



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

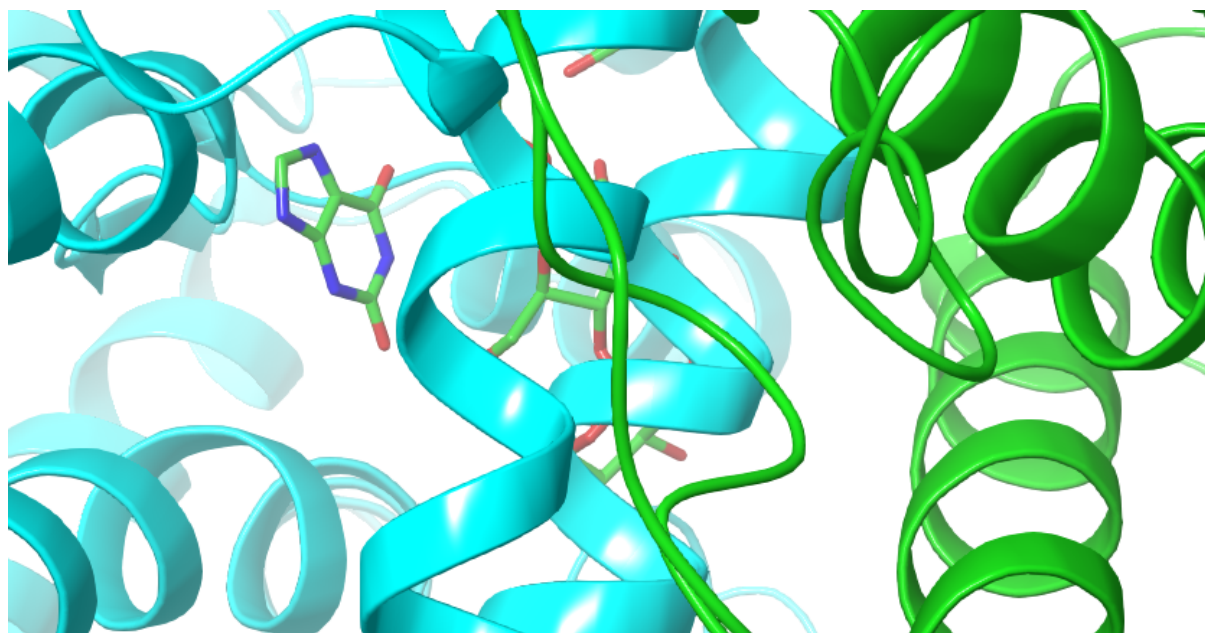
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ –  
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

---

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**«Μοριακές προσομοιώσεις,  
μελέτη διαμεμβρανικών υποδοχέων»**



**Δανάη Παππά**

Πτυχιούχος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΑΘΗΝΑ 2022**



HELLENIC REPUBLIC  
National and Kapodistrian  
University of Athens  
— EST. 1837 —

HELLENIC REPUBLIC  
National and Kapodistrian  
University of Athens

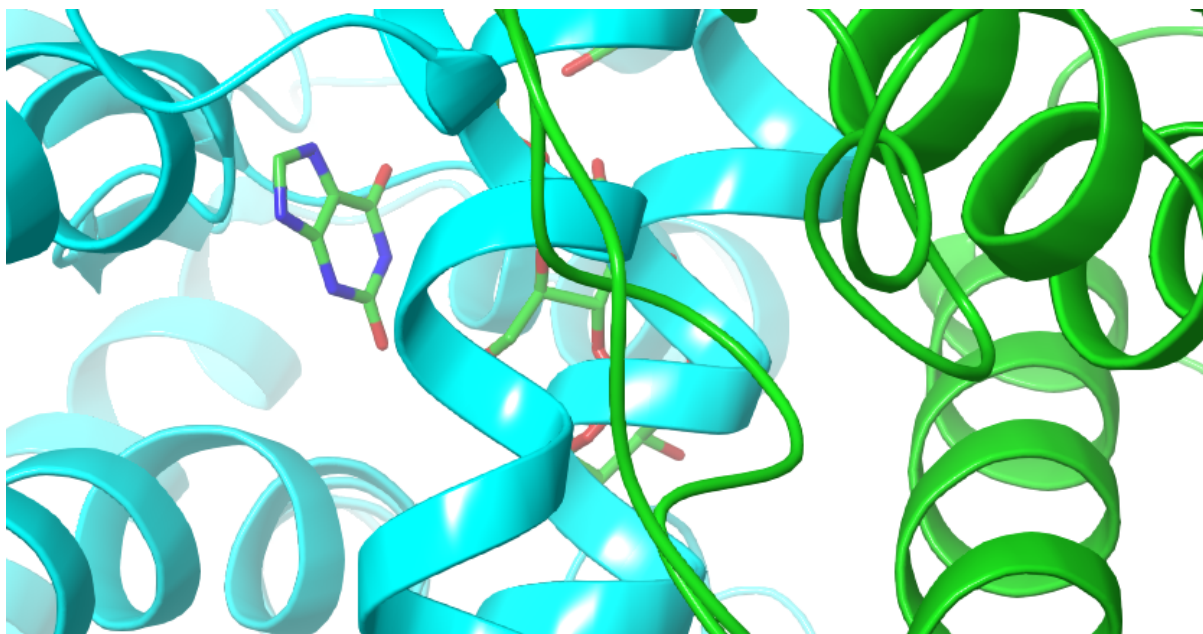
SCHOOL OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MASTER IN «BIOINFORMATICS –  
COMPUTATIONAL BIOLOGY»

---

Master Diploma Thesis

# «Molecular Simulations, Study of Transmembrane Receptors»



**Danae Pappa**  
Agricultural Biotechnology MSc., Agricultural University of Athens

A T H E N S   2 0 2 2



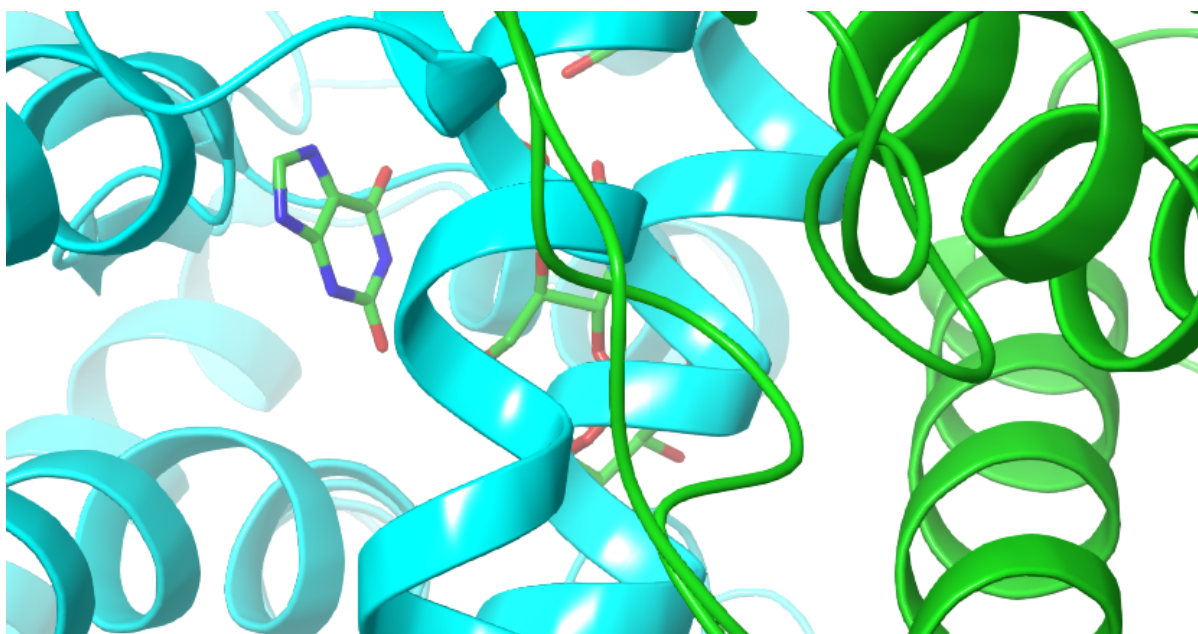
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ –  
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α  
«Μοριακές προσομοιώσεις, μελέτη  
διαμεμβρανικών υποδοχέων»



Τριμελής εξεταστική επιτροπή  
Καθηγητής Εμμανουήλ Μικρός (Επιβλέπων)  
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας,  
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών

Καθηγητής Ιωάννης Τρουγκάκος  
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου  
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών





# Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Τμήμα Φαρμακευτικής και συγκεκριμένα τον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας και τον κύριο Εμμανουήλ Μικρό που δέχτηκαν να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή τους, ούσα προερχόμενη από διαφορετικό τμήμα, το Τμήμα Βιολογίας.

Συγκεκριμένα, εκφράζω θερμές ευχαριστίες προς τον κύριο Γιώργο Λαμπρινίδη που χωρίς την καθοδήγηση και την υπομονή του δεν θα ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη και προς την Ηλιάνα Ζάντζα που μου προσέφερε συμβουλές, πληροφορίες και με άψογη συνεργασία καταφέραμε να εξαγάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα.

Θερμές ευχαριστίες, επίσης, στα υπόλοιπα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τον κύριο Ιωάννη Τρουγκάκο και την κυρία Βασιλική Οικονομίδου που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής για την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Τις θερμότερες των ευχαριστιών στο φιλικό μου περιβάλλον και την οικογένειά μου, για την όποιας μορφής στήριξη μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Τμήμα Βιολογίας, παρόλο που ακόμα και στο τέλος του ταξιδιού αυτού δυσκολεύονται να κατανοήσουν με τι καταπιάστηκα στην εν λόγω μελέτη.



*Only a few know, how much one must know  
to know how little one knows*

***Werner Heisenberg***

# Περιεχόμενα

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| Ευχαριστίες .....                                            | 5  |
| Περιεχόμενα .....                                            | 8  |
| Περιεχόμενα εικόνων .....                                    | 9  |
| Περιεχόμενα πινάκων .....                                    | 11 |
| Συντμήσεις .....                                             | 12 |
| Περίληψη.....                                                | 15 |
| Abstract .....                                               | 16 |
| 1.    Εισαγωγή .....                                         | 18 |
| 1.1 <i>Aspergillus nidulans</i> .....                        | 18 |
| 1.1.1    Ο κύκλος ζωής του <i>A.nidulans</i> .....           | 18 |
| 1.1.2    Ο <i>A. nidulans</i> ως οργανισμός μοντέλο .....    | 20 |
| 1.2    Βιολογικές Μεμβρανικές και Μεμβρανικές Πρωτεΐνες..... | 21 |
| 1.2.1    Βιολογικές Μεμβράνες.....                           | 21 |
| 1.2.2    Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού .....                      | 22 |
| 1.2.3    Λιπιδικές σχεδίες .....                             | 23 |
| 1.2.4    Μεμβρανικές Πρωτεΐνες.....                          | 24 |
| 1.2.5    Κανάλια και Μεταφορείς .....                        | 26 |
| 1.3    Οικογένεια Μεταφορέων NAT/NCS2 .....                  | 28 |
| 1.4    Μεταφορέας UapA.....                                  | 30 |
| 1.4.1    Η δομή του UapA .....                               | 31 |
| 1.4.2    Μηχανισμός δράσης UapA.....                         | 34 |
| 1.5    UapA και χημική συγγένεια αναλόγων ξανθίνης.....      | 36 |
| 1.6    Πουρίνες.....                                         | 37 |

|       |                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6.1 | Γενικά χαρακτηριστικά .....                                          | 37 |
| 1.6.2 | Σημασία Πουρινών .....                                               | 38 |
| 1.6.3 | Ξανθίνη.....                                                         | 39 |
| 1.7   | Σκοπός της μελέτης.....                                              | 40 |
| 2.    | Μέθοδοι .....                                                        | 41 |
| 2.1   | Μοριακές Προσομοιώσεις.....                                          | 41 |
| 2.2   | Υπολογισμοί Ελεύθερης Ενέργειας Σύνδεσης.....                        | 42 |
| 2.2.1 | Ελεύθερη ενέργεια Πρόσδεσης (FEP).....                               | 42 |
| 2.2.2 | Μοριακή Μηχανική επιφάνειας Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) .....        | 44 |
| 3.    | Αποτελέσματα .....                                                   | 48 |
| 3.1   | Προετοιμασία UapA.....                                               | 48 |
| 3.1.1 | Επιλογή και δημιουργία των αναλόγων ξανθίνης .....                   | 48 |
| 3.2   | Υπολογισμός Ελεύθερης Ενέργειας πρόσδεσης με τη μέθοδο FEP .....     | 50 |
| 3.3   | Υπολογισμός Ελεύθερης Ενέργειας πρόσδεσης με το Λογισμικό AMBER..... | 58 |
| 3.4   | Συγκρίσεις αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων .....                    | 73 |
| 4.    | Συζήτηση.....                                                        | 78 |
|       | Βιβλιογραφία.....                                                    | 80 |

## Περιεχόμενα εικόνων

|                   |                                                                                                                       |           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Εικόνα 1:         | Ο κύκλος ζωής του <i>A. nidulans</i> .....                                                                            | 19        |
| Εικόνα 2:         | Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού με ενσωματωμένες πρωτεΐνες και λιπίδια .....                                                 | 23        |
| Εικόνα 3:         | Μοντέλο λιπιδικών σχεδίων .....                                                                                       | 24        |
| Εικόνα 4:         | Μηχανισμοί μεταφοράς.....                                                                                             | 26        |
| Εικόνα 5:         | Είδη διαμεμβρανικής μεταφοράς (παθητική, ενεργητική) και ενσωματωμένων πρωτεϊνών (κανάλια, μεταφορείς, αντλίες) ..... | 28        |
| Εικόνα 6:         | Δομή του UapA .....                                                                                                   | 33        |
| Εικόνα 7:         | Περιοχές δέσμησης υποστρώματος και περιοχές ειδικότητας του UapA .....                                                | 34        |
| Εικόνα 8:         | Ειδικότητα υποστρώματος UapA.....                                                                                     | 35        |
| Εικόνα 9:         | Οι 4 διαμορφώσεις του μεταφορέα UapA.....                                                                             | 35        |
| <b>Εικόνα 10:</b> | <b>Αναμενόμενο vs πειραματικό <math>\Delta G_{\text{binding}}</math> .....</b>                                        | <b>36</b> |
| Εικόνα 11:        | Γενική 2D δομή πουρινών με σημειωμένη αρίθμηση των ατόμων.....                                                        | 37        |
| Εικόνα 12:        | 2D δομή της ξανθίνης N7.....                                                                                          | 39        |
| Εικόνα 13:        | Αναπαράσταση της μεθόδου FEP .....                                                                                    | 43        |

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 14: Απλοποιημένη αναπαράσταση του υπολογισμού μεταβολής ελεύθερης ενέργειας ...                                                                                           | 45 |
| Εικόνα 15: Αναπαράσταση της προσέγγισης MM-PBSA για τον υπολογισμό του $\Delta G^\circ$ .....                                                                                    | 46 |
| Εικόνα 17: Ραβδόγραμμα των υπολογισμών $\Delta\Delta G^\circ$ με την μέθοδο FEP σε ανάλογα του ταυτομερούς N7 ξανθίνης .....                                                     | 51 |
| Εικόνα 18: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης .....                                                       | 52 |
| Εικόνα 19: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης .....                                                         | 54 |
| Εικόνα 20: Ραβδόγραμμα των υπολογισμών $\Delta\Delta G^\circ$ με την μέθοδο FEP σε ανάλογα του ταυτομερούς N9 ξανθίνης .....                                                     | 54 |
| Εικόνα 21: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης .....                                                       | 56 |
| Εικόνα 22: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης .....                                                         | 57 |
| Εικόνα 23: Ραβδόγραμμα των υπολογισμών $\Delta\Delta G^\circ$ με την μέθοδο MM-PBSA σε ανάλογα του ταυτομερούς N7 ξανθίνης .....                                                 | 62 |
| Εικόνα 24: Διάγραμμα συσχέτισης των πιο σημαντικών ευρημάτων μεταξύ $\Delta\Delta G^\circ$ του μονομερούς N7 με το αναμενόμενο $\Delta\Delta G^\circ$ με τη μέθοδο MM-PBSA. .... | 62 |
| Εικόνα 25: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης .....                                                                  | 64 |
| Εικόνα 26: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης .....                                                                    | 65 |
| Εικόνα 27: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς παρουσία λιπιδικής στοιβάδας UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης.....                                        | 68 |
| Εικόνα 28: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης .....                                                                  | 70 |
| Εικόνα 26: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης .....                                                                    | 71 |
| Εικόνα 30: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς με λιπιδική στοιβάδα UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης.....                                                | 73 |
| Εικόνα 31: Συγκρίσεις των στιγμιοτύπων των αποτελεσμάτων του MM-PBSA για τις N7 ξανθίνες .....                                                                                   | 74 |
| Εικόνα 32: Συγκρίσεις των στιγμιοτύπων των αποτελεσμάτων του MM-PBSA για τις N7 και N9 ξανθίνες σε μονομερές UapA.....                                                           | 76 |
| Εικόνα 33: Συγκρίσεις των στιγμιοτύπων των αποτελεσμάτων για τις N7 ξανθίνες σε μονομερές UapA με την μέθοδο FEP και MM-PBSA αντίστοιχα.....                                     | 77 |

## Περιεχόμενα πινάκων

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πίνακας 1: Λιπιδική σύσταση διαφορετικών τύπων μεμβρανών ορισμένων ζώων και βακτηρίων .....                                                                                                                                     | 21 |
| Πίνακας 2: Στοιχίση με ClustalW που αναδεικνύει το διατηρημένο μοτίβο των NAT/NCS2 πρωτεϊνών. Οι διατηρημένες θέσεις είναι σημειωμένες στον πίνακα, [Q/E/P], N, G, T, και [R/K/G]...                                            | 30 |
| Πίνακας 3: Πειραματικά προσδιορισμένα Km/i και $\Delta G^\circ$ και το αναμενόμενο $\Delta\Delta G^\circ$ το οποίο υπολογίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα.....                                                                | 36 |
| Πίνακας 4: Παραδείγματα παραγώγων πουρίνης .....                                                                                                                                                                                | 39 |
| Πίνακας 5: Οι δομές των αναλόγων ξανθίνης που μελετήθηκαν .....                                                                                                                                                                 | 49 |
| Πίνακας 6: Υπολογισμός του $\Delta\Delta G^\circ$ για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N7 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο FEP και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικά δεδομένα $\Delta\Delta G^\circ$ .....     | 50 |
| Πίνακας 7: Υπολογισμός του $\Delta\Delta G^\circ$ για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N9 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο FEP και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικά δεδομένα $\Delta\Delta G^\circ$ .....     | 54 |
| Πίνακας 8: Υπολογισμός του $\Delta\Delta G^\circ$ για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N7 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικά δεδομένα $\Delta\Delta G^\circ$ ..... | 61 |
| Πίνακας 9: Υπολογισμός του $\Delta\Delta G^\circ$ για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N9 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικά δεδομένα $\Delta\Delta G^\circ$ ..... | 68 |



# Συντμήσεις

|                                                            |                                                                         |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| ATP (adenosine triphosphate)                               | τριφωσφορική αδενοσίνη                                                  |
| E.coli                                                     | εντεροβακτήριο <i>Escherichia coli</i>                                  |
| UapA (Uric acid-xanthine permease A)                       | Περμεάση ουρικού οξέος - ξανθίνης                                       |
| MD (Molecular Dynamics)                                    | ΜΔ (Μοριακή Δυναμική)                                                   |
| Xan (xanthine)                                             | Ξανθίνη                                                                 |
| PCR (polymerase chain reaction)                            | αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης                                         |
| FEP (Free Energy Perturbation)                             | Διατάραξη ελεύθερης ενέργειας                                           |
| NAT (Nucleobase – Ascorbate Transporter)                   | οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού                |
| NCS2 (Nucleobase-Cation Symporter-2)                       | οικογένεια-2 συµμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων - κατιόντων            |
| 1MX (1-methyl-xanthine)                                    | 1-μεθυλο-ξανθίνη                                                        |
| MM-PBSA Molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area | Μοριακή Μηχανική Επιδιαλύτωσης Επιφάνειας Poisson - Boltzmann           |
| pH                                                         | ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξωνίου |
| TMS (transmembrane segment)                                | διαμεμβρανικό τμήμα                                                     |
| 3MX (3-methyl-xanthine)                                    | 3-μεθυλο-ξανθίνη                                                        |
| 8MX (8-methyl-xanthine)                                    | 8-μεθυλο-ξανθίνη                                                        |
| 2SX (2-thio-xanthine)                                      | 2-θειοξανθίνη                                                           |
| 6SX (6-thio-xanthine)                                      | 6-θειοξανθίνη                                                           |
| A. nidulans                                                | ασκομύκητας <i>Aspergillus nidulans</i>                                 |
| MC (Monte Carlo)                                           | Μέθοδος Monte Carlo                                                     |
| ps                                                         | picosecond                                                              |

**Αμινοξέα:**

|   |     |                  |
|---|-----|------------------|
| A | Ala | Αλανίνη          |
| C | Cys | Κυστεΐνη         |
| D | Asp | Ασπαρτικό οξύ    |
| E | Glu | Γλουταμινική οξύ |
| F | Phe | Φαινυλαλανίνη    |
| G | Gly | Γλυκίνη          |
| H | His | Ιστιδίνη         |
| I | Ile | Ισολευκίνη       |
| K | Lys | Λυσίνη           |
| L | Leu | Λευκίνη          |
| M | Met | Μεθειονίνη       |
| N | Asn | Ασπαραγίνη       |
| P | Pro | Προλίνη          |
| Q | Gln | Γλουταμίνη       |
| R | Arg | Αργινίνη         |
| S | Ser | Σερίνη           |
| T | Thr | Θρεονίνη         |
| V | Val | Βαλίνη           |
| W | Trp | Τρυπτοφάνη       |
| Y | Tyr | Τυροσίνη         |

**Αμινοξέα:**

|   |     |                  |
|---|-----|------------------|
| A | Ala | Αλανίνη          |
| C | Cys | Κυστεΐνη         |
| D | Asp | Ασπαρτικό οξύ    |
| E | Glu | Γλουταμινική οξύ |
| F | Phe | Φαινυλαλανίνη    |
| G | Gly | Γλυκίνη          |
| H | His | Ιστιδίνη         |
| I | Ile | Ισολευκίνη       |
| K | Lys | Λυσίνη           |
| L | Leu | Λευκίνη          |
| M | Met | Μεθειονίνη       |
| N | Asn | Ασπαραγίνη       |
| P | Pro | Προλίνη          |
| Q | Gln | Γλουταμίνη       |
| R | Arg | Αργινίνη         |
| S | Ser | Σερίνη           |
| T | Thr | Θρεονίνη         |
| V | Val | Βαλίνη           |
| W | Trp | Τρυπτοφάνη       |
| Y | Tyr | Τυροσίνη         |



# Περίληψη

Τα μέλη της ευρέως διαδεδομένης οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT) είναι συμμεταφορείς  $H^+$  ή  $Na^+$  ειδικοί για την κυτταρική πρόσληψη είτε πουρινών και πυριμιδινών, είτε L-ασκορβικού οξέος. Ο μεταφορέας ουρικού οξέος - ξανθίνης UapA είναι ένα αρχέτυπο, που έχει μελετηθεί εκτενώς σε γενετικό και λειτουργικό επίπεδο, μυκιατικός μεταφορέας NAT, ο οποίος παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την ξανθίνη και το ουρικό οξύ. Επιπλέον, η κρυσταλλική δομή του UapA σε σύμπλοκο με ξανθίνη έχει λυθεί πρόσφατα, επιτρέποντας μελέτες σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό που καθορίζει την επιλεκτικότητα του υποστρώματος *in silico* βάσει της δομής στην πρόβλεψη συγγένειας δέσμευσης. Εδώ, επιλέχθηκαν έξι ανάλογα ξανθίνης για τη δημιουργία ακριβών προγνωστικών μοντέλων των αλληλεπιδράσεων υποστρώματος με τον UapA. Δημιουργήθηκαν μοντέλα συσχέτισης για πειραματικά προσδιορισμένα  $K_m$  και θεωρητικοί υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας  $\Delta G^\circ$  αναλόγων ξανθίνης. *In silico* θεωρητικοί υπολογισμοί και μοριακές προσομοιώσεις έγιναν για την πρόβλεψη συγγένειας δέσμευσης χρησιμοποιώντας υπολογισμούς σύνδεσης και μοριακής δυναμικής (FEP, MMPBSA). Καθώς η ξανθίνη μπορεί να αποκτήσει δύο ταυτομερείς μορφές, με βάση την πρωτονίωση των N7 ή N9, και τα δύο ταυτομερή χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα ανάλογα. Ο UapA αντιμετωπίστηκε ως μονομερές ή διμερές. Εξετάστηκε η παρουσία ή η απουσία διπλής στιβάδας λιπιδίων στους υπολογισμούς, προκειμένου να παραχθεί το πιο ακριβές μοντέλο πρόβλεψης και να διερευνηθεί πώς η λιπιδική διπλή στιβάδα μπορεί να επηρεάσει τη συγγένεια σύνδεσης. Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πιο αξιόπιστα αποτελέσματα μπορούμε να εξαγάγουμε από τη μελέτη ενός μοντέλου στη μονομερή του μορφή με τη μέθοδο του MM-PBSA, μέθοδος πιο γρήγορη υπολογιστικά από τις υπόλοιπες που μελετήθηκαν.

# Abstract

Members of the ubiquitous Nucleobase Ascorbate Transporter (NAT) family are H<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup> symporters specific for the cellular uptake of either purines and pyrimidines or L-ascorbic acid. UapA is a prototypic, extensively studied at the genetic and functional level, fungal NAT showing high-affinity for xanthine and uric acid. Moreover, the crystal structure of UapA in complex with xanthine has been recently solved, allowing studies on the molecular mechanism that determines substrate selectivity using structure-based *in silico* prediction of binding affinities. Here, six xanthine analogues were selected to create accurate predictive models of the UapA-substrate interactions. Correlation models for experimentally determined K<sub>m</sub> and theoretical calculations of free energy  $\Delta G^\circ$  of xanthine analogues were created. *In silico* theoretical calculations and molecular simulations were made for predicting binding affinities using docking and molecular dynamics calculations (FEP, MMPBSA). As xanthine might acquire two tautomeric forms, based on the protonation of N7 or N9, both tautomers were utilized for all analogues. UapA was treated as monomer or dimer. The presence or absence of lipid bilayer in our calculations was considered, in order to produce the most accurate predicting model and investigate how the lipid bilayer might influence the binding affinities. Methods were evaluated in terms of their reliability in relation to the computational time needed. Finally, the results showed that more reliable results can be obtained from the study of a model in its monomeric form by the method of MM-PBSA, which is computationally faster than the rest studied.



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 *Aspergillus nidulans*

### 1.1.1 Ο κύκλος ζωής του *A.nidulans*

Το είδος *Aspergillus nidulans* κατατάσσεται συστηματικά (Kirk *et al.*, 2008; Houbraeken, de Vries and Samson, 2014):

Βασίλειο: *Fungi*

Διαίρεση: *Eumycota*

Υποδιαίρεση: *Ascomycotina*

Κλάση: *Plectomycetes*

Τάξη: *Eurotiales*

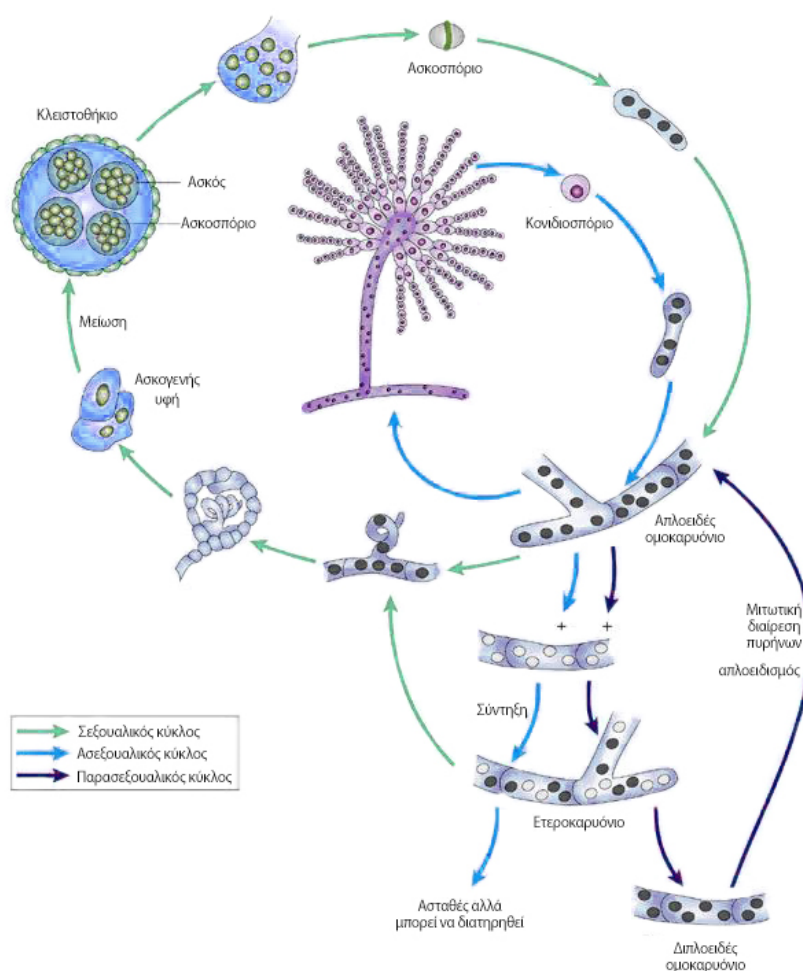
Οικογένεια: *Trichocomaceae*

Γένος: *Aspergillus*

Ο *Aspergillus nidulans* είναι μη παθογόνος, ομοθαλικός και νηματοειδής μύκητας. Ανήκει στο πλέον ποικιλόμορφο φύλο του βασιλείου των Μυκήτων, με περίπου 64.000 είδη ανάμεσα τους μονοκύτταρες ζύμες, τρούφες καθώς και οι γνωστές μαύρες και πράσινες μούχλες. Ο όρος «ομοθαλικός» αναφέρεται στην ικανότητα ενός οργανισμού να αναπαραχθεί σεξουαλικά. (Kirk *et al.*, 2008)

Ο *A. nidulans* έναν έχει περίπλοκο κύκλο ζωής, ο οποίος μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις αναπαραγωγικούς υποκύκλους, τον ασεξουαλικό, τον σεξουαλικό και τον παρασεξουαλικό. Όλοι οι κύκλοι θεωρείται ότι εκκινούν με την εκβλάστηση λανθανόντων σπορίων, είτε κονιδιοσπορίων του ασεξουαλικού κύκλου ζωής μέσω της διαδικασίας της μίτωσης, είτε ασκοσπορίων κατά τη διάρκεια του σεξουαλικού κύκλου ζωής μέσω της διαδικασίας της μείωσης. Τα σπόρια ενεργοποιούνται κάτω από

συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι ασκοί, που περιέχουν τα ασκοσπόρια, αποθηκεύονται σε κλειστοθήκια, τα οποία περιβάλλονται από «κύτταρα hülle». (Kirk *et al.*, 2008; Houbraken, de Vries and Samson, 2014). Ο ασεξουαλικός κύκλος αναπαραγωγής του δίνει τη δυνατότητα ποικιλίας φαινοτύπων, ενώ μέσω των ασκοσπορίων πραγματοποιούνται διασταυρώσεις μεταξύ των στελεχών. (Pontecorvo *et al.*, 1953; Morris and Enos, 1992)



**Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής του *A. nidulans***  
(Casselton and Zolan, 2002)

Υπάρχουν αρκετοί πιθανοί λόγοι για τους οποίους κάποιοι Ασπέργιλλοι, όπως και ο *A. nidulans*, έχουν διατηρήσει την ικανότητα της αναπαραγωγής φυλετικά, παρά το υψηλό μεταβολικό κόστος συγκριτικά με την αφυλετική αναπαραγωγή. Η εγγενής αναπαραγωγή που περιλαμβάνει την επικοινωνία (η οποία είναι εφικτή ακόμα και σε ομοθαλλικά είδη) μπορεί να παραγάγει μεγάλη γενετική ποικιλότητα και νέους γονότυπους πιο σύντομα από ό,τι η αφυλετική αναπαραγωγή. Παράλληλα, η εγγενής αναπαραγωγή οδηγεί στην απομάκρυνση επιβλαβών μεταλλάξεων και τη συγκέντρωση χρήσιμων που θα μπορούσαν να συσσωρευτούν κατά την αγενή αναπαραγωγή. Επιπλέον, τα ασκοσπόρια εν συγκρίσει



με τα κονίδια έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να επιβιώνουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. (Schoustra *et al.*, 2007)

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο *A. nidulans* σχετίζεται στενά με μεγάλο αριθμό άλλων ειδών *Aspergillus* βιομηχανικής και ιατρικής σημασίας, όπως *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. flavus* και *A. fumigates*, τα οποία δεν έχουν σεξουαλικό κύκλο, αλλά εκμεταλλεύονται πειραματικά χρησιμοποιώντας τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν για τον *A. nidulans*. (Scazzocchio, 2006)

