντέλο (κάτω σχήμα) παρουσιάζονται οι θέσεις της αλληλουχίας 315-340 και των 5 εγγενών κυστεϊνών στα πλαίσια της γενικής τοπολογικής οργάνωσης του μεταφορέα YgfO. Στο επάνω μέρος της εικόνας που βρίσκεται σε πλαίσιο, παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή του YgfO που μελετήθηκε και περιλαμβάνει την αμινοξική αλληλουχία του μοτίβου NAT/NCS2 και των περιοχών που το πλαισιώνουν (αριστερό σχήμα) καθώς και ένα γράφημα προσομοίωσης α-έλικας των καταλοίπων 328-339 (δεξί σχήμα). Οι μαύρες γραμμές που ξεκινούν από το κέντρο του γραφήματος προσομοίωσης της α-έλικας αναλογούν σε μέγεθος με το IC_{50} κάθε διαπεράσης. Με μαύρο κύκλο και στα δύο σχήματα υποδεικνύονται οι θέσεις που παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία ($IC_{50s} < 80 \mu M$) στην επίδραση του NEM, σε γκρι κύκλο αυτές που παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία ($IC_{50s} \geq 400 \mu M$), ενώ σε λευκό κύκλο οι θέσεις που δεν παρουσιάζουν ευαισθησία ($IC_{50s} > 2 mM$) στο NEM. Τα λευκά τετράγωνα δείχνουν τις θέσεις όπου οι διαπεράσεις μοναδικής κυστεϊνης παρουσιάζουν αμελητέα ενεργότητα. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις που είναι αναντικατάστατες για την έκφραση (Pro318) ή για την ενεργότητα (Gln324, Asp325), ενώ τα διακεκομμένα βέλη τις θέσεις που επηρεάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα (Thr332, Gly333). Το τοπολογικό μοντέλο έχει προέλθει από το υπολογιστικό πρόγραμμα TMHMM (<http://www.sbc.su.se/PRODIV-TMHMM>)



4.4 Νέα δεδομένα και προοπτικές για τη μελέτη των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2)

Συνοπτικά, στην παρούσα διατριβή, η εφαρμογή της μεταλλαξιγένεσης σάρωσης κυστεϊνών για τη μελέτη του βακτηριακού μεταφορέα ξανθίνης YgfO της οικογένειας NAT/NCS2 επέτρεψε την ανάπτυξη ενός πρώτου πειραματικού μοντέλου δομής-λειτουργίας που υποδεικνύει κατάλοιπα σημαντικά για την εξειδίκευση και τη λειτουργία της YgfO, θέσεις του πυριμιδινικού και ιμιδαζολικού δακτυλίου της ξανθίνης που είναι σημαντικές για την εξειδίκευση αναγνώρισης προσδετών καθώς και μοριακά στοιχεία που είναι σημαντικά για τη λειτουργική σύγκριση μεταξύ του βακτηριακού μεταφορέα YgfO και του μυκητιακού ομολόγου UapA. Το μοντέλο αυτό αποτελεί τη βάση για την εκκίνηση μελετών που θα δώσουν απαντήσεις σε ερωτήματα που αφορούν πλευρές των σχέσεων δομής – λειτουργίας, όπως (α) την τοπολογική οργάνωση των μεταφορέων NAT, (β) την αναγνώριση καταλοίπων που συμμετέχουν στο κέντρο δέσμευσης της ξανθίνης και των δομικών της αναλόγων, (γ) την αναγνώριση καταλοίπων που συνεισφέρουν έμμεσα στο μηχανισμό μεταφοράς, χωρίς να επηρεάζουν τη δέσμευση του υποστρώματος, (δ) την διερεύνηση των μοριακών στοιχείων που οδήγησαν στην εξελικτική μετατροπή των μεταφορέων της οικογένειας NAT από μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων στους μύκητες, βακτήρια και φυτά, σε μεταφορείς ασκορβικού οξέος στα θηλαστικά, κ.ο.κ..

Πέρα όμως από τη σημασία τους στην κατανόηση ενός βασικού κυτταρικού μηχανισμού, οι μελέτες αυτές μπορούν να αποτελέσουν βάση για τη μελλοντική χρήση των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων ως μορίων-κλειδιών στη συστηματική αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η γνώση που προέρχεται από τη μελέτη του μεταφορέα YgfO στο πρότυπο σύστημα της *E. coli* K-12 (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela *et al.*, 2005) καθώς επίσης και η σύγκριση του με τα αποτελέσματα από τη μελέτη του μεταφορέα UapA στο σύστημα του *A. nidulans* (Diallinas and Scazzocchio 1989, Amilis *et al.*, 2001, Goudela *et al.*, 2005, Koukaki *et al.*, 2005, Vlanti *et al.*, 2006, Pantazopoulou and Diallinas, 2006) και των μεταφορέων ασκορβικού των θηλαστικών SVCT1 και SVCT2 (Tsukaguchi *et al.*, 1999, Liang *et al.*, 2001, Corpe *et al.*, 2005), θα μας επιτρέψει να εντοπίσουμε τα μοριακά στοιχεία που οδηγούν στην αλλαγή της εξειδίκευσης υποστρωμάτων, να προβλέψουμε την εξειδίκευση ομολόγων μεταφορέων διαφόρων παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων και να προχωρήσουμε στον σχεδιασμό νέων NAT



υποστρωμάτων με αντιμυκητιακές ή αντιβακτηριακές ιδιότητες. Προς την κατεύθυνση αυτή, είναι υπό εξέλιξη μια σειρά πειραμάτων που θα στηρίζεται σε μεταλλαξιγένεση σημειακής στόχευσης σε θέσεις που αποκάλυψε ως σημαντικές η μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης της YgfO, καθώς και η δημιουργία χμαιρικών κατασκευών μεταξύ YgfO και UarA με στόχο τον εντοπισμό καταλοίπων που ευθύνονται για την αλλαγή εξειδίκευσης μεταξύ των βακτηριακών και μυκητιακών συστημάτων μεταφοράς (Georgoroulou, Parakostas, Mermelekas and Frillingos, υπό προετοιμασία).

