

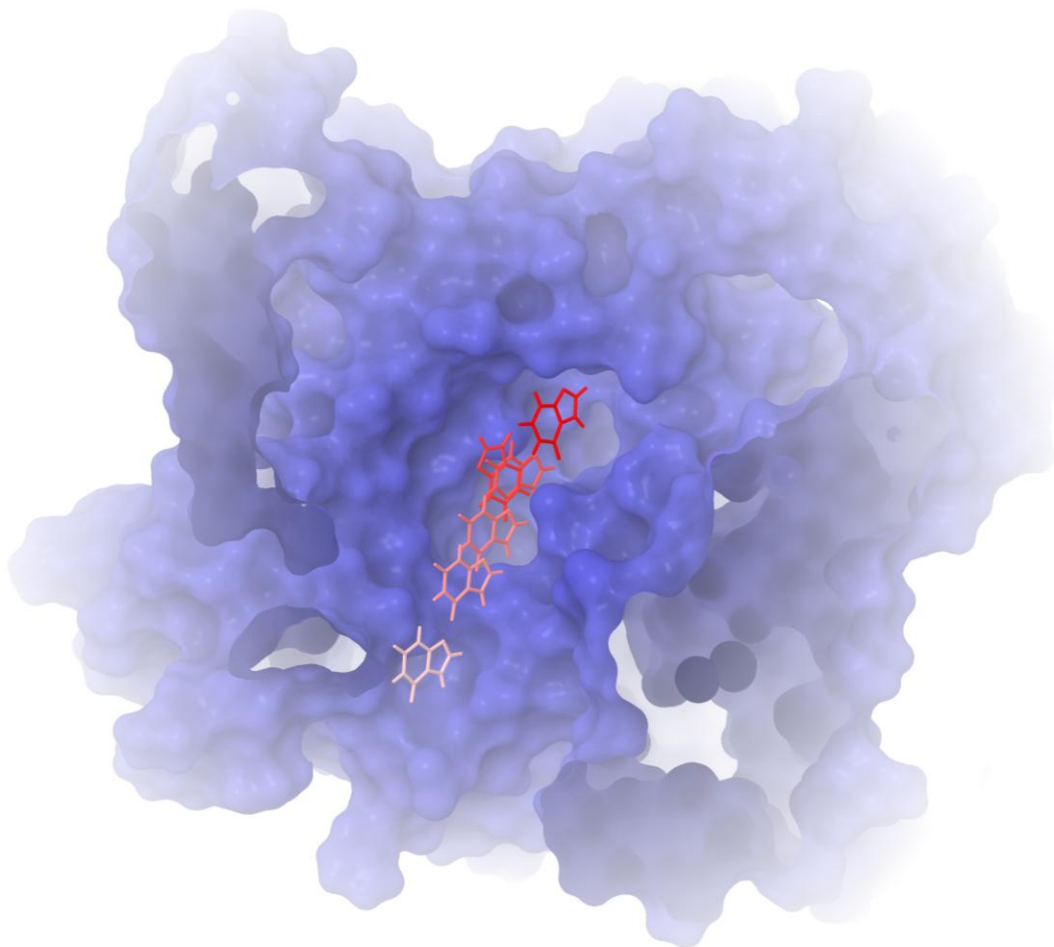


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Γενετικές, μοριακές, βιοχημικές και βιοφυσικές
προσεγγίσεις στη μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας
διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΩΣΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ



ΑΘΗΝΑ 2013



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Γενετικές, μοριακές, βιοχημικές και βιοφυσικές
προσεγγίσεις στη μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας
διαμεμβρανικών μεταφορέων πουρινών**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΩΣΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ, 2013



**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF BIOLOGY – DEPARTMENT OF BOTANY
MOLECULAR MICROBIOLOGY LAB**

**Genetic, molecular, biochemical and biophysical approaches
in studying structure – function relations in transmembrane
purine transporters**

Ph.D. Thesis

**VASILIKI KOSTI
BIOLOGIST**

ATHENS, 2013

Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Γ. Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής
2. Ε. Μικρός, Καθηγητής
3. Ε. Φριλίγγος, Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή

1. Α. Καραγκούνη, Καθηγήτρια
2. Ε. Μικρός, Καθηγητής
3. Ε. Φριλίγγος, Καθηγητής
4. Σ. Χαμόδρακας, Καθηγητής
5. Γ. Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής
6. Α. Παππά, Επίκουρη Καθηγήτρια
7. Β. Σοφianoπούλου, Ερευνήτρια Α΄

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



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, εν μέρει στο Εργαστήριο του κ. Διαλλινά, στο Τμήμα Βιολογίας, και εν μέρει στο Εργαστήριο του κ. Μικρού, στο Τμήμα Φαρμακευτικής.

“Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα”

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική μου διατριβή πραγματοποιήθηκε στο ΕΚΠΑ και διήρκησε σχεδόν τέσσερα χρόνια. Μέσα σ' αυτό το διάστημα συνεργάστηκα με αρκετούς ανθρώπους, για τους οποίους θα ήθελα να κάνω εδώ μια μνεία.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Γιώργο Διαλλινά. Στο εργαστήριό του εργάστηκα και ως προπτυχιακή και μεταπτυχιακή φοιτήτρια, αλλά και ως υποψήφια διδάκτορας. Σχεδόν όλες μου οι επιστημονικές γνώσεις αποκτήθηκαν σ' αυτό το εργαστήριο, με τις καλές και τις λιγότερο καλές στιγμές, όπως γίνεται σε όλους τους χώρους εργασίας, όπου περνάς περίπου 12 ώρες ημερησίως. Θα ήθελα, λοιπόν, να ευχαριστήσω τον κύριο Διαλλινά που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ μαζί του και να αποκτήσω εμπειρίες ζωής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κο. Μάνο Μικρό, στο εργαστήριο του οποίου εκπόνησα μέρος της διδακτορικής μου διατριβής. Τον ευχαριστώ για την πολύ καλή μας συνεργασία, για την ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφερε τις στιγμές που ήθελα να τα παρατήσω και για τις γνώσεις που τόσο ανιδιοτελώς μου προσέφερε. Χωρίς αυτόν δε θα είχα καταφέρει να σας παραδώσω αυτό το γραπτό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον κο. Στάθη Φριλίγγο. Η ανταλλαγή επιστημονικών απόψεων μαζί του ήταν πέρα για πέρα ευχάριστη και εποικοδομητική. Οι συμβουλές του ως μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής ήταν καίριες και με βοήθησαν να προχωράω την έρευνά μου. Τέλος, η στήριξη του, ειδικά κατά τη διόρθωση του τελικού κειμένου της διδακτορικής μου διατριβής, είναι ανεκτίμητη.

Εδώ θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κο. Σταύρο Χαμόδρακα, την κα. Αμαλία Καραγκούνη, την κα. Κατερίνα Παππά και την κα. Βίκυ Σοφianoπούλου. Τους ευχαριστώ για το χρόνο τους, για το ενδιαφέρον τους να διορθώσουν επιμελώς τη διατριβή μου και να μου δώσουν καίριες και επιστημονικές διορθώσεις-συμβουλές.

Όλα αυτά τα χρόνια, όμως, οι άνθρωποι που με έζησαν περισσότερο και στήριξαν καθημερινά την πρόοδό μου ήταν τα παιδιά του εργαστηρίου μου. Πρώτα και κύρια απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Σωτήρη Αμίλλη. Τον ευχαριστώ γιατί ήταν πάντα εκεί, να μας λύσει τις απορίες μας, να μας βοηθήσει όταν κολλούσαμε πειραματικά, να μας στηρίζει ψυχολογικά όταν απογοητεύομασταν. Πάντα υπομονετικός και πρόθυμος σε ότι κι αν του ζητούσαμε, πάντα εκεί. Σωτήρη, σ' ευχαριστώ πολύ για όλα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Χρήστο Γουρνά και τον Γιάννη Παπαγεωργίου. Ήταν οι υποψήφιοι διδάκτορες που ανέλαβαν την εκπαίδευση μου από τη στιγμή που μπήκα στο εργαστήριο ως προπτυχιακή φοιτήτρια. Τους ευχαριστώ που μου έμαθαν από το πιο απλό, πως να κρατάω την πιπέτα, μέχρι να σκέφτομαι και να δρω σαν επιστήμονας. Ειδικά με το Χρήστο περάσαμε ατελείωτες ώρες περιμένοντας πάνω από ένα gel Western, ανυπομονώντας αν θα δώσει σήμα ουβικουιτινωμένης ζώνης... Χρήστο, σ' ευχαριστώ και καλή σταδιοδρομία.

Τον ένα χρόνο που πέρασα στο εργαστήριο του κου. Μικρού είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ με δύο καλούς επιστήμονες, αλλά κυρίως ανθρώπους, τον Γιώργο Λαμπρινίδη και τον Βασίλη Μυριανθόπουλο. Θα ήθελα λοιπόν να τους ευχαριστήσω για τα υπέροχα και διαφορετικά πράγματα που μου έδειξαν. Πριν από αυτήν την εμπειρία η έννοια βιοπληροφορική μου ήταν σχεδόν άγνωστη ως αντικείμενο. Τους ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την υπομονή τους να με μάθουν άγνωστα πράγματα, όπως Linux, python, modeller, SAR... Αλλά κυρίως τους ευχαριστώ για τις συμβουλές τους και το χρόνο τους, ακόμη και στη διόρθωση του γραπτού μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διπλωματικούς με τους οποίους συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια, την Αιμιλία Κρυπωτού που είναι πλέον Υποψήφια Διδάκτορας και κάναμε μαζί μία δημοσίευση με άριστη συνεργασία, τον Βασίλη Γιαλελή, την Κατερίνα Γαλανοπούλου, τον Μίνωα Ευαγγελινό και τον Αλέξανδρο Κοκοτό.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια, τους γονείς μου Βαγγέλη και Δέσποινα και τον αδελφό μου Κωνσταντίνο. Ιδιαίτερα όμως εσένα μαμά, γιατί χωρίς εσένα δε θα τα είχα καταφέρει...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Πολλές ανθρώπινες ασθένειες έχουν συνδεθεί με δυσλειτουργία ή τροποποιημένη λειτουργία μεμβρανικών μεταφορέων, όπως η κυστική ίνωση και η αδρενολευκοδυστροφία. Εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών, δεν είναι δυνατή η κρυστάλλωση και απόδοση της τρισδιάστατης δομής όλων των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, μια πρώτη ιδέα για την αναδίπλωση των διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης θα μπορούσε να ληφθεί μέσω μοντέλων ομολογίας, εάν υπάρχει διαθέσιμη μια αντιπροσωπευτική κρυσταλλογραφική δομή. Τα τελευταία χρόνια έχει κρυσταλλωθεί ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών μεταφοράς, και μέσω αυτών έχουν δημιουργηθεί μοντέλα ομολογίας συγγενικών πρωτεϊνών. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι μεταφορείς δευτερογενούς ενεργότητας. Καθώς η κρυσταλλογραφία αποδίδει ένα στατικό, μόνο, στιγμιότυπο δυναμικών πρωτεϊνικών δομών έξω από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία αποτελεί τη φυσική τους τοπολογία, απαιτούνται ταυτόχρονα και άλλες βιολογικές προσεγγίσεις. Προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι παράγοντες που καθορίζουν την εκλεκτικότητα του υποστρώματος σε δομές με χαμηλή πρωτοταγή ομολογία, αλλά υψηλή δομική ομοιότητα είναι επιτακτική η συνδυαστική χρήση δεδομένων κρυσταλλογραφίας καθώς και συστηματικής μεταλλαξιγένεσης. Η τελευταία αυτή βιολογική προσέγγιση σε συνδυασμό με την κατασκευή μοντέλου ομολογίας μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική και αξιόπιστη προσέγγιση στη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων δευτερογενούς ενεργότητας. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν με βιοφυσικές και γενετικές/μοριακές προσεγγίσεις δύο μεταφορείς πουρινών στον πρότυπο ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*, ο UapA και ο FcyB.

Ο UapA είναι ένας συµμεταφορέας ουρικού οξέος-ξανθίνης/ H^+ της οικογένειας NAT/NCS2, για τον οποίο υπάρχει πληθώρα δομικών και λειτουργικών μεταλλαγών. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατασκευάστηκε το μοντέλο ομολογίας του, στηριζόμενο στην δομή του UraA, την πρώτη κρυσταλλογραφία της οικογένειας. Το μοντέλο επαληθεύτηκε με μοριακή δυναμική (Desmond). Με υπολογισμούς άκαμπτης και εύκαμπτης πρόσδεσης υπεδείχθη η θέση δέσμευσης του υποστρώματος στον μεταφορέα, τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν, ο μηχανισμός πρόσδεσης και η πορεία του υποστρώματος από τη θέση

δέσμευσης προς το κυτταρόπλασμα (LMCS, Glide-IFD, QSAR). Προς επαλήθευση των υπολογισμών κατασκευάστηκαν, με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, μεταλλαγές των καταλοίπων που υποδείχθηκαν από τους υπολογισμούς ότι συμμετέχουν στη δέσμευση και μεταφορά του υποστρώματος. Τα στελέχη που έφεραν τις μεταλλαγές αυτές χαρακτηρίστηκαν πλήρως φαινοτυπικά (με δοκιμασίες ανάπτυξης σε πουρίνες ως μοναδικές πηγές αζώτου) και βιοχημικά (με μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης και πειράματα ανταγωνισμού), καθώς επίσης μελετήθηκε και η υποκυτταρική τους τοπολογία (με μικροσκοπική παρατήρηση της πρωτεΐνης συνεζευγμένης με GFP). Η βιολογική αυτή προσέγγιση επαλήθευσε τους υπολογισμούς πρόσδεσης και το προβλεπόμενο μοντέλο. Τέλος, κατασκευάστηκαν άλλα δύο μοντέλα ομολογίας της οικογένειας, του μεταφορέα ξανθίνης SNBT1 (στον *Rattus norvegicus*) και του μεταφορέα L-ασκορβικού (στον *Homo sapiens*). Στα μοντέλα αυτά με υπολογισμούς πρόσδεσης υπεδείχθη το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος και συνεκρίθησαν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν με τα αντίστοιχα του UarA. Βρέθηκε ότι τα κατάλοιπα που συμμετέχουν είναι κοινά, υποδεικνύοντας την εξελικτική τους σχέση.

Ο FcyB είναι ένας συμμεταφορέας πουρινών/ H^+ της οικογένειας NCS1/PRT, χαρακτηρισμένος στον *A. nidulans*. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατασκευάστηκε το μοντέλο ομολογίας του, βασιζόμενο στη δομή του Mhp1 της ίδιας οικογένειας. Το μοντέλο αυτό επιβεβαιώθηκε με υπολογισμούς μοριακής δυναμικής (Desmond). Τέλος, με υπολογισμούς πρόσδεσης υπεδείχθη η θέση δέσμευσης των υποστρωμάτων (αδενίνη, υποξανθίνη, γουανίνη, κυτοσίνη) στον μεταφορέα και τα εμπλεκόμενα αμινοξικά κατάλοιπα. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων και της συντήρησης των καταλοίπων στην στοίχιση πρωτοταγούς αλληλουχίας προτάθηκαν μεταλλαγές για την επαλήθευση των υπολογισμών πρόσδεσης τόσο στον FcyB, όσο και σε άλλα μέλη της οικογένειας στον *A. nidulans* (FurA, FurD).

ABSTRACT

Membrane transport proteins play a crucial role in development, differentiation and survival of eukaryotic cells. Many human diseases have been linked to dysfunction or modified function of membrane transporters, such as cystic fibrosis and adrenoleukodystrophy. Due to technical difficulties, it is possible to crystallize and yield of all the three dimensional structure of proteins. For this reason, a first idea for the folding of the various regions of the protein could be obtained by homology modeling, if there is provided a representative crystallographic structure. In recent years a large number crystallize transport proteins, and these are created by homology models related proteins. Such an example is secondary activity transporters. As crystallography yields a static, single, dynamic snapshot protein structure outside of the lipid bilayer, which is the physical topology, requires time and other biological approaches. In order to clarify the factors that determine the selectivity of substrate structures with low primary homology but high structural similarity is imperative that the combined use of crystallographic data and systematic mutagenesis. The latter biological approach in conjunction with the construction Homology modeling can be an effective and reliable approach to the study of structure-function relationships of transporters secondary activity. In this PhD thesis were studied by biophysical and genetic / molecular approaches two purine transporters in the model ascomycete *Aspergillus nidulans*, UapA and FcyB.

UapA is a uric acid-xanthine / H^+ co-transporter of the NAT/NCS2family, for which there is a wealth of structural and functional mutations. In this PhD thesis we constructed homology model, relying on the structure of UraA, the first X-ray crystallography of the family. The model was verified by molecular dynamics (Desmond). Calculations with rigid and flexible tether suggested binding site of the carrier substrate, amino acid residues involved, the fastening device and the path of the substrate from the binding site to the cytoplasm (LMCS, Glide-IFD, QSAR). To verify the calculations made by site-directed mutagenesis, mutations of residues indicated by the calculations that are involved in binding and transport of the substrate. The strains bearing the mutations were characterized phenotypically completely (with growth assays in purines as sole nitrogen sources) and biochemically (by measuring uptake of radiolabeled xanthine and competition experiments) and also studied and their subcellular topology (by microscopic

observation of the protein-conjugated GFP). The biological approach verified the calculations mooring and the estimated model. Finally, two other models were constructed homology family, carrier xanthine SNBT1 (in *Rattus norvegicus*) and carrier L-ascorbate (in *Homo sapiens*). In models with these calculations suggested the binding of the substrate binding site and the residues were compared with the corresponding part of UapA. Found that the residues involved are common, indicating their evolutionary relationship.

FcyB is a purine / H^+ co-transporter of the NCS1/PRT family, featured on *A. nidulans*. In this PhD thesis we constructed a homology model, based on the structure of Mhp1 of the same family. This model was confirmed by molecular dynamics calculations (Desmond). Finally, binding calculations suggested that the binding of substrates (adenine, hypoxanthine, guanine, cytosine) to the carrier and the affected amino acid residues. Based on these results and maintenance of residues in primary sequence alignment proposed changes to verify the calculations tether both FcyB, and other family members in *A. nidulans* (FurA, FurD).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1ο - Εισαγωγή	1
1.1 <i>Aspergillus nidulans</i> : ένα σύστημα μελέτης με πολλαπλά πλεονεκτήματα..	3
1.2 Πλασματική μεμβράνη - Μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφορείς.....	5
1.2.1 Εξέλιξη της πλασματικής μεμβράνης	5
1.2.2 Δομή της πλασματικής μεμβράνης	6
1.2.3 Εκλεκτική διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης	8
1.2.4 Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς.....	13
1.2.4.1 Τα κανάλια ως μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς	13
1.2.4.2 Μεταφορείς: μια διακριτή δομικά και λειτουργικά κατηγορία μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς από τα κανάλια	14
1.2.5 Η βιολογική σημασία των μεταφορέων στη λειτουργία και τη βιωσιμότητα του κυττάρου	18
1.2.6 Μεταφορείς πουρινών.....	19
1.2.6.1 Η οικογένεια NAT/NCS2.....	20
1.2.6.2 Η οικογένεια που ορίζεται από τον AzgA.....	21
1.2.6.3 Η PRT ή NCS1 οικογένεια.....	21
1.2.6.4 Η ENT οικογένεια	21
1.2.6.5 Η CNT οικογένεια.....	24
1.2.6.6 Η οικογένεια PUP	25
1.2.6.7 Η οικογένεια UPS	25
1.3 Σύγχρονες τάσεις στη μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας διαμεμβρανικών μεταφορέων	26
1.3.1 Δομή και μηχανισμός μεταφοράς της 6+6 διαμόρφωσης μεταφορέων – Το παράδειγμα του LacY	27
1.3.2 Δομή και μηχανισμός μεταφοράς της 5+5 διαμόρφωσης μεταφορέων – Το παράδειγμα του LeuT	28
1.4 Μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας στην οικογένεια NCS1/PRT ...	31

1.4.1 Η NCS1/PRT οικογένεια συµµεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/H ⁺	
31	
1.4.2 Κρυσταλλογραφικά δεδοµένα από τον µεταφορέα Mhp1	32
1.4.2.1 Δομή του Mhp1	32
1.4.2.2 Ο ρόλος του ιόντος.....	36
1.4.2.3 Περιοχές ελεγχόµενης διέλευσης του υποστρώµατος.....	39
1.4.3 Ο µεταφορέας FcyB στον <i>Aspergillus nidulans</i>	40
1.4.3.1 Ο φυσιολογικός ρόλος του FcyB	42
1.4.3.2 Ανάγκη δηµιουργίας µοντέλου του FcyB	43
1.5 Μελέτη των σχέσεων δοµής-λειτουργίας στην οικογένεια NAT/NCS2.....	45
1.5.1 Η NAT/NCS2 οικογένεια συµµεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/H ⁺	
.....	45
1.5.1.1 Εξελκτικές σχέσεις της οικογένειας NAT.....	48
1.5.1.2 Ο ρόλος των NAT στη φυσιολογία των οργανισµών	50
1.5.1.3 Μέλη της οικογένειας NAT µεταφέρουν ασκορβικό οξύ στα κύτταρα των θηλαστικών	52
1.5.2 Σχέσεις δοµής-λειτουργίας της οικογένειας NAT σε πρότυπα µικροβιακά συστήµατα – Το παράδειγµα του UapA.....	54
1.5.2.1 Μοντέλο της δευτεροταγούς δοµής του UapA	55
1.5.2.2 Γενετικά και βιοχηµικά δεδοµένα για τις σχέσεις δοµής-λειτουργίας στον UapA	55
1.5.2.3 Γενετικά και βιοχηµικά δεδοµένα για τις σχέσεις δοµής-λειτουργίας στον XanQ	59
1.5.3 Σχέσεις δοµής-λειτουργίας στους SVCT µεταφορείς.....	62
1.5.4 Μοντέλα αλληλεπίδρασης των NAT µε τα υποστρώµατά τους.....	64
1.5.5 Κρυσταλλογραφικά δεδοµένα από τον µεταφορέα UraA	67
1.5.5.1 Δομή του UraA.....	68
1.5.5.2 Δέσµευση της ουρακίλης	69

1.6	Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής	70
1.6.1	Μελέτη του μεταφορέα UapA	70
1.6.2	Μελέτη του μεταφορέα FcyB	72
	Κεφάλαιο 2 ^ο – Υλικά & Μέθοδοι.....	73
2.1	Μύκητες	75
2.1.1	Στελέχη	75
2.1.2	Θρεπτικά υποστρώματα.....	76
2.1.3	Συντήρηση στελεχών του <i>A. nidulans</i>	77
2.1.4	Διασταυρώσεις στελεχών <i>A. nidulans</i> και ανάλυσή τους.....	78
2.1.5	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα <i>Aspergillus nidulans</i> 79	
2.1.6	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση	80
2.1.6.1	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	80
2.1.6.2	Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιακό φορέα.....	81
2.1.7	Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του <i>Aspergillus nidulans</i>	81
2.1.8	Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του <i>Aspergillus nidulans</i> 82	
2.1.8.1	Πέψη του γονιδιωματικού DNA και διαχωρισμός των ζωνών σε πήκτωμα αγαρόζης.....	83
2.1.8.2	Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	83
2.1.8.3	Προϋβριδισμός – Κατασκευή ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη ³² P[^{rad} CTP] – Υβριδισμός.....	84
2.1.8.4	Εκπλύσεις της μεμβράνης – Εμφάνιση	86
2.1.9	Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών και η κινητική τους 86	
2.1.9.1	Προετοιμασία κονιδίων του <i>A. nidulans</i>	86
2.1.9.2	Προσθήκη της ραδιοσημασμένης ουσίας.....	87
2.1.10	Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών	88

2.1.10.1	Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών για την ανίχνευση ουβικουτινυλιωμένων μορφών του UapA.....	89
2.1.10.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford	90
2.1.10.3	Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE	90
2.1.10.4	Χρώση με διάλυμα χρωστικής Coomassie	91
2.1.10.5	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF	91
2.1.10.6	Χρώση των δεσμευμένων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών με Ponceau S.....	92
2.1.10.7	Ανοσοαποτύπωμα και Χημειοφθορισμός.....	92
2.1.11	Μικροσκοπία επιφθορισμού	93
2.2	Βακτήρια	94
2.2.1	Θρεπτικά υποστρώματα & Συντήρηση.....	94
2.2.2	Βακτήρια ως δέκτες πλασμιδίων – Προετοιμασία.....	94
2.2.3	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i>	95
2.2.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....	96
2.3	Κατευθυνόμενη <i>in vitro</i> PCR μεταλλαξιγένεση.....	96
2.3.1	Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή στοχευόμενων μεταλλαγών	97
2.3.2	Σύσταση της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης	98
2.4	Υπολογιστικά προγράμματα	99
2.4.1	Μοντέλο ομολογίας – Modeller 9v8.....	99
2.4.2	Προετοιμασία πρωτεΐνης για υπολογισμούς.....	99
2.4.3	Σταθερότητα μοντέλου – Desmond software	100
2.4.4	Υπολογισμοί πρόσδεσης (Docking)	100
2.4.4.1	Υπολογισμοί άκαμπτης πρόσδεσης (Rigid Docking)	101
2.4.4.2	Υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης (Flexible Docking)	101

2.4.4.3	Αλγόριθμοι Διαδικασιών Εύκαμπτης Πρόσδεσης – Συνδυασμός Low Mode και Monte Carlo.....	102
	Κεφάλαιο 3 ^ο - Αποτελέσματα.....	103
3.1	Μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας του μεταφορέα UapA	105
3.1.1	Μοντέλο ομολογίας του μεταφορέα UapA.....	105
3.1.1.1	Στοιχίση της πρωτοταγούς πρωτεϊνικής αλληλουχίας των UraA και UapA	105
3.1.1.2	Κατασκευή του μοντέλου ομολογίας του UapA.....	108
3.1.2	Δέσμευση του υποστρώματος – Υπολογισμοί πρόσδεσης	112
3.1.2.1	Υπολογισμοί πρόσδεσης με Low Mode/Monte-Carlo, Glide και IFD	112
3.1.2.2	Τα αποτελέσματα του QSAR αποσαφηνίζουν τον τρόπο δέσμευσης της ξανθίνης στον UapA.....	116
3.1.3	Πορεία του υποστρώματος προς το κυτταρόπλασμα	118
3.1.3.1	Ο ρόλος του αμινοξέος F155 και του ευρύτερου TMS3.....	120
3.1.3.2	Ο ρόλος του αμινοξέος D360 στην πορεία μεταφοράς του υποστρώματος.....	124
3.1.3.3	Ο ρόλος του TMS12 στην εξειδίκευση του UapA.....	125
3.1.4	Εξωκυττάρειες περιοχές ελεγχόμενης πρόσβασης του υποστρώματος καθορίζουν την εξειδίκευση του UapA	132
3.1.5	Κυτταροπλασματικά στοιχεία πιθανώς συνθέτουν μία εσωτερική περιοχή ελεγχόμενης διέλευσης – Ο ρόλος του αμινοξέος R481	135
3.1.5.1	Μεταλλαγές του R481 οδηγούν σε διεύρυνση της εξειδίκευσης του UapA	136
3.1.5.2	Ενδομοριακή συνεργασία του R481 με άλλες περιοχές του μεταφορέα UapA καθορίζουν την εξειδίκευσή του	141
3.1.5.3	Ο ρόλος του R481 στη δομική σταθερότητα του UapA	143
3.1.5.4	Η HuiARsp5 λιγάση της ουβικουϊτίνης σηματοδοτεί την καταστροφή των ασταθών μορφών στο χυμοτόπιο	145

3.1.5.5	Η λυσίνη 572 είναι ο δέκτης των μορίων ουβικουιτίνης	146
3.1.6	Αναζητώντας στοιχεία της δομής που εξηγούν την εξέλιξη της εξειδίκευσης στα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2	147
3.2	Δομικές μελέτες στον μεταφορέα FcyB.....	149
3.2.1	Μοντέλο ομολογίας του FcyB	150
3.2.1.1	Στοίχιση της πρωτοταγούς πρωτεϊνικής αλληλουχίας των Mhr1 και FcyB	150
3.2.1.2	Κατασκευή και επαλήθευση του μοντέλου ομολογίας του FcyB....	153
3.2.2	Δέσμευση του υποστρώματος – Υπολογισμοί πρόσδεσης	156
Κεφάλαιο 4 ^ο - Συμπεράσματα		161
4.1	Δομή και λειτουργία του μεταφορέα UarA	163
4.1.1	Δομή του UraA – Σύγκριση με το μοντέλο του UarA	164
4.1.2	Γενετικά πειράματα επιβεβαιώνουν το μοντέλο του UarA.....	166
4.1.3	Λειτουργικές μελέτες επιβεβαιώνουν τον τρόπο σύνδεσης UarA – ξανθίνης.....	168
4.1.4	Γενετικές ενδείξεις για την πορεία του υποστρώματος προς το κυτταρόπλασμα.....	170
4.1.5	Γενετικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη περιοχών ελεγχόμενης πρόσβασης.....	171
4.1.6	Εξελκτικές σχέσεις των μελών της οικογένειας NAT	172
4.2	Δομή και λειτουργία του μεταφορέα FcyB	173
Βιβλιογραφία.....		177
Παράρτημα.....		205

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1-1	Μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού.....	6
Εικόνα 1-2	Μικροδομές της πλασματικής μεμβράνης.....	7
Εικόνα 1-3	Μηχανισμοί παθητικής μεταφοράς.....	9
Εικόνα 1-1	Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας Na^+/K^+	10
Εικόνα 1-2	Δομή του μεταφορέα Sav1866 της υπο-οικογένειας MDR-ABC του <i>Staphylococcus aureus</i> συγκρυσταλλωμένο με AMP-PNP.....	11
Εικόνα 1-3	Μοντέλο της συµμεταφοράς Na^+ -γλυκόζης από τον ανθρώπινο μεταφορέα SGLT1.....	13
Εικόνα 1-4	Σχηματική αναπαράσταση των εναλλαγών της διαμόρφωσης ενός καναλιού σε έναν κύκλο μεταφοράς.....	15
Εικόνα 1-5	Μηχανισμοί μεταφοράς υποστρωμάτων.....	17
Εικόνα 1-6	Κρυσταλλογραφικά λυμένες δομές μεταφορέων.....	18
Εικόνα 1-7	Οι πέντε νουκλεοτιδικές βάσεις των DNA και RNA.....	20
Εικόνα 1-8	Μοντέλο του μεταφορέα TbNBT1.....	23
Εικόνα 1-9	Προβλεπόμενο μοντέλο του hCNT3.....	25
Εικόνα 1-10	Δομή και μηχανισμός μεταφοράς του LacY.....	28
Εικόνα 1-11	Δομή κέντρου δέσμευσης και μηχανισμός μεταφοράς των μεταφορέων με 5+5 διαμόρφωση.....	30
Εικόνα 1-12	Δομή του μεταφορέα υδαντοΐνης Mhp1 του <i>Microbacterium liquefaciens</i>	34
Εικόνα 1-13	Θέσεις δέσμευσης υποστρώματος και κατιόντος.....	35
Εικόνα 1-14	Αναπαραστάσεις επιφανείας των τριών μορφών του Mhp1, που δείχνει τις κοιλότητες της καθεμιάς.....	37
Εικόνα 1-15	Οι θέσεις δέσμευσης του νατρίου και του υποστρώματος στην κλειστή και στην κυτταροπλασματικά ανοικτή δομή.....	38
Εικόνα 1-16	Ο μηχανισμός μεταφοράς του Mhp1.....	39
Εικόνα 1-17	Προβλεπόμενη δομή και σχέσεις δομής-λειτουργίας των δύο πρωτοτύπων NAT μεταφορέων, UapA και XanQ.....	48
Εικόνα 1-18	Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις εξελικτικές σχέσεις επιλεγμένων NAT μεταφορέων.....	50
Εικόνα 1-19	Δοκιμασίες ανάπτυξης.....	51

Εικόνα 1-20	Το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών του <i>A. nidulans</i> και οι γνωστοί μεταφορείς αυτών.....	52
Εικόνα 1-21	Μοντέλα του UapA.....	56
Εικόνα 1-22	Μοντέλο των περιοχών του UapA που αλληλεπιδρούν με την ξανθίνη.....	58
Εικόνα 1-23	Μοντέλο της δευτεροταγούς δομής του XanQ.....	60
Εικόνα 1-24	Υποθετική διάταξη των TM8, TM9a, TM9b και TM12 στον μεταφορέα XanQ από κυτταροπλασματική όψη.....	62
Εικόνα 1-25	Μοντέλα των αλληλεπιδράσεων των NAT με τα υποστρώματά τους.....	66
Εικόνα 1-26	Δομή του UraA.....	69
Εικόνα 1-27	Θέση της ουρακίλης στον UraA.....	70
Εικόνα 3-1	Πολλαπλή στοίχιση του UapA, του UraA και των NAT ομολόγων γνωστής λειτουργίας και εξειδίκευσης, που χρησιμοποιήθηκε για το μοντέλο ομολογίας του UapA.....	106
Εικόνα 3-2	Στοίχιση των μεταφορέων UraA και UapA.....	108
Εικόνα 3-3	Μέση τετραγωνική ρίζα απόκλισης (RMSD) των Ca-ανθράκων όλων των ελίκων, για κάθε 0.25 ns της μοριακής δυναμικής συνολικής διάρκειας 50 ns.....	109
Εικόνα 3-4	Θεωρητική δομή του UapA.....	110
Εικόνα 3-5	Αλληλεπιδράσεις UapA – υποστρώματος. Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων διαφορετικών μοντέλων σύνδεσης (Α-Δ) της ξανθίνης με τον UapA (μοντέλα 1-4 αντίστοιχα).....	114
Εικόνα 3-6	Μοντέλο σχέσεων δομής-δράσης (SAR) της αλληλεπίδρασης του UapA με ανάλογα ξανθίνης.....	117
Εικόνα 3-7	Υπολογισμοί πρόσδεσης αναλόγων της ξανθίνης στον UapA για το στιγμότυπο 3-9A.....	118
Εικόνα 3-8	Μοντέλο της πορείας μετατόπισης της ξανθίνης διαμέσου του UapA.....	119
Εικόνα 3-9	Συστηματική μελέτη των καταλοίπων S154 και F155 του TMS3.....	122
Εικόνα 3-10	Συστηματική μελέτη του καταλοίπου D360 στο TMS8.....	125
Εικόνα 3-11	Χαρακτηρισμός των μεταλλαγών V463I και A469E παρουσία της μεταλλαγής F528S.....	127
Εικόνα 3-12	Χαρακτηρισμός των μεταλλαγών V463I και A469E απουσία της μεταλλαγής F528S.....	129

Εικόνα 3-13	Υποθετική δευτερεύουσα θέση δέσμευσης της ξανθίνης στην εξωκυτταρική πλευρά του TMS14.....	133
Εικόνα 3-14	Ανάλυση των μεταλλαγών στην υποθετική δευτερεύουσα θέση δέσμευσης.....	135
Εικόνα 3-15	Συστηματική μελέτη μεταλλαγών στο αμινοξύ R481 παρουσία της μεταλλαγής F528S.....	137
Εικόνα 3-16	Συστηματική μελέτη μεταλλαγών στο αμινοξύ R481 απουσία της μεταλλαγής F528S.....	139
Εικόνα 3-17	Χαρακτηρισμός μεταλλαγών εξειδίκευσης.....	142
Εικόνα 1-28	Υποκυτταρικός εντοπισμός μεταλλαγμένων μεταφορέων του UapA με πλαισιοτροποποιητικές μεταλλαγές στο αμινοξύ R481.....	145
Εικόνα 1-29	Ανάλυση μικροσκοπίας φθορισμού.....	147
Εικόνα 1-20	Μετατρέποντας τον UapA σε μεταφορέα L-ασκορβικού οξέος.....	149
Εικόνα 1-30	Στοιχίση πολλαπλών αλληλουχιών του FcyB και ομολόγων γνωστής λειτουργίας της NCS1 οικογένειας.....	151
Εικόνα 1-31	Στοιχίση των μεταφορέων Mhp1 (ικρίωμα) και FcyB.....	153
Εικόνα 1-32	Δομικό μοντέλο του FcyB.....	156
Εικόνα 1-33	Υπολογισμοί πρόσδεσης υποστρώματος στον FcyB.....	158

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1-1	Συγγένεια δέσμευσης (K_{mi}) και ελεύθερη ενέργεια (ΔG°) διαφόρων ουσιών στον FcyB.....	41
Πίνακας 1-2	Πρωτεΐνες της οικογένειας NAT γνωστής λειτουργίας.....	46
Πίνακας 2-1	Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια και τον μετασχηματισμό του <i>A. nidulans</i> (σε όγκο 1 l).....	76
Πίνακας 2-2	Σύσταση διαλυμάτων (σε όγκο 1 l) και συγκεντρώσεις χρησιμοποιούμενων αυξοτροφιών.....	77
Πίνακας 2-3	Σύσταση της PCR αντίδρασης.....	79
Πίνακας 2-4	Συνθήκες της PCR αντίδρασης.....	79
Πίνακας 2-5	Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το μετασχηματισμό.....	82
Πίνακας 2-6	Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανάλυσης κατά Southern.....	84
Πίνακας 2-7	Η σύσταση της αντίδρασης ραδιοσήμανσης του ιχνηθέτη με ^{32}P -[adCTP], μέσω της τυχαίας πρόσδεσης εξαμερών.....	86
Πίνακας 2-8	Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση εμπλουτισμένων ουβικουιτινωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	89
Πίνακας 2-9	Σύσταση διαλυμάτων μεταφοράς και έκπλυσης.....	92
Πίνακας 2-3	Σύσταση της αντίδρασης PCR της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.....	98
Πίνακας 2-4	Πρόγραμμα PCR για την εφαρμογή της in vitro κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.....	98
Πίνακας 3-1	Αλληλουχίες πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην πολλαπλή στοίχιση.....	106
Πίνακας 3-2	Προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα στο μοντέλο του UapA.....	111
Πίνακας 3-3	Αλληλεπιδράσεις UapA-ξανθίνης στις ενεργειακά βέλτιστες διαμορφώσεις.....	115
Πίνακας 3-4	Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγών στο κατάλοιπο S154.....	123
Πίνακας 3-5	Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του TMS12 στο F528S.....	128

Πίνακας 3-6	Κινητική ανάλυση των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του TMS12 απουσία της μεταλλαγής F528S.....	131
Πίνακας 3-7	Είδος των νουκλεοτιδικών αλλαγών στο γονίδιο του <i>uarA</i> , καθώς και τις αμινοξικές αλλαγές που προκαλούνται στο R481.....	136
Πίνακας 3-8	Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του R481 στο F528S.....	138
Πίνακας 3-9	Κινητική ανάλυση των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του R481 απουσία της μεταλλαγής F528S.....	140
Πίνακας 1-10	Κινητική ανάλυση των μεταλλαγών εξειδίκευσης.....	143
Πίνακας 1-11	Αμινοξέα που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος στους μεταφορείς μυκήτων (<i>UapA</i>), κατώτερων θηλαστικών (<i>rSNBT1</i>) και του ανθρώπου (<i>SVCT2</i>).....	148
Πίνακας 1-12	Αλληλουχίες πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην πολλαπλή στοίχιση.....	151
Πίνακας 1-5	Προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας στο μοντέλο του FcyB.....	155
Πίνακας 1-6	Αλληλεπιδράσεις των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων της πρωτεΐνης με τις θέσεις του δακτυλίου των υποστρωμάτων.....	159
Πίνακας 1-7	Αμινοξέα του FcyB τα οποία χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης.....	174

Κεφάλαιο 1ο

Εισαγωγή

1.1 *Aspergillus nidulans*: ένα σύστημα μελέτης με πολλαπλά πλεονεκτήματα

Ο *Aspergillus nidulans* είναι μη παθογόνος ομοθαλλικός νηματοειδής μύκητας. Όπως πολλοί μικροοργανισμοί, αναπτύσσεται με ευκολία σε φτηνά στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (15-44°C), επιτρέποντας την απομόνωση θερμοευαίσθητων και θερμοανθεκτικών μεταλλαγών. Διαθέτει ποικιλία μεταβολικών μονοπατιών, πολλά από αυτά τα οποία είναι χαρακτηρισμένα. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιεί μια πληθώρα διαφορετικών πηγών αζώτου και άνθρακα. Πλεονέκτημά του για αυτούς τους χαρακτηρισμούς, η φύση του αφυλετικού κύκλου αναπαραγωγής του, που δίνει τη δυνατότητα ύπαρξης μιας ποικιλίας φαινοτύπων, εν αντιθέσει με το αύξηση-μη αύξηση των βακτηρίων. Η διάμετρος της αποικίας, η πυκνότητα και το ύψος των εναέριων υφών, η ύπαρξη ή μη και ο αριθμός των κονιδιοσπορίων επιτρέπουν τον απόλυτο διαχωρισμό μερικής ή ολικής απώλειας της λειτουργικότητας, ανθεκτικότητας, ευαισθησίας ή υπερευαισθησίας σε κάποια τοξική ουσία (Todd *et al.*, 2007).

Ο φυλετικός του κύκλος είναι πολύ γρήγορος μιας και σε τρεις το πολύ εβδομάδες από την έναρξη μιας διασταύρωσης είναι δυνατή η ανάλυση των απογόνων. Κάθε κλειστοθήκιο περιέχει έως και 100.000 ασκούς και κάθε ασκός μια οκτάδα ασκοσπορίων. Ο τόσο μεγάλος αριθμός απογόνων καθιστά εύκολη τη γενετική χαρτογράφηση και έχει παράγει έναν από τους πιο λεπτομερείς γενετικούς χάρτες οργανισμών που υπάρχει. Για το λόγο αυτό άλλωστε τον επέλεξε και ο Pontecorvo (Pontecorvo, 1952; Pontecorvo *et al.*, 1953), με σκοπό τη διερεύνηση της δομής των γονιδίων, και συνέβαλε ουσιαστικά στην αποσύζευξη της ιδέας του αδιαίρετου γονιδίου με αυτών της μονάδας ανασυνδυασμού, μεταλλαγής και λειτουργικότητας. Είναι χαρακτηριστικό πως στον *A. nidulans* έχει γίνει διαχωρισμός ενδογονιδιακών μεταλλαγών που απέχουν μόλις 11 ζεύγη βάσεων μεταξύ τους, με χρήση μειωτικού ανασυνδυασμού (Scazzocchio, 2006). Το κατοπινό σύστημα βέβαια του Benzer με τον φάγο T4 αποδείχθηκε μεγαλύτερης αναλυτικής ικανότητας (Benzer & Champe, 1961).

Επίσης η ομοθαλλική και απλοειδής φύση των μυκηλίων επιτρέπει την σύντηξή τους και δημιουργία σταθερών ετεροκαρύων, ανάμεσα σε οποιαδήποτε σχεδόν στελέχη. Η δημιουργία σταθερών διπλοειδικών κονιδιοσπορίων μέσω του παραφυλετικού κύκλου καθιστά εύκολη τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων δύο ή περισσότερων μεταλλαγών καθώς και τον καθορισμό του μεταξύ τους γενετικού χαρακτήρα (π.χ. επικρατείς, υπολειπόμενες μεταλλαγές, φαινόμενα επίστασης). Με

τη διαδικασία της απλοειδοποίησης είναι δυνατή η χαρτογράφηση μεταλλαγών. Για το σκοπό αυτό, απομονώνεται στέλεχος με διπλοειδή πυρήνα, με χρήση παραφυλετικού κύκλου μεταξύ του επιθυμητού στελέχους και ενός με τουλάχιστον ένα φαινοτυπικά διακριτό γονιδιακό χαρακτήρα για κάθε χρωμόσωμα. Κατόπιν αποσταθεροποιείται το διπλοειδές, και είναι δυνατή η παρακολούθηση του χρωμοσώματος το οποίο ακολουθεί την επιθυμητή μεταλλαγή. Επίσης, με χρήση του μιτωτικού επιχιασμού είναι δυνατή η χαρτογράφηση μιας μεταλλαγής σε σχέση με το κεντρομερές (López-Villavicencio *et al.*, 2013).

Οι ανωτέρω λόγοι, αλλά και η ευρεία χρήση του *A. nidulans* είχαν δημιουργήσει μια μεγάλη γκάμα μεταλλαγών και αυξοτροφιών, οι οποίες με την ανακάλυψη της ικανότητας γενετικού μετασχηματισμού του *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1983) κατέστησαν δυνατή την εφαρμογή μεθόδων ανάστροφης γενετικής και την εύκολη κατασκευή διαειδικών πλασμιδίων με γονίδια επιλογής για την *Escherichia coli* και τον *A. nidulans*. Η ικανοποιητική αποδοτικότητα μετασχηματισμού σε συνδυασμό με την ικανότητα «διάσωσης» των πλασμιδίων προσφέρουν την ευελιξία των μοριακών και γενετικών χειρισμών. Επιπλέον, η ανεύρεση αυτόνομα αντιγραφόμενων πλασμιδίων (Gems *et al.*, 1991), που αυξάνουν κατά πολύ την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, διευκόλυνε πολύ την κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, ακόμη και χωρίς την ανάγκη κλωνοποίησης σε *E. coli*.

Πρόσφατα, και μετά τη δημοσίευση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος του *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005), έχει αναπτυχθεί μια σειρά από τεχνικές που επιτρέπει την εύκολη απαλοιφή και αντικατάσταση γονιδίων ή τη σήμανση των προϊόντων τους με μια ποικιλία επιτόπων. Πιο συγκεκριμένα, έχουν κατασκευασθεί στελέχη που φέρουν έλλειψη του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης (Nayak *et al.*, 2006), υπεύθυνης για γεγονότα ετερόλογου ανασυνδυασμού. Στα στελέχη αυτά ο μετασχηματισμός δίνει γένεση σε απογόνους που έχουν προέλθει σχεδόν μόνο από γεγονότα ομόλογου ανασυνδυασμού. Έτσι καθίσταται ευκολότερη η στοχευόμενη ενσωμάτωση πλασμιδίων στο γονιδίωμα, και οι κάθε είδους γονιδιακές αντικαταστάσεις ή σημάνσεις πρωτεϊνών με επιτόπους στον γονιδιωματικό τους τόπο (Szewczyk *et al.*, 2006). Μεγάλη συμβολή σε αυτό είχε η ανάπτυξη νέων PCR τεχνικών για τη σύζευξη διαφορετικών DNA τμημάτων χωρίς τη διαμεσολάβηση κυττάρων και την ανάγκη περιοριστικών ενδονουκλεασών (Yu *et al.*, 2004), καθώς και η κατασκευή του συστήματος cre/lox (Forment *et al.*, 2006), που επιτρέπει την ανακύκλωση του γονιδίου επιλογής του μετασχηματισμού. Με τη

χρήση των ανωτέρω εργαλείων έγινε πολύ ευκολότερος ο χαρακτηρισμός απαραίτητων γονιδίων, μιας και απαλοιφή τους οδηγεί μόνο σε βιώσιμα ετεροκάρυα (Osmani *et al.*, 2006). Αν προσθέσει κανείς τις σύγχρονες τεχνικές των μικροσυστοιχιών, βλέπει πως ο *A. nidulans* μοιάζει έτοιμος για την εποχή της Βιολογίας Συστημάτων και της Πρωτεομικής. Ο *A. nidulans* έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο-πρότυπο σύστημα σε τρία κυρίως επιστημονικά πεδία: της ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και της μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα.

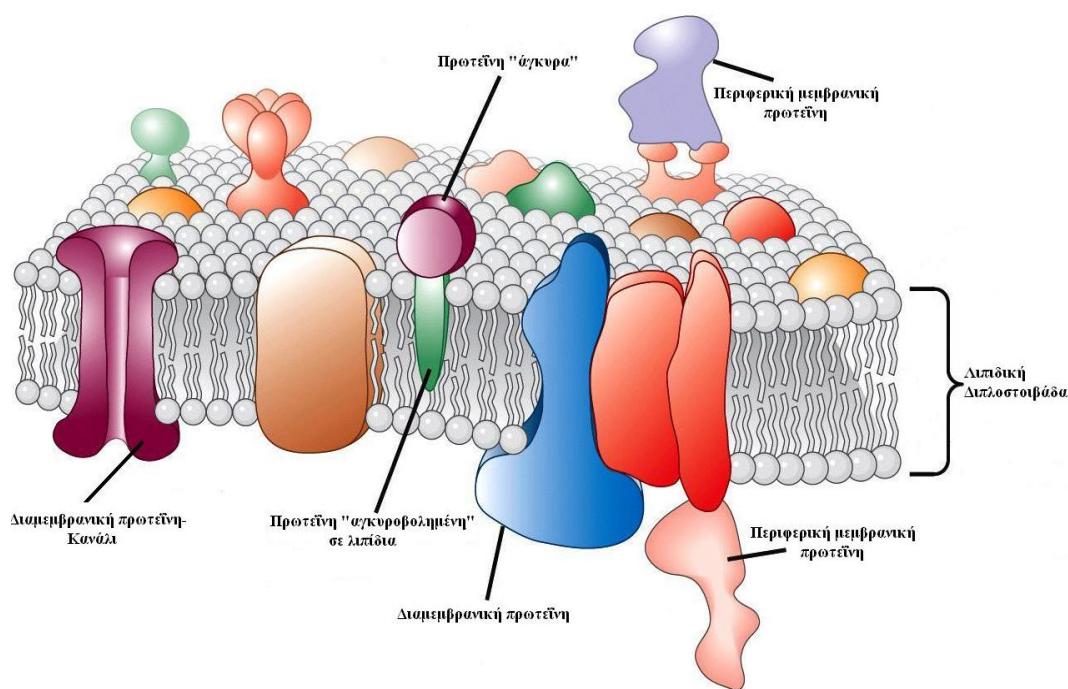
1.2 Πλασματική μεμβράνη - Μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφορείς

1.2.1 Εξέλιξη της πλασματικής μεμβράνης

Η πλασματική μεμβράνη αποτελεί το φυσικό σύνορο των κυττάρων, και ταυτόχρονα το πρώτο σημείο αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον. Σήμερα πιστεύεται πως η βιολογική εξέλιξη στα πρώτα της βήματα διαδραματίστηκε μέσα σε κυστίδια λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Πράγματι, η ικανότητα εκλεκτικής διαπερατότητας των μορίων κάθετα στη διπλοστοιβάδα και η οριοθέτηση ενός ασφαλούς και πλούσιου περιβάλλοντος στον ελλιπή πρωτόγονο μεταβολισμό πρέπει να αποδείχτηκε κρίσιμη για την μετέπειτα εξέλιξη της ζωής (Alberts *et al.*, 2002). Με την πολυπλοκότητα και τον ανταγωνισμό να αυξάνονται, και τα χημικά θρεπτικά μέσα να ελαττώνονται, η πλασματική μεμβράνη απέκτησε νέους ρόλους και έδωσε λύσεις. Αφενός, φιλοξένησε πρωτεΐνες που μετέφεραν νέες, πιο σύνθετες οργανικές ουσίες στο κύτταρο, οι οποίες δεν μπορούσαν να διασχίσουν τη μεμβράνη. Έτσι, νέες πηγές άνθρακα και αζώτου, ενεργειακά πλουσιότερες, άρχισαν να χρησιμοποιούνται. Αφετέρου, εξελίχθηκε στις επιφάνειες των μεμβρανών η φωτοσύνθεση, και κατόπιν η αναπνοή, και αποφεύχθηκε το διαφαινόμενο πρόωρο τέλος της ζωής. Με τη διαμερισματοποίηση του κυττάρου έγινε εφικτή η αύξηση του όγκου και της πολυπλοκότητας του, ενώ το κύτταρο μπόρεσε να αντιλαμβάνεται περιβαλλοντικές αλλαγές, αλλά και μηνύματα από άλλους οργανισμούς. Μέσω της κυτταρικής σύνδεσης και προσκόλλησης, αλλά και της ανάπτυξης μηχανισμών για την κυτταρική επικοινωνία, έγινε δυνατό το πέρασμα από τους μονοκύτταρους στους πολυκύτταρους οργανισμούς (Cooper, 2000).

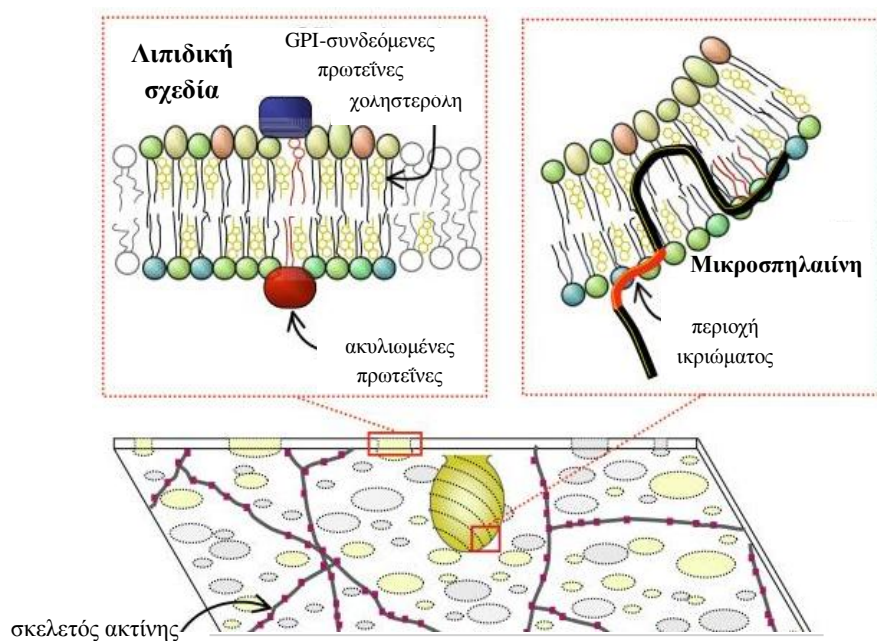
1.2.2 Δομή της πλασματικής μεμβράνης

Η πλασματική μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, σε αναλογίες που διαφέρουν μεταξύ οργανισμών, αλλά και κυττάρων του ίδιου οργανισμού, ακόμη και στο ίδιο το κύτταρο ανάλογα με τις συνθήκες. Οι διαφορές αυτές αντανακλούν λειτουργικές και περιβαλλοντικές εξειδικεύσεις. Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (Singer & Nicolson, 1972) αποτέλεσε μια πρώιμη προσπάθεια απεικόνισης της δισδιάστατης οργάνωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη, και απεικονίζει την πλασματική μεμβράνη ως ένα πολύπαραγοντικό περιβάλλον με τις λειτουργικά ενεργές πρωτεΐνες διάσπαρτες σε μια σχετικά ομοιογενή λιπιδική διπλοστοιβάδα (Εικ. 1-1). Το μοντέλο αυτό δεν αποδίδει λειτουργική σημασία στην φυσική ετερογένεια της οργάνωσης των λιπιδίων από την οποία μπορεί να προκύψουν θερμικές διακυμάνσεις και μη ιδανική ανάμιξη. Καταφέρνει να εξηγήσει τις φυσικοχημικές διαφορές της μεμβράνης, όπως τη ρευστότητα, το σημείο τήξης και τη θερμοκρασία μετάπτωσης. Διαφορές στη σύσταση σε λιπαρά οξέα, στο μήκος και τον αριθμό των ακόρεστων δεσμών των αλειφατικών αλυσίδων, αλλά και της περιεκτικότητας σε στερόλες, ρυθμίζουν τις ανωτέρω παραμέτρους. Σε φυσιολογικές συνθήκες η μεμβράνη διατηρείται σε κατάσταση «υγρού κρυστάλλου». Η ρευστότητα αυτή, που είναι συνάρτηση της σύστασής της, αλλάζει με τη θερμοκρασία. Έτσι, όταν η μεμβράνη ψυχθεί και βρεθεί στο κάτω όριο του σημείου μετάπτωσης της, μετατρέπεται αντιστρεπτά σε πήκτωμα.



Εικόνα 1-1 Μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού. (Lodish *et al.*, 2008)

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν παράσχει σημαντικά πιο σύνθετη εικόνα της οργάνωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στη μεμβράνη του πλάσματος. Σύνδεση της δομής-περιεκτικότητας της μεμβράνης με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες έγινε με το μοντέλο των λιπιδικών σχεδίων (lipid rafts – Simons & Ikonen, 1997; Brown & London, 2000). Η υπόθεση της λιπιδικής σχεδίας στηρίζεται στην ιδέα ότι τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης έχουν διαφορετικές βιοφυσικές τάσεις σύνδεσης του ενός με το άλλο, και, στην απλούστερη μορφή της, προτείνει την ύπαρξη πλευρικής ετερογένειας στην πλασματική μεμβράνη που προκύπτει από την αυστηρότερη σύνδεση της χοληστερόλης με κεκορεσμένα και μονο-ακόρεστα φωσφολιπίδια από ότι με πολυ-ακόρεστα φωσφολιπίδια. Η υπόθεση αυτή συσχετίζει τη λειτουργική σημασία με την υπάρχουσα πλευρική ετερογένεια στην πλασματική μεμβράνη και προτείνει ότι οι περιοχές της μεμβράνης που προκύπτουν από τέτοιες ετερογένειες παίζουν ενεργό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της μεταγωγής σήματος (Gasperi *et al.*, 2013; Sebastião *et al.*, 2013), της διακίνησης κυστιδίων (de Juan-Sanz *et al.*, 2011; Echarrri *et al.*, 2007), της προσκόλλησης και της κινητικότητας των κυττάρων (Jahn *et al.*, 2011; Rege & Hagoood, 2006), και της εισόδου παθογόνων ιών και βακτηρίων (Vieira *et al.*, 2010).



Εικόνα 1-2 Μικροδομές της πλασματικής μεμβράνης. Τα μικροσπηλαία και οι λιπιδικές σχεδίες είναι μικροδομές εξαρτώμενες από τη χοληστερόλη των οποίων η οργάνωση φαίνεται να διευκολύνει τη διαλογή των πρωτεϊνών και των λιπιδίων που οργάνωνονται σε υψηλά διατεταγμένες δομές. Η μικροσπηλαιΐνη καθοδηγεί το σχηματισμό των μικροσπηλαίων και φαίνεται να αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών μέσω της περιοχής ικρίωμάτός της (caveolin scaffolding domain). (Τροποποιημένο από Laude & Prior, 2004)

Οι λιπιδικές σχεδίες φαίνεται να είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και κορεσμένα λιπίδια, όπως σφιγγολιπίδια που τοποθετούνται μαζί για να σχηματίσουν μια άκρως διατεταγμένη δομή, διακριτή από την περιβάλλουσα “θάλασσα” των άτακτα διατεταγμένων, κυρίως ακόρεστων, λιπιδίων (Εικ. 1-2). Η υπόθεση της λιπιδικής σχεδίας περιλαμβάνει και τα δύο φύλλα της πλασματικής μεμβράνης, παρά το γεγονός ότι τα σφιγγολιπίδια βρίσκονται μόνο στο περιπλασμικό φύλλο (Laude & Prior, 2004). Τα γλυκοσφιγγολιπίδια διαθέτουν συνήθως ένα λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας που προτείνεται να είναι σε θέση να συνδέεται με μία δομή λιπιδικής σχεδίας εμπλουτισμένη σε κορεσμένα λιπίδια, χοληστερόλη και περιφερικές πρωτεΐνες αγκυροβολημένες με κεκορεσμένες ακυλ-αλυσίδες στο κυτταροπλασματικό φύλλο. Κατ’ αυτόν τον τρόπο η ιδιαίτερα διατεταγμένη φύση αυτής της περιοχής παρέχει ένα μηχανισμό για τη διαλογή των πρωτεϊνών και των λιπιδίων ανάλογα με την ικανότητά τους να παρεμβάλλονται σε αυτήν την αυστηρά δεμένη δομή (Laude & Prior, 2004; Sengupta *et al.*, 2007). Πρωτεΐνες που βρίσκονται προς τον περιπλασμικό χώρο προσδεμένες με άγκυρες γλυκο-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (Glyco- phosphatidyl- inositol – GPI anchors), πρωτεΐνες που βρίσκονται προς το κυτταρόπλασμα προσδεμένες με κορεσμένες παλμιτοϋλο- ή μυριστουϋλο- ομάδες και πρωτεΐνες που προσδέουν τη χοληστερόλη, όλες φαίνεται να τείνουν να εισχωρούν σε λιπιδικές σχεδίες (Lingwood & Simons, 2010). Λόγω της δομικής τους ομοιότητας με τις λιπιδικές σχεδίες, τα μικροσπήλαια (caveolae) συχνά εξετάζονται ως ειδικός υποτύπος των λιπιδικών σχεδιών (Εικ. 1-2).

1.2.3 Εκλεκτική διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης

Η πλασματική μεμβράνη είναι διαπερατή για μικρά, μη πολικά μόρια, όπως η αιθανόλη. Το υδρόφοβο, όμως, περιβάλλον των αλειφατικών ουρών των λιπιδίων δημιουργεί ένα σχεδόν αδιαπέραστο φράγμα για μεγάλες ή πολικές ενώσεις. Για τις ενώσεις αυτές το κύτταρο διαθέτει μια ποικιλία μηχανισμών υπεύθυνων για τη μεταφορά και τη ρύθμιση της συγκέντρωσης τους. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι σε όλους τους οργανισμούς το 10–20% των γονιδίων τους κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταφοράς, κανάλια και μεταφορείς (Xiong, 2006).

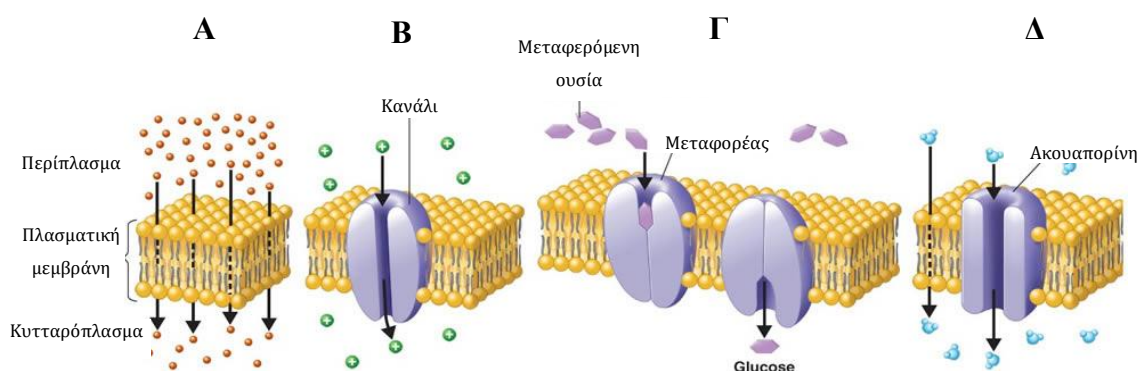
Οι μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (Cooper, 2000):

I. Παθητική μεταφορά – Απλή διάχυση μέσω των λιπιδίων

Η λιπιδική διπλοστιβάδα είναι ιδιαίτερα διαπερατή σε αέρια, όπως το οξυγόνο (O_2) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), σε υδρόφοβα μόρια, όπως το βενζένιο, και σε μικρά πολικά αλλά μη φορτισμένα μόρια, όπως η αιθανόλη, η ουρία και το νερό (H_2O – όσμωση, Εικ. 1-3Δ). Κατά την απλή διάχυση τα μόρια αυτά κινούνται διαμέσου των λιπιδίων, βάσει της κλίσης της συγκέντρωσής τους, μέσα ή έξω από το κύτταρο, χωρίς τη συμμετοχή άλλων παραγόντων (π.χ. πρωτεΐνες μεταφοράς). Ο ρυθμός διάχυσης της εκάστοτε ουσίας εξαρτάται από την κλίση της συγκέντρωσής της και την υδροφοβικότητά της (Εικ. 1-3Α).

II. Παθητική μεταφορά – Διευκολυνόμενη διάχυση μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Η διευκολυνόμενη διάχυση είναι ένας τύπος παθητικής μεταφοράς, όπου ορισμένες ουσίες διασχίζουν την μεμβράνη, μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς μόνες τους αδυνατούν να διαπεράσουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Η μεταφορά αυτή γίνεται κατά την κλίση της συγκέντρωσής τους, ή αν πρόκειται για φορτισμένα μόρια βάσει του ηλεκτροχημικού τους δυναμικού, και δεν απαιτείται ενέργεια. Τέτοια μόρια είναι τα ιόντα, οι υδατάνθρακες, τα νουκλεοσίδια και τα αμινοξέα. Στη διευκολυνόμενη διάχυση αυτών των μορίων συμμετέχουν δύο κατηγορίες πρωτεϊνών, τα κανάλια και οι μεταφορείς.

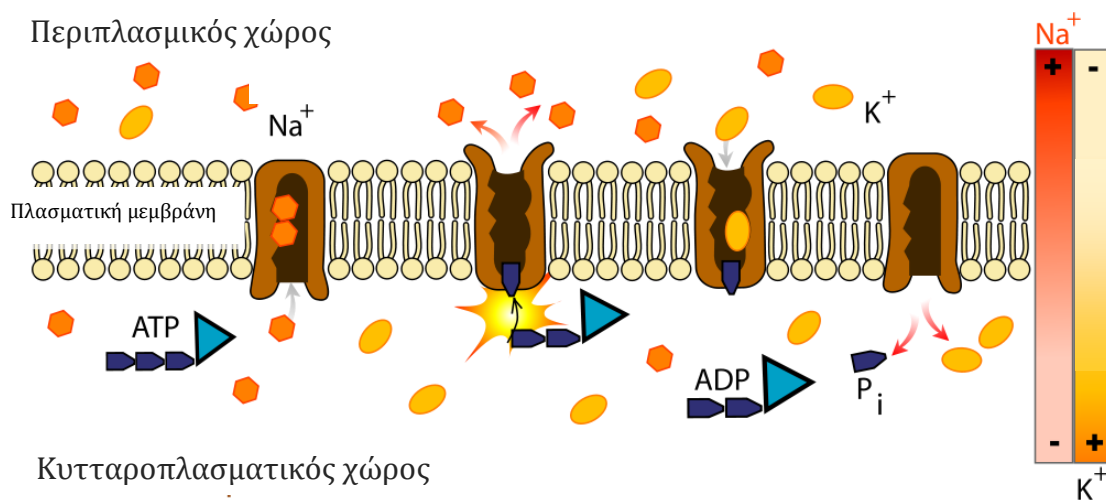


Εικόνα 1-3 Μηχανισμοί παθητικής μεταφοράς. Α. Απλή διάχυση μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Β. και Γ. Διευκολυνόμενη διάχυση μέσω καναλιού και μεταφορέα αντίστοιχα. Δ. Όσμωση μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας (αριστερά) και μεταφορά μορίων νερού διαμέσου ακουαπορίνης (δεξιά). (http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/index.html)

Τα κανάλια σχηματίζουν ανοιχτούς διαύλους κατά μήκος της μεμβράνης επιτρέποντας την ελεύθερη διάχυση κάθε μορίου που διαθέτει το κατάλληλο μέγεθος και φορτίο (Εικ. 1-3Β). Τα περισσότερα κανάλια δεν παραμένουν μόνιμα ανοιχτά παρά ρυθμίζονται από πύλες (gates), οι οποίες ανοίγουν ταχύτατα αποκρινόμενες στο σήμα που δέχονται. Διαμέσου αυτών μεταφέρονται κυρίως ιόντα, νευροδιαβιβαστές και νερό (ακουαπορίνες–aquaporins, Εικ. 1-3Δ). Αντίθετα, οι μεταφορείς προσδέχουν εξειδικευμένα τα μόρια που θα μεταφέρουν. Έπειτα υπόκεινται σε αλλαγή της διαμόρφωσής τους η οποία επιτρέπει στο μόριο να απελευθερωθεί στην άλλη πλευρά της μεμβράνης (Εικ. 1-3Γ).

III. Πρωτογενής ενεργός μεταφορά

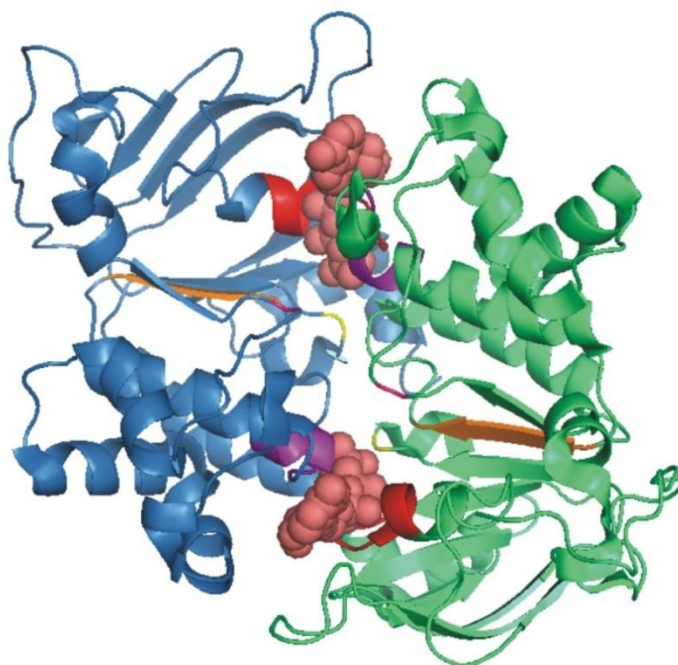
Η ροή των μορίων στη διευκολυνόμενη διάχυση, είτε μέσω μεταφορέων ή καναλιών, πραγματοποιείται πάντα σε κατεύθυνση που καθορίζεται από την ηλεκτροχημική κλίση ή την κλίση συγκέντρωσης (μεταφορά από την υψηλή στη χαμηλή) κατά μήκος της μεμβράνης. Σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, το κύτταρο πρέπει να μεταφέρει μόρια αντίθετα από την κλίση της συγκέντρωσής τους.



Εικόνα 1-4 Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας Na^+/K^+ . Αρχικά προσδέονται τρία Na^+ , οπότε και πυροδοτείται η ATP-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της αντλίας. Η φωσφορυλίωση εκθέτει τις θέσεις πρόσδεσης του Na^+ στο περίπλασμα και ελαττώνει τη συγγένεια δέσμευσης της αντλίας για Na^+ , οπότε και τα ιόντα απελευθερώνονται. Ταυτόχρονα προσδέονται δύο K^+ στις περιπλασματικές θέσεις υψηλής συγγένειας. Η πρόσδεση των K^+ πυροδοτεί την αποφωσφορυλίωση της αντλίας και συνεπώς την επαναφορά της προς το κυτταρόπλασμα του κυττάρου, όπου απελευθερώνονται τα ιόντα K^+ . Η μεταφορά και των δύο ιόντων πραγματοποιείται αντίθετα από την κλίση της συγκέντρωσής τους. (https://en.wikipedia.org/wiki/Active_transport)

Στην πρωτογενή ενεργό μεταφορά, η ενέργεια που παρέχεται από άλλη συνεξυγμένη αντίδραση (όπως η υδρόλυση του ATP) χρησιμοποιείται για την αναρροϊκή μεταφορά των μορίων προς ενεργειακά δυσμενή κατεύθυνση. Οι αντλίες

που διατηρούν την κλίση των ιόντων κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης αποτελούν αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ενεργού μεταφοράς που καθοδηγείται από την υδρόλυση του ATP, όπως οι αντλίες Na^+/K^+ (Εικ. 1-4) και Ca^{+2} . Παρόμοιες αντλίες ιόντων στην πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων, των ζυμών, και των φυτικών κυττάρων είναι υπεύθυνες για την ενεργό μεταφορά H^+ έξω από το κύτταρο. Επιπλέον, H^+ αντλούνται ενεργητικά και έξω από τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, συντελώντας στην οξύτητα των γαστρικών υγρών. Δομικά διακριτές αντλίες είναι υπεύθυνες για την ενεργό μεταφορά των H^+ εντός των λυσοσωμάτων και των ενδοσωμάτων. Εξάιρεση αποτελεί ένας τρίτος τύπος αντλίας H^+ στις συνθετάσες του ATP των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών: Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αντλίες μπορεί να θεωρηθεί ότι λειτουργούν αντίστροφα, καθώς η κίνηση των ιόντων κατά την ηλεκτροχημική τους διαβάθμιση, και όχι αντίθετα από αυτήν, καθοδηγεί τη σύνθεση του ATP (Cooper, 2000).



Εικόνα 1-5 Δομή του μεταφορέα Sav1866 της υπο-οικογένειας MDR-ABC του *Staphylococcus aureus* συγκρυσταλλωμένο με AMP-PNP. (Dawson & Locher, 2007)

Η μεγαλύτερη οικογένεια ATP-εξαρτώμενων μεμβρανικών μεταφορέων αποτελείται από τους μεταφορείς ABC (ATP binding cassette transporters), που ονομάζονται έτσι επειδή χαρακτηρίζονται από υψηλά συντηρημένες περιοχές δέσμησης του ATP (Εικ. 1-5). Περισσότερα από εκατό μέλη της οικογένειας έχουν ταυτοποιηθεί τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα βακτήρια, οι ABC μεταφορείς χρησιμοποιούν την ενέργεια που προέρχεται από την

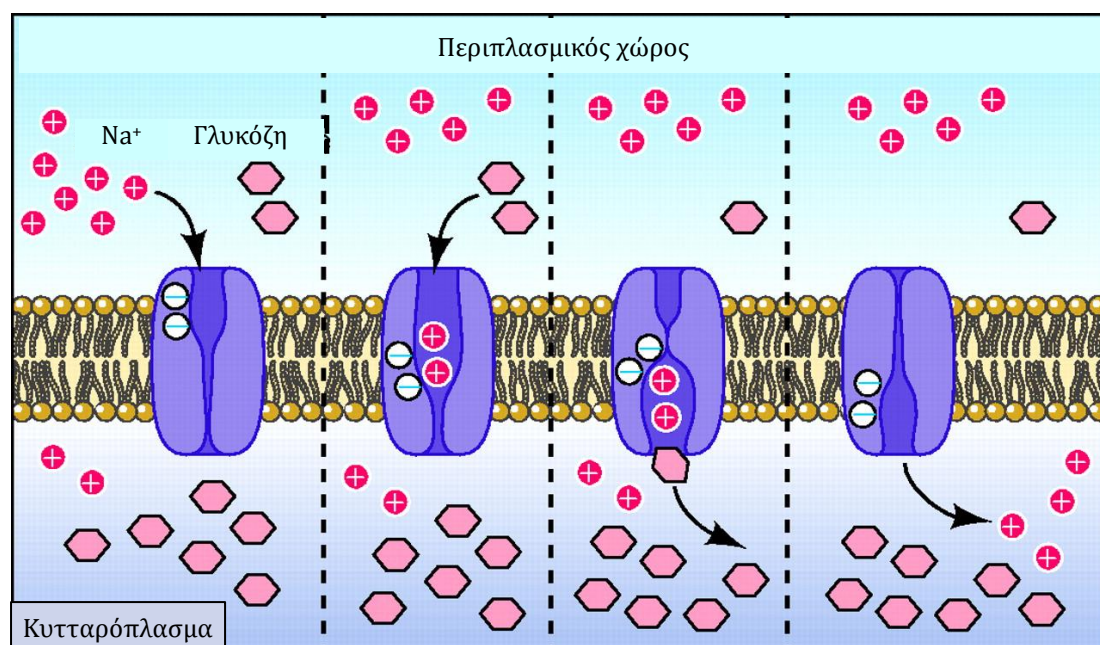
υδρόλυση ATP για να μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα μορίων, συμπεριλαμβανομένων ιόντων, σακχάρων και αμινοξέων (Cooper, 2000). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η υπερέκφραση ή η δυσλειτουργία τους έχει συνδεθεί με ασθένειες, όπως ο καρκίνος [μεταφορείς MDR (multidrug resistance) – Sui *et al.*, 2012] και η κυστική ίνωση [CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) – Hoffman & Ramsey, 2013] αντίστοιχα. Μέχρι σήμερα έχουν λυθεί κρυσταλλογραφικά δεκαπέντε μεταφορείς της οικογένειας σε αρχαία (δύο), βακτήρια (εννέα), αλλά και σε φυτικούς (δύο στην *Arabidopsis thaliana*) και ζωικούς (δύο στον *Mus musculus*) οργανισμούς (στοιχεία από RCSB Protein Data Bank – 22/06/2013).

IV. Δευτερογενής ενεργός μεταφορά

Τα κανάλια ιόντων και οι μεταφορείς ABC που συζητήθηκαν προηγουμένως χρησιμοποιούν ενέργεια που προέρχεται απευθείας από την υδρόλυση ATP για τη μεταφορά μορίων ενάντια στην ηλεκτροχημική τους κλίση. Άλλα μόρια μεταφέρονται επίσης ενάντια στην κλίση της συγκέντρωσης τους, χρησιμοποιώντας την ενέργεια που προέρχεται από τη συνεξυγμένη μεταφορά ενός δεύτερου μορίου προς την ενεργειακά ευνοϊκή κατεύθυνση (Cooper, 2000). Η διαβάθμιση συγκέντρωσης του Na^+ που διατηρείται από την αντλία Na^+-K^+ παρέχει μια συχνά χρησιμοποιούμενη πηγή ενέργειας που τροφοδοτεί την ενεργό μεταφορά σακχάρων, αμινοξέων, και ιόντων σε κύτταρα θηλαστικών. Η κλίση H^+ καθορίζεται από τις αντλίες H^+ σε βακτήρια, μύκητες και φυτικά κύτταρα και διαδραματίζει παρόμοιο ρόλο (Thwaites & Anderson, 2007).

Η ενεργός μεταφορά μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με συμμεταφορά, δηλαδή με μεταφορά δύο μορίων προς την ίδια κατεύθυνση, είτε με αντιμεταφορά, κατά την οποία δύο μόρια μεταφέρονται προς αντίθετες κατευθύνσεις. Η ταυτόχρονη πρόσληψη γλυκόζης/ Na^+ είναι ένα τυπικό παράδειγμα συμμεταφοράς στα κύτταρα θηλαστικών (Εικ. 1-6) (Wright *et al.*, 2004). Σε βακτήρια, μύκητες και φυτικά κύτταρα η συμμεταφορά των θρεπτικών ουσιών πραγματοποιείται με H^+ , αντί ιόντων Na^+ . Παρόλο που το Na^+ θεωρείται το κυρίαρχο ιόν συμμεταφοράς στα θηλαστικά, έχουν βρεθεί και συμμεταφορείς H^+ (Thwaites & Anderson, 2007). Τυπικό παράδειγμα αντιμεταφοράς είναι το Ca^{+2} στα ανθρώπινα κύτταρα το Ca^{+2} εξάγεται από τα κύτταρα όχι μόνο από την αντλία Ca^{+2} , αλλά επίσης μέσω ενός αντιμεταφορέα $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ που μεταφέρει Na^+ μέσα στο κύτταρο και Ca^{+2} έξω από αυτό (Jornot *et al.*, 1999). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες ανταλλαγής

$\text{Na}^+\text{-H}^+$, οι οποίες ρυθμίζουν το ενδοκυτταρικό pH στα κύτταρα των θηλαστικών. Οι αντισυμβαλλόμενες $\text{Na}^+\text{-H}^+$ μεταφέρουν Na^+ εντός του κυττάρου κατά την εξαγωγή H^+ , απομακρύνοντας έτσι την περίσσεια H^+ που παράγονται από μεταβολικές αντιδράσεις και αποτρέποντας την οξίνιση του κυτταροπλάσματος (Ahearn *et al.*, 1994). Πρόσφατα, δύο αντισυμβαλλόμενες $\text{Na}^+\text{-H}^+$ στην *Yersinia pestis* φάνηκε να επηρεάζουν την μολυσματικότητά της, αποτελώντας έτσι φαρμακευτικό στόχο για λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτήν, και ενδεχομένως και για άλλα παθογόνα βακτήρια που μεταδίδονται με το αίμα (Minato *et al.*, 2013).



Εικόνα 1-6 Μοντέλο της συμμεταφοράς Na^+ -γλυκόζης από τον ανθρώπινο μεταφορέα SGLT1. Η περιπλασμική περίσσεια Na^+ καθοδηγεί τη μεταφορά γλυκόζης προς το εσωτερικό του κυττάρου αντίθετα από τη διαβάθμιση συγκέντρωσής της. Αρχικά, το περιπλασμικό Na^+ προσδένεται στην αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη για να επιτρέψει τη δέσμευση της γλυκόζης με υψηλή συγγένεια. Δύο ιόντα Na^+ και ένα μόριο γλυκόζης μεταφέρονται στη συνέχεια κατά μήκος της μεμβράνης, όπου πρώτα η γλυκόζη και έπειτα τα Na^+ απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, λόγω της χαμηλής συγγένειας για τη γλυκόζη και της χαμηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του Na^+ . Η πρωτεΐνη χωρίς προσδέματα στη συνέχεια επιστρέφει στην αρχική διαμόρφωση κυρίως λόγω του αρνητικού δυναμικού της μεμβράνης και της υψηλής εξωτερικής συγκέντρωσης Na^+ . (Wright *et al.*, 2004)

1.2.4 Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά ουσιών διακρίνονται σε κανάλια και μεταφορείς.

1.2.4.1 Τα κανάλια ως μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς

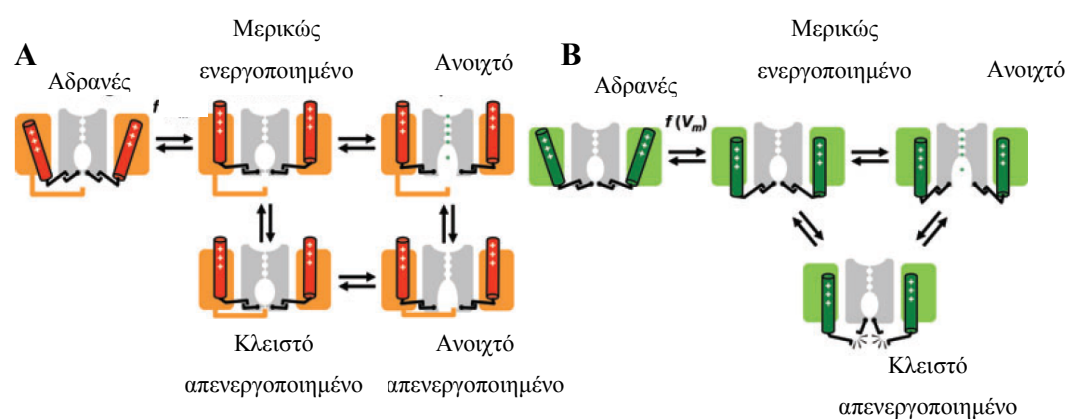
Τα κανάλια μπορεί να αποτελούνται είτε από διαμεμβρανικές β-πτυχωτές επιφάνειες, που σχηματίζουν ένα β-βαρέλι, όπως έχει παρατηρηθεί στην εξωτερική

μεμβράνη των κατά Gram⁻ βακτηρίων, στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες, είτε συχνότερα από α-έλικες, όπως απαντώνται σε αρχαία, βακτήρια, και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχουν στο κέντρο τους και κάθετα ή σχεδόν κάθετα στη μεμβράνη έναν υδάτινο πολικό πόρο κατάλληλου εύρους για να επιτρέπει το πέρασμα συγκεκριμένων μορίων σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους κλίση και χωρίς την ανάγκη ενέργειας (Saier, 2000). Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι τα κανάλια, όπως και οι μεταφορείς, λαμβάνουν διαφορετικές διαμορφώσεις, κλειστή αδρανής – μερικώς ενεργοποιημένη – ανοιχτή – μερικώς απενεργοποιημένη, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες (Εικ. 1-7) (Bähring & Covarrubias, 2011). Στην ανοιχτή διαμόρφωση πραγματοποιείται μεταφορά, ενώ στην αδρανή, στην μερικώς ενεργοποιημένη και στην απενεργοποιημένη όχι. Στην μερικώς ενεργοποιημένη κατάσταση, το κανάλι εξακολουθεί να παραμένει κλειστό, αλλά τελικά μεταπίπτει στην ανοιχτή. Αντιθέτως, στις διαμορφώσεις όπου είναι απενεργοποιημένο, το κανάλι μεταπίπτει στην αδρανή κατάσταση και δυσκολότερα στην ενεργοποιημένη. Έτσι, στην αδρανή, στην μερικώς ενεργοποιημένη και στην απενεργοποιημένη η ροή του υποστρώματος παρεμποδίζεται από ορισμένες διαμορφώσεις του καναλιού, συμπεριλαμβανομένης της απόφραξης του πόρου. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που ελέγχουν το άνοιγμα/κλείσιμο και την αδρανοποίηση των καναλιών πιστεύεται ότι είναι σε δομικά διακριτές περιοχές και, ως εκ τούτου αναφέρονται ως διαφορετικές “πύλες” (gates) ή “περιοχές ελεγχόμενης πρόσβασης” (gating domains) (Bähring & Covarrubias, 2011; Mathie *et al.*, 2010).

1.2.4.2 Μεταφορείς: μια διακριτή δομικά και λειτουργικά κατηγορία μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς από τα κανάλια

Οι μεταφορείς αποτελούνται από αρκετά διαμεμβρανικά τμήματα (TMS), τα οποία έχουν κυρίως δομή α-έλικας. Οι α-έλικες σχηματίζονται ως επί το πλείστον από μη πολικά υδρόφοβα αμινοξέα. Αυτό συντελεί στην σωστή τοπογένεσή τους κατά την πρωτεϊνοσύνθεση στις μεμβράνες του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), αλλά και στην σωστή διαμόρφωσή τους στο αλειφατικό περιβάλλον της μεμβράνης. Η α-έλικα έχει επικρατήσει στους μεταφορείς λόγω της ευκαμψίας της, που επιτρέπει τις κινήσεις, αλλά και της ποικιλότητας στον αριθμό αμινοξέων ενός TMS. Η ποικιλότητα αυτή των αμινοξέων έχει σχέση με τη λειτουργία, αλλά και με το γεγονός ότι η διαμόρφωση ενός TMS δεν είναι πάντα κάθετη στη μεμβράνη, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις ακόμη και οριζόντια (Xiong, 2006).

Ο προσανατολισμός των μεταφορέων καθορίζεται από τον προσανατολισμό του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Η πληροφορία υπάρχει στη αμινοξική της ακολουθία, η οποία καθορίζει την τοποθέτησή της στην μεμβράνη του ΕΔ κατά την συνμεταφραστική τοπογένεση. Σημαντικό ρόλο παίζει η υδροφοβικότητα ενός TMS αλλά και η ύπαρξη πολικών, θετικά φορτισμένων αμινοξέων στις ενδοκυτταρικές θηλιές που συνδέουν δυο TMS (“*positive inside rule*” - Andersson & von Heijne, 1994). Η τελική δομή ενισχύεται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και σπανιότερα μέσω δεσμών υδρογόνου και ιοντικών αλληλεπιδράσεων (Xiong, 2006).



Εικόνα 1-7 Σχηματική αναπαράσταση των εναλλαγών της διαμόρφωσης ενός καναλιού σε έναν κύκλο μεταφοράς. Οι ακριανές χρωματιστές υπομονάδες είναι δέκτες του σήματος ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης του καναλιού. **A.** Κανάλια που μεταπίπτουν πρώτα σε μία ανοιχτή απενεργοποιημένη διαμόρφωση και έπειτα στην κλειστή. **B.** Κανάλια που μεταπίπτουν απευθείας από την μερικώς ενεργοποιημένη ή την ανοιχτή διαμόρφωση στην κλειστή απενεργοποιημένη. (Bähring & Covarrubias, 2011)

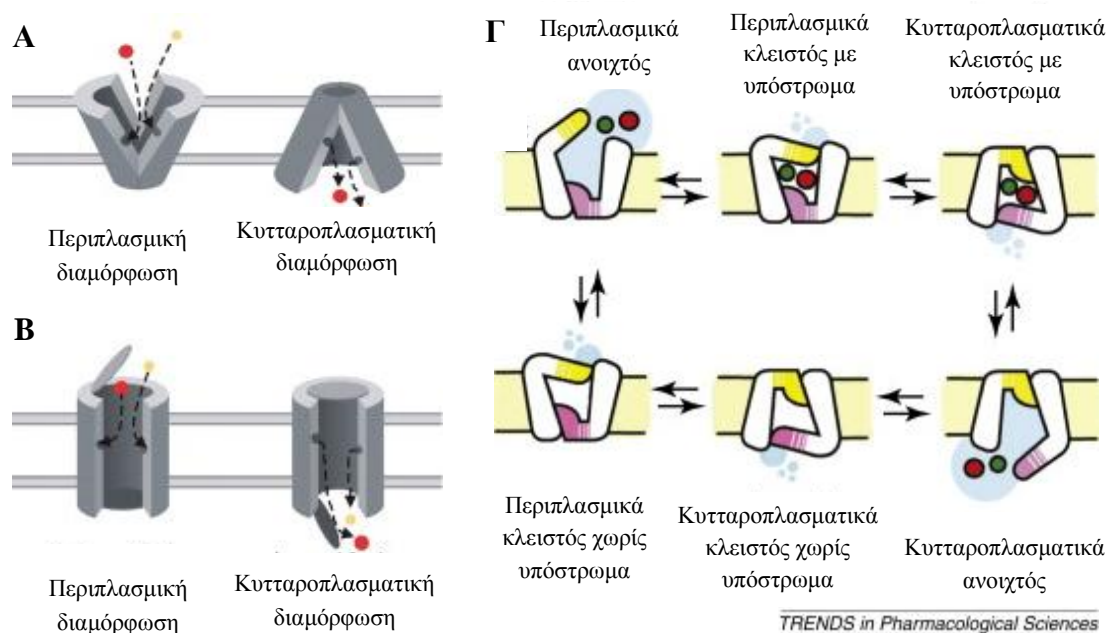
Η δομή των μεταφορέων δεν σχηματίζει ανοικτό πόρο, όπως τα κανάλια (Εικ. 1-7), αλλά μοιάζει περισσότερο με ένζυμο που εκλεκτικά ανοίγει και μεταφέρει εξειδικευμένες ουσίες με αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του (Εικ. 1-8). Αρχικά είχαν διατυπωθεί δύο μηχανισμοί μεταφοράς: το μοντέλο με εναλλαγή κίνησης (rocker-switch mechanism – Mitchell, 1963) και ο μηχανισμός του ελεγχόμενου πόρου (gated-pore mechanism – Patlak, 1957). Σύμφωνα με το πρώτο, η αλλαγή της διαμόρφωσης από περιπλαστική (outward-facing) σε κυτταροπλασματική (inward-facing) πραγματοποιείται με απότομες και άκαμπτες κινήσεις των δύο διακριτών δομικά και λειτουργικά περιοχών, των N- και C-τερματικών περιοχών (N- and C-terminal domains), καθεμιά από τις οποίες αποτελείται από έξι στενά πακεταρισμένες έλικες, και οι δύο περιοχές ενώνονται με έναν μακρύ, κυτταροπλασματικό, κεντρικά τοποθετημένο βρόχο (loop) (Εικ. 1-8A). Ο πόρος μετατόπισης του υποστρώματος

εντοπίζεται μεταξύ των N- και C-τερματικών περιοχών (Law *et al.*, 2007). Το μοντέλο του ελεγχόμενου πόρου εστιάζει στις τοπικές κινήσεις των περιπλαστικών και κυτταροπλασματικών πυλών, που πλαισιώνουν την θέση δέσμευσης του υποστρώματος και υποβάλλονται σε εναλλασσόμενα ανοίγματα (Εικ. 1-8B).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα υπήρχε η πεποίθηση ότι οι δύο παραπάνω μηχανισμοί είναι διακριτοί. Η κατάσταση αυτή άλλαξε με τη συσσώρευση δομικών δεδομένων μεταφορέων που εμφάνιζαν ενδιάμεσα στοιχεία, αρχής γενομένης από το 2005 με την κρυσταλλογραφία του LeuT (Yamashita *et al.*, 2005). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο μηχανισμός μεταφοράς στους μεταφορείς δευτερογενούς ενεργότητας εμφανίζει στοιχεία και των δύο προαναφερθέντων μηχανισμών, περιλαμβάνοντας έτσι ισομερισμό μεταξύ της περιπλαστικά και κυτταροπλασματικά στραμμένης διαμόρφωσης, καθώς και τοπικό άνοιγμα και κλείσιμο των πυλών που εν μέρει ή πλήρως εγκλωβίζουν το δεσμευμένο υπόστρωμα. Επιπλέον ενδιάμεσες διαμορφώσεις μπορεί να προκύψουν μεταξύ περιπλαστικά και κυτταροπλασματικά στραμμένης διαμόρφωσης, είτε σε διαμόρφωση με το υπόστρωμα ή χωρίς αυτό. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η θερμοδυναμική υπαγορεύει ότι η μεταφορά οδηγείται μόνο από τη διαφορά του ηλεκτροχημικού δυναμικού της διαλυμένης ουσίας στις δύο πλευρές της μεμβράνης, και είναι ανεξάρτητη από τη διαδρομή. Ως εκ τούτου, ο αριθμός και η σχετική σταθερότητα των εμπλεκόμενων διαμορφώσεων μπορεί να ποικίλει, εφ' όσον κανένα από τα ενδιάμεσα δεν έχει μία ελεύθερη ενέργεια που είναι πάρα πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή, ειδικά τα ενεργειακά εμπόδια είναι υψηλά. Υποστηρίζοντας αυτήν την άποψη, διάφοροι μεταφορείς κρυσταλλώθηκαν σε διαφορετικές διαμορφώσεις, οι οποίες παρέχουν δομική στιγμιότυπα του κύκλου μεταφοράς.

Στο σύγχρονο μοντέλο εναλλασσόμενης πρόσβασης (alternating-access model – Εικ. 1-8Γ) ο κύκλος μεταφοράς ξεκινά με έναν κενό, περιπλαστικά στραμμένο μεταφορέα (outward open) που δεσμεύει το υπόστρωμα και το συζευγμένο ιόν από το εξωκυτταρικό διάλυμα με ταυτόχρονο κλείσιμο της πύλης (outward bound). Ο μεταφορέας υφίσταται μια μετάβαση σε μια κυτταροπλασματικά στραμμένη διαμόρφωση στην οποία η περιπλαστική πύλη δεν μπορεί πλέον να ανοίξει, ενώ έχει ενεργοποιηθεί το άνοιγμα της κυτταροπλασματικής πύλης, η οποία και αυτή είναι προς το παρόν κλειστή (inward bound). Με το άνοιγμα της κυτταροπλασματικής πύλης απελευθερώνονται το υπόστρωμα και το ιόν στο κυτταρόπλασμα (inward open), δίνοντας ένα άδειο κυτταροπλασματικά στραμμένο διαμορφομερές (inward empty closed). Μέσω ισομερισμού το διαμορφομερές αυτό επιστρέφει στην

περιπλασμικά κλειστή στραμμένη κατάσταση (outward empty closed), ολοκληρώνοντας έτσι έναν κύκλο μεταφοράς.

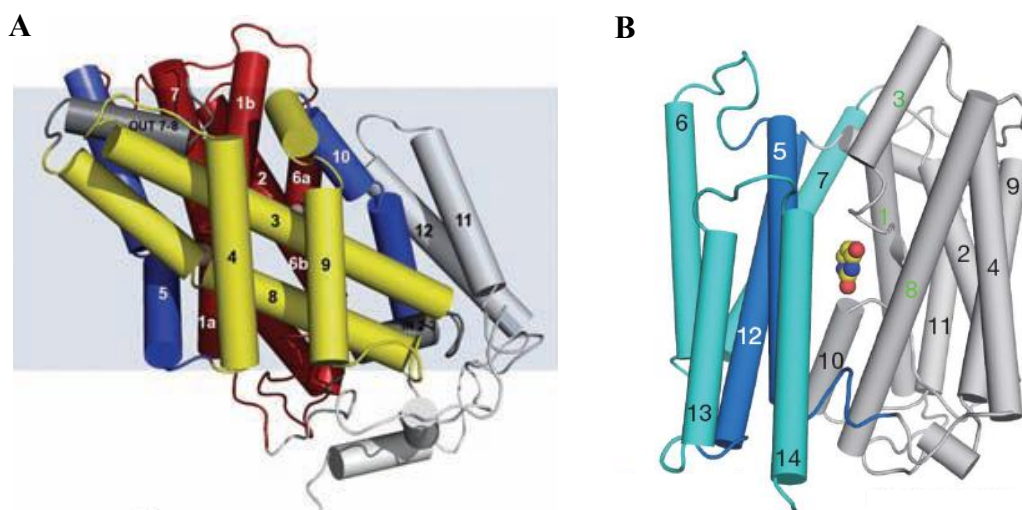


Εικόνα 1-8 Μηχανισμοί μεταφοράς υποστρωμάτων. Α. και Β. Σχηματική αναπαράσταση των μοντέλων rocker-switch και gated-pore αντίστοιχα (Focke *et al.*, 2013). Γ. Σύγχρονο μοντέλο εναλλασσόμενης πρόσβασης για τη συμεταφορά υποστρώματος (κόκκινη σφαίρα) και ιόντος (πράσινη σφαίρα), που συνδυάζει στοιχεία και από τα δύο μοντέλα (Boudker & Verdon, 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, η δομή των μεταφορέων μοιάζει με εκείνη των ενζύμων. Έτσι, και η κινητική τους υπακούει στις κλασσικές θεωρίες που περιγράφονται για τα ένζυμα από τους Michaelis-Menten και χαρακτηρίζεται από τρεις ιδιότητες: την εξειδίκευση προς το υπόστρωμα, τη συγγένεια προς το υπόστρωμα (K_m) και την ταχύτητα μεταφοράς (V). Με βάση αυτές τις θεωρίες, όταν όλες οι θέσεις δέσμησης υποστρώματος του μεταφορέα είναι κατειλημμένες τότε ο μεταφορέας έχει τη μέγιστη ταχύτητα μεταφοράς (V_{max}). Η σταθερά συγγένειας του μεταφορέα για την ουσία (K_m) ορίζεται ως ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος κατά την οποία η ταχύτητα μεταφοράς είναι το $V_{max}/2$ (Randall *et al.*, 2002).

Τέλος, στις μέρες μας, με προγράμματα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής και τις διαθέσιμες κρυσταλλογραφικά λυμένες δομές, φαίνεται πως η μεγάλη πλειοψηφία των μεταφορέων, αποτελείται από 10-14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας, που ενώνονται μεταξύ τους με σχετικά μικρά, υδρόφιλα, εξωκυτταρικά ή κυτοπλασματικά τμήματα (Shaikh *et al.*, 2013 – Εικ. 1-9). Η ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας των μεταφορέων είναι ανάλογη της εξειδίκευσής τους, ενώ αντίθετα οι ενεργειακές απαιτήσεις και τα κινητικά τους χαρακτηριστικά είναι

ανεξάρτητα από την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμά τους και αντανακλούν την εξελικτική προσαρμογή τους στο περιβάλλον στο οποίο λειτουργούν (Lluis *et al.*, 2013).



Εικόνα 1-9 Κρυσταλλογραφικά λυμένες δομές μεταφορέων. Α. Ο Mhp1 (NCS1 οικογένεια) με 12 TMSs (Shimamura *et al.*, 2010). Β. Ο UraA (NCS2 οικογένεια) με 14 TMSs (Lu *et al.*, 2011).

1.2.5 Η βιολογική σημασία των μεταφορέων στη λειτουργία και τη βιωσιμότητα του κυττάρου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σημαντική για το κύτταρο ικανότητα εκλεκτικής διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη μεταφορικών πρωτεϊνών σε αυτήν. Οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία ουσιών, συμβάλλοντας σε πολλές διαδικασίες. Σε μια προσπάθεια περιληπτικής αναφοράς των ρόλων των πρωτεϊνών αυτών, πρέπει σίγουρα να αναφερθεί πως οι μεταφορείς (Abramson *et al.*, 2003; de Koning & Diallinas, 2000; Koronakis *et al.*, 2000; Poncet & Taylor, 2013):

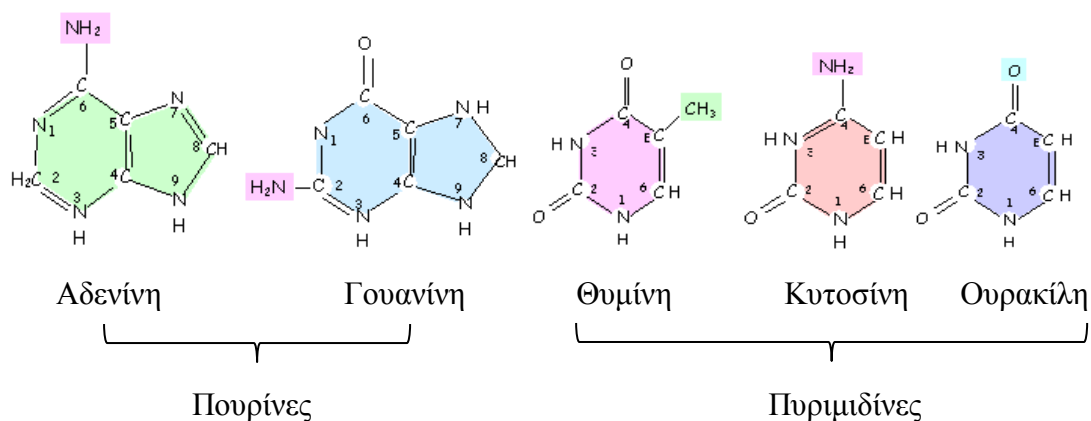
- Είναι οι διαμεσολαβητές της ελεγχόμενης διακυτταρικής επικοινωνίας ή της επικοινωνίας του κυττάρου με το περιβάλλον του.
- Συμμετέχουν ενεργά στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το περιβάλλον, από τους μονοκύτταρους οργανισμούς έως και τα ετερότροφα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών.
- Συμβάλλουν στην κατανομή των μεταβολιτών στα οργανίδια.
- Απεκκρίνουν ταχέως τοξικές ουσίες.
- Διατηρούν την πολικότητα της μεμβράνης (π.χ. Na^+/K^+ -ATPάσες).

- Συμβάλουν καθοριστικά στη νευρική και μυϊκή λειτουργία μέσω της ταχείας μεταφοράς νευροδιαβιβαστών και ασβεστίου στους νευρώνες και τα μυϊκά κύτταρα.
- Μεταφέροντας ορμόνες και άλλες ουσίες του ενδοκρινικού και παρακρινικού συστήματος, συμμετέχουν στην άμεση προσαρμογή και συνεργασία των διαφόρων οργάνων.
- Εξασφαλίζουν άμυνα και προστασία στους ιστούς με τη διανομή και ανακατανομή αντιβιοτικών και αντι-ιικών ουσιών, αλλά και αντιοξειδωτικών, όπως ουρικό ή ασκορβικό οξύ.
- Διάφορα συστήματα μεταφοράς νουκλεϊκών οξέων προάγουν την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ διαφορετικών οργανισμών με συνέπεια την προώθηση της διαφοροποίησης των ειδών).
- Αποτελούν ευκαιριακούς στόχους για την είσοδο ιών στο κύτταρο.
- Μπορούν να αποτελέσουν μόρια στόχους για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών, μέσω της αναστολής της θρέψης τους, ή της καλύτερης πρόσληψης τοξικών για αυτούς ουσιών.

1.2.6 Μεταφορείς πουρινών

Δύο πουρίνες και δύο πυριμιδίνες αποτελούν τον κορμό των πληροφοριακών μορίων της ζωής, του DNA και του RNA (Εικ. 1-10) . Συνεπώς, μια έλλειψη σε αυτές θα είχε καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Οι περισσότερες πουρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου σε πολλούς μικροοργανισμούς, αλλά και φυτά, μέσω ενός εκτεταμένου μεταβολικού μονοπατιού, το οποίο δεν υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς. Στο παραγόμενο ουρικό οξύ έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές ικανότητες, και κυκλοφορεί στο πλάσμα του ανθρώπινου αίματος λίγο κάτω από τη διαλυτότητά του (Faaland *et al.*, 1998; Tsukaguchi *et al.*, 1999; de Koning & Diallinas, 2000). Ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ως αντιμεταβολίτες και αντικαρκινικά. Ωστόσο, η πλασματική μεμβράνη αποτελεί ένα φυσικό φράγμα για τις περισσότερες από αυτές, και μπορούν να την διασχίσουν μόνο με τη βοήθεια των αντίστοιχων μεταφορέων τους. Τέτοιοι μεταφορείς έχουν βρεθεί στα Αρχαία, τα Βακτήρια, τους Μύκητες, τα Φυτά, τα Πρωτόζωα, τα Μετάζωα και στον Άνθρωπο. Ένας μικρός αριθμός τέτοιων μεταφορέων έχει χαρακτηριστεί τα τελευταία χρόνια, ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των ομολόγων τους παραμένουν

άγνωστης λειτουργικότητας και ενδείξεις για τη λειτουργία τους βασίζονται στην ομοιότητα που παρουσιάζουν με μόρια γνωστής λειτουργίας. Η μελέτη του τρόπου καθορισμού της εξειδίκευσης μεταφορέων-μοντέλων και η βελτίωση των οργανισμών-συστημάτων ετερόλογης έκφρασης θα βοηθήσουν καταλυτικά στο χαρακτηρισμό της λειτουργίας του μεγάλου όγκου αλληλουχιών που έχει προκύψει από τις αλληλουχίσεις γονιδιωμάτων.



Εικόνα 1-10 Οι πέντε νουκλεοτιδικές βάσεις των DNA και RNA. (<http://staff.um.edu.mt/acus1/3Molgen.htm>)

Με τα υπάρχοντα δεδομένα, οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ταξινομούνται σε έξι οικογένειες, και όλοι τους είναι δευτερογενούς ενεργότητας. Τα κριτήρια για την ταξινόμηση σε μία οικογένεια, είναι: 1) η ταυτότητα πάνω από 20%, 2) η ομοιότητα πάνω από 40%, 3) παρόμοιες ιδιότητες υδροφοβικότητας, με 10-14 TMS και 4) η ύπαρξη συντηρημένων αλληλουχιών που να βρίσκονται σε παρόμοιες τοπολογικά περιοχές. Η αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών, που έχει αποδειχθεί πως έχουν λειτουργική σημασία, σε μερικώς δημοσιευμένες ή μη πληρούσες τα ανωτέρω κριτήρια πρωτεΐνες, έχει βοηθήσει στην ταξινόμησή τους (Saier *et al.*, 2009).

1.2.6.1 Η οικογένεια NAT/NCS2

Η πρώτη και σημαντικότερη οικογένεια είναι αυτή των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού οξέος (Nucleobase Ascorbate Transporters, NAT/Nucleobase Cation Symporters 2, NCS2) και περιλαμβάνει μέλη από Αρχαία, Βακτήρια και Ευκαρυωτικά (για λεπτομέρειες βλ. §1.5.1).

1.2.6.2 Η οικογένεια που ορίζεται από τον AzgA

Μια δεύτερη, πρόσφατα χαρακτηρισμένη οικογένεια, αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα AzgA (μεταφορέας αδενίνης-υποξανθίνης-γουανίνης) του *A. nidulans* και συμπεριλαμβάνει μεταφορείς σε αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά, όπου η λειτουργία τους έχει συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες (Jain *et al.*, 2012). Η πρωτεΐνη AzgA (580 αμινοξέα, 12 προβλεπόμενα TMS) του *A. nidulans* είναι ένας υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας μεταφορέας αδενίνης, υποξανθίνης, γουανίνης, 8-αζαξανθίνης και 2,6-διαμινοπουρίνης, ο οποίος μεταφέρει επίσης πουρίνες και το τοξικό ανάλογο 8-αζαγουανίνη (Cecchetto *et al.* 2004, Goudela *et al.* 2006). Στην ίδια οικογένεια ανήκει και ο μεταφορέας υποξανθίνης-γουανίνης PbuG του *Bacillus subtilis* (Johansen *et al.* 2003). Στο εργαστήριό μας κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε κινητικά, με ετερόλογη έκφραση στον *A. nidulans*, ο ομόλογος μεταφορέας του *Aspergillus fumigatus*, AfAzgA (Goudela *et al.*, 2006), ο οποίος εμφανίζει παρόμοια κινητική και εξειδίκευση με τον AzgA. Πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν δύο ορθόλογα του AzgA της *Arabidopsis thaliana* ως μεταφορείς αδενίνης-γουανίνης (AtAzgA1 και AtAzgA2 - Mansfield *et al.*, 2009).

1.2.6.3 Η PRT ή NCS1 οικογένεια

Η τρίτη οικογένεια γνωστή ως **PRT (NCS1) (Purine Related Transporters, Nucleobase Cation Symporters 1)**, αντιπροσωπεύεται από μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών που απαντώνται στα Βακτήρια, τους Μύκητες και τα Αρχαία (Jund *et al.*, 1988; Weber *et al.*, 1990; Danielsen *et al.*, 1992; de Montigny *et al.*, 1998) (για λεπτομέρειες, βλ. §1.4.1).

1.2.6.4 Η ENT οικογένεια

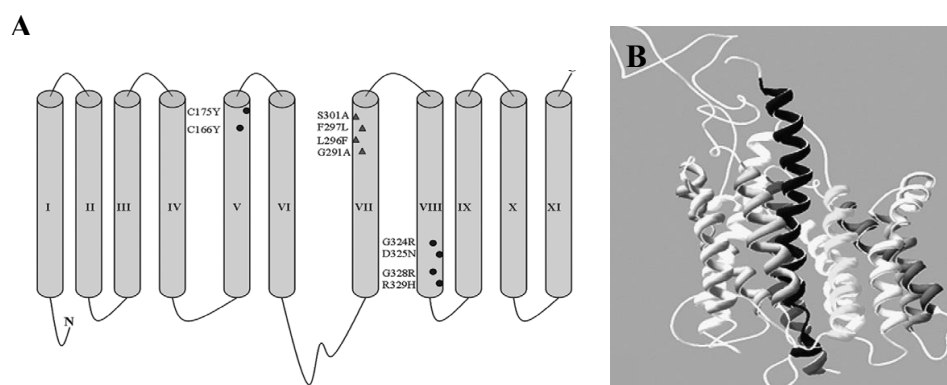
Η τέταρτη οικογένεια (**ENT, Equilibrative Nucleoside Transporters**) περιλαμβάνει μεταφορείς κυρίως νουκλεοσιδίων, αλλά και νουκλεοτιδικών βάσεων και απαντάται μόνο σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Hyde *et al.*, 2001). Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις μεταφορείς της οικογένειας (hENT 1, 2, 3 και 4), με τους hENT1 και hENT2 (50% ταυτότητα αλληλουχίας) να είναι καλά μελετημένοι, όπως και οι ομόλογοι τους στον αρουραίο (rENT1, rENT2). Πρόκειται για ευρείας εξειδίκευσης και κατανομής μεταφορείς πουρινικών/πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και αναλόγων τους. Οι hENT1 και rENT1 απαντώνται στην πλασματική μεμβράνη, στα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα (Lee *et al.*, 1994). Ο

hENT2 έχει περίπου 100-1000 μικρότερη συγγένεια για τα νουκλεοσιδία από τον hENT1 (Visser *et al.*, 2002), αλλά μεταφέρει και τις πουρίνες υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη, καθώς και τις πυριμιδίνες θυμίνη και ουρακίλη, ενώ αποτελεί τον πρώτο αναγνωρισμένο μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων σε θηλαστικά (Yao *et al.*, 2002). Πρόσφατα, η αναστολή της λειτουργίας του hENT1 συσχετίστηκε με προστασία του ήπατος σε ισχαιμικά επεισόδια και προτάθηκαν αναστολείς ENT για την πρόληψη ή την θεραπεία της ισχαιμικής βλάβης του ήπατος (Zimmerman *et al.*, 2013). Ο hENT3 είναι λυσοσωμικός pH-εξαρτώμενος μεταφορέας με ευρεία εξειδίκευση (Hyde *et al.*, 2001). Ο hENT4/PMAT είναι αρκετά διαφορετικός λειτουργικά από τα υπόλοιπα μέλη. Αρχικά περιγράφηκε ως μεταφορέας μονοάμινο/οργανικού (PMAT), ωστόσο παρουσιάζει κάποια δυνατότητα μεταφοράς της αδενοσίνης σε όξινο pH, και αναστέλλεται μόνο ασθενώς από τους κλασικούς αναστολείς των ENT (Barnes *et al.*, 2006).

Μέλη της οικογένειας, εκτός από τα θηλαστικά, διαθέτουν και τα πρωτόζωα καθώς επίσης και οι οργανισμοί *A. nidulans*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *C. elegans* και *D. melanogaster*. Έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά δύο εκ των πέντε ENT του *C. Elegans* μεταφορείς αδενοσίνης-ουριδίνης CeENT1 και CeEnt2 (Appleford *et al.*, 2004), οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων-πυριμιδινών ENT1 (Möhlmann *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2011) και ENT3 της *Arabidopsis thaliana* (Traub *et al.*, 2007; Cornelius *et al.*, 2012) και ο μεταφορέας Fun26p του *S. cerevisiae*, ο οποίος εντοπίζεται στα χυμοτόπια και μεταφέρει ουριδίνη, αδενοσίνη και κυτιδίνη (Vickers *et al.*, 2000).

Ιδιαίτερα μελετημένοι και χαρακτηρισμένοι είναι και οι ENT μεταφορείς των πρωτοζώων *Plasmodium falciparum* (PfNT1, μεταφορέας νουκλεοσιδίων/αναλόγων, αδενίνης, υποξανθίνης - Carter *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2000), *Toxoplasma gondii* (TgAT1 και TgAT2, μεταφορείς αδενοσίνης, ινoσίνης και άλλων πουρινικών και πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και αναλόγων τους - de Koning *et al.*, 2003), *Leishmania donovani* (LdNT1.1 και LdNT1.2 μεταφορείς αδενοσίνης και πυριμιδινών και LdNT2 μεταφορέας ινoσίνης και γουανοσίνης - Aronow *et al.*, 1987; Vasudevan *et al.*, 1998), *Leishmania major* (LmaNT3, υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης, υποξανθίνης, γουανίνης, αδενίνης, αλλοπουρινόλης και LmaNT4, χαμηλής συνάφειας μεταφορέας αδενίνης - Ortiz *et al.*, 2009a; Sanchez *et al.*, 2004) και *Trypanosoma brucei brucei* (TbNT2 μεταφορέας αδενοσίνης, ινoσίνης, γουανοσίνης και TbAT1 μεταφορέας αδενοσίνης και αδενίνης - Carter & Fairlamb,

1993; Mäser *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999). Επίσης χαρακτηρισμένος είναι ο TbNBT1 μεταφορέας του *T. brucei brucei*, ο πρώτος αναγνωρισμένος ENT μεταφορέας εξειδικευμένος μόνο για νουκλεοτιδικές βάσεις (υποξανθίνη, αδείνη, γουανίνη, ξανθίνη) και όχι για νουκλεοσίδια (Burchmore *et al.*, 2003; Henriques *et al.*, 2003), ο οποίος έχει επιπλέον μελετηθεί με τυχαία και κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και έχουν ταυτοποιηθεί περιοχές σημαντικές για τη λειτουργία και εξειδίκευσή του (Parageorgiou *et al.*, 2008a). Στο *T. brucei brucei* έχουν εντοπιστεί συνολικά 16 μέλη της οικογένειας ENT, εκ των οποίων τα περισσότερα είναι χαρακτηρισμένα (Al-Salabi *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2009b).



