



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

“Διαμεμβρανική μεταφορά νουκλεοσιδίων και αναλόγων νουκλεοσιδίων από βακτήρια του μικροβιώματος: φυλογενετική και λειτουργική χαρτογράφηση των βακτηριακών μεταφορέων της γεμισταβίνης (dFdC)”

ΙΩΣΗΦΙΔΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

“Διαμεμβρανική μεταφορά νουκλεοσιδίων και αναλόγων νουκλεοσιδίων από βακτήρια του μικροβιώματος: φυλογενετική και λειτουργική χαρτογράφηση των βακτηριακών μεταφορέων της γεμισταβίνης (dFdC)”

ΙΩΣΗΦΙΔΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023

“Στο παντοτινό σημείο αναφοράς μου, τον μπαμπά μου”

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	6
Συντμήσεις	9
Περίληψη	11
Abstract.....	12
Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή.....	13
1.1 Γεμισταβίνη : ένα ανάλογο της κυτιδίνης με χημειοθεραπευτική δράση	14
1.1.1 Ενδοκυτταρική πρόσληψη, μεταβολισμός και μηχανισμός δράσης της Γεμισταβίνης .	15
1.1.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη θεραπεία με γεμισταβίνη	17
1.2 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων/ανάλογων νουκλεοσιδίων στον άνθρωπο.....	20
1.2.1 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας SLC28 (CNTs)	21
1.2.2 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας SLC29 (ENTs).....	22
1.3 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων/ανάλογων νουκλεοσιδίων στα βακτήρια	23
1.3.1 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας NHS.....	24
1.3.2 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας CNT	25
1.4 Δομικά πρότυπα των μεταφορέων νουκλεοσιδίων.....	26
1.4.1 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια CNT	26
1.4.2 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια NHS	30
1.4.3 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια ENT	31
1.5 Μεταφορά υποστρώματος – Μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης	32
Σκοπός	38
Κεφάλαιο 2 : Υλικά και Μέθοδοι.....	39
2.1 Όργανα εργαστηρίου	40
2.2 Χημικά αναλώσιμα	42
2.3 Διαλύματα	44
2.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	47
2.5 Φυλογενετική ανάλυση των μεταφορέων νουκλεοσιδίων των οικογενειών CNT/NHS, στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων	49
2.6 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	50
2.6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	50
2.6.2 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA (περιοριστική πέψη – ανασύνδεση).....	52
2.6.3 Κατασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού.....	53
2.6.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	53
2.7 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε μικρή κλίμακα (10mL)	54
2.8 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών	54

2.9 Αναλύσεις πρωτεϊνών	55
2.9.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	55
2.9.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	56
2.9.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	56
2.10 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)	56
2.10.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε βακτηριακά ομόλογα	56
2.10.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση.....	57
2.10.3 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς παρουσία μη σημασμένων νουκλεοσιδίων. 58	
Κεφάλαιο 3 : Αποτελέσματα	59
3.1 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων/ανάλογων νουκλεοσιδίων στην <i>E. coli</i> K-12.....	60
3.2 Φυλογενετική ανάλυση των ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας CNT στα Πρωτεοβακτήρια	64
3.3 Φυλογενετική ανάλυση των ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας NHS στα Πρωτεοβακτήρια	67
3.4 Συντήρηση αμινοξικών καταλοίπων στις οικογένειες μεταφορέων CNT και NHS	69
3.5 Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ομόλογων μεταφορέων CNT και NHS από τα <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 και <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955.....	72
3.5.1. Γονίδια σε οπερόνια μεταβολισμού νουκλεοσιδίων.....	72
3.5.2. Γονίδια που δεν εντοπίζονται σε οπερόνια μεταβολισμού νουκλεοσιδίων	73
3.6 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των πιθανών μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS από τα <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955 και <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	74
Κεφάλαιο 4 : Συζήτηση	82
Βιβλιογραφία	93
Παράρτημα	103
Παράρτημα 1.....	104
Παράρτημα 2.....	106
2.1 Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 275 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, που ανήκουν στην οικογένεια CNT	106
2.2 Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 146 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, που ανήκουν στην οικογένεια CNT	110
Παράρτημα 3.....	113
3.1 Στοιχίση αμινοξικών αλληλουχιών του μεταφορέα vCNT και επιλεγμένων ομολόγων στην οικογένεια CNT.....	113
3.2 Στοιχίση αμινοξικών αλληλουχιών του μεταφορέα NurG και επιλεγμένων ομολόγων στην οικογένεια NHS	115
Παράρτημα 4.....	117
Π4.1 Γενετικοί τόποι των γονιδίων των μεταφορέων στην οικογένεια CNT	117

4.1.1 Γενετικός τύπος του γονιδίου του μεταφορέα NupC και των ομόλογων του KpNupC, KpNupC2, CfNupC	117
4.1.2 Γενετικός τύπος του γονιδίου του μεταφορέα PsuT και του ομόλογου του CfPsuT	120
4.1.3 Γενετικός τύπος του γονιδίου του μεταφορέα vCNT και του ομόλογου του KpvcCNT.	121
Π4.2 Γενετικοί τύποι των γονιδίων των μεταφορέων στην οικογένεια NHS	122
4.2.1 Γενετικός τύπος του γονιδίου του μεταφορέα NupG και των ομόλογων του KpNupG και CfNupG.....	122
4.2.2 Γενετικός τύπος του γονιδίου του μεταφορέα ΧαpB και του ομόλογου του CfΧαρB...	123
4.2.3 Γενετικός τύπος του γονιδίου του μεταφορέα YegT και των ομόλογων του CfYegT, Cf-Yeg-x, Cf-Yeg-1, Kp-Yeg-1	124

Συντμήσεις

Å (angstrom): μονάδα μέτρησης μήκους ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$)

ATP (adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη

Avidin- HRP: σύζευγμα αβιδίνης - υπεροξειδάσης

BAD (biotin acceptor domain): περιοχή δέσμευσης βιοτίνης

BSA (Bovine Serum Albumin): Αλβουμίνη ορού βοός

CNT (Concentrative Nucleoside Transporter): οικογένεια «συγκεντρωτικών» μεταφορέων νουκλεοσιδίων

DMSO (dimethyl sulfoxide): διμεθυλο - σουλφοξειδίο

DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid): αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ

ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter) : οικογένεια «εξισοροποιητικών» μεταφορέων νουκλεοσιδίων

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

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

kDa (kiloDalton): μονάδα μέτρησης ατομικής μάζας ($1 \text{ Da} = 1.66 \times 10^{-24} \text{ g}$)

LacY- epitope: επίτοπος LacY – αλληλουχία του καρβοξυτελικού δωδεκαπεπτιδίου της περμεάσης λακτόζης LacY

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

LB: θρεπτικό υλικό Luria Bertani ή Luria Broth

PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis): ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

PCR (Polymerase Chain Reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

pH ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξωνίου [H_3O^+] ενός διαλύματος

PVDF (polyvinylidene difluoride): διφθοριούχο πολυβινυλιδένιο

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

TM (transmembrane segment): διαμεμβρανικό τμήμα

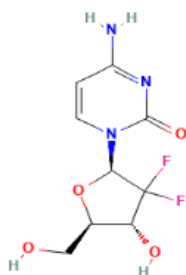
wt (wild-type): φυσικού τύπου

Αμινοξέα

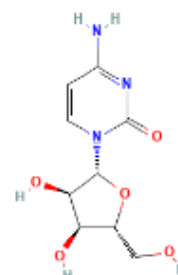
A ή Ala: αλανίνη	M ή Met: μεθειονίνη
C ή Cys: κυστεΐνη	N ή Asn: ασπαραγίνη
D ή Asp: ασπαρτικό οξύ	P ή Pro: προλίνη
E ή Glu: γλουταμικό οξύ	Q ή Gln: γλουταμίνη
F ή Phe: φαινυλαλανίνη	R ή Arg: αργινίνη
G ή Gly: γλυκίνη	S ή Ser: σερίνη
H ή His: ιστιδίνη	T ή Thr: θρεονίνη
I ή Ile: ισολευκίνη	V ή Val: βαλίνη
K ή Lys: λυσίνη	W ή Trp: τρυπτοφάνη
L ή Leu: λευκίνη	Y ή Tyr: τυροσίνη

Πυριμίδινες και ανάλογα πυριμιδινών

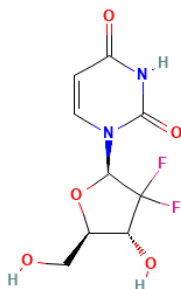
dFdC: 2',2'-διφθορο-2'-δεοξυκυτιδίνη (Γεμισταβίνη)



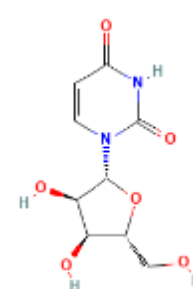
Κυτιδίνη



dFdU: 2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη



Ουριδίνη



Περίληψη

Ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα, η γεμισαβίνη (dFdC), ανάλογο του νουκλεοσιδίου της κυτιδίνης, αποτελεί «χρυσό κανόνα» για την αντιμετώπιση επιθετικών καρκίνων του παγκρέατος. Πρόσφατα (Geller *et al.*, 2017) δείχθηκε ότι τα βακτήρια που εποικίζουν καρκινικούς όγκους συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι του φαρμάκου μεταβολίζοντάς το στην ανενεργή του μορφή (dFdU). Το φαινόμενο συσχετίσθηκε με συγκεκριμένα είδη γ-Πρωτεοβακτηρίων (κυρίως *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii*), τα οποία περιέχουν πολλαπλούς δυνητικούς μεταφορείς που θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη του ανάλογου dFdC.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ασχολείται με την ταυτοποίηση πιθανών μεταφορέων γεμισαβίνης των βακτηριακών ειδών *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii*. Έχοντας ως βάση τους κύριους μεταφορείς γεμισαβίνης της *Escherichia coli* K-12, NupC και NupG (Anagnostopoulou, Botou, and Frilingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα), πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των πιθανών μεταφορέων νουκλεοσιδίων των αντίστοιχων οικογενειών, CNT (NupC-like) και NHS (NupG-like), σε όλα τα Πρωτεοβακτήρια. Από τους ομόλογους μεταφορείς που εντοπίστηκαν στα δύο βακτήρια, οι συγγενικά κοντινότεροι των δύο μεταφορέων της *E. coli* υποβλήθηκαν σε λειτουργικό χαρακτηρισμό, μέσω ετερόλογης έκφρασης σε κύτταρα *E. coli* JW2389 (*ΔnupC*).

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν πέντε, υψηλής συγγένειας, μεταφορείς για τη γεμισαβίνη ($K_M < 12.5 \mu\text{M}$ και $> 2.5 \mu\text{M}$). Αυτοί είναι οι KpNupC, KpncCNT και KpNupG από το στέλεχος *K. pneumoniae* ATCC 25955 και οι CfNupC και CfNupG από το *C. freundii* ATCC 8090. Επίσης βρέθηκε ότι οι μεταφορείς αυτοί μπορούν να αναγνωρίσουν τα φυσικά πυριδιμινικά νουκλεοσίδια ουριδίνη και κυτιδίνη. Από τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι τα παραπάνω βακτηριακά στελέχη που συναντώνται συχνά στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (Geller *et al.*, 2017, Nejman *et al.*, 2020) μπορούν να προσλάβουν με υψηλή συγγένεια το ανάλογο dFdC (γεμισαβίνη). Ταυτόχρονα αναδεικνύεται η σημασία μιας νέας οικογένειας μεταφορέων νουκλεοσιδίων που σχετίζεται με τη διαμεμβρανική μεταφορά γεμισαβίνης, της οικογένειας NHS, η οποία βρίσκεται μόνο στα βακτήρια, σε αντίθεση με την οικογένεια CNT η οποία είναι ευρέως διαδεδομένη και περιλαμβάνει μεταφορείς γεμισαβίνης τόσο σε βακτήρια όσο και στον άνθρωπο. Συνολικά, η εργασία αυτή αποτελεί μια αρχική πειραματική βάση, προκειμένου να αναλυθεί περαιτέρω η εμπλοκή συγκεκριμένων βακτηρίων στη διαθεσιμότητα του φαρμάκου εντός των όγκων και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων έναντι της γεμισαβίνης.

Abstract

Gemcitabine (dFdC), a widely used anticancer drug, is considered as a «gold-standard» therapy in treating aggressive pancreatic cancers. Recent research (Geller *et al.*, 2017) has revealed that bacteria colonizing cancer tumors play a role in the development of drug resistance. These bacteria metabolize gemcitabine into its inactive form (dFdU), leading to reduced efficacy. This phenomenon has been associated with specific species of γ -Proteobacteria, particularly *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*, which possess multiple candidate transporters for the uptake of dFdC.

In this thesis, we focus on elucidating the potential gemcitabine transporters of two bacterial species, *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*. Based on NupC and NupG of *Escherichia coli* K-12, which we identified as the main gemcitabine transporters in *E. coli* (Anagnostopoulou, Botou, and Frillingos, unpublished data), we conducted a phylogenetic analysis of the putative nucleoside transporters belonging to the CNT (NupC-like) and NHS (NupG-like) families, across all Proteobacteria. Among the homologous transporters identified in *K. pneumoniae* and *C. freundii*, we focused on the transporters that exhibited close similarity to the *E. coli* homologs. These transporters were further characterized through functional analysis via heterologous expression in *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$).

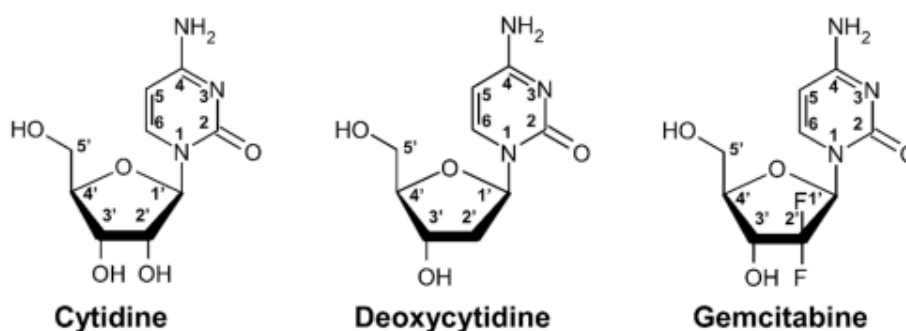
A total of five high-affinity gemcitabine transporters were identified ($K_M < 12.5 \mu\text{M}$ and $> 2.5 \mu\text{M}$), namely KpNupC, KpvcCNT and KpNupG from *K. pneumoniae* strain ATCC 25955 and CfNupC and CfNupG from *C. freundii* strain ATCC 8090. These results reveal that bacterial strains frequently found in pancreatic ductal adenocarcinoma (Geller *et al.*, 2017, Nejman *et al.*, 2020) can effectively transport gemcitabine with high affinity. Additionally, this study highlights the significance of a novel family of nucleoside transporters, the NHS family, which is exclusively found in bacteria, in contrast to the CNT family which is widely distributed and includes gemcitabine transporters in both bacteria and humans. Overall, this work provides an initial experimental basis in order to further analyze the involvement of specific bacteria in drug availability within tumors and in the development of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells.

Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή

1.1 Γεμισταβίνη : ένα ανάλογο της κυτιδίνης με χημειοθεραπευτική δράση

Τα χημικά τροποποιημένα ανάλογα νουκλεοσιδίων πουρινών και πυριμιδινών αντιπροσωπεύουν το 20% των χημειοθεραπευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου. Τα ανάλογα αυτά μιμούνται τα φυσικά δομικά στοιχεία των νουκλεϊκών οξέων, λειτουργώντας έτσι ως αντιμεταβολίτες που παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό των νουκλεοσιδίων/νουκλεοτιδίων και στη σύνθεση του DNA/RNA (Vande Voorde *et al.*, 2014).

Η γεμισταβίνη (dFdC, 2',2'-διφθορο-2'-δεοξυκυτιδίνη, Gemzar) (**Εικόνα 1.1**) είναι ένας αντιμεταβολίτης, ανάλογο του νουκλεοσιδίου της κυτιδίνης, με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα έναντι ενός μεγάλου εύρους όγκων. Ως αντικαρκινικός παράγοντας έχει εγκριθεί και χρησιμοποιείται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, του μαστού, της ουροδόχου κύστης και τον ωθηκών. Στη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος εισήχθη το 1997 από τους Burris *et al.*, και παραμένει μέχρι σήμερα θεραπεία πρώτης γραμμής στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC), το οποίο αντιπροσωπεύει το 90% όλων των παγκρεατικών καρκίνων.



Εικόνα 1.1: Δομή της γεμισταβίνης. Αριστερά και δεξιά απεικονίζονται αντίστοιχα οι χημικοί τύποι της κυτιδίνης και της γεμισταβίνης, ενός ανάλογου του νουκλεοσιδίου της κυτιδίνης. Διακρίνονται οι δύο υποκαταστάτες φθορίου (F) στη θέση 2' του δακτυλίου της ριβόζης στο μόριο της γεμισταβίνης. Στη μέση απεικονίζεται η 2-δεοξυκυτιδίνη την οποία η γεμισταβίνη ανταγωνίζεται για ενσωμάτωση στο DNA. (Saiki *et al.*, 2020)

Παρά την πρόοδο που έχει γίνει στην θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος, η πρόγνωση παραμένει εξαιρετικά δυσσώληνη. Χαρακτηριστικό αυτού είναι τα παρόμοια ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος πεθαίνουν από αυτόν. Μεταξύ των παραγόντων που εμπλέκονται στην κακή

έκβαση της νόσου βρίσκονται η έλλειψη αρχικών συμπτωμάτων, η πρώιμη μετάσταση, η αργοπορημένη διάγνωση και η αδυναμία χειρουργικής εκτομής του όγκου.

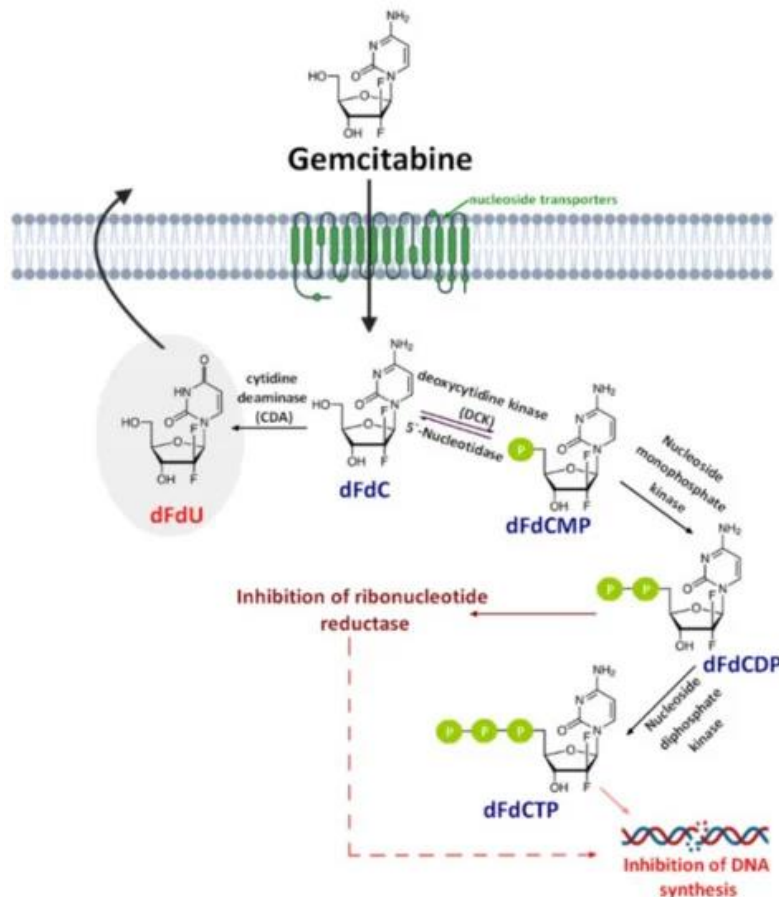
Η τρέχουσα χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση βασίζεται κυρίως στη γεμισταβίνη, είτε ως μονοθεραπεία είτε συνδυαστικά με άλλα φάρμακα όπως η σισπλατίνη και η οξυπλατίνη. Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό απόκρισης ασθενών με PDAC στη γεμισταβίνη είναι χαμηλό (περίπου 30%), με την αντίσταση στη θεραπεία να αποτελεί τον κύριο περιοριστικό παράγοντα του φαρμάκου (Saiki *et al.*, 2020, Koltai *et al.*, 2022).

1.1.1 Ενδοκυτταρική πρόσληψη, μεταβολισμός και μηχανισμός δράσης της Γεμισταβίνης

Η γεμισταβίνη είναι ένα υδρόφιλο μόριο, επομένως η διάχυση μέσω της υδρόφοβης κυτταρικής μεμβράνης είναι αργή και αμελητέα. Για να εισέλθει μέσα στα κύτταρα χρειάζονται εξειδικευμένα πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς, οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων (hNTs). Έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι διαμεμβρανικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων που συμμετέχουν στην πρόσληψη γεμισταβίνης, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των «συγκεντρωτικών» μεταφορέων νουκλεοσιδίων CNT (Concentrative Nucleoside Transporter) και στην οικογένεια των «εξισορροπητικών» μεταφορέων νουκλεοσιδίων ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter). Μεταξύ αυτών, κύριος μεταφορέας γεμισταβίνης θεωρείται ο hENT1 και σε μικρότερο βαθμό οι hENT2, hCNT1 και hCNT3. Μάλιστα τα επίπεδα έκφρασης του hENT1 αποτελούν προγνωστικό δείκτη σε ασθενείς με PDAC που λαμβάνουν γεμισταβίνη ως θεραπεία (Koltai *et al.*, 2022).

Η γεμισταβίνη είναι ένα προφάρμακο το οποίο για να ασκήσει την κυτταροτοξική του δράση, μεταβολίζεται ενδοκυτταρικά στην ενεργή μορφή του, την τριφωσφορική γεμισταβίνη (dFdCTP) (Hawryłkiewicz and Ptaszynska, 2021). Στην **Εικόνα 1.2** απεικονίζεται το μονοπάτι του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού της γεμισταβίνης.

Ο βασικός μηχανισμός δράσης της γεμισταβίνης είναι η αναστολή της σύνθεσης του DNA. Συγκεκριμένα η τριφωσφορική γεμισταβίνη (dFdCTP) ενσωματώνεται στο DNA, παρεμποδίζοντας την δράση της DNA πολυμεράσης. Κατά συνέπεια η αντίδραση πολυμερισμού σταματά και τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση.



Εικόνα 1.2: Δράση της γεμισαβίνης, Γεμισαβίνη: Πρόσληψη, Μεταβολισμός και Μηχανισμός δράσης. Η γεμισαβίνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω μεταφορέων νουκλεοσιδίων (hNTs). Μόλις εισέλθει στο κύτταρο υφίσταται μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων, από την κινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCK), την κινάση των μονοφωσφορικών νουκλεοσιδίων (NMPK) και την κινάση των διφωσφορικών νουκλεοσιδίων (NDPK) και μετατρέπεται κατά σειρά στη μονοφωσφορική γεμισαβίνη (dFdCMP), διφωσφορική γεμισαβίνη (dFdCDP) και την τριφωσφορική γεμισαβίνη (dFdCTP) που είναι ο ενεργός μεταβολίτης. Η dFdCTP δρά ως ανταγωνιστής της τριφωσφορικής δεοξυκυτιδίνης (dCTP), αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA. Η διφωσφορική γεμισαβίνη αναστέλλει την ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση (RNR), «ενισχύοντας» τη δράση της dFdCTP. Η πλειοψηφία της ενδοκυτταρικής γεμισαβίνης (~ 90%) απενεργοποιείται από την απαμινάση της κυτιδίνης (CDA) και μετατρέπεται σε ένα λιγότερο ενεργό μεταβολίτη την 2',2-διφθορο-2-δεοξουριδίνη (dFdU) η οποία απεκκρίνεται από τα κύτταρα μέσω ABC μεταφορέων. (Hawryłkiewicz and Ptaszyńska, 2021)

Ένας πρόσθετος μηχανισμός δράσης της γεμισαβίνης είναι η «αυτο-ενίσχυση» της μέσω αναστολής των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της δεοξυκυτιδίνης, την οποία η γεμισαβίνη ανταγωνίζεται.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση (RNR) η οποία μετατρέπει τα ριβονουκλεοτίδια (NTPs) σε δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Η διφωσφορική μορφή της γεμισαβίνης (dFdCDP) αναστέλλει τη δράση της RNR. Ως εκ τούτου μειώνεται η “δεξαμενή” των

διαθέσιμων νουκλεοσιδίων για τη σύνθεση του DNA, αυξάνοντας τις πιθανότητες που έχει η γεμισαβίνη να ενσωματωθεί στο DNA (de Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014).

1.1.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη θεραπεία με γεμισαβίνη

Ένα από τα βασικά προβλήματα με τη χρήση της γεμισαβίνης, αλλά και εν γένει των αντικαρκινικών φαρμάκων, είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία.

Ένα καινούργιο πεδίο μελέτης στην ανάπτυξη και την θεραπεία του καρκίνου είναι το ανθρώπινο μικροβίωμα. Σήμερα είναι γνωστό ότι κάθε καρκινικός τύπος χαρακτηρίζεται από εξειδικευμένα (tumor-specific) βακτήρια τα οποία εντοπίζονται κυρίως εντός των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Nejman *et al.*, 2020). Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του καρκίνου του παγκρέατος. Σε αντίθεση με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό, ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες, εποικίζει τους παγκρεατικούς όγκους. Η παρουσία τους όχι μόνο προάγει την εμφάνιση και την ανάπτυξη της νόσου, αλλά επηρεάζει την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία (Zhang *et al.*, 2021).

Η βιβλιογραφία συσχετίζει την παρουσία βακτηρίων με επιπλοκές στη δράση φαρμάκων-ανάλογων νουκλεοσιδίων. Ένα παράδειγμα είναι αυτό της brivudine (BRV), ενός ανάλογου νουκλεοσιδίου με αντική δράση, κατά του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Η brivudine βρέθηκε ότι προσλαμβάνεται και μεταβολίζεται από το εντερικό μικροβίωμα, κυρίως βακτήρια του γένους *Bacteroides*, στον ηπατοτοξικό μεταβολίτη bromovinyluracil (BVU) (Zimmermann *et al.*, 2019). Ο βακτηριακός μεταβολισμός έχει επίσης συσχετιστεί με την δράση μιας σειράς αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Τέτοιες περιπτώσεις είναι τα ανάλογα νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων όπως η 5-φθορο-ουρακίλη (5-FU) και 5-φθορο-2'-δεοξυ-ουριδίνη (FUDR), αλλά και άλλα φάρμακα όπως ο αναστολέας τοποϊσομεράσης *Camptothecin* (CPT). Η επίδραση των τριών προαναφερθέντων φαρμάκων στον νηματώδη *C. elegans* τροποποιήθηκε παρουσία βακτηριακών στελεχών *E. coli* και *Comamonas aquatica* (García-González *et al.*, 2017).

Στην περίπτωση του καρκίνου του παγκρέατος, το ενδιαφέρον συγκεντρώνει η γεμισαβίνη, η οποία όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα αποτελεί «χρυσό κανόνα» στην θεραπεία για την αντιμετώπιση του. Μια μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2015 δείχνει ότι η αποτελεσματικότητα της γεμισαβίνης μπορεί να μεταβληθεί από στελέχη *E. coli* που έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινους όγκους (Lehouritis *et al.*, 2015).

Το 2017 οι Geller *et al.* δημοσίευσαν μια μελέτη στην οποία αναφέρουν ότι τα βακτήρια που εντοπίζονται σε αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος (PDACs) μπορούν δυνητικά να τροποποιήσουν την ευαισθησία του όγκου στη γεμισαβίνη, επηρεάζοντας τη συγκέντρωσή της εντός των καρκινικών κυττάρων.

Οι ερευνητές αρχικά αναφέρουν ότι τα βακτήρια μπορούν να αδρανοποιήσουν τη γεμισαβίνη, μεταβολίζοντάς την στην ανενεργό της μορφή 2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη (dFdU). Αυτή η ικανότητα των βακτηρίων συσχετίστηκε με μια ισομορφή του ενζύμου απαμινάση της κυτιδίνης (297 amino acids, long isoform, CDD_L). Η ταυτόχρονη χορήγηση αντιβιοτικού και γεμισαβίνης σε μοντέλο ποντικού με καρκίνο του παχέος εντέρου αποκατέστησε την αποτελεσματικότητα της γεμισαβίνης, ενώ στελέχη *E. coli* ΔCDD_L απέτυχαν να μεταβολίσουν τη γεμισαβίνη, επιβεβαιώνοντας το ρόλο των βακτηρίων και του ενζύμου *in vivo*.

Εν συνεχεία οι ερευνητές εξέτασαν μια σειρά από PDACs, αποδεικνύοντας ότι τα βακτήρια αποτελούν συστατικό του μικροπεριβάλλοντος των όγκων. Συγκεκριμένα, βακτηριακό DNA ανιχνεύθηκε στην πλειοψηφία των όγκων που εξετάστηκαν (76%) σε σύγκριση με τα δείγματα φυσιολογικού παγκρεατικού ιστού (3%). Ακολούθησε χαρακτηρισμός των βακτηριακών ειδών και βρέθηκε ότι η πολυπληθέστερη τάξη (51%) ήταν τα γ-Πρωτεοβακτήρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 98% των βακτηρίων που υπάρχουν στην Εγκυκλοπαίδεια Γονιδίων και Γονιδιωμάτων του Κιότο (KEGG) και εκφράζουν την CDD_L είναι γ-Πρωτεοβακτήρια. Τέλος, αναφέρεται ότι σε *in vitro* πειράματα με ανθρώπινες καρκινικές σειρές ενοφθαλμισμένες με βακτήρια που προήλθαν από ανθρώπινους PDACs, οι 14/15 περιπτώσεις ήταν ανθεκτικές στη γεμισαβίνη.

Τα αποτελέσματα δείχνουν συλλογικά ότι τα βακτήρια αφενός είναι συστατικό του μικροπεριβάλλοντος των παγκρεατικών αδενοκαρκινωμάτων και αφετέρου επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα και κατ' επέκταση την αποτελεσματικότητα της γεμισαβίνης. Στην παρούσα έρευνα τονίζεται η σημασία του ενζύμου απαμινάση της κυτιδίνης, φαίνεται όμως ότι το ένζυμο αυτό δεν είναι ο μοναδικός καθοριστικός παράγοντας στην αδρανοποίηση της γεμισαβίνης. Για την μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων απαιτείται η ενεργός διαμεμβρανική μεταφορά του φαρμάκου στο εσωτερικό του κυττάρου, καθώς η ικανότητα μεταβολισμού της γεμισαβίνης σε κύτταρα *E. coli* K-12 μειώθηκε ύστερα από τη γονιδιακή απαλοιφή του μεταφορέα νουκλεοσιδίων NupC (Geller *et al.*, 2017).

Παραπάνω αναφέρθηκε πως η ταυτόχρονη χορήγηση γεμισαβίνης και αντιβιοτικών αποκατέστησε την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στα μοντέλα ποντικών. Ωστόσο η θεραπεία ασθενών με αντιβιοτικά και γεμισαβίνη δεν είναι μια απλή προσέγγιση, ακόμη και αν διαπιστωθεί πως ο μεταβολισμός του φαρμάκου από τα βακτήρια είναι κλινικής σημασίας,

καθώς ενέχονται κίνδυνοι όπως η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Geller and Strausman, 2018)

Μια εναλλακτική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η μελέτη και κατ' επέκταση η στόχευση των διαμεμβρανικών μεταφορέων που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη της γεμισιταβίνης. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει μεταφορείς νουκλεοσιδίων των οικογενειών CNT (SLC28), ENT (SLC29) και κάποια μέλη της οικογένειας μεταφορέων οργανικών ιόντων SLC22 (Organo Anion Transporters, OATs, Organo Cation Transporters, OCTs) (Pastor-Anglada and Pérez-Torras, 2015). Ορισμένοι από αυτούς τους μεταφορείς, όπως οι μεταφορείς της γεμισιταβίνης, έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί ως προς τη λειτουργία και την εξειδίκευσή τους,

Αντίθετα, οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς των βακτηρίων που θα μπορούσε να είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη γεμισιταβίνης δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα, με αποτέλεσμα ελάχιστα να είναι γνωστά για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας τους. Το γεγονός αυτό σχετίζεται καταρχάς με τις τεχνικές δυσκολίες μελέτης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς καθώς είναι δυναμικές πρωτεΐνες, άρρηκτα συνδεδεμένες με τη μεμβράνη (César-Razquin *et al.*, 2015). Επίσης οι βακτηριακοί μεταφορείς νουκλεοσιδίων κατηγοριοποιούνται σε δύο οικογένειες, την CNT (Concentrative Nucleoside Transporter) και την NHS (Nucleoside Proton Symporter), και οι περισσότεροι μεταφορείς εξ αυτών δεν έχουν ομόλογα στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Κατά συνέπεια, δεν έχουν συγκεντρώσει ενδιαφέρον ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι και ελάχιστα είναι γνωστά για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας τους.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μελέτη της πρόσληψης γεμισιταβίνης, καθώς και άλλων φαρμάκων-ανάλογων νουκλεοσιδίων, από τα βακτήρια του μικροβιώματος που φαίνεται ότι ανταγωνίζονται τους ανθρώπινους μεταφορείς, μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση του μικροβιώματος με τον όγκο αλλά και να επηρεάσει δυνητικά την έκβαση και την επιτυχία της θεραπείας.

1.2 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων/ανάλογων νουκλεοσιδίων στον άνθρωπο

Η γεμισταβίνη είναι ένας αντιμεταβολίτης, ανάλογο του νουκλεοσιδίου της κυτιδίνης. Εφόσον η δραστικότητα της εξαρτάται από την είσοδό της στις ενδοκυτταρικές μεταβολικές οδούς, άρα η διέλευση μέσω της μεμβράνης έχει πολύ μεγάλη σημασία για την μετέπειτα λειτουργία της. Τα νουκλεοσίδια και τα ανάλογά τους είναι υδρόφιλα μόρια για τα οποία οι κυτταρικές μεμβράνες εμφανίζουν χαμηλή ή αμελητέα διαπερατότητα. Για να διευκολυνθεί η πρόσληψη τους, εξειδικευμένα πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς (nucleoside transporters, NTs) διαμεσολαμβάνουν στη μετατόπισή τους από το εξωτερικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα (Pastor-Anglada and Casado, 2006, Joung *et al.*, 2013, Boswell-Casteel and Hays, 2017).

Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί μεταφοράς νουκλεοσιδίων στα κύτταρα, η διευκολυνόμενη μεταφορά, η οποία οδηγεί σε εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του νουκλεοσιδίου μέσα και έξω από το κύτταρο (equilibrative), και η ενεργός μεταφορά, εξαρτώμενη από διαβάθμιση ιόντων, η οποία οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση του νουκλεοσιδίου μέσα στο κύτταρο σε σχέση με το εξωτερικό του κυττάρου (concentrative). Στον πρώτο μηχανισμό η κινητήριος δύναμη για τη μεταφορά είναι η βαθμίδωση συγκέντρωσης του υποστρώματος εκατέρωθεν της μεμβράνης, ενώ στο δεύτερο μηχανισμό κινητήριος δύναμη είναι η ηλεκτροχημική βαθμίδωση ιόντων (συνήθως ιόντων νατρίου ή πρωτονίων), ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του νουκλεοσιδίου μέσα και έξω από το κύτταρο (Pastor-Anglada and Casado, 2006).

Οι δύο παραπάνω κύριοι μηχανισμοί είναι αποτέλεσμα της έκφρασης δύο οικογενειών γονιδίων, των SLC28 και SLC29 αντίστοιχα. Η οικογένεια SLC28 κωδικοποιεί για τους «συγκεντρωτικούς» μεταφορείς νουκλεοσιδίων (CNTs, Concentrative Nucleoside Transporter, TC #2.A.41) και η οικογένεια SLC29 κωδικοποιεί για τους «εξισορροπητικούς» μεταφορείς νουκλεοσιδίων (ENTs, Equilibrative Nucleoside Transporter, TC #2.A.57) (Govindarajan *et al.*, 2022, Pastor-Anglada and Casado, 2006). Και οι δύο οικογένειες είναι εξελικτικά παλιές. Οι CNT μεταφορείς εντοπίζονται σε ένα ευρύ φάσμα προκαρυωτών και ευκαρυωτών αλλά όχι σε φυτά ενώ η οικογένεια ENT κατανέμεται ευρέως σε ευκαρυώτες (Govindarajan *et al.*, 2022, Joung *et al.*, 2013, Ho and Wang, 2014).

1.2.1 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας SLC28 (CNTs)

Τα μέλη της οικογένειας των συγκεντρωτικών μεταφορέων CNT έχουν εντοπιστεί σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μύκητες (Loewen *et al.*, 2003), νηματώδεις σκώληκες (Xiao *et al.*, 2001) και θηλαστικά (Ho and Wang, 2014), αλλά όχι σε φυτά (Young *et al.*, 2013).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν τρία γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια SLC28 (*SLC28A1*, *SLC28A2*, *SLC28A3*), τα οποία κωδικοποιούν για τρεις CNT μεταφορείς (CNT1-3 αντίστοιχα). Ορθόλογοι μεταφορείς άλλων ειδών (π.χ. αρουραίος, ποντικός, κουνέλι) έχουν επίσης κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί (Kong *et al.*, 2004, Young *et al.*, 2013., Wang *et al.*, 1997).

Και οι τρεις hCNTs είναι δευτερογενείς ενεργητικοί μεταφορείς και συγκεκριμένα συμμεταφορείς εξαρτώμενοι από ιόντα Na^+ . Ο μεταφορέας CNT3 είναι ο μοναδικός που μπορεί να καταλύσει και H^+ -συζευγμένη μεταφορά όμως με διαφορετική εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματά του (για παράδειγμα, η zidovudine (AZT, azidothymidine) είναι υπόστρωμα που μεταφέρεται μόνο σε σύζευξη με ιόντα Na^+ ενώ δεν μπορεί να μεταφερθεί από τον hCNT3 σε σύζευξη με H^+). Μάλιστα έχει βρεθεί ότι στις όξινες συνθήκες που εντοπίζονται είτε φυσιολογικά όπως στην περίπτωση του νεφρικού και εντερικού επιθηλίου, είτε παθολογικά όπως στο υποξικό μικροπεριβάλλον των όγκων, η μεταφορά μέσω του hCNT3 μπορεί να ενεργοποιηθεί τόσο από ιόντα Na^+ όσο και από H^+ (Young *et al.*, 2013, Govindarajan *et al.*, 2022).

Τοπολογικά, σε κυτταρικό επίπεδο, οι μεταφορείς CNT εκφράζονται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επίσης εντοπίζονται σε αφθονία στην κορυφαία περιοχή (apical membrane) διαφόρων τύπων επιθηλιακών κυττάρων, ενώ διαφέρουν όσον αφορά την κατανομή τους στους διάφορους τύπους ιστών.

Οι CNTs μεταφέρουν ειδικά τα νουκλεοσίδια και τα δομικά ανάλογά τους. Η ουριδίνη και η αδενοσίνη είναι κοινά υποστρώματα και των τριών hCNTs, οι οποίοι όμως δείχνουν διαφορετική εξειδίκευση όσον αφορά τα υπόλοιπα υποστρώματά τους. Ο CNT1 είναι εκλεκτικός για τα νουκλεοσίδια πυριμιδινών, ο CNT2 είναι εκλεκτικός για τα νουκλεοσίδια πουρινών και ο CNT3 μεταφέρει νουκλεοσίδια τόσο πουρινών όσο και πυριμιδινών. Κατά κανόνα οι CNTs δεν μεταφέρουν νουκλεοτιδία και νουκλεοτιδικές βάσεις, όμως αρκετές έρευνες (π.χ. Peng *et al.*, 2008, Gloeckner-Hofmann *et al.*, 2006) έχουν συσχετίσει τη μειωμένη έκφραση του CNT3 με ανθεκτικότητα σε ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα (π.χ. 5-φθοροουρακίλη, 6-μερκαπτοπουρίνη και 6-θειογουανίνη) (Ho and Wang, 2014, Young *et al.*, 2013, Govindarajan *et al.*, 2022).

1.2.2 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας SLC29 (ENTs)

Οι μεταφορείς της οικογένειας ENT περιορίζονται στους ευκαρυώτες όπου είναι ευρέως καταναμημένοι. Μέλη της οικογένειας που έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά ανήκουν σε μύκητες, φυτά, πρωτόζωα, έντομα, νηματώδεις και θηλαστικά.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει τέσσερα γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια SLC29 (*SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* και *SLC29A4*) και τα οποία κωδικοποιούν για τέσσερις ENT μεταφορείς (hENT1-4 αντίστοιχα) (Joung *et al.*, 2013).

Οι ENTs, σε αντίθεση με τους CNTs, είναι μονομεταφορείς, οι οποίοι κατά βάση δεν απαιτούν ενέργεια (είτε ATP, είτε διαβάθμιση ιόντων). Μεσολαβούν στη διευκολυνόμενη διάχυση των υποστρωμάτων τους και προς τις δύο πλευρές της μεμβράνης, σύμφωνα με τη βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους. Παρά το γεγονός ότι η παθητική μεταφορά είναι χαρακτηριστική της οικογένειας ENT, υπάρχουν εξαιρέσεις. Πρώτον, έχει βρεθεί ότι η μεταφορά μέσω των ανθρώπινων ENT3 και ENT4 αυξάνεται σημαντικά σε περιβάλλοντα με όξινο pH (π.χ. λυσοσώματα). Δεύτερον έχουν βρεθεί ομόλογοι μεταφορείς του ENT3 σε πρωτόζωα, οι οποίοι καταλύουν τη μεταφορά των υποστρωμάτων τους συζευγμένη με H⁺. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι και η μεταφορά μέσω του hENT3 μπορεί επίσης να είναι συζευγμένη με H⁺ (Stein *et al.*, 2003, Ho and Wang, 2014, Boswell-Casteel and Hays, 2017).

Οι ENTs μεταφέρουν νουκλεοσίδια και νουκλεοτιδικές βάσεις διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Παρόντες στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και ιστούς, οι hENT1 και hENT2 μεταφέρουν ένα εύρος νουκλεοσιδίων πουρινών και πυριμιδινών, με χαμηλότερες σταθερές συγγένειας (K_M) σε σχέση με τους CNTs. Λειτουργικά οι hENT1 και hENT2 μπορούν να διακριθούν με βάση την υψηλότερη ευαισθησία του hENT1 στην αναστολή από NBMPR (αναστολή σε συγκεντρώσεις nM έναντι mM για τον hENT2). Επίσης ο hENT2, και σε μικρότερο βαθμό ο hENT1, μεταφέρει με χαμηλή συγγένεια νουκλεοτιδικές βάσεις όπως υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη, ουρακίλη και θυμίνη (Govindarajan *et al.*, 2022, Boswell-Casteel and Hays, 2017).