Ένα άλλο παράδειγμα περαιτέρω πειραματικής ανάλυσης που είναι υπό εξέλιξη στο εργαστήριό μας (Mermelekas, Georgoroulou, Libanopoulou and Frillingos, υπό προετοιμασία), αφορά ένα από τα κεντρικά ερευνητικά προβλήματα σχετικά με τους μεταφορείς NAT που είναι το πρόβλημα της τοπολογικής τους οργάνωσης, δηλ. κατά πόσον οι πολυτοπικές αυτές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν 11, 12, 13, ή 14 διαμεμβρανικά τμήματα (Diallinas *et al.*, 1995, 1998; De Koning and Diallinas, 2000) και πως οριοθετούνται τα τμήματα αυτά. Η εκκρεμότητα αυτή επηρεάζει ιδιαίτερα το κατά πόσον, για παράδειγμα, η αλληλουχία 315-340, που αποτέλεσε ένα από τα αντικείμενα της παρούσας εργασίας, βρίσκεται σε διαμεμβρανικό τμήμα ή σε υδρόφιλη κυτταροπλασματική ή περιπλασματική περιοχή. Συνεπώς, μια σαφέστερη εικόνα θα συνεισέφερε ουσιαστικά στην πληρέστερη κατανόηση του ρόλου των συγκεκριμένων καταλοίπων ως προς το κέντρο δέσμευσης και τον μηχανισμό μεταφοράς των μεταφορέων NAT. Η πλέον ενδεδειγμένη πειραματική προσέγγιση, που έχει δώσει και στο παρελθόν λύσεις σε παρόμοια ερευνητικά προβλήματα για πολυτοπικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως ο μεταφορέας προλίνης PutP της *E. coli* (Jung *et al.*, 1998) ο αντιμεταφορέας $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1 των θηλαστικών (Iwamoto *et al.*, 2000), ο μεταφορέας οξαλικού OxIT του *Oxalobacter formigenes* (Ye *et al.*, 2001), ο αντιμεταφορέας $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE1 του ανθρώπου (Zhu *et al.*, 2003), μεταφορέας φυλλικού hRFC του ανθρώπου (Cao and Matherly, 2004), βασίζεται στη στρατηγική της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης και συγκεκριμένα στη δημιουργία μεταλλαγμάτων μοναδικής κυστεϊνης σε συγκεκριμένες θέσεις και έλεγχο τους με βιοχημικές (επίδραση με πολικά SH-αντιδραστήρια (Akabas *et al.*, 1992, Kwaw *et al.*, 2001, Frillingos *et al.*, 1997a, Frillingos and Kaback, 1997, Venkatesan *et al.*, 2000, Yagur-Kroll and Amster-Choder, 2005)) ή βιοφυσικές τεχνικές (Ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό, EPR) (Voss *et al.*, 1996, 1997, 1998, Reeve *et al.*, 2002, Oda *et al.*, 2003).

Συνολικά, η εφαρμογή των ανωτέρω τεχνικών αναμένεται να δώσει σαφή εικόνα για την τοπολογία και την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης και να αποκαλύψει όλες τις πιθανές θέσεις αμινοξέων που είναι ευαίσθητες στην αλλαγή διαμόρφωσης της YgfO κατά τον κύκλο



μεταφοράς του υποστρώματος ή εμπλέκονται με ουσιαστικό τρόπο στον μηχανισμό δέσμευσης και/ή μεταφοράς υποστρώματος.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ – ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ
(NAT TRANSPORTERS)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ
ΚΑΡΑΤΖΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΣ

Το γονιδίωμα της *E. coli* K-12 περιλαμβάνει τα γονίδια *ygfO* και *yicE* που αποτελούν μέλη της εξελικτικά συντηρημένης οικογένειας μεταφορών νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2). Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν μεγάλη συντήρηση αλληλουχίας μεταξύ τους (45% ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων) και είναι συγγενικά με τον μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης *UapA* του *A. nidulans*, το εκτενέστερα έως τώρα μελετημένο μέλος της οικογένειας NAT/NCS2. Τα γονίδια *ygfO* και *yicE* κλωνοποιήθηκαν και αφού υπερεκφράστηκαν εξωχρωμοσωμικά στην *E. coli* K-12, ελέγχθηκαν λειτουργικά ως προς την ενεργότητα πρόσληψης ξανθίνης και άλλων πιθανόν υποστρωμάτων, υπό συνθήκες όπου τα επίπεδα πρόσληψης ξανθίνης μέσω των ενδογενών γονιδίων ήταν πολύ χαμηλά έως μηδενικά. Για να επιτευχθεί η δυνατότητα παρακολούθησης των επιπέδων έκφρασης των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών, με ανοσοαποτύπωση ή *in vivo* με μικροσκοπία φθορισμού και απομόνωσης τους με χρωματογραφία συγγένειας, δημιουργήθηκαν εναλλακτικές κατασκευές με εισαγωγή κατάλληλων αλληλουχιών [περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD), καρβοξυτελικός επίτοπος LacY, His₁₀, GFP] στο C-τελικό άκρο των *YgfO* και *YicE*.

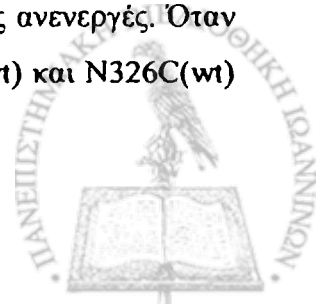
Οι πρωτεΐνες *YgfO* και *YicE* δείχθηκε ότι εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων της *E. coli* και λειτουργούν ως εξειδικευμένοι, υψηλής συγγένειας (K_m 4.2 μ M για την *YgfO* ή 2.9 μ M για την *YicE*) συμμεταφορείς ξανθίνης:H⁺. Καμία από τις δύο διαπεράσεις δεν μεταφέρει υποξανθίνη, ουρακίλη ή ουρικό οξύ σε συγκεντρώσεις > 0.1 mM. Από πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης [³H]ξανθίνης, χρησιμοποιώντας σε μη ραδιενεργή μορφή 64 φυσικές πουρίνες ή πυριμιδίνες και ανάλογα αυτών, δείχθηκε ότι οι διαπεράσεις *YgfO* και *YicE* αναστέλλονται έντονα ως προς την πρόσληψη ξανθίνης από ανάλογα τροποποιημένα στις θέσεις 1, 2, 3, 6 ή 9 (1-μεθυλοξανθίνη, 2-θειοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη, 6-θειοξανθίνη,



9-μεθυλοξανθίνη). Αντίθετα, οι YgfO και YicE δεν αναγνωρίζουν ουρικό ή ανάλογα ξανθίνης τροποποιημένα στις θέσεις 7 και 8 (7-μεθυλοξανθίνη, 7-δεαζαξανθίνη, 8-μεθυλοξανθίνη, 8-αζαξανθίνη, αλλοπουρινόλη). Η αδυναμία μεταφοράς ουρικού διακρίνει σαφώς τις βακτηριακές YgfO και YicE από τις ομόλογες μυκητιακές UarA και Xut1.

Προκειμένου να δημιουργήσουμε ένα αποδοτικό σύστημα μελέτης των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT/NCS2) στην *E. coli* K-12 που να επιτρέπει εφαρμογή των τεχνολογιών της μεταλλαξιγένεσης κυστεϊνικής σάρωσης, αντικαταστήσαμε μία προς μία τις εγγενείς Cys των διαπερασών YgfO και YicE με Ser στο υπόστρωμα των YgfO ή YicE που φέρουν στο C-τελικό τους άκρο τις αλληλουχίες BAD, His₁₀ ή τον επίτοπο της LacY. Όλα τα μεταλλάγματα της YgfO (C203S, C204S, C219S, C227S, C433S) ή της YicE (C40S, C58S, C141S, C333S) εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων σε παρόμοια επίπεδα με τις αντίστοιχες φυσικού τύπου διαπεράσεις και είναι πλήρως λειτουργικά ως προς την ικανότητα μεταφοράς [³H] ξανθίνης. Συνδυάζοντας όλες τις αντικαταστάσεις των εγγενών Cys προς Ser στο ίδιο πρωτεϊνικό μόριο, δημιουργήθηκαν λειτουργικά μόρια μεταφορέων ελεύθερα κυστεϊνών (Cys-less YgfO και Cys-less YicE). Η Cys-less YgfO, μετά από πειράματα κινητικής ανάλυσης και ανταγωνισμού πρόσληψης [³H] ξανθίνης χρησιμοποιώντας σε μη ραδιενεργή μορφή 18 φυσικές πουρίνες ή πυριμιδίνες και ανάλογα αυτών, δείχθηκε ότι παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερη ικανότητα μεταφοράς ξανθίνης και μικρότερη αυστηρότητα της εξειδίκευσης στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου.

Χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα της ελεύθερης κυστεϊνών YgfO, επιχειρήθηκε συστηματική ανάλυση της αλληλουχίας ³¹⁵GSIPITTFQNNGVIQMTGVASRYVG³⁴⁰ η οποία περιλαμβάνει το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2 (κατάλοιπα 324-333), με μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης. Το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2 (NAT signature motif) είναι μία εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία 10 καταλοίπων των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT), που έχει εμπλακεί στον καθορισμό της εξειδίκευσης υποστρωμάτων και της λειτουργίας της δόδου μεταφοράς πουρινών βάσει πειραμάτων στον μεταφορέα UarA του ασκομύκητα *A. nidulans*. Η λειτουργική ανάλυση των 26 διαπερασών μοναδικής κυστεϊνης, έδειξε ότι, δέκα έξι (16) έχουν υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, συγκρίσιμη με την φυσικού τύπου. Από τις υπόλοιπες δέκα (10), οι διαπεράσεις T320C, T321C, I329C και T332C παρουσιάζουν χαμηλή ενεργότητα (10-25% αυτής της Cys-less), οι F322C, N325C και N326C είναι οριακώς ενεργές (5-8% του C-less), ενώ οι P318C, Q324C και G340C είναι πλήρως ανενεργές. Όταν μεταφέρθηκαν στο φυσικού τύπου υπόστρωμα, τα μεταλλάγματα F322C(wt) και N326C(wt)



εμφάνισαν υψηλή ενεργότητα, το G340A(ωι) είχε χαμηλή ενεργότητα, ενώ τα P318G(ωι), Q324C(ωι), N325C(ωι) και G340C(ωι) παρέμειναν ανενεργά. Η χαμηλή έως αμελητέα ενεργότητα των μεταλλαγμάτων στις θέσεις Pro318 ή Gly340 συσχετίζεται με χαμηλά έως αμελητέα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, ενώ στις άλλες θέσεις δεν επηρεάζεται σημαντικά η έκφραση.

Πειράματα αναστολής με *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) έδειξαν ότι υπάρχουν τρεις διαδοχικές περιοχές αλληλουχίας με διαφορετικό προφίλ ευαισθησίας στο NEM: η ενεργότητα στις θέσεις 315-322 δεν επηρεάζεται από το NEM (IC50s ≥ 0.4 mM), ενώ η ενεργότητα στις θέσεις 323-329 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη (IC50s 15-80 μ M), και οι θέσεις 330-340 ακολουθούν μία περιοδικότητα εναλλασσόμενης ευαισθησίας στο NEM που υποδεικνύει διαμόρφωση α -έλικας. Από πειράματα αλκυλίωσης, οι θέσεις της περιοχής 330-340 φαίνεται ότι είναι προσβάσιμες και αντιδρούν με το NEM. Επομένως, η επιλεκτική ευαισθησία της μίας πλευράς α -έλικας σε απενεργοποίηση, όπως παρατηρήσαμε, φαίνεται να οφείλεται σε εμπλοκή του μηλεϊμιδικού προσδέματος, στις θέσεις αυτές, με παρεμπόδιση του μηχανισμού της μεταφοράς ξανθίνης.

Στη συνέχεια, για να κατανοήσουμε τον ρόλο των συντηρημένων καταλοίπων του μοτίβου «υπογραφή» στον μηχανισμό μεταφοράς και εξειδίκευσης υποστρωμάτων της YgfO, εφαρμόσαμε εκτενή σημειακή μεταλλαξιγένεση, αντικαθιστώντας την Gln324 με Asn, Glu, Pro, Ala ή Cys, την Asn325 με Asp, Gln, Ser, Thr, Cys ή Ala, την Gly327 με Ala, Pro ή Cys, την Thr332 με Asn, Ala, Asp ή Cys και την Gly333 με Cys, Arg ή Lys. Τα μεταλλάγματα αυτά αναλύθηκαν ως προς την ενεργότητα μεταφοράς [3 H]ξανθίνης και τον ανταγωνισμό της πρόσληψης ξανθίνης από μία σειρά πουρινών και συνθετικών αναλόγων τους. Οι αναλύσεις μας δείχνουν ότι η Gln324 είναι απαραίτητη για την υψηλή συγγένεια δέσμευσης και μεταφοράς ξανθίνης, η Asn325 είναι αναντικατάσταση στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς, η Gly327 δεν είναι κρίσιμη για την ενεργό μεταφορά ή τον καθορισμό της εξειδίκευσης, ενώ οι Thr332 και Gly333 αποτελούν σημαντικούς καθοριστές της εξειδίκευσης αναγνώρισης προσδετών από την YgfO.



SUMMARY

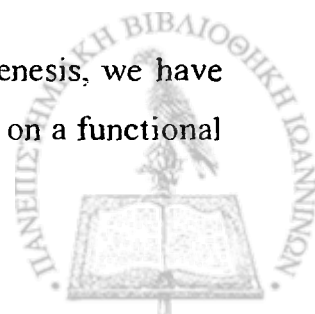
DEVELOPMENT OF A MODEL BACTERIAL SYSTEM FOR STUDYING STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN THE NUCLEOBASE – ASCORBATE TRANSPORTER FAMILY (NAT/NCS2)

DOCTORATE THESIS BY
KARATZA PANAYIOTA

The coding potential of the genome of *E. coli* K-12 includes *ygfO* and *yicE*, two members of the evolutionarily conserved NAT/NCS2 transporter family that are highly homologous to each other (45% residue identity) and closely related to UapA of *Aspergillus nidulans*, a most extensively studied microbial member of this family. *YgfO* and *yicE* were cloned from the genome, over-expressed extrachromosomally and assayed for uptake of [³H]xanthine and other nucleobases, in *E. coli* K-12, under conditions of negligible activity of the corresponding endogenous systems. Alternative, essentially equivalent functional versions of YgfO and YicE were engineered by C-terminal tagging with ten consecutive His codons (His₁₀ version) or with an epitope from the *E. coli* lactose permease and a biotin-acceptor domain from *Klebsiella pneumoniae* (BAD version) or with green fluorescent protein (GFP version) to allow immunodetection and affinity purification.