Εικόνα 1-11 Μοντέλο του μεταφορέα TbNBT1. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής του μεταφορέα. Το μοντέλο δημιουργήθηκε με τη μέθοδο TMPRED. Οι έλικες αναπαρίστανται με γκρι κυλίνδρους και τα TMS αριθμούνται από I-IX. **B.** Προβλεπόμενη τριτοταγής δομή του μεταφορέα βάσει της δομής του LacY. Τα TMS απεικονίζονται ως κορδέλες. (Parageorgiou *et al.*, 2008a)

Μεταφορείς ENT μοιράζονται μια προτεινόμενη τοπολογία που αποτελείται από 11 διαμεμβρανικές περιοχές, με ένα κυτταροπλασματικό αμινοτελικό άκρο και ένα περιπλασματικό καρβοξυτελικό (Sundaram *et al.*, 2001). Μελέτες των διαφόρων ENT του ανθρώπου και του αρουραίου δείχνουν ότι η περιοχή μεταξύ διαμεμβρανικών περιοχών 3 και 6 περιέχει κατάλοιπα υπεύθυνα τόσο για την ευαισθησία και την αντίσταση σε τοξικά ανάλογα και στεφανιαία αγγειοδιασταλτικά (Sundaram *et al.*, 2001; Sundaram *et al.*, 1998). Σχετικά με την εκλεκτικότητα του υποστρώματος, οι διαμεμβρανικές περιοχές 1 και 6 στον hENT2 συμβάλλουν στην ικανότητά του να μεταφέρει δεοξυ-νουκλεοσίδια, ενώ οι διαμεμβρανικές περιοχές 5 και 6 εμπλέκονται στην αναγνώριση της νουκλεοτιδικής βάσης (Yao *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2001). Ο TbNBT1 μεταφορέας του *T. brucei brucei* προβλέπεται επίσης να αποτελείται από 11 TMS, με κυτταροπλασματικό αμινοτελικό άκρο, όμως. Οι διαδοχικές α -έλικες συνδέονται μεταξύ τους με κοντούς βρόχους, εκτός από αυτούς

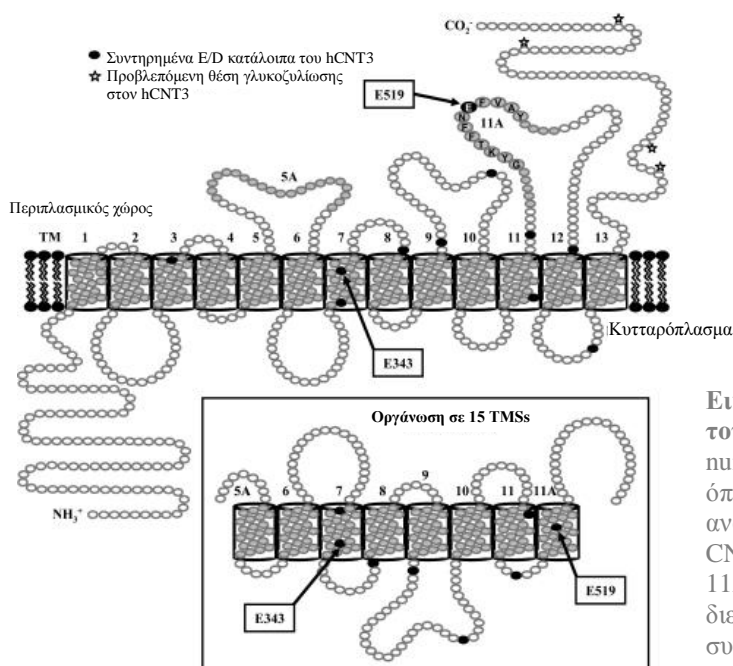
μεταξύ των TMS 1-2 και TMS 6-7, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα επιμηκυνσμένοι (Εικ. 1-11 – Parageorgiou *et al.*, 2008a).

1.2.6.5 Η CNT οικογένεια

Η οικογένεια συγκεντρωτικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων CNT (Concentrative Nucleoside Transporter) περιέχει μέλη σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και μύκητες, όπου είναι συµμεταφορείς H^+ , και σε θηλαστικά, όπου είναι συµμεταφορείς Na^+ , αλλά όχι σε πρωτόζωα (Podgorska *et al.*, 2005). Αποτελούνται από περίπου 400 αμινοξέα (βακτήρια) ή από 600-700 αμινοξέα (ευκαρυωτικά) διευθετημένα σε 10-14 διαµεμβρανικά τμήματα α-έλικας (TMSs). Ο χαρακτηρισμένος μεταφορέας rCNT1 του ποντικού προβλέπεται να αποτελείται από 13 TMSs, με το αμινοτελικό άκρο να βρίσκεται προς το κυτταρόπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό προς το περίπλασμα (Hamilton *et al.*, 2001). Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί τρεις διαφορετικής εξειδίκευσης μεταφορείς της οικογένειας, οι hCNT1, hCNT2 και hCNT3. Ο hCNT1 μεταφέρει νουκλεοσίδια πυριμιδινών και αδενοσίνη, ο hCNT2 μεταφέρει αποκλειστικά νουκλεοσίδια πουρινών και ο hCNT3 είναι ευρείας εξειδίκευσης και μεταφέρει τόσο πουρινικά όσο και πυριμιδινικά νουκλεοσίδια (Molina-Arcas *et al.*, 2009). Για τον hCNT2 το ενεργό κέντρο φαίνεται να αποτελείται από τα TMS 7-8, ενώ ο hCNT3 προβλέπεται να αποτελείται από 13 ή 15 TMS (Εικ. 1-12 – Slugoski *et al.*, 2009).

Στον μύκητα *C. albicans* ο ομόλογος μεταφορέας ονομάζεται CaCNT και πιθανολογείται ότι έχει την ίδια τοπολογία με τον μεταφορέα rCNT1 του ποντικού (Hamilton *et al.*, 2001; Loewen *et al.*, 2003). Οι NupC, NupG και XapB της *E. coli* μεταφέρουν μόνο ξανθίνη (Loewen *et al.*, 2004). Οι τρεις μεταφορείς του *B. subtilis* πιστεύεται πως έχουν διακριτές ικανότητες, ο πρώτος μεταφέρει νουκλεοσίδια υποξανθίνης και γουανίνης, ο δεύτερος νουκλεοσίδια αδενίνης και ο τρίτος νουκλεοσίδια πυριμιδινών (κυτιδίνη, ουριδίνη και τα αντίστοιχα δεοξυριβονουκλεοσίδια). Τα πρώτα τρία TMSs του CNT1 των θηλαστικών δεν είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του και μάλιστα απουσιάζουν από τα βακτηριακά ομόλογα (Hamilton *et al.*, 2001). Το μοναδικό μέλος της οικογένειας στον *A. nidulans*, ο CntA, αποτελεί έναν ευρείας εξειδίκευσης, υψηλής συγγένειας μεταφορέα νουκλεοσιδίων, όπως ουριδίνη, κυτιδίνη, ινοσίνη, θυμιδίνη, αδενοσίνη και γουανοσίνη (Hamari *et al.*, 2009). Επίσης αποτελεί το μοναδικό μεταφορέα του τοξικού ανάλογου 5-φθόρο-ουριδίνη στον μύκητα. Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι η

λειτουργία τέτοιων πρωτεϊνών συσχετίζεται στον άνθρωπο με περιπτώσεις χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Pastor-Anglada *et al.*, 2004).



Εικόνα 1-12 Προβλεπόμενο μοντέλο του hCNT3 (GenBankTM accession number: AF305210) με 13 ± 2 TMS, όπως προβλέπεται με βιοπληροφορική ανάλυση των μελών της οικογένειας CNT. Με εισδοχή των TMS 5A και 11A στη μεμβράνη και αντίθετες διευθετήσεις των TMS 6–11 συντελούν σε μοντέλο με 15 TMS (πλαίσιο). (Slugoski *et al.*, 2009)

1.2.6.6 Η οικογένεια PUP

Η οικογένεια PUP περιλαμβάνει μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών που απαντώνται αποκλειστικά σε φυτά. Δομικά οι μεταφορείς της οικογένειας προβλέπεται να αποτελούνται από 9-10 TMSs. Ο πρώτος μεταφορέας της οικογένειας που χαρακτηρίστηκε ήταν ο AtPUP1 στο φλοιώμα και τους γυρεόκοκκους της *A. thaliana*, ο οποίος αναγνωρίζει και μεταφέρει με υψηλή συγγένεια αδενίνη και κυτοσίνη, πιθανώς με συμμεταφορά πρωτονίου (Gillissen *et al.*, 2000). Άλλες πουρίνες όπως η υποξανθίνη, καθώς και φυτορμόνες (ζεατίνη, κυτοκίνη) και αλκαλοειδή (καφεΐνη) αποτελούν συναγωνιστικούς αναστολείς της πρόσληψης αδενίνης και πιθανώς συνιστούν υποστρώματα του μεταφορέα (Williams & Miller, 2001). Στον ίδιο οργανισμό έχουν βρεθεί 15 παράλογα γονίδια (28-54% ταυτότητα σε συγκρίσεις ανά δύο), ενώ μη χαρακτηρισμένοι μεταφορείς φαίνεται να υπάρχουν σε πολλά φυτά (Gillissen *et al.*, 2000; Burkle *et al.*, 2003).

1.2.6.7 Η οικογένεια UPS

Η οικογένεια UPS (Ureide Permeases) ή NBUT (Nucleobase Uptake Transporter) της οποία μέλη προέρχονται επίσης κυρίως από φυτά, περιλαμβάνει μεταφορείς πουρινών, ουρεϊδών, κυτοκινών και αναλόγων τους. Χαρακτηρισμένα

μέλη της οικογένειας αποτελούν οι μεταφορείς AtUPS1 και 2 του *A. thaliana* και ο μεταφορέας αλλαντοΐνης του *Phaseolus vulgaris*, οι οποίοι μεταφέρουν αλλαντοΐνη, ουρακίλη και φθορο-ουρακίλη (Desimone *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2004), ενώ ο AtUPS1 μεταφέρει επίσης ουρικό οξύ και ξανθίνη (Desimone *et al.*, 2002). Η UPS οικογένεια συμπεριλαμβάνει πέντε παράλογα της *A. thaliana*, τα οποία παρουσιάζουν ταυτότητα στην αμινοξική τους ακολουθία 64-82%, ενώ όμοιες αλληλουχίες έχουν εντοπιστεί σε αρκετά άλλα φυτά. Μακρινά ομόλογα συναντώνται στα *Bacteroides thetaiotamicron* και *Entamoeba histolytica*. Ο AtUPS1 μεταφορέας πιθανώς αποτελείται από δέκα διαμεμβρανικά τμήματα με μία μακριά κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή, είναι συμμεταφορέας πρωτονίων και η έκφρασή του ρυθμίζεται από πηγές αζώτου (Desimone *et al.*, 2002).

1.3 Σύγχρονες τάσεις στη μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας διαμεμβρανικών μεταφορέων

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων (Oberai *et al.*, 2006). Πολλές ανθρώπινες ασθένειες έχουν συνδεθεί με δυσλειτουργία ή τροποποιημένη λειτουργία μεμβρανικών μεταφορέων, όπως η κυστική ίνωση και η αδρενολευκοδυστροφία (MacGurn *et al.*, 2012; Geillon *et al.*, 2012). Εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών, δεν είναι δυνατή η κρυστάλλωση και απόδοση της τρισδιάστατης δομής όλων των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, μια πρώτη ιδέα για την αναδίπλωση των διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης θα μπορούσε να ληφθεί μέσω μοντέλων ομολογίας, εάν υπάρχει διαθέσιμη μια αντιπροσωπευτική κρυσταλλογραφική δομή. Τα τελευταία χρόνια έχει κρυσταλλωθεί ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών μεταφοράς, και μέσω αυτών έχουν δημιουργηθεί μοντέλα ομολογίας συγγενικών πρωτεϊνών. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι μεταφορείς δευτερογενούς ενεργότητας (Boudker & Verdon, 2010). Οι μεταφορείς δευτερογενούς ενεργότητας διακρίνονται σε διάφορες οικογένειες με βάση την πρωτοταγή τους αλληλουχία και τη λειτουργία τους. Όμως, πολλές από αυτές τις οικογένειες εμφανίζουν δομικές ομοιότητες, υποδηλώνοντας ότι περιορισμένες δομικές αναδιπλώσεις έχουν εξελιχθεί σε μεταφορείς με διαφορετική λειτουργία (Oberai *et al.*, 2006). Η πλειοψηφία των γνωστών δομών εμπίπτουν σε τρεις κοινές αναδιπλώσεις που αντιπροσωπεύονται από την περμεάση της λακτόζης LacY, τον

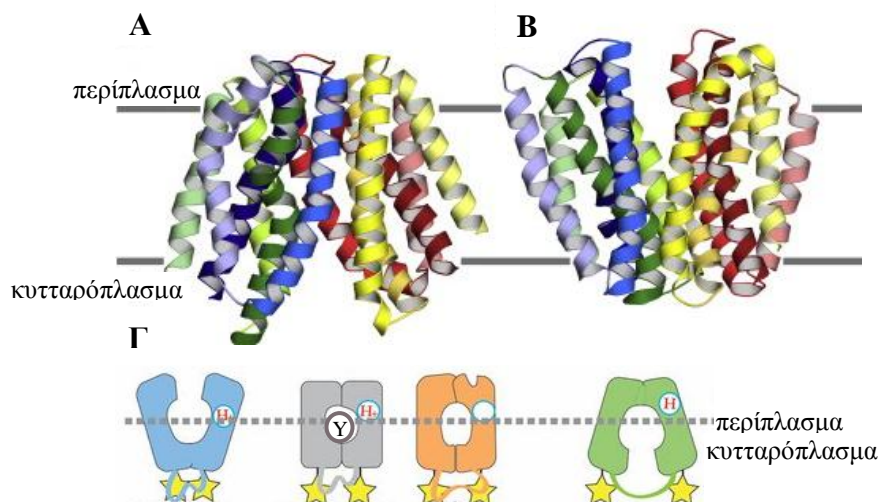
συμμεταφορέα λευκίνης- Na^+ LeuT (Boudker & Verdon, 2010), και το συμμεταφορέα ουρακίλης/ H^+ UraA (Lu *et al.*, 2011).

Καθώς η κρυσταλλογραφία αποδίδει ένα στατικό, μόνο, στιγμιότυπο δυναμικών πρωτεϊνικών δομών έξω από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία αποτελεί τη φυσική τους τοπολογία, απαιτούνται ταυτόχρονα και άλλες βιολογικές προσεγγίσεις (Kaback *et al.*, 2011). Προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι παράγοντες που καθορίζουν την εκλεκτικότητα του υποστρώματος σε δομές με χαμηλή πρωτοταγή ομολογία, αλλά υψηλή δομική ομοιότητα είναι επιτακτική η συνδυαστική χρήση δεδομένων κρυσταλλογραφίας καθώς και συστηματικής μεταλλαξιγένεσης. Η τελευταία αυτή βιολογική προσέγγιση σε συνδυασμό με την κατασκευή μοντέλου ομολογίας μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική και αξιόπιστη προσέγγιση στη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μεταφορέων δευτερογενούς ενεργότητας (Frillingos, 2012).

1.3.1 Δομή και μηχανισμός μεταφοράς της 6+6 διαμόρφωσης μεταφορέων – Το παράδειγμα του LacY

Η οικογένεια μεταφορέων MFS (Major Facilitator Superfamily) αποτελεί τη μεγαλύτερη γνωστή οικογένεια μεταφορέων δευτερογενούς ενεργότητας. Είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ιόντων σε συνδυασμό με ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, από μονοαμίνες μέχρι σάκχαρα και πεπτίδια (Saier *et al.*, 1999). Η περμεάση της λακτόζης (LacY), ένας συμμεταφορέας σακχάρου/ H^+ , αποτελεί το μέλος-πρότυπο των αυτών μεταφορέων, οι οποίοι συνήθως σχηματίζουν 12 TMSs, αν και ορισμένα μέλη έχουν 14 έλικες. Μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων X που επέλυσαν τη δομή της LacY (Abramson *et al.*, 2003) και ενός άλλου μεταφορέα των MFS, τον GLPT (Huang *et al.*, 2003), έδειξαν ότι οι 12 έλικες διατάσσονται σε δύο περιοχές των έξι ελίκων η καθεμιά (Εικ. 1-13), οι οποίες εμφανίζουν ψευδο-συμμετρία με έναν άξονα να διατρέχει κάθετα τη μεμβράνη μεταξύ των δύο μισών. Η εξελικτική σχέση που προτείνεται από την δομική ομοιότητα των δύο περιοχών είναι συνεπής με την παρουσία εξελικτικά συντηρημένων μοτίβων αλληλουχίας μεταξύ των ελίκων 2 και 3 στην N-τερματική περιοχή και στις συμμετρικές τους έλικες 8 και 9 στην C-τερματική περιοχή (Saier *et al.*, 1999). Ανάλυση των κρυσταλλικών δομών της LacY αποκάλυψε ότι οι δύο περιοχές σχηματίζουν μια κοιλότητα που είναι ανοιχτή προς το κυτταρόπλασμα, με μία θέση πρόσδεσης κατά προσέγγιση στο κέντρο της μεμβράνης (Abramson *et al.*, 2003). Οι σημαντικές πλευρικές αλυσίδες για την αναγνώριση του

σακχάρου είναι κυρίως στην N-τερματική περιοχή (Mirza *et al.*, 2006). Κατάλοιπα που απαιτούνται για την μετατόπιση των πρωτονίων είναι επίσης περίπου στη μέση της μεμβράνης, αν και τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται κυρίως στην C-τερματική περιοχή (Smirnova *et al.*, 2009).



Εικόνα 1-13 Δομή και μηχανισμός μεταφοράς του LacY. **A** και **B**. Διαμορφώσεις του LacY με τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος εκτεθειμένη στο κυτταρόπλασμα (κρυσταλλογραφία – **A**) ή στον περιπλασμικό χώρο (μοντέλο – **B**)(Radestock & Forrest, 2011). **Γ**. Προτεινόμενος μηχανισμός κύκλου μεταφοράς στον LacY, όπου η περιπλαστικά στραμμένη διαμόρφωση (γαλάζια) μεταβαίνει στην κυτταροπλασματική (πράσινη) με ενδιάμεσες διαμορφώσεις την κλειστή πρωτονιωμένη με υπόστρωμα (γκρι, Y: υπόστρωμα) και την κλειστή μη-πρωτονιωμένη με υπόστρωμα (Madej *et al.*, 2012).

Τα πειραματικά δεδομένα συγκλίνουν στο γεγονός ότι ο LacY υφίσταται μεγάλη αλλαγή στη διαμόρφωσή του προκειμένου να εκθέσει το υπόστρωμα στην άλλη πλευρά της μεμβράνης, σύμφωνα με τον μηχανισμό εναλλασσόμενης πρόσβασης (βλ. §1.2.3.2). Κατά τη διάρκεια αυτής της αλλαγής τα δύο μισά κινούνται ανεξάρτητα και αντίθετα το ένα από το άλλο, συντελώντας στη μετάβαση του υποστρώματος απευθείας από την περιπλασμική περιοχή στο κυτταρόπλασμα (rocker-switch mechanism – βλ. §1.2.3.2) . Το πιο πρόσφατο μοντέλο του μηχανισμού μεταφοράς περιλαμβάνει και ενδιάμεσες διαμορφώσεις του μεταφορέα (Madej *et al.*, 2012).

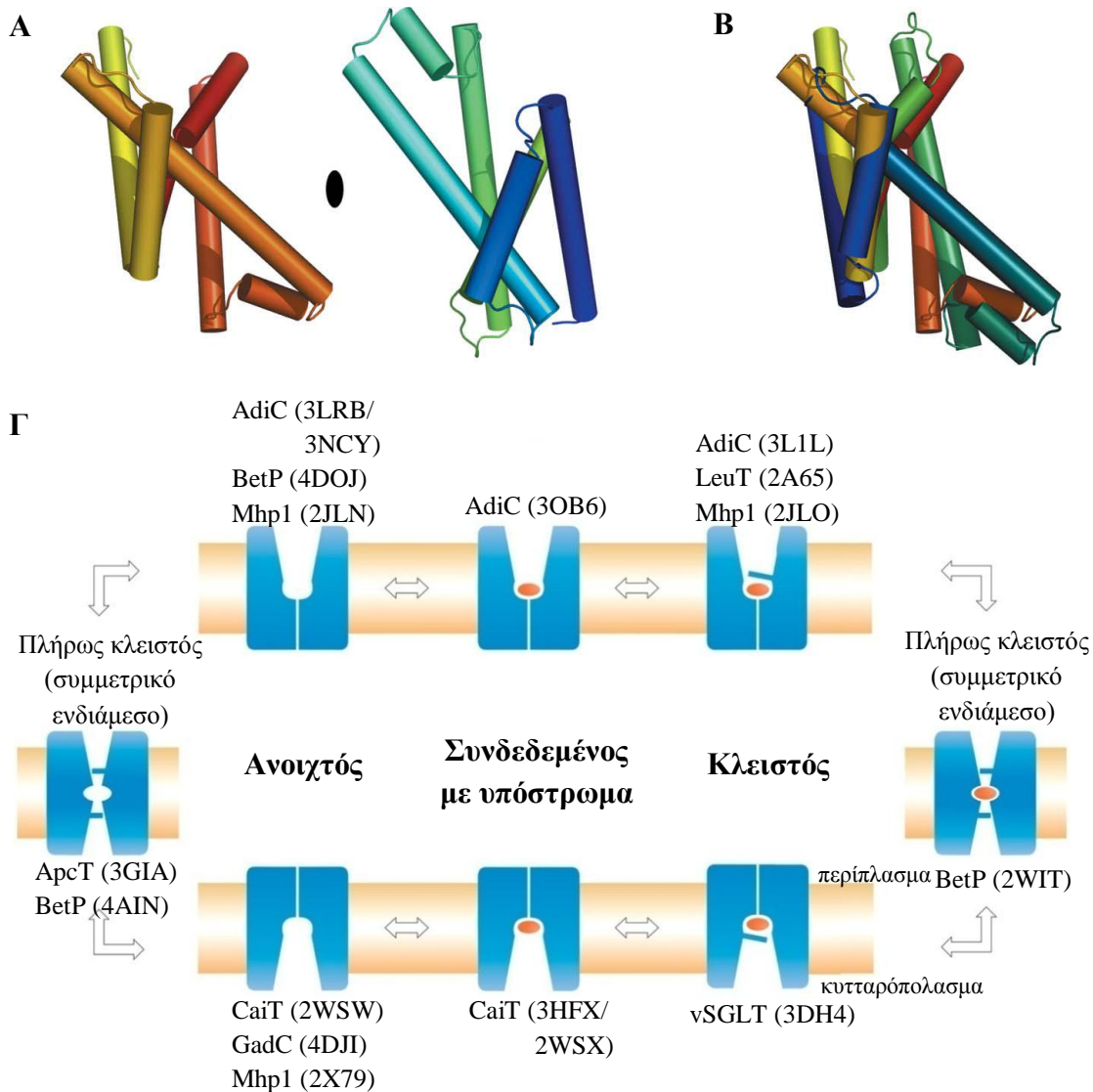
1.3.2 Δομή και μηχανισμός μεταφοράς της 5+5 διαμόρφωσης μεταφορέων – Το παράδειγμα του LeuT

Ο δεύτερος τύπος αναδίπλωσης αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα LeuT της οικογένειας συμμεταφορέων νευροδιαβιβαστών/Na⁺ (neurotransmitter-sodium-symport – NSS), αλλά τώρα έχει παρατηρηθεί και σε μια σειρά άλλων δομών που δημοσιεύτηκαν τα τελευταία χρόνια. Αυτές οι δομές εντοπίζονται σε πολλούς μεταφορείς δευτερογενούς ενεργότητας από διαφορετικές οικογένειες στους οποίους,

λόγω της χαμηλής τους ομοιότητας ως προς την πρωτοταγή αλληλουχία, δεν ήταν αναμενόμενο να έχουν μια παρόμοια αναδίπλωση.

Εκτός από τον LeuT, παρόμοιες δομές εμφανίζουν ο συμμεταφορέας γαλακτόζης/ Na^+ vSGLT (Faham *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010) της οικογένειας συμμεταφορέων διαλυτών ουσιών/ Na^+ (sodium-solute symporter – SSS), ο συμμεταφορέας βεταΐνης/ Na^+ BetP (Ressl *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2012) της οικογένειας μεταφορέων βεταΐνης/χολίνης/καρνιτίνης (betaine/choline/ carnitine transporter – BCCT), ο αντιμεταφορέας L-καρνιτίνης/ γ -βουτυροβεταΐνης CaiT (Tang *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2010) από την ίδια οικογένεια, και τρία μέλη της οικογένειας μεταφορέων αμινοξέων/πολυαμίνης/οργανικών – κατιόντων (aminoacid/polyamine/organocation – APC), ο αντιμεταφορέας αργινίνης/αγματίνης AdiC (Fang *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010; Kowalczyk *et al.*, 2011), ο γενικός μεταφορέας αμινοξέων/ H^+ ApcT (Shaffer *et al.*, 2009), ο αντιμεταφορέας γλουταμικού/GABA GadC (Ma *et al.*, 2012) και ο μεταφορέας υδαντοΐνης Mhp1 (Weyand *et al.*, 2008; Shimamura *et al.*, 2010) της οικογένειας συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/ H^+ -1 (nucleobase cation symport-1 – NCS1) (Εικ. 1-13A). Η αναδίπλωση αυτή έχει περιγραφεί ως μια ανεστραμμένη επανάληψη πέντε ελίκων στην οποία οι πέντε ΔE του αμινοτελικού άκρου είναι τοπολογικά ισοδύναμες με τις επόμενες πέντε και συσχετίζονται μεταξύ τους με ένα δισδιάστατο ψευδο-άξονα που διατρέχει το κέντρο του μεμβράνης (Abramson & Wright, 2009) (Εικ. 1-13B). Τα δύο μισά της πρωτεΐνης είναι πλήρως αλληλένδετα καθώς αμφότερα συμβάλλουν στη διαμόρφωση της θέσης δέσμευσης του υποστρώματος, η οποία βρίσκεται “θαμμένη” στη μεμβράνη, περίπου στο κέντρο του κάθε μεταφορέα.

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και ένας τρίτος τύπος διαμόρφωσης που προς το παρόν αντιπροσωπεύεται από μία μόνο δομή, αυτή του μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E. coli*, η οποία αναλύεται παρακάτω (βλ. §1.5.2.1).



Εικόνα 1-14 Δομή κέντρο δέσμησης και μηχανισμός μεταφοράς των μεταφορέων με 5+5 διαμόρφωση. **A.** και **B.** Η ανεστραμμένη επανάληψη του Mhp1 (Weyand *et al.*, 2011). **A.** Οι N-και C-τερματικές επαναλαμβανόμενες μονάδες απεικονίζονται με τον ίδιο προσανατολισμό, αλλά έχουν διαχωριστεί για έμφαση. Η θέση του δισδιάστατου ψευδο-άξονα υποδηλώνεται σε σχήμα οβάλ. **B.** Η C-τερματική επανάληψη έχει περιστραφεί γύρω από τον δισδιάστατο ψευδο-άξονα του **A.**

Γ. Συμμετρικές διαμορφώσεις κατά μήκος του εναλλακτικού μηχανισμού πρόσβασης των μεταφορέων με την αναδίπλωση των 5+5 ανεστραμμένων επαναλήψεων. Με την πρόσδεση του υποστρώματος (κόκκινο ελλειψοειδές) στην ανοιχτή προς τα έξω αρο διαμόρφωση, η συνδεδεμένη με το υπόστρωμα διαμόρφωση (AdiC) εξελίσσεται σε μια κλειστή, όπου δύο πύλες (παχιά και λεπτή) αποτρέπουν τη διάχυση του υποστρώματος προς οποιαδήποτε πλευρά της μεμβράνης. Η σύγκλειση του υποστρώματος από μια λεπτή πύλη είναι ένας συνηθισμένος μηχανισμός στον κύκλο μεταφοράς αυτών των μεταφορέων, παρά τη συμμετοχή διαφορετικών μοριακών γεγονότων, όπως περιγράφεται για τους LeuT, vSGLT, Mhp1, BetP, και AdiC. Οι προς τα έξω-μορφές σχετίζονται συμμετρικά με τις αντίστοιχες προς τα έξω. Μετάβαση στις προς τα έξω μορφές απαιτεί ένα παροδικό πλήρως κλειστό συμμετρικό ενδιάμεσο. Σε συνεζευγμένους με ιόντα συμμεταφορείς (LeuT, vSGLT, Mhp1, ArcT, και BetP) μια ελεύθερη μετάβαση μεταξύ των ανοιχτών δομών (προς τα έξω και προς τα έξω) απαιτείται για να κλείσει τον κύκλο μεταφοράς. Η κλειστή αρο δομή του ArcT (20) προσεγγίζει αυτήν τη μορφή. Στους αντιμεταφορείς (AdiC, CaiT και GadC), η επιστροφή στην προς τα έξω κατάσταση απαιτεί τη δέσμηση και τη μετατόπιση ενός νέου ενδοκυτταρικού υποστρώματος που θα κινηθεί τον μεταφορέα αντίθετα μέσω όλων των μορφών, αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Οι κωδικοί πρόσβασης της Protein Data Bank αναφέρονται στις παρενθέσεις. (Τροποποιημένο από Kowalczyk *et al.*, 2011)

1.4 Μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας στην οικογένεια NCS1/PRT

1.4.1 Η NCS1/PRT οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/H⁺

Τα μέλη της οικογένειας NCS1/PRT (Nucleobase Cation Symporter 1/ Purine Related Transporters) αποτελούνται από 419-635 αμινοξέα, και οι μέχρι πρότινος προβλέψεις δευτεροταγούς δομής ανέφεραν 9-12 πιθανά διαμεμβρανικά τμήματα (transmembrane segments – TMSs), με το αμινο- και το καρβοξυτελικό άκρο να διευθετούνται προς το κυτταρόπλασμα. Ορισμένοι από τους μεταφορείς αυτής της οικογένειας έχει δειχθεί ότι είναι συμμεταφορείς υποστρώματος/H⁺. Η οικογένεια NCS1/PRT περιορίζεται σε προκαρυωτικά, μύκητες και φυτά (de Koning & Diallinas, 2000). Περιλαμβάνει μεταφορείς πουρινών, ουρακίλης, κυτοσίνης, ουριδίνης, αλλαντοΐνης, πυριδοξίνης και θειαμίνης (<http://www.tcdb.org/>). Με βάση το γεγονός ότι ορισμένα βακτηριακά μέλη της οικογένειας NAT/NCS2 (Nucleobase – Ascorbate Transporters/Nucleobase Cation Symporter 2), όπως για παράδειγμα ο μεταφορέας ξανθίνης PbuX του *B. Subtilis*, έχουν ομοιότητες με μέλη της NCS1/PRT, έχει προταθεί ότι οι δύο αυτές οικογένειες μπορεί να έχουν μακρινή εξελικτική συγγένεια (<http://www.tcdb.org/>) (de Koning & Diallinas, 2000).

Μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών της οικογένειας NCS1/PRT είχαν χαρακτηριστεί για πρώτη φορά πριν από περισσότερα από 20 χρόνια στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Οι μεταφορείς αυτοί μπορούν να χωριστούν σε δύο υποοικογένειες τις Fcy-like και τις Fur-like (de Koning & Diallinas, 2000). Από αυτούς, ο μεταφορέας αδενίνης/γουανίνης/ υποξανθίνης/κυτοσίνης Fcy2p (Weber *et al.*, 1990) και ο μεταφορέας ουρακίλης Fur4p (Jund *et al.*, 1988) έχουν αποτελέσει πρότυπα για τη μελέτη της μεταφορικής λειτουργίας και της κυτταρικής ρύθμισης. Η αμινοξική ταυτότητα μεταξύ των Fcy2p και Fur4p είναι χαμηλή (19% ταυτότητα) αλλά απαντώνται κοινά μοτίβα (de Koning & Diallinas, 2000). Άλλα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας αποτελούν ο μεταφορέας κυτοσίνης CodB της *E. coli* (Danielsen *et al.*, 1992) και ο μεταφορέας αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης-κυτοσίνης της *C. albicans* (Fcy21) (Goudela *et al.*, 2006). Ομόλογοι μεταφορείς του Fcy2p έχουν αναφερθεί και στον παθογόνο μύκητα *C. lusitaniae* (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005), ενώ η *Candida glabrata* διαθέτει ένα σύστημα μεταφοράς αδενίνης-γουανίνης (K_m 0,6–5,7 μ M), ένα διαφορετικό σύστημα μεταφοράς κυτοσίνης (K_m 4.0 μ M) και δεν διαθέτει σύστημα μεταφοράς υποξανθίνης (Gupta *et al.*, 1995). Άγνωστης λειτουργίας πρωτεΐνες με παρόμοιες αλληλουχίες έχουν αναφερθεί σε είδη *Aspergillus*, *Neurospora*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Pyrococcus* και

Aeropyrum. Μερικές ομόλογες πρωτεΐνες με τις Fcy2p και Fur4p άγνωστης λειτουργίας υπάρχουν σε όλους τους άλλους ζυμομύκητες (Pantazopoulou & Diallinas, 2007).

Στον *A. nidulans* υπάρχουν 12 μέλη της οικογένειας NCS1/PRT εκ των οποίων επτά ομαδοποιούνται στις Fur-like πρωτεΐνες και πέντε στις Fcy-like πρωτεΐνες. Από τις Fur-like πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί οι μεταφορείς FurA, πρόκειται για τον κύριο, αλλά όχι τον μοναδικό, μεταφορέα αλλαντοΐνης (Hamari *et al.*, 2009; Αδημοσίευτα αποτελέσματα εργαστηρίου Διαλλινά) και FurD, ένας μεταφορέας εξαιρετικά υψηλής συγγένειας για ουρακίλη (K_m 450 nM) (Amillis *et al.*, 2007). Από τις Fcy-like πρωτεΐνες έχει χαρακτηριστεί ο FcyB, ένας υψηλής συγγένειας και χαμηλής μεταφορικής ικανότητας συμμεταφορέας υποξανθίνης – αδενίνης – κυτοσίνης – γουανίνης/ H^+ (Vlanti & Diallinas, 2008). Ο φυσιολογικός του ρόλος φαίνεται να είναι η πρόσληψη κυτοσίνης και η μικρή, αλλά συνεχής τροφοδότηση του κυττάρου με τις υπόλοιπες πουρίνες ως εναλλακτική πηγή πρόσληψής τους, δευτερεύουσα του AzgA. Την τελευταία πενταετία έγινε γνωστή η πρώτη τρισδιάστατη δομή μεταφορέα της NCS1 οικογένειας με την απόκτηση κρυστάλλου του μεταφορέα βενζυλο-υδαντοΐνης Mhp1 από το *Microbacterium liquefaciens* (Weyand *et al.*, 2008).

1.4.2 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα από τον μεταφορέα Mhp1

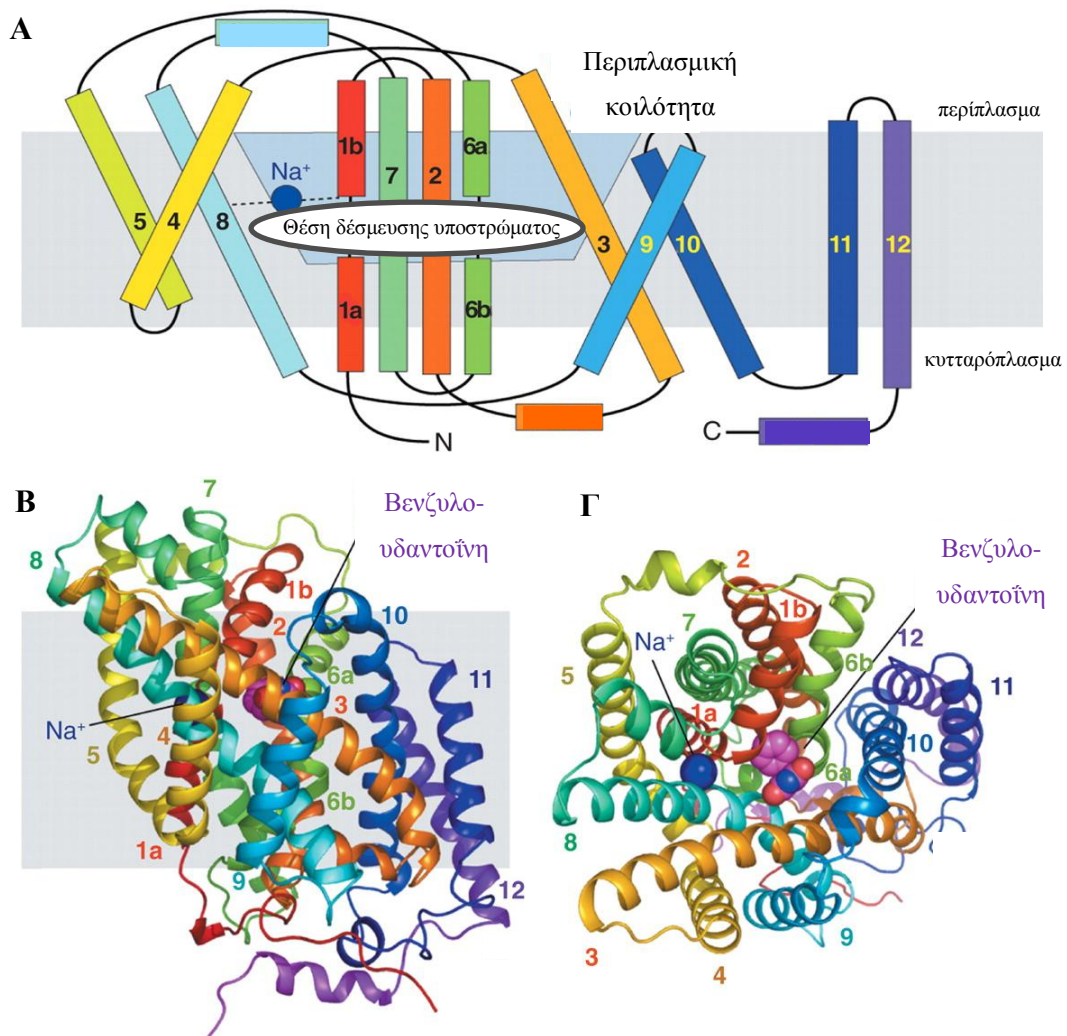
Ο Mhp1 από το *Microbacterium liquefaciens* είναι μέλος της οικογένειας συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/ H^+ NCS1/PRT (Suzuki & Henderson, 2006). Ο ίδιος ο Mhp1 ανακαλύφθηκε επειδή ανήκει σε ένα σύμπλεγμα γονιδίων που περιλαμβάνουν μία υδαντοΐνάση και μία καρβαμοϋλάση που μετατρέπουν τις 5-υποκατεστημένες 1-υδαντοΐνες σε 1-αμινοξέα (Suzuki & Henderson, 2006). Διαπιστώθηκε ότι ο Mhp1 καταλύει την μεταφορά 5-ινδολυλ-μεθυλ- ή 5-βενζυλο-υδαντοΐνης στα βακτήρια, όπου μπορούν να μετατραπούν σε τρυπτοφάνη ή φαινυλαλανίνη από τα άλλα ένζυμα της συστοιχίας γονιδίων (gene cluster) (Weyand *et al.*, 2008).

1.4.2.1 Δομή του Mhp1

Η δομή του Mhp1 λύθηκε αρχικά με ανάλυση 2,85 Å σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις: την περιπλασμική ανοιχτή διαμόρφωση (outward-facing open) και την περιπλασμική δεσμευμένη με το υπόστρωμα κλειστή διαμόρφωση (outward-facing

occluded) (Weyand *et al.*, 2008). Αποτελείται από 12 TMSs τα οποία είναι διευθετημένα σε δύο επαναλαμβανόμενες μονάδες (TMSs 1-5, αμινοξέα 20-190 και TMSs 6-10, αμινοξέα 204-388) ενωμένες με μια θηλειά 29 αμινοξέων και ακολουθούμενες από δύο ακόμα διαμεμβρανικές α-έλικες. (Εικ. 1-15Α). Η ομοιότητα των δύο επαναλαμβανόμενων μονάδων είναι πολύ μεγάλη, παρά την απουσία σημαντικής ομοιότητας σε επίπεδο αλληλουχίας μεταξύ των δύο μονάδων. Οι δύο μονάδες έχουν αντίθετη τοπολογία σε σχέση με τη μεμβράνη και σχετίζονται μεταξύ τους με μια περιστροφή περίπου 168° γύρω από έναν άξονα που διαπερνά το κέντρο της μεμβράνης και είναι παράλληλος προς την επιφάνειά της. Ανεστραμμένη επαναλαμβανόμενη τοπολογία συχνά παρατηρείται σε πολλούς μεμβρανικούς μεταφορείς και κανάλια. Οι δύο επαναλαμβανόμενες μονάδες είναι πλήρως διαπλεγμένες μεταξύ τους σχηματίζοντας μία κεντρική δέσμη τεσσάρων ελίκων που αποτελείται από τις δύο διακοπόμενες διαμεμβρανικές έλικες, τις 1 και 6 που σχετίζονται με τις 2 και 7. Αυτή η δέσμη περιβάλλεται, στην πλευρά των ελίκων 1 και 6 από ένα στρώμα που δημιουργείται από άλλες 6 έλικες. Οι έλικες 3 και 8, που βρίσκονται ακριβώς απέναντι από τις 1 και 6 (αντίστοιχα), σχηματίζουν μια μακριά αντιπαράλληλη μονάδα που διαπερνά τις δύο δομές σχήματος V που σχηματίζονται από τις έλικες 4-5 και τις 9-10, αντίστοιχα (Εικ. 1-15B). Οι θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος και του κατιόντος και η εξωγενώς στραμμένη (outward facing) κοιλότητα που συνδέει αυτές τις θέσεις με το εξωτερικό μέρος της μεμβράνης, είναι όλα διευθετημένα μεταξύ της δέσμης των κεντρικών 4 ελίκων και του εξωτερικού στρώματος των ελίκων (Εικ. 1-15Γ). Η αμινοξική αλληλουχία για τις έλικες 11 και 12 και η καρβοξυτελική περιοχή είναι πολύ λίγο συντηρημένες στην οικογένεια NCS1 και ο δομικός ρόλος αυτής δεν περιοχής δεν έχει ξεκαθαριστεί (Weyand *et al.*, 2008).

Στο μοντέλο που δημοσιεύθηκε το 2008 από τους Weyand και συνεργάτες, η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος εντοπίζεται στην εγκοπή των διακεκομμένων ελίκων 1 και 6, και απέναντι από τις 3 και 8 (Εικ. 1-16Α). Το σημείο εντοπίζεται στη βάση της περιπλαστικά στραμμένης κοιλότητας, η οποία αποτελείται από τις γειτονικές επιφάνειες των ελίκων 1, 3, 6, 8 και 10 και επιτρέπει την πρόσβαση του υποστρώματος στο σημείο πρόσδεσης (Εικ. 1-16Α). Ο δακτύλιος της υδαντοΐνης σχηματίζει μια αλληλεπίδραση μέσω του π ηλεκτρονιακού νέφους (π -stacking) με τον ινδολικό δακτύλιο της τρυπτοφάνης (W) 117 και βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με την ασπαραγίνη (N) 318 και τη γλουταμίνη (Q) 121 έτσι ώστε να επιτρέπεται η δημιουργία δεσμού υδρογόνου (Εικ. 1-16). Η W117 και η N318 είναι συντηρημένες

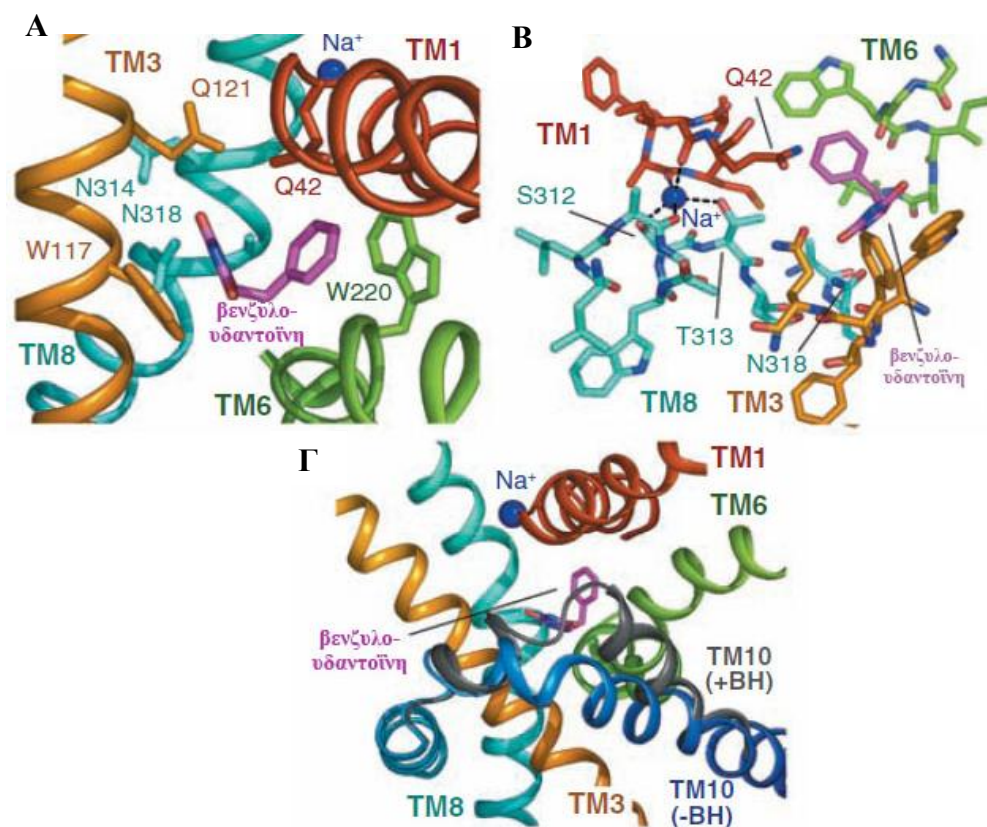


Εικόνα 1-15 Δομή του μεταφορέα υδαντοΐνης Mhp1 του *Microbacterium liquefaciens*.

A. Τοπολογία του Mhp1. Οι θέσεις δέσμησης του υποστρώματος και του κατιόντος απεικονίζονται με τη μορφή καφέ έλλειψης και μπλε κύκλου αντίστοιχα. Η μεμβράνη απεικονίζεται με γκρι χρώμα και η εξωτερική κοιλότητα που παρατηρείται σε αυτή τη δομή δίνεται με γαλάζιο χρώμα. Τα TMS 3 και 8 συνδέονται μεταξύ τους στην τρισδιάστατη δομή. **B.** Δομή του Mhp1 στη μεμβράνη χωρίς υπόστρωμα. Οι θέσεις δέσμησης του υποστρώματος και του Na^+ δίνεται ως αναφορά. **Γ.** Κάτοψη από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. (Weyand *et al.*, 2008)

μεταξύ όλων των μεταφορέων της οικογένειας, ενώ η Q121 διαφοροποιείται μόνο στον μεταφορέα ουριδίνης Fui1. Ένα άλλο συντηρημένο κατάλοιπο, η N314, βρίσκεται εντός απόστασης μήκους δεσμού H από την N318 έτσι ώστε μπορεί να συγκρατείται η πλευρική αλυσίδα της ασπαραγίνης σε κατάλληλη θέση και να αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα. Ο δακτύλιος βενζολίου του υποστρώματος βρίσκεται μεταξύ της W220 και της Q42 (Εικ. 1-16A). Η πλευρική αλυσίδα της W220 κινείται μέσα στο κέντρο δέσμησης σε σχέση με τη θέση που έχει στην δομή χωρίς υπόστρωμα και δημιουργεί μια αλληλεπίδραση τύπου pi-stacking με το βενζολικό δακτύλιο. Αυτός ο τρόπος πρόσδεσης συμφωνεί με την παρατήρηση ότι ο Mhp1 έχει καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για την 5-ινδολυλ-μεθυλ-υδαντοΐνη από την βενζυλο-

υδαντοΐνη (Suzuki & Henderson, 2006), γιατί ο ινδολικός δακτύλιος στην υδαντοΐνη θα σχημάτιζε μια πιο εκτεταμένη και στενή αλληλεπίδραση με την W220, και επίσης, η πλευρική αλυσίδα της Q42 θα μπορούσε να σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το άζωτο των ινδολικών δακτυλίων. Αυτό το κατάλοιπο θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα στους NCS1 μεταφορείς όπως προτείνεται από σύγκριση αλληλουχίων (Pantazopoulou & Diallinas, 2007; Weyand *et al.*, 2008).



Εικόνα 1-16 Θέσεις δέσμευσης υποστρώματος και κατιόντος. **A.** Θέση δέσμευσης υποστρώματος με τις συμμετέχουσες έλικες και τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν. Η βενζυλο-υδαντοΐνη και το νάτριο δείχνονται με μωβ και μπλε αντίστοιχα. **B.** Οι έλικες και τα κατάλοιπα που περιβάλλουν τις θέσεις δέσμευσης. **Γ.** Η αλλαγή διαμόρφωσης στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Η έλικα 10 και ο βρόχος μεταξύ των 9 και 10 παρουσιάζουν μια αλλαγή διαμόρφωσης που εμποδίζουν την έξοδο προς το εξωτερικό του προσδεμένου υποστρώματος. Το ίχνος αυτής της έλικα, δείχνεται με γκρι, και βρίσκεται από πάνω στη δομή με υπόστρωμα. Η βενζυλο-υδαντοΐνη σ' αυτές τις θέσεις συμβολίζεται με BH. (Weyand *et al.*, 2008)

Τα κατάλοιπα που παρατηρήθηκαν στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος συμφωνούν με τα αποτελέσματα ερευνών κατά τις οποίες μελετήθηκαν μεταλλάξεις στον Fcy2. Αν και ο Fcy2 είναι μακρινό συγγενικό ομόλογο του Mhp1, τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στις θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος και του κατιόντος μπορούν να στοιχηθούν με αυτά του Mhp1 με βεβαιότητα. Τρεις από τις γενετικώς

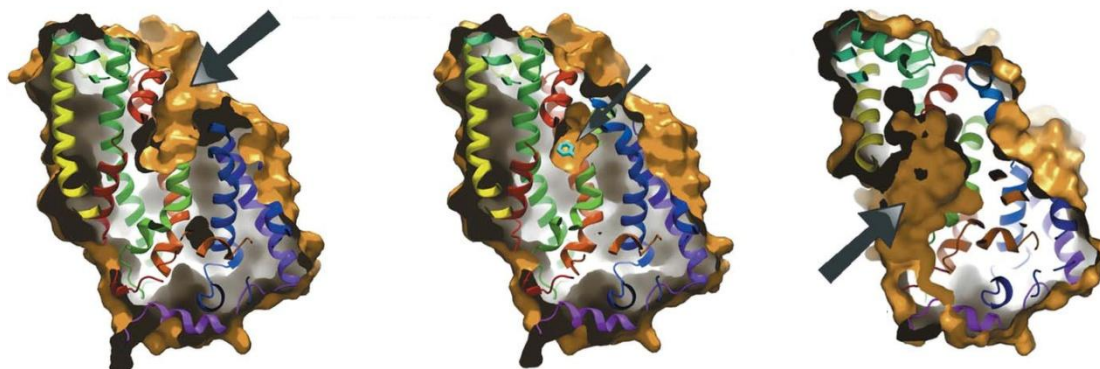
επιλεγμένες μεταλλαγμένες μορφές του Fcy2, οι οποίες δείχνουν ένα αλλαγμένο K_m για την πρόσληψη του υποστρώματος, ήταν υποκαταστάσεις του $^{371}\text{I-A-N-N-I-P-N}^{377}$ τμήματος του Fcy2, τα οποία αντιστοιχούν στα κατάλοιπα 311-318 του Mhp1 (Chevallier *et al.*, 1975; Blotch *et al.*, 1992; Brèthes *et al.*, 1992). Μελέτες στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης σε αυτά τα κατάλοιπα έδειξαν τη σημασία στην πρόσδεση του υποστρώματος της N374 και της N377, τα οποία είναι ισοδύναμα με την N314 και N318 του Mhp1, αντίστοιχα (Ferreira *et al.*, 1997; Weyand *et al.*, 2008). Το κατιόν που βρέθηκε στον κρύσταλλο και μελετήθηκε το κέντρο δέσμευσής του ήταν το Na, γεγονός που θα συζητηθεί εκτενέστερα παρακάτω (βλ. §1.4.2.2).

1.4.2.2 Ο ρόλος του ιόντος

Στην αρχική δομή του Mhp1 υπήρχε μια μεγάλη κοιλότητα που εκτεινόταν από την περιπλαστική όψη της πρωτεΐνης μέχρι το κέντρο, δηλαδή η δομή ήταν ανοικτή προς το περίπλασμα με βάση το εναλλασσόμενο μοντέλο πρόσβασης (Εικ. 1-17), και δεν περιείχε δεσμευμένο υπόστρωμα. Περιείχε, ωστόσο, ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην ίδια θέση όπως το ιόν νατρίου στον LeuT, ο οποίος λύθηκε σε ανάλυση 1,65 Å (Yamashita *et al.*, 2005). Συνεπώς, η ηλεκτρονιακή αυτή πυκνότητα θεωρήθηκε επίσης νάτριο στον Mhp1, λαμβάνοντας υπόψη και τις αποστάσεις μεταξύ του ιόντος και των καταλοίπων που το περιέβαλαν. Κάποιοι από τους μεταφορείς της NCS1 οικογένειας στους ζυμομύκητες και τα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου και του Mhp1, θεωρούνταν να είναι πιθανότερα πρωτονιο- παρά νάτριο-εξαρτώμενοι (Suzuki & Henderson, 2006; Pantazopoulou & Diallynas, 2007; Ren *et al.*, 2007). Η εξάρτηση από νάτριο σε μελέτες ολικής κυτταρικής μεταφοράς μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία ενός ξεχωριστού αντισταθμιστικού συστήματος μεταφοράς νατρίου στην μεμβράνη. Στην περίπτωση του Mhp1 η ευαισθησία των χημικών δοκιμασιών μειώνεται από την μειωμένη διαλυτότητα και λιπόφιλη φύση του υποστρώματος, εμποδίζοντας τον έλεγχο για εξάρτηση από νάτριο στα πρωτεολιποσώματα. Είναι επίσης πιθανό ότι ο Mhp1 και άλλοι NCS1 μεταφορείς έχουν ευέλικτη εκλεκτικότητα για το κατιόν, όπως ο MelB συμμεταφορέας σακχάρου-κατιόντος (Wilson & Ding, 2001; Weyand *et al.*, 2008).

Για την κτήση της περιπλαστικής-κλειστής κατάστασης ο Mhp1 συγκρυσταλλώθηκε παρουσία της βενζυλο-υδαντοΐνης. Η προκύπτουσα δομή, αν και χαμηλής ανάλυσης (4 Å), έδειξε ότι η βενζυλο-υδαντοΐνη δεσμεύεται στο κάτω μέρος της κοιλότητας η οποία είχε παρατηρηθεί στην έξω-ανοικτή δομή. Ταυτόχρονα με

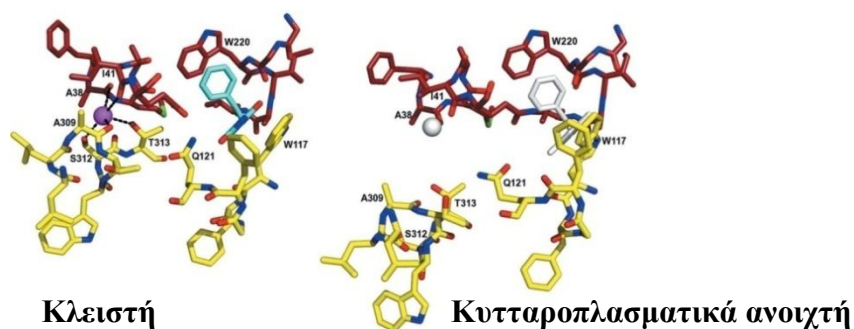
την δέσμευση της βενζυλο-υδαντοΐνης είχε επίσης συμβεί μία διαμορφωτική αλλαγή η οποία κλείδωσε το υποστρώμα στη θέση δέσμευσης του, σφραγίζοντας αποτελεσματικά την έξοδο του προς το εξωτερικό (Εικ. 1-18). Το πέρασμα προς το εσωτερικό ακόμη εμποδιζόταν από αμινοξέα που εκτείνονταν περίπου 20 Å μακριά υποδεικνύοντας ότι μία πολύ μεγαλύτερη διαμορφωτική αλλαγή ήταν αναγκαία για να αλλάξει τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος ώστε να είναι προσβάσιμο στο εσωτερικό. Η προς τα έσω-ανοικτή μορφή αποκτήθηκε από κρυστάλλους που αναπτύχθηκαν από επιλεγμένες παρτίδες πρωτεΐνης που είχε εκφραστεί σε *E. coli* σε καθορισμένα μέσα υπό την παρουσία σεληνομεθειονίνης (Shimamura *et al.*, 2010). Σε αυτή τη δομή η εξωκυτταρική πλευρά της πρωτεΐνης ήταν εντελώς κλειστή και αντ' αυτού μία κοιλότητα υπήρχε στην ενδοκυτταρική πλευρά. Στη θέση δέσμευσης του νατρίου παρατηρήθηκε ηλεκτρονιακή πυκνότητα υποδεικνύοντας ότι ένα άγνωστο μόριο είχε δεσμευθεί κατά την έκφραση της πρωτεΐνης και κλείδωσε την πρωτεΐνη σε μία προς τα έσω-ανοικτή διαμόρφωση.



Εικόνα 1-17 Αναπαραστάσεις επιφανείας των τριών μορφών του Mhp1, που δείχνει τις κοιλότητες της καθεμιάς. Τα διαγράμματα με κορδέλες έχουν χρωματιστεί όπως στην Εικόνα 1-15. (Από το συμπληρωματικό υλικό των Shimamura *et al.*, 2010)

Οι θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος και του νατρίου βρίσκονται στη διεπαφή των μοτίβων δέσμης (bundle motif) και κατακερματισμού (hash motif). Στις προς τα έξω στραμμένες δομές και οι δύο θέσεις είναι άθικτες με το ιόν νατρίου να αλληλεπιδρά με κατάλοιπα στα TMS 1 και 8 και την βενζυλο-υδαντοΐνη να τοποθετείται εφαρμοστά μεταξύ των δακτυλίων ινδόλης των Trp117 στο TMS 3 και Trp220 στο TMS 6 (Εικ. 1-18). Στην κυτταροπλασματικά ανοικτή δομή και οι δύο θέσεις δέσμευσης έχουν διαταραχθεί, ιδιαίτερα η θέση δέσμευσης του νατρίου, όπου τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το ιόν απομακρύνονται περίπου 4,5 Å (Εικ. 1-18). Η χωροδιάταξη της θέσης δέσμευσης του νατρίου υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο των ιόντων στο μηχανισμό. Η συγκέντρωση του νατρίου είναι πιθανόν να είναι πολύ

υψηλότερη στο περίπλασμα των βακτηρίων σε σχέση με την κυτταροπλασματική (Harold & Maloney, 1996). Η δέσμευση του νατρίου θα πρέπει να σταθεροποιηθεί την προς τα έξω διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία απουσία του νατρίου πρέπει να εμφανίζεται παροδικά. Σε αυτήν τη διαμόρφωση η θέση δέσμευσης του υποστρώματος είναι έτοιμη να δεχθεί το υπόστρωμα, το οποίο είναι πιθανό να είναι παρόν σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Στην πραγματικότητα, σε πειράματα σβέσης φθορισμού (fluorescence quenching) η παρουσία νατρίου αυξάνει τη συγγένεια του Mhp1 για βενζυλο-υδαντοΐνη περίπου δέκα φορές (Weyand *et al.*, 2008).

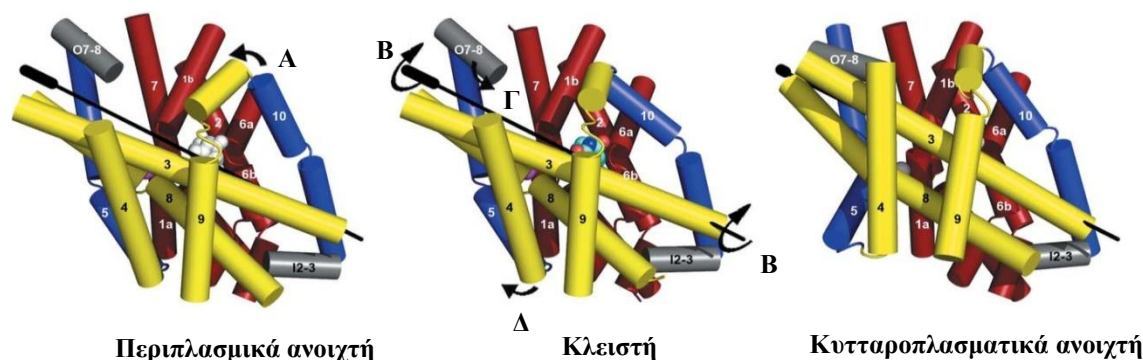


Εικόνα 1-18 Οι θέσεις δέσμευσης του νατρίου και του υποστρώματος στην κλειστή και στην κυτταροπλασματικά ανοικτή δομή. Στην κλειστή δομή το ιόν νατρίου έχει παρασταθεί ως μια μωβ σφαίρα και η βενζυλο-υδαντοΐνη με κυανό άτομα άνθρακα. Στην κυτταροπλασματικά ανοικτή δομή όπου τα μόρια αυτά δεν είναι παρόντα αναπαρίστανται στην υποθετική τους θέση με λευκό χρώμα. (Shimamura *et al.*, 2010)

Η δέσμευση του υποστρώματος θα πρέπει να προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή για τη μετάβαση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματικά προσανατολισμένη κατάσταση, αποσταθεροποιώντας έτσι τις θέσεις δέσμευσης του νατρίου και του υποστρώματος και επιτρέποντας την είσοδο αυτών μέσα στο κύτταρο. Τα ακριβή βήματα κατά μήκος του μονοπατιού δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Δεδομένου ότι η μεταφορά της βενζυλο-υδαντοΐνης συζεύγνυται με νάτριο, φαίνεται ότι η πρόσδεση υποστρώματος απουσία νατρίου δεν θα πρέπει να ενεργοποιήσει την αλλαγή στην προς τα έσω προσανατολισμένη διαμόρφωση. Και πάλι πειράματα σβέσης φθορισμού (fluorescence quenching) δείχνουν ότι η συγγένεια του νατρίου αυξάνεται όταν η βενζυλο-υδαντοΐνη είναι παρούσα, υποδεικνύοντας ότι η σύνδεση της βενζυλο-υδαντοΐνης επίσης ωθεί την ισορροπία υπέρ της προς τα έξω διαμόρφωσης. Αυτός ο μηχανισμός υποστηρίζεται από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Shimamura *et al.*, 2010).

1.4.2.3 Περιοχές ελεγχόμενης διέλευσης του υποστρώματος

Ο μηχανισμός εναλλαγής μεταξύ των διαφόρων καταστάσεων της πρωτεΐνης έχει περιγραφεί με δύο ομάδες πυλών: την παχιά (thick) και τη λεπτή (thin) (Krishnamurthy *et al*, 2009; Abramson & Wright, 2009). Οι λεπτές πύλες, που αποτελούνται από λίγα μόνο αμινοξικά κατάλοιπα, ελέγχουν τη ροή του υποστρώματος μέσα και έξω από την κοιλότητα σε κάθε πλευρά της πρωτεΐνης. Στον Mhp1, οι έλικες 5 και 10 παίζουν το ρόλο των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών λεπτών πυλών, αντίστοιχα, αν και προς το παρόν δεν είναι σαφές αν θα μπορούσε να υπάρχει μια προς τα έσω προσανατολισμένη κλειστή κατάσταση. Η παχιά πύλη επηρεάζει την εναλλαγή μεταξύ της προς τα έσω και προς τα έξω προσανατολισμένης κατάστασης. Στον Mhp1 αυτό λειτουργεί περισσότερο σαν ένας μηχανισμός, όπου η πύλη είναι είτε στην μία διαμόρφωση ή στην άλλη, χωρίς να εμφανίζεται ποτέ μια κατάσταση στην οποία να υπάρχει ένα κανάλι από τη μία πλευρά της πρωτεΐνης εως την άλλη (Εικ. 1-19). Ο μηχανισμός χρησιμοποιεί την εσωτερική συμμετρία της πρωτεΐνης με τα TMS5 και 10 να εκτελούν μια παρόμοια λειτουργία στο εσωτερικό και στο εξωτερικό της πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Ωστόσο, δεδομένου ότι ο άξονας περιστροφής δεν είναι στο κέντρο της πρωτεΐνης και οι C-τερματικές διαμεμβρανικές έλικες περιορίζουν τις κινήσεις στο ένα μέρος της πρωτεΐνης σε σχέση με το άλλο, το σύστημα δεν είναι εντελώς συμμετρικό.



Εικόνα 1-19 Ο μηχανισμός μεταφοράς του Mhp1. Οι κινήσεις οριοθετούνται από τα βέλη. **A.** Η έλικα 10 κάμπτεται πάνω από το υπόστρωμα. **B.** Το μοτίβο κατακερματισμού περιστρέφεται κατά 30° γύρω από τον άξονα περιστροφής που εμφανίζεται ως μια μαύρη γραμμή. **Γ.** Η μικρή εξωκυτταρική έλικα κινείται για να σφραγίσει εντελώς την εξωκυτταρική πλευρά της πρωτεΐνης. **Δ.** Η έλικα 5 κάμπτεται για να ανοίξει την κοιλότητα στην ενδοκυτταρική πλευρά με τρόπο ανάλογο αυτού της έλικας 10. (Shimamura *et al.*, 2010)

1.4.3 Ο μεταφορέας FcyB στον *Aspergillus nidulans*

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (orf) του *fcyB* αποτελείται από 1.605 ζεύγη βάσεων και έχει ένα εσώνιο μήκους 78 ζ.β. (βρίσκεται μεταξύ των 442 και 521 ζ.β.), σύμφωνα με την καταχώρηση στη βάση δεδομένων του *A. nidulans*. Ανάλυση της υποθετικής περιοχής του υποκινητή του *fcyB* γονιδίου έδειξε ότι περιέχει τρεις θέσεις WGATAR που προσαρμόζονται στην κοινή αλληλουχία του γενικού μεταγραφικού παράγοντα AreA, που είναι ένας ομοιάζων με GATA (GATA-like) μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για την έκφραση σχεδόν όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη χρήση του αζώτου στον *A. nidulans*, συμπεριλαμβανομένων και όλων των προηγουμένως γνωστών γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς πουρινών (Scazzocchio, 2000; Pantazopoulou & Diallinas, 2007). Όλες αυτές οι θέσεις έχουν το μοτίβο TGATA και βρίσκονται στις θέσεις -55, -72 και -221 από το σημείο έναρξης της μετάφρασης. Ο υποκινητής του *fcyB* επίσης εμπεριέχει την αλληλουχία 5'-CGG-X6-CCG-3' που αντιστοιχεί σε ένα UaY ειδικό σημείο πρόσδεσης (θέση -523 από το κωδικόνιο έναρξης). Ο UaY είναι θετικός μεταγραφικός παράγοντας, ειδικός για το μονοπάτι και διαμεσολαβητής κατά την επαγωγή μέσω πουρινών (Suarez *et al.*, 1995). Οι θέσεις δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων AreA και UaY μπορούν να δρουν ως φυσιολογικές θέσεις δέσμευσης μεσολαβώντας στην καταστολή μέσω καταβολιτών αζώτου και στην επαγωγή μέσω πουρινών. (Vlanti *et al.*, 2008)

Η πρωτεΐνη που παράγεται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του *fcyB* είναι εξαιρετικά υδρόφοβη και αποτελείται από 508 αμινοξέα τα οποία έχουν προβλεφθεί να σχηματίζουν μια δευτεροταγή δομή με 12 TMSs ενωμένα με σχετικά κοντές θηλειές, ενώ τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα θα πρέπει να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Έπειτα από δημιουργία στελεχών με απενεργοποιημένο το *fcyB* μέσω knock-out, αποδείχθηκε ότι ο FcyB συμμετέχει στη μεταφορά πουρινών, συνεισφέροντας μόλις το 5-10% της συνολικής πρόσληψης υποξανθίνης σε στέλεχος άγριου τύπου (Πίν. 1-1), με την υπόλοιπη πρόσληψη να γίνεται κατά βάση από τον κύριο μεταφορέα πουρινών AzgA (80-85%) και σε πολύ μικρό ποσοστό από το γενικό μεταφορέα πουρινών UapC (5%) (Vlanti *et al.*, 2008).

Σε στελέχη που έφεραν απαλοιφή του *fcyB* (ΔF) και των γονιδίων *uapA*, *uapC*, *azgA* και *fcyB* ($\Delta ACZF$), βρέθηκε ότι και τα δύο ήταν πλήρως ανθεκτικά στο τοξικό ανάλογο 5-φθοροκυτοσίνη υποδεικνύοντας ότι ο FcyB είναι η κύρια είσοδος του αναλόγου και πιθανώς και της κυτοσίνης (Πίνακας 1-1)(Vlanti *et al.*, 2008). Όμως,

βρέθηκε ότι δύο ακόμα μεταφορείς συμμετέχουν σε πολύ μικρό ποσοστό στην πρόσληψη 5-φθοροκυτοσίνης και ίσως και κυτοσίνης, ο μεταφορέας ουρακίλης FurD (Amillis *et al.*, 2007) και ο μεταφορέας νουκλεοσιδίων CntA (Hamari *et al.*, 2009).

Πίνακας 1-1 Συγγένεια δέσμευσης (K_{mi}) και ελεύθερη ενέργεια (ΔG^0) διαφόρων ουσιών στον FcyB. (Vlanti *et al.*, 2008)

Υποστρώματα	K_i (μM)	ΔG^0 ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Αδενίνη	7	-30,6
Γουανίνη	11,5	-29,3
Υποξανθίνη	20	-27,9
Κυτοσίνη	20	-27,9
5-φθοροκυτοσίνη	145	-22,8
5-μεθυλοκυτοσίνη	146	-22,8
3-μεθυλοαδενίνη	260	-21,3
Γουανοσίνη	280	-21,1
5-αζακυτοσίνη	346	-20,6
9-μεθυλογουανίνη	380	-20,3
6-θειογουανίνη	1000	-17,8
Αμινοπυρινόλη	1000	-17,8
2-μερκαπτο 4-αμινοπυριμιδίνη	1000	-17,8
Πουρίνη	1000	-17,8
7-δεαζαγουανίνη	>1000	> -17,8
6-χλωροπουρίνη	>1000	> -17,8
8-αζαγουανίνη	>1000	> -17,8
8-αζαξανθίνη	>1000	> -17,8
Ξανθίνη	>1000	> -17,8
Ουρακίλη	>1000	> -17,8
2-υδροξυ 6-αμινοπουρίνη	>1000	> -17,8
Αλλοπυρινόλη	>1000	> -17,8
Ιμιδαζόλιο	>1000	> -17,8
6-θειοπουρίνη	>1000	> -17,8
1-δεαζαπουρίνη	>1000	> -17,8
2-υδροξυπυριμιδίνη	>1500	> -16,8
5,6-διυδροουρακίλη	>1500	> -16,8
Αδενοσίνη	>1500	> -17,8

1.4.3.1 Ο φυσιολογικός ρόλος του FcyB

Όλοι οι νηματώδεις μύκητες με γνωστή αλληλουχία έχουν ομόλογες πρωτεΐνες με τον FcyB ή με τους Fcy21p/Fcy2p του *S. cerevisiae*. Εντούτοις, φαίνεται ότι οι όμοιοι με τον FcyB μεταφορείς μπορούν να στρατολογηθούν για διαφορετικές φυσιολογικές διαδικασίες. Οι νηματώδεις μύκητες χρησιμοποιούν τις πουρίνες ως πηγές αζώτου και ο κύριος μεταφορέας για μαζική πρόσληψη αδενίνης, υποξανθίνης και γουανίνης φαίνεται να είναι ο AzgA για τον *A. nidulans* και οι ομοιάζοντες με AzgA μεταφορείς για τους άλλους μύκητες. Στον *S. cerevisiae* αυτές οι πουρίνες δεν χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου ή είναι ανεπαρκείς, λόγω απώλειας ενζύμων του καταβολικού μονοπατιού των πουρινών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Pantazopoulou & Diallinas, 2007). Έτσι, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης πολλοί ζυμομύκητες έχασαν και τις AzgA-like πρωτεΐνες, όμως μπορούν να προσλάβουν πολύ ικανοποιητικά αδενίνη, υποξανθίνη και γουανίνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων, μέσω των Fcy2p/Fcy21p μεταφορέων.

Πιστεύεται, λοιπόν, ότι ο κύριος βιοχημικός ρόλος του FcyB είναι η πρόσληψη της κυτοσίνης, ενώ ταυτόχρονα, η συνεχής, αλλά, χαμηλή πρόσληψη πουρινών τον καθιστά εφεδρικό στην παροχή μεταβολιτών για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων ή νουκλεϊκών οξέων. Θεωρητικά, θα μπορούσε ο FcyB να παρέχει πουρίνες υπό συνθήκες που δεν εκφράζεται ο AzgA, αλλά αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί μέχρι τώρα πειραματικά καθώς δεν έχουν βρεθεί κάποιες φυσιολογικές συνθήκες κατά την βλαστητική ανάπτυξη όπου εκφράζεται μόνο ο FcyB και όχι ο AzgA. Επίσης, και οι δύο πρωτεΐνες έχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης για τις πουρίνες και έτσι μπορούν να προσδένουν τα υποστρώματά τους εξίσου καλά (Vlanti & Diallinas, 2008).

Έπειτα από σύγκριση της έκφρασης του FcyB και του AzgA στα φυλετικά και αφυλετικά διαμερίσματα του *A. nidulans* φάνηκε ότι ακολουθούν διαφορετικό προφίλ (Vlanti & Diallinas, 2008):

1. Ο FcyB εκφράζεται σε διαφοροποιημένα κύτταρα απ' όπου προκύπτουν τα σπόρια και στα εκβλαστώνοντα κονιδιοσπόρια, ενώ ο AzgA όχι.
2. Ο FcyB εκφράζεται στους νεαρούς ασκούς/ασκοσπόρια, ενώ και πάλι ο AzgA απουσιάζει.

Αυτές οι παρατηρήσεις είναι συμβατές με την υπόθεση ότι ο FcyB είναι πιθανά ένας αναβολικός μεταφορέας που παρέχει κυτοσίνη και πουρίνες κατά τη διάρκεια της κυτταρικής/πυρηνικής διαίρεσης στα σπόρια που παράγονται κατά τον φυλετικό και τον αφυλετικό κύκλο. Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν επίσης με το γεγονός ότι ο

FcyB εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, παροδικά, στο σημείο της εκβλάστησης που συμπίπτει με την πρώτη πυρηνική διαίρεση κατά την βλαστητική ανάπτυξη. Υποδεικνύεται, δηλαδή, ότι ο FcyB εξυπηρετεί στην παροχή νουκλεοτιδικών βάσεων κατά τη διάρκεια πυρηνικών διαιρέσεων σε αναπτυξιακά στάδια που θα οδηγήσουν σε κυτταρική διαφοροποίηση. Το γεγονός όμως ότι δεν ανιχνεύθηκε κάποιος φαινότυπος που να σχετίζεται με την εκβλάστηση, την παραγωγή ασκοσπορίων ή κονιδιοσπορίων ή την βιωσιμότητα στελεχών όταν ήταν απενεργοποιημένο το *fcyB*, προτείνει ότι η μεταφορική λειτουργία του FcyB δεν είναι ουσιώδης, αλλά μια ασφαλιστική δικλείδα στη ζωή των μυκήτων (Vlanti & Diallinas, 2008).

1.4.3.2 Ανάγκη δημιουργίας μοντέλου του FcyB

Η κατανόηση του μηχανισμού της πρωτεϊνικής λειτουργίας γενικά απαιτεί τη γνώση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης, η οποία τελικά καθορίζεται από την αμινοξική αλληλουχία. Ο καθορισμός της πρωτεϊνικής δομής με χρήση πειραματικών μεθόδων όπως κρυσταλλογραφία ακτίνων X ή φασματοσκοπία NMR δεν είναι επιτυχής με όλες τις πρωτεΐνες ειδικά τις μεμβρανικές. Μέχρι το 2006 υπήρχαν περίπου 2 εκατομμύρια πρωτεΐνες κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων Swissprot και TrEMBL, ανάμεσα στις οποίες περίπου 30.000 δομές είχαν λυθεί πειραματικά. Αν και ο ρυθμός του καθορισμού δομών πειραματικά συνέχισε να αυξάνεται, ο αριθμός των νέων ακολουθιών αυξάνεται ταχύτερα από τον αριθμό των λυμένων δομών (Xiang, 2006).

Το τεράστιο κενό μεταξύ του αριθμού των διαθέσιμων αλληλουχιών και των λυμένων πρωτεϊνών θα μπορούσε να μειωθεί μέσω υπολογιστικών μεθόδων. Η θεωρητική πρόγνωση δομής μπορεί να χωριστεί σε δύο στρατόπεδα: με χρήση *ab-initio* μεθόδου και με δημιουργία ομόλογων μοντέλων (*homology modeling*). Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιεί αρχές θεωρητικής χημείας και φυσικής, προκειμένου να προβλέψει της πτύχωσης της πρωτεΐνης. Αντίθετα, η δεύτερη μέθοδος προβλέπει την τρισδιάστατη δομή μια πρωτεΐνης έχοντας ως μόνο δεδομένο την αμινοξική της αλληλουχία, αφού όμως βρει την ομοιότητα σε επίπεδο αλληλουχίας με μια ή περισσότερες πρωτεΐνες γνωστής δομής (Xiang, 2006).

Η δημιουργία των ομόλογων μοντέλων συνήθως περιλαμβάνει τα παρακάτω τέσσερα βήματα: α) αναγνώριση ομόλογης πρωτεΐνης γνωστής δομής από τη βάση δεδομένων PDB που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο, β) στοίχιση της επιθυμητής αλληλουχίας στη δομή πρότυπο, γ) χτίσιμο του μοντέλου με βάση τη στοίχιση και δ)

έλεγχο και τροποποίηση του μοντέλου. Όταν η ταυτότητα της αλληλουχίας είναι πάνω από 40%, η στοίχιση είναι καλή και δεν υπάρχουν πολλά κενά, και το 90% των ατόμων της κύριας αλυσίδας θα μπορούσαν να δημιουργήσουν μοντέλο με RMSD (root mean square distance) σφάλμα της τάξης του 1 Å. Σε αυτό το επίπεδο ταυτότητας μεταξύ των αλληλουχιών οι διαφορές στη δομή μεταξύ των πρωτεϊνών οφείλεται σε θηλειές και πλευρικές αλυσίδες. Όταν η ταυτότητα της αλληλουχίας είναι περίπου 30-40%, είναι δύσκολο να δημιουργηθεί σωστή στοίχιση γιατί μπορεί να υπάρχουν πολλές ελλείψεις και προσθήκες βάσεων. Για ομοιότητες αυτού του επιπέδου, το 80% των ατόμων του σκελετού της κύριας αλυσίδας μπορούν να προβλεφθούν με RMSD σφάλμα της τάξης των 3,5 Å, ενώ τα υπόλοιπα κατάλοιπα του μοντέλου έχουν μεγαλύτερα σφάλματα, ειδικά στις περιοχές που υπάρχουν οι ελλείψεις και οι προσθήκες. Ακόμα και σε σωστά στοιχισμένες περιοχές, υπάρχουν δυσκολίες στην ενσωμάτωση των θηλειών και των πλευρικών αλυσίδων στο μοντέλο. Όταν η ομοιότητα της ακολουθίας είναι μικρότερη του 30%, το κύριο πρόβλημα είναι η αναγνώριση των ομόλογων δομών και η στοίχιση γίνεται ακόμα πιο δύσκολη (Xiang, 2006).

Στην περίπτωση του FcyB η διαθέσιμη ομόλογη δομή είναι αυτή του μεταφορέα υδαντοΐνης Mhp1. Τα μοντέλα που δημιουργούνται είναι διαθέσιμα για περαιτέρω δοκιμασίες μέσω υπολογιστικών μεθόδων. Τέτοιου τύπου δοκιμασίες είναι το threading και οι υπολογισμοί πρόσδεσης (docking calculations), όπου το πρώτο αφορά στον έλεγχο του μοντέλου που δημιουργήθηκε από δυναμικής σκοπιάς καθώς και στην εκτίμηση του σε σχέση με την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης, ενώ το δεύτερο αφορά στην εύρεση πιθανών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με κάποιο μόριο που επιλέγουμε και έτσι τον προσδιορισμό των αμινοξέων που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (δH) με το μόριο και πιθανά την εύρεση-πρόβλεψη του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Μια από τις ενδιαφέρουσες εφαρμογές των υπολογισμών πρόσδεσης είναι ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων. Η ανάπτυξη ενός καινούριου φαρμάκου είναι μια διαδικασία που συχνά απαιτεί περίπου 10 χρόνια προσπάθειας και πολλές φορές μια τεράστια οικονομική επένδυση. Με τη χρήση των υπολογισμών πρόσδεσης θα μπορούσε να προβλεφθούν σε αρχικό στάδιο ουσίες οι οποίες δε θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν σωστά και έτσι η δημιουργία φαρμάκων θα γινόταν πιο αποτελεσματική και γρήγορη (Lavecchia & Di Giovanni, 2013).

1.5 Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια NAT/NCS2

1.5.1 Η NAT/NCS2 οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/H⁺

Η οικογένεια NAT/NCS2 ορίστηκε ιστορικά με την κλωνοποίηση και χαρακτηρισμό των μεταφορέων ουρικού οξέως-ξανθίνης UapA (Diallinas & Scazzocchio, 1989; Gorfinkiel *et al.*, 1993) και UapC (Diallinas *et al.*, 1995) στο πρότυπο σύστημα-μοντέλο *A. nidulans* και των μεταφορέων ουρακίλης UraA στην *E. coli* (Anderson & von Heijne, 1994) και PyrP στον *Bacillus subtilis* (Turner *et al.*, 1994). Είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη οικογένεια μεταφορέων πουρινών μεταξύ των οργανισμών και περιλαμβάνει μέλη από βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά, έντομα, νηματώδεις και θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Μεταφορείς αυτής της οικογένειας δεν απαντώνται στον *S. cerevisiae* και στα παρασιτικά πρωτόζωα.

Σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί ως προς την εξειδίκευση και τη λειτουργία τους αρκετοί ακόμα μεταφορείς της οικογένειας NAT (Πίν. 1-2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περισσότεροι χαρακτηρισμένοι NAT μεταφορείς των θηλαστικών (SVCT1 and SVCT2) αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση L-ασκορβικό οξύ, και όχι πουρίνες ή πυριμιδίνες (βλ. §1.5.1.3). Επομένως, η οικογένεια NAT μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρεις υποοικογένειες με βάση την εξειδίκευση. Η πρώτη απαντάται σε βακτήρια, μύκητες και φυτά και περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος, η δεύτερη απαντάται μόνο σε βακτήρια και είναι εξειδικευμένη για μεταφορά ουρακίλης, και η τρίτη απαντάται στα θηλαστικά και είναι εξειδικευμένη για ασκορβικό οξύ. Η συγγένεια δέσμευσης, K_m , ποικίλλει από 2-8 μM για την ξανθίνη, 7-130 μM για το ουρικό οξύ και 8-237 μM για το ασκορβικό οξύ. Η μεταφορική ικανότητα εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από ποικίλα αναπτυξιακά και φυσιολογικά σήματα, αλλά γενικά οι μεταφορείς NAT χαρακτηρίζονται από μέτρια ως υψηλή μεταφορική ικανότητα. Οι μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος μεταφέρουν με χαμηλή απόδοση και ουρακίλη, ενώ επιπλέον αναγνωρίζουν, αλλά δεν μεταφέρουν L-ασκορβικό οξύ σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (> 35 mM). Αντίθετα, οι SVCT1 και SVCT2 μεταφορείς ασκορβικού οξέος δεν αναγνωρίζουν νουκλεοτιδικές βάσεις. Οι NAT μεταφορείς βακτηρίων, μυκήτων και φυτών είναι συμμεταφορείς H⁺, ενώ οι μεταφορείς των θηλαστικών είναι συμμεταφορείς Na⁺.

Πίνακας 1-2 Πρωτεΐνες της οικογένειας NAT γνωστής λειτουργίας. (Τροποποιημένο από Gournas *et al.*, 2008)

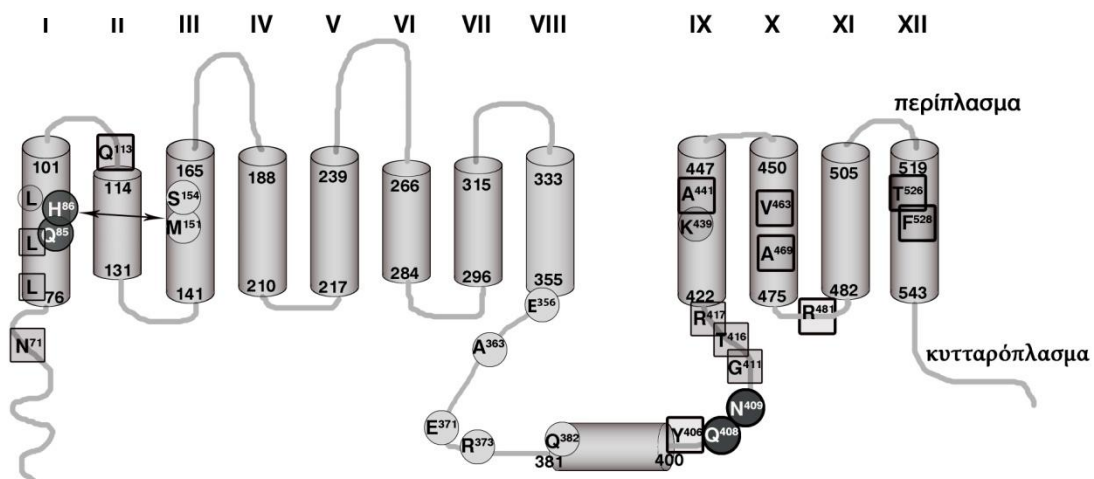
Οργανισμός	Μεταφορέας	Φυσιολογικά υποστρώματα [$K_{m/i}$ (μM)]	Μεταφορική ικανότητα	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Aspergillus nidulans</i>	UapA	X [7], UA [8]	H	Diallinas & Scazzocchio, 1989
	UapC	X[4], UA[136]	M	Diallinas <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AfUapC	X [6], UA [171]	H	Goudela <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida albicans</i>	Xut1p	X [4], UA [50]	H	Goudela <i>et al.</i> , 2005
	XanQ	X [4]	H	Karatza & Frillingos, 2005
<i>Escherichia coli</i>	XanP	X [3]	L	Karatza & Frillingos, 2005
	YgfU	UA [500]	H	Papakostas & Frillingos, 2012
	UraA	U	n.d.	Andersen <i>et al.</i> , 1995
	PucJ	UA, X	n.d.	Schultz <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus subtilis</i>	PucC	UA, X	n.d.	Schultz <i>et al.</i> , 2001
	PbuX	X	n.d.	Christiansen <i>et al.</i> , 1997
	PyrP	U	n.d.	Turner <i>et al.</i> , 1994
<i>Zea mays</i>	Lpe1	X [30] , Ua [33]	H	Argyrou <i>et al.</i> , 2001
	SVCT1	AA [29]	H	Tsukaguchi <i>et al.</i> , 1999
<i>Rattus norvegicus</i>	SVCT2	AA [10-100]	L	Tsukaguchi <i>et al.</i> , 1999
	rSNBT1	U [21], X [83], HX [17], T [13], G [80]	H	Yamamoto <i>et al.</i> , 2010
<i>Mus musculus</i>	SVCT1	AA [8]	n.d.	Castro <i>et al.</i> , 2001
	SVCT2	AA [103]	M	Castro <i>et al.</i> , 2001
<i>Homo sapiens</i>	hSVCT1	AA [65-237]	H	Daruwala <i>et al.</i> , 1999
	hSVCT2	AA [8-62]	L/H	Daruwala <i>et al.</i> , 1999
<i>Sus scrofa</i>	SVCT2	AA [27]	n.d	Holms <i>et al.</i> , 2000

X: ξανθίνη, UA: ουρικό οξύ, HX: υποξανθίνη, U: ουρακίλη, T: θυμίνη, G: γουανίνη, AA: L-ασκορβικό οξύ
H: υψηλή, M: μέτρια, L: χαμηλή, n.d.: δεν έχει πραγματοποιηθεί

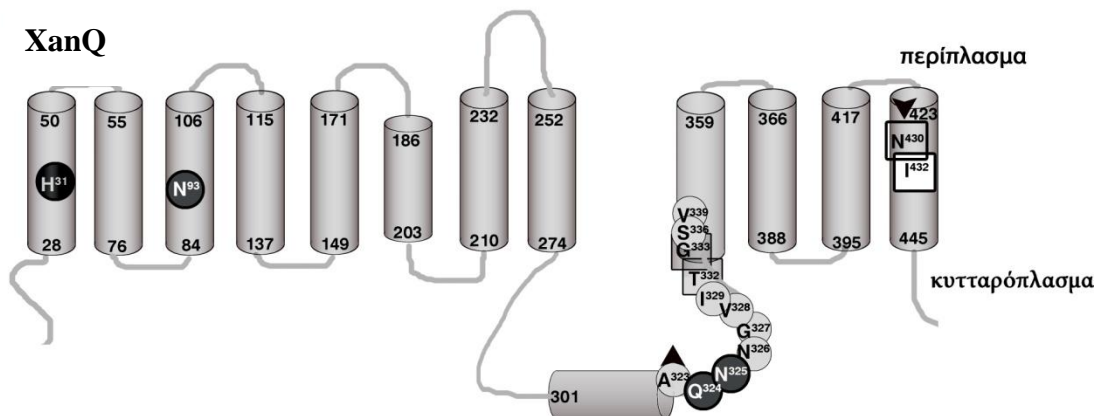
Προκειμένου μια άγνωστη πρωτεΐνη να ταξινομηθεί στην οικογένεια NAT πρέπει να πληροί τρία κριτήρια: να έχει μήκος 400-650 αμινοξέα, να αποτελείται από 10-14 πιθανά TMS με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο διευθετημένα προς το κυτταρόπλασμα, και να φέρει σε κατάλληλες θέσεις δύο υψηλά συντηρημένες συναινετικές αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες αυτές είναι η αλληλουχία υπογραφή της οικογένειας, [(F/Y/S)⁴⁰⁷X(Q/E/P)NXGXXXXT(R/K/G)XXNR⁴²¹] (όπου X: υδρόφοβο αμινοξύ, έντονη γραφή: αμινοξέα με υψηλό βαθμό συντήρησης) η οποία εντοπίζεται σε μια αμφιπαθική περιοχή μετά το TMS8 (Diallinas *et al.*, 1998 ; Koukaki *et al.*, 2005) και το μοτίβο QH στην καρδιά του TMS1 (Pantazopoulou & Diallinas, 2006). Οι δύο παραπάνω αλληλουχίες έχειδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερες σημαντικές για τη λειτουργία των μεταφορέων UapA, UapC και XanQ. Επιπλέον κριτήριο συνιστά η παρουσία ορισμένων σχεδόν απόλυτα συντηρημένων πολικών ή φορτισμένων αμινοξέων. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, εκατοντάδες πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας από κατά Gram-αρνητικά και θετικά Βακτήρια, Αρχαία, Μύκητες, Φυτά και Ζώα έχουν καταταχθεί στην οικογένεια NAT.

Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχε διαθέσιμη κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή της οικογένειας (βλ. §1.5.2 – Lu *et al.*, 2011), παρά μόνο μοντέλα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής. Σύμφωνα με αυτά, η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή των NAT συνήθως αποτελείται από 12 TMS με κυταροπλασματικά αμινο- και καρβοξυτελικά άκρα, δομή που μοιάζει με αυτήν των περισσότερων μεταφορέων δευτερογενούς ενεργότητας, συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων της MFS οικογένειας, επαληθευμένη με κρυσταλλογραφικά δεδομένα (βλ. §1.3.1). Για τους μεταφορείς αυτούς έχειδειχθεί πως τα σημεία δέσμευσης υποστρώματος ή πρωτονίου δομούνται από συγκεκριμένα αμινοξέα που βρίσκονται στην καρδιά TMS, αλλά έχειτονιστεί και ο σημαντικός ρόλος ευέλικτων αμφιπαθικών ελίκων και διαμεμβρανικών φουρκετών (Sobczak & Lolkema, 2005). Στην οικογένεια NAT, η πρόβλεψη υψηλής περιεκτικότητας σε α-έλικες υποστηρίζεται από πρωταρχικά πειράματα κυκλικού διχρωισμού, που δείχνουν ότι τα δύο πρότυπα μέλη της (UapA και XanQ) αποτελούνται >80-90 % α-έλικες (Lemuh *et al.*, 2009). Εν αντιθέσει με μέλη της MFS οικογένειας και παρόμοια με τη διαμόρφωση μεταφορέων τύπου LeuT (βλ. §1.3.2), δεν παρατηρείται καμία συμμετρία ή κάποιος μεγάλος κυταροπλασματικός βρόχος να ενώνει τα δύο μισά της πρωτεΐνης (Εικ. 1-20).

UapA



XanQ



Εικόνα 1-20 Προβλεπόμενη δομή και σχέσεις δομής-λειτουργίας των δύο πρωτοτύπων NAT μεταφορέων, UapA και XanQ (μέχρι το 2011). Τα υποθετικά α-ελικοειδή TMSs εμφανίζονται ως κύλινδροι. Απεικονίζονται τα σημαντικά κατάλοιπα για τη λειτουργία. Τα απολύτως αναγκαία κατάλοιπα για τη λειτουργία απεικονίζονται σε μαύρο φόντο (UapA: Q85, E356, D388, Q408, N409 και YgfO: Q324, N325). Τα κατάλοιπα που επηρεάζουν την εξειδίκευση ή/και τη συγγένεια απεικονίζονται σε τετράγωνα (UapA: N71, L77, L84, Q113, G411, T416, R417, T526, F528 και YgfO: T332, G333, N430, I432). Στον XanQ οι κυκλωμένες περιοχές εμφανίζουν τις θέσεις σάρωσης με Cys-μεταλλαξιγένεση. (Τροποποιημένο από Diallinas & Gounas, 2008)

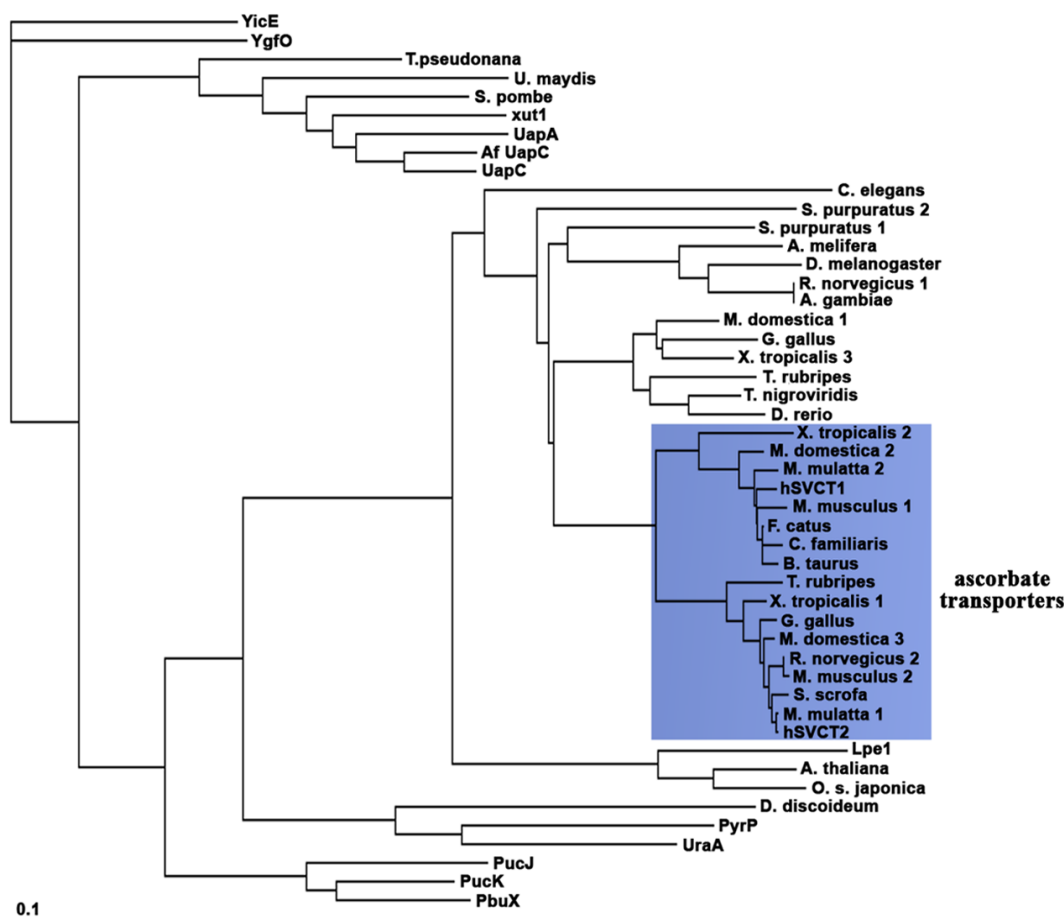
1.5.1.1 Εξελικτικές σχέσεις της οικογένειας NAT

Γενικά οι μεταφορείς των βακτηρίων και των μυκήτων εμφανίζουν μεγαλύτερη ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ τους (30-35%), από ότι με τους μεταφορείς των φυτών και των ζώων (22-24%) (Pantazopoulou & Diallinas, 2007). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* δε διαθέτει κανένα μεταφορέα της οικογένειας NAT, γεγονός που αντανακλά την έλλειψη ενζύμων καταβολισμού ξανθίνης και ουρικού οξέος. Ελάχιστοι είναι οι οργανισμοί που δεν διαθέτουν NAT ομόλογα, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τα Πρωτόζωα. Οι UapA και UapC εμφανίζουν 65% ταυτότητα και 80% ομοιότητα. Οι υπόλοιποι Ασπεργίλλοι έχουν μόνο έναν NAT, ομόλογο του UapC, όπως δείχνει συνταϊνική

ανάλυση (Pantazopoulou & Diallinas, 2007). Τα φυτά διαθέτουν πολλούς NAT μεταφορείς, εκ των οποίων ο μόνος λειτουργικά χαρακτηρισμένος είναι ο υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας συμμεταφορέας ουρικού οξέος-ξανθίνης/H⁺ Lpe1, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό των χλωροπλαστών στο καλαμπόκι (Argyrou *et al.*, 2001). Η *Drosophila melanogaster* διαθέτει ένα NAT ομόλογο, ενώ ο *Caenorhabditis elegans* έξι. Οι NAT πρωτεΐνες των μεταζώων είναι 35-40% ταυτόσημες μεταξύ τους και 25% ταυτόσημες με τις πρωτεΐνες των φυτών. Τα θηλαστικά, εκτός από τους δύο χαρακτηρισμένους μεταφορείς ασκορβικού οξέος (SVCT1 και SVCT2), διαθέτουν και ομόλογα άγνωστης λειτουργίας τα οποία φέρουν συντηρημένες αλληλουχίες που μοιάζουν περισσότερο με αυτές των χαρακτηρισμένων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων των βακτηρίων, μυκήτων και φυτών. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές είχε προταθεί πως οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι υπεύθυνες για την εμφανιζόμενη ενεργότητα πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων που είχε ανιχνευθεί παλιότερα στα θηλαστικά (Gounas *et al.*, 2008). Πράγματι, πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ένας από αυτούς τους μεταφορείς του *Rattus norvegicus*, ο rSNBT1, ως ο πρώτος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων των θηλαστικών, με υποστρώματα τις ουρακίλη, θυμίνη, υποξανθίνη, γουανίνη και ξανθίνη (Yamamoto *et al.*, 2010). Υποστρώματα του μεταφορέα αποτελούν επίσης τα τοξικά ανάλογα 5-φθόρο-ουρακίλη και οξυπουρινόλη. Η εξειδίκευση του συγκεκριμένου μεταφορέα είναι σαφώς πιο διευρυμένη από τα μυκητιακά ομόλογά του και μοιάζει αρκετά με μεταλλαγμένες μορφές του UapA (βλ. §1.5.1 – Πιν. 1-2). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο rSNBT1 είναι δευτερογενούς ενεργότητας συμμεταφορέας κατιόντων νατρίου. Ομόλογά του δεν φαίνεται να υπάρχουν στον άνθρωπο (Yamamoto *et al.*, 2010).

Οι πρωτεΐνες που ταξινομούνται με τους μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών προέρχονται όλες από σπονδυλωτά και υποδιαιρούνται σε δύο εξελικτικούς κλάδους, το ένα παρόμοιο με τον SVCT1 και το άλλο με τον SVCT2 (Εικ. 1-21). Τα περισσότερα σπονδυλωτά, εκτός από τα πρωτεύοντα, επίσης διαθέτουν NAT ομόλογα, τα οποία ταξινομούνται σε ξεχωριστό κλάδο, όπου και ανήκει ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων, rSNBT1. Τα ομόλογα αυτά όντως διαθέτουν συντηρημένες αλληλουχίες που μοιάζουν περισσότερο με τους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων βακτηρίων, μυκήτων και φυτών, παρά με τους μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών και είναι πολύ πιθανό να εμφανίζουν παρόμοιες ενεργότητες. Τελευταία έχει αρχίσει να γίνεται αντιληπτό

πως η συντήρηση συγκεκριμένων σημαντικών αμινοξικών καταλοίπων είναι πιο κρίσιμη για τον καθορισμό της εξειδίκευσης των μελών της οικογένειας NAT, παρά η πρωτοταγής αμινοξική ομοιότητα. Άλλωστε τα μέλη της οικογένειας NAT φαίνεται να έχουν αναπτύξει μια ιδιαίτερη πλαστικότητα ως προς την εξειδίκευση (Goudela *et al.*, 2005; Koukaki *et al.*, 2005).

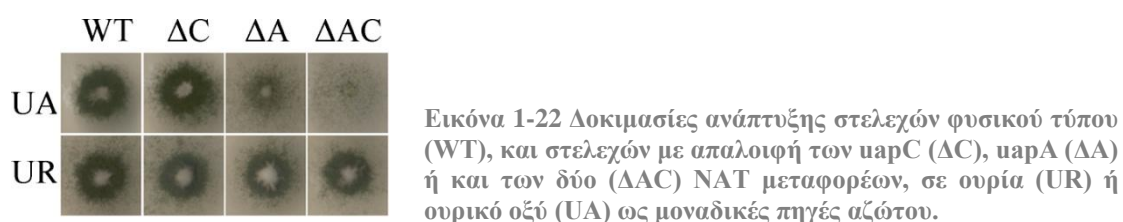


Εικόνα 1-21 Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις εξελικτικές σχέσεις επιλεγμένων NAT μεταφορέων. Σε φόντο βρίσκονται οι μεταφορείς ασκορβικού οξέος των μεταζώων. (Από Gournas *et al.*, 2008)

1.5.1.2 Ο ρόλος των NAT στη φυσιολογία των οργανισμών

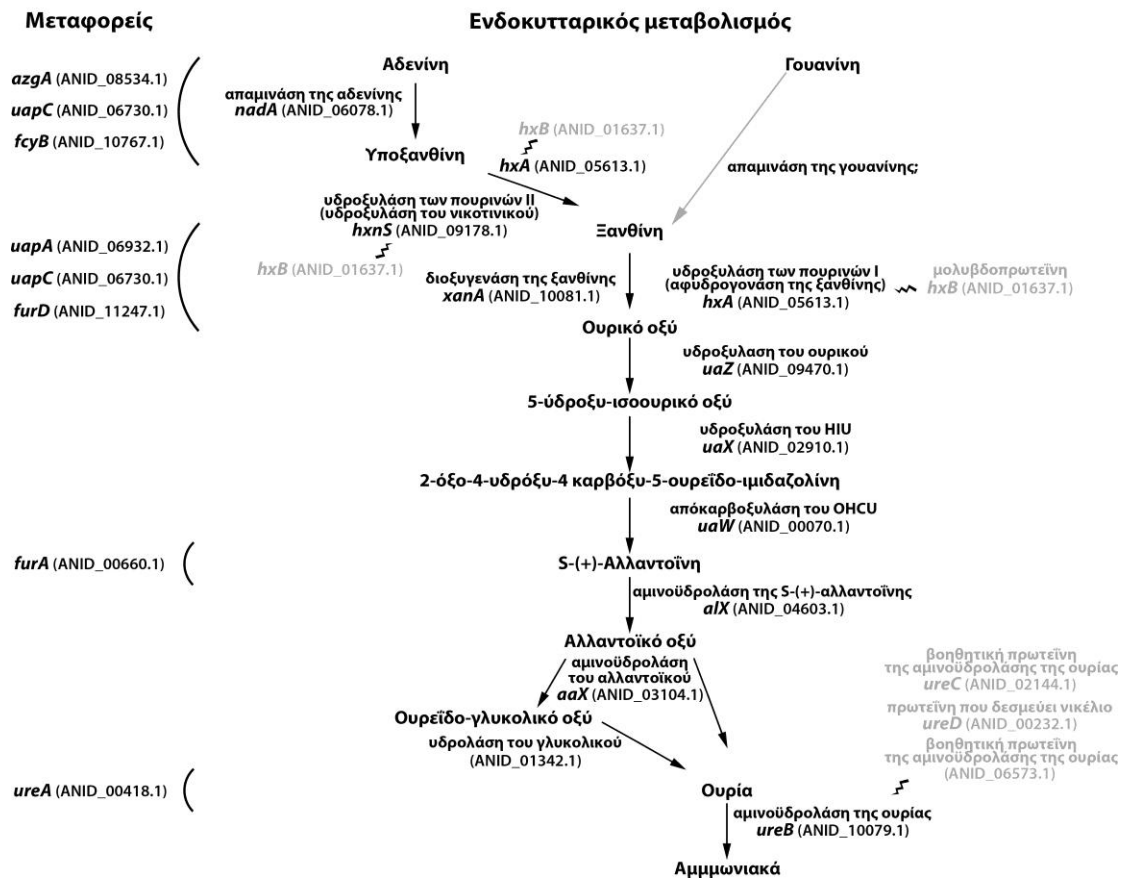
Στα Βακτήρια, τους Μύκητες και τα Φυτά οι NAT είναι υπεύθυνοι για την υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας πρόσληψη ουρικού οξέος και/ή ξανθίνης, ή ουρακίλης. Το ουρικό οξύ καταβολίζεται, μέσω συνεχόμενων οξειδώσεων, αρχικά σε ουρεΐδες και τελικά σε ουρία και αμμωνία, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια σχετικά καλή πηγή αζώτου (Pantazopoulou & Diallinas, 2007 – Εικ. 1-22, 1-23). Η ξανθίνη οξειδώνεται σε ουρικό οξύ, ακολουθώντας εν συνεχεία το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι. Το ουρικό οξύ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή

νουκλεοσιδίων και μόνο μερικά Βακτήρια και Φυτά μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ξανθίνη για αναβολικούς σκοπούς. Εν αντιθέσει, η ουρακίλη μπορεί άμεσα να κατευθυνθεί στη σύνθεση νουκλεοσιδίων και νουκλεϊκών οξέων, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή αζώτου. Κάποια όμως Βακτήρια (π.χ των γενών *Pseudomonas* και *Rhizobium*) χρησιμοποιούν την ουρακίλη για τη βιοσύνθεση αλανίνης και ασπαρτικού οξέος. Τα Βακτήρια χρησιμοποιούν τους NAT για την πρόσληψη ουρικού οξέος και/ή ξανθίνης ή ουρακίλης (Turner *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1995; Karatza & Frillingos, 2005; Parakostas & Frillingos, 2012), ενώ οι μύκητες για την πρόσληψη ουρικού οξέος και ξανθίνης (de Koning & Diallinas, 2000). Παρά το γεγονός πως όλα τα Βακτήρια έχουν NAT πρωτεΐνες, μόνο μερικά (π.χ *B. subtilis*) μπορούν να χρησιμοποιήσουν το ουρικό ή την ξανθίνη σαν πηγές αζώτου, ενώ τα υπόλοιπα δεν μπορούν (π.χ *E. coli*), λόγω ανεπαρκούς καταβολισμού. Διακριτοί φαινότυποι σχετιζόμενοι με τη λειτουργία των NAT παρατηρούνται εύκολα στον *A. nidulans*, όπου μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας των UapA ή UapC μεταφορέων οδηγούν σε ανεπαρκή αύξηση στις πουρίνες αυτές (Darlington & Scazzocchio, 1967; Pantazopoulou & Diallinas, 2007) (Εικ. 1-22).



Στα φυτά μόνο μια NAT πρωτεΐνη, η ZmLpeI (leaf permease1) του *Zea mays* έχει χαρακτηριστεί με λειτουργική συμπλήρωση ενός στελέχους του *A. nidulans* με έλλειψη στους ενδογενείς μεταφορείς πουρινών. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος, πολύ όμοια με τις μυκητιακές UapA και UapC πρωτεΐνες (Argyrou *et al.*, 2001). Ένα αλλήλιο απώλειας λειτουργίας του *lpe1* παρουσιάζει προβληματική χλωροπλαστική ανάπτυξη (Schultes *et al.*, 1996), χωρίς όμως ο Lpe1 να είναι πλαστιδιακός μεταφορέας. Το *lpe1* γονίδιο εκφράζεται σε μη-φωτοσυνθετικούς ιστούς, κυρίως στις ρίζες, και φαίνεται να αναστέλλεται από φως. Η έκφρασή του προτείνει πως ο μεταφορέας αυτός μπορεί να μην είναι μόνο υπεύθυνος για την πρόσληψη ουρικού οξέος/ξανθίνης, αλλά να σχετίζεται με την πλαστιδιακή λειτουργία και/ή μεταβολικές διαδικασίες που επηρεάζονται από το φως. Αρκετοί NAT έχουν επίσης μελετηθεί στην *Arabidopsis thaliana* αλλά η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη, αφού η ετερόλογή τους

έκφραση δεν ήταν επιτυχής ή στελέχη με διαγραφή γονιδίων δεν είχαν διακριτό φαινότυπο. Είναι μόνο γνωστό πως οι περισσότεροι έχουν γενική έκφραση, με ιδιαίτερη παρουσία σε φλοιωματικούς ιστούς, μια ένδειξη πως ίσως λειτουργούν στη αναδιανομή μεταβολιτών σε μεγάλες αποστάσεις (Maurino *et al.*, 2006).



Εικόνα 1-23 Το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών του *A. nidulans* και οι γνωστοί μεταφορείς αυτών. Μαζί με τις εκάστοτε ενζυμικές ενεργότητες παρατίθενται τα αντίστοιχα γονίδια, καθώς και ο κωδικός τους αριθμός. Η τεθλασμένη γραμμή υποδεικνύει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν γκρι χρώμα, όπως και το βέλος που υποδεικνύει την πιθανολογούμενη διάσπαση της γουανίνης σε υποξανθίνη.

1.5.1.3 Μέλη της οικογένειας NAT μεταφέρουν ασκορβικό οξύ στα κύτταρα των θηλαστικών

Η βιταμίνη C είναι μια αποτελεσματική αντιοξειδωτική και UV-απορροφητική (Ringvold *et al.*, 2000) ουσία, ενώ ενέχει σημαντικό ρόλο σε πολλές ενζυματικές αντιδράσεις ως συμπράγοντας. Η ποικίλλουσα διασπορά της μεταξύ έξω- και ενδο-κυτταρικών υγρών, η παρουσία της σε μια πληθώρα οργάνων και ιστών, και το γεγονός πως οι άνθρωποι έχουν χάσει τη δυνατότητα να τη βιοσυνθέτουν, οδήγησαν σε πολλές προσπάθειες για τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων και μοριακών στοιχείων των μεταφορικών της συστημάτων. Προκαταρκτικές μελέτες

στα θηλαστικά αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο διακριτών συστημάτων, ένα για την χαμηλής συγγένειας μεταφορά της οξειδωμένης της μορφής, ανυδρο-ασκορβικό οξύ, και άλλο ένα υπεύθυνο για την υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας πρόσληψη του L-ασκορβικού οξέος. Το πρώτο πραγματοποιείται από τους διευκολυνόμενης διάχυσης μεταφορείς εξοζών (GLUT1, GLUT3 και GLUT4) (Rumsey *et al.*, 1997; Rumsey *et al.*, 2000), οι οποίοι διαθέτουν τιμές συγγένειας δέσμευσης για το ανυδρο-ασκορβικό της τάξης του 1 mM. Η φυσιολογική σημασία αυτού είναι υπό αμφισβήτηση, αφού η βιταμίνη C σπάνια βρίσκεται σε τέτοια μορφή *in vivo*, και η συγκέντρωση των εξοζών, που τυγχάνουν πολύ μεγαλύτερης συγγένειας για αυτούς τους μεταφορείς, είναι υψηλότερη. Το δεύτερο αποτελείται από δύο μέλη της οικογένειας NAT, τους SVCT1 και SVCT2 (Daruwala *et al.*, 1999), που πραγματοποιούν ενεργό συμμεταφορά βιταμίνης C και ιόντων νατρίου. Τα ομόλογά τους στον αρουραίο ήταν αυτά που κλωνοποιήθηκαν πρώτα το 1999 (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Στους ανθρώπους, η NAT οικογένεια περιλαμβάνει τους hSVCT1 και hSVCT2, καθώς και δύο ορφανά μέλη, τους hSVCT3 και hSVCT4 (Daruwala *et al.*, 1999).

Όπως υποδεικνύεται από τις λειτουργικές τους διαφορές, την κατανομή τους στους ιστούς και στην πολικότητα της μεμβράνης, οι δύο μεταφορείς έχουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους. Ο SVCT1 είναι υπεύθυνος για την διατήρηση της σωματικής ομοιόστασης ασκορβικού οξέος, μέσω διαιτητικής απορρόφησης και νεφρικής επαναπρόσληψης. Ο SVCT2 έχει επιφορτισθεί με την πρόσληψη βιταμίνης C σε μεταβολικά ενεργές και εξειδικευμένες δομές, προστατεύοντάς τες από το οξειδωτικό στρες και την υπεριώδη ακτινοβολία. Ποντίκια ομόζυγα για διαγραφή του *slc23a2* πέθαναν αμέσως μετά τη γέννηση, παρά τη φυσιολογική ανάπτυξη που είχαν στη μήτρα (Sotiriou *et al.*, 2002). Η αιτία θανάτου ήταν η αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω διάχυτης εγκεφαλικής αιμορραγίας, που υποδεικνύει προβληματικές λειτουργίες του νευρικού συστήματος. Τα ετερόζυγα επιβίωσαν ως την ενηλικίωση αλλά είχαν μειωμένα επίπεδα ασκορβικού οξέος στον εγκέφαλο και πολλούς άλλους ιστούς. Η μελέτη αυτή έδειξε την απόλυτη ανάγκη του SVCT2 κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής, που επιβεβαιώνεται από το ρόλο του μεταφορέα στην πρόσληψη ασκορβικού οξέος στον πλακούντα (Biondi *et al.*, 2007). Φαίνεται πως η μητρική παροχή βιταμίνης C είναι πολύ σημαντική στα θηλαστικά, αφού η βιοσύνθεση ασκορβικού αρχίζει αργά κατά την κύηση. Τα πρωτεύοντα δεν βιοσυνθέτουν καθόλου ασκορβικό, υποδεικνύοντας ένα πιο κρίσιμο ρόλο της μεταφοράς του.