Ο ENT3 σε αντίθεση με τους ENT1 και ENT2, που εντοπίζονται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, φέρει στο αμινοτελικό του άκρο μια αλληλουχία μήκους 51 αμινοξέων. Στην αλληλουχία αυτή υπάρχει ένα μοτίβο με δύο λευκίνες που οδηγεί σε ενδοκυτταρική στόχευση στα λυσοσώματα, τα ενδοσώματα και πιθανώς στα μιτοχόνδια. Αποκοπή της αμινοτελικής περιοχής ή μεταλλαξιγένεση των λευκινών σε αλανίνη είχε σαν αποτέλεσμα την

έκφραση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη. Λειτουργικά ο hENT3 μεταφέρει ένα εύρος νουκλεοσιδίων πουρινών, πυριμιδινών και θεραπευτικών ανάλογων, με σχετικά χαμηλή συγγένεια. Επίσης ενώ οι ENTs γενικά δεν μεταφέρουν νουκλεοτίδια, έρευνες (π.χ. Govindarajan *et al.*, 2009) αναφέρουν ότι ο ENT3 μπορεί να μεταφέρει τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) ή άλλες θεραπευτικές ενώσεις που φέρουν τριφωσφορικές τροποποιήσεις (π.χ. τριφωσφορική ριμπαβιρίνη (RTP)) (Baldwin *et al.*, 2005, Govindarajan *et al.*, 2022).

Η γενεαλογική γραμμή (lineage) του ENT4 αποκλίνει από αυτές των ENT1-3. Ο ENT4 ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά από την αλληλούχιση του γονιδιώματος και όχι ως ένας λειτουργικά χαρακτηρισμένος μεταφορέας. Είναι ο μοναδικός μεταξύ των οικογενειών CNT και ENT που δεν μεταφέρει ουριδίνη και εκτός από την αδενοσίνη ($K_M = 413\mu\text{M}$) δεν αλληλεπιδρά σημαντικά με άλλα νουκλεοσίδια, νουκλεοτίδια ή νουκλεοτιδικές βάσεις. Για την ακρίβεια ο ENT4 είναι κυρίως γνωστός ως μονομεταφορέας αμινών της πλασματικής μεμβράνης (PMAT) εξαιτίας της ικανότητάς του να μεταφέρει οργανικά κατιόντα. Σε αντίθεση με τους ENT1-3, η μεταφορά μέσω του PMAT/ENT4 είναι ευαίσθητη σε αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης και το εξωκυτταρικό pH και ως εκ τούτου, ο ENT4 χαρακτηρίζεται ως ένας ηλεκτρογενής μεταφορέας (electrogenic transporter) που χρησιμοποιεί το ενδοκυτταρικά αρνητικό μεμβρανικό δυναμικό ως κινητήριο δύναμη για τη μετατόπιση των υποστρωμάτων του. Τοπολογικά ο ENT4 εντοπίζεται ως επί το πλείστον στον εγκέφαλο και την καρδιά όπου μεταφέρει αδενοσίνη και μονοαμίνες. (Baldwin *et al.*, 2005 Govindarajan *et al.*, 2022, Boswell-Casteel and Hays, 2017).

1.3 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων/ανάλογων νουκλεοσιδίων στα βακτήρια

Τα συστήματα μεταφοράς νουκλεοσιδίων που επιτρέπουν στα βακτήρια να συλλέγουν νουκλεοσίδια από το περιβάλλον τους είναι ευρέως διαδεδομένα (Kirchman *et al.* 1982, Neuhard and Nygaard 1987). Αυτά τα συστήματα μεταφοράς τροφοδοτούν με νουκλεοσίδια τη σύνθεση νουκλεοτιδίων και δεοξυνουκλεοτιδίων μέσω των οδών περίσωσης. (Munch-Petersen and Mygind 1976). Εκτός όμως από αυτές τις φυσιολογικές διεργασίες, οι βακτηριακοί μεταφορείς νουκλεοσιδίων αποτελούν την οδό με την οποία διάφορα κυτταροτοξικά ανάλογα νουκλεοσιδίων εισέρχονται στα κύτταρα. Αυτές οι ενώσεις αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος λόγω της αντιμικροβιακής, αντικρκινικής και αντικαρκινικής τους δράσης, αφού παρεμβάλλονται στο μεταβολισμό των νουκλεοσιδίων και κατ' επέκταση στον κύκλο ζωής των κυττάρων. Ένα παράδειγμα είναι η χρήση της ζιδοβουλίνης ή αζιδοθυμιδίνης (3'-azido-3'-

deoxythymidine, AZT), ενός αντικοκού παράγοντα ο οποίος χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της λοίμωξης από τον ιό HIV και ταυτόχρονα ασκεί αντιβακτηριδιακή δράση έναντι δευτερογενών μολύνσεων από βακτηριακά παθογόνα όπως τα *E. coli* και *Salmonella typhimurium*, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Xie *et al.*, 2004).

Η εξωτερική μεμβράνη στην *E. coli* και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια εμπεριέχει μια ειδική για τα νουκλεοσίδια πορίνη, την Tsx, που διευκολύνει την είσοδο νουκλεοσιδίων στον περιπλασματικό χώρο (Ye and van den Berg, 2004). Η είσοδος μέσω της εσωτερικής μεμβράνης πραγματοποιείται από εξειδικευμένα πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς.

Μελέτες στην *E. coli* κατέδειξαν την παρουσία δύο διαφορετικών συστημάτων μεταφοράς νουκλεοσιδίων. Το ένα εξ αυτών (*gru/nupG*) μεταφέρει νουκλεοσίδια πουρινών και πυριμιδινών αλλά δεν αναστέλλεται από το αντιβιοτικό showdomycin (C-νουκλεοσιδικό ανάλογο της ουριδίνης που προέρχεται από το βακτήριο *Streptomyces showdoensis*) ενώ το άλλο σύστημα (*cru/NupC*) μεταφέρει νουκλεοσίδια πυριμιδινών και αδενοσίνη και αναστέλλεται από showdomycin (Munch-Petersen and Mygind, 1976; Munch-Petersen *et al.*, 1979).

Σήμερα είναι γνωστό ότι οι μεταφορείς NupC και NupG είναι μέλη δύο διαφορετικών οικογενειών μεταφορέων νουκλεοσιδίων. Συγκεκριμένα ο NupC ανήκει στην οικογένεια CNT, τα ανθρώπινα ομόλογα της οποίας έχουν περιγραφεί αναλυτικά παραπάνω. Αντίστοιχα, ο μεταφορέας NupG ανήκει στην οικογένεια NHS (Nucleoside:H⁺ Symporter, TC #2.A.1.10), η οποία με τη σειρά της ανήκει στην Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily, MFS) (TC #2.A.1). Η MFS είναι η μεγαλύτερη οικογένεια δευτερογενών ενεργητικών μεταφορέων. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της Διεθνούς Επιτροπής για τους Μεταφορείς (Transport Commission database, TCDB), οι μεταφορείς MFS, ανάλογα με την εξέλιξη και τη λειτουργία τους, ταξινομούνται σε 16 οικογένειες και 89 υποοικογένειες και συμπεριλαμβάνουν μεταφορείς για ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως ανόργανα και οργανικά ιόντα, νουκλεοσίδια, σάκχαρα, αμινοξέα, πεπτίδια και λιπίδια (Drew *et al.*, 2021, Yan and Leung, 2015, Vaziri *et al.*, 2013).

1.3.1 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας NHS

Οι μεταφορείς της οικογένειας NHS είναι δευτερογενείς ενεργητικοί μεταφορείς και συγκεκριμένα H⁺ εξαρτώμενοι συμμεταφορείς, οι οποίοι εντοπίζονται σε ένα εύρος βακτηρίων. Ομόλογα του NupG της *E. coli* έχουν εντοπιστεί σε παθογόνα του ανθρώπινου εντέρου (*Salmonella typhimurium*), σε βακτήρια που σχετίζονται με την περιοδοντική νόσο

(*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*) και σε φυτοπαθογόνα του γένους *Erwinia* (Vaziri *et al.*, 2013)

Στην *E. coli* υπάρχουν τρεις μεταφορείς νουκλεοσιδίων που ανήκουν στην οικογένεια NHS, οι NupG, XapB και YegT. Από τους μεταφορείς αυτούς, μέχρι στιγμής, λειτουργικά έχει μελετηθεί ο NupG, για τον οποίο η βιβλιογραφία αναφέρει ως υποστρώματα νουκλεοσίδια τόσο πουρινών όσο και πυριμιδινών. (Wang *et al.*, 2021).

Ο XapB έχει 58% ταυτότητα και 76% ομοιότητα αλληλουχίας με τον NupG και έχει ταυτοποιηθεί ως ένας ειδικός, για την ξανθοσίνη, μεταφορέας. Για την ακρίβεια, το γονίδιο *xapB* που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα, αναγνωρίστηκε ως μέλος ενός οπερονίου καταβολισμού της ξανθοσίνης, στην *E. coli*. Το δεύτερο γονίδιο του οπερονίου είναι το *xapA* που κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφορυλάση της ξανθοσίνης. Βρέθηκε ότι η ανάπτυξη παρουσία ξανθοσίνης μειώνεται σημαντικά όταν υπάρχουν μεταλλάγματα του *xapB* και επίσης αποδείχθηκε ότι ο XapB κλασματοποιείται με την κυτταρική μεμβράνη. Ο XapB μοιράζεται μεγάλη ταυτότητα και ομοιότητα αλληλουχίας με τον μεταφορέα NupG. Ως εκ τούτου ο XapB θεωρήθηκε ένας πιθανός συμμεταφορέας ξανθοσίνης πρωτονίων (Seeger *et al.*, 1995).

Όσον αφορά τον τρίτο μεταφορέα, τον YegT, δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί λειτουργικά.

1.3.2 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας CNT

Οι βακτηριακοί μεταφορείς της οικογένειας CNT είναι δευτερογενείς ενεργητικοί μεταφορείς, αλλά σε αντίθεση με τα ανθρώπινα ομόλογα τους, είναι H⁺ εξαρτώμενοι.

Στην *E. coli* υπάρχουν τρεις μεταφορείς νουκλεοσιδίων που ανήκουν στην οικογένεια CNT, οι NupC, NupX και YeiM. Από αυτούς τους μεταφορείς, λειτουργικά έχει μελετηθεί ο NupC, ο οποίος θεωρείται μεταφορέας νουκλεοσιδίων πυριμιδινών, αδενοσίνης και ινοσίνης με μεγαλύτερες σταθερές συγγένειας (μικρότερες K_M), σε σχέση με τους ομόλογους μεταφορείς στον άνθρωπο (Loewen *et al.*, 2004).

Ο μεταφορέας YeiM (ή PsuT) θεωρείται πιθανός μεταφορέας ψευδουριδίνης καθώς το γονίδιο *yeiM* (*psuT*) ανήκει στο ίδιο οπερόνιο με τα γονίδια *psuG* και *psuK* που κωδικοποιούν για τη γλυκοσιδάση της 5' φωσφορικής ψευδουριδίνης και την κινάση της ψευδουριδίνης, αντίστοιχα. Η ψευδουριδίνη, ενώ αποβάλλεται από τα ανθρώπινα κύτταρα ως προϊόν αποικοδόμησης του RNA, χρησιμοποιείται από την *E. coli* για τη σύνθεση πυριμιδινών, καθώς η κινάση της ψευδουριδίνης και η γλυκοσιδάση της 5' φωσφορικής ψευδουριδίνης τη μετατρέπουν σε 1-

φωσφορική ριβόζη και ουρακίλη. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ψευδουρίνης (Preumont *et al.*, 2008).

Ο μεταφορέας NurX δεν έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά μέχρι στιγμής.

1.4 Δομικά πρότυπα των μεταφορέων νουκλεοσιδίων

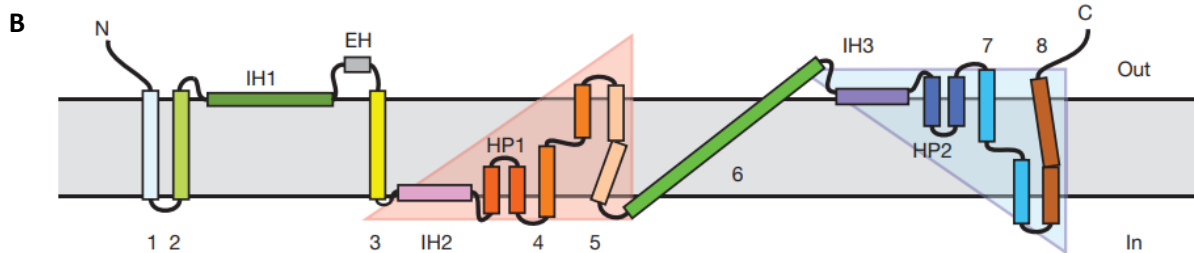
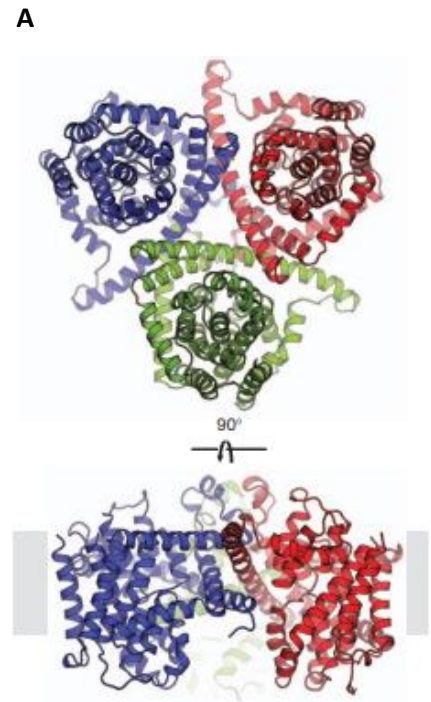
Ανεξάρτητα από την εξελικτική ή λειτουργική ταξινόμησή τους, αρκετοί μεταφορείς μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά και με βάση αυτά εμπίπτουν σε κοινά δομικά πρότυπα. Οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων και ανάλογων νουκλεοσιδίων είναι δευτερογενείς ενεργητικοί μεταφορείς. Η πλειοψηφία των κρυσταλλογραφικών δομών των δευτερογενών ενεργητικών μεταφορέων εμπίπτει σε τρία δομικά-μηχανιστικά πρότυπα (Roberts, 2021, Drew and Boudker, 2016)). Αυτά είναι το μοτίβο N₆-C₆ της οικογένειας MFS (Major Facilitator Superfamily), ο τύπος των δύο δομικά ανεστραμμένων επαναλήψεων 5+5 TMs του βακτηριακού ομόλογου συμμεταφορέα αμινοξέων/Na⁺ LeuT της οικογένειας NSS (Neurotransmitter Sodium Symporter) και διάφοροι άλλοι τύποι ανεστραμμένων επαναλήψεων, όπως αυτός του αντιμεταφορέα Na⁺/H⁺ NhaA της *E. coli*, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με το μηχανιστικό πρότυπο του «ανεγκυστήρα» (βλέπε παρακάτω, 1.5. Μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης).

Οι μεταφορείς της οικογένειας ENT (SLC29) και οι βακτηριακοί NHS μεταφορείς ομαδοποιούνται στο ίδιο δομικό πρότυπο, αυτό της οικογένειας MFS, ενώ οι μεταφορείς της οικογένειας CNT (SLC28) ανήκουν σε ένα διαφορετικό πρότυπο που περιγράφεται από ένα βακτηριακό ομόλογο μεταφορέα νουκλεοσιδίων, τον vcCNT (Roberts, 2021, Shi, 2013).

1.4.1 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια CNT

Οι πρώτες πληροφορίες για τη δομή και το μηχανισμό μεταφοράς στην οικογένεια CNT προήλθαν από την κρυσταλλική δομή του vcCNT, ενός μεταφορέα από το βακτήριο *Vibrio cholerae* (Johnson *et al.*, 2012). Ο μεταφορέας vcCNT κρυσταλλώθηκε σε μια «κλειστή-προς-το-εσωτερικό» διαμόρφωση, σε σύμπλοκο με την ουριδίνη και ευκρίνεια 2.4 Å. Για την μεταφορά των υποστρωμάτων του χρησιμοποιεί διαβάθμιση ιόντων Na⁺, όπως οι ανθρώπινοι μεταφορείς.

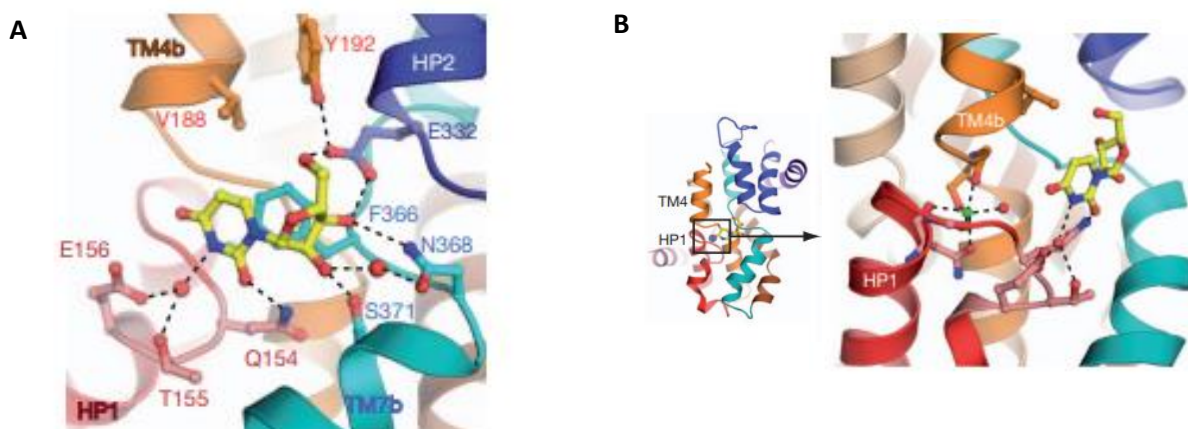
Ο μεταφορέας απομονώθηκε κρυσταλλογραφικά ως ένα ομοτριμερές, με σχήμα τριγωνικής λεκάνης, ανοιχτής προς την ενδοκυτταρική πλευρά (Εικόνα 1.3A). Κάθε μονομερές χωρίζεται σε δύο επιμέρους δομικές περιοχές (domains), ανάλογα με τη θέση τους σε σχέση με το κέντρο του μονομερούς (Εικόνα 1.3B). Η πρώτη δομική περιοχή τοποθετείται στο εξωτερικό του μονομερούς και δημιουργεί ένα ικρίωμα (scaffold domain) συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στη δημιουργία και τη σταθερότητα της δομής του μεταφορέα. Η δεύτερη δομική περιοχή εντοπίζεται στο εσωτερικό του μονομερούς, φέρει το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος και του ιόντος και ονομάζεται περιοχή «πυρήνα» ή περιοχή μεταφοράς (transport domain).



Εικόνα 1.3: Δομικό μοτίβο του vCNT. Βασισμένο στη δομή του μεταφορέα vCNT (PDB code : 3TIJ) A. Σχηματική αναπαράσταση του ομοτριμερούς όπως φαίνεται από το κυτταρόπλασμα (πάνω) και παράλληλα στη μεμβράνη (κάτω). Η μεμβρανική διπλοστιβάδα απεικονίζεται με γκρι χρώμα. Τα διαφορετικά μονομερή απεικονίζονται με μπλε, κόκκινο και πράσινο χρώμα. B. Τοπολογικό διάγραμμα ενός μονομερούς στο μεταφορέα vCNT. Κάθε μονομερές αποτελείται από οκτώ διαμεμβρανικές έλικες (TM1- TM8), δύο ελικοειδείς φουρκέτες επανεισόδου (HP1 & HP2) και τρεις διεπιφανειακές έλικες (IH1- IH3) που εκτείνονται παράλληλα στη μεμβράνη. Απεικονίζονται το transport domain (δομικές ομάδες σε ροζ και κυανό φόντο, που εμφανίζουν 2-fold ψευδοσυμμετρία μεταξύ τους) και το scaffold domain που αποτελείται από τις TM1 TM2, TM3, TM6, τη διεπιφανειακή έλικα IH1 και μια μικρή εξωκυτταρική έλικα EH.

Έχουν ταυτοποιηθεί τα κατάλοιπα από τις φουρκέτες HP1 και HP2 καθώς και από τις περιοχές ελεύθερης διαμόρφωσης των TM4 και TM7 που εμπλέκονται στη δέσμευση της ουριδίνης (Εικόνα 1.4A). Επίσης έχει εντοπιστεί το κέντρο δέσμευσης του Na^+ (Εικόνα 1.4B), το οποίο

τοποθετείται μεταξύ των περιοχών HP1 και TM4 συνδέοντας μεταξύ τους αυτές τις δύο περιοχές αλληλουχίας, ολοκληρώνοντας έτσι το σχηματισμό του κέντρου δέσμευσης του νουκλεοσιδίου (Johnson *et al.*, 2012, 2014).

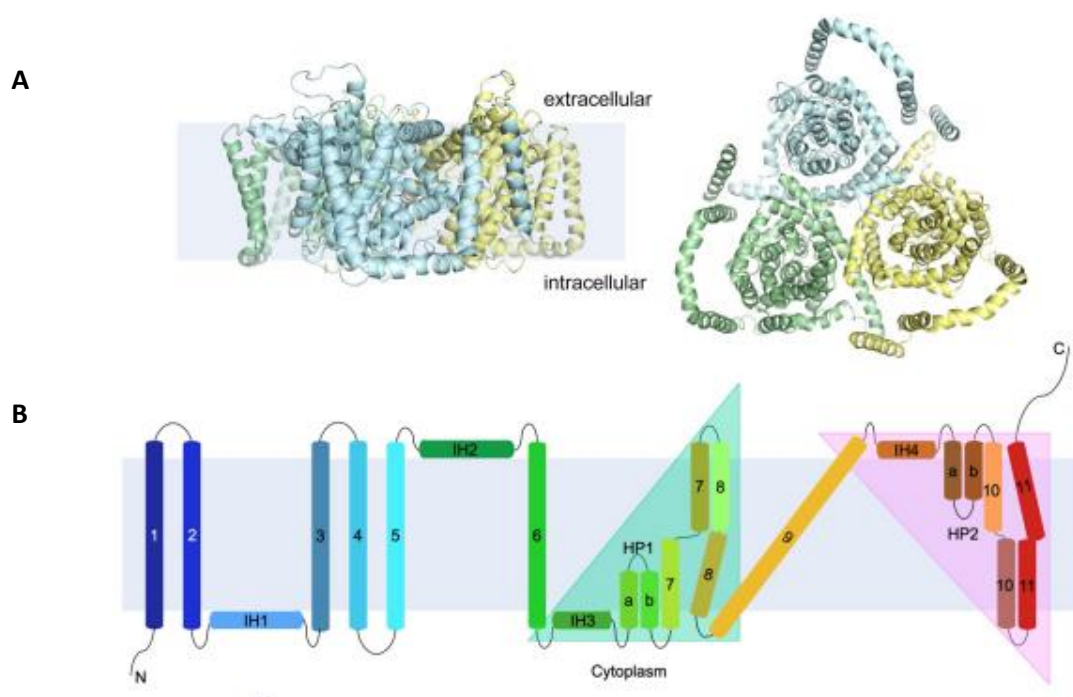


Εικόνα 4: Δομικό μοτίβο στο κέντρο δέσμευσης του vcCNT. Α. Το κέντρο δέσμευσης ουριδίνης. Απεικονίζονται οι φουρκέτες HP1 (κόκκινο) και HP2 (μπλε) και οι διαμεμβρανικές έλικες TM4b (πορτοκαλί) και TM7b (κυανό). Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές. Τα κατάλοιπα Gln154, Thr155, Glu156 και Val188 αλληλεπιδρούν με την αζωτούχο βάση της ουριδίνης (ουρακίλη) ενώ τα κατάλοιπα Glu332, Asn368 και Ser371 αλληλεπιδρούν με τη ριβόζη της ουριδίνης. Επιπλέον τονίζεται ο ρόλος του Phe366 που φαίνεται να προσανατολίζει το υπόστρωμα στο κέντρο δέσμευσης, λειτουργώντας ως ένα φίλτρο επιλεκτικότητας. Β. Το κέντρο δέσμευσης του Na⁺ τοποθετείται ανάμεσα στη φουρκέτα HP1 και την ασυνεχή διαμεμβρανική έλικα TM4 (αριστερά) και βρίσκεται πολύ κοντά στο κέντρο δέσμευσης της ουριδίνης (δεξιά). Η εικόνα προέρχεται από το άρθρο Johnson *et al.*, 2012.

Ο μεταφορέας vcCNT, λόγω υψηλής ταυτότητας αλληλουχίας (36-39%) με τους ανθρώπινους μεταφορείς της οικογένειας (hCNTs), αποτελεί ένα άριστο σύστημα για τη μελέτη τους. Η δημοσίευση της κρυσταλλικής δομής του vcCNT άνοιξε το δρόμο, μεταξύ άλλων, για την κατανόηση του μηχανισμού αναγνώρισης και μεταφοράς από τους hCNTs μιας σειράς φαρμάκων-anáλογων νουκλεοσιδίων όπως η γεμισιταβίνη. Συγκεκριμένα, οι Johnson *et al.* (2014) χρησιμοποίησαν τις πληροφορίες που προέκυψαν από τη δομή του vcCNT ώστε να τροποποιήσουν χημικά τη γεμισιταβίνη με σκοπό να βελτιώσουν την συγγένειά της για τον vcCNT. Ως συνέπεια αυτού προέκυψε ένα χημικά τροποποιημένο φάρμακο, η πυρρολο-γεμισιταβίνη (pyrrolo-gemcitabine), το οποίο αναγνωρίζει με υψηλότερη συγγένεια τον vcCNT (μικρότερη τιμή K_M). Συγχρόνως βρέθηκε ότι το φάρμακο αναγνωρίζει ειδικά (subtype-specific) τον μεταφορέα hCNT1 και όχι τις ισομορφές hCNT2, hCNT3. (Johnson *et al.*, 2014).

Μεταγενέστερα, το 2020, δημοσιεύθηκε η πρώτη δομή ενός ανθρώπινου μεταφορέα CNT. Συγκεκριμένα, μέσω κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) προσδιορίστηκε η δομή μιας ισομορφής του hCNT3, της CNT3ins, σε ευκρίνεια 3.6 Å και «ανοιχτή-προς-τα-μέσα» διαμόρφωση. Η CNT3ins εντοπίζεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου όπου εμπλέκεται στη μεταφορά νουκλεοσιδίων. Σε αντίθεση με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη hCNT3, η CNT3ins δεν διαθέτει ένα τμήμα μήκους 69 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο, το οποίο προορίζεται για στόχευση της πρωτεΐνης στη πλασματική μεμβράνη.

Δομικά προέκυψε ότι η CNT3ins έχει επίσης τριμερή οργάνωση (**Εικόνα 5A**). Σε αντίθεση όμως με τα βακτηριακά ομόλογα της, έχει τρεις επιπλέον αμινοτελικές διαμεμβρανικές έλικες (TM1-TM3), υψηλά συντηρημένες μεταξύ των hCNTs (**Εικόνα 5B**). Οι έλικες αυτές δεν είναι απαραίτητες για την πλήρη ενεργότητα μεταφοράς, αλλά είναι σημαντικές για την έκφραση και στόχευση των hCNTs στη μεμβράνη (Zhou *et al.*, 2020).

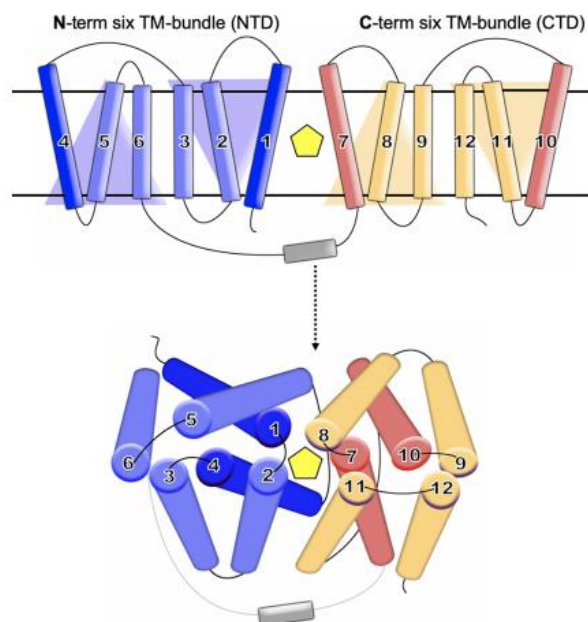


Εικόνα 5: Δομικό μοτίβο του hCNT3. Η δομή της πρωτεΐνης CNT3ins (PDB code : 6KSW) A. Σχηματική αναπαράσταση της τριμερούς διαμόρφωσης παράλληλα με την μεμβράνη (αριστερά) και όπως φαίνεται από το κυτταρόπλασμα (δεξιά). Τα διαφορετικά μονομερή απεικονίζονται με κυανό, πράσινο και κίτρινο χρώμα. B. Τοπολογικό διάγραμμα ενός μονομερούς. Οι δομικά αναστραμμένες επαναλήψεις της περιοχής του «πυρήνα» (core domain) απεικονίζονται σε ροζ και κυανό φόντο (Zhou *et al.*, 2020).

1.4.2 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια NHS

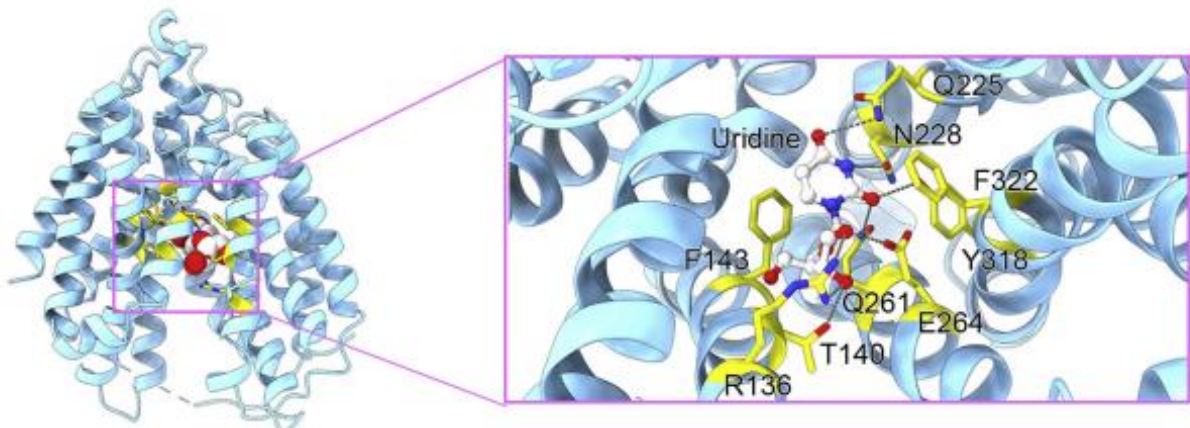
Το 2021 δημοσιεύθηκε από τους Wang *et al.* η πρώτη κρυσταλλική δομή για το μεταφορέα NurG (PDB : 7DL9), σε ευκρίνεια 3.0 Å και σε μια «ανοιχτή-προς-το-εσωτερικό» διαμόρφωση, χωρίς την παρουσία κάποιου υποστρώματος.

Οι μέχρι τότε αλγόριθμοι πρόβλεψης που συνέδεαν τη δομή του NurG με την εξελικτικά διακριτή υπεροικογένεια MFS (Patching *et al.*, 2005 Xie *et al.*, 2004) επιβεβαιώθηκαν, καθώς βρέθηκε πράγματι ότι ο NurG ακολουθεί το δομικό πρότυπο της MFS (Εικόνα 6), με τις 12 διαμεμβρανικές έλικες (TM1-12) οργανωμένες σε δύο διακριτές δομικές περιοχές με 6 συνεχόμενες διαμεμβρανικές έλικες η κάθε μία (N6-C6). Οι δύο περιοχές, N6 (TM1-6) και C6 (TM7-12), αφενός εμφανίζουν ένα επίπεδο συμμετρίας κάθετο στη μεμβράνη και αφετέρου αποτελούνται η καθεμία από δύο δομικά ανεστραμμένες επαναλήψεις των 3 TMs. Συνδέονται μεταξύ τους με έναν εύκαμπτο βρόχο. Η κοιλότητα μεταξύ των περιοχών N6 και C6 είναι στραμμένη προς το κυτταρόπλασμα ενώ μεταξύ τους σχηματίζεται το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος.



Εικόνα 6: Γενικό δομικό μοτίβο των μεταφορέων MFS. Σχηματική αναπαράσταση του δομικού προτύπου στην υπεροικογένεια MFS. (Drew *et al.*, 2021).

Έχουν ταυτοποιηθεί τα κατάλοιπα από τις N- και C- περιοχές του NurG που συνιστούν το κέντρο δέσμευσης των υποστρωμάτων (Εικόνα 7). Τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με την ριβόζη της ουριδίνης συντηρούνται και στα άλλα δύο μέλη της οικογένειας NHS (HarB, YegT). Αντίθετα, τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με την αζωτούχο βάση της ουριδίνης είναι συντηρημένα στον μεταφορέα HarB, αλλά όχι στον YegT. Όπως προαναφέρθηκε, ο HarB θεωρείται μεταφορέας ειδικός για τη ξανθοσίνη. Από τα δεδομένα όμως για τον NurG, φαίνεται ότι ο NurG δεν δεσμεύει, ούτε μεταφέρει ξανθοσίνη. Η διαφορά αυτή υποδεικνύει ότι και άλλα κατάλοιπα, εκτός του κέντρου δέσμευσης, συμμετέχουν στον καθορισμό της εξειδίκευσης του υποστρώματος, όμως τέτοια κατάλοιπα δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη (Wang *et al.*, 2021).

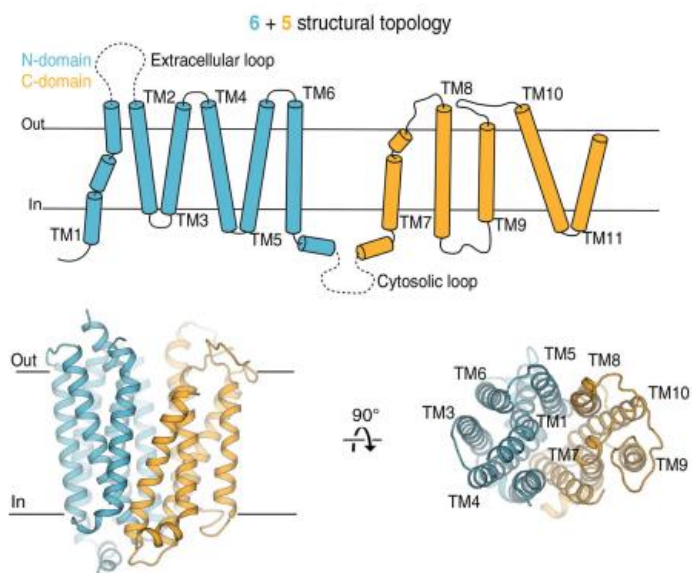


Εικόνα 7: Δομικό μοτίβο και κέντρο δέσμευσης του NurG. Το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος του μεταφορέα NurG σε σύμπλοκο με την ουριδίνη, όπως προέκυψε από την προσομείωση των αλληλεπιδράσεων του NurG με την ουριδίνη. Αριστερά οι α -έλικες του μεταφορέα αναπαρίστανται σαν κορδέλες (ribbons) και η ουριδίνη με τη μορφή σφαιρών (spheres). Δεξιά υπάρχει η λεπτομερής αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων του κέντρου δέσμευσης (κίτρινες ράβδοι) και της ουριδίνης (λευκές ράβδοι). Συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα R136 και T140 (από την N περιοχή) και το κατάλοιπο E264 (από την C περιοχή) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη ριβόζη. Αντίστοιχα, τα κατάλοιπα Q225, N228, Q261, Y318 από την C περιοχή δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη βάση (ουρακίλη). Τα κατάλοιπα F143 και F322 φαίνεται να καθορίζουν τον προσανατολισμό της ουριδίνης κατά τη δέσμευση. Η εικόνα προέρχεται από το άρθρο Wang *et al.*, 2021.

1.4.3 Δομικό πρότυπο στην οικογένεια ENT

Ενώ λειτουργικά οι ENTs έχουν μελετηθεί εκτενώς, τα δεδομένα που αφορούν τη δομή και τις διαμορφωτικές αλλαγές που υφίστανται κατά την μεταφορά των υποστρωμάτων τους, είναι υπό διερεύνηση. Η προσοχή στρέφεται ιδιαίτερα στον hENT1, ο οποίος ρυθμίζει τα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά επίπεδα της αδενοσίνης ελέγχοντας έτσι την κυτταρική σηματοδότηση μέσω της αδενοσίνης. Αυτή η ιδιότητα καθιστά τον hENT1 μόριο-στόχο μιας ομάδας φαρμάκων - ανάλογων νουκλεοσιδίων και μη - που αναστέλλουν την επαναπρόσληψη της αδενοσίνης (Adenosine Reuptake Inhibitors, AdoRIs) και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι καρδιοπάθειες. Η κατανόηση του μηχανισμού μεταφοράς των υποστρωμάτων και κατ' επέκταση και του τρόπου με τον οποίο αναστέλλεται ο hENT1 από τους AdoRIs θα βοηθήσει, μεταξύ άλλων, στην ανάπτυξη νέων αναστολέων (Wright και Lee, 2019, Wu *et al.*, 2022).

Το 2019 οι Wright και Lee απομόνωσαν κρυσταλλογραφικά δύο δομές του hENT1, ως σύμπλοκα με δύο διαφορετικούς AdoRIs, σε «ανοιχτή-προς-το-εξωτερικό» διαμόρφωση (**Εικόνα 8**). Οι δύο AdoRIs είναι ένα ανάλογο αδενοσίνης, το NBMPR (S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine), και ο αγγειοδιασταλτικός παράγοντας dilazer (3-[4-[3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)oxypropyl]-1,4-diazepan-1-yl]propyl 3,4,5-trimethoxybenzoate). Από τις κρυσταλλικές δομές προκύπτει ότι ο hENT1 υιοθετεί ένα δομικό πρότυπο παρόμοιο με αυτό της MFS (N6-C6), καθώς αποτελείται από 11 διαμεμβρανικές έλικες, οργανωμένες σε δύο διακριτές δομικές περιοχές (N- και C-domains), με 6 + 5 TMs αντίστοιχα. Η τοπολογία των 11 TMs θεωρείται ότι έχει προκύψει από ένα πρόγονο με 12 TMs, ο οποίος έχασε την τελευταία διαμεμβρανική του



έλικα. Οι εξελικτικοί και λειτουργικοί λόγοι για αυτή την απόκλιση είναι ασαφείς.

Εικόνα 8: Δομικό μοτίβο του hENT1. Η δομή του μεταφορέα hENT1 σε σύμπλοκο με το dilazer. (PDB code : 6OB7) A. Τοπολογικό διάγραμμα του μεταφορέα. Χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη ψευδοσυμμετρίας (6+5) ανάμεσα στις περιοχές N- και C-. B. Σχηματική αναπαράσταση της τριμερούς διαμόρφωσης του hENT1 παράλληλα με τη μεμβράνη (αριστερά) και όπως φαίνεται εξωκυτταρικά (δεξιά). Η εικόνα προέρχεται από το άρθρο Wright & Lee, 2019.

1.5 Μεταφορά υποστρώματος – Μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης

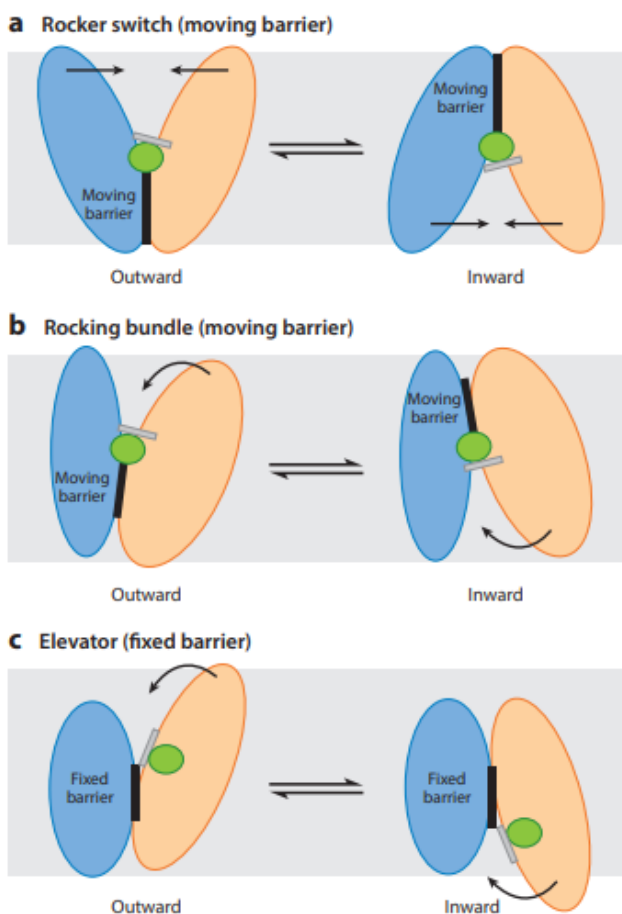
Ανεξάρτητα από την εξελικτική προέλευση, τη λειτουργία και τις ενεργειακές απαιτήσεις, ο τρόπος δράσης των διαμεμβρανικών μεταφορέων βασίζεται στο μοντέλο της εναλλασσόμενης πρόσβασης (alternating access), το οποίο περιγράφηκε πριν από μισό αιώνα από τους Oleg Jardetsky (Jardetsky, 1966), Peter Mitchell (Mitchell, 1957) και Clifford Patlak (Patlak, 1957).

Σύμφωνα με αυτό, η σύνδεση ενός υποστρώματος στο κέντρο δέσμευσης ενός μεταφορέα από τη μία πλευρά της μεμβράνης επάγει διαμορφωτικές αλλαγές, επιτρέποντας στο υπόστρωμα να απελευθερωθεί στην άλλη πλευρά της μεμβράνης.

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει διακριτά στάδια διαμορφωτικών αλλαγών, τα οποία επιτρέπουν στον μεταφορέα να είναι ανοιχτός-προς-την-περιπλασματική/εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης, ώστε να δεσμεύσει το υποστρώμα (outward-open) και στη συνέχεια να το απελευθερώσει στην κυτταροπλασματική πλευρά (inward-open). Μεταξύ των διαμορφώσεων από τις οποίες περνά ο μεταφορέας, υπάρχει τουλάχιστον μια ενδιάμεση κατάσταση όπου το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος είναι κλειστό (occluded) και από τις δύο πλευρές (Weyand *et al.*, 2010).