Both YgfO and YicE were shown to be present in the plasma membrane of *E. coli* and function as specific, high-affinity transporters for xanthine (K_m 4.2 μ M for YgfO, or 2.9 μ M for YicE), in a proton motive force-dependent manner. They display no detectable transport of uracil, hypoxanthine, or uric acid at external concentrations of up to 0.1 mM. Using transport inhibition experiments with 64 different purines and purine-related analogues, YgfO and YicE-mediated [³H]-xanthine transport was efficiently inhibited by 1-, 3- and 9-methylxanthine, 2-thioxanthine and 6-thioxanthine. Both YgfO and YicE are inefficient in recognizing uric acid or xanthine analogues modified at positions 7 and 8 of the purine ring (7-methylxanthine, 7-deazaxanthine, 8-methylxanthine, 8-azaxanthine, allopurinol), which distinguishes them from their fungal homologues UapA and Xut1.

To engineer genetic backgrounds appropriate for Cys-scanning mutagenesis, we have replaced each native Cys of YgfO and YicE with a Ser. Mutations were made on a functional



YgfO or YicE tagged at C terminus with an epitope from *E. coli* lactose permease and either a biotin-acceptor domain or a His₁₀. All single-replacement mutants (YgfO C203S, C204S, C219S, C227S, C433S and YicE C40S, C58S, C141S, C333S) were found to express in the membrane at wild-type levels and catalyze high [³H]xanthine uptake. Combinatorial replacements yielded functional Cys-less versions for both YgfO and YicE. Relative to wild-type, Cys-less YgfO displays an increased V_{max} for xanthine uptake and increased plasticity for bulky substituents at the imidazol part of purines. There are no other significant changes, as determined by transport kinetics and inhibition analysis with 18 different purines and purine-related analogues.

The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif is a conserved sequence motif of the ubiquitous NAT/NCS2 family, implicated in defining the function and selectivity of purine translocation pathway in the major fungal homolog UapA. To analyze the role of NAT motif more systematically, we employed Cys-scanning mutagenesis of the *E. coli* homolog YgfO. Using the functional mutant devoid of Cys residues (C-less), each amino acid residue in sequence ³¹⁵GSIPITTF**AQNNGVIQMTG**VASRYVG³⁴⁰ including the NAT motif (motif in underlined boldface) was replaced individually with Cys. Of the 26 single-Cys mutants, 16 accumulate xanthine to $\geq 50\%$ of the steady state observed with C-less YgfO, T320C, T321C, I319C and T332C accumulate to low levels (10-25% of C-less), F322C, N325C and N326C accumulate marginally (5-8% of C-less), P318C, Q324C and G340C are inactive. When transferred to wild-type, F322C(wt) and N326C(wt) are highly active, but P318G(wt), Q324C(wt), N325C(wt) and G340C(wt) are inactive and G340A(wt) displays low activity. Immunoblot analysis shows that replacements at Pro318 or Gly340 are associated with low or negligible expression in the membrane. All other mutants are expressed to high or moderate levels.

Inhibition analysis with *N*-ethylmaleimide (NEM) shows that the single-Cys mutants fall to three regions: positions 315-322 are insensitive to *N*-ethylmaleimide, with IC₅₀s ≥ 0.4 mM, positions 323-329 are highly sensitive, with IC₅₀s of 15-80 μ M, and sensitivity of positions 330-340 follows a periodicity, with mutants sensitive to inactivation clustering on one face of an α -helix. Sulfhydryl alkylation analysis of the single-Cys mutants using an engineered carboxyl-terminal His₁₀ tag and Ni²⁺-IDA affinity chromatography reveals that most of the single-Cys mutants of region 330-340 are accessible to NEM and selective inactivation at the inhibition-sensitive positions should be attributed to severe blocking effects of the maleimidyl adduct that are associated with the conformational changes of turnover.



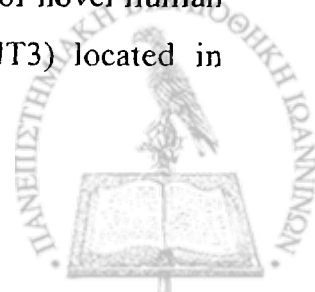
In order to understand the contribution of the key conserved residues of the NAT motif to the mechanism and ligand recognition profile of YgfO, positions Gln324, Asn325, Gly327, Thr332 and Gly333 were subjected to extensive site-directed mutagenesis and mutants were analyzed for active transport, kinetics and inhibition of [^3H]xanthine uptake by a series of purines and synthetic analogues. Our mutant library included individual replacements of Gln324 with Asn, Glu, Pro, Ala or Cys, of Asn325 with Asp, Gln, Ser, Thr, Cys or Ala, of Gly327 with Ala, Pro or Cys, of Thr332 with Asn, Ala, Asp or Cys, and of Gly333 with Cys, Arg or Lys. Analysis of these mutants indicates that Gln324 is critical for high affinity uptake and ligand recognition, Asn325 is fully irreplaceable with respect to active xanthine transport, Gly327 is not essential for either active xanthine transport or specificity, while Thr332 and Gly333 are important determinants of the ligand specificity profile.



ΑΝΑΦΟΡΕΣ



1. 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
2. Abramson, J., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2004) Structural comparison of lactose permease and the glycerol-3-phosphate antiporter: members of the major facilitator superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 413-419
3. Adler, J., and Bibi, E. (2004) Determinants of substrate recognition by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA identified on both sides of the membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 8957-8965
4. Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M. & Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-310
5. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2000) *Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc, New York and London
6. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6858-6862
7. Añillis, 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
8. Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. (2004) Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol. Microbiol.* **52**, 205-216
9. 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
10. Argyrou, E., Sophianopoulou, V., Schultes, N., and Diallinas, G. (2001) Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **13**, 953-964
11. Baldwin, S. A., Yao, S. Y., Hyde, R. J., Ng, A. M., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M. W., Cass, C. E., and Young, J. D. (2005) Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* **280**, 15880-15887



12. Barabote. R. D., and Saier, M. H., Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 608-634
13. Behrens, P. F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K. S., and Landwehrmeyer, G. B. (2002) Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* **125**, 1908-1922
14. Berg. J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2005) *Biochemistry*, 5th edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco
15. 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
16. Bolhuis, H., Poelarends, G., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A. J., and Konings, W. N. (1995) The *Lactococcal* *ImrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 26092-26098
17. Buchel, D. E., Gronenborn, B., and Muller-Hill, B. (1980) Sequence of the lactose permease gene. *Nature* **283**, 541-545
18. Burchmore, R. J., Wallace, L. J., Candlish, D., Al-Salabi, M. I., Beal, P. R., Barrett, M. P., Baldwin, S. A., and de Koning, H. P. (2003) Cloning, heterologous expression, and in situ characterization of the first high affinity nucleobase transporter from a protozoan. *J. Biol. Chem.* **278**, 23502-23507
19. Burkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C., and Frommer, W. B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 13-26
20. Busch, W. and Saier, M. H., Jr. (2002) The transporter classification (TC) system, 2002 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 287-337
21. Calamia, J., and Manoil, C. (1990) Lac permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 4937-4941
22. Cao, W., and Matherly, L. H. (2003) Characterization of a cysteine-less human reduced folate carrier: localization of a substrate-binding domain by cysteine-scanning mutagenesis and cysteine accessibility methods. *Biochem. J.* **374**, 27-36