Κάποιες γενετικές ισομορφές των SVCT του ανθρώπου έχουν συσχετισθεί με πρόωρο τοκετό (Erichsen *et al.* 2006).

Οι δύο μεταφορείς έχουν δειχθεί να εκφράζονται σε μια πληθώρα ιστών. Ένας σημαντικός ρόλος του SVCT2 είναι η ανάπτυξη, ωρίμανση και οξειδωτική προστασία των νευρώνων του εγκεφάλου (Tsukaguchi *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2007). Υψηλή έκφραση του SVCT2 έχει επίσης δειχθεί στους οφθαλμούς (Obrenovich *et al.*; 2006) όπου το ασκορβικό πιστεύεται πως παίζει σημαντικό UV-απορροφητικό ρόλο, ανάλογο του ουρικού στα έντομα και τα πτηνά, και ίσως στους μύκητες. Είναι αξιοσημείωτο πως τα νυκτόβια θηλαστικά και πτηνά έχουν μειωμένα επίπεδα ασκορβικού και ουρικού οξέος στο μάτι αντίστοιχα, σε σχέση με τους ημερόβιους συγγενείς τους. Ο SVCT2 έχει επίσης δειχθεί να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα επινεφρίδια (Bornstein *et al.*, 2003; Patak *et al.*, 2004) και το μυελό των οστών (Wu *et al.*, 2004; McNulty *et al.*, 2005), όπου το ασκορβικό έχει αντιοξειδωτικούς και ρυθμιστικούς ρόλους.

1.5.2 Σχέσεις δομής-λειτουργίας της οικογένειας NAT σε πρότυπα μικροβιακά συστήματα – Το παράδειγμα του UapA

Οι σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT έχουν μελετηθεί κυρίως στον ευκαρυωτικό μεταφορέα UapA, αλλά και στον προκαρυωτικό XanQ (Εικ. 1-19). Ο UapA είναι ένα υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας μεταφορέας ουρικού οξέος και ξανθίνης στον νηματοειδή ασκομύκητα *A. nidulans* και ένας από τους πιο εκτενώς μελετημένους συμμεταφορείς διαλυμένης ουσίας/H⁺ της οικογένειας NAT, τόσο σε γενετικό όσο και σε βιοχημικό επίπεδο (Gorfinkiel *et al.*, 1993; Gournas *et al.*, 2008; Diallinas *et al.*, 2008). Χιμαιρικές κατασκευές του με τον UapC (ένα κινητικά διακριτό παράλογο του UapA) (Diallinas *et al.*, 1998) και τυχαία επιλεγμένες ή ορθολογικά σχεδιασμένες μεταλλαγές, έχουν μελετηθεί με μικροσκοπική παρατήρηση (με συνεξυγμένη την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη – GFP) και λεπτομερή κινητική ανάλυση των λειτουργικών μεταλλαγών χρησιμοποιώντας μια συλλογή αναλόγων πουρίνης. Οι παραπάνω μελέτες έχουν οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα ως προς τις σχέσεις δομής-λειτουργίας του εν λόγω μεταφορέα (Meintanis *et al.*, 2000; Amillis *et al.*, 2001; Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou & Diallinas, 2006; Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008β). Πολλά άλλαξαν με την απόκτηση της κρυσταλλογραφικής δομής του πρώτου NAT ομολόγου, UraA, της *E. coli* (Lu *et al.*, 2011).

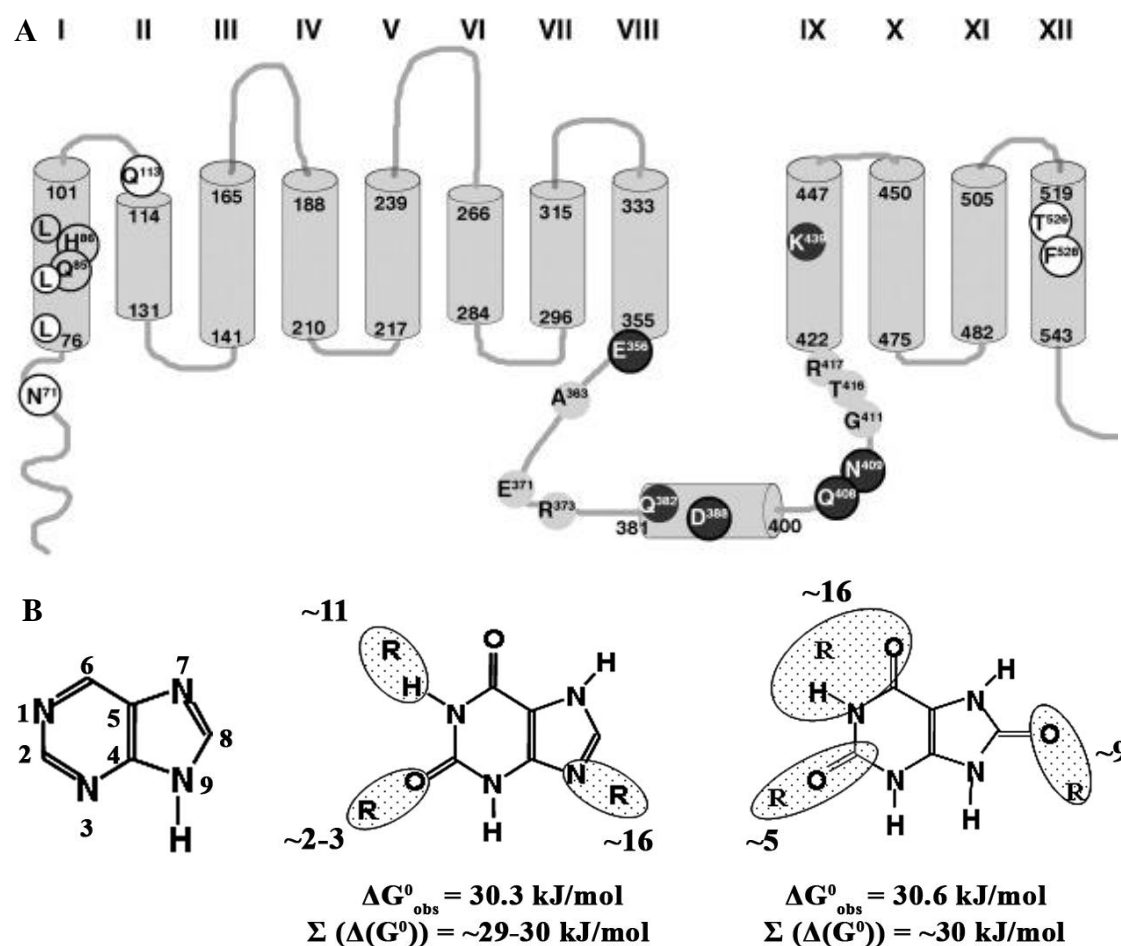
1.5.2.1 Μοντέλο της δευτεροταγούς δομής του UapA

Σύμφωνα με προγράμματα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής ο μεταφορέας φαίνεται να αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές α-έλικες, ενωμένες μεταξύ τους με μικρότερους ή μεγαλύτερους βρόχους (Εικ. 1-24Α). Όλοι οι αλγόριθμοι προβλέπουν τα διαμεμβρανικά τμήματα που εμφανίζονται στην εικόνα ως TMS1-TMS9 και TMS12. Η επέκταση του TMS9 κατά δύο α-ελικοειδείς σπείρες βασίστηκε στα αποτελέσματα της Cys-σάρωσης (βλ. §1.5.2.3) στον μεταφορέα XanQ (Karatza *et al.*, 2006). Οι περισσότεροι αλγόριθμοι προβλέπουν επίσης τα TMS10-TMS11 όπως φαίνονται στην εικόνα. Μερικοί αλγόριθμοι προβλέπουν ένα επιπλέον TMS στο βρόχο μεταξύ των TMS8 και TMS9 (οριζόντιος κύλινδρος στην Εικ. 1-24Α). Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, τα TMSs προβλέπεται να είναι κυρίως α-ελικοειδή και εντός της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Το μοντέλο φαίνεται, επίσης, να υπακούει στον κανόνα των θετικών προς τα έξω, όσον αφορά τους βρόχους που ενώνουν τα TMSs. Με βάση τα παραπάνω, έχει προταθεί ότι η επιπλέον α-έλικα μεταξύ των TMS8 και TMS9 θα μπορούσε να είναι μια ευέλικτη και δυναμική περιοχή (επαναισερχόμενος βρόχος - reentrant loop), που αποκτά εναλλακτική τοπολογία κατά τη διάρκεια της δέσμησης του υποστρώματος και της μεταφοράς (Papageorgiou *et al.*, 2008β). Τέλος, σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο στην περιοχή που συνδέει τα διαμεμβρανικά τμήματα 8 και 9 (TMS8-TMS9), τον μακρύ αμφιφιλικής φύσης βρόχο, εντοπίζεται το χαρακτηριστικό μοτίβο της οικογένειας ⁴⁰⁶FQNNGVIALTRCANR⁴²¹ (βλ. §1.5.1) και περιέχονται βασικά στοιχεία της δέσμησης και της μεταφοράς του υποστρώματος (Meintanis *et al.*, 2000; Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008β).

1.5.2.2 Γενετικά και βιοχημικά δεδομένα για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας στον UapA

Από γενετικές μελέτες φάνηκε ότι τα στοιχεία που συμμετέχουν στη δέσμηση και τη μεταφορά του υποστρώματος αντανakλώνται σε τέσσερα αναντικατάστατα αμινοξέα (E356, D388, Q408, N409) και πολλά άλλα κατάλοιπα που επηρεάζουν τη λειτουργία, τη συγγένεια δέσμησης του υποστρώματος ή την εξειδίκευση του UapA (A363, E371, R373, G411, T416, R417). Κινητικές ενδείξεις υποδηλώνουν έντονα ότι το παραπάνω μοτίβο αλληλεπιδρά με το ιμιδαζολικό τμήμα της ξανθίνης, του ουρικού οξέος ή άλλων υποστρωμάτων του UapA (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005). Σε αυτήν την αλληλεπίδραση, το Q408 θα μπορούσε να κάνει άμεσα

δεσμό υδρογόνου με τη θέση N9 ή C8=O της ξανθίνης ή του ουρικού οξέος, αντίστοιχα (Εικ. 1-23B), ενώ το N409 φαίνεται να είναι ένα δυναμικό στοιχείο απολύτως αναγκαίο για την κατάλυση της μεταφοράς. Τα G411 και T416 είναι σημαντικά για την εξειδίκευση του UapA για ξανθίνη και ουρικό οξύ, ενώ το R417 αυξάνει τη συγγένεια του UapA ειδικά για ουρικό οξύ (Koukaki *et al.*, 2005; Goudela *et al.*, 2005).



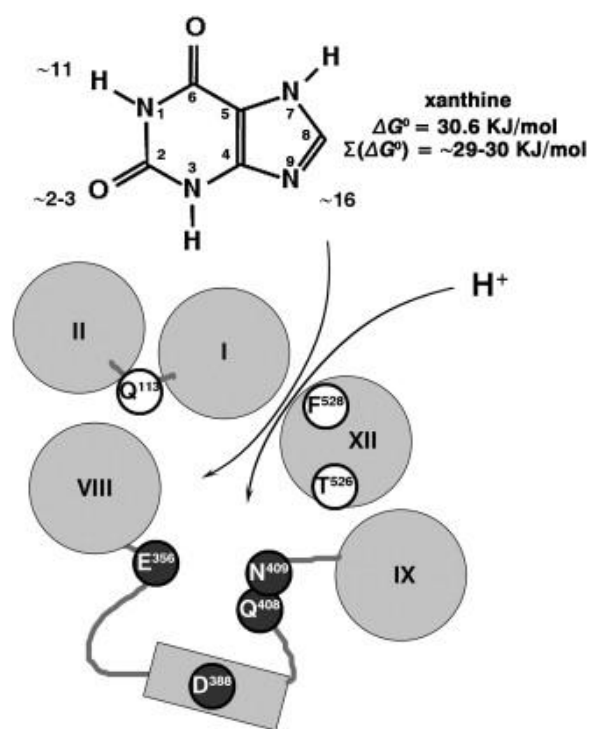
Εικόνα 1-24 Μοντέλα του UapA. **A.** Μοντέλο δευτεροταγούς δομής του UapA βάσει διαφόρων αλγορίθμων (PredictProtein, HHpred, TMHMM, SOSUI, TMAP, TopPred, κλπ.), το πρόγραμμα Conseq (<http://conseq.tau.ac.il/>), και μικρές χειροκίνητες τροποποιήσεις ανάλογα με την παρουσία καταλοίπων προλίνης στα όρια των υποθετικών ελίκων. Τα I-XII αντιπροσωπεύουν τις διαμεμβρανικές περιοχές (TMS). Υποδεικνύονται οι αριθμοί των αμινοξέων στα όρια των TMSs. Οι λευκοί και μαύροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν αμινοξέα που συμμετέχουν στην αλλαγή της εξειδίκευσης ή της λειτουργίας του UapA, αντίστοιχα. Άλλα αμινοξέα ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία επισημαίνονται με γκρι κύκλους. (Parageorgiou *et al.*, 2008β) **B.** Μοντέλα των αλληλεπιδράσεων του UapA με τα υποστρώματά του. Οι ΔG^0 υπολογίζονται από το αντίστοιχο K_i [όπου $K_i = IC_{50}/[1+(L/K_m)]$]. Το R αντιπροσωπεύει ένα αμινοξύ στον μεταφορέα το οποίο αλληλεπιδρά, μέσω ενός δεσμού υδρογόνου, με μια συγκεκριμένη θέση της πουρίνης (Τροποποιημένο από Gournas *et al.*, 2008).

Ένας απολύτως απαραίτητος λειτουργικός ρόλος έχει αποδοθεί στο E356, ενώ το D388 φαίνεται να ενέχει δομικό ρόλο και όχι λειτουργικό (Parageorgiou *et al.*, 2008β). *In silico* προβλέψεις, αναζήτηση στις δομικές βάσεις δεδομένων και

δεδομένα από NMR πρότειναν ότι τα λειτουργικά αμινοξικά κατάλοιπα ⁴⁰⁸QNNG⁴¹¹ πρέπει να διαμορφώνουν μια θηλιά, πιθανώς συμπεριλαμβανομένης και μιας β-στροφής (Parachristodoulou και συνεργάτες, αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου του Καθ. Ε. Μικρού).

Έχει βρεθεί επίσης με μεταλλαγές ότι τρία κατάλοιπα διευρύνουν την εξειδίκευση του UapA χωρίς να επηρεάζουν την κινητική συμπεριφορά του ως προς φυσιολογικά υποστρώματα, ουρικό οξύ και ξανθίνη. Αυτά είναι τα T526 και F528 στο TMS12 και το Q113 στον μικρό υποθετικό περιπλαστικό βρόχο που συνδέει τα TMS1 και TMS2 (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006; Parageorgiou *et al.*, 2008β – Εικ. 1-24A). Πιο συγκεκριμένα, κατασταλτικές μεταλλαγές δεύτερης θέσης της κρουοευσθησίας της Q408E μεταλλαγής του UapA εντοπίστηκαν αρχικά στο αμινοξικό κατάλοιπο F528 μέσα στο προβλεπόμενο TMS12 (Amillis *et al.*, 2001). Συστηματική στοχευμένη μεταλλαξιγένεση έδειξε πως όταν αυτό το αμινοξύ υποκαθίσταται από μικρά ή αλειφατικά αμινοξέα (F→A/S), ο UapA μετατρέπεται σε έναν χαμηλής συγγένειας, υψηλής μεταφορικής ικανότητας μεταφορέα για όλα τα είδη των πουρινών, χωρίς επίπτωση στην υψηλή του συγγένεια για τα φυσιολογικά του υποστρώματα, ουρικά οξύ και ξανθίνη (Vlanti *et al.*, 2006). Με άλλα λόγια, το F528 του TMS12 συμμετέχει σε ένα πολύ αποδοτικό “φίλτρο επιλεκτικότητας” (specificity filter), το οποίο αποκλείει πουρίνες εκτός από το ουρικό οξύ και την ξανθίνη από το κέντρο δέσμευσης του UapA. Μόλις αφαιρεθεί το φίλτρο (με μετάλλαξη του F), ο UapA μπορεί ακόμα να δεσμεύσει (σε 5-10 μM) και να μεταφέρει τα φυσιολογικά υποστρώματά του, τόσο αποτελεσματικά όσο και ο φυσικού τύπου μεταφορέας, αλλά μπορεί επίσης να δεσμεύσει και να μεταφέρει αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη και άλλα πουρινικά ανάλογα, όταν παρέχονται σε συγκεντρώσεις της τάξης του mM. Είναι ενδιαφέρον πως συγκεκριμένοι συνδυασμοί μεταλλαγών του F528 με υποκαταστάσεις του Q408 οδηγούν σε μια σειρά μορίων UapA με διαφορετικά χαρακτηριστικά κινητικής και εξειδίκευσης. Αυτό προτείνει μια μοριακή “συνομιλία” της περιοχής δέσμευσης των πουρινών, που καθορίζεται από την αλληλουχία-μοτίβο των NAT, και το φίλτρο επιλεκτικότητας στο TMS12, η οποία καθορίζει τα κινητικά χαρακτηριστικά και την εξειδίκευση του UapA. Με όμοιο τρόπο και χαρακτηρισμό μεταλλαγμένων στελεχών (Q113→L/E, T526→M/L – Vlanti *et al.*, 2006; Parageorgiou *et al.*, 2008β) αποδόθηκε στα τρία αυτά κατάλοιπα (Q113, T526 και F528) ο χαρακτηρισμός “στοιχεία μοριακού φίλτρου επιλεκτικότητας”.

Μια ασθενέστερη αλλά παρόμοια επίδραση στην εξειδίκευση του UarA προέκυψε επίσης με αρκετές ορθολογικά σχεδιασμένες μεταλλάξεις κατά μήκος του TMS1 (N71→A/D/Q, L77→A, L84→A – Parageorgiou *et al.*, 2008β) , μερικές από τις οποίες μπορεί επίσης να επηρεάζουν τη λειτουργία και ανακύκλωση (turnover) του UarA ($^{85}\text{QH}^{86}$ – Argyrou *et al.*, 2001; Gournas *et al.*, 2010; Amillis *et al.*, 2011). Ειδικές αλληλεπιδράσεις και κινητικές μελέτες υποδηλώνουν έντονα ότι η διαφορετική τοποθέτηση των TMS1 και TMS12 σε σχέση με την περιοχή TMS8-TMS9 ενεργεί ως ένα δυναμικό φίλτρο που επιτρέπει ή περιορίζει την πρόσβαση των διαφορετικών πουρινών στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος (Εικ. 1-25 – Parageorgiou *et al.*, 2008β).



Εικόνα 1-25 Μοντέλο των περιοχών του UarA που αλληλεπιδρούν με την ξανθίνη. Το σκεπτικό για τον εντοπισμό των θέσεων του δακτυλίου της ξανθίνης που αλληλεπιδρούν με τον UarA έχει ως εξής: Με τη σύγκριση των διαφορών τιμών ΔG° , που υπολογίζονται από τιμές K_i , κατά την αλληλεπίδραση των δύο υποθετικών υποστρωμάτων που διαφέρουν σε μία μόνο θέση κάθε φορά (π.χ., ξανθίνη έναντι υποξανθίνης ή 2-θειοξανθίνης), υπολογίζεται η συνεισφορά αυτής της θέσης (π.χ., C2) στην πρόσδεση. Στην περίπτωση των αναλόγων με ογκώδεις υποκαταστάσεις, η διάκριση μεταξύ ενεργειακών απωλειών λόγω τροποποίησης της θέσης που εμπλέκεται άμεσα στη δέσμευση ή τροποποίησης από στερεοχημική παρεμπόδιση βασίστηκε στην κινητική συμπεριφορά στελεχών που φέρουν μεταλλάξεις εξειδίκευσης. (Parageorgiou *et al.*, 2008β)

Με βιοχημικές αναλύσεις, οι οποίες επιτρέπουν τη μετατροπή των τιμών συναγωνιστικής αναστολής (K_i) διαφόρων νουκλεοτιδικών βάσεων σε διαφορά ελεύθερης ενέργειας ΔG° , έχουν γίνει προσπάθειες εκτίμησης του βαθμού συνεισφοράς κάθε θέσης του πουρινικού δακτυλίου στις αλληλεπιδράσεις με το UarA (Εικ. 1-24B και §1.5.3). Προτείνεται ότι οι πουρίνες δεσμεύονται σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα του UarA μέσω ενός ισχυρού ιοντικού δεσμού πρωτονίων με το N₁-H, ενός ασθενέστερου δεσμού H με το O₂, και ενός τρίτου, πιο ευλύγιστου δεσμού, με ένα δέκτη πρωτονίων (N₇, N₉ ή O₈) του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Η ευλυγισία της τρίτης επαφής μπορεί να εξηγήσει τις διαφορετικές

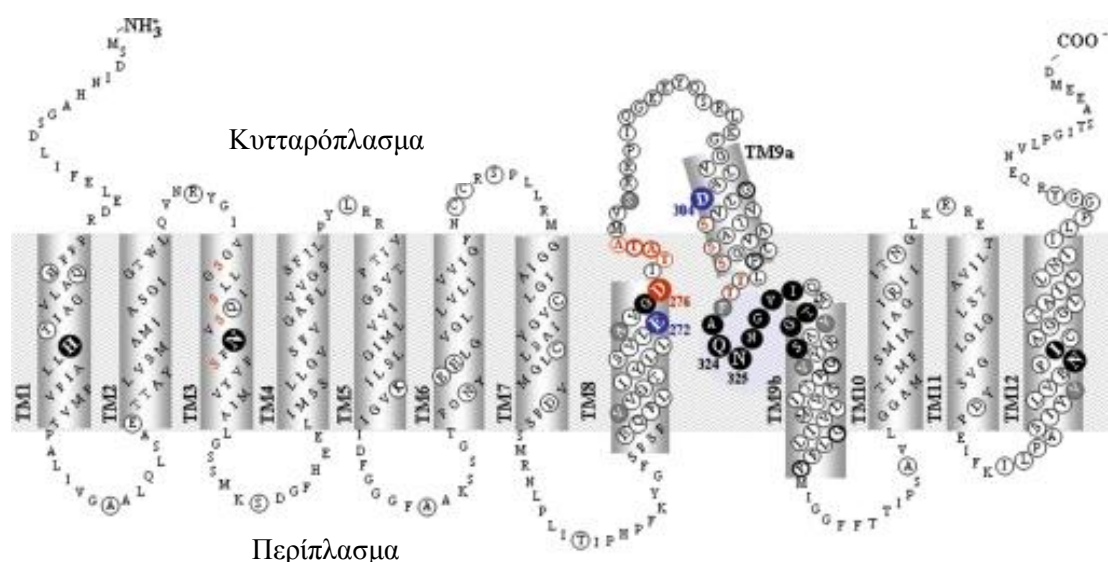
συγγένειες πρόσδεσης διαφόρων αναλόγων ουσιών συμπεριλαμβανομένων και των φαρμάκων αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη. Αντίστοιχα μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για τα ομόλογα του UapA στην *Candida albicans* (Uap1) και την *E.coli* (XanQ & XanP) (Karantza & Frillingos, 2005). Συγκριτικές αναλύσεις των τεσσάρων μοντέλων έδειξαν ότι οι μεταφορείς UapA, Uap1 και XanP αλληλεπιδρούν με παρόμοιους υδρογονοδεσμούς με τον πουρινικό δακτύλιο. Οι αλληλεπιδράσεις με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο φάνηκε να είναι εξαρτώμενες και από τον μεταφορέα και από την ουσία, και περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου με τις θέσεις N₉ (ξανθίνη), O₈ (ουρικό οξύ) ή N₇ (διάφορα ανάλογα). Παρ' όλο που όλοι οι μεταφορείς δεσμεύουν την ξανθίνη με παρόμοια υψηλή συγγένεια, η δέσμευση του ουρικού οξέος αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μεταφορέων μυκήτων.

1.5.2.3 Γενετικά και βιοχημικά δεδομένα για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας στον XanQ

Ο ρόλος της συντηρημένης αλληλουχίας-μοτίβο των NAT και των περιοχών που την πλαισιώνουν έχει μελετηθεί επίσης στον XanQ μεταφορέα ξανθίνης της *E. coli* με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και κυστεϊνική σάρωση, δίνοντας εντυπωσιακά παρόμοια συμπεράσματα σχετικά με το λειτουργικό ρόλο των αμινοξικών καταλοίπων Q324, N325 και G327 του σε σχέση με τα ομόλογα κατάλοιπα (Q408, N409 και G411) του UapA. Ο ρόλος των άλλων δύο, συντηρημένων στη συναινετική αλληλουχία των NAT, καταλοίπων των UapA και XanQ (T416 και R417 ή T332 και G333, αντίστοιχα – Εικ. 1-26) ερευνήθηκε επίσης και αποδείχθηκαν να διαδραματίζουν βοηθητικό ρόλο στον καθορισμό της εξειδίκευσης της πρόσληψης, ειδικά όσον αφορά την αναγνώριση του ουρικού οξέος ή άλλων υποστρωμάτων τροποποιημένων στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου (Karantza & Frillingos, 2005; Goudela *et al.*, 2005).

Χρησιμοποιώντας έναν λειτουργικό μεταφορέα XanQ απαλλαγμένο από κυστεϊνικά κατάλοιπα (ακυστεϊνικός), κάθε αμινοξικό κατάλοιπο της αλληλουχίας ³¹⁵GSLPITTF AQNNGVIQMTGVASRYVG³⁴⁰ (της αντίστοιχης στον UapA ³⁹⁹TMTPTTFQ NNGVIALTRCANRWAG⁴²⁴) αντικαταστάθηκε μεμονωμένα με Cys (ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε κυστεϊνες, cysteine scanning mutagenesis – Frillingos *et al.*, 1994). Η επίδραση του NEM (*N*-ethylmaleimide), ένα αντιδραστήριο σουλφυδρυλίωσης με ικανότητα διάσχισης της πλασματικής μεμβράνης, στο αρχικό ποσοστό μεταφοράς ξανθίνης και η ανάλυση της αλκυλιοποίησης κάθε μονής cys-

μεταλλαγής στην ακολουθία 315-340, έδειξαν ότι τα κατάλοιπα A323, N326, G327, V328, I329, T332, G333 και S336 μπορούν να αντικατασταθούν με Cys χωρίς να επηρεασθεί η λειτουργικότητα του μεταφορέα, αλλά υποβάλλονται σε ισχυρή παρεμπόδιση κατά την περαιτέρω τροποποίηση από NEM. Η πιο εύλογη εξήγηση για αυτό είναι ότι αυτά τα κατάλοιπα σχετίζονται είτε με τις διαμορφωτικές αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την κατάλυση της μεταφοράς, είτε με τη σταθερότητα και το χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης. Το ίδιο έδειξε και τροποποίηση των συγκεκριμένων μεταλλαγών με 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate {MTSES(-)} (Georgoroulou *et*

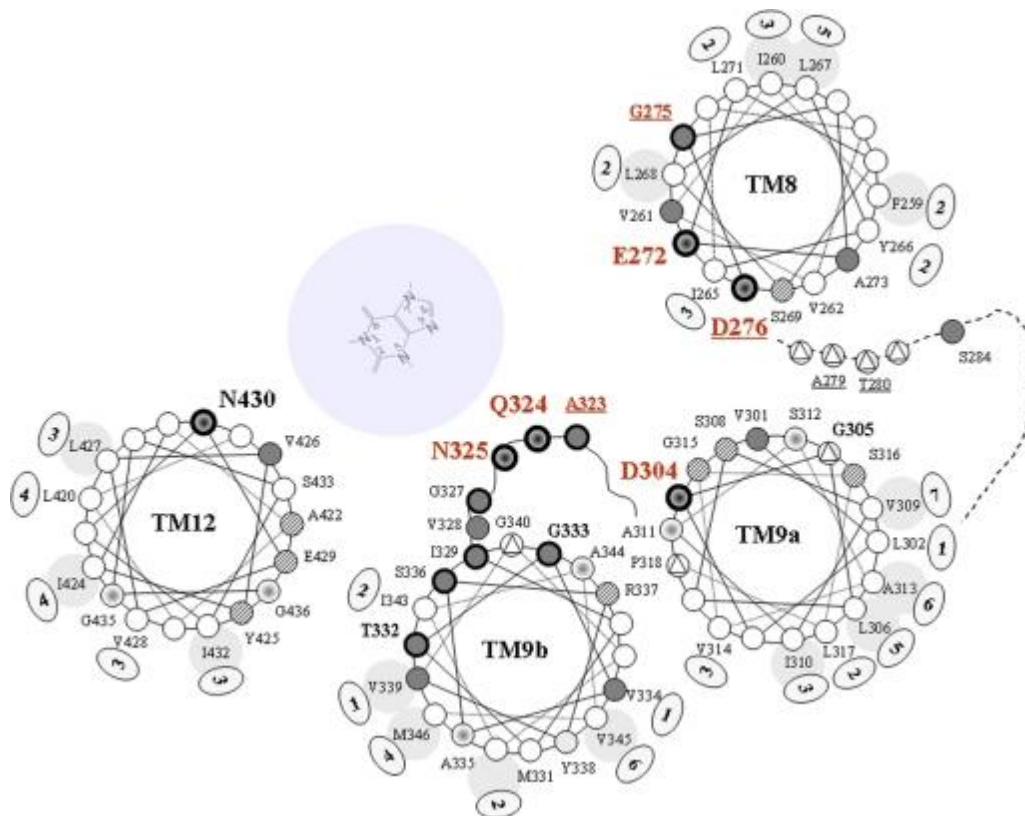


Εικόνα 1-26 Μοντέλο της δευτεροταγούς δομής του XanQ. Το μοντέλο βασίζεται στο πρόγραμμα TMHMM, σε πειραματικά στοιχεία πως η C τερματική περιοχή είναι κυτταροπλασματική (7, 15) και αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου, σχετικά με την προσβασιμότητα των βρόχων σε υδρόφιλα αντιδραστήρια. Αναντικατάστατα κατάλοιπα του XanQ είναι αριθμημένα και τονισμένα. Οι ευαίσθητες σε NEM θέσεις εμφανίζονται σε σκούρο φόντο. Τα κατάλοιπα που αναλύθηκαν με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση είναι κυκλωμένα. Η διαφορούμενη τμήμα τοπολογία του τμήματος 299-319 αναρροϊκά του μοτίβου NAT χαρακτηρίζεται ως TM9a, και το αμφιπαθικό τμήμα 330-354 που ακολουθεί χαρακτηρίζεται ως TM9b. Η σύντομη αλληλουχία που παρεμβάλλεται μεταξύ των TM9a και TM9b υποδεικνύεται ως ένας επανεισερχόμενος βρόγχος με υδρόφιλο κυτταροπλασματικό μέτωπο, με βάση τα στοιχεία σχετικά με την προσβασιμότητα του διαλύτη και τις ιδιότητες αναγνώρισης του υποστρώματος των καταλοίπων του NAT μοτίβου. Το κατάλοιπο D276 (TM8) και η καταρροϊκή αλληλουχία ²⁷⁸TATA²⁸¹, καθώς και τα κατάλοιπα που σχηματίζουν ένα συνεχόμενο α-ελικοειδές υδρόφιλο μέτωπο στο TM9a εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. (Mermelekas *et al.*, 2010)

al., 2010), έναν αλκυλιωτικό παράγοντα που, όμως, αδυνατεί να διασχίσει την υδρόφοβη πλασματική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως η συναινετική αλληλουχία των NAT είναι προσβάσιμη περιπλασματικά, αν και έχει κυτταροπλασματική τοπολογία. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός πως η ικανότητα άμεσης αντίδρασης με το NEM της μεταλλαγής A323C ενισχύεται σημαντικά παρουσία ξανθίνης, γεγονός που προτείνει ότι αυτό το τμήμα των

καταλοίπων έχει δυναμικά ενεργή διαμόρφωση και υποβάλλεται σε μετακινήσεις που συνδέονται με τον κύκλο μεταφοράς της πρωτεΐνης. Τέλος, η ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε κυστεΐνες παρείχε στοιχεία συμβατά με την θεώρηση πως τα κατάλοιπα 329-339, που βρίσκονται καταρροϊκά της συναινετικής αλληλουχίας των NAT, έχουν δομή τριών στροφών α -έλικας, με τα υπολείμματα I329, T332, G333, S336 και V339 να είναι σε μια περιοχή ευαίσθητη σε αλκυλίωση με τρόπο που είναι σημαντικό για τη μεταφορά (Karatza *et al.*, 2006). Αυτά τα συμπεράσματα πρότειναν ότι η υποθετική διαμεμβρανική έλικα μετά από την συναινετική αλληλουχία των NAT (TMS9) πρέπει να επεκταθεί με δύο πρόσθετες ελικοειδείς στροφές μέσα στην προηγούμενη υδρόφιλη θηλιά (βλ. §1.5.2.1).

Κατάλοιπα του TMS12 του XanQ, που αντιστοιχούν και με τα κατάλοιπα επιλεκτικότητας του UapA, έχουν βρεθεί να είναι κι εδώ απολύτως κρίσιμα για τη λειτουργία του μεταφορέα, αλλά όχι για την επιλεκτικότητα υποστρωμάτων (Papakostas *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα, οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι τα N430 (το αντίστοιχο T526 στον UapA) και I432 (F528 στον UapA) θέτουν στερικούς περιορισμούς στο υπόστρωμα ή στην πρόσδεσή του, προκαλώντας χαμηλής συγγένειας δέσμευση του φυσιολογικού υποστρώματος ξανθίνη ή άλλων ογκωδών αναλόγων. Στην περίπτωση του N430 οι στερικές παρεμποδίσεις φαίνεται να πραγματοποιούνται με άμεση αλληλεπίδραση, ενώ το I432 που βρίσκεται από την άλλη πλευρά της έλικας τις δημιουργεί έμμεσα, πιθανώς λόγω αλληλεπίδρασης με το Q324 (Q408 στον UapA). Οι ίδιοι συγγραφείς επίσης προτείνουν ότι τα αμινοξέα που συγκεντρώνονται σε μια πλευρά των ελίκων TMS9 και TMS12 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε στοχευμένη αλκυλιοποίηση, και ότι τα TMS8, TMS9 και TMS12 ίσως αλληλεπιδρούν λειτουργικά και πιθανώς φυσικά (Εικ. 1-27). Βιοχημικές αναλύσεις του XanQ φυσικού τύπου, αλλά και μεταλλαγών του έδειξαν ότι ο μεταφορέας αυτός αλληλεπιδρά κυρίως με το N_3-H και το O_2 , και λιγότερο με το N_1-H (με το οποίο αλληλεπιδρά ο UapA – Εικ. 1-25) (Mermelekas *et al.*, 2010).



Εικόνα 1-27 Υποθετική διάταξη των TM8, TM9a, TM9b και TM12 στον μεταφορέα XanQ από κυτταροπλασματική όψη. Τα τμήματα της αλληλουχίας του XanQ εμφανίζονται ως ελικοειδή σχήματα των καταλοίπων 259-276 (TM8), 301-318 (TM9a), 329-346 (TM9b) και 419-436 (TM12). Τα τέσσερα αναντικατάστατα κατάλοιπα E272, D304, Q324, N325 (κόκκινα) και D276 (περιέχει μία σημαντική καρβοξυλομάδα – κόκκινο, υπογραμμισμένο) και το N430, που γειτνιάζει με τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος (9) είναι μεγενθυμένα, με έντονα γράμματα και εμφανίζονται ως στόχοι. Οι ευαίσθητες σε NEM μονές Cys μεταλλαγές που εμφανίζονται με σκούρο φόντο, και οι υψηλά ευαίσθητες περιοχές ($IC_{50} \leq 30 \mu\text{M}$) εμφανίζονται με εντονότερη περιφέρεια. Οι θέσεις που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος με αυξημένη ευαισθησία στην απενεργοποίηση από NEM αναφέρονται με κόκκινο χρώμα και είναι υπογραμμισμένες (A323, G275). Οι θέσεις όπου μεταλλαγές αυτών βλάπτουν την έκφραση του μεταφορέα στη μεμβράνη υποδεικνύονται με τρίγωνο. Το μοτίβο NAT (μεταξύ των TM9a και TM9b) υποδεικνύεται ως επανεισερχόμενος βρόχος με κυτταροπλασματικό μέτωπο και προσπελάσιμη στο υπόστρωμα εσωτερική κοιλότητα. Τα κατάλοιπα που διατηρούνται είτε αυτά καθαυτά είτε όσον αφορά τον χαρακτήρα της πλευρικής τους αλυσίδας στα γνωστά μέλη της οικογένειας υποδεικνύονται μεγενθυμένα. Οι θέσεις που διατηρούν μία υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα στα γνωστά μέλη υποδεικνύονται από μια μεγαλύτερη ανοιχτόχρωμη γκρι περιοχή στο εξωτερικό της έλικας. Θέσεις που διατηρούν υδρόφοβα κατάλοιπα σε μέλη με στενή ομολογία αλληλουχίας με τον XanQ (ταυτότητα αλληλουχίας $\geq 43\%$) υποδεικνύονται με ένα πρόσθετο μικρό οβάλ στο εξωτερικό της έλικας με έναν αριθμό που δηλώνει τον αριθμό των διαφορετικών υποκαταστάσεων αμινοξέων που βρέθηκαν σε κάθε θέση. Θέσεις που διατηρούν μία υδρόφιλη ή μία μικρή πλευρική αλυσίδα δείχνονται ως γραμμοσκιασμένοι κύκλοι ή στόχοι, αντίστοιχα. (Mermelekas *et al.*, 2010)

1.5.3 Σχέσεις δομής-λειτουργίας στους SVCT μεταφορείς

Παρά το μεγάλο όγκο δουλειάς στους SVCT, δεν υπάρχει ευρέως αποδεκτή άποψη για τα κινητικά τους χαρακτηριστικά, με τα αποτελέσματα να διαφέρουν μεταξύ κυτταρικών σειρών, ιστών, ή συστημάτων έκφρασης. Για τις ανθρώπινες ισομορφές, τιμές K_m από 65-237 μM για τον SVCT1 και από 8-62 μM για τον SVCT2

έχουν αναφερθεί (Savini *et al.*, 2008). Έχει δειχθεί πως το K_m του SVCT2 σε δέκα διαφορετικές αρχικές κυτταρικές σειρές είναι κοντά στα 20 μM (Godoy *et al.*, 2007). Οι τιμές V_m επίσης διαφέρουν. Δεδομένα από ετερόλογη έκφραση των δύο μεταφορέων δείχνουν υψηλότερη μεταφορική ικανότητα για τον SVCT1, ενώ κάποιες ενδογενώς αποκτηθείσες τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά. Και οι δύο μεταφορείς δείχνουν ευαισθησία στο pH, με τη μέγιστη μεταφορική ικανότητα να υπάρχει στο pH 7,5. Στο pH 5,5 η τιμή αυτή μειώνεται στο 50-60%, μια διαφορά που δεν μπορεί να εξηγηθεί από την ιονική κατάσταση του ασκορβικού οξέος, αφού η pK_a του στο 4,2 υποδεικνύει πως περισσότερο από 95% του L-ασκορβικού οξέος είναι στην αποπρωτονιομένη μορφή σε αυτό το pH (Varma *et al.*, 2009).

Οι SVCTs έχουν απόλυτη ανάγκη για ιόντα νατρίου. Κινητικές μελέτες πρόσληψης με ποικίλες συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου και σταθερή συγκέντρωση ασκορβικού έδειξαν σιγμοειδή καμπύλη και για τους δύο μεταφορείς. Μη γραμμική ανάλυση της απόκλισης έδωσε μια σταθερά Hill με τιμή 2, προτείνοντας πως τουλάχιστον 2 ιόντα νατρίου συμμεταφέρονται με κάθε μόριο ασκορβικού οξέος. Αυτό δείχθηκε άμεσα στον SVCT1 με τη μέτρηση καθαρού θετικού φορτίου κατά την πρόσληψη ασκορβικού. Δεν φάνηκε όμως να συμβαίνει το ίδιο και με τον SVCT2, ο οποίος δείχθηκε να μην είναι ηλεκτρογενής (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Ο μεταφορέας έχει την απόλυτη ανάγκη ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, ενώ απουσία και των δύο οδηγεί σε μια ανενεργή μορφή του μεταφορέα, μειώνοντας δραματικά την V_m , χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την K_m . Η στοιχειομετρία 2:1 ιόντων νατρίου-ασκορβικού επιβεβαιώθηκε με τη σύγκριση πρόσληψης ραδιοσημασμένου νατρίου σε κορεσμό ασκορβικού, σε σχέση με την πρόσληψη ασκορβικού. Συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου παραπάνω από 20 mM αλλάζουν την διαμόρφωση ενός χαμηλής συγγένειας ($K_m > 0,5 \text{ mM}$) σε έναν υψηλής συγγένειας μεταφορέα. Είναι ενδιαφέρον πως η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος επηρεάζει συνεργατικά την αλλαγή αυτή υποδηλώνοντας μια αμοιβαία λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο υποστρωμάτων. Η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζει επίσης τη στοιχειομετρία τις αντίδρασης, καθώς και τη σειρά της δέσμευσης, η οποία προτείνεται πως είναι Na^+ -ασκορβικό οξύ- Na^+ (Godoy *et al.*, 2007). Παρόλα αυτά, και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο SVCT2 δείχθηκε και σε αυτή την εργασία να μην είναι ηλεκτρογενής. Οι συγγραφείς προσπάθησαν να εξηγήσουν το παράδοξο αυτό με τις παραδοχές πως είτε τα ρεύματα ήταν πολύ χαμηλά για να μετρηθούν, είτε ο SVCT2 λειτουργεί και ως αντιμεταφορέας, επιτρέποντας την εκροή ενός κατιόντος.

Ο ρόλος των δύο συνεχόμενων σχεδόν απόλυτα συντηρημένων στην NAT αλληλουχία αμινοξέων στη μέση του πρώτου διαμεμβρανικού τμήματος, QH, έχει μελετηθεί και στους SVCT. Ένας σημαντικός λόγος για τη μελέτη αυτή ήταν η pH-εξαρτώμενη λειτουργία τους, κάτι που θα μπορούσε να οφείλεται σε κατάλοιπα ιστιδίνης. Μεταλλαξιγένεση της ιστιδίνης του hSVCT1 (His51) σε αλανίνη οδήγησε σε μειωμένη πρόσληψη ραδιοσημασμένου ασκορβικού (Varma *et al.*, 2009), λόγω μικρής μείωσης της συγγένειας δέσμευσης, χωρίς να επηρεάζεται το V_m . Η αντίστοιχη μεταλλαγή της ιστιδίνης στον hSVCT2 (H109A) αποδείχθηκε απώλειας λειτουργίας (Ormazabal *et al.*, 2010). Μεταλλαξιγένεση όλων των καταλοίπων ιστιδίνης του hSVCT2 έδειξε πως σημαντική για την pH-εξαρτώμενη λειτουργία του είναι η His413, που βρίσκεται στην εξωκυτταρική θηλιά μεταξύ των TMS7 και TMS8. Ο μηχανισμός της εξάρτησης από το pH φαίνεται να προκαλείται από διακοπή της συνεργατικής δράσης ιόντων νατρίου-ασκορβικού οξέος στην αύξηση της συγγένειας του μεταφορέα. Οι συγγραφείς επίσης προτείνουν πως οι ιστιδίνες His(203), His(206), and His(413), όλες ευρισκόμενες περιπλαστικά, συμμετέχουν στη δομική συγκρότηση των διαμεμβρανικών τμημάτων του μεταφορέα, ενώ η απόλυτα συντηρημένη His109 ίσως συμμετέχει στη δέσμευση του ασκορβικού οξέος. Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν περαιτέρω πως η αλληλουχία QH στο πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα των NAT είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία τους και τα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα συμμετέχουν στο μηχανισμό λειτουργίας του μεταφορέα.

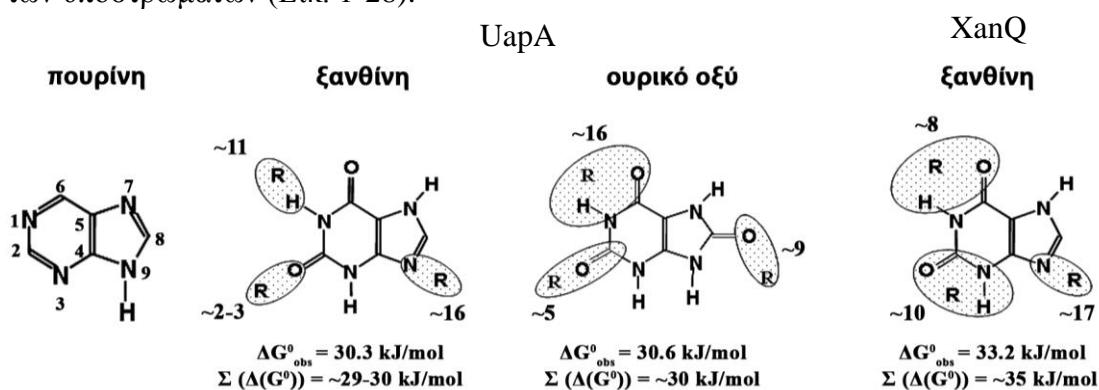
1.5.4 Μοντέλα αλληλεπίδρασης των NAT με τα υποστρώματά τους

Τα ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιμεταβολίτες ενάντια σε έναν πλήθος διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών και ιών και στην χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου και της λευχαιμίας (5- φθόρουρακίλη, 5-μέρκαπτο-πουρίνη, 6-θειο-γουανίνη). Ανάλογα πουρινών χρησιμοποιούνται επίσης ως αντι-ικές ενώσεις (acyclovir, ganciclovir, carbocvir), αντιβιοτικά και φάρμακα ενάντια σε παρασιτικές ασθένειες (π.χ. αλλοπουρινόλη, πυριμεθαμίνη), αλλά και για την πρόληψη της απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνων (αζαθειοπουρίνη) και τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας (αλλοπουρινόλη) και της χρόνιας λεμφογενούς λευχαιμίας (Stelmach & Robak, 2013; Robak & Robak, 2012). Οι κινητικές και γενετικές αναλύσεις των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων στα βακτηριακά και μυκητιακά πρότυπα συστήματα, όπου μια δεδομένη πρωτεΐνη μπορεί να μελετηθεί σε ένα γενετικό υπόβαθρο που στερείται όλους τους άλλους σχετικούς

μεταφορείς, μπορούν να οδηγήσουν στη διαμόρφωση των αλληλεπιδράσεων μεταφορέα-υποστρώματος. Τέτοια μοντέλα μπορούν να εξεταστούν με τη χρήση αντίστροφης γενετικής και να χρησιμοποιηθούν για την κατανόηση της λειτουργίας των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Αυτή η γνώση μπορεί, μακροπρόθεσμα, να αποτελέσει ένα ουσιαστικό βήμα στην πρόβλεψη της χρήσης ή/και του σχεδιασμού αντιμυκητιακών βασισμένων σε πουρίνες που δεν θα λαμβάνονται από τους ανάλογους μεταφορείς των μολυσμένων ιστών των ασθενών.

Στο εργαστήριό του Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Διαλλινά, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα γενετικά υπόβαθρα, έχουν πραγματοποιηθεί λεπτομερείς κινητικές αναλύσεις δέσμευσης υποστρωμάτων αρκετών μυκητιακών NAT, όπως ο UapA (Goudela *et al.*, 2005) του *A. nidulans*, ο UapC (Goudela *et al.*, 2008) του *A. fumigatus* και ο Xut1p της *C. albicans* (Goudela *et al.*, 2006). Η λογική αυτής της προσέγγισης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να καθορίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταφορέα-υποστρωμάτων για μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων και νουκλεοσιδίων πρωτοζώων και θηλαστικών (de Koning & Diallinas, 2000; Diallinas & Gournas, 2008; Gournas *et al.*, 2008). Συνοπτικά, χρησιμοποιώντας μια ευρεία συλλογή πουρινών και πουρινικών ανάλογων, καθορίστηκαν τιμές K_i για ενώσεις που παρεμποδίζουν την πρόσληψη ραδιοσημασμένης ξανθίνης, από πλήρεις καμπύλες δόσης-αντίδρασης. Κατόπιν υπολογίστηκαν οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs ΔG° από τον τύπο $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_i)$, όπου το R είναι η ιδανική σταθερά των αερίων και το T η απόλυτη θερμοκρασία (°K). Συγκρίνοντας τη διαφορά σε ΔG° στην αλληλεπίδραση δύο υποθετικών υποστρωμάτων που διαφέρουν σε μια μόνο θέση κάθε φορά (π.χ. ξανθίνη/2-θειο-ξανθίνη ή αδενίνη/3-δεάζα-αδενίνη), υπολογίστηκε η συμβολή αυτής της θέσης στη δέσμευση. Λαμβάνοντας υπόψη τις απώλειες λόγω πιθανών στερεοειδικών παρεμποδίσεων ή της αλλαγής της τρισδιάστατης δομής της πουρίνης, καθώς και τη δομή των προτιμώμενων ταυτομερών μορφών των υποστρωμάτων, αναπτύχθηκαν μοντέλα που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις κάποιων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων με τα πιθανά υποστρώματά τους (Εικ. 1-24B). Πολύ σημαντική για την ανάπτυξη του μοντέλου του UapA ήταν η συνεισφορά της μελέτης των αλληλίων που φέρουν μεταλλαγές στο TMS12, οι οποίες άρουν τις στερεοειδικές παρεμποδίσεις (Parageorgiou *et al.*, 2008β). Τα αλλήλια αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. §1.5.2.2) εξακολουθούν να αναγνωρίζουν με την ίδια συγγένεια την ξανθίνη και τα ανάλογά της με

υποκαταστάσεις σε θέσεις σημαντικές για τη δέσμευση. Το γεγονός αυτό ενίσχυσε τις προηγούμενες παρατηρήσεις και λειτούργησε καταλυτικά για την μικρή τροποποίηση του μοντέλου με σκοπό τη βελτίωσή του. Φαίνεται πως σημαντικές θέσεις για τη δέσμευση είναι οι θέσεις 1 και 9, και σε μικρότερο βαθμό η 3 (Εικ. 1-28). Για τις πρώτες δύο, η ενέργεια βρίσκεται στην τάξη ενός ισχυρού υδρογονοδεσμού. Λόγω της πρωτονίωσης των θέσεων αυτών, το πιο πιθανό είναι να δεσμεύονται από κάποιο αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ, αν και έχουν δειχθεί περιπτώσεις που ένα μόριο ύδατος λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ δύο πρωτονιόφιλων ομάδων. Ανάλογα μοντέλα έχουν κατασκευαστεί σε συνεργασία με την ομάδα του Καθηγητή Ε. Φριλίγγου για τον μεταφορέα XanQ της *E. coli* (Goudela *et al.*, 2005). Με τη σύγκριση των κινητικών μοντέλων των διαφορετικών NAT μεταφορέων μερικές σημαντικές διαφορές έχουν καθιερωθεί. Παραδείγματος χάριν, οι περιοχές δέσμευσης υποστρωμάτων των XanQ και UapA, παρά τις ομοιότητες όσον αφορά τη γενική συμβολή του πυριμιδινικού δακτυλίου της ξανθίνης στη δέσμευση, έχουν σημαντική διαφορά στην ενέργεια δέσμευσης που αφορούν κάποιες άλλες θέσεις. Η πιο σημαντική διαφορά ωστόσο είναι η ανικανότητα του XanQ να δεσμεύσει ουρικό οξύ ή τα ανάλογα πουρινών που φέρουν υποκαταστάσεις στις θέσεις 7 ή 8, που επεξηγεί το βασικό ρόλο της θέσης 8 στους διαφορετικούς δεσμευτικούς προσανατολισμούς των υποστρωμάτων (Εικ. 1-28).



Εικόνα 1-28 Μοντέλα των αλληλεπιδράσεων των NAT με τα υποστρώματά τους. Οι ΔG° υπολογίζονται από το αντίστοιχο K_i [όπου $K_i = IC_{50}/[1+(L/K_m)]$, §2.1.9]. Το R αντιπροσωπεύει ένα αμινοξύ στον μεταφορέα το οποίο αλληλεπιδρά, μέσω ενός δεσμού υδρογόνου, με μια συγκεκριμένη θέση της πουρίνης. (Gournas *et al.*, 2008)

Από τέτοια μοντέλα κάποιες προβλέψεις μπορούν να εξαχθούν σχετικά με πιθανά ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στόχευση των μυκήτων. Παραδείγματος χάριν, φαίνεται ότι μια σημαντική διαφορά μεταξύ των μυκητιακών μεταφορέων που έχουν αναλυθεί και των αναλόγων

ανθρώπινων μεταφορέων είναι η συμμετοχή του N3 στη δέσμευση υποστρωμάτων (Kraupp and Marz, 1995; Wallace *et al.*, 2002). Μυκητιακά NATs δεν φαίνεται να χρησιμοποιούν το N3 για να δεσμεύσουν το ουρικό οξύ, την ξανθίνη και τα ανάλογά τους. Αυτό οδηγεί στην πρόβλεψη πως τα ανάλογα τις ξανθίνης με υποκαταστάσεις στη θέση N3 ίσως αποτελέσουν εξειδικευμένα υποστρώματα για τους μυκητιακούς NAT. Είναι γνωστό ότι τα N3-υποκαθιστάντα ανάλογα διοχετεύονται στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις ως ειδικοί αντι-υικοί ανασταλτικοί παράγοντες (Shigeta *et al.*, 1988; Andrei & De Clercq, 1990). Παρομοίως, πουρίνες ή ανάλογά τους θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως αποδοτικά φάρμακα ενάντια στους παθογόνους μύκητες (Ward *et al.*, 2011).

Οι κινητικές μελέτες στους μεταφορείς ασκορβικού οξέος είναι περιορισμένες και έχουν πραγματοποιηθεί σποραδικά. Οι SVCT έχουν αυστηρή εξειδίκευση για L-ασκορβικό οξύ. Ακόμη και το στερεοϊσομερές του, D-ισοασκορβικό οξύ αναγνωρίζεται πολύ ασθενώς ($K_i > 700 \mu\text{M}$) από τους δύο ανθρώπινους μεταφορείς (Tsukaguchi *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2000). Αφυδροασκορβικό οξύ, γλυκόζη, δεοξυγλυκόζη και μια σειρά από πουρίνες, πυριμιδίνες και βιταμίνες έδειξαν καθόλου ή ελάχιστη αναστολή στην πρόσληψη ραδιοσημανσμένου ασκορβικού οξέος (Rajan *et al.*, 1999; Tsukaguchi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Επιπλέον, ανάλογα του ασκορβικού με υποκαταστάσεις στις θέσεις 2 και 3 επίσης φαίνεται να μην αναγνωρίζονται (Rumsey *et al.*, 1999), εν αντιθέσει με ανάλογα που φέρουν υποκαταστάσεις στις θέσεις 5 και 6. Μάλιστα το 6-δεόξυ, 6-ίοδο-L-ασκορβικό οξύ έχει δείχθει να μεταφέρεται (Kim *et al.*, 2009). Τα παραπάνω υποδεικνύουν πως οι θέσεις 2 και 3 είναι σημαντικές για τις αλληλεπιδράσεις των SVCT με το ασκορβικό οξύ, ενώ οι θέσεις 5 και 6 όχι, ανοίγοντας τον δρόμο για πιθανούς φαρμακευτικούς σχεδιασμούς.

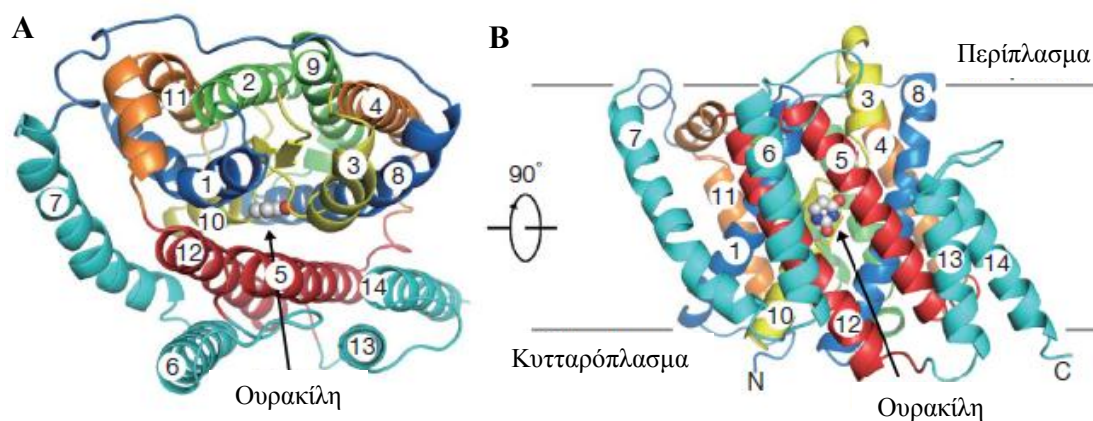
1.5.5 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα από τον μεταφορέα UraA

Ο UraA ήταν ο πρώτος μεταφορέας της οικογένειας για τον οποίο αποκτήθηκε κρυσταλλογραφική δομή, μόλις το 2011 (Lu *et al.*, 2011). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει άλλος κρύσταλλος της NAT οικογένειας.

1.5.5.1 Δομή του UraA

Ο UraA αποτελεί καινοτομία στις δομές, καθώς η αναδίπλωσή της δεν μοιάζει με καμίας προηγούμενης. Περιλαμβάνει 14 διαμεμβρανικά τμήματα, με τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα να βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά (Εικ. 1-28). Οι δύο καρβοξυτελικές α-έλικες, α13 και α14, είναι μόνο κατά το ήμισυ μέσα στη μεμβράνη. Δύο μικρές, αντιπαράλληλες β-έλικες στα TMS3 και TMS10 βρίσκονται στο κέντρο της δομής. Κάθε β-κλώνου προηγείται μια εκτεταμένη, ξεδιπλωμένη δομή και ακολουθεί μια σύντομη α-έλικα, η α3 ή η α10 (Εικ. 1-28B). Οι ασυνεχείς έλικες έχουν παρατηρηθεί σε μια σειρά από πρωτεΐνες-μεταφορείς (Scrapanti & Hunte, 2007), αλλά είναι ασυνήθιστο για μία αποελικωμένη περιοχή να αποτελεί το ήμισυ του διαμεμβρανικού τμήματος. Αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά διακρίνουν τον UraA από άλλες γνωστές δομές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών Το NAT μοτίβο μήκους 11 αμινοξέων, το οποίο προβλεπόταν να είναι ένας κυτταροπλασματικός βρόχος (Koukaki *et al.*, 2005; Georgoulou *et al.*, 2010) αποτελεί την α10 διαμεμβρανική έλικα στον UraA.

Τα 14 διαμεμβρανικά τμήματα του UraA διατάσσονται σε δύο δομικές επαναλήψεις, την TMS1-TMS7 και την TMS8-TMS14, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μια περιστροφή περίπου 180° γύρω από έναν άξονα παράλληλο προς την διπλοστοιβάδα της μεμβράνης. Η παρουσία των δύο ανεστραμμένων επαναλήψεων είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό για έναν αριθμό μεταφορέων (Yamashita *et al.*, 2005) και καναλιών (Fu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009) (βλ. §1.3.2). Βάσει της διάταξης αυτής τα TMSs οργανώνονται σε μία συμπαγή επικράτεια, τον πυρήνα (core domain) και μια επικράτεια ελεγχόμενης πρόσβασης (gate domain). Η περιοχή του πυρήνα περιλαμβάνει τα TMS1-TMS4 και TMS8-TMS11, και η περιοχή της ελεγχόμενης πρόσβασης περιέχει τα άλλα έξι τμήματα. Η σύνδεση μεταξύ των δύο επικρατειών πραγματοποιείται κυρίως με αλληλεπιδράσεις υδρόφοβων κατάλοιπα από τα TMS1, TMS3 και TMS8 στην περιοχή του πυρήνα και τα TMS5 και TMS12 περιοχή ελεγχόμενης πρόσβασης.



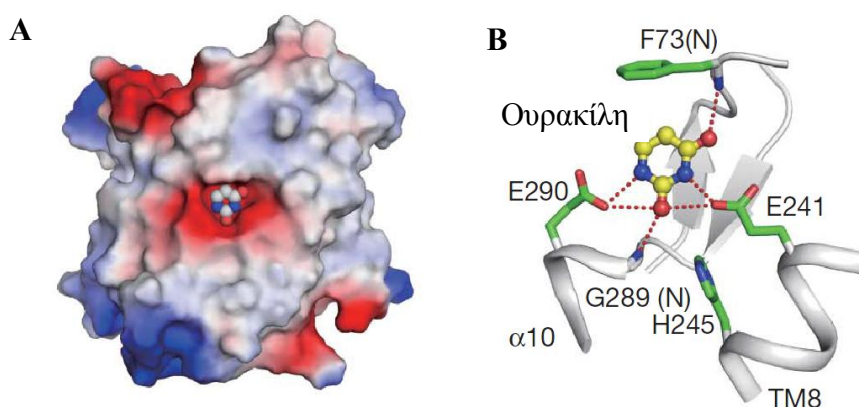
Εικόνα 1-29 Δομή του UraA. Α. Κάτοψη της δομής, όπου υποδεικνύεται η προσδεσμένη ουρακίλη. Β. Πρόσωση της δομής. (Lu *et al.*, 2011)

Σε αντίθεση με την υδρόφοβη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο περιοχών, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δεσμών υδρογόνου εντός της περιοχής του πυρήνα, με τις β-πτυχωτές επιφάνειες των TMS3 και TMS10 στο κέντρο. Εκτός από τους κοινούς δεσμούς υδρογόνου των αντιπαράλληλων β-ελίκων, η ομάδα υδροξυλίου της Tyr 288 στο TMS10 σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το οξυγόνο του καρβονυλίου και το άζωτο του αμιδίου της Ser 71 στο TMS3. Υπάρχουν 12 επιπλέον δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των TMS3/TMS10 και των άλλως διαμεμβρανικών τμημάτων της περιοχής του πυρήνα.. Αυτές οι εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις μπορούν να διευκολύνουν τη διαμόρφωση των αποελιγμένων περιοχών των TMS3 και TMS10 καθώς και ακινητοποίηση των διαμεμβρανικών τμημάτων στηνπεριοχή του πυρήνα (Lu *et al.*, 2011).

1.5.5.2 Δέσμευση της ουρακίλης

Οι αντιπαράλληλοι β-κλώνοι και οι βρόχοι που συνδέουν τα TMS3 και TMS10 παρέχουν ένα “καταφύγιο” για την ουρακίλη μεταξύ του πυρήνα και της πύλης. Ο δακτύλιος πυριμιδίνης της ουρακίλης, η οποία είναι περίπου παράλληλη προς τις β-έλικες, περιβάλλεται από αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό (Εικ. 1-29Α). Η αναγνώριση της ουρακίλης πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από την περιοχή του πυρήνα, εμπλέκοντας κατάλοιπα από τα TMS1, TMS3, TMS8, TMS10 και TMS12 (Εικ. 1-29Β). Δύο κατάλοιπα γλουταμικού, τα E241 και E290, δεσμεύουν την ουρακίλη, σχηματίζοντας το καθένα δύο δεσμούς υδρογόνου με αυτήν (Εικ. 1-29Β). Αντικατάσταση των καταλοίπων με αλανίνη οδήγησε σε πλήρη αδυναμία δέσμευσης της ουρακίλης. Επιπλέον, τα δύο άτομα οξυγόνου της ουρακίλης

σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα αζώτου των αμιδίων της F73 και της G289. Ειδικότερα, οι G289 και E290 ευρίσκονται εντός του μοτίβου υπογραφής NAT. Μία ομάδα υδροξυλίου στο β-NG σχηματίζει δεσμό υδρογόνου, τόσο με το άζωτο του ιμιδαζολίου της H245 όσο και με το οξυγόνο του καρβονυλίου της ουρακίλης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένα μόριο νερού μπορεί να καταλάβει τη θέση του β-NG υδροξυλίου και κάνει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις. Σε αυτή την περίπτωση, η H245 μπορεί να συμβάλει στην δέσμευση της ουρακίλης με δεσμό υδρογόνου διαμέσου του νερού (Lu *et al.*, 2011).



Εικόνα 1-30 Θέση της ουρακίλης στον UraA. **A.** Η ουρακίλη εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που περιβάλλεται από αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό. Η περιοχή του πυρήνα απεικονίζεται ως επιφάνεια ηλεκτροστατικού δυναμικού. **B.** Η ουρακίλη (κίτρινη) δεσμεύεται με πολικές αλληλεπιδράσεις στον UraA. (Lu *et al.*, 2011)

1.6 Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής

1.6.1 Μελέτη του μεταφορέα UarA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο UarA είναι ένας πολύ καλά μελετημένος μεταφορέας με πληθώρα χαρακτηρισμένων μεταλλαγών οι οποίες επηρεάζουν τη δομική σταθερότητα ή/και την εξειδίκευση του. Έχει προταθεί μάλιστα ότι το Q408 είναι το αμινοξύ που δεσμεύει το υπόστρωμα από τη θέση N₁-H ή N₉. Επίσης, και άλλα υψηλά συντηρημένα αμινοξέα έχει δείχθει να συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος, με άγνωστο μέχρι πριν τρόπο (π.χ. E356, D388).

Λόγω της εκτεταμένης μελέτης του έχουν εντοπιστεί και στοιχεία εκτός του NAT μοτίβου που επηρεάζουν την εξειδίκευσή του με έμμεσο πιθανώς τρόπο (Q113, T526, F528), συνιστώντας την ύπαρξη ενός “μοριακού φίλτρου” που επιλέγει τα εισερχόμενα στον μεταφορέα υποστρώματα. Έχει προταθεί μάλιστα ότι τα απομακρυσμένα αυτά στοιχεία (TMS1 και TMS12) γειτνιάζουν στην τριτοταγή δομή

για ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα (βλ. Εικ. 1-25). Τα στοιχεία όμως που αφορούσαν τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του UapA ήταν ασαφή και έμμεσα.

Μόλις το 2011 αποκτήθηκε ο πρώτος, και μοναδικός μέχρι σήμερα, κρύσταλλος δομής της οικογένειας, αυτός του μεταφορέα ουρακίλης, UraA, στην *E. coli*. Η δομή του μεταφορέα αυτού διέφερε ως προς τη διάταξη των ελίκων του από τις υπόλοιπες μέχρι σήμερα δομές, υποδεικνύοντας τη δομική ιδιαιτερότητα της οικογένειας. Η δομή αυτή διέφερε και από τις μέχρι τότε προβλέψεις δευτεροταγούς δομής των NAT.

Με βάση τα παραπάνω, στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ακολουθήθηκε διπλή προσέγγιση, τόσο βιοφυσική, όσο και γενετική:

Αφενός κατασκευάστηκε το μοντέλο τριτοταγούς δομής του UapA προκειμένου να προσδιοριστεί η θέση του NAT μοτίβου και η σχετική του θέση με το μοριακό φίλτρο. Με βάση το μοντέλο αυτό θα ήταν εφικτή η χαρτογράφηση των κρίσιμων από προηγούμενες γενετικές μελέτες αμινοξικών καταλοίπων και η αποσαφήνιση του ρόλου τους στη δομή και τη λειτουργία του μεταφορέα. Προς αυτήν την κατεύθυνση συνέβαλλαν και τα πειράματα υπολογισμών πρόσδεσης, τα οποία υπέδειξαν τον τρόπο σύνδεσης της ξανθίνης με τη θέση δέσμευσής της στον UapA. Τα πειράματα αυτά ευόδωσαν καθώς ήδη υπήρχαν δεδομένα από προηγούμενες γενετικές μελέτες για σύγκριση, αλλά και τα νέα κατάλοιπα που προτάθηκαν ήταν εφικτό να τεθούν υπό δοκιμή με μοριακές και γενετικές τεχνικές, δίνοντας μία πιο ολοκληρωμένη πρόταση για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας στον μεταφορέα UapA.

Παράλληλα με τα παραπάνω πειράματα, θελήσαμε με γενετικές προσεγγίσεις να διερευνήσουμε περαιτέρω το μηχανισμό της σύνδεσης μεταφορέα-υποστρώματος κυρίως από τις θέσεις N₁ και N₉. Επιλέξαμε την αδενίνη ως καταλληλότερη για το ρόλο αυτό. Δομικά η αδενίνη διαφέρει κατά πολύ από τις υπόλοιπες πουρίνες λόγω της αντίστροφης πρωτονίωσης (σε σχέση με την ξανθίνη) στις θέσεις N₁ και N₉ του πουρινικού δακτυλίου, αλλά και λόγω της αντικατάστασης του -O στη θέση 6 από μία -NH₂. Δηλαδή, η αδενίνη διαφέρει στις θέσεις που μέχρι τώρα θεωρούνται ότι συμμετέχουν στο μηχανισμό δέσμευσης. Επιπρόσθετα, η αλλαγή του -O στη θέση 6 διαταράσσει τους δεσμούς που πιθανώς δημιουργούνται κατά τη δέσμευση αυτή. Λόγω της τόσο μεγάλης διαφορετικότητας στη δομή η αδενίνη μεταφέρεται σε μικρό βαθμό από τον UapA με χαμηλή συγγένεια.

Η μεταλλαγή F528S έχει κάνει το πρώτο βήμα για την πρόσδεση της αδενίνης, καθώς ο μεταφορέας εδώ βρίσκεται σε μια πιο «χαλαρή» δομή και

επιτρέπει σε μικρό βαθμό τη μεταφορά της αδενίνης μέσω του UapA, αν και με χαμηλή συγγένεια δέσμευσης ($K_i = 3,5 \text{ mM}$). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή στόχος μας ήταν να απομονώσουμε μία μεταλλαγή δεύτερης θέσης η οποία, σε συνδυασμό με τη μεταλλαγή F528S που ήδη αναγνωρίζει την αδενίνη, να βελτιώσει την εξειδίκευση του μεταφορέα για την πουρίνη αυτή. Ένας τέτοιος μεταφορέας UapA θα έχει βελτιώσει τη συγγένεια δέσμευσης σε κάποια από τις θέσεις 1, 6 και 9. Αν η βελτίωση αυτή είναι εξειδικευμένη για την αδενίνη και όχι για την υποξανθίνη, τότε η συγγένεια θα έχει αυξηθεί από τις θέσεις 1 ή 6 του δακτυλίου της πουρίνης. Με αυτόν τον τρόπο προσπαθήσαμε να ανακαλύψουμε ποια είναι η περιοχή της πρωτεΐνης που συμμετέχει στο μηχανισμό δέσμευσης από τη θέση 1.

1.6.2 Μελέτη του μεταφορέα FcyB

Ο μεταφορέας FcyB ανήκει σε μία άλλη μεγάλη οικογένεια, την NCS1. Και σ' αυτήν την οικογένεια, όπως και στη NAT, υπάρχει μία μόνο διαθέσιμη δομή από κρύσταλλο, αυτή του μεταφορέα Mhp1 στο *Microbacterium liquefaciens*. Ο μεταφορέας FcyB έχει ιδιαίτερο ιατροβιολογικό ενδιαφέρον, καθώς μεταφέρει το τοξικό ανάλογο 5-φθορο-κυτοσίνη, έναν πιθανό φαρμακευτικό αντιμυκητιακό στόχο. Παρόλο που ο μεταφορέας φυσικού τύπου έχει χαρακτηριστεί (Vlanti & Diallinas, 2008), δεν υπάρχουν διαθέσιμες μεταλλαγές δομής ή εξειδίκευσης που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην περαιτέρω μελέτη του. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας κατασκευάστηκε το μοντέλο ομολογίας του FcyB και με υπολογισμούς πρόσδεσης προτάθηκε ο μηχανισμός δέσμευσης των φυσιολογικών του υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα από τους υπολογισμούς μένει να επιβεβαιωθούν με μοριακές-γενετικές προσεγγίσεις.

Κεφάλαιο 2ο

Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Μύκητες

2.1.1 Στελέχη

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη μυκήτων:

wt: *pabaA1* Στέλεχος *A. nidulans* φυσικού τύπου αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

ΔACZ argB2 pabaA1: *argB2 pabaA1 ΔazgA ΔuapC ΔuapA* Μεταλλαγές έλλειψης των γονιδίων των τριών μεταφορέων πουρινών (*azgA, uapC, uapA*), αυξότροφο για αργινίνη και παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

UapA-GFP: το στέλεχος ΔACZ argB2 pabaA1 με ομόλογη μονή ενσωμάτωση στο *argB* του pAN510-GFP πλασμιδίου (Pantazopoulou *et al.*, 2007).

Τα στελέχη που φέρουν μεταλλαγές απώλειας ή τροποποιημένης λειτουργίας του UapA έχουν κατασκευασθεί και περιγραφεί σε άλλες εργασίες οι οποίες αναφέρονται. Όλα είναι προϊόν του στελέχους ΔACZ *argB2 pabaA1* το οποίο έχει μετασχηματισθεί με τα πλασμίδια που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγμένες μορφές του UapA συνεζευγμένες με GFP. Όλα τα υπόλοιπα στελέχη που αναφέρονται και χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διατριβή αποτελούν προϊόν μετασχηματισμού ή διασταύρωσης των ανωτέρω στελεχών, και λεπτομέρειες για αυτά αναφέρονται στα αποτελέσματα.

Η μεταλλαγή *pabaA1* προκαλεί αυξοτροφία για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος (Vlanti & Diallinas, 2008).

Η μεταλλαγή *argB2* οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου της τρανσκαρβαμοϋλάσης της ορνιθίνης, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της αργινίνης (Buxton *et al.*, 1985).

Καμία από τις ανωτέρω μεταλλαγές δεν εμπλέκεται ή επηρεάζει το μεταβολισμό και την πρόσληψη πουρινών.

2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Οι καλλιέργειες των μυκήτων έγιναν σε Πλήρη και Ελάχιστα Υποστρώματα η σύσταση των οποίων αναγράφεται στους Πίνακες 2-1 και 2-2 (Cove, 1966; Scazzocchio *et al.*, 1982).

Πίνακας 2-1 Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια και τον μετασχηματισμό του *A. nidulans* (σε όγκο 1 l).

	Πλήρες υπόστρωμα (Complete Medium)	Ελάχιστο υπόστρωμα (Minimal Medium)	Ισοοσμωτικό Ελάχιστο υπόστρωμα (Sucrose MM)
Δ/μα Αλάτων*	20 ml	20 ml	20 ml
Δ/μα Βιταμινών*	10 ml	-	-
D-Γλυκόζη	10 g	10 g	10 g
Casamino acids	1 g	-	-
Πεπτόνη (Bacto-peptone)	2 g	-	-
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	1 g	-	-
Σακχαρόζη	-	-	342,3 g

*: η σύστασή τους φαίνεται στον Πίνακα 2-2.

Η προσαρμογή του pH έγινε με τη χρήση διαλύματος NaOH (3 N) και HCl (1 N). Στα στερεά θρεπτικά μέσα, πλήρη και ελάχιστα, προστέθηκε 2% και 1% άγαρ αντίστοιχα. Στα εκλεκτικά υποστρώματα για δοκιμασίες ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκε μία ειδικά επεξεργασμένη άγαρ της εταιρείας Oxoid, η οποία περιέχει ελάχιστα ποσοστά πηγών αζώτου, και επέτρεψε τη διάκριση μικρών διαφορών στη μορφή της αποικίας (μέγεθος, πυκνότητα κονιδιοσπορίων) των προς μελέτη στελεχών. Στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε επιπλέον μία πηγή αζώτου. Η πιο κοινή «ουδέτερη» πηγή αζώτου είναι η ουρία, η οποία προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Γλουταμίνη, προλίνη και νιτρικά ιόντα χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Οι πουρίνες ως μοναδικές πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν συνήθως σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml (περίπου 500-600 μM). Σε καλλιέργειες για την απομόνωση RNA, ουρακίλη και κυτοσίνη προστέθηκαν σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml επίσης. Η οξυπουρινόλη, τοξικό ανάλογο της ξανθίνης που μεταφέρεται από τον *uarA*, χρησιμοποιήθηκε σε

τελική συγκέντρωση 100 μ M. Η 8-αζαγουανίνη και η 6-μεθοξυ-πουρίνη χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml. Όπου ήταν αναγκαία η προσθήκη αργινίνης ή ουρακίλης και ουριδίνης ως αυξοτροφιών, χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 5 mM, 2,5 mM και 5 mM αντίστοιχα. Η επαγωγή της έκφρασης του UapA από τον υποκινητή *alcA_p* επιτεύχθηκε μετά από 2,5 ώρα ανάπτυξης σε MM με ουρία (5 mM), φρουκτόζη (0,1%) και αιθανόλη (3%). Η καταστολή επιτεύχθηκε σε MM με ουρία (5 mM) και γλυκόζη (1%). Σε υγρές καλλιέργειες για μικροσκοπία επιφθορισμού, απομόνωση πρωτεϊνών ή δοκιμασίες πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης, το κυκλοεξιμίδιο προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 20 μ g/ml, 15 λεπτά πριν από την προσθήκη υποστρώματος ή ιόντων αμμωνίας. Οι υπόλοιπες αυξοτροφίες χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις, οι οποίες αναγράφονται στη σύσταση του διαλύματος βιταμινών στον Πίνακα 2-2.

Πίνακας 2-2 Σύσταση διαλυμάτων (σε όγκο 1 l) και συγκεντρώσεις χρησιμοποιούμενων αυξοτροφιών.

Δ/μα Αλάτων		Δ/μα Βιταμινών		Δ/μα Ιχνοστοιχείων	
KCl	26 g	pABA*	20 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O	40 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	26 g	Βιοτίνη	1 mg	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	400 mg
KH ₂ PO ₄	76 g	Ασβέστιο**	50 mg	FeO ₄ P·4 H ₂ O	714 mg
Χλωροφόρμιο	2 ml	Ριβοφλαβίνη	50 mg	MnSO ₄ ·1 H ₂ O	728 mg
Δ/μα ιχνοστοιχείων	50 ml	Πυριδοξίνη	50 mg	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	800 mg
				ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	8 mg

* pABA: p-αμινοβενζοϊκό οξύ

** Ασβέστιο: D-παντοθενικό ασβέστιο

2.1.3 Συντήρηση στελεχών του *A. nidulans*

Τα στελέχη του *A. nidulans* μπορούν να συντηρηθούν για τουλάχιστον δύο χρόνια σε γλυκερόλη 50% στους -80 °C. Συγκεκριμένα, φρέσκα κονιδιοσπόρια περισυλλέγονται σε σωλήνα τύπου Eppendorf που περιέχει 0,7 ml αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (σύσταση σε 1 l: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂PO₄ 1,44 g, KH₂PO₄ 0,24 g, pH 7,4 με 1 N HCl). Σε αυτό το διάλυμα κονιδιοσπορίων προστίθεται ίσος όγκος 100% γλυκερόλης. Κατόπιν καλής αναδεύσεως ακολουθεί αποθήκευση στους -80 °C.

2.1.4 Διασταυρώσεις στελεχών *A. nidulans* και ανάλυσή τους

Οι διασταυρώσεις στελεχών του *A. nidulans* πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο Pontecorvo *et al.*, 1953. Πιο συγκεκριμένα:

- Τα επιθυμητά στελέχη, τα οποία έπρεπε να διαθέτουν τουλάχιστον μια διαφορετική αυξοτροφία έκαστο για τη σταθεροποίηση του ετεροκαρύου, εμβολιάστηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα και σε απόσταση μισού εκατοστού και κατόπιν επώασθηκαν μέχρι το σχηματισμό μεταξύ τους αναστομώνσεων των υφών. Ειδικά τα HulAΔC2 στελέχη, λόγω της πολύ καθυστερημένης τους ανάπτυξης, εμβολιάζονταν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα με 0,5 M δισόξινο φωσφορικό νάτριο, τουλάχιστον δύο μέρες πριν εμβολιασθεί το δεύτερο στέλεχος.
- Οι αναστομώσεις αποκόπηκαν και μεταφέρθηκαν σε στερεό ελάχιστο για το ετεροκάρυο θρεπτικό υπόστρωμα (που παρείχε δηλαδή μόνο τις κοινές των δύο στελεχών αυξοτροφίες) με νιτρικά ιόντα (τα νιτρικά μεταβολίζονται καλύτερα αναερόβια από τις άλλες πηγές αζώτου) ως πηγή αζώτου και επώασθηκαν για 2-3 μέρες στους 37 °C.
- Ακολούθησε αποκλεισμός του αέρα και περαιτέρω καλλιέργεια για 2 τουλάχιστον εβδομάδες στους 37 °C.
- Τέσσερα τουλάχιστον σχηματισμένα κλειστοθήκια απομονώθηκαν και διερρήχθησαν σε σωλήνα τύπου errendorf με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό, ώστε να απελευθερωθούν τα ασκοσπόρια.
- Δείγματα από αυτά επιστρώθηκαν σε στερεό ελάχιστο για το ετεροκάρυο θρεπτικό υπόστρωμα, για να διαπιστωθεί η προέλευση των δύο πυρήνων που έχουν συντηχθεί στο κάθε κλειστοθήκιο. Μόνο από κλειστοθήκιο το οποίο έχει προέλθει από τη σύντηξη πυρήνων των δύο μητρικών στελεχών μπορούν να προέλθουν ανασυνδυασμένοι απόγονοι οι οποίοι να μεγαλώνουν στο θρεπτικό αυτό υπόστρωμα.
- Από τέτοια δείγματα επιστρώθηκαν αραιώσεις σε πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και απομόνωση των απογόνων.
- Οι απόγονοι αναλύθηκαν με δοκιμασίες ανάπτυξης κατάλληλες για τους εκάστοτε γονότυπους, όπως ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου για τον *UapA*, και τις αντίστοιχες βιταμίνες για τις μεταλλαγές αυξοτροφιών.
- Ο διαχωρισμός των *uapA* από *ΔuapA* και *uapA-gfp* πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) (με την

ΚΑΡΑ Taq DNA polymerase της ΚΑΡΑ Biosystems) χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών UapA 5' upstream for και UapA 3' downstream rev και τις συνθήκες που φαίνονται στους πίνακες 2-3 και 2-4. Σε στελέχη με το μεταφορέα αγρίου τύπου (*uapA*) το μέγεθος του προϊόντος αναμενόταν στα 3.500 ζεύγη βάσεων, σε έλλειψη γονιδίου (*ΔuapA*) στα 800 ζεύγη βάσεων και σε στελέχη με τον *uapA-gfp* στα 4.200 ζεύγη βάσεων.

Πίνακας 2-3 Σύσταση της PCR αντίδρασης.

Συστατικά της αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
DNA υπόστρωμα	10 μg
Εκκινητής 5' - 3'	135 ng
Εκκινητής 3' - 5'	135 ng
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	250 μM για το καθένα
ΚΑΡΑ Taq polymerase	1 u
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (με Mg ⁺²)	1X
H ₂ O (απεσταγμένο)	Μέχρι τα 25 μl

Πίνακας 2-4 Συνθήκες της PCR αντίδρασης.

Βήμα	Θερμοκρασία (° C)	Διάρκεια	
1. Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	} 25 κύκλοι επανάληψης
2. Αποδιάταξη	95	30 sec	
3. Πρόσδεση εκκινητών	T _m εκκινητών	30 sec	
4. Επιμήκυνση	72	1 min/kb	
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 min	
6. Παύση	12	-	

2.1.5 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα *Aspergillus nidulans*

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μικρής συγκέντρωσης γονιδιωματικού DNA αποτελεί παραλλαγή του αντίστοιχου πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Lockington *et al.*, 1985:

- 50-100 mg μυκηλίου θρυμματίστηκαν καλά με υγρό άζωτο και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Eppendorf χωρητικότητας 2,0 ml.
- Στο θρυμματισμένο μυκήλιο προστέθηκαν 0,8 ml διαλύματος 0,2 M Tris-HCl pH 8,0, 1% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, και ακολούθησε επώαση για 10-20 λεπτά στον πάγο.

- Το παρασκεύασμα στη συνέχεια καθαρίστηκε με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Πιο συγκεκριμένα:
 - ✓ Προστέθηκε ίσος όγκος (0,8 ml) ουδέτερης φαινόλης (pH 7-7,5), της εταιρίας Sigma, και ύστερα από καλή ανάδευση το παρασκεύασμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρωση δημιουργήθηκαν δύο φάσεις. Η ελαφρότερη φάση περιείχε το διάλυμα του DNA, ενώ η μεσόφαση περιείχε διάφορα ανεπιθύμητα συστατικά που είχαν απομείνει από το μυκήλιο.
 - ✓ Ακολούθησε πολύ προσεκτικός διαχωρισμός της πάνω φάσης (DNA), αποφεύγοντας τη μεσόφαση, και μεταφορά σε ένα νέο σωλήνα Eppendorf.
 - ✓ Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφόρμιου και ακολούθησε καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως. Μετά τη φυγοκέντρωση δημιουργήθηκαν ξανά δύο φάσεις, όπου στην πάνω φάση βρισκόταν το DNA και στην κάτω φάση το χλωροφόρμιο.
 - ✓ Περισυλλέχθηκε η «πάνω» φάση σε νέο Eppendorf αποφεύγοντας τη μεσόφαση.
- Ακολούθησε κατακρήμιση του DNA με την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και 1/10 του όγκου οξικού νατρίου 3 M pH 5,2 με φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 λεπτά.
- Το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη, ακολούθησε εξάτμιση της αιθανόλης και επαναδιάλυση του DNA σε 50 µl νερού υψηλής καθαρότητας.

2.1.6 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση

Οι πέψεις του DNA και οι κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας τις οδηγίες που αναφέρονται στα Κεφάλαια 1.53-1.73 του Sambrook *et al.* (1989).

2.1.6.1 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πραγματοποιήθηκαν πολυάριθμες πέψεις πλασμιδιακού και γονιδιωματικού DNA ή προϊόντων PCR αντίδρασης. Η ποσότητα του ενζύμου, που χρησιμοποιήθηκε για κάθε πέψη, εξαρτήθηκε από την συγκέντρωση του DNA υποστρώματος. Γενικότερα, οι ιδιότητες ενός περιοριστικού ενζύμου, καθώς και οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση ορίζονται από τον κατασκευαστή (NEB, Fermentas, Takara).

2.1.6.2 Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Σε όλες τις κλωνοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν, τόσο το ένθεμα όσο και ο φορέας κλωνοποίησης ήταν υψηλής καθαρότητας. Το πλασμίδιο και το ένθεμα χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 1/3 (συνήθως σε συγκεντρώσεις 0,1 μg πλασμιδίου/ 0,3 μg ενθέματος). Στις περιπτώσεις, στις οποίες έγινε αποκυκλοποίηση του φορέα μετά από πέψη με ένα μοναδικό περιοριστικό ένζυμο, ακολούθησε αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων του με την προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης αλκαλικής φωσφατάσης (Sambrook *et al.*, 1989), προκειμένου να αποφευχθεί η κυκλοποίηση του φορέα χωρίς την επικόλληση του ενθέματος. Πριν την προσθήκη της λιγάσης, η οποία καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των άκρων του φορέα και του ενθέματος, ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση ενζύμων και διαλυμάτων της πέψης, είτε μέσω διήθησης από ειδική κολώνα, είτε με κατακρήμνιση παρουσία αιθανόλης. Σε κάθε νέα κλωνοποίηση μαζί με το διάλυμα λιγάσης συμπεριλήφθηκε και μία επιπλέον αντίδραση «μάρτυρας». Η αντίδραση αυτή, περιείχε τα ίδια συστατικά με την πραγματική αντίδραση λιγάσης, αλλά δεν περιείχε ένθεμα και υποδείκνυε την περίπτωση ύπαρξης συμβατών άκρων στο φορέα, είτε λόγω ημιτελούς πέψης, είτε λόγω ατελούς δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.7 Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του *Aspergillus nidulans*

Οι μετασχηματισμοί έγιναν όπως περιγράφονται στο Koukaki *et al.*, 2003.
Αναλυτικότερα:

- 200 ml ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα με τις κατάλληλες ουσίες ως προς τις οποίες το στέλεχος είναι αυξότροφο και 5 mM ουρίας ως μοναδική πηγή αζώτου εμβολιάζονται με περίπου 3×10^9 κονιδιοσπόρια σε 10 ml 0,04 % αποδιατακτικού tween και επωάζονται στους 37 °C με 130 rpm ανάδευση για 3-4 ώρες. Η επώαση σταματάει στη φάση όπου μικροσκοπική παρατήρηση δείχνει πως τα κονίδια μόλις αρχίζουν να εκβλαστάνουν.
- Στη συνέχεια, τα κονίδια μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 4000 rpm.
- Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 20 ml Διαλύματος 1 (Πίνακας 2-5), 170 mg glucanex και μερικούς κόκκους BSA (αλβουμίνης ορού βοδιού, bovine serum albumin). Το εναιώρημα αυτό επωάζεται για 5 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια

στους 30 °C με ανάδευση στις 130 rpm και για 90-120 λεπτά για τη δημιουργία πρωτοπλαστών.

- Μετά το τέλος της επώασης οι πρωτοπλάστες διαμοιράζονται σε γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου corex όπου και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 4000 rpm.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και οι πρωτοπλάστες πλένονται με προσθήκη 10 ml Διαλύματος 2 και φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε όγκο Διαλύματος 2 ανάλογα με τον αριθμό των μετασχηματισμών που πραγματοποιούνται, χρησιμοποιώντας 200 μl πρωτοπλαστών για κάθε μετασχηματισμό.
- Τα 200 μl πρωτοπλαστών επωάζονται με 0,5-3 μg του εκάστοτε DNA παρουσία 50 μl διαλύματος 60% PEG 6.000 (polyethylene glycol) σε 10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM CaCl₂ για 15 λεπτά στον πάγο.
- Στη συνέχεια στο μίγμα πρωτοπλαστών-DNA προστίθενται 500 μl διαλύματος PEG 60% και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα πλένεται προσθέτοντας 1 ml Διαλύματος 2 και φυγοκεντρώντας για 5 λεπτά στις 5000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τελικά το ίζημα πρωτοπλαστών επαναδιαλύεται σε 200 μl του παραπάνω διαλύματος και απλώνεται ήπια σε ισοοσμωτικό επιλεκτικό στερεό μέσο καλλιέργειας.
- Τα τρυβλία επωάζονται για 4 μέρες στους 37 °C.

Πίνακας 2-5 Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το μετασχηματισμό.

Διάλυμα	Σύσταση
1	1,2M MgSO ₄ 10mM Orthophosphate pH 5,8 1M Σορβιτόλη
2	10mM Tris-HCl pH 7,5 10mM CaCl ₂

2.1.8 Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του *Aspergillus nidulans*

Η διαδικασία της ανάλυσης κατά Southern που περιγράφεται παρακάτω, αποτελεί τροποποίηση της αντίστοιχης μεθόδου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 9.31-9.57 στο Sambrook *et al.*, 1989.

Η ανάλυση κατά Southern έγινε σε όλα τα μετασηματισμένα στελέχη του *A. nidulans*, προκειμένου να διαπιστωθεί τόσο το είδος της ενσωμάτωσης του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του στελέχους δέκτη όσο και ο αριθμός των πλασμιδιακών αντιγράφων που ενσωματώθηκαν.

2.1.8.1 Πέψη του γονιδιωματικού DNA και διαχωρισμός των ζωνών σε πήκτωμα αγαρόζης

3-5 μg γονιδιωματικού DNA που απομονώθηκε από τα μετασηματισμένα στελέχη υποβλήθηκε σε πέψη με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, παρουσία ριβονουκλεάσης A 1 μg/ml. Το εκάστοτε περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε με το κριτήριο της εμφανούς διαφοράς ομόλογων και ετερόλογων ενσωματώσεων στον εκάστοτε γονιδιακό τόπο. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης πέψη του γονιδιωματικού DNA, το περιοριστικό ένζυμο προστέθηκε σε δύο φάσεις ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα του περιοριστικού ενζύμου προστέθηκε από την αρχή στην τελική συγκέντρωση (1X). Στην πρώτη φάση προστέθηκε η μισή ποσότητα του ενζύμου και το ένζυμο αφέθηκε να δράσει για δώδεκα ώρες στους 37 °C. Μετά την πάροδο των δώδεκα ωρών προστέθηκε ¼ της ποσότητας περιοριστικού ενζύμου και το ένζυμο αφέθηκε να δράσει για άλλες 2 ώρες στους 37 °C.

2.1.8.2 Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αφού έγινε καλός διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης στο πήκτωμα αγαρόζης (για περίπου 5 ώρες στα 55 Volt), το πήκτωμα τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, προκειμένου να διασπαστεί το DNA σε μικρότερα κομμάτια και να διευκολυνθεί η μεταφορά του σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιήθηκε με τη βύθιση του πηκτώματος σε διάλυμα μετουσίωσης (Πίν. 2-6) για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξουδετερώθηκε σε διάλυμα εξουδετέρωσης (Πίν. 2-6) για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA στη συνέχεια μεταφέρθηκε μέσω της δράσης τριχοειδών φαινομένων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Hybond-N⁺ (Amersham) με τη βοήθεια διαλύματος αλάτων 20X SSC (Πίνακας 2-6), χαρτιών Whatman και απορροφητικού χαρτιού (Sambrook *et al.*, 1989). Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς του DNA στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω στην τράπεζα UV για 5 λεπτά, προκειμένου να μονιμοποιηθεί η πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη μέσω της

δημιουργίας ομοιοπολικών «σταυροδεσμών» (cross-linking) μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης.

Πίνακας 2-6 Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανάλυσης κατά Southern.

Διαλύματα	Σύσταση στο λίτρο
TAE (50x)	242 g Tris base 57,1 ml κρυσταλλικό CH ₃ COOH 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
Διάλυμα Μετουσίωσης	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Διάλυμα Εξουδετέρωσης	1,5 M NaCl 1 M Tris-HCl pH 8,0
20X SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ pH 7,0 με NaOH 0,5 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,0
Ρυθμιστικό διάλυμα Church	1% BSA, 7% SDS 1 mM EDTA

2.1.8.3 Προϋβριδισμός – Κατασκευή ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη ³²P[^{ad}CTP] – Υβριδισμός

Η επιλογή της θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιείται ο προϋβριδισμός και ο υβριδισμός είναι καθοριστικής σημασίας. Όσο υψηλότερη είναι αυτή η θερμοκρασία τόσο πιο αυστηρές γίνονται οι συνθήκες πρόσδεσης του ιχνηθέτη στο DNA που είναι προσδεμένο στη μεμβράνη. Σε χαμηλές θερμοκρασίες ευνοείται η πρόσδεση του ιχνηθέτη με τμήματα του γονιδιωματικού DNA με τα οποία υπάρχει μικρή ομολογία στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Στα συγκεκριμένα πειράματα ο υβριδισμός έγινε στους 65° C. Ο προϋβριδισμός της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες επίσης στους 65° C σε ρυθμιστικό διάλυμα Church (Πίνακας 2-6) με περιστροφή μέσα σε ειδικούς κυλίνδρους. Ο υβριδισμός έγινε για 15-18 ώρες στους 65° C στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του κατάλληλου ραδιοσημασμένου ανιχνευτή.

Οι DNA ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κατά Southern ήταν: Για το ORF του *uapA* το τμήμα 860 bp που ενισχύθηκε με τους εκκινητές 26 και 27, για το *argB* το DNA τμήμα 800 bp που προκύπτει από την πέψη του pAN510exp πλασμιδίου με *Sall*, και για το *pABA* το DNA τμήμα ~2000 bp που προκύπτει από την

πέψη του πλασμιδίου pAN520exp με *SacI*. Από κάθε προϊόν, 250 ng χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ιχνηθέτη. Η σήμανση του ιχνηθέτη έγινε με «τυχαία πρόσδεση» (random priming) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της BRL Multiprime DNA labelling Kit. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής:

- Τα 250 ng από του ιχνηθέτη προσαρμόστηκαν σε όγκο 21 μl με την προσθήκη απεσταγμένου νερού και αποδιατάχθηκαν με βρασμό για 2 λεπτά, προκειμένου να ανοίξουν οι αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA.
- Το βρασμένο δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο, ώστε να μειωθεί η κινητικότητα των αλυσίδων και να αποφευχθεί η δημιουργία διπλής έλικας.
- Στο αποδιαταγμένο DNA προστέθηκε μίγμα όλων των πιθανών συνδυασμών τυχαίων εξανουκλεοτιδίων (random hexamers), τα τρία από τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP), το τέταρτο δεοξυνουκλεοτίδιο dCTP που ήταν ραδιοσημασμένο με ^{32}P (^{32}P -[$^{\alpha}$ dCTP]), Klenow DNA πολυμεράση, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ο όγκος της αντίδρασης προσαρμόστηκε με την προσθήκη νερού στα 50 μl (Πίν. 2-7). Η αντίδραση επώαστηκε για μία ώρα στους 37° C. Τα τυχαία εξανουκλεοτίδια προσδέθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε μονόκλωνη αλυσίδα DNA του ιχνηθέτη. Στα κενά που παρέμειναν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες, συντέθηκε το συμπληρωματικό κομμάτι DNA, μέσω της δράσης της Klenow πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί για αυτό το σκοπό τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια. Επειδή το dCTP δεοξυνουκλεοτίδιο είναι ραδιοσημασμένο με ^{32}P , η συμπληρωματική αλυσίδα που συντέθηκε περιείχε ^{32}P -[$^{\alpha}$ dCTP] και επομένως ήταν ραδιοσημασμένη.
- Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στους 37 °C, το παραπάνω μίγμα διηθήθηκε μέσα από ειδικό κολωνάκι χωρητικότητας 100 μl (Pharmacia), το οποίο συγκράτησε τα ελεύθερα νουκλεοτίδια που δεν κατάφεραν να ενσωματωθούν κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του ιχνηθέτη και τα οποία δημιουργούν θόρυβο (μαύρες κουκίδες) στο φιλμ αυτοραδιογραφίας.
- Το μίγμα που διηθήθηκε από το κολωνάκι, αποδιατάχθηκε με βρασμό για 2 λεπτά και αμέσως προστέθηκε μέσα στο διάλυμα προϋβριδισμού στον κύλινδρο που βρισκόταν η μεμβράνη, για να ξεκινήσει ο υβριδισμός. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε για τουλάχιστον 12 ώρες στους 65 °C.

Πίνακας 2-7 Η σύσταση της αντίδρασης ραδιοσήμανσης του ιχνηθέτη με ^{32}P -[adCTP], μέσω της τυχαίας πρόσδεσης εξαμερών.

Συστατικά της αντίδρασης	Συγκεντρώσεις
DNA ιχνηθέτης	250 ng
Τυχαία εξανουκλεοτίδια (Sigma)	10 ng
dATP (BRL)	10 μM
dGTP (BRL)	10 μM
dTTP (BRL)	10 μM
^{32}P -[$^{\text{a}}$ dCTP]	0,05 mCi
Klenow DNA πολυμεράση (Minotech)	5 u
10X ρυθμιστικό διάλυμα Klenow	1X
H ₂ O (απεσταγμένο)	μέχρι τα 50 μl

2.1.8.4 Εκπλύσεις της μεμβράνης – Εμφάνιση

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις εκπλύσεις της μεμβράνης και η κάθε έκπλυση διήρκεσε μισή ώρα. Οι τρεις πρώτες εκπλύσεις έγιναν μέσα στον κύλινδρο με περιστροφή και στους 65° C με διάλυμα 2X SSC, 0,1% SDS. Η τελευταία έκπλυση έγινε με διάλυμα 0,2X SSC, 0,1% SDS, μέσα σε λεκάνη με ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος των εκπλύσεων, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα αυτοραδιογραφίας μαζί με φιλμ (Kodak X-omat) και η κασέτα μεταφέρθηκε στους -80° C. Η πρώτη εμφάνιση πραγματοποιήθηκε μετά από δύο ώρες έκθεσης, με κοινά φωτογραφικά διαλύματα ανάπτυξης και μονιμοποίησης της εταιρείας Kodak, και έπειτα ανάλογα με τις ανάγκες. Γενικά, η διάρκεια της έκθεσης καθορίζεται από την ποιότητα σήμανσης του ιχνηθέτη αλλά και από τη συγκέντρωση του DNA που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη.

2.1.9 Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών και η κινητική τους

2.1.9.1 Προετοιμασία κονιδίων του *A. nidulans*

Τα κινητικά πειράματα μέτρησης της πρόσληψης ραδιοσημασμένων πουρινών σε κονιδιοσπόρια και νεαρά μυκήλια στελεχών του *A. nidulans* έγιναν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Papageorgiou *et al.* (2008β) και Tazebay *et al.* (1995, 1997).

Τα στελέχη του *A. nidulans* που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύχθηκαν επαρκώς μετά από επώασή τους σε στερεό, πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37° C για 3-4 ημέρες. Τα κονιδιοσπόρια του μύκητα επαναδιαλύθηκαν στη συνέχεια σε διάλυμα

Tween-80, συγκέντρωσης 0,01%, διηθήθηκαν μέσω φίλτρου blutex και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 25 ml υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος που περιείχε τις κατάλληλες αυξοτροφίες, καθώς και τις αρμόζουσες κατά περίπτωση πηγές αζώτου και άνθρακα. Πριν από την επιμόλυνση υπολογίστηκε ο αριθμός των κονιδιοσπορίων και προσαρμόστηκε σε τελική συγκέντρωση 5×10^6 κονιδιοσπόρια / ml καλλιέργειας. Η καλλιέργεια επωάστηκε σε αναδεδόμενο επωαστήρα σε συνθήκες 37° C και 140 rpm, για τον απαιτούμενο χρόνο. Στις συνθήκες αυτές τα κονιδιοσπόρια χρειάζονται περίπου 4 ώρες για να φτάσουν στο τέλος της ισοτροπικής φάσης ανάπτυξης, ενώ μυκήλια, παρόμοια με τις συνήθεις συνθήκες του μικροσκοπίου χρειάζονται περίπου 16 ώρες επώασης.

2.1.9.2 Προσθήκη της ραδιοσημασμένης ουσίας

Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη της ραδιοσημασμένης ουσίας ($[^3\text{H}]$ -ξανθίνη (21.1 Ci/mmol), Moravek Biochemicals, Brea, CA) σε συγκέντρωση 0,15 μM για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1 λεπτό). Η πρόσληψη της ραδιοσημασμένης ουσίας τερματίστηκε με την προσθήκη περίσσειας (σε τελική συγκέντρωση 1 mM) μη σημασμένης ουσίας. Ακολούθησαν στάδια έκπλυσης της ραδιοσημασμένης ουσίας που δεν είχε προσληφθεί από τα κύτταρα. Η έκπλυση έγινε με φυγοκέντρηση του μίγματος στις 12000 rpm για 7-10 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου, επαναδιάλυση του μίγματος σε 1 ml ψυχρού υγρού διαλύματος και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα τελικά επαναδιαλύθηκε και ομογενοποιήθηκε με vortex σε 1 ml διαλύματος σπινθηρισμού, που περιείχε τον οργανικό διαλύτη τολουένιο, Triton-X-100 και μικροποσότητες των ενισχυτών σήματος PPO και POPOP (σύσταση σε 1 l: 666 ml τολουένιο, 2,66 g PPO, 0,066 g POPOP, 333 ml Triton-X-100). Τέλος, στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της πρόσληψης της ραδιοσημασμένης πουρίνης σε ειδικό φωτόμετρο σπινθηρισμού (Tazebay *et al.*, 1995; Tazebay *et al.*, 1997).

Στα πειράματα ανταγωνισμού προστέθηκαν ταυτόχρονα η ραδιοσημασμένη ουσία σε συγκέντρωση 0,5 ή 1 μM και δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις της μη ραδιοσημασμένης ουσίας (πουρίνες, ανάλογα πουρινών), η οποία έδρασε ως ανταγωνιστής. Από τα πειράματα ανταγωνισμού μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για την εξειδίκευση του μεταφορέα ως προς τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται ως ανταγωνιστές. Τα υποστρώματα που δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο του

μεταφορέα είναι αυτά που ανταγωνίζονται τη δέσμευση της ραδιοσημασμένης ουσίας στο ίδιο ενεργό κέντρο. Η δέσμευση ενός υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του μεταφορέα δεν συνεπάγεται απαραίτητα ότι ο μεταφορέας μεταφέρει το συγκεκριμένο υπόστρωμα κατά μήκος της μεμβράνης. Στα πειράματα κινητικής της πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε συνθήκη και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν. Ο αποδεσμευτής κλίσης πρωτονίων carbonylcyanide chlorophenylhydrazone (CCCP) και ο αναστολέας ATPασών *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) προστέθηκαν 10 λεπτά πριν την προσθήκη ραδιοσημασμένου υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 30 μM και 100 μM αντίστοιχα.

Η σταθερά συγγένειας K_m του μεταφορέα για το ραδιοσημασμένο υπόστρωμα μπορεί να υπολογισθεί εφαρμόζοντας τις εξισώσεις Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, όπου γίνεται συσχέτιση της ταχύτητας της αντίδρασης (V) με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (S). Με τον τρόπο αυτό μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για τις σχέσεις συγγένειας του φυσικού τύπου όσο και των μεταλλαγμένων μεταφορέων με τα υποστρώματά τους, αλλά και ετερόλογων πρωτεϊνών κατάλληλα εκφρασμένων στον *A. nidulans*. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Prism3, με το οποίο και εξήχθησαν οι τιμές $K_{m,i}$. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τουλάχιστον 2 ανεξάρτητα πειράματα με τρεις επαναλήψεις έκαστο, των οποίων η τυπική απόκλιση των καθαρών τιμών είναι το πολύ 10%.

2.1.10 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση πρωτεϊνών του *A. nidulans*, κονιδιοσπόρια από στελέχη του μύκητα αναπτυγμένα για 4 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα συλλέχθηκαν σε 0.01% (w/v) TWEEN-20 και, μέσω διήθησης με τη χρήση αποστειρωμένου φίλτρου blutex, εμβολιάστηκαν σε κωνική φιάλη με 100 ml του εκάστοτε αντίστοιχου ελάχιστου θρεπτικού μέσου (MM), που περιείχε τις απαραίτητες πηγές αζώτου και αυξοτροφίες. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 12-16 ώρες στους 25 °C, με ανάδευση στις 140 rpm. Τα μυκήλια συλλέχθηκαν με τη χρήση φίλτρων blutex, θρυμματίστηκαν 4-5 φορές έκαστο παρουσία υγρού αζώτου και 400 mg θρυμματισμένου μυκηλίου συλλέχθηκαν σε σωλήνες 2 ml τύπου eppendorf. Κατόπιν ακολουθήθηκαν διαδικασίες ανάλογα με το είδος της επιθυμητής ανάλυσης, όπως αναφέρονται παρακάτω.

2.1.10.1 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών για την ανίχνευση ουβικουιτινιωμένων μορφών του UraA

Το θρυμματισμένο μυκηλίο αναδιαλύθηκε μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης με 25 mM N-ethyl-meilamide (NEM), 1 mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500) (μέχρι τα 2 ml) και επώασθηκε 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στους 4 °C, στα 3000 g προκειμένου να απομακρυνθούν αδιάσπαστα κύτταρα και κυτταρικά τοιχώματα. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα προπαγωμένα erpendorf 2 ml και οι ολικές μεμβρανικές πρωτεΐνες κατακρημνίσθηκαν με φυγοκέντρηση στα 13.000 g, στους 4 °C για 45 λεπτά. Το ίζημα επαναϊωρήθηκε σε 400 μl διάλυμα απομόνωσης που περιείχε 5 M ουρία και επώασθηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στα 13.000 g για 45 λεπτά, στους 4 °C, και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 320 μL διαλύματος απομόνωσης, εμπλουτισμένο με 25 mM NEM, 1 mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500).

Πίνακας 2-8 Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση εμπλουτισμένων ουβικουιτινιωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Διάλυμα	Σύσταση
Διάλυμα απομόνωσης	100 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA pH 8,0
	250 mM Tris
	50 mM Tris-HCl pH 6,8
1x Διάλυμα μετουσίωσης	2% SDS
	10% Γλυκερόλη
	2 mM EDTA
	2% β-μερκαπτοαιθανόλη
	0,005% μπλε της βρωμοφαινόλης

Για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών προστέθηκαν 80 μl τριχλωρο-οξικού οξέος (TCA) 50%. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλύθηκε με προσθήκη και επαναρρόφηση 400 μL Tris Base 1 M, για την εξουδετέρωση του όξινου pH λόγω του TCA. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl 1X διάλυμα μετουσίωσης ουβικουιτινιωμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους. Με αυτό το

πρωτόκολλο δεν είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο της Bradford και ο καθορισμός της ισοποσοτικής τους φόρτωσης για την ανάλυση Western έγινε με προηγούμενη αναλυτική ηλεκτροφόρηση μέρους του δείγματος σε SDS-PAGE και χρώση με διάλυμα χρωστικής coomassie (παράγραφος 6.17.7). Πριν την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE επωάστηκαν για 10-15 λεπτά στους 37 °C.

2.1.10.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Το σύμπλοκο πρωτεϊνών με τη χρωστική του αντιδραστηρίου Bradford (100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml αιθανόλη, 100 ml H₃PO₄, 850 ml H₂O) προκαλεί αλλαγή του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Το ποσοστό απορρόφησης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, 2-5 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε 2 ml αντιδραστηρίου Bradford σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες, αναμείχθηκαν και η οπτική τους πυκνότητα προσδιορίστηκε στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 2 ml του αντιδραστηρίου. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών καθορίζεται συγκρίνοντας τις τιμές οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων με την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της αλβουμίνης (BSA).

2.1.10.3 Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε όπως στο Pantazopoulou *et al.* 2007. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%, SDS 0,1%. Η σύσταση των πηκτωμάτων φαίνεται παρακάτω:

Συστατικό	Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (10 ml)	Πήκτωμα συσσώρευσης 4% (10 ml)
Acrylamide/Bisacrylamide 30% (37,5:1)	3,3 ml	1,3 ml
H ₂ O απεσταγμένο	4,05 ml	6 ml
Lower Tris	2,5 ml	-
Upper Tris	-	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 μl	100 μl
10 % (w/v) APS	50 μl	50 μl
TEMED	10 μl	20 μl

Lower Tris: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 ; Upper Tris: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
APS: Ammonium persulfate

Τα δείγματα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά στα 110 V, παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris, 192 mM Γλυκίνη, 0,1 % w/v SDS) σε συσκευή Mini PROTEAN™ Tetra Cell (Bio-Rad) μέχρι η χρωστική τους (~15 kDa) να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος (~ 1,5 ώρα). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για την ανίχνευση ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA πραγματοποιήθηκε στα 110 V μέχρι να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος η ζώνη των 50 kDa του πρωτεϊνικού μάρτυρα (Fermentas) (~3 ώρες). Ο λόγος της εκτεταμένης ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ήταν η ανάγκη διαχωρισμού των πιθανών ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA, αφού το μόριο της ουβικουιτίνης έχει μοριακό βάρος περίπου 5 kDa, όταν η UapA-GFP έχει περίπου 95 kDa, αλλά τρέχει στα 80 kDa. Ο λόγος για την αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης αυτής είναι ο ίδιος με όλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών, μιας και δεν προσδέουν το ίδιο ποσοστό SDS σε σχέση με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Ως γνωστόν, στην SDS-PAGE οι πρωτεΐνες αναλύονται ηλεκτροφορητικά με βάση το αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο που τους προσδίδει η προσάρτηση μορίων SDS σε υδρόφοβα αμινοξέα. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαθέτουν περισσότερα τέτοια, οπότε αποκτούν ισχυρότερο αρνητικό φορτίο και εμφανίζουν αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα στις συνθήκες αυτές. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε για χρώση με διάλυμα χρωστικής coomassie ή μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF (Amersham) για την πραγματοποίηση ανάλυσης κατά Western.

2.1.10.4 Χρώση με διάλυμα χρωστικής Coomassie

Η χρώση των SDS-PAGE με διάλυμα χρωστικής Coomassie πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 0,25% Coomassie brilliant blue, 45% μεθανόλη, 10% κρυσταλλικό οξικό οξύ για μία ώρα υπό ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός του πηκτώματος με 2-3 πλυσίματα των 30 λεπτών σε 30% μεθανόλη, 10% κρυσταλλικό οξικό οξύ.

2.1.10.5 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς για 30 λεπτά, ώστε να αποκτήσει οριστικό τελικό μέγεθος. Μετά το πέρας αυτών, η PVDF μεμβράνη ενεργοποιήθηκε για 30 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη και τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς για 30 λεπτά. Κατόπιν η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω στο πήκτωμα και δύο χαρτιά Whatmann 4 mm προστέθηκαν

εκατέρωθεν. Ο ανωτέρω σχηματισμός τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς, με τη μεμβράνη προς το θετικό πόλο (οι πρωτεΐνες έχουν αποκτήσει αρνητικό φορτίο λόγω του SDS και θα κινηθούν προς αυτόν). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα στα 100 V σε διάλυμα μεταφοράς θερμοκρασίας 4 °C και χρήση παγοκύστης. Μετά το τέλος της μεταφοράς η μεμβράνη πλύθηκε σε διάλυμα TBS και τοποθετήθηκε σε διάλυμα TBS-Tween μέχρι την επώασή της με το επιθυμητό αντίσωμα.

Πίνακας 2-9 Σύσταση διαλυμάτων μεταφοράς και έκπλυσης.

Διάλυμα	Σύσταση
Διάλυμα μεταφοράς	25 mM Tris 192 mM γλυκίνη 20% (v/v) μεθανόλη
Διάλυμα TBS	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl
Διάλυμα TBS-Tween	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,05-0,1% Tween 20

2.1.10.6 Χρώση των δεσμευμένων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών με Ponceau S.

Η αποδοτικότητα της μεταφοράς μπορεί να ελεγχθεί με χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με το αντιδραστήριο Ponceau S, το οποίο δεσμεύεται ειδικά στις πρωτεϊνικές ζώνες προσδίδοντάς τους χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα (Salinovich & Montelaro, 1986). Για τη χρώση, η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα Ponceau S (AppliChem) για 2 λεπτά υπό ανάδευση, και στη συνέχεια εκπλύθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης από τη χρωστική σε διάλυμα TBS-Tween υπό ανάδευση.