### 1.1.2 Ο *A. nidulans* ως οργανισμός μοντέλο

Ο *A. nidulans* έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως πρότυπο μικροβιακό σύστημα για τη μοριακή βιολογία και την αντίστροφη γενετική. Το γονιδιώμά του ήταν από τα πρώτα που αλληλουχήθηκαν το 2005 από τη Monsanto σε συνεργασία με το Board Institute. (Galagan *et al.*, 2005). Έχει περίπου 30 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων και προβλέπεται ότι περιέχει περίπου 9,5 χιλιάδες γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε 8 καλά σημασμένα χρωμοσώματα με πληθώρα δεικτών αντοχής σε χρώματα, φάρμακα κ.ά. Τα γονίδια του μπορούν να τροποποιηθούν, να κλωνοποιηθούν και να εκφραστούν υπό τον έλεγχο ρυθμιζόμενων προαγωγών ή ακόμα και να διαγραφούν κατά βούληση, καθώς μπορεί να είναι απομονωμένοι πρωτοπλάστες. (Morris and Enos, 1992)

Η ανάπτυξη του ευνοείται σε ένα μεγάλο εύρος ήπιων θερμοκρασιών, χαρακτηριστικό το οποίο επιτρέπει την απομόνωση μεταλλαγών που σχετίζονται με τη θερμοευαισθησία ή και την θερμοανθεκτικότητα. Αναπτύσσεται εύκολα σε στερεά και υγρά υποστρώματα χωρίς μεγάλο κόστος. Διαθέτει πληθώρα μεταβολικών μονοπατιών, εκ των οποίων πολλά είναι χαρακτηρισμένα, που του επιτρέπουν τη χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου. Το μέγεθος της αποικίας, το σχήμα, η ανάπτυξη των υφών και των κονιδιοσπορίων, τα οποία είναι μη πυρηνικά, επιτρέπουν τη διάκριση ολικής ή μερικής απώλειας της λειτουργικότητας και ευαισθησίας σε τοξικές ουσίες. (Todd, Davis and Hynes, 2007)

Τα μη πυρηνικά κονιδιοσπόρια είναι ένα χρήσιμο εργαλείο αν τοποθετηθεί σε κατάλληλα μέσα, για την άμεση διαλογή των μετασχηματιστών. Μπορεί να χρησιμεύσει ως στέλεχος ξενιστή για την ετερόλογη έκφραση γονιδίων, τα οποία έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων ακόμη και υψηλότερων ευκαρυωτικών. (Goudela *et al.*, 2008)

Ο *A. nidulans* εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα ακόμα και εν συγκρίσει με τον ζυμομύκητα *S. cerevisiae* που είναι ο πλέον διαδεδομένος μύκητας μοντέλο. Μπορεί να παρουσιάζει ο *A. nidulans* περίπου των διπλάσιο αριθμό γονιδίων από τον *S. cerevisiae*, καθώς δεν έχει υποστεί επανάληψη του γονιδιώματός του και παρατηρείται σχεδόν πλήρης απουσία γενετικής πλεονασματικότητας. Επίσης, το επίπεδο ομοιότητας μεταξύ ορθολογικών ανθρώπων - *A. nidulans* είναι συνήθως υψηλότερο από αυτό μεταξύ ανθρώπων - *S. cerevisiae*. Επιπλέον, ένα πρακτικό πλεονέκτημα είναι το μεγάλο μέγεθος των

κυττάρων το οποίο διευκολύνει τις μελέτες με συμβατική μικροσκοπία, διότι τα οργανίδια είναι λιγότερο γεμάτα από ό,τι στον *S. cerevisiae*. (Peñalva *et al.*, 2012)

## 1.2 Βιολογικές Μεμβρανικές και Μεμβρανικές Πρωτεΐνες

### 1.2.1 Βιολογικές Μεμβράνες

Οι μεμβράνες προσδιορίζουν τα εξωτερικά σύνορα του κυττάρου και διαχωρίζουν σε διαμερίσματα το εσωτερικό του, όπως π.χ. μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Ο ρόλος των μεμβρανών στις διεργασίες των κυττάρων είναι βασικός, αλλά ωστόσο και πολύπλοκος. Μια μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, οι οποίοι είτε είναι συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες, είτε αποτελούν δομικά συστατικά των γλυκολιπιδίων. Η ποσοτική και ποιοτική σύσταση των πρωτεϊνών των μεμβρανών σχετίζεται άμεσα με τον τύπο και τη λειτουργία τους. Στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών οι πρωτεΐνες αποτελούν το 60% κατά βάρος των μεμβρανών, ενώ στην εσωτερική πλασματική μεμβράνη αυτό το ποσοστό φτάνει το 75%. Ένα παράδειγμα της συσχέτισης της σύστασης με τον λειτουργικό ρόλο των μεμβρανών είναι η πλασματική μεμβράνη του βακτηρίου *E. coli* που περιέχει εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στη βιοσύνθεση του ATP, στη διακίνηση των πρωτεϊνών και στους μηχανισμούς διαίρεσης. Ωστόσο, η εξωτερική μεμβράνη του *E. coli* επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες και κατά συνέπεια αποτελείται και από διαφορετικές πρωτεΐνες. Αντίστοιχα, κάθε τύπος μεμβρανών έχει χαρακτηριστική σύσταση λιπιδίων. Μπορεί να γίνεται αναφορά στη λειτουργία και τον ρόλο των μεμβρανών, ιδιότητα όμως που δεν μένει ανεπηρέαστη από τους εξωτερικούς παράγοντες, όπως π.χ. η θερμοκρασία. Το σύνολο των αλλαγών το οποίο είναι ικανό να αλλάξει τις φυσικές ιδιότητες των συνθετικών διπλοστιβάδων αναφέρεται ως μετάπτωση φάσης. (Κατινάκης, 2004)

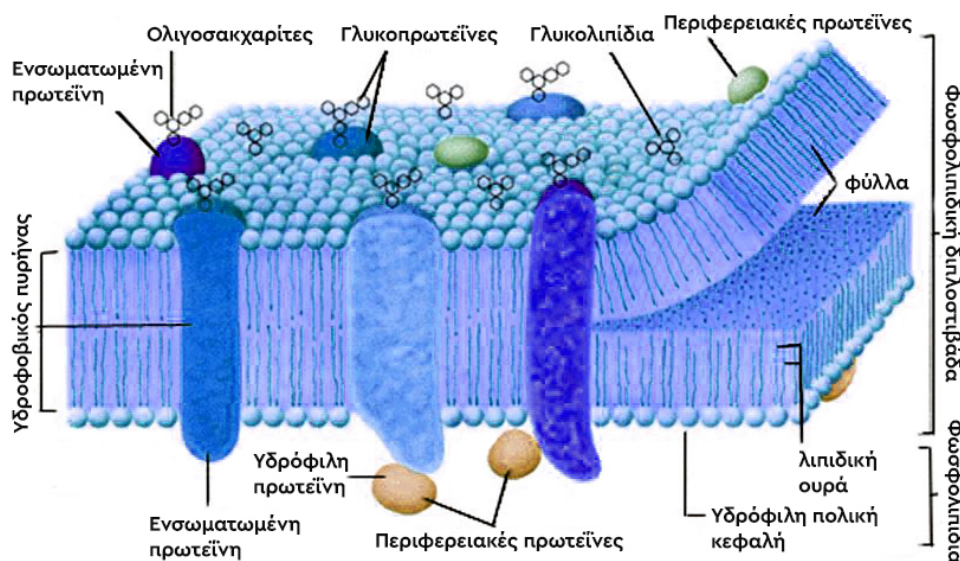
| Τύπος μεμβρανών                    | Λιπιδική σύσταση % κατά βάρος |    |    |    |    |     |     |     |     | Γλυκολιπίδια |
|------------------------------------|-------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|--------------|
|                                    | CI                            | PC | PE | PI | PS | PG  | DPG | SM  | PA  |              |
| Ήπαρ αρουραίου                     | 30                            | 18 | 11 | 4  | 9  | -   | -   | 14  | 1   | -            |
| Πλασματική μεμβράνη                | 6                             | 55 | 16 | 8  | 3  | -   | -   | 3   | -   | -            |
| Μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη   | 3                             | 45 | 25 | 6  | 1  | 2   | 18  | 2,5 | 0,7 | -            |
| Μιτοχονδριακή εσωτερική μεμβράνη   | 5                             | 50 | 23 | 13 | 2  | 2,5 | 3,5 | 5   | 1,3 | -            |
| Πυρηνική μεμβράνη                  | 10                            | 55 | 20 | 7  | 2  | -   | -   | 3   | 1   | -            |
| Πλασματική μεμβράνη <i>E. coli</i> | 0                             | 0  | 80 | -  | -  | 15  | 5   | -   | -   | -            |

CI: χοληστερόλη, PC: Φωσφατιδυλοχολίνη, PE: Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, PI: φωσφατιδυλινόσιτόλη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη

**Πίνακας 1: Λιπιδική σύσταση διαφορετικών τύπων μεμβρανών ορισμένων ζώων και βακτηρίων**

## 1.2.2 Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού

Σύμφωνα με το μοντέλο της μεμβρανικής δομής που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα και προτάθηκε το 1972 από τους Jonathan Singer και Garth Nicolson, η μεμβράνη είναι ένα ρευστό μωσαϊκό. Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού περιγράφει και τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών των μεμβρανών, υδρόφιλες και υδρόφοβες, ενώ παράλληλα εξηγεί τις θερμοδυναμικές ιδιότητές τους, όπως το σημείο τήξης και η ρευστότητα. Οι μεμβράνες έχουν δομή που ομοιάζει με αυτή ενός λεπτού φύλλου, με πάχος μερικών μορίων, και σχηματίζουν ένα κλειστό σύνορο μεταξύ διαμερισμάτων που έχουν διαφορετική σύσταση. Το πάχος των περισσότερων μεμβρανών κυμαίνεται από 60Å μέχρι 100Å. Αποτελούνται κυρίως από λιπίδια και πρωτεΐνες. Ο λόγος της μάζας πρωτεϊνών προς λιπιδίων στην πλειονότητα των βιολογικών μεμβρανών κυμαίνεται μεταξύ 1:4 και 4:1. Επίσης, οι μεμβράνες περιέχουν υδατάνθρακες συνδεδεμένους με λιπίδια και πρωτεΐνες. Τα μεμβρανικά λιπίδια έχουν μια υδρόφιλη και μια υδρόφοβη περιοχή και σχηματίζουν αυθόρμητα κλειστά διμοριακά φύλλα σε υδατικό περιβάλλον. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα έχει διττό ρόλο: είναι ταυτόχρονα φραγμός διαπερατότητας και διαλύτης για τις ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιτελούν χαρακτηριστικές λειτουργίες της κάθε μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως κανάλια, αντλίες, ένζυμα, υποδοχείς και μεταγωγείς ενέργειας. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι βυθισμένες στην διπλοστοιβάδα λιπιδίων, δημιουργώντας το κατάλληλο περιβάλλον για τη δράση τους. Τα μόρια λιπιδίων και πρωτεϊνών που τις αποτελούν διατηρούνται ως δομημένο σύνολο μέσω πολλών μη ομοιοπολικών συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων. Οι μεμβράνες είναι ασυμμετρικές. Η μία όψη της βιολογικής μεμβράνης είναι διαφορετική από την άλλη. Τα λιπιδικά μόρια διαχέονται με μεγάλη ταχύτητα μέσα στο μεμβρανικό επίπεδο, όπως κάνουν και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, εκτός και αν είναι αγκυροβολημένες μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων. Αντιθέτως, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες μπορούν να περιστραφούν από τη μία όψη της μεμβράνης στην άλλη. Οι μεμβράνες μπορούν να θεωρηθούν ως δισδιάστατα διαλύματα προσανατολισμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών. Για τους παραπάνω λόγους οι μεμβράνες χαρακτηρίζονται ως ρευστές δομές. (Singer and Nicolson, 1972; Stryer, Berg and Tymoczko, 2002; Cooper and Hausman, 2007)



**Εικόνα 2: Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού με ενσωματωμένες πρωτεΐνες και λιπίδια**

### 1.2.3 Λιπιδικές σχεδίες

Προϊόντος του χρόνου, πολλές μελέτες συνέβαλαν στο να σκιαγραφηθεί μια πιο σύνθετη εικόνα οργάνωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στη μεμβράνη του πλάσματος. Σύνδεση της δομής - περιεκτικότητας της μεμβράνης με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες έγινε με το μοντέλο των λιπιδικών σχεδίων (lipid rafts) (Simons and Ikonen, 1997; Brown and London, 2000). Το μοντέλο της λιπιδικής σχεδίας στηρίζεται στη βασική αρχή ότι τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης έχουν διαφορετικές βιοφυσικές τάσεις σύνδεσης και προτείνει την ύπαρξη πλευρικής ετερογένειας στην μεμβράνη η οποία προκύπτει από την αυστηρότερη κκορεσμένων και μονο-ακόρεστων φωσφολιπιδίων με τη χοληστερόλη από ό,τι με πολύ-ακόρεστα φωσφολιπίδια.

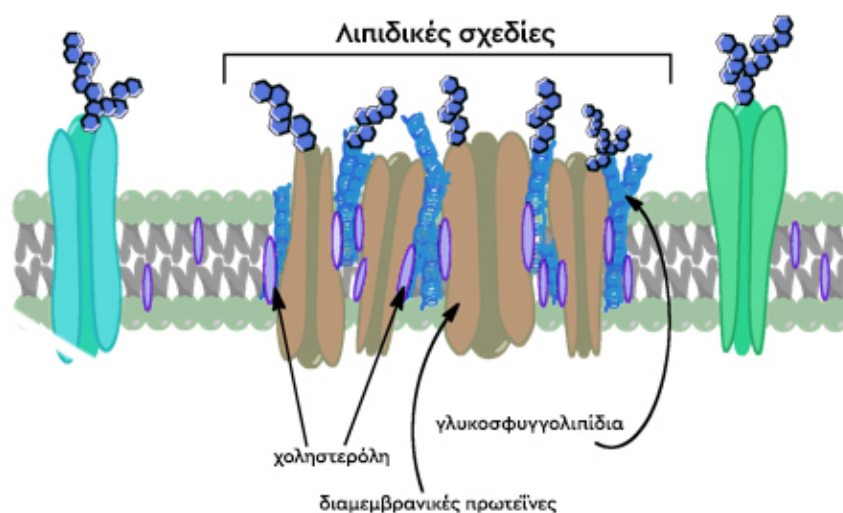
Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η λειτουργική σημασία σχετίζεται άμεσα με την πλευρική ετερογένεια στη μεμβράνη, ενώ παράλληλα προτείνει ότι οι περιοχές της πλασματικής μεμβράνης που προκύπτουν από τις ετερογένειες αυτές παίζουν κύριο ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως είναι η μεταγωγή σήματος (Gasperi *et al.*, 2012; Sebastião *et al.*, 2013), η κινητικότητα που παρατηρείται στα κύτταρα (Rege and Hagoood, 2006; Jahn, Su and Braet, 2011), η διακίνηση κυστιδίων (Echarri, Muriel and Del Pozo, 2007; Juan-Sanz *et al.*, 2011) και η είσοδος παθογόνων βακτηρίων και ιών (Vieira *et al.*, 2010).

Οι λιπιδικές σχεδίες είναι πλούσιες τόσο σε χοληστερόλη, όσο και σε κορεσμένα λιπίδια, όπως τα σφιγγολιπίδια που τοποθετούνται διαδοχικά προς τον σχηματισμό μιας διατεταγμένης δομής η οποία είναι διακριτή από τα ατάκτως διατεταγμένα ακόρεστα κατά κύριο λόγο λιπίδια. Η υπόθεση της λιπιδικής

σχεδίας αφορά και τις δύο πλευρές της μεμβράνης, παρά το γεγονός ότι τα σφιγγολιπίδια εντοπίζονται μόνο στη μία πλευρά από τις δύο (Laude and Prior, 2004).

Το λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας των γλυκοσφιγγολιπιδίων προτείνεται πως έχει την ικανότητα να συνδέεται με μια δομή λιπιδικής σχεδίας με χοληστερόλη, κορεσμένα λιπίδια, περιφερειακές πρωτεΐνες. Κατά αυτόν τον τρόπο, η διατεταγμένη φύση της συγκεκριμένης περιοχής παρέχει έναν μηχανισμό για τη διαλογή λιπιδίων και πρωτεϊνών ανάλογα με την ικανότητά τους να παρεμβάλλονται σε αυτήν την αυστηρά δεμένη δομή (Laude and Prior, 2004; Sengupta, Baird and Holowka, 2007).

Πρωτεΐνες που βρίσκονται προς την πλευρά του περιπλαστικού χώρου και είναι προσδεμένες με άγκυρες γλυκο-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης, πρωτεΐνες που βρίσκονται προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος προσδεμένες με κορεσμένες ριστούλ- ή παλμιτοϋλο- και πρωτεΐνες που φέρουν χοληστερόλη, όλες φαίνεται ότι εισχωρούν σε λιπιδικές σχεδίες (Lingwood and Simons, 2010). Τα μικροσπήλαια συχνά εξετάζονται ως ειδικός υποτύπος των λιπιδικών σχεδίων, λόγω της ομοιότητάς τους στο επίπεδο της δομής.



Εικόνα 3: Μοντέλο λιπιδικών σχεδίων

#### 1.2.4 Μεμβρανικές Πρωτεΐνες

Τα φωσfolιπίδια μπορεί να αποτελούν το θεμελιώδες δομικό στοιχείο των βιολογικών μεμβρανών, ωστόσο οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ευθύνονται για τις εξειδικευμένες λειτουργίες των μεμβρανών του κυττάρου. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, βάσει του τρόπου σύνδεσής τους με τη μεμβράνη, κατατάσσονται σε δύο κύριες ομάδες. Οι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που είναι ενσωματωμένες στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας. Οι περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες δεν είναι ενσωματωμένες στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας, αλλά σχετίζονται έμμεσα με τη μεμβράνη, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων με ενσωματωμένες πρωτεΐνες. Οι περισσότερες ενσωματωμένες πρωτεΐνες διατρέχουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα, τμήματά τους προεξέχουν και από τις



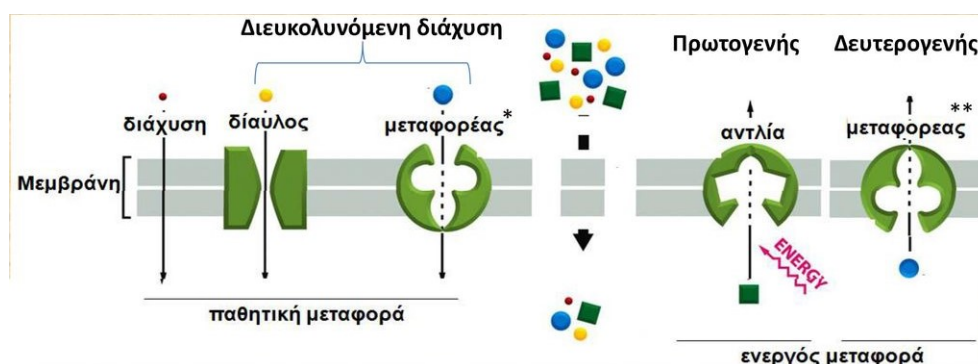
δύο πλευρές της μεμβράνης. Τα τμήματα των πρωτεϊνών που βρίσκονται εντός της μεμβράνης παρουσιάζουν συνήθως περιοχές 20-25 μη πολικών αμινοξέων με δευτεροταγή δομή α-έλικας. Οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες αυτών των αμινοξέων αλληλεπιδρούν με τις λιπιδικές αλυσίδες των λιπιδίων της μεμβράνης. Ο σχηματισμός της α-έλικας εξουδετερώνει την πολικότητα του πεπτιδικού δεσμού, όπως ακριβώς και η αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Η μόνη διαφορετική από αυτή την πρωτεϊνική δομή που έχει βρεθεί να διαπερνά τη λιπιδική διπλοστιβάδα είναι το β-βαρέλι που σχηματίζεται μετά από αναδίπλωση β-πτυχωτών προς μια δομή που ομοιάζει με βαρέλι. Τα β-βαρέλια εντοπίζονται σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες χλωροπλαστών, μιτοχονδρίων και βακτηρίων. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι αμφιπαθικά μόρια, με τα υδρόφιλα τμήματά τους να βρίσκονται εκτεθειμένα στο υδατικό περιβάλλον στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να διασχίζουν τη μεμβράνη μόνο μία φορά ή και παραπάνω. (Cooper and Hausman, 2007)

Οι περισσότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών μεμβρανών έχουν τροποποιηθεί χημικά μέσω της προσθήκης υδατανθράκων, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και μπορούν να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες μπορούν να συγκρατούνται αγκυροβολημένες στην πλασματική μεμβράνη μέσω λιπιδίων συνδεδεμένων, ομοιοπολικά στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να συνδέονται με την πλευρά της μεμβράνης που βρίσκεται από την πλευρά του κυτταροδιαλύματος μέσω της προσθήκης ενός λιπαρού οξέος με 14 άνθρακες στο N-τελικό τους άκρο ή μέσω της προσθήκης, κυστεϊνών στις πλευρικές αλυσίδες, ενός λιπαρού οξέος με 16 άνθρακες ή πρενυλικών ομάδων με 15 ή 20 άνθρακες. Διαφορετικά, οι πρωτεΐνες συνδέονται στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης μέσω προσθήκης γλυκολιπιδίων στο c-τελικό άκρο τους. (Cooper and Hausman, 2007)

Η μεμβράνη ρυθμίζει την κυκλοφορία των μορίων μέσα και έξω από το κύτταρο. Με εξαίρεση τα αέρια (π.χ.  $O_2$  και  $CO_2$ ) και μικρά υδρόφοβα μόρια, τα περισσότερα μόρια δεν μπορούν να διαχυθούν σε όλη τη φωσfolιπιδική διπλοστοιβάδα με ρυθμούς επαρκείς για να καλύψουν τις κυτταρικές ανάγκες. Τρεις κατηγορίες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεσολαβούν στη μεταφορά ιόντων, σακχάρων, αμινοξέων και άλλων μεταβολιτών μέσω των κυτταρικών μεμβρανών: αντλίες, κανάλια και μεταφορείς που τροφοδοτούνται με ATP. Κατά την ενεργό μεταφορά, μια πρωτεΐνη μεταφοράς συνδυάζει την κίνηση ενός υποστρώματος έναντι της κλίσης συγκέντρωσης προς την υδρόλυση ATP. Σε διευκολυνόμενη διάχυση, μια πρωτεΐνη μεταφοράς συνδράμει στην κίνηση ενός συγκεκριμένου υποστρώματος (μορίου ή ιόντος) κάτω από τη βαθμίδα συγκέντρωσης. Στη δευτερογενή ενεργό μεταφορά, ή μεταφορά από κοινού, μια πρωτεΐνη μεταφορέας συνδέει την κίνηση ενός υποστρώματος έναντι της κλίσης συγκέντρωσης προς την κίνηση ενός δεύτερου υποστρώματος προς τα κάτω στη βαθμίδα συγκέντρωσης. Η καταλύομενη από πρωτεΐνη μεταφορά μιας διαλυμένης ουσίας διαμέσου μιας μεμβράνης πραγματοποιείται πολύ γρηγορότερα από την παθητική διάχυση, εμφανίζει  $V_{max}$  όταν ο περιορισμένος αριθμός μορίων μεταφοράς είναι κορεσμένα με υπόστρωμα και είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο για το υπόστρωμα. Η διαλυμένη ουσία από πρωτεΐνη, διαμέσου μιας μεμβράνης, καταλύεται πολύ πιο γρήγορα

κατά την παθητική διάχυση, ενώ φαίνεται ότι εμφανίζει  $V_{max}$  όταν ο περιορισμένος αριθμός μορίων των μεταφορέων είναι δεσμευμένα με υποστρώμα, για το οποίο είναι και ιδιαίτερα εξειδικευμένοι.

Οι πρωτεΐνες μεταφορείς GLUTs, οι οποίες είναι μεταφορείς γλυκόζης, προτείνεται ότι μεταφέρονται μεταξύ δύο διαμορφωτικών καταστάσεων, μία κατά την οποία η θέση σύνδεσης του υποστρώματος βλέπει προς τα μέσα και μία προς τα έξω. Το σύνολο των μελών της οικογένειας πρωτεϊνών GLUT έχουν παρόμοια δομή και είναι ειδικά στη μεταφορά σακχάρων. Σημαντικές παράμετροι για τον μεταβολισμό του σακχάρου είναι το  $K_m$ , οι ιδιότητες των υποστρωμάτων και η έκφραση σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων.



Εικόνα 4: Μηχανισμοί μεταφοράς

### 1.2.5 Κανάλια και Μεταφορείς

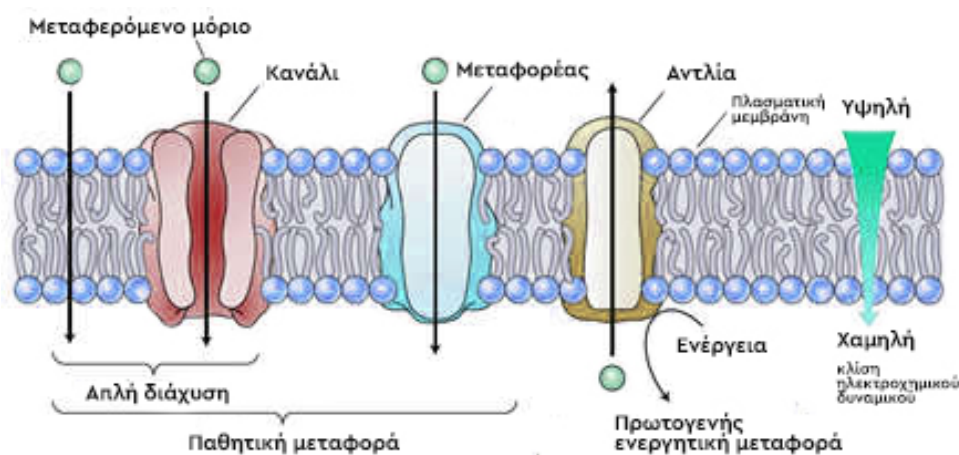
Τα κανάλια είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μονομερή ή ομο-ολιγομερή και διευκολύνουν την παθητική διάχυση ιόντων ή μικρών μορίων (π.χ. νερό ή ακετυλοχολίνη) κατάντη της συγκέντρωσής τους (από υψηλότερη προς χαμηλότερη) ή κάτω από ηλεκτροχημική συγκέντρωση. Επομένως, απαιτείται μικρή ενεργειακή αλληλεπίδραση μεταξύ μεταφερόμενου μορίου και καναλιού. Η παθητική μεταφορά ιόντων στον πόρο οδηγεί σε μια ροή που προσεγγίζει ένα ρυθμό  $10^6 - 10^7$  ιόντων/δευτερόλεπτο, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που διαφοροποιείται ένα κανάλι από έναν μεταφορέα. Τα κανάλια δεν είναι «τρύπες» στη μεμβράνη, αλλά είναι ιδιαίτερα επιλεκτικά για τα υποστρώματά τους. Η εκλεκτικότητα αυτή επιτυγχάνεται μέσω της ύπαρξης φίλτρων επιλεκτικότητας, τα οποία αποτελούνται από αμινοξικά κατάλοιπα, εξειδικευμένα για τα μόρια που μεταφέρονται μέσω του καναλιού. (Moran *et al.*, 2015)

Ένα συνεχώς προσπελάσιμο κανάλι θα οδηγούσε σε μαζικές ανεξέλεγκτες κινήσεις ιόντων και άλλων μορίων με καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Συγκεκριμένα στοιχεία πύλης υπάρχουν συχνότερα και στις δύο πλευρές της μεμβράνης, τα οποία ελέγχουν την προσβασιμότητα στα φίλτρα επιλεκτικότητας και επομένως στον πόρο του καναλιού. Και οι δύο πύλες έχουν τη δυνατότητα να ανοίγουν ταυτόχρονα, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τους μεταφορείς, όπου οι πύλες ανοίγουν κατ' εναλλαγή (Gadsby, 2009). Τα εξωτερικά σήματα που είναι υπεύθυνα για την εναλλαγή μεταξύ μιας

ανοικτής και μιας κλειστής κατάστασης των πυλών περιλαμβάνουν αλλαγές στην διαμεμβρανική τάση, τη σύνδεση των υποκαταστατών ή τη μηχανική καταπόνηση. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις καναλιών που διαθέτουν μια επιπλέον «υδρόφοβη πύλη» που μπορεί να προσαρμόζεται στις τοπικές αλλαγές στη διάμετρο και/ή την υδρόφιλη κατάσταση των πόρων του καναλιού λόγω μεταπτώσεων υγρού - ατμού του νερού μέσα στον πόρο (Aryal, Sansom and Tucker, 2015)

Οι μεταφορείς είναι πρωτεΐνες που μπορούν να διαμεσολαβούν στη μεταφορά υποστρώματος κατάντη της συγκέντρωσής του ή ενεργή μεταφορά μορίων από χαμηλή συγκέντρωση σε υψηλότερη και έτσι η λειτουργία τους συνδυάζεται με ενέργεια, εξ ου και ενεργός μεταφορέας. Με βάση το είδος της ενέργειας που συνδέεται με τη μεταφορά, ένας ενεργός μεταφορέας μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως κύριος ή δευτερέων ενεργός μεταφορέας. Οι μονομεταφορείς μεταφέρουν ένα υπόστρωμα κατάντη την ηλεκτροχημική του κλίση χωρίς συζευγμένη απελευθέρωση ενέργειας, αλλά σε αντίθεση με τα κανάλια, δεσμεύουν το υπόστρωμά τους και υφίστανται αλλαγές διαμόρφωσης για να το μεταφέρουν. Η πρωταρχική ενεργός μεταφορά επιτυγχάνεται με άμεση σύζευξη του μεταφερόμενου μορίου κατά τη σύνδεση και υδρόλυση του ATP, ενώ στη δευτερογενή ενεργό μεταφορά η κίνηση ενός μορίου κατά της ηλεκτροχημικής του κλίσης συνδυάζεται με την κίνηση ενός άλλου μορίου (συνήθως ιόντος) κάτω από την ηλεκτροχημική του κλίση. Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί για μόρια που κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση ή προς την αντίθετη. Ο μηχανισμός που διέπει τη λειτουργία του μεταφορέα φαίνεται να είναι πιο περίπλοκος από αυτόν ενός καναλιού και απαιτεί μεγαλύτερες διαμορφωτικές αλλαγές από ανοικτή σε κλειστή κατάσταση. Οι μεταφορείς έχουν επίσης πύλες. Φαίνεται ότι δύο πύλες και στις δύο πλευρές της μεμβράνης είναι απαραίτητες για τον διαδοχικό έλεγχο της προσβασιμότητας και της απελευθέρωσης υποστρωμάτων από και προς μια σημαντική, κεντρικά τοποθετημένη θέση σύνδεσης υποστρώματος. Αυτός ο μηχανισμός οδηγεί σε πολύ πιο αργό ρυθμό μεταφοράς περίπου 102-105 μορίων/δευτερόλεπτο σε σύγκριση με τον ρυθμό μεταφοράς των καναλιών (Dubyak, 2004). Μέχρι πρόσφατα, η ειδικότητα των μεταφορέων θεωρούνταν ότι εξαρτάται αποκλειστικά από την τοπολογική καταλληλότητα και τη δύναμη των αλληλεπιδράσεων υποστρωμάτων με συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα, όταν υπάρχουν σε μια μεγάλη, ελεύθερα προσβάσιμη, δεσμευτική τσέπη (Coutre and Ronald Kaback, 2000). Ωστόσο, αυτό το δόγμα αμφισβητήθηκε με την ανακάλυψη μεταλλάξεων που θα μπορούσαν επίσης να οδηγήσουν σε σημαντικές τροποποιήσεις της ειδικότητας (Diallinas, 2014).





**Εικόνα 5:** Είδη διαμεμβρανικής μεταφοράς (παθητική, ενεργητική) και ενσωματωμένων πρωτεϊνών (κανάλια, μεταφορείς, αντλίες)

## 1.3 Οικογένεια Μεταφορέων NAT/NCS2

Στην οικογένεια NAT/NCS2 (Nucleobase Ascorbate Transporter/Nucleobase Cion Symporter 2) συγκαταλέγονται πλήθος αλληλουχιών πρωτεϊνών που προέρχονται από Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά και ζώα. Οι πρωτεΐνες της NAT οικογένειας έχουν μήκος κατά κύριο λόγο από 414-650 αμινοξέα και είναι πιθανό να διαθέτουν 14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας (TMSs) και κυτταροπλασματικά N- και C-άκρα.