23. Cao, W., and Matherly, L. H. (2004) Analysis of the membrane topology for transmembrane domains 7-12 of the human reduced folate carrier by scanning cysteine accessibility methods. *Biochem. J.* **378**, 201-206
24. 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
25. Carter, N. S., Ben Mamoun, C., Liu, W., Silva, E. O., Landfear, S. M., Goldberg, D. E., and Ullman, B. (2000a) Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **275**, 10683-10691
26. Carter, N. S., Drew, M. E., Sanchez, M., Vasudevan, G., Landfear, S. M., and Ullman, B. (2000b) Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. *J. Biol. Chem.* **275**, 20935-20941
27. Casadaban, M. J., and Cohen, S. N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207
28. Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004) The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* **279**, 3132-31341
29. Chang, A. B., Lin, R., Keith Studley, W., Tran, C.V., and Saier, M. H., Jr. (2004) Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **21**, 171-181
30. Chiang, C. W., Carterm N., Sullivan, W. J. Jr., Donald, R. G., Roos, D. S., Naguib, F. N., el Kouni, M. H., Ullman, B., and Wilson, C. M. (1999) The adenosine transporter of *Toxoplasma gondii*. Identification by insertional mutagenesis, cloning, and recombinant expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 35255-35261
31. Christiansen, L. C., Schou, S., Nygaard, P., and Saxild, H. H. (1997) Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *xpt-pbuX* operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J. Bacteriol.* **179**, 2540-2550



32. Consler, T. G., Persson, B. L., Jung, H., Zen, K. H., Jung, K., Prive, G. G., Verner, G. E. and Kaback, H. R. (1993) Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 6934-6938
33. Corpe, C. P., Lee, J. H., Kwon, O., Eck, P., Narayanan, J., Kirk, K. L., and Levine, M. (2005) 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid: an ascorbate analog specific for Na⁺-dependent vitamin C transporter but not glucose transporter pathways. *J. Biol. Chem.* **280**, 5211-5220
34. Cruz-Ramos, H., Glaser, P., Wray, L. V. Jr., and Fisher, S. H. (1997) The *Bacillus subtilis* ureABC operon. *J. Bacteriol.* **179**, 3371-3373
35. Danielsen, S., Kilstruo, M., Barilla, K., Jochimsen, B., and Neuhard, J. (1992) Characterization of the *Escherichia coli* *codBA* operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol. Microbiol.* **6**, 1335-1344.
36. Danielsen, S., Boyd, D., and Neuhard, J. (1995) Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* cytosine permease. *Microbiology* **141**, 2905-2913
37. Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640-6645
38. de Koning, H. and Diallinas, G. (2000). Nucleobase transporters. *Mol. Membr. Biol.* **17**, 75-94
39. de Koning, H. P., and Jarvis, S. M. (1997a) Hypoxanthine uptake through a purine-selective nucleobase transporter in *Trypanosoma brucei brucei* procyclic cells is driven by protonmotive force. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1102-1110
40. de Koning, H. P., and Jarvis, S. M. (1997b) Purine nucleobase transport in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is mediated by two novel transporters. *Mol. Biochem. Parasitol.* **89**, 245-258
41. 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
42. de Montigny, J., Straub, M. L., Wagner, R., Bach, M. L., and Chevallier, M. R. (1998) The uracil permease of *Schizosaccharomyces pombe*: a representative of a family of 10 transmembrane helix transporter proteins of yeasts. *Yeast* **14**, 1051-1059



43. Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., Tegeder, M., Frommer, W. B., and Schumacher, K. (2002) A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 847-856
44. Diallinas, G., and Scazzocchio, C. (1989) A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization and sequence of a *cis*-acting mutation. *Genetics* **122**, 341-350
45. Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H. N., Jr., Cecchetto, G., and Scazzocchio, C. (1995) Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **270**, 8610-8622
46. Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A. & 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
47. Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77
48. Elion, G. B. (1993) Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J. Med. Virol.* **1**, 2-6
49. Engel, A., Fujiyoshi, Y., and Agre, P. (2000) The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.* **19**, 800-806
50. Enomoto, A., Kimura, H., Chairoungdua, A., Shigeta, Y., Jutabha, P., Cha, S. H., Hosoyamada, M., Takeda, M., Sekine, T., Igarashi, T., Matsuo, H., Kikuchi, Y., Oda, T., Ichida, K., Hosoya, T., Shimokata, K., Niwa, T., Kanai, Y., and Endou, H. (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417**, 447-452
51. Faaland, C. A., Race, J. E., Ricken, G., Warner, F. J., Williams, W. J., and Holtzman, E. J. (1998) Molecular characterisation of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel family that is homologous to bacterial and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1442**, 353-360



52. Felle, H., Porter, J. S., Slayman, C. L., and Kaback, H. R. (1980) Quantitative measurements of membrane potential in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **19**, 3585-3590
53. Ferrarese, C., Sala, G., Riva, R., Begni, B., Zoia, C., Tremolizzo, L., Galimberti, G., Millul, A., Bastone, A., Mennini, T., Balzarini, C., Frattola, L., and Beghi, E. (2001) Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **56**, 270-272
54. Flintoff, W. F., Williams, F. M., Sadlish, H. (2003) The region between transmembrane domains 1 and 2 of the reduced folate carrier forms part of the substrate-binding pocket *J. Biol. Chem.* **278**, 40867-40876
55. Fox, I. H., and Kelley, W. N. (1978) The role of adenosine and 2'- deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Bioch.* **47**, 655-686
56. Franco, P. J., and Brooker, R. J. (1994) Functional roles of Glu-269 and Glu-325 within the lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 7379-7386
57. Frei, B., England, L., and Ames, B. N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6377-6381
58. Frillingos, S., Sahin-Toth, 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
59. Frillingos, S. and Kaback, H. R. (1996). Probing the conformation of the lactose permease of *Escherichia coli* by *in situ* site-directed sulfhydryl modification. *Biochemistry* **35**, 3950-3956
60. Frillingos, S. and Kaback, H. R. (1997). The role of helix VIII in the lactose permease of *Escherichia coli*: II. Site-directed sulfhydryl modification. *Protein Sci.* **6**, 438-443
61. Frillingos, S., Wu, J., Venkatesan, P., and Kaback, H. R. (1997a) Binding of ligand or monoclonal antibody 4B1 induces discrete structural changes in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 6408-6414
62. Frillingos, S., Gonzalez, A., and Kaback, H. R. (1997b) 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
63. 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