2.1.10.7 Ανοσοαποτύπωμα και Χημειοφθορισμός

Μετά τη μεταφορά τους στη μεμβράνη, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν ειδικά, με τη βοήθεια αντισωμάτων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένους επιτόπους. Η αλληλεπίδραση επιτόπου-αντισώματος επιτρέπει την ειδική και υψηλής διακριτικότητας ανίχνευση μιας πρωτεΐνης που έχει ακινητοποιηθεί σε μια μεμβράνη, μέσω μιας διαδικασίας που καλείται ανοσοανίχνευση. Μετά τη μεταφορά ενός ηκτητώματος SDS σε μεμβράνη, οι περιοχές της μεμβράνης που είναι ελεύθερες πρωτεϊνών πρέπει να αδρανοποιηθούν προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική

δέσμευση του πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος στη μεμβράνη. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα σε 2% διάλυμα σκόνης γάλακτος σε TBS-Tween (διάλυμα αδρανοποίησης), σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για 2 ώρες με το πρωτογενές αντίσωμα (mouse anti-GFP μονοκλωνικό αντίσωμα, Roche, αραιώση 1:1000-2000 σε διάλυμα αδρανοποίησης) και έκπλυση με διάλυμα TBS-Tween 2 x 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα στο οποίο είναι χημικά συνδεδεμένο το μόριο αναφοράς Horse Radish Peroxidase (HRP) (rabbit anti-mouse IgG-HRP, Cell Signalling). Μετά την επώαση με τα αντισώματα η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα TBS-Tween 2 x 10 λεπτά, στη συνέχεια για άλλα 10 λεπτά με διάλυμα TBS. Τέλος, υποβλήθηκε σε αντίδραση χημειοφθορισμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Supersignal West Pico Chemiluminescent (Pierce) ως υπόστρωμα του ενζύμου HRP. Η μεμβράνη στεγνώθηκε μεταξύ διηθητικών χαρτιών, επικαλύφθηκε με 2 ml μίγματος του συγκεκριμένου υποστρώματος πάνω σε γυαλί για 90-240 δευτερόλεπτα, περιτυλίχθηκε σε διαφανή μεμβράνη και στη συνέχεια εκτέθηκε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, όπως έχει περιγραφεί για τη διαδικασία της ανάλυσης κατά Southern.

2.1.11 Μικροσκοπία επιφθορισμού

Τα δείγματα για το μικροσκόπιο επιφθορισμού έχουν ετοιμαστεί σύμφωνα με τους Valdez-Taubas *et al.* (2004). Ειδικότερα, τα δείγματα επώαστηκαν σε τρυβλία Petri 3 cm με καλυπτρίδα, προστατευμένα από το φως, σε υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα (MM – βλ. Πιν. 2-1) συμπληρωμένο με ουρία ως πηγή του αζώτου και τις κατάλληλες αυξοτροφίες στους 25 °C για 12 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε διάφορες συνθήκες για 2-4 ώρες.

Η χρώση με FM4-64 (Molecular Probes, Inc, USA) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το Penalva, 2005. Ειδικότερα, καλυπτρίδες με εκβλαστημένα κονίδια ή νεαρά μυκήλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 3 cm, καλυμμένες με 0,1 ml 10 μM FM4-64, επώαστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά, ξεπλύθηκαν με 5 ml MM, και μεταφέρθηκαν σε 3 mL νέου MM για 10 - 60 λεπτά.

Η χρώση των χυμοτοπίων με CMAC (7-αμινο-4-χλωρομεθυλο κουμαρίνη) (Molecular Probes, Inc, USA) ήταν σύμφωνα με τους Pantazopoulou *et al.*, 2007. Καλυπτρίδες με εκβλαστημένα κονίδια ή νεαρά μυκήλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 3

cm, καλυμμένα με 0,1 ml αραιώση 1/1000 της CMAC (5 mg/ml διαλύματος), επώστηκαν στους 25 °C για 20 λεπτά, ξεπλύθηκαν με 3 ml MM, και μεταφέρθηκαν σε 3 ml νέο MM για 20 λεπτά.

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο επιφθορισμού αντίθεσης φάσεων Zeiss AxioPlan με τα κατάλληλα φίλτρα και οι προκύπτουσες εικόνες αποκτήθηκαν με την Zeiss-MRC5 ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με χρήση του λογισμικού V4.40.0 AxioVs40. Οι εικόνες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Adobe Photoshop CS3.

2.2 Βακτήρια

2.2.1 Θρεπτικά υποστρώματα & Συντήρηση

Η καλλιέργεια των βακτηρίων του στελέχους DH5a έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani (LB) (Σύσταση σε 1 l: Bacto Tryptone 10 g, NaCl 10 g, BactoYeast Extract 5 g, pH 7,0) (Sambrook *et al.*, 1989). Η προσαρμογή του pH έγινε με διαλύματα NaOH (1 N) και HCl (1 N). Σε περιπτώσεις παρασκευής στερεού θρεπτικού υποστρώματος, προστέθηκε επιπλέον 1,5% άγαρ μετά την προσαρμογή του pH. Στις περιπτώσεις στις οποίες χρειάστηκε η προσθήκη αμικικιλίνης, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Τα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν στους -80 °C σε 50% γλυκερόλη.

2.2.2 Βακτήρια ως δέκτες πλασμιδίων – Προετοιμασία

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δεκτικών κυττάρων της *E. coli* αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 1.82-1.84 στο Sambrook *et al.* (1989) και διαμορφώθηκε ως εξής:

- Μία απομονωμένη αποικία του βακτηρίου *E. coli* (DH5a) χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Luria Bertoni (LB) και η καλλιέργεια επώστηκε για 16 ώρες στους 37 °C με ανάδευση στις 220 rpm.
- Από την πυκνή καλλιέργεια βακτηρίων που παράχθηκε, χρησιμοποιήθηκε 0,5 ml για την επιμόλυνση 400 ml υγρού LB σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 1 l, ώστε να εξασφαλιστεί καλός αερισμός και ανάδευση.
- Τα κύτταρα επώστηκαν στους 37 °C με ανάδευση στις 260 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει το 0,45-0,55, σε μήκος κύματος 600 nm.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στις 4500 g και στους 4 °C.

- Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 160 ml ψυχρού διαλύματος TFB I (30 mM CH₃COOK, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 5,8 με 1 M CH₃COOH), επώστηκαν για 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκαν όπως προηγουμένως.
- Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε ξανά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20 ml ψυχρού διαλύματος TFB II (10 mM MOPS pH 6,5, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 6,5 με 1 M KOH).
- Το εναιώρημα των κυττάρων επώστηκε για 15-60 λεπτά στον πάγο.
- Τέλος, τα κύτταρα διαμοιράστηκαν σε Eppendorf και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, όπου μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον έξι μήνες χωρίς να χάσουν την δεκτικότητά τους (Sambrook *et al.* 1989).

2.2.3 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων *E. coli* αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 1.74-1.81 του Sambrook *et al.*, 1989 και πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Σε 200 μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 0,01-0,5 μg DNA.
- Το μίγμα επώστηκε για 20 λεπτά στον πάγο.
- Ακολούθησε θερμικό σοκ των δεκτικών κυττάρων, με απότομη μεταφορά τους από τον πάγο στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα και απότομη επαναφορά στον πάγο, όπου και παρέμειναν για 2 λεπτά. Το θερμικό σοκ των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων χαλάρωσε την κυτταρική μεμβράνη και διευκόλυνε την εισαγωγή του πλασμιδίου.
- Τα κύτταρα στη συνέχεια επώστηκαν για 60 λεπτά στους 37 °C σε 1 ml υγρού θρεπτικού LB προκειμένου να επανέλθουν στους φυσιολογικούς ρυθμούς ανάπτυξης και να εκφραστεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο εκάστοτε αντιβιοτικό (π.χ. το γονίδιο bla της β-λακταμάσης που θα εξασφαλίσει στα μετασχηματισμένα στελέχη ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη). Ο χρόνος επώασης σε LB δεν πρέπει να ξεπερνάει τη μία ώρα, ώστε τα κύτταρα που θα επιλεγθούν να προέρχονται από μετασχηματισμένα κύτταρα και όχι από την διαίρεση αυτών.
- Τα μετασχηματισμένα κύτταρα στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml).
- Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 16-18 ώρες.

2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, έγινε όπως περιγράφεται στο kit Nucleospin της εταιρείας Macherey-Nagel.

Για τη γρήγορη απομόνωση μικρής συγκέντρωσης και μέτριας καθαρότητας πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα, για διαγνωστικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω απλό και γρήγορο πρωτόκολλο που αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 1.34-1.37 του Sambrook *et al.*, 1989. Συγκεκριμένα:

- 1,5 ml αναπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων μετασχηματισμένων με πλασμίδιο, φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 12000 rpm.
- Το ιζήμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl διαλύματος 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA.
- Προστέθηκαν 200 μl διαλύματος 200 mM NaOH, 1% SDS και το μίγμα αναδεύτηκε καλά.
- Έπειτα, προστέθηκαν 200 μl διαλύματος 3 M CH₃COONa pH 5,5 και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά στις 12000 rpm.
- Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 500-600 μl διαλύματος ισοπροπανόλης και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά στις 12000 rpm.
- Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με 140 μl αιθανόλης 70% και επαναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο νερού υψηλής καθαρότητας (δισ-απεσταγμένο, HPLC, Milli-Q).

2.3 Κατευθυνόμενη *in vitro* PCR μεταλλαξιγένεση

Για την δημιουργία στοχευόμενων μεταλλαγών στο γονίδιο *uarA*, και συγκεκριμένα στο πλασμίδιο pAN510-GFP (Pantazopoulou *et al.*, 2007) εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, όπως περιγράφεται από την εταιρεία Stratagene (*quick change mutagenesis*), χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές.

2.3.1 Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή στοχευόμενων μεταλλαγών

Η κάθε μεταλλαγή κατασκευάστηκε με τη χρήση ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους 30-40 νουκλεοτιδικών βάσεων το κάθε ένα, τα οποία ήταν μεταξύ τους συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλο, ήταν αρκετά μεγάλοι ώστε να εξασφαλίζεται ένα μεγάλο τμήμα απόλυτης συμπληρωματικότητας, το οποίο θα αντισταθμίζει τη μειωμένη συμπληρωματικότητα στο σημείο όπου βρίσκονται οι τροποποιημένες νουκλεοτιδικές βάσεις. Η νουκλεοτιδική ακολουθία του 5' εκκινητή ήταν πανομοιότυπη με την αλληλουχία περιοχής του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, ενώ στο κέντρο περίπου έφερε τις νουκλεοτιδικές βάσεις προς αλλαγή. Ο 3' εκκινητής ήταν απόλυτα συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος στην αλληλουχία του 5' εκκινητή. Λόγω του «εκφυλισμού» του γενετικού κώδικα, είναι γνωστό ότι παραπάνω από ένα κωδικόνια είναι δυνατόν να κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ. Το κωδικόνιο που θα αντικαθιστούσε αυτό του φυσικού τύπου γονιδίου, ώστε να προκαλέσει τη μεταλλαγή, έπρεπε να περιέχει το μικρότερο δυνατό αριθμό νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων (mismatch) και επιπλέον να εμφανιζόταν με υψηλή συχνότητα στο γονιδίωμα του οργανισμού, στον οποίο επρόκειτο να εκφραστεί το μεταλλαγμένο γονίδιο.

Η θερμοκρασία πρόσδεσης του εκκινητή στη DNA μήτρα (T_m), υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω εμπειρικό τύπο:

$$T_m = 69,3 + 0,41(\text{GC}\%) - 650/L$$

όπου L: ο αριθμός νουκλεοτιδικών βάσεων του εκκινητή και

GC%: το % ποσοστό περιεκτικότητας του εκκινητή σε γουανίνες (G) και κυτοσίνες (C).

Τόσο το L όσο και το GC% αναφέρεται στο τμήμα του εκκινητή, ο οποίος παρουσιάζει συμπληρωματικότητα με τη DNA μήτρα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί με PCR. Στην περίπτωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταλλαξιγένεση, από το T_m που προέκυψε εφαρμόζοντας τον παραπάνω τύπο αφαιρέθηκε το ποσοστό επί τοις εκατό των νουκλεοτιδικών βάσεων οι οποίες είχαν μεταβληθεί σε σύγκριση με το φυσικού τύπου γονιδίου (% mismatch) και από την θερμοκρασία που προέκυψε αφαιρέθηκαν επιπλέον 5°C. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μικρότερο από τα δύο T_m που υπολογίστηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών.

2.3.2 Σύσταση της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Η αντίδραση PCR στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, περιλάμβανε μόνο 25 κύκλους προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία λαθών στη νουκλεοτιδική ακολουθία του προϊόντος της αντίδρασης. Οι πιθανότητες δημιουργίας λάθους ελαχιστοποιήθηκαν λόγω της χρήσης μίας ειδικής πολυμεράσης, της Pfx DNA πολυμεράσης (Invitrogen). Η πολυμεράση αυτή έχει τη δυνατότητα να διορθώνει πιθανά λάθη της (proof reading). Επιπλέον, είναι ανθεκτική στην παρατεταμένη σύνθεση, καθώς μπορεί να συνθέσει πλασμίδια μεγέθους μέχρι και 15 kb. Η διάρκεια σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας από την DNA πολυμεράση διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το μέγεθος του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, η διάρκεια σύνθεσης είναι 60 δευτερόλεπτα για κάθε kb του πλασμιδίου. Στα συγκεκριμένα πειράματα, το πλασμίδιο μήτρα pAN510-GFP έχει μέγεθος περίπου 9 kb και επομένως η σύνθεση έγινε για 9 λεπτά. Η σύσταση και το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης φαίνονται στους Πίνακες 2-10 και 2-11.

Πίνακας 2-10 Σύσταση της αντίδρασης PCR της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.

Συστατικά της PCR	Τελική συγκέντρωση
Πλασμίδιο (υπόστρωμα)	10 ng
Εκκινητής 5' - 3'	135 ng
Εκκινητής 3' - 5'	135 ng
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 μM καθενός
Pfx DNA polymerase	2,5 u
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (περιέχει MgCl ₂)	1X (C _{τελ} MgCl ₂ 1,5 mM)
H ₂ O (απεσταγμένο)	μέχρι τελικού όγκου 50 μl

Πίνακας 2-11 Πρόγραμμα PCR για την εφαρμογή της *in vitro* κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.

Βήμα	Θερμοκρασία (° C)	Διάρκεια
1. Αρχική αποδιάταξη	95	5 min
2. Αποδιάταξη	95	15 sec
3. Πρόσδεση εκκινητών	T _m εκκινητών	30 sec
4. Επιμήκυνση	72	1 min/kb πλασμιδίου
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 min
6. Παύση	12	-

} 25 κύκλοι επανάληψης

2.4 Υπολογιστικά προγράμματα

2.4.1 Μοντέλο ομολογίας – Modeller 9v8

Η κατασκευή του μοντέλου ομολογίας πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Modeller 9v8 (Sali & Blundell, 1993). Κατασκευάστηκαν 100 διαφορετικά θεωρητικά μοντέλα. Η κατασκευή ενός μεγάλου αριθμού μοντέλων και όχι ενός και μοναδικού μοντέλου επιλέχθηκε λόγω της χρήσης του ειδικού αλγορίθμου βελτιστοποίησης της διαμόρφωσης των βρόχων της πρωτεΐνης. Με την εφαρμογή του αλγορίθμου αυτού πραγματοποιείται μία εκτεταμένη διερεύνηση της διαμόρφωσης των τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που δεν έχουν μία συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή. Η κατασκευή πολλών μοντέλων επιτρέπει στο λογισμικό την πιο εκτεταμένη διερεύνηση της χωροδιάταξης των τμημάτων αυτών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και άρα την ακριβέστερη αναπαράστασή τους.

Για την επιλογή του βέλτιστου μοντέλου ως κριτήριο επιλογής χρησιμοποιήθηκε η τιμή μιας αντικειμενικής συνάρτησης (objective function), μιας εγγενούς συνάρτησης του λογισμικού Modeller στην οποία περιγράφεται ο βαθμός στον οποίο έχουν τηρηθεί οι στερεοχημικοί περιορισμοί που τίθενται από το πρόγραμμα κατά τη διαδικασία κατασκευής των μοντέλων. Η τιμή αυτή οφείλει να είναι όσο το δυνατόν πιο χαμηλή. Το μοντέλο με τη χαμηλότερη τιμή επιλέχθηκε για περαιτέρω επεξεργασία.

2.4.2 Προετοιμασία πρωτεΐνης για υπολογισμούς

Η πρωτεΐνη προετοιμάστηκε για υπολογισμούς πρόσδεσης χρησιμοποιώντας το Protein Preparation Workflow (Schrödinger Suite 2011 Protein Preparation Wizard), όπως αυτό υλοποιείται στα προγράμματα Schrödinger και είναι προσβάσιμο από το λογισμικό Maestro (Maestro, Version 9.2, Schrödinger, LLC, NY, 2011).

Εν συντομία, προστέθηκαν άτομα υδρογόνου και βελτιστοποιήθηκε ο προσανατολισμός των ομάδων υδροξυλίου, Asn, Gln, καθώς και η κατάσταση πρωτονίωσης της His για να μεγιστοποιηθεί η σύνδεση υδρογόνου. Τέλος, το σύμπλοκο υπόστρωμα-πρωτεΐνη βελτιστοποιήθηκε με μια υπό περιορισμούς ελαχιστοποίηση εκτελούμενη από το Impref που βασίζεται στη μοριακή μηχανική (Impact, Έκδοση 5.7 Impact, Schrödinger, LLC, Νέα Υόρκη, 2011) και στο δυναμικό πεδίο OPLS2001, θέτοντας ως μέγιστη τετραγωνική ρίζα απόκλισης την τιμή 0,30 (Jorgensen *et al.*, 1996). Η προετοιμασία των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε με το LigPrep (LigPrep, Έκδοση 2.5, Schrödinger, LLC, Νέα Υόρκη, 2011) εφαρμογή

που αποτελείται από μια σειρά βημάτων που εκτελούν μετατροπές, εφαρμόζουν διορθώσεις στη δομή, δημιουργούν καταστάσεις ιονισμού και ταυτομερή, και βελτιστοποιούν τη γεωμετρία.

2.4.3 Σταθερότητα μοντέλου – Desmond software

Μετά την επιλογή του καλύτερου μοντέλου και την κατάλληλη προετοιμασία αυτού, πραγματοποιήθηκε η τελική βελτιστοποίησή του και ταυτόχρονα ο έλεγχος σταθερότητας. Η βελτιστοποίηση ενός μοντέλου ομολογίας συνίσταται καταρχήν στην πλήρη ελαχιστοποίηση της ενέργειάς του υπό τους όρους του πεδίου δυνάμεων μέσα στο οποίο θα πραγματοποιηθούν οι υπολογισμοί που θα ακολουθήσουν. Κατά δεύτερο λόγο, μετά την ελαχιστοποίηση πραγματοποιείται μία προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής, η οποία εξυπηρετεί δύο σκοπούς. Αφ' ενός ολοκληρώνεται η ενεργειακή βελτιστοποίηση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Αφ' ετέρου, κατά τη διάρκεια της δυναμικής καταγράφεται η μέση τιμή απόκλισης (RMSD) των άλφα-ανθράκων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από τις αρχικές συντεταγμένες. Η τιμή αυτή είναι σημαντικό κριτήριο σταθερότητας και τιμές απόκλισης που δεν ξεπερνούν τα 3 Å υποδεικνύουν ένα σταθερό μοντέλο.

Στην προκειμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής με το λογισμικό Desmond (Desmond Molecular Dynamics System, Version 3.0, D. E. Shaw Research, NY), διάρκειας 18 και 50 ns (στον FcyB και τον UarA αντίστοιχα), η οποία προετοιμάστηκε με 1 ns δυναμικής εξισορρόπησης σε λιπιδική διπλοστιβάδα με POPC (1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine), διαλυτοποιώντας τη μεμβράνη σε TIP4P νερό, εξουδετερώνοντας με ιόντα και προσθέτοντας 150 mM αλάτι (Bowers *et al.*, 2006). Κατά τη διάρκεια του χρόνου προσομοίωσης, το υπό κατασκευή μοντέλο φάνηκε σταθερό καθώς τηρούσε το παραπάνω κριτήριο απόκλισης. Ακολούθησαν υπολογισμοί για το βέλτιστο πρωτόκολλο πρόσδεσης.

2.4.4 Υπολογισμοί πρόσδεσης (Docking)

Για τη διαδικασία υπολογισμών πρόσδεσης διακρίνονται δύο κυρίως τεχνικές, η άκαμπτη πρόσδεση (rigid docking) και η εύκαμπτη πρόσδεση (flexible docking). Τα περισσότερα λογισμικά μπορούν να αξιοποιήσουν και τις δυο μεθόδους, ανάλογα με τις ανάγκες του χρήστη.

2.4.4.1 Υπολογισμοί άκαμπτης πρόσδεσης (Rigid Docking)

Στους υπολογισμούς άκαμπτης πρόσδεσης (rigid docking) τόσο η πρωτεΐνη όσο και το πρόσδεμα αναπαρίστανται από σημεία που ισαπέχουν και έχουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι υπολογισμοί αυτοί τοποθετούν το άκαμπτο υπόστρωμα σε διάφορες θέσεις της πρωτεΐνης, υπολογίζουν τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται και προτείνουν συγκεκριμένες θέσεις όπου μπορεί το υπόστρωμα να συνδεθεί. Οι μέθοδοι στηρίζονται σε ταχείς υπολογισμούς ταιριάσματος με βάση το μοντέλο κλειδί-κλειδαριάς για την αναγνώριση ενός υποστρώματος από την πρωτεΐνη. Αυτήν την μέθοδο ακολουθούν λογισμικά όπως το Glide (Friesner *et al.*, 2004). Η εύρεση των θέσεων πρόσδεσης υπολογίζεται είτε από σάρωση όλης της επιφάνειας της πρωτεΐνης, είτε από τυχαίες τοποθετήσεις του υποστρώματος στην περιοχή της πρωτεΐνης (π.χ. Glide). Η μέθοδος αυτή, λόγω της αυξημένης ταχύτητάς της χρησιμοποιούταν στο παρελθόν για σάρωση ψηφιακών βιβλιοθηκών. Σήμερα, όμως, με την εξέλιξη των H/Y, έχει αντικατασταθεί από εύκαμπτους υπολογισμούς πρόσδεσης. Για το λόγο αυτό, το προαναφερθέν λογισμικό έχει τροποποιηθεί ώστε να επιτελεί και εύκαμπτους υπολογισμούς πρόσδεσης.

2.4.4.2 Υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης (Flexible Docking)

Στους υπολογισμούς εύκαμπτης πρόσδεσης (flexible docking), ο όρος «εύκαμπτη» αναφέρεται μόνο στο υπόστρωμα, ή και στην πρωτεΐνη ταυτόχρονα. Στους υπολογισμούς με άκαμπτη την πρωτεΐνη, έχουμε είτε ακινητοποιημένα όλα τα αμινοξέα της πρωτεΐνης, είτε αναπαράσταση της πρωτεΐνης με σημεία που ισαπέχουν και έχουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, ώστε να προσομοιάζουν το πρωτεϊνικό περιβάλλον του προσδέματος. Αντίθετα, το πρόσδεμα μπορεί να λάβει διάφορους προσανατολισμούς και διάφορες διαμορφώσεις, ανάλογα των βαθμών ελευθερίας που διαθέτει. Οι υπολογισμοί αυτοί είναι σαφώς πιο ταχείς από τους αντίστοιχους της διαδικασίας με εύκαμπτη την πρωτεΐνη, αλλά δεν μπορούν να προβλέψουν την διαμόρφωση της πρωτεΐνης όταν συνδεθεί μόριο ογκώδες που θα προκαλέσει μεταβολές στα παρακείμενα αμινοξέα. Τα λογισμικά που χρησιμοποιούνται για τους σχετικούς υπολογισμούς διαφέρουν κυρίως στην μέθοδο που χρησιμοποιούν για να δημιουργήσουν τις ποικίλες δομές που θα αξιολογήσουν. Τα λογισμικά Glide (Friesner *et al.*, 2004) χρησιμοποιούν προσομοιώσεις Monte Carlo, όπου δημιουργούνται τυχαίες αρχικές δομές οι οποίες αξιολογούνται ενεργειακά από εξισώσεις ενέργειας που περιέχονται στο κάθε λογισμικό.

Στην περίπτωση που ο όρος “εύκαμπτη”, αναφέρεται στην πρωτεΐνη, αυτή αναπαριστάται από όλα της τα αμινοξέα, τα οποία είναι ελεύθερα να κινηθούν κατά την διάρκεια των υπολογισμών και να λάβουν τις ευνοϊκότερες ενεργειακά διαμορφώσεις. Οι υπολογισμοί αυτοί αν και χρονοβόροι σε σχέση με τους προηγούμενους, μπορούν να δώσουν πολύ καλή εικόνα της αλλαγής που μπορεί να επέλθει σε μια πρωτεΐνη όταν προσδεθεί ένα ογκώδες μόριο. Την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούν λογισμικά όπως το Macromodel, για την ακριβή πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης – υποστρώματος.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του IFD πρωτοκόλλου που καθιερώθηκε από το Schrödinger Suite 2011. Το πρωτόκολλο IFD βασίζεται σε μια επαναληπτική εφαρμογή του αλγορίθμου Glide για υπολογισμούς άκαμπτης πρόσδεσης και τον αλγόριθμο Prime για τελειοποίηση της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε μία βελτιωμένη προσομοίωση της σύνδεσης από την άποψη της ευελιξίας πρωτεΐνης.

2.4.4.3 Αλγόριθμοι Διαδικασιών Εύκαμπτης Πρόσδεσης – Συνδυασμός Low Mode και Monte Carlo

Για τη διαδικασία υπολογισμών πρόσδεσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν διάφοροι αλγόριθμοι προκειμένου να βρεθούν οι ευνοϊκότερες ενεργειακά δομές του συμπλόκου υποδοχέας-πρόσδεμα. Αυτές μπορεί να είναι, η προσομοίωση του προσδέματος και της πρωτεΐνης σαν σκληρές σφαίρες, υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής, υπολογισμοί προσομοίωσης Monte Carlo, η μέθοδος LowMode που αξιοποιεί τις δονήσεις χαμηλών συχνοτήτων καθώς και συνδυασμός τους, καθώς και γενετικοί αλγόριθμοι.

Ένας πολύ αποτελεσματικός συνδυασμός στην διερεύνηση του διαμορφωσιακού χώρου και ιδιαίτερα στην διαδικασία πρόσδεσης, είναι μεταξύ Monte Carlo και Low Mode Search. Με αυτό το συνδυασμό η μια μέθοδος καλύπτει ατέλειες της άλλης. Με τη διαδικασία Monte Carlo μπορούμε να κάνουμε μεγάλες αλλαγές σε κύριους βαθμούς ελευθερίας μέσω της τυχαίας μεταβολής τους, ενώ με το Low Mode Search μπορούμε να ανιχνεύσουμε το σύνολο των βαθμών ελευθερίας χωρίς αυτές να έχουν οριστεί προηγουμένως. Αντίθετα η μέθοδος Low Mode δεν μπορεί να κάνει μεγάλες κινήσεις στους βαθμούς ελευθερίας, αλλά προσομοιώνει την κίνηση χαμηλών συχνοτήτων του μορίου, που αναφέρονται σε σκελετικές κινήσεις.

Κεφάλαιο 3ο

Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη των σχέσεων δομής – λειτουργίας του μεταφορέα UapA

Σε περιπτώσεις όπου ο μεταφορέας είναι πλήρως χαρακτηρισμένος και καλά μελετημένος, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει διαθέσιμη συγγενική δομή, συχνά εφαρμόζεται διπλή προσέγγιση:

1. Κατασκευή μοντέλου ομολογίας και πραγματοποίηση υπολογισμών πρόσδεσης.
2. Εφαρμογή τεχνικών στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και περαιτέρω βιοχημικός χαρακτηρισμός.

Η παραπάνω πορεία ακολουθήθηκε στη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του μεταφορέα UapA.

3.1.1 Μοντέλο ομολογίας του μεταφορέα UapA

Το μοντέλο ομολογίας του μεταφορέα UapA κατασκευάστηκε βάσει της δομής του UraA από την *Escherichia coli*, η οποία είναι και η μοναδική διαθέσιμη κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή της οικογένειας NAT/NCS2 (βλ. §1.5.5). Παρακάτω αναλύονται τα βήματα και οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν προκειμένου να κατασκευαστεί το μοντέλο ομολογίας.

3.1.1.1 Στοιχισή της πρωτοταγούς πρωτεϊνικής αλληλουχίας των UraA και UapA

Βήμα 1^ο

Εύρεση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>). Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-1.

Βήμα 2^ο

Στοιχισή των αλληλουχιών με το πρόγραμμα MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) με τις προϋπάρχουσες παραμέτρους του προγράμματος (Corpet, 1988). Το αποτέλεσμα της στοιχισής απεικονίζεται στην Εικόνα 3-1.

Πίνακας 3-1 Αλληλουχίες πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην πολλαπλή στοίχιση.

Όνομα πρωτεΐνης	Κωδικός UniProt	Οργανισμός	Λειτουργία
UraA	P0AGM7	<i>Escherichia coli</i>	Μεταφορέας ουρακίλης (Andersen <i>et al.</i> , 1995)
UapA	Q07307	<i>Aspergillus nidulans</i>	Συμμεταφορέας ουρικού οξέος – ξανθίνης/H ⁺ (Gorfinkiel <i>et al.</i> , 1993)
UapC	P48777	<i>Aspergillus nidulans</i>	Συμμεταφορέας πουρινών/H ⁺ (Diallinas <i>et al.</i> , 1995)
Lpe1	Q41760	<i>Zea mays</i>	Συμμεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων–ασκορβικού οξέος/H ⁺ (Schultes <i>et al.</i> , 1996)
Snbt1	D2KX48	<i>Rattus norvegicus</i>	Συμμεταφορέας ξανθίνης – ουρακίλης/Na ⁺ (Yamamoto <i>et al.</i> , 2010)
Svct1	Q9UHI7	<i>Homo sapiens</i>	Συμμεταφορέας L-ασκορβικού οξέος/Na ⁺ (Wang <i>et al.</i> , 1999)
Svct2	Q9UGH3	<i>Homo sapiens</i>	Συμμεταφορέας L-ασκορβικού οξέος/Na ⁺ (Rajan <i>et al.</i> , 1999)
XanQ	P67444	<i>Escherichia coli</i>	Συμμεταφορέας ξανθίνης/H ⁺ (Karatzas & Frillingos, 2005)
XanP	P0AGM9	<i>Escherichia coli</i>	Συμμεταφορέας ξανθίνης/H ⁺ (Karatzas & Frillingos, 2005)
YgfU	Q46821	<i>Escherichia coli</i>	Συμμεταφορέας ουρικού οξέος/H ⁺ (Papakostas & Frillingos, 2005)
PucJ	O32139	<i>Bacillus subtilis</i>	Συμμεταφορέας ουρικού οξέος/H ⁺ (Schultz <i>et al.</i> , 2001)
PyrP	A2RJN3	<i>Lactococcus lactis</i>	Συμμεταφορέας ουρακίλης/H ⁺ (Martinussen <i>et al.</i> , 2001)
RutG	P75892	<i>Escherichia coli</i>	Συμμεταφορέας πυριμιδινών/H ⁺ (Kim <i>et al.</i> , 2010)

Εικόνα 3-1 Πολλαπλή στοίχιση του UapA, του UraA και των NAT ομολόγων γνωστής λειτουργίας και εξειδίκευσης, που χρησιμοποιήθηκε για το μοντέλο ομολογίας του UapA. Τα προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα (TMS) του UapA αναπαριστώνται με έγχρωμους κυλίνδρους. Τα TMSs που σχηματίζουν μικρά β-φύλλα απεικονίζονται με βέλη. Τα αμετάβλητα και υψηλά συντηρημένα αμινοξέα περιέχονται σε κόκκινα και μπλε κουτιά, αντίστοιχα. Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στη λειτουργία και εξειδίκευση του μεταφορέα επισημαίνονται με αστερίσκους: κόκκινο για τα κατάλοιπα της περιοχής δέσμωσης του υποστρώματος, πορτοκάλι για εκείνα που βρίσκονται στην πορεία μεταφοράς του υποστρώματος, πράσινο για αμινοξέα που διευρύνουν την εξειδίκευση και μαύρο για άλλα σημαντικά κατάλοιπα που εμπλέκονται σε δυναμικές αλληλεπιδράσεις των TMSs. α: μικρά α-ελικοειδή τμήματα.

Βήμα 3^ο

Βελτιστοποίηση της στοίχισης UraA – UapA ώστε η τελική μορφή να χρησιμοποιηθεί για μοντελοποίηση του UapA (Εικόνα 3-2). Κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρέθηκαν κάποια κοινά κενά της πολλαπλής στοίχισης των δύο αλληλουχιών και ελέγχθηκε η ορθή στοίχιση κάποιων συντηρημένων περιοχών, όπως για παραδειγμα τα μοτίβα QE στο TMS1 και το χαρακτηριστικό για την οικογένεια NAT (Q/E/P)NXG-4X-T στο TMS10. Οι δύο πρωτεϊνικές αλληλουχίες εμφάνισαν 23% ταυτότητα και 41% συντήρηση, ομοιότητα αρκετά χαμηλή, αλλά ικανή να δημιουργήσει μοντέλο ομολογίας, ειδικά εάν το τελευταίο συνδυαστεί και με προϋπάρχοντα πειραματικά δεδομένα (βλ. §1.5.2 – 1.5.4).

UraA	4	--RAIGVSERPPLLQTIPLSLQH ^{LFAMFGATVLPVLFHIN} -----PATVLLFNGI	52
UapA	64	APPPFGLNEKIPVLLAFILGLQH ^{ALAMLAGVVTPLI} ISSLSLPSDLQQYLVSLSLIVCGL	125
UraA	53	GTLLYLFICKG-----KIPAYLGSSFAFISPVLLLLPLGY-----EV	89
UapA	126	LSMVQITRFHIYKTPYYIGSGVLSVMGV ^{SFSIISV} ASGAFNQMY ^{SNGFCQLDEAGNRLPCPE}	187
UraA	90	ALGGFIMCGVLFCLVSFIVKKAGTGWLDVLP ^{PPAAMGAI} VAVIGLELAGVAAGMAG-----	145
UapA	188	AYGALIGTSACCALVEILLAFVPPKVIQKIF ^{PPPIVTGPTV} MLIGISLIGTGFKDWAGGSACM	249
UraA	146	-----LLPAEGQTPDSKT- ^{IIISITTLAVTVL} GSVLF ^{RGFLAIIP} ILIGVLVGYALSFA	198
UapA	250	DDGMLCPSATAPRPLPWG ^{SPEF} IGLGLFVFSIIL ^{CERFGAPIMKSCSV} VIGLVGCIVAAA	311
UraA	199	MGIVDTPPIINAHWFALPTLYTP-RFEWF--AILTILPAALV ^{VIAEHVGH} LVTANIVKKDLL	258
UapA	312	CGYF ^{SHAD} DAAPAA ^{SF} IWK ^{TFP} -LSVYGPMVLP ^{ILAVFI} ICACECIGDVTATCDVSRLEV ^R	373
UraA	259	---RDPGLHRSMFANGLSTV ^{ISGFFG} STPNTTYG ^{NTIGVMAIT} RVYSTV ^{WIGGAA} IFAILLSC	318
UapA	374	GGTFESRIQGA ^{VLADG} INSVVAALATMT ^{PTTFA} Q ^{MNGVIAL} T ^{RCANRW} AGYCCCLILIVAGI	436
UraA	319	VGK ^{LAAA} IQMIPLPVMGGVSL ^{LLYGV} IGASGIRV ^{LIESKVDY} NKAQNLILTSVIL ^{IIGVSG} --	379
UapA	437	FAK ^{FAAA} I ^{VAI} PNSVMGGMKT ^{FLFASV} ISGQAI ^{VAKAPFT} -RRNRFIL ^{TASMAL} GYGATLVP	498
UraA	380	--AKVNIG-----AAELK ^G MALAT ^I VIGIGLSL ^{IFKL} IS----	410
UapA	499	TWFGNVFPQTENRDLEGFENAI ^{ELVLE} TGFAV ^{TAF} VAMLLNA ^{MPAEV} BEIG	550

Εικόνα 3-2 Στοίχιση των μεταφορέων UraA και UapA. Τα απόλυτα και υψηλά συντηρημένα αμινοξέα είναι γραμμοσκιασμένα με μαύρο και γκρι αντίστοιχα. Σε κόκκινο πλαίσιο έχουν επισημανθεί ορισμένα από τα συντηρημένα μοτίβα της οικογένειας NAT, που όφειλαν, ως ένδειξη αξιοπιστίας της στοίχισης, να ταυτίζονται.

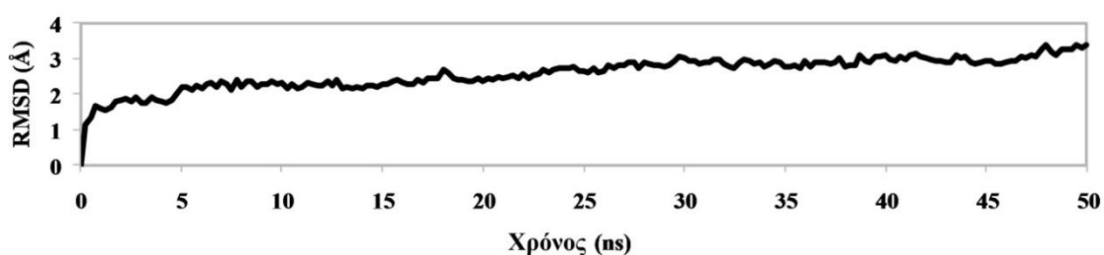
3.1.1.2 Κατασκευή του μοντέλου ομολογίας του UapA

Ο δομή του UraA (PDB ID: 3QE7) είναι διαθέσιμη στην κυτταροπλασματικά ανοιχτή διαμόρφωση με υπόστρωμα (βλ. §1.5.5). Η δομή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως κριώμα για την κατασκευή μοντέλου ομολογίας του UapA. Το γεγονός ότι η διαμόρφωση του UraA περιείχε και το υπόστρωμα αποτέλεσε πλεονέκτημα για επακόλουθα μοντέλα αλληλεπίδρασης του UapA με τα φυσιολογικά του υποστρώματα μέσω υπολογισμών πρόσδεσης.

Για την κατασκευή του μοντέλου ομολογίας χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Modeller 9v8 (βλ. §2.4.1). Εν συνεχεία εφαρμόστηκε η συνήθης διαδικασία βελτιστοποίησης των βρόχων (loop refinement) και ένα πρωτόκολλο προσομοίωσης ανόπτησης (simulated annealing protocol) για τη βελτιστοποίηση ολόκληρου του μοντέλου. Από τις 40 προκύπτουσες δομές επιλέχθηκε εκείνη με την υψηλότερη βαθμολογία χωρικών περιορισμών (spatial restraints score) για μοριακή δυναμική διάρκειας 50 ns χρησιμοποιώντας το λογισμικό Desmond (βλ. §2.4.3 – Εικ. 3-3), διάρκεια που στη διεθνή βιβλιογραφία θεωρείται ικανοποιητική. Κατά τη διαδικασία αυτή το σύστημα προετοιμάστηκε με την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης του UraA σε μια λιπιδική διπλοστοιβάδα POPC, χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες των λιπιδίων της μεμβράνης του UraA, όπως έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων OPM (Orientations of Proteins in Membranes database - <http://opm.phar.umich.edu/>), διαλυτοποιώντας εν συνεχεία τη μεμβράνη σε νερό. Κατά την εκτέλεση του προγράμματος χρησιμοποιήθηκαν οι προϋπάρχουσες ρυθμίσεις με τις εξής διαφοροποιήσεις:

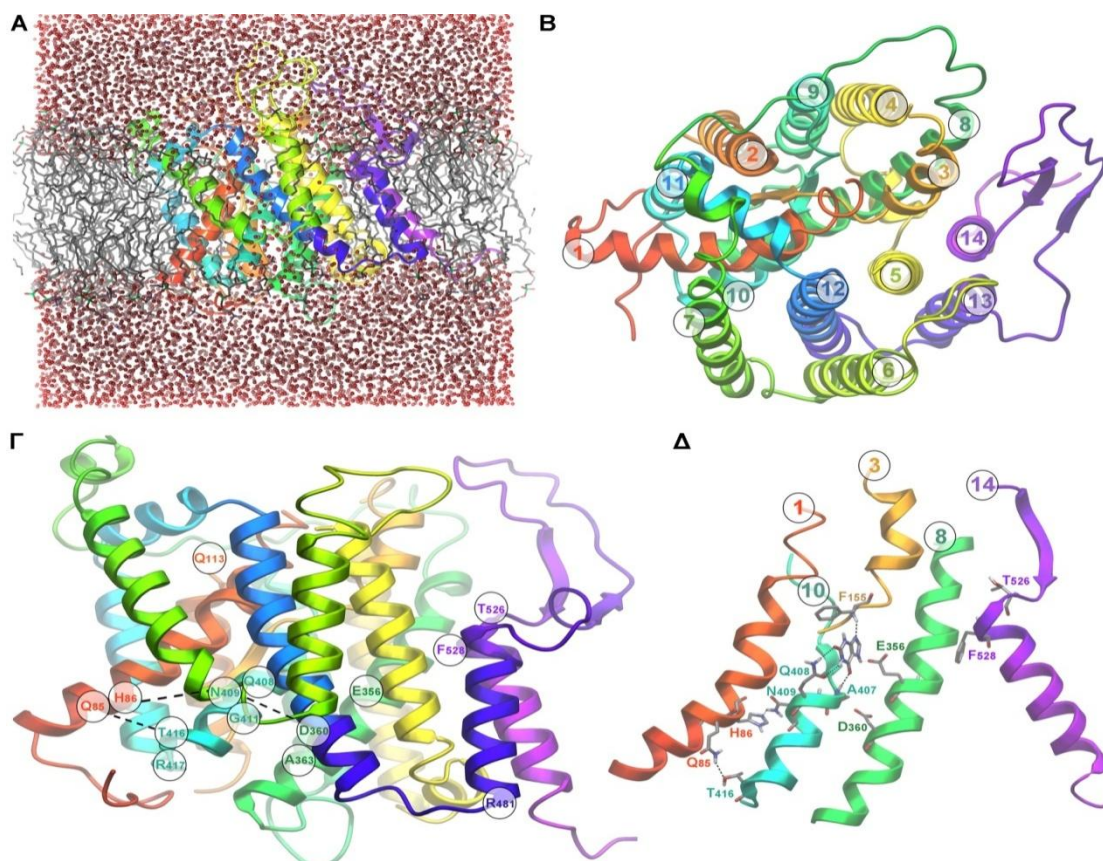
- Ενυδάτωση (Solvation)
 - Solvent Model: Predefined TIP4P
 - Membrane model: POPC
 - Box shape: Orthorombic
 - Box size calculator: Buffer
 - Distances a: 10.0 Å b: 10.0 Å c: 10.0 Å
- Ιόντα (Ions)
 - Ion placement: Neutralize (Cl⁻)
 - Add salt
 - Salt concentration: 0.15 M

Η τετραγωνική ρίζα της απόκλισης των Ca-ανθράκων όλων των ελίκων δεν υπερέβη την απόσταση των 4Å καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, υποδεικνύοντας την σταθερότητα του θεωρητικού μοντέλου (Εικ. 3-7).



Εικόνα 3-3 Μέση τετραγωνική ρίζα απόκλισης (RMSD) των Ca-ανθράκων όλων των ελίκων, για κάθε 0.25 ns της μοριακής δυναμικής συνολικής διάρκειας 50 ns. (Kosti *et al.*, 2012)

Η συνολική τρισδιάστατη δομή του μοντέλου UarA (Εικ. 3-4) αντιστοιχεί σε ένα εσωστρεφές διαμορφομερές με 14 διαμεμβρανικά τμήματα και προεξέχουσα δευτεροταγή δομή αυτή της α -έλικας. Η αρχιτεκτονική του μεταφορέα τον διαιρεί σε δύο διακριτούς τομείς, έναν συμπαγή πυρήνα (core domain) που αποτελείται από τα τμήματα TMS 1-4 και 8-11, και την περιοχή ελεγχόμενης πρόσβασης (gate domain) των TMS 5-7 και 12-14 (Εικ. 3-4, Πίν. 3-2).



Εικόνα 3-4 Θεωρητική δομή του UarA. Α. Προβλεπόμενη τρισδιάστατη δομή του UarA έπειτα από μοριακή δυναμική με το λογισμικό Desmond. Β. Κάτοψη του μοντέλου UarA όπου διακρίνονται οι περιοχές του πυρήνα (TMS1-4, 8-11) και της ελεγχόμενης πρόσβασης (TMS5-7, 12-14) με αριθμημένα τα TMS. Γ. Πλευρική όψη της δομής του UarA όπου υποδεικνύεται η τοπολογία των σημαντικών καταλοίπων για τη λειτουργία (Q85, H86, E356, A363, Q408, N409, G411, T416, R417) και την εξειδίκευση (Q113, R481, T526, F528) του UarA. Δ. Λεπτομέρεια των δυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των TMS1 (Q85, H86), TMS8 (D360) και TMS10 (N409, T416). Απεικονίζεται επίσης το TMS14 και οι θέσεις των καταλοίπων T526 και F528, τα οποία συμμετέχουν κυρίως στην εξειδίκευση του UarA, εν συγκρίσει με τα σημαντικά κατάλοιπα στα TMS1, TMS8 και TMS10, τα οποία εμπλέκονται στη δέσμευση του υποστρώματος και τη μεταφορά του. Στο Α, Γ και Δ το άνω μέρος του σχήματος είναι προς τον εξωκυττάριο χώρο και το κάτω μέρος προς το κυτταρόπλασμα. (Kosti *et al.*, 2012)

Οι διαμεμβρανικές έλικες συνδέονται με σχετικά μεγάλους βρόχους, η πλειοψηφία των οποίων αντιστοιχεί σε μεγάλες εισδοχές στην πρωτεϊνική αλληλουχία του UarA σε σχέση με τον UraA. Το τελευταίο αυτό γεγονός αποτέλεσε

πρόσθετη δυσκολία στην απόκτηση ακριβούς διαμόρφωσης των βρόχων του μεταφορέα και γι' αυτό κάποιοι βρόχοι παραλήφθηκαν από τους μετέπειτα υπολογισμούς πρόσδεσης (βρόχοι σύνδεσης TMS 1-2, 2-3 και 5-6) (Εικ. 3-4).

Η κατανομή των ιονισμένων καταλοίπων στην επιφάνεια του μεταφορέα είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι τα περισσότερα από αυτά είναι τοποθετημένα είτε στις κυτταροπλασματικές και περιπλαστικές επιφάνειες ή κατά μήκος του πόρου στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Τα θετικά φορτία συγκεντρώνονται κυρίως στους κυτταροπλασματικούς βρόχους, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και ονομάζεται κανόνας των θετικών φορτίων προς τα έσω (positive inside rule).

Πίνακας 3-2 Προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα στο μοντέλο του UapA.

Διαμεμβρανικό τμήμα	Αριθμός και είδος αμινοξέων
TMS 1	L77 – V95
TMS 2	T118 – R133
β3*	S149 – V153
TMS 3	I158 – A164
TMS 4	A188 – F208
TMS 5	T223 – W242
TMS 6	L274 – F288
TMS 7	M293 – A311
TMS 8	L344 – S368
TMS 9	I381 – A398
β10*	T404 – F406
TMS 10	A407 – T416
TMS 11	R421 – G435
TMS 12	S450 – K473
TMS 13	N480 – A494
TMS 14	G527 – I541

β: διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας

Τέλος, εμφανίζονται δίκτυα σταθεροποιητικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ελίκων. Για παράδειγμα, οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων N409, H86, Q85 και T416 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου σταθεροποιώντας τις έλικες 1 και 10, ενώ ένα ακόμη δίκτυο δημιουργείται μεταξύ των ελίκων 8 και 10 με τη συμμετοχή των

πλευρικών αλυσίδων των N410, T405 και D360 (Εικ. 3-8Γ & Δ). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι προαναφερθέντες δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται στην περιοχή του πυρήνα της πρωτεΐνης (core domain), υποδεικνύοντας την ανάγκη δομικής σταθερότητας της περιοχής αυτής.

3.1.2 Δέσμευση του υποστρώματος – Υπολογισμοί πρόσδεσης

Ένας από τους βασικότερους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν η διαλεύκανση της διαδικασίας αναγνώρισης των φυσιολογικών υποστρωμάτων από τον UapA και η επακόλουθη μετατόπιση τους κατά μήκος του πόρου μεταφορά. Για την επίτευξή του πραγματοποιήθηκε μία διπλή προσέγγιση. Η πρώτη ήταν ο προσδιορισμός/επαλήθευση του ρόλου καταλοίπων που έχουν προσδιοριστεί από προγενέστερες γενετικές μελέτες ως κρίσιμα για την αλληλεπίδραση με τα φυσιολογικά υποστρώματα. Η δεύτερη ήταν η δημιουργία μιας υπόθεσης δομής-λειτουργίας με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η οποία θα μπορούσε με τη σειρά της να διευκολύνει το σχεδιασμό ενώσεων, οι οποίες ανταγωνιζόμενες τα φυσιολογικά υποστρώματα θα μπορούσαν να δράσουν ως αναστολείς με πιθανή ιατρική σημασία. Προκειμένου να μελετηθούν τα παραπάνω ζητήματα δημιουργήθηκαν, αρχικά, μοντέλα αλληλεπίδρασης του UapA με την ξανθίνη, ένα από τα δύο φυσιολογικά υποστρώματά του, με τη χρήση υπολογισμών πρόσδεσης (βλ. §3.1.2.1). Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκαν υπολογισμοί ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης, προκειμένου να συσχετιστούν τα πειραματικά δεδομένα ($K_{m/i}$ και ΔG°) με τους υπολογισμούς και να οριστικοποιηθεί το επικρατές μοντέλο (βλ. §3.1.2.2).

3.1.2.1 Υπολογισμοί πρόσδεσης με Low Mode/Monte-Carlo, Glide και IFD

Ένα ζήτημα που ελήφθη υπόψη εξαρχής κατά τους υπολογισμούς αφορούσε την ταυτομέρεια της ξανθίνης. Σε ουδέτερο pH η ξανθίνη εμφανίζεται με δύο κυρίαρχα, ταυτομερή (Kulikowska *et al.*, 2004), τα οποία όμως δημιουργούν μια βασική διαφορά στις ιδιότητες δεσμού υδρογόνου κάθε ισομερούς. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί και με τις δύο καταστάσεις πρωτονίωσης, στη θέση N7 ή N9, και τα αντίστοιχα ταυτομερή τους ονομάστηκαν Xan7H και Xan9H αντιστοίχως (σχήμα των δυο ταυτομερών).

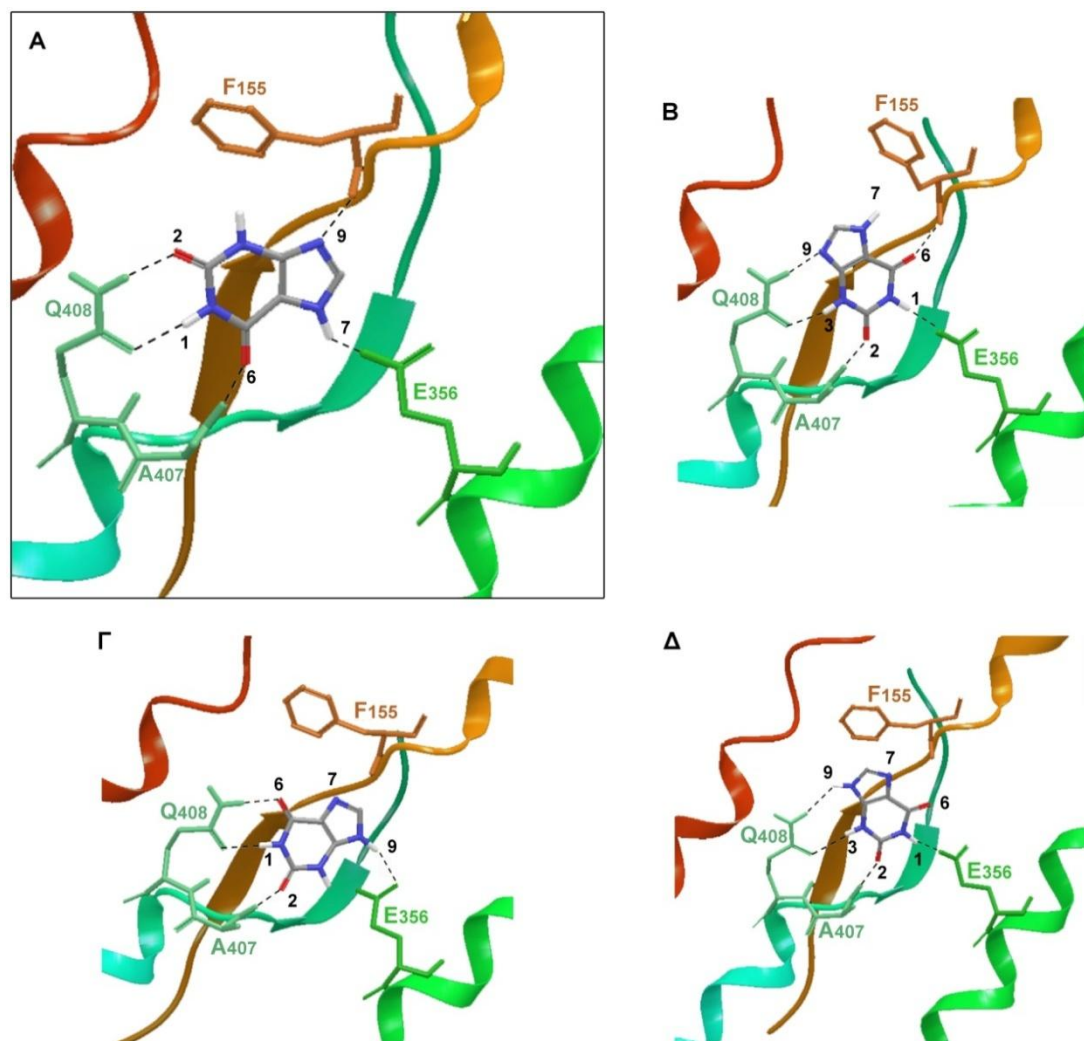
Οι υπολογισμοί πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση δύο διακριτών πρωτοκόλλων, ένα πρωτόκολλο βασιζόμενο στον αλγόριθμο μεικτής δειγματοληψίας

Low-mode/Monte Carlo για υπολογισμούς εύκαμπτης πρόσδεσης (βλ. §2.4.4.3), και ένα πρωτόκολλο άκαμπτης πρόσδεσης Glide ακολουθούμενο από Induce Fit Docking (IFD), μέσω των λογισμικών της Schrodinger Suite 2011 (βλ. §2.4.4.1). Το Prime που περιέχεται στο IFD είναι ένα εργαλείο μοντελοποίησης ειδικό για την βελτιστοποίηση πρωτεϊνικών δομών που προέρχονται από την ομολογία. Η εφαρμογή του, ως μέρος του IFD πρωτοκόλλου, θεωρήθηκε στην περίπτωση του UapA ως πολλά υποσχόμενη, δεδομένου ότι αποτελούσε μια προσέγγιση συμπληρωματική με την κλασική Low-mode/Monte Carlo.

Αρχικά εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο άκαμπτης πρόσδεσης Glide ακολουθούμενο από υπολογισμούς IFD. Για κάθε ταυτομερές της ξανθίνης επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά στιγμιότυπα, τα οποία είχαν προκύψει ως δομές χαμηλότερης ενέργειας στους υπολογισμούς Glide – IFD (Εικ. 3-5A και B για το UapA-Xan7H και Εικ. 3-9Γ και Δ για το UapA-Xan9H σύμπλοκο). Τα στιγμιότυπα 3-5A και 3-5Γ είναι αρκετά όμοια μεταξύ τους, όπως αντίστοιχα και τα 3-5B και 3-5Δ. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών πρόσδεσης ήταν αρκετά συνεπή ως προς τα γενετικά δεδομένα, ωστόσο σχετικά ασαφή ώστε να προτείνουν ένα μοναδικό τρόπο δέσμευσης της ξανθίνης.

Αναλυτικότερα, στο στιγμιότυπο 3-5A το ταυτομερές Xan7H σταθεροποιείται στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος της πρωτεΐνης από πέντε δεσμούς υδρογόνου (Πίν. 3-3). Εδώ το Q408 διαδραματίζει καίριο ρόλο στη δέσμευση, γεγονός που συμφωνεί με στοιχεία από βιολογικά πειράματα που δείχνουν μια άμεση συμβολή του εν λόγω καταλοίπου στην αναγνώριση του υποστρώματος. Ο προαναφερθής δεσμός υδρογόνου ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ του αμιδίου της πλευρικής αλυσίδας του Q408 και της ξανθίνης παρουσιάζεται επίσης στο στιγμιότυπο 3-5Γ που περιγράφει την UapA-Xan9H αλληλεπίδραση. Ωστόσο, ενώ στο 3-5A το Q408 συνδέεται με το N₁-H και το C₂-O του δακτυλίου της πουρίνης Xan7H, στο 3-5Γ οι αντίστοιχες θέσεις αλληλεπίδρασης είναι το N₁-H και το C₆-O του Xan9H. Τα γενετικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το καρβοξύλιο του E356 αποτελεί σημαντικό στοιχείο στην αναγνώριση των υποστρωμάτων από την πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών πρόσδεσης ήρθαν σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, καθώς δείχθηκε ότι το κατάλοιπο αυτό αλληλεπιδρά μέσω ενός δεσμού υδρογόνου με την N₇-H ομάδα, είτε στη θέση 7 του Xan7H ή στη θέση 9 του Xan9H, και πιθανώς επηρεάζει τον προσανατολισμό του υποστρώματος εντός της θέσης δέσμευσης στην πρωτεΐνη (Εικ. 3-5). Δύο επιπλέον αλληλεπιδράσεις

συμβάλουν στην περαιτέρω σταθεροποίηση των συμπλοκών, η αλληλεπίδραση μεταξύ του -NH του σκελετού του A407 και είτε του C₆-O (Xan7H) ή του C₂-O (Xan9H), και η αλληλεπίδραση μεταξύ του καρβονυλίου του σκελετού της F155 και είτε του N₉ της Xan7H ή του N₇ της Xan9H.



Εικόνα 3-5 Αλληλεπιδράσεις UapA – υποστρώματος. Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων διαφορετικών μοντέλων σύνδεσης (Α-Δ) της ξανθίνης με τον UapA (μοντέλα 1-4 αντίστοιχα). Α και Β. Σύμπλοκο UapA-Xan7H. Γ και Δ. Σύμπλοκο UapA-Xan9H. Το επικρατές μοντέλο (Α) υποδεικνύεται σε πλαίσιο και σε μεγαλύτερη κλίμακα, καθώς υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα, υπολογισμούς πρόσδεσης και SAR. (Kosti *et al.*, 2012)

Στη δεύτερη ενεργειακά βέλτιστη δομή του συμπλόκου UapA-Xan7H, το υπόστρωμα σταθεροποιείται επίσης μέσω πέντε δεσμών υδρογόνου (Εικ. 3-5B). Εδώ, το Q408 αλληλεπιδρά με το N₃-H και το N₉ της πουρίνης, ενώ το E356 αλληλεπιδρά με το N₁-H. Τέλος, στο στιγματότυπο 3-9Δ το σύμπλοκο UapA-Xan9H σταθεροποιείται με τέσσερις δεσμούς υδρογόνου, όπου το Q408 συνεισφέρει με έναν μόνο δεσμό υδρογόνου, ενώ το E356 αλληλεπιδρά με το N₁-H της ξανθίνης. Αξίζει να σημειωθεί πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σκελετών των A407 και F155 με

το υπόστρωμα παρατηρούνται και στα τέσσερα στιγμιότυπα με μικρές διαφοροποιήσεις στις θέσεις της ξανθίνης με τις οποίες αλληλεπιδρούν (Εικ. 3-5 & Πιν. 3-3). Τέλος, μία κοινώς παρατηρούμενη αλληλεπίδραση ήταν οι π-π αλληλεπιδράσεις του πουρινικού δακτυλίου ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων F406 και F460.

Πίνακας 3-3 Αλληλεπιδράσεις UapA-ξανθίνης στις ενεργειακά βέλτιστες διαμορφώσεις.

Διαμόρφωση	Θέση δακτυλίου – Αμινοξύ αλληλεπίδρασης	Ανάπτυγμα υποστρώματος
UapA-Xan7H_1 (Εικ. 3-5A)	N ₁ -H – Q408 C ₂ =O – Q408 C ₆ =O – A407 N ₇ -H – E356 N ₉ – F155	<p>Xan7H</p>
UapA-Xan7H_2 (Εικ. 3-5B)	N ₁ -H – E356 C ₂ =O – A407 N ₃ -H – Q408 C ₆ =O – F155 N ₉ – Q408	
UapA-Xan9H_1 (Εικ. 3-5Γ)	N ₁ -H – Q408 C ₂ =O – Q408 C ₆ =O – A407 N ₉ -H – E356	<p>Xan9H</p>
UapA-Xan9H_2 (Εικ. 3-5Δ)	N ₁ -H – E356 C ₂ =O – A407 N ₃ -H – Q408 N ₉ – Q408	

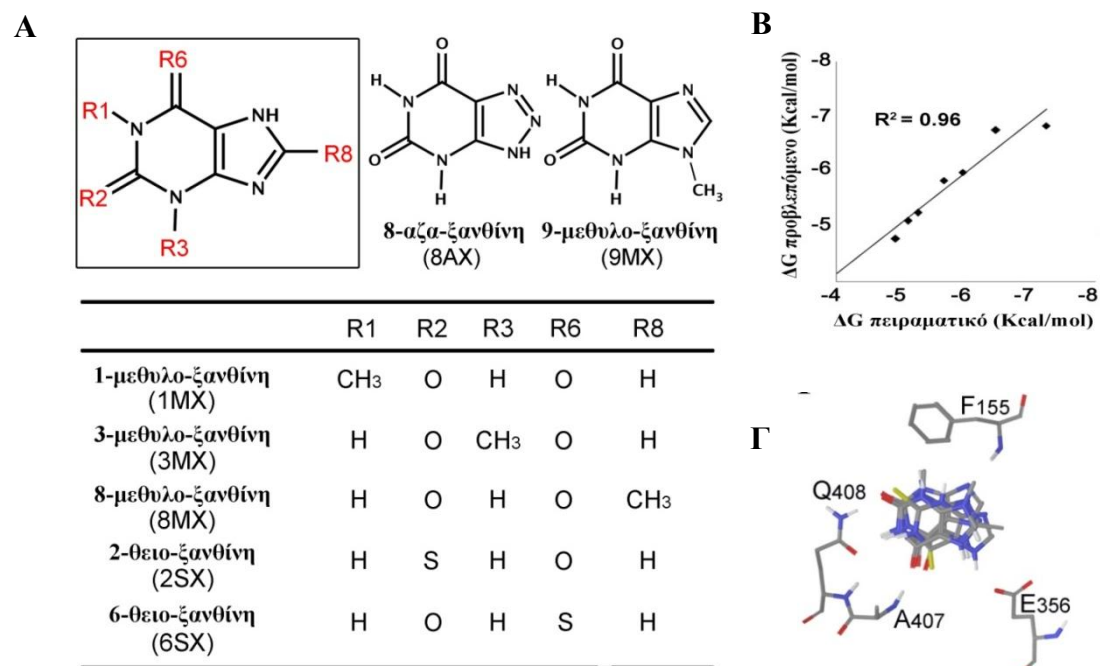
Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η διαμόρφωση του συμπλόκου UapA-ξανθίνης και να αξιολογηθεί το IFD πρωτόκολλο, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης χρησιμοποιώντας αλγόριθμο μεικτής δειγματοληψίας Low mode/Monte Carlo. Ως αρχικές δομές χρησιμοποιήθηκαν οι επιλεγμένες από το IFD πρωτόκολλο. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ήταν επαρκώς συνεπή. Στην περίπτωση του Xan7H ταυτομερούς η ενεργειακά βέλτιστη δομή του συμπλόκου ήταν ταυτόσημη και στις δύο μεθοδολογίες (Εικ. 3-5A). Αντίθετα, στην περίπτωση του Xan9H ταυτομερούς, το ολικό ελάχιστο των υπολογισμών εύκαμπτης πρόσδεσης διέφερε από αυτές των υπολογισμών με το IFD και στερούταν εξειδικευμένων

αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη. Έτσι, ενώ οι υπολογισμοί πρόσδεσης προσέφεραν πληθώρα πληροφοριών για τη διαδικασία αναγνώρισης, οι οποίες ήταν σε πλήρη συνέπεια με τα γενετικά δεδομένα, δεν ήταν πειστικοί στον καθορισμό της δεσπόζουσας γεωμετρίας δέσμευσης από τις τέσσερις πιθανές διευθετήσεις της ξανθίνης.

3.1.2.2 Τα αποτελέσματα του QSAR αποσαφηνίζουν τον τρόπο δέσμευσης της ξανθίνης στον UapA

Για τον περαιτέρω έλεγχο της συνέπειας των τεσσάρων διαφορετικών τρόπων σύνδεσης της ξανθίνης με τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα, επιχειρήθηκε η δημιουργία μοντέλων Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationship – QSAR), εξετάζοντας ένα μικρό σύνολο αναλόγων της ξανθίνης με γνωστή ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (Εικ. 3-6Α). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επαναλαμβανόμενων κύκλων υπολογισμών πρόσδεσης – βαθμολόγησης του λογισμικού PtGen 2.1 (βλ. §2.4.4.4). Εκτιμήθηκαν οι θεωρητικές συγγένειες δέσμευσης (E_{binding}) με αξιολόγηση της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταφορέα-υποστρώματος, της ενέργειας διαλυτοποίησης του υποστρώματος και τις αλλαγές, τόσο στην εσωτερική ενέργεια του υποστρώματος, όσο και στην μεταβολή της εντροπία του κατά την πρόσδεση του στον μεταφορέα. Κατόπιν, υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης ($\Delta G^{\circ}_{\text{pred}}$) μέσω γραμμικής συσχέτισης της πειραματικής ελεύθερης ενέργειας ($\Delta G^{\circ}_{\text{exp}}$) και της συγγένειας δέσμευσης (E_{binding}) για κάθε ανάλογο. Στην παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα επτά αναλόγων ξανθίνης ως ομάδα εκμάθησης (training set – XAN, 2SX, 6SX, 3MX, 8MX, 9MX, 8AX) και δημιουργήθηκαν τέσσερα διαφορετικά μοντέλα από την υπέρθεση όλων των υποστρωμάτων για καθένα από τα τέσσερα στιγμιότυπα πρόσδεσης της ξανθίνης (Εικ. 3-9), χρησιμοποιώντας για κάθε ανάλογο το κατάλληλο ταυτομέρες κάθε φορά (για τα στιγμιότυπα 3-9Α & Β τα ανάλογα πρωτονιωμένα στη θέση 7 και για τα στιγμιότυπα 3-9Γ & Δ τα ανάλογα πρωτονιωμένα στη θέση 9). Ανάλογα ξανθίνης με πολύ χαμηλή συγγένεια σύνδεσης, όπως η 1-μεθυλοξανθίνη (1MX) και η υποξανθίνη εξαιρέθηκαν από την ομάδα εκμάθησης (training set), αλλά χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (test set – 1MX, υποξανθίνη, αδενίνη και γουανίνη). Τα πιθανά ορθά μοντέλα θα έπρεπε να προβλέπουν τη χαμηλή ενέργεια σύνδεσης των αναλόγων της ομάδας υπολογισμού και την υψηλή ενέργεια σύνδεσης των αναλόγων της ομάδας ελέγχου με το μεταφορέα. Η ποιότητα κάθε μοντέλου

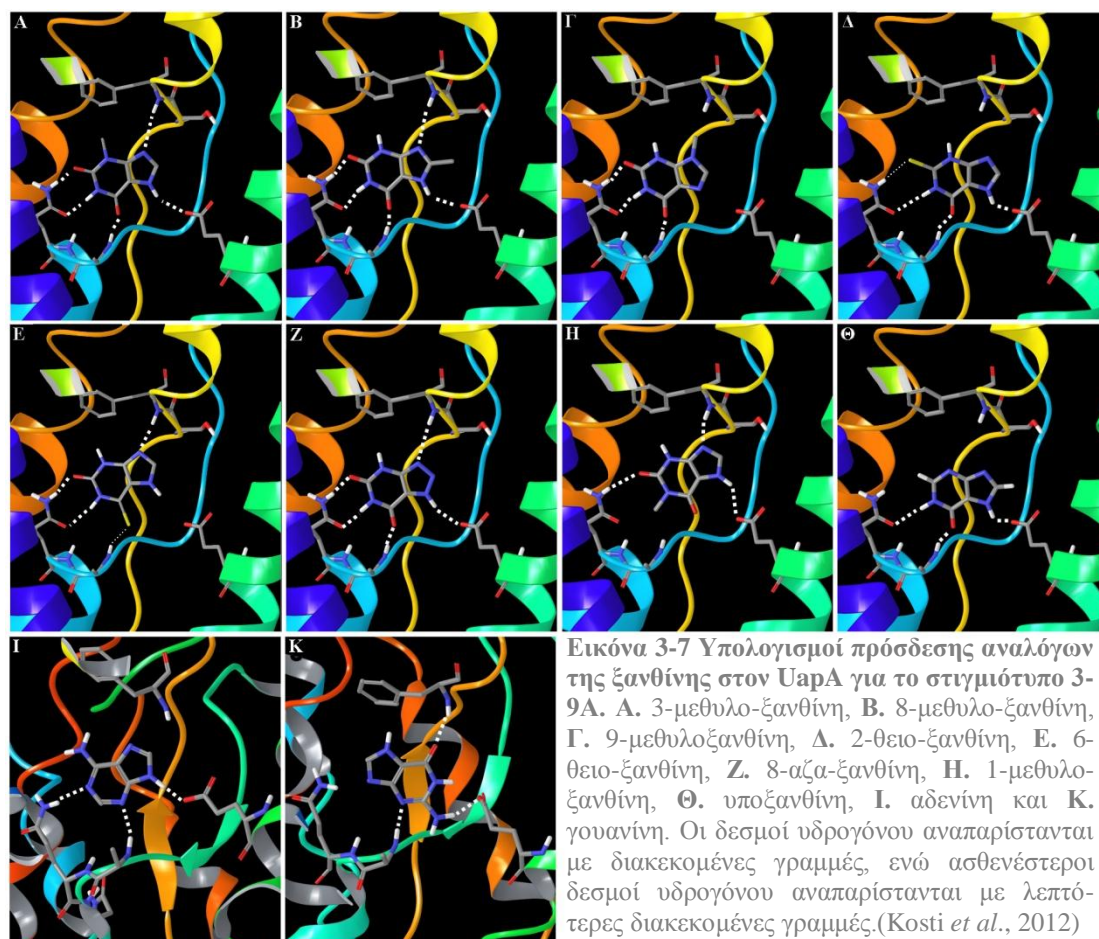
εκτιμήθηκε από το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης r^2 μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικά προβλεπόμενων τιμών ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης (ΔG°) και το βαθμό απόκλισης από τον προσανατολισμό της ξανθίνης.



Εικόνα 3-6 Μοντέλο σχέσεων δομής-δράσης (SAR) της αλληλεπίδρασης του UapA με ανάλογα ξανθίνης. **A**. Δομές αναλόγων της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του μοντέλου. **B**. Προβλεπόμενη προς Πειραματική $\Delta G_{\text{binding}}$. **Γ**. Υπέρθωση των αναλόγων της XAN εντός της θέσης δέσμευσης στον UapA, όπως προτείνεται από το τελικό μοντέλο. (Kosti *et al.*, 2012)

Ενώ τα μοντέλα των 3-5A και 3-5Γ έδειξαν μια ικανοποιητική συσχέτιση (με r^2 0.958 και 0.964 αντίστοιχα), το προσδιορισθέν r^2 για τα μοντέλα 3-5B και 3-5Δ ήταν αρκετά χαμηλό (0.567 και 0.473 αντίστοιχα). Στο 3-5A μοντέλο η καλή συσχέτιση (Εικ. 3-6B) συνοδεύτηκε από θέσεις δέσμευσης των αναλόγων που ήταν σύμφωνες με αυτήν της ξανθίνης (Εικ. 3-6Γ), ενώ στο μοντέλο 3-5Γ παρατηρήθηκε μια επανατοποθέτηση όλων των αναλόγων σε σχέση με την αρχική θέση της ξανθίνης. Θεωρώντας ότι ο υψηλός βαθμός δομικής ομοιότητας μεταξύ της ξανθίνης και των επιλεγμένων αναλόγων καθιστά αναγκαίο έναν εξίσου υψηλό βαθμό ευθυγράμμισης του πουρινικού τους δακτυλίου εντός της κοιλότητας δέσμευσης, το μοντέλο του 3-5A στιγμιότυπου επιλέχθηκε ως σύγκλιση των τριών προσεγγίσεων που εφαρμόστηκαν. Το μοντέλο αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τον υπολογισμό της ενέργειας δέσμευσης της ομάδας ελέγχου (Εικ. 3-7 Η έως και Κ). Οι υπολογισθείσες ενέργειες δέσμευσης του λογισμικού PrGen έδειξαν ότι η συγγένεια δέσμευσης τους

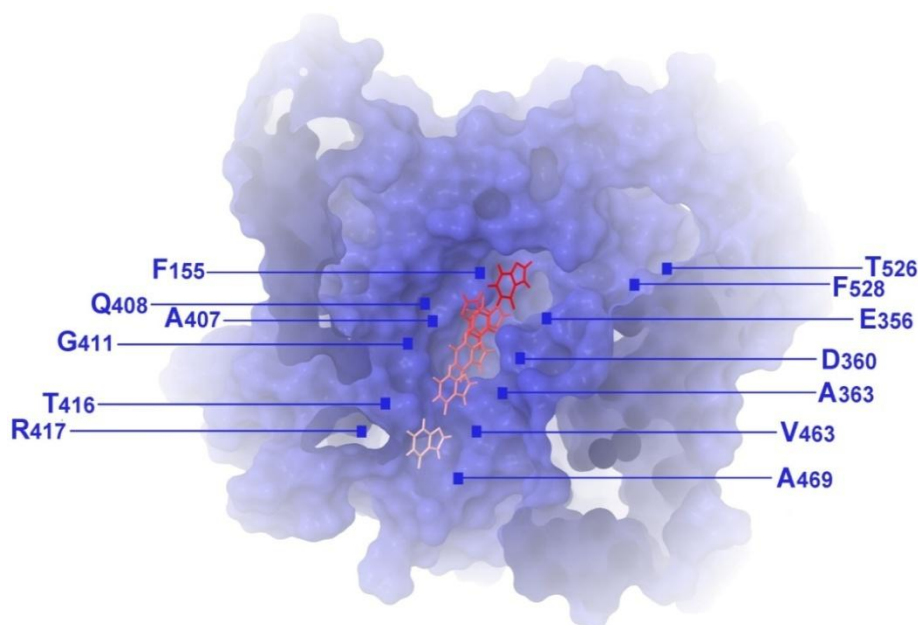
ήταν υψηλότερη από 24,3 Kcal/mol, τιμή που ταιριάζει με τις πειραματικά προσδιορισμένες.



3.1.3 Πορεία του υποστρώματος προς το κυτταρόπλασμα

Εκτός από τη δημιουργία ενός μοντέλου σύνδεσης μεταφορέα-υποστρώματος, αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση η πρόβλεψη της πορείας του υποστρώματος από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα διαμέσου του μεταφορέα. Για αυτού του τύπου τη μελέτη στον UapA επελέγησαν υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης, δεδομένου ότι μπορούν να τοποθετήσουν τυχαία το υπόστρωμα στο εσωτερικό του χώρου δέσμευσης, χρησιμοποιώντας ειδικούς αλγόριθμους περιστροφής και μετάφρασης (rotational and translational algorithms). Ο διαμορφωτικός χώρος του συμπλέγματος μεταφορέα – υποστρώματος υπέστη εκτενή δειγματοληψία με τη χρήση του αλγορίθμου διαμορφωτικής αναζήτησης Monte Carlo/Low-Mode. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική στην δειγματοληψία παρόμοιων συστημάτων και θεωρείται μια ισχυρή τεχνική (Soares-Silva *et al.*, 2011). Ξεκινώντας από το κέντρο δέσμευσης, η ξανθίνη τοποθετήθηκε κατά μήκος του

πόρου (που σχηματίζεται από τα TMSs 8, 10 και 12) σε απόσταση περίπου 6 και 12 Å, και προς τις δύο κατευθύνσεις, παράγοντας πέντε αρχικές δομές για υπολογισμούς πρόσδεσης. Πραγματοποιήθηκαν 5.000 βήματα Monte Carlo/Low Mode για κάθε αρχική θέση, ακολουθούμενα από ελαχιστοποίηση ενέργειας. Κατά τη διάρκεια των υπολογισμών το υπόστρωμα ήταν ελεύθερο να κινηθεί κατά μήκος των τριων καρτεσιανών αξόνων xyz από 0 έως 5 Å με ταυτόχρονη ελεύθερη περιστροφή 0-180°. Οι χαμηλότερες ενεργειακά δομές που ελήφθησαν παρείχαν ένα θεωρητικό μονοπάτι του υποστρώματος (Εικ. 3-8).



Εικόνα 3-8 Μοντέλο της πορείας μετατόπισης της ξανθίνης διαμέσου του UapA. Τα κατάλοιπα F155, Q408, E356 και A407 καθορίζουν το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος, ενώ τα T526 και F528 υποδεικνύουν μια θεωρητική εξοκυτάρια περιοχή ελεγχόμενης πρόσβασης (βλ §3.2.4). (Kosti *et al.*, 2012)

Η προτεινόμενη πορεία μετατόπισης του υποστρώματος ξεκινά από το κέντρο δέσμευσης του στον μεταφορέα (κατάλοιπα F155, E356, A407 και Q408) και ακολουθείται από μεταγενέστερα στιγμιότυπα της ξανθίνης προς την κυτταροπλασματική πλευρά του μεταφορέα, πλησίον των καταλοίπων D360, A363, G411, T416, R417, V463 και A469 (Εικ. 3-12). Από τα παραπάνω αμινοξέα τα E356, A363, Q408, G411, T416, και R417 ήταν γνωστά από προηγούμενες γενετικές προσεγγίσεις του εργαστηρίου για το ρόλο τους στην δέσμευση και μεταφορά του υποστρώματος (βλ. 1.5.2). Τα υπόλοιπα κατάλοιπα (F155, A407, D360, V463 και A469) απετέλεσαν νέο στοιχείο για περαιτέρω γενετική και βιοχημική διερεύνηση (βλ. §3.1.3.1-3.1.3.3 και 3.1.6). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι, η λήψη στιγμιότυπων

ξανθίνης μόνο από το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος του μεταφορέα και προς την κυτταροπλασματική πλευρά ήταν αναμενόμενη, καθώς η διαμόρφωση του UapA, βάσει του κρυστάλλου του UraA, βρίσκεται σε προς τα έξω ανοιχτή δομή. Συνεπώς, το εξωκυττάριο τμήμα του μεταφορέα δεν είναι κατάλληλα διαμορφωμένο, ώστε να είναι προσβάσιμο στο υπόστρωμα, ενώ το αντίστοιχο κυτταροπλασματικό είναι.

3.1.3.1 Ο ρόλος του αμινοξέος F155 και του ευρύτερου TMS3

	S	V	M	G	V	S	F	S	I	I	S	V	A	S	G	A
UapA	S	V	M	G	V	S	F	S	I	I	S	V	A	S	G	A
UapC	S	V	V	G	T	S	F	G	T	I	T	V	A	T	G	T
Lpe1	Y	I	Y	P	A	V	A	I	I	L	S	P	R	Y	.	.
SNBT1	F	V	A	P	S	L	A	M	L	S	L	P	A	W	K	C
SVCT1	F	L	V	P	A	K	A	I	L	A	L	E	R	W	K	C
SVCT2	F	L	A	P	A	R	A	I	L	S	L	D	K	W	K	C
XanQ	S	I	Q	S	V	N	F	S	F	V	T	V	M	I	A	.
XanP	S	I	Q	G	T	S	F	N	F	V	A	P	L	I	M	.
YgfU	V	I	M	S	V	T	F	A	A	V	T	P	M	I	A	.
PucJ	V	M	L	G	S	S	F	V	A	V	T	P	M	I	A	.
UraA	A	Y	L	G	S	S	F	A	F	I	S	P	V	L	L	L
PyrP	A	Y	M	G	S	S	F	A	Y	I	G	A	M	T	L	L
RutG	S	Y	L	G	S	S	A	A	F	V	G	V	V	I	A	A

Όπως φάνηκε παραπάνω, οι υπολογισμοί πρόσδεσης, ανεξάρτητα από τον αλγόριθμο κάθε φορά, υπέδειξαν ότι ο σκελετός του αμινοξέος F155 συμμετέχει στη δέσμευση του υποστρώματος, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με αυτό. Στη στοίχιση των μελών της οικογένειας NAT παρατηρείται υψηλή συντήρηση του συγκεκριμένου καταλοίπου, το οποίο υποκαθίσταται μόνο από Ala. Και

μάλιστα, το αμινοξύ αλανίνη εμφανίζεται μόνο στα μέλη της οικογένειας από ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στα φυτά (*Lpe1*), στα τρωκτικά (*SNBT1*) και στον άνθρωπο (*SVCT1* & *SVCT2*). Ταυτόχρονα, παρατηρείται ότι και η Ser154 που προηγείται της Phe, είναι μερικώς συντηρημένη στην οικογένεια. Το κατάλοιπο αυτό αντιστοιχεί στο αμινοξύ N93 του βακτηριακού ομόλογου μεταφορέα ξανθίνης *XanQ* (πρώην *YgfO*) στην *E. coli*. Υποκαταστάσεις της Asn σε Ser και Ala διευρύνουν την εξειδίκευση του *XanQ*, καθιστώντας εφικτή τη μετρήσιμη μεταφορά ουρικού οξέος, μιμούμενες την εξειδίκευση του *UapA* (Karena & Frillingos, 2009). Βάσει των παραπάνω δεδομένων, σχεδιάστηκαν οι μεταλλαγές S154A, S154N και F155A. Ιδίως με τη μεταλλαγή S154N επιχειρήθηκε μία προσομοίωση του μεταφορέα *XanQ*, ώστε να διερευνηθεί αν και στον *UapA* το κατάλοιπο αυτό διαδραματίζει τον ίδιο σημαντικό ρόλο.

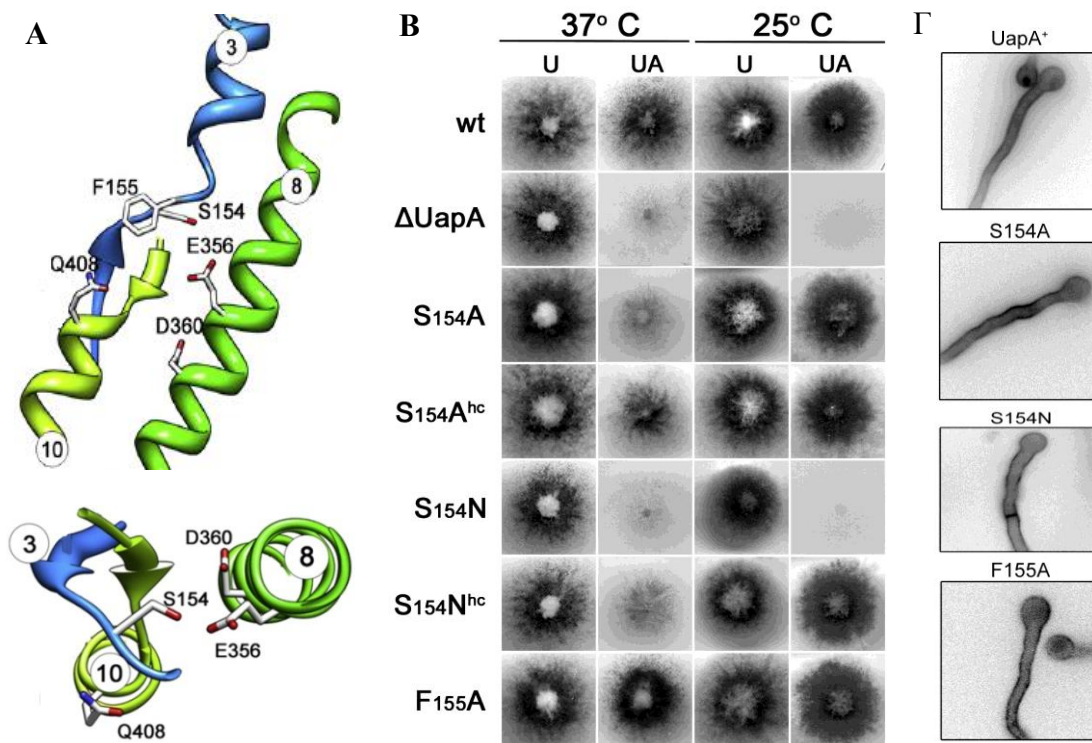
Αρχικά, οι μεταλλαγές αυτές κατασκευάστηκαν με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια στο πλασμίδιο pAN510-GFP. Εν συνεχεία, τα πλασμίδια με την εκάστοτε μεταλλαγή εισήχθησαν σε στέλεχος του *A. nidulans* με γονότυπο *ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2 pabaA1* και η επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε βάσει της συμπλήρωσης της αυξοτροφίας σε αργινίνη. Ο αριθμός των πλασμιδίων που ενσωματώθηκαν κάθε

φορά προσδιορίστηκε με ανάλυση κατά Southern. Για κάθε μεταλλαγή επιλέχθηκε ένα στέλεχος με μονή ομόλογη ενσωμάτωση του πλασμιδίου στον γονιδιακό τόπο του *argB*, και όπου κρίθηκε αναγκαίο (μεταλλαγές στο S154) ένα ακόμη στέλεχος με πολλαπλές εν σειρά ενσωματώσεις.

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν υποβλήθηκαν, αρχικά, σε δοκιμασίες ανάπτυξης στους 25 και 37 °C (Εικ. 3-9B) και εν συνεχεία σε υποκυτταρικό εντοπισμό της εκάστοτε μεταλλαγής με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein – GFP) σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εικ. 3-9Γ). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν τα εξής:

- Η μεταλλαγή F155A παρουσίασε ανάπτυξη πανομοιότυπη με το αγρίου τύπου στέλεχος.
- Μονή ενσωμάτωση (single copy – sc) της μεταλλαγής S154A οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη στους 37 °C, με ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου. Παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης ελήφθη με την ξανθίνη ως μοναδική πηγή αζώτου.
- Η μεταλλαγή S154N (sc) είχε δραματική επίδραση στη μεταφορική ικανότητα του UapA, γεγονός που ήταν εμφανές από την απουσία ανάπτυξης στους 25 και 37 °C, με ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου.
- Στελέχη με τα αλληλόμορφα S154A και S154N σε πολλαπλά αντίγραφα (high copy – hp) εμφάνισαν μερική αποκατάσταση της ικανότητας να μεταφέρουν ξανθίνη ή το ουρικό οξύ, ως επί το πλείστον στην περίπτωση του S154A.
- Ανάλυση υποκυτταρικού εντοπισμού έδειξε ότι καμία από τις μεταλλάξεις του TMS3 δεν επηρέασαν τον εντοπισμό του UapA-GFP στην μεμβράνη πλάσματος (Εικ. 3-9Γ).
- Καμία από τις μεταλλαγές του TMS3 που αναλύθηκαν δεν μπορούσε να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε άλλη πουρίνη ως μοναδική πηγή αζώτου, πλην των φυσιολογικών υποστρωμάτων του UapA, ουρικό οξύ και ξανθίνη.

Η αποκατάσταση ελλιπούς μεταφορική ικανότητας του UapA από την έκφραση με πολλαπλά αντίγραφα συνεπάγεται ότι οι σχετικές μεταλλάξεις επηρεάζουν είτε αυτή καθεαυτή τη μεταφορά ή/και την καταστροφή του μεταφορέα. Ωστόσο, στην περίπτωση των μεταλλάξεων της Ser154, η δεύτερη υπόθεση θα μπορούσε να απορριφθεί αμέσως με βάση την εικόνα από την μικροσκοπική παρατήρηση, όπου ο μεταφορέας εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, όπως στο στέλεχος φυσικού τύπου (Εικ. 3-9Γ). Έτσι, το N154 θα πρέπει να επηρεάζει την λειτουργία του UapA.



Εικόνα 3-9 Συστηματική μελέτη των καταλοίπων S154 και F155 του TMS3. **A.** Πρόσωση (πάνω) και κάτοψη (κάτω) των TMS3, 8 και 10 στο μοντέλο του UapA, όπου απεικονίζεται η σχετική θέση των S154 και F155 με τα κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης του υποστρώματος. **B.** Δοκιμασίες ανάπτυξης των μεταλλαγών στο TMS3 σε 5mM ουρία (U) ή 0,5 mM ουρικό οξύ (UA) ως μοναδικές πηγές αζώτου στους 25°C και 37°C. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος φυσικού τύπου (wild type – wt) και ως αρνητικός το στέλεχος με απαλοιφή του UapA (Δ UapA). **Γ.** Υποκυτταρική τοπολογία των TMS3 μεταλλαγών με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein – GFP) σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φυσικού τύπου μεταφορέας με GFP. (Τροποποιημένο από Amillis *et al.*, 2011)

Για την περαιτέρω διερεύνηση της ιδέας αυτής, εξετάστηκε αν οι αντικαταστάσεις S154A και S154N επηρέασαν την συγγένεια δέσμευσης υποστρωμάτων ή την εξειδίκευση του UapA. Στον Πίνακα 3-4 δίνεται μια λεπτομερή κινητική ανάλυση των S154A και S154N μεταλλαγών, η οποία αποδεικνύει ότι τα δύο μόρια, UapA-S154N και UapA-S154A, έχουν προφίλ συγγένεια υποστρώματος διαφορετικό από εκείνο του UapA άγριου τύπου. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, υπάρχει μια μικρή, δύο έως τρεις φορές, μείωση της συγγένειας για τα ανάλογα με ογκώδεις υποκαταστάσεις στη θέση 8 ή 9 του δακτυλίου πουρίνης (8-μεθυλ-ξανθίνη, 9-μεθυλ-ξανθίνη, οξυπουρινόλη). Επιπλέον, το S154A εμφανίζει μία μείωση της συγγένειας για το ουρικό οξύ περίπου 7 φορές, ενώ το S154N οδηγεί σε μέτρια αύξηση της συγγένειας για ξανθίνη και ουρακίλη. Έτσι, το κατάλοιπο Ser154 είναι σημαντικό για τον καθορισμό της εξειδίκευσης του UapA. Αξίζει, εδώ, να σημειωθεί

το γεγονός ότι τα στελέχη με τις μεταλλάξεις S154A και S154N εμφάνισαν μειωμένη ταχύτητα πρόσληψης υποστρώματος σε σχέση με το φυσικού τύπου στέλεχος (~35% και 25% αντίστοιχα). Αντίθετα, το στέλεχος με τη μεταλλαγή F155A εμφάνισε μικρότερη μείωση της ταχύτητας μεταφοράς (~60%), αλλά το προφίλ εξειδίκευσής του δεν διέφερε από αυτό του μεταφορέα αγρίου τύπου. Όσον αφορά τα φυσιολογικά υποστρώματα ουρικό οξύ και ξανθίνη και οι δύο μεταλλάξεις της S154, S154A και S154N, εμφανίζουν βελτίωση της συγγένειας δέσμησης για την ξανθίνη και ελάττωση της συγγένειας δέσμησης για το ουρικό οξύ, εικόνα παρόμοια με τη μεταλλαγή του XanQ N93S (Karena & Frillingos, 2009), γεγονός που υποδηλώνει ότι το κατάλοιπο αυτό συμμετέχει στην εξειδίκευση του μεταφορέα για ξανθίνη.

Πίνακας 3-4 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγών στο κατάλοιπο S154. (Amillis *et al.*, 2011)

	$K_{m/i}$ (μ M)		
Υπόστρωμα	UapA	S154N	S154A
Ξανθίνη	8	1,4	7,6
Ουρικό οξύ	7	10	53
Αδενίνη	α.α.	α.α.	>1000
Υποξανθίνη	α.α.	α.α.	>1000
Γουανίνη	α.α.	α.α.	>1000
Ουρακίλη	α.α.	523	>1000
2-θειο-ξανθίνη	63	35	48
3-μεθυλ-ξανθίνη	28	47	62
6-θειο-ξανθίνη	350	326	553
7-μεθυλ-ξανθίνη	α.α.	1000	α.α.
8-μεθυλ-ξανθίνη	100	194	188
9-μεθυλ-ξανθίνη	200	634	539
Οξυπουρινόλη	100	67	160

Μεταλλαγή	απουσία υποστρώματος (%)	1mM ξανθίνη (%)
UapA	~100	~20
S154A	~35	~5
S154N	~20	~5
F155*	~55	~18

Συγκριτικά ποσοστά (%) πρόσληψης ραδιοσημασμένης 3 H-ξανθίνης διαμέσου του UapA σε στέλεχος φυσικού τύπου (UapA) και στις μεταλλάξεις του TMS3 απουσία ή παρουσία του μη-ραδιοσημασμένου υποστρώματος (1 mM ξανθίνη).

Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων με τρεις επαναλήψεις για κάθε σημείο συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση ήταν <20%.
α.α.: απουσία αναστολής (90-100% πρόσληψης)
> 1000: αναστολή 60-75% σε συγκέντρωση 1 mM
*: το στέλεχος F155A εμφάνισε προφίλ όμοιο με αυτό του μεταφορέα αγρίου τύπου, γι' αυτό και δεν εμφανίζεται στον πίνακα

3.1.3.2 Ο ρόλος του αμινοξέος D360 στην πορεία μεταφοράς του υποστρώματος

	TMS 8																										
	356	360	363																								
UapA	L	.	P	I	I	A	V	F	I	I	C	A	C	E	C	I	G	D	V	T	A	T	C	D	V	S	
UapC	L	.	P	L	L	A	V	Y	M	V	I	M	M	E	S	I	G	D	I	T	A	T	C	D	V	S	
Ipe1	C	F	Q	D	C	F	A	M	L	A	A	S	F	A	S	L	I	E	S	T	G	T	L	I	A	V	S
SNBT1	S	L	A	G	V	F	G	I	I	A	G	V	I	S	S	M	V	E	S	V	G	D	Y	H	A	C	A
SVCT1	T	A	A	A	V	L	G	M	F	S	A	T	L	A	G	I	I	E	S	I	G	D	Y	Y	A	C	A
SVCT2	S	A	A	G	V	I	G	M	L	S	A	V	V	A	S	I	I	E	S	I	G	D	Y	Y	A	C	A
XanQ	S	F	H	Q	F	L	V	V	G	T	I	Y	L	L	S	V	L	E	A	V	G	D	I	T	A	T	A
XanP	E	W	S	L	L	P	L	M	L	V	F	M	I	T	S	L	E	T	I	G	D	I	T	A	T	S	
YgfJ	D	P	V	S	I	L	T	M	T	A	V	L	I	I	V	F	I	E	S	M	G	M	F	L	A	L	G
PucJ	E	I	G	P	I	L	T	M	L	I	V	G	I	V	I	I	V	E	S	T	G	V	F	Y	A	I	G
UraA	.	.	.	A	I	L	T	I	L	P	A	A	L	V	V	I	A	E	H	V	G	H	L	V	V	T	A
PyrP	Y	P	S	A	I	L	T	M	A	P	I	A	F	V	T	M	T	E	H	F	G	H	I	M	V	L	N
RutG	.	.	.	A	M	M	L	I	A	P	V	A	V	I	L	V	A	E	N	L	G	H	L	K	A	V	A

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η πιθανή πορεία μετατόπισης του υποστρώματος ξεκινά από την κύρια θέση δέσμευσης του υποστρώματος (κατάλοιπα F155, E356, A407 και Q408) και ακολουθείται από επόμενα στιγμιότυπα δέσμευσης

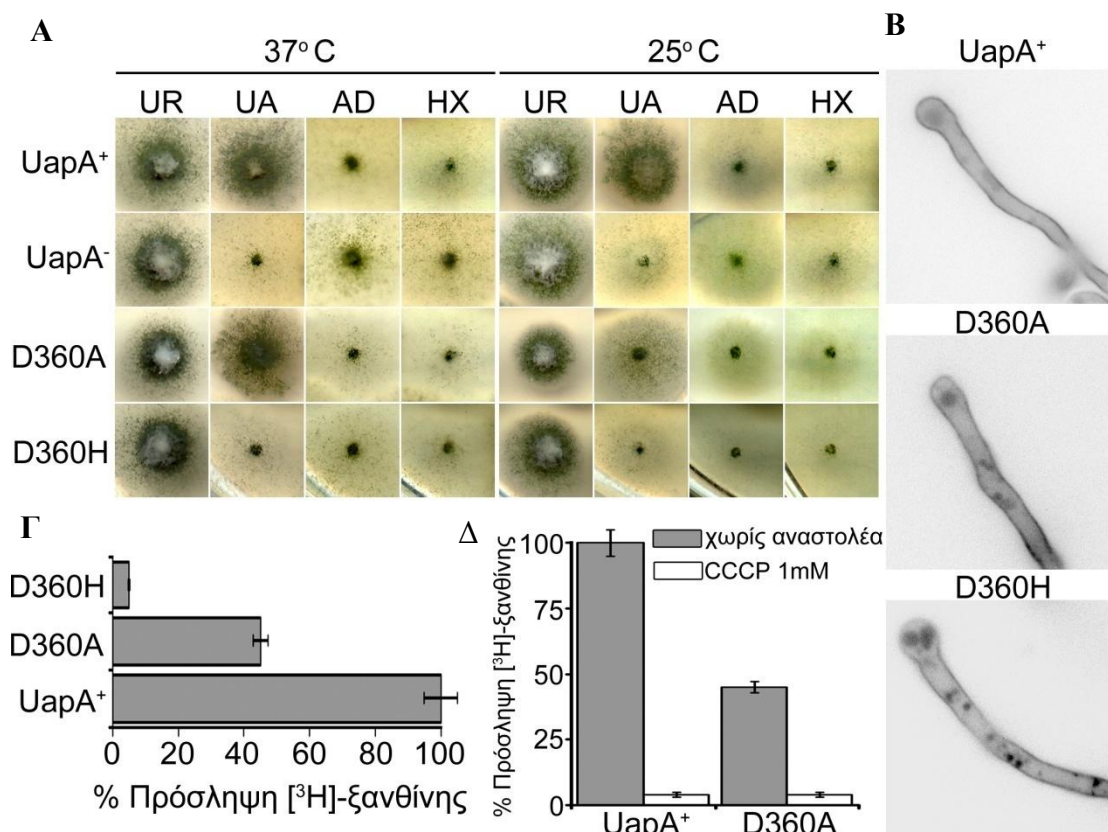
της ξανθίνης προς την κυτταροπλασματική πλευρά του μεταφορέα, κοντά στα κατάλοιπα D360, A363, G411, T416, R417, V463 και A469 (Εικ. 3-8).

Το D360, είναι ένα υψηλά συντηρημένο κατάλοιπο στα μέλη της οικογένειας NAT και δεν είχε μελετηθεί στο παρελθόν. Ωστόσο, το καρβοξύλιο στο αντίστοιχο Asp στον XanQ έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του μεταφορέα συμμετέχοντας είτε στη μεταφορά του πρωτονίου, είτε σε ζεύγη φορτίων κατά την εναλλαγή των διαμορφώσεων του μεταφορέα (Mermelekas *et al.*, 2010). Στον UraA αντιστοιχεί στην H245, ένα κατάλοιπο που προτείνεται να είναι σημαντικό για τον πρωτονιο-συζευγμένο μηχανισμό μεταφοράς της ουρακίλης (Lu *et al.*, 2011). Λόγω σύγκλισης υπολογισμών πρόσδεσης και βιβλιογραφικών δεδομένων ο ρόλος του έμελε να διερευνηθεί περαιτέρω.

Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν μεταλλάξεις του Asp360 σε Ala και His (D360A και D360H αντίστοιχα) σε κατάλληλους φορείς με συνεζευγμένη την GFP. Με τα πλασμίδια αυτά μετασηματίστηκε κατάλληλο στέλεχος και έπειτα από ανάλυση κατά Southern, επιλέχθηκε ένα στέλεχος σε κάθε μεταλλαγή που έφερε μονή ενσωμάτωση του πλασμιδίου, ομόλογη στον γονιδιακό τόπο του *argB*, για περαιτέρω φαινοτυπικό και βιοχημικό χαρακτηρισμό.

Η D360H στις δοκιμασίες ανάπτυξης εμφάνισε την εικόνα μετάλλαξης πλήρους απώλειας λειτουργίας (Εικ. 3-10A & Γ), και, παρά το γεγονός ότι εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, έδειξε αυξημένα επίπεδα καταστροφής στο χυμοτόπιο (Εικ. 3-10B). Η D360A ήταν σχετικά σταθερά εντοπιζόμενη στην πλασματική μεμβράνη (Εικ. 3-10B), αλλά διατηρούσε χαμηλή μεταφορική ταχύτητα, κυρίως στους 37°C (Εικ. 3-10A & Γ). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η χαμηλή μεταφορική ταχύτητα του UapA-D360A ήταν εξαρτώμενη από την βαθμίδωση πρωτονίων της πλασματικής μεμβράνης και το pH, με τρόπο όμοιο με το αγρίου τύπου αλληλόμορφο (Εικ. 3-10Δ).

Επιπλέον, το D360A παρουσίασε προφίλ εξειδίκευσης και συγγένειας δέσμευσης του υποστρώματος πολύ όμοια με την πρωτεΐνη άγριου τύπου (Εικ. 3-10A και αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την συμμετοχή του D360 ως κατάλοιπο απαραίτητο για τη δέσμευση και συμεταφορά του πρωτονίου, και υποδεικνύουν μια μάλλον έμμεση συμμετοχή του στη μεταφορά του υποστρώματος, πιθανώς μέσω των αλληλεπιδράσεών του με τα αμινοξέα N410 και T405.



Εικόνα 3-10 Συστηματική μελέτη του καταλοίπου D360 στο TMS8. **A.** Δοκιμασίες ανάπτυξης των μεταλλαγών στο TMS3 σε 5mM ουρία (U) ή 0,5 mM ουρικό οξύ (UA), αδενίνη (AD) ή υποξανθίνη (HX) ως μοναδικές πηγές αζώτου στους 25°C και 37°C. Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν το ισογενετικά στελέχη με φυσικού τύπου μεταφορέα (UapA⁺) και με απαλοιφή του γονιδίου (UapA⁻) αντίστοιχα. **B.** Υποκυτταρική τοπολογία των D360 μεταλλαγών με GFP σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φυσικού τύπου μεταφορέας με GFP (UapA⁺). **Γ.** και **Δ.** Συγκριτικά ποσοστά (%) πρόσληψης ραδιοσημασμένης [³H]-ξανθίνης διαμέσου του UapA σε στέλεχος φυσικού τύπου (UapA⁺) και στις μεταλλαγές του D360 (**Γ**) και απουσία ή παρουσία του αναστολέα κλίσης πρωτονίων CCCP (**Δ**). (Τροποποιημένο από Kosti *et al.*, 2012)

3.1.3.3 Ο ρόλος του TMS12 στην εξειδίκευση του UapA

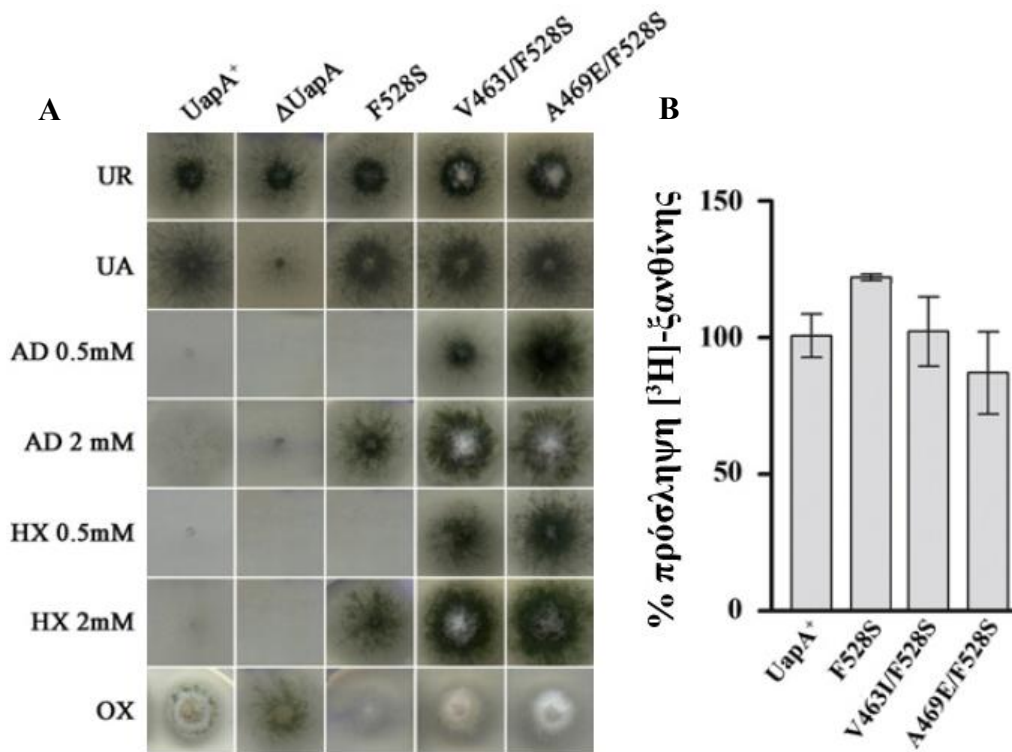
Όπως έχει συζητηθεί και προηγουμένως (βλ. §1.5.2, 3.1.3), στοιχεία του TMS12 φαίνεται να είναι σημαντικά για την εξειδίκευση του UapA, τόσο από υπολογισμούς πρόσδεσης, όσο και από γενετικές – μοριακές προσεγγίσεις (Amillis *et al.*, 2001; Vlanti *et al.*, 2006; Parageorgiou *et al.*, 2008β). Οι υπολογισμοί εύκαμπτης

πρόσδεσης στην κυτταροπλασματική πλευρά του μεταφορέα υπέδειξαν τα κατάλοιπα V463 και A469 του TMS12 ως πιθανά για αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα κατά την είσοδό του στο κύτταρο (Εικ. 3-8). Από πειράματα τυχαίας μεταλλαξιγένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία προέκυψαν τα ίδια κατάλοιπα ως στοιχεία που επηρεάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα.

Όσον αφορά τις μεταλλαγές V463I και A469E (νουκλεοτιδικές αλλαγές GTC→ATC και GCG→GAG αντίστοιχα) προέκυψαν από τυχαία μεταλλαξιγένεση με υπεριώδη ακτινοβολία και επιλογή σε χαμηλή συγκέντρωση αδενίνης (500 μM), μία πουρίνη που δεν αποτελεί φυσιολογικό υπόστρωμα του UapA:

- Η μεταλλαξιγένεση πραγματοποιήθηκε σε στέλεχος που έφερε τη μεταλλαγή UapA-F528S και αναπτυσσόταν σε υψηλή συγκέντρωση αδενίνης (2 mM). Σκοπός ήταν ο εντοπισμός στοιχείων του μεταφορέα που καθορίζουν την εξειδίκευση του. Η μεταλλαγή F528S, όπως θα δούμε και παρακάτω (βλ. §3.2.4), δεν επηρεάζει την κινητική και το προφίλ εξειδίκευσης του UapA για τα φυσιολογικά του υποστρώματα (ουρικό οξύ και ξανθίνη), αλλά προσδίδει στον UapA την ικανότητα μεταφοράς με χαμηλή συγγένεια άλλων πουρινών (π.χ. αδενίνη, υποξανθίνη) και ανάλογων πουρινών με ογκώδεις υποκαταστάσεις.
- Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του *uapA* ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στάλθηκε για αλληλούχηση, προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι πιθανές μεταλλαγές δεύτερης θέσης που προσέδιδαν στον UapA-F528S την ικανότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλή συγκέντρωση αδενίνης (500 μM). Μεταξύ των μεταλλαγών ταυτοποιήθηκαν και οι V463I(F528S) και A469E(F528S).
- Ακολούθησε πλήρης φαινοτυπικός χαρακτηρισμός (Εικ. 3-11A). Η ανάπτυξη των V463I/F528S και A469E/F528S σε ουρικό οξύ και ξανθίνη ήταν πανομοιότυπη με τον μεταφορέα αγρίου τύπου. Το V463I/F528S αναπτυσσόταν καλύτερα σε αδενίνη και υποξανθίνη συγκέντρωσης 2 mM, από ότι σε 0.5 mM, ενώ το A469E/F528S εμφάνιζε καλύτερη ανάπτυξη στη χαμηλή συγκέντρωση αδενίνης. Οι παρατηρήσεις αυτές υπέδειξαν ότι οι μεταλλαγές εξακολουθούσαν να μεταφέρουν με χαμηλή συγγένεια τις πουρίνες αδενίνη και υποξανθίνη, όπως και το στέλεχος F528S.
- Μελέτες πρόσληψης ραδιοσημασμένου υποστρώματος έδειξαν ότι η μεταφορική τους ικανότητα για [³H]-ξανθίνη ήταν πανομοιότυπη με τον μεταφορέα αγρίου τύπου, ενώ δεν ανιχνεύθηκε μεταφορά ραδιοσημασμένης υποξανθίνης (Εικ. 3-11B). Έτσι, το κινητικό προφίλ των V463I/F528S και A469E/F528S υπέδειξε ότι

πρόκειται για μεταλλαγές με διευρυμένη εξειδίκευση, επιδεικνύοντας υψηλή μεταφορική ικανότητα, αλλά πολύ χαμηλή συγγένεια δέσμευσης για πουρίνες πλην των ουρικό οξύ και ξανθίνη.



Εικόνα 3-11 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγών V463I και A469E παρουσία της μεταλλαγής F528S. **A.** Φαινότυποι ανάπτυξης στελεχών που εκφράζουν τον άγριου τύπου μεταφορέα (UapA⁺) ή φέρουν πλήρη απαλοιφή αυτού (ΔUapA), το UapA-F528S (F528S) και τις διπλές μεταλλαγές V463I/F528S και A469E/F528S σε πουρίνες ως μοναδικό πηγές азώτου. Η ανάπτυξη σε ουρία (UR, 5 mM) χρησιμοποιείται σαν ένας έλεγχος. Οι πουρίνες που ελέγχθηκαν ως πηγές азώτου περιλαμβάνουν το ουρικό οξύ (UA, 0.5 mM), την αδενίνη (AD, 0,5 και 2 mM) και την υποξανθίνη (HX, 0.5 και 2 mM). Η οξυπουρινόλη (OX, 100 μM) είναι ένα τοξικό ανάλογο του ουρικού οξέος/ξανθίνης που μεταφέρεται διαμέσου του UapA. Η ανάπτυξη σε ξανθίνη έχει επίσης δοκιμαστεί, και τα αποτελέσματα είναι ταυτόσημα με εκείνα του UA (δεν απεικονίζονται). Οι δοκιμασίες ανάπτυξης διεξήχθησαν στους 37°C και pH 6,8, τα οποία είναι οι τυπικές συνθήκες αναπτύξεως του *A. nidulans* στο εργαστήριο. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν στους 25°C. Να σημειωθεί ότι η έκφραση του UapA συντελεί σε φυσιολογική ανάπτυξη στο UA (κανονικό ρυθμό ανάπτυξης αποικίας και σπορίωσης που συνήθως παρατηρούνται σε ελάχιστο μέσο) και μερική ευαισθησία στην OX (μειωμένη διάμετρος αποικίας και έλλειψη σπορίωσης), αλλά δεν μπορεί να υποστηρίξει ανάπτυξη σε AD ή HX. Η έκφραση του UapA-F528S οδηγεί σε παρόμοια ανάπτυξη με αυτή του UapA⁺ στο UA, αλλά προσδίδει επίσης την ικανότητα για ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις (2 mM) AD ή HX και υπερευαισθησία στην OX. Το στέλεχος UapA-F528S χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή μεταλλαγών που αναπτύσσονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις AD (0,5 mM). Παρατηρήστε ότι οι νέες μεταλλαγές διαφέρουν από το αρχικό στέλεχος (UapA-F528S) ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε AD ή HX, ιδιαίτερα στις χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των πουρινών (0.5 mM). **B.** Σχετικός ρυθμός μεταφοράς ³H-ξανθίνης εκφρασμένος ως ποσοστό του αρχικού ρυθμού πρόσληψης (V) σε σύγκριση με τον ρυθμό του άγριου-τύπου (UapA⁺). Η τυπική απόκλιση σε όλα τα πειράματα ήταν πάντα <20% της μέσης τιμής. (Τροποποιημένο από Kosti *et al.*, 2010)

- Λεπτομερής ανάλυση του προφίλ εξειδίκευσης των νέων μεταλλαγών με μετρήσεις της συγγένειας δέσμευσης ($K_{i,m}$) για διάφορες πουρίνες και ανάλογά τους έδειξε ότι η συγγένεια δέσμευσης για τα φυσιολογικά υποστρώματα ουρικό

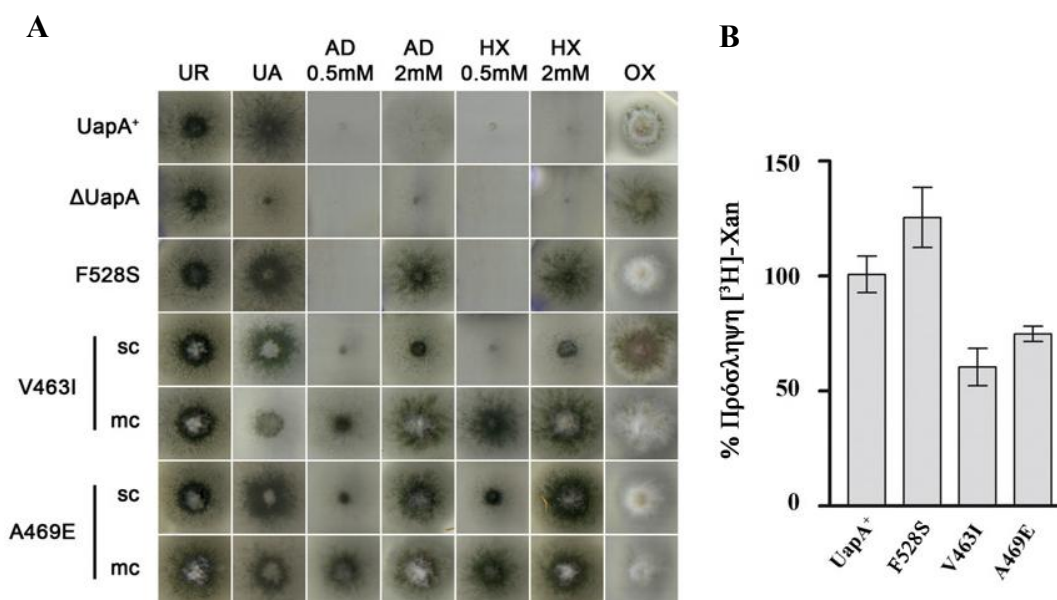
οξύ και ξανθίνη ήταν παρόμοια με τον μεταφορέα αγρίου τύπου (Πιν. 3-5). Η συγγένειά τους για αδενίνη και υποξανθίνη ήταν ελαφρώς αυξημένη εν συγκρίσει με τα UapA⁺ και F528S, αλλά ακόμα πολύ χαμηλή, και συνεπώς οριακά μετρήσιμη. Το αποτέλεσμα αυτό ήρθε σε συμφωνία με τις δοκιμασίες ανάπτυξης, κατά τις οποίες πλήρης αύξηση εμφανιζόταν κυρίως στη συγκέντρωση των 2 mM. Τέλος, εμφάνισαν αυξημένη συγγένεια δέσμευσης για την ουρακίλη, την οξυπουρινόλη και για ανάλογα της ξανθίνης με ογκώδεις υποκαταστάτες σε όλες σχεδόν τις θέσεις του πουρινικού δακτυλίου εκτός των θέσεων N₁-H και N₉. Το τελευταίο αυτό γεγονός, σε συνδυασμό με τη γνώση ότι οι θέσεις N₁-H και N₉ συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος από τον UapA (βλ. §3.1.2, Εικ. 3-5), υποδεικνύει ότι τα αμινοξέα V463 και A469 αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με την ξανθίνη από τις θέσεις N1 και/ή N9 κατά την πορεία της προς το κυτταρόπλασμα.