Τα χαρακτηρισμένα μέλη της NAT/NCS2 οικογένειας ανήκουν σε βακτήρια (*E. coli*, *B. subtilis*), μύκητες (*A. nidulans*, *A. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *C. albicans*), αλλά και σε φυτά (*Zea mays*) και θηλαστικά (ποντικός, αρουραίος, άνθρωπος). Είναι στη μεγάλη πλειονότητά τους συμμεταφορείς H<sup>+</sup> εξειδικευμένοι για οξειδωμένες πουρίνες (ξανθίνη, ουρικό οξύ) ή ουρακίλη. Ωστόσο, οι μυκητιακοί μεταφορείς ουρακίλης δεν ανήκουν στις NAT/NCS2 αλλά στην οικογένεια NCS1/PRT. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι μέλη της οικογένειας από θηλαστικά, SVCT1 και SVCT2, οι οποίοι είναι συμμεταφορείς ασκορβικού / Na<sup>+</sup>, εμφανίζουν υψηλή συγγένεια και βαθμό ειδικότητας και για το ασκορβικό (βιταμίνη C) (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Τα φυτά έχουν πολλούς μεταφορείς NAT/NCS2. Ωστόσο, με γνωστή λειτουργία είναι μόνον ο Lpe1. Ο Lpe1 είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης ο οποίος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη χλωροπλαστών στο καλαμπόκι (*Zea mays*). (Liang, Johnson and Jarvis, 2001)

Η οικογένεια NAT/NCS2 (Nucleobase Ascorbate Transporter/Nucleobase Cion Symporter 2) περιλαμβάνει μέλη από όλους τους τομείς της ζωής. Η οικογένεια NAT ορίστηκε από την κλωνοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μεταφορέων UapC και UapA ουρικού οξέος - ξανθίνης των *A. nidulans* και των μεταφορέων ουρακίλης UraA και PyrP των *E. coli* και *B. subtilis* αντίστοιχα (Gournas *et al.* 2008, Diallinas and Gournas 2008 για κριτικές και αναφορές σε αυτό). Οι πρωτεΐνες NAT είναι συμπαραγωγείς

H<sup>+</sup> ή Na<sup>+</sup> και είναι ειδικές για πουρίνες, ανάλογα πουρίνης, πυριμιδίνες, συμπεριλαμβανομένων καθιερωμένων αναλόγων που χρησιμοποιούνται στη φαρμακολογική πρακτική (π.χ. οξυπουρινόλη, αλλοπουρινόλη) ή ασκορβικό οξύ (Diallinas and Gournas, 2008; Faaland et al., 1998; Gournas et al., 2008 · Tsukaguchi et al., 1999). Αυτή η οικογένεια συμπεριλαμβάνεται πλέον στην υπεροικογένεια APC (Wong et al., 2012). Τα μέλη της οικογένειας NAT προτάθηκε αρχικά ότι έχουν 12 TMS, αλλά η κρυσταλλική δομή του μεταφορέα ουρακίλης UraA από *E. coli* αποκάλυψε ότι η δομή περιλαμβάνει 14 TMS (Lu et al., 2011).

Η οικογένεια Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT), επίσης γνωστή ως οικογένεια Nucleobase-Cation Symporter 2 (NCS2), περιλαμβάνει χιλιάδες μέλη σχεδόν στην πλειοψηφία των οργανισμών και των ειδών (Diallinas and Gournas, 2008; Papageorgiou et al., 2008; Frillingos, 2012). Οι πρωτεΐνες NAT αποτελούνται από 14 α-ελικοειδή υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα (TMS) και κυτταροπλασματικές N και C-τερματικές περιοχές, καθώς και σημαντική συνολική ομοιότητα αλληλουχίας αμινοξέων (>24% μεταξύ βακτηρίων, μυκήτων, φυτών, θηλαστικών) και διατηρημένα μοτίβα. Τα δύο πιο καλά διατηρημένα μοτίβα, που βρίσκονται στο TMS1 (Gln-His) και το TMS10 (Gln/Glu/Pro-Asn-X-Gly-X4-Thr-Arg/Lys/Gly), χρησιμεύουν ως πρόσθετα κριτήρια για τον εντοπισμό μεταφορέων της οικογένειας NAT. Αυτά τα μοτίβα αποτελούν, επίσης, μέρος της θέσης δέσμευσης υποστρώματος των NAT (Amillis et al., 2011; Karena and Frillingos, 2011; Kosti et al., 2012). Τα περισσότερα μέλη που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα είναι Na<sup>+</sup> (θηλαστικά) ή H<sup>+</sup> (βακτήρια, μύκητες, φυτά) συζευγμένοι συμμεταφορείς ειδικοί για την κυτταρική πρόσληψη ξανθίνης, ουρικού οξέος ή ουρακίλης, συναφή ανάλογα ή φάρμακα. Είναι ενδιαφέρον ότι στα πρωτεύοντα, οι μεταφορείς NAT είναι αποκλειστικά ειδικοί για τη μεταφορά L-ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Μια ιδέα που προκύπτει από τις μελέτες για το UraA είναι ότι η εξειδίκευση του υποστρώματος δεν καθορίζεται μόνο από την κύρια θέση δέσμευσης υποστρώματος, αλλά και από τη λειτουργία περιοχών πύλης που ομοιάζουν με κανάλια (Diallinas, 2008, 2014). Αυτές οι πύλες υπάρχουν στην εσωτερική και εξωτερική πλευρά των μεταφορέων και ο προφανής τους ρόλος είναι να ανοίγουν και να κλείνουν κατά τη δέσμευση και την απελευθέρωση του υποστρώματος (Papageorgiou et al., 2008; Kosti, Papageorgiou and Diallinas, 2010). Ωστόσο, καθώς οι τομείς πύλης δεν είναι εκτεταμένα διατηρημένοι και λειτουργούν με διαφορετικούς μηχανισμούς σε διαφορετικούς μεταφορείς (Kazmier et al., 2014; Penmatsa and Gouaux, 2014; Simmons et al., 2014), οι προβλέψεις σχετικά με την ειδικότητα του υποστρώματος δεν είναι απλές. (Kryptou, Scazzocchio and Diallinas, 2015)

Οι μεταφορείς NAT έχουν επίσης την ικανότητα να μεσολαβούν στην πρόσληψη τοξικών αναλόγων πουρίνης (Goudela et al., 2008; Yamamoto et al., 2010).

|                    |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |                    |          |
|--------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|--------------------|----------|
| SVCT1_R.norvegicus | 491 | - | P | N | I | G | V | L | G | I | T | K | - 500 | ασκορβικό          |          |
| PyrP_L.lactis      | 306 | - | E | N | I | G | V | M | A | I | T | K | - 315 | ουρακίλη           |          |
| YedG_E.coli        | 331 | - | E | N | I | G | V | M | A | V | T | K | - 340 |                    |          |
| UraA_E.coli        | 290 | - | E | N | I | G | L | V | M | A | I | T | R     | - 299              | ουρακίλη |
| Lpe1_Z.mays        | 346 | - | E | N | A | G | L | L | A | V | T | R | - 355 | ουρικό οξύ/ξανθίνη |          |
| UapA_A.nidulans    | 449 | - | Q | N | N | G | V | I | A | L | T | R | - 458 | ουρικό οξύ/ξανθίνη |          |
| UapC_A.nidulans    | 407 | - | Q | N | N | G | V | I | A | L | T | R | - 416 | ουρικό οξύ/ξανθίνη |          |
| Xut1_C.albicans    | 386 | - | Q | N | N | G | V | I | S | I | T | K | - 395 | ουρικό οξύ/ξανθίνη |          |
| YgfO_E.coli        | 324 | - | Q | N | N | G | V | I | Q | M | T | G | - 333 | ξανθίνη            |          |
| YicE_E.coli        | 336 | - | Q | N | N | G | V | I | Q | L | T | G | - 345 | ξανθίνη            |          |
| PbuX_B.subtilis    | 293 | - | Q | N | V | G | L | B | Q | L | T | G | - 302 | ξανθίνη            |          |
| PucJ_B.subtilis    | 298 | - | Q | N | A | G | L | L | Q | L | T | G | - 307 | ουρικό οξύ         |          |
| YcpX_C.perfringens | 169 | - | Q | N | I | G | I | I | S | L | T | G | - 178 | πουρίνη            |          |
| YgfU_E.coli        | 341 | - | Q | N | V | G | L | V | S | V | T | G | - 350 |                    |          |
| YbbY_E.coli        | 306 | - | S | S | I | G | L | L | T | Q | T | G | - 315 |                    |          |
| YgfQ_E.coli        | 328 | - | E | S | A | A | G | T | A | A | G | G | - 337 |                    |          |
| YjcD_E.coli        | 322 | - | E | S | A | A | G | T | A | A | G | G | - 331 |                    |          |
| YicO_E.coli        | 345 | - | E | S | T | S | G | V | A | V | G | G | - 354 |                    |          |
| YieG_E.coli        | 318 | - | E | S | S | S | G | V | S | V | G | G | - 327 |                    |          |

**Πίνακας 2: Στοιχισή με ClustalW που αναδεικνύει το διατηρημένο μοτίβο των NAT/NCS2 πρωτεϊνών. Οι διατηρημένες θέσεις είναι σημειωμένες στον πίνακα, [Q/E/P], N, G, T, και [R/K/G]**

(Karatza and Frillingos, 2005)

## 1.4 Μεταφορέας UapA

Ο *A. nidulans* έχει δύο μεταφορείς που ανήκουν στη NAT/NCS2 οικογένεια και ονομάζονται UapA και UapC. Ο UapA αποτελείται από 574 αμινοξέα και είναι υψηλής συγγένειας και ενεργότητας μεταφορέας που ευθύνεται για την πρόσληψη του ουρικού οξέος και ξανθίνης, όπως επίσης για τη μεταφορά 2-θειοουρικού, 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλο-ξανθίνης, αλλοπουρινόλης ή οξυπουρινόλης, αλλά όχι υποξανθίνης ή αδερίνης. (Diallinas and Scazzocchio, 1989) Ο UapA έχει χαρακτηριστεί όσον αφορά τη μεταγραφική και κυτταρική του ρύθμιση, την έκφραση κατά τη διάρκεια του αγενούς ή σεξουαλικού κύκλου, τις σχέσεις δομής-λειτουργίας που καθορίζουν την εξειδίκευση και τη σταθερότητα του (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis, Karagouni and Diallinas, 2000; Koukaki *et al.*, 2005; Vlanti *et al.*, 2006; Pantazopoulou and Diallinas, 2007; Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti, Papageorgiou and Diallinas,

2010; Amillis *et al.*, 2011), ενώ προσφάτως λύθηκε και η κρυσταλλογραφική του δομή (Alguel *et al.*, 2016). (Kryptou, Scazzocchio and Diallinas, 2015)

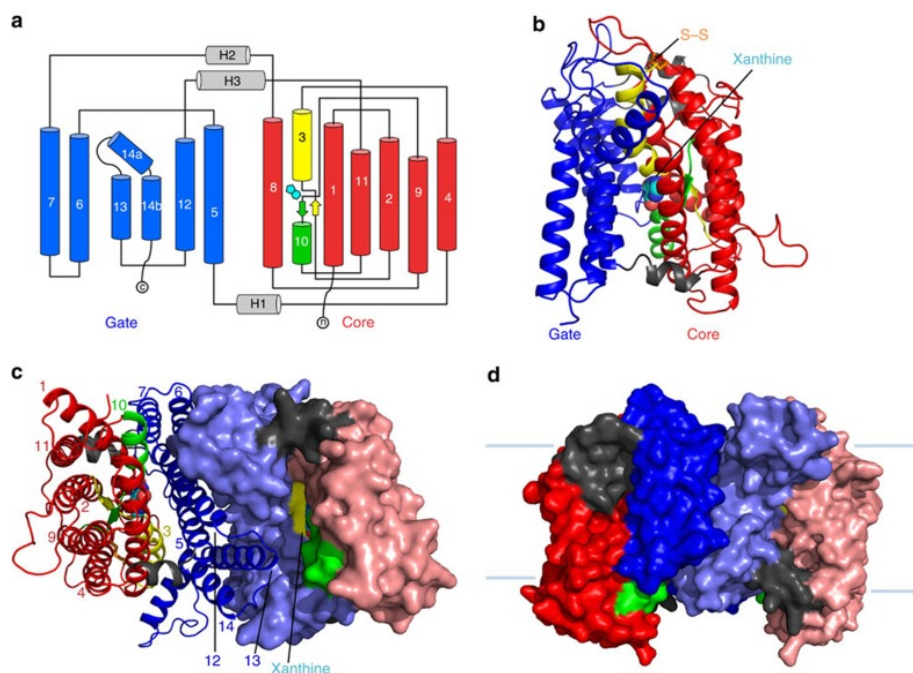
Ο UapA ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων NAT/NCS2. Είναι ένας υψηλής συγγένειας και υψηλής μεταφορικής ικανότητας μεταφορέας ξανθίνης - ουρικού οξέος που λειτουργεί ως συμμεταφορέας πρωτονίων (H<sup>+</sup>) στον νηματοειδή ασκομύκητα *A. nidulans*. Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα αμινοξέα (E356, Q408, N409) στις διαμεμβρανικές περιοχές του 8 - 9 (TMS8-9) αποτελούν κομβικά στοιχεία του κέντρου πρόσδεσης και μεταφοράς των πουρινών, ενώ άλλα εκτός του κέντρου δέσμησης υποστρωμάτων (TMS1-2, TMS9, TMS10-11 & TMS12) εμπλέκονται στο μηχανισμό εξειδίκευσης για συγκεκριμένα υποστρώματα, υποδεικνύοντας την ύπαρξη εκλεκτικών «θυρών» διαπερατότητας σε μεταφορείς. Ο UapA δεσμεύει το υπόστρωμα από τις θέσεις N1 και N9 του πουρινικού δακτυλίου. Η περιοχή TMS8-9 συμμετέχει στον μηχανισμό δέσμησης από τη θέση 9. (Alguel *et al.*, 2016)

Ο UapA είναι ένας εντατικά μελετημένος μεταφορέας, λόγω της ανάπτυξης απλών κυτταρικών, γενετικών και βιοχημικών δοκιμασιών, σε έναν οργανισμό μοντέλο, όπως ο *A. nidulans* (Diallinas and Gournas, 2008). Τέτοια πειράματα μας επέτρεψαν να αποκτήσουμε μια εικόνα των καταλοίπων που είναι κρίσιμα για τη δέσμηση και τη μεταφορά ξανθίνης από τον UapA, αλλά να απομονώσουμε επίσης τυχαίες μεταλλάξεις που αλλάζουν την ειδικότητα της πρωτεΐνης και επιτρέπουν τη μεταφορά μη φυσικών υποστρωμάτων (Papageorgiou *et al.*, 2008; Kosti, Papageorgiou and Diallinas, 2010; Kosti *et al.*, 2012). Οι μεταλλάξεις φαίνεται να μη συμβαίνουν στη θέση σύνδεσης, αλλά μάλλον σε θέσεις που δεν θα μπορούσαν να είχαν προβλεφθεί εκ των προτέρων. Σε ένα πείραμα, 20 στις 28 αμερόληπτες μεταλλάξεις που επέτρεψαν στον *A. nidulans* να δεσμεύσει υποξανθίνη παρατηρήθηκε ότι περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του Arg481 (Kosti, Papageorgiou and Diallinas, 2010). Ωστόσο, η λύση της δομής του ομόλογου *E. coli*, UraA, (Lu *et al.*, 2011) απέτυχε να παράσχει επαρκή εξήγηση για αυτή, ή για άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ειδικότητα. Ο UapA υπάρχει ως διμερές στη μεμβράνη και σε διάλυμα με απορρυπαντικό. Όπως και με άλλους μεταφορείς (Torres *et al.*, 2003), υπάρχουν ενδείξεις ότι ο ολιγομερισμός του UapA είναι σημαντικός για τη μεταφορά του UapA στη μεμβράνη πλάσματος (Martzoukou *et al.*, 2015). Ο ολιγομερισμός προτείνεται να έχει δυνητικό ρόλο στη λειτουργία άλλων μεταφορέων, ωστόσο, αυτές οι παρατηρήσεις δεν διαθέτουν λεπτομερές δομικό πλαίσιο (F Kilic, 2000; JK De Zutter, 2013; Zhen *et al.*, 2015). Η λύση της δομής του UapA έδειξε ότι ο διμερισμός παίζει βασικό ρόλο στη λειτουργία του μεταφορέα. (Alguel *et al.*, 2016)

### 1.4.1 Η δομή του UapA

Ο UapA, όπως και πολλές άλλες πρωτεΐνες μεταφοράς μεμβράνης, είναι διμερές. Αυτό έχει αποδειχθεί σημαντικό για τη σωστή διακίνηση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη του πλάσματος. (Martzoukou *et al.*, 2015) Ο σχηματισμός διμερών είναι επίσης σημαντικός τόσο για την ειδικότητα όσο και για τη μεταφορά. Η κρυσταλλική δομή δείχνει ότι το N άκρο του TM 13 της μίας υπομονάδας,

συμπεριλαμβανομένης της πλευρικής αλυσίδας του Arg481, συμβάλλει στο κανάλι μετατόπισης της αντίθετης υπομονάδας προς τα μέσα. (Alguet *et al.*, 2016) Το Arg481 είναι κατάλοιπο το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο σε πειράματα γενετικής επιλογής που έχουν σχεδιαστεί με σκοπό να τροποποιήσουν την ειδικότητα της πρωτεΐνης, ώστε να επιτρέπεται η μεταφορά του μη φυσικού υποστρώματος, υποξανθίνης (Kosti, Papageorgiou and Diallinas, 2010). Είναι πιθανό το Arg481 από το αντίθετο μονομερές να λειτουργεί ως ένα από τα πολλά σημεία ελέγχου που διασφαλίζουν τη μεταφορά του σωστού υποστρώματος. Οι κυρίαρχες μεταλλάξεις με αρνητική επίδραση δείχνουν ότι η μία υπομονάδα επηρεάζει τη λειτουργία της άλλης όσον αφορά τη μεταφορά υποστρώματος. Ο δομικός μηχανισμός για αυτό το κυρίαρχο αρνητικό αποτέλεσμα είναι αρκετά δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Υπάρχουν διάφοροι δείκτες που οδηγούν πιθανώς σε έναν μηχανισμό τύπου «ανελκυστήρα» για τον UapA, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος ότι η ξανθίνη αλληλεπιδρά αποκλειστικά με κατάλοιπα της περιοχής του πυρήνα. Επιπλέον, η σύγκριση του UapA που βλέπει προς τα μέσα με τον δομικά ομόλογο AE1 που βλέπει προς τα έξω (Arakawa *et al.*, 2015) αποκαλύπτει μια αλλαγή αρκετά σημαντική. Κατ' επέκταση, ομόλογοι μεταφορείς συμπεριλαμβανομένων των ανταλλακτών ανιόντων (Arakawa *et al.*, 2015; Geertsma *et al.*, 2015) μπορούν επίσης να χρησιμοποιούν τον μηχανισμό «ανελκυστήρα». Οι περισσότερες μεταλλαγές του UapA που προσδιορίζονται στην αμερόληπτη σάρωση (screening) και επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να μεταφέρει μη φυσικά υποστρώματα (υποξανθίνη, αδενίνη) φαίνονται είτε στη διεπαφή μεταξύ πυρήνα και πύλης είτε στο σημείο σύνδεσης μεταξύ των δύο τμημάτων. Οι μεταλλάξεις μπορεί να έχουν μικρές επιπτώσεις στη μεταφορά αλλάζοντας τις σχετικές θέσεις της περιοχής πυρήνα και πύλων. Είναι πιθανό και άλλες διαμορφωτικές αλλαγές εκτός από την κίνηση του ανελκυστήρα να απαιτούνται κατά τη μεταφορά, όπως φαίνεται για άλλες πρωτεΐνες (Shi, 2013). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν σύζευξη μεταξύ των υπομονάδων του UapA. Ο διμερισμός UapA παίζει ρόλο στη βελτίωση της διαδικασίας επιλεκτικότητας υποστρώματος. (Alguet *et al.*, 2016)

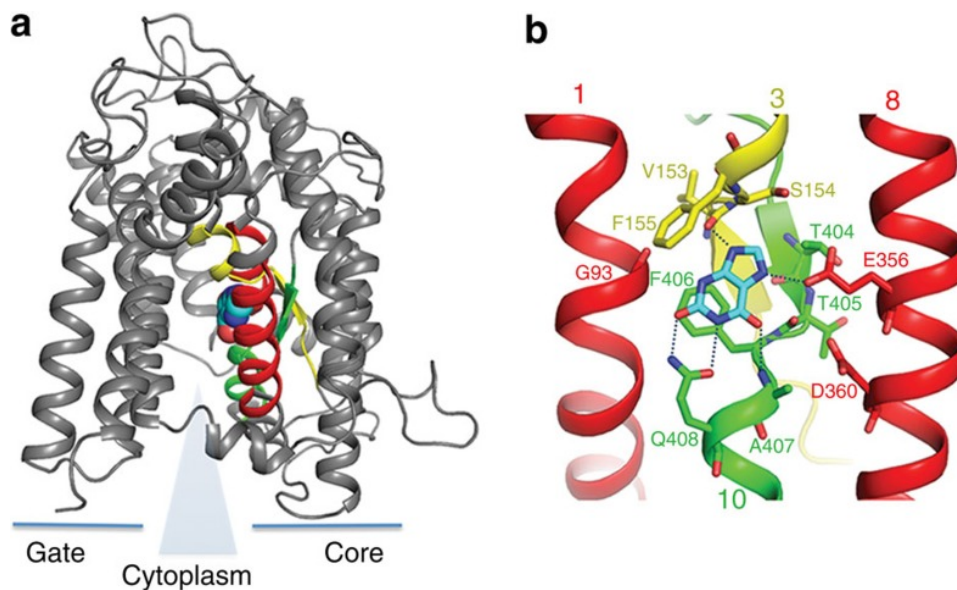


**Εικόνα 6: Δομή του UapA**

Στην εικόνα 12 φαίνεται (α) το διάγραμμα τοπολογίας του UapA. Τα α-έλικες αντιπροσωπεύονται από κυλίνδρους και β-πτυχωτές με βέλη. Η θέση δέσμευσης υποστρώματος μεταξύ των N- άκρων των TMs 3 και 10 υποδεικνύεται από την θέση της ξανθίνης (κυανό). Η πρωτεΐνη είναι διατεταγμένη σε δύο περιοχές, ένα πεδίο πύλης που αποτελείται από TMs 5-7, 12-14 (μπλε) και ένα βασικό πεδίο που αποτελείται από TMs 1-4, 8-11 (κόκκινο). Οι μισές έλικες και οι βραχείες περιοχές β-κλώνου των TMs 3 και 10 (και τα δύο μέρη του πυρήνα) είναι χρωματισμένα κίτρινα και πράσινα, αντίστοιχα. (β) Αναπαράσταση του μονομερούς UapA. Ο τομέας πύλης εμφανίζεται με μπλε χρώμα, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του τομέα πυρήνα εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα. Οι αμφιπαθικές έλικες που συνδέουν τους τομείς πυρήνα και πύλης εμφανίζονται με γκρι χρώμα. Με πορτοκαλί σημειώνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Μόνο τα άκρα N-τελικών (υπολείμματα 12–65) και C-τελικών (υπολείμματα 546–574) λείπουν από τη δομή. (γ) Διμερές UapA από την κυτταροπλασματική πλευρά. (δ) Αναπαράσταση της επιφάνειας του διμερούς. Οι απαλές μπλε γραμμές δείχνουν την πιθανή θέση της μεμβράνης (Alguet *et al.*, 2016)

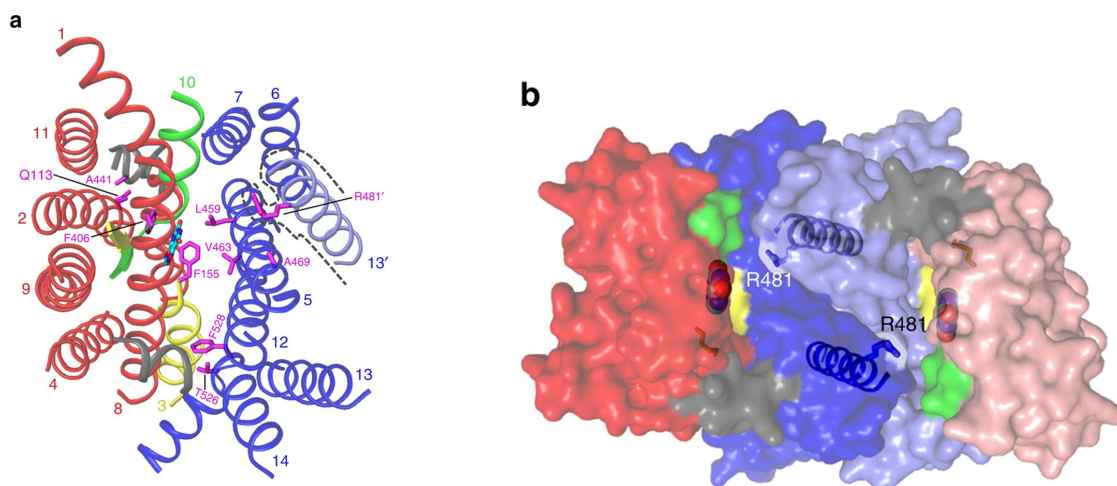


### 1.4.2 Μηχανισμός δράσης UapA



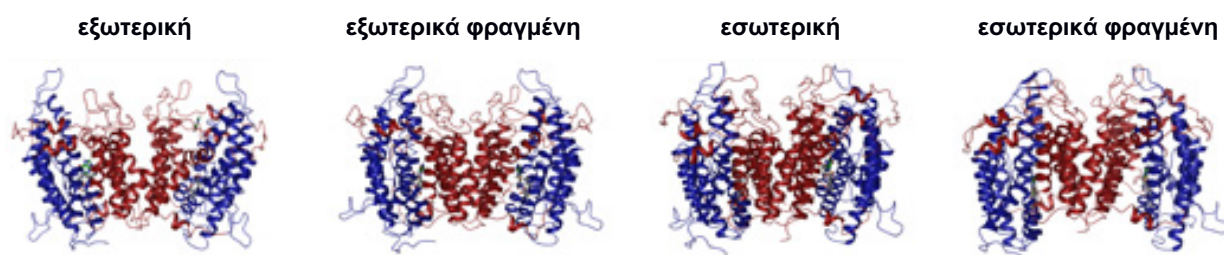
Εικόνα 7: Περιοχές δέσμευσης υποστρώματος και περιοχές ειδικότητας του UapA

Στην εικόνα 13 διακρίνουμε: (α) Ένα μονομερές UapA που εμφανίζεται σε γκρι χρώμα με τις βασικές περιοχές σύνδεσης υποστρώματος της πρωτεΐνης χρωματισμένες. Το μπλε τρίγωνο δείχνει το κανάλι μετατόπισης γεμάτο με διαλύτη από τη θέση σύνδεσης υποστρώματος στο κυτόπλασμα. Η ξανθίνη εμφανίζεται σε κυανό μοντέλο γεμίσματος χώρου. (β) Τοποθεσία δέσμευσης ξανθίνης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στη δέσμευση υποστρώματος επισημαίνονται. Οι ομάδες πλευρικής αλυσίδας και κύριας αλυσίδας των Glu356, Gln408 και Ala407 και οι ομάδες κύριας αλυσίδας των Phe155, Val153 βρίσκονται όλες σε απόσταση που επιτρέπει την δημιουργία δεσμών υδρογόνου με την ξανθίνη. Ουσιαστικά οι κύριες επαφές είναι μεταξύ του αμιδίου N του Phe155 και του N9 της ξανθίνης, Glu356 και N7-H, Gln408 και N1-H και C2=O, και του αμιδίου N του Ala407 και C6=O. Οι ομάδες πλευρικής αλυσίδας Phe155 και Phe406 πακετάρονται επίσης γύρω από την ξανθίνη. Άλλα κατάλοιπα από τις περιοχές TM 1, 3 και 8 συμβάλλουν στην αρχιτεκτονική της θέσης σύνδεσης όπως υποδεικνύεται. (Alguel *et al.*, 2016)



**Εικόνα 8: Ειδικότητα υποστρώματος UapA**

Στην εικόνα 8 μπορεί να διακρίνει κανείς: (α) Τη θέση των διαφόρων καταλοίπων που εμπλέκονται στην ειδικότητα του υποστρώματος. Οι ελικοειδείς περιοχές της πρωτεΐνης παρουσιάζονται ως κύλινδροι χρωματισμένοι. Το TM 13 από το αντίθετο μονομερές δείχνεται με ανοιχτό μπλε χρώμα και υποδεικνύεται από τη μαύρη διακεκομμένη γραμμή, η οποία εντοπίζεται γύρω από την επιφάνεια του TM. Τα μεμονωμένα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην εξειδίκευση του υποστρώματος παρουσιάζονται στο μοντέλο με χρώμα φούξια και επισημαίνονται. Η ξανθίνη εμφανίζεται με κυανό. (β) Τη δομή του διμερούς UapA ως αναπαράσταση επιφάνειας που δείχνει την εγγύτητα του R481 από το αντίθετο μονομερές, προς τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος. Το TM 13 και στα δύο μονομερή παρουσιάζεται σε αναπαράσταση κορδέλα (ribbon), με το R481 να υποδεικνύεται σε αναπαράσταση ράβδου (stick). Η ξανθίνη εμφανίζεται με άτομα άνθρακα κυανίου. (Alguet *et al.*, 2016)



**Εικόνα 9: Οι 4 διαμορφώσεις του μεταφορέα UapA**

Τα 3 μοντέλα του μεταφορέα UapA (διμερές) που προέρχονται από ομόλογη μοντελοποίηση και το κρυσταλλογραφικό στην εσωτερική διαμόρφωση. Ο βασικός τομέας (μπλε) κινείται προς τον τομέα πύλης (κόκκινος) ο οποίος είναι άκαμπτος. Το σχήμα υπογραμμίζει με απλοποιημένο τρόπο πώς αλλάζει η τοπολογία των τερματικών ανάλογα με τη συνολική διαμόρφωση του μεταφορέα (δηλαδή προς τα έξω, απόφραξη, προς τα μέσα) και αυτή η τροποποιημένη διαμόρφωση είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση και των δύο ενδομοριακών συμβάντων (π.χ. δραστηριότητα μεταφοράς, αλλοστερική ρύθμιση) και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (δηλαδή πανταχού παρούσα, ενδοκυττάρωση, διαλογή, σηματοδότηση

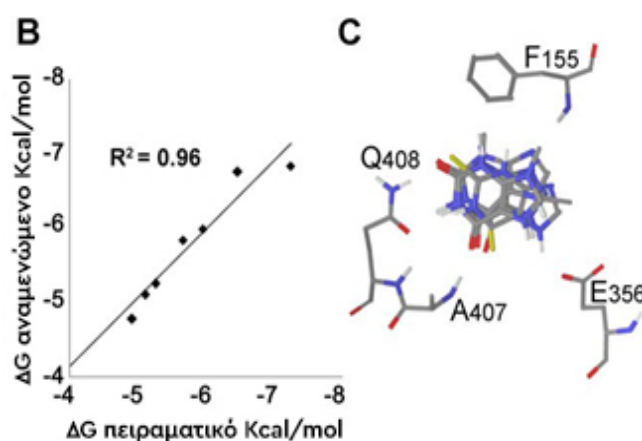


κ.λπ.). Στην εξωτερική διαμόρφωση, οι ουρές N και C βρίσκονται σε στενότερη επαφή με άλλους τομείς του μεταφορέα από ό,τι στην εσωτερική διαμόρφωση.

## 1.5 UapA και χημική συγγένεια αναλόγων ξανθίνης

Έχει προσδιοριστεί πειραματικά η χημική συγγένεια αναλόγων ξανθίνης με τον UapA. Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν για κάθε σημείο συγκέντρωσης. Η τυπική απόκλιση ήταν <20%. (Parageorgiou *et al.*, 2008)

Ο UapA αντιμετωπίστηκε ως μονομερές και ως διμερές. Η ύπαρξη ή απουσία λιπιδικής διπλοστιβάδας στους υπολογισμούς μας εξετάστηκε, προκειμένου να παραχθεί το πιο ακριβές μοντέλο πρόβλεψης και να διερευνηθεί πώς η διπλή στιβάδα λιπιδίων μπορεί να επηρεάσει τη συγγένεια σύνδεσης.