Την τελευταία δεκαετία έχουν δημοσιευθεί αρκετές κρυσταλλικές δομές μεταφορέων, διαφορετικών οικογενειών, που έχουν συμβάλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών μεταφοράς.

Έχουν προταθεί τρεις διακριτοί μηχανισμοί, οι οποίοι περιγράφουν την εναλλαγή μεταξύ των διαμορφώσεων των μεταφορέων. Αυτοί είναι : 1. ο μηχανισμός του «διακόπτη» (rocker-switch), 2. Ο μηχανισμός «αιώρησης» (rocking-bundle), 3. ο μηχανισμός του «ανεγκυστήρα (elevator-like)» (Εικόνα 9).



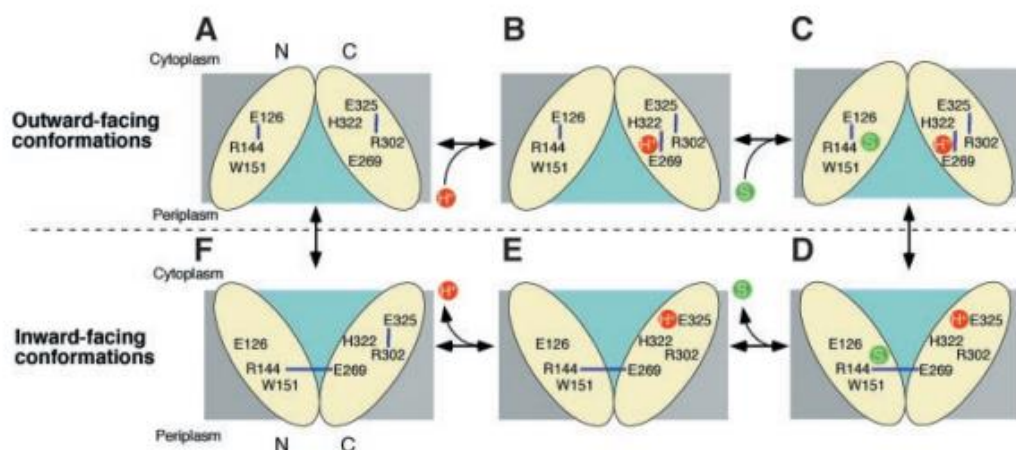
Εικόνα 9 : Γενικά δομικά-μηχανιστικά πρότυπα για τους μεταφορείς. Οι περισσότεροι μεταφορείς λειτουργούν είτε με το μηχανισμό του «διακόπτη» (rocker switch) (τον οποίο ακολουθούν οι μεταφορείς της υπερικογένειας MFS), είτε με το μηχανισμό «αιώρησης» (rocking bundle) (τον οποίο ακολουθούν μεταφορείς της υπερικογένειας APC). Σε αυτούς τους μεταφορείς, το κέντρο δέσμευσης εντοπίζεται στη μεσεπιφάνεια δύο δομικών περιοχών (domains), περίπου στο μέσο της μεμβράνης. Η εναλλασσόμενη πρόσβαση επιτυγχάνεται όταν ο φραγμός μεταξύ των δύο περιοχών που εμποδίζει την απελευθέρωση του υποστρώματος, αίρεται και επανασχηματίζεται στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Πιο πρόσφατα βρέθηκε και ένας άλλος μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης, ο μηχανισμός του «ανεγκυστήρα» (elevator-like). Σε αυτόν, η θέση δέσμευσης του υποστρώματος εντοπίζεται σε μια δομική περιοχή (transport domain), η οποία μετακινείται κατά μήκος μιας άλλης δομικής περιοχής (scaffold domain) που λειτουργεί ως κριώμα. Άρα λοιπόν η εναλλαγή μεταξύ της ανοιχτής-προς-το-εσωτερικό και ανοιχτής-προς-το-εξωτερικό διαμόρφωσης γίνεται εξαιτίας της ολίσθησης του transport domain κατά μήκος της μεμβράνης. (Drew and Boudker, 2016)

Και στους τρεις μηχανισμούς που αναφέρθηκαν, η εναλλασσόμενη πρόσβαση επιτυγχάνεται με κινήσεις δύο δομικών περιοχών (που φαίνονται με διαφορετικό χρώμα στην Εικόνα 9), ενώ το κέντρο δέσμευσης σχηματίζεται είτε στη μεσεπιφάνεια των δύο δομικών περιοχών είτε στη μία δομική περιοχή η οποία ολισθαίνει μαζί με το κέντρο δέσμευσης κατά μήκος της άλλης.

Αναλυτικότερα, στο **μηχανισμό του «διακόπτη» (rocker-switch)**, η δέσμευση του υποστρώματος επάγει διαμορφωτικές αλλαγές **και των δύο δομικών περιοχών**, εκθέτοντας το κέντρο δέσμευσης στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Έτσι, το δεσμευμένο υπόστρωμα μπορεί να απελευθερωθεί (Majumder *et al.*, 2018). Άρα η πρωτεΐνη κινείται γύρω από το υπόστρωμα, εκθέτοντας το κέντρο δέσμευσης διαδοχικά σε κάθε πλευρά της μεμβράνης (Kaback, 2015; Drew and Boudker, 2016).

Ο μηχανισμός έχει προταθεί κυρίως για τους μεταφορείς της υπεροικογένειας MFS. Οι πρώτες κρυσταλλικές δομές που τον περιέγραψαν ήταν αυτή του συμμεταφορέα λακτόζης/H⁺ LacY (Abramson *et al.*, 2003) (**Εικόνα 10**) και του αντιμεταφορέα τριφωσφορικής γλυκερόλης/ανόργανου φωσφόρου GlpT (Huang *et al.*, 2003) της *E. coli*.

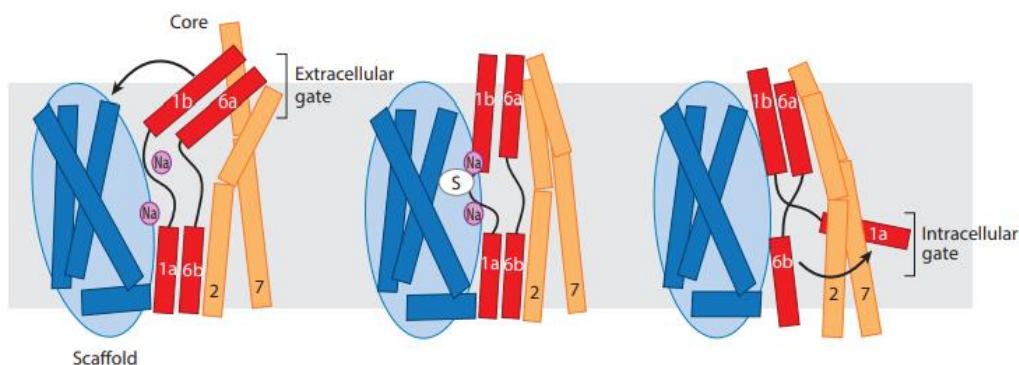
Ο μηχανισμός του διακόπτη εναλλασσόμενων διαμορφώσεων έχει προταθεί για τους μεταφορείς νουκλεοσιδίων των οικογενειών ENT και NHS.



Εικόνα 10: Κύκλος λειτουργίας της περμεάσης λακτόζης (LacY), Ο μηχανισμός συμμεταφοράς λακτόζης/H⁺ από την πρωτεΐνη LacY. Οι δομικές περιοχές N- και C- εμφανίζονται με οβάλ κίτρινο σχήμα. Το πρωτόνιο και το μόριο λακτόζης απεικονίζονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα αντίστοιχα και οι δεσμοί υδρογόνου με σκούρες μπλε γραμμές. Η εισροή αποτελείται από 6 βήματα, ξεκινώντας από την ανοιχτή-προς-το εξωτερικό διαμόρφωση (A). Ακολουθούν : Η πρωτονίωση του LacY (A→B), η δέσμευση της λακτόζης (B→C), οι διαμορφωτικές αλλαγές που επάγει η σύνδεση οδηγώντας σε ανοιχτή-προς-το-εσωτερικό διαμόρφωση (C→D), η απελευθέρωση του υποστρώματος (D→E), η απελευθέρωση του πρωτονίου (E→F) και η επαναφορά στην ανοιχτή-προς-το-εξωτερικό διαμόρφωση (F→A) (Abramson, 2003).

Στο **μηχανισμό «αιώρησης» (rocking-bundle)**, η μία δομική περιοχή παραμένει άκαμπτη (scaffold domain) ενώ η άλλη περιοχή (core domain) υφίσταται αλλαγές διαμόρφωσης, οι οποίες σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία ελέγχου, εμπλέκονται στην ελεγχόμενη είσοδο και έξοδο του υποστρώματος (**Εικόνα 11**).

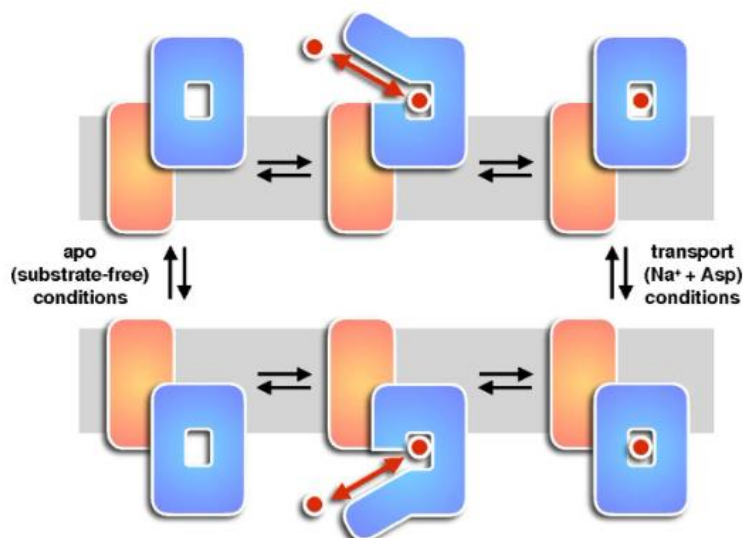
Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο βακτηριακός συμμεταφορέας αμινοξέων : Na^+ LeuT, της οικογένειας NSS (Neurotransmitter Sodium Symporter) (Majumder *et al.*, 2018).



Εικόνα 12: Κύκλος λειτουργίας του μεταφορέα Glt_{PH} . Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου μεταφοράς από τον Glt_{PH} . Με μπλέ χρώμα απεικονίζεται η περιοχή μεταφοράς, η οποία ολισθαίνει κατά μήκος της μεμβράνης (γκρί χρώμα). Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται η αγκυροβολημένη στη μεμβράνη, στατική περιοχή του κριώματος. Το υπόστρωμα (κόκκινο χρώμα) μπορεί να συνδεθεί και να απελευθερωθεί (κόκκινο βέλος) και στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Η μετακίνηση του transport domain κατά μήκος της μεμβράνης συμβαίνει είτε παρουσία είτε απουσία υποστρώματος. (Εικόνα από Ruan *et al.*, 2017)

Όσον αφορά το **μηχανισμό του «ανεγκυστήρα» (elevator-like)**, η πρώτη περίπτωση περιεγράφηκε το 2009 για τον συμμεταφορέα Na^+ - ασπαρτικού Glt_{PH} (Εικόνα12) της οικογένειας SLC1.

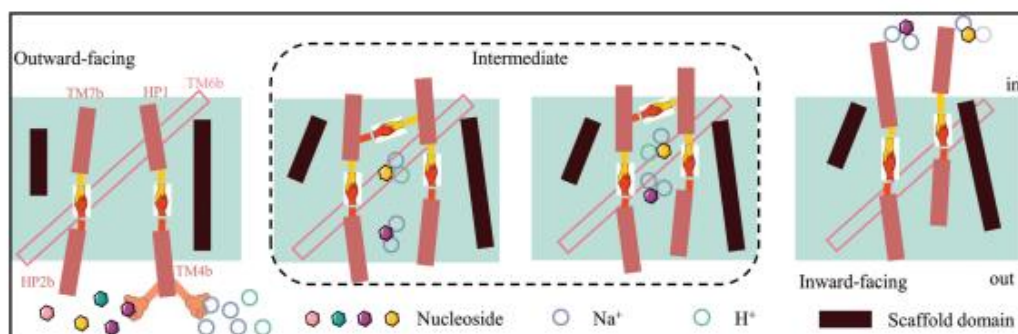
Οι μεταφορείς που χρησιμοποιούν το **μηχανισμό του ανεγκυστήρα (elevator-like)** ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες και δεν εμπίπτουν όλοι στο ίδιο δομικό πρότυπο αλλά μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Οι περισσότεροι



Εικόνα 11: Βασικές διαμορφώσεις του μεταφορέα LeuT. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών αναδιατάξεων που υφίσταται η περιοχή «πυρήνα» (κόκκινο και πορτοκαλί χρώμα) σε σχέση με την περιοχή «εισόδου» (μπλέ χρώμα), στον LeuT. Τα ιόντα νατρίου απεικονίζονται ως σφαίρες (μωβ χρώμα) και το υπόστρωμα απεικονίζεται με οβαλ σχήμα (λευκό χρώμα). Τα τμήματα των ελίκων TM1, TM6 αποτελούν τα δομικά στοιχεία που ελέγχουν την πρόσβαση προς και από το ενεργό κέντρο. (εικόνα από Drew & Boudker, 2016).

είναι είτε διμερή είτε τριμερή και από τις κρυσταλλικές τους δομές σε συνδυασμό με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής και λειτουργικές αναλύσεις έχει φανεί ότι η μία δομική περιοχή (scaffold domain) ευθύνεται για τον ολιγομερισμό και η άλλη (transport domain) εντοπίζεται περιφερικά. Επίσης, τα υποστρώματα συνδέονται κυρίως η εξ ολοκλήρου στο transport domain, το οποίο φέρει δομικά στοιχεία (ελικοειδείς φουρκέτες) που σχηματίζουν πύλες (gates), οι οποίες ελέγχουν την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο (Garaeva and Slotboom, 2020). Τα πρώτα παραδείγματα μεταφορέων που λειτουργούν με μηχανισμό ανελκυστήρα ήταν ο αντιμεταφορέας Na^+/H^+ NhaA της *E. coli* (Padan *et al.*, 2006) και ο μεταφορέας γλουταμικού του υπερθερμόφιλου αρχαίου *Pyrococcus horikoshii* Glt_{PH} (Gouaux, 2008) (**Εικόνα 12**).

Ο μηχανισμός του «ανελκυστήρα» έχει προταθεί μεταξύ των άλλων και για τους μεταφορείς νουκλεοσιδίων της οικογένειας CNT, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην περίπτωση των βακτηριακών (Hirschi *et al.*, 2017) αλλά στην περίπτωση των ανθρώπινων ομολόγων (Duan *et al.*, 2021) (**Εικόνα 13**). Σε αντίθεση με την αρχική θεωρία ότι η συνολική διαμόρφωση της περιοχής transport domain κατά την κίνηση του ανελκυστήρα δεν αλλάζει (rigid-body movement), από τις παραπάνω περιγραφές προκύπτει ένας μηχανισμός πολλαπλών σταδίων, με ενδιάμεσες διαμορφώσεις που ευνοούν τη μετάβαση του μεταφορέα μεταξύ των δύο τελικών σταδίων (inward open \leftrightarrow outward open).



Εικόνα 13: Μηχανισμός του hCNT3. Μεταφορά νουκλεοσιδίων μέσω του μηχανισμού του «ανεγκυστήρα» στον hCNT3. Κατά την elevator-like κίνηση ο hCNT3 υφίσταται συστολή και μετακίνηση προς το εσωτερικό της μεμβράνης ενώ HP1, TM7b και HP2b, TM4b δρούν συνεργιστικά ως ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές πύλες (gates), αντίστοιχα. Στην περίπτωση του ενεργού κέντρου, ο hCNT3 εμφανίζει μεγαλύτερο διαμεμβρανικό πόρο στην προς-τα-έξω-διαμόρφωση, γεγονός που ευνοεί την κατευθυνόμενη μεταφορά των νουκλεοσιδίων (Duan *et al.*, 2021).

Σκοπός

Η γεμισαβίνη (dFdC), ένα ανάλογο της κυτιδίνης (2',2'-διφθορο-2'-δεοξυκυτιδίνη), είναι ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα και αποτελεί την βασική θεραπευτική επιλογή σε προχωρημένους και μεταστατικούς καρκίνους του παγκρέατος (de Souza Cavalcante and Monteiro, 2014).

Ένα βασικό πρόβλημα στη χρήση της γεμισαβίνης είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων έναντι του φαρμάκου. Σε μια μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2017 από τους Geller *et al.*, φαίνεται πως η αποτελεσματικότητα της γεμισαβίνης κατά αδενοκαρκινωμάτων του παγκρέατος (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC) επηρεάζεται από βακτήρια που εποικίζουν τους όγκους. Τα βακτήρια αναγνωρίζουν και απενεργοποιούν την dFdC, μεταβολίζοντάς την στην ανενεργό της μορφή 2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη (dFdU). Το φαινόμενο αυτό συσχετίστηκε με συγκεκριμένα είδη γ-Πρωτεοβακτηρίων, εκ των οποίων τα πολυπληθέστερα ήταν *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii*.

Τα προαναφερθέντα βακτηριακά είδη περιέχουν διαμεμβρανικούς μεταφορείς που θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη νουκλεοσιδίων και κατ' επέκταση της γεμισαβίνης. Οι μεταφορείς αυτοί δεν έχουν μελετηθεί πειραματικά ώστε να είναι γνωστές οι σχέσεις δομής-λειτουργίας τους. Επίσης, αυτά τα είδη είναι συγγενικά ενός άλλου γ-Πρωτεοβακτηρίου, της *E. coli*, της οποίας οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων μελετώνται στο εργαστήριό μας.

Με έναυσμα τις παραπάνω παρατηρήσεις, ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν να εντοπιστούν ποιοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς από τα τρία βακτηριακά είδη, που έχουν κατεξοχήν συσχετισθεί με το φαινόμενο της χημειοανθεκτικότητας, είναι υπεύθυνοι για την δέσμευση και μεταφορά της γεμισαβίνης και κατ' επέκταση επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της δράσης του φαρμάκου. Για τον σκοπό αυτό, αφού χαρακτηρίστηκαν οι μεταφορείς γεμισαβίνης της *E. coli*, προχωρήσαμε σε φυλογενετική ανάλυση όλων των ομόλογων μεταφορέων νουκλεοσιδίων από τα γονιδιώματα των *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii* ώστε να εντοπιστούν οι πιθανοί μεταφορείς γεμισαβίνης, τους οποίους στη συνέχεια υποβάλαμε σε λειτουργικό χαρακτηρισμό και σύγκριση με τους αντίστοιχους μεταφορείς της *E. coli*.

Κεφάλαιο 2 : Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Όργανα εργαστηρίου

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

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415 D)

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

Λάμπα UV (UV transilluminator, Canon, Europe)

Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut), Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας

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

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

Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Χρησιμοποιήθηκε **σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων** (Microliter Syringes), Hamilton (Bonaduz, Switzerland)

Συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Mini Trans-Blot transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, California). Η μεταφορά έγινε σε **μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου** (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Pall Corporation, Ann Arbor, Missouri)

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

Συσκευή ταχείας διήθησης (glass filter holder assembly, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA)- Χρησιμοποιήθηκαν ηθμοί διήθησης (Whatman GF/C, 25mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2μm) για την κατακράτηση του κυτταρικού κλάσματος

Συσκευή υπερήχων digital sonifier model 250-D (Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut)

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

Υπερφυγόκεντρος Beckmann Optima™ Ultracentrifuge (Beckmann Instruments, Palo Alto, California)

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

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

Φωτόμετρο (Ultraspec-2001, Biochrom, Cambridge, England)

2.2 Χημικά αναλώσιμα

Ραδιενεργά σημασμένα υποστρώματα της εταιρείας Moravек Biochemicals (Brea, CA):

[5-³H] γεμισταβίνη (10,7 Ci/mmol)

Φυσικά νουκλεοσίδια και ανάλογα αυτών της εταιρείας CarboSynth

ουριδίνη, κυτιδίνη, γεμισταβίνη

Συζεύγματα για ανοσοαποτύπωση: σύζευγμα αβιδίνης υπεροξειδάσης (avidin-HRP, Millipore, California, USA)

Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών (markers):

10x loading buffer for agarose gel electrophoresis (Takara, BIO INC., Japan)

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

Ένζυμα

αλκαλική φωσφατάση alkaline phosphatase (Takara, BIO INC., Japan)

DNA πολυμεράση: PrimeStar GXL DNA polymerase, Takara (BIO INC., Japan)

περιοριστικές ενδονουκλεάσες Apal, BamHI (Takara, BIO INC., Japan)

DNA λιγάση (συνδετάση) του βακτηριοφάγου T4 T4 DNA ligase (Takara, BIO INC., Japan)

Ολιγο-δεοξυριβονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), τα οποία συντέθηκαν κατά παραγγελία από την εταιρεία Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany

Οργανικοί διαλύτες

Αιθανόλη (ethanol absolute, Sigma Aldrich)

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide-DMSO, Fluka)

Μεθανόλη (methanol, Sigma Aldrich)

Πακέτα υλικών (kits):

Πακέτο υλικών καθαρισμού DNA από δείγματα πήγματος αγαρόζης NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Macherey-Nagel (Duren, Germany)

Πακέτο ενισχυμένης χημιοφωταύγειας ECLTM Western Blotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Πακέτο προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης BCA Protein assay reagent kit, Pierce, Thermo Scientific, USA

Πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας NucleoSpin Plasmid Macherey-Nagel (Duren, Germany)

Χημικές ενώσεις

EDTA αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma Aldrich)

Αναγωγικά αντιδραστήρια

Διθειοθρεϊτόλη (DTT, Invitrogen)

Αναστολείς πρωτεασών

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

2.3 Διαλύματα

Διάλυμα Αποκλεισμού (Blocking buffer) 5% BSA σε TBST 1x

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διάλυμα Διαχωρισμού (Separation buffer), pH 8.8: Tris 1.5M, SDS 0.4% (w/v)

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

Διάλυμα Επαναιώρησης (Resuspension buffer): Tris-HCl 50mM, pH 8, NaCl 100mM, Na₂EDTA

1mM Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Διάλυμα [5-³H] Γεμισταβίνης (2,5μM): [5-³H] Γεμισταβίνη (10.7 Ci/mmol) 1μL, 36,384 μl ddH₂O

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα Επαναιώρησης TB, pH 6.7: Pipes 10mM, MnCl₂ 55mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250mM, αποστείρωση

Μέθοδος: Παρασκευή κυττάρων επιδεικτικών μετασχηματισμού

Διάλυμα Επιστοίβαξης (Stacking buffer), pH 6.8: Tris 0.5M, SDS 0.4% (w/v)

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

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

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

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

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διάλυμα Σακχαρόζης (Sucrose buffer): Tris-HCl 25 mM, pH 8, σακχαρόζη 45% (w/v), Na₂EDTA

1mM Μέθοδος: Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Διάλυμα TBST 10x: Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM, NaCl 1.5 M, Triton X-100, 2% (v/v)

Μέθοδος: Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Διάλυμα Τερματισμού: KPi 0.1M pH 5.5, LiCl 0,1M pH 5.5

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

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

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Διάλυμα Υπερθειϊκού Αμμωνίου (APS): APS 10% (w/v)

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

Διάλυμα Φόρτωσης 4x (Loading buffer): Tris pH 6.8 250mM, SDS 9.2% (w/v), DTT 100mM, Γλυκερόλη 40% (v/v), Μπλε της βρωμοφαινόλης 0.2% (w/v)

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

Θρεπτικό Υλικό SOB, pH 7.5: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Τρυπτόνη 2% (w/v), NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, αποστείρωση

Μέθοδος: Παρασκευή κυττάρων επιδεικτικών μετασχηματισμού

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth), pH 7.2: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Τρυπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), αποστείρωση

Μέθοδος: Παρασκευή κυττάρων επιδεικτικών μετασχηματισμού

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό LB (Luria Broth) **και άγαρ**, pH 7.2: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), Πεπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), άγαρ 1.5%, αποστείρωση

Μέθοδος: Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Ελάχιστο Θρεπτικό Μέσο (M9 minimal medium) : γλυκόζη 0.4% w/v, NH₄Cl 20mM, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 0,2 mM, διάλυμα αλάτων αρχικής συγκέντρωσης 5x (5x salts) που περιέχει Na₂HPO₄ x 2 H₂O 250 mM, KH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 49,6 mM, το οποίο αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 1x. Τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα.

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Ρυθμιστικό διάλυμα Κρι, pH 7.5: KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0.1M

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Ρυθμιστικό διάλυμα ΜΚ (pH 6.5) : MES 5 mM, KCl 0.15 M

Μέθοδος: Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς

Ρυθμιστικό διάλυμα ΤΑΕ (pH 8.0) : Tris-acetate 40mM, Na₂EDTA 1mM

Μέθοδος: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αραρόζης

2.4 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

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

***E. coli* TOP10F'** (F' {lacIq, Tn10(TetR)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mrcBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG) : χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα, λόγω του μεγάλου βαθμού επιδεκτικότητας (competence efficiency) που διαθέτει.

***E. coli* JW2389** (F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, ΔnupC730::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514), **ΔnupC** (Keio collection; Baba *et al.*, 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZp/o*, υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β, D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* JW2389 γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς γεμισταβίνης.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

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

pT7-5/BAD (Karatza and Frillingos, 2005): τροποποιημένο pT7-5 που φέρει την αλληλουχία για την δομική περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD, Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler *et al.*, 1991) ακολουθούμενη από την αλληλουχία για το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco *et al.*, 1984), σε κατάλληλη θέση (μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *ApaI* και *HindIII*) και προσανατολισμό ώστε να επιτρέπει κλωνοποίηση γονιδίων με εισαγωγή των ανωτέρω περιοχών στο C-τελικό άκρο της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του εισαχθέντος γονιδίου.

pT7-5/nupC-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5/BAD που φέρει το γονίδιο *nupC* της περμεάσης NupC της *E. coli* K-12 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/nupG-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5/BAD που φέρει το γονίδιο *nupG* της περμεάσης NupG της *E. coli* K-12 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*kpNupG*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*kpNupG*) της *KpNupG* της *K. pneumoniae* ATCC 25955 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*kpNupC1*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*kpNupC1*) της *KpNupC1* της *K. pneumoniae* ATCC 25955 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*kpNupC2*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*kpNupC2*) της *KpNupC2* της *K. pneumoniae* ATCC 25955 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*kprncCNT*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*kprncCNT*) της *KprncCNT* της *K. pneumoniae* ATCC 25955 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*cfNupC*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*cfNupC*) της *CfNupC* του *C. freundii* ATCC 8090 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*cfNupG*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*cfNupG*) της *CfNupG* του *C. freundii* ATCC 8090 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*cfPsuT*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*cfPsuT*) της *CfPsuT* του *C. freundii* ATCC 8090 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*cfXapB*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*cfXapB*) της *CfXapB* του *C. freundii* ATCC 8090 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*cfYegT*-BAD (Botou and Frillingos): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*cfYegT*) της *CfYegT* του *C. freundii* ATCC 8090 με την αλληλουχία για την περιοχή δέσμευσης βιοτίνης (BAD) και το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) στο C-τελικό του άκρο.

2.5 Φυλογενετική ανάλυση των μεταφορέων νουκλεοσιδίων των οικογενειών CNT/NHS, στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων

Σύμφωνα με τους Geller *et al.* (2017), τα συνηθέστερα βακτηριακά είδη που εντοπίστηκαν σε δείγματα PDACs και επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του ανάλογου dFdC, ανήκουν στην κλάση των γ-Πρωτεοβακτηρίων και είναι κυρίως *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii*. Τα βακτήρια αυτά περιέχουν δυνητικούς μεταφορείς νουκλεοσιδίων που θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για τη πρόσληψη της γεμισταβίνης.

Με βάση τους λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς νουκλεοσιδίων NurC, NurG της *E. coli* K-12, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση όλων των ομόλογων μεταφορέων που εμπίπτουν στις οικογένειες CNT και NHS, στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων. Ο στόχος είναι να εντοπιστούν στα βακτηριακά είδη που μας ενδιαφέρουν, δηλαδή τα *P. putida*, *K. pneumoniae* και *C. freundii*, οι μεταφορείς που είναι ομόλογοι με τους προαναφερθέντες NurC και NurG.

Τα ομόλογα των Πρωτεοβακτηρίων υποβλήθηκαν σε φυλογενετική ανάλυση ως εξής. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναζήτηση όλων των γονιδιωμάτων που ανήκουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, στη βάση δεδομένων IMG/M του JGI (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Chen *et al.*, 2022). Ανακτήθηκαν συνολικά 6434 βακτηριακά στελέχη, ταξινομημένα σε α-, β-, γ-, δ- και ε- Πρωτεοβακτήρια, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως.

Ακολούθησε αναζήτηση των πρωτεϊνικών ομόλογων αλληλουχιών με το πρόγραμμα Blast-p, για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Ως αλληλουχίες επερώτησης (query) χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των NurC και NurG της *E. coli* K-12. Με τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκαν συνολικά 6.434 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην οικογένεια CNT και 4.560 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην οικογένεια NHS. Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε αρχικά σε 927 στην οικογένεια CNT και 388 στην οικογένεια NHS, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος. Ακολούθησε περαιτέρω μείωση των αλληλουχιών σε 275 στην οικογένεια CNT και 146 στην οικογένεια NHS, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά γένος. Οι επιμέρους ομόλογες αλληλουχίες στοιχήθηκαν με το πρόγραμμα Muscle και υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA 6), ώστε να κατασκευαστούν τα τελικά φυλογενετικά δέντρα.

Από τα δέντρα προέκυψαν οι αλληλουχίες των ομόλογων μεταφορέων στα βακτηριακά είδη που έχουν κατεξοχήν συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα στη γεμισταβίνη. Οι αλληλουχίες

αυτές ελέγχθηκαν ως προς το ποσοστό ομολογίας τους με τους μεταφορείς NurC και NurG της *E. coli* και ως προς την οργάνωση του γενετικού τους τόπου, χρησιμοποιώντας στοιχεία από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.

Οι ομόλογοι δυνητικοί μεταφορείς από τα βακτήρια *K. pneumoniae* και *C. freundii* ακολούθως υποβλήθηκαν σε λειτουργικό χαρακτηρισμό. Αντίθετα, δεν βρέθηκαν ομόλογοι δυνητικοί μεταφορείς των οικογενειών CNT και NHS στο είδος *P. putida*.

2.6 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

2.6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα γονίδια των ομόλογων μεταφορέων κινητοποιήθηκαν από το γονιδίωμα των *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Χάριν συντομίας, οι ομόλογοι μεταφορείς της *K. pneumoniae* ATCC 25955 θα ονομάζονται KrNurC1, KrNurC2, KrncCNT, KrNurG, Kr-Yeg-1 και οι ομόλογοι μεταφορείς του *C. freundii* ATCC 8090 θα ονομάζονται CfNurC, CfPsuT, CfNurG, CfXapB, CfYegT, Cf-Yeg-x, Cf-Yeg-1.

Το υπόστρωμα (template) που χρησιμοποιήθηκε στην PCR ήταν το ολικό γονιδιωματικό DNA. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών (primers) εισήχθησαν οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων BamHI και ApsI στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων (**Πίνακας 2.1**). Το BamHI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GGATCC-3' ενώ το ApsI την 5'-GGGCCC-3'. Οι περιοριστικές θέσεις επιτρέπουν στη συνέχεια την ένθεση (insertion) των PCR προϊόντων στην αλληλουχία του pT7-5.

Για κάθε αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν :

- 100 ng γονιδιωματικού DNA
 - 100 μM από κάθε sense και anti-sense εκκινητή
 - 2.5 mM dNTPs
 - 1x ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει MgCl₂
 - 1 U/μl DNA πολυμεράσης
- Αποστειρωμένο ddH₂O από στήλη Millipore, μέχρι τελικό όγκο 100μl

Η PCR εφαρμόζεται για 30 κύκλους στις παρακάτω συνθήκες:

98°C για 3 min	
98°C για 1 min	αποδιάταξη δίκλωνου DNA (Denaturation)
68-69°C για 1:30 min*	πρόσδεση εκκινητών (Annealing)
72°C για 2 min	επιμήκυνση DNA (Extension)
72°C για 7 min	

*Η θερμοκρασία πρόσδεσης (annealing) καθορίζεται από το T_m των εκκινητών και τροποποιείται ανάλογα με την περίπτωση.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή
<i>kpNupC1</i>	Sense : 5' – GATTCAGGATCCATGGACCGCGTCTTGCAATTTGTC – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATGGGCCCAGAACCAGTGCCGCAATCGAG – 3'
<i>kpNupC2</i>	Sense : 5' – GAGTCAGGATCCATGGCGGCCTTATTGACTTGCGAAAAG – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATGGGCCCAGCACCAGCCCTGCGAAGCTGG – 3'
<i>kpncCNT</i>	Sense : 5' – GAGTCAGGATCCATGCAAATCCTCATGGGACTTATCGGCATG – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATGGGCCCAGGGCGAGAAAACTCCGGCGATG – 3'
<i>cfNupC</i>	Sense : 5' – GATCAGGATCCATGGACCGCGTCTTCATTTTGTATTG – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATGGGCCCAGCACTAGTGCTGCGATAGATG – 3'
<i>cfPsuT</i>	Sense : 5' – GAGTCAGGATCCATGGATATAATGAGAAGTGTTGTGG – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATGGGCCCAGCCAGTCCGATAAAGAAACCGG – 3'
<i>kpNupG</i>	Sense : 5' – GACGCTGGATCCATGAATCTCAAGCTGCAGCTCAAAATACTGTC – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATTGGGCCCTCGCTCTGCTGTGCTGCGGTCGGTTG – 3'
<i>cfNupG</i>	Sense : 5' – GAGTCAGGATCCATGAACCTTAAGCTGCAGCTGAAAG – 3'
	Anti-sense : 5' – GATTATGGGCCCCTGCCGCGATAGTTTGGGTGCCTG – 3'
<i>cfXapB</i>	Sense : 5' – GGAGGTGGATCCATGGGTATCGCATCTCGCTTAAAG – 3'
	Anti-sense : 5' – CTATAAGGGCCCTGTGCCAGTGATTTCTGCGCCAGTCGTTT – 3'
<i>cfYegT</i>	Sense : 5' – GATCATGGATCCATGAAAACACTACAGTTAAGCTGTCCGTTT – 3'
	Anti-sense : 5' – GATCATGGGCCCCTTTACTTCCCCTTGTTCACACG – 3'
<i>kp-Yeg-1</i>	Sense : 5' – GTAGTAGGATCCATGGTCACAACAACAGAAGGTCGGGAAAG – 3'
	Anti-sense : 5' – GTTTCTGGGCCCCTGCGGCTCTTTCTCGTTGTTACTG – 3'

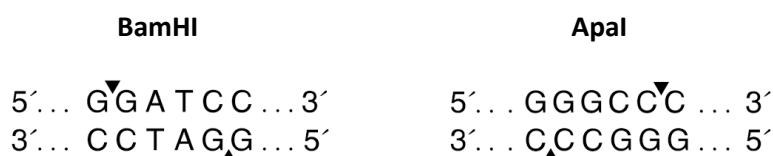
<i>cf1-Yeg-x</i>	Sense : 5' - GATGTAGGATCCATGGACCTTAACAAAACACCACGCCTG - 3'
	Anti-sense : 5' – GTTGTAGGGCCCGGAGTTTGCTTTTTTCAATGGGAG - 3'
<i>cf2-Yeg-1</i>	Sense : 5' – GTAGTAGGATCCATGGTGTCAACAACCGAAAGTAGTGG – 3'
	Anti-sense : 5' – GATCATGGGCCCCGCCTGCTCTTTATCGTCATACTTG - 3'

Πίνακας 2.1 : Οι εκκινητές νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των ομόλογων γονιδίων από τα στελέχη *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090. Με έντονη γραμματοσειρά φαίνονται οι αλληλουχίες των θέσεων περιορισμού για τα ένζυμα BamHI (GGATCC) και ApaI (GGGCCC) στα 5' και 3' άκρα του γονιδίου, αντίστοιχα.

Ακολούθως, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ηλεκτροφόρηση επιτρέπει την ανίχνευση, το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση ή/και τον καθαρισμό των τμημάτων DNA. Τα PCR προϊόντα ανακτήθηκαν με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).

2.6.2 Κατασκευή ανασυνδυσμένου DNA (περιοριστική πέψη – ανασύνδεση)

Για την κατασκευή των ανασυνδυσμένων πλασμιδίων, επωάστηκαν ο πλασμιδιακός φορέας pT7-5/BAD και τα προς ένθεση (insertion) προϊόντα DNA που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *BamHI*. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μοναδικές και επακριβώς αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις, τόσο στον φορέα, όσο και στα PCR προϊόντα που δημιουργήθηκαν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1 : Αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων *BamHI* και *ApaI*

Στο τέλος της περιοριστικής πέψης, και πριν την αντίδραση με το ένθεμα DNA, τα ελεύθερα 5' άκρα του φορέα pT7-5/BAD αποφωσφορυλιώθηκαν με χρήση αλκαλικής φωσφατάσης, προς αποφυγή ανεπιθύμητης επανασύνδεσης των ανοικτών άκρων του. Ακολούθησε

ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (1%), καθαρισμός και ανασύνδεση με χρήση T4 DNA λιγάσης (ligation).

Η αντίδραση της λιγάσης έγινε στους 16°C, για 16 ώρες, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL. Οι ποσότητες ενθέματος (insert) και φορέα (vector) χρησιμοποιήθηκαν σε μοριακή αναλογία 3:1, όπως υπολογίστηκε για κάθε κατασκευή, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Πραγματοποιήθηκαν 9 διαφορετικές αντιδράσεις ανασύνδεσης, από τις οποίες προέκυψαν τα εξής ανασυνδυασμένα πλασμίδια : pT7-5/*kpNupC1*-BAD, pT7-5/*kpNupC2*-BAD, pT7-5/*kpNupG*-BAD, pT7-5/*kprncCNT*-BAD, pT7-5/*cfNupC*-BAD, pT7-5/*cfPsuT*-BAD, pT7-5/*cfNupG*-BAD, pT7-5/*cfXapB*-BAD, pT7-5/*cfYegT*-BAD.

2.6.3 Κατασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού

Κύτταρα *E. coli* JW2389 (*ΔnupC*) προετοιμάστηκαν ώστε να γίνουν επιδεκτικά μετασχηματισμού (competent) με βάση το πρωτόκολλο των Inoue *et al.*, 1990.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB (10mL), στους 37°C, για 16 ώρες. Η καλλιέργεια αραιώνεται σε θρεπτικό διάλυμα SOB μέχρι τελικού όγκου 250mL. Η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *ΔnupC* γίνεται παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (0.05mg/mL). Η ανάπτυξη των κυττάρων συνεχίστηκε στον επωαστήρα του θερμού θαλάμου, στους 37°C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση 200rpm, μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει στην τιμή 0.6(μέσο λογαριθμικής καμπύλης αύξησης) . Εν συνεχεία, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 10 min και συλλέγονται με φυγοκέντρηση, στις 3000 rpm (10 min, 4°C), σε φυγόκεντρο Heraeus Megafuge 1.0R. Τα κύτταρα ακολούθως αναδιαλύονται σε 40 mL ψυχρού διαλύματος TB. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται, με επαναίρωση σε 10 mL ψυχρού TB που περιέχει 7% (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Τα κύτταρα χαρακτηρίζονται πλέον ως επιδεκτικά και είναι έτοιμα να μετασχηματιστούν με τα κατάλληλα πλασμίδια (plasmid DNA prep) ή τα προϊόντα της αντίδρασης ανασύνδεσης (ligation products). Τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

2.6.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA (προϊόν της αντίδρασης ανασύνδεσης) προστίθεται σε επιδεκτικά *ΔnupC* και γίνεται επώαση στον πάγο για 5 min. Τα κύτταρα στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ που περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/mL). Οι αποικίες επιλέγονται

με βάση την ανθεκτικότητά τους στην αμπικιλίνη και τα μετασηματισμένα κύτταρα αποθηκεύονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο LB με γλυκερόλη (30%), στους -80°C.

Σε κάθε περίπτωση, γίνεται επιβεβαίωση της αλληλουχίας του DNA (sequencing) ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *Bam*HI και *Apa*I σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας (MWG-Biotech).

2.7 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε μικρή κλίμακα (10mL)

Κύτταρα *E. coli* JW2389 (*ΔnurC*) που φέρουν τα κατάλληλα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 3mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB που περιέχει αμπικιλίνη (0.1mg/mL) και καναμυκίνη 0.05mg/mL για 16h, στους 37°C, υπό αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται αραίωση σε LB (1mL πλήρους καλλιέργειας + 9mL νέου LB), πάλι παρουσία των παραπάνω αντιβιοτικών και τα κύτταρα αναπτύσσονται στις ίδιες συνθήκες για 2 ώρες (μέχρι το μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης). Προστίθεται ισοπρόπουλο -θείο - β,D - γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM, για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για επιπλέον 2 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης (6000 rpm, 10min, 4°C).