Πίνακας 3-5 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγών δευτέρας θέσης του TMS12 στο F528S. (Kosti *et al.*, 2010)

Υπόστρωμα	<i>K_{mi}</i> (μM)			
	UapA	F528S	V463I/F528S	A469E/F528S
Ξανθίνη	8	3	13	1,5
Ουρικό οξύ	7	11	12	2
Αδενίνη	α.α.	α.α.	α.α.	~2000
Υποξανθίνη	α.α.	~2000	α.α.	~1800
Γουανίνη	α.α.	~2000	α.α.	500
Ουρακίλη	α.α.	~2000	386	127
1-μεθυλ-ξανθίνη	280	420	~1000	300
2-θειο-ξανθίνη	63	63	38	100
3-μεθυλ-ξανθίνη	28	24	57	30
6-θειο-ξανθίνη	350	92	56	20
7-μεθυλ-ξανθίνη	α.α.	~1000	210	88
8-μεθυλ-ξανθίνη	100	45	33	10
9-μεθυλ-ξανθίνη	200	345	~1000	~1000
Οξυπουρινόλη	100	45	31	22

Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων με τρεις επαναλήψεις για κάθε σημείο συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση ήταν <20%.
α.α.: απουσία αναστολής (90-100% πρόσληψης)
> 1000: αναστολή 60-75% σε συγκέντρωση 1 mM

Προκειμένου να διερευνηθεί αν φαινότυπος των παραπάνω στελεχών οφείλεται σε συνεργασία των μεταλλαγών δεύτερης θέσης με την F528S, ή αν οι μεταλλαγές V463I και A469E είναι από μόνες τους ικανές να δώσουν αυτόν τον φαινότυπο, κατασκευάστηκαν στελέχη που έφεραν τις μονές μεταλλαγές απουσία της αρχικής F528S. Για τον περαιτέρω φαινοτυπικό χαρακτηρισμό επιλέχθηκαν ένα στέλεχος με μονή ενσωμάτωση κι ένα με πολλαπλή για κάθε μεταλλαγή. Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τα στελέχη που έφεραν τη μονή ενσωμάτωση. Ακολούθησαν δοκιμασίες ανάπτυξης σε πουρίνες ως μοναδικές πηγές αζώτου στους 37°C (Εικ. 3-12) και στους 25°C.



Εικόνα 3-12 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγών V463I και A469E απουσία της μεταλλαγής F528S.
A. Δοκιμασίες ανάπτυξης επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών που φέρουν μοναδικές (sc) ή πολλαπλές (mc) ενσωματώσεις των πλασμιδίων με τα μεταλλαγμένα uapA αλληλόμορφα (37 °C, pH 6,8). Παρουσιάζονται επίσης ισογενετικοί θετικοί (UapA⁺) και αρνητικοί (ΔUapA) μάρτυρες. Η ανάπτυξη στην ουρία (UR, 5 mM) χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Οι πουρίνες που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές αζώτου ήταν το ουρικό οξύ (UA, 0,5 mM), η αδενίνη (AD) και η υποξανθίνη (HX). Η οξυπουρινόλη (OX, 100 μM) είναι ένα τοξικό ανάλογο των ουρικό οξύ/ξανθίνη που προσλαμβάνεται διαμέσου του UapA. **B.** Απεικόνιση της ταχύτητας πρόσληψης (V) των υπό μελέτη στελεχών. Η τυπική απόκλιση σε όλα τα πειράματα ήταν πάντα <20% της μέσης τιμής. (Τροποποιημένο από Kostí *et al.*, 2010)

Τα αποτελέσματα και στις δύο θερμοκρασίες ήταν πανομοιότυπα. Οι δοκιμασίες ανάπτυξης έδειξαν ότι τα νέα στελέχη V463I και A469E, απουσία της μεταλλαγής F528S, παρουσιάζουν ανάπτυξη αγρίου τύπου σε ουρικό οξύ, κάτι το οποίο ίσχυε για τις μεταλλαγές παρουσία του F528S. Αντίθετα, η ανάπτυξη στις υπόλοιπες πουρίνες ήταν αισθητά διαφορετική σε σχέση με τα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη που έφεραν τη μεταλλαγή F528S. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη που έφεραν μονή ενσωμάτωση του πλασμιδίου διατήρησαν ελάχιστα ή και έχασαν εντελώς την

ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε 0,5 mM αδενίνη και υποξανθίνη, ενώ στα mc στελέχη η ανάπτυξη σε αδενίνη ή υποξανθίνη ήταν εντονότερη. Το στέλεχος με μονή ενσωμάτωση A469E αναπτυσσόταν ικανοποιητικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αδενίνης και υποξανθίνης (2 mM), φαινότυπος παρόμοιος με της μεταλλαγής F528S. Το στέλεχος V463I παρουσίαζε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην οξυπουρινόλη, φαινότυπος που εμφανίζεται σε στελέχη όπου απουσιάζει λειτουργικός UapA (Δ UapA). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλαγές V463I και A469E δεν βελτίωσαν τη συγγένεια δέσμευσης για αδενίνη και ότι ο φαινότυπος ανάπτυξης σε 0,5 mM αδενίνη των διπλά μεταλλαγμένων στελεχών ήταν αποτέλεσμα συνέργειας των νέων μεταλλαγών με την F528S.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα των νέων στελεχών να προσλαμβάνουν πουρίνες, και προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (K_m , V_{max}) της μεταφοράς. Στα μεταλλαγμένα στελέχη προσδιορίστηκαν οι σταθερές συγγένειας (K_m) για τα βασικά υποστρώματα του UapA, ξανθίνη και ουρικό, και ακολούθησε σύγκριση των τιμών αυτών με τις αντίστοιχες του UapA φυσικού τύπου (Πίν. 3-9). Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η ταχύτητα πρόσληψης των V463I και A469E παρουσιάζει υπολογίσιμη μείωση (Εικ. 3-12B).

Στον Πίνακα 3-6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα υπολογισθέντα K_i για τα μεταλλαγμένα στελέχη, σε αντιπαράθεση με τα αντίστοιχα φυσικού τύπου και Δ ACZF:UapA-F528S. Στις πουρίνες αδενίνη και υποξανθίνη, λόγω μεγαλύτερου ενδιαφέροντος, δοκιμάστηκε ως μέγιστη συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένου υποστρώματος τα 2000 μ M. Στις υπόλοιπες πουρίνες και τα ανάλογα αυτών η μέγιστη συγκέντρωση μη ραδιοσημασμένου υποστρώματος ήταν 1000 μ M. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι:

- Η συγγένεια δέσμευσης του V463I για ξανθίνη και ουρικό οξύ είναι μειωμένη κατά 6 φορές σε σχέση με του φυσικού τύπου και το A469E εμφανίζει τιμή K_i για το ουρικό οξύ αυξημένη κατά 8 φορές.
- Στα στελέχη V463I και A469E εμφανίζεται μία συντηρητική βελτίωση της συγγένειας δέσμευσης της αδενίνης και μια τάση βελτίωσης της συγγένειας δέσμευσης των πουρινών υποξανθίνη, γουανίνη, ουρακίλη καθώς και στα ανάλογα ξανθίνης με ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις 2,3,7 και 8, αλλά όχι για ανάλογα των θέσεων 1 και 9 του πουρινικού δακτυλίου, που θεωρούνται και σημαντικότερες. Το τελευταίο αυτό γεγονός, σε συνδυασμό με τη γνώση ότι οι θέσεις N₁-H και N₉ συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος από τον UapA

(βλ. §3.2.2, Εικ. 3-9), υποδεικνύει ότι τα αμινοξέα V463 και A469 δεσμεύουν την ξανθίνη από τις θέσεις N₁-H και/ή N₉ κατά την πορεία της προς το κυτταρόπλασμα.

- Γενικά, η συγγένεια δέσμευσης των στελεχών για πουρίνες, πέραν των ουρικό οξύ και ξανθίνη, παραμένει αρκετά χαμηλή (>700 μM), γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι τα στελέχη με μονή ενσωμάτωση αναπτύσσονται ικανοποιητικά μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις αδενίνης και υποξανθίνης (2 mM).

Πίνακας 3-6 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του TMS12 απουσία της μεταλλαγής F528S. (Kosti *et al.*, 2010)

Υπόστρωμα	<i>K_{m/i}</i> (μM)			
	UapA	F528S	V463I	A469E
Ξανθίνη	8	3	1,3	8,5
Ουρικό οξύ	7	11	12	58
Αδενίνη	<i>a.a.</i>	<i>a.a.</i>	~1700	~1500
Υποξανθίνη	<i>a.a.</i>	~2000	900	880
Γουανίνη	<i>a.a.</i>	~2000	750	<i>a.a.</i>
Ουρακίλη	<i>a.a.</i>	~2000	268	380
1-μεθυλ-ξανθίνη	280	420	300	500
2-θειο-ξανθίνη	63	63	60	280
3-μεθυλ-ξανθίνη	28	24	7	32
6-θειο-ξανθίνη	350	92	132	300
7-μεθυλ-ξανθίνη	<i>a.a.</i>	~1000	270	690
8-μεθυλ-ξανθίνη	100	45	100	61
9-μεθυλ-ξανθίνη	200	345	379	<i>a.a.</i>
Οξυπουρινόλη	100	45	97	18

a.a.: απουσία αναστολής (90-100% πρόσληψης), > 1000: αναστολή 60-75% σε C = 1 mM, ~1000/2000: αναστολή 50-60% σε C = 1 mM/2 mM

Συμπερασματικά, κανένα από τα παραπάνω κατάλοιπα (S154, F155, D360, V463 και A469) δεν είναι κρίσιμης σημασίας για την σηματοδότηση καταστροφής του UapA ή για τη δέσμευση του υποστρώματος σε αυτόν, όπως φαίνεται και από τις σχετικές μεταλλάξεις. Έτσι, όλα τα στοιχεία της προτεινόμενης πορείας του υποστρώματος σχετίζονται με μεταλλάξεις που επηρεάζουν, είτε το ρυθμό μεταφοράς (τιμές ταχύτητας – V), ή την εξειδίκευση του UapA ως προς το μεταφερόμενο

υπόστρωμα. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε πλήρη συμφωνία με το γεγονός ότι τα κατάλοιπα αυτά εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική περιοχή του μεταφορέα, καταρροϊκά της κεντρικής θέσης δέσμευσης του υποστρώματος.

3.1.4 Εξωκυττάρια περιοχές ελεγχόμενης πρόσβασης του υποστρώματος καθορίζουν την εξειδίκευση του UapA

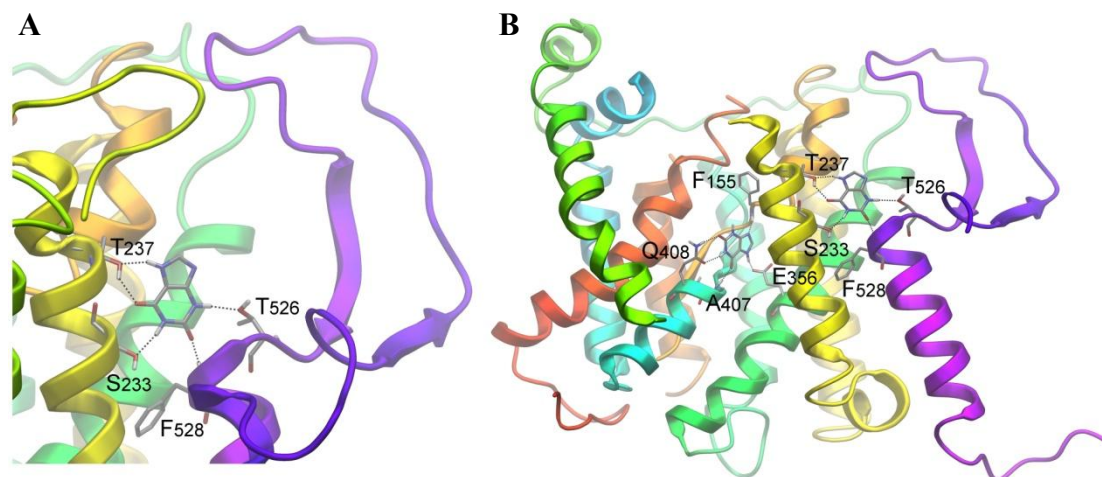
Από τις πιο προεξέχουσες μεταλλαγές εξειδίκευσης στον UapA είναι οι υποκαταστάσεις των αμινοξέων T526 και F528 με αλειφατικά ή πολικά κατάλοιπα (M/L για το T526 και A/S/T για το F528). Αυτές οι υποκαταστάσεις, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (βλ. §3.2.3.3) δεν επηρεάζουν την κινητική και το προφίλ εξειδίκευσης του UapA για τα φυσιολογικά του υποστρώματα (ουρικό οξύ και ξανθίνη), αλλά προσδίδουν στον UapA την ικανότητα μεταφοράς με χαμηλή συγγένεια άλλων πουρινών και ανάλογων πουρινών με ογκώδεις υποκαταστάσεις (Vlanti *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008β). Βάσει των παραπάνω δεδομένων έχει προταθεί ότι αυτά τα δύο κατάλοιπα ενεργούν ως στοιχεία ενός “μοριακού φίλτρου” ή μιας “δυναμικής πύλης” η οποία επιλέγει ποιες πουρίνες μπορούν να έχουν πρόσβαση στην κεντρική θέση δέσμευσης. Ως εκ τούτου, υποκαταστάσεις των T526 και F528 διευρύνουν την επιλεκτικότητα αυτής της πύλης.

Στο μοντέλο του UapA που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής (βλ. §3.1.1.2), τα T526 και F528 βρίσκονται στην εξωκυττάρια άκρη του TMS14, σε τοποθεσία ιδανική για τον καθορισμό εισόδου των υποστρωμάτων σε μια πορεία προς την κεντρική θέση δέσμευσης (Εικ. 3-4Γ & Δ, 3-8). Δημιουργήθηκε, λοιπόν, το ερώτημα εάν αυτή η υποθετική εξωκυττάρια πύλη μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως μία δευτερεύουσα θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Αν και σε όλους τους μεταφορείς που έχουν μελετηθεί, οι περισσότερες ενδείξεις υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας μόνο κύριας θέσης δέσμευσης του υποστρώματος τοποθετημένη σε μια κεντρική κοιλότητα, η ύπαρξη δευτερευουσών θέσεων δέσμευσης σε εξωκυττάρια και κυτταροπλασματικές θέσεις των μεταφορέων αποτελεί ένα πρόσφατο και ιδιαίτερα αμφισβητήσιμο ζήτημα (Schulze *et al.*, 2010).

Προκειμένου να εξεταστεί η πιθανή συμμετοχή των καταλοίπων T526 και F528 ως στοιχεία μιας εξωκυττάριας περιοχής ελεγχόμενης διέλευσης και/ή μιας προβλεπόμενης δευτερογενούς θέσης δέσμευσης, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης της ξανθίνης χρησιμοποιώντας μεγάλο εύρος δειγματοληψίας.

Τα αποτελέσματα υπέδειξαν την ύπαρξη μιας ιδιαίτερης γεωμετρίας πρόσδεσης σε απόσταση από την κεντρική περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, η οποία θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ανεξάρτητη εξωκυττάρια θέση αναγνώρισης, και η οποία περιλαμβάνει τα κατάλοιπα T526 και F528 (Εικ. 3-13).

Πιο συγκεκριμένα, ένα μικρό σύνολο στιγμιotypών με ευνοϊκές γεωμετρίες φαίνεται να καταλαμβάνουν μια κοιλότητα που σχηματίζεται στο όριο μεταξύ των εξωκυτταρικών και διαμεμβρανικών περιοχών της πρωτεΐνης. Στην περιοχή αυτή σχηματίζεται μια καλά καθορισμένη κοιλότητα μεταξύ της περιοχής ελεγχόμενης πρόσβασης του μεταφορέα και τις διακριτές έλικες TMS13 και TMS14. Η πουρίνη σταθεροποιείται στο σημείο αυτό με δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα S233, T237, T526 και F528. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, από τοπολογική άποψη η κοιλότητα αυτή είναι η πιο εύκολα προσβάσιμη από τον εξωκυττάριο χώρο και ταυτόχρονα βρίσκεται σε πολύ κοντινή απόσταση από την κεντρική θέση δέσμευσης (η απόσταση μεταξύ των E356 και F528 είναι μόνο 12 Å).



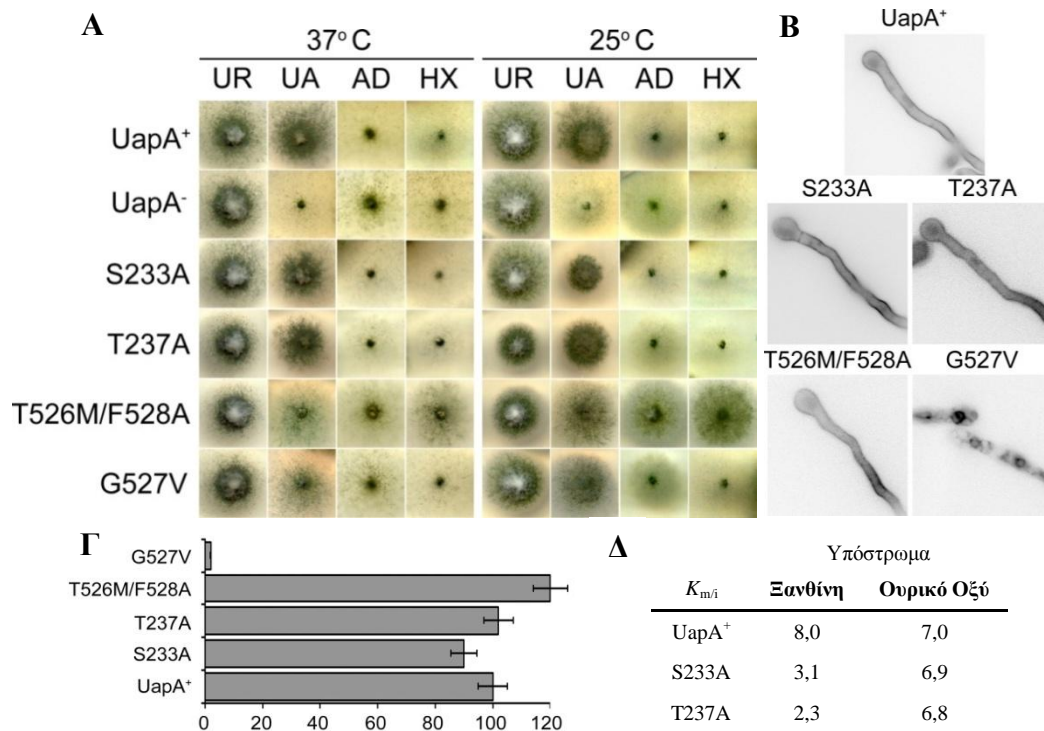
Εικόνα 3-13 Υποθετική δευτερεύουσα θέση δέσμευσης της ξανθίνης στην εξωκυτταρική πλευρά του TMS14. **A.** Εστιασμένη άποψη. **B.** Σχετική θέση κύριας και δευτερεύουσας θέσης δέσμευσης του υποστρώματος. Ορισμένες έλικες έχουν αφαιρεθεί για λόγους οπτικής διάκρισης. (Kosti *et al.*, 2012)

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι κύρια και δευτερεύουσα θέση δέσμευσης του υποστρώματος είναι αλληλένδετες, καθώς μια “συνδετική” διαδρομή μπορεί εύκολα να υποτεθεί με μικρές κινήσεις και ελαφριά πλευρική μετατόπιση των ελίκων TMS4 και TMS7. Η εγγύτητα αυτή ενισχύεται περαιτέρω βιοχημικά στον XanQ όπου η δέσμευση του υποστρώματος προστατεύει από αλκυλίωση κατάλοιπα κυστεΐνης τεχνητά τοποθετημένα στο TMS14 (Papakostas *et al.*, 2008).

Για την τελική επαλήθευση της ύπαρξης αυτής της εξωκυττάριας περιοχής ελεγχόμενης πρόσβασης και αν λειτουργεί ως δευτερεύουσα θέση πρόσδεσης του υποστρώματος ακολούθησε μελέτη των υποδειγμένων εμπλεκόμενων αμινοξέων με γενετικές και βιοχημικές προσεγγίσεις. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν μεταλλαγές που αφορούσαν τα κατάλοιπα S233, T237 και G527, τα οποία δεν είχαν μελετηθεί στο παρελθόν. Επίσης κατασκευάστηκε η διπλή μεταλλαγή T526M/F528A. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των υπολογισμών πρόσδεσης, αντικαταστάσεις των S233 και θα T237 ίσως θα διεύρυναν το προφίλ εξειδίκευσης του UapA, παρόμοια με τις αντικαταστάσεις των T526 και F528, ενώ η μεταλλαγή G527V θα επηρέαζε επίσης την τοπική αρχιτεκτονική και, συνεπώς, θα χαλάρωνε ή θα απενεργοποιούσε την εξειδίκευση του UapA. Όπως είναι γνωστό, οι μεταλλαγές T526M και F528A αφήνουν ανεπηρέαστο το προφίλ εξειδίκευσης του UapA για τα φυσιολογικά του υποστρώματα και διευρύνουν τη χαμηλής συγγένειας μεταφορά άλλων πουρινών. Το διπλά μεταλλαγμένο T526M/F528A ίσως χαλάρωνε περαιτέρω την εξειδίκευση του UapA.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μεταλλαγών έδειξε ότι η αντικατάσταση των S233 και T237 σε Ala δεν επηρέασε καθόλου την τοποθέτηση του UapA στην πλασματική μεμβράνη, την καταστροφή του ή την κινητική μεταφοράς και το προφίλ εξειδίκευσης του, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα κατάλοιπα αυτά δεν αποτελούν μέρος της εξωκυτταρικής πύλη ή μια δευτερεύουσα θέση πρόσδεσης. Αντίθετα, το G527V είχε την εικόνα μεταλλαγής απώλειας λειτουργίας, ειδικά στους 37°C (Εικ. 3-14A και Γ), προφανώς λόγω της αστάθειας της πρωτεΐνης και της καταστροφής/αποδόμησής του στο χυμοτόπιο (Εικ. 3-20B). Η μεταλλαγή T526M/F528A έδειξε ότι εξαρτάται από τη θερμοκρασία, διεύρυνε, όπως προβλέφθηκε, την εξειδίκευση του UapA, οδηγώντας σε ανάπτυξη σε αδενίνη ή υποξανθίνη (Εικ. 3-20A), υποστηρίζοντας το ρόλο των καταλοίπων T526 και F528 στην λειτουργία της “δυναμικής πύλης” επιλεκτικής εισόδου υποστρωμάτων.

Συνοψίζοντας, η ανάλυση των νέων μεταλλαγών υποστηρίζει περαιτέρω το ρόλο των καταλοίπων T526, G527 και F528 ως στοιχεία μιας εξωκυτταρικής περιοχής ελεγχόμενης πρόσβασης του υποστρώματος που ελέγχει την εξειδίκευση του μεταφορέα, αλλά αποτυγχάνουν να παρέχουν γενετική επαλήθευση της παρουσίας μιας δευτερεύουσας θέσης δέσμευσης του υποστρώματος στην περιοχή αυτή.



Εικόνα 3-13 Ανάλυση των μεταλλαγών στην υποθετική δευτερεύουσα θέση δέσμευσης.

A. Δοκιμασίες ανάπτυξης σε πουρίνες ως μοναδικές πηγές αζώτου στους 25 και 37°C. Το UA είναι ουρικό οξύ, το AD αδενίνη και το HX υποξανθίνη. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται η ανάπτυξη σε ουρία (UR). Απεικονίζονται επίσης ο θετικός (UapA⁺) και ο αρνητικός (UapA⁻) ισογενετικός μάρτυρας. **B.** In vivo υποκυτταρική έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του UapA-GFP και του μεταφορέα αγρίου τύπου (UapA⁺) σε μικροσκόπιο επιφθορισμού. **Γ.** Σχετικός ρυθμός μεταφοράς ³H-ξανθίνης εκφρασμένος ως ποσοστό του αρχικού ρυθμού πρόσληψης (V) των μεταλλαγμών και του μεταφορέα άγριου-τύπου (UapA⁺). Ως 100% ορίζεται η μεταφορική ικανότητα του UapA⁺. **Δ.** Τιμές $K_{m/i}$ για τις νέες λειτουργικές μεταλλαγές του UapA και τον αγρίου τύπου UapA⁺. (Τροποποιημένο από Kostí *et al.*, 2012)

3.1.5 Κυτταροπλασματικά στοιχεία πιθανώς συνθέτουν μία εσωτερική περιοχή ελεγχόμενης διέλευσης – Ο ρόλος του αμινοξέος R481

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (βλ. §3.1.4), εκτός από την κεντρική θέση δέσμευσης του υποστρώματος, υπάρχουν και άλλα στοιχεία που καθορίζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα UapA, με προεξέχουσες μεταλλαγές εξειδίκευσης στον τις υποκαταστάσεις των αμινοξέων T526 και F528. Προκειμένου να βρεθούν κι άλλες περιοχές του UapA που έχουν τον ίδιο ρόλο πραγματοποιήθηκε τυχαία μεταλλαξιγένεση με υπεριώδη ακτινοβολία σε στέλεχος που έφερε τη μεταλλαγή F528S (βλ. §3.1.3.3). Όλες οι μεταλλαγές που απομονώθηκαν ήταν ενδογονιδιακές στον UapA και η πλειοψηφία τους αφορούσε το αμινοξύ R481. Το κατάλοιπο αυτό εντοπίζεται στην αρχή του TMS13, στην κυτταροπλασματική περιοχή του UapA. Είναι η λιγότερο συντηρημένη από τις τρεις Arg της περιοχής (R478, R479 και R481), με τις προηγούμενες δύο να εντοπίζονται στο μικρό βρόχο έξι αμινοξέων μεταξύ των TMS12 και 13 (Εικ. 3-5). Το γεγονός ότι η περιοχή αυτή εντοπίζεται

στην κυτταροπλασματική πλευρά του μεταφορέα συνάδει με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν ότι τα θετικά φορτία σε κυταροπλασματικές περιοχές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών υπερτερούν και συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη (positive inside rule). Για τους παραπάνω λόγους ακολούθησε συστηματική μελέτη του αμινοξέος R481.

3.1.5.1 Μεταλλαγές του R481 οδηγούν σε διεύρυνση της εξειδίκευσης του UapA

Αρχικά μελετήθηκαν οι μεταλλαγές δεύτερης θέσης στο R481 που είχαν αποκτηθεί από την τυχαία μεταλλαξιγένεση στο στέλεχος με τη μεταλλαγή F528S. Από τη μεταλλαξιγένεση αυτή προέκυψαν τρεις διαφορετικές αντικαταστάσεις του ίδιου αμινοξέος, οι R481Q, R481L και R481G, με την πρώτη να αποτελεί την πιο συχνή αντικατάσταση.

Πίνακας 3-7 Είδος των νουκλεοτιδικών αλλαγών στο γονίδιο του *uapA*, καθώς και τις αμινοξικές αλλαγές που προκαλούνται στο R481.

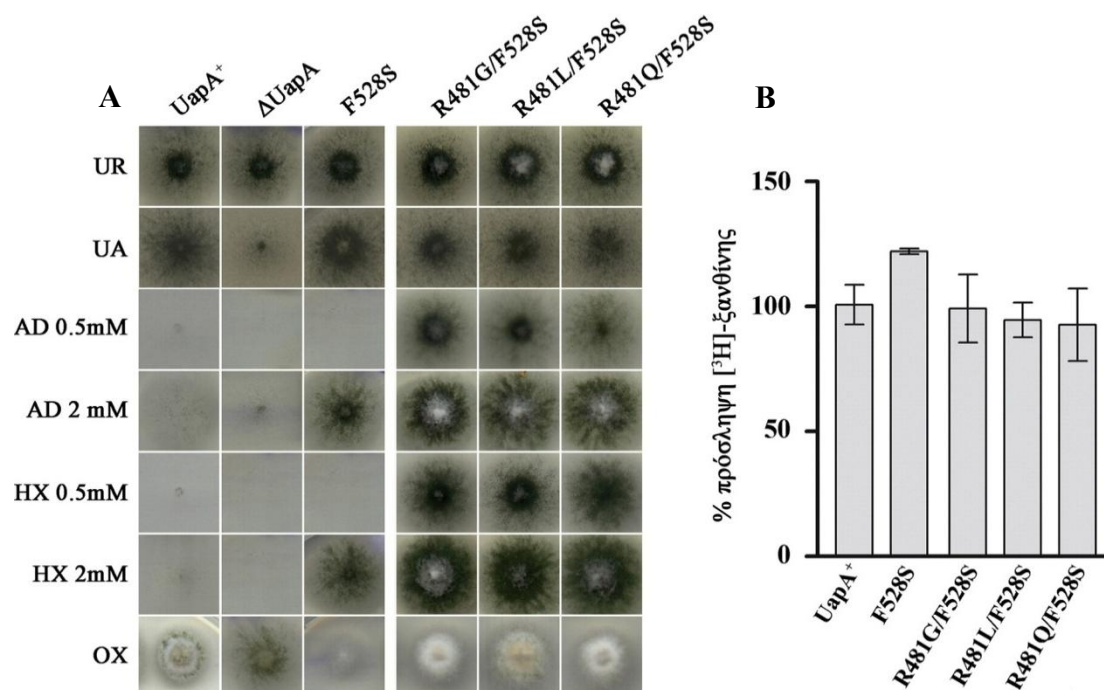
Νουκλεοτιδική αντικατάσταση	Αμινοξική αντικατάσταση
CGG → CAG	R → Q
CGG → CTG	R → L
CGG → CTA	
CGG → GGG	R → G

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός σε δοκιμασίες ανάπτυξης με πουρίνες ως πηγές αζώτου των στελεχών αυτών έδειξε ότι (Εικ. 3-15Α):

- Όλα τα στελέχη παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη σε αδενίνη από ότι σε υποξανθίνη.
- Τα στελέχη R481L/F528S και R481Q/F528S, είχαν καλύτερη ανάπτυξη στην αδενίνη από ότι στο ουρικό οξύ .
- Την πιο έντονη ανάπτυξη σε αδενίνη παρουσίασε το R481G/F528S.
- Το R481L/F528S εμφάνισε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην οξυπουρινόλη σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη και το R481G/F528S τη μικρότερη.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα των νέων στελεχών να προσλαμβάνουν πουρίνες, και προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (K_m , V_{max}) της μεταφοράς. Στα μεταλλαγμένα στελέχη προσδιορίστηκαν οι σταθερές συγγένειας K_m για τα βασικά υποστρώματα του UapA, ξανθίνη και ουρικό, και ακολούθησε σύγκριση των τιμών αυτών με τις αντίστοιχες του UapA φυσικού τύπου και του

στελέχους Δ ACZF:UapA-F528S. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταλλαγή R481G/F528S δεν επηρεάζει την ταχύτητα πρόσληψης, η R481L/F528S την αυξάνει και η R481Q/F528S επιφέρει υπολογίσιμη μείωση της τάξης του 30% – Εικ. 3-15B). Ακολούθως, με πειράματα συναγωνιστικού ανταγωνισμού της πρόσληψης [3 H]-ξανθίνης με μη σημασμένες πουρίνες και ανάλογά τους, προσδιορίστηκε η συγγένεια του UapA τόσο στα μεταλλαγμένα στελέχη, όσο και στα στελέχη φυσικού τύπου και Δ ACZF:UapA-F528S (Πίν. 3-9).



Εικόνα 3-14 Συστηματική μελέτη μεταλλαγών στο αμινοξύ R481 παρουσία της μεταλλαγής F528S. **A.** Φαινότυποι ανάπτυξης στελεχών που εκφράζουν τον άγριου τύπου μεταφορέα (UapA⁺) ή φέρουν πλήρη απαλοιφή αυτού (Δ UapA), το UapA-F528S (F528S) και τις μεταλλαγές δεύτερης θέσης στο κατάλοιπο σε πουρίνες ως μοναδικό πηγές αζώτου. Η ανάπτυξη σε ουρία (UR, 5 mM) χρησιμοποιείται για έλεγχο. Οι πουρίνες που ελέγχθηκαν περιλαμβάνουν το ουρικό οξύ (UA, 0.5 mM), την αδενίνη (AD, 0,5 και 2 mM) και την υποξανθίνη (HX, 0.5 και 2 mM). Η οξυπουρινόλη (OX, 100 μ M) είναι ένα τοξικό ανάλογο του ουρικού οξέος/ξανθίνης που μεταφέρεται διαμέσου του UapA. Η ανάπτυξη σε ξανθίνη έχει επίσης δοκιμαστεί, και τα αποτελέσματα είναι ταυτόσημα με εκείνα του UA (δεν απεικονίζονται). Οι δοκιμασίες ανάπτυξης διεξήχθησαν στους 37°C και pH 6,8, τα οποία είναι οι τυπικές συνθήκες αναπτύξεως του *A. nidulans* στο εργαστήριο. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν στους 25°C. Το στέλεχος UapA-F528S χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή μεταλλαγών που αναπτύσσονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις AD (0,5 mM). Οι νέες μεταλλαγές διαφέρουν από το αρχικό στέλεχος (UapA-F528S) ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε AD ή HX, ιδιαίτερα στις χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των πουρινών (0.5 mM). **B.** Σχετικός ρυθμός μεταφοράς 3 H-ξανθίνης εκφρασμένος ως ποσοστό του αρχικού ρυθμού πρόσληψης (V) σε σύγκριση με τον ρυθμό του άγριου-τύπου (UapA⁺). Η τυπική απόκλιση σε όλα τα πειράματα ήταν πάντα <20% της μέσης τιμής. (Τροποποιημένο από Kosti *et al.*, 2010)

Από τον κινητικό χαρακτηρισμό των τριών στελεχών φαίνεται ότι:

- Δεν υπάρχει ουσιαστική βελτίωση της συγγένειάς τους για αδενίνη και υποξανθίνη.
- Ανεξάρτητα από το αμινοξύ που αντικατέστησε την Arg481, τα στελέχη εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά για τα βασικά υποστρώματα ξανθίνη και ουρικό οξύ, καθώς και για τις πουρίνες αδενίνη και υποξανθίνη, αλλά συγκριτικά με τον μεταφορέα αγρίου τύπου εμφανίζουν 8-10 φορές βελτίωση της συγγένειας δέσμευσης.
- Όλες οι μεταλλαγές παρουσιάζουν μια γενική απελευθέρωση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων με εξαίρεση τις θέσεις N₁-H και N₉. Είναι χαρακτηριστική η αύξηση της συγγένειας δέσμευσης για την 6-θειο-ξανθίνη κατά 100 φορές περίπου σε σύγκριση με το μεταφορέα αγρίου τύπου.

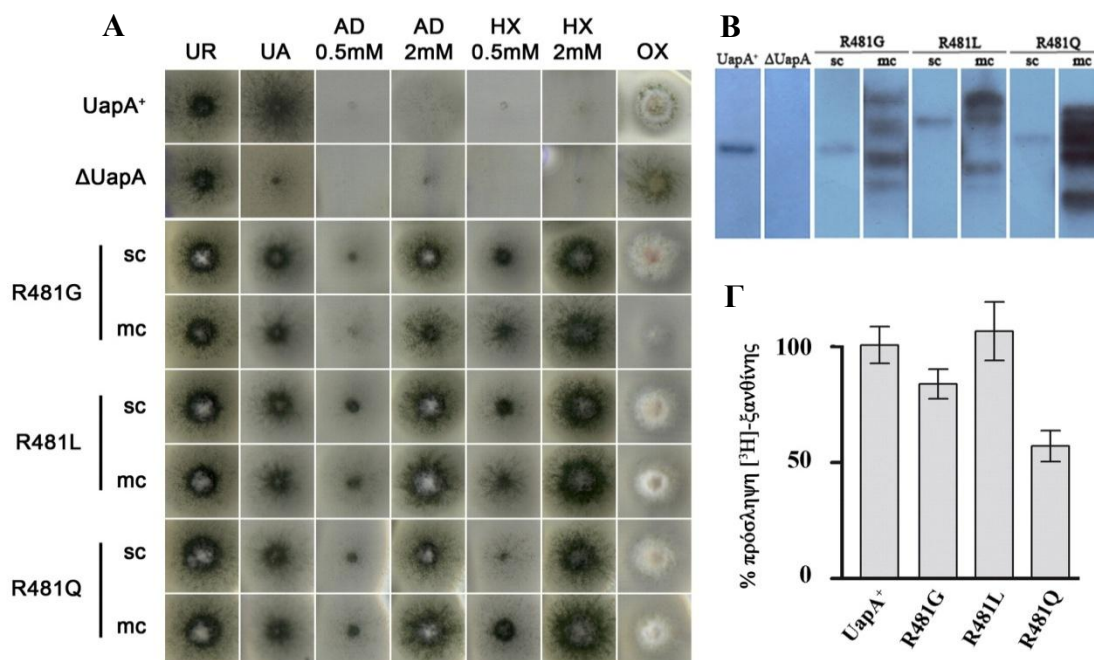
Πίνακας 3-8 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του R481 στο F528S. (Kosti *et al.*, 2010)

Υπόστρωμα	$K_{m/i}$ (μM)				
	UapA	F528S	R481L/ F528S	R481Q/ F528S	R481G/F528S
Ξανθίνη	8	3	1	1,1	0,56
Ουρικό οξύ	7	11	1,4	1,5	1,1
Αδενίνη	<i>a.a.</i>	<i>a.a.</i>	<i>a.a.</i>	<i>a.a.</i>	<i>a.a.</i>
Υποξανθίνη	<i>a.a.</i>	~2000	1630	1630	1530
Γουανίνη	<i>a.a.</i>	~2000	<i>a.a.</i>	~1000	<i>a.a.</i>
Ουρακίλη	<i>a.a.</i>	~2000	3	9,3	1,8
1-μεθυλ-ξανθίνη	280	420	723	~1000	100
2-θειο-ξανθίνη	63	63	12	19	3,1
3-μεθυλ-ξανθίνη	28	24	2,8	4,1	,9
6-θειο-ξανθίνη	350	92	3,5	13	3
7-μεθυλ-ξανθίνη	<i>a.a.</i>	~1000	128	239	50
8-μεθυλ-ξανθίνη	100	45	6,7	40	3,2
9-μεθυλ-ξανθίνη	200	345	244	<i>a.a.</i>	>1000
Οξυπουρινόλη	100	45	332	218	151

a.a.: απουσία αναστολής (90-100% πρόσληψης), > 1000: αναστολή 60-75% σε C = 1 mM

Προκειμένου να διερευνηθεί αν φαινότυπος των παραπάνω στελεχών οφείλεται σε συνεργασία των μεταλλαγών δεύτερης θέσης με την F528S, ή αν οι μεταλλαγές V463I και A469E είναι από μόνες τους ικανές να δώσουν αυτόν τον φαινότυπο,

κατασκευάστηκαν στελέχη που έφεραν τις μονές μεταλλαγές απουσία της αρχικής F528S, όπως και σε προηγούμενη μελέτη (βλ. §3.1.3.3). Για τον περαιτέρω φαινοτυπικό χαρακτηρισμό επιλέχθηκαν ένα στέλεχος με μονή ενσωμάτωση κι ένα με πολλαπλή για κάθε μεταλλαγή (Εικόνα 3-16B). Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τα στελέχη που έφεραν τη μονή ενσωμάτωση.



Εικόνα 3-15 Συστηματική μελέτη μεταλλαγών στο αμινοξύ R481 απουσία της μεταλλαγής F528S. **A.** Δοκιμασίες ανάπτυξης επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών που φέρουν μοναδικές (sc) ή πολλαπλές (mc) ενσωματώσεις των πλασμιδίων με τα μεταλλαγμένα uapA αλληλόμορφα (37°C, pH 6,8). Παρουσιάζονται επίσης ισογενετικοί θετικοί (UapA⁺) και αρνητικοί (ΔUapA) μάρτυρες. **B.** Ανάλυση κατά Southern στελεχών με μονή (sc – single copy) και πολλαπλή ενσωμάτωση (mc – multy copy) αντίστοιχα για τις μεταλλαγές του R481. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ένα στέλεχος αγρίου τύπου με ένα φυσικό αντίγραφο UapA (UapA⁺) και το στέλεχος στο οποίο μετασχηματίστηκαν τα πλασμίδια (ΔUapA). **Γ.** Απεικόνιση της ταχύτητας πρόσληψης (V) των υπό μελέτη στελεχών. Η τυπική απόκλιση σε όλα τα πειράματα ήταν πάντα <20% της μέσης τιμής. (Τροποποιημένο από Kostí *et al.*, 2010)

Από τις δοκιμασίες ανάπτυξης φάνηκε ότι οι μεταλλαγές του R481 απουσία της αρχικής F528S, απώλεσαν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλή συγκέντρωση αδενίνης (500 μM), αλλά διατήρησαν την ανάπτυξή τους στην υψηλή συγκέντρωση AD 2 mM). Όσον αφορά την υποξανθίνη, τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονταν σε μικρό βαθμό παρουσία χαμηλής συγκέντρωσής της, εκτός από το στέλεχος με μονή ενσωμάτωση του R481Q. Σε 2 mM υποξανθίνη όλα τα στελέχη αναπτύσσονταν πολύ ικανοποιητικά. Τα στελέχη με πολλαπλές ενσωματώσεις εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία σε οξυπουρινόλη από τα sc στελέχη, γεγονός που υποδεικνύει δοσοεξαρτώμενη μεταφορά και όχι μεταβολή της συγγένειας δέσμευσης.

Πίνακας 3-9 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγών δεύτερης θέσης του R481 απουσία της μεταλλαγής F528S. (Kosti *et al.*, 2010)

Υπόστρωμα	$K_{m/i}$ (μM)				
	UapA	F528S	R481L	R481Q	R481G
Ξανθίνη	8	3	18	3	0,9
Ουρικό οξύ	7	11	19	6	3,5
Αδενίνη	α.α.	α.α.	α.α.	α.α.	~2500
Υποξανθίνη	α.α.	~2000	α.α.	α.α.	~1000
Γουανίνη	α.α.	~2000	α.α.	α.α.	~700
Ουρακίλη	α.α.	~2000	~1000	α.α.	~1200
1-μεθυλ-ξανθίνη	280	420	200	150	200
2-θειο-ξανθίνη	63	63	90	43	10
3-μεθυλ-ξανθίνη	28	24	27	19	5,1
6-θειο-ξανθίνη	350	92	57	59	3,7
7-μεθυλ-ξανθίνη	α.α.	~1000	140	65	41
8-μεθυλ-ξανθίνη	100	45	100	10	2,5
9-μεθυλ-ξανθίνη	200	345	124	286	200
Οξυπουρινόλη	100	45	14	14	26

α.α.: απουσία αναστολής (90-100% πρόσληψης), > 1000: αναστολή 60-75% σε C = 1 mM

Ο περαιτέρω κινητικός χαρακτηρισμός έδειξε ότι (Πιν. 3-9):

- Η συγγένεια δέσμευσης των νέων μεταλλαγών για ξανθίνη και ουρικό οξύ είναι παρόμοια μ' εκείνη του UapA φυσικού τύπου (οι διαφορές κυμαίνονται από 2-3 φορές πάνω ή κάτω), με εξαίρεση το R481G, που το K_m για ξανθίνη είναι βελτιωμένο κατά 9 φορές σε σχέση με του φυσικού τύπου.
- Η μεταλλαγή R481G εμφανίζει μία γενική τάση βελτίωσης της συγγένειας δέσμευσης των πουρινών αδενίνη, υποξανθίνη, γουανίνη και ουρακίλη και τα ανάλογα τις ξανθίνης με υποκαταστάτες στις θέσεις N₁ και N₉.
- Και οι τρεις μεταλλαγές παρουσιάζουν βελτιωμένη συγγένεια δέσμευσης στα ανάλογα ξανθίνης με ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις 2,3,7 και 8, αλλά όχι για ανάλογα των θέσεων 1 και 9 του πουρινικού δακτυλίου.
- Γενικά, η συγγένεια δέσμευσης των στελεχών για τις πουρίνες αδενίνη-υποξανθίνη-γουανίνη παραμένει αρκετά χαμηλή (>700 μM), γεγονός που υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη ανάπτυξη των στελεχών σε πουρίνες άλλες του ουρικού οξέος και

ξανθίνης οφείλεται περισσότερο σε αυξημένη μεταφορική ικανότητα του UapA στη μονάδα του χρόνου και όχι τόσο σε βελτιωμένη συγγένεια δέσμευσης.

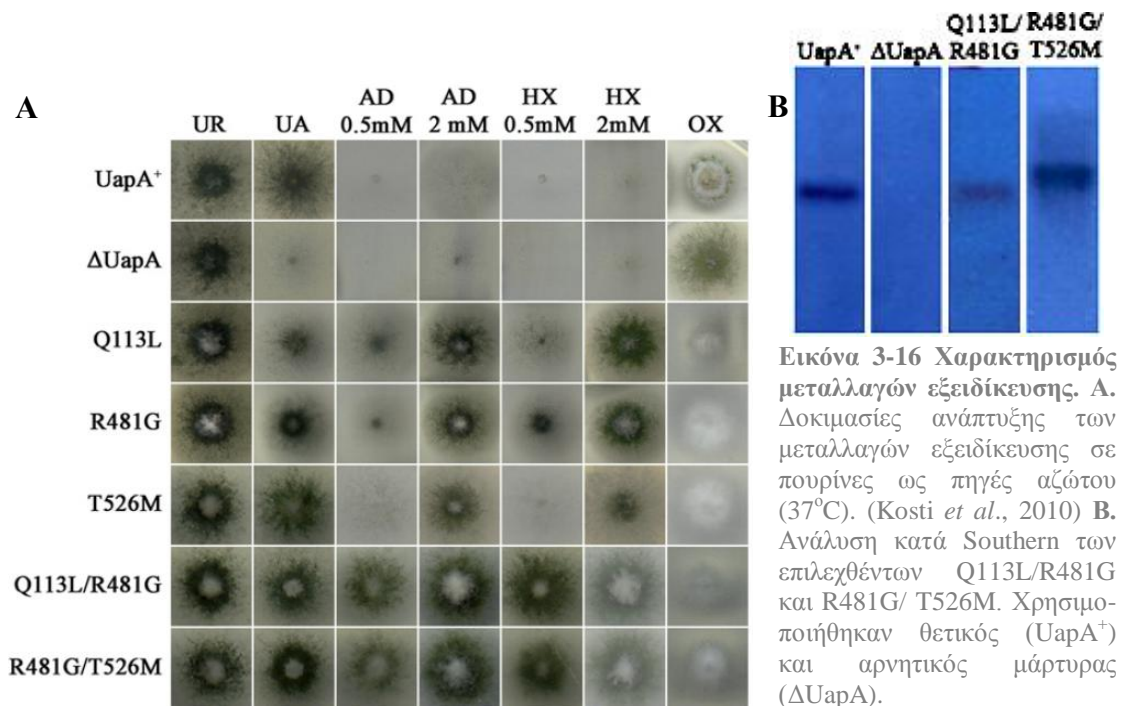
Τα παραπάνω υποδεικνύουν τη συνεργιστική δράση των F528 και R481 στην εξειδίκευση του UapA.

3.1.5.2 Ενδομοριακή συνεργασία του R481 με άλλες περιοχές του μεταφορέα UapA καθορίζουν την εξειδίκευσή του

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (βλ. §3.1.4), εκτός από την κεντρική θέση δέσμευσης του υποστρώματος, υπάρχουν και άλλα στοιχεία που καθορίζουν την εξειδίκευση του UapA. Τέτοιες μεταλλαγές εξειδίκευσης αφορούν αντικαταστάσεις των αμινοξέων T526 και F528 στο βρόχο μεταξύ των TMS13 και 14 (βλ. §3.1.4), καθώς και του αμινοξέος Q113 που εντοπίζεται στο βρόχο μεταξύ των TMS1 και 2 (Εικ. 3-5Γ). Φαίνεται επίσης πως αυτές οι δύο περιοχές, δηλαδή οι βρόχοι των TMS1-2 και TMS13-14, ίσως «συνεργάζονται» προκειμένου να σχηματίσουν ένα μοριακό φίλτρο εξειδίκευσης που επιτρέπει την ελεγχόμενη πρόσβαση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του μεταφορέα, κάτι σαν αρχική «διαλογή» των ουσιών που θα μπουν τελικά στο κύτταρο διαμέσου του UapA (Amillis *et al.*, 2001; Parageorgiou *et al.*, 2008β).

Με δεδομένο ότι το R481 ως κυτταροπλασματικό στοιχείο φαίνεται να συνεργάζεται λειτουργικά με το περιπλασματικό F528 (βλ. §3.1.5.1), επόμενος στόχος ήταν η επιβεβαίωση της συνεργασίας του R481 με την ευρύτερη περιοχή του βρόχου TMS13-14, καθώς και η διερεύνηση της πιθανότητας “συνεργασίας” του με το Q113. Για το σκοπό αυτό, η μεταλλαγή R481G, η οποία εμφάνισε τις βέλτιστες συγγένειες δέσμευσης για αδερίνη και υποξανθίνη (Πιν. 3-10), συνδυάστηκε με το έτερο στοιχείο “φίλτρου” του βρόχου TMS13-14, το T526 (R481G/T526M), καθώς και με το Q113 (Q113L/R481G). Έπειτα από ανάλυση κατά Southern επιλέχθηκαν στελέχη που έφεραν μονή ενσωμάτωση του εκάστοτε πλασμιδίου (Εικ. 3-16B).

Στα στελέχη που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανάπτυξης σε πουρίνες ως μοναδικές πηγές αζώτου στους 37°C (Εικ. 3-16A) και στους 25 °C. Τα αποτελέσματα και στις δύο θερμοκρασίες ήταν πανομοιότυπα. Τα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη Q113L/R481G και R481G/T526M παρουσίασαν παρόμοιους φαινοτύπους μ’ εκείνους του στελέχους R481G/F528S (βλ. §3.1.5.1 και Εικ.3-14), καθώς αναπτύσσονταν σε χαμηλές συγκεντρώσεις αδερίνης και υποξανθίνης (0,5 mM). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το R481 αλληλεπιδρά με τα Q113 και T526.



Η συνεργιστική δράση του R481G με τις τρεις προαναφερθείσες μεταλλαγές (Q113L, T526M και F528S) φάνηκε και στον κινητικό χαρακτηρισμό που ακολούθησε. Από τις μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης φάνηκε ότι συγγένεια δέσμευσης των Q113/R481G και R481G/T526M για τις διάφορες πουρίνες είναι αισθητά βελτιωμένη σε σχέση με τα στελέχη που φέρουν τις μονές μεταλλαγές (Q113, R481G και T526M – Πίν. 3-11). Ειδικότερα, το R481G/T526M παρουσιάζει υψηλή συγγένεια δέσμευσης για την ουρακίλη (32 μM), ενδιάμεση συγγένεια για τις υποξανθίνη και γουανίνη (179 μM και 225 μM αντίστοιχα) και την υψηλότερη συγγένεια όλων των στελεχών για την αδερίνη (1 mM), αν και η τιμή αυτή εξακολουθεί να είναι χαμηλή. Επίσης, έχει αυξημένη συγγένεια για την ξανθίνη, την οξυπουρινόλη και σχεδόν όλα τα ανάλογα της ξανθίνης, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την 9-μέθυλο-ξανθίνη. Ανάλογες παρατηρήσεις μπορεί να κάνει κανείς και για το Q113L/R481G ως προς τη συμπεριφορά του στα ανάλογα ξανθίνης. Το στέλεχος αυτό όμως, δεν παρουσιάζει υπολογίσιμη βελτίωση της συγγένειας δέσμευσης ως προς την αδερίνη και την υποξανθίνη.

Πίνακας 3-10 Κινητική ανάλυση των μεταλλαγών εξειδίκευσης. (Kosti *et al.*, 2010)

Υπόστρωμα	K_{mi} (μM)					
	UapA	Q113L	R481G	T526M	Q113L/R481G	R481G/T526M
Ξανθίνη	8	4	18	5	1,3	1,2
Ουρικό οξύ	7	10	19	12	2,5	8
Αδενίνη	α.α.	α.α.	α.α.	~2500	α.α.	980
Υποξανθίνη	α.α.	260	α.α.	~1700	~1300	179
Γουανίνη	α.α.	~1000	α.α.	-	α.α.	225
Ουρακίλη	α.α.	413	~1000	76/>1000	536	32
1-μεθυλ-ξανθίνη	280	280	200	288	~300	~40
2-θειο-ξανθίνη	63	10	90	8	17	13
3-μεθυλ-ξανθίνη	28	9	27	11	8	5,5
6-θειο-ξανθίνη	350	38	56,6	6	4,5	4
7-μεθυλ-ξανθίνη	α.α.	~1000	140	~1000	α.α.	361
8-μεθυλ-ξανθίνη	100	110	100	6	4	4
9-μεθυλ-ξανθίνη	200	α.α.	124	202	α.α.	~1000
Οξυπουρινόλη	100	29	14	22	11	2

α.α.: απουσία αναστολής (90-100% πρόσληψης), > 1000: αναστολή 60-75% σε C = 1 mM, ~1000: αναστολή 50-60% σε C = 1mM

3.1.5.3 Ο ρόλος του R481 στη δομική σταθερότητα του UapA

Καθώς, όπως έχει προαναφερθεί (βλ. §3.1.5), η R481 εντοπίζεται σε μια κυτταροπλασματική περιοχή πλούσια σε συντηρημένες αργινίνες, στην αρχή του TMS13, και φαίνεται να συνεργάζεται με άλλες περιοχές του UapA καθορίζοντας την εξειδίκευσή του, ένα ακόμη ερώτημα που δημιουργήθηκε ήταν αν η φύση ή θέση του αμινοξέος αυτού του προσέδιδε τους παραπάνω ρόλους. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν δύο παραλλαγές του UapA:

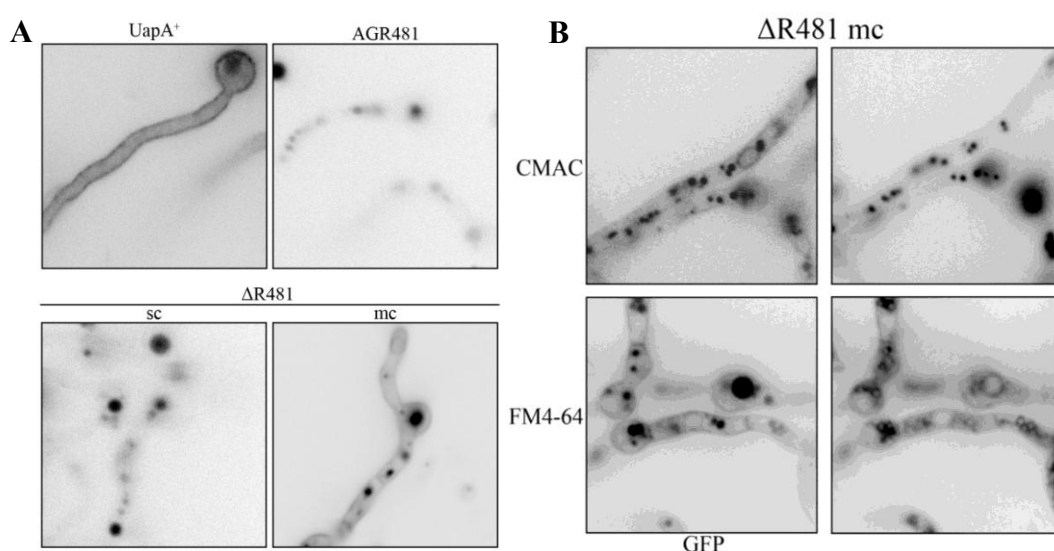
- Στη μία έγινε εισδοχή δύο ουδέτερων αμινοξέων (αλανίνη – γλυκίνη) πριν το R481 (AGR481). Μ' αυτόν τον τρόπο το R481 αλλάξε θέση αυξάνοντας το μήκος του βρόχου και, μεταφερόμενο προς το κέντρο του TMS13, θα μπορούσε να υποδείξει τη σημασία της θέσης του και του μήκους του βρόχου TMS12-13 στη δομή και τη λειτουργία του UapA.
- Η άλλη παραλλαγή του μεταφορέα έφερε έλλειψη του αμινοξέος R481 (Δ R481), προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για την λειτουργία του R481 αυτού καθαυτού.

Η κατασκευή των παραπάνω πλασμιδίων έγινε με κατευθυνόμενη *in vitro* PCR μεταλλαξιγένεση (βλ. §2.3). Εν συνεχεία, τα πλασμίδια αυτά εισήχθησαν σε κατάλληλο στέλεχος. Από το μετασηματισμό προέκυψαν στελέχη με ανενεργή λειτουργία του *UapA*, καθώς τα στελέχη αυτά αδυνατούσαν να αναπτυχθούν σε οποιαδήποτε πουρίνη-υπόστρωμα του *UapA* ως μοναδική πηγή αζώτου. Ο φαινότυπος αυτός οδήγησε σε νέα ερωτήματα ως προς την τοπολογία και τη δομική σταθερότητα των στελεχών αυτών. Η απουσία ανάπτυξης θα μπορούσε να συμβαίνει για τρεις λόγους:

1. Ο μεταφορέας, λόγω δομικής αστάθειας, αποικοδομείται και ίσως δεν στοχεύεται στην πλασματική μεμβράνη ώστε να επιτελέσει το έργο του.
2. Ο μεταφορέας στοχεύεται στη μεμβράνη, αλλά η μεταλλαγή προκαλεί μείωση του χρόνου ζωής της πρωτεΐνης, η οποία ενδοκυτώνεται και καταστρέφεται ταχύτατα.
3. Ο μεταφορέας εντοπίζεται στη μεμβράνη, αλλά η εκάστοτε μεταλλαγή (εισδοχή ή αφαίρεση αμινοξέος) απενεργοποιεί αυτή καθαυτή τη λειτουργία του.
4. Η έλλειψη ανάπτυξης είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης της δομικής αστάθειας και της απώλειας λειτουργίας.

Προκειμένου να διερευνηθεί ποιος από τους παραπάνω λόγους είναι η αιτία του φαινοτύπου ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών, κάτι που κατέστη δυνατό αφού το γονίδιο του *uapA* που έφερε την εκάστοτε μεταλλαγή (AGR ή ΔR) ήταν συνεζυγμένο με το *gfp* για τον εύκολο υποκυτταρικό του εντοπισμό. Τα πειράματα μικροσκοπίου αποκάλυψαν ότι τα δύο στελέχη παρουσίαζαν διαταραγμένη υποκυτταρική τοποθέτηση του *UapA* σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου (Εικ. 3-18A). Ειδικότερα, το AGR481 στέλεχος απουσίαζε πλήρως από την πλασματική μεμβράνη και εντοπιζόταν διάχυτα στο εσωτερικό οργανιδίων και του χυμοτοπίου, υποδηλώνοντας ότι η μορφή αυτή του *UapA* είναι εντελώς ασταθής και καταστρέφεται ταχύτατα. Το sc ΔR481 στέλεχος παρουσίαζε τον ίδιο φαινότυπο. Αντίθετα, το mc ΔR481 στέλεχος εμφανιζόταν στη μεμβράνη και τα διαφράγματα, σε πολύ μικρότερη ποσότητα όμως από τον φυσιολογικό *UapA*, αλλά κυρίως εντοπιζόταν σε οργανίδια, στο χυμοτόπιο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ταυτοποίηση των παρατηρούμενων οργανιδίων πραγματοποιήθηκε με χρώσεις και μικροσκοπική παρατήρηση (βλ. §2.1.11– Εικ. 3-18B). Η εξήγηση μιας τέτοιας εικόνας θα μπορούσε να είναι ότι, όταν η πρωτεΐνη παράγεται σε μεγάλη ποσότητα, παρά την καθυστέρηση εξόδου από το ΕΔ λόγω λανθασμένης δομής, κάποια ποσότητα καταφέρνει να ενσωματωθεί στην πλασματική μεμβράνη. Εξακολουθεί

βέβαια να καταστρέφεται σε μεγάλο βαθμό. Η απλούστερη εξήγηση για τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι αλλαγή της θέσης της Arg481 και του μήκους του βρόχου TMS12-13 αποσταθεροποιεί τον UapA. Βέβαια, το γεγονός ότι ακόμη και το mc ΔR481 που εμφανίζει κάποια ποσότητα UapA στη μεμβράνη εξακολουθεί να μην αναπτύσσεται σε πουρίνες πιθανώς υποδηλώνει ότι εκτός από τη δομική αστάθεια και η λειτουργία του UapA έχει χαθεί. Άρα, πιθανώς η περιοχή αυτή διαδραματίζει λειτουργικό και δομικό ρόλο.



Εικόνα 3-17 Υποκυτταρικός εντοπισμός μεταλλαγμένων μεταφορέων του UapA με πλαισιοτροποποιητικές μεταλλαγές στο αμινοξύ R481. **A.** Ανάλυση μικροσκοπίας φθορισμού σε στέλεχος με τον φυσικού τύπου μεταφορέα UapA (UapA⁺) και σε στέλεχη που εκφράζουν τις μεταλλαγές AGR481 και ΔR481 (sc: single copy – mc: multy copy). **B.** Ταυτοποίηση υποκυτταρικών κυστιδιακών δομών στο ΔR481 (mc) με χρώσεις. Η αριστερή φωτογραφία, σε κάθε χρώση, είναι στο πράσινο φίλτρο για τη GFP, και η δεξιά στο μπλε ή στο κόκκινο για τις χρώσεις CMAC και FM4-64 αντίστοιχα.

3.1.5.4 Η HulARsp5 λιγάση της ουβικουΐτινης σηματοδοτεί την καταστροφή των ασταθών μορφών στο χυμοτόπιο

Το επόμενο ερώτημα που δημιουργήθηκε ήταν με ποιο μηχανισμό καταστρέφεται ο UapA, όταν φέρει αυτές τις μεταλλαγές. Ήταν γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι η σηματοδότηση για καταστροφή στον μεταφορέα αγρίου τύπου πραγματοποιείται με προσθήκη μορίων ουβικουΐτινης (μονο-πολύ-ουβικουΐτινίωση) από την HulA^{Rsp5} λιγάση της ουβικουΐτινης σε ένα και μοναδικό κατάλοιπο λυσίνης, την K572. Μερική απενεργοποίηση της λιγάσης (HulA^{Rsp5}ΔC2) ή αντικατάσταση της λυσίνης από άλλο θετικό αμινοξύ (K572R) έχουν ως αποτέλεσμα

ο UapA να μην ενδοκυτώνεται για καταστροφή στο χυμοτόπιο και να παραμένει σταθερός στην πλασματική μεμβράνη (Gounas *et al.*, 2010).

Βάσει των παραπάνω, το πρώτο βήμα ήταν να εισαχθούν οι μεταλλαγές AGR και ΔR σε στέλεχος που έφερε μερική απενεργοποίηση της λιγάσης (HulA^{Rsp5}ΔC2). Τα στελέχη που προέκυψαν αδυνατούσαν να αναπτυχθούν σε οποιαδήποτε πουρίνη-υπόστρωμα του UapA ως μοναδική πηγή αζώτου. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφειλόταν είτε σε μη αποκατάσταση της τοπολογίας τους, είτε λόγω απώλειας της λειτουργικότητας.

Προκειμένου να διαπιστωθεί ποιο από τα δύο ενδεχόμενα ισχύει ακολούθησαν πειράματα οπτικής μικροσκοπίας. Η μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι στα στελέχη που έφεραν την HulA^{Rsp5}ΔC2 είχε αποκατασταθεί η υποκυτταρική τοποθέτηση των UapA-AGR481-GFP και UapA-ΔR481-GFP αντίστοιχα, και πλέον ο μεταφορέας εντοπιζόταν, όπως και ο αγρίου τύπου, στην πλασματική μεμβράνη και τα διαφράγματα (Εικ. 3-19). Επιπλέον, εντοπιζόνταν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, σημάδι πως το κύτταρο “αντιλαμβάνεται” την εσφαλμένη αναδίπλωσή τους. Το γεγονός ότι, παρά την ορθή τοπολογία, τα στελέχη αυτά συνέχιζαν να εμφανίζουν αδυναμία ανάπτυξης σε πουρίνες, υπέδειξε ότι το αμινοξύ R481 και η εγγύς περιοχή επηρεάζουν τόσο τη δομική σταθερότητα του μεταφορέα, όσο και την ορθή λειτουργία του. Επίσης, έδειξε ότι η HulA^{Rsp5} λιγάση της ουβικουΐτινης σηματοδοτεί, και στην περίπτωση ασταθών μορφών του UapA, την καταστροφή τους στο χυμοτόπιο.

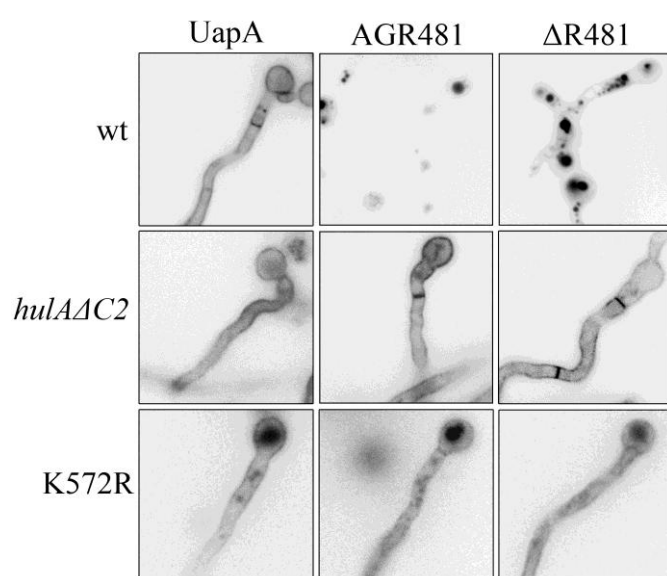
3.1.5.5 Η λυσίνη 572 είναι ο δέκτης των μορίων ουβικουΐτινης

Απορρέον ερώτημα ήταν, εφόσον η HulA^{Rsp5} είναι η ίδια λιγάση που προσαρτεί μόρια ουβικουΐτινης τόσο στις ασταθείς μορφές, όσο και στον αγρίου τύπου μεταφορέα (ως απόκριση σε συγκεκριμένα σήματα), η λυσίνη στην οποία προστίθενται τα μόρια είναι η ίδια (K572); Για να διερευνηθεί το ενδεχόμενο αυτό κατασκευάστηκαν οι διπλές μεταλλαγές AGR481/K572R και ΔR481/K572R: Έπειτα από ανάλυση κατά Southern επιλέχθηκε ένα στέλεχος με μονή ενσωμάτωση για κάθε μεταλλαγή.

Τα στελέχη αυτά υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες ανάπτυξης με πουρίνες ως πηγές αζώτου. Ο φαινότυπός τους ήταν ίδιος με στελεχών που έχουν πλήρη απώλεια λειτουργίας, και αδυνατούσαν να αναπτυχθούν παρουσία οποιασδήποτε πουρίνης. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφειλόταν είτε σε μη αποκατάσταση της τοπολογίας τους,

είτε λόγω απώλειας της λειτουργικότητας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροσκοπίας έδειξαν ότι η τοποθέτηση των UapA-AGR481/K572R-GFP και UapA-ΔR481/K572R-GFP είχε αποκατασταθεί και πλέον ο μεταφορέας εντοπιζόταν, όπως και ο αγρίου τύπου, στην πλασματική μεμβράνη, τα διαφράγματα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, εικόνα σχεδόν πανομοιότυπη με τα στελέχη *HulA^{Rsp5}ΔC2* (Εικ. 3-19).

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι οι ασταθείς μορφές του UapA, ουβικουιτινιώνονται από την *HulA^{Rsp5}* λιγάση της ουβικουιτίνης στο κατάλοιπο K572.



Εικόνα 3-18 Ανάλυση μικροσκοπίας φθορισμού του UapA φυσικού τύπου (UapA) και των AGR481 και ΔR481 μεταλλαγών σε στελέχη χωρίς άλλη μεταλλαγή (wt), με μερική απενεργοποίηση της *HulA^{Rsp5}* λιγάσης (*hulAΔC2*) και με τη μεταλλαγή δεύτερης θέσης K572R στον UapA (K572R) αντίστοιχα.

3.1.6 Αναζητώντας στοιχεία της δομής που εξηγούν την εξέλιξη της εξειδίκευσης στα μέλη της οικογένειας NAT/NCS2

Τα μέλη της οικογένειας NAT στα πρωτεύοντα μεταφέρουν L-ascorbate/ Na^+ αντί για νουκλεοτιδικές βάσεις/ H^+ . Άλλα θηλαστικά έχουν μεταφορείς της οικογένειας και με τις δύο εξειδικεύσεις, άλλους για τη μεταφορά L-ασκορβικού και άλλους για τις νουκλεοτιδικές βάσεις (Gournas *et al.*, 2008). Έχοντας διαθέσιμη τη δομή του UraA κατασκευάστηκαν τα μοντέλα του rSNBT1, μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων στον αρουραίο, και του SVCT2, μεταφορέα L-ασκορβικού στον άνθρωπο, και πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί πρόσδεσης με τα φυσιολογικά υποστρώματα του καθενός (ξανθίνη και ασκορβικό οξύ αντίστοιχα) και για τους δύο μεταφορείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το L-ασκορβικό και η ξανθίνη δεσμεύονται ειδικά σε μια κεντρική θέση δέσμησης στον SVCT2 και τον rSNBT1 αντίστοιχα.

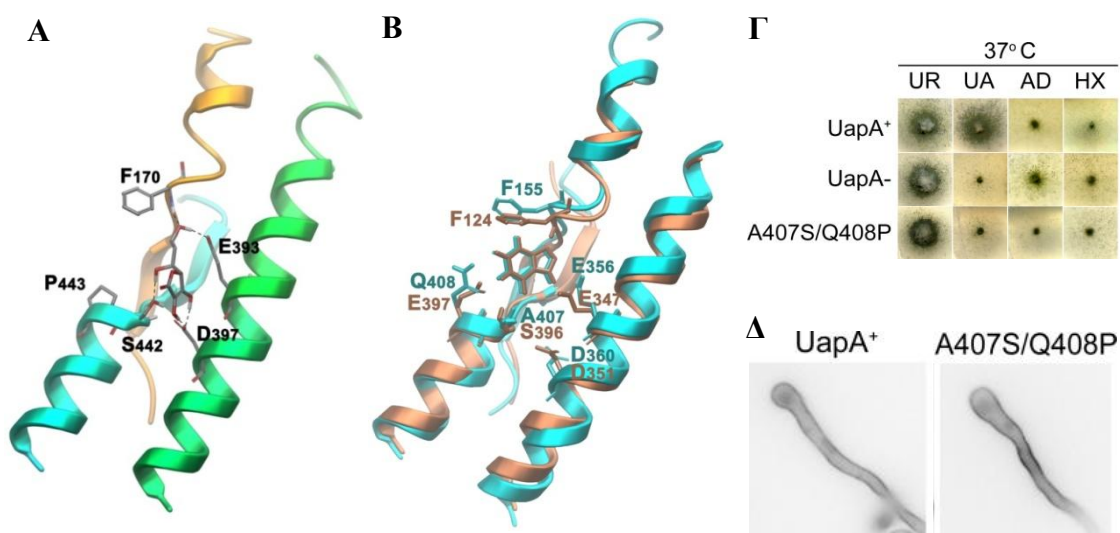
(Εικ. 3-19A και B), αλλά το μη φυσιολογικό τους υπόστρωμα όχι. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετείχαν στις αλληλεπιδράσεις του rSNBT1 με το υπόστρωμα ήταν ταυτόσημα ή υψηλά συντηρημένα σε σύγκριση με εκείνα που προσδιορίστηκαν στον UapA (Πιν. 3-11). Αντίθετα, ο SVCT2, ο οποίος στερείται του κρίσιμου καταλοίπου Gln/Glu που δεσμεύει το υπόστρωμα και εντοπίζεται σε μέλη της οικογένειας NAT εξειδικευμένα για νουκλεοτιδικές βάσεις (Q408 στον UapA, E397 στον rSNBT1), δέσμευε το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιώντας τα F170, S442, E393 και D397, κατάλοιπα που αντιστοιχούν στα F155, A407, E356 και D360 του UapA. Έτσι, είναι σαφές ότι η «αντικατάσταση» ενός καταλοίπου Gln/Glu με Pro στο NAT μοτίβο που εντοπίζεται στο TMS10, είναι μια κρίσιμη διαφορά για την αλλαγή της εξειδίκευσης σε αυτήν την οικογένεια των μεταφορέων.

Πίνακας 3-11 Αμινοξέα που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος στους μεταφορείς μυκήτων (UapA), κατώτερων θηλαστικών (rSNBT1) και του ανθρώπου (SVCT2).

UapA (<i>Aspergillus nidulans</i>)	rSNBT1 (<i>Rattus norvegicus</i>)	SVCT2 (<i>Homo sapiens</i>)
F155	F124	F170
E356	E347	E393
D360	D351	D397
A407	S396	S442
Q408	E397	P443

Για να ελεγχθεί αν αυτή η διαφορά (Q/E→P) είναι αρκετή για να αλλάξει την εξειδίκευση του UapA από πουρίνες σε L-ασκορβικό κατασκευάστηκε η διπλή μεταλλαγή UapA-A407S/Q408P, και εξετάστηκε η έκφραση, η σταθερότητα και το προφίλ εξειδίκευσης της ως προς τις πουρίνες και το L-ασκορβικό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διπλή μετάλλαξη δεν επηρεάζει την έκφραση του UapA αλληλόμορφου (σημασμένου με GFP) στην πλασματική μεμβράνη, μια πολύ ισχυρή ένδειξη ότι η συνολική αναδίπλωση του μεταφορέα δεν επηρεάζεται. Παρόλα αυτά, το στέλεχος με τη μεταλλαγή αυτή έχασε παντελώς την ικανότητα πρόσληψης πουρινών και δεν απέκτησε μετρήσιμη πρόσληψη L-ασκορβικού. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει έντονα ότι η εξέλιξη της εξειδίκευσης μέσα σε μια οικογένεια μεταφορέων δεν είναι απλώς το αποτέλεσμα τοπικών αλλαγών στην κύρια θέση δέσμευσης του υποστρώματος, αλλά θα μπορούσε επίσης να εξαρτάται και από άλλα στοιχεία, όπως

οι εξωκυττάρειες και κυτταροπλασματικές περιοχές ελεγχόμενης πρόσβασης/διέλευσης του υποστρώματος.



Εικόνα 3-20 Μετατρέποντας τον UapA σε μεταφορέα L-ασκορβικού οξέος. **Α.** Δέσμευση του L-ασκορβικού στον SVCT2. **Β.** Δέσμευση της ξανθίνης στα επάλληλα rSNBT1(ροζ) και UapA (γαλάζιο). **Γ.** Δοκιμασίες ανάπτυξης του A407S/Q408P με κατάλληλο θετικό (UapA⁺) και αρνητικό μάρτυρα (UapA⁻). **Δ.** In vivo υποκυτταρική έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του UapA-GFP και του μεταφορέα αγρίου τύπου (UapA⁺) σε μικροσκόπιο επιφθορισμού. (Kosti *et al.*, 2012)

3.2 Δομικές μελέτες στον μεταφορέα FcyB

Όπως είδαμε και πριν στον UapA, η συνήθης διαδικασία που ακολουθείται σε τέτοιου τύπου μελέτες είναι αρχικά η κατασκευή ενός μοντέλου ομολογίας. Ακολουθούν υπολογισμοί μοριακής δυναμικής με χρήση μορίων διαλύτη ή και λιπιδίων στην περίπτωση που έχουμε διαμεμβρανική πρωτεΐνη ώστε να διαπιστωθεί η σταθερότητα του μοντέλου. Αν το θεωρητικό μοντέλο δεν είναι σταθερό παρατηρούμε σταδιακή αποδόμηση της πρωτεΐνης. Εν συνεχεία πραγματοποιούνται υπολογισμοί πρόσδεσης με τα φυσιολογικά υποστρώματα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο τρόπος σύνδεσής τους στην πρωτεΐνη. Ως τελικό βήμα μπορεί να πραγματοποιηθεί μοριακή δυναμική της πρωτεΐνης με το υπόστρωμα να κινείται μέσα σε αυτή, υποδεικνύοντας την πορεία του από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα. Με τα αποτελέσματα αυτά ο ερευνητής είναι σε θέση να μελετήσει περαιτέρω τον μεταφορέα-στόχο με γενετικές μελέτες. Την προσέγγιση αυτή ακολουθήσαμε στην περίπτωση του μεταφορέα FcyB, όπου δεν υπήρχαν προγενέστερες μελέτες με μεταλλαγές.

3.2.1 Μοντέλο ομολογίας του FcyB

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (§1.4.2), η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή της οικογένειας NCS1/PRT είναι ο Mhp1 από το *Microbacterium liquefaciens*. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατασκευάστηκε μοντέλο ομολογίας του FcyB με ικρίωμα τη δομή του Mhp1.

3.2.1.1 Στοιχίση της πρωτοταγούς πρωτεϊνικής αλληλουχίας των Mhp1 και FcyB

Προκειμένου να είναι αξιόπιστη μία στοιχίση αλληλουχιών συχνά πραγματοποιείται αρχικά μία πολλαπλή στοιχίση η οποία περιλαμβάνει τις δύο πρωτεΐνες και 4-5 ακόμη αλληλουχίες από διαφορετικούς οργανισμούς με υψηλή ομολογία και ίδια λειτουργία, ώστε να υπάρχει μια ομαλή εξελικτική μετάβαση ανάμεσα στις πρωτεΐνες, και όχι εξελικτικά άλματα (Baxevanis & Quellerie, 2001). Η αμινοξική αλληλουχία κάθε πρωτεΐνης απαιτείται σε μορφή fasta για να αναγνωρίζεται από το εκάστοτε πρόγραμμα στοιχίσης. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Βήμα 1ο

Εύρεση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>). Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-12.

Βήμα 2ο

Στοιχίση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) με τις προϋπάρχουσες παραμέτρους του προγράμματος (Corpet, 1988). Στην Εικόνα 3-21 φαίνεται το αποτέλεσμα της στοιχίσης.

Πίνακας 3-12 Αλληλουχίες πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην πολλαπλή στοίχιση.

Όνομα πρωτεΐνης	Κωδικός UniProt	Οργανισμός	Λειτουργία
Mhp1	D6R8X8	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	Συμμεταφορέας υδαντοΐνης/ιόντος
FcyB	C8V329	<i>Aspergillus nidulans</i>	Συμμεταφορέας πουρινών-κυτοσίνης/H ⁺
AfFcyB	B1PXD1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Συμμεταφορέας πουρινών-κυτοσίνης/H ⁺
Fcy21p	C8Z766	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Συμμεταφορέας πουρινών-κυτοσίνης/H ⁺
Fcy2p	E7Q2W6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Συμμεταφορέας πουρινών-κυτοσίνης/H ⁺
FurD	A6N844	<i>Aspergillus nidulans</i>	Συμμεταφορέας ουρακίλης/H ⁺
Fur4p	C8Z415	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Συμμεταφορέας ουρακίλης/H ⁺
FurA	-*	<i>Aspergillus nidulans</i>	Συμμεταφορέας αλλαντοΐνης/H ⁺
Dal4p	E7KDZ2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Συμμεταφορέας αλλαντοΐνης/H ⁺
Fui1p	E7Q0S0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Συμμεταφορέας ουριδίνης/H ⁺
AtNcs1	Q9LZD0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Συμμεταφορέας αδενίνης-γουανίνης-ουρακίλης/H ⁺

*: Η πρωτεϊνική αλληλουχία μας δόθηκε από τους συγγραφείς

Εικόνα 3-19 Στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών του FcyB και ομολόγων γνωστής λειτουργίας της NCS1 οικογένειας. Τα διαμεμβρανικά τμήματα που προβλέπονται στον FcyB υποδεικνύονται με πολύχρωμους κυλίνδρους. Απόλυτα και υψηλά συντηρημένα αμινοξέα περικλείονται σε κόκκινα και μπλε κουτιά αντίστοιχα. Σημαντικά αμινοξέα για τη λειτουργία και την εξειδίκευση υποδεικνύονται με αστερίσκους: κόκκινους για κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα, μπλε για εκείνα που προσδέχουν και μεταφέρουν το υπόστρωμα και μαύρα για λοιπά σημαντικά αμινοξέα. (Kryotou *et al.*, 2012)

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

TMS 1a, TMS 1b, TMS 2

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

alpha-2-3, TMS 3, TMS 4, TMS 5

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

TMS 5, alpha-5-6, TMS 6, TMS 7

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

TMS 7, alpha-7-8, TMS 8, TMS 9

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

alpha-9-10, TMS 10a, TMS 10b, TMS 11, TMS 12

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

TMS 12

FcyB
Af_FcyB
Fcy21p
Fcy2p
Mhpl
furA
Fur4p
Dal4p
Fuilp
FurD
AtNcs1

Βήμα 3ο

Βελτιστοποίηση της στοίχισης Mhp1 – FcyB ώστε η τελική μορφή να χρησιμοποιηθεί για μοντελοποίηση του FcyB (Εικ. 3-22). Κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρέθηκαν κάποια κοινά κενά της στοίχισης των δύο αλληλουχιών και ελέγχθηκε η ορθή στοίχιση κάποιων συντηρημένων περιοχών, όπως είναι οι ασπαραγίνες στο TMS8.

```
Mhp1 10 RSLNPSNAPTRYAER-----SVGFSLAAIWFAMAIQVAIFIAAGQMTSS--FQVWQVIVVAIAAGCTIIVILLFETQSAAI 84
FcyB 44 QRFAAELNTEQRGIERVPAAEQTDTSVFNIGSMWLAANMVVSSSAIGVLGKSVVSLGFVDAILLTVLFFNLLGIMTVCSF-SCFG 126

Mhp1 85 RWGINFTVAARMFFGIRGSLIPTTKALLSLFFFGFQTLGALALDEITRLLTFTNLPLWTVIFGAIQVVTTFYGITFTIRWMN 168
FcyB 127 PFGRLQMVFSRLWFGWYVTKGFAVLNIIAQLGWSAANAIVGAQMLHAVNSDVPGFAA----ILHISICTLLVTFAGYKVVHLYE 206

Mhp1 169 VFASPVLAMGVYMYLMLDGAD-VSLGEVMSMGGENPGMPFSTALMIFVGGWIAVVVSIHDIVK--ECKVDPNASREGQTKAD 249
FcyB 207 YWSWIPTFIVFMIILGTFAHSGDFQNLPMGVGTSEMGVLSFGSAVYGFATGWTSYAADYTVYQPANRSKRKIFLSTWLGILV 290

Mhp1 250 ARYATAQWLGMVPASTIFCFEFIGAASMLVCEWNPVLAITEVVGVSIPMAILEQVFLVLLATWSTNPAANLISPAYT-LCSTF-- 330
FcyB 291 LLFVEMLGVAVMTATDCKSKYDVGYS-NGGLIAAVLQPLG-----GFGDECLVILALSIVANNCENFYSVALTVQVLSRYA 369

Mhp1 331 ---PRVFTFKTGVIVSAVVGLLMPWQFAGVINTFNLILASALGPLAGIMISDYFLVRRRISLHDLYRTKGIYTYWRGVNWNVA 411
FcyB 370 QRVPRFIWTLFGTGVSLAIAIPGYS-HFETVLENFMFIAYWLAIYSAIATMDHFVFKR---GFSGYVVENFDKREKLPVGIAA 449

Mhp1 412 LAVYAVALAVSFLTPDLMFVTGLIAALLLHIPAMRWVAKTFPLFSEAESRNEDYLRPIGP 471
FcyB 450 TIAFGFGVAGMITGMSQPWYVGPIDARHAAGGDVGFELGFAPAAEFSYLCLRPFE-IKFFGR 508
```

Εικόνα 3-20 Στοίχιση των μεταφορέων Mhp1 (ικρίωμα) και FcyB. Τα απόλυτα και υψηλά συντηρημένα αμινοξέα είναι γραμμοσκιασμένα με μαύρο και γκρι αντίστοιχα. Σε κόκκινο πλαίσιο επισημαίνεται η συντηρημένη αλληλουχία του TMS8.

3.2.1.2 Κατασκευή και επαλήθευση του μοντέλου ομολογίας του FcyB

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, ο Mhp1 έχει κρυσταλλωθεί σε τρεις διαμορφώσεις: α) περιπλαστικά ανοιχτή χωρίς υπόστρωμα (PDB ID: 2JLN), β) περιπλαστικά κλειστή με υπόστρωμα (PDB ID: 2JLO) και γ) κυτταροπλασματικά ανοιχτή χωρίς υπόστρωμα (PDB ID: 2X79) (Εικ. 1-17). Σε πρώτη φάση επιλέχθηκε η περιπλαστικά κλειστή διαμόρφωση με υπόστρωμα ως ικρίωμα για την κατασκευή μοντέλου ομολογίας του FcyB. Η διαμόρφωση αυτή θεωρήθηκε καταλληλότερη και για μετέπειτα μοντέλα αλληλεπίδρασης του FcyB με τα φυσιολογικά του υποστρώματα μέσω υπολογισμών πρόσδεσης (docking calculations), καθώς ήταν ήδη με προσδεμένο το υπόστρωμα της βενζυλο-υδαντοΐνης στον Mhp1.

Για την κατασκευή του μοντέλου ομολογίας χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Modeller 9v8 (βλ. §2.4.1). Εν συνεχεία εφαρμόστηκε η συνήθης διαδικασία βελτιστοποίησης των βρόχων (loop refinement) και ένα πρωτόκολλο προσομοίωσης ανόπτησης (simulated annealing protocol) για τη βελτιστοποίηση ολόκληρου του μοντέλου. Από τις 100 προκύπτουσες δομές, ακολούθησε επεξεργασία της δομής με την υψηλότερη βαθμολογία χωρικών περιορισμών (spatial restraints score) με μοριακή δυναμική για 18 ns χρησιμοποιώντας το λογισμικό Desmond (βλ. §2.3 – Εικ.

3-3). Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι συντεταγμένες των λιπιδίων της μεμβράνης του Mhp1 (προκαρυωτικό σύστημα), όπως έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων OPM (Orientations of Proteins in Membranes database - <http://opm.phar.umich.edu/>), και στη θέση αυτών τοποθετήθηκαν ευκαρυωτικά λιπίδια, ώστε να προσομοιωθεί η παρουσία του FcyB στην πλασματική μεμβράνη. Κατά την εκτέλεση του προγράμματος χρησιμοποιήθηκαν οι προϋπάρχουσες ρυθμίσεις με τις εξής διαφοροποιήσεις:

- Ενυδάτωση (Solvation)
 - Solvent Model: Predefined TIP4P
 - Membrane model: POPC
 - Box shape: Orthorombic
 - Box size calculator: Buffer
 - Distances a: 10.0 Å b: 10.0 Å c: 10.0 Å
- Ιόντα (Ions)
 - Ion placement: Neutralize (Cl⁻)
 - Add salt
 - Salt concentration: 0.15 M

Δεδομένου ότι η τετραγωνική ρίζα απόκλισης των ανθράκων των διαμεμβρανικών τμημάτων δεν υπερέβη την απόσταση των 3Å από τις αρχικές συντεταγμένες, η διαδικασία αυτή υπέδειξε τη σταθερότητα του θεωρητικού μοντέλου.

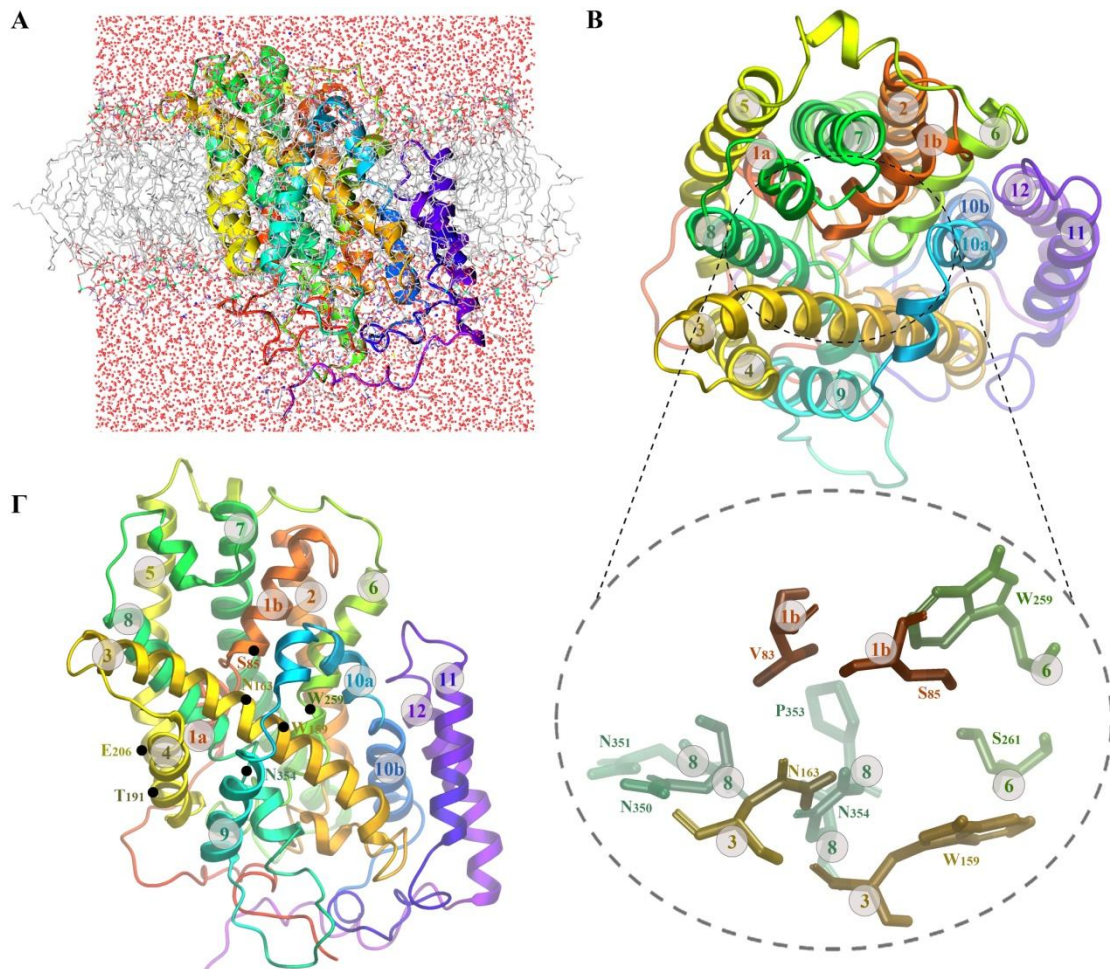
Η συνολική τρισδιάστατη δομή του μοντέλου FcyB (Εικ. 3-24) αντιστοιχεί σε ένα εξωστρεφές διαμορφομερές με 12 διαμεμβρανικά τμήματα με προεξέχουσα δευτεροταγή δομή αυτή της α-έλικας. Η αρχιτεκτονική του μεταφορέα τον διαιρεί σε δύο διακριτούς τομείς, ένα συμπαγή πυρήνα που αποτελείται από τα τμήματα TMS1-10 και στην καρβοξυ-τελική περιοχή των TMS11-12 (Εικόνα 3-23, Πίν. 3-13). Οι διαμεμβρανικές έλικες στον πυρήνα συνδέονται με σχετικά μικρούς βρόχους (14 αμινοξικών καταλοίπων), ενώ ο βρόχος που χωρίζει τον πυρήνα και τα TMS11-12 είναι μακρύτερος (23 κατάλοιπα). Η κατανομή των ιονισμένων καταλοίπων στην επιφάνεια του μεταφορέα είναι δικαιολογημένη, δεδομένου ότι τα περισσότερα από αυτά είναι τοποθετημένα είτε στις κυτταροπλασματικές και περιπλασματικές επιφάνειες ή κατά μήκος του πόρου στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Τα θετικά φορτία συγκεντρώνονται κυρίως στους κυτταροπλασματικούς βρόχους, φαινόμενο που έχει

παρατηρηθεί και σε άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (positive inside rule - Andersson & von Heijne, 1994). Ο πυρήνας του FcyB υποδιαιρείται σε δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις αποτελούμενες από τα διαμεμβρανικά τμήματα 1-5 και 6-10, διατεταγμένα σε έναν δυσδιάστατο ψευδοσυμμετρικό άξονα, παράλληλο με το επίπεδο της μεμβράνης. Οι δύο επαναλαμβανόμενες μονάδες είναι περιπεπλεγμένες κατά τέτοιο τρόπο, ώστε σχηματίζουν δύο διακριτές τοπολογικά περιοχές που απαρτίζονται από τα διαμεμβρανικά τμήματα 1, 2, 6, και 7 και τα 3, 4, 8, και 9, αντιστοίχως, που συνδέονται με τις έλικες 5 και 10. Η θέση σύνδεσης του υποστρώματος βρίσκεται στο χώρο μεταξύ των δύο υποτομών του πυρήνα (Εικ. 3-23B και §3.2.2 – Εικ. 3-24).

Πίνακας 3-7 Προβλεπόμενα διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας στο μοντέλο του FcyB.

Διαμεμβρανικό τμήμα	Αριθμός και είδος αμινοξέων
TMS 1a	V70 – N81
TMS 1b	V84 – S95
TMS 2	F101 – G126
α 2-3	Q132 – F135
TMS 3	T145 – S176
TMS 4	I184 – F196
TMS 5	Y199 – H226
α 5-6	I233 – G236
TMS 6	F248 – T267
TMS 7	S282 – S319
α 7-8	L324 – L329
TMS 8	D337 – V362
TMS 9	T378 – A389
α 9-10	S394 – V399
TMS 10a	M404 – Y409
TMS 10b	A412 – F423
TMS 11	I447 – T462
TMS 12	G471 – A489

α: μικρά τμήματα α-έλικας ανάμεσα σε μεγάλα διαμεμβρανικά τμήματα

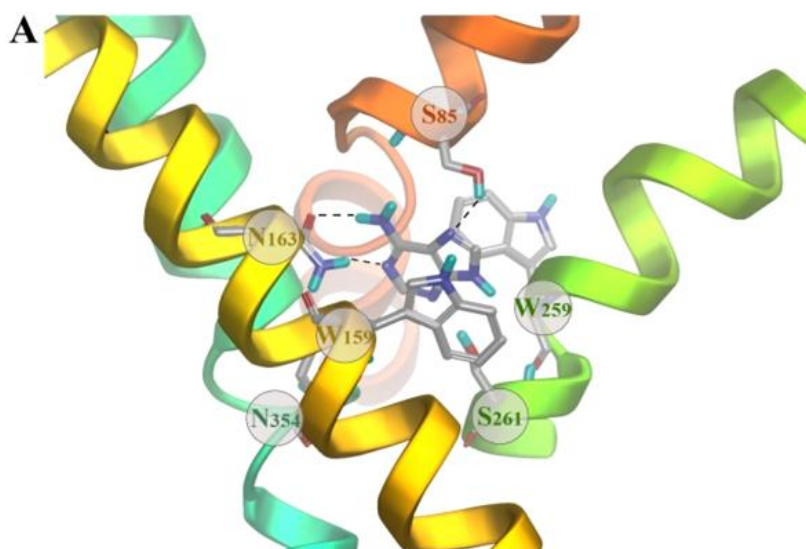


Εικόνα 3-21 Δομικό μοντέλο του Fc γ B. **A.** Μοντελοποιημένη τρισδιάστατη δομή του Fc γ B με μοριακή δυναμική στο λογισμικό Desmond. **B.** Κάτοψη του μοντέλου Fc γ B όπου ο πυρήνας των πρώτων 10 TMSs διακρίνεται σαφώς από τα δύο τελευταία TMSs 11 και 12, τα οποία πιθανώς δεν επηρεάζουν τη μεταφορά. Ο πυρήνας μπορεί επίσης να διακριθεί σε δύο υποτομείς, ο πρώτος απαρτίζεται από τα TMSs 1, 2, 6, και 7 και ο δεύτερος από τα TMSs 3, 4, 8, και 9, συνδεδεμένοι με τις εύκαμπτες έλικες TMS5 και TMS10. Η θέση δέσμευσης του υποστρώματος βρίσκεται στο χώρο μεταξύ των δύο υποτομέων του πυρήνα. Στην κοντινή όψη, παρουσιάζεται η τοπολογία των κρίσιμων καταλοίπων για τη λειτουργία της θέσης δάσμευσης του υποστρώματος: Ser-85, Trp-159, Asn-163, Trp-259, Asn-350, Asn-351, Pro-353, και Asn-354. **Γ.** Πρόσωση της δομής του Fc γ B όπου φαίνεται η τοπολογία των καταλοίπων Ser-85, Trp-159, Asn-163, Trp-259, και η Asn-354, που εμπλέκονται σε άμεσες αλληλεπιδράσεις με υποστρώματα, καθώς επίσης και τα κατάλοιπα Thr-191 και Glu-206. Τα TMS επισημαίνονται με χρώματα όπως στην Εικόνα 3-2. (Kryotou *et al.*, 2012)

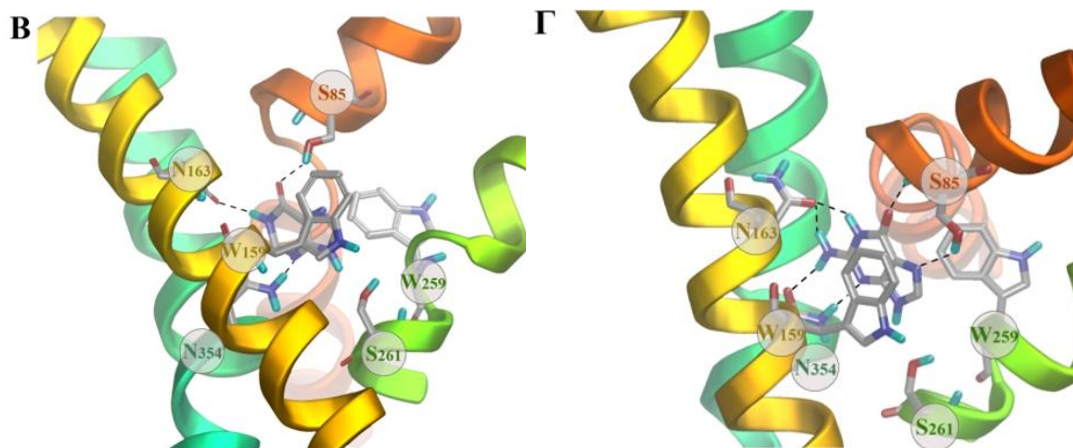
3.2.2 Δέσμευση του υποστρώματος – Υπολογισμοί πρόσδεσης

Χρησιμοποιώντας το μοντέλο του Fc γ B, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking calculations) προκειμένου να διερευνηθεί η θέση δέσμευσης των υποστρωμάτων στον μεταφορέα και ο τρόπος σύνδεσής τους με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων αυτού. Τα τέσσερα κύρια φυσιολογικά υποστρώματα, δηλαδή η υποξανθίνη, η αδενίνη, η γουανίνη, και η κυτοσίνη, καθώς και το αντιμυκητιακό 5-φθορο-κυτοσίνη (5-FC) (Πίν. 3-15) χρησιμοποιήθηκαν για υπολογισμούς πρόσδεσης στην μοντελοποιημένη δομή του Fc γ B.

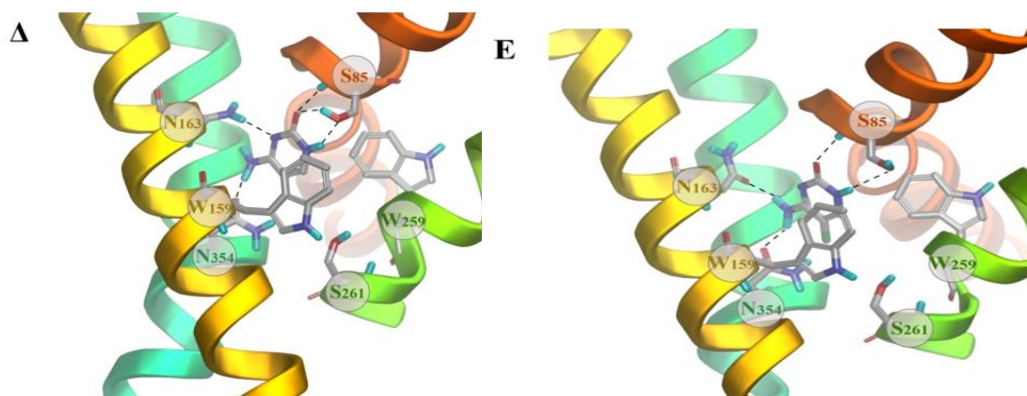
Επειδή το μοντέλο του FcyB είναι ένα θεωρητικά υπολογισμένο μοντέλο, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης με χρήση ενός νέου αλγορίθμου που ονομάζεται Induced Fit Docking (IFD)(βλ. §2.4.4.1) που εκμεταλλεύεται τον αλγόριθμο Glide σε συνδυασμό με το Prime. Επειδή το Prime είναι ένα εργαλείο μοντελοποίησης εξειδικευμένο στη βελτίωση των πρωτεϊνικών δομών που προέρχονται από ομολογία, ως μέρος του IFD πρωτοκόλλου θεωρήθηκε χρήσιμο στην περίπτωση του μεταφορέα FcyB. Κατά τη διαδικασία αυτή, η δομή του μοντέλου του FcyB διατάχθηκε επάλληλα με την κρυσταλλογραφία του Mhr1 (PDB code: 2JLO) και με τα φυσιολογικά υποστρώματα του πρώτου με τη θέση όπου κρυσταλλώθηκε η βενζυλο-υδαντοΐνη. Αυτές οι συντεταγμένες πρωτεΐνης (FcyB) – υποστρώματος (αδενίνη/υποξανθίνη/γουανίνη/κυτοσίνη/5-FC) χρησιμοποιήθηκαν ως “αρχική θέση” για τους μετέπειτα υπολογισμούς. Ο βέλτιστος προσανατολισμός για κάθε υπόστρωμα επιλέχθηκε τελικά βάσει της χαμηλότερης ενέργειας, του αριθμού των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, καθώς και της οπτικής επιθεώρησης (Εικ. 3-24, Πίν. 3-14).



Ο FcyB αλληλεπιδρά με την αδενίνη μέσω ενός διπλού δεσμού H που σχηματίζεται μεταξύ της N163 και τις θέσεις C₆-NH₂ και N₁ της πουρίνης, ένα δεσμό H μεταξύ της Ser-85 και της θέσης N7 της πουρίνης, και με π – π υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του δακτυλίου της πουρίνης μεταξύ των δακτυλίων της ινδόλης των Trp-159 και Trp-259 (Εικ. 3-24_A, Πίν. 3-14).



Ο FcyB αλληλεπιδρά με τις υποξανθίνη και γουανίνη, μέσω της δημιουργίας τριών δεσμών H μεταξύ της N163 και του N₁-H, μεταξύ της Ser-85 και του C₂=O₂ και μεταξύ της N354 και N₃, καθώς και με π – π υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του δακτυλίου της πουρίνης με τις Trp-159 και Trp-259 (Εικ. 3-24_B και Γ, Πίν. 3-14).



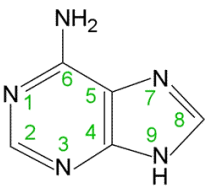
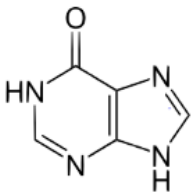
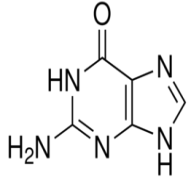
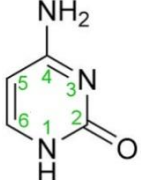
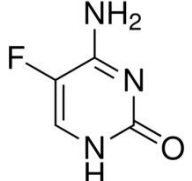
Εικόνα 3-22 Υπολογισμοί πρόσδεσης υποστρώματος στον FcyB. Α. Αδενίνη, Β. Υποξανθίνη, Γ. Γουανίνη, Δ. Κυτοσίνη, Ε. 5-φθορο-Κυτοσίνη. (Krypotou *et al.*, 2012)

Τέλος, ο FcyB αλληλεπιδρά με την κυτοσίνη και το τοξικό ανάλογο της 5-FC σχηματίζοντας τρεις H δεσμούς μεταξύ της N163 και του N3 της πυριμιδίνης, μεταξύ της N354 και του C₄-NH₂, και μεταξύ των S85 με N₁ και C₂=O₂ καθώς και με π – π υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις W159 και W259 (Εικ. 3-23Δ & Ε, Πίν. 3-15).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η N163 και τα δύο απόλυτα συντηρημένα κατάλοιπα τρυπτοφάνης, W159 και W259, αλληλεπιδρούν με παρόμοιες θέσεις των δακτυλίων όλων των πουρινών και της κυτοσίνης, ενώ οι αλληλεπιδράσεις που εμπλέκουν τα κατάλοιπα S85 και N354 διαφέρουν ανάλογα με το υπόστρωμα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από βιολογικά πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (της Υ.Δ. Αιμιλίας Κρυπωτού – Krypotou *et al.*, 2012). Επιπλέον, το μοντέλο και η ανάλυση των υπολογισμών πρόσδεσης έδειξε ότι δύο γειτονικά κατάλοιπα, τα N350 και N351, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την

N354 με έναν τρόπο που πιθανώς χτίζει μια αναγκαία “αρχιτεκτονική” για τη δέσμευση του υποστρώματος. Τέλος, στα μοντέλα δέσμευσης των πουρινών, η S261 ήταν επίσης σε απόσταση δεσμού H είτε από τη θέση N₃ (αδενίνη) ή από τη θέση N₉-H (υποξανθίνη, γουανίνη). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, ανάλυση μεταλλάξεων δεν υποστηρίζουν την εμπλοκή της S261 στην απευθείας συνδέση με το υπόστρωμα (βλ. §4.2).

Πίνακας 3-8 Αλληλεπιδράσεις των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων της πρωτεΐνης με τις θέσεις του δακτυλίου των υποστρωμάτων. Για τους παρόντες υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν ταυτομερή της αδενίνης, της υποξανθίνης και της γουανίνης με -H στη θέση 9, και όχι στην 7.

Υπόστρωμα	Θέση δακτυλίου – Αμινοξύ αλληλεπίδρασης (πλευρική ομάδα)	Ανάπτυγμα υποστρώματος
Αδενίνη	N ₁ -H – N163 C ₆ -NH ₂ – N163 N ₇ – S85	
Υποξανθίνη	N ₁ -H – N163 N ₃ – N354 C ₆ =O – S85	
Γουανίνη	N ₁ -H – N163 N ₃ – N354 N ₇ – S85	
Κυτοσίνη	N ₁ -H – S85 C ₂ =O – S85 N ₃ – N163 C ₄ -NH ₂ – N354	
5-FC	N ₁ -H – S85 C ₄ -NH ₂ – N163 N354	

Κεφάλαιο 4ο

Συμπεράσματα - Προοπτικές

4.1 Δομή και λειτουργία του μεταφορέα UapA

Η παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσίασε ένα θεωρητικό μοντέλο ομολογίας του UapA, το οποίο αποκαλύπτει μια σειρά από σημαντικές πτυχές σχετικά με το πώς αυτός ο μεταφορέας επιλέγει και μεταφέρει τα υποστρώματα του. Τα αποτελέσματα από τις διαφορετικές μεθοδολογίες υπολογισμών πρόσδεσης ήταν σύμφωνα με τα αποτελέσματα του SAR, και ως εκ τούτου προτάθηκε ένα εξαιρετικά συνεπές μοντέλο για την αναγνώριση του υποστρώματος από τον UapA. Προφανώς όλα τα δομικά μοντέλα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με μεγάλη προσοχή, όταν χρησιμοποιούνται για να προβούμε σε εικασίες σχετικά με τη λειτουργία. Ωστόσο, ο UapA είναι μια εξέχουσα περίπτωση, καθώς είναι διαθέσιμες πληθώρα μεταλλαγών, συμπεριλαμβανομένου τυχαία επιλεγμένων μεταλλαγών, και έχουν χρησιμοποιηθεί για να κατανοήσουμε τη λειτουργία χωρίς να γνωρίζουμε τη δομή του μεταφορέα. Προς μεγάλη ικανοποίηση, τα προηγούμενα και τα παρόντα γενετικά και βιοχημικά δεδομένα υποστηρίζουν πλήρως τα δομικά στοιχεία που προτείνονται, γεγονός που επιτρέπει τη δημιουργία εικασιών, βάσει πειραματικών δεδομένων.

Επιπλέον, οι προσεγγίσεις υπολογισμών πρόσδεσης δεν ήρθαν μόνο σε εξαιρετική συμφωνία με το *in vivo* προφίλ εξειδίκευσης του UapA, αλλά επίσης παρείχαν μια λογική εξήγηση για τη διαφορά στην εξειδίκευση του υποστρώματος μεταξύ των ομολόγων του αρουραίου και του ανθρώπου της οικογένειας NAT, καθώς ο πρώτος είναι εξειδικευμένος για νουκλεοτιδικές βάσεις και ο τελευταίος για L-ασκορβικό οξύ.

Το παρόν έργο ενισχύει την νέα έννοια της ύπαρξης των δυναμικών πυλών ή μοριακών φίλτρων εκλεκτικότητας σε συγκεκριμένες οικογένειες μεταφορέων (Diallinas & Gournas, 2008; Naftalin, 2010; Conde *et al.*, 2010). Η ύπαρξη φίλτρων ή πυλών μπορεί εύκολα να συμβαδίσει με τον γενικά αποδεκτό μηχανισμό εναλλασόμενων διαμορφώσεων στους μεταφορείς (Smirnova *et al.*, 2011). Η ελεγχόμενη διέλευση, η οποία εισάγει τα κλειστά και ανοικτά ενδιάμεσα στις προς τα έξω και προς τα έσω στραμμένες διαμορφώσεις, μπορεί να έχει εξελιχθεί για να προσθέτει επιπλέον εξειδίκευση ή για την πρόληψη της διαρροής υποστρωμάτων προς τη λάθος κατεύθυνση (Diallinas, 2008).

4.1.1 Δομή του UraA – Σύγκριση με το μοντέλο του UarA

Ο μεταφορέας UraA δομικά φαίνεται να χωρίζεται σε δύο μέρη, τον “πυρήνα”, που αποτελείται από τα TMS1-4 και 8-11, και την “πύλη” που αποτελείται από τα υπόλοιπα. Οι περιοχές δηλαδή ανεστραμμένης συμμετρίας που εμφανίζει ο μεταφορέας (TMS1-7 και TMS8-14) δεν έχουν διακριτή λειτουργία, αλλά τα όμοια μεταξύ τους διαμεμβρανικά τμήματα αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν δύο διακριτές δομές. Ο πυρήνας του μεταφορέα βρίσκεται στο κέντρο της δομής και σχηματίζει το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος, καθώς και το κύριο τμήμα του υδάτινου πόρου. Το τμήμα με λειτουργία πύλης, όπως ακριβώς είχε προταθεί να υπάρχει στον UarA (Parageorgiou *et al.* 2008β, Kostis *et al.* 2010), βρίσκεται περιφερειακά της δομής του πυρήνα ελέγχοντας την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο. Αυτό δεν διακρίνεται καλά στην υπάρχουσα κρυσταλλωμένη δομή, μιας και ο UraA κρυσταλλώθηκε σε μια άκαμπτη κυτταροπλασματικά ανοιχτή διαμόρφωση. Κάποια όμως από τα αμινοξικά κατάλοιπα της δομής της πύλης βρίσκονται αρκετά κοντά, και σε κάποια άλλη διαμόρφωση φαίνεται πως θα μπορούσαν να είναι ακόμη πιο κοντά στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος.

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική ανάλυση των μέχρι στιγμής γνώσεων στις σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT με τη δομή του UraA. Τα επιπλέον TMS που φαίνεται να έχει ο UraA, και μάλλον όλοι οι NAT, οφείλονται σε δύο λόγους. Αφενός, η προηγουμένως θεωρούμενη αμφιπαθικής φύσεως α-έλικα μεταξύ των TMS8 και 9 που είχε προταθεί πως μπορεί να λειτουργεί ως έλικα εισόδου-εξόδου (reentrant loop) από την λιπιδική διπλοστιβάδα, είναι διαμεμβρανικό τμήμα, το ένατο του UraA. Αφετέρου, η αλληλουχία-μοτίβο των NAT, για την οποία υπήρχαν δεδομένα από NMR πως σχηματίζει μια β-στροφή μεταξύ των N408 και Q409 (Ε. Μικρός και Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα), φαίνεται στον UraA να είναι διαμεμβρανική α-έλικα (το TMS10 του UraA), αμέσως μετά την β-πτυχωτή επιφάνεια. Η παρουσία μιας γλυκίνης στη συγκεκριμένη περιοχή στον UraA είναι πιθανό να προκαλεί τη β-πτυχωτή επιφάνεια νωρίτερα. Άλλωστε, δεδομένα από ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε κυστεΐνες και μελέτες της προσβασιμότητάς τους στον XanQ έδειξαν πως προς το τέλος της NAT αλληλουχίας πρέπει να σχηματίζεται α-έλικα, ενώ στη δομή του UraA η περιοχή αυτή αποτελεί θηλιά μεταξύ των TMS10 και 11. Ίσως η διαφορά στην εξειδίκευση του UraA να σχετίζεται με αυτές τις μικρές διαφορές.