Εικόνα 10: Αναμενόμενο vs πειραματικό  $\Delta G_{\text{binding}}$

(C) Υπέρθωση αναλόγων ξανθίνης στο σημείο πρόσδεση στον μεταφορέα UapA όπως προτείνεται από το τελικό μοντέλο. (Kosti *et al.*, 2012)

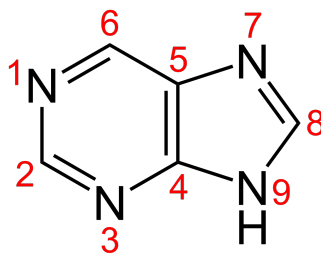
|                        | $K_{m/i}$ ( $\mu M$ ) | $\Delta G^\circ$ (kJ/mol) | $\Delta \Delta G^\circ \text{exp}$ (kcal/mol) |
|------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|
| ξανθίνη                | 7                     | -30,6                     | 0,0                                           |
| 1-μεθυλο-ξανθίνη (1MX) | 280                   | -21,0                     | 2,30                                          |
| 2-θειο-ξανθίνη (2SX)   | 63                    | -25,0                     | 1,34                                          |
| 3-μεθυλο-ξανθίνη (3MX) | 28                    | -27,0                     | 0,86                                          |
| 6-θειο-ξανθίνη (6SX)   | 346                   | -20,1                     | 2,51                                          |
| 8-μεθυλο-ξανθίνη (8MX) | 100                   | -23,8                     | 1,63                                          |

Πίνακας 3: Πειραματικά προσδιορισμένα  $K_{m/i}$  και  $\Delta G^\circ$  και το αναμενόμενο  $\Delta \Delta G^\circ$  το οποίο υπολογίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα

## 1.6 Πουρίνες

### 1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η πουρίνη είναι ένας αρωματικός ετερόκυκλο που αποτελείται από άνθρακα και άζωτο. Οι πουρίνες έχουν  $\text{NH}_2$  ομάδα και οξοομάδες που εμφανίζουν κετο-ενόλη και ταυτομερισμό αμίνης - ιμίνης, αν και κυριαρχούν οι αμινο- και οξομορφές φυσιολογικές συνθήκες. Η βασική πουρίνη έχει εννέα άτομα στη δομή της. Έχει δύο κύκλους: έναν εξαμελή δακτύλιο πυριμιδίνης και έναν πενταμελή δακτύλιο ιμιδαζόλης συντηγμένο μεταξύ τους. Τέσσερα άτομα αζώτου είναι παρόντα στις θέσεις 1, 3, 7 και 9. Η αρίθμηση της πουρίνης ξεκινά με το πρώτο άζωτο του εξαμελούς δακτυλίου και στη συνέχεια προχωρά αριστερόστροφα. Ο δακτύλιος ιμιδαζόλης αριθμείται δεξιόστροφα. Άλλες σημαντικές πουρίνες περιλαμβάνουν υποξανθίνη, ξανθίνη, θεοβρωμίνη, καφεΐνη, ουρικό οξύ και ισογουανίνη. Οι βάσεις πουρίνης συνδέονται με τον C-1 των πεντοζών μέσω του ένατου ατόμου αζώτου για να σχηματίσουν νουκλεοζίτες. (Kumari, 2018)



Εικόνα 11: Γενική 2D δομή πουρινών με σημειωμένη αρίθμηση των ατόμων

Οι πουρίνες εμπλέκονται σε διεργασίες σε όλους τους οργανισμούς και είναι ζωτικής σημασίας ενώσεις, διότι πρόκειται για απαραίτητα συστατικά των νουκλεοτιδίων και κατ' επέκταση των νουκλεϊκών οξέων, ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και καταβολικά ως πηγές άνθρακα ή/και αζώτου.

Στις πουρίνες συγκαταλέγονται η αδενίνη και η γουανίνη, οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό DNA και RNA. Οι πουρίνες είναι επίσης συστατικά άλλων σημαντικών βιομορίων, όπως ATP, GTP, κυκλικό AMP, NADH και συνένζυμο A. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που περιέχει την πουρίνη αδενίνη αποτελεί το «νόμισμα» της ενέργειας σε όλα τα βιολογικά συστήματα, ενώ παράγωγα νουκλεοτιδίων συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η UDP-γλυκόζη στη σύνθεση του γλυκογόνου. Κυκλικά νουκλεοτίδια, όπως τα cGMP και cAMP αποτελούν

«αγγελιοφόρους» που μεταβιβάζουν τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά σήματα. (Stryer, Berg and Tymoczko, 2002)

Οι νουκλεοτιδικές βάσεις παίζουν κομβικό ρόλο στα φυτά, καθώς συμμετέχουν στη μεταφορά και αποθήκευση του αζώτου με τη μορφή ουρεΐδων (αλλαντοϊκό, αλλαντοΐνη), η οποία εξαρτάται από τη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό των νουκλεοτιδικών βάσεων (Schubert and Boland, 1990).

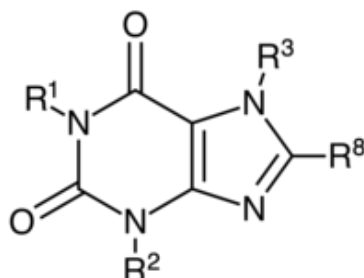
## 1.6.2 Σημασία Πουρινών

Οι πουρίνες είναι τα βασικά δομικά στοιχεία πολλών σημαντικών μορίων ζωτικής φυσιολογικής σημασίας. Το πιο σημαντικό μόριο πουρίνης είναι η 5'-τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) στην οποία αποθηκεύεται το 95% της χημικής ενέργειας και από την οποία προέρχεται ενέργεια για να προκαλέσει πολυάριθμες ενεργειακά εξαρτώμενες αντιδράσεις. Το ATP είναι απαραίτητο για τη δημιουργία του δεύτερου αγγελιοφόρου cAMP και τη ρύθμιση πολλών ευαίσθητων σε ATP ενζύμων, καναλιών. Το ATP είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση ιοντικών διαβαθμίσεων, απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, αποπόλωση και αγωγή νευρών, γονιδιακή έκφραση και σύνθεση νουκλεϊκών και δεοξυνουκλεϊκών οξέων (RNA και DNA) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μυοκαρδίου και της καρδιακής επιδιόρθωσης. Το ATP και τα παράγωγά του (ADP, AMP, αδενοσίνη και cAMP) είναι ζωτικής σημασίας για πολλά μοριακά κυτταρικά γεγονότα που είναι υπεύθυνα και ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο και τη συσταλτική δραστηριότητα στην καρδιά. (Abd-Elfattah *et al.*, 1996)

Τα ριβο- μονονουκλεοτίδια πουρίνης και πυριμιδίνης που συσσωρεύονται είτε *de novo*, είτε από τη συνθετική οδό φωσφορυλιώνονται μέσω του αντίστοιχου διφωσφορικού στο τριφωσφορικό, το οποίο είναι η ενεργή ενδοκυτταρική μορφή των περισσότερων μονονουκλεοτιδίων. Εκτός από την ποικιλία των ζωτικών μεμονωμένων κυτταρικών λειτουργιών που περιγράφονται παραπάνω, αυτά τα ριβο- μονονουκλεοτίδια είναι βασικά ενδιάμεσα στη σύνθεση των πολυνουκλεοτιδίων RNA και DNA αντίστοιχα, ενσωματωμένα στο DNA μετά τον σχηματισμό του δεοξυριβονουκλεοτιδίου από το αντίστοιχο διφωσφορικό από το ένζυμο ριβονουκλεοτιδική αναγωγή. Το τελευταίο είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο. Η δραστηριότητα και η εξειδίκευσή του ελέγχονται με περίπλοκο τρόπο τόσο από πουρίνη όσο και από πυριμιδίνη ριβό- και δεοξυ- ριβονουκλεοτίδια. Αυτή η διαδικασία είναι ιδιαίτερα ενεργή σε κύτταρα και ιστούς με υψηλό ρυθμό εναλλαγής (π.χ. λεμφοκύτταρα, επιθήλιο του εντέρου, δέρμα, μυελό των οστών κ.λπ.). Υπάρχει περίπου πέντε φορές περισσότερο RNA και DNA στο σώμα. (Simmonds, 2003)

Η περίσσεια πουρίνης, είτε προκαλείται από υπερπαραγωγή, είτε από ανεπαρκή διάσωση, είτε από αναποτελεσματική απέκκριση από μαζική καταστροφή κυττάρων, είτε από υψηλή πρόσληψη πουρίνης, μπορεί να οδηγήσει σε υπερουριχαιμία -ειδικά σε πρωτεύοντα ζώα στα οποία η πρόσληψη ουρικού οξέος στα ηπατοκύτταρα μειώνεται. Λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας του ουρικού οξέος, η υπερουριχαιμία μπορεί να οδηγήσει σε κατακρήμνιση του ουρικού οξέος στο ουροποιητικό σύστημα και

στις αρθρώσεις, προκαλώντας ουρική αρθρίτιδα με την παρεμπόδιση του ουροποιητικού συστήματος (ουρολιθίαση) και οδυνηρό πρήξιμο των αρθρώσεων. Η υπερουριχαιμία και η ουρική αρθρίτιδα στους ανθρώπους μπορεί επίσης να προκύψουν από δύο τύπους γενετικών ελαττωμάτων -το ένα προκαλεί απώλεια ελέγχου ανατροφοδότησης της συνθετάσης PRPP και το άλλο οδηγεί σε ανεπάρκεια των ενζύμων APRT και HGPRT. (Engelking, 2015)

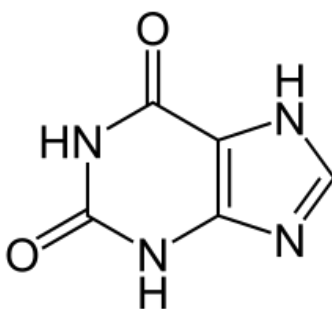


| Όνομα             | R <sup>1</sup>  | R <sup>2</sup>                | R <sup>3</sup>                               | R <sup>8</sup> |
|-------------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------------------------|----------------|
| Ξανθίνη           | H               | H                             | H                                            | H              |
| Καφεΐνη           | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>               | CH <sub>3</sub>                              | H              |
| Θεοβρωμίνη        | H               | CH <sub>3</sub>               | CH <sub>3</sub>                              | H              |
| Θεοφυλλίνη        | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>               | H                                            | H              |
| Paraxanthine      | CH <sub>3</sub> | H                             | CH <sub>3</sub>                              | H              |
| 8-γλωροθεοφυλλίνη | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>               | H                                            | Cl             |
| 8-βρωμοθεοφυλλίνη | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>               | H                                            | Br             |
| Διπροφυλλίνη      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> | H              |
| IBMX              | CH <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> | H                                            | H              |
| Ουρικό οξύ        | H               | H                             | H                                            | O              |

Πίνακας 4: Παραδείγματα παραγώγων πουρίνης

### 1.6.3 Ξανθίνη

Η ξανθίνη είναι βάση πουρίνης που βρίσκεται στους περισσότερους ιστούς και υγρά του σώματος, σε ορισμένα φυτά και σε λίθους νεφρών. Είναι ένα ενδιάμεσο στην αποικοδόμηση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης σε ουρικό οξύ, που σχηματίζεται από οξείδωση της υποξανθίνης. Οι μεθυλιωμένες ενώσεις ξανθίνης, η καφεΐνη, η θεοβρωμίνη και η θεοφυλλίνη και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται στην ιατρική για τη βρογχοδιασταλτική τους δράση. (Dorland, 2012)



Εικόνα 12: 2D δομή της ξανθίνης N7

Υπάρχει μια γενετική ασθένεια του μεταβολισμού της ξανθίνης, η ξανθινουρία, η οποία οφείλεται σε ανεπάρκεια του ενζύμου αφυδρογονάσης της ξανθίνης, που απαιτείται για την επεξεργασία της ξανθίνης στο σώμα. Χωρίς έλεγχο, η ξανθινουρία μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό λίθων στα νεφρά και ασθένεια του ουροποιητικού συστήματος (λόγω λίθων ξανθίνης) και σε μυϊκή νόσο (λόγω εναποθέσεων ξανθίνης στους μυς). Η θεραπεία γίνεται με την αποφυγή τροφών και ποτών που περιέχουν παράγωγα ξανθίνης, όπως καφέ, τσάι και προϊόντων τύπου cola.

Το όνομα «ξανθίνη» προήλθε από την ελληνική λέξη «ξανθός», διότι σχηματίζει κίτρινα άλατα, με την κατάληξη -ίνη της χημικής ορολογίας.

## 1.7 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του διαμεμβρανικού υποδοχέα UapA, ο οποίος είναι εξειδικευμένος για τη μεταφορά ξανθίνης και ουρικού οξέος στον μύκητα *Aspergillus Nidulans*. Δημιουργία μοντέλου συσχέτισης πειραματικά προσδιορισμένων  $K_m$  και θεωρητικών υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας  $\Delta G$  αναλόγων ξανθίνης. Χρήση *in silico* θεωρητικών υπολογισμών και μοριακών προσομοιώσεων για τη δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης της ενέργειας σύνδεσης με τη χρήση υπολογισμών πρόσδεσης (docking) και υπολογισμών μοριακής δυναμικής (FEP, MMPBSA) για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα UapA. Σκοπός της μελέτης είναι η κατανόηση του μηχανισμού αναγνώρισης των αναλόγων ξανθίνης (πουρινών), ώστε να εξηγηθούν οι διαφορές στη συγγένεια σύνδεσης. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων πρόβλεψης και ως προς την αξιοπιστία τους και σε σχέση με τον υπολογιστικό χρόνο που απαιτούν.

## 2. Μέθοδοι

### 2.1 Μοριακές Προσομοιώσεις

Με τη βοήθεια της στατιστικής είναι δυνατός ο υπολογισμών της κατάστασης ισορροπίας συστημάτων που ορίζονται από κάποια μεγέθη, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, ο αριθμός σωματιδίων κ.ά. Η πολυπλοκότητα της επίλυσης αναλυτικά, αλλά και ο χρόνος που απαιτείται για τον υπολογισμό τέτοιου όγκου δεδομένων συντέλεσαν στην ανάπτυξη αριθμητικών μεθόδων για την επίλυση προβλημάτων αυτού του είδους. Η ραγδαία ανάπτυξη των υπολογιστικών δυνατοτήτων τα τελευταία χρόνια, καθώς και η επέκταση της μνήμης των υπολογιστών έχει καταστήσει ευκολότερο τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων μεγάλου αριθμού σωματιδίων.

Οι αριθμητικές λύσεις που επιλύουν την εξίσωση κίνησης αποτελούν τη βάση για τη δημιουργία μοριακών προσομοιώσεων, οι οποίες έχουν σκοπό την πρόβλεψη των ιδιοτήτων των μορίων, τόσο δομικών, όσο και θερμοδυναμικών. Οι μοριακές προσομοιώσεις συχνά βοηθούν στην επαλήθευση θεωριών μέσω της απόκτησης τιμών φυσικών ποσοτήτων που μπορεί να μην υπάρχει ακόμα πρόσβαση σε αυτές πειραματικά. Επιπλέον, η συσχέτιση της βιολογικής δράσης με τη δομή μιας ένωσης που μπορεί να προσεγγιστεί με τη χρήση μοριακών προσομοιώσεων είναι εξέχουσας σημασίας για την ανάπτυξη ενώσεων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Μέσω των μοριακών προσομοιώσεων μπορεί να μελετηθεί μια γκάμα συστημάτων από μικρά μόρια μέχρι εξαιρετικά σύνθετες δομές, όπως για παράδειγμα είναι οι βιολογικές μεμβράνες. Μεγάλο ρόλο στον υπολογιστικό χρόνο που απαιτείται έχει η πολυπλοκότητα του συστήματος. Ωστόσο, οι δυνατότητες των μοριακών προσομοιώσεων επεκτείνονται καθώς βελτιστοποιούνται τα διαθέσιμα μέσα.

Οι *in silico* μοριακές προσομοιώσεις μπορούν να διακριθούν σε δύο βασικές κατηγορίες, τη μέθοδο Monte Carlo και τις Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΠΜΔ). (Leach, 2002) Η μέθοδος Monte Carlo στηρίζεται στην παραγωγή με τυχαία σειρά καταστάσεων του στατιστικού μέσω της χρήσης ψευδοτυχαίων αριθμών που παράγονται από τον υπολογιστή. Ενώ στη μέθοδο ΠΜΔ αναπαράγονται με χρονική σειρά καταστάσεις του συστήματος. Η Μοριακή Δυναμική (ΜΔ) είναι ικανή να προβλέπει με μεγάλη επιτυχία μακροσκοπικά δυναμικά μεγέθη για μια πληθώρα συστημάτων. Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τεχνικών έγκειται στον τρόπο με τον οποίο υπολογίζονται οι ιδιότητες του υπό μελέτη συστήματος. Η μέθοδος Monte Carlo είναι καταλληλότερη για συστήματα που βρίσκονται σε αέρια φασ, σε αντίθεση με τη μέθοδο ΜΔ που χρησιμοποιείται σε βιολογικά συστήματα όπου η δυναμική των μορίων επηρεάζεται από την ύπαρξη πολλών βαθμών ελευθερίας. Το βασικότερο πλεονέκτημα που

παρουσιάζει η μέθοδος της ΜΔ είναι η ικανότητα υπολογισμού δυναμικών ιδιοτήτων, όπως για παράδειγμα ιδιότητες που εξαρτώνται από τον χρόνο. Πολλές φορές οι δύο μέθοδοι, Monte Carlo και ΜΔ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά. (Guarnieri and Still, 1994)

Οι υπολογιστικές μεθοδολογίες για την κατανόηση των δομικών και ενεργειακών σχέσεων κατά την αλληλεπίδραση βιομορίων διαφέρουν σε ταχύτητα και ακρίβεια. Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD) και Monte Carlo (MC) σε συνδυασμό με τους υπολογισμούς διαταραχής ελεύθερης ενέργειας (FEP) ή θερμοδυναμικής ολοκλήρωσης (TI) θεωρούνται υπολογιστικές προσεγγίσεις αναφοράς, όταν πρόκειται για την εκτίμηση της συγγένειας μιας σύνδεσης. (Boresch *et al.*, 2003; Huang and Jacobson, 2007) Αν και το FEP και οι εξισώσεις TI είναι ακριβείς, τα αποτελέσματα σε μεγάλο βαθμό επηρεάζονται από: i) πεδία δύναμης που περιγράφουν ελλιπώς ή εσφαλμένα την πρωτεΐνη, τον προσδέτη και τις αλληλεπιδράσεις τους, ii) περιορισμένη δειγματοληψία του χώρου φάσης και iii) προκλήσεις για την ακριβή καταγραφή των αλλαγών κατά την ενυδάτωση. (Deng and Roux, 2006; Mobley, Chodera and Dill, 2006; Wang, Deng and Roux, 2006)

## 2.2 Υπολογισμοί Ελεύθερης Ενέργειας Σύνδεσης

### 2.2.1 Ελεύθερη ενέργεια Πρόσδεσης (FEP)

Η μέθοδος FEP βασίζεται στην αρχή κατά την οποία μεταβολή ελεύθερης ενέργειας και μεταβολή ενθαλπίας είναι σχεδόν ίσες, εάν οι δύο δομές που μελετώνται διαφέρουν ελάχιστα. Αρχίζοντας από μία δομή γίνονται σε κάθε βήμα μικρές αλλαγές μέχρι να προκύψει η τελική δομή. Σε κάθε βήμα γίνεται υπολογισμός της μέσης τιμής της ενθαλπίας με υπολογισμούς ΜΔ ή MC.

Το σημαντικότερο είναι να γνωρίζουμε πόσο έντονα ένα μόριο θα προσκολληθεί σε έναν υποδοχέα. Αυτό εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ τους. Γενικά, η συσχέτιση δύο αλληλεπιδρώντων μορίων εξαρτάται από παράγοντες ενθαλπίας και εντροπίας. Όπως κάθε αυθόρμητη διαδικασία, οι ενώσεις δύο μορίων προκύπτουν μόνο όταν χαρακτηρίζεται από αρνητική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης Gibbs. Αυτό υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\Delta G_b = \Delta H_b - T \Delta S_b$$

$\Delta G_b$ ,  $\Delta H_b$ ,  $\Delta S_b$  είναι οι αλλαγές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, της ενθαλπίας και της εντροπίας, αντίστοιχα, κατά τη σύνδεση.

Σύμφωνα με την παραπάνω σχέση, η πρόσδεση μπορεί να ευνοηθεί από την ενθαλπία, την εντροπία ή και τα δύο. Η ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμοί υδρογόνου, Van der Waals κ.ά.

συνοδεύεται από διάχυση θερμότητας με αποτέλεσμα τη μείωση της ενθαλπίας. Αντίθετα, το φαινόμενο της υδροφοβικότητας οδηγεί σε ένα εντροπικό πλεονέκτημα.

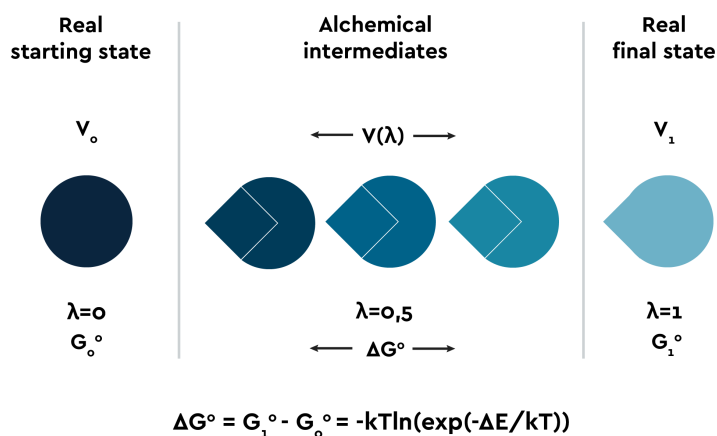
Η πρόβλεψη της ελεύθερης ενεργειακής σύνδεσης ενός προσδέτη με έναν υποδοχέα είναι ένας από τους πιο σημαντικούς και απαιτητικούς στόχους του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων (Verlinde and Hol, 1994; Gohlke and Klebe, 2002). Το λογισμικό που μελετά τη σύνδεση έχει δύο στόχους: τον εντοπισμό της διαμόρφωσης του υποκαταστάτη στην κοιλότητα του υποδοχέα και τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης. Για το τελευταίο, έχουν αναπτυχθεί διάφορες λειτουργίες.

Η μέθοδος συγκρίνει τη δράση ελεύθερης δέσμευσης του προσδέτη A με εκείνη του προσδέτη B. Αυτό γίνεται με τον υπολογισμό της διαφοράς στις τιμές  $\Delta G_A$  και  $\Delta G_B$ :

$$\Delta\Delta G = \Delta G_B - \Delta G_A$$

Η αρνητική τιμή  $\Delta\Delta G$  υποδηλώνει ότι η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης του B ( $\Delta G_B$ ) είναι μικρότερη από την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης του A ( $\Delta G_A$ ), επομένως η σύνδεση του B είναι η ευνοούμενη ενεργειακά σε σχέση με τη σύνδεση του A. Επομένως, εάν ο προσδέτης A είναι το μόριο οδήγησης, για να το βελτιστοποιήσουμε, είναι απαραίτητο να προσδιορίσουμε έναν προσδέτη B, έτσι ώστε η διαφορά τους να είναι αρνητική.

Ωστόσο, ο προσδιορισμός των  $\Delta G_A$  και  $\Delta G_B$  υπολογιστικά δεν είναι εύκολη υπόθεση λόγω των μεγάλων ενεργειακών φραγμών που προκύπτουν στην προσομοίωση των συγκεκριμένων αλλαγών. Για να ξεπεραστεί αυτή η δυσκολία, χρησιμοποιείται μια τεχνική που υπολογίζει έμμεσα την τιμή του  $\Delta\Delta G$ , στην οποία ο προσδέτης A αλχημικά μεταβάλλεται ή «μεταλλάσσεται» στον προσδέτη B. Μελετάται συνεπώς η αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας στη μετατροπή του A σε B. Αυτός ο υπολογισμός πραγματοποιείται όταν τα δύο μόρια βρίσκονται στο νερό-διαλύτη και όταν συνδέονται με τον υποδοχέα.



Εικόνα 13: Αναπαράσταση της μεθόδου FEP



Συνεπώς, δημιουργείται ένας κλειστός θερμοδυναμικός κύκλος. Το άθροισμα όλων των αλλαγών κατά τη διάρκεια του κύκλου ισούται με μηδέν, διότι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs είναι μια θερμοδυναμική ιδιότητα.

$$\Delta G_A + \Delta G_2 - \Delta G_B - \Delta G_1 = 0 \Rightarrow \Delta G_A - \Delta G_B = \Delta G_1 - \Delta G_2$$

Άρα η διαφορά υπολογίζεται έμμεσα από την εξίσωση:

$$\Delta \Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1$$

μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Robert Zwanzig το 1954 και η αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια υπολογίζεται από την εξίσωση [54]:

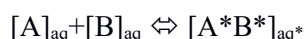
$$\Delta G(A \rightarrow B) = G_B - G_A = -kT \ln \exp \left( \frac{-U_B - U_A}{kT} \right)$$

## 2.2.2 Μοριακή Μηχανική επιφάνειας Poisson-Boltzmann (MM/PBSA)

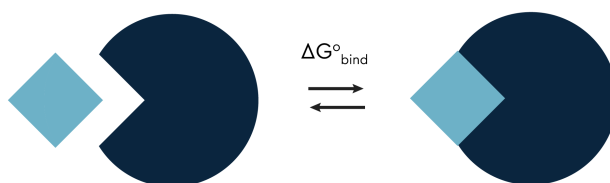
Οι υπολογισμοί μοριακής σύνδεσης χρησιμοποιώντας κατάλληλες συναρτήσεις βαθμολόγησης ήταν επιτυχείς σε ορισμένες περιπτώσεις. (Yuriev and Ramsland, 2013) Ωστόσο, μέθοδοι δέσμησης ελεύθερης ενέργειας τελικού σημείου είτε λαμβάνουν υπ' όψιν τη διαλυτότητα του προσδέματος και της πρωτεΐνης πριν και μετά τη δέσμηση, όπως η μέθοδος γραμμικής αλληλεπίδρασης (LIE), είτε χρησιμοποιούν ένα σιωπηρό μοντέλο διαλυτότητας (Kollman *et al.*, 2000) όπως η Molecular Mechanics - Generalized Born Surface Area (MMGBSA) ή οι μέθοδοι Molecular Mechanics - Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), μπορεί να βελτιώσουν σημαντικά τη βαθμολογία. (Homeyer *et al.*, 2014; Zhang, Wong and Lightstone, 2014). Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης μπορούν να συνδέσουν σωστά συνδέσμους υψηλής συγγένειας, αλλά πιθανότατα δίνουν πιθανές διαμορφώσεις σύνδεσης για συνδετήρες που δεν δεσμεύονται. Αυτό οδηγεί σε μεγάλο αριθμό ψευδώς θετικών επιτυχιών, δηλαδή παρόμοιες θέσεις σύνδεσης τόσο για ενεργές όσο και για ανενεργές. Ένας τρόπος για να μειώσετε τον αριθμό των ψευδώς θετικών είναι να εκτελέσετε προσομοιώσεις ΜΔ και να ελέγξετε τη σταθερότητα της θέσης σύνδεσης. Ακόμα κι αν η στάση σύνδεσης για μια ανενεργή ένωση είναι σταθερή κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων ΜΔ, η μέση ελεύθερη ενέργεια δέσμησης μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας στιγμιότυπα από την τροχιά προσομοίωσης ΜΔ και να συγκριθεί με τη μέση ελεύθερη ενέργεια δέσμησης μιας δραστηκής ένωσης αναφοράς χρησιμοποιώντας τη Molecular Mechanics - Generalized Born Μέθοδοι Surface Area (MM-GBSA) ή Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area

(MM-PBSA) (Feig *et al.*, 2004). Ενώ χρησιμοποιείται το MM-PBSA, οι μοριακοί προσανατολισμοί σύνδεσης που προέρχονται από εικονική διαλογή με δομή βελτιώνονται συνήθως με σύντομη προσομοίωση ΜΔ (Feig *et al.*, 2004). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί ακόμη και στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η δειγματοληψία με προσομοιώσεις ΜΔ μειώνεται σε ελαχιστοποίηση της σύνδεσης μοριακής μηχανικής (MM). (Huanga and Caflischa, 2010; Li, Liu and Wang, 2010)

Ο γενικός στόχος της μεθόδου MM-PBSA και της συμπληρωματικής μεθόδου MM-GBSA είναι να υπολογίσει τη διαφορά ελεύθερης ενέργειας μεταξύ δύο καταστάσεων που αντιπροσωπεύουν συχνότερα τη δεσμευμένη και μη δεσμευμένη κατάσταση δύο μορίων ή εναλλακτικά να συγκρίνει την ελεύθερη ενέργεια δύο διαφορετικών διαμορφώσεων του ίδιου μορίου.

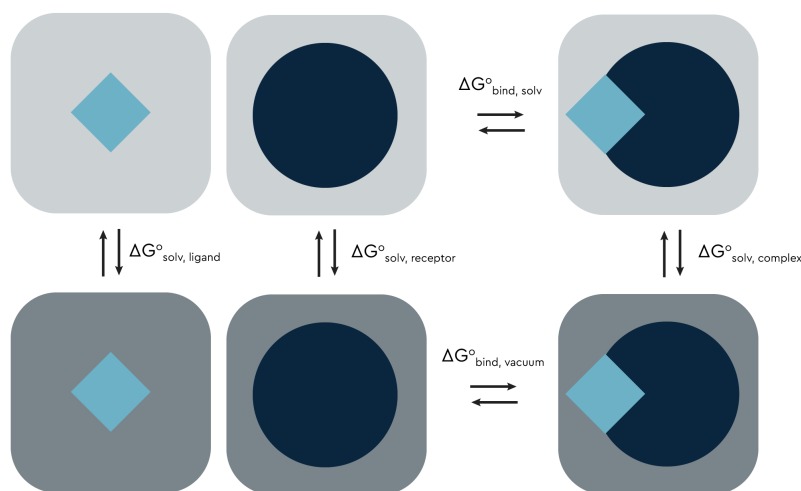


Στην ιδανική περίπτωση, θα θέλαμε να υπολογίσουμε αυτήν την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



**Εικόνα 14:** Απλοποιημένη αναπαράσταση του υπολογισμού μεταβολής ελεύθερης ενέργειας

Ωστόσο, σε μια τέτοια προσομοίωση αυτών των καταστάσεων, η πλειονότητα των ενεργειακών συνεισφορών θα προέλθει από αλληλεπιδράσεις του διαλύτη και οι διακυμάνσεις της συνολικής ενέργειας θα είναι μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερες από την ενέργεια σύνδεσης. Συνεπώς, ο υπολογισμός θα χρειαστεί ένα άπειρο χρονικό διάστημα. Επομένως, μια πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι ο διαχωρισμός του υπολογισμού σύμφωνα με τον ακόλουθο θερμοδυναμικό κύκλο:



**Εικόνα 15: Αναπαράσταση της προσέγγισης MM-PBSA για τον υπολογισμό του  $\Delta G^\circ$**

Προφανώς από αυτό το διάγραμμα η δέσμευση ελεύθερης ενέργειας  $\Delta G_{\text{bind, solv}}$  μπορεί να υπολογιστεί:

$$\Delta G_{\text{bind, solv}}^\circ = \Delta G_{\text{bind, vacuum}}^\circ + \Delta G_{\text{solv, complex}}^\circ - (\Delta G_{\text{solv, ligand}}^\circ + \Delta G_{\text{solv, receptor}}^\circ)$$

Στην προσέγγιση MM-PBSA οι διαφορετικές συνεισφορές στη ελεύθερη ενέργεια υπολογίζονται με διάφορους τρόπους:

Οι ενέργειες στο διάλυμα υπολογίζονται είτε με επίλυση της εξίσωσης Poisson Boltzman, είτε με γενικευμένη εξίσωση για καθεμία από τις τρεις καταστάσεις (αυτό δίνει την ηλεκτροστατική συμβολή στην ενέργεια), προσθέτοντας έναν εμπειρικό όρο για υδρόφοβες συνεισφορές:

$$\Delta G_{\text{solv}}^\circ = G_{\text{electrostatic, } \epsilon=80}^\circ - G_{\text{electrostatic, } \epsilon=1}^\circ + \Delta G_{\text{hydrophobic}}^\circ$$

Προκύπτει, υπολογίζοντας τη μέση ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ υποδοχέα και συνδέτη και λαμβάνοντας υπ' όψιν την αλλαγή της εντροπίας κατά τη σύνδεση, εάν είναι απαραίτητο/επιθυμητό:

$$\Delta G_{\text{vacuum}}^\circ = \Delta E_{\text{molecular mechanics}}^\circ - T \cdot \Delta S_{\text{normal mode analysis}}^\circ$$

Η συμβολή της εντροπίας μπορεί να βρεθεί εκτελώντας κανονική ανάλυση τρόπου λειτουργίας στα τρία είδη, αλλά στην πράξη οι συνεισφορές εντροπίας μπορούν να αγνοηθούν εάν επιθυμείται μόνο σύγκριση καταστάσεων παρόμοιας εντροπίας, όπως δύο προσδέματα που συνδέονται με την ίδια πρωτεΐνη. Ο λόγος για αυτό είναι ότι οι υπολογισμοί ανάλυσης κανονικής λειτουργίας είναι υπολογιστικά δαπανηροί και τείνουν να έχουν μεγάλο περιθώριο σφάλματος που εισάγει σημαντική αβεβαιότητα στο αποτέλεσμα.

Οι μέσες ενέργειες αλληλεπίδρασης υποδοχέα και προσδέτη συνήθως λαμβάνονται με την εκτέλεση υπολογισμών σε ένα σύνολο μη συσχετισμένων στιγμιότυπων που συλλέγονται από μια εξισορροπημένη προσομοίωση μοριακής δυναμικής (ΜΔ).

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής βιολογικής σημασίας σε μακρομόρια έχουν δώσει βαθύτερες γνώσεις για τη δυναμική τους και τις λειτουργίες τους καθώς και τις αλληλεπιδράσεις με τον περιβάλλοντα χώρο σε ατομικό επίπεδο. Οι παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια προσομοιώσεων ΜΔ όχι μόνο απεικονίζουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης των μορίων μεταξύ τους, αλλά εξηγούν επίσης τη μικροσκοπική προέλευση ή τις κινητήριες δυνάμεις των βιολογικών λειτουργιών, ειδικά όταν οι προσομοιώσεις συνδυάζονται με υπολογιστικά εξελεγμένους υπολογισμούς ελεύθερης ενέργειας. (Jo *et al.*, 2008)

## 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Προετοιμασία UapA

Τα αρχεία δομών που λαμβάνονται από τη βάση δεδομένων Protein Data Bank και άλλες πηγές συχνά στερούνται απαραίτητων πληροφοριών για την εκτέλεση εργασιών που σχετίζονται με τη μοντελοποίηση. Συνήθως, από αυτά τα αρχεία λείπουν υδρογόνα, φορτία, πλευρικές αλυσίδες ή/και περιοχές ολόκληρου βρόχου. Για να γίνουν αυτές οι δομές κατάλληλες για εργασίες μοντελοποίησης, θα χρησιμοποιήθηκε το Protein Preparation Wizard, λογισμικό που βρίσκεται στην ομπρέλα του προγράμματος Maestro, ώστε να επιλυθούν τυχόν ζητήματα στη δομή του UapA.