2.8 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την παρασκευή κλάσματος μεμβρανών από την εσωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη κυττάρων *E. coli* JW2389 (*ΔnurC*) περιλαμβάνει ωσμωτικό σοκ, επώαση με EDTA και λυσοζύμη και κατεργασία με υπερήχους (Kaback, 1974; Frillingos *et al.*, 1994). Αναλυτικότερα :

Μετά την ανάπτυξη, επαγωγή και συγκομιδή των κυττάρων *E. coli* JW2389 (*ΔnurC*) από 10ml καλλιέργειας, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10ml διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension buffer). Ακολουθεί μια ακόμη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1ml διαλύματος επαναιώρησης, το οποίο περιέχει και αναστολέα πρωτεασών (Pefabloc) σε αναλογία 1ml διαλύματος επαναιώρησης: 1μl Pefabloc (τελική συγκέντρωση Pefabloc 0.2μM). Το εναιώρημα (1ml) μεταφέρεται σε μικροσωληνάρια τύπου erpendorf, φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 5min σε 13000rpm και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος σακχαρόζης (Sucrose buffer) με Pefabloc (στην ίδια αναλογία). Ακολουθεί επώαση στους 4°C για 20min. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται εκ νέου σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 5min στις 13000rpm,

επαναιωρούνται σε 800μl dH₂O και επωάζονται για 10 min, στους 4°C. Με το πέρας της επώασης, προστίθεται 10μl λυσοζύμης (αρχικής συγκέντρωσης 10mg/ml) και ακολουθεί εκ νέου επώαση για 30min στον πάγο. Αμέσως μετά, ακολουθεί θραύση των κυττάρων με τη χρήση συσκευής υπερήχων (sonication), (2 ώσεις των 15sec για κάθε δείγμα σε ένταση 40%, στη συσκευή Branson 250-D). Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (5min, 13000rpm), ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα άθραυστα κύτταρα (cell debris) και το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρείται για 30min σε 90000rpm στους 4°C. Τέλος, το ίζημα των μεμβρανών διαλυτοποιείται σε 40μl ddH₂O και τα δείγματα υποβάλλονται σε

Πήγμα	30% Ακρυλαμίδιο (mL)	10% SDS (mL)	10% APS (mL)	TEMED (mL)	Διάλυμα (mL)	ddH ₂ O (mL)
Πήγμα Διαχωρισμού (100 mL)	42	1	1	0,05	Διαχωρισμού, 25	32
Πήγμα Επιστοιβάξης (30 mL)	4,5	0,3	0,3	0,03	Επιστοιβάξης, 7,5	17,4

ηλεκτροφόρηση και περαιτέρω αναλύσεις (§2.14) είτε αμέσως, είτε μετά από 12-24 ώρες, αφού ενδιάμεσα φυλαχθούν στους 4°C.

2.9 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.9.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με βάση το πρωτόκολλο BCA Protein Assay Reagent Kit (Novagen). Το πρωτόκολλο βασίζεται στο συνδυασμό της αναγωγής του Cu⁺² σε Cu⁺¹ σε αλκαλικό περιβάλλον, με την υψηλής ευαισθησίας χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού (Cu⁺¹) (στα 562nm) χρησιμοποιώντας δισκινchonικό οξύ (bicinchoninic acid). Στη συνέχεια, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης και σύμφωνα με αυτή, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

2.9.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ddH₂O έτσι ώστε τα μεμβρανικά δείγματα να εξισορροπηθούν στα 100μg πρωτεΐνης ανά 50μL. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer) σε αναλογία 4:1 (δείγμα : διάλυμα φόρτωσης)

και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου (12%) –δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πήγμα διαχωρισμού 12% και πήγμα επιστοίβαξης 5% σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 2 : Πρωτόκολλο για την παρασκευή πήγματος διαχωρισμού και πήγματος επιστοίβαξης (Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)).

2.9.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των διαχωρισμένων πλέον πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυ-βινυλιδενικού διφθοριδίου (polyvinylidene difluoride, PVDF) σε διάλυμα μεταφοράς, για 4 ώρες στα 400 mA. Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επώαζεται για 16 ώρες στους 4°C σε Διάλυμα Αποκλεισμού [Blocking buffer: 5% BSA (αλβουμίνης ορού βοός) σε TBST 1x] για τη δέσμευση των κενών θέσεων. Ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με το σύζευγμα αβιδίνης- υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50.000 σε TBST (1X) - 5% BSA για 1 ώρα και έπειτα πραγματοποιούνται 8 πλύσεις με TBST (1X). Για την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος (ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του σήματος) χρησιμοποιείται η αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL).

2.10 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)

2.10.1 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς σε βακτηριακά ομόλογα

Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* JW2389 (*ΔημρC*) μετασχηματισμένων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύσσεται σε 3 mL πλήρους θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη 0.1mg/mL και καναμυκίνη 0.05mg/mL. Η καλλιέργεια αφήνεται στους 37°C, υπό ανάδευση 200rpm, για 16h. Με το πέρας των 16h, το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας αλλάζει από πλήρες (LB) σε ελάχιστο (M9) ως εξής. 1 mL κυττάρων πλήρους καλλιέργειας σε LB που αντιστοιχούν σε OD₆₀₀ 0,1, συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο Eppendorf Centrifuge 5415 D (13.000 rpm, 10 min). Κατόπιν, τα κύτταρα ξεπλένονται με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Κ_ρi (pH 7,5) και επαναφυγοκεντρούνται (13.000 rpm, 10 min). Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1 mL M9 και προστίθενται ακόμη 9 mL M9. Η καλλιέργεια συνεχίζεται στους 37°C, υπό αερόβιες συνθήκες, στις 200 rpm, μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν στο μέσο της λογαριθμικής καμπύλης αύξησης OD₆₀₀ 0,6. Σε αυτό το στάδιο προστίθεται ισοπροπυλο-θειο-β, D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM, για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, και η ανάπτυξη συνεχίζεται για άλλες 1.45 h. Ακολουθούν δύο φυγοκεντρήσεις (6000 rpm, 10 min, 4 °C), στο τέλος των οποίων τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml διαλύματος MK (5mM MES, pH 6.5 και 150mM KCl). Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για μια τελευταία φορά στις ίδιες συνθήκες και επαναιωρούνται σε 1mL διαλύματος MK. Έπειτα, οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών δειγμάτων εξισορροπούνται με φωτομέτρηση στα 420nm και προστίθεται κατάλληλος όγκος MK, ώστε η τελική τιμή της οπτικής πυκνότητας να είναι OD₄₂₀ 10, που αντιστοιχεί σε ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.7 mg/mL (Frillingos *et al.*, 1994).

Κατά τη δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] γεμισταβίνης (10,7 Ci/mmol), χρησιμοποιούνται σε κάθε αντίδραση 50μl κυττάρων (0,035 μg ολικής πρωτεΐνης). Σε αυτά προστίθεται 20mM γλυκερόλη και ακολουθεί επώαση στους 25°C, για 3min, μετά το πέρας των οποίων προστίθεται το υπόστρωμα τελικής συγκέντρωσης 0.1μM, για χρόνους 5sec-1min. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με 2 x 3 mL διαλύματος τερματισμού με ταχεία διήθηση υπό κενό (*rapid filtration*), σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm. Μετά τη διήθηση, ο ηθμός μεταφέρεται σε σωληνάρια σπινθηρισμού (*scintillation vials*) που περιέχουν 8 mL υγρού σπινθηρισμού (*scintillation fluid*) και αφήνεται να επωασθεί για 24 h. Τα [³H] δείγματα μετρώνται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter).

2.10.2 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση

Στα πειράματα κινητικής ανάλυσης πρόσληψης [³H] γεμισταβίνης, η αρχική ταχύτητα πρόσληψης του υποστρώματος μετρήθηκε στα 5 sec. Οι συγκεντρώσεις ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 1μM έως 1mM (αρχική συγκέντρωση/διάλυμα εργασίας) με τελικές συγκεντρώσεις 0.04 μM έως 40 μM.

Οι σταθερές V_{max} και K_M εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 6 (<http://www.graphpad.com>).

2.10.3 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς παρουσία μη σημασμένων νουκλεοσιδίων

Στα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [³H] γεμισταβίνης από νουκλεοσίδια πυριμιδινών, προστέθηκαν στο διάλυμα των κυττάρων οι μη σημασμένοι προσδέτες (0.1 μM έως 1 mM) και στη συνέχεια ακολούθησε δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς με [5-³H] γεμισταβίνη 0.1 μM.

Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκε στα 5 sec και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 6. Οι τιμές K_i που δίνονται προκύπτουν από την εφαρμογή του τύπου των Cheng and Prusoff (1973) $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_M)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [5-³H] γεμισταβίνης.

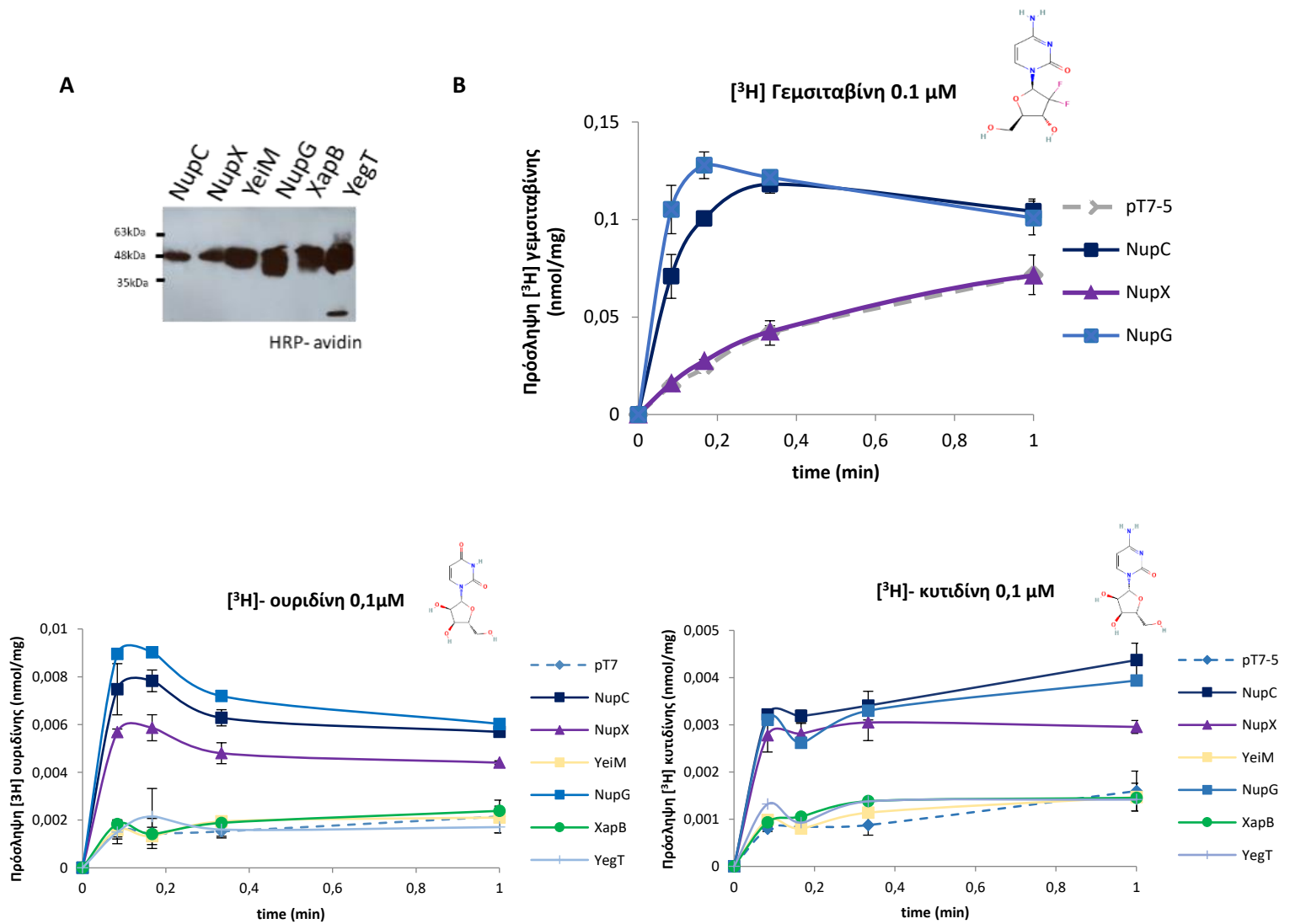
Κεφάλαιο 3 : Αποτελέσματα

3.1 Μεταφορείς νουκλεοσιδίων/ανάλογων νουκλεοσιδίων στην *E. coli* K-12

Το έναυσμα για τη μελέτη των μεταφορέων νουκλεοσιδίων από συγκεκριμένα βακτηριακά είδη (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* και *Pseudomonas putida*), ήταν η μελέτη των Geller *et al.* (2017) που συσχετίζει την παρουσία των ειδών αυτών στο μικροπεριβάλλον αδενοκαρκινωμάτων του παγκρέατος (PDAC, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι της γεμισιταβίνης (2',2'-διφθορο-2'-δεοξυκυτιδίνη, dFdC). Τα βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν τη γεμισιταβίνη στην ανενεργό της μορφή (2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη, dFdU), γεγονός που φαίνεται πως εξαρτάται από την ενεργό διαμεμβρανική μεταφορά του φαρμάκου στο εσωτερικό τους (Geller *et al.*, 2017). Σε αντίθεση με τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, όπου η μεταφορά της γεμισιταβίνης έχει συνδεθεί με μεταφορείς των οικογενειών SLC28 και SLC29, οι οποίοι έχουν μελετηθεί εκτενώς, δεν υπάρχουν δεδομένα για τους βακτηριακούς μεταφορείς της γεμισιταβίνης.

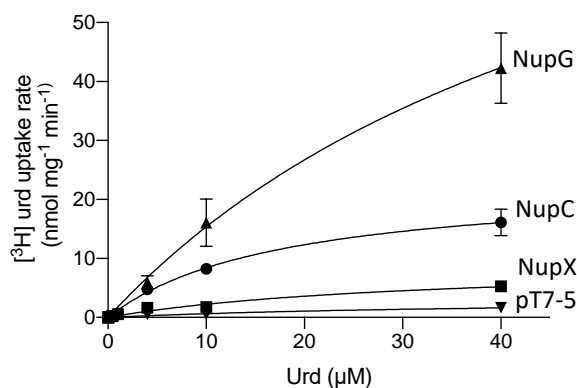
Για να αναζητήσουμε τους πιθανούς μεταφορείς της γεμισιταβίνης στα *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida* και *Citrobacter freundii* και να κατανοήσουμε τη συμβολή τους στο μεταβολισμό του φαρμάκου, στηριχθήκαμε στη μελέτη των ομόλογων μεταφορέων γεμισιταβίνης ενός συγγενικού γ-Πρωτεοβακτηρίου, της *E. coli* K-12, της οποίας οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων μελετώνται στο εργαστήριό μας. Οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων των βακτηρίων ανήκουν σε δύο οικογένειες, την οικογένεια CNT (Concentrative Nucleoside Transporter) και την οικογένεια ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter). Στην *E. coli* υπάρχουν τρεις μεταφορείς που ανήκουν στην οικογένεια CNT, οι NupC, NupX, PsuT, και τρεις μεταφορείς που ανήκουν στην NHS, οι NupG, XapB, YegT.

Πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας, από την ανάλυση των ομόλογων CNT και NHS μεταφορέων στην *E. coli* K-12, δείχνουν ότι οι μεταφορείς NupC (CNT) και NupG (NHS) μεταφέρουν γεμισιταβίνη και πυριμιδίνες (ουριδίνη και κυτιδίνη) (**Εικόνα 3.1**) με υψηλή συγγένεια (**Εικόνα 3.2**). Ο μεταφορέας NupX μεταφέρει ουριδίνη και κυτιδίνη λιγότερο αποτελεσματικά (**Εικόνα 3.2**), αλλά δεν μεταφέρει γεμισιταβίνη (**Εικόνα 3.1**). Κανένας από τους υπόλοιπους ομόλογους μεταφορείς PsuT (CNT), YegT (NHS) και XapB (NHS) δεν βρέθηκε να μεταφέρει φυσικά πυριμιδινικά νουκλεοσίδια (ουριδίνη, κυτιδίνη) (**Εικόνα 3.1**).

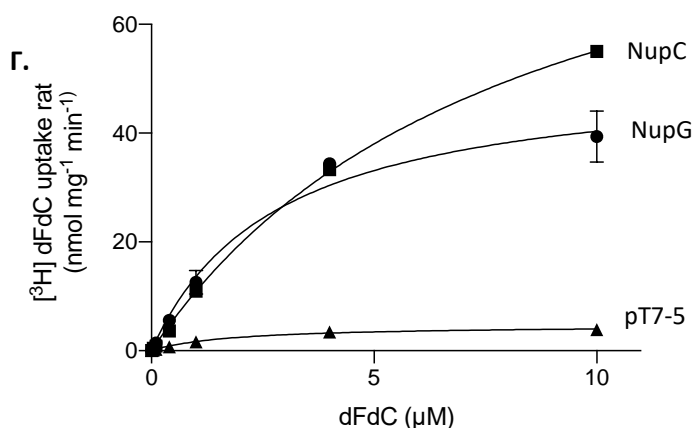
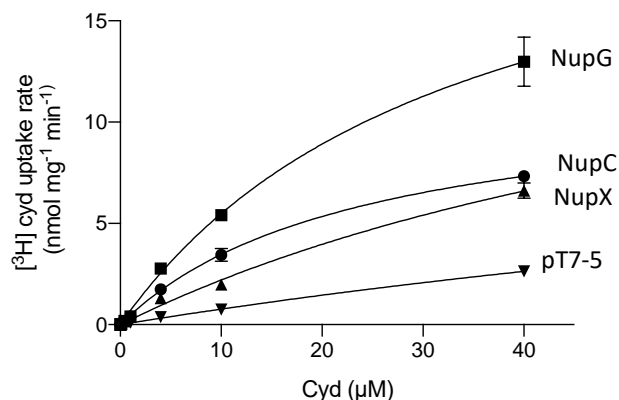


Εικόνα 3.1 : A) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των ομόλογων CNT και NHS μεταφορέων της *E. coli*. Κλάσματα μεμβρανών (25 mg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$) που εκφράζουν τις υπό μελέτη περμεάσες σε πλασμίδια pT7-5/-BAD, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και έγινε αποτύπωση (western blotting) με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP), σε αραιώση 1:50000. **B. Ανάλυση ενεργότητας μεταφοράς γεμισταβίνης, κυτιδίνης και ουριδίνης των μεταφορέων NupC, NupG και NupX της *E. coli* K-12.** Κύτταρα JW2389 ($\Delta nupC$) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1μM [³H] γεμισταβίνης, 0.1μM [³H] ουριδίνης και, 0.1μM [³H] κυτιδίνης. Οι μετρήσεις για κάθε πείραμα επαναλήφθηκαν 2-5 φορές και οι τιμές που φαίνονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους των μετρήσεων μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις (SD). Τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από την ερευνητική δουλειά της Ελένης Αναγνωστοπούλου στο εργαστήριό μας (Anagnostoroulou, Botou, & Frilingos, unpublished data).

A.



B.



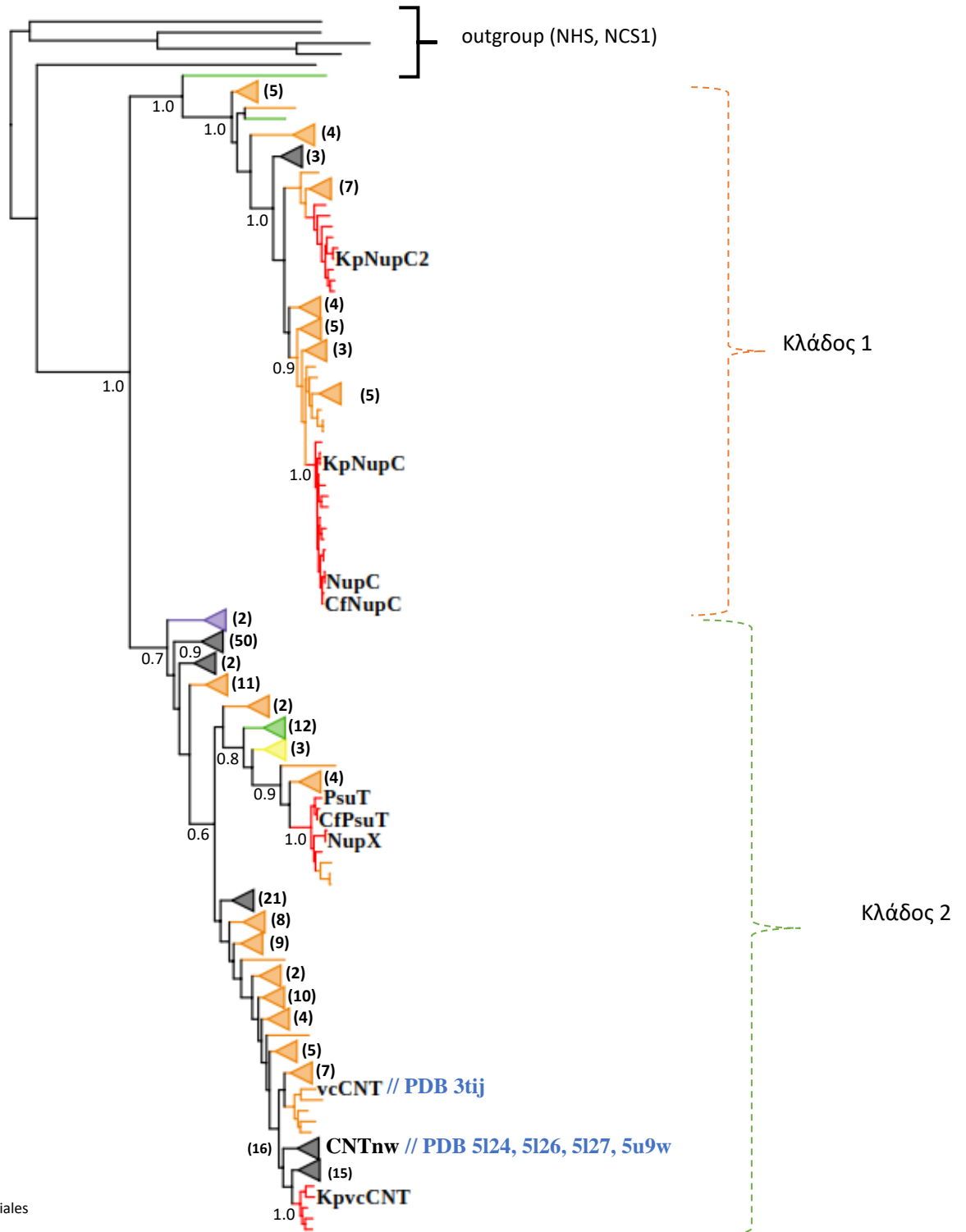
	NupC		NupG		NupX	
	K_M (μM)	V_{max}/K_M ($\mu\text{l min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	K_M (μM)	V_{max}/K_M ($\mu\text{l min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	K_M (μM)	V_{max}/K_M ($\mu\text{l min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
Οουριδίνη	13.6	1.3	50.8	1.7	8.1	0.4
Κυτιδίνη	14.4	0.4	26.9	0.6	56.3	0.2
Γεμισαβίνη	9.8	10.3	2.9	16.7	-	-

Εικόνα 3.2: Κινητική ανάλυση της ενεργότητας των μεταφορέων NupC και NupG. Κύτταρα *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ουριδίνης (A), [^3H] κυτιδίνης (B) και [^3H] γεμισαβίνης (dFdC) (Γ) (σε εύρος συγκεντρώσεων 0.04 μM -40 μM του αντίστοιχου νουκλεοσιδίου). Η αρχικές ταχύτητες πρόσληψης προσδιορίστηκαν στα 5 sec. Οι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση σε κάθε πείραμα επαναλήφθηκαν 2-3 φορές και οι τιμές που φαίνονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους των μετρήσεων μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις (SD). Οι τιμές K_M και V_{max} εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 6. Οι τιμές αυτές είναι μέσοι όροι 2 πειραματικών μετρήσεων και η τυπική απόκλιση (S.D.) είναι < 15%. Τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από την ερευνητική δουλειά

της Ελένης Αναγνωστοπούλου στο εργαστήριό μας (Anagnostopoulou, Botou, & Frilingos, unpublished data).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι κύριοι μεταφορείς γεμισταβίνης και πυριμιδινών (ουριδίνης, κυτιδίνης) στην *E. coli* K-12 είναι οι NupC (οικογένεια CNT) και NupG (οικογένεια NHS). Έχοντας ως βάση τους δύο αυτούς μεταφορείς, πραγματοποιήθηκε η φυλογενετική ανάλυση των ομόλογων μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS, που εμπίπτουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, ώστε να εντοπιστούν οι δυνητικοί μεταφορείς γεμισταβίνης στα είδη *Pseudomonas putida*, *Citrobacter freundii* και *Klebsiella pneumoniae*.

3.2 Φυλογενετική ανάλυση των ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας CNT στα Πρωτεοβακτήρια



Εικόνα 3.3: Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 275 ομόλογων μεταφορέων από Πρωτεοβακτήρια, που ανήκουν στην οικογένεια CNT. Για την κατασκευή του δέντρου χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Maximum Likelihood, με βάση το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992) (MEGA6). Περιλαμβάνονται όλα τα ομόλογα βακτηρίων που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG, εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά γένος. Τα ποσοστά των δέντρων στα οποία οι ταξινομικές μονάδες (taxa) που συσχετίζονται, ομαδοποιούνται μαζί, εμφανίζονται (ως δεκαδικά ψηφία) δίπλα στους κύριους κλάδους. Διακλαδώσεις με bootstrap value < 0.5 δεν εμφανίζονται. Οι ομόλογοι μεταφορείς των οικογενειών NHS (NupG, XapB και YegT) και NCS1 (Nucleobase:Cation Symporters-1) (CodB, YbbW), της *E. coli* έχουν χρησιμοποιηθεί ως outgroup. Τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν διαφορετικές κλάσεις Πρωτεοβακτηρίων. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή περικλείεται ο φυλογενετικός κλάδος που περιλαμβάνει τον μεταφορέα NupC της *E. coli*, τους KpNupC, KpNupC2 από το στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 και το CfNupC από το *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (Κλάδος 1). Με πράσινη διακεκομμένη γραμμή περικλείεται ο δεύτερος κλάδος όπου περιλαμβάνονται οι PsuT και NupX της *E. coli*, ο CfPsuT από το *C. freundii* ATCC 8090 και ο KpncCNT από *K. pneumoniae* ATCC 25955. Με μπλε γραμματοσειρά υποδεικνύονται οι δύο ομόλογοι CNT από τα *Vibrio cholerae* (vcCNT) και *Neisseria wadsworthii* (CNTnw) που έχουν αναλυθεί κρυσταλλογραφικά, σε ευκρίνεια 2.4 Å (Johnson *et al.*, 2012) και 3.4 Å (Hirschi *et al.*, 2017), αντίστοιχα. Οι αριθμοί πρόσβασης (accession numbers) των ομολόγων, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/>) παρατίθενται στο Παράρτημα 1.

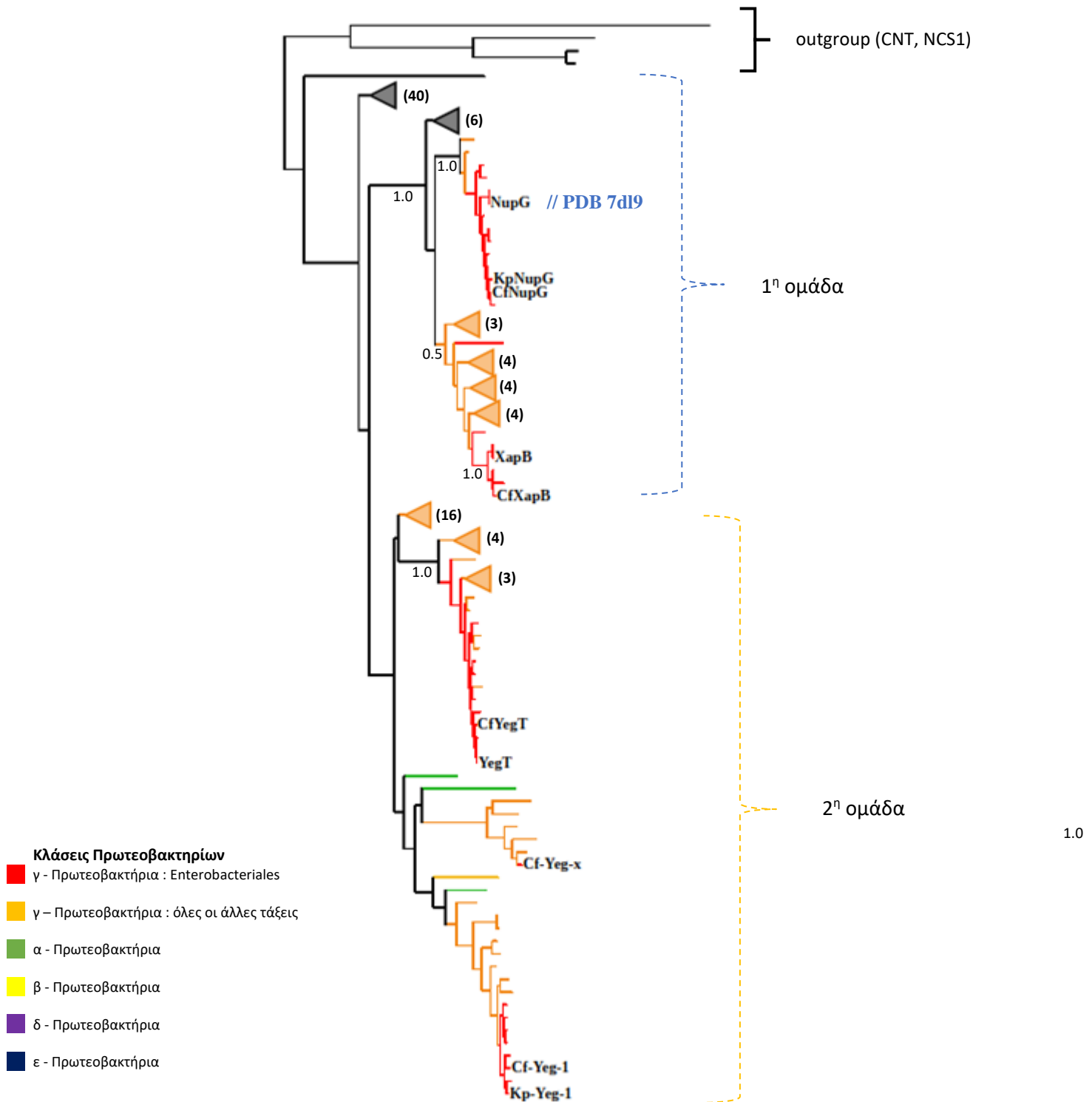
Με βάση την παραπάνω φυλογενετική ανάλυση φαίνεται πως η οικογένεια CNT στα Πρωτεοβακτήρια ταξινομείται σε δύο μεγάλους μονοφυλετικούς κλάδους. Ο ένας κλάδος περιλαμβάνει τους ομόλογους μεταφορείς του NupC της *E. coli* και ο δεύτερος τους ομόλογους των NupX και PsuT της *E. coli*. Μεταξύ των κλάδων αυτών εντοπίζονται συνολικά τρεις ομόλογοι CNT μεταφορείς του στελέχους *K. pneumoniae* ATCC 25955 και δύο ομόλογοι CNT μεταφορείς του *C. freundii* ATCC 8090 (**Παράρτημα 1**). Το είδος *Pseudomonas putida* δεν έχει ομόλογους μεταφορείς στην οικογένεια CNT.

Αναλυτικότερα, τα δύο από τα τρία ομόλογα του *K. pneumoniae* ATCC 25955 έχουν στενή συγγένεια με τον NupC της *E. coli*. Ο πρώτος ομόλογος μεταφορέας, KpNupC σύμφωνα με την **Εικόνα 3.3**, τοποθετείται εντός μιας ομάδας ομολόγων από γ-Πρωτεοβακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και εμφανίζει στενή εξελικτική συγγένεια με τον NupC, με ταυτότητα 94%. Ο δεύτερος ομόλογος μεταφορέας (KpNupC2) είναι επίσης συγγενής του NupC, με ταυτότητα 74%. Ο τρίτος (KpncCNT) εντοπίζεται στο δεύτερο κλάδο, είναι εξελικτικά απομακρυσμένος από τα ομόλογα της *E. coli* (NupC, PsuT, NupX) και φαίνεται να σχετίζεται εξελικτικά με τα διαθέσιμα κρυσταλλωμένα ομόλογα, vcCNT του *Vibrio cholerae* (Johnson *et al.*, 2012) και CNTnw του *Neisseria wadsworthii* (Hirschi *et al.*, 2017).

Το στέλεχος *C. freundii* ATCC 8090 έχει ένα στενά συγγενικό ομόλογο του *E. coli* NupC, τον CfNupC. Ο CfNupC βρίσκεται στην ίδια ομάδα ομολόγων μεταφορέων της οικογένειας Enterobacteriaceae με τον NupC και το ποσοστό ταυτότητας των αμινοξικών αλληλουχιών του

CfNupC και του NupC είναι 98%. Ένας δεύτερος ομόλογος μεταφορέας του NupC από το *C. freundii* ATCC 8090, ο CfPsuT, εμφανίζει μεγαλύτερη εξελικτική συγγένεια με τον PsuT της *E. coli*, με τον οποίο έχει ταυτότητα 95%. Τοπολογικά βρίσκεται στον ίδιο υποκλάδο με τον μεταφορέα PsuT της *E. coli* και τον παράλογό του, NupX.

3.3 Φυλογενετική ανάλυση των ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας NHS στα Πρωτεοβακτήρια



Εικόνα 3.4: Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 146 ομόλογων μεταφορέων από Πρωτεοβακτήρια, που ανήκουν στην οικογένεια NHS. Για την κατασκευή του δέντρου χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Maximum Likelihood, με βάση το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992) (MEGA6). Περιλαμβάνονται όλα τα ομόλογα βακτηρίων που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων JGI/IMG, εκπροσωπούμενα από ένα στέλεχος ανά γένος. Τα ποσοστά των δέντρων στα οποία οι ταξινομικές μονάδες (taxa) που συσχετίζονται, ομαδοποιούνται μαζί, εμφανίζονται (ως δεκαδικά ψηφία) δίπλα στους κύριους κλάδους. Οι ομόλογοι μεταφορείς των οικογενειών CNT (NupC, NupX, PstT) και NCS1 (Nucleobase:Cation Symporters-1) (CodB, YbbW), της *E. coli* έχουν χρησιμοποιηθεί ως outgroup. Τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν διαφορετικές κλάσεις Πρωτεοβακτηρίων. Με μπλε διακεκομμένη γραμμή περικλείεται η ομάδα που περιλαμβάνει τους μεταφορείς NupG και XarB της *E. coli* και τους KpNupG και CfNupG, CfXarB από *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090. Με κίτρινη διακεκομμένη γραμμή περικλείεται η ομάδα όπου εντοπίζεται ο YegT της *E. coli* και οι Kp-Yeg-1 και CfYegT, Cf-Yeg-x, Cf-Yeg-1 από *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090, αντίστοιχα. Με μπλε γραμματοσειρά υποδεικνύεται το PDB ID της κρυσταλλικής δομής του NupG, ο οποίος αναλύθηκε πρόσφατα σε ευκρίνεια 3.0 Å (Wang *et al.*, 2021). Οι αριθμοί πρόσβασης (accession numbers) των ομόλογων, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/>) παρατίθενται στο Παράρτημα 1.

Με βάση την παραπάνω φυλογενετική ανάλυση φαίνεται πως η οικογένεια NHS στα Πρωτεοβακτήρια ταξινομείται σε δύο μεγάλες ομάδες ομόλογων. Η 1^η ομάδα περιλαμβάνει τους ομόλογους μεταφορείς των NupG και XarB της *E. coli* και η 2^η περιλαμβάνει τους ομόλογους του YegT. Μεταξύ των ομάδων αυτών εντοπίστηκαν συνολικά δύο ομόλογοι NHS μεταφορείς του στελέχους *K. pneumoniae* ATCC 25955 και πέντε ομόλογοι NHS μεταφορείς του *C. freundii* ATCC 8090 (**Παράρτημα 1**). Η *P. putida* δεν έχει ομόλογους μεταφορείς στην οικογένεια NHS.

Αναλυτικότερα, οι δύο από τους επτά δυνητικούς μεταφορείς, ο KpNupG του *K. pneumoniae* ATCC 25955 και ο CfNupG του *C. freundii* ATCC 8090, εμφανίζουν στενή εξελικτική συγγένεια με τον NupG της *E. coli*. Οι δύο από αυτούς, σύμφωνα με την **Εικόνα 3.4**, εντοπίζονται σε έναν υποκλάδο ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας Enterobacteriaceae, μεταξύ των οποίων βρίσκεται και ο NupG. Η ταυτότητα των δύο αυτών ομόλογων, KpNupG και CfNupG, με τον NupG, είναι 86%.

Το *C. freundii* ATCC 8090 έχει δύο δυνητικούς μεταφορείς, CfXarB και CfYegT, οι οποίοι με βάση την τοπολογία τους στο παραπάνω δέντρο, εμφανίζουν στενή εξελικτική συγγένεια με τους XarB και YegT της *E. coli*, αντίστοιχα, καθώς βρίσκονται σε ομάδες ομόλογων της οικογένειας Enterobacteriaceae στις οποίες εντοπίζονται και οι XarB και YegT, αντίστοιχα. Οι ταυτότητες των CfXarB και CfYegT με τα XarB και YegT, είναι 88% και 96%, αντίστοιχα.

Τα δύο στελέχη που μελετώνται έχουν επιπλέον κάποιους δυνητικούς μεταφορείς που σύμφωνα με την Εικόνα 2 βρίσκονται στην ίδια ευρύτερη ομάδα με τον YegT της *E. coli* αλλά

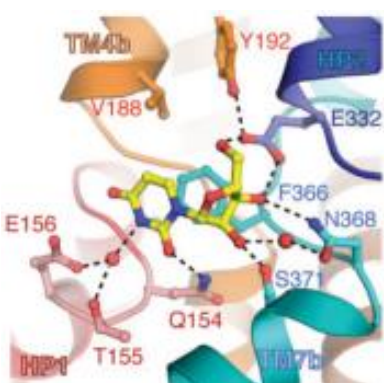
σε διαφορετικούς υποκλάδους. Αυτοί οι εξελικτικά απομακρυσμένοι ομόλογοι του YegT είναι ο Kp-Yeg-1 από το *K. pneumoniae* ATCC 25955 και οι Cf-Yeg-x και Cf-Yeg-1 από το *C. freundii* ATCC 8090.

3.4 Συντήρηση αμινοξικών καταλοίπων στις οικογένειες μεταφορέων CNT και NHS

Από τα παραπάνω φυλογενετικά δέντρα, ταυτοποιήθηκαν οι νέοι δυνητικοί μεταφορείς γεμισαβίνης των στελεχών *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090 και εξετάστηκε η εξελικτική τους σχέση με τους ομόλογους μεταφορείς των οικογενειών CNT και NHS της *E. coli*. Παράλληλα, εξετάσαμε τον βαθμό ομοιότητας των αμινοξικών καταλοίπων που βρίσκονται στις προβλεπόμενες θέσεις δέσμησης υποστρώματος των υπό μελέτη ομόλογων πρωτεϊνών, με βάση τα δομικά πρότυπα που είναι γνωστά για κάθε οικογένεια.

Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ομόλογων μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS από τα *K. pneumoniae* ATCC 25955, *C. freundii* ATCC 8090 και *E. coli* K-12 στοιχήθηκαν πλήρως (**Παράρτημα 2.1 και Παράρτημα 2.2**). Η στοιχίση έγινε με βάση τους δομικά χαρακτηρισμένους μεταφορείς vCNT (Johnson *et al.*, 2012) στην οικογένεια CNT και NurG (Wang *et al.*, 2021) στην οικογένεια NHS. Από τα δεδομένα των κρυσταλλικών δομών των μεταφορέων vCNT και NurG είναι γνωστά τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στην αναγνώριση, τον προσανατολισμό και τη δέσμηση του υποστρώματος. Οι αντίστοιχες θέσεις στους ομόλογους δυνητικούς μεταφορείς της *K. pneumoniae* και του *C. freundii* φαίνονται στις **Εικόνες 3.5 & 3.6**.

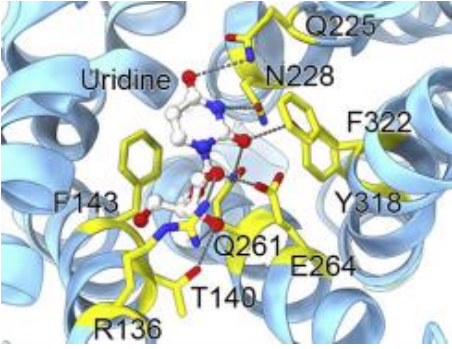
Από τη στοιχίση προκύπτει πως υπάρχει υψηλή συντήρηση του κέντρου δέσμησης υποστρώματος μεταξύ των μεταφορέων CNT. Από τα εννέα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν άμεσα δεσμεύοντας το υπόστρωμα στον vCNT, τα επτά είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλα τα ομόλογα που εξετάσαμε (**Εικόνα 3.5**), ενώ ένα κατάλοιπο, Thr155, συντηρείται στον κλάδο που περιλαμβάνει τον vCNT και τα PsuT/NurX (**Εικόνα 3**) ενώ αντικαθίσταται από κατάλοιπο παρόμοιου χαρακτήρα πλευρικής αλυσίδας, δηλαδή σερίνη (S), στον κλάδο που περιλαμβάνει τα ορθόλογα του NurC (**Εικόνα 3**).



Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις	HP2		TM7		HP1				TM4	TM7
	δεσμοί υδρογόνου με τη ριβόζη				δεσμοί υδρογόνου με την αζωτούχο βάση					π-π stacking
vcCNT	Y192	E332	N368	S371	G153	Q154	T155	E156	V188	F366
KrvcCNT	Y192	E333	N375	S378	G153	Q154	T155	E156	V188	F373
NupC	Y185	E321	N352	S355	G146	Q147	S148	E149	I181	F350
KrNupC	Y185	E321	N352	S355	G146	Q147	S148	E149	I181	F350
KrNupC2	Y185	E315	N346	S349	G146	Q147	S148	E149	I181	F344
CfNupC	Y185	E321	N352	S355	G146	Q147	S148	E149	I181	F350
NupX	Y192	E331	N365	S368	G153	Q154	T155	E156	T188	F363
PsuT	Y192	E331	N365	S368	G153	Q154	T155	E156	M188	F363
CfPsuT	Y192	E331	N365	S368	G153	Q154	T155	E156	M188	F363

Εικόνα 3.5: Αμινοξικά κατάλοιπα των μεταφορέων νουκλεοσιδίων της οικογένειας CNT που εμπλέκονται στη δέσμευση του υποστρώματος. Στο σχήμα (αριστερά) απεικονίζεται το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος του vcCNT, σε σύμπλοκο με την ουριδίνη (από Johnson *et al.*, 2012). Στον πίνακα (δεξιά) καταγράφονται τα αμινοξικά κατάλοιπα των υπό μελέτη βακτηριακών μελών της οικογένειας CNT που προβλέπεται να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με το τμήμα της ριβόζης ή με το τμήμα της αζωτούχο βάσης ή εμπλέκονται σε δεσμούς π-π stacking με τον πυριμιδινικό δακτύλιο. Με έντονη γραμματοσειρά απεικονίζονται όσα κατάλοιπα είναι ταυτόσημα και στους εννέα μεταφορείς, ενώ με πλάγια όσα συντηρούν το χαρακτήρα της πλευρικής αλυσίδας. Οι ομόλογοι μεταφορείς είναι: NupC, NupX, PsuT της *E. coli*, KrvcCNT, KrNupC, KrNupC2 της *K. pneumoniae*, CfNupC, CfPsuT του *C. freundii* και vcCNT του *V. cholerae*.