64. 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
65. Fujiwara, S., and Noguchi, T. (1995) Degradation of purines: only ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals. *Biochem. J.* **312**, 315-318
66. Gillissen, B., Burkle, L., Andre, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B. and Frommer, W. B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291- 300
67. Gnann, J. W., Jr., Barton, N. H., and Whitley, R. J. (1983) Acyclovir: mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. *Pharmacotherapy* **3**, 275-283
68. Gorfinkiel, L., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. (1993) Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23376-23381
69. Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S. & Diallinas, G. (2005) Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT family. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 263-275
70. Goudela, S., Tsilivi, H., and 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**, 291-303
71. Gould, G. W., and Holman, G. D. (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J.* **295**, 329-341
72. Griffiths, M., Beaumont, N., Yao, S. Y., Sundaram, M., Boumah, C. E., Davies, A., Kwong, F. Y., Coe, I., Cass, C. E., Young, J. D., and Baldwin, S. A. (1997a) Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat. Med.* **3**, 89-93
73. Griffiths, M., Yao, S. Y., Abidi, F., Phillips, S. E., Cass, C. E., Young, J. D., and Baldwin, S. A. (1997b) Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (*ei*) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem. J.* **328**, 739-743



74. Guan, L., Murphy, F. D., and Kaback, H. R. (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**, 3475-3480
75. Guan, L., Hu, Y., and Kaback, H. R. (2003) Aromatic stacking in the sugar binding site of the lactose permease. *Biochemistry* **42**, 1377-1382
76. Guan, L., and Kaback, H. R. (2006) Lessons from lactose permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 67-91
77. Guan, L., Smirnova, I. N., Verner, G., Nagamori, S., and Kaback, H. R. (2006) Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 1723-1726
78. Hammond, D. J., and Gutteridge, W. E. (1984) Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Mol. Bioch. Parasitol.* **13**, 243-261
79. Hediger, M. A. (2002a) New view at C. *Nat. Med.* **8**, 445-446
80. Hediger, M. A. (2002b) Kidney function: gateway to a long life? *Nature* **417**, 393-395
81. 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
82. Huntley, S. A., Krofchick, D., and Silverman, M. (2004). Position 170 of Rabbit Na⁺/glucose cotransporter (rSGLT1) lies in the Na⁺ pathway; modulation of polarity/charge at this position regulates charge transfer and carrier turnover. *Biophys. J.* **87**, 295-310
83. Huntley, S. A., Krofchick, D., and Silverman, M. A. (2006) Glutamine to glutamate mutation at position 170 (Q170E) in the rabbit Na⁺/glucose cotransporter, rSGLT1, enhances binding affinity for Na⁺. *Biochemistry* **45**, 4653-4663
84. Hyde, R. J., Cass, C. E., Young, J. D., and Baldwin, S. A. (2001) The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol. Membr. Biol.* **18**, 53-63
85. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28



86. Iwamoto, T., Uehara, A., Imanaga, I., and Shigekawa, M. (2000) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent Ca²⁺ affinity. *J. Biol. Chem.* **275**, 38571-38580
87. Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 42-48
88. Johansen, L. E., Nygaard, P., Lassen, C., Agerso, Y., and Saxild, H. H. (2003) Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). *J. Bacteriol.* **185**, 5200-5209
89. Jund, R., Weber, E., and Chevallier, M. R. (1988) Primary structure of the uracil transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Bioch.* **171**, 417-424
90. Jung, H., Rubenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M., and Schmid, R. (1998) Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**, 26400-26407
91. 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
92. Kaback, H. R. (1997). A molecular mechanism for energy coupling in a membrane transport protein, the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5539-5543
93. Kaback, H. R., Sahin-Tóth, M. & Weinglass, A. B. (2001). The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 610-620
94. Karatza, P. & Frillingos, S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 251-261.
95. Kato, R., Maeda, T., Akaike, T., and Tamai, I. (2006) Characterization of novel Na⁺-dependent nucleobase transport systems at the blood-testis barrier. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**, 968-975
96. Kilic, F., Murphy, D. L., and Rudnick, G. (2003) A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity. *Mol. Pharmacol.* **64**, 440-446



97. Kiss, A., Farah, K., Kim, J., Garriock, R. J., Drysdale, T. A., and Hammond, J. R. (2000) Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem. J.* **352**, 363-372
98. Konings, W. N., Barnes, E. M., Jr., and Kaback, H. R. (1971) Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. 2. The coupling of reduced phenazine methosulphate to the concentrative uptake of beta-galactosides and amino acids. *J. Biol. Chem.* **246**, 5857-5861
99. Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S. & 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
100. Kwaw, I., Zen, K. C., Hu, Y. & 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
101. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
102. Landfear, S. M., Ullman, B., Carter, N. S., and Sanchez, M. A. (2004) Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot. Cell* **3**, 245-254
103. Lemieux, M. J., Huang, Y., and Wang, D. N. (2004) The structural basis of substrate translocation by the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. *Res. Microbiol.* **155**, 623-629
104. Liang, W. J., Johnson, D. & Jarvis, S. M. (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol. Membr. Biol.* **18**, 87-95
105. Lievens, J. C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Boscovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le, Goff, L., and Bates, G. P. (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis.* **8**, 807-821
106. Liu, W., Boitz, J. M., Galazka, J., Arendt, C. S., Carter, N. S., and Ullman, B. (2006) Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, in press
107. Lolkema, J. S., and Poolman, B. (1995) Uncoupling in secondary transport proteins. A mechanistic explanation for mutants of lac permease with an uncoupled phenotype. *J. Biol. Chem.* **270**, 12670-12676



108. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C., and Breaker, R. R. (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**, 577-586
109. Mandal, M., and Breaker, R. R. (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 451-463
110. Mao, Y., Mathewson, L., Sato, Y., and Rudnick, G. (2006) Involvement of serotonin transporter extracellular loop 1 in serotonin binding and transport. *In press*
111. Martin, J. C., Dvorak, C.A., Smee, D. F., Matthews, T. R., and Verheyden, J. P. (1983) 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent. *J. Med. Chem.* **26**, 759-761
112. Martinussen, J., Schallert, J., Andersen, B., and Hammer, K. (2001) The pyrimidine operon pyrRPB-carA from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **183**, 2785-2794
113. Maser, P., Sutterlin, C., Kralli, A., and Kaminsky, R. (1999) A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science* **285**, 242-244
114. Matthews, T., and Boehme, R. (1988) Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect Dis.* **3**, 490-494
115. Maurino, V. G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K., and Flugge, U. I. (2006) Identification and Expression Analysis of Twelve Members of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1381-1393
116. Meintanis, C., Karagouni, A. D. & 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
117. Mirza, O., Guan, L., Verner, G., Iwata, S. & Kaback, H. R. (2006). Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. *EMBO J.* **25**, 1177-1183
118. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587-593
119. Murakami, S., and Yamaguchi, A. (2003) Multidrug-exporting secondary transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 443-452