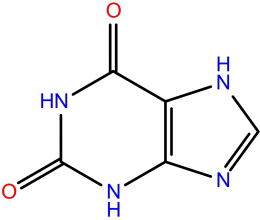
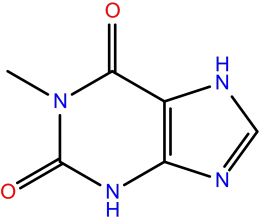
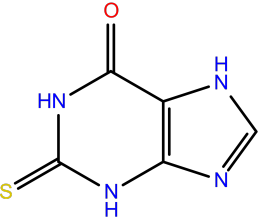
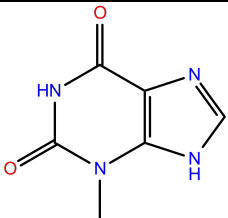
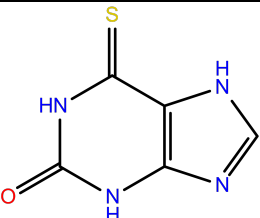
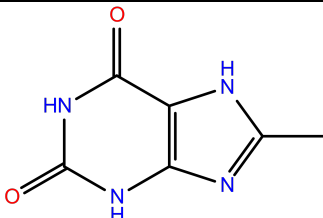
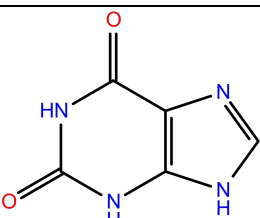
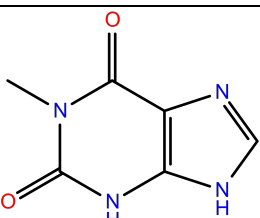
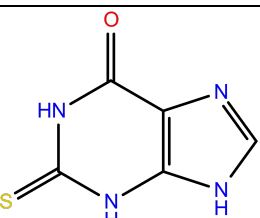
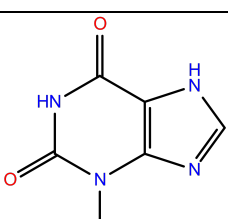
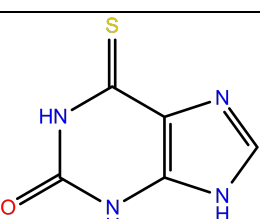
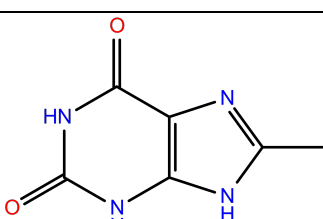
Το Protein Preparation Wizard διαθέτει εργαλεία επεξεργασίας, τροποποίησης και βελτίωσης που θα χρησιμοποιήσουμε στη δομή 1FJS.pdb. Στην καρτέλα Εισαγωγή και Επεξεργασία, οι προτεινόμενες ελάχιστες εργασίες επεξεργασίας ελέγχονται από προεπιλογή.

Υπάρχουν επίσης επιλογές για συμπλήρωση πλευρικών αλυσίδων ή/και θηλιών που λείπουν, ανάλογα με τις ανάγκες της δομής σας. Η καρτέλα Αναθεώρηση και Τροποποίηση σας εμφανίζει όλα τα στοιχεία του συμπλέγματος, σε ξεχωριστές ενότητες: Αλυσίδες, Νερά, Συνδέματα και Hets. Εδώ, μπορείτε να επιλέξετε ποια στοιχεία του συμπλέγματος να διατηρήσετε ή να αφαιρέσετε. Η καρτέλα Βελτίωση επιτρέπει πιο λεπτομερείς τροποποιήσεις στη δομή του ΠΣΠ. Το τμήμα εκχώρησης δεσμού Η χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου - μια διαδικασία που δειγματοληπτεί τους προσανατολισμούς του νερού και ανατρέπει τις πλευρικές αλυσίδες Asn, Gln και/ή His σε μια καθορισμένη τιμή pH. Η προσαρμογή του pH θα αλλάξει τις καταστάσεις πρωτονίωσης των υπολειμμάτων και των προσδεμάτων ανάλογα και είναι χρήσιμη εάν θέλετε να αντικατοπτρίσετε με ακρίβεια τις πειραματικές συνθήκες. Το τμήμα περιορισμένης ελαχιστοποίησης διορθώνει τις συγκρούσεις που μπορεί να προκύψουν με την προσθήκη υδρογόνων ή την πλήρωση πλευρικών αλυσίδων που λείπουν. Από προεπιλογή, χρησιμοποιείται RMSD 0,3 Å, ελαχιστοποιώντας τόσο τα υδρογόνα όσο και τα βαρέα άτομα μέσω αρμονικών περιορισμών ποινής. Προαιρετικά, μπορεί να επιλεγεί ελαχιστοποίηση μόνο με υδρογόνο.

#### 3.1.1 Επιλογή και δημιουργία των αναλόγων ξανθίνης

Καθώς η ξανθίνη μπορεί να αποκτήσει δύο ταυτομερείς μορφές, με βάση την πρωτονίωση του N7 και του N9, και τα δύο ταυτομερή χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα ανάλογα. Για την κατασκευή τους τόσο

στην περίπτωση των αρχείων για τη μέθοδο FEP, όσο και για τη μέθοδο MM-PBSA χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Maestro και με την υποκατάσταση του εκάστοτε στοιχείου και στη συνέχεια με την υπέρθεσή του (superimposition) στην αρχική δομή με τη χρήση τριών σημείων κατά τρόπο ώστε η θέση του να διαφέρει το δυνατόν ελάχιστα από την αρχική. Κατόπιν, στην περίπτωση των αναλόγων για τη μέθοδο MM-PBSA πραγματοποιήθηκε εξαγωγή (export) των δομών ξεχωριστά με τον τύπο αρχείου αρχείου .sdf.

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |    |
| N7 ξανθίνη                                                                          | N7 1-μεθυλο-ξανθίνη                                                                 | N7 2-θειο-ξανθίνη                                                                     |
|   |   |   |
| N7 3-μεθυλο-ξανθίνη                                                                 | N7 6-θειο-ξανθίνη                                                                   | N7 8-μεθυλο-ξανθίνη                                                                   |
|  |  |  |
| N9 ξανθίνη                                                                          | N9 1-μεθυλο-ξανθίνη                                                                 | N9 2-θειο-ξανθίνη                                                                     |
|  |  |  |
| N9 3-μεθυλο-ξανθίνη                                                                 | N9 6-θειο-ξανθίνη                                                                   | N9 8-μεθυλο-ξανθίνη                                                                   |

**Πίνακας 5: Οι δομές των αναλόγων ξανθίνης που μελετήθηκαν**

## 3.2 Υπολογισμός Ελεύθερης Ενέργειας πρόσδεσης με τη μέθοδο FEP

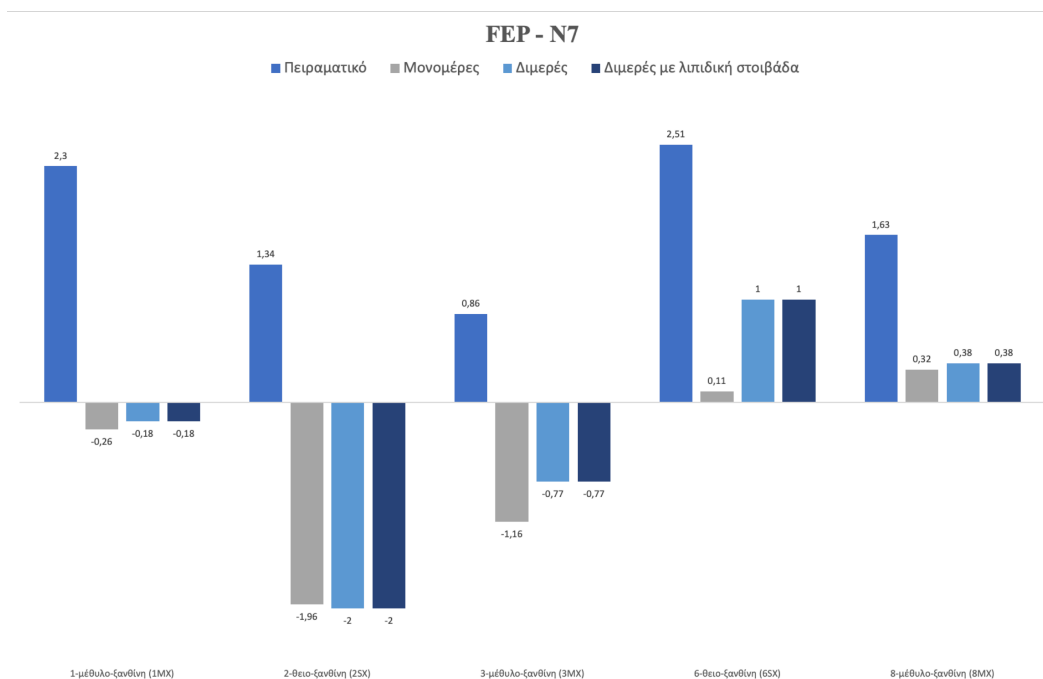
Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης με τη μέθοδο FEP χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Maestro, στο οποίο πραγματοποιήθηκε και η προετοιμασία της πρωτεΐνης όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αλλά και η δημιουργία των αναλόγων ξανθίνης.

Κατά τη διαδικασία του FEP αυτή επιλέχθησαν οι δύο προσδέτες, η ξανθίνη και το εκάστοτε ανάλογο, και ο UapA, όσες φορές και τα αποτελέσματα FEP που εμφανίζονται.

Το αρχείο εξόδου είναι ένα ddG.mae αρχείο σε μορφή Maestro και περιέχει την τιμή  $\Delta G$  και από τα δύο αρχεία εισόδου. Η τελική τιμή  $\Delta\Delta G$  καταγράφεται για κάθε μεταλλαγή ως ιδιότητα καταχώρισης s\_des\_ddG\_jobname1-jobname2.

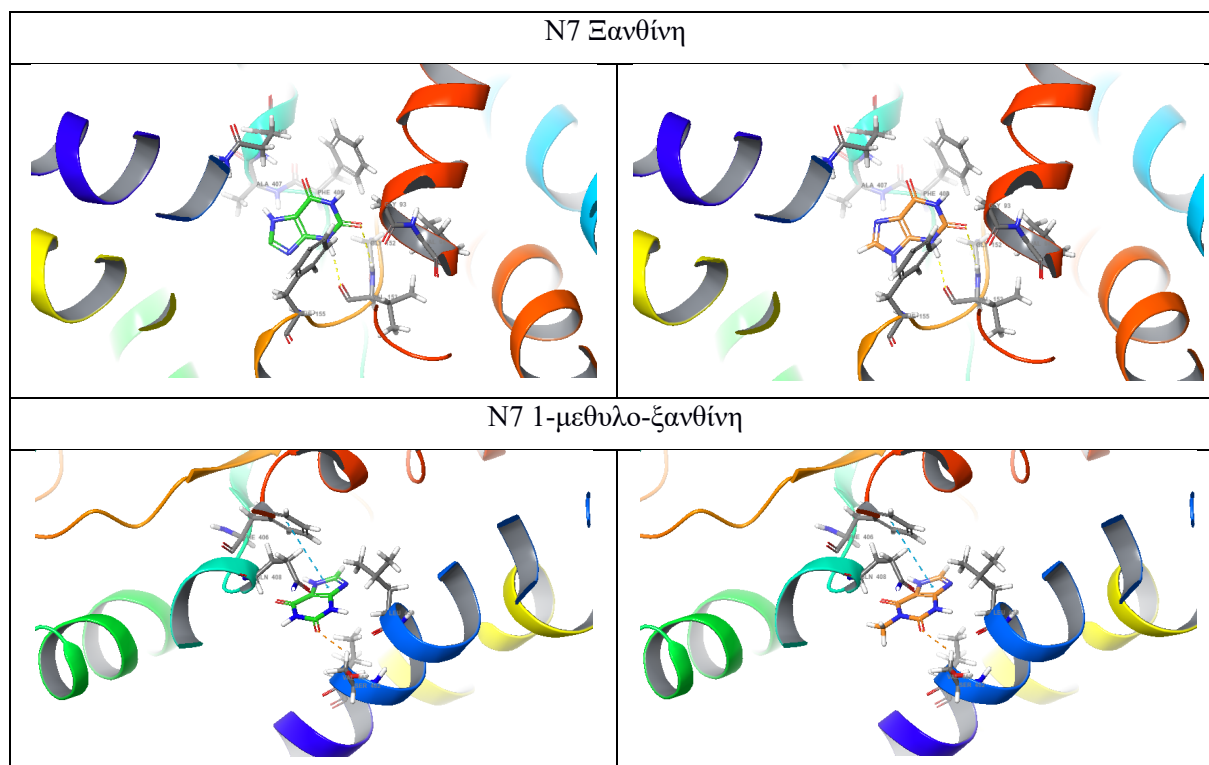
| N7                      | Πειραματικά<br>δεδομένα                 | Μονομερές                               | Διμερές | Διμερές με λιπιδική<br>στοιβάδα |
|-------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------|---------------------------------|
|                         | $\Delta\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$ | $\Delta\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$ |         |                                 |
| ξανθίνη                 | 0,0                                     | 0,00                                    | 0,00    | 0,00                            |
| 1-μέθυλο-ξανθίνη (1MX)  | 2,30                                    | -0,26                                   | -0,18   | -0,87                           |
| 2-θειο-ξανθίνη (2SX)    | 1,34                                    | -1,96                                   | -2,00   | -1,29                           |
| 3-μέθυλο-ξανθίνη (3MX)  | 0,86                                    | -1,16                                   | -0,77   | -0,96                           |
| 6-θειο-ξανθίνη (6SX)    | 2,51                                    | 0,11                                    | 1,00    | -0,07                           |
| 8- μέθυλο-ξανθίνη (8MX) | 1,63                                    | 0,32                                    | 0,38    | -0,42                           |
| Συσχέτιση               | -                                       | 0,2                                     | 0,34    | -0,09                           |

Πίνακας 6: Υπολογισμός του  $\Delta\Delta G^\circ$  για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N7 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο FEP και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικά δεδομένα  $\Delta\Delta G^\circ$

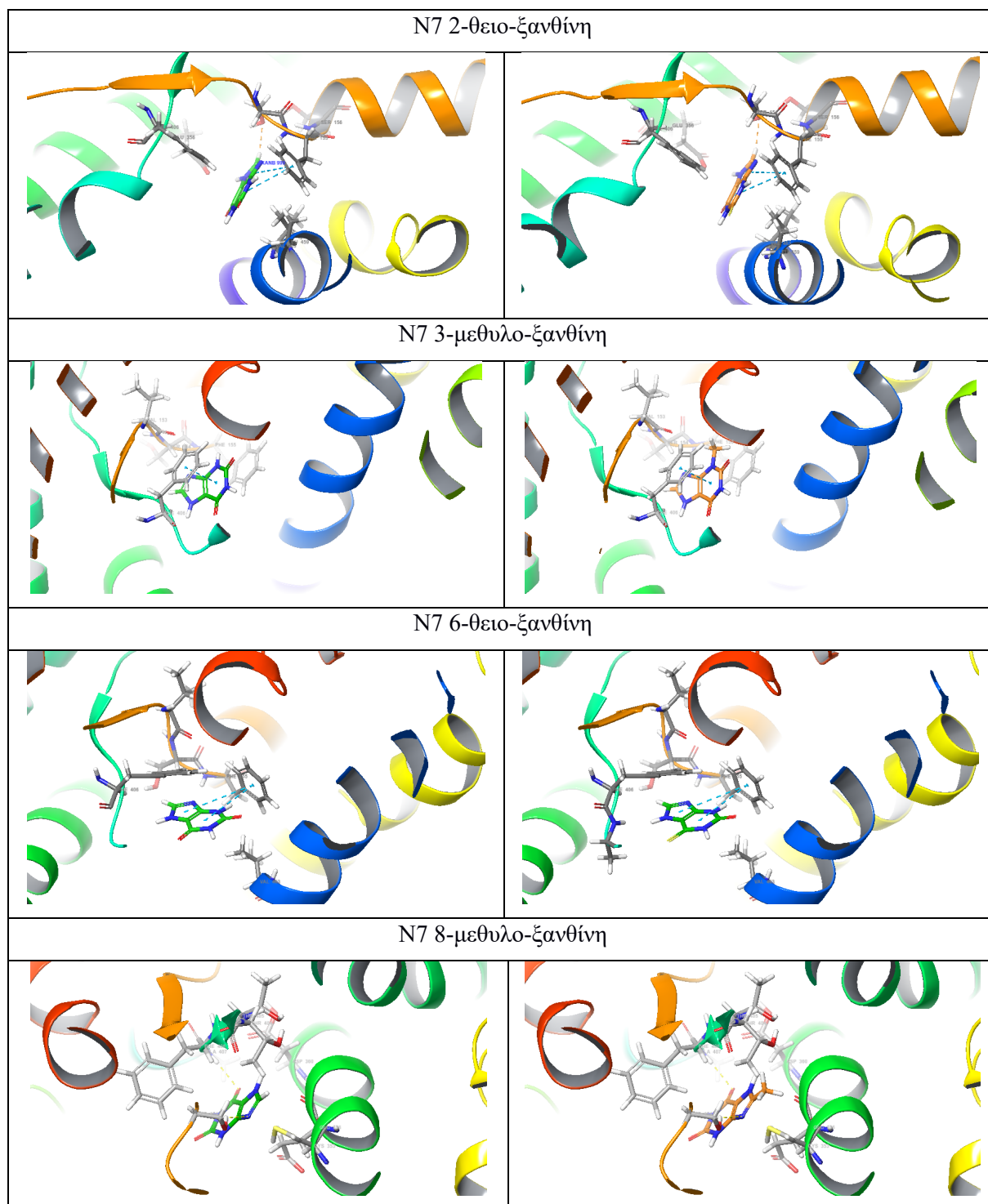


**Εικόνα 16: Ραβδόγραμμα των υπολογισμών  $\Delta G^\circ$  με την μέθοδο FEP σε ανάλογα του ταυτομερούς N7 ξανθίνης**

Το ενεργό κέντρο μονομερών UarA απουσία λιπιδίων με ανάλογα του ταυτομερούς N7 της ξανθίνης. Παρακάτω παρατίθενται τα στιγμιότυπα από τα αποτελέσματα του FEP. Αριστερά φαίνεται η αρχική δομή και δεξιά η τελική δομή μετά την αλχημική μετατροπή.



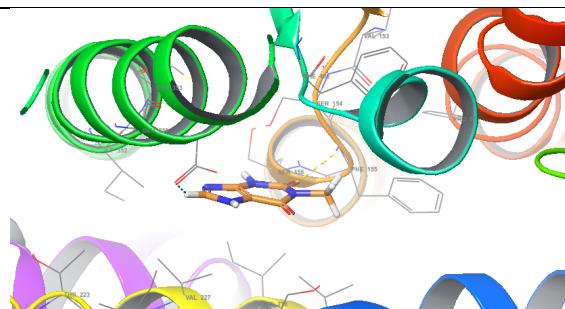
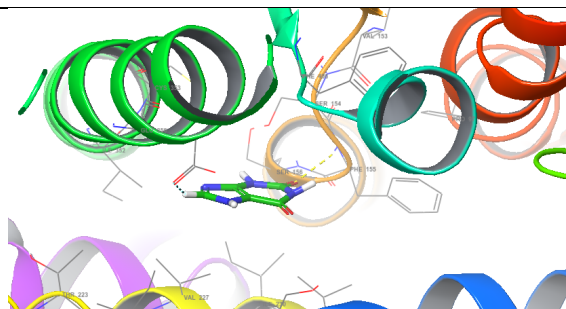




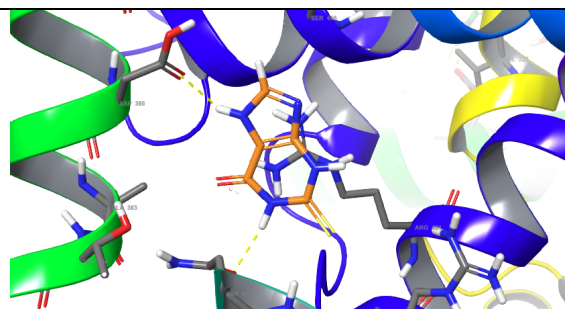
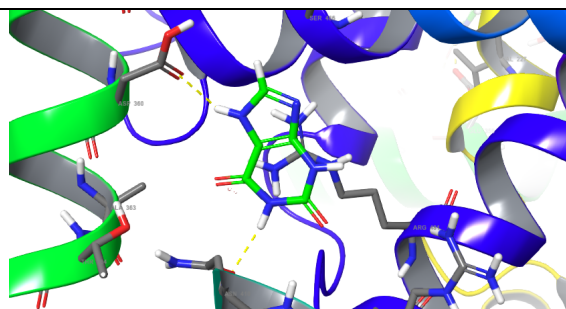
**Εικόνα 17: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης**

Το ενεργό κέντρο διμερών UapA απουσία λιπιδίων με ανάλογα του ταυτομερούς N7 της ξανθίνης. Παρακάτω παρατίθενται τα στιγμιότυπα από τα αποτελέσματα του FEP. Αριστερά φαίνεται η αρχική δομή και δεξιά η τελική δομή μετά την αλχημική μετατροπή.

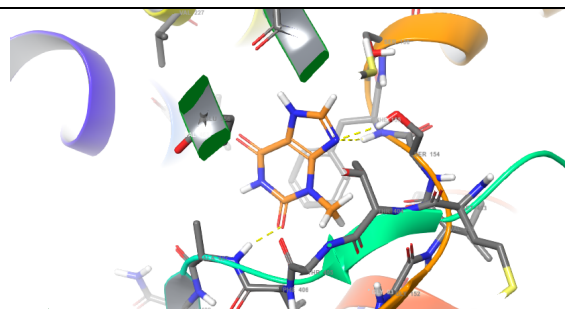
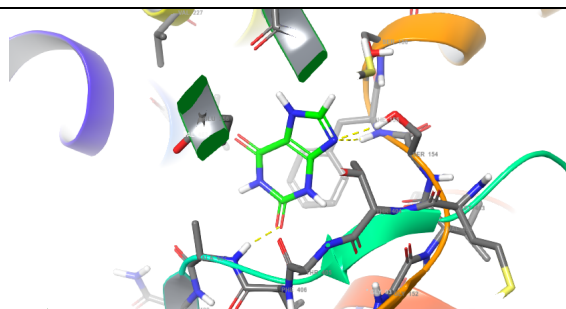
N7 1-μεθυλο-ξανθίνη



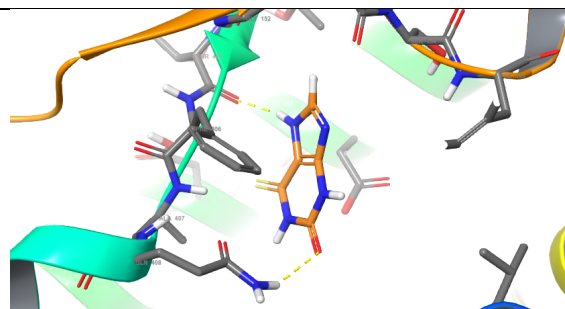
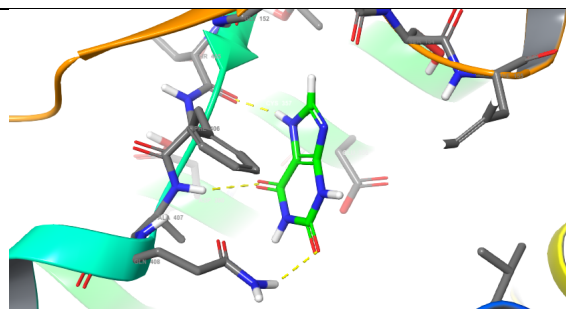
N7 2-θειο-ξανθίνη



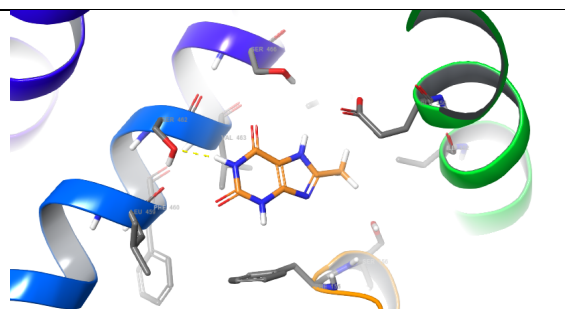
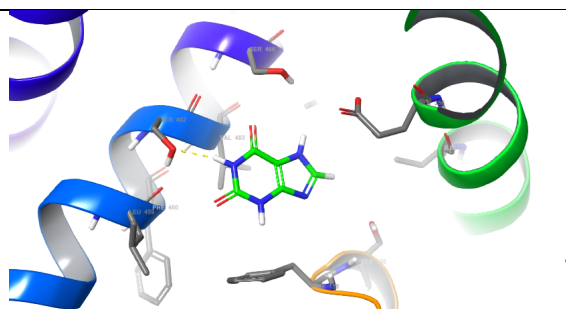
N7 3-μεθυλο-ξανθίνη



N7 6-θειο-ξανθίνη



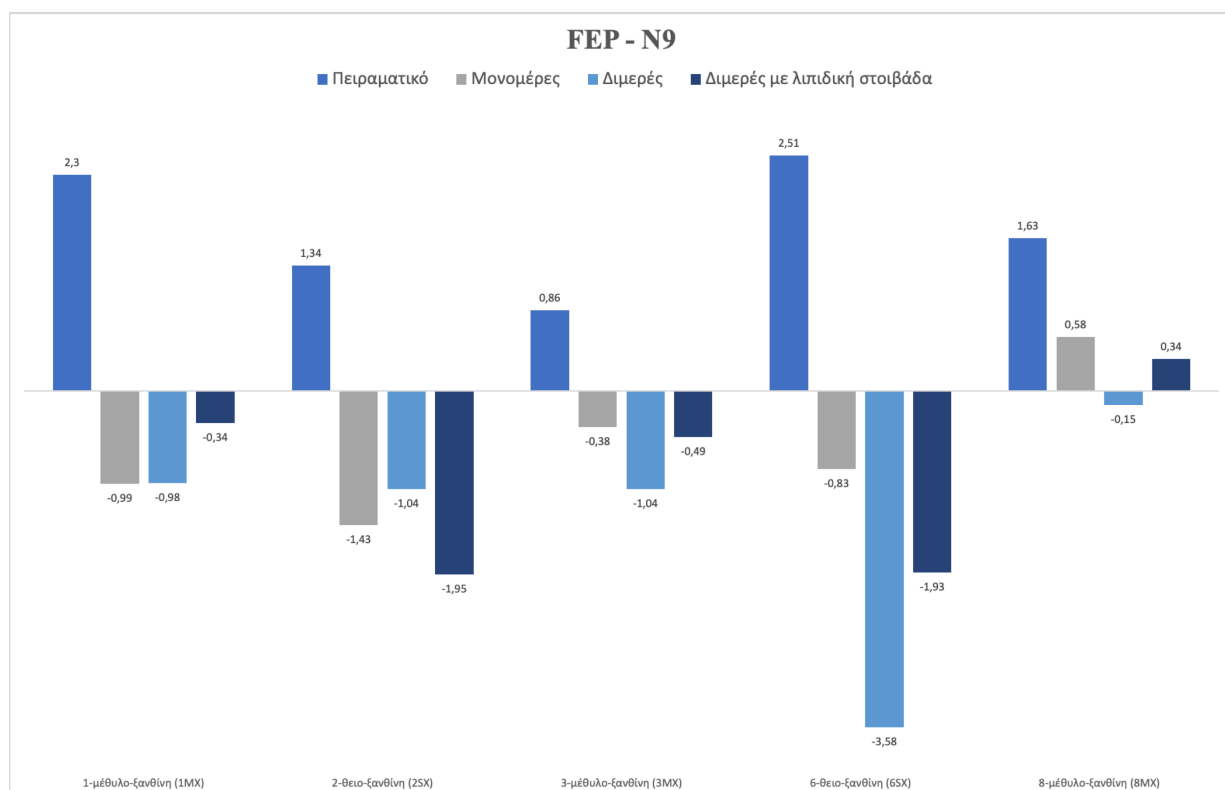
N7 8-μεθυλο-ξανθίνη



**Εικόνα 18: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης**

| N9                     | Πειραματικά δεδομένα          | Μονομερές                     | Διμερές | Διμερές με λιπιδική στοιβάδα |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|------------------------------|
|                        | $\Delta\Delta G^0$ (kcal/mol) | $\Delta\Delta G^0$ (kcal/mol) |         |                              |
| ξανθίνη                | 0,0                           | 0,00                          | 0,00    | 0,00                         |
| 1-μέθυλο-ξανθίνη (1MX) | 2,30                          | -0,99                         | -0,98   | -0,34                        |
| 2-θειο-ξανθίνη (2SX)   | 1,34                          | -1,43                         | -1,04   | -1,95                        |
| 3-μέθυλο-ξανθίνη (3MX) | 0,86                          | -0,38                         | -1,04   | -0,49                        |
| 6-θειο-ξανθίνη (6SX)   | 2,51                          | -0,83                         | -3,58   | -1,93                        |
| 8-μέθυλο-ξανθίνη (8MX) | 1,63                          | 0,58                          | -0,15   | 0,34                         |
| Συσχέτιση              | -                             | -0,38                         | -0,67   | -0,40                        |

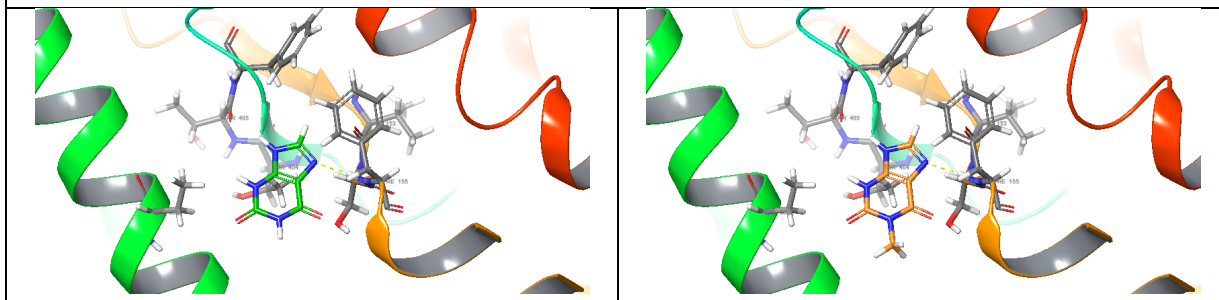
**Πίνακας 7: Υπολογισμός του  $\Delta\Delta G^0$  για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N9 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο FEP και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικά δεδομένα  $\Delta\Delta G^0$**



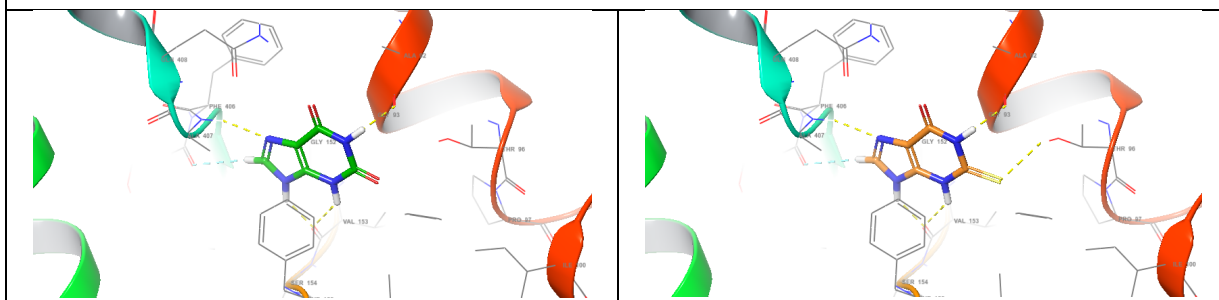
**Εικόνα 19: Ραβδόγραμμα των υπολογισμών  $\Delta\Delta G^0$  με την μέθοδο FEP σε ανάλογα του ταυτομερούς N9 ξανθίνης**

Παρακάτω παρατίθενται τα στιγμιότυπα από τα αποτελέσματα του FEP. Αριστερά φαίνεται η αρχική δομή και δεξιά η τελική δομή μετά την αλχημική μετατροπή.