Το πλέον εντυπωσιακό συμπέρασμα είναι πως το Glu290 του UraA, που αποτελεί μέρος της αλληλουχίας NAT, φαίνεται να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το υπόστρωμα (Εικ. 1-30B). Το Glu290 είναι αντίστοιχο των Gln408 του UapA και Gln324 του XanQ που έχουν προταθεί να δεσμεύουν το υπόστρωμα των μεταφορέων αυτών. Μάλιστα η Gln408 του UapA έχει προταθεί να αλληλεπιδρά με τη θέση N₉ του πουρινικού δακτυλίου της ξανθίνης. Υποκατάσταση του Glu290 του UraA με Ala οδηγεί επίσης σε απώλεια λειτουργίας. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως η απόλυτα συντηρημένη στους NAT Asn (409 στον UapA, 325 στον YgfO και 291 στον UraA) βρίσκεται πολύ κοντά στο κέντρο δέσμευσης και αλληλεπιδρά με την επίσης απόλυτα συντηρημένη ιστιδίνη του QH μοτίβου του TMS1. Η ασπαραγίνη αυτή είχε προταθεί να συμμετέχει σε δυναμικές αλληλεπιδράσεις κατά την ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς των UapA και XanQ (Koukaki *et al.*, 2005, Georgoroulou *et al.*, 2010). Επίσης, πολλά αμινοξικά κατάλοιπα που είχαν δειχθεί να επηρεάζουν την πρόσβαση των υποστρωμάτων στο κέντρο δέσμευσης του UapA, όπως οι Thr526, Phe528 και Ala463 συμμετέχουν στη δομή της πύλης του UraA. Μάλιστα το αντίστοιχο της Thr526 (Asn430 του XanQ) θα μπορούσε να βρίσκεται πολύ κοντά στο κέντρο δέσμευσης σε μια άλλη διαμόρφωση του μεταφορέα, όπως ακριβώς είχε προταθεί για την N430 του XanQ. Επιπλέον, η Ala463 βρίσκεται δίπλα στο αντίστοιχο της Phe342 του UraA, η οποία αλληλεπιδρά με δυνάμεις Van der Waals με το υπόστρωμα. Τον ίδιο ρόλο έχει και η Y406, η οποία είχε απομονωθεί με την ίδια γενετική επιλογή (Kosti *et al.*, 2010).

Ένα επιπλέον στοιχείο που προκύπτει είναι πως το απόλυτα συντηρημένο γλουταμικό της θέσης 356 του UapA (241 του UraA, 272 του XanQ) είναι το δεύτερο κατάλοιπο που δεσμεύει το υπόστρωμα, σχηματίζοντας άμεσα δεσμό υδρογόνου με αυτό. Μάλιστα στη δομή του UraA φαίνεται να βρίσκεται αντιδιαμετρικά του Glu290 (Q408 του UapA), γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την ανικανότητα αποδοτικής μεταφοράς που εμφανίζει το E356D αλληλίο, αφού η απόσταση μεταξύ των δύο καταλοίπων αυξάνεται. Οι συγγραφείς επίσης προτείνουν πως το συγκεκριμένο κατάλοιπο πιθανώς να συμμετέχει και στη δέσμευση και μεταφορά του πρωτονίου. Αν και δεν μπορεί να αποκλεισθεί, δεν έχει παρατηρηθεί κάτι τέτοιο σε άλλους μεταφορείς. Πάντως ένας πιθανός ρόλος του συγκεκριμένου καταλοίπου στη δέσμευση του πρωτονίου δεν είναι ασύμβατος με τα δεδομένα της συγκεκριμένης διατριβής και μένει να ερευνηθεί περαιτέρω πειραματικά.

4.1.2 Γενετικά πειράματα επιβεβαιώνουν το μοντέλο του UarA

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή κατασκευάστηκε το μοντέλο του UarA και προτάθηκε ένας μηχανισμός πρόσδεσης της ξανθίνης στο κέντρο δέσμευσής του. Φαίνεται ότι τα κρίσιμα κατάλοιπα που προτάθηκαν για τη δέσμευση του υποστρώματος και τη μεταφορά του έρχονται σε συμφωνία με τα ήδη υπάρχοντα γενετικά και βιοχημικά δεδομένα.

Όλα τα κατάλοιπα που χαρακτηρίστηκαν ως κρίσιμα για τη λειτουργία του UarA εντοπίζονται στα TMSs 1, 3, 8 και 10 της περιοχής του πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, το χαρακτηριστικό NAT μοτίβο (Q/E/P)NXG-4X-T (⁴⁰⁸QNNG⁴¹¹-4X-⁴¹⁶T στον UarA), το οποίο έχει προταθεί από λειτουργικές μελέτες να είναι ένα ουσιαστικό στοιχείο για την αναγνώριση και τη μεταφορά του υποστρώματος, βρίσκεται στο TMS10, μια μικρή έλικα εννέα καταλοίπων απέναντι από το TMS8, στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο περιοχών της πρωτεΐνης (Εικ. 3-7Γ). Η σημασία του NAT μοτίβου είναι διπλή. Πρώτον, το Q408 εμπλέκεται άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος, όπως έντονα έχει προταθεί από λειτουργικές μελέτες, από τη στοίχισή της με το E290 το οποίο στον UraA είναι ένα κατάλοιπο αλληλεπιδρών με το υπόστρωμα, καθώς και από υπολογισμούς πρόσδεσης που διεξήχθησαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή (βλ. §3.1.2). Δεύτερον, τα N409, N410 και T416 φαίνεται να εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της εσωτερικής τριτοταγούς δομής πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το μοντέλο, ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των N409, H86, Q85 και T416 διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση των TMS1 και TMS10, που ανήκουν και οι δύο στην περιοχή του πυρήνα (Εικ. 3-7Γ & Δ). Πειραματική υποστήριξη για τις δυναμικές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των καταλοίπων προέρχεται από το γεγονός ότι η υποκατάσταση οποιουδήποτε από τα τέσσερα κατάλοιπα προσδίδει κρυοευαισθησία στη μεταφορική ικανότητα του UarA. Επιπλέον, οι περισσότερες υποκαταστάσεις αυτών των καταλοίπων οδηγούν σε δραματική μείωση της V_m , αλλά δεν επηρεάζουν τις τιμές K_m ή τον τοποθέτηση του UarA στην πλασματική μεμβράνη (Koukaki *et al.*, 2005; Pantazopoulou & Diallinas, 2006). Ένα παρόμοιο δίκτυο αποτελείται από τις πλευρικές αλυσίδες των N410, T405 και D360, πιθανώς ενισχύοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των TMS8 και TMS10, τα οποία επίσης ανήκουν στην περιοχή του πυρήνα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, το μοντέλο του UarA αποκάλυψε πιθανές σημαντικές αλληλεπιδράσεις του TMS1 με τα TMS3 και TMS10. Η σημασία του TMS3 (κατάλοιπα F155 και S154) και η αλληλεπίδρασή του

με το TMS1 υποστηρίζεται γενετικά από λειτουργικές μελέτες των σχετικών μεταλλάξεων και με μεταλλαγές δεύτερης θέσης της μεταλλαγής H86D (TMS1), οι οποίες βρίσκονται στο M151 (TMS3) (Amillis *et al.*, 2011). Τέλος, το κατάλοιπο E356 του UarA, για το οποίο προηγούμενες λειτουργικές μελέτες (Parageorgiou *et al.*, 2008) και υπολογισμοί πρόσδεσης (βλ. §3.1.2) δείχνουν ότι είναι το δεύτερο σημαντικότερο κατάλοιπο που αλληλεπιδρά άμεσα με την ξανθίνη, συνάδει απόλυτα με το E241 στη δομή του UraA, ένα κατάλοιπο που εμφανίζεται να αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει μία ακόμη δομή μοντέλου ομολογίας για την περμεάση XanQ στην *E. coli*, η οποία έχει επίσης δείξει ότι οι λειτουργικές μεταλλάξεις χαστογραφούνται στα TMS1, TMS3, TMS8 και TMS10 (Karena & Frilligos, 2011). Έτσι, λειτουργικές μελέτες σε δύο εξελικτικά πολύ μακρινούς ομόλογους μεταφορείς, όπως ο UarA και ο XanQ, επιβεβαιώνουν τις λεπτομέρειες της κρυσταλλικής δομής του UraA και τις μοντελοποιημένες δομές των ίδιων, ιδίως σε ό, τι αφορά τη θέση σύνδεσης υποστρώματος.

Είναι ενδιαφέρον ότι στον UarA στοιχεία διακριτά από τη θέση δέσμησης, τα οποία εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (TMS12-TMS14) και στον βρόχο TMS1-2, έδειξαν να ελέγχουν εξειδίκευσή του ως προς το μεταφερόμενο υπόστρωμα, στηρίζοντας έτσι τη ιδέα ότι τα μέλη της οικογένειας NAT αποτελούνται από δύο τοπολογικά και λειτουργικά διακριτές δομικές διαμορφώσεις, του πυρήνα και της ελεγχόμενης πρόσβασης, όπως αυτό προτάθηκε για τη δομή UraA (Lu *et al.*, 2011). Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε τη βάση της πεποίθησης ότι οι μεταλλαγές εξειδίκευσης προσδιορίζουν διακριτά “φίλτρα εκλεκτικότητας” ή δυναμικές “πύλες” που επιτρέπουν ή περιορίζουν την πρόσβαση των υποστρωμάτων στην πραγματική θέση δέσμησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο UarA έχει σημαντικές δομικές διαφορές με τους XanQ και UraA στις περιοχές ελεγχόμενης πρόσβασης, η οποία αντικατοπτρίζεται σε γενετικές και λειτουργικές διαφορές [Parageorgiou *et al.*, 2008β; Vlanti *et al.*, 2006; Papakostas *et al.*, 2008]. Αυτό φαίνεται και από μεταλλάξεις στο TMS14 που αφορούν τα κατάλοιπα T526 και F528 στον UarA, και αντιστοιχούν στα N430 και I432 στον XanQ. Ειδικότερα, ενώ μεταλλαγές στα T526 και F528 διευρύνουν δραματικά την εξειδίκευση του UarA, οι ανάλογες μεταλλάξεις στον XanQ επηρεάζουν κυρίως την κινητική μεταφοράς σε σχέση με το φυσιολογικό υπόστρωμά του, την ξανθίνη, και πολύ λιγότερο την εξειδίκευση για ανάλογα ξανθίνης με ογκώδη αντικαταστάσεις. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ο UarA έχει αποκτήσει μια πιο ευέλικτη περιοχή ελεγχόμενης

διέλευσης, μια υπόθεση που έρχεται σε συμφωνία με τα σημαντικά μεγαλύτερα TMS13-TMS14 του UapA σε σχέση με τον XanQ.

4.1.3 Λειτουργικές μελέτες επιβεβαιώνουν τον τρόπο σύνδεσης UapA – ξανθίνης

Με τους υπολογισμούς πρόσδεσης που πραγματοποιήθηκαν για την ξανθίνη καθώς και τη δημιουργία μοντέλων ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης (QSAR), στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής προτάθηκε ένας πιθανός τρόπος με τον οποίο η ξανθίνη δεσμεύεται στον UapA. Αυτό το μοντέλο αλληλεπίδρασης θα μπορούσε να εξηγήσει πολύ ικανοποιητικά το προφίλ εξειδίκευση υποστρώματος του UapA. Η 3-μεθυλοξανθίνη (3MX), η οποία είναι ένα πολύ καλό πρόσδεμα, τοποθετείται πολύ παρόμοια με την ξανθίνη (XAN) (Εικ. 3-7Α). Η ομάδα μεθυλίου της έχει τοποθετηθεί κοντά στην ομάδα φαινυλίου του F155 που σχηματίζοντας ασθενείς αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Η 8-μεθυλοξανθίνη (8MX) είναι ένα μέτριο πρόσδεμα, καθώς παρεμποδίζεται στερεοχημικά από την ομάδα μεθυλίου της πλευρικής αλυσίδας του T404 και την καρβοξυλομάδα του E356, μειώνοντας την συγγένεια σύνδεσης της σε σύγκριση με την ξανθίνη. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του N7-H της 8MX και του COOH του E356 εξακολουθεί να υφίσταται, αλλά είναι ασθενέστερος (Εικ. 3-7B). Η 9-μεθυλοξανθίνη (9MX) (Εικ. 3-7Γ) παρουσιάζει επίσης μέτρια συγγένεια δέσμευσης, καθώς η ομάδα του μεθυλίου της τοποθετείται κοντά στην αμινομάδα του σκελετού της F155, διαταράσσοντας τον N9-NH_{F155} δεσμό υδρογόνου. Η 1-μεθυλοξανθίνη (1MX), η οποία δεν είναι πρόσδεμα, μετατοπίζεται σημαντικά, χωρίς να μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα Q408 και E356 (Εικ. 3-7H). Η 2-θειοξανθίνη (2SX) είναι καλύτερο πρόσδεμα σε σύγκριση με την 6-θειοξανθίνη (6SX) (Εικ. 3-7Δ και Ε). Ο δεσμός C = S είναι μακρύτερος από τον C = O, εκτοπίζοντας το υπόστρωμα 2SX προς το E356, ενώ η 6SX μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση, προς την F155. Έτσι, η 2SX σχηματίζει τις περισσότερες από τις αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν στην ξανθίνη, (ωστόσο ο δεσμός υδρογόνου με το θείο είναι ασθενέστερος σε σύγκριση με το οξυγόνο – Gregoret *et al.*, 1991), ενώ η 6SX στερείται δεσμού υδρογόνου με το E356. Η 8-αζα-ξανθίνη (8AX), αν και είναι τοποθετημένη ακριβώς όπως η ξανθίνη (Εικ. 3-7Z), είναι ένα ασθενές πρόσδεμα, πιθανώς λόγω των στερεοηλεκτρονιακών ιδιοτήτων της N-N = N ομάδας, εμποδίζοντας με είσοδο ή/και τη μετατόπιση του υποστρώματος διαμέσου του μεταφορέα. Τέλος, η υποξανθίνη (HX), δεν μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με τα Q408 και E356 ταυτόχρονα, και ως εκ τούτου είναι εντελώς μετατοπισμένη στο

εσωτερικό της κοιλότητας δέσμησης σε σύγκριση με την ξανθίνη (Εικ. 3-13Θ). Επιπρόσθετοι υπολογισμοί πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν για πουρίνες που δεν αναγνωρίζονται από τον άγριου τύπου UapA, όπως η γουανίνη και η αδενίνη, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορετικές καταστάσεις ταυτομερής τους. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, το αμίδιο του Q408 απέτυχε να σχηματίσει δισχιδή δεσμό υδρογόνου με το υπόστρωμα, καταλήγοντας σε λιγότερους δεσμούς υδρογόνου εν συγκρίσει με την ξανθίνη (Εικ. 3-7I και 3-5A αντίστοιχα).

Σε συμφωνία με το το μοντέλο αυτό, τα κατάλοιπα Q408 και E356 είναι απολύτως απαραίτητα για τη δέσμηση του υποστρώματος και τις μεταφορές (ακόμη και οι πιο συντηρημένες αντικαταστάσεις Q408E και E356D οδηγούν σε δραματική απώλεια της ικανότητας μεταφοράς), ενώ τα κατάλοιπα A407 και F155 μπορούν να αντικατασταθούν λειτουργικά (Koukaki *et al.*, 2005; Papageorgiou *et al.*, 2008β; Amillis *et al.*, 2011). Περαιτέρω αποδείξεις για την άμεση συμμετοχή των Q408 και E356 στη δέσμηση του υποστρώματος προέρχεται από το γεγονός ότι η μεταλλαγή Q408E προσδίδει την ικανότητα για δέσμηση νέων υποστρωμάτων (υποξανθίνη και γουανίνη), και η μεταλλαγή E356D οδηγεί σε 18-πλάσια αύξηση της συγγένειας δέσμησης για ξανθίνη, αλλά καταστρέφει τη μεταφορική ικανότητα. Η τελευταία αυτή διαπίστωση πρέπει να τονιστεί καθώς παρέχει ενδείξεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι το E356 διαδραματίζει ρόλο όχι μόνο στην άμεση πρόσδεση του υποστρώματος, αλλά και στη δυναμική μετάβασης του μεταφορέα από της προς τα έξω στην προς τα έσω δομή. Υπολογισμοί εύκαμπτης πρόσδεσης της ξανθίνης στον UapA-E356D, έδειξαν σαφώς ότι, αν και η μεταλλαγή επιδρά λίγο στις φυσικοχημικές ιδιότητες και στο προφίλ αλληλεπίδρασης, η μετάλλαξη του γλουταμικού προς ασπαρτικό είναι κρίσιμη για την ευκαμψία της πλευρικής αλυσίδας που συμμετέχει. Η βραχύτερη πλευρική αλυσίδα του D356 ενέχει σοβαρό περιορισμό στον διαμορφωτικό χώρο στον οποίο έχει πρόσβαση η καρβοξυλομάδα σε σύγκριση με την πρωτεΐνη άγριου τύπου. Αυτός ο περιορισμός δρα συνεργιστικά με τη διάταξη των τριών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με τον δακτύλιο πυριμιδίνης της ξανθίνης. Ως αποτέλεσμα, η ταυτόχρονη και λεπτά συντονισμένη πρόσδεση της ξανθίνης στους τέσσερις εταίρους αλληλεπίδρασης F155, E356, A407 και Q408 μέσω δεσμών υδρογόνου δεν είναι πλέον εφικτή ως συνέπεια της μειωμένης διαμορφωτική ευελιξία του τελευταίου. Μπορεί να υποτεθεί ότι μια αποτυχία στο σχηματισμό ενός σταθερού και βέλτιστα εξισορροπημένου συμπλέγματος θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την αλλαγή διαμόρφωσης και επομένως να οδηγήσει σε διατάραξη της

λειτουργικότητας του μεταφορέα, όπως προσδιορίζεται πειραματικά για αυτή τη μεταλλαγή. Μια μηχανιστική εξήγηση για την εν λόγω διαταραχή μπορεί να περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του E356 με κατάλοιπα που βρίσκονται κατά μήκος του πόρου, το ρόλος του ως μεσολαβητής της ολίσθησης της ξανθίνης προς το D360 και κυρίως την πιθανή συμμετοχή του στην κάθοδο του πρωτονίου. Συνοψίζοντας, μπορούμε να εικάσουμε ότι η βραχύτερη πλευρική αλυσίδα του D356 μειώνει την ικανότητα του να αλληλεπιδράσει με το υπόστρωμα, όπως φαίνεται καθαρά στην αδυναμία των υπολογισμών πρόσδεσης να υποδείξουν σύνδεση του D356 με την ξανθίνη. Αυτό με τη σειρά του θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τη μετάβαση από την προς τα έξω στην προς τα έσω διαμόρφωση, κίνηση απαραίτητη για την κατάλυση της μεταφοράς (Kaback *et al.*, 2011; Smirnova *et al.*, 2011). Έμμεση υποστήριξη αυτής της εικασίας προέρχεται από το γεγονός ότι καθαρισμένη UapA-E356D πρωτεΐνη είναι σημαντικά πιο σταθερή από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (Leung *et al.*, 2012).

4.1.4 Γενετικές ενδείξεις για την πορεία του υποστρώματος προς το κυτταρόπλασμα

Η προτεινόμενη πορεία μετατόπισης του υποστρώματος ξεκινά από την κεντρική θέση δέσμευσης του υποστρώματος (κατάλοιπα F155, E356, A407 και Q408) και ακολουθείται από μεταγενέστερα στιγμιότυπα της ξανθίνης προς την κυτταροπλασματική πλευρά του μεταφορέα, κοντά στα κατάλοιπα D360, A363, G411, T416, R417, V463 και A469 (Εικ. 3-8). Τα αποτελέσματα από την υποκατάσταση του D360 έρχονται σε αντίθεση με την συμμετοχή του ως κατάλοιπο απαραίτητο για τη δέσμευση και τη συμεταφορά του πρωτονίου και μάλλον υποστηρίζουν έναν έμμεσο ρόλο στη μετατόπιση του υποστρώματος, ενδεχομένως μέσω αλληλεπιδράσεων με τα T405 και N410, όπως έχει ειπωθεί και νωρίτερα.

Τα A363 και G411 έχει αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμα κατάλοιπα για τη μεταφορά (Koukaki *et al.*, 2005; Diallinas *et al.*, 1998). Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκεκριμένες υποκαταστάσεις του G411 είτε ακινητοποιούν τον UapA (G411V) (Leung *et al.*, 2012), ή αυξάνουν κατά 2 φορές την ταχύτητα μεταφοράς (G411A, G411V) (Koukaki *et al.*, 2005), γεγονός που υποδηλώνει ότι το G411 είναι ένα βασικό δυναμικό στοιχείο στις κινήσεις που σχετίζονται με τη μεταφορά διαμέσου του UapA. Το κατάλοιπο R417 έχει δείχθει ότι είναι σημαντικό ειδικά για την αύξηση της συγγένεια δέσμευσης του ουρικού οξέος (Goudela *et al.*, 2005). Σε συμφωνία με

αυτό έρχεται το γεγονός ότι η μεταλλαγή R417G μειώνει δραματικά τη δέσμευση του ουρικού οξέος, αλλά διατηρεί υψηλή συγγένεια για την ξανθίνη.

Τα άλλα δύο κατάλοιπα, V463 και A469, δεν φαίνεται να είναι σημαντικά για τη μεταφορά του υποστρώματος καθεαυτή, αλλά συγκεκριμένες υποκαταστάσεις αυτών επηρεάζουν σημαντικά την εξειδίκευση του UapA (Kosti *et al.*, 2010). Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι, κανένα από τα παραπάνω κατάλοιπα δεν είναι κρίσιμης σημασίας για την καταστροφή της πρωτεΐνης ή για τη δέσμευση του υποστρώματος, όπως φαίνεται από τις σχετικές μεταλλάξεις. Έτσι, όλα τα στοιχεία της προτεινόμενης πορείας του υποστρώματος σχετίζονται με μεταλλαγές που επηρεάζουν είτε τα ποσοστά μεταφοράς (τιμές V) ή την εξειδίκευση. Αυτή η παρατήρηση είναι σε πλήρη συμφωνία με τα κατάλοιπα της προς το κυτταρόπλασμα πορείας του υποστρώματος.

4.1.5 Γενετικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη περιοχών ελεγχόμενης πρόσβασης

Προγενέστερα γενετικά δεδομένα υπέδειξαν τα αμινοξέα T526 και F528 ως προεξέχοντα για τον καθορισμό της εξειδίκευσης του UapA. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, τόσο με υπολογισμούς πρόσδεσης, όσο και με πρόσθετα γενετικά πειράματα (T526M/F528A), ο ρόλος τους επιβεβαιώθηκε, καθώς επίσης προστέθηκε και το G527 ως αμινοξύ της περιοχής με τον ίδιο ρόλο. Δεν επετεύχθη, όμως, να αποδειχθεί γενετικά ότι στην εξωκυττάρια αυτή περιοχή υπάρχει μία δευτερεύουσα θέση δέσμευσης του μεταφορέα. Αυτό μπορεί να συνέβη είτε γιατί το μοντέλο του UapA βρίσκεται στην προς τα έξω ανοιχτή διαμόρφωση και άρα αγνοούμε ποια κατάλοιπα μπορεί να βρίσκονται εκτεθειμένα στην προς τα έξω διαμόρφωση, είτε επειδή η περιοχή είναι ιδιαίτερα δυναμική και μπορεί να περνάει ταχύτατα από το στιγμιότυπο αυτό και να συνεχίζει προς τα έξω, μη δίνοντας έτσι μετρήσιμο φαινότυπο, όταν το απολέσει.

Εκτός από τα παραπάνω κατάλοιπα στο TMS13, άλλες μεταλλαγές που επηρεάζουν την εξειδίκευση του UapA αφορούν το αμινοξύ R481 (Kosti *et al.*, 2010). Υποκατάσταση του R481 με αλιφατικά κατάλοιπα διευρύνει την εξειδίκευση του UapA παρόμοια με μεταλλάξεις στα Q113, T526 και F528. Το κατάλοιπο αυτό βρίσκεται όρια του βρόχου TMS12-TMS13 με TMS13. Οι υπολογισμοί πρόσδεσης της ξανθίνης δεν έδειξαν πρόσδεση σε αυτό. Οι λόγοι για τους οποίους είναι σημαντικό για την εξειδίκευση του UapA στο ουρικό οξύ και την ξανθίνη δεν είναι,

προς το παρόν, κατανοητοί. Θα μπορούσε να συμβαίνει μέσω μιας επίδρασης ντόμινο από την εξωκυττάρια πύλη ή θα μπορούσε να ορίζει ένα στοιχείο μιας δυναμικής εσωστρεφούς πύλης. Πιο πιθανή είναι η δεύτερη υπόθεση βάσει δύο παρατηρήσεων. Πρώτον, απαλοιφή του R481 ή ένθεση αμινοξικών καταλοίπων (Ala-Gly) αμέσως πριν από το R481 οδηγούν σε αυξημένη, θερμοκρασιο-εξαρτώμενη αστάθεια του UarA και καταστροφή του στο χυμοτόπιο, εικόνα που εμφανίζεται συνήθως σε μεταλλάξεις δυναμικών στοιχείων του μεταφορέα (Kosti *et al.*, 2010). Δεύτερον, διπλές μεταλλαγές που περιλαμβάνουν αντικαταστάσεις του R481 και του T526 ή F528, χαλαρώνουν περαιτέρω την εξειδίκευσή του UarA, δείχνοντας ότι υπάρχει ένα προσθετικό αποτέλεσμα των προς τα έξω και προς τα μέσα τοποθετημένων μεταλλαγών, το οποίο μπορεί πιο εύκολα να εξηγηθεί, αν λειτουργούν δύο ανεξάρτητες πύλες εκλεκτικής διαπερατότητας και στις δύο πλευρές του UarA. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι το R481 είναι τοπολογικά μακριά από το κυτταροπλασματικό άκρο της πορείας μετατόπισης του υποστρώματος, όπως ορίζεται εδώ, η οποία είναι κοντά στο R417 (βλ. Εικ. 3-8), θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι το μοντέλο του UarA που κατασκευάστηκε εδώ βασίζεται σε μια στατική διαμόρφωση του UraA σε προς τα έξω ανοιχτή δομή και, κατά συνέπεια, δεν θα πρέπει να αποκλεισθεί ότι σε μια υποθετική προς τα έξω διαμόρφωση του UarA, ο βρόχος TMS12-TMS13 και το R481 είναι κοντά στη κυτταροπλασματικό άκρο της πορείας μετατόπισης του υποστρώματος.

4.1.6 Εξελικτικές σχέσεις των μελών της οικογένειας NAT

Παλαιότερα είχε προταθεί ότι η παρουσία ενός καταλοίπου Gln ή Glu στο NAT μοτίβο (Q408 σε UarA) είναι μια μοριακή υπογραφή για την πρόβλεψη κατά πόσο μία πρωτεΐνη NAT είναι εξειδικευμένη για νουκλεοτιδικές βάσεις και όχι για L-ασκορβικό. Σε μεταφορείς L-ασκορβικού το κατάλοιπο Gln/Glu αντικαθίσταται από ένα κατάλοιπο Pro, γεγονός που υποδεικνύεται και από τους υπολογισμούς πρόσδεσης. Τα παρόντα ευρήματα δείχνουν ότι η περαιτέρω εξειδίκευση των NAT ομολόγων που ανήκουν σε εξελικτικά μακρινές ομάδες, όπως μύκητες και μετάρζωα δεν μπορεί να καθοριστεί μόνο από τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μέσα σε μια μεγάλη, κεντρική τοποθεσία, τη θέση δέσμησης του υποστρώματος. Όταν κατασκευάστηκε γενετικά μία θέση δέσμησης του υποστρώματος του UarA μιμούμενη αυτή του ανθρώπινου μεταφορέα ασκορβικού SVCT2, προέκυψε ένας φαινομενικά ανενεργός μεταφορέας UarA. Αυτό υποδηλώνει έντονα ότι η αλλαγή

της εξειδίκευσης μεταξύ του UapA και του SVCT2 εκτείνεται και πέρα από τις αλλαγές στο χώρο δέσμευσης του υποστρώματος, και πιθανώς περιλαμβάνει αλλαγές σε δυναμικά στοιχεία των μεταφορέων αυτών, συμπεριλαμβανομένων των πυλών και των μοριακών φίλτρων, όπως αυτές που περιγράφονται εδώ. Η παρατήρηση αυτή είναι χρήσιμη για μελλοντικές προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν οι μεταφορείς της οικογένειας NAT ως εξειδικευμένες πύλες για την ανάπτυξη στοχευμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων, αλλά και για τον ορθολογικό σχεδιασμό *in vitro* εξελικτικών προσεγγίσεων για την κατανόηση του πώς λειτουργούν οι μεταφορείς.

4.2 Δομή και λειτουργία του μεταφορέα FcyB

Τα αποτελέσματα από τους υπολογισμούς πρόσδεσης υπέδειξαν ότι πέντε κατάλοιπα στον FcyB μπορεί να εμπλέκονται άμεσα στη πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτά είναι η S85 στο TMS1, οι W159 και N163 στο TMS3, η W259 στο TMS6 και η N354 στο TMS8. Δύο ακόμη κατάλοιπα ασπαραγίνης, η N350 και η N351, μπορεί επίσης να αλληλεπιδρούν με την Asn-354 με έναν τρόπο που να είναι κρίσιμη για την πρόσδεση του υποστρώματος. Πέντε από αυτά τα υποθετικά λειτουργικά κατάλοιπα, οι W159, N163, W259, N350 και N354, ταυτίζονται με κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία έχουν δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα (βενζυλο-υδαντοΐνη) στον Mhp1, δηλαδή οι W117, Q121, W220, N314 και N318. Είναι ενδιαφέρον ότι, αυτά τα κατάλοιπα είναι είτε απολύτως (W117, N314 και N318) ή πολύ (W220 και Q121) συντηρημένα στην οικογένεια NCS1 (βλ. Εικ. 3-20).

Δεδομένης της ποικιλομορφίας εξειδίκευσης των μεταφορέων-μελών της οικογένειας, υποδεικνύεται ότι κάποια άλλα κατάλοιπα, λιγότερο συντηρημένα, θα καθορίζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα και θα συμμετέχουν στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Ο *A. nidulans* διαθέτει 12 ταυτοποιημένα μέλη, κάποια από τα οποία είναι άγνωστης λειτουργίας, και κάποια άλλα έχουν διαφορετική εξειδίκευση.

Βάσει των αποτελεσμάτων από τους υπολογισμούς πρόσδεσης και την παρατήρηση της πρωτοταγούς στοίχισης θα μπορούσαν να μελετηθούν ορισμένα κατάλοιπα με γενετικές προσεγγίσεις κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και πλήρη φαινοτυπικό και βιοχημικό χαρακτηρισμό, εν αρχή στον FcyB (Πίν. 4-1). Στα κατάλοιπα αυτά θα περιλαμβάνονται τόσο απόλυτα συντηρημένα αμινοξέα (W159, N350 και N354) για να επιβεβαιωθεί το αναντικατάστατο του ρόλου τους, αλλά και λιγότερο συντηρημένα αμινοξέα, τα οποία πιθανώς να καθορίζουν την εξειδίκευση

του μεταφορέα. Τα κατάλοιπα που θα δώσουν κάποιον φαινότυπο θα μπορούσαν εν συνεχεία να μελετηθούν και στους άλλους δύο γνωστούς μεταφορείς της οικογένειας, τους FurA και FurD.

Τα βιολογικά πειράματα που προτάθηκαν (κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένου υποστρώματος, σήμανση των μεταλλαγμένων μορφών με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη για υποκυτταρικό εντοπισμό) πραγματοποιήθηκαν από την Υποψήφια Διδάκτορα Αιμιλία Κρυπωτού στο Εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Γεωργίου Διαλυνά στα πλαίσια της Διδακτορικής της Διατριβής. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, καθώς και των παραπάνω υπολογιστικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν από την Υποψήφια Διδάκτορα Βασιλική Κωστή στο Εργαστήριο του Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρού στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έχουν δημοσιευτεί (Krypotou *et al.*, 2012).

Πίνακας 4-1 Αμινοξέα του FcyB τα οποία χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης.

FcyB	Mhp1	FurA	FurD	Ρόλος στον Mhp1
N81	A40	S53	A52	-
V83	Q42	N55	N54	Σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με το υπόστρωμα
S85	A44	N57	A56	-
W159	W117	W131	W130	π – π στοιβαξη με το υπόστρωμα
N163	Q121	Q135	Q134	Σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με το υπόστρωμα
T191	Q153	S182	Q181	Το TMS4 κάμπτεται για είσοδο του υποστρώματος
E206	V169	T198	A197	Το TMS5 κάμπτεται για είσοδο του υποστρώματος
W259	W220	F252	Y250	π – π στοιβαξη με το υπόστρωμα
S261	A222			-
N350	N314	N418	N337	Σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με την N318
N351	P315	I419	I338	-
P353	A317	A421	A340	-
N354	N318	N422	N341	Σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με το υπόστρωμα

Τα βιολογικά πειράματα έδειξαν τα παρακάτω:

- Ως προς την ανάπτυξή τους σε αδενίνη και σε υποξανθίνη, καθώς και ως προς την ευαισθησία τους στην 5-FC οι μεταλλαγμένες μορφές του μεταφορέα FcyB μπορούν να διακριθούν σε:
 - ο Μεταλλαγές με φαινότυπο αγρίου τύπου (E206).

- Μεταλλαγές ολικής (N81A, W159A, N163L, W259A, N350Q, P353A, N354D) ή μερικής απώλειας λειτουργίας (V83N, S261A).
- Μεταλλαγές αλλαγής εξειδίκευσης (T191A, N163Q, N350A, N350D, N351A, N354A, N354Q).
- Οι μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένου υποστρώματος ήρθαν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ανάπτυξης.
- Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών συνεζυγμένων με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη έδειξε ότι:
 - Στις μεταλλαγές W159, W259 και P353 ο μεταφορέας εντοπίζεται στη μεμβράνη. Συνεπώς η απώλεια λειτουργίας τους συνδέεται άμεσα με την απώλεια μεταφορικής ικανότητας.
 - Στις μεταλλαγές N81, S85, N163, T191, N350, N351 και N54, όπου η τοπολογία του μεταφορέα είναι μη αναμενόμενη, δεν μπορούμε να συμπεράνουμε αν η αλλαγή της μεταφορικής ικανότητας οφείλεται στη μεταλλαγή ή στη μερική απώλεια λειτουργίας λόγω ελαττωματικής αναδίπλωσης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των βιολογικών πειραμάτων:

- Επιβεβαίωσαν τη συμμετοχή αμινοξικών κατάλοιπων από τα TMS 1, 3, 6 και 8 στη δέσμευση και/ή στη μεταφορά υποστρώματος, όπως αυτά είχαν προβλεφθεί από το μοντέλο και τους υπολογισμούς πρόσδεσης. Ειδικότερα, τα κατάλοιπα S85, W159, N163, W259, N350, N351, P353, και N354 αποδείχθηκαν αναντικατάστατα στη μεταφορά διαμέσου του FcyB.
- Έδειξαν ότι τα κατάλοιπα N81, V83, S261, T191 και Q206 διαδραματίζουν δευτερεύοντα ρόλο στην τοπολογία ή τη μεταφορική ικανότητα του μεταφορέα.

Τα αποτελέσματα των βιοπληροφορικών προσεγγίσεων και των θεωρητικών υπολογισμών κατάφεραν να προβλέψουν τη συμμετοχή αμινοξικών κατάλοιπων στον FcyB τα οποία βρίσκονται στην ίδια θέση με αντίστοιχα αμινοξέα του Mhp1 που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος (βλ. Πίν. 4-1). Έτσι, παρόλο που οι δύο μεταφορείς διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση για το μεταφερόμενο υπόστρωμα και εμφανίζουν χαμηλή συνολικά αμινοξική ομολογία, μοιράζονται κοινά δομικά

στοιχεία και υψηλά συνώνυμα αμινοξέα για να “χτίσουν” το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος.

Τέλος, δεδομένου ότι υπάρχουν τρεις διαθέσιμες δομές στον Mhp1, θα μπορούσαν να κατασκευαστούν και τα υπόλοιπα δύο μοντέλα ομολογίας του FcyB. Τα τρία αυτά μοντέλα θα μπορούσαν να υποβληθούν σε μοριακή δυναμική για να διερευνηθεί ο μηχανισμός εναλλαγής της προς τα έξω με την προς τα έσω δομή, καθώς και η πορεία μεταφοράς των υποστρωμάτων.

Βιβλιογραφία

- Άρθρα σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- Abramson J. & Wright E.M. (2009). Structure and function of Na⁽⁺⁾-symporters with inverted repeats. *Curr Opin Struct Biol*, **19**, 4, 425–432.
- Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H.R. & Iwata S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 5633, 610-5.
- Ahearn G.A., Zhuang Z., Duerr J. & Pennington V. (1994). Role of the invertebrate electrogenic 2Na⁺/1H⁺ antiporter in monovalent and divalent cation transport. *J Exp Biol*, **196**, 319-35.
- Al-Salabi M.I., Wallace L.J., Lüscher A., Mäser P., Candlish D., Rodenko B., Gould M.K., Jabeen I., Ajith S.N. & de Koning H.P. (2007). Molecular interactions underlying the unusually high adenosine affinity of a novel *Trypanosoma brucei* nucleoside transporter. *Mol Pharmacol*, **71**, 3, 921-9.
- Amillis S., Kosti V., Pantazopoulou A., Mikros E. & Diallinas G. (2011). Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J Mol Biol*, **411**, 3, 567-80.
- Amillis S., Koukaki M. & Diallinas G. (2001). Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J Mol Biol*, **313**, 4, 765-74.
- Amillis S., Hamari Z., Roumelioti K., Scazzocchio C. & Diallinas G. (2007). Regulation of expression and kinetic modelling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol Membr Biol*, **24**, 206–214.
- Andersen P.S., Frees D., Fast R. & Mygind B. (1995). Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J Bacteriol*, **177**, 8, 2008-2013.
- Andersson H. & von Heijne G. (1994). Positively charged residues influence the degree of SecA dependence in protein translocation across the *E. coli* inner membrane. *FEBS Letters*, **347**, 2–3, 169–172.
- Andrei G. & De Clercq E. (1990). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. *Antiviral Res*, **14**, 4-5, 287-99.
- Appleford P.J., Griffiths M., Yao S.Y., Ng A.M., Chomey E.G., Isaac R.E., Coates D., Hope I.A., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin SA. (2004). Functional redundancy of two nucleoside transporters of the ENT family (CeENT1,

- CeENT2) required for development of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Membr Biol*, **21**, 4, 247-59.
- Argyrou E., Sophianopoulou V., Schultes N. & Diallinas G. (2001). Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell*, **13**, 4, 953-64.
- Aronow B., Kaur K., McCartan K. & Ullman B. (1987). Two high affinity nucleoside transporters in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, **22**, 1, 29-37.
- Bähring R. & Covarrubias M. (2011). Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *J Physiol*, **589**, Pt 3, 461-79.
- Barnes K., Dobrzynski H., Foppolo S., Beal P.R., Ismat F., Scullion E.R., Sun L., Tellez J., Ritzel M.W., Claycomb W.C., Cass C.E., Young J.D., Billeter-Clark R., Boyett M.R. & Baldwin S.A. (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res*, **99**, 5, 510-9.
- Baxevanis A.D. & Ouellette B.F. (2001). Gene identification: methods and considerations. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 6:Unit 6.6. doi: 10.1002/0471142905.hg0606s29.
- Benzer S. & Champe S.P. (1961). Ambivalent rII mutants of phage T4. *Proc Natl Acad Sci USA*, **47**, 7, 1025-38.
- Bernard C., Traub M., Kunz H.H., Hach S., Trentmann O. & Möhlmann T. (2011). Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, **62**, 13, 4627-37.
- Biondi C., Pavan B., Dalpiaz A., Medici S., Lunghi L. & Vesce F. (2007). Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol Hum Reprod*, **13**, 1, 77-83.
- Bloch J.C., Sychrova H., Souciet J.L., Jund R. & Chevallier M.R. (1992). Determination of a specific region of the purine-cytosine permease involved in the recognition of its substrates. *Mol Microbiol*, **6**, 2989.
- Bornstein S.R., Yoshida-Hiroi M., Sotiriou S., Levine M., Hartwig H.G., Nussbaum R.L. & Eisenhofer G. (2003). Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2). *FASEB J*, **17**, 13, 1928-30.

- Boudker O. & Verdon G. (2010). Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci*, **31**, 9, 418-26.
- Bradford M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brèthes D., Chirio M.C., Napias C., Chevallier M.R., Lavie J.L. & Chevallier J. (1992). In vivo and in vitro studies of the purine/cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. Functional analysis of a mutant with an altered apparent transport constant of uptake. *Eur J Biochem*, **204**, 699–704.
- Brown D.A. & London E. (2000). Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221–17224.
- Burchmore R.J., Wallace L.J., Candlish D., Al-Salabi M.I., Beal P.R., Barrett M.P., Baldwin S.A. & de Koning H.P. (2003). Cloning, heterologous expression, and in situ characterization of the first high affinity nucleobase transporter from a protozoan. *J Biol Chem*, **278**, 26, 23502-7.
- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C. & Frommer W.B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J*, **34**, 1, 13-26.
- Buxton F.P., Gwynne D.I. & Davies R.W. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* using the argB gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **37**, 1-3, 207-14.
- Carter N.S., Ben Mamoun C., Liu W., Silva E.O., Landfear S.M., Goldberg D.E. & Ullman B. (2000). Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **275**, 14, 10683-91.
- Carter N.S. & Fairlamb A.H. Nature. (1993). Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, **361**, 6408, 173-6.
- Castro M., Caprile T., Astuya A., Millán C., Reinicke K., Vera J.C., Vásquez O., Aguayo L.G. & Nualart F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem*, **78**, 4, 815-23.
- Cecchetto G., Amillis S., Diallinas G., Scazzocchio C. & Drevet C. (2004). The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J Biol Chem*, **279**, 5, 3132-41.

- Chapeland-Leclerc F., Bouchoux J., Goumar A., Chastin C., Villard J. & Noël T. (2005). Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 3101-8.
- Chevallier M.R., Jund R. & Lacroute F. (1975). Characterization of cytosine permeation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **122**, 629–641.
- Christiansen L.C., Schou S., Nygaard P. & Saxild H.H. (1997). Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol*, **179**, 8, 2540-50.
- Cornelius S., Traub M., Bernard C., Salzig C., Lang P. & Möhlmann T. (2012). Nucleoside transport across the plasma membrane mediated by equilibrative nucleoside transporter 3 influences metabolism of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biol*, **14**, 5, 696–705.
- Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*, **16**, 22, 10881-10890.
- Cove DJ. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, **113**, 1, 51-6.
- Danielsen S., Kilstrup M., Barilla K., Jochimsen B. & Neuhard J. (1992). Characterization of the *Escherichia coli* codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol Microbiol*, **6**, 10, 1335-44.
- Darlington A.J. & Scazzocchio C. (1967). Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol*, **93**, 3, 937-40.
- Daruwala R., Song J., Koh W.S., Rumsey S.C. & Levine M. (1999). Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett*, **460**, 3, 480-4.
- Dawson R.J. & Locher K.P. (2007) Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett*, **581**, 5, 935-8.
- de Juan-Sanz J., Zafra F., López-Corcuera B. & Aragón C. (2011). Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination. *Traffic*, **12**, 12, 1850-67.

- de Koning H.P., Al-Salabi M.I., Cohen A.M., Coombs G.H. & Wastling J.M. (2003). Identification and characterisation of high affinity nucleoside and nucleobase transporters in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **33**, 8, 821-31.
- de Koning H.P. & Diallinas G. (2000). Nucleobase transporters. *Mol Membr Biol*, **17**, 75-94.
- de Montigny J., Straub M.L., Wagner R., Bach M.L. & Chevallier M.R. (1998). The uracil permease of *Schizosaccharomyces pombe*: a representative of a family of 10 transmembrane helix transporter proteins of yeasts. *Yeast*, **14**, 11, 1051-9.
- Desimone M., Catoni E., Ludewig U., Hilpert M., Schneider A., Kunze R., Tegeder M., Frommer W.B. & Schumacher K. (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 4, 847-56.
- Diallinas G., Gorfinkiel L., Arst H.N. Jr., Cecchetto G. & Scazzocchio C. (1995). Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J Biol Chem*, **270**, 15, 8610-22.
- Diallinas G. & Gournas C. (2008). Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)*, **2**, 5, 363-72.
- Diallinas G. & 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, 341-50.
- Diallinas G., Valdez J., Sophianopoulou V., Rosa A. & Scazzocchio C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J*, **17**, 14, 3827-37.
- Diallinas G. (2008). Biochemistry. An almost-complete movie. *Science*, **322**, 5908, 1644-5.
- Echarri A., Muriel O. & Del Pozo M.A. (2007). Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 5, 627-37.

- Erichsen H.C., Engel S.A., Eck P.K., Welch R., Yeager M., Levine M., Siega-Riz A.M., Olshan A.F. & Chanock S.J. (2006). Genetic variation in the sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1, and SLC23A2 and risk for preterm delivery. *Am J Epidemiol*, **163**, 3, 245-54.
- Faaland C.A., Race J.E., Ricken G., Warner F.J., Williams W.J. & Holtzman E.J. (1998). Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochim Biophys Acta*, **1442**, 2-3, 353-60.
- Faham S., Watanabe A., Besserer G.M., Cascio D., Specht A., Hirayama B.A., Wright E.M. & Abramson, J. (2008). The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science*, **321**, 5890, 810–814.
- Fang Y., Jayaram H., Shane T., Kolmakova-Partensky L., Wu F., Williams C., Xiong Y. & Miller, C. (2009). Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature*, **460**, 7258, 1040–1043.
- Ferreira T., Brethes D., Napias C. & Chevallier J. (1997). Functional analyses of mutated purine-cytosine permease from *Saccharomyces cerevisiae*. A possible role of the hydrophilic segment 371–377 in the active carrier conformation. *J Biol Chem*, **272**, 9697–9702.
- Focke P.J., Wang X. & Larsson H.P. (2013). Neurotransmitter transporters: structure meets function. *Structure*, **21**, 5, 694-705.
- Forment J.V., Ramón D. & MacCabe A.P. (2006). Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/loxP system. *Curr Genet*, **50**, 3, 217-24.
- Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shelley M., Perry J.K., Shaw D.E., Francis P. & Shenkin P.S. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy; *J Med Chem*, **47**, 7, 1739–1749.
- Frillingos S. (2012). Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *Int J Biochem Mol Biol*, **3**, 3, 250-72.

- Fu D., Libson A., Miercke L.J., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J. & Stroud R.M. (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, **290**, 481–486.
- Galagan J.E., Calvo S.E., Cuomo C., Ma L.J., Wortman J.R., Batzoglou S., Lee S.I., Baştürkmen M., Spevak C.C., Clutterbuck J., Kapitonov V., Jurka J., Scazzocchio C., Farman M., Butler J., Purcell S., Harris S., Braus G.H., Draht O., Busch S., D'Enfert C., Bouchier C., Goldman G.H., Bell-Pedersen D., Griffiths-Jones S., Doonan J.H., Yu J., Vienken K., Pain A., Freitag M., Selker E.U., Archer D.B., Peñalva M.A., Oakley B.R., Momany M., Tanaka T., Kumagai T., Asai K., Machida M., Nierman W.C., Denning D.W., Caddick M., Hynes M., Paoletti M., Fischer R., Miller B., Dyer P., Sachs M.S., Osmani S.A., & Birren B.W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, **438**, 7071, 1105-15.
- Gao X., Lu F., Zhou L., Dang S., Sun L., Li X., Wang J. & Shi Y. (2009). Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science*, **324**, 5934, 1565–1568.
- Gao X., Zhou L., Jiao X., Lu F., Yan C., Zeng X., Wang J. & Shi Y. (2010). Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature*, **463**, 7282, 828–832.
- Gasperi V., Dainese E., Oddi S., Sabatucci A. & Maccarrone M. (2013). GPR55 and its interaction with membrane lipids: comparison with other endocannabinoid-binding receptors. *Curr Med Chem*, **20**, 1, 64-78.
- Geillon F., Trompier D., Gondcaille C., Lizard G., Savary S. (2012). Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy. *Med Sci (Paris)*, **28**, 12, 1087-94.
- Gems D., Johnstone I.L. & Clutterbuck A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, **98**, 1, 61-7.
- Georgopoulou E., Mermelekas G., Karena E. & Frillingos S. (2010). Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the YgfO xanthine permease: Asn-325 binds and Ala-323 senses substrate. *J Biol Chem*, **285**, 19422–19433.

- Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B. & Frommer W.B. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 2, 291-300.
- Godoy A., Ormazabal V., Moraga-Cid G., Zúñiga F.A., Sotomayor P., Barra V., Vasquez O., Montecinos V., Mardones L., Guzmán C., Villagrán M., Aguayo L.G., Oñate S.A., Reyes A.M., Cárcamo J.G., Rivas C.I. & Vera J.C. (2007). Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *J Biol Chem*, **282**, 1, 615-24.
- Gorfinkiel L., Diallynas G. & Scazzocchio C. (1993). Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, **268**, 23376-23381.
- Goudela S., Karatza P., Koukaki M., Frillingos S. & Diallynas G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol Membr Biol*, **22**, 3, 263-75.
- Goudela S., Reichard U., Amillis S. & Diallynas G. (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, **45**, 4, 459-72.
- Goudela S., Tsilivi H. & Diallynas G. (2006). Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Mol Membr Biol*, **23**, 291–303.
- Gournas C., Amillis S., Vlanti A. & Diallynas G. (2010). Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol Microbiol*, **75**, 1, 246-60.
- Gournas C., Papageorgiou I. & Diallynas G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol Biosyst*, **4**, 5, 404-16.
- Gregoret L.M., Rader S.D., Fletterick R.J. & Cohen F.E. (1991). Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins*, **9**, 2, 99-107.
- Gupta S., Kerridge D. & Chevallier M.R. (1995). A purine permease in *Candida glabrata*. *FEMS Microbiol Lett*, **126**, 93–96.
- Hamari Z., Amillis S., Drevet C., Apostolaki A., Vágvölgyi C., Diallynas G. & Scazzocchio C. (2009). Convergent evolution and orphan genes in the

- Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, **73**, 43-57.
- Hamilton S.R., Yao S.Y., Ingram J.C., Hadden D.A., Ritzel M.W., Gallagher M.P., Henderson P.J., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem*, **276**, 30, 27981-8.
- Henriques C., Sanchez M.A., Tryon R. & Landfear S.M. (2003). Molecular and functional characterization of the first nucleobase transporter gene from African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, **130**, 2, 101-10.
- Hoffman L.R. & Ramsey B.W. (2013). Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest*, **143**, 1, 207-13.
- Huang Y., Lemieux M.J., Song J., Auer M. & Wang D.N. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 5633, 616-20.
- Hyde R.J., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (2001). The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol*, **18**, 53-63.
- Jahn K.A., Su Y. & Braet F. (2011). Multifaceted nature of membrane microdomains in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, **17**, 6, 681-90.
- Jain S., Sutchu S., Rosa P.A., Byram R. & Jewett M.W. (2012). *Borrelia burgdorferi* harbors a transport system essential for purine salvage and mammalian infection. *Infect Immun*, **80**, 9, 3086-93.
- Johansen L.E., Nygaard P., Lassen C., Agersø Y. & Saxild H.H. (2003). Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). *J Bacteriol*, **185**, 17, 5200-9.
- Jorgensen W.L., Maxwell D.S. & Tirado-Rives, J. (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetic and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc*, **118**, 11225–11236
- Jornot L., Maechler P., Wollheim C.B. & Junod A.F. (1999). Reactive oxygen metabolites increase mitochondrial calcium in endothelial cells: implication of the Ca²⁺/Na⁺ exchanger. *J Cell Sci*, **112**, Pt 7, 1013-22.

- Jund R., Weber E. & Chevallier M.R. (1988). Primary structure of the uracil transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **171**, 417–424.
- Kaback H.R., Smirnova I., Kasho V., Nie Y. & Zhu Y. (2011). The alternating access transport mechanism in LacY. *J Membr Biol*, **239**, 85-93.
- Karatza P., Panos P., Georgopoulou E. & Frillingos S. (2006). Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix. *J Biol Chem*, **281**, 52, 39881-90.
- Karatza P. & Frillingos S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol Membr Biol*, **22**, 251-261.
- Karena E. & Frillingos S. (2011). The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **286**, 45, 39595-605.
- Karena E. & Frillingos S. (2009). Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. *J Biol Chem*, **284**, 24257–24268.
- Kim J., Yamamoto F., Gondo S., Yanase T., Mukai T. & Maeda M. (2009). 6-Deoxy-6-[¹³¹I]iodo-L-ascorbic acid for the in vivo study of ascorbate: autoradiography, biodistribution in normal and hypolipidemic rats, and in tumor-bearing nude mice. *Biol Pharm Bull*, **32**, 11, 1906-11.
- Kim K.S., Pelton J.G., Inwood W.B., Andersen U., Kustu S. & Wemmer D.E. (2010). The Rut pathway for pyrimidine degradation: novel chemistry and toxicity problems. *J Bacteriol*, **192**, 16, 4089-102.
- Koronakis V., Sharff A., Koronakis E., Luisi B. & Hughes C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, **405**, 6789, 914-9.
- Kosti V., Lambrinidis G., Myriantopoulos V., Diallinas G. & Mikros E. (2012). Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. *PLoS One*, **7**, 7, e41939.
- Kosti V., Papageorgiou I. & Diallinas G. (2010). Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter

- selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol Biol*, **397**, 5, 1132-43.
- Koukaki M., Giannoutsou E., Karagouni A. & Diallinas G. (2003). A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J Microbiol Methods*, **55**, 3, 687-95.
- Koukaki M., Vlanti A., Goudela S., Pantazopoulou A., Gioule H., Tournaviti S. & Diallinas G. (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J Mol Biol*, **350**, 3, 499-513.
- Kowalczyk L., Ratera M., Paladino A., Bartoccioni P., Errasti-Murugarren E., Valencia E., Portella G., Bial S., Zorzano A., Fita I., Orozco M., Carpena X., Vázquez-Ibar J.L. & Palacín M. (2011). Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 10, 935-40.
- Kraupp M. & Marz R. (1995). Nucleobase and nucleoside transport in mammalian cells. *Wien Klin Wochenschr*, **107**, 22, 677-80.
- Krishnamurthy H., Piscitelli C.L. & Gouaux E. (2009). Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature*, **459**, 7245, 347–355.
- Kryptou E., Kosti V., Amillis S., Myriantopoulos V., Mikros E. & Diallinas G. (2012). Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 transporter. *J Biol Chem*, **287**, 44, 36792-803.
- Kulikowska E., Kierdaszuk B. & Shugar D. (2004). Xanthine, xanthosine and its nucleotides: solution structures of neutral and ionic forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *Acta Biochim Pol*, **51**, 2, 493-531.
- Laude A.J. & Prior I.A. (2004). Plasma membrane microdomains: organisation, function and trafficking. *Mol Membr Biol*, **21**, 3, 193-205.
- Lavecchia A. & Di Giovanni C. (2013). Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Curr Med Chem*, **20**, 23, 2839-60.
- Law C.J., Yang Q., Soudant C., Maloney P.C. & Wang N. (2007). Kinetic evidence is consistent with the rocker-switch mechanism of membrane transport by GltT. *Biochemistry*, **46**, 43, 12190–12197.

- Lee E.W., Lai Y., Zhang H. & Unadkat J.D. (2006). Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem*, **281**, 24, 16700-6.
- Lemuh N.D., Diallinas G., Frillingos S., Mermelekas G., Karagouni A.D. & Hatzinikolaou D.G. (2009). Purification and partial characterization of the xanthine-uric acid transporter (UapA) of *Aspergillus nidulans*. *Protein Expr Purif*, **63**, 1, 33-9.
- Leung J., Cameron A.D., Diallinas G. & Byrne B. (2012). Stabilizing the heterologously expressed uric acid-xanthine transporter UapA from the lower eukaryote *Aspergillus nidulans*. *Mol Membr Biol*, **30**, 1, 32-42.
- Lingwood D. & Simons K. (2010). Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle. *Science*, **327**, 46-50.
- Lluis M.W., Godfroy J.I. 3rd & Yin H. (2013). Protein engineering methods applied to membrane protein targets. *Protein Eng Des Sel*, **26**, 2, 91-100.
- Lockington R.A., Sealy-Lewis H.M., Scazzocchio C. & Davies R.W. (1985). Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **33**, 2, 137-49.
- Loewen S.K., Ng A.M., Mohabir N.N., Baldwin S.A., Cass C.E. & Young J.D. (2003). Functional characterization of a H⁺/nucleoside co-transporter (CaCNT) from *Candida albicans*, a fungal member of the concentrative nucleoside transporter (CNT) family of membrane proteins. *Yeast*, **20**, 8, 661-75.
- Loewen S.K., Yao S.Y., Slugoski M.D., Mohabir N.N., Turner R.J., Mackey J.R., Weiner J.H., Gallagher M.P., Henderson P.J., Baldwin S.A., Cass C.E. & Young J.D. (2004). Transport of physiological nucleosides and anti-viral and anti-neoplastic nucleoside drugs by recombinant *Escherichia coli* nucleoside-H(+) cotransporter (NupC) produced in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Membr Biol*, **21**, 1, 1-10.
- López-Villavicencio M., Debets A.J., Slakhorst M., Giraud T. & Schoustra S.E. (2013). Deleterious effects of recombination and possible nonrecombinatorial advantages of sex in a fungal model. *J Evol Biol*, **26**, 9, 1968-78.

- Lu F., Li S., Jiang Y., Jiang J., Fan H., Lu G., Deng D., Dang S., Zhang X., Wang J. & Yan N. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, **472**, 7342, 243-6.
- Ma D., Lu P., Yan C., Fan C., Yin P., Wang J. & Shi Y. (2012). Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature*, **483**, 7391, 632-6.
- MacGurn J.A., Hsu P.C. & Emr S.D. (2012). Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem*, **81**, 231-59.
- Madej M.G., Soro S.N. & Kaback H.R. (2012). Apo-intermediate in the transport cycle of lactose permease (LacY). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 44, E2970-8.
- Mansfield T.A., Schultes N.P. & Mourad G.S. (2009). AtAzc1 and AtAzc2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, **583**, 2, 481-6.
- Martinussen J., Schallert J., Andersen B. & Hammer K. (2001). The pyrimidine operon pyrRBP-carA from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, **183**, 9, 2785-94.
- Mäser P., Sütterlin C., Kralli A. & Kaminsky R. (1999). A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science*, **285**, 5425, 242-4.
- Mathie A., Al-Moubarak E. & Veale E.L. (2010). Gating of two pore domain potassium channels. *J Physiol*, **588**, Pt 17, 3149-56.
- Maurino V.G., Grube E., Zielinski J., Schild A., Fischer K. & Flügge U.I. (2006). Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **47**, 10, 1381-93.
- McNulty A.L., Stabler T.V., Vail T.P., McDaniel G.E. & Kraus V.B. (2005). Dehydroascorbate transport in human chondrocytes is regulated by hypoxia and is a physiologically relevant source of ascorbic acid in the joint. *Arthritis Rheum*, **52**, 9, 2676-85.
- Meintanis C., Karagouni A.D. & Diallinas G. (2000). Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Mol Membr Biol*, **17**, 1, 47-57.
- Mermelekas G., Georgopoulou E., Kallis A., Botou M., Vlantos V. & Frillingos S. (2010). Cysteine-scanning analysis of helices TM8, TM9a, and TM9b and

- intervening loops in the YgfO xanthine permease: a carboxyl group is essential at ASP-276. *J Biol Chem*, **285**, 45, 35011-20.
- Minato Y., Ghosh A., Faulkner W.J., Lind E.J., Schesser Bartra S., Plano G.V., Jarrett C.O., Hinnebusch B.J., Winogrodzki J., Dibrov P. & Häse C.C. (2013). Na⁺/H⁺ antiport is essential for *Yersinia pestis* virulence. *Infect Immun*, **81**, 9, 3163-72.
- Mirza O., Guan L., Verner G., Iwata S. & Kaback HR. (2006). Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. *EMBO J*, **25**, 6, 1177-83.
- Mitchell P. (1963). Molecule, group and electron translocation through natural membranes. *Biochem Soc Symp*, **22**, 142–168.
- Möhlmann T., Mezher Z., Schwerdtfeger G. & Neuhaus H.E. (2001). Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). *FEBS Lett*, **509**, 3, 370-4.
- Molina-Arcas M., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (2009). Nucleoside Transporter Proteins. *Current Vascular Pharmacology*, **7**, 426-434.
- Nayak T., Szewczyk E., Oakley C.E., Osmani A., Ukil L., Murray S.L., Hynes M.J., Osmani S.A. & Oakley B.R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **172**, 3, 1557-66.
- Oberai A., Ihm Y., Kim S. & Bowie J.U. (2006). A limited universe of membrane protein families and folds. *Protein Sci*, **15**, 7, 1723-34.
- Obrenovich M.E., Fan X., Satake M., Jarvis S.M., Reneker L., Reddan J.R., Monnier V.M. (2006). Relative suppression of the sodium-dependent Vitamin C transport in mouse versus human lens epithelial cells. *Mol Cell Biochem*, **293**, 1-2, 53-62.
- Ormazabal V., Zuñiga F.A., Escobar E., Aylwin C., Salas-Burgos A., Godoy A., Reyes A.M., Vera J.C. & Rivas C.I. (2010). Histidine residues in the Na⁺-coupled ascorbic acid transporter-2 (SVCT2) are central regulators of SVCT2 function, modulating pH sensitivity, transporter kinetics, Na⁺ cooperativity, conformational stability, and subcellular localization. *J Biol Chem*, **285**, 47, 36471-85.
- Ortiz D., Sanchez M.A., Quecke P. & Landfear S.M. (2009). Two novel nucleobase/pentamidine transporters from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **163**, 2, 67-76.

- Osmani A.H., Oakley B.R. & Osmani S.A. (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc*, **1**, 5, 2517-26.
- Pantazopoulou A & Diallinas G. (2006). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol Membr Biol*, **23**, 4, 337-48.
- Pantazopoulou A. & Diallinas G. (2007). Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol Rev*, **31**, 657–675.
- Papageorgiou I., Gournas C., Vlanti A., Amillis S., Pantazopoulou A. & Diallinas G. (2008 β). Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol*, **382**, 5, 1121-35.
- Papageorgiou I., de Koning H.P., Soteriadou K. & Diallinas G. (2008 α). Kinetic and mutational analysis of the *Trypanosoma brucei* NBT1 nucleobase transporter expressed in *Saccharomyces cerevisiae* reveals structural similarities between ENT and MFS transporters. *Int J Parasitol*, **38**, 6, 641-53.
- Papakostas K., Georgopoulou E. & Frillingos S. (2008). Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. *J Biol Chem*, **283**, 20, 13666-78.
- Papakostas K. & Frillingos S. (2012). Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **287**, 19, 15684-95.
- Pastor-Anglada M., Molina-Arcas M., Casado F.J., Bellosillo B., Colomer D. & Gil J. (2004). Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, **18**, 3, 385-93.
- Patak P., Willenberg H.S. & Bornstein S.R. (2004). Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocr Res*, **30**, 4, 871-5.
- Patlak C.S. (1957). Contributions to the theory of active transport: II. The gate type non-carrier mechanism and generalizations concerning tracer flow, efficiency, and measurement of energy expenditure. *Bull Math Biophys*, **19**, 209–235.

- Perez C., Koshy C., Yildiz O. & Ziegler C. (2012). Alternating-access mechanism in conformationally asymmetric trimers of the betaine transporter BetP. *Nature*, **490**, 7418, 126-30.
- Podgorska M., Kocbuch K. & Pawelczyk T. (2005). Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol*, **52**, 4, 749-58.
- Poncet N. & Taylor P.M. (2013). The role of amino acid transporters in nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **16**, 1, 57-65.
- Pontecorvo G. (1952). Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. *Nature*, **170**, 4318, 204-5.
- Pontecorvo G., Roper J.A., Hemmons L.M., Macdonald K.D. & Bufton A.W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, **5**, 141-238.
- Qiu S., Li L., Weeber E.J. & May J.M. (2007). Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res*, **85**, 5, 1046-56.
- Radestock S. & Forrest L.R. (2011). The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *J Mol Biol*, **407**, 698-715.
- Rajan D.P., Huang W., Dutta B., Devoe L.D., Leibach F.H., Ganapathy V. & Prasad P.D. (1999). Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun*, **262**, 762-768.
- Rege T.A. & Hagood J.S. (2006). Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 10, 991-9.
- Ren Q., Chen K. & Paulsen I.T. (2007). TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Res*, **35**, D274.
- Ressl S., Terwisscha van Scheltinga A.C., Vonnrhein C., Ott V. & Ziegler C. (2009). Molecular basis of transport and regulation in the Na⁽⁺⁾/betaine symporter BetP. *Nature*, **458**, 7234, 47-52.
- Ringvold A., Anderssen E. & Kjønniksen I. (2000). Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 1, 20-3.

- Robak T. & Robak P. (2012). Purine nucleoside analogs in the treatment of rarer chronic lymphoid leukemias. *Curr Pharm Des*, **18**, 23, 3373-88.
- Rumsey S.C., Daruwala R., Al-Hasani H., Zarnowski M.J., Simpson I.A. & Levine M. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus oocytes* and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, **275**, 36, 28246-53.
- Rumsey S.C., Kwon O., Xu G.W., Burant C.F., Simpson I. & Levine M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem*, **272**, 30, 18982-9.
- Rumsey S.C., Welch R.W., Garraffo H.M., Ge P., Lu S.F., Crossman A.T., Kirk K.L. & Levine M. (1999). Specificity of ascorbate analogs for ascorbate transport. Synthesis and detection of [(125)I]6-deoxy-6-iodo-L-ascorbic acid and characterization of its ascorbate-specific transport properties. *J Biol Chem*, **274**, 33, 23215-22.
- Saier M.H. Jr., Beatty J.T., Goffeau A., Harley K.T., Heijne W.H., Huang S.C., Jack D.L., Jähn P.S., Lew K., Liu J., Pao S.S., Paulsen I.T., Tseng T.T., Virk P.S. (1999). The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **1**, 2, 257-79.
- Saier M.H. Jr. (2000) Families of proteins forming transmembrane channels. *J Membr Biol*, **175**, 3, 165-80.
- Saier M.H., Yen M.R., Noto K., Tamang D.G. & Elkan C. (2009). The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res*, **37**, D274–D278.
- Sali A. & Blundell T.L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, **234**, 779–815.
- Salinovich O. & Montelaro R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **156**, 2, 341-7.
- Sanchez M.A., Tryon R., Pierce S., Vasudevan G. & Landfear S.M. (2004). Functional expression and characterization of a purine nucleobase transporter gene from *Leishmania major*. *Mol Membr Biol*, **21**, 1, 11-8.
- Sanchez M.A., Ullman B., Landfear S.M., Carter N.S. (1999). Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **274**, 2, 30244-9.

- Savini I., Rossi A., Pierro C., Avigliano L. & Catani M.V. (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, **34**, 3, 347-55.
- Scazzocchio C., Sdrin N. & Ong G. (1982). Positive regulation in a eukaryote, a study of the uaY gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the uaY--oxpA cluster. *Genetics*, **100**, 2, 185-208.
- Scazzocchio C. (2000). The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 126–131.
- Scazzocchio C. (2006). *Aspergillus* genomes: secret sex and the secrets of sex. *Trends Genet*, **22**, 10, 521-5.
- Schmidt A., Su Y.H., Kunze R., Warner S., Hewitt M., Slocum R.D., Ludewig U., Frommer W.B., Desimone M. (2004). UPS1 and UPS2 from *Arabidopsis* mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *J Biol Chem*, **279**, 43, 44817-24.
- Schultes N.P., Brutnell T.P., Allen A., Dellaporta S.L., Nelson T. & Chen J. (1996). Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. *Plant Cell*, **8**, 463-475.
- Schultz A.C., Nygaard P. & Saxild H.H. (2001). Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J Bacteriol*, **183**, 11, 3293-302.
- Schulze S., Köster S., Geldmacher U., Terwisscha van Scheltinga A.C. & Kühlbrandt W. (2010). Structural basis of Na⁽⁺⁾-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature*, **467**, 7312, 233-6.
- Screpanti E. & Hunte C. (2007). Discontinuous membrane helices in transport proteins and their correlation with function. *J Struct Biol*, **159**, 261–267.
- Sebastião A.M., Colino-Oliveira M., Assaife-Lopes N., Dias R.B. & Ribeiro J.A. (2013). Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology*, **64**, 97-107.
- Sengupta P., Baird B. & Holowka D. (2007). Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 5, 583-590.
- Shaffer, P.L., Goehring, A., Shankaranarayanan, A., & Gouaux, E. (2009). Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science*, **325**, 5943, 1010–1014.

- Shaikh, S.A., Li, J., Enkavi, G., Wen, P.C., Huang, Z., & Tajkhorshid, E. (2013). Visualizing functional motions of membrane transporters with molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, *52*, 4, 569-87.
- Shigeta S, Konno K, Yokota T, Nakamura K, De Clercq E. (1988). Comparative activities of several nucleoside analogs against influenza A, B, and C viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, *32*, 6, 906-11.
- Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N.G., Hadden, J.M., Sharples, D., Sansom, M.S., Iwata, S., Henderson, P.J., & Cameron, A. D. (2010). Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science*, *328*, 5977, 470–473.
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membrane. *Nature*, *387*, 6633, 569–572.
- Singer, S.J., & Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, *175*, 4023, 720–31.
- Slugoski MD, Ng AM, Yao SY, Lin CC, Mulinta R, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. (2009). Substituted cysteine accessibility method analysis of human concentrative nucleoside transporter hCNT3 reveals a novel discontinuous region of functional importance within the CNT family motif (G/A)XKX3NEFVA(Y/M/F). *J Biol Chem*, *284*, 25, 17281-92.
- Smirnova I, Kasho V, Kaback HR. (2011). Lactose permease and the alternating access mechanism. *Biochemistry*, *50*, 45, 9684-93.
- Smirnova I, Kasho V, Sugihara J, Choe JY, Kaback HR. (2009). Residues in the H⁺ translocation site define the pK_a for sugar binding to LacY. *Biochemistry*, *48*, 37, 8852-60.
- Soares-Silva I, Sa-Pessoa J, Myriantopoulos V, Mikros E, Casal M, *et al.* (2011) A substrate translocation trajectory in a cytoplasm-facing topological model of the monocarboxylate/H(+) symporter Jen1p. *Mol Microbiol*, *81*, 805–817.
- Sobczak I, Lolkema JS. (2005). The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, *69*, 4, 665-95.
- Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH, Nussbaum RL. (2002). Ascorbic-acid

- transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med*, 8, 5, 514-7.
- Stelmach P, & Robak T. (2013). Pathogenesis, prophylaxis and treatment of infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 67, 560-8.
- Suarez, T., De Queiroz, M.V., Oestreicher, N., & Scazzocchio, C. (1995) The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 14, 1453–1467.
- Sui, H., Fan, Z.Z., & Li, Q. (2012). Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *J Int Med Res*, 40, 2, 426-35.
- Sundaram M, Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. (2001). Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins. *Biochemistry*, 40, 8146-51.
- Sundaram M, Yao SY, Ng AM, Griffiths M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. (1998). Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem*, 273, 34 21519-25.
- Suzuki, S., & Henderson, P.J. (2006). The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *J Bacteriol*, 188, 9, 3329–3336.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., & Oakley, B.R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc*, 1, 6, 3111-20.
- Tang, L., Bai, L., Wang, W.H., & Jiang, T. (2010). Crystal structure of the carnitine transporter and insights into the antiport mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 4, 492-6.
- Tazebay UH, Sophianopoulou V, Cubero B, Scazzocchio C, Diallinas G. (1995). Post-transcriptional control and kinetic characterization of proline transport in germinating conidiospores of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett*, 132, 1-2, 27-37

- Tazebay UH, Sophianopoulou V, Scazzocchio C, Diallinas G. (1997). The gene encoding the major proline transporter of *Aspergillus nidulans* is upregulated during conidiospore germination and in response to proline induction and amino acid starvation. *Mol Microbiol*, 24, 1, 105-17.
- Thwaites, D.T., & Anderson, C.M. (2007). H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol*, 92, 4, 603-19.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., & Davies, R.W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26, 2-3, 205-21.
- Todd, R.B., Davis, M.A., & Hynes, M.J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc*, 2, 4, 811-21.
- Traub M, Flörchinger M, Piecuch J, Kunz HH, Weise-Steinmetz A, Deitmer JW, Ekkehard Neuhaus H, Möhlmann T. (2007). The fluorouridine insensitive 1 (*fur1*) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 49, 5, 855-64.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F., & Hediger, M.A. (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399, 6731, 70-5.
- Turner RJ, Lu Y, Switzer RL. (1994). Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *J Bacteriol*, 176, 12, 3708-22.
- Valdez-Taubas J, Harispe L, Scazzocchio C, Gorfinkiel L, Rosa AL. (2004). Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 41, 1, 42-51.
- Varma S, Sobey K, Campbell CE, Kuo SM. (2009). Hierarchical contribution of N- and C-terminal sequences to the differential localization of homologous sodium-dependent vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochemistry*, 48, 13, 2969-80.
- Vasudevan G, Carter NS, Drew ME, Beverley SM, Sanchez MA, Seyfang A, Ullman B, Landfear SM. Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by

- rescue of a transport-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 17, 9873-8.
- Vickers MF, Young JD, Baldwin SA, Ellison MJ, Cass CE. (2001). Functional production of mammalian concentrative nucleoside transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol*, 18, 1, 73-9.
- Vieira, F.S., Corrêa, G., Einicker-Lamas, M., & Coutinho-Silva, R. (2010). Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? *Biol Cell*, 102, 7, 391-407.
- Visser F, Vickers MF, Ng AM, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. (2002). Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *J Biol Chem*, 277, 395-401.
- Vlanti A, Amillis S, Koukaki M, Diallinas G. (2006). A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J Mol Biol*, 357, 3, 808-19.
- Vlanti, A., & Diallinas, G. (2008). The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol Microbiol*, 68, 4, 959-977.
- Wallace LJ, Candlish D, De Koning HP. (2002). Different substrate recognition motifs of human and trypanosome nucleobase transporters. Selective uptake of purine antimetabolites. *J Biol Chem*, 277, 29, 26149-56.
- Wang Y, Huang Y, Wang J, Cheng C, Huang W, Lu P, Xu YN, Wang P, Yan N, Shi Y. (2009). Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462, 467-472.
- Wang Y, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. (2000). Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 2, 488-94.
- Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., & Prasad, P.D. (1999). Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochim Biophys Acta*, 1461, 1-9.
- Ward CP, Wong PE, Burchmore RJ, de Koning HP, Barrett MP. (2011). Trypanocidal furamide analogues: influence of pyridine nitrogens on trypanocidal

- activity, transport kinetics, and resistance patterns. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 5, 2352-61.
- Watanabe, A., Choe, S., Chaptal, V., Rosenberg, J.M., Wright, E.M., Grabe, M., & Abramson, J. (2010). The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature*, 468, 7326, 988-91.
- Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M.R., & Jund, R. (1990). The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. *Mol Microbiol*, 4, 585–596.
- Weyand, S., Shimamura, T., Beckstein, O., Sansom, M.S., Iwata, S., Henderson, P.J., & Cameron, A.D. (2011). The alternating access mechanism of transport as observed in the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *J Synchrotron Radiat*, 18, 20-23.
- Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K., Carpenter, E.P., Rutherford, N.G., Hadden, J.M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S.G., Hope, R.J., Norbertczak, H.T., Roach, P.C., Iwata, S., Henderson, P.J., & Cameron, A.D. (2008). Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science*, 322, 5902, 709–713.
- Williams L, Miller A. (2001). Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 659-688.
- Williams L1, Miller A.
- Wilson, T.H., & Ding, P.Z. (2001). Sodium-substrate cotransport in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1505, 1, 121.
- Wright, E.M., & Turk, E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*, 447, 5, 510-8.
- Wu X, Itoh N, Taniguchi T, Hirano J, Nakanishi T, Tanaka K. (2004). Stimulation of differentiation in sodium-dependent vitamin C transporter 2 overexpressing MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 4, 1159-64.
- Xiang, Z. (2006). Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Curr Protein Pept Sci*, 7, 3, 217-227.
- Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*, 1st Edition. Cambridge University Press.

- Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J.Y., Yoshida, Y., Ohta, K.Y., & Yuasa, H. (2010). Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. *J Biol Chem*, 285, 9, 6522-31.
- Yamashita, A., Singh, S.K., Kawate, T., Jin, Y., & Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, 437, 7056, 215–223.
- Yao SY, Ng AM, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. (2001). Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)- insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol Membr Biol*; 18: 161-7.
- Yao SY, Ng AM, Vickers MF, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. (2002). Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J Biol Chem*, 277, 28, 24938-48.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 41, 11, 973-81.
- Zimmerman MA, Tak E, Ehrentraut SF, Kaplan M, Giebler A, Weng T, Choi DS, Blackburn MR, Kam I, Eltzschig HK, Grenz A. (2013). Equilibrative nucleoside transporter (ENT)-1-dependent elevation of extracellular adenosine protects the liver during ischemia and reperfusion. *Hepatology*, 58, 5, 1766-78.

- Βιβλία

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science.
- Cooper G.M. (2000). *The Cell. A Molecular Approach.*, 2nd ed. Boston University. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Harold F.M. & Maloney P.C. (1996). *Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. Edited by F. C. Neidhardt. Washington: ASM Press, p. 293.

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H. & Matsudaira P. (2008). *Molecular Cell Biology*, 6th ed. New York: W.H. Freeman & Company.

Randall D., Burggren W. & French K. (2002). *Eckert animal physiology*, 4th ed. New York: W.H. Freeman.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Ιστοσελίδες

Ιστοσελίδα <http://staff.um.edu.mt/acus1/3Molgen.html>

Ιστοσελίδα της RCSB Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Ιστοσελίδα της Βάσης δεδομένων Ταξινόμησης Μεταφορέων (Transporter Classification Database) <http://www.tcdb.org/>

Ιστοσελίδα της διαδικτυακής εγκυκλοπαίδειας Βικιπαίδεια https://en.wikipedia.org/wiki/Active_transport

Ιστοσελίδα του εκδοτικού οίκου Pearson http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/index.html

Ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων UniprotKB <http://www.uniprot.org/>

Ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων OPM (Orientations of Proteins in Membranes database) <http://opm.phar.umich.edu/>

Ιστοσελίδα της MultAlin για στοίχιση αλληλουχιών <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

- Πρακτικά Συνεδρίων

Bowers K., Chow E., Xu H., O. Dror R., Eastwood M.P., Gregersen B.A., Klepeis J.L., Kolossvary I., Moraes M.A., Sacerdoti F.D., Salmon J.K., Shan Y. & Shaw D.E. (2006). *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, November 11–17, 2006.

Παράρτημα

Δημοσιεύσεις Διδακτορικής Διατριβής

Dynamic Elements at Both Cytoplasmically and Extracellularly Facing Sides of the UapA Transporter Selectively Control the Accessibility of Substrates to Their Translocation Pathway

Vasiliki Kosti, Ioannis Papageorgiou and George Diallinas*

Department of Botany,
Faculty of Biology,
University of Athens,
Panepistimioupolis,
Athens 15781, Greece

Received 17 December 2009;
received in revised form
17 February 2010;
accepted 19 February 2010
Available online
25 February 2010

In the UapA uric acid–xanthine permease of *Aspergillus nidulans*, subtle interactions between key residues of the putative substrate binding pocket, located in the TMS8–TMS9 loop (where TMS is transmembrane segment), and a specificity filter, implicating residues in TMS12 and the TMS1–TMS2 loop, are critical for function and specificity. By using a strain lacking all transporters involved in adenine uptake ($\Delta azgA \Delta fcyB \Delta uapC$) and carrying a mutation that partially inactivates the UapA specificity filter (F528S), we obtained 28 mutants capable of UapA-mediated growth on adenine. Seventy-two percent of mutants concern replacements of a single residue, R481, in the putative cytoplasmic loop TMS10–TMS11. Five missense mutations are located in TMS9, in TMS10 or in loops TMS1–TMS2 and TMS8–TMS9. Mutations in the latter loops concern residues previously shown to enlarge UapA specificity (Q113L) or to be part of a motif involved in substrate binding (F406Y). In all mutants, the ability of UapA to transport its physiological substrates remains intact, whereas the increased capacity for transport of adenine and other purines seems to be due to the elimination of elements that hinder the translocation of non-physiological substrates through UapA, rather than to an increase in relevant binding affinities. The additive effects of most novel mutations with F528S and allele-specific interactions of mutation R481G (TMS10–TMS11 loop) with Q113L (TMS1–TMS2 loop) or T526M (TMS12) establish specific interdomain synergy as a critical determinant for substrate selection. Our results strongly suggest that distinct domains at both sides of UapA act as selective dynamic gates controlling substrate access to their translocation pathway.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Aspergillus nidulans*; nucleobase ascorbate transporter (NAT) family; structure–function relationships; uric acid

Edited by J. Karn

Introduction

UapA, a high-affinity, high-capacity transporter for uric acid and xanthine in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans* is one of the most extensively studied, at the genetic and biochemical level, solute/H⁺ symporter.^{1–3} Chimeric construc-

tions with UapC (a kinetically distinguishable UapA paralogue)⁴ and randomly selected or rationally designed mutations, combined with green fluorescent protein (GFP)-based fluorescence microscopy and detailed kinetic analyses of functional mutants using a collection of purine analogues, have led to important conclusions concerning structure–function–specificity relationships in this permease.^{5–10} Of primary importance are the findings strongly supporting that the long amphiphilic loop linking transmembrane segments 8 and 9 (TMS8–TMS9) contains basic elements of the substrate translocation pathway.^{5,7,10} These are reflected in four irreplaceable amino acid residues (E356, D388, Q408, N409) and several other residues affecting

*Corresponding author. E-mail address:

diallina@biol.uoa.gr.

Abbreviations used: GFP, green fluorescent protein; TMS, transmembrane segment; NAT, nucleobase ascorbate transporter; ORF, open reading frame.

UapA function, substrate affinity or specificity (A363, E371, R373, G411, T416, R417). Several of these critical residues (Q408, N409, G411, T416, R417) define the so-called NAT (nucleobase ascorbate transporter) signature motif (residues 406–417) present in all UapA homologues constituting the NAT family.^{2–4} Kinetic evidence has strongly suggested that this motif interacts with the imidazole moiety of xanthine, uric acid or other UapA ligands.^{7,11} In this interaction, Q408 could make a direct H-bond with position N9 or C8=O of xanthine or uric acid, respectively, whereas N409 seems to be a dynamic element absolutely necessary for molecular movements associated with transport. Finally, G411 and T416 are important for narrowing the specificity of UapA to xanthine and uric acid, whereas R417 increases the affinity of UapA specifically for uric acid.^{7,11} An absolutely necessary functional role has also been assigned to E356, whereas the absolute need for D388 seems to be associated with a structural role rather than a functional one.¹⁰

A second important conclusion concerns three residues enlarging UapA specificity without affecting its kinetic behavior toward physiological substrates, uric acid and xanthine. These are T526 and F528 in TMS12 and Q113 in the short putative extracytoplasmic loop linking TMS1 and TMS2^{6,9,10} (see Fig. 1a). A weaker but similar effect on UapA specificity was also obtained with several rationally designed mutations along TMS1,¹⁰ some of which can also affect UapA function and turnover.¹² Allele-specific interactions and kinetic evidence have strongly suggested that differential positioning of TMS1 and TMS12 with respect to the TMS8–TMS9 region acts as a dynamic filter to allow or restrict access of different purines to the substrate binding pocket (discussed also later).¹⁰

Interestingly, UapA is probably unique among NAT homologues of known function with respect to its high affinity and capacity for uric acid transport.^{2,3} All other NAT members of prokaryotes and fungi show high affinity for either xanthine or uracil (<10 μM) but only moderate (>50 μM) or no affinity for uric acid. The only other NAT member showing high affinity for uric acid is the maize Lpe1 carrier.¹² Interestingly, known mammalian NAT homologues, which are Na⁺ rather than H⁺ symporters, are specific either for nucleobases (uracil and xanthine mostly) or for L-ascorbate.^{13,14} However, none of the characterized bacterial, plant or fungal NATs can transport ascorbate.^{2,3} The unique efficiency for uric acid recognition and transport of UapA seems to depend on specific synergistic interdomain interactions that cannot be reproduced in other NAT members or in chimeric molecules where TMS1, TMS12 or TMS8–TMS9 of UapA has been replaced by that of homologous carriers from fungi (UapC),⁹ bacteria (YgfO)⁹ or mammals (SVCT2) (S. Amillis and G. Diallinas, unpublished results).

Analogous rationally designed mutations and the substituted-cysteine accessibility method in the

Escherichia coli xanthine permease YgfO, a prototype bacterial member of the NAT family, have led to very similar conclusions with respect to the functional role of the TMS8–TMS9 region and in particular the NAT signature motif and the four functionally irreplaceable amino acid residues.^{15–18} However, in line with the finding that fine interdomain interactions in NAT carriers are protein-specific and critical for specificity, none of the YgfO mutations that correspond to the UapA specificity mutations has led to a carrier that can efficiently recognize and transport a purine other than xanthine.

In this work, we used a novel two-step genetic approach to isolate UapA versions that can efficiently transport adenine. Our results show that we obtained mutations defining novel elements of the UapA specificity/selectivity filter, including a putative cytoplasm-facing loop. These results are discussed with respect to the importance of interdomain synergy and the role of loops as dynamic gates at both sides of the transporter in substrate selection.

Results

Rationale of a novel genetic screen for UapA mutants able to transport adenine

Based on detailed kinetic analyses of the wild-type, single and double mutants, we have proposed a model that rationalizes UapA–substrate interactions.^{2,3,10,11} In brief, in the wild type, uric acid or xanthine enters into the putative substrate binding pocket, an essential part of which is made by TMS8–TMS9, and binds to specific residues with high affinity through two strong H-bonds implicating N1-H and N9 (xanthine) or N1-H and C8=O (uric acid) and a weaker bond involving C2=O. Purines, other than xanthine or uric acid, seem to be excluded from the wild-type substrate binding pocket due to steric and/or repulsive forces exerted by the positioning of specific residues in TMS1, in the TMS1–TMS2 loop and in TMS12, which thus collectively act as a molecular filter. All previously identified UapA residues that affect substrate binding and transport, and especially those mapping in the NAT signature motif, seem to be involved in interactions with the imidazole moiety of purines.^{7,9,10} We still ignore which part of UapA, or any other NAT member, interacts with the pyrimidine moiety of purines.

To approach this puzzle, we thought of selecting UapA mutants that would transport adenine, a purine that has a distinct pyrimidine moiety compared with the natural substrates of UapA. Considering the proposed UapA–substrate interaction model, two genetic modifications on the permease molecule should be satisfied to acquire high affinity for adenine: (1) the substrate binding pocket should be accessible to adenine and (2) an appropriately positioned residue should interact

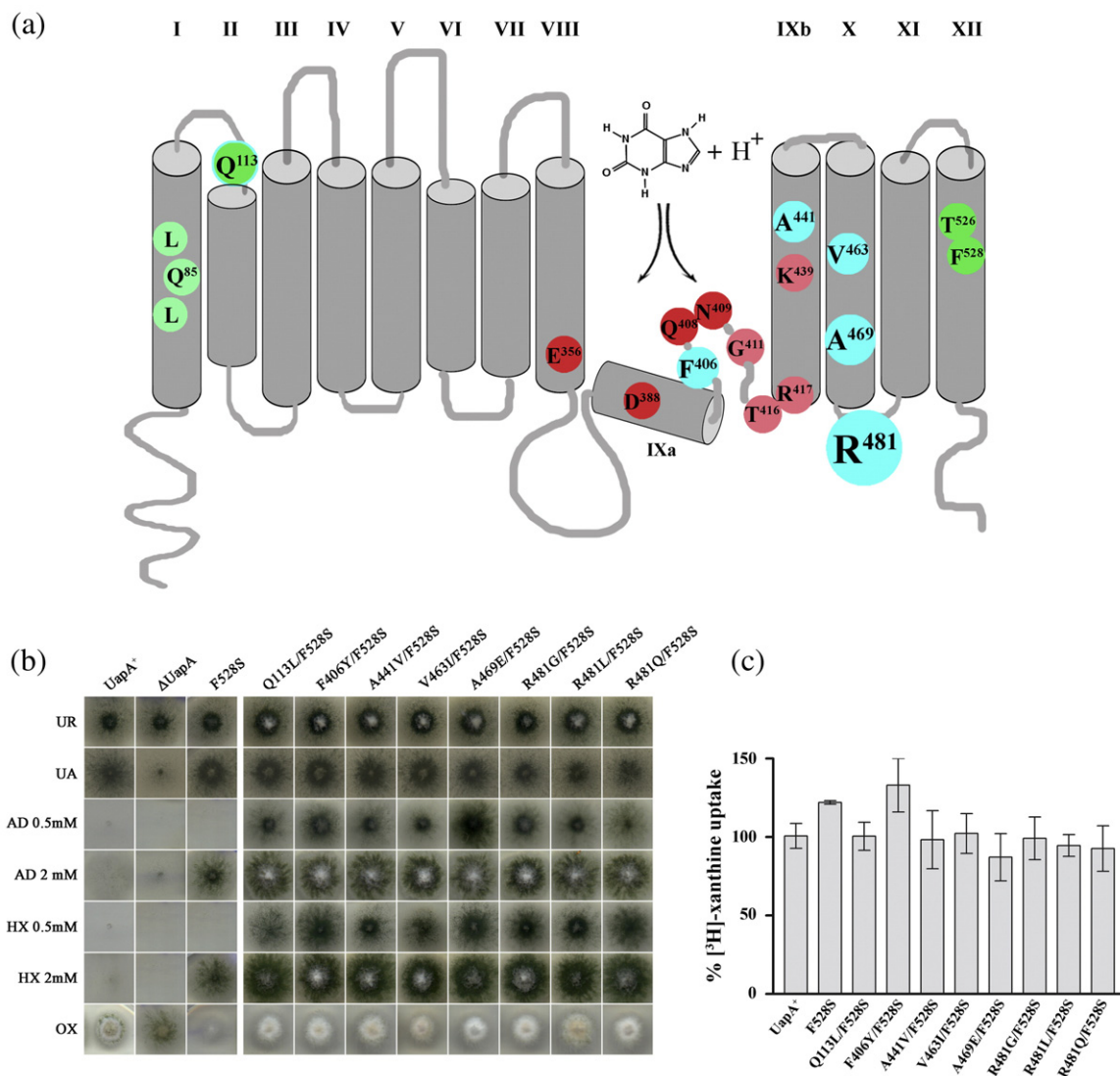


Fig. 1. (a) Topology of UapA and specificity mutations. Previously characterized residues affecting UapA function and/or specificity are marked in red (absolutely necessary for function), pink (affecting transport kinetics and specificity) or green (affecting specificity but not transport kinetics for physiological substrates). Lighter green signifies milder effects on UapA specificity. Residues in the TMS8–TMS9 loop (in red) are elements of the putative substrate binding site of UapA, whereas those in TMS1 and TMS12 (in green) are elements of a specificity filter restricting access of purines other than uric acid and xanthine to the *bona fide* substrate site. Mutations isolated in this work are highlighted in blue. R481 is emphasized in size to denote the high frequency (72%) of mutations concerning this residue. Latin numbers denote putative TMSs. (b) Growth phenotypes of strains expressing wild-type UapA⁺ or UapA-F528S (F528S) on purines as sole nitrogen sources (left panel). A strain with total deletion of the *uapA* locus (Δ UapA) is also shown as a negative control. Growth on urea (UR, 5 mM) is used as a control. Purines tested as nitrogen sources include uric acid (UA, 0.5 mM), adenine (AD, 0.5 and 2 mM) and hypoxanthine (HX, 0.5 and 2 mM). OX is oxypurinol (100 μ M), a toxic analogue of uric acid/xanthine that is taken up by UapA. Growth on xanthine has also been tested, and results are identical with those of UA (not shown). Growth tests were performed at 37 °C and pH 6.8, which are the standard growth conditions of *A. nidulans* in the laboratory. Similar results were obtained at 25 °C. Note that UapA expression mediates normal growth on UA (normal colony growth rate and conidiation typically observed in minimal medium) and partial sensitivity to OX (reduced colony diameter and lack of conidiation) but cannot support growth on AD or HX. Expression of UapA-F528S leads to similar UapA⁺ growth on UA but also confers the ability for growth on high concentrations (2 mM) of AD or HX and oversensitivity to OX. Strain UapA-F528S was used to select for mutants growing on low AD (0.5 mM) concentrations. The identity, frequency and topology of mutations isolated are shown in Table 1 and in (a), whereas growth phenotypes of corresponding mutants on purines are shown in the right panel of (b). Notice that all new mutants isolated differ from the original strain (UapA-F528S) used for their selection in their ability to grow stronger on AD or HX, particularly evident at low concentrations of these purines (0.5 mM). (c) Relative ³H-labelled xanthine transport rates of the new mutants expressed as percentage of initial uptake rates (*V*) compared with the wild-type (UapA⁺) rate. Standard deviations in all experiments were always <20% of the mean values shown.

with the non-protonated N1 atom or the amide ($-\text{NH}_2$) groups of C6 or C2. The first condition is already satisfied by several previously isolated mutations, such as those concerning Q113 (TMS1–TMS2 loop), T526 or F528 (TMS12).¹⁰ These mutants grow equally well with *uapA*⁺ strains on standard uric acid and xanthine concentrations (>0.3 mM), but their growth on adenine or hypoxanthine necessitates higher concentrations (>1 – 2 mM) because the relevant binding affinities are very low (see Fig. 1b, left panel). Using one of these mutants (UapA-F528S), we wanted to obtain second-site mutations that will allow improved growth on lower concentrations (0.5 mM) of adenine. An additional prerequisite for this scheme was that the original mutant strain used should lack all other carriers that are able to transport adenine. This strain was made by introducing, through transformation, the *uapA*-F528S allele in a genetic background lacking all endogenous transporters mediating adenine transport ($\Delta uapC \Delta azgA \Delta fcyB$)¹⁹ (see Materials and Methods). UapA-F528S was selected among all available specificity mutants that perform very low-affinity adenine transport because it was the only one that in the $\Delta uapC \Delta azgA \Delta fcyB$ background showed practically no growth on adenine at concentrations <1 mM (see Fig. 1b). UV mutagenesis of the UapA-F528S/ $\Delta uapC \Delta azgA \Delta fcyB$ strain and selection for growth on 0.5 mM adenine as sole nitrogen source led to the isolation of 65 mutants.

Molecular and functional characterization of UapA mutants

After purification, all mutants were tested on various purines as nitrogen sources. All were capable of growth in all purines, at both 25 and 37 °C (not shown). The *uapA* open reading frame (ORF) of 28 of them was obtained by PCR and sequenced. In all cases, a single base substitution, besides the original F528S mutation, was detected within the *uapA* ORF (Table 1). The 28 mutations corresponded to 8 amino acid substitutions (Fig. 1a and Table 1). The great majority (71.4%) involved substitutions of R481, a residue located in the putative short loop linking TMS10 and TMS11 (Fig. 1a). Five mutations (17.1%) involved two residues, V463 and A469, located in TMS10. The remaining three were obtained once and involved residues Q113 (in the TMS1–TMS2 loop), F406 (in the NAT motif in TMS8–TMS9 loop) and A441 (in TMS9). Interestingly, mutation Q113L was also obtained previously as a mutation conferring UapA-mediated growth on 2 mM adenine. Figure 1b shows the growth phenotypes of the 8 mutants obtained. For most of them, growth on adenine or hypoxanthine was stronger at 2 mM compared with that at 0.5 mM, whereas growth on uric acid and xanthine was identical in the range 0.5–2.0 mM. A possible exception was mutant A469E/F528S, which seemed to grow significantly better than all other mutants at

Table 1. Topology and frequency of second-site specificity mutations obtained in mutant UapA-F528S

Amino acid substitution	Topology in UapA	Nucleotide change	Number obtained
Q113L	TMS1–TMS2 loop	CAG→CTG	1
F406Y	TMS8–TMS9 loop	TTT→TAT	1
A441V	TMS9	GCT→GTT	1
V463I	TMS10	GTC→ATC	2
A469E	TMS10	GCG→GAG	3
R481G	TMS10–TMS11 loop	CGG→GGG	1
R481Q	TMS10–TMS11 loop	CGG→CAG	14
R481L	TMS10–TMS11 loop	CGG→CTG	5
		CGG→CTA	
Total			28

TMS stands for predicted TMS of the UapA. Nucleotide changes are highlighted in bold.

0.5 mM adenine. These observations suggested that the mutants isolated might still have relatively low affinity for purines, other than the physiological substrates of UapA.

Uptake studies showed that all mutants have a very similar capacity for ³H-labelled xanthine influx compared with the UapA⁺ wild-type control (Fig. 1c). These activities were dependent on the H⁺ gradient of the plasma membrane, as evidenced from the transport inhibition by H⁺ gradient uncouplers (not shown). However, no measurable uptake of radiolabelled hypoxanthine was obtained (not shown). This apparent paradox of no detectable hypoxanthine uptake in mutants able to grow on this purine has also been obtained with several previously isolated mutants. These mutants were shown to exhibit very low hypoxanthine or adenine binding affinities ($K_i > 2$ mM), and thus it is technically impossible to detect hypoxanthine or adenine uptake in standard assays performed with concentrations of 0.2–2.0 μM radiolabelled purines.^{9,10} Similarly, the very low affinity of the novel mutants for purines other than uric acid or xanthine was confirmed by measuring K_i values of purines, pyrimidines and analogues (see below). Thus, the transport profile of all new isolates is typical of UapA mutants with relaxed specificity, exhibiting high-capacity transport but very low binding affinities for purines other than xanthine or uric acid.

Substrate binding profile of UapA mutants

A detailed kinetic profile, reflected in $K_{m/i}$ values, was established as previously described (see Materials and Methods) for all eight new mutations (Table 2). All mutations affected little the affinity of UapA for uric acid or xanthine ($K_{m/i}$ values of 0.8–15 μM) compared with either the wild-type protein or the original UapA-F528S mutant ($K_{m/i}$ of 3–11 μM). Mutations of R481 had the strongest effect as reflected in $K_{m/i}$ values for uric acid or xanthine reduced by 2- to 12-fold. Several mutants also showed a minor increase (up to 4-fold) in affinity for adenine, hypoxanthine or guanine compared with the original F528S strain, but their actual

Table 2. Substrate binding profile of specificity mutants obtained in F528S genetic background

Substrate/ligand	$K_{m/i}$ (μM)									
	UapA ⁺	F528S	Q113L/ F528S	F406Y/ F528S	A441V/ F528S	V463I/ F528S	A469E/ F528S	R481G/ F528S	R481L/ F528S	R481Q/ F528S
Xanthine	8	3	3	1.3	6	13	1.5	1.6	1.0	0.8
Uric acid	7	11	4	6	15	12	2	0.9	1.4	1.3
Adenine	NI	NI	~2000	~2000	~1800	NI	~2000	NI	NI	NI
Hypoxanthine	NI	~2000	~1500	~2000	~1100	NI	~1800	~2000	~1600	~1600
Guanine	NI	~2000	982	~1000	500	NI	500	NI	NI	NI
Uracil	NI	~2000	77	322	123	386	127	75	113	35
1-Methyl-xanthine	280	420	820	~1000	88	~1000	300	247	851	151
2-Thio-xanthine	63	63	16	59	20	38	100	10	12	8
3-Methyl-xanthine	28	24	5	7	10	57	30	14	3	4
6-Thio-xanthine	350	92	9	50	22	56	20	13	4	8
7-Methyl-xanthine	NI	~1000	46	274	92	210	88	89	115	48
8-Methyl-xanthine	100	45	8	9	10	33	10	9	7	4
9-Methyl-xanthine	200	345	452	302	662	~1000	~1000	~1000	NI	161
Oxypurinol	100	45	6	25	9	31	22	3	3	10

$K_{m/i}$ values were determined as described in Materials and Methods. NI indicates no inhibition (90%–100% uptake). The '~' symbol stands for values >1000 μM that were approximately estimated. Results are averages of at least three independent experiments with three replicates for each concentration point. Standard deviation was <20%.

affinities for these purines were still very low ($K_{m/i}$ > 500 μM). This was in agreement with growth tests showing that full growth on adenine or hypoxanthine was only achieved at 2 mM. These results show that the mutants isolated have an increased capacity for adenine or hypoxanthine accumulation and most probably for several other nucleobases, which, however, is not due to a significant increase in corresponding binding affinities. This is highlighted mostly in mutants of R481, which show no or very little measurable affinity for these purines despite growing strongly on adenine or hypoxanthine (Table 2).

Interestingly, all mutants showed a tendency of increased binding affinities for uracil, oxypurinol and several xanthine analogues with bulky substitutions at positions 2, 3, 7 and 8. None of the mutations, however, increases the affinity of UapA for analogues substituted at positions N1 and N9, which are proposed to be absolutely critical for direct interactions with the substrate binding site¹⁰ (Table 2). Among all mutants, those concerning R481 showed the highest increase in UapA affinities for uracil, oxypurinol and bulky xanthine analogues. This picture not only supported the proposed model on the importance of the different positions in the purine ring for binding to the substrate pocket but also resembled the effect of previously isolated specificity mutations mapping in the TMS1–TMS2 loop and in TMS12.^{2,3,9,10}

Additive effects of novel mutations and F528S

We constructed by genetic transformation strains expressing the novel *uapA* mutation alleles in the absence of F528S. In all new strains, *uapA* alleles were expressed from their endogenous promoter from plasmids integrated in single or multiple copies (see Materials and Methods). Figure 2 and Table 3 show the analysis of these strains. In the

absence of F528S, all mutants, in single- or multiple-copy plasmid versions, showed nearly wild-type growth on uric acid or xanthine, similar to that also obtained in the presence of F528S. In contrast, growth on other purines was significantly different from that obtained in the presence of F528S. In particular, all mutants arising from single-copy plasmid integration, besides A441V, retained very little or even lost the ability for growth on 0.5 mM adenine or hypoxanthine. In some mutants, but not those concerning R481 and A441, growth on adenine or hypoxanthine was stronger in multiple-copy plasmid mutants. Most single-copy plasmid mutants, besides F406Y and V463I, could grow well, similar to F528S, at elevated adenine or hypoxanthine concentrations (2 mM). The F406Y and V463I mutants were also more resistant to oxypurinol, resembling a control strain lacking UapA activity.

Uptake studies showed that none of the mutations significantly affected UapA-mediated, H⁺-dependent transport of ³H-labelled xanthine (Fig. 2b and not shown). Furthermore, no measurable uptake of radiolabelled hypoxanthine was obtained (not shown), predicting that all single mutants exhibit very low binding affinities for purines other than their natural substrates. This was confirmed by directly measuring K_i values of purines, pyrimidines and analogues. Table 3 shows the substrate binding profile of the novel mutants established in the absence of F528S. It was clear that this is different from the one obtained in the genetic background of the F528S mutation. Affinities for xanthine and uric acid were close to that of the wild-type protein (2- to 3-fold differences), with the exception of V463I and R481Q, which have K_m values for xanthine reduced by 6- and 9-fold, respectively, and A469E, which has a K_i value for uric acid increased by 8-fold. A very moderate increase in the affinity for adenine was obtained only for some mutants (V463I, A469E), whereas there is a stronger and more general trend

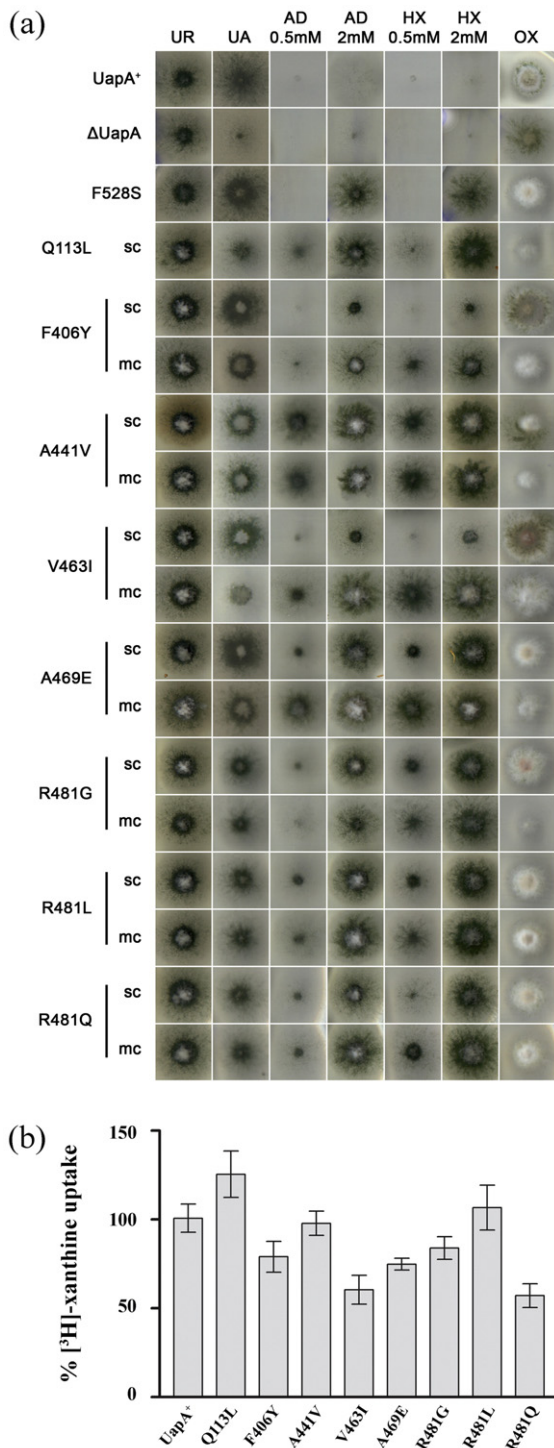


Fig. 2. (a) Growth tests of the novel mutations in the absence of the original substitution on different purines as nitrogen sources. Control strains and growth conditions are described in Fig. 1b. (b) Relative ³H-labelled xanthine transport rates of single-copy novel mutations expressed as percentage of initial uptake rates (*V*) compared with the wild-type (UapA⁺) rate, as described in Fig. 1c.

for moderately increased affinities for hypoxanthine, guanine, uracil and xanthine analogues with bulky substitutions at positions 2, 3, 7 and 8, but not for analogues substituted at positions 1 and 9. For

several mutants, this increase was smaller than that observed in the F528S genetic background. On the whole, however, affinities for purines other than uric acid and xanthine remain very low (>700 μM), in agreement with the observation that all single-copy plasmid mutants, besides A441V, could only grow well on adenine or hypoxanthine at 2 mM (see Fig. 2). The only notable exception was mutant A441V, which showed a rather moderate affinity for hypoxanthine (260 μM) that could in principle partially explain growth on 0.5 mM hypoxanthine. However, the same mutant has no detectable affinity for adenine, despite its ability to grow on this purine at 0.5 mM, prompting us to believe that, even in that case, growth on purines other than uric acid or xanthine is due to increased capacity of transport *per se*, rather than increased substrate binding affinities (see later).

Functional consequences of mutations affecting the TMS10–TMS11 loop

To further investigate the role of the TMS10–TMS11 loop and in particular that of residue R481, we followed a dual approach: First, we constructed double mutants by combining a selected mutation in R481 (R481G) with other mutations affecting UapA specificity, located in the TMS1–TMS2 loop (Q113L) or in TMS12 (T526M). Second, we made two UapA mutations that either delete R481 (ΔR481) or relocate its position within the TMS10–TMS11 loop by introducing two small and flexible amino acid residues (Ala–Gly) just upstream from it (AGR481).

The double mutants Q113L/R481G and R481G/T526M showed growth phenotypes very similar to R481G/F528S (i.e., they can grow on low adenine or hypoxanthine concentration; Fig. 3). This suggested that the effects of R481G and Q113L or T526M are additive, similar to R481G and F528S. The additive effect of R481G with all three previously described mutations affecting UapA specificity was also reflected in substrate binding affinities. Table 4 shows that the binding affinities for most purines of Q113L/R481G, and especially R481G/T526M, were significantly increased compared with the single mutants. More specifically, R481G/T526M shows high affinity for uracil (32 μM), moderate affinity for hypoxanthine and guanine (179–225 μM) and the highest affinity, albeit still low, for adenine (~1 mM), among all mutants described herein and previously. It also has increased affinity for xanthine, oxypurinol and nearly all xanthine analogues tested, with 9-methyl-xanthine being a notable exception.

The ΔR481 and AGR481 mutations inactivated UapA function, as the corresponding mutants could not grow in any purine as sole nitrogen source (Fig. 3a). To investigate the basis of phenotype, we analysed these mutants by making use of a GFP tag (addition of GFP at the C-terminus of UapA has no effect on UapA subcellular expression or on its function²⁰). Figure 3b shows that in both mutants,

Table 3. Substrate binding profile of specificity mutants in the absence of F528S

Substrate/ligand	$K_{m/i}$ (μM)								
	UapA ⁺	Q113L	F406Y	A441V	V463I	A469E	R481G	R481L	R481Q
Xanthine	8	4	3	4	1.3	8.5	18	3	0.9
Uric acid	7	10	11	10	12	58	19	6	3.5
Adenine	NI	NI	NI	NI	~1700	~1500	NI	NI	~2500
Hypoxanthine	NI	260	~2000	260	900	880	NI	NI	~1000
Guanine	NI	~1000	~2000	NI	750	NI	NI	NI	~700
Uracil	NI	413	~2000	413	268	380	~1000	NI	~1200
1-Methyl-xanthine	280	280	420	280	300	500	200	150	200
2-Thio-xanthine	63	10	63	10	60	280	90	43.1	10.1
3-Methyl-xanthine	28	9	24	9	7	32.1	27	18.5	5.1
6-Thio-xanthine	350	38	92	38	132	300	56.6	59.1	3.7
7-Methyl-xanthine	NI	~1000	~1000	~1000	270	690	140	65.3	41.3
8-Methyl-xanthine	100	110	45	110	100	61	100	10	2.5
9-Methyl-xanthine	200	NI	345	NI	379	NI	124	286	200
Oxypurinol	100	29	8.2	14.4	96.5	18.4	14.3	14.4	25.8

For details, see Table 2.

UapA-GFP molecules label vacuolar lumens or other internal structures but not the plasma membrane—a picture characteristic of misfolded or

extremely unstable transporters. The simplest explanation of this result is that altering the length of the TMS10–TMS11 loop destabilizes UapA.

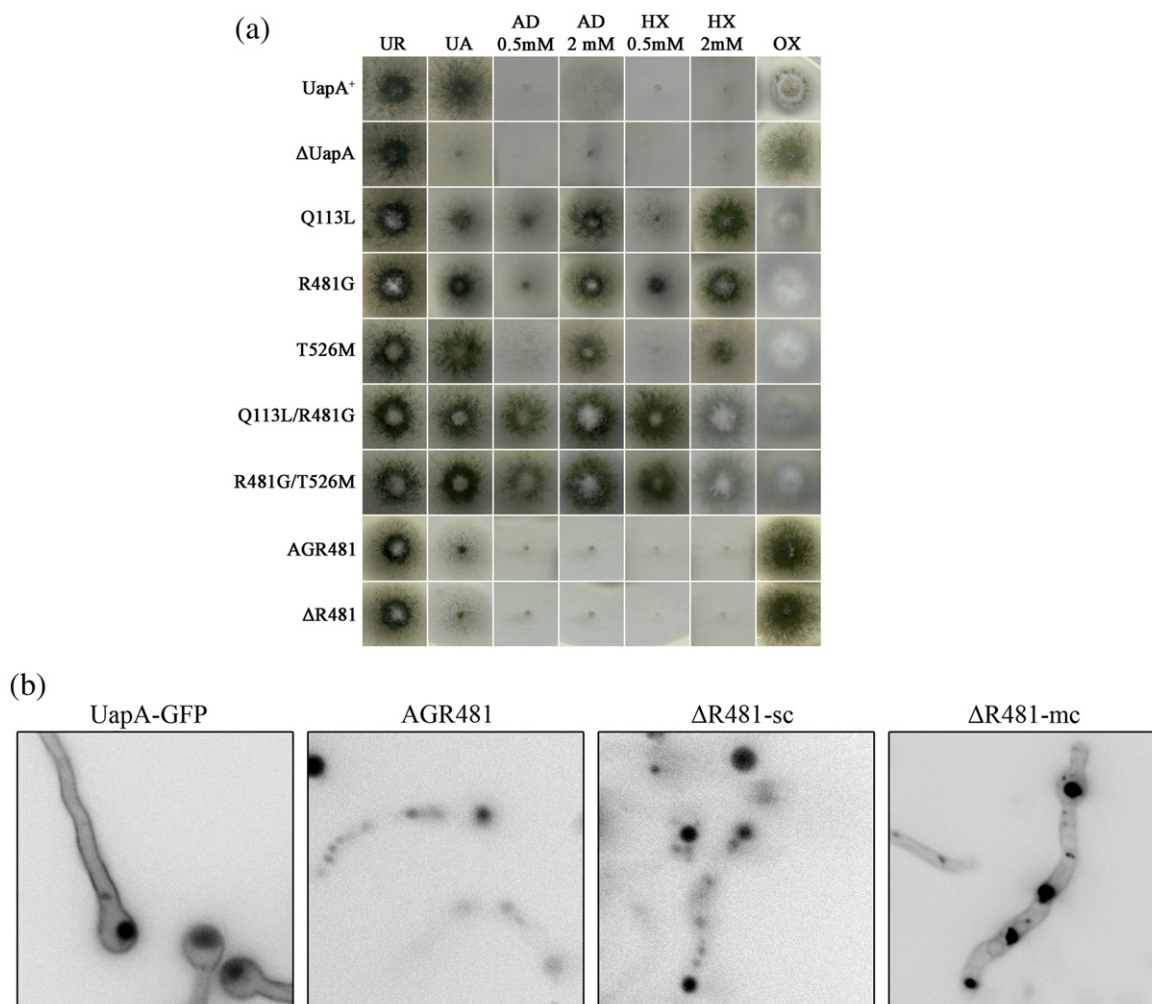


Fig. 3. (a) Growth tests of the constructed mutations on different purines as nitrogen sources. Control strains and growth conditions are described in Fig. 1b. (b) Epifluorescence microscopy of a wild-type (UapA-GFP) control and AGR481 and Δ R481 mutants. Strains were grown as described by Koukaki *et al.*⁷ In all mutant strains, UapA was weakly expressed in the plasma membrane and appeared mostly at the vacuoles. For Δ R481, two strains are shown carrying a single copy (Δ R481-sc) or multiple copies (Δ R481-mc) of the mutated allele. All images have the same magnification.

Table 4. Substrate binding profile of rationally designed double mutations

Substrate/ligand	$K_{m/i}$ (μ M)					
	UapA ⁺	Q113L	R481G	T526M ^a	Q113L/R481G	R481G/T526M
Xanthine	8	8	18	5	1.3	1.2
Uric acid	7	7	19	12	2.5	8
Adenine	NI	NI	NI	~2500	NI	980
Hypoxanthine	NI	NI	NI	~1700	1300	179
Guanine	NI	NI	NI	ND	NI	225
Uracil	NI	NI	~1000	76/>1000	536	32
1-Methyl-xanthine	280	280	200	288	~300	~40
2-Thio-xanthine	63	63	90	8	17	13
3-Methyl-xanthine	28	28	27	11	8	5.5
6-Thio-xanthine	350	350	57	6	4.5	4
7-Methyl-xanthine	NI	NI	140	~1000	NI	361
8-Methyl-xanthine	100	100	100	6	4	4
9-Methyl-xanthine	200	200	124	202	NI	~1000
Oxypurinol	100	29	14	22	11	2

For details, see Table 2. ND indicates not determined.