120. Murphy, D. L., Andrews, A.M., Wichems, C. H., Li, Q., Tohda, M., and Greenberg, B. (1998) Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *J. Clin. Psychiatry* **15**, 4-12
121. Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., and Kaback, H. R. (1981) Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**, 11804-11808
122. Nikaido, H. (2000) How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells *Trends Microbiol.* **8**, 481-483
123. Nygaard, P., Bsted, S. M., Andersen, K. A., and Saxild, H. H. (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
124. Nyyssonen, K., Porkkala-Sarataho, E., Kaikkonen, J., and Salonen, J. T. (1997) Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men. *Atherosclerosis* **130**, 223-233
125. Oda, M. N., Forte, T. M., Ryan, R. O., and Voss, J. C. (2003) The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 455-460
126. Paluszynski, J. P., Klassen, R., Rohe, M., and Meinhardt, F. (2006) Various cytosine/adenine permease homologues are involved in the toxicity of 5-fluorocytosine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 707-715
127. 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
128. Papageorgiou, I. G., Yakob, L., Al Salabi, M. I., Diallinas, G., Soteriadou, K. P., and De Koning, H. P. (2005) Identification of the first pyrimidine nucleobase transporter in *Leishmania*: similarities with the *Trypanosoma brucei* U1 transporter and antileishmanial activity of uracil analogues. *Parasitology* **130**, 275-283
129. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., and Brandolin, G. (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**, 39-44



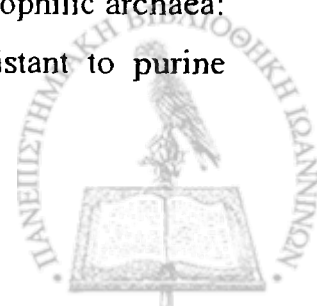
130. Pelissier, H. C., Frerich, A., Desimone, M., Schumacher, K., and Tegeder, M. (2004) PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of *French bean*. *Plant Physiol.* **134**, 664-675
131. Pinson, B., Napias, C., Chevallier, J., Van den Broek, P. J., and Brethes, D. (1997) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cytosine transporter using energizable plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **272**, 28918-28924
132. Pokorska, A., Drevet, C., and Scazzocchio, C. (2000) The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localization sequence. *J. Mol. Biol.* **298**, 585-596
133. Reeve, I., Hummel, D., Nelson, N., and Voss, J. (2002) Overexpression, purification, and site-directed spin labeling of the Nramp metal transporter from *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8608-8613
134. Reitzer, L., and Schneider, B. L. (2001) Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 422-444
135. Ren, Q., Kang, K. H., and Paulsen, I. T. (2004) TransportDB: A relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.* **32**, D284-D288
136. Ródnan, G.P., Robin, J.A., Tolchin, S.F., and Elion, G.B. (1975) Allopurinol and gouty hyperuricemia. Efficacy of a single daily dose. *JAMA* **231**, 1143-1147
137. Ross, C. W. (1981) Biosynthesis of nucleotides, *In The Biochemistry of Plants* (New York: Academic Press) pp. 169-205
138. Rybczynska, M., Liu, R., Lu, P., Sharom, F.J., Steinfels, E., Pietro, A. D., Spitaler, M., Grunicke, H., and Hofmann, J. (2001) MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. *Br. J. Cancer* **84**, 1405-1411
139. Sahin-Toth, M., Lawrence, M. C., and Kaback, H. R. (1994) Properties of permease dimer, a fusion protein containing two lactose permease molecules from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5421-5425
140. 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



141. Sahin-Tóth, M., le Coutre, J., Kharabi, D., le Maire, G., Lee, J. C. & Kaback, H. R. (1999). Characterization of Glu126 and Arg144, two residues that are indispensable for substrate binding in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 813-819
142. Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lawrence, M. C. & Kaback, H. R. (2000). The sucrose permease of *Escherichia coli*: Functional significance of cysteine residues and properties of a cysteine-less transporter. *Biochemistry* **39**, 6164-6169.
143. Sahin-Toth, M., and Kaback, H. R. (2001) Arg-302 facilitates deprotonation of Glu-325 in the transport mechanism of the lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 6068-6073
144. Saier, M. H., Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 354-411
145. Saier, M. H., Hvorup, R. N., and Barabote, R. D. (2005) Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 220-4
146. Sanchez, M. A., Tryon, R., Pierce, S., Vasudevan, G., and Landfear, S. M. (2004) Functional expression and characterization of a purine nucleobase transporter gene from *Leishmania major*. *Mol. Membr. Biol.* **21**, 11-18
147. Sanchez, M. A., Ullman, B., Landfear, S. M., and Carter, N. S. (1999) Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **274**, 30244-30249
148. Sato, Y., Zhang, Y. W., Androutsellis-Theotokis, A., and Rudnick, G. (2004) Analysis of transmembrane domain 2 of rat serotonin transporter by cysteine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 22926-22933
149. Scazzocchio, C. (1994) The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation. *Prog. Ind. Microbiol.* **29**, 221-257
150. Schmidt, A., Su, Y. H., Kunze, R., Warner, S., Hewitt, M., Slocum, R. D., Ludewig, U., Frommer, W. B., and Desimone, M. (2004) UPS1 and UPS2 from *Arabidopsis* mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *J. Biol. Chem.* **279**, 44817-44824
151. Schneider, B. L., Kiupakis, A. K., and Reitzer, L.J. (1998) Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 4278-4286



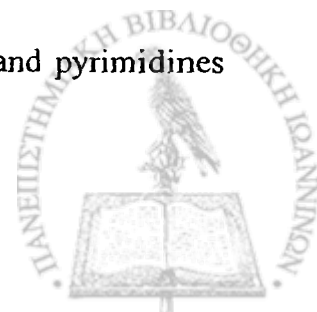
152. Schroers, A., Kramer, R., and Wohlrab, H. (1997) The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine. *J. Biol. Chem.* **272**, 10558-10564
153. Schubert, K. R., and Boland, M. J. (1990) The ureides. In *The Biochemistry of Plants*, (San Diego: Academic Press) pp. 197-282
154. Schultz, A. C., Nygaard, P., and Saxild, H. H. (2001) Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J. Bacteriol.* **183**, 3293-3302
155. Sevanian, A., Davies, K. J., and Hochstein, P. (1991) Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1129-1134
156. Slotboom, D. J., Konings, W. N., and Lolkema, J. S. (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 293-307
157. Slotboom, D. J., Konings, W. N., and Lolkema, J. S. (2001) Cysteine-scanning mutagenesis reveals a highly amphipathic, pore-lining membrane-spanning helix in the glutamate transporter GltT. *J. Biol. Chem.* **276**, 10775-10781
158. 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
159. Smyth, D. G., Blumenfeld, O. O., and Komingsberg, W. (1964) Reactions of *N*-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem. J.* **91**, 589-595
160. Sorgen, P. L., Hu, Y., Guan, L., Kaback, H. R., and Girvin, M. E. (2002) An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 14037-14040
161. Spector, T., and Johns, D. G. (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**, 583-589
162. Stein, A., Vaseduvan, G., Carter, N. S., Ullman, B., Landfear, S. M., and Kavanaugh, M. P. (2003) Equilibrative nucleoside transporter family members from *Leishmania donovani* are electrogenic proton symporters. *J. Biol. Chem.* **278**, 35127-35134
163. Stuer-Lauridsen, B., and Nygaard, P. (1998) Purine salvage in two halophilic archaea: characterization of salvage pathways and isolation of mutants resistant to purine analogs. *J. Bacteriol.* **180**, 457-463