Στην οικογένεια NHS, τα κατάλοιπα που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη ριβόζη του υποστρώματος στον NupG συντηρούνται πλήρως σε όλα τα ομόλογα που εξετάσαμε (**Εικόνα 6**) ενώ εκείνα που σχηματίζουν π-π δεσμούς (π-π stacking) με την ουριδίνη (F322 και F373) συντηρούν τον αρωματικό χαρακτήρα της πλευρικής αλυσίδας σε όλα τα ομόλογα και, μάλιστα, συντηρούνται ως Phe (F) στον κλάδο που περιλαμβάνει τα NupG και ΧαρB (**Εικόνα 4**) ενώ αντικαθίστανται από τρυπτοφάνη (W) ή τυροσίνη (Y) στον κλάδο που περιλαμβάνει τα ορθόλογα του YegT και Yeg-1 (**Εικόνα 4**). Αντίθετα, υπάρχουν διαφορές στα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το τμήμα της αζωτούχο βάσης (Q261, Q225, N228, Y318) καθώς αυτά συντηρούνται μεταξύ των ομόλογων μεταφορέων των *E. coli*, *C. freundii* και *K. pneumoniae* του πρώτου φυλογενετικού κλάδου (NupG/ΧαρB) ενώ διαφοροποιούνται σημαντικά στους ομόλογους δυνητικούς μεταφορείς του δεύτερου κλάδου (YegT/Yeg-1/Yeg-x) (**Εικόνα 3.6**).



Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις	TM5		TM8		TM7		TM10		TM5
	δεσμοί υδρογόνου με τη ριβόζη			δεσμοί υδρογόνου με την αζωτούχο βάση					π-π stacking
NupG	R ¹³⁶	T ¹⁴⁰	E ²⁶⁴	Q ²⁶¹	Q ²²⁵	N ²²⁸	Y ³¹⁸	F ³²²	F ¹⁴³
CfNupG	R ¹³⁶	T ¹⁴⁰	E ²⁶⁴	Q ²⁶¹	Q ²²⁵	N ²²⁸	Y ³¹⁸	F ³²²	F ¹⁴³
KpNupG	R ¹³⁶	T ¹⁴⁰	E ²⁶⁴	Q ²⁶¹	Q ²²⁵	N ²²⁸	Y ³¹⁸	F ³²²	F ¹⁴³
XapB	R ¹³⁶	T ¹⁴⁰	E ²⁶⁴	Q ²⁶¹	Q ²²⁵	N ²²⁸	Y ³¹⁸	F ³²²	F ¹⁴³
CfXapB	R ¹³⁶	T ¹⁴⁰	E ²⁶⁴	Q ²⁶¹	Q ²²⁵	N ²²⁸	Y ³¹⁸	F ³²²	F ¹⁴³
YegT	R ¹³¹	T ¹³⁵	E ²⁵⁵	Q ²⁵²	A ²²⁶	Y ²²⁹	H ³¹⁰	Y ³¹⁴	W ¹³⁸
CfYegT	R ¹³¹	T ¹³⁵	E ²⁵⁵	Q ²⁵²	A ²²⁶	Y ²²⁹	H ³¹⁰	Y ³¹⁴	W ¹³⁸
Cf-Yeg-x	R ¹³⁴	T ¹³⁸	E ²⁵²	I ²⁴⁹	T ²²³	S ²²⁶	Q ³⁰⁵	W ³⁰⁹	F ¹⁴¹
Kp-Yeg-1	R ¹⁴⁸	T ¹⁵²	E ²⁶⁶	Q ²⁶³	G ²³⁷	Y ²³⁹	H ³¹⁹	Y ³²³	W ¹⁵⁵
Cf-Yeg-1	R ¹⁴⁸	T ¹⁵²	E ²⁶⁶	Q ²⁶³	G ²³⁷	Y ²³⁹	Q ³¹⁹	Y ³²³	W ¹⁵⁵

Εικόνα 3.6: Αμινοξικά κατάλοιπα των μεταφορέων νουκλεοσιδίων της οικογένειας NHS που εμπλέκονται στη δέσμευση του υποστρώματος. Στο σχήμα (αριστερά) απεικονίζεται το κέντρο δέσμευσης του NupG, σε σύμπλοκο με την ουριδίνη (Wang *et al.*, 2021). Στον πίνακα καταγράφονται τα αμινοξικά κατάλοιπα των υπό μελέτη βακτηριακών μελών της οικογένειας NHS που προβλέπονται να αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με το τμήμα της ριβόζης ή με το τμήμα της αζωτούχου βάσης ή εμπλέκονται σε δεσμούς π-π stacking με τον πυριμιδινικό δακτύλιο. Με έντονη γραμματοσειρά απεικονίζονται όσα κατάλοιπα είναι ταυτόσημα και στους δέκα μεταφορείς, ενώ με πλάγια όσα συντηρούν το χαρακτήρα της πλευρικής αλυσίδας. Οι ομόλογοι μεταφορείς είναι: NupG, XapB, YegT της *E. coli*, KpNupG, Kp-Yeg-x της *K. pneumoniae*, CfNupG, CfXapB, CfYegT, Cf-Yeg-x και Cf-Yeg-1 του *C. freundii*.

Σε κάθε περίπτωση, η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών επιβεβαιώνει την εξελικτική συγγένεια που παρατηρήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση, καθώς οι δυνητικοί μεταφορείς των οικογενειών CNT και NHS των *K. pneumoniae* και *C. freundii* συντηρούν τα αμινοξικά κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης που έχουν οι κοντινότεροι ομόλογοί τους στην *E. coli*.

3.5 Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ομόλογων μεταφορέων CNT και NHS από τα *Citrobacter freundii* ATCC 8090 και *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955.

Επίσης, εξετάσαμε την οργάνωση των γενετικών τόπων των γονιδίων των νέων δυνητικών μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS από τα *C. freundii* και *K. pneumoniae*, με σκοπό να ελέγξουμε αν τα γονίδια των δύο βακτηριακών ειδών που μας ενδιαφέρουν ανήκουν σε κάποιο γνωστό οπερόνιο μεταβολισμού νουκλεοσιδίων ή αν υπάρχει συντήρηση των αντίστοιχων γενετικών τόπων μεταξύ των *C. freundii*, *K. pneumoniae* και *E. coli*. Αναλυτική περιγραφή των γενετικών τόπων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς των οικογενειών CNT και NHS της *E. coli*, καθώς και των ομόλογων γονιδίων από τα *K. pneumoniae* και *C. freundii* υπάρχει στο **Παράρτημα 4**.

3.5.1. Γονίδια σε οπερόνια μεταβολισμού νουκλεοσιδίων

Το γονίδιο *psuT* (*yeiM*) της *E. coli* K-12 κωδικοποιεί για τον δυνητικό μεταφορέα PsuT (ο οποίος θεωρείται πιθανός μεταφορέας ψευδοουριδίνης). Το γονίδιο *psuT* συνεκφράζεται με δύο γονίδια (κινάσης ψευδοουριδίνης, και C-C γλυκοσιδάσης φωσφορικής ψευδοουριδίνης) που ευθύνονται για τον καταβολισμό της ψευδοουριδίνης. Η ψευδοουριδίνη (Ψ) είναι το πιο κοινό τροποποιημένο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στο RNA. Είναι ένα ισομερές του νουκλεοσιδίου της ουριδίνης στο οποίο η νουκλεοτιδική βάση συνδέεται με το δακτύλιο της ριβόζης μέσω ενός δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C) αντί ενός γλυκοσιδικού δεσμού άνθρακα-αζώτου. (Preumont *et al.*, 2008, McKenney *et al.*, 2017). Ορθόλογο γονίδιο του *psuT*, με όμοιο γενετικό τόπο, εντοπίστηκε στο γονιδίωμα του *C. freundii*. Το *cfPsuT* ανήκει επίσης σε ένα οπερόνιο που περιλαμβάνει γονίδια ομόλογα των *psuG* και *psuK* της *E. coli*, με ταυτότητες 91% και 61%, αντίστοιχα (**Παράρτημα 4.1.2**).

Το γονίδιο *xapB* της *E. coli* K-12 αποτελεί μέλος ενός οπερονίου καταβολισμού της ξανθοσίνης. Το *xapB* συνεκφράζεται με το γονίδιο *xapA* που κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφορυλάση της ξανθοσίνης ενώ στον ίδιο γενετικό τόπο εντοπίζεται και το *xapR* που κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος, παρουσία ξανθοσίνης, ενεργοποιεί τη μεταγραφή των παραπάνω δύο γονιδίων (Seeger *et al.*, 1995). Στο *C. freundii*, σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση, εντοπίζεται ένας ομόλογος μεταφορέας του ΧαρΒ, ο CfΧαρΒ. Το *cfXapB* ομαδοποιείται με δύο γονίδια ομόλογα των *xapA* και *xapR* της *E. coli*, με ταυτότητες 88% και 81%, αντίστοιχα (**Παράρτημα 4.2.2**).

3.5.2. Γονίδια που δεν εντοπίζονται σε οπερόνια μεταβολισμού νουκλεοσιδίων

Το *nupC* της *E. coli* εντοπίζεται σε ένα γενετικό τόπο, του οποίου τα γονίδια δεν έχουν κάποια λειτουργική συσχέτιση με τον μεταβολισμό νουκλεοσιδίων. Έχουν εντοπιστεί τρία ομόλογα γονίδια του *nupC*, δύο στο γονιδίωμα της *K. pneumoniae*, τα *kpNupC* και *kpNupC2* και ένα στο γονιδίωμα του *C. freundii*, το *cfNupC*. Από αυτά, τα *cfNupC* και *kpNupC* εμφανίζουν πολύ υψηλό βαθμό συντήρησης στις γονιδιωματικές περιοχές, γεγονός που σε συνδυασμό με τη φυλογενετική του εντόπιση και τα υψηλά επίπεδα ταυτότητας των αμινοξικών αλληλουχιών τους σε σχέση με το *nupC* (94% και 98% αντίστοιχα) υποδεικνύει ότι αυτά τα γονίδια έχουν πολύ στενή εξελικτική σχέση μεταξύ τους και πιθανώς να είναι ορθόλογα (**Παράρτημα 4.1.1**).

Το γονίδιο *nupG* εντοπίζεται σε ένα οπερόνιο, στο οποίο ομαδοποιείται με τρία γονίδια, τα *mutY*, *gggX* και *mltC*. Αυτά κωδικοποιούν κατά σειρά για μια DNA γλυκοσυλάση ειδική για αδενίνη (A/G specific adenine glycosylase), μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με βιοσύνθεση και επιδιόρθωση των πρωτεϊνών σιδήρου-θείου (Fe-S cluster biosynthesis and repair protein) και μια τρανσγλυκοσυλάση μωρεΐνης (membrane-bound lytic murein transglycosylase) (Gifford and Wallace, 1999). Στα γονιδιώματα των *C. freundii* και *K. pneumoniae* βρέθηκαν δύο ομόλογα γονίδια, τα *cfNupG* και *kpNupG*, τα οποία ομαδοποιούνται με γονίδια ομόλογα των *mutY*, *gggX* και *mltC* της *E. coli*, με επίπεδα ταυτότητας 87-91% για τα ομόλογα της *K. pneumoniae* και 91-93% για τα ομόλογα του *C. freundii* (**Παράρτημα 4.2.1**).

Το γονίδιο *yegT* εντοπίζεται σε ένα οπερόνιο όπου συνεκφράζεται με δύο γονίδια, τα *yegU* και *yegV*, που κωδικοποιούν για μια δυνητική ADP-ριβουσογλυκοϋδρολάση και μια δυνητική κινάση σακχάρων, αντίστοιχα. Από την φυλογενετική ανάλυση προέκυψαν τέσσερα ομόλογα γονίδια του *yegT*, τρία στο γονιδίωμα του *C. freundii* και ένα στο γονιδίωμα της *K. pneumoniae*. Από αυτά, το γονίδιο *cfYegT* του *C. freundii* ομαδοποιείται με δύο γονίδια ομόλογα των *yegU* και *yegV* (Εικόνα 3.2.3.2), με ταυτότητες 87% και 80%, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι γενετικοί τόποι των γονιδίων των Cf-Yeg-x και Cf-Yeg-1 του *C. freundii* και Kp-Yeg-1 του *K. pneumoniae*, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως εξελικτικά απομακρυσμένοι ομόλογοι του YegT, παρουσιάζουν τελείως διαφορετική οργάνωση (**Παράρτημα 4.2.3**).

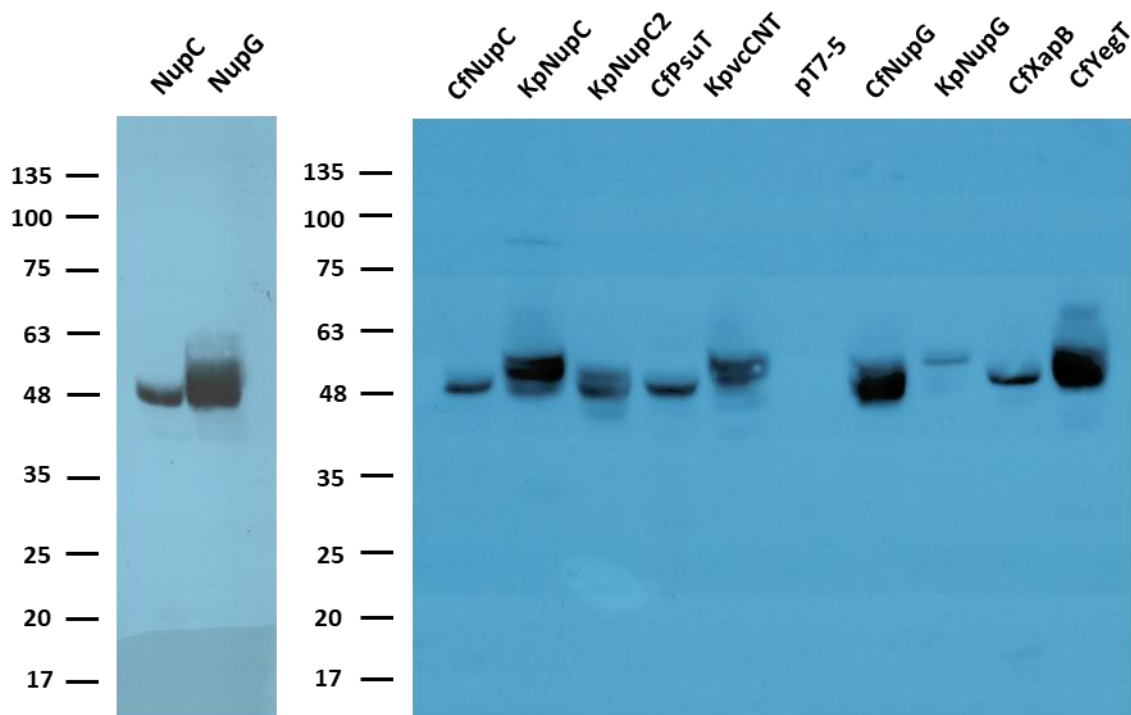
Η τελευταία περίπτωση γενετικού τόπου που εξετάσαμε είναι αυτή του γονιδίου του *KrncCNT*, από την *K. pneumoniae*. Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση, το *krncCNT* είναι ομόλογο του *vcCNT*, του *V. cholerae*. Το *vcCNT* βρίσκεται δίπλα σε ένα οπερόνιο (οπερόνιο *deo*) που εμπλέκεται στον καταβολισμό δεοξυριβονουκλεοσιδίων πυριμιδινών ως πηγή ενέργειας. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζει ο γενετικός τόπος του *krncCNT*, καθώς

ομαδοποιείται με ένα σύμπλεγμα γονιδίων, ομόλογων αυτών του *V. cholerae*, με υψηλά επίπεδα ταυτότητας (70-80%) (Παράρτημα 4.1.3)

3.6 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των πιθανών μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS από τα *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 και *Citrobacter freundii* ATCC 8090

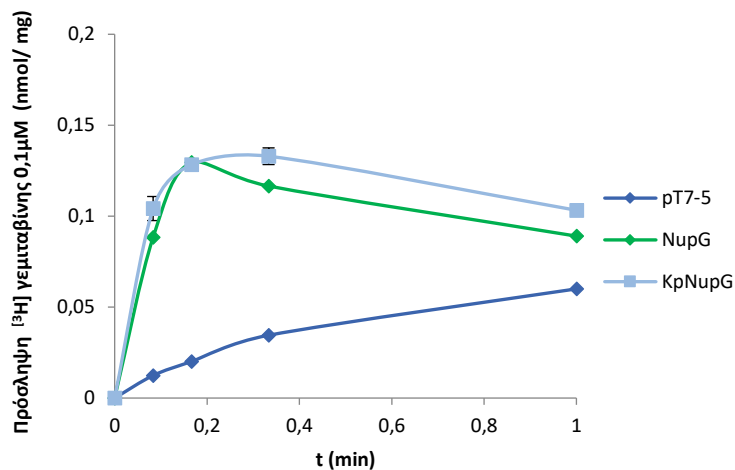
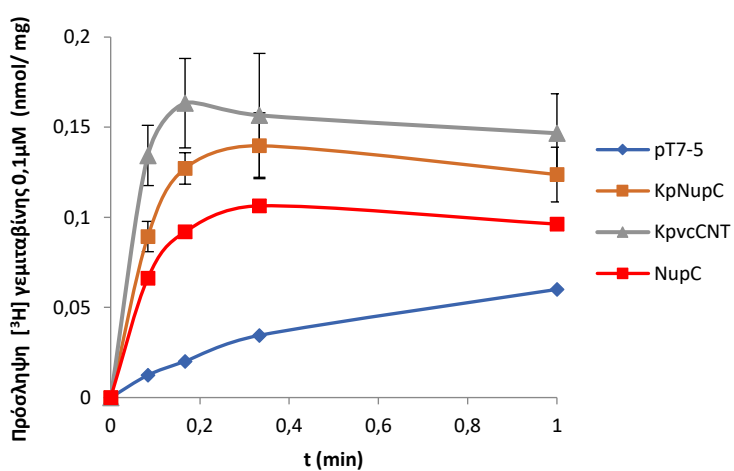
Τα γονίδια των δυνητικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων των *K. pneumoniae* και *C. freundii* κινητοποιήθηκαν με PCR από το γονιδίωμα του *K. pneumoniae* ATCC 25955 και του *C. freundii* ATCC 8090, αντίστοιχα. Κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5/BAD, που φέρει μία περιοχή δέσμησης βιοτίνης BAD (Biotin Acceptor Domain) η οποία επιτρέπει αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης με αβιδίνη – HRP (Karatza and Frillingos, 2005), και στη συνέχεια εκφράστηκαν ετερόλογα σε *E. coli*. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταφορέων ελέγχθηκαν στη μεμβράνη των κυττάρων της *E. coli* με ανοσοαποτύπωση κατά western (Εικόνα 3.7). Από το σύνολο των πιθανών μεταφορέων, οι KpNupC, CfNupG και CfYegT εμφάνισαν υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη, παρόμοια με αυτά του NupG της *E. coli*, οι CfNupC, KpNupC2, CfPsuT, KpncCNT και CfCharB έδειξαν επίσης σημαντικά αλλά χαμηλότερα επίπεδα, παρόμοια με του NupC της *E. coli*, ενώ ο KpNupG εμφανίζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.7.

Οι δυνητικοί μεταφορείς εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα μεταφοράς [³H] γεμισταβίνης, μέσω ετερόλογης έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων σε κύτταρα *E. coli* JW2389 (*ΔnupC*). Τα πειράματα ενεργού μεταφοράς έδειξαν ότι, στην περίπτωση του *C. freundii*, γεμισταβίνη μπορούν να μεταφέρουν οι CfNupC και CfNupG, όπως οι ομόλογοί τους NupC και NupG από την *E. coli*, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι CfPsuT, CfCharB και CfYegT έδειξαν ελάχιστη ενεργότητα μεταφοράς γεμισταβίνης, σε επίπεδα που προσεγγίζουν αυτά του αρνητικού μάρτυρα (Εικόνα 3.8). Στην περίπτωση της *K. pneumoniae*, γεμισταβίνη μπορούν να μεταφέρουν και οι τρεις δυνητικοί μεταφορείς των οικογενειών CNT και NHS που εξετάστηκαν. Αυτοί είναι οι KpNupC και KpNupG, οι οποίοι είναι ομόλογοι των NupC και NupG, αντίστοιχα, καθώς και ο KpncCNT (Εικόνα 3.8).

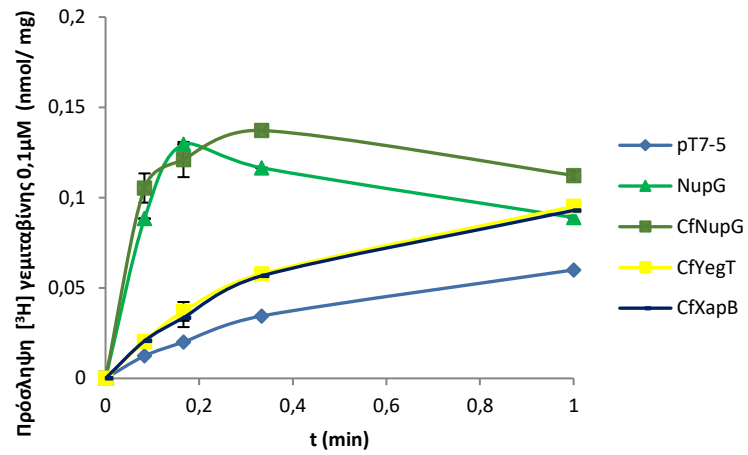
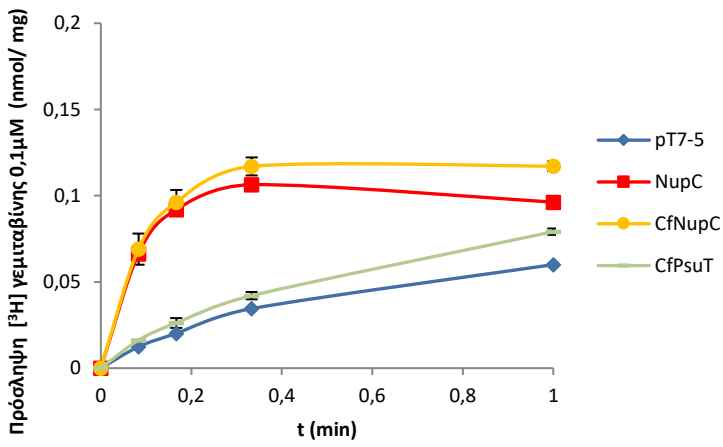


Εικόνα 3.7 : Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των ομόλογων CNT και NHS μεταφορέων από τα στελέχη *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090. Κλάσματα μεμβρανών (40 µg ολικής πρωτεΐνης ανά διαδρομή) από κύτταρα *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$), στα οποία εκφράζονται τα γονίδια των μεταφορέων από κατάλληλα πλασμίδια, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος αβιδίνης -υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000. Δίνονται οι θέσεις μετανάστευσης πρωτεϊνών πρότυπων μοριακών μαζών, σε kDa.

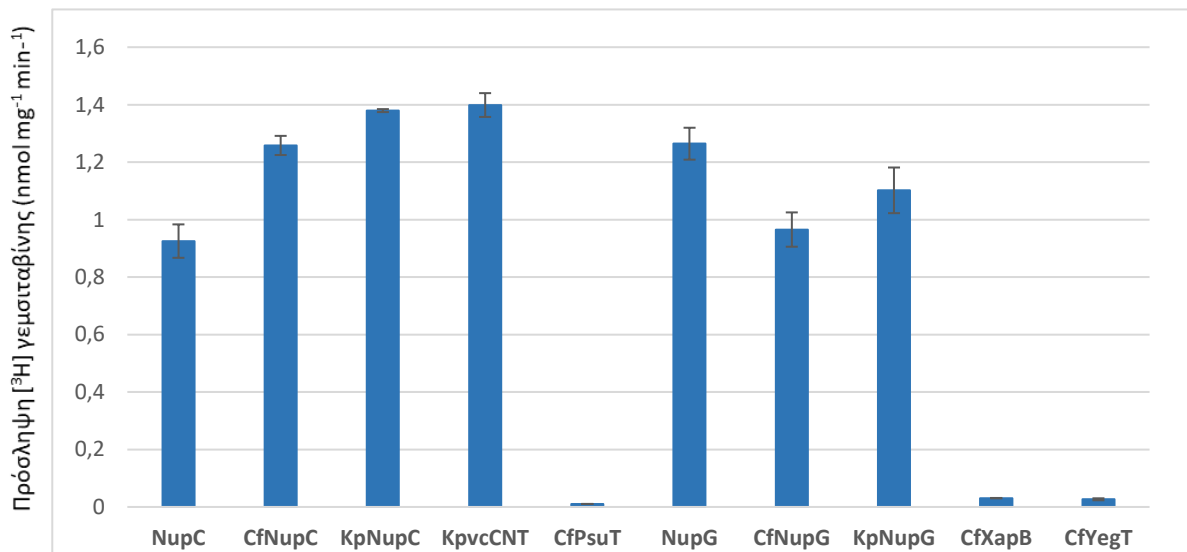
A.



B.



Γ.



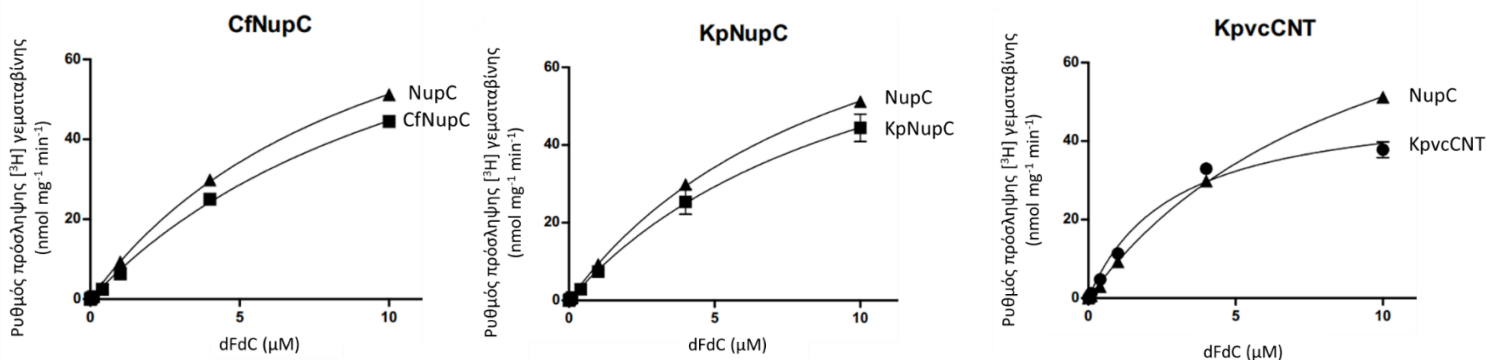
Εικόνα 3.8 : Ανάλυση ενεργότητας μεταφοράς γεμισταβίνης των ομόλογων CNT και NHS μεταφορέων από τα στελέχη (A) *C. freundii* ATCC 8090 και (B) *K. pneumoniae* ATCC 25955. Αριστερά απεικονίζονται οι ομόλογοι μεταφορείς της οικογένειας CNT ενώ δεξιά απεικονίζονται οι ομόλογοι μεταφορείς της οικογένειας NHS. *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς 0.1μΜ [³H] γεμισταβίνης, στους 25°C, pH 6.5, με τη μέθοδο ταχείας διήθησης. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που εκφράζουν τους μεταφορείς γεμισταβίνης της *E. coli* NupC και NupG ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο pT7-5/BAD, χωρίς την ένθεση γονιδίου. Γ. Φαίνονται τα αποτελέσματα από τις τιμές της αρχικής ταχύτητας (όπως μετρήθηκε σε χρόνους 5sec). Προηγείται η

ομάδα των ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας CNT και ακολουθεί η ομάδα των ομόλογων μεταφορέων της οικογένειας NHS. Από τα δεδομένα έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Οι μετρήσεις για κάθε πείραμα επαναλήφθηκαν 2 φορές και οι τιμές που φαίνονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους των μετρήσεων μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις (SD).

Οι μεταφορείς που βρέθηκε ότι μπορούν να μεταφέρουν το υπόστρωμα στη συγκέντρωση 0.1 μM (Εικόνα 8) εξετάστηκαν στη συνέχεια ως προς την ικανότητα μεταφοράς σε εύρος συγκεντρώσεων 0.04 – 40 μM [^3H] γεμισαβίνης, πραγματοποιώντας κινητική ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι CfNupC και KpNupC εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για τη γεμισαβίνη (K_M 12.76 \pm 1.26 μM και K_M 10.85 \pm 2.01 μM αντίστοιχα), ενώ η μέγιστη ενεργότητα μεταφοράς ήταν $V_{\text{max}} = 101.6 \pm 6.25 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ για τον CfNupC και $V_{\text{max}} = 92.8 \pm 10.15 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ για τον KpNupC (Εικόνα 9). Παρόμοια εικόνα εμφανίζει ο NupC της *E. coli* (K_M 9.8 μM , $V_{\text{max}} = 101.8 \pm 3.28 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Εικόνα 3.9). Για τον KpvcCNT (ο οποίος εμφανίζει ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων 31% με τον NupC της *E. coli*), η κινητική ανάλυση έδειξε ότι μεταφέρει γεμισαβίνη με υψηλή συγγένεια (K_M 2.8 μM), ενώ η μέγιστη ενεργότητα μεταφοράς ήταν $V_{\text{max}} = 50.7 \pm 3.06 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

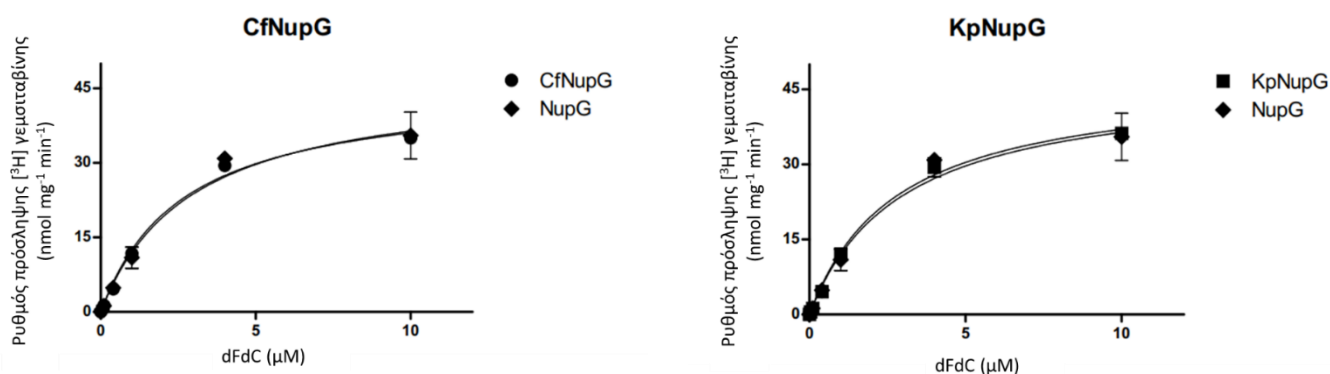
Στην περίπτωση των ομόλογων μεταφορέων που ανήκουν στην οικογένεια NHS, βρέθηκε ότι οι CfNupG και KpNupG μεταφέρουν γεμισαβίνη επίσης με υψηλή συγγένεια (K_M 2.65 \pm 0.29 μM και K_M 2.79 \pm 0.27 μM αντίστοιχα), υψηλότερη των μεταφορέων από την οικογένεια CNT (με εξαίρεση τον KpvcCNT με τον οποίο εμφανίζουν παρόμοιες K_M), ενώ η μέγιστη ενεργότητα μεταφοράς ήταν $V_{\text{max}} = 45.61 \pm 1.78 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ για τον CfNupG και $V_{\text{max}} = 47.35 \pm 1.83 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ για τον KpNupG (Εικόνα 9). Όμοιες ιδιότητες εμφανίζει και ο NupG της *E. coli* (K_M 2.9 \pm 0.58 μM , $V_{\text{max}} = 47.09 \pm 3.37 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Εικόνα 3.9).

A.



	K_M (μM)	V_{max} ($nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu l\ min^{-1}\ mg^{-1}$)
NupC	9.8 ± 0.56	101.8 ± 3.28	10.3
CfNupC	12.76 ± 1.26	101.6 ± 6.25	7.8
KpNupC	10.85 ± 2.01	92.8 ± 10.15	8.6
KpvcCNT	2.8 ± 0.47	50.7 ± 3.06	18.1

B.



	K_M (μM)	V_{max} ($nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$)	V_{max}/K_M ($\mu l\ min^{-1}\ mg^{-1}$)
NupG	2.9 ± 0.58	47.09 ± 3.37	16.7
CfNupG	2.65 ± 0.29	45.61 ± 1.78	17.2
KpNupG	2.79 ± 0.27	47.35 ± 1.83	17.1

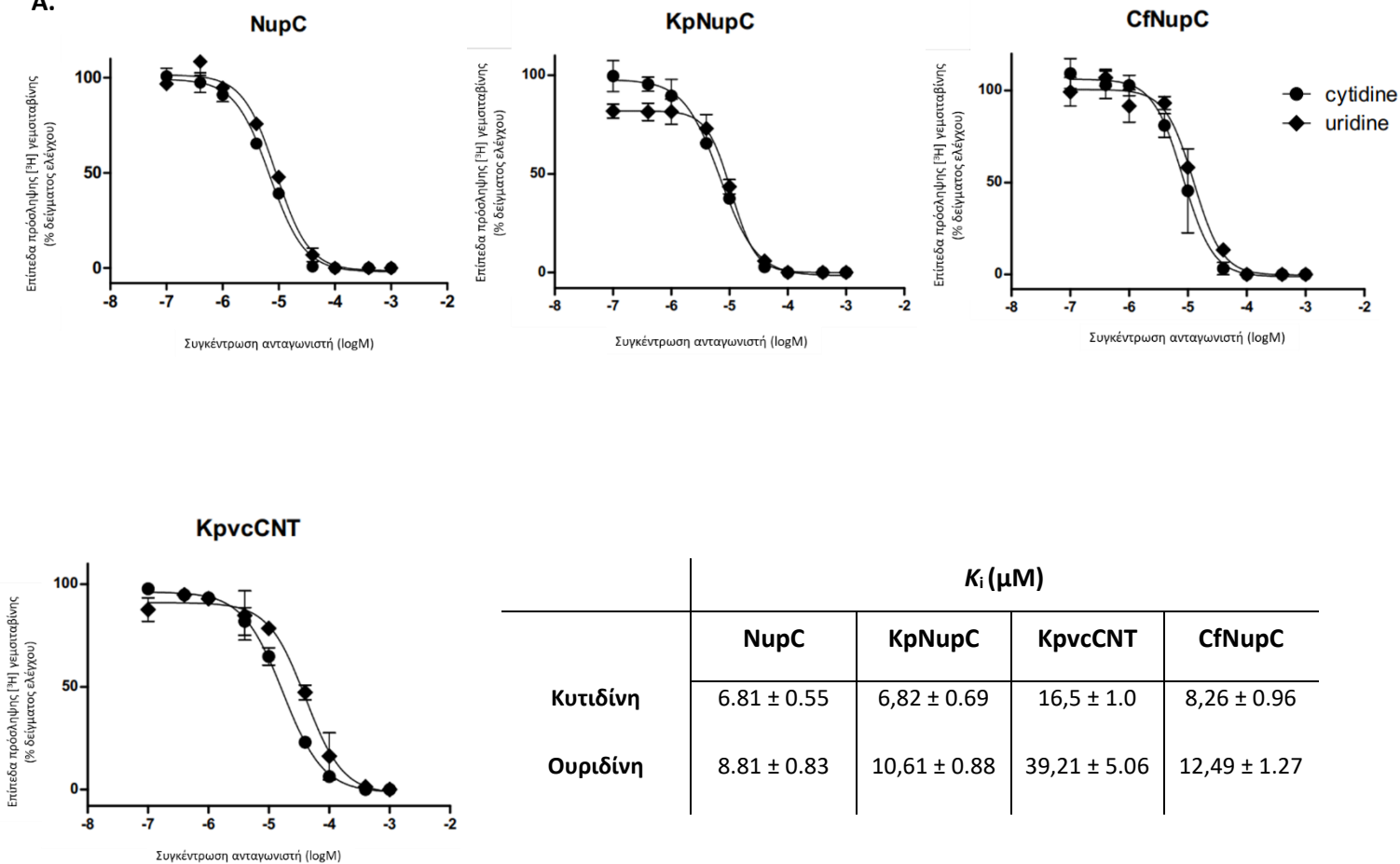
Εικόνα 3.9 : Κινητική ανάλυση των ομόλογων μεταφορέων των οικογενειών CNT (A) και NHS (B) από τα στελέχη *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090. Κύτταρα *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$) που εκφράζουν τις αντίστοιχες κατασκευές υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3H] γεμισταβίνης (0.04–40 μM), στους 25°C, pH 6.5, με τη μέθοδο ταχείας διήθησης. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης μετρήθηκε στα 5 sec (οι τιμές που φαίνονται στα διαγράμματα για κάθε συγκέντρωση dFdC είναι μέσοι όροι από δύο μετρήσεις με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις τους). Από τα δεδομένα έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές K_M και V_{max}

εξάγονται από διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism6, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

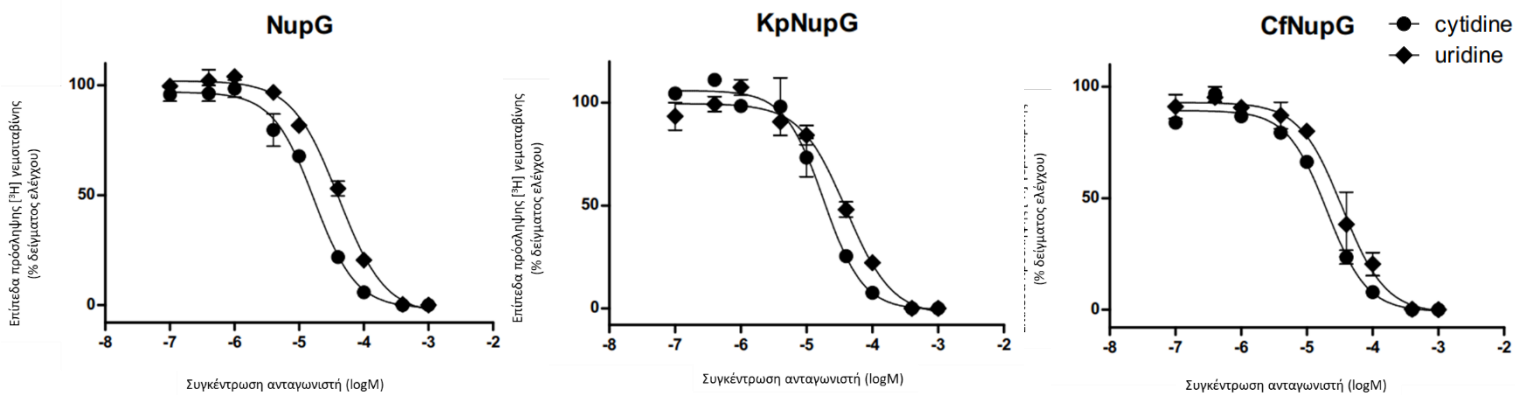
Ακολούθησαν πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης 0.1 μM [^3H] γεμισταβίνης από τα φυσικά νουκλεοσίδια ουριδίνη και κυτιδίνη σε ένα εύρος τελικών συγκεντρώσεων 0.1 μM – 1 mM , με σκοπό να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) και στη συνέχεια εξ αυτών οι τιμές K_i (**Εικόνα 3.10**). Οι τιμές K_i δηλώνουν τις σταθερές ανταγωνισμού για κάθε πιθανό προσδέτη ή υπόστρωμα και δίνουν ένα πρώτο μέτρο της συγγένειας δέσμησης: όσο πιο μικρή η K_i τόσο πιο μεγάλη η φαινομενική συγγένεια δέσμησης του προσδέτη στο μεταφορέα. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ενεργότητα πρόσληψης γεμισταβίνης αναστέλλεται με υψηλή συγγένεια και από τις δύο ενώσεις, για το σύνολο των μεταφορέων που εξετάσαμε. Η κυτιδίνη αναγνωρίζεται από τους μεταφορείς ισχυρότερα σε σχέση με την ουριδίνη, ενώ οι τιμές K_i των μεταφορέων NHS και CNT από τα *C. freundii* και *K. pneumoniae* είναι παραπλήσιες με των αντίστοιχων ομόλογων μεταφορέων της *E. coli*.

Στην περίπτωση των μεταφορέων της οικογένειας CNT, οι KpNupC και CfNupC αναγνωρίζουν ισχυρά τόσο την κυτιδίνη ($K_i < 10 \mu\text{M}$), όσο και την ουριδίνη (K_i 10 έως 13 μM), με τιμές K_i , παρόμοιες με αυτές του NupC της *E. coli*. Αντίθετα, οι δύο ενώσεις δεσμεύονται λιγότερο ισχυρά στην περίπτωση του KpncCNT, ο οποίος εμφανίζει περίπου 3 φορές υψηλότερο K_i στην περίπτωση της κυτιδίνης και περίπου 5 φορές υψηλότερο K_i στην περίπτωση της ουριδίνης, σε σχέση με τον NupC. Οι μεταφορείς της οικογένειας NHS αναγνωρίζουν λιγότερο ισχυρά και τις δύο ενώσεις, σε σχέση με τους μεταφορείς της οικογένειας CNT. Συγκεκριμένα, οι KpNupG και CfNupG εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια δέσμησης για την κυτιδίνη (K_i 17-20 μM) σε σχέση με την ουριδίνη (K_i 33-39 μM), ενώ οι τιμές K_i για τις δύο ενώσεις είναι παραπλήσιες με αυτές του NupG της *E. coli* (**Εικόνα 3.10**).

A.



B.