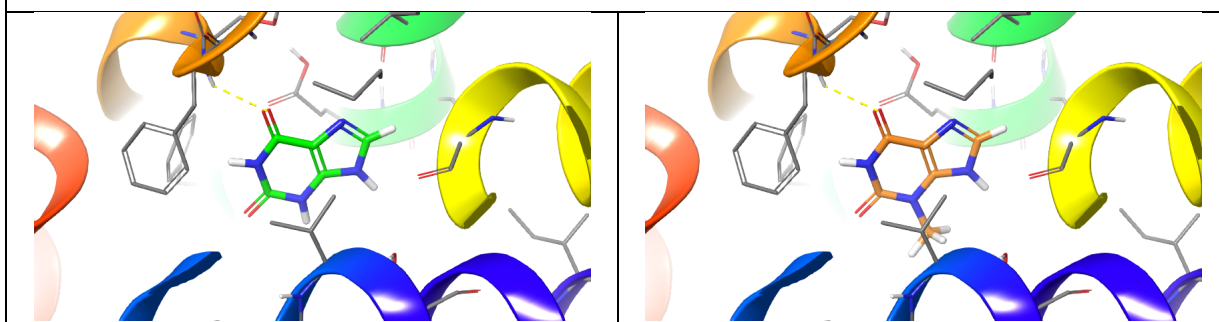
N9 1-μεθυλο-ξανθίνη



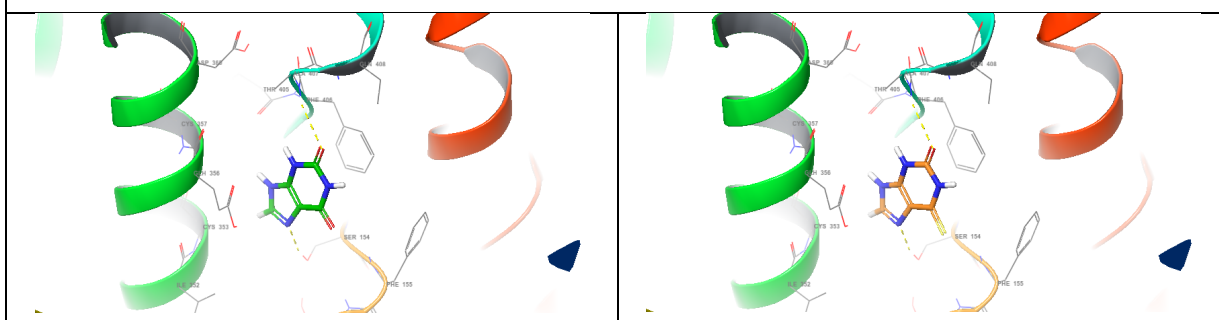
N9 2-θειο-ξανθίνη



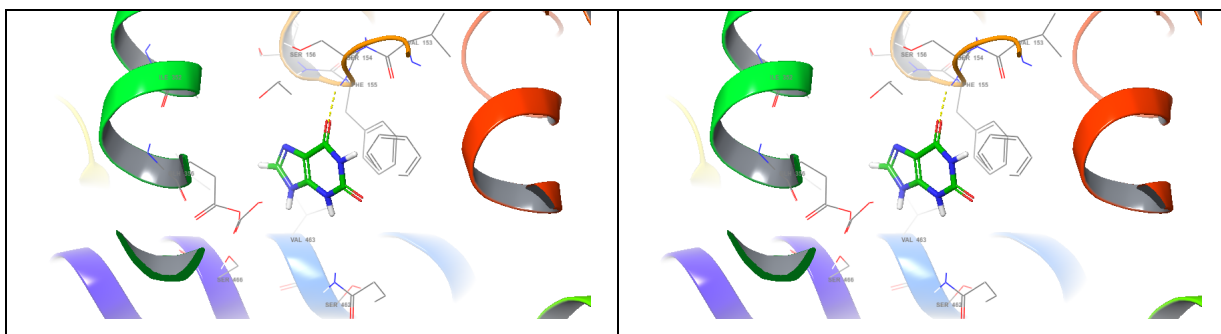
N9 3-μεθυλο-ξανθίνη



N9 6-θειο-ξανθίνη

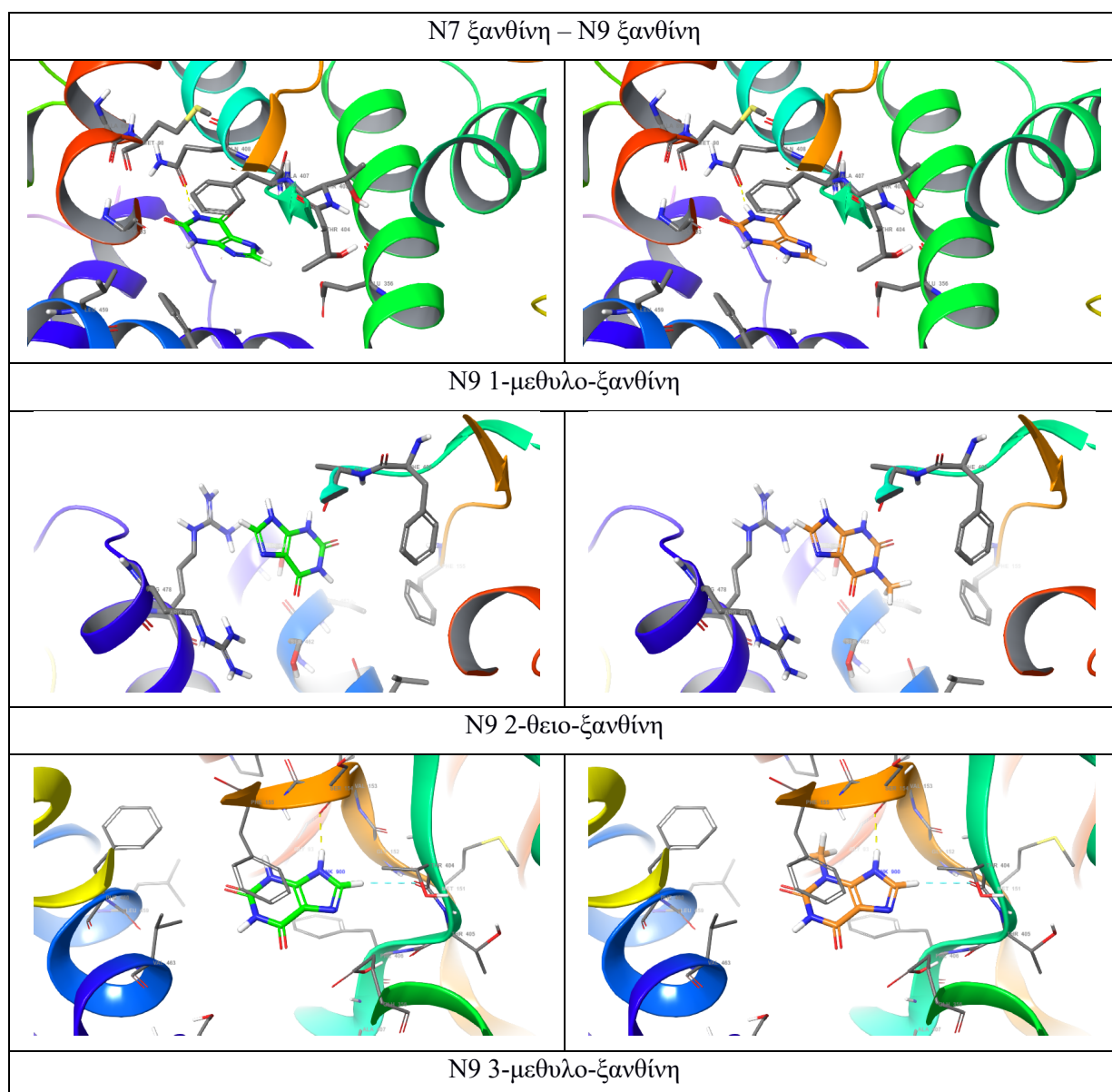


N9 8-μεθυλο-ξανθίνη

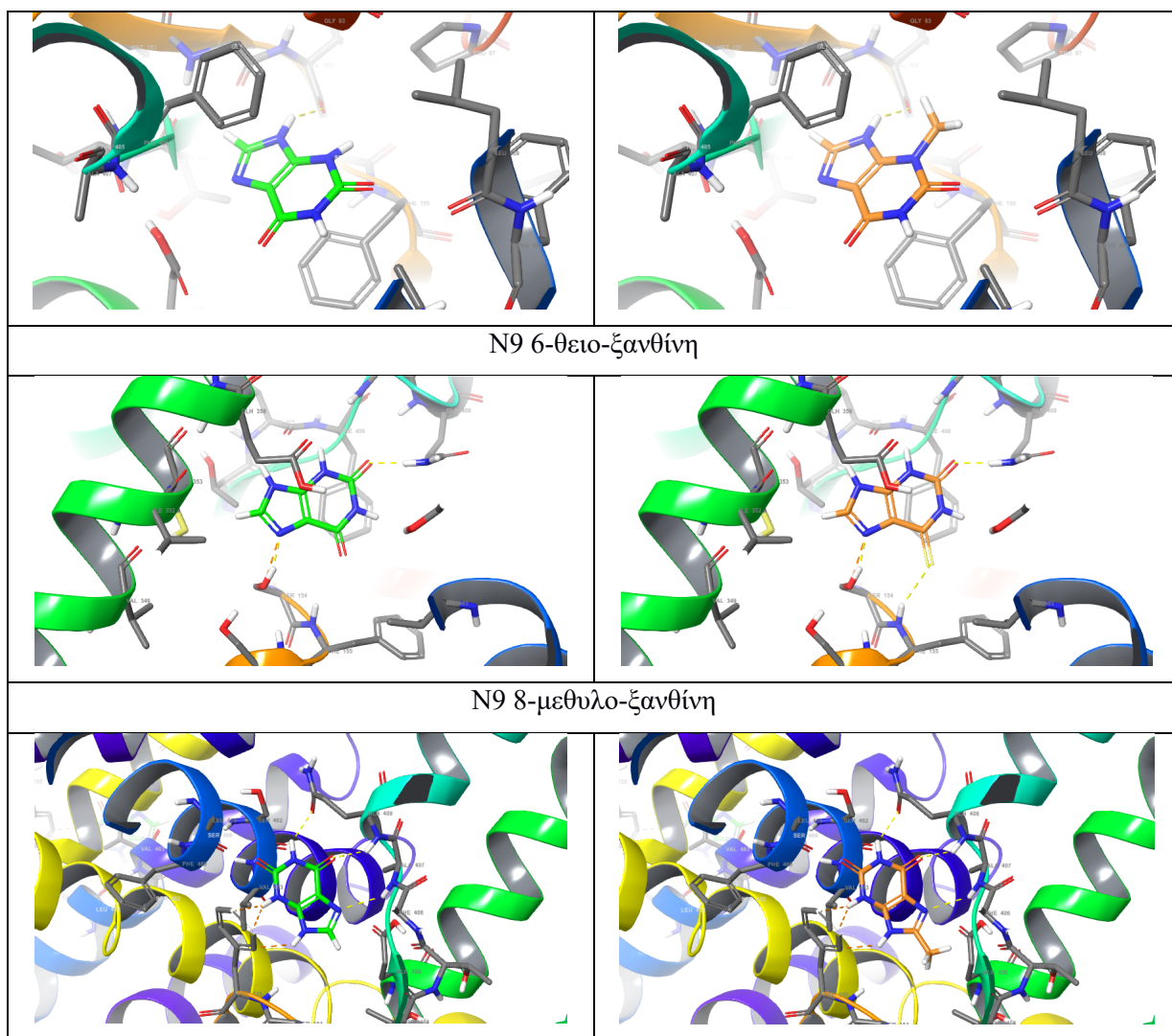


**Εικόνα 20: Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UarA με ανάλογα N9 ξανθίνης**

Παρακάτω παρατίθενται τα στιγμιότυπα από τα αποτελέσματα του FEP. Αριστερά φαίνεται η αρχική δομή και δεξιά η τελική δομή μετά την αλχημική μετατροπή.







**Εικόνα 21:** Στιγμιότυπα από την αρχική και τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης

Σε αναπαραστάσεις των αποτελεσμάτων παρατηρούμε σχεδόν σε όλα τα αποτελέσματα της μεθόδου FEP, ενώ αναμέναμε να πηγαίνουμε σε μια λιγότερο σταθερή δομή σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα αυτό να μην συμβαίνει στην παρούσα μελέτη, με ελάχιστες αλλαγές στην αρχική και τελική διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι η N9 9-θειο-ξανθίνη, όπου φαίνεται να έχουμε πιο σταθερή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου με εμφάνιση και ενός παραπάνω δεσμού.

### 3.3 Υπολογισμός Ελεύθερης Ενέργειας πρόσδεσης με το Λογισμικό AMBER

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι:

#### 1) Δημιουργία της αρχικής δομής και εκτέλεση προσομοίωσης για την απόκτηση ενός συστήματος σε ισορροπία

##### (i) Μοντελοποίηση συστήματος

Το σύστημα που μοντελοποιήθηκε σε αυτήν την προσομοίωση είναι η πρωτεΐνη UapA του *A. nidulans* σε αλληλεπίδραση με την ξανθίνη. Ως αρχείο εισόδου χρησιμοποιήθηκε μερικώς εξισορροπημένο και προετοιμασμένο με αφαίρεση πρωτονίων αρχείο pdb (pdb ID:5i6c), είτε προετοιμασμένο με το λογισμικό CHARMM membrane builder αρχείο με μοντέλο λιπιδικής στοιβάδας.

Το επόμενο βήμα ήταν να διαχωριστούν οι δομές της πρωτεΐνης UapA (ως μονομερές και ως διμερές) και των ξανθινών (xanA, xanB). Οι δομές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθούν ζεύγη αρχείων prmtop και inprcrd αερίου φάσης για τον υπολογισμό MM-PBSA καθώς και μία για το σύμπλοκο που θα χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση των προσομοιώσεων MD:

```
source /home/OPT/amber18/amber.sh

antechamber -i XAN7.sdf -fi sdf -o XAN7_ref.mol2 -fo mol2 -c bcc -s 2
parmchk2 -i XAN7_ref.mol2 -f mol2 -o XAN7.frcmod

tleap
source leaprc.gaff2
source leaprc.protein.ff19SB
source leaprc.lipid17
source leaprc.water.tip3p

prot = loadpdb uapa_monomer_forleap.pdb
solute = loadpdb membrane_water_ions_forleap.pdb
loadamberparams XAN7.frcmod
XAN7=loadmol2 XAN7_ref.mol2

complex_UapA_XAN7=combine{prot XAN7 solute}

set complex_UapA_XAN7 box { 85.385 81.555 97.084 }
```

```

addions2 complex_UapA_XAN7 Na+ 0
addions2 complex_UapA_XAN7 Cl- 0

saveamberparm complex_UapA_XAN7 complex_UapA_XAN7_solvated.prmtop
complex_UapA_XAN7_solvated.inpcrd

```

## (ii) Εξισορρόπηση του συμπλόκου

Εξισορρόπηση του συμπλόκου με την πραγματοποίηση μιας σύντομης ελαχιστοποίησης, 50ps θέρμανσης, 50 ps ισορροπίας πυκνότητας ακολουθούμενο από 500ps σταθερής εξισορρόπησης πίεσης στα 300K. Όλες οι προσομοιώσεις εκτελούνται με ανακίνηση σε άτομα υδρογόνου, ένα χρονικό βήμα 2 fs και δυναμική langevin για έλεγχο θερμοκρασίας. Τα αρχεία εισόδου έχουν ως εξής:

| min.in                                                                                                                                                                           | heat.in                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <pre> minimise 5i6c &amp;cntrl   imin=1,maxcyc=1000,ncyc=500,   cut=8.0,ntb=1,   ntc=2,ntf=2,   ntp=100,   ntr=1, restraintmask=':1-242',   restraint_wt=2.0 / </pre>            | <pre> heat 5i6c &amp;cntrl   imin=0,irest=0,ntx=1,   nstlim=25000,dt=0.002,   ntc=2,ntf=2,   cut=8.0, ntb=1,   ntp=500, ntwx=500,   ntt=3, gamma_ln=2.0,   tempi=0.0, temp0=300.0, ig=-1,   ntr=1, restraintmask=':1-242',   restraint_wt=2.0,   nmropt=1 / &amp;wt TYPE='TEMP0', istep1=0, istep2=25000,   value1=0.1, value2=300.0, / &amp;wt TYPE='END' / </pre> |
| density.in                                                                                                                                                                       | equil.in                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <pre> heat 5i6c &amp;cntrl   imin=0,irest=1,ntx=5,   nstlim=25000,dt=0.002,   ntc=2,ntf=2,   cut=8.0, ntb=2, ntp=1, taup=1.0,   ntp=500, ntwx=500,   ntt=3, gamma_ln=2.0, </pre> | <pre> heat 5i6c &amp;cntrl   imin=0,irest=1,ntx=5,   nstlim=250000,dt=0.002,   ntc=2,ntf=2,   cut=8.0, ntb=2, ntp=1, taup=2.0,   ntp=1000, ntwx=1000,   ntt=3, gamma_ln=2.0, </pre>                                                                                                                                                                                 |



|                                                                                 |                          |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| temp0=300.0, ig=-1,<br>ntr=1, restraintmask=':1-242',<br>restraint_wt=2.0,<br>/ | temp0=300.0, ig=-1,<br>/ |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|

## 2) Εκτέλεση προσομοίωσης και λήψη ενός συνόλου στιγμιότυπων

Η φάση προσομοίωσης θα πρέπει να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες με την τελική φάση εξισορρόπησης για να αποφευχθεί απότομο άλμα της δυναμικής ενέργειας, λόγω αλλαγής των συνθηκών προσομοίωσης.

Το αρχείο εισόδου είναι το παρακάτω:

| <b>prod.in</b>                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| prod 5i6c<br>&cntrl<br>imin=0, irest=1, ntx=5,<br>nstlim=250000, dt=0.002,<br>ntc=2, ntf=2,<br>cut=8.0, ntb=2, ntp=1,<br>taup=2.0,<br>ntpr=5000, ntwx=5000,<br>ntt=3, gamma_ln=2.0,<br>temp0=300.0, ig=-1,<br>/ istrng=0.100,<br>/ |

## 3) Υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης

Αρχείο εισόδου για τον υπολογισμό PB (Poisson – Boltzmann) και GB (Generalized Bond)

| <b>mmpbsa.in</b>                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Input file for running PB and GB<br>&general<br>endframe=50, verbose=1,<br># entropy=1,<br>/ |

```

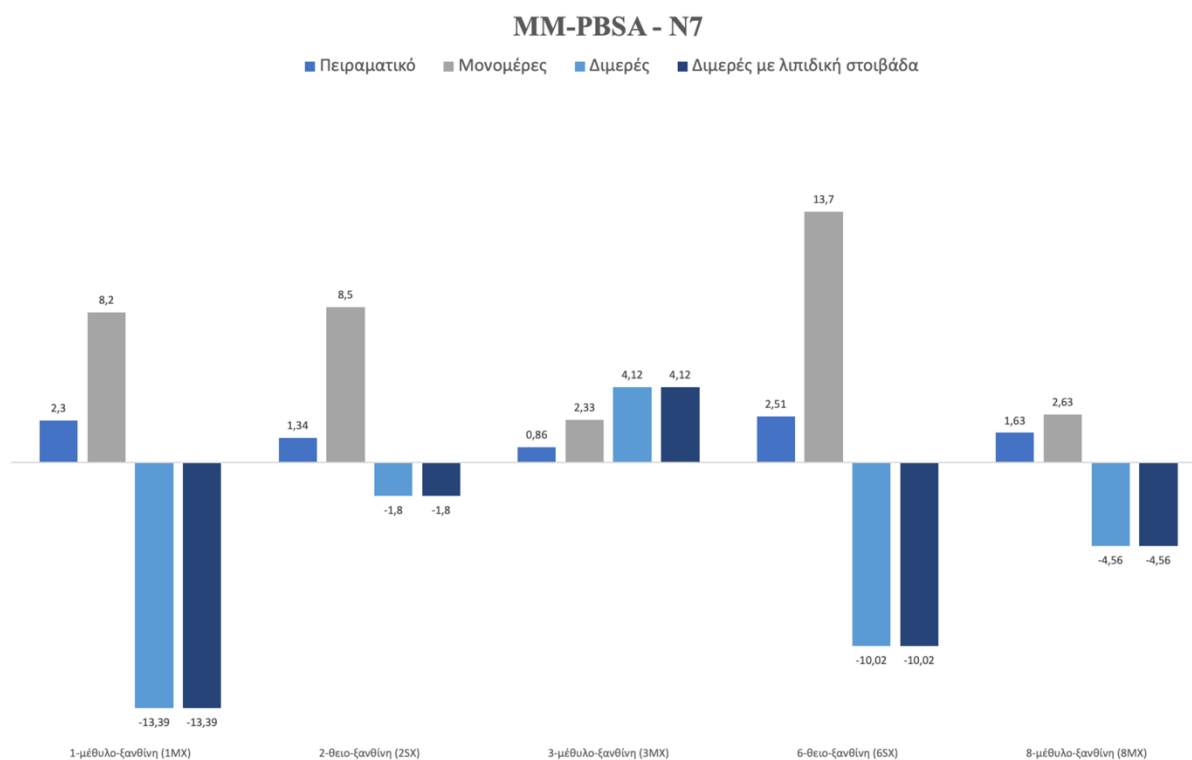
&gb
  igb=2, saltcon=0.100
/
&pb
  istrng=0.100,
/

```

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, κατά τον υπολογισμό του  $\Delta\Delta G^\circ$  παρατηρούμε μια καλή συσχέτιση για το μονομερές απουσία λιπιδίων, γεγονός που δεν ακολουθείται από μια καλή συσχέτιση και των υπολοίπων δομών (διμερών και διμερών με λιπιδική στοιβάδα), όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, παρακάτω.

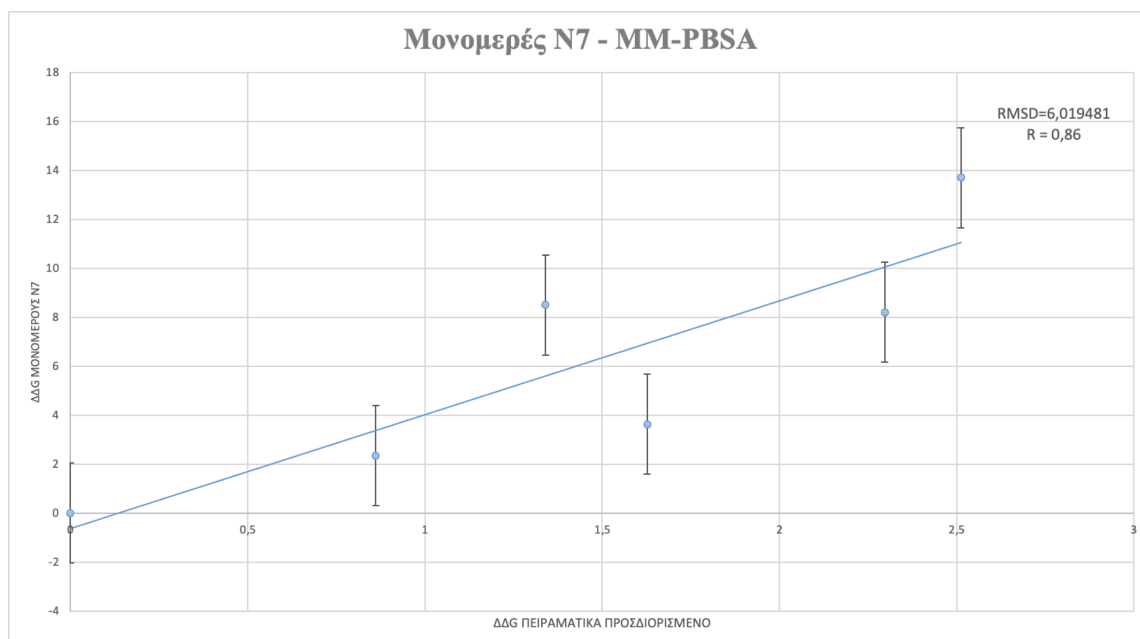
| N7                     | Πειραματικά<br>δεδομένα                 | Μονομερές                               | Διμερές       | Διμερές με<br>λιπιδική στοιβάδα |
|------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|---------------------------------|
|                        | $\Delta\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$ | $\Delta\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$ |               |                                 |
| ξανθίνη                | 0,0                                     | 0,00                                    | 0,00          | 0,00                            |
| 1-μέθυλο-ξανθίνη (1MX) | 2,30                                    | 8,20                                    | -13,39        | -6,70                           |
| 2-θειο-ξανθίνη (2SX)   | 1,34                                    | 8,50                                    | -1,80         | -8,73                           |
| 3-μέθυλο-ξανθίνη (3MX) | 0,86                                    | 2,33                                    | 4,12          | -12,79                          |
| 6-θειο-ξανθίνη (6SX)   | 2,51                                    | 13,70                                   | -10,02        | -5,46                           |
| 8-μέθυλο-ξανθίνη (8MX) | 1,63                                    | 2,63                                    | -4,56         | -1,32                           |
| Συσχέτιση              | -                                       | <b>0,87</b>                             | <b>-0,774</b> | <b>-0,16</b>                    |

**Πίνακας 8:** Υπολογισμός του  $\Delta\Delta G^\circ$  για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N7 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικό δεδομένα  $\Delta\Delta G^\circ$



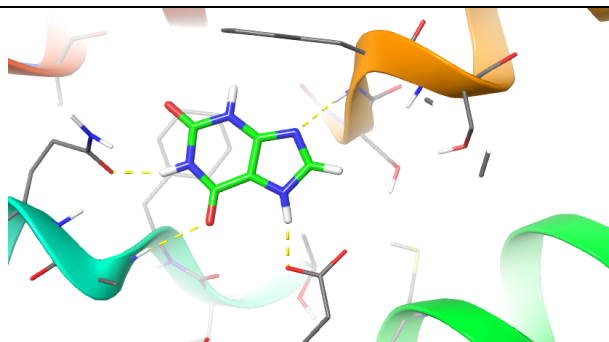
**Εικόνα 22: Ραβδόγραμμα των υπολογισμών  $\Delta\Delta G^0$  με την μέθοδο MM-PBSA σε ανάλογα του ταντομερούς N7 ξανθίνης**

Εφ' όσον διαφαινόταν μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ  $\Delta\Delta G^0$  του μονομερούς N7 με το αναμενόμενο  $\Delta\Delta G^0$  ένα διάγραμμα συσχέτισης αυτών των τιμών δίνει μια ξεκάθαρη εικόνα:

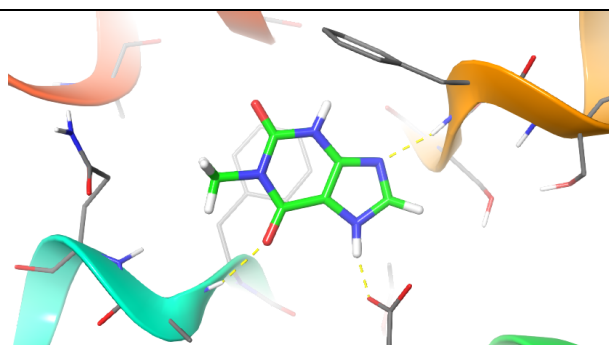


**Εικόνα 23: Διάγραμμα συσχέτισης των πιο σημαντικών ευρημάτων μεταξύ  $\Delta\Delta G^0$  του μονομερούς N7 με το αναμενόμενο  $\Delta\Delta G^0$  με τη μέθοδο MM-PBSA.**

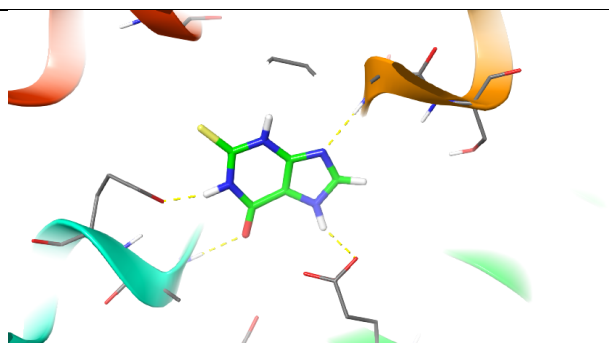
N7 ξανθίνη



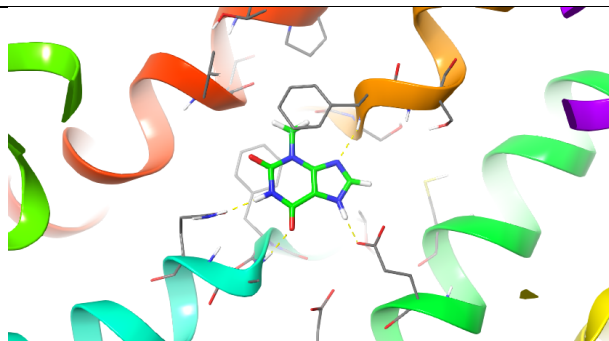
N7 1-μεθυλο-ξανθίνη



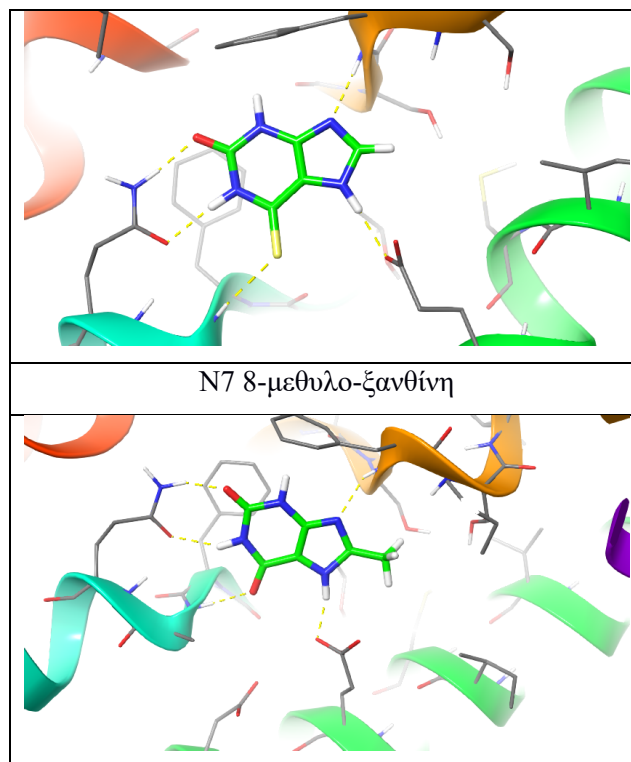
N7 2-θειο-ξανθίνη



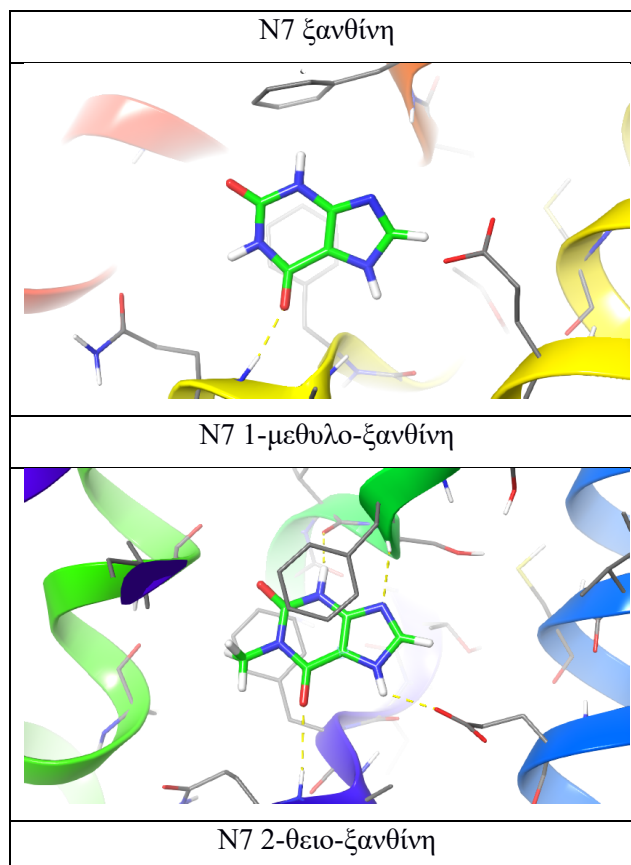
N7 3-μέθυλο-ξανθίνη

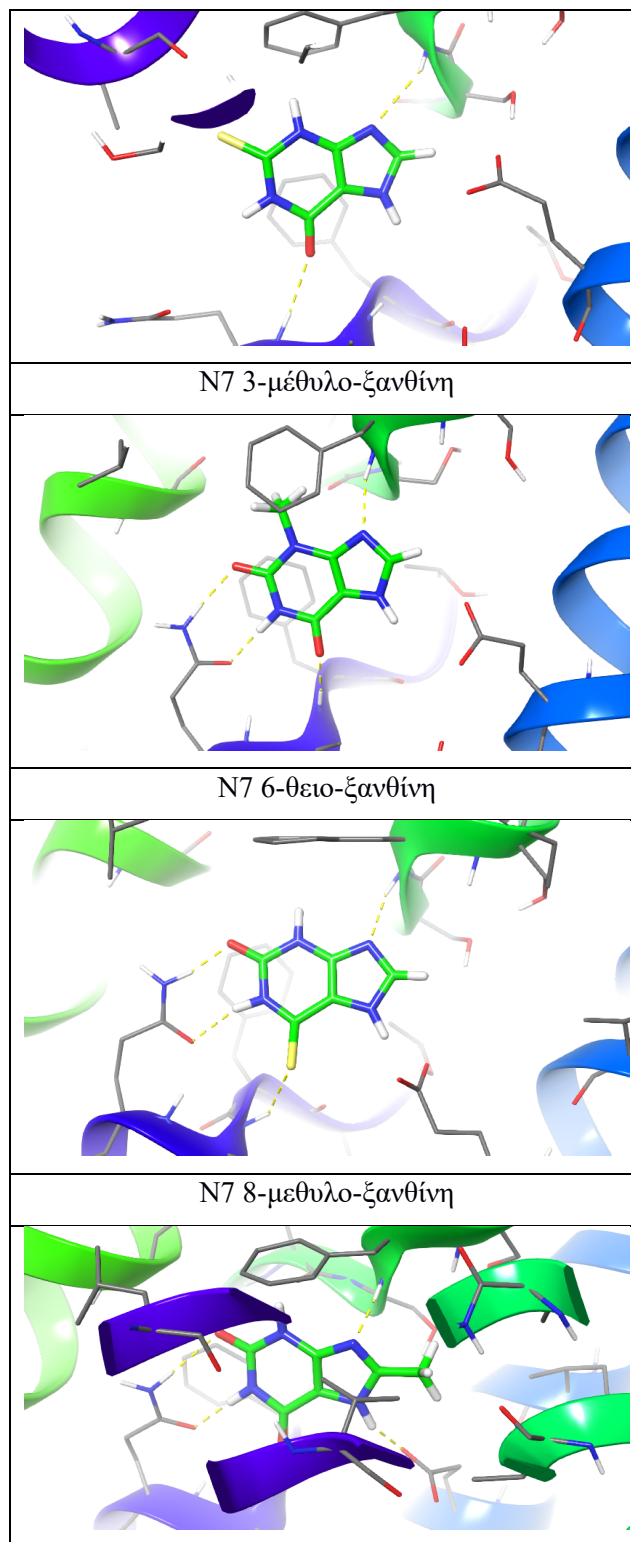


N7 6-θειο-ξανθίνη

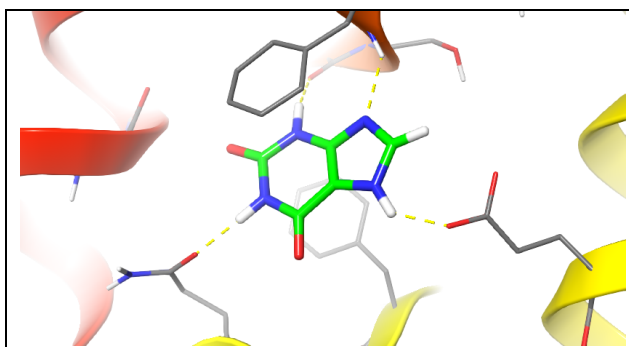


Εικόνα 24: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης

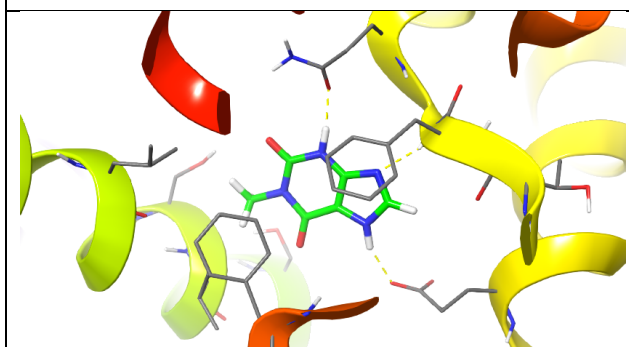




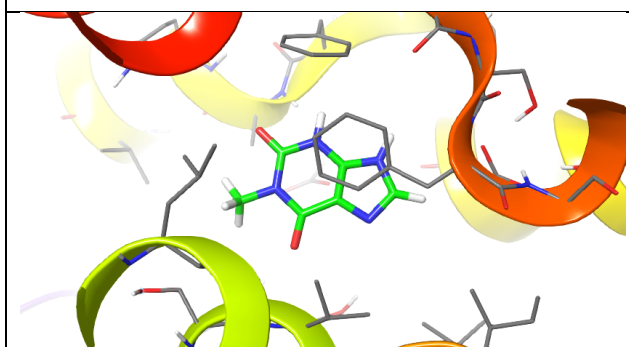
Εικόνα 25: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης



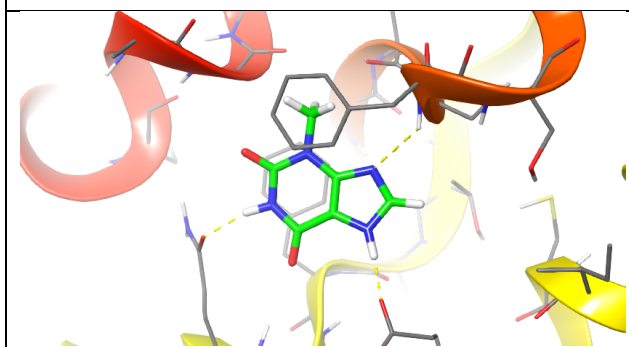
N7 1-μεθυλο-ξανθίνη



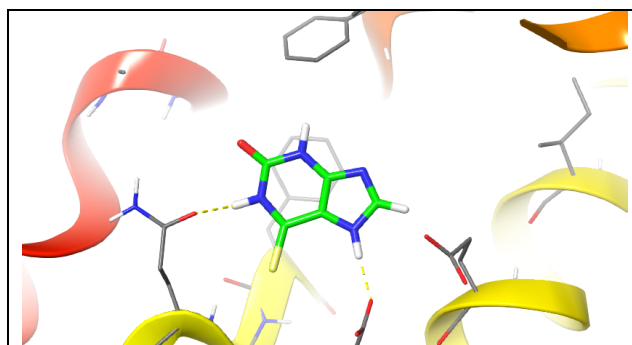
N7 2-θειο-ξανθίνη



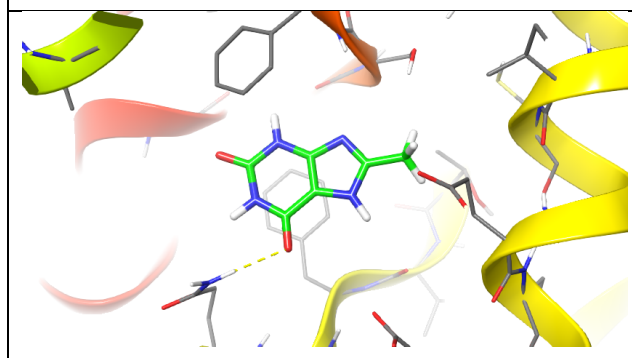
N7 3-μέθυλο-ξανθίνη



N7 6-θειο-ξανθίνη



N7 8-μεθυλο-ξανθίνη





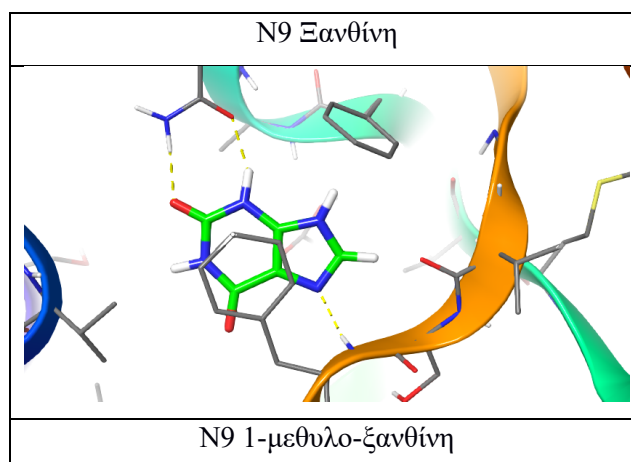
**Εικόνα 26: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς παρουσία λιπιδικής στοιβάδας UapA με ανάλογα N7 ξανθίνης**

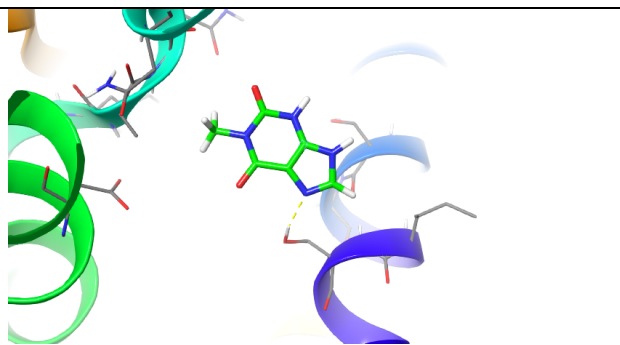
Τα αποτελέσματα για το ταυτομερές N9 δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα όπως συνέβη παραπάνω. Η συσχέτιση τόσο για τη μονομερή και διμερή μορφή απουσία λιπιδίων, όσο και για το διμερές με λιπιδική στοιβάδα κυμάνθηκε κοντά στο 0. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 9, όπου έγινε αναλυτικό υπολογισμός του  $\Delta\Delta G^\circ$  για την εκάστοτε περίπτωση.

| N9                     | Πειραματικά<br>δεδομένα                 | Μονομερές                               | Διμερές      | Διμερές με<br>λιπιδική<br>στοιβάδα |
|------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------|------------------------------------|
|                        | $\Delta\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$ | $\Delta\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$ |              |                                    |
| ξανθίνη                | 0,0                                     | 0,00                                    | 0,00         | 0,00                               |
| 1-μέθυλο-ξανθίνη (1MX) | 2,30                                    | 5,48                                    | -3,34        | 15,44                              |
| 2-θειο-ξανθίνη (2SX)   | 1,34                                    | 3,90                                    | -5,56        | 11,65                              |
| 3-μέθυλο-ξανθίνη (3MX) | 0,86                                    | 5,17                                    | -6,30        | 3,62                               |
| 6-θειο-ξανθίνη (6SX)   | 2,51                                    | -7,08                                   | -2,12        | -3,26                              |
| 8-μεθυλο-ξανθίνη (8MX) | 1,63                                    | 16,180                                  | -1,62        | 15,71                              |
| Συσχέτιση              | -                                       | <b>-0,09</b>                            | <b>-0,11</b> | <b>0,25</b>                        |

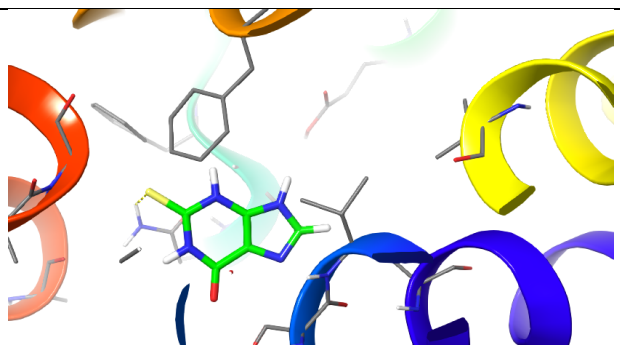
**Πίνακας 9: Υπολογισμός του  $\Delta\Delta G^\circ$  για κάθε ανάλογο του ταυτομερούς N9 ξανθίνης που εξετάστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA και συσχέτισή του με το αναμενόμενο από τα πειραματικό δεδομένα  $\Delta\Delta G^\circ$**

Αναλυτικά τα στιγμιότυπα παρουσιάζονται παρακάτω.

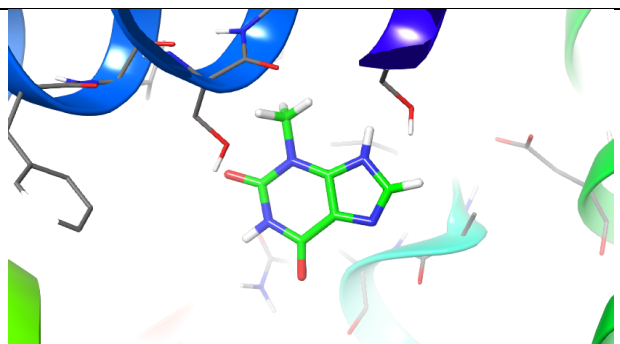




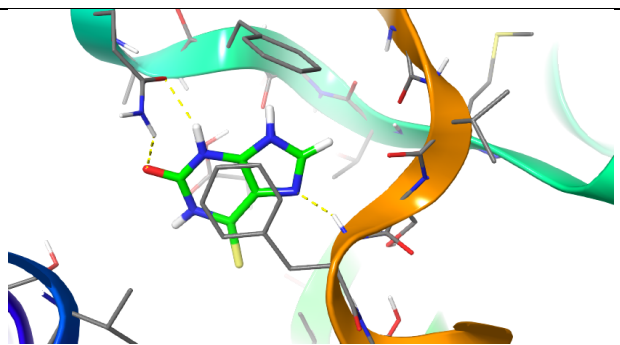
N9 2-θειο-ξανθίνη



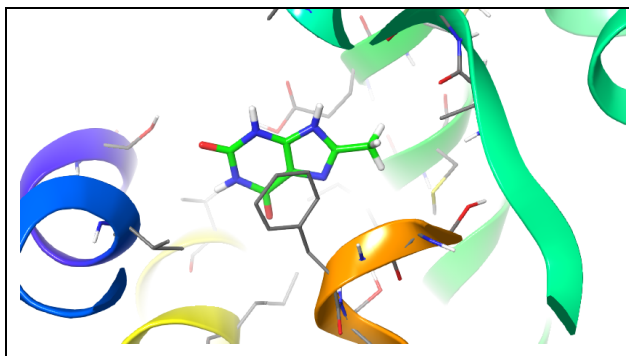
N9 3-μεθυλο-ξανθίνη



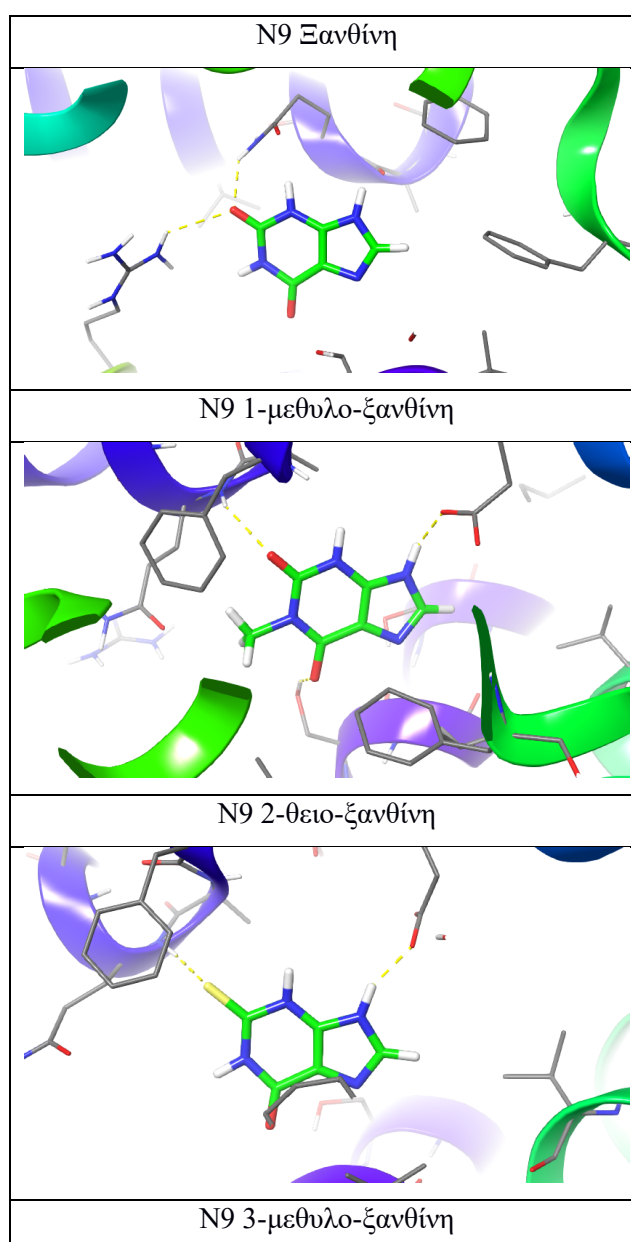
N9 6-θειο-ξανθίνη

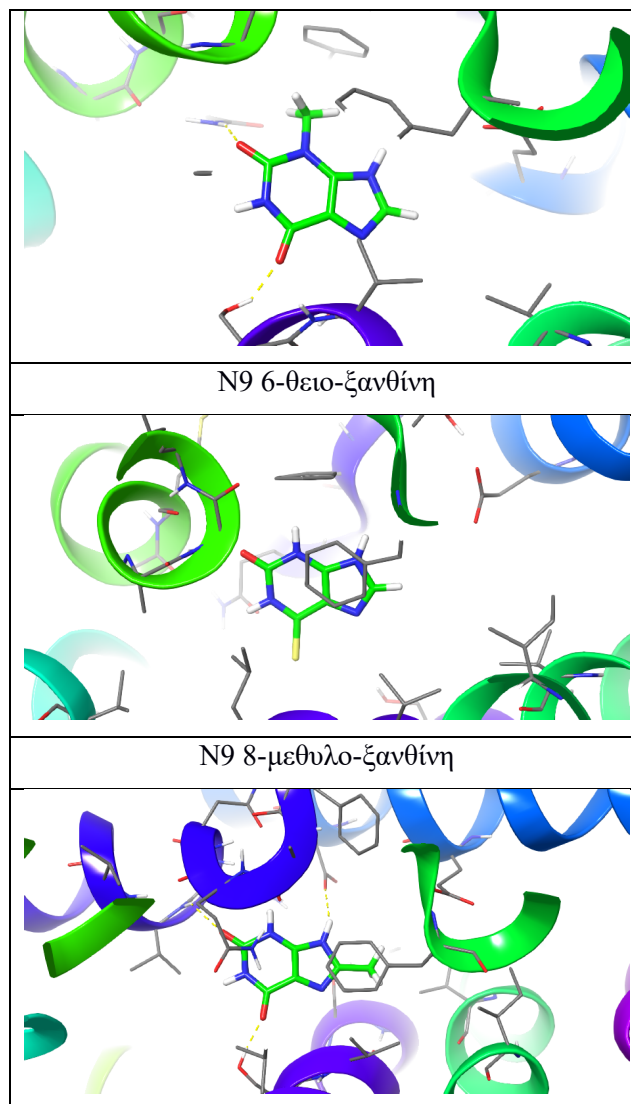


N9 8-μεθυλο-ξανθίνη

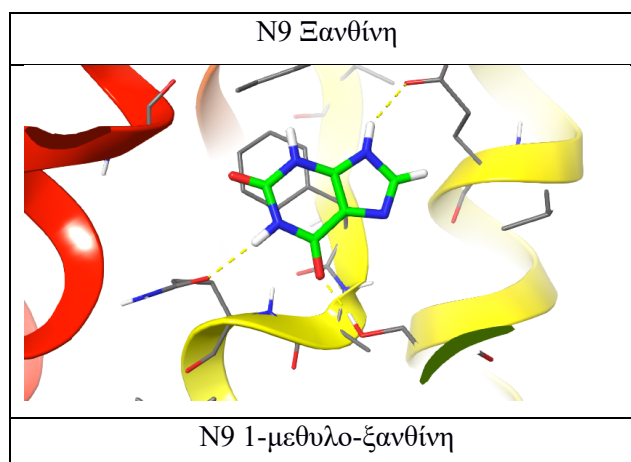


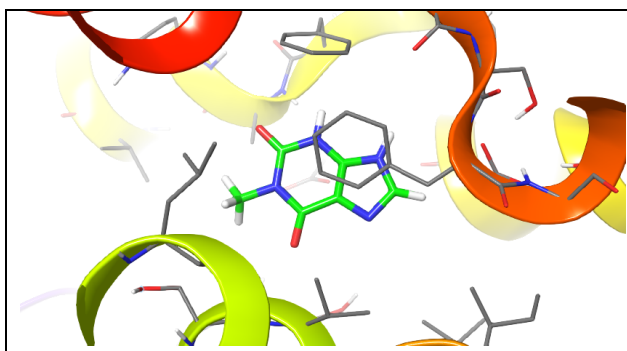
Εικόνα 27: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του μονομερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης



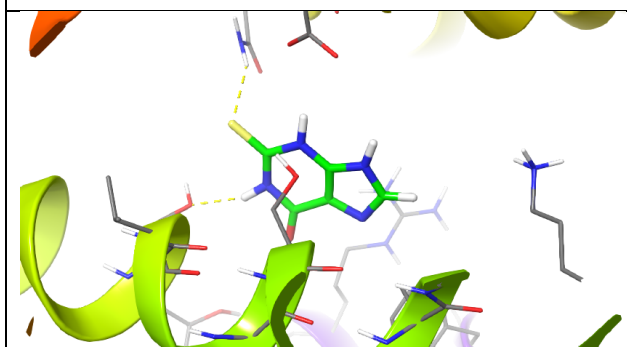


**Εικόνα 28: Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης**

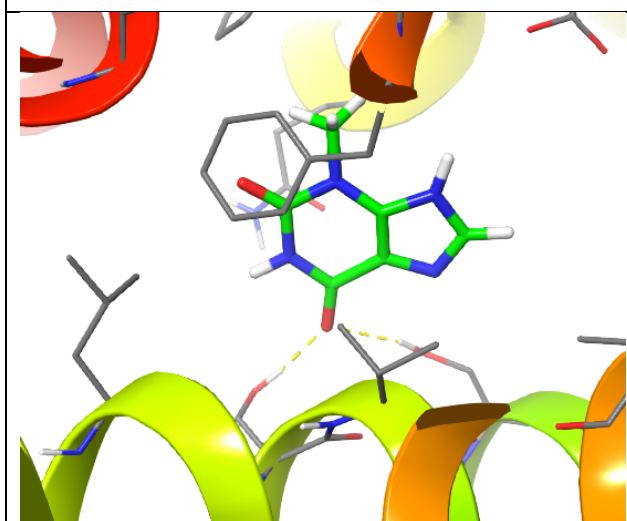




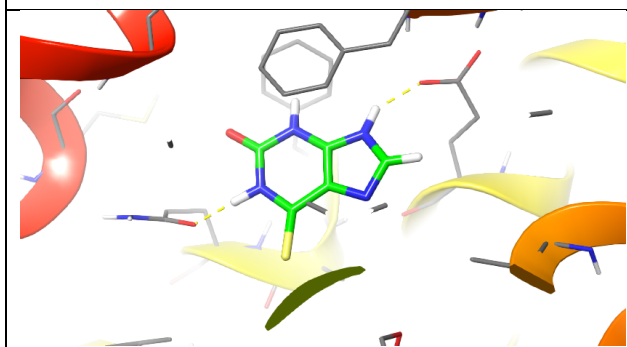
N9 2-θειο-ξανθίνη



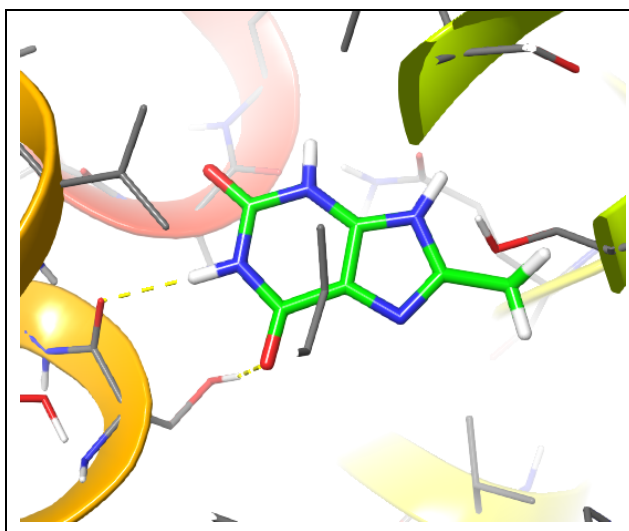
N9 3-μεθυλο-ξανθίνη



N9 6-θειο-ξανθίνη



N9 8-μεθυλο-ξανθίνη

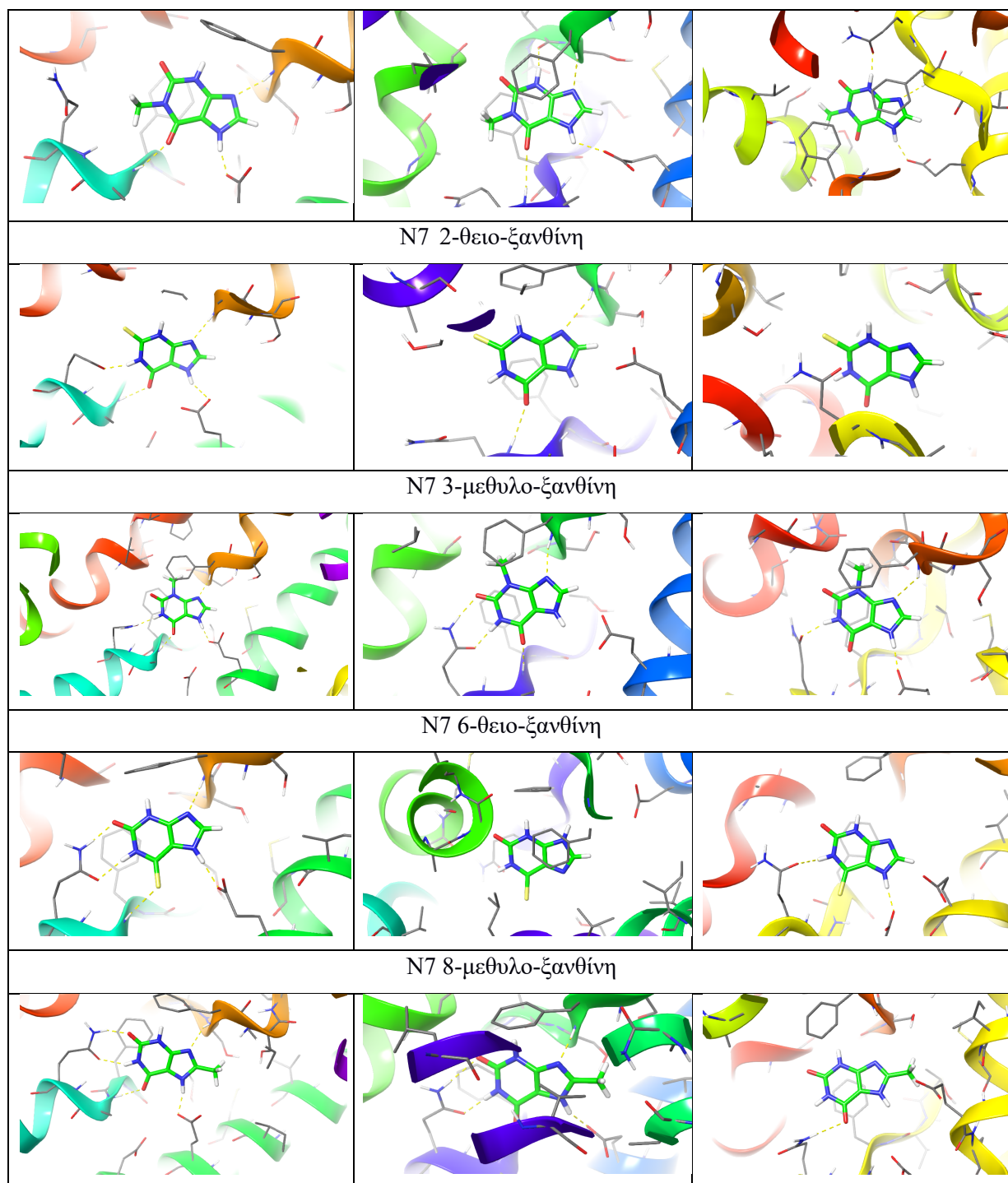


**Εικόνα 29:** Στιγμιότυπα από την τελική δομή του ενεργού κέντρου του διμερούς με λιπιδική στοιβάδα UapA με ανάλογα N9 ξανθίνης

### 3.4 Συγκρίσεις αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να γίνει μια επισκόπηση των αποτελεσμάτων και σύγκριση στη βάση αυτή τη φορά της ξανθίνης. Διαπιστώνεται πιο ξεκάθαρα στην περίπτωση των N7 ξανθινών η διαφορά μεταξύ του αριθμού των πιθανών δεσμών μεταξύ ξανθίνης και UapA, αλλά και η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου που στην περίπτωση του μονομερούς παρουσιάζει ελάχιστες διαφοροποιήσεις από ταυτομερές σε ταυτομερές ειδικά εν συγκρίσει με το ενεργό κέντρο του διμερούς.

| Μονομερές με MM - PBSA | Διμερές με MM - PBSA | Διμερές παρουσία λιπιδίων με MM - PBSA |
|------------------------|----------------------|----------------------------------------|
| N7 ξανθίνη             |                      |                                        |
|                        |                      |                                        |
| N7 1-μεθυλο-ξανθίνη    |                      |                                        |

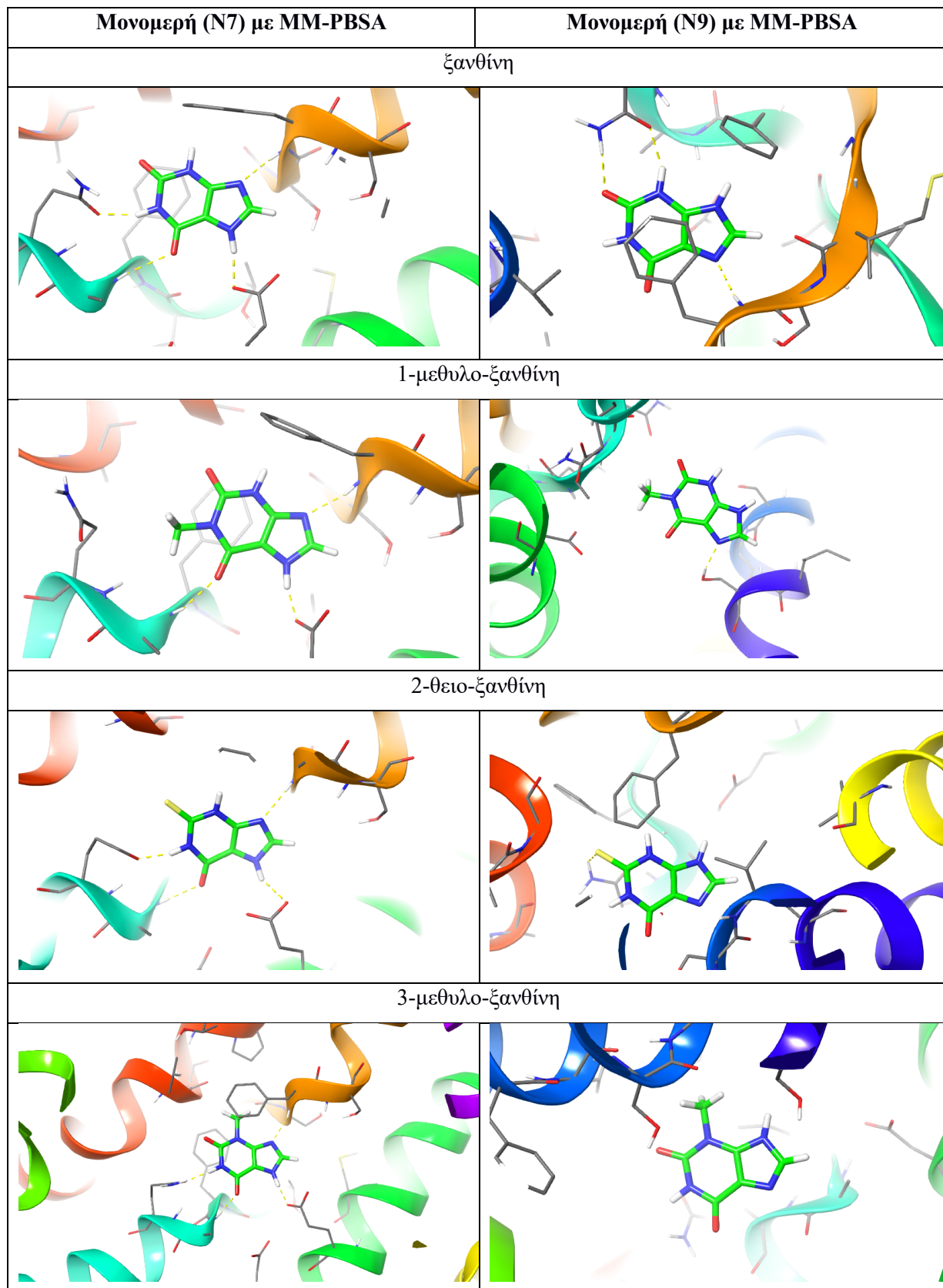


**Εικόνα 30: Συγκρίσεις των στιγμιότυπων των αποτελεσμάτων του MM-PBSA για τις N7 ξανθίνες**

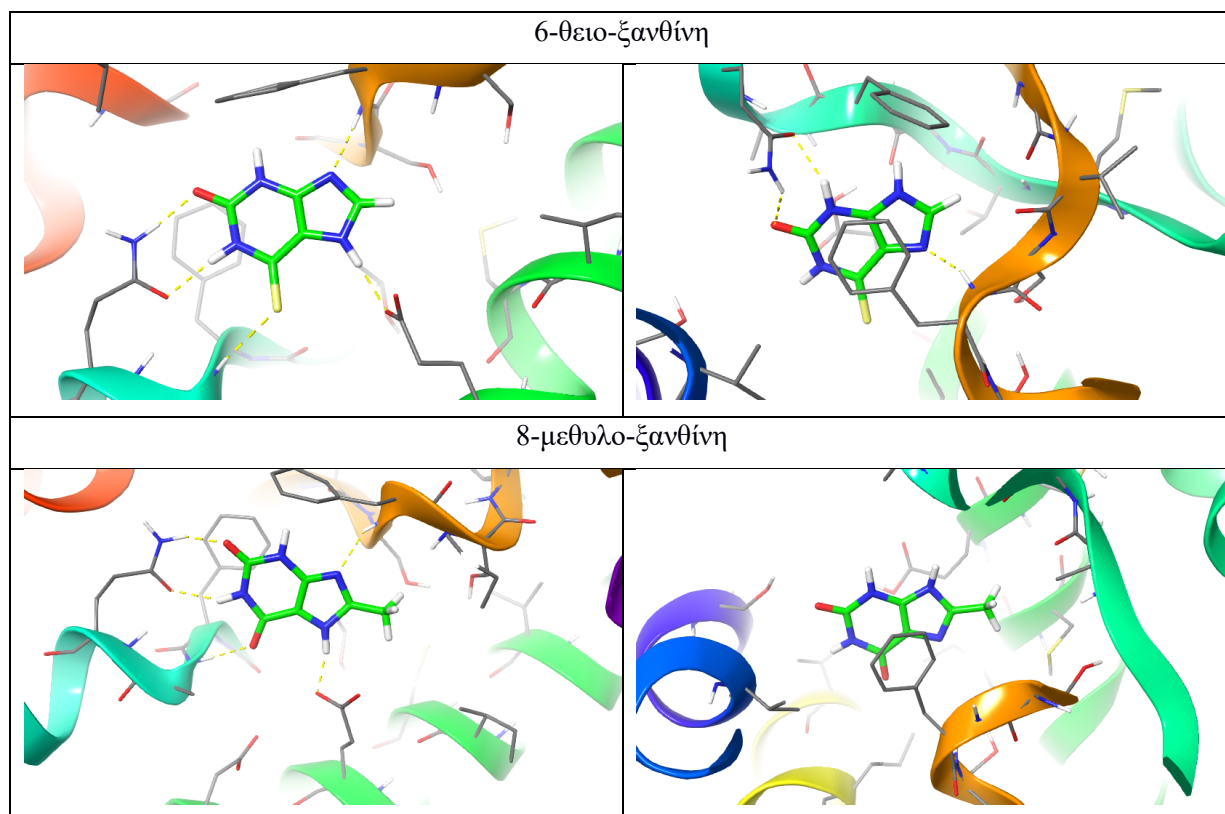
Ενώ στην πρώτη περίπτωση, του μονομέρους του UapA με N7 ξανθίνες, παρατηρούνται 3-4 πιθανοί δεσμοί στις περισσότερες περιπτώσεις και τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα πειραματικά προσδιορισμένα δεδομένα, στην περίπτωση των N9 ξανθινών τα αποτελέσματα απέχουν αρκετά από την πειραματικά προσδιορισμένη και αναμενόμενη τιμή. Παρατηρούνται περιπτώσεις με έναν ή και κανέναν πιθανό δεσμό, όπως στην περίπτωση της 2-θειοξανθίνης σε μονομερές UapA στις οποίες