164. Sundaram, M., Yao, S. Y., Ingram, J. C., Berry, Z. A., Abidi, F., Cass, C. E., Baldwin, S. A., and Young, J. D. (2001) Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J. Biol. Chem.* **276**, 45270-45275
165. Sweet, G., Gandor, C., Voegelé, R., Wittekindt, N., Beuerle, J., Truniger, V., Lin, E. C., and Boos, W. (1990) Glycerol facilitator of *Escherichia coli*: cloning of *glpF* and identification of the *glpF* product. *J. Bacteriol.* **172**, 424-430
166. Tamura, N., Konishi, S., Iwaki, S., Kimura-Someya, N., Nada, S., and Yamaguchi, A. (2001) Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *J. Biol. Chem.* **276**, 20330-20339
167. Tavoularis, S., Scazzocchio, C., and Sophianopoulou, V. (2001) Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Genet Biol.* **33**, 115-125
168. Tchieu, J. H., Norris, V., Edwards, J. S., and Saier, M. H., Jr. (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 329-346
169. 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
170. Thanassi, D. G., Cheng, L. W., and Nikaido, H. (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2512-2518
171. 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
172. Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J., and Wright, E.M. (1991) Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* **350**, 354-356
173. Turner, R. J., Lu, Y., and Switzer, R. L. (1994) Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* **176**, 3708-3722



174. Vanoni, C., Massari, S., Losa, M., Carrega, P., Perego, C., Conforti, L., and Pietrini, G. (2004) Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J. Cell Sci.* **117**, 5417-5426
175. Vasudevan, G., Carter, N. S., Drew, M. E., Beverley, S. M., Sanchez, M. A., Seyfang, A., Ullman, B., and Landfear S. M. (1998). Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9873-9878
176. Vazquez-Ibar, J. L., Guan, L., Svrakic, M., and Kaback, H. R. (2003) Exploiting luminescence spectroscopy to elucidate the interaction between sugar and a tryptophan residue in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12706-12711
177. Vazquez-Ibar, J. L., Guan, L., Weinglass, A. B., Verner, G., Gordillo, R., and Kaback, H. R. (2004) Sugar recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 49214-49221
178. Venkatesan, P., and Kaback, H. R. (1998) The substrate-binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 9802-9807
179. Venkatesan, P., Liu, Z., Hu, Y., and Kaback, H. R. (2000) Site-directed sulfhydryl labeling of the lactose permease of *Escherichia coli*: N-ethylmaleimide-sensitive face of helix II. *Biochemistry* **39**, 10649-10655
180. Vickers, M. F., Yao, S. Y., Baldwin, S. A., Young, J. D., and Cass, C. E. (2000) Nucleoside transporter proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: demonstration of a transporter (FUI1) with high uridine selectivity in plasma membranes and a transporter (FUN26) with broad nucleoside selectivity in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* **275**, 25931-25938
181. Viitanen, P., Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., and Kaback, H. R. (1986) Purification, reconstitution, and characterization of the lac permease of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **125**, 429-452
182. 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**, 808-819
183. Vogels, G. D., and Van der Drift, C. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **40**, 403-468



184. Voss, J., He, M. M., Hubbell, W. L., and Kaback, H. R. (1996) Site-directed spin labeling demonstrates that transmembrane domain XII in the lactose permease of *Escherichia coli* is an alpha-helix. *Biochemistry* **35**, 12915-12918
185. Voss, J., Hubbell, W. L., Hernandez-Borrell, J., and Kaback, H. R. (1997) Site-directed spin-labeling of transmembrane domain VII and the 4B1 antibody epitope in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 15055-15061
186. Voss, J., Hubbell, W. L., and Kaback, H. R. (1998) Helix packing in the lactose permease determined by metal-nitroxide interaction. *Biochemistry* **37**, 211-216
187. Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M. R., and Jund, R. (1990) The purine-cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. *Mol. Microbiol.* **4**, 585-596
188. Weinglass, A. B. & Kaback, H. R. (1999). Conformational flexibility at the substrate binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11178-11182
189. Weinglass, A. B., Whitelegge, J. P., Hu, Y., Verner, G. E, Faull, K. F., and Kaback, H. R. (2003) Elucidation of substrate binding interactions in a membrane transport protein by mass spectrometry. *EMBO J.* **22**, 1467-1477
190. White, S. H., and Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319-365
191. Wolin, C. D., and Kaback, H. R. (1999) Estimating loop-helix interfaces in a polytopic membrane protein by deletion analysis. *Biochemistry* **38**, 8590-8597
192. Wolin, C. D., and Kaback, H. R. (2001) Functional estimation of loop-helix boundaries in the lactose permease of *Escherichia coli* by single amino acid deletion analysis. *Biochemistry* **40**, 1996-2003
193. Wright, E. M., Turk, E., and Martin, M. G. (2002) Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem. Biophys.* **36**, 115-121
194. 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
195. 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



196. Yagur-Kroll, S., and Amster-Choder, O. (2005). Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* beta-glucoside transporter BglF. *J. Biol. Chem.* **280**, 19306-19318
197. 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
198. Yao, S. Y., Ng, A. M., Muzyka, W. R., Griffiths, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., and Young, J. D. (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
199. Yao, S. Y., Ng, A. M., Vickers, M. F., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., and Young, J. D. (2002) Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J. Biol. Chem.* **277**, 24938-24948
200. Ye, L., Jia, Z., Yung, T., and Maloney, P. (2001) Topology of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, determined by site-directed fluorescence labeling. *J. Bacteriol.* **183**, 2490-2496
201. Ye, L., and Maloney, P. (2002) Structure/function relationships in OxIT, the oxalate/formate antiporter of *Oxalobacter formigenes*: assignment of transmembrane helix 2 to the translocation pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 20372-30378
202. Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **431**, 811-818
203. Yoo, H. S., Cunnigham, T. S., and Cooper, T. G. (1992) The allantoin and uracil permease gene sequences of *Saccharomyces cerevisiae* are nearly identical. *Yeast* **8**, 997-1006
204. Zalkin, H., and Nygaard, P. (1996) Biosynthesis of purine nucleosides, pp 561-579. In F. C. Neidhardt et al. (eds), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edition, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
205. Zgurskaya, H. I., and Nikaido, H. (1999) Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 7190-7195



206. Zhang, Y. W, and Rudnick, G. (2005) Serotonin transporter mutations associated with obsessive-compulsive disorder and phosphorylation alter binding affinity for inhibitors. *Neuropharmacology* **49**, 791-797
207. Zhao, M., Zen, K. C., Hubbell, W. L., and Kaback. H. R. (1999a) Proximity between Glu126 and Arg144 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7407-7412
208. Zhao, M., Zen, K. C., Hernandez-Borrell, J., Altenbach, C., Hubbell, W. L., and Kaback, H. R. (1999b) Nitroxide scanning electron paramagnetic resonance of helices IV and V and the intervening loop in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 15970-15977
209. Zhu, Q., Lee, D. W., and Casey, J. R. (2003) Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1. *J. Biol. Chem.* **278**, 3112-3120