	K_i (μM)		
	NupG	KpNupG	CfNupG
Κυτιδίνη	16,58 \pm 1.83	17,59 \pm 2.11	19,54 \pm 1.97
Ουριδίνη	39,41 \pm 3.50	38,60 \pm 4.8	33,40 \pm 4.33

Εικόνα 3.10: Ανταγωνισμός πρόσληψης [^3H] γεμισταβίνης από κυτιδίνη και ουριδίνη στους ομόλογους μεταφορείς των οικογενειών CNT (A) και NHS (B) από τα από τα στελέχη *K. Pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090. Απεικονίζονται κατά σειρά οι ομόλογοι μεταφορείς των οικογενειών CNT (A) και NHS (B). Κύτταρα *E. coli* JW2389 ($\Delta nupC$) υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] γεμισταβίνης (0.1 μM , 25 $^\circ\text{C}$) για 5 sec, έπειτα από επώαση με μη σημασμένη ουριδίνη (ρόμβοι) ή κυτιδίνη (κύκλοι) (0.1 μM – 1mM). Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης μετρήθηκε στα 5 sec (οι τιμές που φαίνονται στα διαγράμματα για κάθε συγκέντρωση ουριδίνης ή κυτιδίνης είναι μέσοι όροι από δύο μετρήσεις με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις τους). Οι τιμές IC₅₀ εξήχθησαν μετά από προσαρμογή των δεδομένων στην κατάλληλη εξίσωση για σιγμοειδή καμπύλη με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 6. Από τα δεδομένα έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τον τύπο των Cheng and Prusoff, $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + (L/K_m)]$, όπου L είναι η τιμή της συγκέντρωσης της [^3H] γεμισταβίνης και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 2 πειράματα, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις.

Κεφάλαιο 4 : Συζήτηση

Συνεισφορά της διατριβής στην ανάδειξη βακτηριακών μεταφορέων γεμισταβίνης (dFdc) του ανθρώπινου μικροβιώματος που εμπλέκονται στην πρόσληψη του φαρμάκου.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ανεύρεση και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός μεταφορέων γεμισταβίνης από τα βακτηριακά στελέχη *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090, των οποίων η παρουσία στο μικροπεριβάλλον PDAC όγκων έχει συσχετισθεί με επιπλοκές στη δράση της γεμισταβίνης (Geller *et al.*, 2017). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη διαμεμβρανική πρόσληψη του φαρμάκου (αλλά ούτε και για τους μεταφορείς νουκλεοσιδίων εν γένει) από τα παραπάνω είδη (*Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii*) και οι μόνες πληροφορίες που έχουμε σχετικά με την πρόσληψη του φαρμάκου από βακτήρια προέρχονται από δύο μελέτες σχετικά με το μεταφορέα NurC της *E. coli*. Στην πρώτη μελέτη, εξετάζεται η μεταφορά του φαρμάκου από το NurC μέσω ετερόλογης έκφρασης σε ωκύτταρα *Xenopus laevis*, σε pH 5.5, 20 °C, και παρατηρείται ότι η γεμισταβίνη μεταφέρεται αποτελεσματικά από το NurC (Loewen *et al.*, 2009). Στη δεύτερη μελέτη, στελέχη *E. coli* από τα οποία απουσιάζουν γονίδια πιθανών μεταφορέων (Δ nurC, Δ nurX, ή Δ nurG) καλλιεργήθηκαν παρουσία του φαρμάκου, τα κύτταρα απομακρύνθηκαν και το ελεύθερο κυττάρων υπερκείμενο προστέθηκε σε καλλιέργεια ανθρώπινων παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, των οποίων η ανάπτυξη παρακολουθείτο μέσω GFP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κύτταρα *E. coli* Δ nurC, ο μεταβολισμός της γεμισταβίνης αναστέλλεται εν μέρει, γεγονός που δείχνει ότι τα βακτήρια εσωτερικεύουν το φάρμακο πριν το μεταβολίσουν και ότι ο NurC σχετίζεται με την πρόσληψη του φαρμάκου από την *E. coli* (Geller *et al.*, 2017).

Εμείς προκειμένου να ταυτοποιήσουμε και να εξετάσουμε τους πιθανούς μεταφορείς γεμισταβίνης εκμεταλλευτήκαμε το γεγονός ότι στο εργαστήριο μας μελετώνται οι μεταφορείς νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων της *E. coli* K-12. Τα αποτελέσματά μας έχουν δείξει ότι οι κύριοι μεταφορείς γεμισταβίνης είναι ο NurC (οικογένεια CNT) και NurG (οικογένεια NHS). Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα αυτά πραγματοποιήσαμε φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων των μεταφορέων νουκλεοσιδίων από τα γονιδιώματα των βακτηριακών ειδών που μας ενδιαφέρουν. Στη συνέχεια, οι ομόλογοι μεταφορείς που προέκυψαν, ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα πρόσληψης του φαρμάκου μέσω ετερόλογης έκφρασης σε κύτταρα *E. coli*.

Νέοι μεταφορείς γεμισταβίνης των οικογενειών CNT και NHS από τα στελέχη *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090.

Αναλύσαμε λειτουργικά οκτώ μεταφορείς. Αυτοί είναι οι KpNupC, KpncCNT (CNT) και KpNupG (NHS) από το στέλεχος *K. pneumoniae* ATCC 25955 και οι CfNupC, CfPsuT (CNT) και CfNupG, CfΧαρB CfPsuT (NHS) από το *C. freundii* ATCC 8090. Από αυτούς, βρήκαμε ότι γεμισταβίνη μεταφέρουν οι KpNupC, KpncCNT, KpNupG, CfNupC και CfNupG.

Από τη φυλογενετική ανάλυση, οι μεταφορείς KpNupC και CfNupC, από την οικογένεια CNT, ταυτοποιήθηκαν ως πιθανοί ορθόλογοι του NupC της *E. coli*. Οι δύο περμεάσες μεταφέρουν γεμισταβίνη με υψηλή συγγένεια παρόμοια με τον NupC (K_M 10-13 μ M), ενώ βρέθηκε ότι, όπως και ο NupC, αναγνωρίζουν επίσης με υψηλή συγγένεια τα φυσικά νουκλεοσίδια πυριμιδινών, με την κυτιδίνη (K_i 6-9 μ M) να αναγνωρίζεται ισχυρότερα από την ουριδίνη (K_i 10-13 μ M). Αντίστοιχα στην οικογένεια NHS, οι μεταφορείς KpNupG και CfNupG είναι πιθανοί ορθόλογοι του NupG της *E. coli*. Οι δύο αυτές περμεάσες μεταφέρουν γεμισταβίνη με υψηλή συγγένεια, παρόμοια με τον NupG (K_M 2-3 μ M), ενώ, όπως και ο NupG, αναγνωρίζουν επίσης με υψηλή συγγένεια τα φυσικά νουκλεοσίδια πυριμιδινών, με την κυτιδίνη να αναγνωρίζεται ισχυρότερα (K_i 17-20 μ M, 27 μ M στον NupG) σε σχέση με την ουριδίνη (K_i 33-39 μ M, 51 μ M στον NupG).

Τα αποτελέσματά μας, αντίθετα από ό,τι γνωρίζαμε μέχρι τώρα, δείχνουν ότι στην πρόσληψη γεμισταβίνης από τα βακτήρια εμπλέκεται και μια δεύτερη ομάδα μεταφορέων εκτός της CNT, η NHS, τρία μέλη της οποίας (NupG, KpNupG, CfNupG) δείξαμε ότι μπορούν να μεταφέρουν γεμισταβίνη. Η οικογένεια NHS, σε αντίθεση με τη CNT, περιορίζεται στα βακτήρια και ακολουθεί διαφορετικό δομικό πρότυπο και διαφορετικό μηχανισμό μεταφοράς υποστρώματος. Τα δεδομένα μας δείχνουν επίσης ότι οι μεταφορείς της οικογένειας NHS αναγνωρίζουν πιο ισχυρά και μεταφέρουν πιο αποτελεσματικά τη γεμισταβίνη σε σχέση με τους μεταφορείς της οικογένειας CNT (οι NupG/KpNupG/CfNupG έχουν υποπενταπλάσιες K_M από τους NupC/KpNupC/CfNupC). Αντίθετα, οι μεταφορείς της οικογένειας CNT αναγνωρίζουν πιο ισχυρά την κυτιδίνη και την ουριδίνη (οι NupG/KpNupG/CfNupG έχουν περίπου τριπλάσιες K_i από τους NupC/KpNupC/CfNupC, τόσο για την κυτιδίνη όσο και για την ουριδίνη).

Στις μελέτες όπου έχει γίνει χαρακτηρισμός των βακτηριακών ειδών στον καρκίνο του παγκρέατος (Geller *et al.*, 2017, Nejman *et al.*, 2020) έχει βρεθεί ότι η πλειοψηφία των βακτηριακών ειδών που εντοπίστηκαν στα δείγματα των όγκων είναι γ-Πρωτεοβακτήρια και ανήκουν στις τάξεις των Enterobacteriales και Pseudomonadales. Η δική μας φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι στα είδη που ανήκουν στην τάξη των Pseudomonadales δεν εντοπίστηκαν ομόλογοι μεταφορείς των οικογενειών CNT και NHS. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το *Pseudomonas Putida* στηρίζεται σε μεταφορείς άλλων οικογενειών προκειμένου να προσλάβει

νουκλεοσίδια και νουκλεοτιδικές βάσεις. Για την ακρίβεια, τα πειραματικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι το *Pseudomonas Putida* έχει μεταφορείς ομόλογους των CodB και YbbW της οικογένειας NCS1 και ομόλογους των UraA και RutG της οικογένειας NAT/NCS2 της *E. coli* K-12, οι οποίοι μπορούν να μεταφέρουν την ουριδίνη (Botou, Kalfa, Anagnostopoulou and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αντίθετα, πολλά από τα είδη των Enterobacteriales έχουν γονίδια ομόλογα των NurC (CNT) και NurG (NHS), καθιστώντας τους δύο αυτούς μεταφορείς σημαντικό εργαλείο για την εύρεση πιθανών μεταφορέων γεμισταβίνης σε βακτήρια που έχουν συσχετισθεί με το φαινόμενο της ανθεκτικότητας (Geller *et al.*, 2017).

Ο τελευταίος μεταφορέας που εξετάσαμε και βρήκαμε ότι μεταφέρει το φάρμακο ανήκει στην οικογένεια CNT και είναι ο KrvnCNT. Ο KrvnCNT μεταφέρει γεμισταβίνη με υψηλότερη συγγένεια (υποπενταπλάσια K_M) και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (διπλάσια τιμή V_{max}/K_M) σε σχέση με τον μεταφορέα NurC και τους ομόλογούς του (KrvNurC, CfvNurC). Ταυτόχρονα αναγνωρίζει τις φυσικές πυριμιδίνες (κυτιδίνη, ουριδίνη) λιγότερο ισχυρά σε σχέση με το NurC (με περίπου τριπλάσιες K_i). Είναι ενδιαφέρον ότι αυτές οι κινητικές ιδιότητες του KrvnCNT ομοιάζουν περισσότερο με αυτές του NurG και των ορθολόγων του. Φυλογενετικά, ο KrvnCNT εντοπίζεται σε ξεχωριστό κλάδο σε σχέση με τον μεταφορέα NurC, από τον οποίο διαφοροποιείται ως προς τα κατάλοιπα που ευθύνονται για τη δέσμευση του υποστρώματος και βρίσκεται πιο κοντά εξελικτικά με τον μεταφορέα vcCNT του *Vibrio cholerae*, ο οποίος θεωρείται ένα εξαιρετικό μοριακό πρότυπο για την μελέτη των ανθρώπινων CNT μεταφορέων (Johnson *et al.*, 2014).

Οι υπόλοιποι μεταφορείς που εξετάσαμε (CfPsuT, CfXarB, CfYegT) ανήκουν στο *C. freundii* ATCC 8090 και ενώ βρήκαμε ότι εκφράζονται στη μεμβράνη της *E. coli*, δεν μεταφέρουν γεμισταβίνη. Από αυτούς, ο CfPsuT ταυτοποιήθηκε ως στενά συγγενικός με το PsuT της *E. coli*, ο οποίος θεωρείται πιθανός μεταφορέας ψευδουριδίνης (Preumont *et al.*, 2008). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το CfPsuT (*cfPsuT*) ανήκει σε ένα οπερόνιο με γονίδια που σχετίζονται με τον καταβολισμό της ψευδουριδίνης και είναι ομόλογα αυτών του αντίστοιχου οπερονίου του *psuT* στην *E. coli*.

Ο CfXarB είναι ομόλογος του XarB της *E. coli*, για τον οποίο τα πειραματικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έχουν δείξει ότι είναι ένας μεταφορέας ειδικός για την ξανθοσίνη (Anagnostopoulou, Botou, and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ταυτόχρονα, ο CfXarB μοιράζεται 58% ταυτότητα με τους μεταφορείς KrvNurG και CfvNurG και διατηρεί τα κατάλοιπα που ευθύνονται για τη δέσμευση του υποστρώματος. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ίσως υπάρχουν και άλλα κατάλοιπα, περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης, τα οποία δεν είναι

γνωστά και αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα. Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε τη μοριακή βάση αυτής της διαφοράς, χρειάζεται να γνωρίζουμε τα προφίλ εξειδίκευσης των δύο μεταφορέων και έπειτα μπορούμε να προχωρήσουμε σε μελέτες μεταλλαξιγένεσης, μέσω των οποίων θα συσχετίσουμε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα με τα διακριτά προφίλ αναγνώρισης των υποστρωμάτων.

Μεταφορέας	Υπόστρωμα	K_m (μM)	Σύστημα έκφρασης	Βιβλιογραφική αναφορά
hCNT1 (SLC28A1)	dFdC Ουριδίνη Κυτιδίνη	17 18 33 23	Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Κυτταρικές σειρές HeLa Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i>	Mackey <i>et al.</i> , 1999 Mackey <i>et al.</i> , 1998 Young <i>et al.</i> , 2013 Young <i>et al.</i> , 2013
hCNT2 (SLC28A2)	dFdC Ουριδίνη Κυτιδίνη	- 40 -	<i>Δεν υπήρξε ενεργότητα μεταφοράς σε ωκύτταρα Xenopus laevis ή κυτταρικές σειρές HeLa</i> Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i>	Ritzel <i>et al.</i> , 2001 Young <i>et al.</i> , 2013 Loewen <i>et al.</i> , 1999
hCNT3 (SLC28A3)	dFdC Ουριδίνη Κυτιδίνη	60 22 15	Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i>	Hu <i>et al.</i> , 2006 Ritzel <i>et al.</i> , 2001 Ritzel <i>et al.</i> , 2001
hENT1 (SLC29A1)	dFdC Ουριδίνη Κυτιδίνη	160 330 230 240 580	Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Κυτταρικές σειρές HeLa Ανθρώπινη παγκρεατική καρκινική σειρά NP31 Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Κυτταρική σειρά PK15 από νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα χοίρου	Mackey <i>et al.</i> , 1999 Mackey <i>et al.</i> , 1998 Garcia-Manteiga <i>et al.</i> , 2003 Young <i>et al.</i> , 2013 Ward <i>et al.</i> , 1999
hENT2 (SLC29A2)	dFdC Ουριδίνη Κυτιδίνη	740 830 200 5610	Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> Κυτταρικές σειρές HeLa Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> PK15 swine kidney tubular epithelial cell line	Mackey <i>et al.</i> , 1999 Mackey <i>et al.</i> , 1998 Young <i>et al.</i> , 2013 Ward <i>et al.</i> , 1999
hENT3 (SLC29A3)	Κυτιδίνη dFdC Ουριδίνη	- - 2000	<i>Το μετάλλαγμα hENT3AA μεταφέρει γεμισταβίνη και κυτιδίνη, ωστόσο δεν έχουν προσδιοριστεί οι σταθερές συγγένειας K_M</i> Ωκύτταρα <i>Xenopus laevis</i>	Baldwin <i>et al.</i> , 2005 Young <i>et al.</i> , 2013
hENT4 (SLC29A4)	dFdC Ουριδίνη Κυτιδίνη	-	<i>Ο hENT4 είναι μεταφορέας μονοαμινών και αδενোসίνης</i>	Wang, 2016

Πίνακας 4.1: Επιλεκτικότητες πυριμιδινικών υποστρωμάτων και τιμές K_m των ανθρώπινων μεταφορέων των οικογενειών SLC28 (CNT) και SLC29 (ENT).

Το γονίδιο του CfYegT ανήκει σε ένα οπερόνιο του οποίου η λειτουργία δεν έχει προσδιοριστεί και είναι στενά συγγενικό του YegT της *E. coli*. Τα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έχουν δείξει μέχρι στιγμής ότι ο YegT δεν μπορεί να μεταφέρει κάποιο νουκλεοσίδιο (Anagnostopoulou, Botou, and Frillingos, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Οι βακτηριακοί μεταφορείς αναγνωρίζουν τη γεμισταβίνη με υψηλότερη συγγένεια σε σχέση με τους ανθρώπινους.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η γεμισταβίνη αποτελεί την κύρια θεραπεία κατά του καρκίνου του παγκρέατος. Εξαιτίας της εμπλοκής των ανθρώπινων μεταφορέων στην πρόσληψη της γεμισταβίνης από τα καρκινικά κύτταρα αλλά και στην απόκριση στη θεραπεία, έχουν γίνει εκτενείς μελέτες γύρω από τους ανθρώπινους μεταφορείς όπου εξετάζονται τα πρότυπα έκφρασης, οι σχέσεις δομής-λειτουργίας τους καθώς και η ρύθμισή τους (Govindarajan *et al.*, 2022, Carter *et al.*, 2021).

Υπάρχουν δύο οικογένειες μεταφορέων νουκλεοσιδίων στον άνθρωπο. Η οικογένεια SLC28 (CNT) με 3 μέλη, τους hCNT1-3 και η οικογένεια SLC29 (ENT) με 4 μέλη, τους hENT1-4 (Amrutkar and Gladhaug, 2017). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η γεμισταβίνη είναι υπόστρωμα για πέντε μεταφορείς νουκλεοσιδίων, τους hCNT1, hCNT2, hCNT3 καθώς και τους hENT1 και hENT2 (Mini *et al.* 2006). Στον Πίνακα 4.1 συνοψίζονται οι τιμές K_M καθώς και η επιλεκτικότητα των hCNT και hENT ως προς τη γεμισταβίνη και τα φυσικά πυριμιδινικά νουκλεοσίδια (ουριδίνη και κυτιδίνη).

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 4.1, οι μεταφορείς της οικογένειας CNT παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια για τα πυριμιδινικά νουκλεοσίδια (ουριδίνη, κυτιδίνη, γεμισταβίνη) σε σχέση με τους μεταφορείς της οικογένειας ENT. Για την ακρίβεια, υψηλότερη συγγένεια για τη γεμισταβίνη έχει ο hCNT1 (K_M 17-18 μM) που είναι εκλεκτικός για νουκλεοσίδια πυριμιδινών και έπειτα ο hCNT3 (K_M 60 μM), ο οποίος μεταφέρει νουκλεοσίδια τόσο πουρινών όσο και πυριμιδινών. Οι δυο μεταφορείς αναγνωρίζουν και τα φυσικά νουκλεοσίδια πυριμιδινών (κυτιδίνη και ουριδίνη) με υψηλή συγγένεια.

Στην περίπτωση της οικογένειας ENT, γεμισταβίνη μεταφέρουν οι ευρείας εξειδίκευσης περμεάσες hENT1 και hENT2, όμως με χαμηλή συγγένεια (K_M 160-330 μM για τον hENT1 και K_M 740 μM για τον hENT2). Ο μεταφορέας hENT3 δεν μεταφέρει γεμισταβίνη, σε αντίθεση με το μετάλλαγμα hENT3AA. Για την ακρίβεια, ο hENT3 φέρει στο αμινοτελικό του άκρο μια αλληλουχία μήκους 51 αμινοξέων, στην οποία υπάρχει ένα μοτίβο με δύο λευκίνες που οδηγεί σε ενδοκυτταρική στόχευση στα λυσοσώματα, τα ενδοσώματα και πιθανώς τα μιτοχόνδρια. Η μεταλλαξιγένεση των λευκινών σε αλανίνες (περίπτωση hENT3AA) έχει σαν αποτέλεσμα την

έκφραση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη (Baldwin *et al.*, 2005, Govindarajan *et al.*, 2022). Για το μετάλλαγμα hENT3AA λοιπόν, έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζει και μεταφέρει τη γεμισταβίνη, χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί η σταθερά K_M (Baldwin *et al.*, 2005). Τέλος, ο μεταφορέας μονοαμινών και αδενοσίνης hENT4, δεν αναγνωρίζει κανένα από τα πυριμιδινικά υποστρώματα (Baldwin *et al.*, 2005).

Μεταφορέας	Υπόστρωμα	K_M (μM)	Σύστημα έκφρασης
NupC <i>E. coli</i> K-12	dFdC	9.8 6.3*	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC) Ωοκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> (ref. 1)
	Ουριδίνη	13.6 10*	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC) Ωοκύτταρα <i>Xenopus laevis</i> (ref. 1)
	Κυτιδίνη	14.4	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
CfNupC <i>C. freundii</i> ATCC 8090	dFdC	12.76	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Ουριδίνη	12.49**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Κυτιδίνη	8.26**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
KpNupC <i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	dFdC	10.85	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Ουριδίνη	10.61**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Κυτιδίνη	6.82**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
KpvcCNT <i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	dFdC	2.8	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Ουριδίνη	39.21**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Κυτιδίνη	16.5**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
NupG <i>E. coli</i> K-12	dFdC	2.9	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Ουριδίνη	50.8**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
		24.4*	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (ref. 2)
		23.6*	<i>E. coli</i> BLR (ref. 3)
Κυτιδίνη	26.9**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)	
CfNupG <i>C. freundii</i> ATCC 8090	dFdC	2.65	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Ουριδίνη	33.40**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Κυτιδίνη	19.54**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
KpNupG <i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	dFdC	2.79	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Ουριδίνη	38.6**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)
	Κυτιδίνη	17.59**	<i>E. coli</i> JW2389 (Δ nupC)

Πίνακας 4.2: Επιλεκτικότητες πυριμιδινικών υποστρωμάτων και τιμές K_M των βακτηριακών μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS από τα στελέχη *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* ATCC 25955 και *C. freundii* ATCC 8090.

*Τιμές K_M από πειράματα των (1) Loewen *et al.*, 2009, (2) Vaziri *et al.*, 2013, (3) Xie *et al.*, 2004

**Σταθερές αναστολής K_i που προέρχονται από πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης 0.1 μM [3 H] γεμισταβίνης από ουριδίνη και κυτιδίνη.

Οι αναγραφόμενες τιμές K_M και K_i είναι οι μέσοι όροι από τουλάχιστον δύο πειράματα με τυπικές αποκλίσεις (S.D.) <20%

Συγκρίνοντας με τα δικά μας αποτελέσματα για τους βακτηριακούς μεταφορείς (Πίνακας 4.2), φαίνεται ότι οι ανθρώπινοι CNT μεταφορείς εμφανίζουν ίδιας τάξης μεγέθους τιμές K_M σε σχέση με τους βακτηριακούς ομόλογους της οικογένειας CNT. Συγκεκριμένα, οι hCNT1 και hCNT3 αναγνωρίζουν τη γεμισιταβίνη αλλά και κυτιδίνη και ουριδίνη, με συγγένεια παρόμοια με τους NurC, CfNurC και KpNurC (παρόμοιες τιμές K_M και/ή K_i). Βλέπουμε λοιπόν ότι οι εν λόγω μεταφορείς της οικογένειας CNT δεν εμφανίζουν επιλεκτικότητα προς συγκεκριμένο πυριμιδινικό υπόστρωμα. Εξάιρεση αποτελεί ο KpncCNT, ο οποίος είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας της γεμισιταβίνης, ενώ φαίνεται να αναγνωρίζει με πολύ μικρότερη συγγένεια την κυτιδίνη (εξαπλάσια τιμή K_i σε σχέση με την K_M για την γεμισιταβίνη), και με ακόμη μικρότερη συγγένεια την ουριδίνη (δεκατετραπλάσια τιμή K_i σε σχέση με την K_M για την γεμισιταβίνη).

Τα μέλη της οικογένειας NHS, σε αντίθεση τόσο με τους ανθρώπινους όσο και με τους βακτηριακούς CNT μεταφορείς (εξαιρουμένου του KpncCNT), εμφανίζουν διαφορετικό προφίλ επιλεκτικότητας, όσον αφορά τα πυριμιδινικά υποστρώματα. Οι NHS αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια τη γεμισιταβίνη, με σημαντικά μικρότερη συγγένεια την κυτιδίνη και με ακόμη μικρότερη συγγένεια την ουριδίνη, προσομοιάζοντας το προφίλ του KpncCNT (Πίνακας 4.2).

Η περίπτωση της οικογένειας ENT είναι διαφορετική, καθώς τα μέλη της έχουν πολύ χαμηλότερη συγγένεια για τη γεμισιταβίνη, συγκριτικά με τους βακτηριακούς μεταφορείς είτε της οικογένειας NHS είτε της οικογένειας CNT. Παρόλα αυτά, ως κύριος μεταφορέας της γεμισιταβίνης εντός των παγκρεατικών κυττάρων θεωρείται ο hENT1 (Young *et al.*, 2013). Οι έρευνες σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι ο hENT1 είναι ο κύριος μεταφορέας του φαρμάκου, με τους υπόλοιπους μεταφορείς να ανιχνεύονται σε ελάχιστα επίπεδα, είτε μεταγραφικά είτε πρωτεϊνικά (Garcia-Manteiga *et al.*, 2003). Επίσης, σε πειράματα κυτταροτοξικότητας *in vitro*, βρέθηκε ότι η παρουσία του hENT1 είναι απαραίτητη προκειμένου να εισέλθει η γεμισιταβίνη εντός των κυττάρων (είτε σε κύτταρα της ανθρώπινης λευχαιμικής σειράς CEM είτε σε ωκύτταρα *Xenopus laevis*) και να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Mackey *et al.*, 1998, 1999).

Μελλοντικοί στόχοι

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνολικά αποδεικνύουν ότι συγκεκριμένα βακτηριακά είδη, τα οποία εντοπίζονται συχνά στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (Geller *et al.*, 2017, Neiman *et al.*, 2020), μπορούν να προσλάβουν τη γεμισιταβίνη και να τη μεταβολίσουν, έχοντας μάλιστα πλεονέκτημα σε σχέση με τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα καθώς οι

αντίστοιχοι βακτηριακοί μεταφορείς εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια σε σχέση με τους ανθρώπινους που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα.

Παρόλα αυτά, τα δεδομένα που έχουμε μέχρι στιγμής για τους βακτηριακούς μεταφορείς προέρχονται από πειράματα που έγιναν μέσω έκφρασης των μεταφορέων σε ετερόλογο σύστημα (*E. coli* JW2389) και κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (25°C, pH 6.5, συνθετικό θρεπτικό μέσο με γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα και αμμώνιο ως μοναδική πηγή αζώτου). Αντίστοιχα τα δεδομένα που έχουμε σχετικά με την πρόσληψη της γεμισταβίνης από τους ανθρώπινους μεταφορείς προέρχονται από καλλιέργειες κυττάρων *in vitro*, με ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες και διαφορετικά συστήματα έκφρασης (ωκύτταρα *Xenopus laevis*, κυτταρικές σειρές HeLa, ανθρώπινη παγκρεατική καρκινική σειρά NP31, κυτταρική σειρά PK15 από νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα χοίρου)

Βέβαια, εντός των καρκινικών όγκων επικρατούν διαφορετικές συνθήκες συγκριτικά με τους φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς. Είναι γνωστό ότι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλών επιπέδων δεσμοπλαστικής αντίδρασης (Desmoplastic reaction). Η δεσμοπλαστική αντίδραση στον όγκο υποδηλώνει την ανάπτυξη ινώδους συνδετικού ιστού γύρω από τα καρκινικά κύτταρα και δημιουργεί υποξικό και υποαγγειακό μικροπεριβάλλον (Akimoto *et al.*, 2022, Randazzo *et al.*, 2020). Σε αυτές τις συνθήκες, θα μπορούσε να επάγεται διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους βακτηριακούς μεταφορείς, με αποτέλεσμα διαφορετικά επίπεδα έκφρασής τους, όπως έχει διαπιστωθεί στην περίπτωση του hENT1 (Mackey *et al.*, 1999). Για να εξετάσουμε αυτό το ζήτημα μπορούμε να ελέγξουμε την έκφραση των μεταφορέων που μελετάμε, σε επίπεδο mRNA, σε καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από δείγματα αδενοκαρκινωμάτων του παγκρέατος.

Δεδομένου ότι τα βακτήρια που εποικίζουν τον όγκο εντοπίζονται κυρίως εντός των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Nejman *et al.*, 2020), θα χρειαστεί να επιβεβαιώσουμε ότι τα συγκεκριμένα είδη (*Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii*), των οποίων τους μεταφορείς μελετήσαμε λειτουργικά, εντοπίζονται εντός των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Αυτό μπορεί να γίνει με συνδυασμό τεχνικών όπως η χρήση φθορίζουσας χρωστικής για τους βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (LPS fluorescence staining) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Στη συνέχεια, μέσω αλληλούχισης 16S rDNA, θα ελέγξουμε για την ύπαρξη των βακτηρίων που μας ενδιαφέρουν. Κατόπιν μπορούμε να εξετάσουμε τα επίπεδα έκφρασης των ομόλογων μεταφορέων CNT και NHS των βακτηρίων που μας ενδιαφέρουν, σε επίπεδο mRNA, μέσω RT-PCR. Τα δεδομένα δεν μπορούν να μας

δώσουν πληροφορίες για τις *in vivo* συνθήκες που επικρατούν σε έναν όγκο, όμως μπορούν να είναι ένας αδρός δείκτης για το πώς εκφράζονται οι μεταφορείς του φαρμάκου, σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

Επίσης, μέσω συγκαλλιέργειας καρκινικών - βακτηριακών κυττάρων, θα μπορούσαμε να εξετάσουμε αν οι βακτηριακοί μεταφορείς που μελετάμε επηρεάζουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη γεμισαβίνη. Οι προηγούμενες μελέτες (Geller *et al.*, 2017, Lehouritis *et al.*, 2015) βασίστηκαν διαδοχικά στην έκθεση των βακτηρίων στο φάρμακο και στη συνέχεια, στην έκθεση των καρκινικών κυττάρων στο μέσο που περισυλλέχθηκε από την καλλιέργεια των βακτηρίων με το φάρμακο. Εμείς μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ένα σύστημα συγκαλλιέργειας βακτηριακών – καρκινικών κυττάρων, όπου η έκθεση στο φάρμακο θα είναι ταυτόχρονη, ώστε να εξετάσουμε αν η πρόσληψη του φαρμάκου μέσω συγκεκριμένων βακτηριακών μεταφορέων και κατ' επέκταση η αποικοδόμηση του, μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στα γειτονικά καρκινικά κύτταρα. Θα μπορούσαμε να κάνουμε συγκαλλιέργεια βακτηριακών πληθυσμών *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 και *Citrobacter freundii* ATCC 8090 με σφαιροειδή από παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία μιμούνται καλύτερα το μικροπεριβάλλον των όγκων σε σχέση με τις δισδιάστατες καλλιέργειες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες αποτελεσματικότητας φαρμάκων (Duval *et al.*, 2017). Μέσω HPLC-MS/MS μπορούμε να εξετάσουμε αν τα παραπάνω βακτήρια έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν τη γεμισαβίνη (2',2'-διφθορο-2'-δεοξυκυτιδίνη) στον ανενεργό της μεταβολίτη dFdU (2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη). Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορούμε να εξετάσουμε αν όντως τα συγκεκριμένα βακτήρια εμπλέκονται στη μείωση της διαθεσιμότητας του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα και κατ' επέκταση αν ευθύνονται για τη χημειοανθεκτικότητα των παγκρεατικών αδενοκαρκινωμάτων του παγκρέατος, έναντι της γεμισαβίνης.

Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε πως η χαρτογράφηση των βακτηριακών ειδών στο μικροβίωμα των όγκων καθώς και οι δομικές και λειτουργικές μελέτες των βακτηριακών μεταφορέων της γεμισαβίνης προκύπτουν και από την ανάγκη για αντιμετώπιση του φαινομένου της χημειοανθεκτικότητας έναντι του φαρμάκου, που επάγεται από τους βακτηριακούς πληθυσμούς. Μία πιθανή προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση ανάλογων της γεμισαβίνης που στοχεύουν στο βακτηριακό μικροπεριβάλλον του όγκου, αλλά όχι στα καρκινικά κύτταρα. Προς αυτή την κατεύθυνση, χρειάζεται καταρχήν να μελετήσουμε διεξοδικά το προφίλ εξειδίκευσης των βακτηριακών μεταφορέων του φαρμάκου, με πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής της μεταφοράς ραδιοσημασμένης γεμισαβίνης, έναντι

μιας σειράς ανάλογων νουκλεοσιδίων/νουκλεοτιδικών βάσεων. Επιλεγμένα ανάλογα μπορούν αναλυθούν περαιτέρω, πειραματικά, ως προς την αλληλεπίδραση τους με τους μεταφορείς της γεμισταβίνης, με στόχο τον προσδιορισμό των σταθερών διάστασης (Kd), με τεχνικές όπως η θερμοφόρηση μικρής κλίμακας (MST, Microscale thermophoresis) (Cléménçon *et al.*, 2018) και η ανάλυση θερμοσταθερότητας (Thermostability shift assay) (Majd *et al.*, 2018), οι οποίες απαιτούν καθαρισμό των πρωτεϊνών, σε μικρή κλίμακα. Τα λειτουργικά δεδομένα που θα προκύψουν, σε συνδυασμό με θεωρητικές προσομοιώσεις (molecular docking simulations), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δοκιμή φαρμάκων πειραματικά, ώστε να βρούμε τυχόν διαφορές στην ειδικότητα μεταξύ ανθρώπινων και βακτηριακών μεταφορέων γεμισταβίνης.

Βιβλιογραφία

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), 610–615. <https://doi.org/10.1126/science.1088196>

Akimoto, N., Väyrynen, J. P., Zhao, M., Ugai, T., Fujiyoshi, K., Borowsky, J., Zhong, R., Haruki, K., Arima, K., Lau, M. C., Kishikawa, J., Twombly, T. S., Takashima, Y., Song, M., Zhang, X., Wu, K., Chan, A. T., Meyerhardt, J. A., Giannakis, M., Nowak, J. A., Ogino, S. (2022). Desmoplastic Reaction, Immune Cell Response, and Prognosis in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* 13, 840198. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840198>

Amrutkar, M., & Gladhaug, I. P. (2017). Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers* 9(11), 157. <https://doi.org/10.3390/cancers9110157>

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>

Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E., & Young, J. D. (1999). Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol. Med. Today* 5(5), 216–224. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01459-8](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01459-8)

Baldwin, S. A., Yao, S. Y., Hyde, R. J., Ng, A. M., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M. W., Cass, C. E., & Young, J. D. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 280(16), 15880–15887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414337200>

Boswell-Casteel, R. C., & Hays, F. A. (2017). Equilibrative nucleoside transporters-A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 36(1), 7–30. <https://doi.org/10.1080/15257770.2016.1210805>

Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15(6), 2403–2413. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>

Carrasco, N., Herzlinger, D., Mitchell, R., DeChiara, S., Danho, W., Gabriel, T. F., & Kaback, H. R. (1984). Intramolecular dislocation of the COOH terminus of the lac carrier protein in reconstituted proteoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(15), 4672–4676. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.15.4672>

Carter, C. J., Mekkawy, A. H., & Morris, D. L. (2021). Role of human nucleoside transporters in pancreatic cancer and chemoresistance. *World J. Gastroenterol.* 27(40), 6844–6860. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i40.6844>

César-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R. A., Hepworth, D., Hediger, M. A., Edwards, A. M., & Superti-Furga, G. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* 162(3), 478–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.022>

Chen, I. M., Markowitz, V. M., Chu, K., Anderson, I., Mavromatis, K., Kyrpides, N. C., & Ivanova, N. N. (2013). Improving microbial genome annotations in an integrated database context. *PLoS One* 8(2), e54859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054859>

Cléménçon, B., Lüscher, B. P., & Hediger, M. A. (2018). Establishment of a novel microscale thermophoresis ligand-binding assay for characterization of SLC solute carriers using oligopeptide transporter PepT1 (SLC15 family) as a model system. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 92, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.03.004>

Consler, T. G., Persson, B. L., Jung, H., Zen, K. H., Jung, K., Privé, G. G., Verner, G. E., & Kaback, H. R. (1993). Properties and purification of an active biotinylated lactose permease from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(15), 6934–6938. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.15.6934>

Coudert, E., Gehant, S., de Castro, E., Pozzato, M., Baratin, D., Neto, T., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., Bridge, A., & UniProt Consortium (2023). Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics* 39(1), btac793. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac793>

de Sousa Cavalcante, L., & Monteiro, G. (2014). Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 741, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.041>

Drew, D., & Boudker, O. (2016). Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Ann. Rev. Biochem.* 85, 543–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014520>

Drew, D., North, R. A., Nagarathinam, K., & Tanabe, M. (2021). Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chem. Rev.* 121(9), 5289–5335. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983>

Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>

Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Persson, B., & Kaback, H. R. (1994). Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33(26), 8074–8081. <https://doi.org/10.1021/bi00192a012>

Garaeva, A. A., & Slotboom, D. J. (2020). Elevator-type mechanisms of membrane transport. *Biochem. Soc. Trans.* 48(3), 1227–1241. <https://doi.org/10.1042/BST20200290>

García-González, A. P., Ritter, A. D., Shrestha, S., Andersen, E. C., Yilmaz, L. S., & Walhout, A. J. M. (2017). Bacterial Metabolism Affects the *C. elegans* Response to Cancer Chemotherapeutics. *Cell* 169(3), 431–441.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.046>

García-Manteiga, J., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Mazo, A., & Pastor-Anglada, M. (2003). Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 9(13), 5000–5008.

Geller, L. T., & Straussman, R. (2018). Intratumoral bacteria may elicit chemoresistance by metabolizing anticancer agents. *Mol. Cell. Oncol.* 5(1), e1405139. <https://doi.org/10.1080/23723556.2017.1405139>

Geller, L. T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O. H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z. A., Shee, K., Thaiss, C. A., Reuben, A., Livny, J., Avraham, R., Frederick, D. T., Ligorio, M., Chatman, K., Johnston, S. E., Mosher, C. M., Brandis, A., Fuks, G., Gurbatri, C., Gopalakrishnan, V., Kim, M., Hurd, M. W., Katz, M., Fleming, J., Maitra, A., Smith D. A., Skalak, M., Bu, J., Michaud, M., Trauger, S. A., Barshack, I., Golan, T., Sandbank, J., Flaherty, K. T., Mandinova, A., Garrett, W. S., Thayer, S. P., Ferrone, C. R., Huttenhower, C., Bhatia, S. N., Gevers, D., Wargo, J. A., Golub, T. R., Straussman, R. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* 357(6356), 1156–1160. <https://doi.org/10.1126/science.aah5043>

Gifford, C. M., & Wallace, S. S. (1999). The genes encoding formamidopyrimidine and MutY DNA glycosylases in *Escherichia coli* are transcribed as part of complex operons. *J. Bacteriol.* 181(14), 4223–4236. <https://doi.org/10.1128/JB.181.14.4223-4236.1999>

Govindarajan R, Quiñones AL, Wang J. (2022). The Nucleoside Transporters CNTs and ENTs. *Drug Transporters 2022* (chapter 8). <https://doi.org/10.1002/9781119739883.ch8>

Hagmann, W., Jesnowski, R., & Löhr, J. M. (2010). Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 12(9), 740–747. <https://doi.org/10.1593/neo.10576>

Hawryłkiewicz, A., & Ptaszyńska, N. (2021). Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy. *Molecules* 26(2), 364. <https://doi.org/10.3390/molecules26020364>

Ho, H. T., & Wang, J. (2014). The Nucleoside Transporters CNTs and ENTs. *Drug transporters: molecular characterization and role in drug disposition*, 107-126.