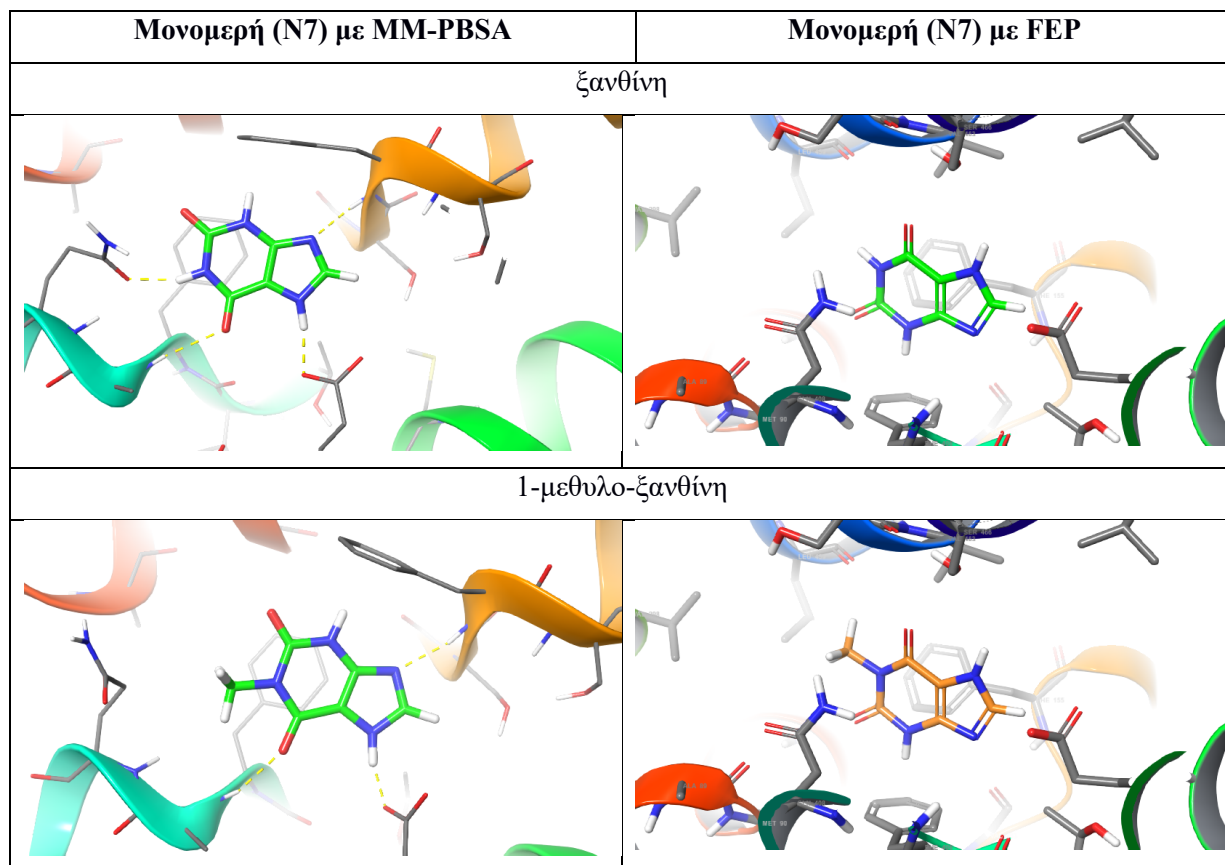
φαίνεται το ενεργό κέντρο να μην έχει συμπαγή δομή και το πακετάρισμα γύρω από την ξανθίνη να έχει χαλαρώσει.

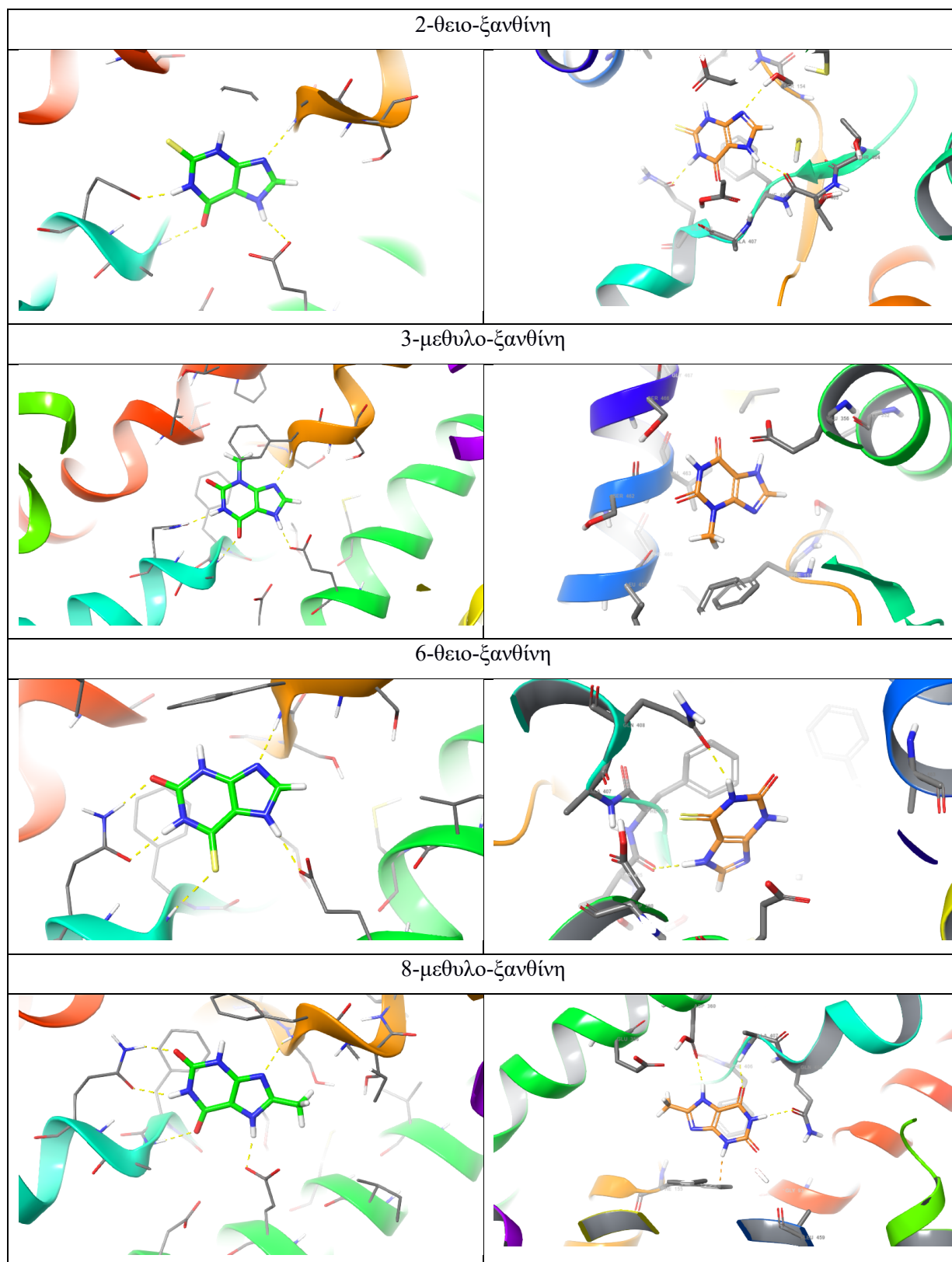






**Εικόνα 31: Συγκρίσεις των στιγμιότυπων των αποτελεσμάτων του MM-PBSA για τις N7 και N9 ξανθίνες σε μονομερές UapA**





**Εικόνα 32:** Συγκρίσεις των στιγμιότυπων των αποτελεσμάτων για τις N7 ξανθίνες σε μονομερές UapA με την μέθοδο FEP και MM-PBSA αντίστοιχα

## 4. Συζήτηση

Η μέθοδος MMPSA και συγκεκριμένα στην κατάσταση του μονομερούς αποδείχθηκε ακριβής για τη συσχέτιση πειραματικής και θεωρητικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης, καθώς εμφάνισε συσχέτιση 0,87.

Προχωρώντας προς την πραγματική εικόνα, δεν παρατηρήθηκε βελτιστοποίηση όταν με την ίδια μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το διμερές και το διμερές παρουσία λιπιδικής στιβάδας. Η ύπαρξη λιπιδικής στιβάδας και η παρουσία διμερούς ενδέχεται να εισαγάγει ενεργειακούς όρους οι οποίοι βρίσκονται πολύ μακριά από τον θύλακα σύνδεσης και σχετίζονται με τον τρόπο εισαγωγής των μορίων (ξανθινών) από το εξωτερικό περιβάλλον του UapA στο εσωτερικό, αλλά και την αναγνώριση των ξανθινών από τον προσδέτη, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ύπαρξης σφαλμάτων στην πρόβλεψη δέσμευσης και τη μειωμένη ακρίβεια στο επίπεδο της σύνδεσης.

Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ της συσχέτισης των μονομερών N7 και N9 με τη διαδικασία MMPBSA που έδωσε τα ακριβέστερα αποτελέσματα πιθανώς να οφείλεται σε αλλαγή της δομής του ενεργού κέντρου σε μια δομή λιγότερο καλά πακεταρισμένη γύρω από την ξανθίνη.

Παρόλο που η δραστηριότητα και η λειτουργία του UapA απαιτεί τον σχηματισμό διμερών και η ύπαρξη λιπιδικής στιβάδας είναι δεδομένη, οι προσομοιώσεις συγγένειας σύνδεσης έχουν καλύτερα αποτελέσματα σε μονομερές. Σε αντίθεση με τις προσομοιώσεις συγγένειας, οι προσομοιώσεις μετατόπισης χρειάζονται τη χρήση διμερούς UapA και διπλής στιβάδας λιπιδίων.

Αν και η μέθοδος FEP θεωρείται πιο ακριβής για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης φαίνεται πως κάτι τέτοιο δεν συνέβη στην παρούσα μελέτη. Επειδή είναι εμπειρικές μέθοδοι, όσο πιο κοντά βρισκόμαστε στο σύστημα τόσο πιο μικρό είναι το σφάλμα. Όσο το σύστημα μεγαλώνει και εντάσσονται και άλλες παράμετροι, μεγαλώνει το σφάλμα. Για τον λόγο αυτό το MM-PBSA ως μονομερές έδειξε καλύτερα αποτελέσματα.

Πέρα από τον παράγοντα της ακρίβειας μιας μεθόδου, αξία έχει και η ταχύτητα της μεθόδου αυτής. Η μέθοδος FEP ο χρόνος για να πραγματοποιηθούν όλες οι διεργασίες της μεθόδου FEP είναι σχεδόν διπλάσιος σε σύγκριση με τη μέθοδο MM-PBSA.

# Βιβλιογραφία

Abd-Elfattah, A.-S. A. *et al.* (1996) “Physiologic and Pathophysiologic Significance of Purine Metabolism in the Heart,” in. Springer, Boston, MA, pp. 3–16. doi: 10.1007/978-1-4613-0455-5\_1.

Alguet, Y. *et al.* (2016) “Structure of eukaryotic purine/H<sup>+</sup> symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity,” *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, pp. 1–9. doi: 10.1038/ncomms11336.

Amillis, S. *et al.* (2011) “Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter,” *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 411(3), pp. 567–580. doi: 10.1016/J.JMB.2011.06.024.

Arakawa, T. *et al.* (2015) “Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3,” *Science*. American Association for the Advancement of Science, 350(6261), pp. 680–684. doi: 10.1126/science.aaa4335.

Aryal, P., Sansom, M. S. P. and Tucker, S. J. (2015) “Hydrophobic Gating in Ion Channels,” *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 427(1), pp. 121–130. doi: 10.1016/J.JMB.2014.07.030.

Boresch, S. *et al.* (2003) “Absolute binding free energies: A quantitative approach for their calculation,” *Journal of Physical Chemistry B*. American Chemical Society, 107(35), pp. 9535–9551. doi: 10.1021/jp0217839.

Brown, A. M. *et al.* (2011) “Purine biosynthesis in archaea: Variations on a theme,” *Biology Direct*. BioMed Central, 6(1), pp. 1–21. doi: 10.1186/1745-6150-6-63.

Brown, D. A. and London, E. (2000) “Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts,” *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 275(23), pp. 17221–17224. doi: 10.1074/jbc.R000005200.

Casseltan, L. and Zolan, M. (2002) “The art and design of genetic screens: Filamentous fungi,” *Nature Reviews Genetics*. Nat Rev Genet, pp. 683–697. doi: 10.1038/nrg889.

Chiu, S. W., Subramaniam, S. and Jakobsson, E. (1999) “Simulation study of a gramicidin/lipid bilayer system in excess water and lipid. I. Structure of the molecular complex,” *Biophysical Journal*. The Biophysical Society, 76(4), pp. 1929–1938. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77352-2.

Cooper, G. M. and Hausman, R. E. (2007) *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*, Sinauer Associates.

Coutre, J. Le and Ronald Kaback, H. (2000) “Structure-function relationships of integral membrane proteins: Membrane transporters vs channels,” *Biopolymers - Peptide Science Section*, pp. 297–307. doi: 10.1002/1097-0282(2000)55:4<297::AID-BIP1003>3.0.CO;2-H.

Davies, O. *et al.* (2012) “Characterisation of multiple substrate-specific (d)ITP/(d)XTPase and modelling of deaminated purine nucleotide metabolism,” *BMB Reports*. BMB Rep, 45(4), pp. 259–264. doi: 10.5483/BMBRep.2012.45.4.259.

Deng, Y. and Roux, B. (2006) “Calculation of standard binding free energies: Aromatic molecules in the T4 lysozyme L99A mutant,” *Journal of Chemical Theory and Computation*. American Chemical Society, 2(5), pp. 1255–1273. doi: 10.1021/ct060037v.

Diallinas, G. *et al.* (1998) “Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues,” *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 17(14), pp. 3827–3837. doi: 10.1093/emboj/17.14.3827.

Diallinas, G. (2008) “Biochemistry: An almost-complete movie,” *Science*, pp. 1644–1645. doi: 10.1126/science.1168107.

Diallinas, G. (2014) “Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters,” *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Research Foundation, p. 207. doi: 10.3389/fphar.2014.00207.

Diallinas, G. and Gournas, C. (2008) “Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems,” *Channels*. Taylor and Francis Inc., pp. 363–372. doi: 10.4161/chan.2.5.6902.

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(2), pp. 341–350. doi: 10.1093/genetics/122.2.341.

Dorland, W. A. N. (William A. N. (2012) *Dorland's illustrated medical dictionary*. Saunders/Elsevier.

Dubyak, G. R. (2004) “Ion homeostasis, channels, and transporters: An update on cellular mechanisms,” *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*. Adv Physiol Educ, 28(4), pp. 143–154. doi: 10.1152/advan.00046.2004.

Echarri, A., Muriel, O. and Del Pozo, M. A. (2007) “Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: Insights from integrin signaling,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Semin Cell Dev Biol, pp. 627–637. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.08.004.

Engelking, L. R. (2015) “Nucleic Acid and Nucleotide Turnover,” in *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. Academic Press, pp. 98–104. doi: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50017-7.

Enomoto, A. *et al.* (2002) “Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates

blood urate levels,” *Nature*. *Nature*, 417(6887), pp. 447–452. doi: 10.1038/nature742.

F Kilic, G. R. (2000) “Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences,” *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. National Academy of Sciences, 97(7), pp. 3106–3111. doi: 10.1073/pnas.97.7.3106.

Faraldo-Gómez, J. D., Smith, G. R. and Sansom, M. S. (2002) “Setting up and optimization of membrane protein simulations,” *European Biophysics Journal* 2002 31:3. Springer, 31(3), pp. 217–227. doi: 10.1007/S00249-002-0207-5.

Feig, M. *et al.* (2004) “Performance Comparison of Generalized Born and Poisson Methods in the Calculation of Electrostatic Solvation Energies for Protein Structures,” *Journal of Computational Chemistry*. *J Comput Chem*, 25(2), pp. 265–284. doi: 10.1002/jcc.10378.

Fox, I. H. and Kelley, W. N. (1978) “The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells.,” *Annual review of biochemistry*. *Annu Rev Biochem*, pp. 655–686. doi: 10.1146/annurev.bi.47.070178.003255.

Frillingos, S. (2012) “Insights to the evolution of nucleobase-ascorbate transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ,” *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. *Int J Biochem Mol Biol*, pp. 250–272. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23097742/> (Accessed: September 11, 2021).

Gadsby, D. C. (2009) “Ion channels versus ion pumps: The principal difference, in principle,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 344–352. doi: 10.1038/nrm2668.

Galagan, J. E. *et al.* (2005) “Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*,” *Nature*. *Nature*, 438(7071), pp. 1105–1115. doi: 10.1038/nature04341.

Gasperi, V. *et al.* (2012) “GPR55 and its Interaction with Membrane Lipids: Comparison with Other Endocannabinoid-Binding Receptors,” *Current Medicinal Chemistry*. *Curr Med Chem*, 20(1), pp. 64–78. doi: 10.2174/09298673130108.

Geertsma, E. R. *et al.* (2015) “Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family,” *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 22(10), pp. 803–808. doi: 10.1038/nsmb.3091.

Gohlke, H. and Klebe, G. (2002) “Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors,” *Angewandte Chemie - International Edition*. *Angew Chem Int Ed Engl*, pp. 2644–2676. doi: 10.1002/1521-3773(20020802)41:15<2644::AID-ANIE2644>3.0.CO;2-O.

Goudela, S. *et al.* (2008) “Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*,” *Fungal Genetics and Biology*. *Fungal Genet Biol*, 45(4), pp. 459–472. doi: 10.1016/j.fgb.2007.08.001.

Guarnieri, F. and Still, W. C. (1994) “A rapidly convergent simulation method: Mixed Monte Carlo/stochastic dynamics,” *Journal of Computational Chemistry*, 15(11), pp. 1302–1310. doi: 10.1002/jcc.540151111.



Homeyer, N. *et al.* (2014) “Binding free energy calculations for lead optimization: Assessment of their accuracy in an industrial drug design context,” *Journal of Chemical Theory and Computation*. American Chemical Society, 10(8), pp. 3331–3344. doi: 10.1021/ct5000296.

Houbraken, J., de Vries, R. P. and Samson, R. A. (2014) “Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species,” in *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 199–249. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.

Huang, N. and Jacobson, M. P. (2007) “Physics-based methods for studying protein-ligand interactions,” *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 10(3), pp. 325–331. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/6281660> (Accessed: September 29, 2021).

Huanga, D. and Caflischa, A. (2010) “Library screening by fragment-based docking,” *Journal of Molecular Recognition*. John Wiley & Sons, Ltd, 23(2), pp. 183–193. doi: 10.1002/jmr.981.

Ishikawa, T., Aw, W. and Kaneko, K. (2013) “Metabolic interactions of Purine derivatives with human ABC transporter ABCG2: Genetic testing to assess gout risk,” *Pharmaceuticals*, pp. 1347–1360. doi: 10.3390/ph6111347.

Jahn, K. A., Su, Y. and Braet, F. (2011) “Multifaceted nature of membrane microdomains in colorectal cancer,” *World Journal of Gastroenterology*. World J Gastroenterol, 17(6), pp. 681–690. doi: 10.3748/wjg.v17.i6.681.

JK De Zutter, K. L. D. D. A. C. (2013) “Sequence determinants of GLUT1 oligomerization: analysis by homology-scanning mutagenesis,” *J. Biol. Chem.*, 288(28), pp. 20734–20744. doi: 10.1074/jbc.m113.469023.

Jo, S. *et al.* (2008) “CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM,” *Journal of Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 29(11), pp. 1859–1865. doi: 10.1002/JCC.20945.

Jo, S., Kim, T. and Im, W. (2007) “Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations,” *PLOS ONE*. Public Library of Science, 2(9), p. e880. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0000880.

Juan-Sanz, J. de *et al.* (2011) “Endocytosis of the Neuronal Glycine Transporter GLYT2: Role of Membrane Rafts and Protein Kinase C-Dependent Ubiquitination,” *Traffic*. John Wiley & Sons, Ltd, 12(12), pp. 1850–1867. doi: 10.1111/J.1600-0854.2011.01278.X.

Jung, D. K. *et al.* (2006) “Structural and functional analysis of PucM, a hydrolase in the ureide pathway and a member of the transthyretin-related protein family,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(26), pp. 9790–9795. doi: 10.1073/pnas.0600523103.

Karatza, P. and Frillingos, S. (2005) “Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in Escherichia coli,” *Molecular Membrane Biology*, 22(3), pp. 251–261. doi: 10.1080/09687860500092927.

Karena, E. and Frillingos, S. (2011) “The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine



permease XanQ of Escherichia coli,” *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), pp. 39595–39605. doi: 10.1074/jbc.M111.299164.

Kazmier, K. *et al.* (2014) “Conformational dynamics of ligand-dependent alternating access in LeuT,” *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 21(5), pp. 472–479. doi: 10.1038/nsmb.2816.

Kirk, P. *et al.* (2008) “Dictionary of the Fungi (10th ed.),” *Dictionary of the Fungi (10th ed.)*, (May 2018).

Kollman, P. A. *et al.* (2000) “Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models,” *Accounts of Chemical Research*. American Chemical Society, 33(12), pp. 889–897. doi: 10.1021/ar000033j.

Kosti, V. *et al.* (2012) “Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family,” *PLoS ONE*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0041939.

Kosti, V., Papageorgiou, I. and Diallinas, G. (2010) “Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway,” *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 397(5), pp. 1132–1143. doi: 10.1016/j.jmb.2010.02.037.

Koukaki, M. *et al.* (2005) “The Nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway,” *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 350(3), pp. 499–513. doi: 10.1016/j.jmb.2005.04.076.

Kryptou, E., Scazzocchio, C. and Diallinas, G. (2015) “Functional characterization of NAT/NCS2 proteins of *Aspergillus brasiliensis* reveals a genuine xanthine-uric acid transporter and an intrinsically misfolded polypeptide,” *Fungal Genetics and Biology*. Fungal Genet Biol, 75, pp. 56–63. doi: 10.1016/j.fgb.2015.01.009.

Kumari, A. (2018) “Purine Structures,” in *Sweet Biochemistry*. Academic Press, pp. 89–91. doi: 10.1016/b978-0-12-814453-4.00017-0.

Laude, A. J. and Prior, I. A. (2004) “Plasma membrane microdomains: Organization, function and trafficking (Review),” *Molecular Membrane Biology*. Mol Membr Biol, pp. 193–205. doi: 10.1080/09687680410001700517.

Leach, A. R. (2002) “Molecular Modeling: Principles and Applications 2nd Ed,” *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, pp. 353–355.

Lee, Y. *et al.* (2005) “Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction,” *FEBS Letters*, 579(21), pp. 4769–4774. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.056.

Li, Y., Liu, Z. and Wang, R. (2010) “Test MM-PB/SA on true conformational ensembles of protein-ligand complexes,” *Journal of Chemical Information and Modeling*. J Chem Inf Model, 50(9), pp. 1682–1692. doi: 10.1021/ci100036a.

- Liang, W. J., Johnson, D. and Jarvis, S. M. (2001) "Vitamin C transport systems of mammalian cells," in *Molecular Membrane Biology*. Mol Membr Biol, pp. 87–95. doi: 10.1080/09687680110033774.
- Lingwood, D. and Simons, K. (2010) "Lipid rafts as a membrane-organizing principle," *Science*. Science, pp. 46–50. doi: 10.1126/science.1174621.
- Lu, F. *et al.* (2011) "Structure and mechanism of the uracil transporter UraA," *Nature*, 472(7342), pp. 243–247. doi: 10.1038/nature09885.
- Martzoukou, O. *et al.* (2015) "Oligomerization of the UapA Purine Transporter Is Critical for ER-Exit, Plasma Membrane Localization and Turnover," *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 427(16), pp. 2679–2696. doi: 10.1016/j.jmb.2015.05.021.
- Meintanis, C., Karagouni, A. D. and Diallinas, G. (2000) "Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family," *Molecular Membrane Biology*. Mol Membr Biol, 17(1), pp. 47–57. doi: 10.1080/096876800294489.
- Mobley, D. L., Chodera, J. D. and Dill, K. A. (2006) "On the use of orientational restraints and symmetry corrections in alchemical free energy calculations," *Journal of Chemical Physics*. American Institute of PhysicsAIP, 125(8), p. 084902. doi: 10.1063/1.2221683.
- Moran, Y. *et al.* (2015) "Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa," *Journal of Experimental Biology*. J Exp Biol, 218(4), pp. 515–525. doi: 10.1242/jeb.110270.
- Morris, N. R. and Enos, A. P. (1992) "Mitotic gold in a mold: *Aspergillus* genetics and the biology of mitosis," *Trends in Genetics*. Trends Genet, pp. 32–33. doi: 10.1016/0168-9525(92)90022-V.
- Pantazopoulou, A. and Diallinas, G. (2007) "Fungal nucleobase transporters," *FEMS Microbiology Reviews*. FEMS Microbiol Rev, pp. 657–675. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00083.x.
- Papageorgiou, I. *et al.* (2008) "Specific Interdomain Synergy in the UapA Transporter Determines Its Unique Specificity for Uric Acid among NAT Carriers," *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 382(5), pp. 1121–1135. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.005.
- Peñalva, M. A. *et al.* (2012) "Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*," *Cellular Logistics*. Taylor & Francis, 2(1), p. 2. doi: 10.4161/CL.19304.
- Penmatsa, A. and Gouaux, E. (2014) "How LeuT shapes our understanding of the mechanisms of sodium-coupled neurotransmitter transporters," *Journal of Physiology*. Blackwell Publishing Ltd, 592(5), pp. 863–869. doi: 10.1113/jphysiol.2013.259051.
- Pontecorvo, G. *et al.* (1953) "The Genetics of *Aspergillus nidulans*," *Advances in Genetics*. Academic Press, 5(C), pp. 141–238. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60408-3.
- Rege, T. A. and Hagood, J. S. (2006) "Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Biochim Biophys Acta, pp. 991–999. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.008.
- Roux, B. and Woolf, T. B. (1996) "Molecular Dynamics of Pfl Coat Protein in a Phospholipid Bilayer," in *Biological Membranes*. Birkhäuser Boston, pp. 555–587. doi: 10.1007/978-1-4684-8580-

Scazzocchio, C. (2006) “Aspergillus genomes: secret sex and the secrets of sex,” *Trends in Genetics*. Trends Genet, pp. 521–525. doi: 10.1016/j.tig.2006.08.004.

Schoustra, S. E. *et al.* (2007) “Mitotic Recombination Accelerates Adaptation in the Fungus *Aspergillus nidulans*,” *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 3(4), pp. 0648–0653. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.0030068.

Sebastião, A. M. *et al.* (2013) “Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: Impact in age-related neurodegenerative diseases,” *Neuropharmacology*. Neuropharmacology, pp. 97–107. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.053.

Sengupta, P., Baird, B. and Holowka, D. (2007) “Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*. NIH Public Access, pp. 583–590. doi: 10.1016/j.semcd.2007.07.010.

Shi, Y. (2013) “Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters,” *Annual Review of Biophysics*, 42(1), pp. 51–72. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130429.

Simmonds, H. A. (2003) “NUCLEIC ACIDS | Physiology,” in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, pp. 4152–4163. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00837-3.

Simmons, K. J. *et al.* (2014) “Molecular mechanism of ligand recognition by membrane transport protein, Mhp1,” *The EMBO Journal*. EMBO J, 33(16), pp. 1831–1844. doi: 10.15252/emboj.201387557.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) “Functional rafts in cell membranes,” *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 569–572. doi: 10.1038/42408.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,” *Science*. Science, 175(4023), pp. 720–731. doi: 10.1126/science.175.4023.720.

Stryer, L., Berg, J. and Tymoczko, J. (2002) *Biochemistry, 5th edition*, Biochemistry.

Tieleman, D. P. and Berendsen, H. J. C. (1998) “A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer,” *Biophysical Journal*. The Biophysical Society, 74(6), pp. 2786–2801. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77986-X.

Tieleman, D. P., Sansom, M. S. P. and Berendsen, H. J. C. (1999) “Alamethicin helices in a bilayer and in solution: Molecular dynamics simulations,” *Biophysical Journal*. The Biophysical Society, 76(1 I), pp. 40–49. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77176-6.

Todd, R. B., Davis, M. A. and Hynes, M. J. (2007) “Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction,” *Nature Protocols*, 2(4), pp. 811–821. doi: 10.1038/nprot.2007.112.

Torres, G. E. *et al.* (2003) “Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter: Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter,” *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), pp. 2731–2739. doi: 10.1074/jbc.M201926200.

Tsukaguchi, H. *et al.* (1999) “A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid

transporters,” *Nature*, 399(6731), pp. 70–75. doi: 10.1038/19986.

Verlinde, C. L. and Hol, W. G. (1994) “Structure-based drug design: progress, results and challenges,” *Structure*, 2(7), pp. 577–587. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00060-5.

Vieira, F. S. *et al.* (2010) “Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms?,” *Biology of the Cell*. Wiley-Blackwell, 102(7), pp. 391–407. doi: 10.1042/bc20090138.

Vlanti, A. *et al.* (2006) “A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter,” *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 357(3), pp. 808–819. doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.070.

Vogels, G. D. and Van Der Drift, C. (1976) “Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms,” *Bacteriological Reviews*. American Society for Microbiology (ASM), pp. 403–468. doi: 10.1128/mmbr.40.2.403-468.1976.

Wang, J., Deng, Y. and Roux, B. (2006) “Absolute binding free energy calculations using molecular dynamics simulations with restraining potentials,” *Biophysical Journal*. Biophys J, 91(8), pp. 2798–2814. doi: 10.1529/biophysj.106.084301.

Yamamoto, S. *et al.* (2010) “Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: Implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals,” *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), pp. 6522–6531. doi: 10.1074/jbc.M109.032961.

Yuriev, E. and Ramsland, P. A. (2013) “Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review,” *Journal of Molecular Recognition*. J Mol Recognit, pp. 215–239. doi: 10.1002/jmr.2266.

Zhang, X., Wong, S. E. and Lightstone, F. C. (2014) “Toward fully automated high performance computing drug discovery: A massively parallel virtual screening pipeline for docking and molecular mechanics/generalized born surface area rescoring to improve enrichment,” *Journal of Chemical Information and Modeling*. J Chem Inf Model, 54(1), pp. 324–337. doi: 10.1021/ci4005145.

Zhen, J. *et al.* (2015) “Dopamine transporter oligomerization: Impact of combining protomers with differential cocaine analog binding affinities,” *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 133(2), pp. 167–173. doi: 10.1111/jnc.13025.

Κατινάκης, Π. (2004) *Βιοχημεία*. Αθήνα, Ελλάδα: Εκδόσεις Έμβρυο.