^a Papageorgiou *et al.*¹⁰

Discussion

UapA mutants with increased transport capacity for non-physiological substrates

Our original goal was to design and test a direct genetic screen for obtaining UapA mutations conferring a specific increase in adenine affinity. Considering that adenine has a pyrimidine moiety very distinctive from that of other purines, we reasoned that such mutations would lead us to the identification of amino acid residues, within the UapA substrate binding pocket, that could directly interact with the so-called amidine group. Our results show that instead of isolating mutants with increased affinity specifically for adenine, we obtained mutations that increase the accumulation of purines other than the physiological substrates of UapA. As this increase concerns solely the transport of purines other than uric acid or xanthine, it cannot be due to an increase in the amount of permease present in the plasma membrane. This in turn suggests that the novel mutations increase the *bona fide* transport capacity of UapA *specifically* for purines that cannot be transported by the wild type or the F528S version of UapA. Importantly, despite a moderate increase in the binding of hypoxanthine or guanine conferred by mutations, all novel mutants still retain low affinities for purines (>260 μ M) other than uric acid or xanthine, independently of the presence of mutation F528S. Particularly for adenine, all mutants showed very low binding affinities (>1.5 mM). This observation further supports the idea that the novel mutations lead to increased intrinsic transport capacity of UapA, specifically for purines other than uric acid or xanthine, rather than increased relative binding affinities. In that sense, the novel mutations are very similar to previously characterized substitutions located in TMS12 and in the TMS1–TMS2 loop.

Residues in TMS9 and TMS10 might line the substrate translocation pathway

Unlike mutations concerning Q113, F406 and R481, which map in putative loops and have a pronounced effect on UapA transport specificity particularly in the presence of the F528S substitution, mutations A441V, V463I and A469E map in TMSs and seem to affect UapA transport specificity even in the absence of mutation F528S (compare growth on 0.5 mM adenine in Figs. 1 and 2). This is evident in mutants arising from multiple-copy plasmid integrations, but at least for A441V, this is also apparent in single-copy transformants (see growth on 0.5 mM adenine in Fig. 2). Furthermore, these mutations also lead to more drastic increases in the binding affinities of several nucleobases in the absence of mutation F528S, rather than in its presence (compare values in Tables 3 and 4). Despite an apparent additive effect of mutations in TMS10 (V463I or A469E) with F528S on the capacity of UapA to transport adenine or hypoxanthine, the effect of TMS9 or TMS10 mutations is not additive with that of F528S with respect to UapA specificity. These observations suggest that residues in TMS9 or TMS10 act independently to contribute in substrate specificity. Given their nature, we can speculate that the corresponding mutated residues contribute through specific van der Waals forces to the progressive sliding or fitting of purines within the substrate translocation pathway. Support for this comes from comparison with other NATs of known specificities. The residue corresponding to V463 in other NAT members is either a Val or an Ile, which, together with the mutation isolated in UapA (V463I), shows that these amino acids might be the only functionally permissive residues at this position. Residue A469 is more variable, being replaced in other NATs by Arg, Ser or Lys. Interestingly, NAT homologues with no (e.g., bacterial members Ygfo, YicE and PbuX) or moderate (e.g., UapC of *A. nidulans* and *Aspergillus fumigatus* or Xut1 of *Candida*

albicans) affinity for uric acid do not possess an Ala residue. The possible contribution of Ala469 in uric acid binding in UapA is supported by the fact that mutation A469E significantly affects (8.5-fold reduction) uric acid binding (see Table 3). Finally, A441 is relatively well conserved, although some NAT members have other small amino acid residues at this position (Gly, Ser, Thr, Pro). The role of the above residues on UapA function could not have been predicted by a rational design of mutations.

Synergy of loops TMS1–TMS2, TMS8–TMS9 and TMS12 determines UapA specificity

We have previously provided evidence that very fine interactions between the TMS8–TMS9 loop, hosting basic elements of the substrate translocation pathway, and the TMS1–TMS2 loop or TMS12, two regions affecting substrate specificity, define the function of UapA, particularly with respect to substrate selection and binding affinity. Here, we obtained new unbiased evidence that TMS12 interacts functionally with the TMS8–TMS9 and TMS1–TMS2 loops. Mutations Q113L (TMS1–TMS2 loop) and F406Y (in the NAT motif in TMS8–TMS9 loop) promote increased transport capacity for adenine, hypoxanthine and probably other several nucleobases only when combined with F528S (TMS12). The additive phenotypes of these mutations are also reflected in differences in the $K_{m/i}$ values for several nucleobases (e.g., xanthine, uric acid, guanine, uracil) and nucleobase analogues. These results confirm that substitutions in these three domains additively inactivate the synergistic interactions responsible for the high substrate specificity of UapA.

Dynamic elements at both sides of UapA selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway

The great majority of mutants (20 of 28, ~72%) selected in the background of F528S concerned residue R481, located in the short putative cytoplasmic loop that links TMS10 with TMS11. This arginine residue is conserved only in fungal homologues, whereas in bacterial, plant and animal NAT members, it is replaced by Leu, Ile, Thr or Lys. Interestingly, in the homologous mammalian NATs, the residues corresponding to UapA R481 are leucines, irrespective of whether they are specific for ascorbate (SVCT1 and SVCT2)^{2,13} or nucleobases (rSNBT).¹⁴ However, none of the mutations of R481, including R481L, conferred to UapA a detectable binding affinity for ascorbate (data not shown). The lack of evolutionary conservation at this position is in line with the observation that mutants with variable substitutions all proved functional. This suggests that R481 might be involved in a fine topological interaction specifically narrowing the selectivity of UapA. Positive cytoplasm-facing residues are believed to play important topological roles in several membrane proteins through their interaction with negatively charged lipids of the inner leaflet of the plasma

membrane.²¹ Alternatively, R481 might interact with a negatively charged residue of UapA and thus create a specific bridge that blocks the passage of purines other than uric acid or xanthine. Interestingly, mutations that delete R481 or affect the length, and apparently the flexibility, of the TMS10–TMS11 loop lead to unstable non-functional UapA molecules that are rapidly turned over. In any way, this short loop seems to act as a key element in the dynamic positioning of the TMS10 and TMS11 α -helices and thus for the selection and translocation of specific substrates through UapA.

The putative inward-facing topology of R481 and the additive nature of R481 substitutions with mutations located toward the extracytoplasmic face of the transporter, which also reduce specificity, strongly suggest that UapA has molecular determinants acting as *selective gates* at both sides of the plasma membrane. *Gating* is a term used mostly for channels and usually implies the dynamic action of domains or some amino acid residues, triggered through either ligand binding or a change in voltage, which allows or restricts the passage of ions through a rather rigid and continuous transmembrane pore. For transporters, the dogma is that they do not form a continuous pore and thus do not use a gating mechanism. They rather exist in at least two alternating conformations, making them accessible to substrates either intracellularly or extracellularly, through a rocker-switch mechanism. In fact, it is probably the binding of substrates that allosterically promotes the alternation of the different conformers. In the last 2 years, however, a number of crystal structures of evolutionary and functionally distinct transporters confirmed the existence of domains or loops at both sides of the plasma membrane that occlude or open the access of substrates to the *sensu stricto* binding site.^{22–28} Our results provide strong functional evidence for the existence of such dynamic domains or amino acids, distinct from the substrate binding site, that are implicated in subtle movements determining the function and specificity of a transporter.

Materials and Methods

Media, strains, growth conditions and transformation genetics

Standard media for *A. nidulans* and *E. coli* were used.²⁹ The $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA \Delta fcyB pabaA1$ strain ($\Delta UapA$) carrying a single-copy integration of the *uapA* ($UapA^+$) was a standard wild-type control. The strain used to select the original mutants was a $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA \Delta fcyB pabaA1$ ($\Delta UapA$) carrying a single-copy integration of the *uapA*-F528S (F528S).¹⁰ *pabaA1* is a genetic auxotrophy for *p*-aminobenzoic acid. UV mutagenesis was as described previously.⁶ An isogenic $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA \Delta fcyB pabaA1$ mutant was the recipient strain in transformations³⁰ with *uapA* alleles cloned in vector pAN520exp³¹ or with an 'empty' vector as a negative control. These vectors allow selection of transformants based on *p*-aminobenzoic acid auxotrophy complementation. Transformants expressing intact *uapA* or *uapA-gfp* alleles, through either single- or

multiple-copy plasmid integration events, were identified by PCR and Southern analysis. In most cases, we selected transformants originating from homologous integration in the *pabaA* locus. In some cases, single-copy *uapA* alleles were integrated heterologously, but these transformants expressed UapA also at physiological levels (not shown). Growth tests were performed at 25 and 37 °C and at different purine concentrations (0.5 and 2 mM): 0.5 mM is the standard purine concentration used in all previous studies concerning purine metabolism in *A. nidulans*. Oxypurinol was used at 100 µM, with nitrate (10 mM) as a nitrogen source. *uapA* alleles resulted in phenotypes that were independent of the presence or absence of the C-terminal *gfp* epitope.²⁰

Plasmid constructions and *uapA* mutations

pAN510 is a pBlueScript vector carrying a *uapA* fusion with its flanking sequences and the *argB* gene as a selection marker.²⁰ pAN510-GFP is a pBlueScript vector carrying a *uapA-gfp* fusion with its flanking sequences and the *argB* gene as a selection marker.²⁰ pAN510exp is a modified version of pAN510, introducing a BamHI site at the translation start codon and knocking out an XbaI site in the pBlueScript multicloning region for cloning purposes.¹⁹ pAN520exp is a modified version of pAN510exp, replacing the auxotrophic marker *argB* with *pabaA* at the Sall site of the plasmid. The *uapA* ORF from the original mutants was amplified by PCR using primers 5'-cgggatccctccatccattcaaccgac-3' and 5'-gctctagactaagcctgctgctgatac-3', cloned in pAN510exp and sequenced†. Mutations ΔR481 and AGR481 were constructed by site-directed mutagenesis according to the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) on vector pAN510-GFP using complementary oligonucleotides carrying the desired substitution (forward primers: 5'-ccgttcacaaggcgaatgccggccggttatctcaccgac-3' and 5'-gcccgttcacaaggcgaatcttaccctaccgctcaatg-3', respectively) and confirmed by sequencing. The *uapA-gfp* fusion was amplified by PCR, using primers 5'-cgggatccctccatccattcaaccgac-3' and 5'-cgtctagactattgta-cagctcgtcc-3', and subsequently cloned in pAN520exp. Finally, the constructed plasmids were introduced by transformation into a Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA* Δ*fcyB* *pabaA1* strain, and the resulting integration events were subjected to Southern analysis.³² Single mutations F406Y, A441V, V463I, A469E, R481Q, R481L and R481G were constructed by replacing the SacI/SacI fragment from each double mutant with the corresponding fragment of pAN510exp. Q113L/R481G was constructed by replacing the ClaI/XbaI fragment of pAN510expUapA-R481G with the corresponding fragment from pAN510expUapA-Q113L, containing the Q113L mutation. R481G/T526M was constructed by replacing the SacI/SacI fragment of pAN510expUapA-T526M with the corresponding fragment from pAN510expUapA-R481G, containing the R481G mutation. In all cases, the *uapA* ORF was amplified by PCR using the primers 5'-cgggatccctccatccattcaaccgac-3' and 5'-gctctagactaagcctgctgctgatac-3 and subsequently cloned in pAN520exp.

Standard nucleic acid manipulations and fluorescence microscopy

Southern blot and PCR analyses were performed as described by Sambrook *et al.*³² [³²P]dCTP-labelled molecules used as *pabaA*- or *uapA*-specific probes were prepared

using a random hexanucleotide primer kit following the supplier's instructions (Takara, Japan). Labelled [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) was purchased from the Institute of Isotopes Co., Ltd. Total genomic DNA isolation from *A. nidulans* strains and all other techniques involving DNA manipulations were described by Sambrook *et al.*³² Samples for fluorescence microscopy were prepared as described previously.²⁰ In brief, the samples were incubated on coverslips in liquid minimal medium²⁹ supplemented with urea as nitrogen source at 25 °C for 12–14 h, observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescence microscope with appropriate filters, and the resulting images were acquired with a Zeiss MRC5 digital camera using the AxioVs40 V4.40.0 software. Images were then processed in Adobe Photoshop CS2 V9.0.2 software.

Kinetic analysis

Radiolabelled purines (19.6–33.4 Ci/mmol) were from Moravék Biochemicals (Brea, CA). ³H-labelled xanthine or hypoxanthine uptake was assayed in conidiospores at 37 or 25 °C as described previously.⁵ All experiments were carried out in triplicate. Initial velocities were corrected by subtracting background uptake values, measured in the *azgA⁻uapA⁻uapC⁻fcyB⁻* mutant. K_m (concentration for obtaining $V_m/2$) and IC_{50} (concentration reducing 50% of the V_m) values for compounds inhibiting the uptake of radiolabelled permeants (xanthine or hypoxanthine) were determined from full dose–response curves with a minimum of eight points spread over the relevant range. In all cases, the Hill coefficients were close to -1 , consistent with competitive inhibition. K_i values were calculated from the Cheng and Prusoff equation, $K_i = IC_{50}/[1 + (L/K_m)]$, in which L is the permeant concentration.³³

Speculative UapA topology

Speculative UapA topology was based on several standard algorithms (PredictProtein, HHpred, TMHMM, SOSUI, TMAP, TopPred, etc.), the ConSeq program‡ and minor manual modifications depending on the presence of Pro residues and the 'positive-inside rule'²¹ at the borders of putative helices. All algorithms predict as α -helical transmembrane domains the segments shown in Fig. 1 as TMS1–TMS8 and TMS12. Most algorithms also predict the TMS9b–TMS11 shown in Fig. 1. Some algorithms predict an extra TMS, which here we call TMS9a (horizontal cylinder in Fig. 1), in the segment between TMS8 and TMS9b. Based on the above and the substituted-cysteine accessibility method performed in YgfO, which shows that TMS9a has extended parts accessible to hydrophilic reagents (see the text), we propose that this segment is a flexible dynamic domain or a reentrant loop that acquires alternative topology during substrate binding and transport.

Acknowledgements

Work in the laboratory of G.D. was partly supported by the University of Athens (ELKE). We are grateful to S. Amillis for helping in the preparation of the manuscript and for discussions.

† <http://www.macrogen.com>

‡ <http://conseq.tau.ac.il/>

References

- Gorfinkiel, L., Diallinas, G. & Scazzocchio, C. (1993). Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23376–23381.
- Gournas, C., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.* **4**, 404–416.
- Diallinas, G. & Gournas, C. (2008). Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)*, **2**, 363–372.
- Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A. & Scazzocchio, C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J.* **17**, 3827–3837.
- Meintanis, C., Karagouni, A. D. & Diallinas, G. (2000). Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Mol. Membr. Biol.* **17**, 47–57.
- Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2001). Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J. Mol. Biol.* **313**, 765–774.
- Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S. & Diallinas, G. (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **350**, 499–513.
- Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2006). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 337–348.
- Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2006). A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.* **357**, 808–819.
- Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2008). Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J. Mol. Biol.* **382**, 1121–1135.
- Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S. & Diallinas, G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 263–275.
- Argyrou, E., Sophianopoulou, V., Schultes, N. & Diallinas, G. (2001). Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell*, **13**, 953–964.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y. *et al.* (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **399**, 70–75.
- Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J. Y., *et al.* (in press). Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. *J. Biol. Chem.*, doi/10.1074/jbc.M109.032961.
- Karatza, P. & Frillingos, S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 251–261.
- Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. (2006). Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329–Val-339 form an alpha-helix. *J. Biol. Chem.* **281**, 39881–39890.
- Papakostas, K., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. (2008). Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. *J. Biol. Chem.* **283**, 13666–13678.
- Karena, E. & Frillingos, S. (2009). Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. *J. Biol. Chem.* **284**, 24257–24268.
- Vlanti, A. & Diallinas, G. (2008). The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol. Microbiol.* **68**, 959–977.
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C. & Diallinas, G. (2007). Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 627–640.
- von Heijne, G. & Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **174**, 671–678.
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y. & Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, **437**, 215–223.
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G. M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B. A. *et al.* (2008). The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science*, **321**, 810–814.
- Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K. *et al.* (2008). Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science*, **322**, 709–713.
- Singh, S. K., Piscitelli, C. L., Yamashita, A. & Gouaux, E. (2008). Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Science*, **322**, 1655–1661.
- Diallinas, G. (2008). Biochemistry. An almost-complete movie. *Science*, **322**, 1644–1645.
- Fang, Y., Jayaram, H., Shane, T., Kolmakova-Partensky, L., Wu, F., Williams, C. *et al.* (2009). Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature*, **460**, 1040–1043.
- Gao, X., Lu, F., Zhou, L., Dang, S., Sun, L., Li, X. *et al.* (2009). Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science*, **324**, 1565–1568.
- Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 51–56.
- Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A. & Diallinas, G. (2003). A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 687–695.
- Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A. & Diallinas, G. (2009). Transport-dependent endocytosis and

- turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol. Microbiol.* **75**, 246-260.
32. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
33. Cheng, Y. & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.



Mutational Analysis and Modeling Reveal Functionally Critical Residues in Transmembrane Segments 1 and 3 of the UapA Transporter

Sotiris Amillis¹, Vasiliki Kosti¹, Areti Pantazopoulou¹, Emmanuel Mikros² and George Diallinas^{1*}

¹Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis, Athens 15781, Greece

²School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimioupolis, Athens 15771, Greece

Received 15 April 2011;

received in revised form

9 June 2011;

accepted 14 June 2011

Available online

29 June 2011

Edited by I. B. Holland

Keywords:

Aspergillus nidulans;
nucleobase ascorbate
transporter (NAT) family;
suppressors;
uric acid/xanthine;
topological modeling

Earlier, we identified mutations in the first transmembrane segment (TMS1) of UapA, a uric acid-xanthine transporter in *Aspergillus nidulans*, that affect its turnover and subcellular localization. Here, we use one of these mutations (H86D) and a novel mutation (I74D) as well as genetic suppressors of them, to show that TMS1 is a key domain for proper folding, trafficking and turnover. Kinetic analysis of mutants further revealed that partial misfolding and deficient trafficking of UapA does not affect its affinity for xanthine transport, but reduces that of uric acid and confers a degree of promiscuity towards the binding of other purines. This result strengthens the idea that subtle interactions among domains not directly involved in substrate binding refine the selectivity of UapA. Characterization of second-site suppressors of H86D revealed a genetic interaction of TMS1 with TMS3, the latter segment shown for the first time to be important for UapA function. Systematic mutational analysis of polar and conserved residues in TMS3 showed that Ser154 is crucial for UapA transport activity. Our results are in agreement with a topological model of UapA built on the recently published structure of UraA, a bacterial homolog of UapA.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The family of nucleobase-ascorbate transporters (NATs), also called the nucleobase-cation symporter-2 (NCS2) family[†], consists of hundreds of

members present in nearly all organisms, a prominent exception being *Saccharomyces cerevisiae* and several protozoa. At present, the function and specificity of nearly 20 NAT proteins are known.^{1–3} These proteins come from bacteria, fungi, plants and mammals. All non-mammalian homologs of known function are specific for nucleobases; namely, xanthine, uric acid or uracil.^{1,2} The mammalian NATs transport either L-ascorbic acid (SVCT1 and SVCT2 proteins in several mammals, including humans^{4,5} or nucleobases; namely, uracil, xanthine or hypoxanthine (in the rat homolog SNBT1⁶). The bacterial, fungal and plant NATs are high-affinity H⁺ symporters, whereas the mammalian homologs use Na⁺ for L-ascorbate or nucleobase symport.^{1–3,6} All NATs are predicted to contain 12–14 putative transmembrane segments (TMS) and cytoplasmically located N- and C-tails, but there was no direct structural

*Corresponding author. E-mail address: diallina@biol.uoa.gr.

Present address: A. Pantazopoulou, Department of Molecular and Cellular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas CSIC, Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain.

Abbreviations used: NAT, nucleobase-ascorbate transporter; TMS, transmembrane segment; GFP, green fluorescent protein.

[†] <http://www.tcdb.org/2.A.40>

data for any member of this family until very recently (see below).

The UapA transporter of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*^{7,8} is the prototype of the NAT family and one of the most extensively studied carriers concerned with regulation of transcription^{9,10} and endocytosis via ubiquitination,¹¹ but mostly with respect to structure–function relationships.^{1,2,12} Through many rounds of alternating rationale and random mutational approaches and construction of chimeric molecules, combined with physiological tests, detailed analysis of transport kinetics and the use green fluorescent protein (GFP)-tagged versions of mutated UapA molecules, we have proposed models to explain how UapA functions and selects its substrates, despite the fact that no direct structural study is available.^{13–19}

In particular, it is known that UapA is a high-affinity, high-capacity symporter of H⁺ and xanthine or uric acid and that several analogs of these purines, especially those that do not have modifications in positions N1-H and N9 or =O8 of the purine ring, can also act as substrates or ligands of UapA, albeit with lower affinity. Four fully conserved amino acid residues (Q85, E356, D388 and N409) have been found to be irreplaceable for function, whereas eight more partially conserved residues (N71, Q113, Q408, G411, T417, R481, T526 and F528) are crucial for determining the transport kinetics and substrate specificity of UapA. According to standard topological algorithms, all functionally important residues in UapA map in four distinct regions; TMS1 and its flanking segments, the amphipathic segment including TMS8–TMS9, the TMS10–TMS11 cytoplasmic loop and TMS12. Strong genetic and biochemical evidence has shown that the amphipathic TMS8–TMS9 region, which includes most of the functionally important residues, hosts the basic elements of the substrate-binding site.^{16–19} One residue in this region, Q408, has been shown to be involved in direct contacts with either N9 or =O8 of xanthine or uric acid, respectively. The other three functional regions (TMS1, TMS10–TMS11 cytoplasmic loop and TMS12) appear to interact dynamically with each other and with the TMS8–TMS9 substrate-binding domain, acting as gating elements or selectivity filters that determine the substrate affinity and specificity of UapA.¹⁹ Most of the above conclusions concerning UapA, especially those concerning the TMS8–TMS9 domain and TMS12 region, are supported by reverse genetics and Cys-scanning mutational analysis of the XanQ xanthine transporter in *Escherichia coli*, which is the most extensively studied bacterial member of the NAT family.^{20–24}

Interestingly, the great majority of functional mutations of UapA do not affect the folding or turnover of UapA, as judged by the normal localization of the relevant mutant forms of GFP-

tagged transporter in the plasma membrane. In fact, the only mutations affecting UapA localization and turnover are a handful of substitutions of residues in TMS1²⁵ or deletions/insertions of one or two residues in the loop linking TMS10 with TMS11.²⁶ In this work, we used previously characterized and novel TMS1 mutations that result in ER-retention and/or increased turnover of UapA, as well as genetic suppressors of these mutations, to show that TMS1 and a TMS1–TMS3 interaction are crucial for proper folding, trafficking and turnover of UapA. Subsequently, using a systematic mutational analysis, we show that Ser154 within TMS3 is crucial for UapA transport activity. Our results are evaluated in relation to a three-dimensional topological model of UapA built on the recently published structure of UraA, a bacterial NAT homolog.

Results

TMS1 mutations affect UapA folding, trafficking and turnover

H86 mutations (H86A, H86D and H86K) isolated earlier lead to increased turnover of UapA through sorting and degradation in the vacuoles at 25 °C.²⁵ H86D also leads to partial retention of UapA in the ER membrane. Mutation I74D constructed here is just upstream from the putative TMS1 and leads to non-conditional, complete ER-retention of UapA. The subcellular localization of GFP-tagged versions of UapA-I74D, UapA-H86A and UapA-H86D is shown in Figure 1a. The relevant mutants have significantly reduced (H86A and H86D) or abolished (I74D) UapA-mediated radiolabeled [³H] xanthine uptake, which is reflected in the inability to grow with uric acid (Fig. 1b) or xanthine (not shown) as sole nitrogen source, given other purine transporters besides UapA are knocked-out (strain details are given in Materials and Methods). Deficient localization or/and increased turnover of transporters is expected to be associated with defective folding. A defect in folding was suggested by the cryosensitive nature of H86 mutations. We showed directly that this is the case for the UapA-H86D mutant, where ER retention is indeed associated with evidence for an unfolded protein response.²⁷ As expected, the UapA-H86A mutant, which is not retained in the ER, similar to wild type, did not show any evidence for an unfolded protein response (UPR: Fig. 1c). Interestingly, however, in the case of H86 mutations, where a fraction of UapA reaches the plasma membrane and thus allows direct measurements of transport rates and K_m values for xanthine, uric acid or other purines, folding defects have been shown not to affect the activity of UapA significantly.²⁵

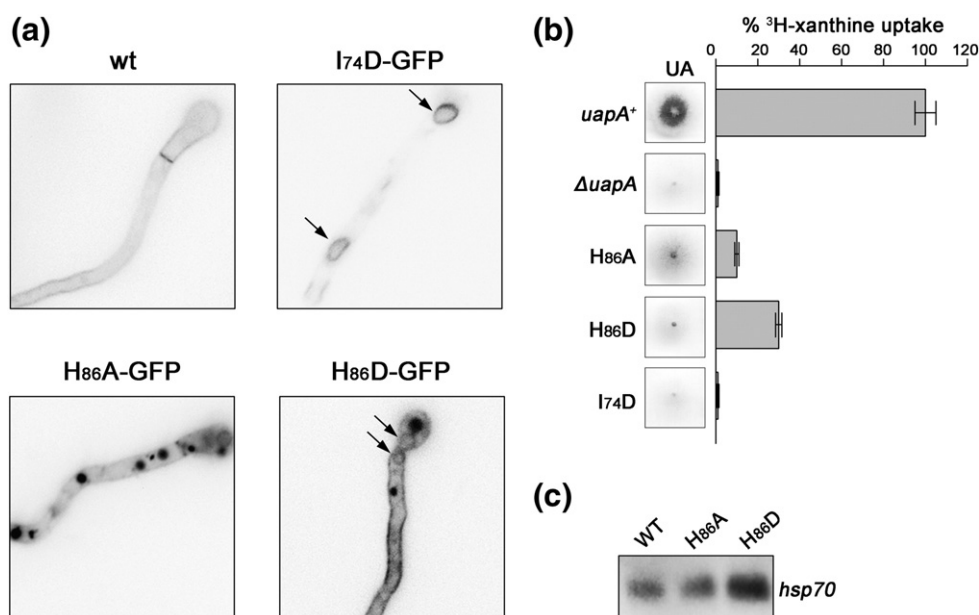


Fig. 1. Functional characterization of TMS1 mutations. (a) Epifluorescent microscopic analysis of GFP-tagged wild type (wt) and mutant alleles (H86A, H86D and I74D) of UapA. UapA-GFP labels primarily the plasma membrane in wt and H86D, but distinct cytoplasmically labeled structures appear in all mutants. Arrows in H86D and I74D depict perinuclear ER rings (membranes). UapA-GFP in H86A labels the plasma membrane but mostly cytoplasmic compact structures, which correspond to vacuoles. (b) Growth with 0.5 mM uric acid (UA) as sole nitrogen source and UapA-mediated radiolabeled ³H-xanthine initial uptake rates (%) in control strains (*uapA*⁺ and Δ *uapA*) and TMS1 mutants. Values represent averages of three independent experiments with standard deviation <20%. (c) Evidence for unfolded protein response in the mutants expressing UapA-H86D. *hsp70* (ANID_02062.1) transcript study-state levels detected by northern blot analysis of total RNA (10 μ g in all lanes). A five-fold increase was estimated in H86D compared to wt or H86A.

Genetic suppression of TMS1 mutations

In order to further understand how missense mutations in TMS1 affect UapA turnover and subcellular trafficking, we selected genetic revertants of mutations H86D and I74D by standard UV mutagenesis. The relevant mutants expressing UapA-H86D or UapA-I74D in an appropriate genetic background cannot grow with uric acid as sole

nitrogen source at 25 °C (Materials and Methods). We obtained and characterized several revertants of both mutants as colonies able to grow with uric acid as sole nitrogen source. In both cases, all revertants were found to be due to genetic suppressor mutations located in UapA. The identity and location of these suppressors is summarized in Table 1. In both cases, mutagenesis was apparently close to saturation because several suppressors were obtained twice or

Table 1. Identity and location of I74D and H86D suppressors

Amino acid substitution	Topology in UapA	Nucleotide change	Numbers obtained
I74D	N-terminal/TMS1	ATT → GAT	-
A. Suppressors of I74D			
I74G	N-terminal/TMS1	GAT → GGT	2
I74V	N-terminal/TMS1	GAT → GTT	2
I74A	N-terminal/TMS1	GAT → GCT	2
I74N	N-terminal/TMS1	GAT → AAT	1
H86D	TMS1	CAT → GAT	-
B. First-site suppressors of H86D			
H86V	TMS1	GAT → GTT	2
H86N	TMS1	GAT → AAT	5
C. Second-site suppressors of H86D			
M151I	TMS3	ATG → ATA	1
M151V	TMS3	ATG → GTG	1

The nucleobase substitutions of the wild type *uapA* codon are shown in bold. Suppressors are indicated as substitutions of the original amino acid residue (Ile74 or His86).

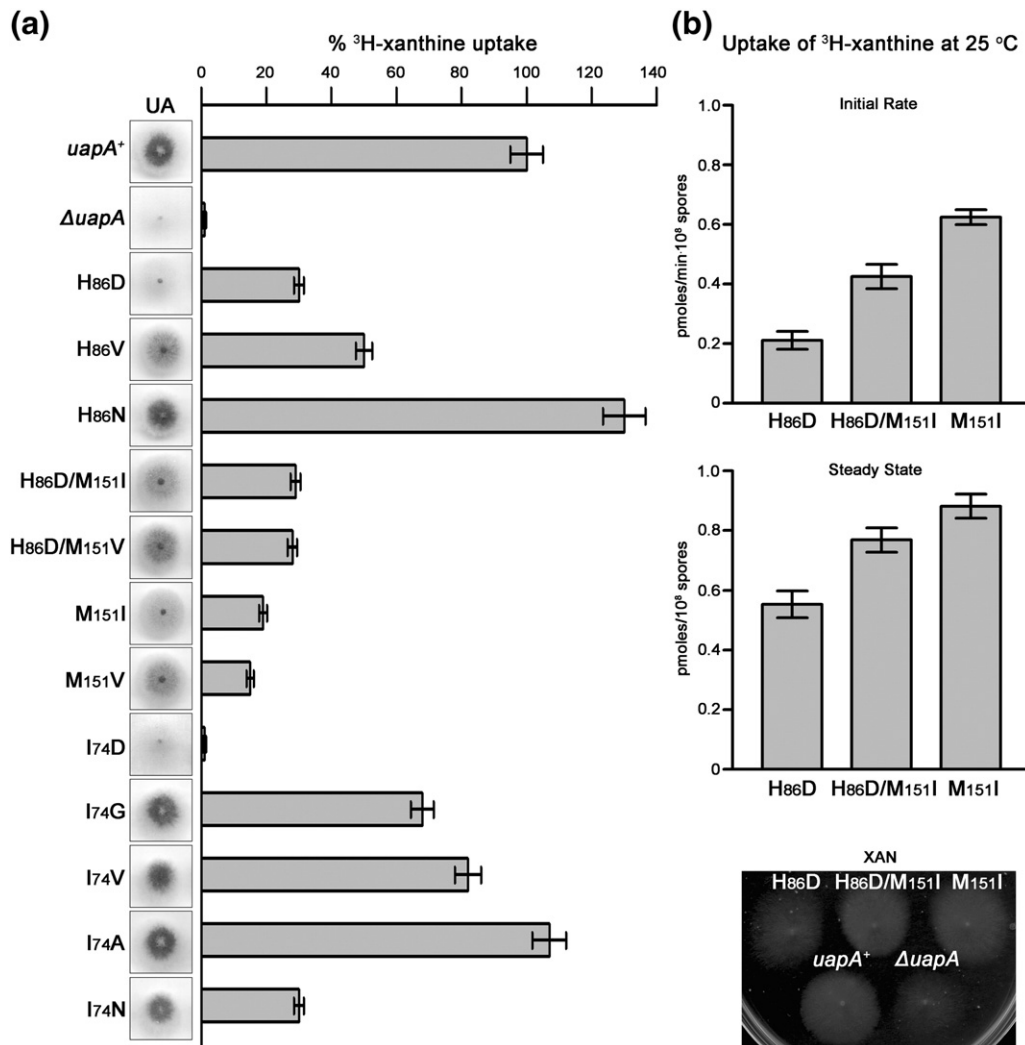


Fig. 2. (a) Comparative growth tests at 25 °C with 0.5 mM uric acid (UA) as sole nitrogen source and UapA-mediated radiolabelled ³H-xanthine uptake rates (%) in control strains (*uapA*⁺ and $\Delta uapA$), TMS1 mutations and their suppressors at 37 °C. (b) Comparative growth tests 25 °C with 1 mM xanthine (XAN) as sole nitrogen source at and UapA-mediated radiolabelled ³H-xanthine initial uptake rates or steady-state uptake levels in the H86D mutation and its suppressor. Values are averages of three independent experiments with standard deviation <20%.

more, or concerned the same codon. All I74D suppressors corresponded to changes in the originally mutated codon (first site-suppressors), whereas H86D revertants were due to both first site-suppressors and mutations replacing Met151 in TMS3 by Val or Ile (second site-suppressors H86D/M151V and H86D/M151I). At this point, we constructed isogenic strains expressing UapA-M151V and UapA-M151I alleles by themselves; i.e. in the absence of the original H86D mutation (Materials and Methods).

Functional characterization, expression and subcellular localization of UapA in suppressors

Figure 2 shows comparative growth tests and xanthine initial uptake rates of all suppressors,

original mutants and control strains. It was apparent that with respect to Ile74, mutations introducing hydrophobic amino acids (Ala, Gly and Val) restored at least 70% of the apparent UapA initial transport rate, whereas introduction of Asn did so only partially (30%). Among H86D suppressors, only the presence of Asn in the originally mutated codon fully restored UapA transport rate (~130%), whereas the presence of Val in that codon partially re-established the transport rate of UapA (54%). Surprisingly, second site-suppressors M151V or M151I did not lead to any change in xanthine initial uptake rates (28–29%) in relation to the original mutated strain expressing H86D (30%). This suggested that substitutions in M151 might have restored, at least to some degree, the turnover rather than the function of plasma

Table 2. Substrate specificity profile of mutants and suppressors

$K_{m/i}$ (μM)			
Allele	Xanthine	Uric acid	Hypoxanthine
Wt	7	8	n.i.
I74D	n.d.	n.d.	n.d.
I74G	8	35	~ 1000
I74V	28	102	n.i.
I74A	7	195	~ 1000
I74N	5	8	280
H86A	7	23	n.i.
H86D	4	15	n.i.
H86V	19	29	n.i.
H86N	4	28	n.i.
H86D/M151I	4	18	n.i.
H86D/M151V	14	17	n.i.
M151I	25	34	n.i.
M151V	15	107	n.i.

$K_{m/i}$ values were determined as described in [Materials and Methods](#). n.d., not determined. n.i., no inhibition (90–100% uptake). The tilde (\sim) identifies values $\geq 1000 \mu\text{M}$ that were estimated. The results are averages of at least three independent experiments with three replicates for each concentration and the standard deviation was $<20\%$.

membrane-embedded UapA-H86D molecules. Relatively low transport capacities were exhibited by the single mutations M151V and M151I (16–22%).

We investigated in more detail the nature of the suppressors isolated by (i) measuring K_m values for substrates, (ii) establishing an extended substrate specificity profile through competition assays (K_i values) and (iii) following the turnover and trafficking of the mutated UapA versions.

Table 2 shows that none of the I74D or H86D suppressors affect the affinity for xanthine significantly. For example, even in the case of the maximal (approx. four-fold) increases in K_{mV} , as is the case in I74V or M151V, this change corresponds to a reduction of less than 3 kJ/mol in the ΔG^0 values governing transport–substrate interactions.¹⁷ Interestingly, however, for some I74D suppressors, significantly higher affinity changes were observed specifically for uric acid, the other physiological substrate of UapA. This is highlighted in I74V and I74A mutants, which showed 13-fold and 24-fold increases in the K_i values for uric acid, respectively. We estimated K_i values for hypoxanthine, a purine not recognized by wild type UapA. Three Ile74 mutants showed low binding affinity for hypoxanthine with values of 280 μM for I74N and $\sim 1 \text{ mM}$ for I74A and I74G (Table 2). These mutants could also recognize adenine, guanine or uracil with very low (1–2 mM) affinity (data not shown). Growth tests showed that none of the Ile74 mutants could grow on purines other than xanthine or uric acid, which indicates that even in the case of I74N, I74A and I74G, purines that are non-physiological substrates of UapA are transported very inefficiently or not at all (not shown).

Figure 3a shows a western blot analysis of UapA-GFP in control strains and mutants H86A, H86D, H86D/M151I, I74D, I74N and I74G. Quantification of the steady-state levels of the UapA-GFP protein was done using the protein levels of the constitutively expressed actin gene as an internal control. H86A is the only mutant with a significantly increased turnover compared to wild type (43% of the wild type UapA-GFP). UapA-GFP levels were also moderately decreased (69% of the wild type) in suppressor H86D/M151I. However, the presence of intact UapA-GFP does not distinguish whether the tagged transporter is in the plasma membrane or in any other internal membrane. Thus, to further analyze the effect of the different suppressor mutations isolated, we examined the subcellular localization of UapA-GFP in the relevant mutant strains. Figure 3b (lower panel) shows that suppressors of I74D introducing small hydrophobic residues (Ala, Gly or Val) fully restored UapA-GFP localization. Introducing a polar residue at Ile74 (I74N) suppressed the ER-retention defect observed with I74D, but led to significantly increased vacuolar sorting of UapA molecules. First-site suppressors of H86D (H86N and H86V) also fully restored UapA-GFP localization (not shown). Finally, the second site-suppressor mutation M151I only partially restored the localization defect (e.g. ER-retention) of UapA molecules carrying H86D (Fig. 3b, upper right panel). These results were in line with those from growth tests, western analysis and kinetic measurements.

Mutational and functional analysis of polar and conserved residues of TMS3

Second site-suppressors of H86D concerned substitutions of Met151, a residue in the middle of the putative TMS3. This segment was predicted, using various algorithms[‡] to form an amphipathic α -helix. However, a three-dimensional topological model of UapA (see below) built on the recently published structure of the UraA (uracil) permease of *Escherichia coli*²⁸ shows that TMS3 includes a short β -strand that includes Met151 (residues 150–153). Six partially conserved Ser residues (positions 145, 149, 154, 156, 159 and 162) flank the β -strand segment and should create a polar interface along TMS3 (Fig. 4a). We substituted all Ser residues of TMS3 with Ala residues (Materials and Methods) and analyzed the relevant mutants. We also mutated the only well-conserved residue of TMS3; Phe155, which is present in all fungal and bacterial NAT homologs (Fig. 4a). Growth tests (Fig. 4b) showed that only two residues were functionally important; S154A

‡ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM2>, <http://bp.nuap.nagoyau.ac.jp/sosui/>, <http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>

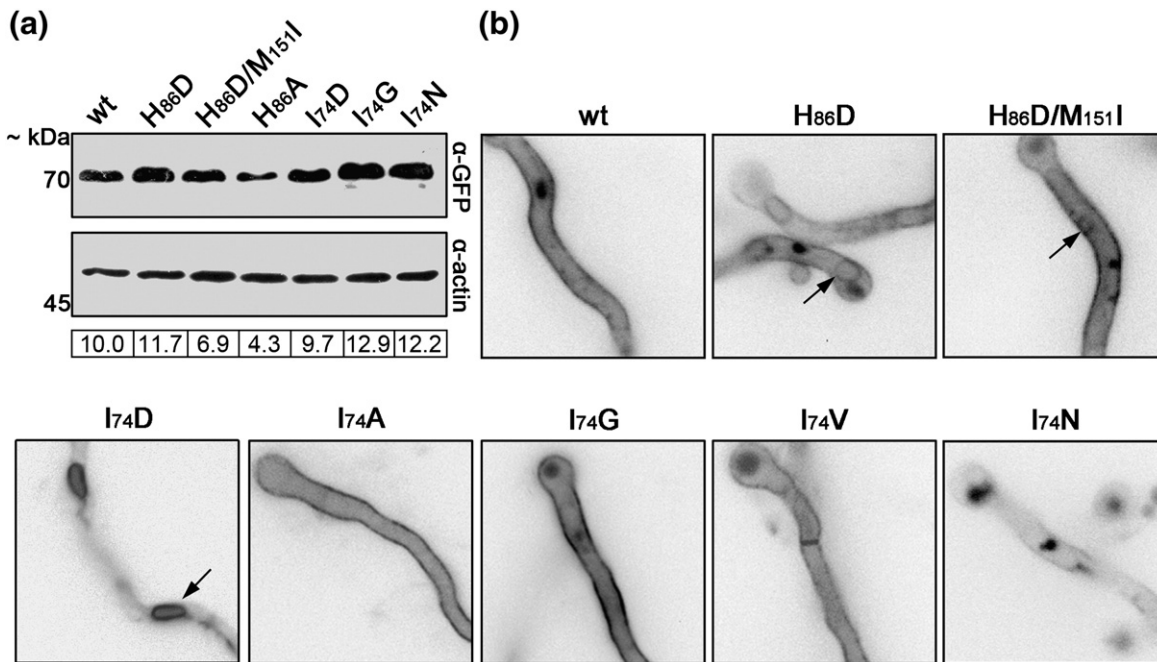


Fig. 3. (a) Western blot analysis of UapA-GFP in control strains and TMS1 mutants and suppressors. Equal amounts of total protein extracts (50 μ g) were loaded in all cases, transferred onto PVDF membranes and hybridized with oligoclonal anti-GFP and anti-actin antibodies. Relative amounts of UapA-GFP were estimated by normalizing with the wt UapA-GFP/actin ratio (value set to 10.0) using ImageJ software. (b) Epifluorescent microscopic analysis of GFP-tagged wt and mutant alleles. Arrows indicate perinuclear ER membranes.

led to significantly reduced growth at 37 °C and S162A led to reduced growth at 25 °C, both with uric acid as the sole nitrogen source. A similar growth profile was obtained with xanthine as the sole nitrogen source (data not shown). None of the TMS3 mutants analyzed could grow with any other purine as sole nitrogen source (data not shown). Subcellular localization analysis (Fig. 4d) showed that none of the TMS3 mutations affected the localization of UapA-GFP in the plasma membrane. All mutants showed detectable UapA-mediated transport (34–127% of wild type values), with S154A and S162A exhibiting the lowest transport rates (34% and 45%, respectively) (Fig. 4c).

On the basis of two observations, we studied the role of Ser154 in UapA function in more detail. First, Ser154 in UapA corresponds to Asn93 in the *E. coli* xanthine permease XanQ. An Asn at this position has been shown to be crucial for substrate specificity in bacterial NATs (Discussion).²² Second, Ser154 has

a crucial position with respect to the putative substrate-binding site in the UapA structural model constructed in this study (see below). We constructed mutation S154N and showed that it did not affect UapA-GFP localization in the plasma membrane (Fig. 4d) but had a dramatic effect on the apparent UapA transport capacity. This is shown by the lack of growth at 37 °C and at 25 °C with uric acid as sole nitrogen source (Fig. 4b) and the low (20%) UapA-mediated transport rate of xanthine (Fig. 4c) in the corresponding mutant. When the S154A and S154N alleles were expressed in high-copy plasmid transformants, partial restoration of the ability to transport xanthine or uric acid was established, mostly in the case of S154A. In principle, restoration of a defect in the apparent transport capacity of UapA by high-copy expression implies that the relevant mutations affect either the intrinsic transport activity and/or the turnover of the transporter. However, in the case of Ser154

Fig. 4. Functional analysis of TMS3 mutants. (a) Multiple alignments of TMS1 and TMS3 of selected NAT sequences. Conserved and partially conserved residues are highlighted in black and grey boxes, respectively. In TMS1, the position of mutations I74D and H86D is indicated. In TMS3, the positions of all mutants studied here are indicated by arrows. Secondary structures as predicted by modeling of UapA topology on the UraA crystal structure are indicated under the alignments. Cylinders denote α -helices. A filled flesh denotes a segment-forming β -strand. (b) Comparative growth tests of TMS3 mutants with 5 mM urea (U) or 0.5 mM uric acid (UA) as sole nitrogen sources at 25 °C or 37 °C. (c) Comparative UapA-mediated radiolabeled ³H-xanthine uptake rates (%) in control strains (*uapA*⁺ and Δ *uapA*) and TMS3 mutants in the absence or in the presence of non-radiolabelled substrate (xanthine 1 mM). (d) Epifluorescence microscopy of the subcellular localization of UapA-GFP in a control strain and TMS3 mutants.

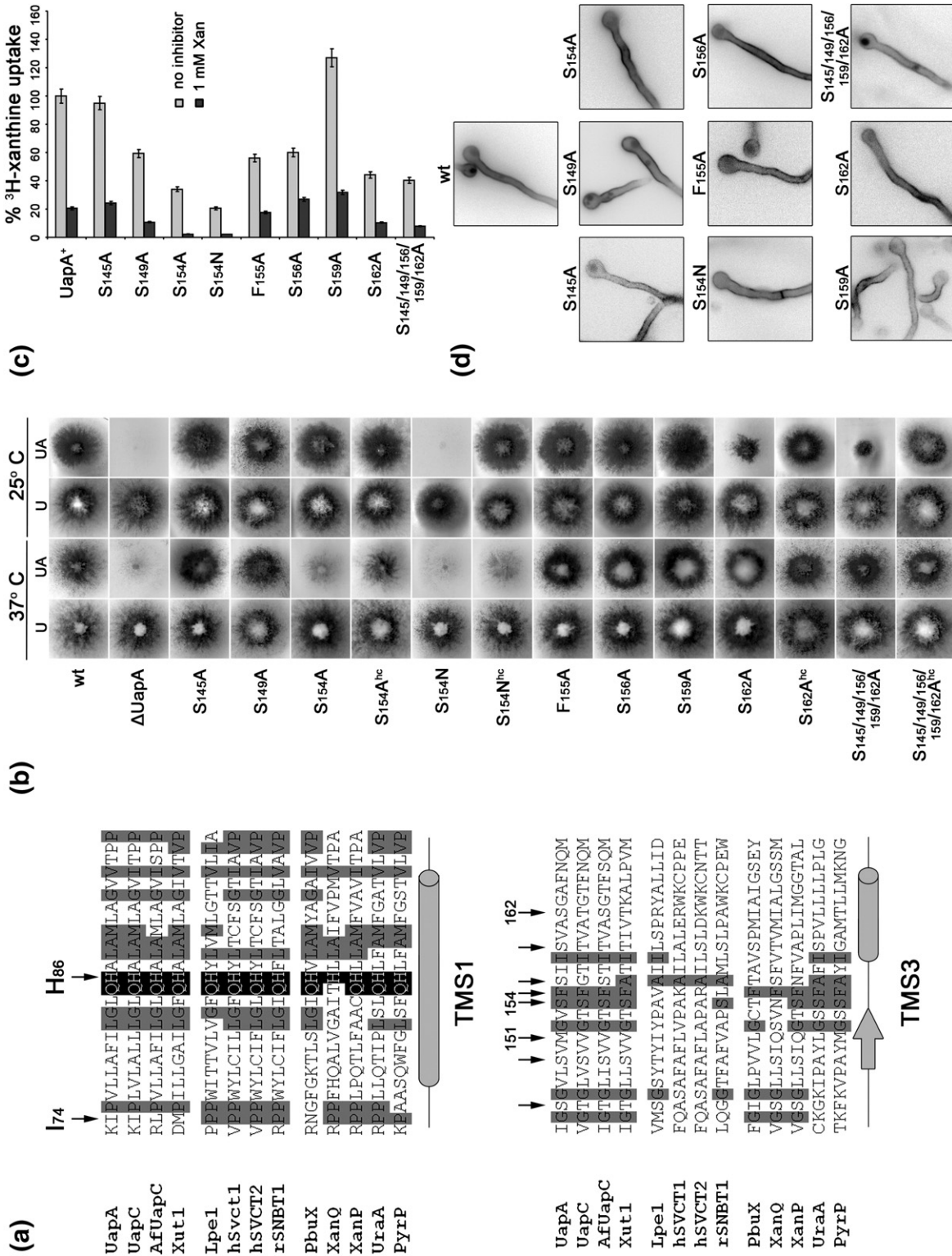


Fig. 4 (legend on previous page)

Table 3. Substrate specificity profile of S154 mutations

Substrate/ligand	UapA ⁺	S154N	S154A
Xanthine	8	1.4	7.6
Uric acid	7	10	53
Adenine	n.i.	n.i.	>1000
Hypoxanthine	n.i.	n.i.	>1000
Guanine	n.i.	n.i.	>1000
Uracil	n.i.	523	>1000
2-Thio-xanthine	63	35	48
3-Methyl-xanthine	28	47	62
6-Thio-xanthine	350	326	553
7-Methyl-xanthine	n.i.	1000	n.i.
8-Methyl-xanthine	100	194	188
9-methyl-xanthine	200	634	539
Oxypurinol	100	67	160

$K_{m/i}$ values were determined as described in [Materials and Methods](#). n.i., no inhibition (90–100% uptake); >1000 indicates 60–75% inhibition at 1mM. The results are averages of at least three independent experiments with three replicates for each concentration point and the standard deviation was <20%.

mutations, the second assumption could be dismissed immediately on the basis of the picture from the epifluorescence microscopic analysis shown in [Fig. 4d](#). Thus, N154 should affect the *bona fide* function of UapA.

To further investigate this idea, we asked whether substitutions S154A and S154N affected the substrate affinity or the specificity of UapA. [Table 3](#) gives a detailed kinetic analysis of S154A and S154N mutants, which establishes that both UapA-S154N and UapA-S154A molecules have substrate affinity profiles different from that of the wild type UapA. In both cases, there is minor two- to three-fold reduction in the affinity for analogs with bulky substitutions at position 8 or 9 of the purine ring (8-methylxanthine, 9-methylxanthine, oxypurinol). In addition, S154A confers an ~7-fold reduction in the affinity for uric acid, whereas S154N leads to moderate increase in the affinity for xanthine and uracil. Thus, Ser154 is important for determining the specificity of UapA.

A UapA model based on the UraA structure

Molecular simulations were undertaken in order to build a UapA model on the basis of its sequence similarity with the only NAT protein with a known crystallographic structure; namely, the UraA uracil permease of *E. coli* that was published while this work was in progress.²⁴ The UraA structure was captured bound with uracil and corresponds to an inward-facing conformation, occluded from the periplasmic side of the membrane but open towards the cytoplasm. The overall topology of the model UapA shown in [Fig. 5](#) is in very good agreement with the structure of UraA, which consists of 14 TMSs with N- and C-termini located cytoplasmical-

ly (Supplementary Data Table S1). The 14 TMSs are arranged, as in UraA, in two inverted and intermingled repeats (TMS1-TMS7 and TMS8-TMS14) related by a rotation of ~180°. TMS1-TMS4 and TMS8-TMS11 create a core domain, which hosts a putative substrate-binding cavity.

In the model UapA structure, TMS1–TMS7 correspond well to the previously proposed TMSs using different algorithms. The model TMS8 starts 13 amino acid residues downstream from the predicted TMS8. Significant topological discrepancies between the model and predicted structures exist immediately downstream from TMS8. These are concerned mainly with three short interrupted α -helices in the model structure (TMS9-TMS10-TMS11), rather than the predicted single long transmembrane segment including helices TMS9a and TMS9b.^{24,26}

Consequently, the predicted TMS11-TMS12 corresponds to TMS13-TMS14 in the model structure. It is noticeable that the segment including the last two TMS in UapA is longer than that of UraA. The significance of this observation in relation to the differential functional role of this segment in bacterial and fungal NAT members will be discussed elsewhere (V. Kosti *et al.*, unpublished results). Noticeably, there are two short β -strands in TMS3 and TMS10 located in the center of the structure, as observed in UraA. The NAT signature motif lies immediately downstream from the β -strand segment of TMS10 and folds as an α -helix. To our satisfaction, the two essential residues proposed to make direct contacts with uracil in UraA (E241 in TMS8 and E290 in TMS10) correspond to E356 and Q408, which we have rigorously shown, by using genetic and biochemical approaches, to be two residues making direct contact with purines in UapA.^{16,18,19}

With respect to the domains and residues analyzed in this study, TMS1 and TMS3 are shown to interact with each other and with TMS10, which includes the elements necessary (the NAT signature motif) for substrate binding and transport. The proximity of TMS1 and TMS3 justifies their genetic and functional interaction revealed by the second site-suppressors of H86D. However, His86 is not within bonding distance to Met151, which lies in the side TMS3 that does not face TMS1. This result indicates that suppression of H86D by replacement of Met151 with Ile or Val should occur through an indirect topological modification. This is supported by the observation that M151I or M151V also suppress other H86 mutations (e.g. H86K and H86A), showing the suppression is not allele-specific (data not shown). By contrast, His86 is within H-bond distance to Asn409 within the signature motif in TMS10, a residue absolutely required for UapA activity. This could very well justify the crucial role of His86 for UapA function. Mutation I74D, which is at the N-terminal border of TMS1, might also somehow affect the crucial interaction of TMS1

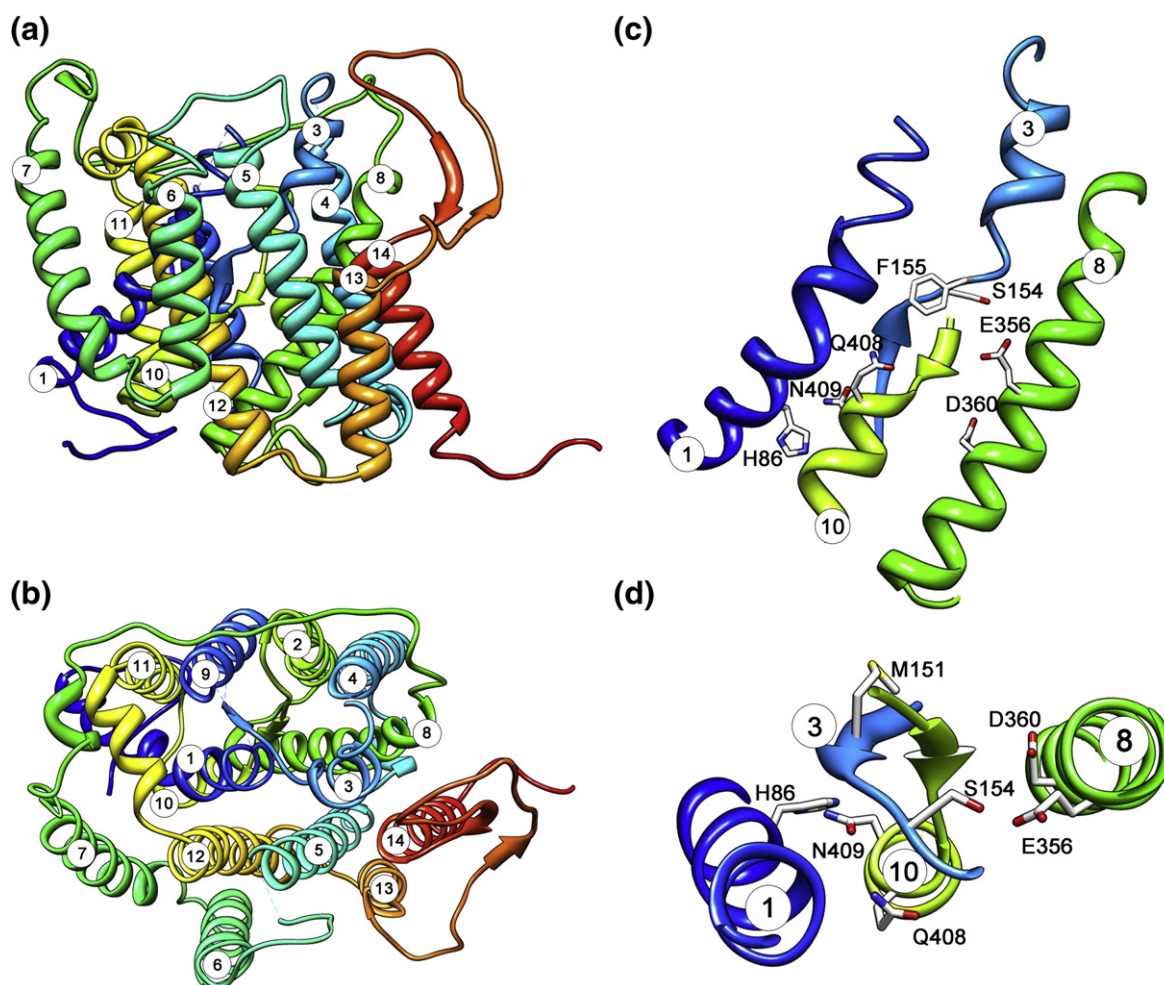


Fig. 5. Model structure of UapA built on the crystal structure of UraA (for details, see the text). The overall structure of UapA as seen from the extracytoplasmic side and from the side are shown in (a) and (b), respectively. Hydrophilic segments 103–117, 137–147, 169–186 and 243–258, which correspond to amino acid sequence alignment gaps with the UraA sequence, could not be structured and are not shown. The numbers of TMSs is indicated. Topological relationships of TMS1, TMS3, TMS8 and TMS10 are shown in more detail in (c) (side view) and (d) (view from the extracytoplasmic side). For clarity, only the parts of the TMS relevant to the functional mutations analyzed here are shown. Amino acid residues genetically and functionally analyzed in this work (His86 in TMS1; Met151, Ser154 and Phe155 in TMS3), and residues involved in substrate binding or transport (Glu356 and Asp360 in TMS8; Gln408 and Asn409 in TMS10) are also shown (see the text). Notice the two antiparallel β -strands in TMS3 and TMS10 and the close proximity of His86–Asn409 or Ser154–Glu356.

with TMS3 and/or TMS10. Ser154 in TMS3 is in close proximity to Glu356 in TMS8, which might also justify its role in UapA function. Replacement of the other Ser residues in TMS3 with Ala did not produce a significant effect on UapA function, and these Ser residues do not appear to lie in crucial positions in the model UapA structure.

Discussion

We have presented a functional analysis of rationally designed or genetically selected mutants affecting UapA function and turnover. The relevant

mutations analyzed and discussed here are located in regions predicted to correspond to TMS1 and TMS3 in UapA. The concomitant publication of the first NAT crystal structure from *E. coli* allowed us to build a topological model of UapA and to verify the topology and possible interactions of the mutations discussed in this work. The model UapA structure fully justified our results and interpretations concerning the role of specific residues in TMS1 and TMS3 in UapA folding, turnover and function.

TMS1 appears to be a key domain, as revealed by the pleiotropic character of mutations mapping within it. For example, the absolutely conserved Gln85 residue in the middle of this helix has been

shown to be essential for transport activity,²⁵ whereas the non-conserved Asn71 and Gln113 residues, located in the flanking cytoplasmic and extracellular loops of TMS1 have been shown to be crucial for both UapA specificity and transport kinetics.¹⁹ None of these purely functionally relevant mutations affect UapA turnover or localization in the plasma membrane. Furthermore, a non-conserved putative Leu zipper motif (Leu77, Leu84, Leu91) has been shown to affect both UapA turnover and transport kinetics, whereas the absolutely conserved His86 and the partially conserved Ile74 were shown, here and earlier,²⁵ to affect UapA folding, ER-exit, turnover and specificity. The central position of TMS1 in the UapA model structure, which allows it to make contacts with several other TMS in the core of UapA and, especially, TMS3, TMS8 and TMS10, justifies the genetic and biochemical data obtained with TMS1 mutations.

Ile74, which is predicted to map two amino acid residues upstream from the model TMS1 (Fig. 5b), could be functionally replaced by Ala, Gly or Val, which suggest that what is important in that case is retention of a hydrophobic or a small side chain at position 74. Most other NAT homologs have either hydrophobic (Ile, Leu and Met) or Pro residues at this position (Fig. 4a). This observation suggests that TMS1 in UapA might be longer than that of bacterial homologs and thus include Ile74. In that case, reducing the hydrophobicity of TMS1 through substitutions of Ile74 with polar residues (e.g. I74D and I74N) might affect UapA stability and/or ER-exit. The fact that no other similar case has been met with any hydrophobic to polar replacements in other TMSs suggests that acquisition of proper topology of TMS1 constitutes a crucial element for a functional build-up of UapA. Interestingly, most mutations concerning Ile74 (I74G, I74A and I74V) also reduce the affinity of UapA for uric acid and confer a low but measurable ability to bind other purines. Earlier data from our laboratory have shown that a number of UapA mutant versions or chimeric UapA/UapC molecules have a similarly reduced affinity for uric acid concomitant with increased capacity to recognize other purines.^{18,19,26} On the basis of these observations, we propose that subtle inter-domain interactions specifically evolved in UapA, but not in other known NAT homologs, form the basis for the exceptionally high affinity and high specificity of UapA for uric acid.^{19,26} The results of this study are in accord with this idea and show that TMS1 is a key domain in inter-domain interactions.

His86 is one of the few known absolutely conserved residues in NAT carriers. Given that members of the NAT family have different specificities and cation selectivity, we propose that His86 should not be involved directly in substrate or cation

recognition.²⁵ This prediction is in accord with our present results and the model structure. The genetic analysis showed a functional interaction of His86 (TMS1) with Met151 (TMS3), whereas the model showed a possible physical interaction of His86 (TMS1) with Asn409 (TMS10). Furthermore, Met151 is in the core of the β -strand of TMS3 which, in the model structure of UapA, appears to be within bonding distance to the β -strand of TMS10, just upstream from the NAT signature motif, in which Asn409 has been shown to be absolutely essential for UapA-mediated transport, despite the fact that it is not necessary for substrate binding.^{16,19} His86 and Asn409 substitutions share a similar functional profile, such as cryosensitivity, loss of transport capacity and conservation of substrate-binding ability.^{16,25} A conserved His (TMS1) – Asn (TMS10) interaction in NAT carriers might be crucial for substrate selectivity, as suggested by mutational analysis of the XanQ permease.²² In this case, it was shown that specific replacement of the analogous His in TMS1 (e.g. H31Q) recognizes low-affinity novel purine bases and analogs. Some other His31 substitutions (H31C and H31L) have led to impaired XanQ activity whereas others (H31K and H31R) have impaired expression in the plasma membrane, similar to the case of H86A and H86D in UapA. Interestingly, , unlike mutations in His86 in UapA (or His31 in XanQ), those concerning Asn409 (or Asn325 in XanQ) do not affect the topology of the transporter, further suggesting that TMS1 has a more complex role in NAT folding than that of TMS10.

On the whole, our results reveal an important physical and functional interaction of TMS1, TMS3 and TMS10 and suggest that mutations in His86 modify the turnover and/or function of UapA through alteration of this interaction. The importance of the interactions of TMS1 with other domains in the NAT family is further supported by work with the human SVCT1 and SVCT2 transporters, which showed recently that the analogous His residue in TMS1 (His51) contributes to substrate binding through a hydrogen bond, whereas mutations in the adjacent conserved Gln residue (Gln50) abolish sodium-dependent ascorbate transport activity.²⁹

We showed that Ser154 in TMS3 has a temperature-dependent effect on the activity of UapA. Single Ala replacements of all other Ser residues and of the conserved Phe155, did not produce a significant functional or turnover effect on UapA. Simultaneous replacement of all Ser of TMS3, except Ser154, with Ala residues did not produce a significant defect in UapA function or turnover (Fig. 4). The suggested functional role of Ser154 in UapA is further supported by studies of bacterial NATs permease.²² In XanQ, which is a transporter highly specific for xanthine, Asn93 corresponds to Ser154 of UapA.

Table 4. Forward primers used for gene specific probes, cloning purposes and for mutant construction

Mutation	Oligonucleotide sequence
uapA expBamHI F	5'-CGGGATCCCTCCATCCATCCATTCAACCGAC-3'
uapA XbaI R	5'-GCTCTAGAGCCTGCTTGCTCTGATACTC-3'
<i>hsp70</i> (ANID_02062.1) F	5'-CGAGGAGCGCCAGGTCA-3'
<i>hsp70</i> (ANID_02062.1) R	5'-AACTCCTCGGCCTCGGC-3'
I74D	5'-GGCCTCAACGAGAAGGATCCCGTGCTGTTGGCGTTTATC-3'
D86H	5'-GTTTATCCTGGGTCTTCAGCATGCGCTTGCCATGTTGG-3'
S145A	5'-CCAGGTAATATATCGGGCGTGGCGTCTCTCAGTTATG-3'
S149A	5'-CTATATCGGCAGTGGCGTCCCTCGCAGTTATGGGGGTCTCGTTTCTC-3'
S154A	5'-GTCCTCTCAGTTATGGGGGTTGCTTCTCCATCATCTCCGTCGC-3'
S154N	5'-GTCCTCTCAGTTATGGGGGTT AACTTCTCCATCATCTCCGTCGC -3'
F155A	5'-CTCAGTTATGGGGGTCTCGGCCTCCATCATCTCCGTCGC-3'
S156A	5'-GTTATGGGGGTCTCGTTCGCCATCATCTCCGTCGCAG-3'
S159A	5'-GTCTCGTTCATCATCGCCGTCGCCAGCGCGCCTTC-3'
S162A	5'-CTCCATCATCTCCGTCGCCCGCGCCGCTTCAACCAGATG-3'
S145A on S149A	5'-CCAGGTAATATATCGGGCGTGGCGTCTCTCAGTTATG-3'
S159A on S156A	5'-GTCTCGTTCGCCATCATCGCCGTCGCCAGCGCGCCTTC-3'
S162A on S156/159A	5'-CGCCATCATCGCCGTCGCCCGCGCCGCTTCAACCAGATG-3'

The nucleobase substitutions of the wild type *uapA* codon are shown in bold. Reverse primers complementary to the forward primers shown here were used for site-directed mutagenesis.

Replacements N93S and N93A are highly active but more promiscuous for recognition of analogs at the imidazole moiety of the substrate, including uric acid, whereas N93D has low activity. N93T has low affinity for xanthine or analogs and N93Q or N93C is inactive.¹⁸ It is interesting to note that the N93S replacement in XanQ partly mimics the specificity of fungal (UapA) or plant (Lpe1)³⁰ homologs (i.e. recognition of uric acid), which have Ser at this position. Furthermore, in UapA, the mirror image replacement S154N increased xanthine recognition (fourfold), whereas S154A has reduced (up to eightfold) uric acid affinity, somehow mimicking the bacterial XanQ permease (Table 3). A similar functional role of the analogous residue in the middle of TMS3 of still another bacterial NAT, the YgfU uric acid permease, was reported recently (K. Papakostas and S. Frillingos, personal communication). Interestingly, Ser154 is close to E356 in TMS8 (Fig. 5c and d), a residue essential for function,^{19,22} possibly through its direct interaction with substrates (V. Kosti *et al.*, unpublished results).

Materials and Methods

Media, strains, growth conditions, and transformation genetics

Standard media were used for growth of *A. nidulans* and *E. coli*.³¹ Chemical reagents were obtained from Sigma St. Louis, MO and from AppliChem GmbH. A strain $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA \Delta argB2 \Delta pabaA1$ ($\Delta UapA$) carrying a single-copy plasmid integration of the *uapA* ($UapA^+$) in the *argB* locus served as a standard wild type control. The parental strain used to select suppressors was $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA \Delta argB2 \Delta pabaA1$ ($\Delta UapA$), expressing the *uapA*-H86D or *uapA*-H86D alleles from a single-copy integrated plasmid.

pabaA1 is a genetic auxotrophy for *p*-aminobenzoic acid. UV mutagenesis is described elsewhere.¹⁵ An isogenic $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA \Delta argB2 \Delta pabaA1$ mutant was the recipient strain in transformations,³² with *uapA* alleles constructed or cloned in vectors pAN510GFP and pAN510exp or with an "empty" vector as a negative control (see below). These vectors allow selection of transformants based on arginine auxotrophy complementation. Transformants expressing intact *uapA* or *uapA-gfp* alleles, through either single-copy or multi-copy plasmid integration events, were identified by PCR and Southern analysis. In most cases, we selected transformants originating from single-copy homologous integrations in the *argB* locus. Growth tests were performed at 25 °C and at 37 °C, pH 6.8. The standard purine concentration used was 0.5 mM in all earlier studies concerning purine metabolism in *A. nidulans*.

Plasmid constructions and *uapA* mutations

pAN510 is a pBluescript vector carrying *uapA* with its flanking sequences and the *argB* gene as a selection marker.¹³ pAN510-GFP is a pBluescript vector carrying a *uapA-gfp* fusion with its flanking sequences and the *argB* gene as a selection marker.³³ pAN510exp is a modified version of pAN510, introducing a BamHI site at the translation start codon and knocking out a XbaI site in the pBluescript multicloning region for cloning purposes.¹⁹ The *uapA* orf from the original mutants was amplified by PCR using primers *uapA* expBamHI F and *uapA* XbaI R (Table 4), cloned in pAN510exp and sequenced (Macrogen Inc.). Mutations I74D, S145A, S149A, S154A, S154N, F155A, S156A, S159A and S162A alone and in combinations were constructed by site-directed mutagenesis according to the instructions accompanying the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) on vector pAN510-GFP, using complementary oligonucleotides carrying the desired substitution (Table 4), and were confirmed by sequencing. The M151V and M151I mutations were constructed by cloning the H86D/M151V and H86D/M151I open reading frame from the original

second site H86D suppressors on vector pAN510exp and reversing the first site mutation using primers D86H (Table 4). The plasmids constructed were introduced by transformation into a $\Delta uapA \Delta uapC \Delta azgA argB2 pabaA1$ strain and the resulting integration events were subjected to Southern analysis (see below).

Standard nucleic acid manipulations

Genomic DNA extraction from *A. nidulans* was as described.³⁴ Plasmid preparation from *E. coli* strains was done with the Nucleospin Plasmid kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel GmbH). DNA bands were purified from agarose gels using the Nucleospin ExtractII kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel GmbH). Southern and northern blot analyses were performed as described.³⁵ Total RNA extraction from *A. nidulans* was done with the TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). In northern blots, equal RNA loading (5–10 µg) was estimated by measurement of absorbance at wavelengths of 260 nm and 280 nm and controlled by estimating the amount of rRNA as described.³⁵ [³²P]dCTP-labeled molecules used as *hsp70* (ANID_02062.1) or *uapA*-specific probes were prepared using a random hexanucleotide primer kit following the supplier's instructions (Takara Bio Inc.) and purified on MicroSpin™ S-200 HR columns, following the supplier's instructions (Roche Applied Science). Labeled [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) was purchased from the Institute of Isotopes Co., Ltd. Restriction enzymes were from Takara Bio Inc. Conventional PCR reactions were done with KAPATaq DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS, USA). Cloning and amplification of products were done with Pfx Platinum (Invitrogen) or Phusion® Flash High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

Membrane protein extraction and western blot analysis

Cultures for protein extraction were prepared as described.³³ Mycelia from cultures were harvested, frozen and broken in liquid nitrogen. All subsequent steps were done at 4°C. Cell extracts were suspended in extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Unbroken cells and debris were removed by centrifugation for 3 min at 3000 rpm. The crude extracts were precipitated with 5% (w/v) TCA and centrifuged for 5 min at 13000 rpm. Pellets were recovered and suspended in extraction buffer supplemented with Protease Inhibitor Cocktail and 0.2 mM PMSF. Equal sample loading was estimated by Bradford assay. Total proteins (50 µg) were separated by SDS-PAGE (10% (w/v) polyacrylamide gel) and electroblotted (Mini PROTEAN™ Tetra Cell, BIO-RAD) onto a PVDF membrane (Macherey-Nagel GmbH) for immunodetection. The membrane was treated with 2% (w/v) non-fat dry milk or according to the manufacturer's instructions and immunodetection was done with a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody (Roche Applied Science), or a mouse anti-actin monoclonal (C4) antibody (MP Biomedicals) and a secondary goat anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling). Blots

were developed by the chemiluminescent method using the West Pico SuperSignal reagent (Pierce) and SuperRX Fuji medical X-Ray films (FujiFILM Europe GmbH).

Kinetic analysis

[³H]Xanthine uptake in conidiospores was assayed at 37 °C or 25 °C as described.^{14,17,36} Radiolabeled purines (19.6–33.4 Ci/mmol) were obtained from Moravек Biochemicals (Brea, CA). K_i values were calculated from the Cheng and Prusoff equation:

$$K_i = IC_{50} / [1 / (L / Km)]$$

where L is the permeant concentration.¹⁷

Epifluorescence microscopy

Samples for fluorescence microscopy were prepared as described.³³ In brief, the samples were incubated on coverslips in liquid Minimal Medium supplemented with urea as nitrogen source for 12–14 h at 25 °C, observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope with appropriate filters, and the resulting images were acquired with a Zeiss MRC5 digital camera using AxioVs40 V4.40.0 software. Images were then processed with Adobe Photoshop CS2 V9.0.2 software.

Model construction, validation and molecular simulations

Alignment of UapA and UraA was done with ClustalWS and the best model was built using MODELLER 9.8 software.³⁷ A stepwise validation approach was followed, consisting of MD model optimization, comparison with existing experimental data and, finally, visual inspection. First, theoretical models were subjected to 2.5 ns of stochastic dynamics simulation and found to be relatively stable, with a measured RMSD of alpha carbons from starting coordinates not exceeding 3 Å. After SD optimization, the best models were tested for structural consistency by considering all available experimental data. Both were in good accordance with mutagenesis and kinetics studies presented earlier and in the present study.

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jmb.2011.06.024](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.024)

Acknowledgements

We thank V. Myrianthopoulos, G. Lambrinides, C. Gournas and V. Taraslia for technical help in modeling, western blots and uptake assays, respectively. V. K. was co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education

and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: Heraclitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund. S. A and G. D. thank Professor J. Strauss (BOKU University, Vienna) for laboratory facilities and consumables. Work in the laboratory of G.D. is partly supported by the University of Athens (ELKE).

References

- Diallinas, G. & Gournas, C. (2008). Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)*, **2**, 363–372.
- Gournas, C., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.* **4**, 404–416.
- Rivas, C. I., Zúñiga, F. A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V. & Vera, J. C. (2008). Vitamin C transporters. *J. Physiol. Biochem.* **64**, 357–375.
- Tsakaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y. *et al.* (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **399**, 70–75.
- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L. & Catani, M. V. (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, **34**, 347–355.
- Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J. Y. *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. *J. Biol. Chem.* **285**, 6522–6531.
- Diallinas, G. & Scazzocchio, C. (1989). A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. *Genetics*, **122**, 341–350.
- Gorfinkiel, L., Diallinas, G. & Scazzocchio, C. (1993). Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23376–23381.
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S. *et al.* (1997). Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *EMBO J.* **16**, 3974–3986.
- Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C. & Diallinas, G. (2004). Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol. Microbiol.* **52**, 205–216.
- Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A. & Diallinas, G. (2010). Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol. Microbiol.* **75**, 246–260.
- Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2007). Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 657–675.
- Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A. & Scazzocchio, C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J.* **17**, 3827–3837.
- Meintanis, C., Karagouni, A. D. & Diallinas, G. (2000). Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Mol. Membr. Biol.* **17**, 47–57.
- Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2001). Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J. Mol. Biol.* **313**, 765–774.
- Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S. & Diallinas, G. (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **350**, 499–513.
- Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S. & Diallinas, G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 263–275.
- Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2006). A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.* **357**, 808–819.
- Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2008). Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J. Mol. Biol.* **382**, 1121–1135.
- Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. (2006). Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix. *J. Biol. Chem.* **281**, 39881–39890.
- Papakostas, K., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. (2008). Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. *J. Biol. Chem.* **283**, 13666–13678.
- Karena, E. & Frillingos, S. (2009). Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. *J. Biol. Chem.* **284**, 24257–24268.
- Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E. & Frillingos, S. (2010). Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the YgfO xanthine permease: ASN-325 binds and ALA-323 senses substrate. *J. Biol. Chem.* **285**, 19422–19433.
- Mermelekas, G., Georgopoulou, E., Kallis, A., Botou, M., Vlantos, V. & Frillingos, S. (2010). Cysteine-scanning analysis of helices TM8, TM9a, and TM9b and intervening loops in the YgfO xanthine permease: a carboxyl group is essential at ASP-276. *J. Biol. Chem.* **285**, 35011–35020.
- Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2006). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains

- determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 337–348.
26. Kosti, V., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. (2010). Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **397**, 1132–1143.
 27. Gregersen, N. & Bross, P. (2010). Protein misfolding and cellular stress: an overview. *Methods Mol. Biol.* **648**, 3–23.
 28. Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G. *et al.* (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, **472**, 243–246.
 29. Varma, S., Campbell, C. E. & Kuo, S. M. (2008). Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters. *Biochemistry*, **47**, 2952–2960.
 30. Argyrou, E., Sophianopoulou, V., Schultes, N. & Diallinas, G. (2001). Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell*, **13**, 953–964.
 31. Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 51–56.
 32. Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A. & Diallinas, G. (2003). A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 687–695.
 33. Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C. & Diallinas, G. (2007). Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 627–640.
 34. Lockington, R. A., Sealy-Lewis, H. M., Scazzocchio, C. & Davies, R. W. (1985). Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **33**, 137–149.
 35. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Editors of Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
 36. Goudela, S., Reichard, U., Amillis, S. & Diallinas, G. (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 459–472.
 37. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. (1995). Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **23**, 318–326.

Identification of the Substrate Recognition and Transport Pathway in a Eukaryotic Member of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Family

Vasiliki Kosti¹, George Lambrinidis², Vassilios Myrianthopoulos², George Diallynas^{1*}, Emmanuel Mikros²

¹ Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece, ² School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece

Abstract

Using the crystal structure of the uracil transporter UraA of *Escherichia coli*, we constructed a 3D model of the *Aspergillus nidulans* uric acid-xanthine/H⁺ symporter UapA, which is a prototype member of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) family. The model consists of 14 transmembrane segments (TMSs) divided into a core and a gate domain, the later being distinctly different from that of UraA. By implementing Molecular Mechanics (MM) simulations and quantitative structure-activity relationship (SAR) approaches, we propose a model for the xanthine-UapA complex where the substrate binding site is formed by the polar side chains of residues E356 (TMS8) and Q408 (TMS10) and the backbones of A407 (TMS10) and F155 (TMS3). In addition, our model shows several polar interactions between TMS1-TMS10, TMS1-TMS3, TMS8-TMS10, which seem critical for UapA transport activity. Using extensive docking calculations we identify a cytoplasm-facing substrate trajectory (D360, A363, G411, T416, R417, V463 and A469) connecting the proposed substrate binding site with the cytoplasm, as well as, a possible outward-facing gate leading towards the substrate major binding site. Most importantly, re-evaluation of the plethora of available and analysis of a number of herein constructed UapA mutations strongly supports the UapA structural model. Furthermore, modeling and docking approaches with mammalian NAT homologues provided a molecular rationale on how specificity in this family of carriers might be determined, and further support the importance of selectivity gates acting independently from the major central substrate binding site.

Citation: Kosti V, Lambrinidis G, Myrianthopoulos V, Diallynas G, Mikros E (2012) Identification of the Substrate Recognition and Transport Pathway in a Eukaryotic Member of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Family. PLoS ONE 7(7): e41939. doi:10.1371/journal.pone.0041939

Editor: Hendrik W. van Veen, University of Cambridge, United Kingdom

Received: February 17, 2012; **Accepted:** June 28, 2012; **Published:** July 25, 2012

Copyright: © 2012 Kosti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work in the laboratory of G.D. was supported by the John S. Latsis Public Benefit Foundation. The research performed by V.K. has been co-financed by the European Union (European Social Fund-ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF)-Research Funding Program: Heracleitus II, Investing in knowledge society through the European Social Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: diallyna@biol.uoa.gr

Introduction

The Nucleobase-Ascorbate Transporter (NATs) family, also called Nucleobase-Cation Symporter-2 (NCS2) family, is one of the most conserved carrier families, including hundreds of members in all organisms, prominent exceptions being *Saccharomyces cerevisiae* and protozoa [1,2]. The function and specificity of nearly 20 NAT proteins, coming from bacteria, fungi, plants and mammals, is presently known, showing that most of them are specific for the symport of xanthine, uric acid or uracil with H⁺. In primates however, NAT homologues (SVCT1 and SVCT2) are specific for the co-transport of L-ascorbic acid/Na⁺ [1,2]. Interestingly, none of the known NATs can recognise salvageable purines (adenine, guanine or hypoxanthine), cytosine or nucleosides. While in microorganisms NATs are not essential for life, serving mostly as nutrient scavengers for nucleobases, their function is necessary for normal growth and survival in plants and mammals [3,4].

The UapA transporter of the filamentous ascomycetes *Aspergillus nidulans* is the prototype member of the NAT family, being one of the most extensively studied eukaryotic carriers with respect to regulation of expression and structure-function relationships. This is not only because of historical reasons, as *uapA* was among the

first eukaryotic transporter genes identified genetically [5] and cloned [6,7] but mainly due to the fact that *uapA* mutants can be easily selected or constructed through classical or reverse genetics, and subsequently analysed biochemically in great detail with simple kinetic studies. The wild-type transporter was shown to be highly specific for the uptake of xanthine and uric acid, as both substrates are recognised with high affinity (7–8 μM) and transported with high capacity [8–10]. In addition, several analogues of xanthine or uric acid, especially those that do not have modifications in positions N1-H, N7-H or N9 of the purine ring, were shown to act as substrates or ligands, albeit with lower affinity [10,11]. Through the analysis of more than a hundred UapA mutants, especially those affecting the specificity or the transport kinetics, the functional importance of several residues has been established [1,2,12,13]. Four absolutely conserved amino acid residues (Q85, E356, D388 and N409) are irreplaceable for function. Among these residues, E356 was proposed to form direct contacts with the purine ring, based on the fact that a specific mutation (E356D) dramatically increases the binding of physiological substrates but reduces their transport [11]. A second partially conserved amino acid, Q408, was also proposed to be involved in direct contacts with substrates, because its substitution with Pro dramatically reduces binding of the physiological

substrates, but mostly because its substitution with Glu offers UapA the capability of recognizing novel substrates, such as hypoxanthine and guanine [9]. Furthermore, a kinetic analysis using several xanthine analogues as competitive inhibitors of xanthine uptake suggested that E356 and Q408 might interact with N1H and N9 or N7H of the purine ring [11]. Four additional absolutely or partially conserved residues, H86, G411, T417, R418, were also shown to be crucial for determining the transport activity of UapA [9,10,14]. Importantly, reverse genetics and Cys-scanning mutational analysis of the homologous XanQ xanthine transporter of *Escherichia coli* showed that the same residues as those found essential for UapA function are also critical for the activity of the bacterial carrier [15–18]. Most interestingly, randomly selected specificity mutations enlarging the substrate profile of UapA concerned nine partially or non-conserved residues, namely N71, Q113, F406, A441, V463, A469, R481, T526 and F528, distributed in several regions of UapA structure [11,12,19,20]. None of these residues was however critical for the binding and transport efficiency of the physiological substrates of UapA.

The crystallization of the first NAT homologue from *Escherichia coli*, the uracil transporter UraA [21], allowed us to build a preliminary topological model of UapA and to verify the topology of the residues affecting UapA function and specificity [13]. The 3D model of UapA corresponds to a cytoplasm-facing conformer made of 14 transmembrane segments (TMSs) divided into two inverted repeats (TMS1–7 and TMS8–14). The structure is spatially arranged into a core and a gate domain, consisting of TMS1–4/8–11 and TMS5–7/12–14, respectively. All residues essential or critical for UapA function fall within TMS1, TMS3 and TMS10 in the core domain. More importantly, residues E356 (TMS8) and Q408 (TMS10) in UapA correspond to residues E241 and E290 in UraA, which were shown to interact with the uracil. The UapA model also revealed putative critical interactions of TMS1 with both TMS3 and TMS10. The importance of TMS3 and the interaction of TMS1 with TMS3 were genetically supported by characterising second-site suppressors of the H86D mutation (TMS1), which are located in M151 (TMS3). Thus, both in UraA and UapA the substrate binding site seems to be built by specific residues in TMS3, TMS8 and TMS10. A similar conclusion was drawn by a recently published 3D model of the XanQ permease [22]. Interestingly, the preliminary UapA model also confirmed that all specificity mutations which do not affect the kinetics of transport of physiological substrates are located distantly from the proposed binding site, that is, outside TMS1, TMS3, TMS8 and TMS10. This observation is in line with our previous proposals that specificity mutations define elements of selectivity filters or dynamic gates which allow or restrict the access of substrates to the *actual* binding site [11,12,19,20].

In this work, we propose a structural model of UapA, through the implementation of a variety of computational methodologies. In addition, the construction and analysis of a number of rationally designed mutations was carried out, in order to gain further insight into the role of the various elements that constitute functional determinants of UapA. The group of residues experimentally characterized as critical for UapA function and specificity was identified and their role in substrate binding and transport was addressed in terms of structure as well as dynamics. The role of the functionally irreplaceable residues E356 and Q408 as the main interacting partners of the various UapA substrates was confirmed. A quantitative structure-activity relationship (SAR) model comprised by an extended set of UapA substrate analogues was constructed. The SAR model was in full agreement with our previous genetic and biochemical studies. Furthermore, advanced molecular simulations outlined a possible translocation mechanism

for the physiological substrate by providing a trajectory-like displacement of xanthine across the protein and towards its cytoplasmic side. Possible selectivity gates at the outward and inward ends of the substrate translocation pathway are also proposed. We finally discuss the possible role of residues in the major binding site with respect to the specificity shift from nucleobases to ascorbate in members of the NAT family.

Results and Discussion

A UapA Structural Model

The construction of a structural model of UapA became possible by the recent release of the crystal structure of UraA of *E. coli* [13,21]. The two proteins share a rather moderate sequence similarity (23% identity, 41% positives), which is however adequate for sustaining a theoretical model of UapA, especially if combined with the plethora of the existing experimental data. The model built here was based on the multiple alignment of the NAT proteins of known function and specificity which was further modified manually so that it accommodates the correct version of UapA primary sequence (Uniprot accession number Q07307, replacing erroneous sequences CBF71770.1 and EAA57687.1) (Figure 1). Model building was performed using MODELLER software. This algorithm has been used recently with success for the norepinephrine transporter NET [23]. The loop refinement routine and a slow simulated annealing protocol for model refinement were implemented and 40 models were obtained. The structure with the optimal objective function was selected for further validation. As a first validation of the model, the structure with the best spatial restraints score was subjected to a 50 ns molecular dynamics run using Desmond software [24]. The system was prepared by embedding the protein in a POPC lipid bilayer and solvating the membrane by explicit water. The RMS deviation of the C α -carbons of all Helices, from starting coordinates was monitored throughout the simulation and did not exceed 3.0 Å, thus indicating the stability of the theoretical model (Figure S1).

The overall 3D structure of the UapA model (Figure 2) corresponds to a cytoplasm-facing conformer made of 14 transmembrane segments (TMSs) that adopt a mostly helical secondary structure. The architecture of the transporter divides it in two distinct subdomains, the core which consists of TM segments 1–4 and 8–11 and the gate consisting of segments 5–7 and 12–14. The transmembrane helices are connected by large loops, the majority of which notably corresponds to lengthy insertions in the sequence alignment, thus posing an additional difficulty in obtaining an accurate conformational representation for this part of the transporter. The distribution of the ionized residues on the protein surface is fairly reasonable, as most of them are positioned either at the cytoplasmic and periplasmic sides or along the protein pore in the protein interior. Positive charges are mostly concentrated in the cytoplasm-facing loops.

Genetic Support for the UapA Model

The topology of residues found to be crucial for UapA function through physiological, cellular and kinetic analyses of relevant mutants is indicated in Figures 1 and 2 and information on them is summarized in Table 1. The overall picture is that critical residues in terms of substrate binding and transport are positioned in good accordance with existing genetic and biochemical data. All residues so far identified as essential or critical for UapA function are located within TMSs 1, 3, 8 and 10 of the core domain. More specifically, the NAT signature motif Q/E/P-N-X-G-X₄-T (Q⁴⁰⁸N⁴⁰⁹N⁴¹⁰G⁴¹¹X₄T⁴¹⁶R⁴¹⁷ in UapA), which was proposed by

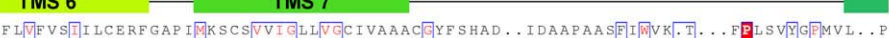
UapAMDSNIH .STDGPPDSVIPNSNPKTTVRORVRLRLARHLITREGLIGDYDYGFLLFRPELPPMKK[P]RAPPFF[L]NEK 73
 UapCMDGPDQIGDPVRRPRTFGDVRRAARAFTTRDGLIGDYDYGFLLFRPLPVVKO[K]RRRAAPP[L]LEDK 66
 LpelMNSAVCSLESNSRRGDGALSSTED .QKTKRDKQKDFSSSHLAV[G]ILD 50
 SNB11MNSAVCSLESNSRRGDGALSSTED .QKTKRDKQKDFSSSHLAV[G]ILD 50
 SVCT1MRAQEDLEGRTOHETTRDPTLPT[P]KFDML[K]IED 38
 SVCT2 MMGIGKNITSKSMEAGSSSTEGKYEDEAKHPAFTPLPVVINGGATSSGEQDNEDTELMAIYTTENGIAEKSSLAETLDSGSLDP[G]RSDMI[T]EDV 96
 XanQMDSINHAGSDLI[L]FELEDR 18
 XanPMSVSTLESENAQPVAOT[O]NSELI[V]RELEDR 29
 YgfUMSAIDSQLPSSSSGQ[Q]RPTDEVDRI 24
 PucJMK 02
 UraAMSKAPITH.NTED[O]NTMTRRAI[G]VSE 25
 PyrPMHDNDILK.VDEK 13
 RutGMAMFGFPHWQLKST[O]STESGVVA[P]EDER 26



UapA [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 168
 UapC [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 163
 Lpel [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 115
 SNB11 [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 133
 SVCT1 [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 145
 SVCT2 [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 191
 XanQ [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 102
 XanP [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 113
 YgfU [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 109
 PucJ [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 86
 UraA [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 85
 PyrP [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 84
 RutG [I]FVLLAFI[L]GL[O]HA[L]AM[L]AG[V]T[PP]L[L]I . . .SSLSL[S]F[SD]LQO[V]L[S]T[L]V[S]C[L]L[S]M[V]Q[I]TRFH[Y]KTP[Y]Y[I]G[S]G[V]L[S]V[M]E[V]S[F]S[I]S[V]SAGAFNQM 97



UapA [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 256
 UapC [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 255
 Lpel [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 205
 SNB11 [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 242
 UraA [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 229
 SVCT2 [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 288
 XanQ [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 194
 XanP [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 181
 YgfU [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 195
 PucJ [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 161
 UraA [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 169
 PyrP [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 159
 RutG [Y]SNGFC[Q]LDEAGNRLPCPEAYGAL[IT]SACCA[L]V[ET]L[L]AF[V]P . . .PKV[IT]OKIF[P]P[MT]GPTV[M]LIGIS[L]IGT[G]F . . .KDWAGGSACMD . . .DGM[IC]P 174



UapA [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 345
 UapC [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 344
 Lpel [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 282
 SNB11 [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 330
 UraA [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 323
 SVCT1 [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 333
 SVCT2 [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 379
 XanQ [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 258
 XanP [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 270
 YgfU [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 256
 PucJ [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 236
 UraA [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 239
 PyrP [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 243
 RutG [S]ATAPRPLPWGSPPEFVIGLGLF[EV]S[IT]ILCERF[G]P[IT]K[S]C[S]V[V]IG[L]L[V]G[C]I[V]A[A]C . . .YF[SH]AD . . .IDAAPA[S]F[I]M[V]K . . .T . . .P[LS]V[Y]G[M]V[L] . . .P 248



UapA [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 438
 UapC [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 437
 Lpel [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 376
 SNB11 [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 427
 UraA [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 381
 SVCT1 [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 414
 SVCT2 [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 473
 XanQ [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 354
 XanP [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 366
 YgfU [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 328
 PucJ [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 311
 UraA [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 331
 PyrP [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 336
 RutG [I]I[A]V[F]I[C]A[C]E[C]I[G]V[T]A[C]D[V]S[R]L[E]V[R]G[G]T[F]E[S]R[Q]G . . .A[V]L[A]G[I]N[S]V[A]A[L]A . . .T[M]P[M]T[F]A[O]N[N]G[V]I[A]I[T]R[C]A[N]R[W]A[G]Y[C]C[C]L[I]L[V]A[G]T[F]A 339



UapA [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 531
 UapC [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 531
 Lpel [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 471
 SNB11 [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 517
 UraA [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 504
 SVCT1 [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 561
 SVCT2 [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 445
 XanQ [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 447
 XanP [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 431
 YgfU [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 410
 PucJ [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 405
 UraA [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 412
 PyrP [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 412
 RutG [K]F[A]A[A]I[V]A[P]P[S]V[M]G[K]M[F]T[F]A[S]V[S]I[S]G[A]I[V]A[K]A[P]F . . .T . . .R[R]N[R]F[L]T[A]S[M]A[L]G[V]G[A]T[L]V[P]T[F]W[G]N[V]P[F]Q[T] . . .E[N]R[D]L[E]G[F]E[A]I[A]L[V]L[E]T[G]F[A]V 414



UapA [A]F[V]A[M]L[L]N[A]I . . .M[P]A[E]V[E] . . .I[G]A[V]T[P]M[P]V[S]A[H]N[R]D[G]E[A]E[Y]Q[S]K[A] 574
 UapC [A]F[V]A[M]L[L]N[A]I . . .M[P]A[E]V[E] . . .I[G]A[V]T[P]M[P]V[S]A[H]N[R]D[G]E[A]E[Y]Q[S]K[A] 580
 Lpel [A]I[L]A[V]L[L]C[T]H[Y]W[E]A[S]V[K]K . . .R[G]W[F]W[E]K[F]S[Y]K[Y]D[G] . . .R[E]E[F]Y[P]L[P]Y[G]L[S]R[Y]F[P]S[L] 527
 SNB11 [A]I[L]A[V]L[L]N[T] . . .I[P]G[S]L[E] . . .R[G]L[L]A[W]E[I]Q[E]D[S]E[T]P[K]A[K]S[Y]V[L]P[W]G[I]G[T]K[F]C[T]S[S]C[R]L[L]P[F]W[R]I[D]H[H]G[D]E[V]G[A]S[Q]L[L]T[C]S[S]G[K]H[P]W[S]V[T] 610
 UraA [A]G[L]A[F]L[L]N[T] . . .V[P]G[S]P[E] . . .R[G]L[I]Q[W]K[A]G[A]H[A]N[S]D[M]S[S]L[S]K[Y]D[F]I[G]M[G]I . . .V[K]R[I]T[F]L[K]Y[I]P[I]C[V]F[K]G[F]S[S] . . .S[K]D[Q]I[A]E[P]T[E]N[E]T[A]S[V]C 650
 SVCT1 [A]G[L]A[F]L[L]N[T] . . .I[P]G[S]L[E] . . .R[G]R[K]W[K]K[G]V[G]K[G]N[S]L[D]G[M]S[Y]N[L]P[F]G[M]N[I] . . .I[K]K[Y]R[C]F[S]Y[L]P[I]S[P]T[F]V[G]Y[T]W[K] . . .G[L]R[K]S[D]N[S]R[S]D[E]D[S]Q[A]T[G] . . . 466
 SVCT2 [G]L[T]A[L]I[L]L[P]G[Y]R[Q]E[N]V . . .I[P]G[S]T[A]E[M]D 463
 XanQ [G]T[A]I[V]A[N]I[L]I[P]G[E]KS[V]S[D]K[L]K[V]R[T]V[R]M[L]L[M]K[L]K[N]E[H]G 482
 XanP [T]L[S]A[V]L[L]V[F]N[G]Y[Q]H[H]A[L] . . .K[E]S[V]S[D]K[L]K[V]R[T]V[R]M[L]L[M]K[L]K[N]E[H]G 449
 YgfU [S]I[T]A[V]L[L]L[F]F[S]L[R]D . . .K[K]E[L]T[A]Q[O]T[E]L[V]L[E]T[L]A[L]E[K]V 443
 PucJ [T]I[V]G[I]L[S]L[I]P[K]L[S]V[R]P[E] . . .V[L]D[A]E[D]A[D]I[T]D[K] 443
 UraA [T]I[L]G[V]L[L]V[L]P[K] . . .D[E]S[E]I 430
 PyrP [T]F[G]A[L]I[L]A[L]L[S]R[K]L[V]D[V]P[P]E . . .V[V]H[Q]E[P] 442
 RutG [T]F[G]A[L]I[L]A[L]L[S]R[K]L[V]D[V]P[P]E . . .V[V]H[Q]E[P] 442

Figure 1. Multiple alignment of UapA, UraA and NAT homologues of known function and specificity, used for UapA modeled structure. Putative transmembrane segments (TMS) of UapA are denoted in colored cylinders. TMSs forming short β -sheets are shown with arrows. α stands for α -helical segments. Invariant and highly conserved amino acids are shaded in red and blue-lined boxes, respectively. Amino acids critical for function and specificity discussed in the text are highlighted with asterisks: red for residues of the substrate binding site, orange for those located in the substrate translocation pathway, green for aminoacids enlarging specificity and black for other important residues involved in dynamic interactions of TMSs. The listed NAT homologues include: UapA of *Aspergillus nidulans*, GI: 88984992; UapC of *Aspergillus nidulans*, GI: 790973; Lpe1 of *Zea mays*, GI: 162462794; SNBT1 of *Rattus norvegicus*, GI: 284010030; SVCT1 of *Homo sapiens*, GI: 6652824; SVCT2 of *Homo sapiens*, GI: 6048257; XanQ of *Escherichia coli*, GI: 161784262; XanP of *Escherichia coli*, GI: 84028014; YgfU of *Escherichia coli*, GI: 85675700; PuCJ of *Bacillus subtilis*, GI: 16080296; UraA of *Escherichia coli*, GI: 187775829; PyrP of *Lactococcus lactis*, GI: 15673585 and RutG of *Escherichia coli*, GI:89107857. doi:10.1371/journal.pone.0041939.g001

functional studies to be an essential element for substrate recognition and transport, is located on TMS10 in a small 9-residue helix opposite TMS8, at the interface between the two

protein subdomains (see Figure 2C). The importance of the NAT motif is dual. First, Q408 is directly involved in substrate binding, as strongly suggested by functional studies [9] its alignment with

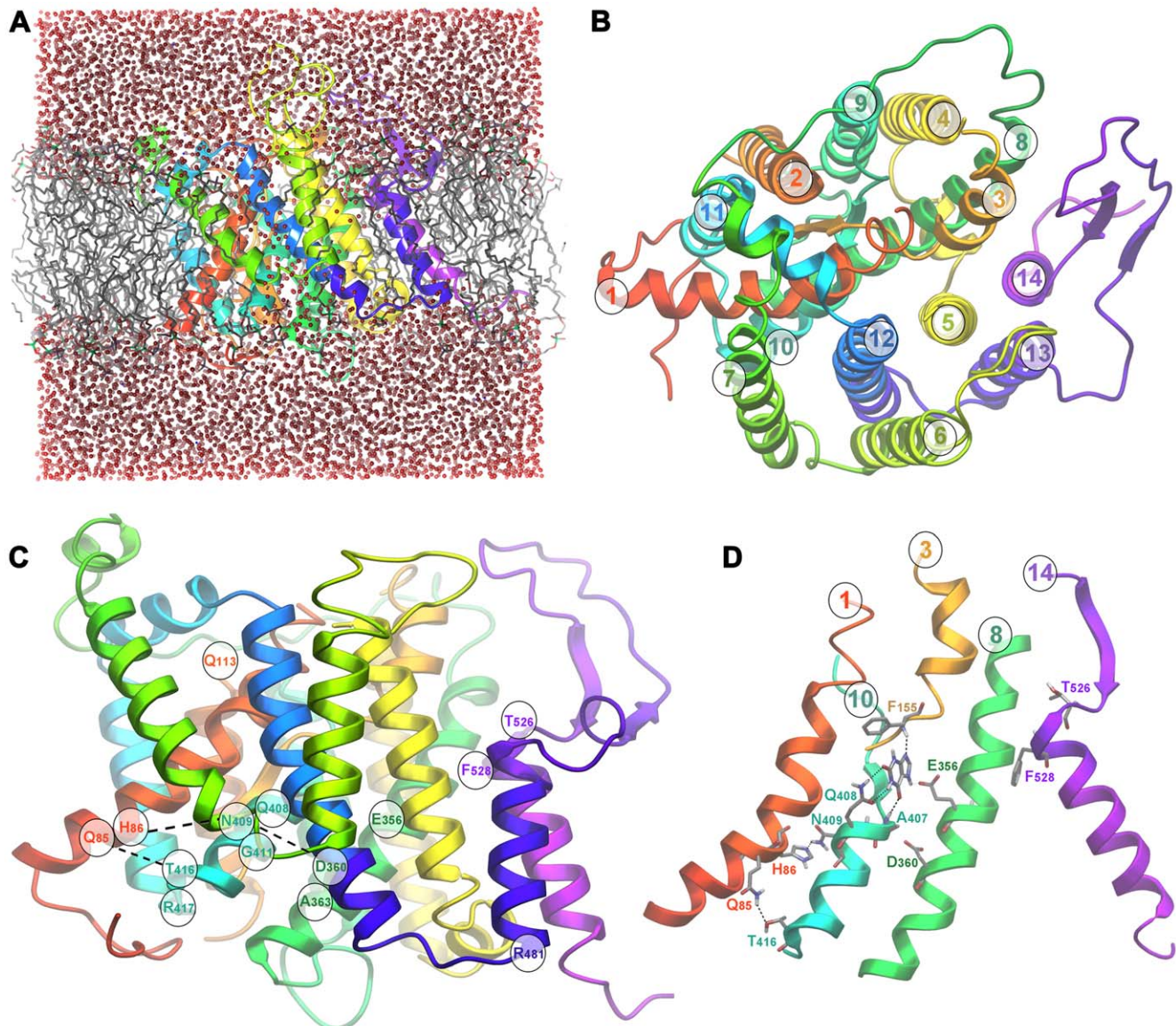


Figure 2. Theoretical structure of UapA. (A) Modeled 3D structure of the UapA validated with molecular dynamics using Desmond software. (B) Top view of UapA model, indicating core (TMS1–4, 8–11)/gate (TMS5–7, 12–14) domains and TMS numbering. (C) Side view of UapA structure showing the topology of residues selected as crucial for the function (Q85, H86, E356, A363, Q408, N409, G411, T416, R417) and specificity (Q113, R481, T526, F528) of UapA. (D) Detailed view of dynamic interactions between TMS1 (Q85, H86), TMS8 (D360) and TMS10 (N409, T416). TMS14 is also shown to highlight the position of residues T526 and F528, which are mostly critical for UapA specificity, in respect to all other important residues in TMS1, TMS8 and TMS10, involved in substrate binding and transport. In (a), (c) and (d) the upper part of the figure is outward-facing and the lower part is cytoplasmic-facing. doi:10.1371/journal.pone.0041939.g002

E290 which is a residue interacting with substrate in UraA [21], and from docking studies performed herein (see later). Second, N409, N410 and T416 seem to be involved in the stabilization of the protein tertiary intra-subdomain structure. More specifically, according to the model, a network of hydrogen bonds is formed between the side-chains of N409, H86, Q85 and T416 facilitating the interaction of TMS1 and TMS10, both belonging to the core subdomain (see Figure 2C, 2D). Experimental support for dynamic intramolecular interactions between these residues comes from the fact that substitution of any of the four residues confers cryosensitivity to UapA transport activity. Furthermore, most substitutions of these residues lead to a dramatic reduction in V_m , but do not affect K_m values or the localization of UapA into the plasma membrane [9,14]. A similar network is comprised by the side-chains of N410, T405 and D360, possibly strengthening the interaction between TMS8 and TMS10, which also belong to the protein core. Furthermore, the UapA model also revealed putative critical interactions of TMS1 with both TMS3 and TMS10. The importance of TMS3 (residues F155 and S154) and its interaction with TMS1 were genetically supported by functional studies of relevant mutants and by second-site suppressors of the H86D (TMS1) mutation, which are located in M151 (TMS3) [13]. Finally, residue E356 in UapA, which previous functional studies [11] and docking studies performed herein (see later) show that is the second major residue involved in direct interactions with xanthine (see below), aligns perfectly with E241 in the UraA structure, which is a residue shown directly to interact with the substrate. Significantly, an homology model of the structure of the XanQ permease in *E. coli* has also shown that functional mutations map in TMS1, TMS3, TMS8 and TMS10 [22]. Thus, functional studies in two evolutionary very distant homologous transporters, such as UapA and XanQ, validate the details of the crystal structure of UraA and the modeled structures of UapA and XanQ, especially as far as it concerns the substrate binding site.

Interestingly, in UapA, elements distinct from the binding site, located in the C-terminal part of the protein (TMS12–TMS14) and in the TMS1–2 loop (see Figure 2C), were shown to control substrate specificity, thus supporting the idea that NATs consist of two topologically and functionally distinct structural folds, the core and the gate domain, as this was proposed for the UraA structure [21]. This observation also formed the basis of our previous proposal which stated that specificity mutations define distinct selectivity filters or dynamic gates which allow or restrict the access of substrates to the actual binding site (see also later). Noteworthy, UapA and XanQ/UraA have significant structural differences in their gating domains, which is reflected in genetic and functional differences [11,20,25]. This is highlighted by mutations in TMS14 concerning residues T526 and F528 in UapA, which correspond to N430 and Ile432 in XanQ. In particular, while T526 and F528 mutations enlarge dramatically the specificity of UapA, the analogous mutations in XanQ affect mostly the transport kinetics in respect to the physiological substrate xanthine and much less the specificity for certain xanthine analogues with bulky substitutions. This observation suggests that in the course of evolution UapA has acquired a more flexible gating domain, a hypothesis in line with a significant longer TMS13–TMS14 in UapA compared to XanQ.

Substrate Docking Leads to a Model for Xanthine-UapA Interactions

A major objective of the present study was the elucidation of the recognition process between UapA and its physiological substrates and their subsequent translocation along the transporter pore. To this respect two objectives were pursued. The first was the determination of the role played by residues which have been

identified through genetic studies as critical for interacting with the physiological substrate. The second was the construction of a structure-activity relationship hypothesis based on those results, which could in turn facilitate the design of compounds that by competing with the physiological substrates could act as inhibitors with potential medical importance. To approach the issues of substrate recognition and translocation, a model of the interaction between UapA and xanthine was created using docking-scoring calculations and the structure of UapA as derived from homology. Docking calculations were performed using two distinct docking protocols, a protocol based on the mixed low-mode/Monte Carlo sampling algorithm for flexible docking and the Induced Fit Docking protocol (IFD) as introduced by Schrodinger 2011 Suite of programs. The IFD protocol is based on an iterative implementation of Glide algorithm for rigid docking and Prime algorithm for protein refinement, resulting in an improved simulation of binding in terms of protein flexibility. This allows for a highly efficient and sophisticated compromise of docking speed and binding accuracy. Furthermore, since Prime is a modeling tool especially developed for refinement of protein structures derived by homology, its implementation as part of the IFD protocol was considered in the case of UapA as promising since it represented an approach complementary to the classical low-mode/Monte Carlo where the protein is modeled as flexible. An additional issue that was addressed concerned the tautomerism of xanthine. In neutral pH xanthine adopts two dominant, almost equally populated tautomeric states [26] which however introduce a key difference to the hydrogen bond properties of each isomer. The different protonation states of N7 and N9 and the corresponding tautomers are denoted as Xan7H and Xan9H respectively.

Docking results were fairly consistent with genetic data however relatively inconclusive in suggesting a unique binding mode for xanthine. Two different docking poses were obtained as lowest energy structures for each tautomer, poses 3A and 3B for the UapA-Xan7H complex and poses 3C and 3D for the UapA-Xan9H complex (Figure 3). In pose 3A Xan7 is stabilized in the protein substrate binding domain by 5 hydrogen bonds. In that pose Q408 plays a key role in binding, in good agreement with data suggesting a direct contribution of that residue to substrate recognition [9,11]. The aforementioned hydrogen bond which is formed between Q408 side chain amide and xanthine is also present in pose 3C describing the UapA-Xan9 interaction. Yet, while in pose 3A the binding partners of Q408 are the NH at position 1 and the carbonyl at position 2 of Xan7H purine ring, in pose 3C the respective interaction sites are NH at position 1 and the carbonyl at position 6 of Xan9H. Genetic data have denoted the carboxylate of E356 as an essential element in protein recognition [11]. Docking results were in accordance with these data as it was shown that this residue interacts through a hydrogen bond with the NH at either position 7 of Xan7H or position 9 of Xan9H and possibly influences the orientation of the ligand inside the protein binding pocket (Figure 3). Two additional interactions further contribute to the stabilization of the complexes, the interaction between the backbone NH of A407 and either 6-carbonyl (Xan7H) or 2-carbonyl (Xan9H) and the interaction between the backbone carbonyl of F155 and either N9 of Xan7H or N7 of Xan9H. In pose 3B of the UapA-Xan7 complex, the substrate is also anchored through 5 hydrogen bonds. In that geometry Q408 interacts with the N3H and N9 of the purine while E356 interacts with NH1. Finally, in pose 3D the UapA-Xan9H is stabilized by 4 hydrogen bonds, where Q408 contributes only one hydrogen bond while E356 interacts with the N1H of xanthine. Interestingly, the interaction between A407 and F155 backbone

Table 1. Summary of residues critical for UapA function and specificity.

Allele	Location	Core Domain	Gate Domain	Effect on transport capacity ¹	Major Substrate binding site	Trajectory (t) or Gate (g)	Enlarged specificity	Critical polar interactions
Q85	TMS1	+	–	+	–	–	–	T416
H86	TMS1	+	–	+	–	–	–	N409
Q113	TMS1–2 loop	+	–	+ or –	–	–	yes	–
M151	B3/TMS3	+	–	+/-	–	–	–	–
S154	TMS3	+	–	+/-	–	–	–	–
F155	TMS3	+	–	–	yes ²	–	–	–
E356	TMS8	+	–	+	yes	–	–	–
D360	TMS8	+	–	+	–	t	–	T405, N410
A363	TMS8	+	–	–	–	t	–	–
F406	B10/TMS10	+	–	–	–	–	yes	–
A407	TMS10	+	–	+	yes ²	–	–	–
Q408	TMS10	+	–	+	yes	–	yes ³	–
N409	TMS10	+	–	+	–	–	–	H86
G411	TMS10	+	–	+ or –	–	t	–	–
T416	TMS10	+	–	–	–	t	–	Q85
R417	TMS10	+	–	–	–	t	–	–
A441	TMS11–12 loop	–	+	–	–	–	yes	–
V463	TMS12	–	+	–	–	t	yes	–
A469	TMS12	–	+	–	–	t	yes	–
R481	TMS13	–	+	–	–	–	yes	–
T526	TMS14	–	+	–	–	g	yes	–
G527	TMS14	–	+	+	–	g	yes	–
F528	TMS14	–	+	–	–	g	yes	–

TMS: transmembrane segment.

B: beta sheet conformation within the TMS.

¹“–”: no major effect on Vmax >50%, “+”: major effect on Vmax <10%, “+/-”: Vmax <30% and “+ or –”: depending on specific substitution.

²Evidence for involvement in substrate binding through peptide backbone interactions, as shown by docking. Consequently mutations with relatively small amino acids do not have an effect.

³Q408E, confers ability to bind hypoxanthine and guanine, but does not lead to their transport. Q408 in combination with gate mutations leads to high-medium affinity binding and transporter of all purines and uracil.

doi:10.1371/journal.pone.0041939.t001

and the substrate is conserved in all four poses with small variations on the xanthine interaction partners. An additional favourable interaction which was commonly present in all four binding orientations was the π - π stacking of the electron-rich purine system between the side-chains of F406 and F460.

To further explore the conformational space of the UapA-xanthine complex and evaluate the convergence of the IFD protocol, fully flexible docking calculations were undertaken using the low mode/Monte Carlo sampling method. The results from the IFD calculations were used as starting structures. The consistency between the two methodologies was fair. In the case of tautomer Xan7H, the global minimum structure of the UapA complex was identical to pose 3A originating from IFD calculations. However, the global minimum structure of Xan9H inside the binding pocket was not close to poses derived from IFD calculations, and lacked specific interactions with the protein. Thus, while docking calculations have provided a rich insight to the recognition process which was in full consistency with genetic data, they were inconclusive in determining the dominant binding geometry out of the four possible Xan orientations and/or protonations.