Hu, H., Endres, C. J., Chang, C., Umapathy, N. S., Lee, E. W., Fei, Y. J., Itagaki, S., Swaan, P. W., Ganapathy, V., & Unadkat, J. D. (2006). Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Mol. Pharmacol.* 69(5), 1542–1553. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018945>

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), 616–620. <https://doi.org/10.1126/science.1087619>

Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)

Jardetzky O. (1966). Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211(5052), 969–970. <https://doi.org/10.1038/211969a0>

Johnson, Z. L., Cheong, C. G., & Lee, S. Y. (2012). Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature* 483(7390), 489–493. <https://doi.org/10.1038/nature10882>

Johnson, Z. L., Lee, J. H., Lee, K., Lee, M., Kwon, D. Y., Hong, J., & Lee, S. Y. (2014). Structural basis of nucleoside and nucleoside drug selectivity by concentrative nucleoside transporters. *eLife* 3, e03604. <https://doi.org/10.7554/eLife.03604>

Karatzá, P., & Frillingos, S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* 22(3), 251–261. <https://doi.org/10.1080/09687860500092927>

Karatzá, 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), 39881–39890. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605748200>

Kirchman, D., Ducklow, H., & Mitchell, R. (1982). Estimates of bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(6), 1296–1307. <https://doi.org/10.1128/aem.44.6.1296-1307.1982>

Koltai, T., Reshkin, S. J., Carvalho, T. M. A., Di Molfetta, D., Greco, M. R., Alfarouk, K. O., & Cardone, R. A. (2022). Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. *Cancers* 14(10), 2486. <https://doi.org/10.3390/cancers14102486>

Kong, W., Engel, K., & Wang, J. (2004). Mammalian nucleoside transporters. *Curr. Drug Metab.* 5(1), 63–84. <https://doi.org/10.2174/1389200043489162>

Lehouritis, P., Cummins, J., Stanton, M., Murphy, C. T., McCarthy, F. O., Reid, G., Urbaniak, C., Byrne, W. L., & Tangney, M. (2015). Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Sci. Rep.* 5, 14554. <https://doi.org/10.1038/srep14554>

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), 661–675. <https://doi.org/10.1002/yea.1000>

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. <https://doi.org/10.1080/0968768031000140836>

Lostao, M. P., Mata, J. F., Larrayoz, I. M., Inzillo, S. M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2000). Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* 481(2), 137–140. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01983-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01983-9)

Mackey, J. R., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (1998). Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* 1(5), 310–324. [https://doi.org/10.1016/s1368-7646\(98\)80047-2](https://doi.org/10.1016/s1368-7646(98)80047-2)

Majd, H., King, M. S., Palmer, S. M., Smith, A. C., Elbourne, L. D., Paulsen, I. T., Sharples, D., Henderson, P. J., & Kunji, E. R. (2018). Screening of candidate substrates and coupling ions of transporters by thermostability shift assays. *eLife*, 7, e38821. <https://doi.org/10.7554/eLife.38821>

Majumder, P., Mallela, A. K., & Penmatsa, A. (2018). Transporters through the looking glass. An insight into the mechanisms of ion-coupled transport and methods that help reveal them. *Journal of the Indian Institute of Science*, 98(3), 283–300. <https://doi.org/10.1007/s41745-018-0081-5>

McKenney, K. M., Rubio, M. A. T., & Alfonzo, J. D. (2017). The Evolution of Substrate Specificity by tRNA Modification Enzymes. *Enzymes* 41, 51–88. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.03.002>

Mitchell, P. 1957. A general theory of membrane transport from studies of bacteria. *Nature* 180:134–136. <https://doi.org/10.1038/180134a0>

Munch-Petersen, A., & Mygind, B. (1976). Nucleoside transport systems in *Escherichia coli* K12: specificity and regulation. *J. Cell. Physiol.* 89(4), 551–559. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040890410>

Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., Arora, R., Cogdill, A. P., Khan, M. A. W., Ologun, G., Bussi, Y., Weinberger, A., Lotan-Pompan, M., Golani, O., Perry, G., Rokah, M., Bahar-Shany, K., Rozeman, E. A., Blank, C. U., Ronai, A., Shaoul, R., Amit, A., Dorfman, T., Kremer, R., Cohen, Z. R., Harnof, S., Siegal, T., Yehuda-Shnaidman, E., Gal-Yam, E. N., Shapira, H., Baldini, N., Langille, M. G. I., Ben-Nun, A., Kaufman, B., Nissan, A., Golan, T., Dadiani, M., Levanon, K., Bar, J., Yust-Katz, S., Barshack, I., Peeper, D. S., Raz, D. J., Segal, E., Wargo, J. A., Sandbank, J., Shental, N., Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* 368(6494), 973–980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>

Neuhard J, Nygaard P. (1987) Purines and pyrimidines. In: Neidhardt F C, Ingraham J L, Low K B, Magasanik B, Schaechter M, Umberger H E, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1987. pp. 445–473

Parales, R. E., & Ingraham, J. L. (2010). The surprising Rut pathway: an unexpected way to derive nitrogen from pyrimidines. *J. Bacteriol.* 192(16), 4086–4088. <https://doi.org/10.1128/JB.00573-10>

Pastor-Anglada, M., & Pérez-Torras, S. (2015). Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front. Pharmacol.* 6, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00013>

Patlak, C.S. 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 (1957). <https://doi.org/10.1007/BF02477764>

Petersen, C., & Møller, L. B. (2001). The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. *J. Biol. Chem.* 276(2), 884–894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008300200>

Preumont, A., Snoussi, K., Stroobant, V., Collet, J. F., & Van Schaftingen, E. (2008). Molecular identification of pseudouridine-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 283(37), 25238–25246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804122200>

Randazzo, O., Papini, F., Mantini, G., Gregori, A., Parrino, B., Liu, D. S. K., Cascioferro, S., Carbone, D., Peters, G. J., Frampton, A. E., Garajova, I., & Giovannetti, E. (2020). "Open Sesame?": Biomarker Status of the Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 and Molecular Mechanisms Influencing its Expression and Activity in the Uptake and Cytotoxicity of Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Cancers* 12(11), 3206. <https://doi.org/10.3390/cancers12113206>

- Ritzel, M. W., Ng, A. M., Yao, S. Y., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., Ritzel, R. G., Mowles, D. A., Carpenter, P., Chen, X. Z., Karpinski, E., Hyde, R. J., Baldwin, S. A., Cass, C. E., & Young, J. D. (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J. Biol. Chem.* 276(4), 2914–2927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007746200>
- Roberts A. G. (2021). The Structure and Mechanism of Drug Transporters. *Methods Mol. Biol.* 2342, 193–234. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1554-6_8
- Ruan, Y., Miyagi, A., Wang, X., Chami, M., Boudker, O., & Scheuring, S. (2017). Direct visualization of glutamate transporter elevator mechanism by high-speed AFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114(7), 1584–1588. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616413114>
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lengeler, J. W., & Kaback, H. R. (1995). Active transport by the CscB permease in Escherichia coli K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208(3), 1116–1123. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1449>
- Saiki, Y., Hirota, S., & Horii, A. (2020). Attempts to remodel the pathways of gemcitabine metabolism: Recent approaches to overcoming tumours with acquired chemoresistance. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 3(4), 819–831. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.39>
- Seeger, C., Poulsen, C., & Dandanell, G. (1995). Identification and characterization of genes (xapA, xapB, and xapR) involved in xanthosine catabolism in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 177(19), 5506–5516. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5506-5516.1995>
- Shi Y. (2013). Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Ann. Rev. Biophys.* 42, 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130429>
- Stein, A., Vaseduvan, G., Carter, N. S., Ullman, B., Landfear, S. M., & Kavanaugh, M. P. (2003). Equilibrative nucleoside transporter family members from *Leishmania donovani* are electrogenic proton symporters. *J. Biol. Chem.* 278(37), 35127–35134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306188200>
- Vande Voorde, J., Sabuncuoğlu, S., Noppen, S., Hofer, A., Ranjbarian, F., Fieuws, S., Balzarini, J., & Liekens, S. (2014). Nucleoside-catabolizing enzymes in mycoplasma-infected tumor cell cultures compromise the cytostatic activity of the anticancer drug gemcitabine. *J. Biol. Chem.* 289(19), 13054–13065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558924>
- Vaziri, H., Baldwin, S. A., Baldwin, J. M., Adams, D. G., Young, J. D., & Postis, V. L. (2013). Use of molecular modelling to probe the mechanism of the nucleoside transporter NupG. *Mol. Membr. Biol.* 30(2), 114–128. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.748939>

Wang J. (2016). The plasma membrane monoamine transporter (PMAT): Structure, function, and role in organic cation disposition. *Clin. Pharmacol. Therapeut.* 100(5), 489–499. <https://doi.org/10.1002/cpt.442>

Wang, C., Xiao, Q., Duan, H., Li, J., Zhang, J., Wang, Q., Guo, L., Hu, J., Sun, B., & Deng, D. (2021). Molecular basis for substrate recognition by the bacterial nucleoside transporter NupG. *J. Biol. Chem.* 296, 100479. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100479>

Wang, J., & Giacomini, K. M. (1997). Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺-dependent nucleoside transporters. *J. Biol. Chem.* 272(46), 28845–28848. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28845>

Ward, J. L., Sherali, A., Mo, Z. P., & Tse, C. M. (2000). Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J. Biol. Chem.* 275(12), 8375–8381. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8375>

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(1), 20–23. <https://doi.org/10.1107/S0909049510032449>

Wright, N. J., & Lee, S. Y. (2019). Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26(7), 599–606. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0245-7>

Xiao, G., Wang, J., Tangen, T., & Giacomini, K. M. (2001). A novel proton-dependent nucleoside transporter, CeCNT3, from *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Pharmacol.* 59(2), 339–348. <https://doi.org/10.1124/mol.59.2.339>

Yang, C., & Leung, G. P. (2015). Equilibrative Nucleoside Transporters 1 and 4: Which One Is a Better Target for Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury?. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 65(6), 517–521. <https://doi.org/10.1097/FJC.000000000000194>

Young J. D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey. *Biochem. Soc. Trans.* 44(3), 869–876. <https://doi.org/10.1042/BST20160038>

Young, J. D., Yao, S. Y., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* 34(2-3), 529–547. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>

Zhang, W., Zhang, K., Zhang, P., Zheng, J., Min, C., & Li, X. (2021). Research Progress of Pancreas-Related Microorganisms and Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* 10, 604531. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.604531>

Zhou, Y., Liao, L., Wang, C., Li, J., Chi, P., Xiao, Q., Liu, Q., Guo, L., Sun, L., & Deng, D. (2020). Cryo-EM structure of the human concentrative nucleoside transporter CNT3. *PLoS Biol.* 18(8), e3000790. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000790>

Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R., & Goodman, A. L. (2019). Separating host and microbiome contributions to drug pharmacokinetics and toxicity. *Science* 363(6427), eaat9931. <https://doi.org/10.1126/science.aat9931>

Παράρτημα

Παράρτημα 1

Αναλυτικός Πίνακας των γονιδίων των μεταφορέων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα Εργασία.

Παρουσιάζονται τα δεδομένα των νέων ομολόγων CNT και NHS μεταφορέων από τα βακτήρια *Klebsiella Pneumoniae* και *Citrobacter freundii*, όπως προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση. Στη πρώτη στήλη κάθε Πίνακα αναγράφεται ο κωδικός γονιδίου κάθε ομολόγου μεταφορέα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων JGI/IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Chen *et al.*, 2022). Στη δεύτερη στήλη αναγράφονται ο κωδικός πρόσβασης (accession code) κάθε ομολόγου μεταφορέα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) (Coudert *et al.*, 2023). Στη τρίτη στήλη αναγράφεται το προτεινόμενο όνομα κάθε μεταφορέα, βάσει της εξελικτικής συγγένειας, όπως αυτή προέκυψε από τη φυλογενετική ανάλυση. Τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 και *E. coli* K12 MG1655 επιλέχθηκαν ως τα πιο αντιπροσωπευτικά, κατά το στάδιο της μείωσης των αλληλουχιών σε ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος και στη συνέχεια σε ομόλογα από ένα στέλεχος ανά γένος.

Κωδικός γονιδίου	UniProt accession code	Όνομα μεταφορέα	Όνομα βακτηριακού στελέχους	Οικογένεια μεταφορέων
2554790801	A0A2W0KM59	KpNupC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	CNT
2554792739	A0A0H3GL94	KpNupC2		
2554791469	W1HT02	KpvcCNT		
2520192439	A0A336NW46	CfNupC	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	
2520193061	D2TRJ2	CfPsuT		
2875681610	P0AFF2	NupC	<i>E. coli</i> K12 - MG1655	
2875681362	P33021	NupX		
2875681365	P33024	PsuT		
	Q9KPL5	vcCNT	<i>Vibrio Cholerae</i> <i>Vibrio cholerae</i> serotype O1 (strain ATCC 39315 / El Tor Inaba N16961)	
2554792305	W1EDS3	KpNupG	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	
2554793634	J2XAI5	Kp-Yeg-1		
2520191764	A0A7D6VR53	CfNupG	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	
2520192040	A0A7W3D7V4	CfXapB		

2520193123	A0A7D6VSQ9	CfYegT		
2520192791	A0A7W3HTK5	Cf-Yeg-x		
2520190044	QIH69779 (GenBank)	Cf-Yeg-1		
2875682215	P0AFF4	NupG	<i>E. coli</i> K12 - MG1655	
2875681626	P45562	XapB		
2875681294	P76417	YegT		

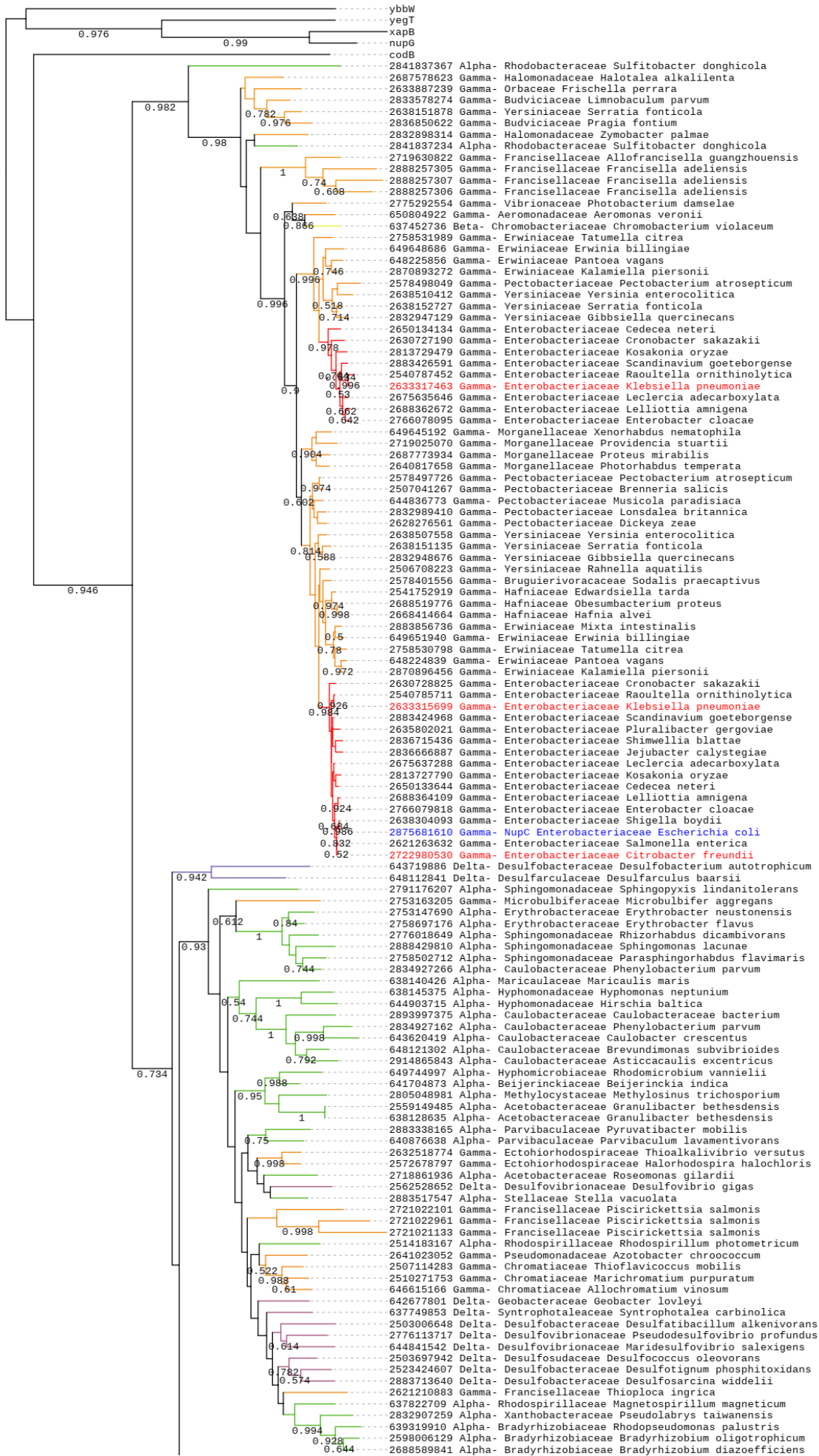
Παράρτημα 2

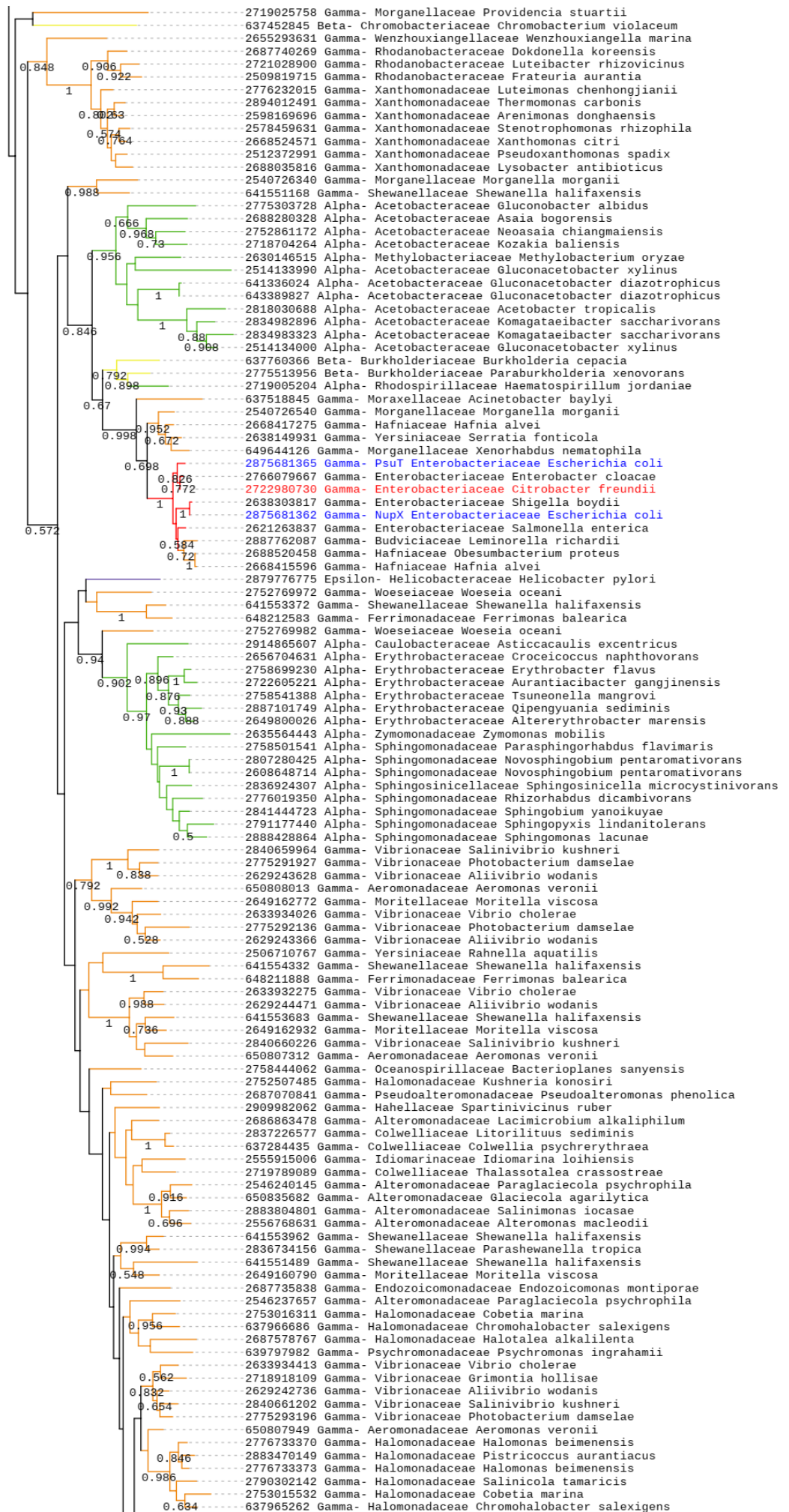
Φυλογενετική ανάλυση των ομολόγων των οικογενειών μεταφορέων CNT και NHS στα Πρωτεοβακτήρια

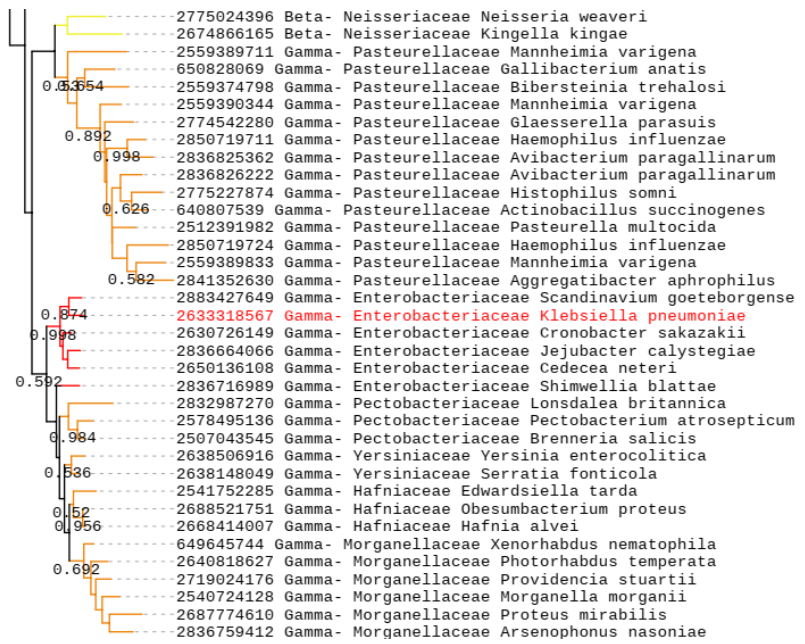
Π2.1 Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 275 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, που ανήκουν στην οικογένεια CNT

Επιλέχθηκαν όλα τα γονιδιώματα που ανήκουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων από τη βάση δεδομένων IMG/M του JGI και ανακτήθηκαν συνολικά 6.662 βακτηριακά στελέχη, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως. Τα γονιδιώματα ταξινομήθηκαν με βάση την κλάση σε α-, β-, γ-, δ- και ε- Πρωτεοβακτήρια. Ακολούθησε αναζήτηση των πρωτεϊνικών ομολόγων αλληλουχιών με το πρόγραμμα Blast-p, για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Ως αλληλουχίες επερώτησης (query) στο πρόγραμμα Blast-p, χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των μεταφορέων NurC και NurG της *E. coli* K-12. Από την αναζήτηση βρέθηκαν 6.434 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην οικογένεια CNT. Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε σε 927 επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος και σε δεύτερη φάση, μειώθηκε σε 275, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά γένος. Οι 275 αλληλουχίες υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA7), με βάση το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992), ώστε να κατασκευαστεί το φυλογενετικό δέντρο. Τα χρώματα που αντιστοιχούν στην κάθε ταξινομική μονάδα απεικονίζονται κάτω από το φυλογενετικό δέντρο. Οι ομόλογοι μεταφορείς των *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii* φαίνονται με κόκκινο χρώμα ενώ οι μεταφορείς της *E. coli* με μπλέ. Οι ομόλογοι μεταφορείς των οικογενειών NHS (NurG, XapB, YegT) και NCS1 (Nucleobase:Cation Symporters-1) (CodB, YbbW), της *E. coli* έχουν χρησιμοποιηθεί ως outgroup. Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κλάδους υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Bootstrap (1000 επαναλήψεις). Οι διακλαδώσεις με bootstrap value <50% δεν εμφανίζονται.

- Κλάσεις Πρωτεοβακτηρίων**
- γ - Πρωτεοβακτήρια : Enterobacteriales
 - γ - Πρωτεοβακτήρια : όλες οι άλλες τάξεις
 - α - Πρωτεοβακτήρια
 - β - Πρωτεοβακτήρια
 - δ - Πρωτεοβακτήρια
 - ε - Πρωτεοβακτήρια

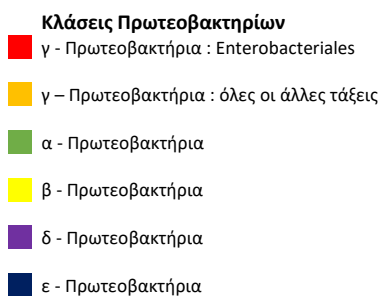


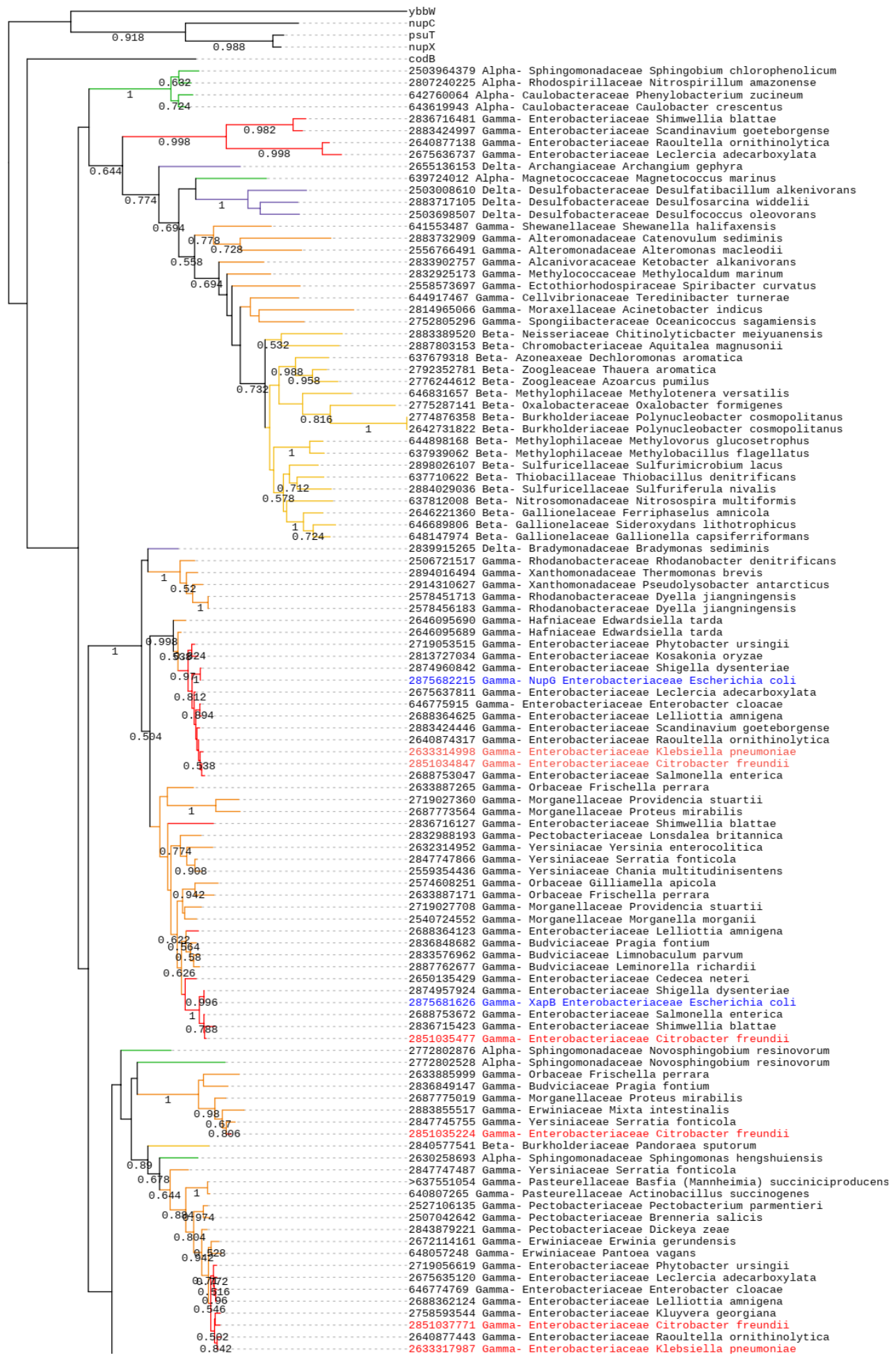


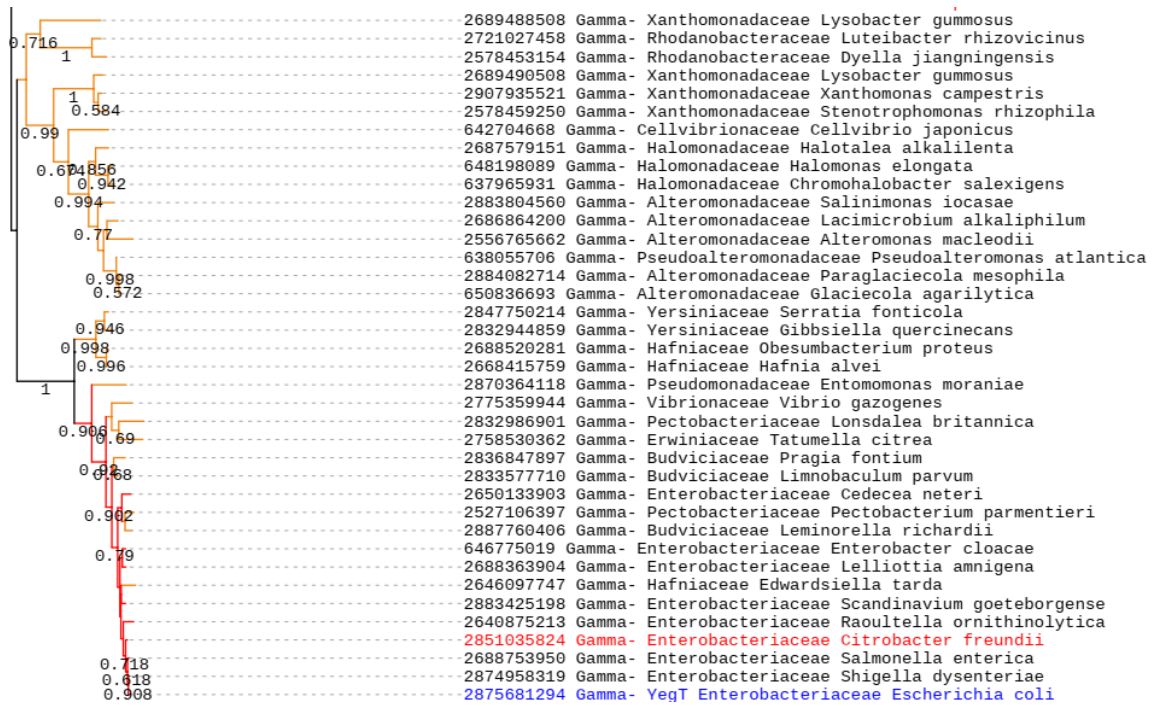


Π2.2 Φυλογενετική ανάλυση μιας σειράς 146 αντιπροσωπευτικών ομολόγων από το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, που ανήκουν στην οικογένεια CNT

Επιλέχθηκαν όλα τα γονιδιώματα που ανήκουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων από τη βάση δεδομένων IMG/M του JGI και ανακτήθηκαν συνολικά 6.662 βακτηριακά στελέχη, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως. Τα γονιδιώματα ταξινομήθηκαν με βάση την κλάση σε α-, β-, γ-, δ- και ε- Πρωτεοβακτήρια. Ακολούθησε αναζήτηση των πρωτεϊνικών ομολόγων αλληλουχιών με το πρόγραμμα Blast-p, για κάθε μία από τις πέντε κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Ως αλληλουχίες επερώτησης (query) στο πρόγραμμα Blast-p, χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των μεταφορέων NupC και NupG της *E. coli* K-12. Από την αναζήτηση βρέθηκαν 6.434 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες που ανήκουν στην οικογένεια CNT. Ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε σε 388 επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος και σε δεύτερη φάση, μειώθηκε σε 146, επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά γένος. Οι 146 αλληλουχίες υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης Maximum Likelihood (MEGA7), με βάση το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992), ώστε να κατασκευαστεί το φυλογενετικό δέντρο. Τα χρώματα που αντιστοιχούν στην κάθε ταξινομική μονάδα απεικονίζονται κάτω από το φυλογενετικό δέντρο. Οι ομόλογοι μεταφορείς των *Klebsiella pneumoniae* και *Citrobacter freundii* φαίνονται με κόκκινο χρώμα ενώ οι μεταφορείς της *E. coli* με μπλέ. Οι ομόλογοι μεταφορείς των οικογενειών CNT (NupC, NupX, PsuT) και NCS1 (Nucleobase:Cation Symporters-1) (CodB, YbbW), της *E. coli* έχουν χρησιμοποιηθεί ως outgroup. Τα ποσοστά αξιοπιστίας που αναγράφονται στους κλάδους υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Bootstrap (1000 επαναλήψεις). Οι διακλαδώσεις με bootstrap value <50% δεν εμφανίζονται.







Παράρτημα 3

Πλήρης στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των ομόλογων μεταφορέων στις οικογένειες CNT και NHS

Π3.1 Στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών του μεταφορέα vcCNT και επιλεγμένων ομόλογων στην οικογένεια CNT

Η ανάλυση στοίχισης αφορά τις δομικές περιοχές HP1, HP4, TM2, TM7, οι οποίες σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του μεταφορέα vcCNT (Johnson *et al.*, 2012) συνιστούν το κέντρο δέσμευσης υποστρώματος. Τα αντίστοιχα τμήματα των μεταφορέων από τα *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* και *E.coli* ελήφθησαν έπειτα από πλήρη στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών τους με τον vcCNT, με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988). Τα κατάλοιπα που είναι απόλυτα συντηρημένα υποδηλώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ κατάλοιπα που απαντώνται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (>70%) υποδηλώνονται με μπλε χρώμα. Τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν άμεσα δεσμεύοντας το υπόστρωμα (Gly153, Gln154, Thr155, Glu156, Val188, Glu332, Phe366, Asn368 και Ser371) έχουν επισημειωθεί με βάση την κρυσταλλική δομή του vcCNT και με κίτρινο χρώμα. Οι μεταφορείς που εξετάζονται είναι : NupC, NupX, PsuT της *E. coli*, KpvcCNT, KpNupC, KpNupC2 της *Klebsiella pneumoniae*, CfNupC, CfPsuT του *Citrobacter freundii* και vcCNT του *Vibrio cholerae*.

	TM1	TM2	
vcCNT MSLFMSLIGMAVLLGIAVLLSSNRKAINLRTVGGAFAIQFSLGAFILYVPWQPELLRG		
KpvcCNT MQILMGLIGMVALLAIAVLLSNRKAINLRTVLGAWIQVIGALILYVPAGRAALLA		
nupX MDVMRSVLGMVLLTIAFLLSVNKKKISLRTVGAALVLQVVGIGIMLWLPPGRWVAEK		
psuT MDIMRSVVGMLVLLAIAFLLSVNKKKISLRTVGAALLLQIAIGGIMLYFPPGKWAWEQ		
CfPsuT MDIMRSVVGMLVLLAIAFLLSVNKKKISLRTVGAALVLQIAIGGIMLYFPPGKWLVEQ		
nupC MDRVLFHVLALAVVAILALLVSSDRKKIRIRYVIQLLVIEVLLAWFFLNSDVGLGFVKG		
CfNupC MDRVLFHVLALAVVAVLALLVSSDRKKIRIRYVIQLLVIEVLLAWFFLNSDVGLGFVRG		
KpNupC MDRVLFHVLAIVVAVLALLVSHDRQKIRIRYVQQLLVIEVLLAWFFLNSDGLGFVKG		
KpNupC2	MAALLTCEKN NMTAFFHLLALAVILALAWLVSYDRQKIRIRYIQLIIEIALAFFFLHAESGLWLVKN		

	IH1	EH	TM3	
vcCNT	FSDAVSNVINYGNDGTSFLFGGLVSGKMFVFGGGGFIFAFRVLPTLIFFSALISVLYYLGMQWVIRIL			
KpvcCNT	MSNGVASVIAYGNEGISFIFGGLVSDKMFVFGGGGFVFALRVLPIVFFSLLIAYLYLGMQLVIRIL			
nupX	VAFGVHKVMAYS DAGSAFIFGSLVGPMDTLFDGAGFIFGFRVLPALIFVTALVSIYYIGVMGILIRIL			
psuT	AALGVHKVMSYSDAGSAFIFGSLVGPMDVLFDFGAGFIFAFRVLPAIIFVTALISLLYYIGVMGLLIRIL			
CfPsuT	AALGVHKVMSYSDAGSAFIFGSLVGPMDVLFDFGAGFIFAFRVLPAIIFVTALISLLYYIGVMGLLIRIL			
nupC	FSEMFKLLGFANEGTNFVFGSMNDK.....GLAFFFLKVLCPVIFISALIGILQHIRVLPVIRAI			
CfNupC	FSEMFKLLGFANEGTNFVFGSMNDK.....GLAFFFLKVLCPVIFISALIGILQHIRVLPVIRAI			
KpNupC	FSEMFKLLGFANEGTNFVFGSMNDK.....GLAFFFLKVLCPVIFISALIGILQHIRILPIVIRAI			
KpNupC2	ISGFFASLLGFAAEGTNFVFGSMSEK.....GLAFFFLGVLCPVIFISALIGILQHWIRILPIVIRAI			

IH2 HP1a HP1b TM4a TM4b

vcCNT GGLQKALGTSRAESMSAAANIFVQQTEAPLVVRPFPVKMTQSELFVAVMCGGLAS IAGGVLAGYASMGVK
KpvcCNT GGALRAVLKTSRTELSATANIFVQQTEAPLVVRPYIATMTRSELFVAVMCGGLASVAGSVLAGYAQMGP
nupX GGIFQKALNISKIESFVAVTTIFLQNEIPAIVKPFIDRLNRNELFTAICSGMASIAGSTMIGYAALGVP
psuT GSIFQKALNISKIESFVAVTTIFLQNEIPAIVKPFIDRMNRNELFTAICSGMASIAGSMIGYAGMGVP
CfPsuT GGIFQKALNISKIESFVAVTTIFLQNEIPAIVKPFIDRLNRNELFTAICSGMASIAGSMKPYVVAALVL
nupC GFLLSKVNGMGKLESFNAVSSILILQSENFIAIKDILGKISRNRMYTMAATAMSTVSMISIVGAYMTM. LE
CfNupC GFLLSKVNGMGKLESFNAVSSILILQSENFIAIKDILGKMSRNRMYTMAATAMSTVSMISIVGAYMTM. LE
KpNupC GTVLSKVNGMGKLESFNAVSSILILQSENFIAIKDILGKMSRNRMYTMAATAMSTVSMISIVGAYMTM. LQ
KpNupC2 GTLLSKVNGMGKLESFNAVSSILILQSENFIAIKVGLGDLSSRRLFTMAATAMSTVSLISIVGAYMTM. LD

TM5a TM5b TM6

vcCNT IEYLVAAASFMAAPGGLLFAKLMMPETEKPDNDITLDGGD. DKPANVIDAAAGGASAGLQALNVGAML
KpvcCNT LEYLIAAASFMAAPGGLLFAKIVPETEKPDNDPAHDSQSADADKPANVLDAAASGAASGMQLALNVGAML
nupX VEYLLAASLMAIPGGILFARLLSPATESSQ. VSFNNSFTETPPKSIIEAAATGAMTGLKIAAGVATVV
psuT IDYLLAASLMAIPGGILFARILSPATEPSQ. VTFENLSFSETPPKSFIEAAASGAMTGLKIAAGVATVV
CfPsuT IDYLLAASLMAIPGGILFARMLSPATEESQ. VTFENLSFSETPPKSIIEAAASGAMTGLKIAAGVATVV
nupC PKYVVAAALVLMNFSTFIVLSLINPYRVDS. EENIQMSNLHEGQSFEMLGEYILAGFKVAIIVAAML
CfNupC PKYVVAAALVLMNFSTFIVLSLINPYTVDS. EENIQMSNLHEGQSFEMLGEYILAGFKVAIIVAAML
KpNupC PKYVVAAALVLMNFSTFIVLSLINPYRVES. EENLQMSNLHEGQSFEMLGEYILAGFKVAIIVAAML
KpNupC2 AKYVVAAALVLMNFSTFIVLSVINPTR. PGS. EQEIKLEKLHESQSFEMLGEYILAGFKVAMIILAML

IH3 HP2a HP2b

vcCNT IAFIIGLIALINGMLGGIGWFGMPPELKLKEMLLGWLFLAPLAFIIGVWNEATVAGEFIFGLKTVANEFFVAYS
KpvcCNT LAFIALIALINGILSGVGFNHPPELSLQMLIGWIFSPPLAVIIGVWHEATVAGSFIGQKLIINEFFVAYM
nupX MAFVAIIALINGIIGGIGWFGFEHASLESILGYLLAPLAVMVDWSDANLAGSLIGQKLAINEFFVAYL
psuT MAFVAIIALINGIIGGIGWFGFANASLESIFGYVLAPLAVMVDWSDANLAGSLIGQKLAINEFFVAYL
CfPsuT MAFVAIIALINGIIGGIGWFGFGHATLEGIIFYVLAPLAVMVDWSDATLAGSLIGQKLAINEFFVAYL
nupC IGFIALIAALNALFATVTFWFGY. SIFSQGILGYIFYPIAVMVGVPSEALQVGSIMATKLVSNFVAMM
CfNupC IGFIALIAALNALFATVTFWFGY. SIFSQGILGYIFYPVAVMVGVPSEALQVGSIMATKLVSNFVAMM
KpNupC IGFIALISALNALFATVTFWFGY. SIFSQGILGYIFYPVAVMVGVPSEALQVGSIMATKLVSNFVAMM
KpNupC2 IGFIALISAINALFATLFG. LSFQGILGYIFYPLAWLIGIPLSDALNAGSIMATKLVANEFFVAMI

TM7a TM7b

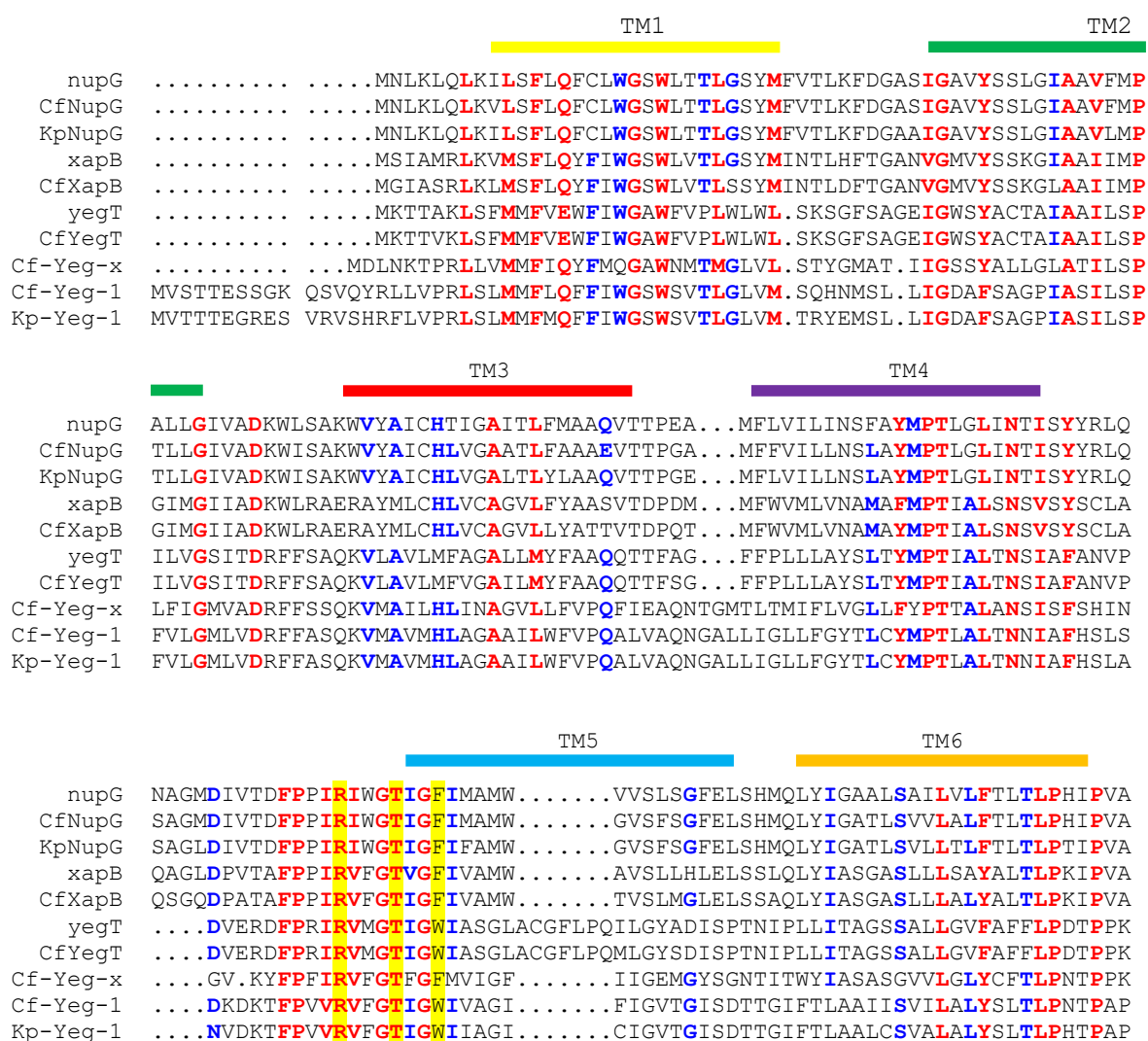
vcCNT QFAPYLTEAAPV. VLSEKTKAIISFALCGFANLSSIAILLGGLGSLAPKRRGDIARMGVKAVIAG
KpvcCNT NFGEYLKADA EVAAGLQVISDHTKAIISFALCGFANLSSIAILLGGLGMAPNRRQDIAQLGLRAVAAG
nupX NFGSPYLQTAG. TLDAKTVAIISFALCGFANFGSIGVGVVGAFAVAPHRAPEIAQLGLRALAAA
psuT SFSPYLQTAG. TLEVKTIAIISFALCGFANFGSIGVGVVGAFAISPKRAPEIAQLGLRALAAA
CfPsuT NFGSPYLQTAG. TLDVKTIAIISFALCGFANFGSIGVGVVGAFAISAPQRAPEIAQLGMRALAAA
nupC DLQKIAST. LSPRAEGIISVFLVSVANFSSIGIIAGAVKGLNEEQGNVVSFRFGLKLVYGS
CfNupC DLQKIAST. LSPRAEGIISVFLVSVANFSSIGIIAGAIKGLNEEQGNVVSFRFGLKLVYGS
KpNupC DLQKIAST. LSPRAEGIISVFLVSVANFSSIGIIAGAIKGLNEEQGNVVSFRFGLKLVYGS
KpNupC2 ELQKIAAS. MTPRGLGILSVFLVSVANFASIGIIAGAIKGLNEPQGNIVSFRFGLRLVYSA

TM8

vcCNT TLSNLMAATIAGFFLSF.
KpvcCNT TLSNLMSATIAGVFLAL.
nupX TLSNLMSATIAGFFIGLA
psuT TLSNLMSATIAGFFIGLA
CfPsuT TLSNLMSATIAGFFMGIA
nupC TLVSVLSASIAALVL. . .
CfNupC TLVSVLSASIAALVL. . .
KpNupC TLVSVLSASIAALVL. . .
KpNupC2 TLVSVLSASFAGLVL. . .