SAR Confirms the Mode of Xanthine Binding to UapA

To further check the consistency of the four different binding modes of Xan with all existing experimental data, we attempt the creation of quantitative Structure Activity Relationship (SAR) models by considering a small set of xanthine analogues with known free energy of binding (Figure 4A). For that purpose, the iterative docking-scoring methodology of PrGen 2.1 software was used [27]. Theoretical binding affinities (E_{binding}) were estimated by evaluating ligand-receptor interaction energies, ligand desolvation energies and changes in both ligand-internal energy and ligand internal entropy upon receptor binding (see Materials and methods). Calculated free energies $\Delta G^{\circ}_{\text{pred}}$ were then obtained by linear regression between experimental free energy $\Delta G^{\circ}_{\text{exp}}$ and E_{binding} . A training set of seven xanthine analogues was used (XAN, 2SX, 6SX, 3MX, 8MX, 9MX, 8AX) and four different models were created by superimposing all ligands to each of the four poses of xanthine, using for each analogue the appropriate tautomer. Xanthine analogues showing a very low binding affinity, such as 1-methylxanthine and hypoxanthine were excluded from the training set, but retained as test set. The quality of each model was evaluated by the coefficient of determination r^2 for the correlation between experimental and predicted ΔG° and the degree of deviation from Xan orientation. While models 3A and

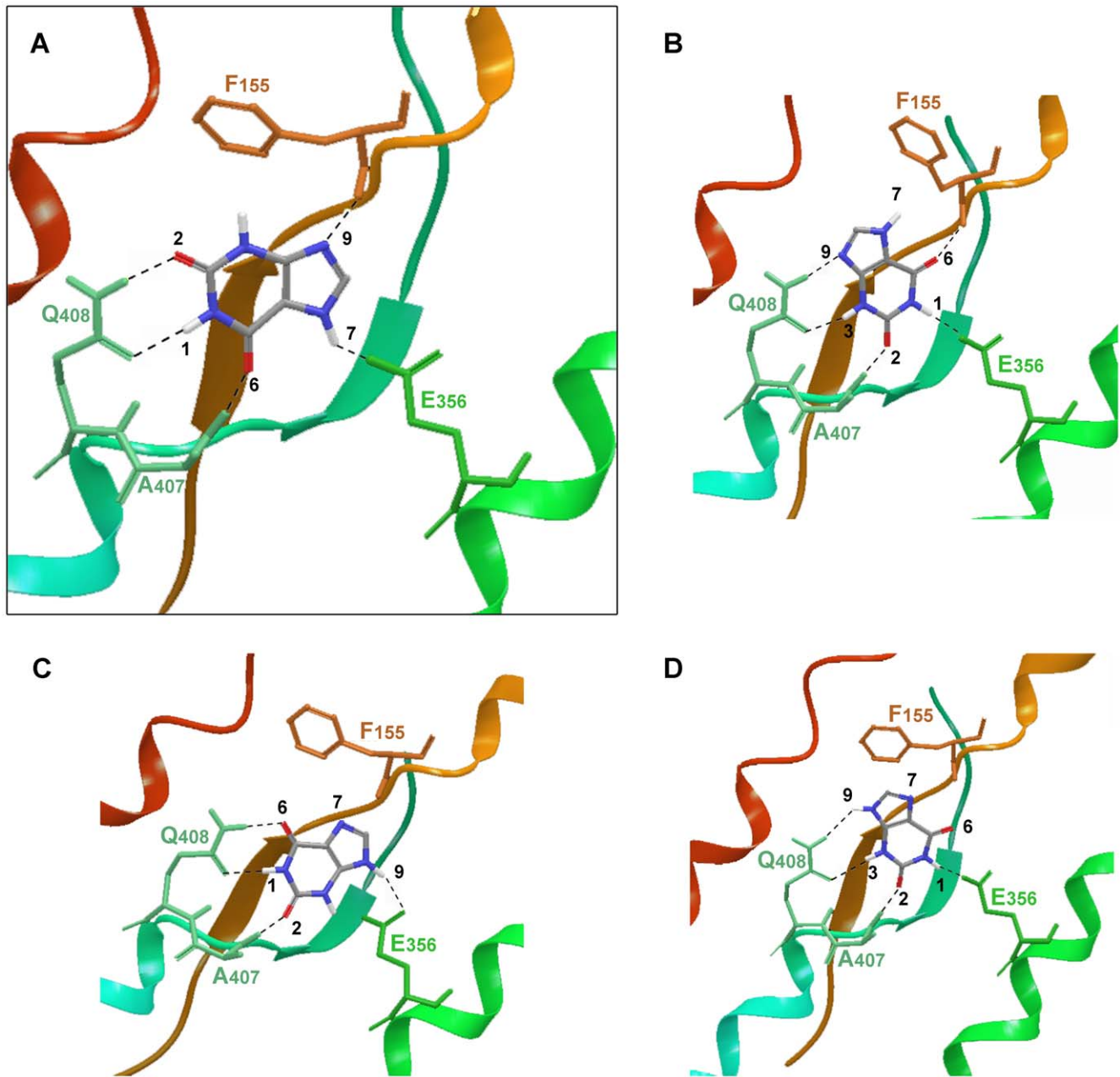


Figure 3. UapA – substrate interactions. Schematic representation of the four different docking poses (A–D) of xanthine-UapA interactions (models 1–4 accordingly). Poses (A) and (B) show the modeled UapA-Xan7H complex and poses (C) and (D) the modeled UapA-Xan9H complex. The most favoured model is shown framed and in bigger scale (A). This model was supported by docking using mixed low-mode/Monte Carlo sampling algorithm for flexible docking and the Induced Fit Docking protocol (IFD), as well as, SAR.
doi:10.1371/journal.pone.0041939.g003

3C demonstrated a satisfactory correlation (r^2 of 0.958 and 0.964 respectively), a poor r^2 was determined for models 3B and 3D (0.567 and 0.473).

In model 3A the good correlation (Figure 4B) was accompanied by docking poses (Figure 4C) of the different analogues that were in agreement with the pose of xanthine, while a repositioning of all analogues with respect to starting pose was evident in model 3B. It is considered that the high degree of structural similarity between Xan and the selected analogues introduces the necessity of an equally high degree of alignment of the purine scaffold within the binding cavity. Thus, model 3A was selected as the consensus of all three approaches utilized. Model 3A was further validated by

calculating the binding energy of the test set. Calculated binding energies using Prgen software showed that their binding affinity was higher than -4.3 Kcal/mol, which is in good agreement with experimental values.

Functional Studies Validate the Proposed Xanthine-UapA Interaction

Model 3A could very well explain the substrate specificity profile of UapA. 3-methylxanthine (3MX), which is a good ligand, is positioned very similar to xanthine (XAN) (Figure S2A). The methyl group is placed near the phenyl group of F155 forming

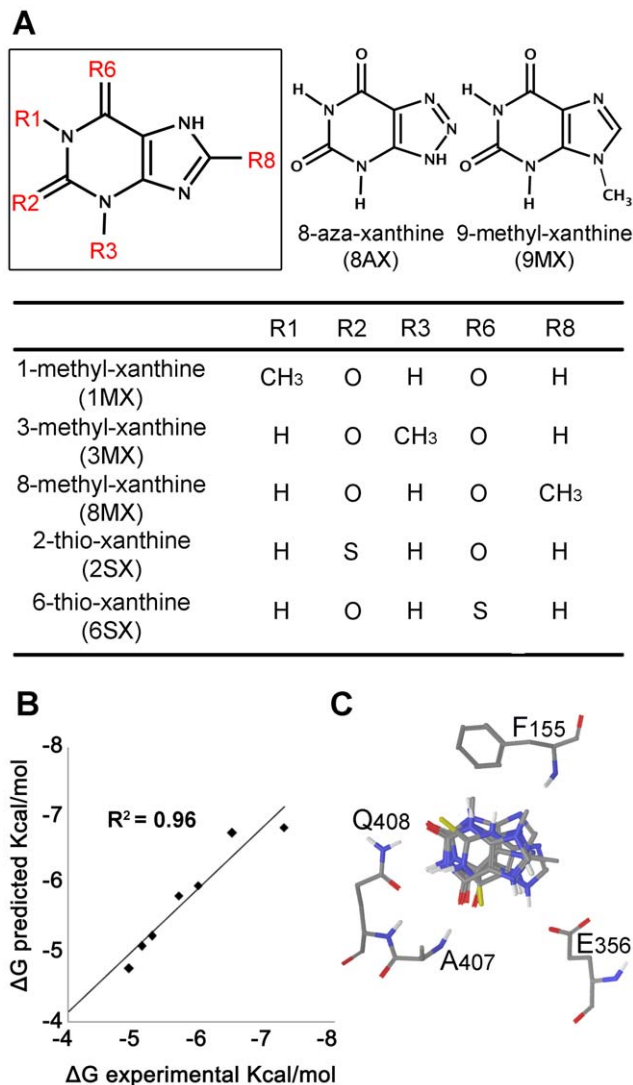


Figure 4. Structure Activity Relationship (SAR) model for the interaction of UapA with xanthine analogues. (A) Structures of XAN analogues used for model creation. (B) Predicted VS Experimental $\Delta G_{\text{binding}}$. (C) Superposition of XAN analogues inside binding domain of UapA as proposed by final model. doi:10.1371/journal.pone.0041939.g004

weak Van der Waals interactions. 8-methylxanthine (8MX) is a moderate binder, showing steric hindrance with the methyl group of the side chain of T404 and the carboxyl group of E356 lowering the binding affinity compared to XAN. The hydrogen bond between N7-H and COOH_{E356} still exists but is weaker (Figure S2B). 9-methylxanthine (9MX) (Figure S2C) shows moderate binding affinity too, as the methyl group is placed close to the NH group of the backbone of F155 disrupting the N9-NH_{F155} H-bond. 1-methylxanthine (1MX), which is a non-binder, is considerably displaced, lacking interaction with Q408 and E356 (Figure S2D). 2-thioxanthine (2SX) is better binder compared to 6-thioxanthine (6SX) (Figure S2E–S2F). The C = S bond is longer than C = O, displacing substrate 2SX towards E356 while 6SX is displaced in opposite direction, towards F155. Thus, 2SX forms most of the interactions found in XAN, (however the sulphur-containing hydrogen bond is weaker compared to the oxygen one [28]), while 6SX lacks H-bond with E356. 8-azaxanthine (8AX) although is positioned identical to XAN (Figure S2G), is a weak binder,

probably because of the stereoelectronic properties of the N-N = N group, preventing the way in and/or the translocation through the transporter. Finally hypoxanthine (HX) cannot form hydrogen bond with Q408 and E356 on the same time and thus is totally displaced inside the binding cavity compared to XAN (Figure S2H). Additionally docking calculations were performed for purines not recognized by the wild-type UapA, such as guanine and adenine taking into account their different tautomeric states. In both cases the Q408 amide failed to form bidentate hydrogen bond with the substrate, resulting in fewer H bond interactions compared to XAN (Figure S2I–S2J).

In line with this model, residues Q408 and E356 are absolutely necessary for substrate binding and transport (even the most conserved substitutions Q408E and E356D lead to dramatic loss of transport activity), while residues A407 and F155 can be functionally replaced [9,11,13]. Further evidence for the direct involvement of Q408 and E356 in substrate binding comes from the fact that the mutation Q408 confers the ability for binding novel substrates (hypoxanthine and guanine) and mutation E356D leads to 18-fold increased affinity for xanthine but abolishes transport. This last finding should be emphasized as it provides indications which might sustain a hypothesis about the role of E356 not only to direct substrate binding but to the dynamics of the inward-outward transporter transition, as well. Flexible docking calculations of XAN to the E356D-UapA, clearly demonstrated that although of minor influence in terms of physicochemical properties and interaction profile, the mutation of glutamate to an aspartate 2-thioxanthine is however critical with respect to the directional flexibility of the side chain involved. The shorter side chain of D356 poses a serious limitation to the conformational space accessible by the carboxylate functionality compared to the wild type protein. This constraint acts synergistically with the highly ordered assembly of the three residues that are engaged in the interaction with the pyrimidine ring of xanthine. As a result, the concurrent and finely tuned anchoring of xanthine to all four interaction partners F155, E356, A407 and Q408 through H-bonds is no longer feasible as a consequence of the reduced conformational flexibility of the latter. It can be speculated that a failure in the formation of a stable and optimally equilibrated complex could negatively affect the energetics of the conformational shift and thus lead to perturbed transporter functionality as was experimentally determined for this mutant. A mechanistic explanation for that perturbation might involve the interaction of E356 with residues located across the pore, its role as a mediator of the sliding of xanthine towards D360 and most importantly its possible functionality at the proton symport cascade. As a summary, we speculate that the shorter side-chain of D356 reduces its capacity to interact with the substrate, as clearly shown in docking results where no acceptable pose of xanthine directly bound to D356 was found. That in turn might negatively influence the transition from an outward-to an inward-facing conformation necessary for transport catalysis [29,30]. Indirect support for this speculation comes from the fact purified UapA-E356D protein is significantly more stable than the wild-type protein [31].

Identification and Genetic Support of a Cytoplasm-facing Substrate Trajectory

Apart from predicting the binding mode of xanthine, another challenging aspect when studying a transporter is to predict the trajectory path of the substrate. Flexible docking calculations were chosen for this study, since they can randomly position the ligand inside the binding pocket using specific rotational and translational algorithm. The conformational space of the complex was

extensively sampled by using the Monte Carlo and Low Mode conformational search algorithm. This method has proven highly efficient in sampling similar systems and it is considered as a robust technique [32]. Starting from the binding pocket previously originated xanthine was placed about 6 and 12 Å along the channel formed by TMSs 8, 10 and 12 on both directions producing 5 initial structures for docking calculations. 5000 steps of Monte Carlo/Low Mode were produced for each run, followed by energy minimization. During Monte Carlo perturbation the ligand was free to move along the x, y, z axes from 0 to 5 Å and simultaneous free rotation. The lowest energetically structures obtained are depicted on Figure 5 providing a theoretical pathway of the ligand before and after the binding pocket.

The proposed substrate translocation pathway starts from the centrally located major substrate binding site (residues F155, E356, A407 and Q408) and is followed by subsequent poses of xanthine docking towards the cytoplasmic face of the transporter, close to residues D360, A363, G411, T416, R417, V463 and A469 (Figure 5).

D360, which is a very well conserved residue in NATs, has not been mutated before. However, the equivalent Asp in XanQ was shown to be absolutely necessary for xanthine transport [22] and in UraA it corresponds to H245, a residue speculatively proposed to be important for a proton-coupled mechanism of transport of Uracil [21]. We mutated Asp360 to Ala and His. D360H scored as a total loss-of-function mutation (Figure 6A, 6C) and despite being localized in the plasma membrane showed increased levels of vacuolar turnover (Figure 6B). D360A was relatively stably localized in the plasma membrane (Figure 6B), but conserved low transport activity, mostly at 37°C (Figure 6A, 6C). Interestingly, the low transport activity of UapA-D360A was dependent on the plasma membrane proton gradient and pH, similar to the wild-type allele (Figure 6D). Furthermore, D360A showed substrate affinity and specificity profiles very similar to the wild-type protein (see Figure 6A and results not shown). These results contradicts the participation of D360 as a residue essential for the

binding and symport of H⁺ and rather supports an indirect role in substrate translocation, possibly through its interactions with N410 and T405, as shown earlier (see Figure 2).

A363 and G411 have been shown to be critical residues for transport [9,33]. Noteworthy, specific substitutions of G411 either immobilize UapA (G411V) [31], or increase 2-fold its apparent *V* (G411A, G411V) [9], suggesting that G411 is a key dynamic element in movements associated with UapA-mediated transport. Residue R417 has been shown to be important specifically for increasing uric acid binding affinity [10]. In line with that, mutation R417G reduces dramatically uric acid binding but conserves high affinity for xanthine.

The other two residues, V463 and A469, do not seem to be important for substrate transport *per se*, but specific substitutions of them affect significantly UapA specificity [12]. Most interestingly, none of the above residues is critical for protein turnover or for substrate binding, as shown by relevant mutations. Thus, all elements of the proposed substrate trajectory are associated with mutations that either affect transport rates (apparent *V* values) or substrate specificity. This observation is in excellent agreement with residues lining a cytoplasm-facing trajectory downstream from the major substrate binding site.

Genetic and Structural Support for a Dynamic Outward-facing Gate Critical for UapA Specificity

Among the most prominent, genetically selected, specificity mutations are substitutions of T526 and F528 with aliphatic or polar amino acid residues (Met and Leu for T526; Ala, Ser, Thr for F528). These substitutions do not affect the kinetic and specificity profile of UapA for its natural substrates (uric acid and xanthine) but confer UapA-mediated low affinity uptake of other purines and purine analogues with bulky substitutions [11,20]. Based on these finding we have proposed that these two residues act as elements of a molecular filter or a dynamic gate which selects which purines can have access to the major substrate binding site, and in turn, substitutions of T526 and F528 loosen

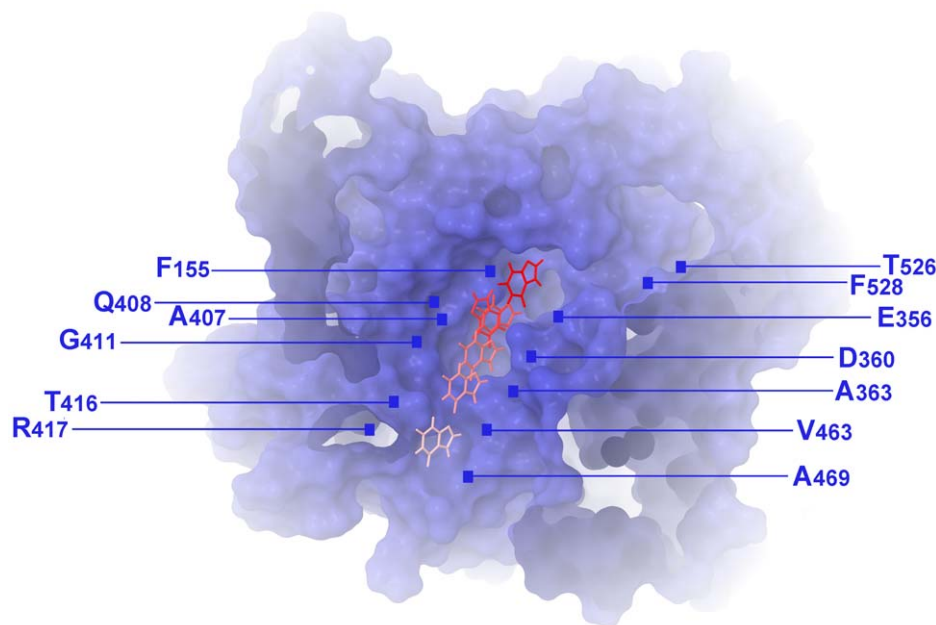


Figure 5. A xanthine translocation pathway in the cytoplasm-facing UapA model. Residues F155, Q408, E356 and A407 define the major substrate binding site, whereas T526 and F528 indicate a putative outward-facing gate (see text). doi:10.1371/journal.pone.0041939.g005

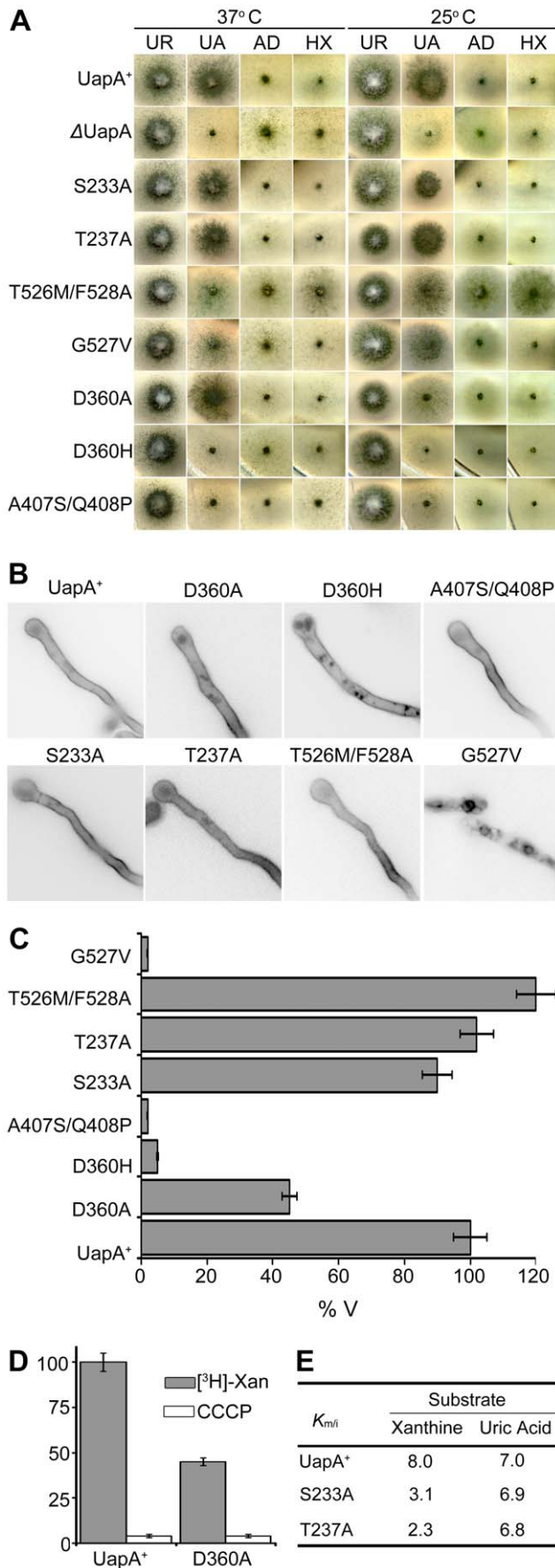


Figure 6. Functional analysis of new UapA mutations. (A) Growth tests on purines as sole nitrogen sources at 25 and 37°C. UA indicates uric acid, AD is adenine, HX is hypoxanthine. As a control, growth on urea is also shown (UR). Positive (UapA⁺) and negative (Δ UapA) isogenic control strains are also shown. (B) Epifluorescence microscopy showing *in vivo* subcellular expression of UapA-GFP mutant alleles and a wild-type control (UapA⁺). (C) Comparative initial uptake rates of ³H-radiolabeled xanthine in UapA mutant alleles and a wt control. 100% is the transport rate in the wt (UapA⁺). (D) K_m values for functional UapA mutants and wt (UapA⁺). For details see Materials and Methods.

doi:10.1371/journal.pone.0041939.g006

the selectivity of this gate. In the UapA model built herein, T526 and F528 are located in the outward-facing edge of TMS14, ideally positioned for defining the entrance of substrates in a trajectory leading to the major binding site. Does this putative outward-facing gate also act as a secondary substrate binding site? Although most evidence supports the existence of a single major substrate binding site positioned in a central cavity of all transporter studied, the existence of secondary binding sites in outward and inward faces of transporters is a recent and strongly debatable issue [34–41].

To test the possible implication of residues T526 and F528 as elements of an outward-facing gate and/or a putative secondary substrate binding site, we performed flexible docking calculations of xanthine utilizing wide sampling. Our results indicated a particular binding geometry at a distance from the major substrate binding domain, which might serve as an individual outward-facing recognition spot and which includes residues T526 and F528 (Figure 7A, 7B). More specifically, a small ensemble of poses with favorable geometries is found to occupy a cavity formed at the boundary between the extracellular and transmembrane regions of the protein. In this area, a well defined cleft is formed between the gate subdomain of the transporter and protruding helices TMS13 and TMS14. The purine is stabilized there by hydrogen bonds accommodated by S233, T237, T526 and F528. It should be mentioned that from a topological perspective that cavity is simultaneously the most easily accessible from the solvent and still in very close proximity to the major binding site (distance between E356 and F528 is only 12 Å). Thus it might be considered that the major and a secondary substrate binding site are interconnected, as a linking path would be easily assumed by hypothesizing slight movements and rolling of helices TMS4 and TMS7. This proximity is further supported biochemically in XanQ where substrate binding protects the alkylation of cysteine residues genetically positioned in TMS14 [25].

To further confirm the existence of this outward-facing gate and test whether it also functions as a secondary substrate docking site, we constructed and analyzed mutations concerning S233 and T237 and G527, which have not been mutated before. We also constructed and analyzed the double substitution T526M/F528A. According to the docking result, substitutions of S233 and T237 would, in principle, enlarge the specificity profile of UapA, similar to substitutions in T526 and F528, whereas substitutions G527V would also affect the local architecture and thus loosen the specificity of UapA. The double substitution T526M/F528A might also further loosen UapA specificity. Results for the analysis of these mutations are shown in Figure 6. Ala substitutions of S233 and T237 did not affect at all the plasma membrane localization, the turnover or the transport kinetic and specificity profile of UapA, strongly suggesting that these residues are not part of the outward-facing gate or of a secondary binding site. In contrast, G527V scored as a loss-of-function mutation, especially at 37°C (Figure 6A, 6C), apparently due to protein instability and vacuolar degradation (Figure 6B), whereas T526M/F528A showed, tem-

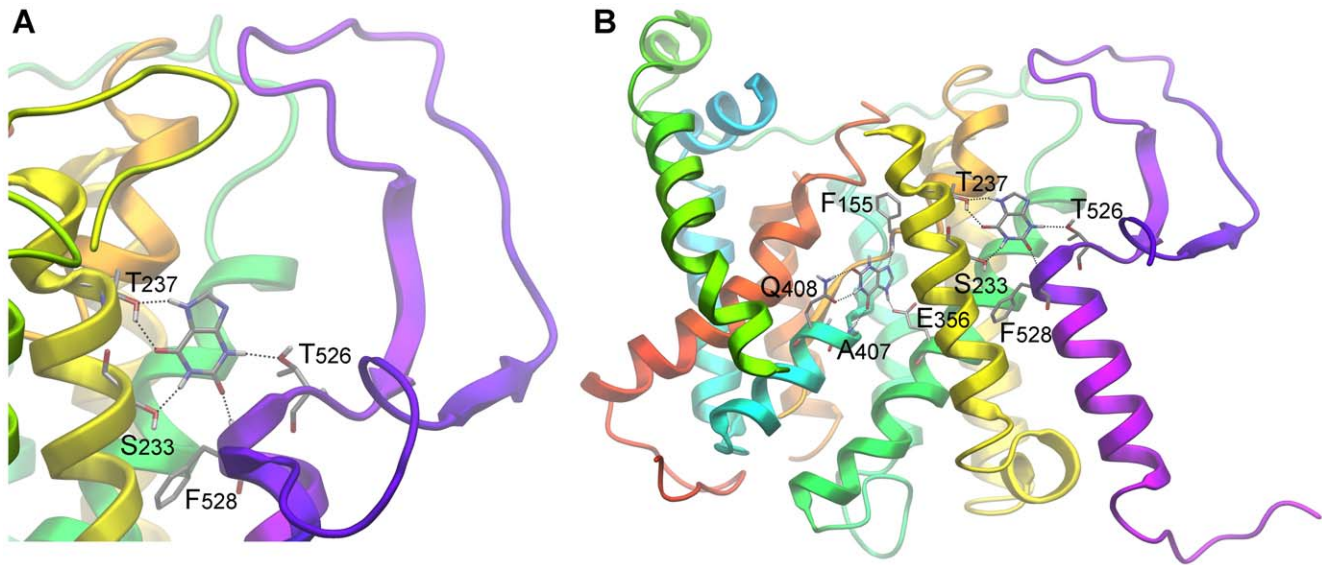


Figure 7. A putative xanthine secondary docking pose at the extra-cytoplasmic side of TMS14. (A) Detailed view and (B) its relative position to the primary binding site.

doi:10.1371/journal.pone.0041939.g007

perature-dependent, enlarged UapA specificity, leading to UapA-mediated growth on adenine or hypoxanthine transport (Figure 6A), strongly supporting the role of the relevant residues in the functioning of dynamic selectivity gate. In summary, the analysis of the new mutations further supports the role of residues T526, G527 and F528 as elements of an outward-facing dynamic gate controlling substrate specificity, but fail to provide genetic support for the presence of a secondary substrate binding in this gate.

Another outward-facing residue that affects dramatically UapA specificity is Q113 located in the loop between TMS1 and TMS2 (see Figures 1 and 2). A specific substitution, Q113L, enlarges UapA specificity similar to mutations concerning T526 and F528. We did not obtain a docking pose of xanthine close to Q113, which in fact seems very distant from the both the major substrate binding site and residues T526 and F528. We do not understand at present how this residue might affect the specificity of UapA, but it is not however uncommon in transmembrane proteins that a mutation might have domino effect on activity.

A Possible Inward-facing Gate?

Besides Q113, T526 and F528, all other randomly selected mutations which have a prominent effect UapA specificity concern residue R481 [12]. Substitution of R481 with aliphatic residues enlarges the specificity of UapA similar to mutations in Q113, T526 and F528. This residue is located at the border of loop TMS12–TMS13 with TMS13 (see Figure 1 and 2). We did not obtain a docking pose of xanthine at this site, which is distantly located from the major substrate binding site. How is critical for the specificity of UapA for uric acid or xanthine is not, at present understood. It might be through a domino effect on the outward-facing gate or it could define an element of a dynamic inward-facing gate. We favor the second hypothesis based on two observations. First, deletion of R481 or a 2 amino acid insertion (Ala-Gly) immediately upstream from R481 lead to increased, temperature-dependent, UapA instability and vacuolar turnover, usually obtained with mutations in dynamic elements of the transporter [12]. Second, double mutants including R481 and substitutions in T526 or F528, further loosen the specificity of

UapA, showing that there is an additive effect of outward-and inward-positioned mutations, which can be more easily rationalized if two independent selectivity gates operate at both sides UapA. Furthermore, despite the fact that R481 is topologically distant from the cytoplasmic end of the substrate translocation trajectory defined herein, which is close to R417 (see Figure 5), it should be taken into account that the UapA model built here is based on a static inward-facing conformation of UraA and consequently it should not be excluded that in a putative outward-facing conformation of UapA, loop TMS12–TMS13 and R481 are proximal to the cytoplasmic end of the substrate translocation trajectory.

In Search of a Structural Rationale for the Evolution of Novel Specificities in the NAT Family

In primates NAT members are specific for L-ascorbate/ Na^+ rather than nucleobases/ H^+ . Other mammals have both NAT versions, specific for either L-ascorbate or nucleobases [1]. We modeled and performed docking studies with the rat nucleobase transporter rSNBT1 and the human L-ascorbate transporter SVCT2. Results, shown in Figure 8, demonstrate that L-ascorbate and xanthine dock specifically in a centrally located binding site in SVCT2 and rSNBT1 respectively, but not *vice versa*. The amino acid residues involved in substrate interactions in rSNBT-1 are identical or highly conserved compared to those identified in UapA (F124, E347, E397 and S396 in rSNBT1 corresponding to F155, E356, Q408 and A407 in UapA. In contrast, in SVCT2, which lacks the critical substrate binding Gln/Glu residue found in nucleobase-specific NATs (Q408 in UapA, E397 in rSNBT1), binds ascorbate using F170, S442, E393 and D397, residues that correspond to F155, A497, E356 and D360 in UapA. Thus, it is clear that the ‘replacement’ of a Gln/Glu by a Pro residue in the NAT motif, located in TMS10, is a crucial difference for the shift in specificity in this family of transporters.

To test whether this difference is sufficient to shift the specificity of UapA from purines to L-ascorbate we constructed mutant UapA-A407S/Q408P, and tested its expression, stability and

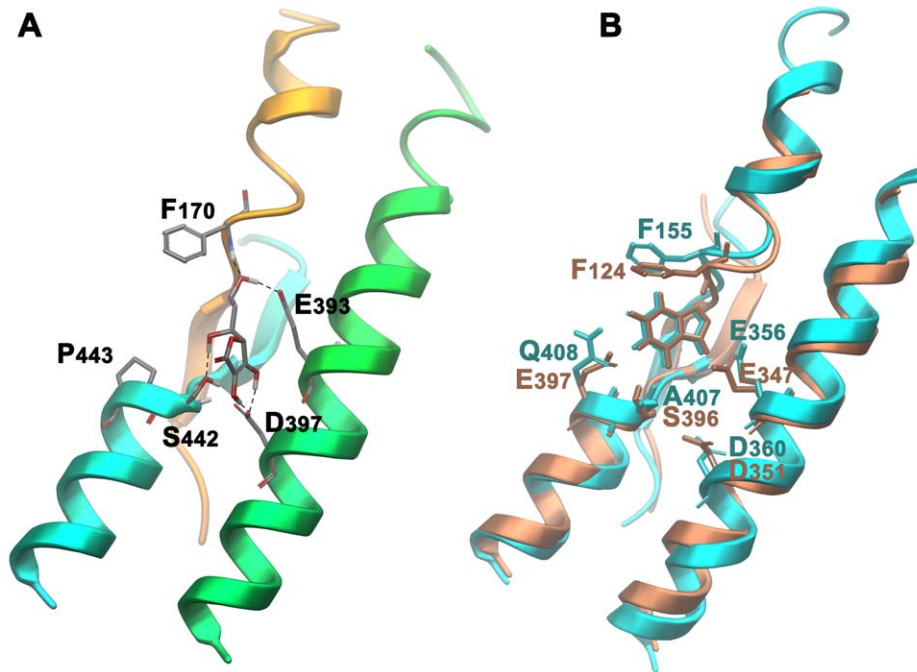


Figure 8. Interactions of NAT proteins with specific substrates. (A) Docking pose of L-ascorbate in SVCT-2 and (B) xanthine on superimposed rSNBT1 (in pink) and UapA (in blue).
doi:10.1371/journal.pone.0041939.g008

transport profile in respect to purines and L-ascorbate. Results included in Figure 6 show that the double mutation does not affect the expression of a GFP-tagged version of this UapA allele to the plasma membrane, a very strong indication that the overall folding of the transporter is not affected. This mutant, however, has lost any detectable capacity of purine uptake and has not acquired identifiable uptake of L-ascorbate. This result strongly suggests that evolution of novel specificities within a transporter family is not simply a result of local changes in the major substrate binding site, but might also depend on other elements, such as outward-or inward-facing gates and molecular filters.

Concluding Remarks

The present work presents a theoretical UapA structural model, which reveals a number of important aspects concerning how this transporter selects and transports its substrates. Results derived from different docking methodologies in conjunction with SAR modeling, were in very good agreement, thus proposing a highly consistent model concerning UapA substrate recognition. Obviously all structural models should be treated with great caution when used to speculate on function. However, UapA presents a unique case where a plethora of mutations, including randomly selected mutations, are available and have been used to understand function without knowing the structure of the transporter. Much to our satisfaction, our previous and present genetic and biochemical data fully support the structural data proposed in this work, and allowed us to speculate on a solid experimental ground.

Furthermore, our docking approaches are not only in excellent agreement with the *in vivo* specificity profile of UapA, but also provided a rationale for the difference in substrate specificity between the rat and the human NAT homologues, the former being specific for nucleobases and the latter for L-ascorbate. We have previously proposed that the presence of a Gln or Glu residue in the NAT motif (Q408 in UapA) is a molecular signature for

predicting whether a NAT protein is specific for nucleobases rather than L-ascorbate. In L-ascorbate transporters Gln/Glu is replaced by a Pro residue. Here we provide strong mutational and structural evidence for this observation.

This work reinforces the novel concept of the existence of dynamic gates or molecular selectivity filters in specific families of transporters [2,42,43]. The existence of filters or gates can be easily reconciled with the generally accepted rocker-switch mechanism of alternating outward-and inward-facing conformational states in transporters underlying their functioning [30]. Gating, which introduces occluded and open intermediates in the outward-and inward-facing conformers, might have evolved to add extra specificity or to prevent leakage of substrates in the wrong direction [44].

Our findings further show that specificity of NAT homologues belonging to evolutionary distant groups, such as fungi and metazoa might not solely be determined from specific interactions within a major, centrally located, substrate binding site. When we genetically constructed a UapA substrate binding site mimicking that of the human ascorbate transporter SVCT2, we obtained an apparently inactive UapA transporter. This strongly suggests that the mutational barrier underlying the specificity shift between UapA and SVCT2 extends beyond changes in the substrate binding site and probably includes changes in dynamic elements of these transporters, including gates and molecular filters, as those described herein. This observation should be critical in future efforts to use NAT transporters as specific gateways for developing targeted antimicrobials, but also for rationally designing *in vitro* evolution approaches for understanding how transporters work.

Materials and Methods

Homology Modeling

Homology model building was performed using MODELLER v.9.8 software [45].

Protein Preparation

The protein was prepared for the docking calculations using the Protein Preparation Workflow (Schrödinger Suite 2011 Protein Preparation Wizard) implemented in Schrödinger suite and accessible from within the Maestro program (Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011). Briefly, the hydrogen atoms were added and the orientation of hydroxyl groups, Asn, Gln, and the protonation state of His were optimized to maximize hydrogen bonding. Finally, the ligand–protein complex was refined with a restrained minimization performed by Impref utility, which is based on the Impact molecular mechanics engine (Impact version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) and the OPLS2001 force field, setting a max rmsd of 0.30. Ligand preparation for docking was performed with LigPrep (LigPrep, version 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) application which consists of a series of steps that perform conversions, apply corrections to the structure, generate ionization states and tautomers, and optimize the geometries.

Molecular Dynamic Simulations

For the MD simulations Desmond v.3 software was implemented (Desmond Molecular Dynamics System, version 3.0, D. E. Shaw Research, New York, NY) [24]. The system was prepared by embedding the protein in a POPC lipid bilayer, solvating the membrane by TIP4P explicit water, neutralizing with counterions and adding 150 mM salt and subsequently following the stepwise equilibration protocol as developed by Desmond for membrane proteins. The 50 ns simulation was performed in the NP γ T ensemble with Langevin thermostat and barostat and semi isotropic pressure restraints. All molecular dynamic simulations were run on Cy-tera HPC facility (<http://www.linksceem.eu/l2/>).

Induced Fit Docking

Molecular docking was performed using the Induced Fit Docking (IFD) protocol [46] (Schrödinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol), which is intended to circumvent the inflexible binding site and accounts for the side chain or backbone movements, or both, upon ligand binding. In the first stage of the IFD protocol, softened-potential docking step, 20 poses per ligand were retained. In the second step, for each docking pose, a full cycle of protein refinement was performed, with Prime 1.6 (Prime, version 3.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) on all residues having at least one atom within 8 Å of an atom in any of the 20 ligand poses. The Prime refinement starts with a conformational search and minimization of the side chains of the selected residues and after convergence to a low-energy solution, an additional minimization of all selected residues (side chain and backbone) is performed with the truncated-Newton algorithm using the OPLS parameter set and a surface Generalized Born implicit solvent model. The obtained complexes are ranked according to Prime calculated energy (molecular mechanics and solvation), and those within 30 kcal/mol of the minimum energy structure are used in the last step of the process, redocking with Glide 5.7 (Glide, version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) using standard precision, and scoring. In the final round, the ligands used in the first docking step are redocked into each of the receptor structures retained from the refinement step. The final ranking of the complexes is done by a composite score which accounts for the receptor–ligand interaction energy (GlideScore) and receptor strain and solvation energies (Prime energy).

Flexible Docking Calculations

Flexible Docking Calculations were performed using MacroModel 9.9 (MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011). As starting structure we used the best pose derived from IFD calculations for both tautomers of Xanthine (Xan7 and Xan9). Partial charges were calculated using the Jaguar Software (Jaguar, version 7.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011). Docking calculations were performed using 1000 steps or 5000 steps search of the mixed Monte Carlo/Low Mode (MC/LMOD) [47] search algorithm with a ratio of 0.5 and OPLSA2005 [48] force field. During the LMOD structural perturbation, and during the subsequent energy minimization, all residues within 6.0 Å from the ligand were allowed to move freely. The remaining residues were treated as “frozen atoms.” Additional structural perturbation was applied for all torsion angles of the three “distorted” aminoacids, using the TORS command. The ligand was subjected to explicit translation/rotation with respect to the binding site via the MOLS command available in MacroModel 9.0. Also a distance-dependent dielectric “constant” of 4r was used. After each successful run the complex was minimized using the TNCG algorithm (rmsG <0.01 kJ/mol Å). Unique conformations were stored only if they were within the lowest 50 kJ/mol.

PrGen

Scoring calculations were performed using the PrGen2.1 software according to the following procedure. Theoretical binding affinities are estimated by evaluating ligand-receptor interaction energies, ligand desolvation energies and changes in both ligand-internal energy and ligand internal entropy upon receptor binding: $E_{\text{binding}} \approx E_{\text{ligand-receptor}} - T\Delta S_{\text{binding}} - \Delta G_{\text{solvation,ligand}} + \Delta E_{\text{internal,ligand}}$. Calculated free energies $\Delta G^{\circ}_{\text{pred}}$ are then obtained by linear regression between experimental free energy $\Delta G^{\circ}_{\text{exp}}$ and E_{binding} . All molecules were superimposed over the position of Xanthine as derived from IFD calculations. Solvation energies, entropy corrections and ligand reference energies were calculated for all ligands after individual minimization using specific built-in PrGen 2.1 modules. To determine the ligand–receptor interaction energy, $E_{\text{ligand-receptor}}$, the program uses the force field Yeti_ENREF_48 [49]. Binding affinities are obtained by linear regression between ΔG° and E_{binding} . All calculations with PrGen 2.1 were run on a Silicon Graphics Octane.

Media, Strains and Growth Conditions and Construction of UapA Mutants

Standard complete (CM) and minimal media (MM) for *A. nidulans* were used (<http://www.fgsc.net>). Auxotrophies were supplemented at the concentrations given in (<http://www.gla.ac.uk/acad/ibls/molgen/aspergillus/supplement.html>). Nitrogen sources were used at the final concentrations: urea 5 mM, uric acid, adenine or hypoxanthine 0.5 mM. Chemical reagents were obtained from Sigma St. Louis, MO and from AppliChem GmbH. A *ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2 pabaA1* strain transformed with plasmid pAN510-GFP, integrated as a single copy in the *argB* locus, served as a standard wild type control [for details of this strains see 9]. pAN510-GFP carries a fully functional *uapA* gene fused with the *gfp* orf to allow for the subcellular localization of UapA-GFP by epifluorescence microscopy [9,20]. An isogenic *ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2 pabaA1* mutant was the recipient strain in transformations with mutant *uapA* alleles which were constructed on vector pAN510-GFP by site-directed mutagenesis according to the instructions accompanying the Quik-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), using complementary oligonucleo-

tides carrying the desired substitution (Table S1), Mutations were confirmed by sequencing. The pAN510-GFP vector allows selection of transformants based on arginine auxotrophy complementation [9]. Transformation of *A. nidulans* was as according to Koukaki *et al.* [50]. Transformants expressing intact *uapA-gfp* alleles, through single-copy plasmid integration events, were identified by standard PCR and Southern analysis. Growth tests were performed at 25°C and at 37°C, pH 6.8.

Standard Nucleic Acid Manipulations

Genomic DNA extraction from *A. nidulans* was as described. Plasmid preparation from *E. coli* strains was done with the Nucleospin Plasmid kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel GmbH). DNA bands were purified from agarose gels using the Nucleospin ExtractII kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel GmbH). [³²P]dCTP-labeled molecules used as *uapA* or *argB* specific probes were prepared using a random hexanucleotide primer kit following the supplier's instructions (Takara Bio Inc.) and purified on MicroSpin™ S-200 HR columns, following the supplier's instructions (Roche Applied Science). Labeled [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) was purchased from the Institute of Isotopes Co., Ltd. Restriction enzymes were from Takara Bio Inc. Conventional PCR reactions were done with KAPATaq DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS, USA). Cloning and amplification of products were done with Pfx Platinum (Invitrogen) or Phusion® Flash High-Fidelity PCR MasterMix (New England Biolabs).

Epifluorescence Microscopy and Transport Kinetic Assays

Samples for fluorescence microscopy were prepared as previously described [9,14,20]. In brief, the samples were incubated on coverslips in liquid Minimal Medium supplemented with urea as nitrogen source for 12–14 h at 25°C, observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope with appropriate

filters, and the resulting images were acquired with a Zeiss MRC5 digital camera using AxioVs40 V4.40.0 software. Images were then processed with Adobe Photoshop CS2 V9.0.2 software. Radiolabelled ³H-xanthine (19.6–33.4 Ci/mmol, Moravek Biochemicals, Brea, CA) or 1-¹⁴C-L-ascorbate (2 mCi/mmol, NEN Life Sciences Boston, MA) uptake in conidiospores was assayed at 37°C as described before [12,20]. K_i values were calculated from the Cheng and Prusoff equation: $K_i = IC_{50}/(1+L/K_m)$ where L is the permeant concentration.

Supporting Information

Figure S1 Root mean square deviation (RMSD) calculation of the Ca-carbons of all helices, recovering information every 0.25 ns from MD performed for 50 ns.

(TIF)

Figure S2 Docking of xanthine analogues in UapA. (A) 3-methylxanthine, (B) 8-methylxanthine, (C) 9-methylxanthine, (D) 1-methylxanthine, (E) 2-thioxanthine, (F) 6-thioxanthine, (G) 8-azaxanthine, (H) hypoxanthine, (I) adenine, (J) guanine. Hydrogen bonds are depicted with dashed lines. Weak hydrogen bonds are depicted with thin dashed lines.

(TIF)

Table S1 Forward oligonucleotides used in this study for construction targeted mutation in *uapA*. Reverse primers, complementary to the ones listed below, were also used. (DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EM GD. Performed the experiments: VK GL VM. Analyzed the data: EM GD VK GL VM. Contributed reagents/materials/analysis tools: EM GD. Wrote the paper: GD EM.

References

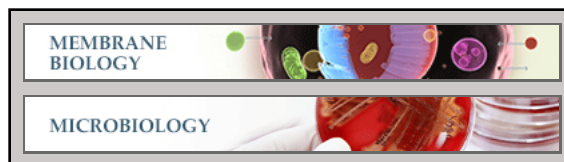
- Gournas C, Papageorgiou I, Diallinas G (2008) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Molecular Biosystems* 4: 404–416.
- Diallinas G, Gournas C (2008) Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family Lessons from model microbial genetic systems. *Channels* 2: 363–372.
- Schultes NP, Brutnell TP, Allen A, Dellaporta SL, Nelson T, et al. (1996) Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. *Plant Cell* 8: 463–475.
- Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang YH, Chen A, et al. (2002) Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nature Medicine* 8: 514–517.
- Arst HN, Jr., Scazzocchio C (1975) Initiator constitutive mutation with an 'up-promoter' effect in *Aspergillus nidulans*. *Nature* 254: 31–34.
- Diallinas G, Scazzocchio C (1989) A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. *Genetics* 122: 341–350.
- Gorfinkiel L, Diallinas G, Scazzocchio C (1993) Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 23376–23381.
- Meintanis C, Karagouni AD, Diallinas G (2000) Amino acid residues N-450 and Q(449) are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Molecular Membrane Biology* 17: 47–57.
- Koukaki M, Vlanti A, Goudela S, Pantazopoulou A, Gioule H, et al. (2005) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *Journal of Molecular Biology* 350: 499–513.
- Goudela S, Karatza P, Koukaki M, Frillingos S, Diallinas G (2005) Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Molecular Membrane Biology* 22: 263–275.
- Papageorgiou I, Gournas C, Vlanti A, Amillis S, Pantazopoulou A, et al. (2008) Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *Journal of Molecular Biology* 382: 1121–1135.
- Kosti V, Papageorgiou I, 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* 397: 1132–1143.
- Amillis S, Kosti V, Pantazopoulou A, Mikros E, Diallinas G (2011) Mutational Analysis and Modeling Reveal Functionally Critical Residues in Transmembrane Segments 1 and 3 of the UapA Transporter. *Journal of Molecular Biology* 411: 567–580.
- Pantazopoulou A, Diallinas G (2006) The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Molecular Membrane Biology* 23: 337–348.
- Karatza P, Georgopoulou E, Panos P, Frillingos S (2006) The NAT motif defines integrity, specificity and affinity of the purine pathway of YgfO transporter. *Febs Journal* 273: 310–310.
- Karena E, Frillingos S (2009) Role of Intramembrane Polar Residues in the YgfO Xanthine Permease HIS-31 AND ASN-93 ARE CRUCIAL FOR AFFINITY AND SPECIFICITY, AND ASP-304 AND GLU-272 ARE IRREPLACEABLE. *Journal of Biological Chemistry* 284: 24257–24268.
- Mermelekas G, Georgopoulou E, Kallis A, Botou M, Vlantos V, et al. (2010) Cysteine-scanning Analysis of Helices TM8, TM9a, and TM9b and Intervening Loops in the YgfO Xanthine Permease A CARBOXYL GROUP IS ESSENTIAL AT ASP-276. *Journal of Biological Chemistry* 285: 35011–35020.
- Georgopoulou E, Mermelekas G, Karella E, Frillingos S (2010) Purine Substrate Recognition by the Nucleobase-Ascorbate Transporter Signature Motif in the YgfO Xanthine Permease ASN-325 BINDS AND ALA-323 SENSES SUBSTRATE. *Journal of Biological Chemistry* 285: 19422–19433.
- Amillis S, Koukaki M, Diallinas G (2001) Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *Journal of Molecular Biology* 313: 765–774.
- Vlanti A, Amillis S, Koukaki M, Diallinas G (2006) A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *Journal of Molecular Biology* 357: 808–819.

21. Lu FR, Li S, Jiang Y, Jiang J, Fan H, et al. (2011) Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature* 472: 243–246.
22. Karena E, Frillingos S (2011) The Role of Transmembrane Segment TM3 in the Xanthine Permease XanQ of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 286: 39595–39605.
23. Schlessinger A, Geier E, Fan H, Irwin JJ, Shoichet BK, et al. (2011) Structure-based discovery of prescription drugs that interact with the norepinephrine transporter, NET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15810–15815.
24. Bowers KJ, Chow E, Xu H, Dror RO, Eastwood MP, et al. (2006) Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, FL, 2006, ACM Press: New York.
25. Papakostas K, Georgopoulou E, Frillingos S (2008) Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgIO xanthine permease-Ile-432 and Asn-430 are important. *Journal of Biological Chemistry* 283: 13666–13678.
26. Kulikowska E, Kierdaszuk B, Shugar D (2004) Xanthine, xanthosine and its nucleotides: solution structures of neutral and ionic forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *Acta Biochimica Polonica* 51: 493–531.
27. Zbinden P, Dobler M, Folkers G, Vedani A (1998) PrGen: Pseudoreceptor modeling using receptor-mediated ligand alignment and pharmacophore equilibration. *Quantitative Structure-Activity Relationships* 17: 122–130.
28. Gregoret LM, Rader SD, Fletcher RJ, Cohen FE (1991) Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins* 9: 99–107.
29. Kaback HR, Smirnova I, Kasho V, Nie YL, Zhou YG (2011) The Alternating Access Transport Mechanism in LacY. *Journal of Membrane Biology* 239: 85–93.
30. Smirnova I, Kasho V, Sugihara J, Kaback HR (2011) Opening the periplasmic cavity in lactose permease is the limiting step for sugar binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15147–15151.
31. Leung J, Cameron AD, Diallinas G, Byrne B (2012) Stabilizing the heterologously expressed uric acid-xanthine transporter UapA from the lower eukaryote *Aspergillus nidulans*. *Molecular Membrane Biology*.
32. Soares-Silva I, Sa-Pessoa J, Myrianthopoulos V, Mikros E, Casal M, et al. (2011) A substrate translocation trajectory in a cytoplasm-facing topological model of the monocarboxylate/H(+) symporter Jen1p. *Mol Microbiol* 81: 805–817.
33. Diallinas G, Valdez J, Sophianopoulou V, Rosa A, Scazzocchio C (1998) Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *Embo Journal* 17: 3827–3837.
34. Nyola A, Karpowich NK, Zhen J, Marden J, Reith ME, et al. (2010) Substrate and drug binding sites in LeuT. *Curr Opin Struct Biol* 20: 415–422.
35. Shi L, Quick M, Zhao Y, Weinstein H, Javitch JA (2008) The mechanism of a neurotransmitter:sodium symporter–inward release of Na⁺ and substrate is triggered by substrate in a second binding site. *Mol Cell* 30: 667–677.
36. Noskov SY (2008) Molecular mechanism of substrate specificity in the bacterial neutral amino acid transporter LeuT. *Proteins* 73: 851–863.
37. Schulze S, Koster S, Geldmacher U, Terwisscha van Scheltinga AC, Kuhlbrandt W (2010) Structural basis of Na⁺-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature* 467: 233–236.
38. Zhao Y, Terry D, Shi L, Weinstein H, Blanchard SC, et al. (2010) Single-molecule dynamics of gating in a neurotransmitter transporter homologue. *Nature* 465: 188–193.
39. Zhao Y, Terry DS, Shi L, Quick M, Weinstein H, et al. (2011) Substrate-modulated gating dynamics in a Na⁺-coupled neurotransmitter transporter homologue. *Nature* 474: 109–113.
40. Cunningham P, Afzal-Ahmed I, Naftalin RJ (2006) Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1. *Journal of Biological Chemistry* 281: 5797–5803.
41. Nielsen S, Pedersen CM, Hansen SG, Petersen MD, Sinning S, et al. (2009) An extended study of dimeric phenyl tropanes. *Bioorg Med Chem* 17: 4900–4909.
42. Naftalin RJ (2010) Reassessment of Models of Facilitated Transport and Cotransport. *Journal of Membrane Biology* 234: 75–112.
43. Conde A, Diallinas G, Chaumont F, Chaves M, Geros H (2010) Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42: 857–868.
44. Diallinas G (2008) Biochemistry. An almost-complete movie. *Science* 322: 1644–1645.
45. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology* 234: 779–815.
46. Sherman W, Day T, Jacobson MP, Friesner RA, Farid R (2006) Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *Journal of Medicinal Chemistry* 49: 534–553.
47. Kolosavary I, Guida WC (1999) Low-mode conformational search elucidated: Application to C39H80 and flexible docking of 9-deazaguanine inhibitors into PNP. *Journal of Computational Chemistry* 20: 1671–1684.
48. Jorgensen WL, Maxwell DS, TiradoRives J (1996) Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 118: 11225–11236.
49. Vedani A, Huhta DW (1990) A New Force-Field for Modeling Metalloproteins. *Journal of the American Chemical Society* 112: 4759–4767.
50. Koukaki M, Giannoutsou E, Karagouni A, Diallinas G (2003) A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J Microbiol Methods* 55: 687–695.

Membrane Biology:
**Modeling, Substrate Docking, and
Mutational Analysis Identify Residues
Essential for the Function and Specificity of
a Eukaryotic Purine-Cytosine NCS1
Transporter**

Emilia Kryptou, Vasiliki Kosti, Sotiris
Amillis, Vassilios Myrianthopoulos,
Emmanuel Mikros and George Diallinas
J. Biol. Chem. 2012, 287:36792-36803.

doi: 10.1074/jbc.M112.400382 originally published online September 11, 2012



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M112.400382](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400382)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](http://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2012/09/11/M112.400382.DC1.html>

This article cites 55 references, 15 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/287/44/36792.full.html#ref-list-1>

Modeling, Substrate Docking, and Mutational Analysis Identify Residues Essential for the Function and Specificity of a Eukaryotic Purine-Cytosine NCS1 Transporter^{*[5]}

Received for publication, July 12, 2012, and in revised form, September 7, 2012. Published, JBC Papers in Press, September 11, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.400382

Emilia Kryptou⁺¹, Vasiliki Kosti⁺¹, Sotiris Amillis[‡], Vassilios Myrianthopoulos[§], Emmanuel Mikros[§], and George Diallinas⁺²

From the ⁺Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece and [§]School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15771, Greece

Background: The purine-cytosine FcyB transporter is a prototype member of the NCS1 family.

Results: Using homology modeling, substrate docking, and rational mutational analysis, we identify residues critical for function and specificity.

Conclusion: Important aspects concerning the molecular mechanism and evolution of transporter specificity are revealed.

Significance: The first systematic approach on structure-function-specificity relationships in a eukaryotic NCS1 member is shown.

The recent elucidation of crystal structures of a bacterial member of the NCS1 family, the Mhp1 benzyl-hydantoin permease from *Microbacterium liquefaciens*, allowed us to construct and validate a three-dimensional model of the *Aspergillus nidulans* purine-cytosine/H⁺ FcyB symporter. The model consists of 12 transmembrane α -helical segments (TMSs) and cytoplasmic N- and C-tails. A distinct core of 10 TMSs is made of two intertwined inverted repeats (TMS1–5 and TMS6–10) that are followed by two additional TMSs. TMS1, TMS3, TMS6, and TMS8 form an open cavity that is predicted to host the substrate binding site. Based on primary sequence alignment, three-dimensional topology, and substrate docking, we identified five residues as potentially essential for substrate binding in FcyB; Ser-85 (TMS1), Trp-159, Asn-163 (TMS3), Trp-259 (TMS6), and Asn-354 (TMS8). To validate the role of these and other putatively critical residues, we performed a systematic functional analysis of relevant mutants. We show that the proposed substrate binding residues, plus Asn-350, Asn-351, and Pro-353 are irreplaceable for FcyB function. Among these residues, Ser-85, Asn-163, Asn-350, Asn-351, and Asn-354 are critical for determining the substrate binding affinity and/or the specificity of FcyB. Our results suggest that Ser-85, Asn-163, and Asn-354 directly interact with substrates, Trp-159 and Trp-259 stabilize binding through π - π stacking interactions, and Pro-353 affects the local architecture of substrate binding site, whereas Asn-350 and Asn-351 probably affect substrate binding indirectly. Our work is the first systematic approach to address structure-function-specificity relationships in a

eukaryotic member of NCS1 family by combining genetic and computational approaches.

Purines and pyrimidines (nucleobases) are absolutely essential metabolites for all cells, being not only the precursors of nucleotide and nucleic acid biosynthesis but also being involved in cell signaling, nutrition, response to stress, and cell homeostasis. Most cells in all domains of life possess specific nucleobase transporters, distinct from those involved in the uptake of nucleosides (1, 2). Nucleobase transporters are important in protozoan and plant development and in the susceptibility of human, protozoan, or fungal cells to purine-related drugs (3–10). Fungi possess three evolutionary distinct families of transporters specific for nucleobases (2, 11, 12). Members of one of them, the so called nucleobase cation symport (NCS1,³ also known as purine-related transporter) family, are ubiquitously distributed in all fungi and are present in some eubacteria, archaea (11–14), and plants (15) but are absent in protozoa and metazoa (see uniprot online). Besides purines, cytosine, and uracil, other known substrates for NCS1 transporters include the antifungals 5-fluorocytosine (5-FC), and 5-fluorouracil, benzyl-hydantoin, allantoin, thiamine, pyridoxal-based compounds, and nicotinamide riboside. All NCS1 members of known function probably act as H⁺ symporters, although the *Microbacterium liquefaciens* benzyl-hydantoin transporter was reported to be a Na⁺ symporter (11).

The NCS1 family includes two major subfamilies, the Fcy-like and the Fur-like transporters (11). Three Fcy-like proteins of Ascomycetes have been well characterized genetically and studied with respect to regulation of expression, transport kinetics, and substrate specificity. These are the Fcy2p (16), Fcy21p (17), and FcyB (13) permeases of *Saccharomyces cerevisiae*.

³ The abbreviations used are: NCS1, nucleobase cation symport 1; TMS, transmembrane segment; 5-FC, 5-fluorocytosine; IFD, induced fit docking; MM, minimal media; ER, endoplasmic reticulum; mRFP, monomeric red fluorescent protein.

* This work was supported in part by the John S. Latsis Public Benefit Foundation.

[5] This article contains supplemental Tables S1 and S2 and Figs. 1–3.

¹ Co-financed by the European Union (European Social Fund) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework-Research Funding Program: THALIS and Heracleitus II, Investing in knowledge society through the European Social Fund.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 30(210)7274649; Fax: 30(210)7274702; E-mail: diallina@biol.uoa.gr.

siae, *Candida albicans*, and *Aspergillus nidulans*, respectively. All three are involved in high affinity transport of adenine, hypoxanthine, guanine, cytosine, and 5-FC. The only physiological difference between Fcy2p/Fcy21p and FcyB is that the two yeast transporters constitute the sole high capacity gateways for purine uptake, whereas in *A. nidulans* high capacity purine uptake is catalyzed by another transporter, called AzgA (17), FcyB acting basically as a cytosine supplier and only secondarily as a purine carrier (13).

Despite some classical genetic approaches in Fcy2p that identified several residues critical for substrate or cation binding and transport (18–20), very little was known with respect to structure-function relationships in NCS1-like transporters until recently. In 2008, however, the crystal structure of a bacterial member of the NCS1 family, namely the Mhp1 benzylhydantoin permease from *M. liquefaciens* (21), was reported (22). Surprisingly, the Mhp1 topology has proved to be very similar to that of several recently revealed structures of other bacterial transporters that showed no sequence similarity and exhibited entirely different specificities. These include the amino acid transporter LeuT (23), the galactose transporter vSGLT (24), the betaine transporter BetP (25), and two amino acid transporters, AdiC (26) and ApcT (27). Dysfunction of members of this growing superfamily in humans is associated with neurological (28) and kidney disorders (29), cancer (30), and drug resistance (31). The core of the fold shared by these transporters is an “inverted repeat” motif with two sets of five transmembrane helices oppositely orientated with respect to the membrane (often called the 5HIR-fold) (32–34). The two extra TMSs (TMS11 and TMS12 in the NCS1 family) do not seem to participate in transport activity, and their role is unclear.

Most interestingly, several different conformations have been observed for these transporters in the recent years. These can be categorized into three classes: outward-facing, as observed in LeuT (35, 36), Mhp1 (22), and AdiC (26, 37); occluded, where a trapped substrate is blocked from exiting on either side of the protein as seen in LeuT (23), Mhp1 (22), BetP (25), and AdiC (37); inward-facing, as seen in Mhp1 (34), vSGLT (24), ApcT (27), and LeuT (36). Up to date, Mhp1 and LeuT are the only transporters trapped into three structural conformations associated with transport catalysis. From analyses of these three structures and molecular dynamics simulations, a mechanism has been proposed for the transport cycle in Mhp1 or LeuT (34, 36, 38). Switching from the outward- to the inward-facing state goes through occluded states and is primarily achieved by a rigid body movement of several TMSs (e.g. 3, 4, 8, and 9 in Mhp1) relative to a rather rigid bundle of helices (1, 2, 6, and 7 in Mhp1). In the occluded transient states, “thin gates” involving only a few residues in specific TMSs (e.g. 5 and 10 in Mhp1) and parts of loops control the opening and closing of the substrate binding site to the exterior or interior. This forms the basis of an alternating access mechanism applicable to probably all transporters of the 5HIR superfamily (32–34, 36, 39). Evidently, details of substrate transport, especially those concerning the occlusion mechanism, remain largely controversial because models have been derived by comparing transporters with divergent amino acid sequences that transport a

wide variety of substrates and that possibly select and transport different ions (Na^+ versus H^+) for driving the symport of their major substrates (34, 36, 38). Furthermore, what is often ignored is that all available structures concern prokaryotic transporters, which despite being similar to important mammalian carriers, also present significant structural and biochemical differences. For example, eukaryotic transporters possess long N- and C-tails or longer hydrophilic loops, absent in prokaryotes, that are often associated with transporter subcellular trafficking, function, specificity, stability, or topology (40–42).

In this work we construct and validate a three-dimensional model of the *A. nidulans* purine-cytosine FcyB transporter based on the outward facing substrate-occluded crystal structure of the Mhp1 benzyl-hydantoin permease from *M. liquefaciens* (PDB entry 2JLO). Subsequently, we use this model to perform independent docking studies and thus identify residues that might be involved in substrate binding and transport. Most importantly, we experimentally validate our speculations on specific amino acid residues by a systematic functional analysis of relevant mutants. Our work is discussed with respect to the molecular determinants underlying substrate specificity in the NCS1 family.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Homology Modeling—Proteins with significantly similar structural-fold with FcyB were identified using HHpred. All 5HIR transporters showed significant similarity with FcyB, but only Mhp1 showed a 100% probability (E value $1.8E^{-55}$; p value $6.6E^{-60}$). Homology model building was performed using MODELLER v.9.8 software (43).

Protein Preparation—The protein was prepared for docking calculations using the Protein Preparation Workflow (Schrödinger Suite 2011 Protein Preparation Wizard) implemented in the Schrödinger suite and accessible from within the Maestro program (Maestro, Version 9.2, Schrödinger, LLC, NY, 2011). Briefly, hydrogen atoms were added, and the orientation of hydroxyl groups, Asn, Gln, and the protonation state of His were optimized to maximize hydrogen bonding. Finally, the ligand-protein complex was refined with a restrained minimization performed by Impref utility that is based on the Impact molecular mechanics engine (Impact Version 5.7, Schrödinger, LLC, NY, 2011) and the OPLS2001 force field, setting a max root mean square deviation of 0.30 (44). Ligand preparation for docking was performed with LigPrep (LigPrep, Version 2.5, Schrödinger, LLC, NY, 2011) application that consists of a series of steps that perform conversions, apply corrections to the structure, generate ionization states and tautomers, and optimize the geometries.

Molecular Dynamic Simulations—For the molecular dynamics simulations, Desmond v.3 software was implemented (Desmond Molecular Dynamics System, Version 3.0, D. E. Shaw Research, NY). The system was prepared by embedding the protein in a 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine (POPC) lipid bilayer, solvating the membrane by TIP4P explicit water, neutralizing with counter ions, and adding 150 mM salt and subsequently following the stepwise equilibration protocol as developed by Desmond for membrane proteins (45). The ori-

Structure-Function Relationships in FcyB

entation of the protein in the bilayer was determined by using the Mhp1 template available in OPM database (46). An 18-ns simulation was performed in the NPγT ensemble with Langevin thermostat and barostat and semi-isotropic pressure restraints (supplemental Fig. S1).

Induced Fit Docking—Molecular docking was performed using the induced fit docking (IFD) protocol (Schrödinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol) that is intended to circumvent the inflexible binding site and accounts for the side chain or backbone movements or both upon ligand binding (47). In the first stage of the IFD protocol, softened-potential docking step, 20 poses per ligand were retained. In the second step for each docking pose, a full cycle of protein refinement was performed with Prime 1.6 (Prime, Version 3.0, Schrödinger, LLC, NY, 2011) on all residues having at least one atom within 8.0 Å of an atom in any of the 20 ligand poses. The Prime refinement starts with a conformational search and minimization of the side chains of the selected residues, and after convergence to a low energy solution, an additional minimization of all selected residues (side chain and backbone) is performed with the truncated-Newton algorithm using the OPLS parameter set and a surface Generalized Born implicit solvent model. The obtained complexes are ranked according to Prime calculated energy (molecular mechanics and solvation), and those within 30 kcal/mol of the minimum energy structure are used in the last step of the process, redocking with Glide 5.7 (Glide, Version 5.7, Schrödinger, LLC, NY, 2011) using standard precision and scoring. In the final round, the ligands used in the first docking step are redocked into each of the receptor structures retained from the refinement step. The final ranking of the complexes is done by a composite score that accounts for the receptor-ligand interaction energy (GlideScore) and receptor strain and solvation energies (Prime energy).

Media, Strains, Growth Conditions, and Transformation Genetics—Standard complete and minimal media (MM) for *A. nidulans* were used. Media and supplemented auxotrophies were at the concentrations given online in fgsc. Nitrogen sources were used at the final concentrations, 5 mM urea, 10 mM NaNO₃, 0.5 mM purines. *Escherichia coli* was grown on Luria-Bertani medium. Media and chemical reagents were obtained from Sigma or AppliChem (Bioline Scientific SA, Hellas, Greece). Transformations were performed as described previously (48). A single-copy plasmid integration of the FcyB served as a standard wild-type control. A $\Delta fcyB::argB$; $\Delta uapA$; $\Delta uapC::AFpyrG$; $\Delta azgA$; *riboB2*; *pabaA1* mutant strain (13) was the recipient strain in transformations with the wild-type pAN520, the pAN530, the pAN540 (see below), or the mutant FcyB alleles carried on the above vectors. As a negative, transformants with empty pAN vectors were used. These vectors allow selection of transformants based on *p*-aminobenzoic acid (*pabaA1*) or riboflavin (*riboB2*) auxotrophy complementation. Transformants expressing intact *fcyB* or *fcyB-gfp* alleles, through either single-copy or multi-copy plasmid integration events, were identified by PCR and Southern analysis. For the relative subcellular localization of wild-type or mutant N81A FcyB-GFP with mRFP-tagged histone H1 (HhoA-mRFP), appropriate strains were constructed by standard genetic crossing. The strain harboring HhoA-mRFP is reported in Edgerton-

Morgan and Oakley (49). Growth tests were performed at 25 and at 37 °C, pH 6.8.

Plasmid Constructions and FcyB Mutations—pAN520 is a modified pBluescript KS(+) vector (Stratagene) based on the plasmid pAN510 (50) that carries the FcyB orf cloned in-frame between the 5' and 3' regulatory sequences of the *uapA* gene and also carrying the *pabaA* gene as a selection marker (13). pAN530 and pAN540 are similar to pAN520, but in this case the *fcyB* and the *fcyB* fused C- or N-terminally with the *gfp* together with the 5' and 3' regulatory sequences of the *uapA* gene were cloned in the pGEMTM-T vector (Promega), also carrying the *riboB* gene from *Aspergillus fumigatus* as a selection marker. Mutations were constructed by site-directed mutagenesis according to the instructions accompanying the QuikChange[®] site-directed mutagenesis kit (Stratagene) on the above vectors and were confirmed by sequencing. Oligonucleotides used for cloning and site-directed mutagenesis purposes are listed in supplemental Table S1.

Standard Nucleic Acid Manipulations—Genomic DNA extraction from *A. nidulans* was as described in fgsc. Plasmid preparation from *E. coli* strains and DNA bands were purified from agarose gels done with the Nucleospin Plasmid kit and the Nucleospin ExtractII kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Lab Supplies Scientific SA, Hellas, Greece). Southern blot analysis was performed as described previously (51). [³²P]dCTP-labeled molecules used as *fcyB*-, *riboB*-, or *pabaA*-specific probes were prepared using a random hexanucleotide primer kit following the supplier's instructions (Takara Bio, Lab Supplies Scientific SA) and purified on MicroSpinTM S-200 HR columns following the supplier's instructions (Roche Diagnostics). Labeled [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) was purchased from the Institute of Isotopes Co. Ltd, Miklós, Hungary. Restriction enzymes were from Takara Bio. Conventional PCR reactions were done with KAPATaq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Lab Supplies Scientific SA). Cloning and amplification of products were done with Pfx Platinum (Invitrogen) or Phusion[®] Flash High-fidelity PCR MasterMix (New England Biolabs, Lab Supplies Scientific SA).

Membrane Protein Extraction and Western Blot Analysis—Cultures for membrane protein extraction were grown in MM supplemented with urea at 37 °C for 8 h. Membrane protein extraction was performed as previously described (52). Equal sample loading was estimated by Bradford assays. Total proteins (30 μg) were separated by SDS-PAGE (10% w/v polyacrylamide gel) and electroblotted (Mini PROTEAN[™] Tetra Cell, Bio-Rad) onto PVDF membranes (Macherey-Nagel, Lab Supplies Scientific SA) for immunodetection. The membrane was treated with 3% (w/v) BSA, and immunodetection was performed with a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody (Roche Diagnostics) or a mouse anti-actin monoclonal (C4) antibody (MP Biomedicals Europe, Lab Supplies Scientific SA) and a secondary goat antimouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology Inc., Bioline Scientific SA). Blots were developed by the chemiluminescent method using the LumiSensor Chemiluminescent HRP Substrate kit (Genscript USA, Lab Supplies Scientific SA) and SuperRX Fuji medical X-Ray films (FujiFILM Europe, Lab Supplies Scientific SA).

Kinetic Analysis— $[^3\text{H}]$ Hypoxanthine (19.6–33.4 Ci/mmol, Moravsek Biochemicals, CA) uptake in MM was assayed in germinating conidiophores of *A. nidulans* concentrated at 10^7 conidiospores/100 μl at 37 °C, pH 6.8, as previously described (40, 53). Initial velocities were measured at 1 min of incubation with concentrations of 0.2–2.0 μM $[^3\text{H}]$ hypoxanthine at the polarity maintenance stage (3–4 h, 130 rpm). $K_{m/i}$ values were obtained directly by performing and analyzing uptakes (Prism 3.02: GraphPad Software) using labeled hypoxanthine at 0.2–0.5 μM or at various concentrations (0.5–2000 μM) of non-labeled substrates. K_i values were calculated by satisfying the criteria for use of the Cheng and Prusoff equation $K_i = \text{IC}_{50}/(1 + (L/K_m))$ in which L is the permeant concentration. IC_{50} values were determined from full dose-response curves, and in all cases the Hill coefficient was close to -1 , consistent with the presence of one binding site. Reactions were terminated with the addition of equal volumes of ice-cold MM containing 1000-fold excess of non-radiolabeled substrate. Background uptake values were corrected by subtracting either values measured in the deleted mutants or values obtained in the simultaneous presence of 1000-fold excess of non-radiolabeled substrate. Both approaches led to the same background uptake level, not exceeding 10–15% of the total counts obtained in wild-type strains. All transport assays were carried out in at least three independent experiments, with three replicates for each concentration or time point. S.D. was $< 20\%$.

Epifluorescence Microscopy—Samples for fluorescence microscopy were prepared as previously described (52). In brief, germ-lings incubated on coverslips in liquid MM supplemented with NaNO_3 as the nitrogen source for 12–14 h at 25 °C were observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope, and the resulting images were acquired with a Zeiss-MRC5 digital camera using the AxioVs40 V4.40.0 software. Image processing, contrast adjustment, and color combining were made using the Adobe Photoshop CS4 Extended Version 11.0.2 software or the ImageJ software. Images were converted to 8-bit grayscale or RGB and annotated using Photoshop CS4 before being saved to TIFF.

RESULTS

FcyB Structural Model—The construction of a structural model of FcyB was based on the crystal structure of the Mhp1 benzyl-hydantoin permease from *M. liquefaciens* (PDB entry 2JLO (22)). The two proteins share a rather moderate sequence similarity (18% identity), which is, however, adequate for sustaining a theoretical model of FcyB. The model built here was based on the alignment of the two proteins, as shown in a multiple alignment including all NSC1 carriers with known function, which was further modified manually (Fig. 1). Model building was performed using MODELLER software. The loop refinement routine and a slow simulated annealing protocol for model refinement were implemented. As a first validation of the model, the structure with the best spatial restraints score was subjected to a 18-ns molecular dynamics run using Desmond software. The system was prepared by embedding the protein in a POPC lipid bilayer and solvating the membrane by explicit water. The root mean square deviation of the transmembrane helices α -carbons from starting coordinates was

monitored throughout the simulation and did not exceed 3 Å, thus indicating the stability of the theoretical model.

The overall three-dimensional structure of the FcyB model (Fig. 2) corresponds to an outward-facing conformer made of 12 TMSs that adopt a mostly helical secondary structure. The architecture of the transporter divides it in two distinct domains, a compact core consisting of segments TMS1–10 and a C-terminal domain made of TMS11–12. The transmembrane helices in the core are connected with rather short loops (< 14 amino acid residues), whereas the loop separating the core and TMS11–12 is longer (23 residues). The distribution of the ionized residues on the protein surface is reasonable, as most of them are positioned either at the cytoplasmic and periplasmic sides or along the protein pore in the protein interior. Positive charges are mostly concentrated in the cytoplasm-facing loops. The core of FcyB is subdivided in two inverted repeats made of TMS1–5 and TMS6–10, arranged in a 2-fold pseudosymmetry axis, running parallel with the membrane plane. The two repeat units are completely intertwined, giving two topologically distinct subdomains made of TMSs 1, 2, 6, and 7 and TMSs 3, 4, 8, and 9, respectively, linked with helices TMS5 and TMS10. As will be shown below, the substrate binding site is located in the space between the two subdomains of the core (see Fig. 2B).

Substrate Docking in FcyB—Using the FcyB model, aspects of substrate recognition were addressed using docking calculations. The four major physiological substrates, namely hypoxanthine, adenine, guanine, and cytosine, as well as the antifungal 5-FC were docked to the modeled structure of FcyB. Calculations were performed using the IFD protocol as introduced by the Schrödinger 2011 Suite of programs. The IFD protocol is based on an iterative implementation of Glide algorithm for rigid docking and Prime algorithm for protein refinement, resulting in an improved simulation of binding in terms of protein flexibility. Furthermore, because Prime is a modeling tool especially developed for refinement of protein structures derived by homology, its implementation as part of the IFD protocol was considered in the case of FcyB as promising. The best orientation for each substrate was finally selected on the basis of lowest energy, number of intermolecular interactions, and visual inspection.

Fig. 3 shows the modeled interactions of FcyB with its four physiological substrates and the antifungal 5-FC. FcyB interacts with adenine through a bidentate H bond that is formed between Asn-163 and ligand sites C6-NH₂ and N1, an H bond between Ser-85 and purine N7, and π - π stacking of the purine ring between the indole rings of Trp-159 and Trp-259 (Fig. 3A). FcyB interacts with hypoxanthine and guanine through the establishment of three H bonds between Asn-163 and N1-H, between Ser-85 and C2=O₂, and between Asn-354 and N3, as well as π - π stacking of the purine ring between Trp-159 and Trp-259 (Fig. 3, B and C). Finally, FcyB interacts with cytosine and its toxic analog 5-FC by forming three H bonds between Asn-163 and N3, between Asn-354 and ligand C4-NH₂, and between Ser-85 and C2=O₂ as well as π - π stacking with Trp-159 and Trp-259 (Fig. 3, D and E).

These results establish that Asn-163 and the two invariable Trp residues, Trp-159 and Trp-259, interact with similar positions of the rings of all purines and cytosine, whereas the inter-

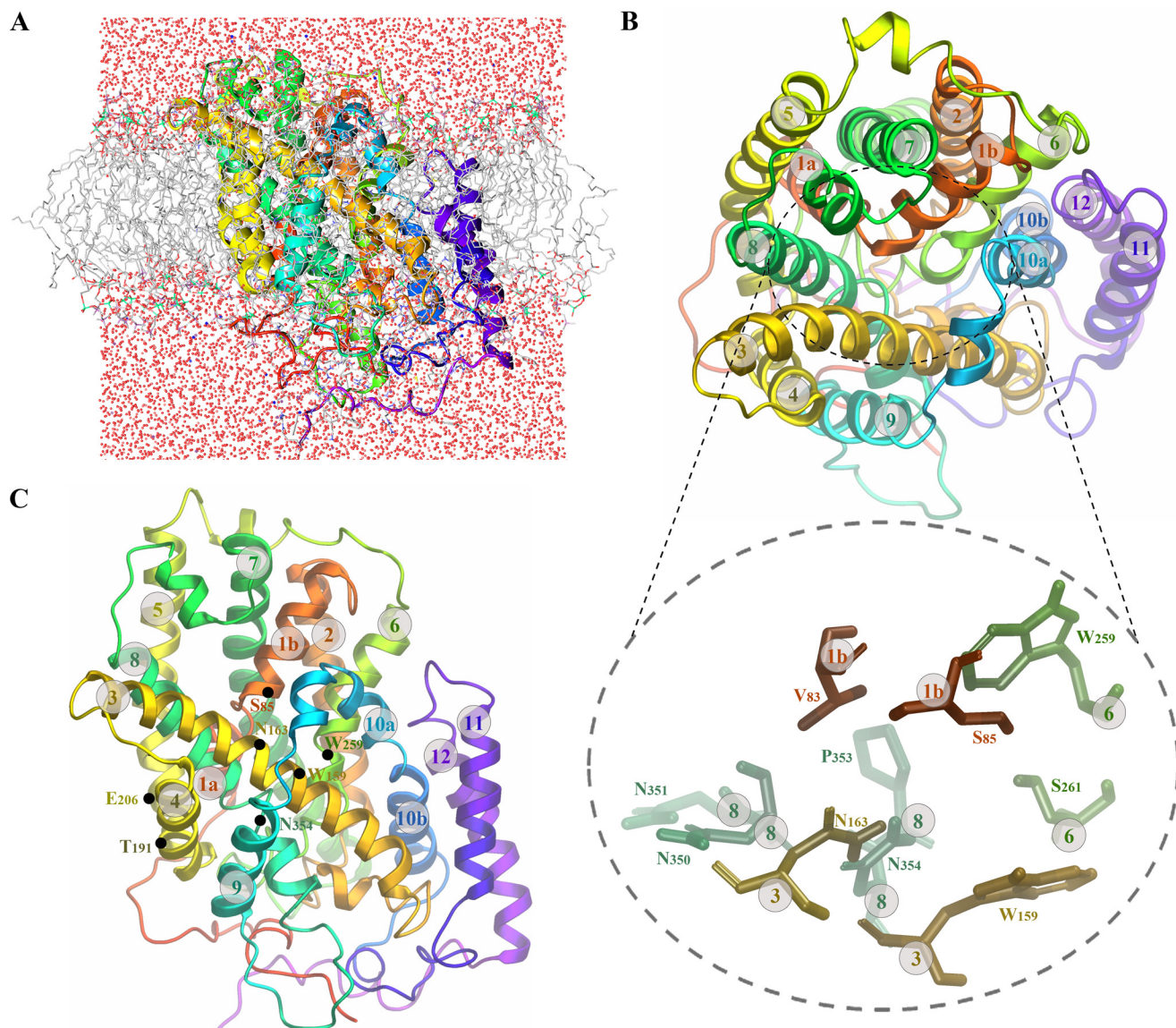


FIGURE 2. **FcyB structural model.** *A*, shown is the modeled three-dimensional structure of FcyB validated with molecular dynamics using Desmond software. *B*, shown is the top view of the FcyB model where the core of the first 10 TMSs is clearly distinguished from the last two TMSs 11 and 12, which probably do not affect transport catalysis *per se*. The core can also be seen as two subdomains, the first made of TMSs 1, 2, 6, and 7 and the second from TMSs 3, 4, 8, and 9, linked with flexible helices TMS5 and TMS10. The substrate binding site is located in the space between the two subdomains of the core. In the *lower panel*, the topology of residues critical for the function of the substrate binding site, Ser-85, Trp-159, Asn-163, Trp-259, Asn-350, Asn-351, Pro-353, and Asn-354, is shown in zoom-out. *C*, shown is the side view of the FcyB structure showing the topology of residues Ser-85, Trp-159, Asn-163, Trp-259, and Asn-354, involved in direct interactions with substrates (see also Fig. 3). Residues Thr-191 and Glu-206 are also shown (see Results). TMS regions are highlighted with colors as in Fig. 1.

actions involving Ser-85 and Asn-354 vary depending on the substrate docked. As will be shown and discussed later, mutational analysis strongly support the docking results. In addition, the model and docking analysis showed that two neighboring Asn residues, Asn-350 and Asn-351, might interact with Asn-354 in a way that probably builds a necessary architecture for substrate binding (see also supplemental Fig. S2). The impor-

tance of residues Asn-350 and Asn-351 in substrate binding was rigorously established through mutational analysis in this work (see later). Finally, in the docking models for purine binding, Ser-261 was also within H bond distance from either N3 (adenine) or N9-H (hypoxanthine, guanine). However, in this case, mutational analysis did not support the involvement of Ser-261 in direct substrate binding (see also later).

FIGURE 1. **Multiple sequence alignment of FcyB and NCS1 homologues of known function.** The three-dimensional FcyB model was constructed on the basis of the alignment shown with Mhp1. Putative TMSs of FcyB are denoted in *colored cylinders*. Invariant and highly conserved amino acids are shaded in *red* and *blue-lined boxes*, respectively. Amino acids critical for function and specificity discussed in the Results are highlighted with *asterisks*: *red* for residues interacting with substrates, *blue* for those critical for substrate binding and transport, and *black* for other residues discussed in the Results. The listed NCS1 homologues include: FcyB of *A. nidulans*, GI: 169798762; AfFcyB of *A. fumigatus* (Af_FcyB), GI: 169798764; Fcy21p of *S. cerevisiae*, GI: 392860008; Fcy2p of *S. cerevisiae*, GI: 6320897; Mhp1 of *M. liquefaciens*, GI: 210060746; FurA of *A. nidulans*, GI: 2876438; Fur4p of *S. cerevisiae*, GI: 6319495; Dal4p of *S. cerevisiae*, GI: 392860728; Fui1p of *S. cerevisiae*, GI: 6319429; FurD of *A. nidulans*, GI: 149212441; AtNcs1 of *Arabidopsis thaliana*, GI: 16648836. All Fcy-like proteins are purine-cytosine transporters. Fur4p and FurD are uracil transporters. FurA and Dal4p are allantoin transporters. Fui1p is a uridine transporter. AtNCS1 is reported to be specific for adenine-guanine-uracil transport, but no direct information on its ability to transport other nucleobases exists (15).

Structure-Function Relationships in FcyB

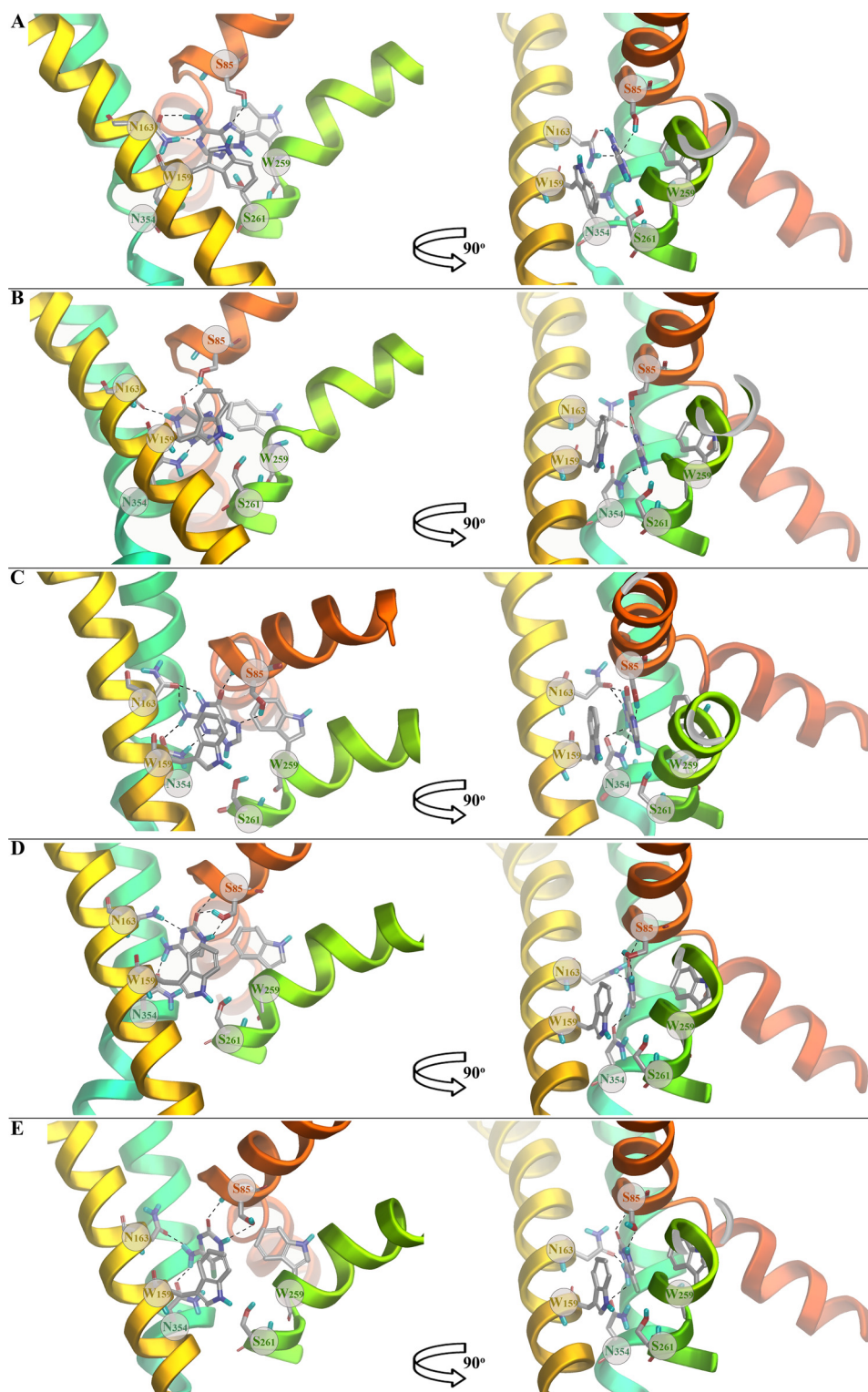


FIGURE 3. **Substrate docking in FcyB.** A, adenine. B, hypoxanthine. C, guanine. D, cytosine. E, 5-FC. Hydrogen bonds are depicted with *dashed lines*.

Rational Design and Construction of FcyB Mutants—Results derived from docking methodologies suggested that five residues in FcyB might be directly involved in substrate binding. These are Ser-85 in TMS1, Trp-159 and Asn-163 in TMS3, Trp-259 in TMS6, and Asn-354 in TMS8. Two more Asn residues, Asn-350 and Asn-351, might also interact with Asn-354 in a way that is critical for substrate binding. Five of these puta-

tively functional residues, Trp-159, Asn-163, Trp-259, Asn-350, and Asn-354, superimpose with amino acid residues, which have been shown to directly interact with the substrate (benzyl-hydantoin) in Mhp1, namely Trp-117, Gln-121, Trp-220, Asn-314, and Asn-318. Interestingly, these residues are either absolutely (Trp-117, Asn-314, and Asn-318) or highly (Trp-220 and Gln-121) conserved in the NCS1 family (see Fig.

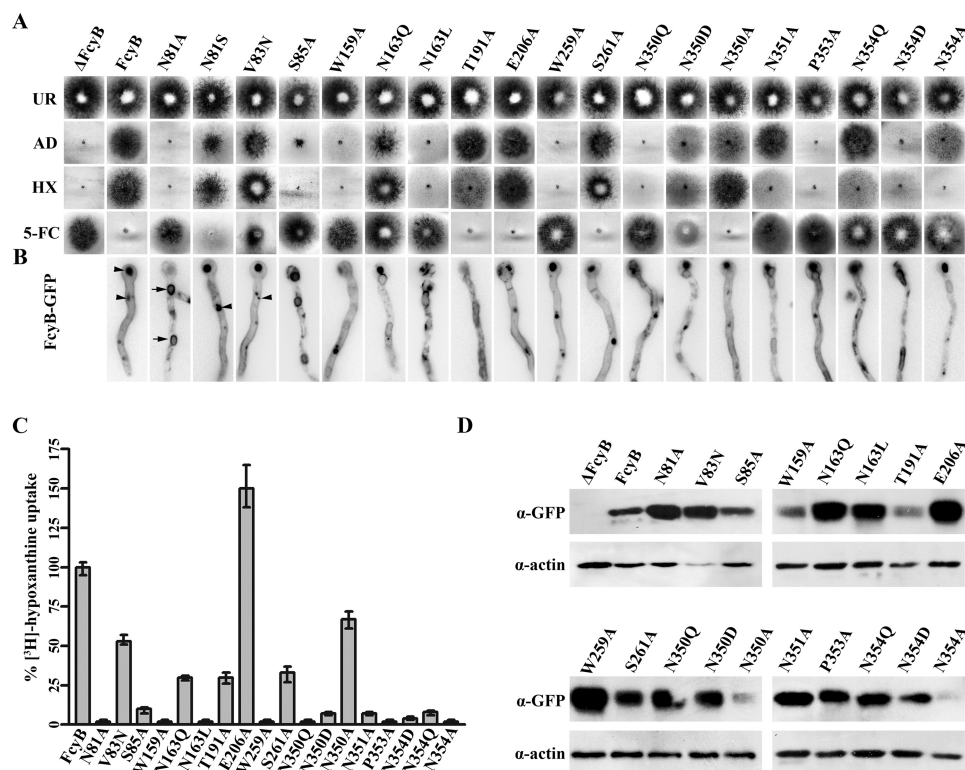


FIGURE 4. Functional analysis of FcyB mutations. *A*, shown are growth tests on purines as sole nitrogen sources and resistance/sensitivity test on 5-FC at 25 °C. *AD* is adenine, and *HX* is hypoxanthine. Growth on urea is also shown (*UR*) as a control. Positive (FcyB) and negative (Δ FcyB) isogenic control strains are shown. *B*, epifluorescence microscopy showing *in vivo* subcellular expression of FcyB-GFP mutant alleles and a wild-type control (FcyB) is presented as *dark structures in a grayscale inverted mode*. In selected samples, *arrows* and *arrowheads* depict perinuclear ER membrane rings (verified by DAPI staining; not shown) and vacuoles, respectively. *C*, comparative initial uptake rates of ^3H -radiolabeled hypoxanthine in FcyB mutant alleles and a wt control are shown. 100% is the transport rate in the wt (FcyB). *D*, Western blot analysis of total proteins from FcyB-GFP mutants detected with anti-GFP antibody is shown. Antibody against actin was used as an internal marker for equal loading.

1). Given the different substrate specificities of NCS1 members, this suggests that some other residues might also be critical for substrate binding, a prediction supported in this work (see later).

To test the functional role of the residues discussed above, as well as residues differentially conserved in NCS1 members with different specificity profiles or residues positioned close to the proposed binding site, we constructed a series of relevant mutations and analyzed functionally the corresponding mutants. The 19 mutations made were: N81A, N81S, S85A, V83N, W159A, N163Q, N163L, T191A, E206A, W259A, S261A, N350Q, N350D, N350A, N351A, P353A, N354Q, N354D, N354A (See supplemental Table S2). The rationale for the specific changes constructed was either to introduce Ala or highly conserved residues or replace FcyB residues with those found in other NCS1 members with different specificity.

All mutations were made in vectors carrying the FcyB orf expressed from the *uapA* promoter (see “Experimental Procedures”). This was so because the endogenous *fcyB* promoter is very weakly expressed under all conditions tested (13). The *uapA* gene encodes a very well studied uric acid-xanthine transporter (for reviews, see Refs. 2 and 12), and thus we used its promoter, which drives low but significant transcription. Furthermore, the *uapA* promoter can be totally repressed in the presence of ammonium ions or glutamine and can be induced in the presence of uric acid or the gratuitous induced 2-thioxanthine (54). In all constructs *fcyB* transcription is terminated

by the 3'-flanking region of *uapA*. In one set of constructs, the FcyB orf was fused in-frame with the *gfp* orf. All plasmids were introduced in a strain lacking all endogenous purine transporters (“Experimental Procedures”).

Phenotypic Analysis of FcyB Mutants—We analyzed all selected transformants on different purines as sole nitrogen sources together with positive and negative isogenic control strains. A summary of this analysis of transformants expressing single-copy FcyB plasmids is shown in Fig. 4A. The positive control strain expressing wild-type FcyB from the *uapA* promoter can grow on adenine and hypoxanthine as sole nitrogen sources and is sensitive to 5-FC. The negative control strain lacking FcyB cannot grow in any purine and is resistant to 5-FC. Based on our previous experience with *A. nidulans* transporters, any mutation reducing steady state rates of purine uptake to <50% that of the wild-type rate is clearly reflected in relevant growth tests. Transport reductions to levels >50% do not lead to distinguishable growth phenotypes. As expected, all strains showed normal growth on nitrogen sources other than purines (e.g. urea). None among the FcyB alleles conferred a capacity for growth on other purines, such as uric acid or xanthine, which are not physiological substrates for the wild-type FcyB (not shown). Within the limits of growth testing on hypoxanthine or adenine and sensitivity to 5-FC, FcyB mutants could be classified into apparent wild-type-like (E206A), total loss-of-function (N81A, W159A, N163L, W259A, N350Q, P353A, N354D), or partial loss-of function (V83N, S261A) or altered specificity

Structure-Function Relationships in FcyB

showing differential capacities to grow on adenine, hypoxanthine, or 5-FC (T191A, N163Q, N350A, N350D, N351A, N354A, N354Q). In particular, mutants T191A, N351A, N354A, and N354Q grow better on adenine than on hypoxanthine, but in addition, T191A has wild-type like 5-FC sensitivity, whereas the other three mutants are significantly resistant to this toxic analog. In contrast, N163Q and N350A grow better on hypoxanthine than on adenine, but in addition, N163Q is resistant to 5-FC, whereas N350A has wild-type-like 5-FC sensitivity. N350D does not grow on hypoxanthine and adenine but is 5-FC-sensitive. The conclusions from this growth test are: (i) Asn-351 and Asn-354 are very important for hypoxanthine and 5-FC (and probably cytosine) transport but less for adenine, (ii) Asn-163 is more important for 5-FC but less critical for adenine transport and even less for hypoxanthine transport, (iii) Asn-350 is more critical for the transport of adenine and less for hypoxanthine 5-FC, and (iv) T191 seems critical solely for hypoxanthine transport.

Apparent Purine Transport Rates in FcyB Mutants—We performed comparative radiolabeled hypoxanthine uptake measurements in the strains shown in Fig. 4A. Our results (Fig. 4C) were in line with growth tests. All mutants characterized as loss-of-function had no or extremely low ($V < 6\%$) apparent uptake capacity for hypoxanthine. Partial loss-of-function mutations had 33–53% apparent uptake capacity, and E206A showed 150% transport capacity compared with wild type. Specificity mutants had low rates for hypoxanthine transport (2–15% that of the wild-type) except N350A (67%). These results showed that most amino acid residues tested, except Glu-206 and to a certain degree Val-83 and Ser-261, are critical for FcyB transport activity and substrate specificity.

Expression Levels and Cytoplasmic Localization of Mutant Versions of FcyB—Reduced apparent V values could imply FcyB problematic trafficking, high turnover, or *bona fide* reduction in transport activity. To distinguish among these possibilities, we reconstructed relevant FcyB alleles tagged with GFP and performed Western blots and epifluorescence microscopic analyses.

Western blot analysis of total proteins isolated by the mutants probed with anti-GFP showed that the FcyB protein steady state levels are either similar or increased (up to 6-fold) compared with the wild type (Fig. 4D). Increased protein steady state levels are in principle due to either increased intrinsic stability, often associated with reduced transport function, or due to reduced vacuolar turnover due to ER retention.

Epifluorescence microscopic analysis of the same mutants confirmed that the FcyB-GFP protein was expressed in all mutants and further revealed that in several mutants (N81A, S85A, N163Q, N163L, T191A, N350D, N351A, N354Q, N354D, N354A) FcyB-GFP had increased ER retention relevant to the wild-type FcyB-GFP protein (Fig. 4B). In fungi, the ER membrane appears mostly as very characteristic perinuclear rings, as verified by Hoechst 33242 or DAPI staining, or by fluorescent labeling of an ER resident chaperone (55–57). We have previously shown that transporters with problematic trafficking are mostly retained in these ER perinuclear rings (11, 40). We also verified the identity of the FcyB-GFP-labeled ER perinuclear rings in a relative mutant (N81A), by nuclei stain-

TABLE 1
Kinetic and specificity profile of mutant versions of FcyB

$K_{m/i}$ values (μM) were determined as described under “Experimental Procedures.” >500 or >1000 stand for inhibition values close to 10–20% at 0.5 and 1 mM, respectively. Results are averages of at least three independent experiments in triplicate for each concentration point. S.D. was $<20\%$.

	Hypoxanthine	Adenine	Guanine	Cytosine
WT	11	7	17	20
V83N	16	2	7	18
S85A	78	26	16	45
N163Q	47	2	>500	73
T191A	9	11	4	3
E206A	6	7	10	14
S261A	4	6	50	17
N351A	3	1	4	16
N350D	5	8	31	6
N350A	6	>1000	25	5
N354D	3	1	>500	4

ing, and by examining the relative localization of these rings with histone H1 labeled with mRFP (supplemental Fig. S3). Noticeably, in some mutants (e.g. N81A) the FcyB-GFP signal intensity does not correspond to the protein steady state levels detected by anti-GFP (see Fig. 4D). This discrepancy between higher GFP signals in the cells and low level detection by Western analysis is not uncommon and is probably due to partial misfolding of proteins that might differentially affect protein turnover and GFP visualization. Also, noticeable is the observation that in mutants with more prominent ER retention the protein levels of FcyB-GFP are often higher than in wild type, probably due to reduced vacuolar turnover.

Mutants related to residues Trp-159, Trp-259, and Pro-353 show a subcellular localization picture similar to wild type (no significant ER-retention), so that their lack of function should be directly associated to lack of transport activity. In mutants showing problematic FcyB trafficking, such as those concerning polar residues Asn-81, Ser-85, Asn-163, T191, Asn-350, Asn-351, and Asn-354, we cannot rigorously conclude whether the relevant residues are critical for transport activity *per se* or whether they affect transport activity indirectly due to partial misfolding. However, the fact that most of these mutants conserve minimal activity allowed us to perform a kinetic analysis and show that they are indeed critical for substrate binding (see below).

Specificity Profile of FcyB Mutants—We performed direct radiolabeled hypoxanthine uptake competition assays to define the binding constants ($K_{m/i}$ s) of FcyB for its physiological substrates in the relevant mutants (for details see “Experimental Procedures”). We could only perform transporter kinetics in mutants that preserve a measurable uptake rate of hypoxanthine. These were S85A, V83N, N163Q, T191A, E206A, S261A, N350D, N350A, N351A, and N354D. Given that $K_{m/i}$ values do not depend on the number of transporter molecules expressed in the plasma membrane, for mutants showing very low hypoxanthine uptake ($< 6\%$), such as N350D, N351A, and N354D, we used multicopy transformants for performing the kinetic analysis. Table 1 summarizes the results obtained. The mutants analyzed could be classified to those little affecting substrate binding (V83N, T191A, E206A, S261A, N350D) and those modifying significantly and, in most cases, differentially the binding of various substrates (N163Q, N350A, N351A, N354D). Among the latter, N163Q leads to a 4-fold reduction in

the binding of hypoxanthine or cytosine, >30-fold reduction in guanine binding, and a 3.5-fold increase in adenine binding. N350A conserves binding affinities for hypoxanthine, guanine, and cytosine close to those of the wild-type (moderately increased binding for hypoxanthine and cytosine) but exhibits a dramatic loss of adenine binding ($K_i > 1000 \mu\text{M}$). N351A has a general tendency to bind with higher affinity (4–7-fold) all purines, but not cytosine. Finally, N354D has a 4-fold increased capacity for hypoxanthine, adenine, and cytosine binding but a dramatic loss of guanine binding ($K_i > 500 \mu\text{M}$). Noticeably, the dramatic differential effect of mutation N350A on the ability of FcyB to bind adenine *versus* hypoxanthine or cytosine binding was nicely reflected in growth tests showing that N350A grows better on hypoxanthine than on adenine and is sensitive to 5-FC (see Fig. 4A). In summary, kinetic analysis of mutants showed that residues Asn-163, Asn-350, and Asn-354 are critical for substrate specificity, whereas Asn-163 and Asn-350 are mostly critical for substrate binding affinities.

DISCUSSION

Evidence from structural studies and molecular simulations have strongly supported the proposal that the transporters of the 5HIR superfamily function by an alternating access mechanism in which substrate binding triggers a conformational change from an outward-facing open conformation through an occluded structure to the an inward-facing open state of the protein (32–34, 36, 39). However, many aspects of this mechanism, as for example the exact steps along the substrate and ion translocation pathway or how gating operates in each case, remain to be investigated. Our current work did not intend to approach the alternating mechanism of transport by members of the 5HIR superfamily. It rather focused on the identification of specific residues that determine the function, transport kinetics, and substrate specificity of a eukaryotic member of the NCS1 family.

The first part of our work presents a theoretical structural model of the FcyB purine-cytosine transporter that reveals a number of important aspects concerning how this transporter might bind and transport its substrates. To validate the theoretical conclusions, we proceeded in a systematic mutational analysis of putatively critical residues. Our experimental results fully support the involvement of specific residues in TMS1, TMS3, TMS6, and TMS8 in substrate binding and/or transport. In particular, residues Ser-85, Trp-159, Asn-163, Trp-259, Asn-350, Asn-351, Pro-353, and Asn-354 were shown to be irreplaceable for FcyB-mediated transport. Among these residues, Ser-85, Asn-163, Asn-350, Asn-351, and Asn-354 seem critical for determining the substrate binding affinity and/or specificity of FcyB (see Fig. 4 and Table 1). Among the irreplaceable amino acids, Asn-163 and Asn-351 might also affect FcyB stability or/and turnover as the GFP-tagged versions of these alleles are significantly blocked in the ER compared with the wild-type protein. The other residues analyzed, Asn-81, Val-83, Ser-261, Thr-191, and Glu-206, seem to have a less critical role on protein turnover or FcyB transport activity. Only mutation T191A moderately affects the affinity and substrate specificity of FcyB. Noticeably, E206A, a residue within TMS5 that has been reported to function as a putative inward-facing gate,

leads to a reduction in FcyB turnover and an increase in apparent transport capacity (see Fig. 4).

Among the eight residues essential for FcyB function and specificity, Trp-159, Asn-163, Trp-259, Asn-350, and Asn-354 correspond to residues shown to be directly involved in substrate binding by the Mhp1 transporter (Trp-117, Gln-121, Trp-220, Asn-314, and Asn-318). Ser-85 is similarly, but not identically positioned, with Gln-42 in Mhp1, which is also involved in substrate binding. The rest two essential FcyB residues, Asn-351 and Pro-353, are within hydrogen bonding distance with residues proposed to be involved in direct substrate binding such that they may hold the local architecture of the binding site in a position to interact with substrates. Thus, FcyB and Mhp1, despite their important specificity difference and overall low amino acid sequence identity, share very similar residues to build their substrate binding sites; four residues are identical (Trp-159, Trp-259, Asn-350, and Asn-354, numbering of FcyB), one is highly conserved (Asn-163 of FcyB replaced by Gln-121 in Mhp1), and three are not conserved (Ser-85, Asn-351, and Pro-353 in FcyB *versus* Gln-42, Pro-315, and Ala-317 in Mhp1). In fact, the four absolutely conserved residues between FcyB and Mhp1 are also highly conserved in all NCS1 members, whereas the other four residues are differentially conserved among different homologues (see Fig. 1). In particular, Asn-163 is conserved in nearly all purine-cytosine Fcy-like NCS1 members, replaced by a Glu residue in a plant adenine-guanine-uracil transporter (AtNcs1), by a Gln in homologues specific for uracil (Fur4p/FurD) or allantoin (Dal4p/FurA), and by a Leu in a uridine-specific transporter (Fui1p). Asn-351 and Pro-353 are conserved in microbial NCS1 members specific for purine-cytosine (Fcy-like proteins) but are replaced by Ile and Ala in the plant adenine-guanine-uracil transporter (AtNcs1) and the uracil- or allantoin-specific transporters (Fur4p, FurD, FurA, and Dal4p) or by Leu and Gly in a uridine-specific homologue (Fui1p). Interestingly, Ser-85, a major amino acid in FcyB function, is not a conserved residue in the NCS1 family.

None of the single mutations constructed and analyzed in this work, including N163L, N163Q, or P353A, which introduce residues present in uracil, allantoin, hydantoin, or uridine transporters, conferred to FcyB the ability to bind or/and transport substrates other than adenine, guanine, hypoxanthine, and cytosine (results not shown). In fact, mutations N163L, N163Q, or P353A led to loss or highly reduced transport capacity of FcyB. This observation strongly suggests that substrate specificity has a more complex molecular basis and might not even be solely determined by the architecture of the binding site but also by elements acting as gates or selectivity filters or by elements contributing to protein stability. We have arrived at a similar conclusion with respect to the role of interdomain synergy in determining the specificity of another group of purine transporters, the nucleobase-ascorbate transporter (NAT/NCS2) family, which was extensively studied in our laboratory (40–42).

A genetic analysis of Fcy2p, a true orthologue of FcyB in *S. cerevisiae*, supports results presented in this work. Genetically selected and subsequent site-directed mutations have strongly suggested a major role of residues Asn-374, Pro-376, and Asn-377, equivalent to Asn-351, Pro-353, and Asn-354 in

Structure-Function Relationships in FcyB

FcyB, in substrate binding (18–19). Noticeably, the effects of mutations in Asn-374 and Asn-377 were partially due to a shift of the pK_a of an ionizable amino acid residue of the unliganded transporter (18). Interestingly, mutation S272L in TMS6, isolated as an allele nonspecific, second-site, suppressor of loss-of-function mutations T213L, N374L, or N377G, partially restored the binding of hypoxanthine and cytosine (19).

Based on the above comparative observations, the docking results with FcyB, and the mutational analysis presented herein, we propose that residues corresponding to Trp-159, Trp-259, Asn-350, Pro-353, and Asn-354 in FcyB are major elements of the substrate binding site in all NCS1 members, whereas residues corresponding to Ser-85, Asn-163, and Asn-351 are mostly specificity determinants. We propose that residues Ser-85, Asn-163, and Asn-354 make direct H-bonds with substrates and Trp-159 and Trp-259 stabilize binding through π - π -stacking interactions with the purine or pyrimidine ring, whereas residues Asn-350, Asn-351, and Pro-353 have an indirect role in substrate binding through local interactions between themselves and the residues binding substrates. The critical role of residues of the four Asn residues, Asn-163, Asn-350, Asn-351, and Asn-354, in FcyB function and specificity is strongly supported by both growth phenotypes and kinetic profiles of the corresponding mutants (Fig. 4A and Table 1). For example, FcyB-N350A binds similarly to wild-type FcyB hypoxanthine, guanine, and cytosine but has lost the capacity for adenine binding. FcyB-N350D has increased binding affinity specifically for hypoxanthine and 5-FC, but only the latter is transported efficiently. N354D or N163Q have specifically lost the ability to bind guanine. Finally, N351A, N354A, and N354Q transport adenine much more efficiently than hypoxanthine and 5-FC, as deduced from the growth tests shown in Fig. 4A (a similar growth phenotype is also exhibited by N351I; results not shown).

Our work is the first systematic functional analysis of a eukaryotic member of the NCS1 family that, moreover, is combined with theoretical approaches concerning the three-dimensional transporter structure. Given the privilege of the several Mhp1 crystal structures available corresponding to different conformations achieved during transport catalysis, we are now in a position to perform a second round of rational mutagenesis combined with unique genetic screens available in *A. nidulans* to understand in more detail not only how FcyB works and selects its substrates but also how substrate specificity has evolved within the NCS1 family.

Acknowledgment—All molecular dynamic simulations were run on Cy-tera high performance computing (HPC) facility.

REFERENCES

- de Koning, H., and Diallinas, G. (2000) Nucleobase transporters (review). *Mol. Membr. Biol.* **17**, 75–94
- Gournas, C., Papageorgiou, I., and Diallinas, G. (2008) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. Genomics, evolution, structure-function relationships, and physiological role. *Mol. Biosyst.* **4**, 404–416
- de Koning, H. P., Bridges, D. J., and Burchmore, R. J. (2005) Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa. From biology to therapy. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 987–1020
- Schultes, N. P., Brutnell, T. P., Allen, A., Dellaporta, S. L., Nelson, T., and Chen, J. (1996) Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. *Plant Cell* **8**, 463–475
- Mourad, G. S., Snook, B. M., Prabhakar, J. T., Mansfield, T. A., and Schultes, N. P. (2006) A fluoroorotic acid-resistant mutant of *Arabidopsis* defective in the uptake of uracil. *J. Exp. Bot.* **57**, 3563–3573
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., and Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 805–836
- Kraupp, M., and Marz, R. (1995) Membrane transport of nucleobases. Interaction with inhibitors. *Gen. Pharmacol.* **26**, 1185–1190
- Köse, M., and Schiedel, A. C. (2009) Nucleoside/nucleobase transporters. Drug targets of the future? *Future Med. Chem.* **1**, 303–326
- Barrett, M. P., and Gilbert, I. H. (2006) Targeting of toxic compounds to the trypanosome's interior. *Adv. Parasitol.* **63**, 125–183
- Pfaller, M. A. (2012) Antifungal drug resistance. Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* **125**, S3–S13
- Pantazopoulou, A., and Diallinas, G. (2007) Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 657–675
- Diallinas G., and Gournas C. (2008) Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family. Lessons from model microbial genetic systems. *Channels* **2**, 363–372
- Vlanti, A., and Diallinas G. (2008) The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is down-regulated by endocytosis. *Mol. Microbiol.* **68**, 959–977
- Hamari, Z., Amillis, S., Drevet, C., Apostolaki, A., Vágvölgyi, C., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. (2009) Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **73**, 43–57
- Mourad, G. S., Tippmann-Crosby, J., Hunt, K. A., Gicheru, Y., Bade, K., Mansfield, T. A., and Schultes, N. P. (2012) Genetic and molecular characterization reveals a unique nucleobase cation symporter 1 in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **586**, 1370–1378
- Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M. R., and Jund, R. (1990) The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. *Mol. Microbiol.* **4**, 585–596
- Goudela, S., Tsilivi, H., and Diallinas, G. (2006) Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 291–303
- Ferreira, T., Brêthes, D., Pinson, B., Napias, C., and Chevallier, J. (1997) Functional analysis of mutated purine-cytosine permease from *Saccharomyces cerevisiae*. A possible role of the hydrophilic segment 371–377 in the active carrier conformation. *J. Biol. Chem.* **272**, 9697–9702
- Ferreira, T., Chevallier, J., Paumard, P., Napias, C., and Brêthes, D. (1999) Screening of an intragenic second-site suppressor of purine-cytosine permease from *Saccharomyces cerevisiae*. Possible role of Ser-272 in the base translocation process. *Eur. J. Biochem.* **260**, 22–30
- Ferreira, T., Napias, C., Chevallier, J., and Brêthes, D. (1999) Evidence for a dynamic role for proline 376 in the purine-cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **263**, 57–64
- Suzuki, S., and Henderson, P. J. (2006) The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *J. Bacteriol.* **188**, 3329–3336
- Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K., Carpenter, E. P., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S. G., Hope, R. J., Norbertczak, H. T., Roach, P. C., Iwata, S., Henderson, P. J., and Cameron, A. D. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science* **322**, 709–713
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **437**, 215–223
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G. M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B. A., Wright, E. M., and Abramson, J. (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* **321**, 810–814

25. Ressler, S., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Vonnrhein, C., Ott, V., and Ziegler, C. (2009) Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP. *Nature* **458**, 47–52
26. Fang, Y., Jayaram, H., Shane, T., Kolmakova-Partensky, L., Wu, F., Williams, C., Xiong, Y., and Miller, C. (2009) Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature* **460**, 1040–1043
27. Shaffer, P. L., Goehring, A., Shankaranarayanan, A., Gouaux, E. (2009) Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science* **325**, 1010–1014
28. Chen, N. H., Reith, M. E., and Quick, M. W. (2004) Synaptic uptake and beyond. The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* **447**, 519–531
29. Wright, E. M., Hirayama, B. A., and Loo, D. F. (2007) Active sugar transport in health and disease. *J. Intern. Med.* **261**, 32–43
30. Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S. H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J. Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T., and Endou, H. (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1). Characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**, 291–302
31. Harada, N., Nagasaki, A., Hata, H., Matsuzaki, H., Matsuno, F., and Mitsuya, H. (2000) Down-regulation of CD98 in melphalan-resistant myeloma cells with reduced drug uptake. *Acta Haematol.* **103**, 144–151
32. Abramson, J., and Wright, E. M. (2009) Structure and function of Na⁺ symporters with inverted repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 425–432
33. Krishnamurthy, H., Piscitelli, C. L., and Gouaux, E. (2009) Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**, 347–355
34. Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., Sharples, D., Sansom, M. S., Iwata, S., Henderson, P. J., and Cameron, A. D. (2010) Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science* **328**, 470–473
35. Singh, S. K., Piscitelli, C. L., Yamashita, A., and Gouaux, E. (2008) A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation. *Science* **322**, 1655–1661
36. Krishnamurthy, H., and Gouaux, E. (2012) X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states. *Nature* **481**, 469–474
37. Gao, X., Lu, F., Zhou, L., Dang, S., Sun, L., Li, X., Wang, J., and Shi, Y. (2009) Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science* **324**, 1565–1568
38. Weyand, S., Shimamura, T., Beckstein, O., Sansom, M. S., Iwata, S., Henderson, P. J., and Cameron, A. D. (2011) The alternating access mechanism of transport as observed in the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *J. Synchrotron. Radiat.* **18**, 20–23
39. Adelman, J. L., Dale, A. L., Zwier, M. C., Bhatt, D., Chong, L. T., Zuckerman, D. M., and Grabe, M. (2011) Simulations of the alternating access mechanism of the sodium symporter Mhp1. *Biophys. J.* **101**, 2399–2407
40. Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., and Diallinas, G. (2008) Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J. Mol. Biol.* **382**, 1121–1135
41. Kosti, V., Papageorgiou, I., and Diallinas, G. (2010) Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **397**, 1132–1143
42. Amillis, S., Kosti, V., Pantazopoulou, A., Mikros, E., and Diallinas, G. (2011) Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J. Mol. Biol.* **411**, 567–580
43. Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815
44. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., and Tirado-Rives, J. (1996) Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236
45. Bowers, K., Chow, E., Xu, H., O. Dror, R., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossvary, I., Moraes, M. A., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., and Shaw, D. E. (2006) *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, November 11–17, 2006
46. Lomize, M. A., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., and Mosberg, H. I. (2006) OPM. Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**, 623–625
47. Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Farid, R. (2006) Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J. Med. Chem.* **49**, 534–553
48. Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A., and Diallinas, G. (2003) A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J. Microbiol. Methods.* **55**, 687–695
49. Edgerton-Morgan, H., and Oakley, B. R. (2012) γ -Tubulin plays a key role in inactivating APC/C^{Cdh1} at the G₁-S boundary. *J. Cell Biol.* **198**, 785–791
50. Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H. N. Jr., Cecchetto, G., and Scazzocchio, C. (1995) Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **270**, 8610–8622
51. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
52. Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A., and Diallinas, G. (2010) Transport-dependent cytosolysis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol. Microbiol.* **75**, 246–260
53. Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004) The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* **279**, 3132–3141
54. Gorfinkiel, L., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. (1993) Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23376–23381
55. Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C., Diallinas, G. (2004) Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol. Microbiol.* **52**, 205–216
56. Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M., Diallinas, G. (2006) A novel-type substrate selectivity filter and ER exit determinants in the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.* **357**, 808–819
57. Erpapazoglou, Z., Kafasla, P., and Sophianopoulou, V. (2006) The product of the SHR3 orthologue of *Aspergillus nidulans* has a restricted range of amino acid transporter targets. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 222–233

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



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