P3.2 Στοιχισή αμινοξικών αλληλουχιών του μεταφορέα NurG και επιλεγμένων ομολόγων στην οικογένεια NHS

Η ανάλυση αφορά την πλήρη στοιχισή των αμινοξικών αλληλουχιών των ομολόγων μεταφορέων NHS των *E. coli*, *C. freundii* και *K. pneumoniae*. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988). Τα κατάλοιπα που είναι απόλυτα συντηρημένα υποδηλώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα κατάλοιπα που απαντώνται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (>70%) υποδηλώνονται με μπλε χρώμα. Τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα (R136, T140, Q225, N228, Q261, E264, Y318, F322, F373) έχουν επισημειωθεί με βάση την κρυσταλλική δομή του NurG και με κίτρινο χρώμα. Οι μεταφορείς που εξετάζονται είναι : NurG, XapB, YegT της *E.coli*, KpNurG, Kp-Yeg-1 της *Klebsiella pneumoniae* και CfNurG, CfXapB, CfYegT, Cf-Yeg-x, Cf-Yeg-1 του *Citrobacter freundii*.



TM7

nupG KQQANQSWTTL**LGLDAFALFK**NKRMA**IF**FFISMMLGAELQITN**MF**GN**TF**LHSFDKDPMFASSFIVQHASI
 CfNupG NQQKNQSWSS**MGLDAFALFK**NKRMA**IF**FFISMMLGAELQITN**MF**GN**TF**LHSFDNNPLFSGSFIVEHASV
 KpNupG NAQRNQS**WTEMLGLNAFALFK**NKRMA**IF**FFISMMLGAELQITN**MF**GN**TF**LHSFDKDPLFAGSFIVEHASV
 xapB EKKATTS**LASKLGLDAFVLF**KNPRMA**IF**FLFAMMLGAVLQITN**VFG**NP**FL**HDFARNPEFADSFVVKYPSI
 CfXapB EKKE**SATLASKLGLDAFVLF**KNPRMA**IF**FLFAMMLGAVLQITN**VFG**NP**FL**HDFARNPEFANSFVVKYPSI
 yegT STGK.MDIK**VMLGLDALIL**LRDKN**FLV**FFCSFLFAM**PLAF**Y**YIF**ANG**YL**TEVG.....MKNATG
 CfYegT STGK.MDFK**VMLGLDALIL**LRDKN**FLV**FFCSFLFAM**PLAF**Y**YIF**ANG**YL**TEVG.....MKNATG
 Cf-Yeg-x AKGS**VFTLRDLCLDALAL**FKDRS**FV**LMLSIFVLMIPK**TAYS**AYIP**FL**KALG.....FDNAAS
 Cf-Yeg-1 AKGL**PVKVRDLFCADAF**ALL**KVR**H**FV**FLSCATLIS**VPLG**TY**YAY**TAS**FL**ADAG.....VGDVST
 Kp-Yeg-1 AKG**MPVQFRDLLCADAF**ALL**KTR**H**FLIF**SLCATLIS**VPLG**TY**YAY**TAS**YL**ADAG.....VKDVST

TM8

TM9

TM10

nupG **IMSISQISE**TL**FIL**TI**PF**FLS**RYGI**KN**VMM**ISIVAW**ILR**FAL**FAY**GDPTP.FGT**VLLVLS**MIVY**GCA**FD**F**
 CfNupG **MMSISQISE**TL**FIL**TI**PF**FLS**RYGI**KN**VML**ISIVAW**MLR**FGL**FAY**GDPTP.FGT**VLLVLS**MIVY**GCA**FD**F**
 KpNupG **LMSISQISE**TL**FIL**TI**PF**FLS**RYGI**KN**VML**ISIVAW**MLR**FGL**FAY**GDPTP.FGT**VLLVLS**MIVY**GCA**FD**F**
 xapB **LLSVSQMAE**V**GFIL**TI**PF**FL**KRF**GI**KTV**MLMSVAV**TLR**FG**FAY**GD**PST**.TGF**ILLLL**S**MIVY**G**CA**FD**F**
 CfXapB **LLSVSQMAE**V**GFIL**TI**PF**FL**KRF**GI**KTV**MLMS**LAW**TL**RFG**F**FAY**GD**PSP**.FGF**VLLLS**M**SIVY**G**CA**FD**F**
 yegT **WMTLGFSE**I**FF**ML**LAL****PF**FL**TKR**FGI**KV**LL**LGL**VTA**AIR**Y**GF**FI**Y**GS**AD**EY**F**TY**ALL**FL**GILL**H**GV**S**Y**DF
 CfYegT **WMTLGFSE**I**FF**ML**LAL****PF**FL**TKR**FGI**KV**LL**LGL**IT**AIR**Y**GF**F**VY**GG**AEE**Y**F**TY**ALL**FL**GILL**H**GV**S**Y**DF
 Cf-Yeg-x **MMQVG**I**ACE**V**IF**ML**L**S**FF**LL**KAG**F**KIT**LM**LGA**V**WC**W**IR**TL**LFA**H**AS**LDA..N**MM**F**V**L**I**G**L**M**L****Q**G**F**C**W**DF
 Cf-Yeg-1 **AM**S**FG****Q**M**SE**I**FF**ML**VI****PF**FL**RRL**G**V**K**Y**ML**L**I**G**M**CA**W**F**V**RY**A**FF****FAL**G**I**SEE..GR**FLLY**L**GILL**H**GV**C**Y**DF
 Kp-Yeg-1 **AM**S**FG****Q**M**SE**I**IV**F**ML**VI**PL**FL**RRL**G**V**K**Y**ML**L**I**G**M**AA**W**F**V**RY**A**FF****FAL**G**V**SEE..GR**FLLY**L**GILL**H**GV**C**Y**DF

TM11

nupG **FNISGSVFE**VEKEVSPAIRAS**AQGM**FLMM**TNG**FGC**ILG**IVSG**KV**VE**MY**TQN.....GITD**WQ**T**V**W**L**I**F**A
 CfNupG **FNISGSVFE**VEKEVRPEIRAS**AQGM**FLMM**TNG**FGC**ILG**IVSG**KV**VE**EH**YTLN.....GITD**WQ**T**V**W**L**I**F**A
 KpNupG **FNISGSVFE**VEKEVRPEIRAS**AQGM**FLMM**TNG**FGC**ILG**M**V**SG**KV**VE**EH**FTVE.....GITN**WQ**S**V**W**L**I**F**A
 xapB **FNISGSVFE**VEQ**EV**DSSIRAS**AQGL**FMTMV**NG**V**GA**W**GS**ILSG**MA**V**DY**FSVD.....G**V**KD**WQ**T**I**W**L**V**F**A
 CfXapB **FNISGSVFE**VEQ**EV**DSSIRAS**AQGL**FMTMV**NG**V**GA**W**GS**ILSG**MA**V**DY**FSVD.....G**V**KD**WQ**T**I**W**L**V**F**A
 yegT **YY**V**TAY****IY**V**D**K**K**AP**V**H**M**R**TAA**Q**L**IT**L**C**CG****GF**S**LL**G**Y**R**L**G**G**V**M**M**E**K**M**F**A**Y**Q**E**P**V**N**G**L**T**F**N**W**S**G**M**W**T**F**G**A**
 CfYegT **YY**V**TAY****IY**V**D**K**K**AP**V**H**M**R**TAA**Q**L**IT**L**C**CG****GF**S**LL**G**Y**R**L**G**G**V**M**M**E**K**M**F**A**Y**Q**E**P**V**N**G**L**T**F**N**W**A**G**M**W**G**F**G**A**
 Cf-Yeg-x **FFT**V**G**D**IY**V**D**R**K**A**AE**I**KA**Q**Q**S**L**R**F**I**V**S**NG**V**G**L**L**F**AS**T**V**C**G**Q**I**F**N**S**T**V**T**E**Q**G**P**Q..AL**P**Q**W**E**T**F**W**L**V**S**A**
 Cf-Yeg-1 **FF**V**V**G**F**I**Y**T**D**R**I**A**G**E**K**V**K**Q**Q**A**Q**S**M**I**V**M**F**T**Y**G**I**G**M**L**L**G**S**Q**I**S**G**A**L**Y**N**H**L**V**A**..G**Q**T..V**P**Q**A**W**T**F**W**W**I**P**A**
 Kp-Yeg-1 **FF**V**V**G**F**I**Y**T**D**R**V**A**G**E**K**V**K**Q**Q**A**Q**S**M**I**V**M**F**T**Y**G**I**G**M**L**L**G**S**Q**I**S**G**A**L**Y**N**H**L**V**A**..G**Q**S..V**P**Q**A**W**T**F**W**W**I**P**A**

TM12

nupG **GYSV**V**L**A**F**A**F**M**A**M**F**K**Y**K**H**V**R**V**P**T**G**T**Q**T**V**S**H**.....
 CfNupG **GYSL**V**L**A**F**A**F**V**A**L**F**K**Y**K**H**V**R**V**P**A**G**T**Q**T**I**A**H**.....
 KpNupG **GYSL**V**L**A**F**A**F**V**A**L**F**K**Y**K**H**V**R**Q**P**T**A**A**Q**Q**S**A.....
 xapB **GYAL**F**L**A**V**I**F**F**F**G**F**K**Y**N**H**D**P**E**K**I**K**H**R**A**V**T**H**.....
 CfXapB **AYAL**V**L**A**V**I**F**A**L**F**F**K**Y**K**H**E**P**E**R**L**A**Q**K**S**L**A**H**.....
 yegT **VMIA**I**I**A**V**L**F**M**I**F**F**R**E**S**D**N**E**I**T**A**I**K**V**D**D**R**D**I**A**L**T**Q**G**E**V**K
 CfYegT **VMIA**V**I**A**V**M**F**M**I**F**F**R**E**S**D**K**E**I**T**A**I**K**V**D**D**R**D**V**A**L**K**Q**G**E**V**K
 Cf-Yeg-x **GVA**A**V**S**V**S**F**F**L**I**F**R**D**D**I**S**K**R**K**A.....D**L**P**L**K**K**A**N**S.
 Cf-Yeg-1 **VAA**A**V**I**A**V**I**F**L**F**S**F**K**Y**D**D**K**E**Q**A.....
 Kp-Yeg-1 **VAA**A**V**I**A**L**I**F**L**F**S**F**Q**Y**N**E**K**E**P**H.....

Παράρτημα 4

Γενετικοί τόποι των γονιδίων των ομόλογων μεταφορέων των οικογενειών CNT και NHS

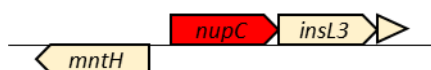
Παρουσιάζονται τα τμήματα των γονιδιωμάτων που περιλαμβάνουν τα γονίδια των μεταφορέων νουκλεοσιδίων των οικογενειών CNT και NHS, της *E. coli* K-12, σε σύγκριση με τα γονίδια των νέων μεταφορέων από τα στελέχη *Citrobacter freundii* ATCC 8090 και *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955. Οι παρακάτω εικόνες προέρχονται από τη βάση δεδομένων JGI/IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Chen *et al.*, 2022) και τα αποτελέσματα είναι οργανωμένα με βάση τους μεταφορείς της *E. coli* K-12, πρώτα στην οικογένεια CNT και έπειτα στην NHS. Πρώτα παρατίθενται οι γενετικοί τόποι των μεταφορέων της *E. coli* K-12 και στη συνέχεια οι γενετικοί τόποι των κοντινότερων ομόλογων τους, από τα στελέχη *C. freundii* και *K. pneumoniae*.

Π4.1 Γενετικοί τόποι των γονιδίων των μεταφορέων στην οικογένεια CNT

Π4.1.1 Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα NupC και των ομόλογων του KpNupC, KpNupC2, CfNupC

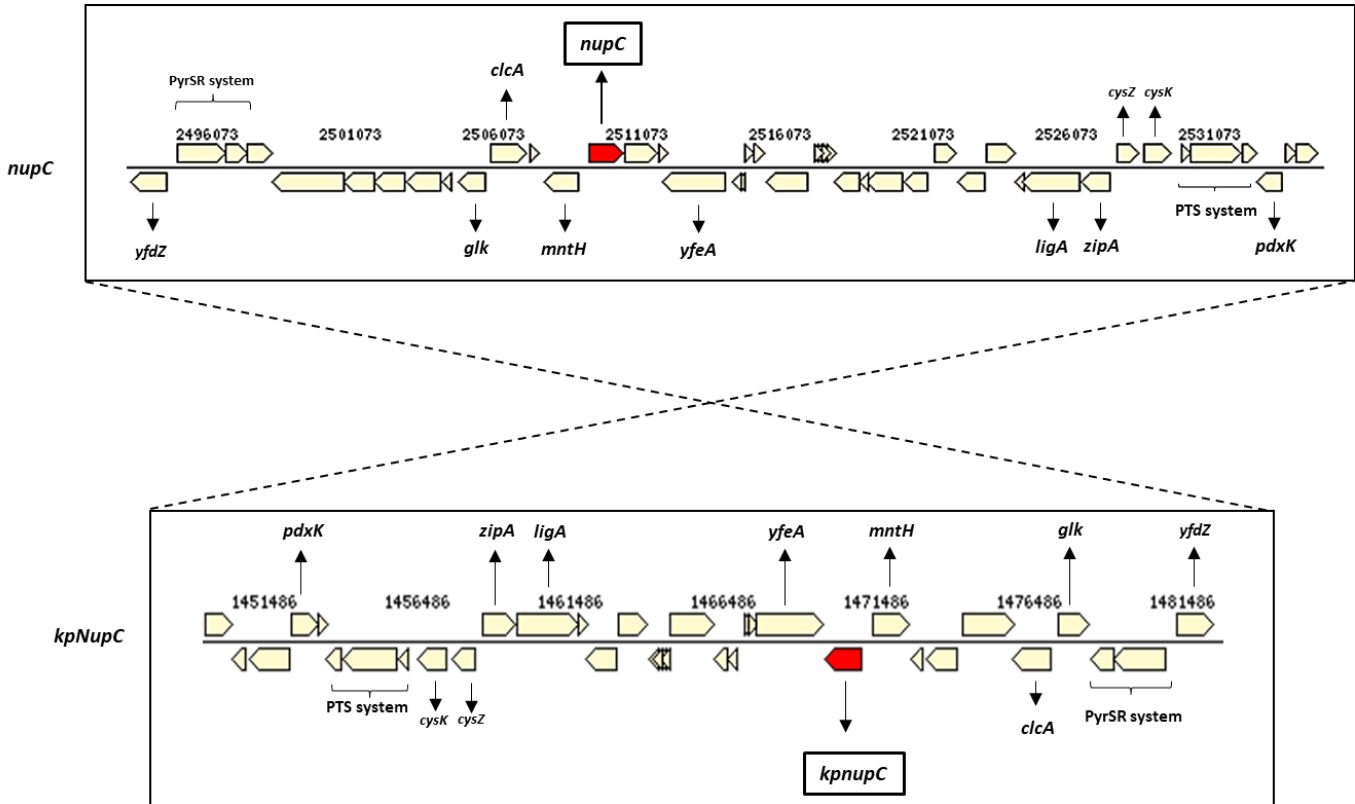
Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση και την συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων οι μεταφορείς KpNupC, KpNupC2 της *Klebsiella pneumoniae* και ο CfNupC του *Citrobacter freundii* είναι ομόλογοι του NupC της *E.coli*.

Το γονίδιο του μεταφορέα NupC (*nupC*) της *E. coli* K-12 εντοπίζεται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων JGI/IMG, δίπλα στο γονίδιο *insL3*, το οποίο κωδικοποιεί για μια τρανσποζάση που ευθύνεται για τη μετάθεση της αλληλουχίας ένθεσης IS186. Μαζί με το *nupC*, αλλά με διαφορετική κατεύθυνση ανάγνωσης, εντοπίζεται και το γονίδιο *mntH* που κωδικοποιεί για ένα μεταφορέα δισθενών ιόντων Mn^{2+} και Fe^{2+} (**Εικόνα Π4.1.1.1**).



Εικόνα Π4.1.1.1: Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *nupC*, στην *E.coli*. (Chen *et al.*, 2022)

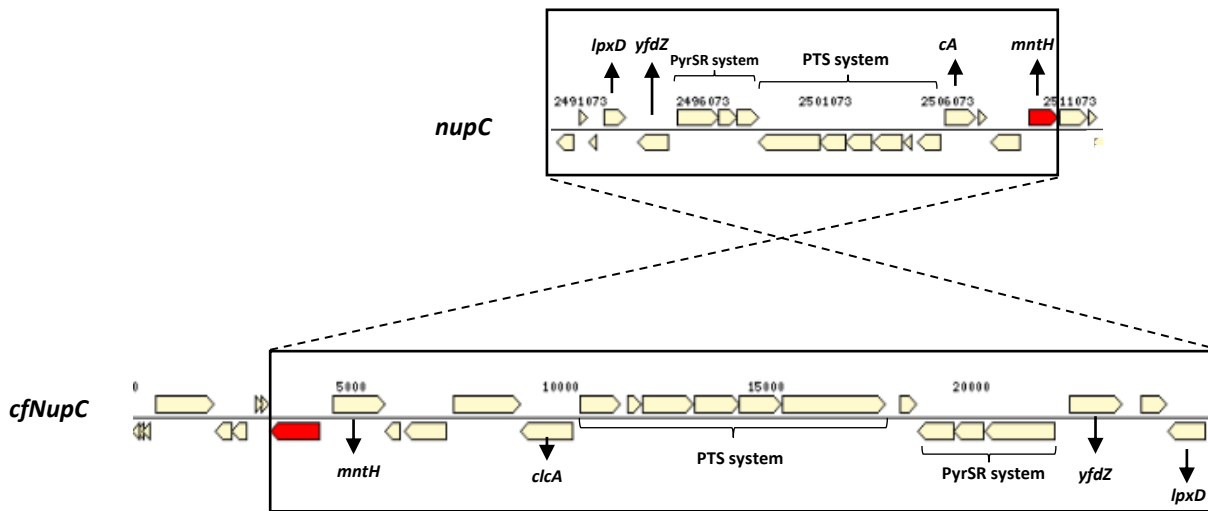
Το γονίδιο του μεταφορέα KpNupC (*kpNupC*) βρίσκεται σε μια περιοχή του γονιδιώματος, αντίθετης κατεύθυνσης σε σύγκριση με το γενετικό τόπο του *nupC* της *E. coli*, η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό διατηρημένη. Τα γονίδια που διατηρούνται μεταξύ των δύο γονιδιωματικών περιοχών έχουν σημειωθεί πάνω στην **Εικόνα Π4.1.1.2**.



Εικόνα Π4.1.1.2 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *kpNupC* της *K. pneumoniae* ATCC 25955 σε σύγκριση με το γενετικό τόπο του γονιδίου *nupC*, στην *E. coli* K-12. Με κόκκινο χρώμα διακρίνονται τα γονίδια *kpNupC* (κάτω) και *nupC* (πάνω) (Chen *et al.*, 2022). Τα γονίδια των οποίων οι συντμήσεις αναγράφονται από αριστερά προς τα δεξιά (με βάση το γενετικό τόπο του *kpNupC*) κωδικοποιούν για τα εξής : ***pdxK*** : κινάση πυριδοξίνης, **PTS system** : σύστημα φωσφοτρανσφεράσης που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, ***cysK*** : συνθάση κυστεΐνης, ***cysZ*** : συμμεταφορέας θειικού:H⁺, ***zipA*** : πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην κυτταρική διαίρεση, ***ligA*** : DNA λιγασή (NAD⁺), ***yfeA*** : πιθανή c-di-GMP φωσφοδιεστεράση, ***mntH*** : μεταφορέας δισθενών ιόντων Mn²⁺ και Fe²⁺, ***clcA*** : αντιμεταφορέας χλωρίου:H⁺, ***glk*** : γλυκοκινάση, ***araC*** : μεταγραφικός παράγοντας που προσδέεται στο DNA. **PyrSR system** : σύστημα μεταγωγής σήματος που εξαρτάται από το πυροσταφυλικό, ***yfdZ*** : τρανσαμινάση αλανίνης (Chen *et al.*, 2022).

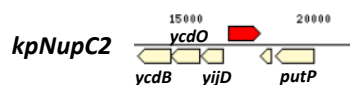
Αντίστοιχα, το γονίδιο του μεταφορέα CfNupC (*cfNupC*) βρίσκεται σε μια περιοχή του γονιδιώματος, η οποία έχει αντίθετη κατεύθυνση και υψηλή ταυτότητα σε σύγκριση με το

γενετικό τόπο του *nupC* της *E.coli*. Στην **Εικόνα Π4.1.1.3** έχουν σημειωθεί με μαύρα πλαίσια οι δύο, αντίθετες κατεύθυνσης, γονιδιωματικές περιοχές που διατηρούνται.



Εικόνα Π4.1.1.3: Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *cfNupC* του *C. freundii* σε σύγκριση με το γενετικό τόπο του γονιδίου *nupC*, στην *E. coli*. Με κόκκινο χρώμα διακρίνονται τα γονίδια *nupC* (πάνω) και *cfNupC* (κάτω) (Chen *et al.*, 2022). Τα γονίδια των οποίων οι συντηρήσεις αναγράφονται από αριστερά προς τα δεξιά (με βάση το γενετικό τόπο του *nupC*) κωδικοποιούν για τα εξής : ***lpxD***: N-ακυλο-τρανσφεράση της UDP-3-O-(3-υδροξυ-μυριστοϋλο) γλυκοζαμίνης, ***yfdZ***: τρανσαμινάση αλανίνης, ***PyrSR system***: σύστημα μεταγωγής σήματος που εξαρτάται από το πυροσταφυλικό, ***PTS system***: σύστημα φωσφοτρανσφεράσης (μεταφοράς φωσφορικής ομάδας σε γλυκόζη ή άλλες εξόζες που συνδυάζεται με διαμεμβρανική μεταφορά των σακχάρων) που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, ***clcA***: αντιμεταφορέας χλωρίου:Η⁺, ***mntH***: μεταφορέας δισθενών ιόντων Mn²⁺ και Fe²⁺. (Chen *et al.*, 2022).

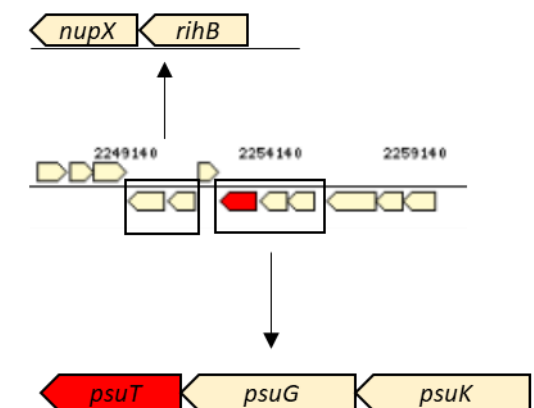
Το γονίδιο του δεύτερου ομόλογου μεταφορέα *KpNupC2* (*kpNupC2*) από την *Klebsiella pneumoniae*, σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα γονίδια, εντοπίζεται σε μια περιοχή του γονιδιώματος, η οποία έχει διαφορετική οργάνωση σε σχέση με το γενετικό τόπο του *nupC*. Το γονίδιο *kpNupC2* βρίσκεται δίπλα σε ένα σύστημα πρόσληψης ιόντων σιδήρου (*ycdB*, *ycdO*, *yijD*) και τον συμμεταφορέα Na⁺/προλίνης *PutP* (**Εικόνα Π4.1.1.4**).



Εικόνα Π4.1.1.4 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *kpNupC2* του *K. pneumoniae*. (Chen *et al.*, 2022).

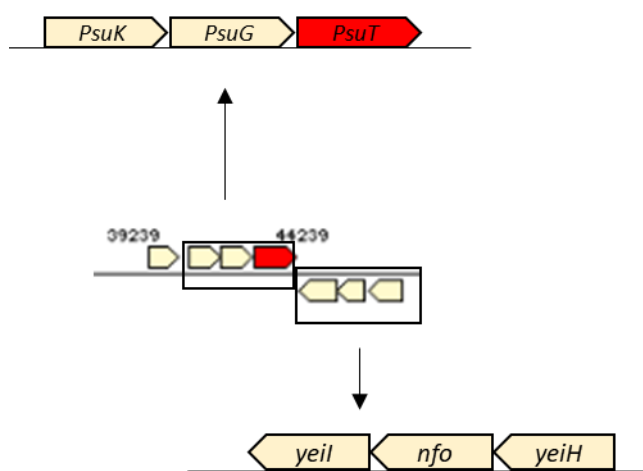
Π4.1.2 Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα PsuT και του ομόλογου του CfPsuT

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα PsuT (*psuT*) στην *E. coli* ανήκει σε ένα οπερόνιο καταβολισμού της ψευδουριδίνης (Εικόνα Π4.1.2.1). Το οπερόνιο αυτό περιλαμβάνει επίσης τα γονίδια *psuG* και *psuK* που κωδικοποιούν για τα ένζυμα γλυκοσιδάση της 5' φωσφορικής ψευδουριδίνης και κινάση της ψευδουριδίνης, αντίστοιχα (Preumont *et al.*, 2008). Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται ένα γονίδιο παράλογο του *psuT*, το *nupX* που κωδικοποιεί για το μεταφορέα νουκλεοσιδίων NupX και το γονίδιο *rihB* που κωδικοποιεί για μια υδρολάση πυριμιδινικών ριβονουκλεοσιδίων. Τα δύο γονίδια στοιχειοθετούν ένα οπερόνιο, υπεύθυνο για τη μεταφορά και τον καταβολισμό ριβονουκλεοσιδίων πυριμιδινών (Petersen and Møller, 2001)



Εικόνα Π4.1.2.1 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *psuT* στην *E. coli* (Chen *et al.*, 2022)

Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση και την συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων, ο μεταφορέας CfPsuT του *Citrobacter freundii* εμφανίζει υψηλής συγγένειας ομολογία με τον μεταφορέα PsuT της *E. coli*. Το γονίδιο *cfpsuT* φαίνεται πως ανήκει επίσης σε ένα οπερόνιο που περιλαμβάνει γονίδια ομόλογα των *psuT*, *psuG* και *psuK* της *E. coli* (Εικόνα Π4.1.2.2), με ταυτότητες 95%, 91% και 61%, αντίστοιχα. Στον ίδιο τόπο, με διαφορετική κατεύθυνση ανάγνωσης, εντοπίζονται κατά σειρά τα γονίδια *yeil*, *nfo*, *yeiH* που κωδικοποιούν για μια κινάση ψευδουριδίνης, μια ενδονουκλεάση και μια ενσωματωμένη στη μεμβράνη, πρωτεΐνη. Οι ταυτότητες των γονιδίων *yeil*, *nfo* και *yeiH* με τα *psuT*, *psuG*, *psuK* είναι 21%, 40% και 20% αντίστοιχα, ενώ οι ταυτότητες των *yeil* και *nfo* με τα *nupX* και *rihB* είναι 23% και



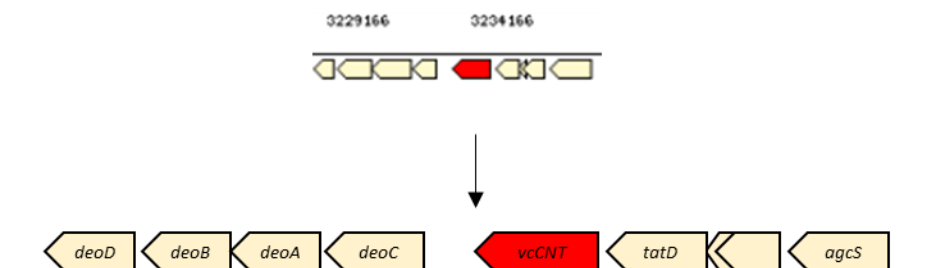
Εικόνα Π4.1.2.2 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *cfpsuT* στο *C. freundii* (Chen *et al.*, 2022).

20%, αντίστοιχα. Υπάρχει περίπτωση λοιπόν τα γονίδια *yeiI*, *nfo* και *yeiH* να είναι αποτέλεσμα διπλασιασμού, όπως στην περίπτωση των σπερονίων που ανήκουν τα *nurX* και *psuT*, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο γενετικός τόπος συντηρείται και κατ' επέκταση υπάρχει υψηλή εξελικτική συγγένεια ανάμεσα στους μεταφορείς PsuT και CfPsuT.

Π4.1.3 Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα vcCNT και του ομόλογου του KrvCNT.

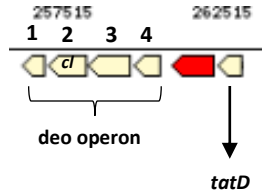
Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση και την συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων, ο μεταφορέας KrvCNT του *Klebsiella pneumoniae* φαίνεται να σχετίζεται εξελικτικά με τον μεταφορέα vcCNT, του *Vibrio cholerae*.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα vcCNT στο *Vibrio cholerae*, τοπολογικά (Εικόνα Π4.1.3.1) βρίσκεται δίπλα στο σπερόνιο *deo* (*deoD*, *deoB*, *deoA*, *deoC*) που εμπλέκεται στον καταβολισμό δεοξυριβονουκλεοσιδίων πυριμιδινών, ως πηγή ενέργειας (Valentin-Hansen *et al.*, 1979). Δύο άλλα γονίδια που βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο, είναι το *tatD* που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με δραστηριότητα DNAase και το *agcS* που κωδικοποιεί για ένα συμμεταφορέα γλυκίνης ή/και αλανίνης : κατιόντων, τον AgcS.



Εικόνα Π4.1.3.1 :Ο γενετικός τόπος του γονιδίου vcCNT, του *Vibrio cholerae*. Όσα γονίδια δεν φέρουν ονομασία, δεν έχουν χαρακτηριστεί (Chen *et al.*, 2022)

Από την οργάνωση του γενετικού τόπου του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα KrvCNT στο *Klebsiella pneumoniae*, παρατηρείται πως υπάρχει συντήρηση μεταξύ των γενετικών τόπων. Το γονίδιο *krvCNT* εντοπίζεται δίπλα σε ένα σκετ γονιδίων (*deoD*, *deoB*, *deoA*, *deoC*), ομόλογων αυτών του *Vibrio Cholerae* με ταυτότητες 76%, 79%, 80% και 70% αντίστοιχα. Το *tatD* που βρίσκεται δίπλα στο γονίδιο *krvCNT*, έχει ταυτότητα 48% με το ομόλογο του, στο *Vibrio cholerae* (Εικόνα Π4.1.3.2).

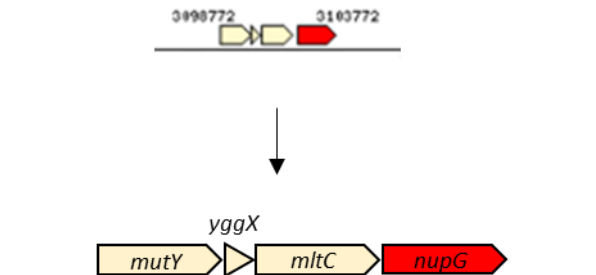


Εικόνα Π4.1.3.2 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα KrvCNT. Οι αριθμοί 1,2,3 και 4 αντιστοιχούν σε γονίδια ομόλογα των κατά σειρά *deoD*, *deoB*, *deoA* και *deoC*, του οπερονίου *deo*, του *V. cholerae*. (Chen *et al.*, 2022).

Π4.2 Γενετικοί τόποι των γονιδίων των μεταφορέων στην οικογένεια NHS

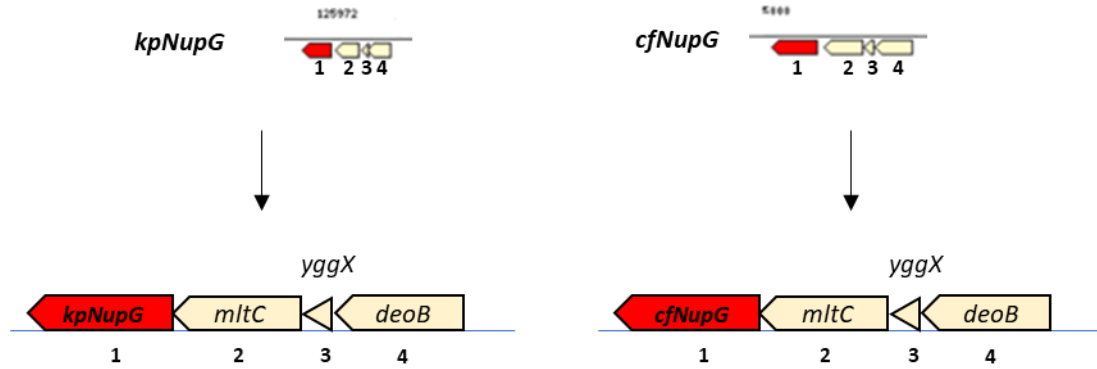
Π4.2.1 Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα NupG και των ομόλογων του KpNupG και CfNupG

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα NupG στην *E. coli* είναι μέλος ενός οπερονίου, το οποίο αποτελείται κατά σειρά από τα γονίδια *mutY*, *ygxX*, *mltC*, και *nupG* (Εικόνα Π4.2.1.1). Τα γονίδια *mutY* κωδικοποιεί για μια A/G specific adenine glycosylase, το *ygxX* για μια Fe-S cluster biosynthesis and repair protein και το *mltC* για μια membrane-bound lytic murein transglycosylase (Gifford and Wallace, 1999).



Εικόνα Π4.2.1.1. : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *nupG*, στην *E. coli* (Chen *et al.*, 2022)

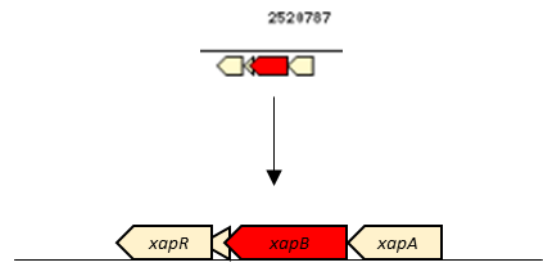
Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση και τη συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων οι μεταφορείς KpNupG της *Klebsiella pneumoniae* και CfNupG του *Citrobacter freundii* είναι ομόλογοι του NupG, της *E. coli* K-12. Και στις δύο περιπτώσεις, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς KpNupG και CfNupG, ομαδοποιούνται με γονίδια ομόλογα των *mutY*, *ygxX* και *mltC* της *E.coli* (Εικόνα Π4.2.1.2) Οι ταυτότητες των ομόλογων *kpnupG*, *mutY*, *ygxX* και *mltC* της *Klebsiella pneumoniae* με αυτά της *E.coli* είναι κατά σειρά 86%, 88%, 91% και 87% ενώ οι αντίστοιχες ταυτότητες των ομόλογων *cfnupG*, *mutY*, *ygxX* και *mltC* του *Citrobacter freundii* είναι 89%, 91%, 94% και 93%.



Εικόνα Π4.2.1.2 : Οι γενετικοί τόποι των γονιδίων *kpNupG* και *cfNupG*. Οι αριθμοί 1,2,3 και 4 αντιστοιχούν κατά σειρά σε γονίδια ομόλογα των *nupG*, *mItC*, *yggX* και *mutY*, της *E.coli*. (Chen *et al.*, 2022).

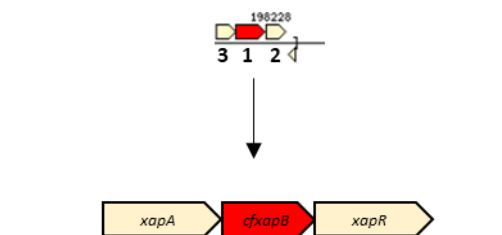
Π4.2.2 Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα ΧαρΒ και του ομόλογου του CfΧαρΒ

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα ΧαρΒ στην *E.coli* αποτελεί μέλος ενός οπερονίου καταβολισμού της ξανθοσίνης. Το άλλο γονίδιο-μέλος του οπερονίου είναι το *χαρΑ*, που κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφορυλάση της ξανθοσίνης. Το γονίδιο *χαρR* κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος, παρουσία ξανθοσίνης, ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της (Seeger *et al.*, 1995)



ΕικόναΠ 4.2.2.1 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου χαρB, στην *E. coli* (Chen *et al.*, 2022)

Το *Citrobacter freundii*, σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση, έχει έναν ομόλογο μεταφορέα του ΧαρΒ, τον CfΧαρΒ. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα, το *cfχαρB*, φαίνεται πως ανήκει σε ένα οπερόνιο, μαζί με ένα γονίδιο που είναι ομόλογο του *χαρΑ* της *E.coli*, με ταυτότητα 88%. Δίπλα στο *χαρB*, εντοπίζεται ένα άλλο γονίδιο, ομόλογο του *χαρR* της *E.coli*, με ταυτότητα 81%. Η συντήρηση του γενετικού

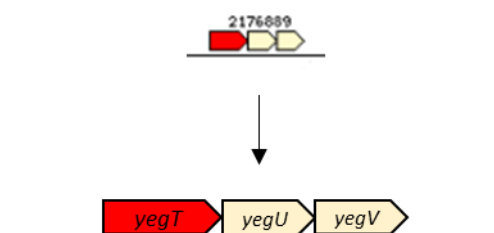


Εικόνα Π4.2.2.2 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *cfχαρB*, στο *C. freundii* (Chen *et al.*, 2022)

τόπου, σε συνδυασμό με τη φυλογενετική ανάλυση και τη συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων υποδεικνύει ότι οι μεταφορείς CharB και CfCharB έχουν στενή εξελικτική συγγένεια.

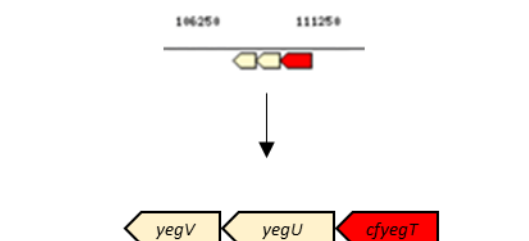
Π4.2.3 Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα YegT και των ομόλογων του CfYegT, Cf-Yeg-x, Cf-Yeg-1, Kr-Yeg-1

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα YegT (*yegT*) στην *E.coli* εντοπίζεται σε ένα οπερόνιο μαζί με το γονίδιο *yegU* που κωδικοποιεί για μια ADP-ριβοσυλογλυκοϋδρολάση και το γονίδιο *yegV* που κωδικοποιεί για μια πιθανή κινάση σακχάρων (Εικόνα 4.2.3.1).



Εικόνα Π4.2.3.1 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *yegT*, στην *E. coli*. (Chen *et al.*, 2022)

Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση και τη συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων, ο μεταφορέας CfYegT του *Citrobacter freundii* είναι ομόλογος με μεταφορέα YegT, του *E.coli*. Οι γενετικοί τόποι των δύο γονιδίων παρουσιάζουν αντίστοιχη εικόνα καθώς το γονίδιο *cfyegT* φαίνεται πως ομαδοποιείται με γονίδια ομόλογα των *yegU* και *yegV* (Εικόνα 4.2.3.2), με ταυτότητες 87% και 80%, αντίστοιχα.



Εικόνα Π4.2.3.2 : Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *cfyegT*, στο *C. freundii* (Chen *et al.*, 2022)

Στον ίδιο κλάδο εντοπίζονται επίσης οι μεταφορείς Cf-Yeg-x, Cf-Yeg-1, Kr-Yeg-1 των *Citrobacter freundii* και *Klebsiella pneumoniae*, ως εξελικτικά απομακρυσμένοι ομόλογοι μεταφορείς του YegT. Οι γενετικοί τόποι των γονιδίων των μεταφορέων δεν παρουσιάζουν ομοιότητα με αυτόν του *yegT*.

Για την ακρίβεια, τα γονίδια των μεταφορέων, *kr-yeg-1* (1) και *cf-yeg-1* (1) (Εικόνα 4.2.3.3) ομαδοποιούνται με το γονίδιο (2) που κωδικοποιεί για ένα συμμεταφορέα φαινυλαλανίνης : πρωτονίων, το γονίδιο (3) που κωδικοποιεί για μια ισομεράση φωσφορικών σακχάρων και το γονίδιο (4) που κωδικοποιεί για μια αφυδρογονάση (Εικόνα 4.2.3.4).



Εικόνα Π4.2.3.3 : Οι γενετικοί τόποι των γονιδίων *kr-Yeg-1* και *cf-Yeg-1* (Chen *et al.*, 2022)

Αντίστοιχα, το γονίδιο που κωδικοποιεί για το μεταφορέα Cf-Yeg-x ομαδοποιείται με ένα γονίδιο (5) που κωδικοποιεί για μια φωσφοδιεστεράση και το γονίδιο *mgtC* (6) που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη-μεταφορέα δισθενών ιόντων Mg^{2+} .



Εικόνα Π4.2.3.4 : Γενετικός τόπος του γονιδίου του μεταφορέα Cf-Yeg-x (Chen *et al.*, 2022).