

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ-ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Εξελικτική Ανάλυση των Εξειδικεύσεων των
Μεταφορέων Νουκλεοτιδικών Βάσεων –
Νουκλεοσιδίων**

ΚΑΛΦΑ ΕΙΡΗΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς	10
1.2 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων	11
1.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2	12
1.3.1 Κοινή δομή και μηχανισμός λειτουργίας των μεταφορέων της NAT/NCS2	13
1.3.2 Κατανόηση των διαφορετικών εξειδικεύσεων των μεταφορέων της NAT/NCS2 ..	15
1.4 Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών	18
1.4.1 Ανασύσταση προγονικών μεταφορέων στην οικογένεια NAT/NCS2	22
ΣΚΟΠΟΣ.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Όργανα	28
2.2 Χημικά Αναλώσιμα	29
2.3 Διαλύματα	31
2.4 Βακτηριακά Στελέχη και Πλασμίδια	33
2.4.1 Βακτηριακά Στελέχη:	33
2.4.2 Πλασμίδια:.....	33
2.5 Φυλογενετική Ανάλυση.....	37
2.6 Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών	37
2.7 Τεχνικές Ανασυνδυσμένου DNA	38
2.7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)	38
2.7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης.....	41
2.7.3 Κατασκευή Ανασυνδυσμένου DNA: Περιοριστική πέψη (restriction) και Ανασύνδεση (ligation)	41
2.7.4 Παρασκευή κυττάρων επιδεικτικών μετασχηματισμού	42
2.7.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	43
2.7.6 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε μικρή κλίμακα (10mL).....	43
2.7.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών.....	44
2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών	44
2.8.1 Προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA	44

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	44
2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	45
2.8.4 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay).....	45
2.8.5 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση.....	46
2.8.6 Πειράματα ανταγωνισμού	46
2.9 In silico αναλύσεις	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
3.1 Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης.....	50
3.1.1 Εύρεση του κοινού προγόνου (AncR1) των μεταφορέων του υποκλάδου RutG... ..	50
3.1.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του προγονικού μεταφορέα AncR1.....	51
3.1.2.1 Ο AncR1 είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ουρακίλης	51
3.1.2.2 Ο AncR1 έχει ευρύ προφίλ εξειδίκευσης παρόμοιο με αυτό του RutG.....	53
3.1.3 Μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα AncR1 για την κατανόηση των διαφορών εξειδίκευσης.....	54
3.1.3.1 Οι αντικαταστάσεις A162T, A308G, και οι συνδυαστικές αντικαταστάσεις τριών ή οκτώ καταλοίπων οδηγούν σε ανενεργούς μεταφορείς ενώ η G354T/A365T οδηγεί σε μεταφορέα ουρακίλης με παρόμοιο K_M και προφίλ εξειδίκευσης με τον AncR1.....	58
3.1.3.2 Ο μεταφορέας AncR1(G354T/A365T) έχει παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης με αυτό του AncR1 και του RutG	59
3.2 Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος.....	61
3.2.1 Εύρεση του κοινού προγόνου (AncX1) των μεταφορέων στον υποκλάδο X1	61
3.2.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα AncX1.....	63
3.2.2.1 Ο AncX1 είναι χαμηλής ενεργότητας μεταφορέας ξανθίνης	63
3.2.2.2 Ο προγονικός μεταφορέας AncX1 έχει ευρύ προφίλ εξειδίκευσης.....	65
3.2.2.3 Ο μεταφορέας PsyXUacT αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το ουρικό οξύ	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	81

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία ασχολείται με την κατανόηση των διαφορών εξειδίκευσης σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς πουρινών ή πυριμιδινών, οι οποίες είναι σημαντικές γιατί παρέχουν πληροφορίες για τους μηχανισμούς μεταφοράς και το πως η λειτουργία τους συνδέεται με τη δομή τους. Η διερεύνηση των διαφορών εξειδίκευσης γίνεται μέσω εξελικτικής ανάλυσης που δείχνει πως προκύπτουν οι διαφορετικές εξειδικεύσεις στους οργανισμούς παράλληλα με την προσαρμογή τους στο περιβάλλον τους.

Συγκεκριμένα η ανάλυση στην παρούσα εργασία εστιάζει σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2. Η οικογένεια NAT/NCS2 εντοπίζεται σε όλα σχεδόν τα φύλα οργανισμών και περιλαμβάνει μεταφορείς με πολλές διαφορετικές εξειδικεύσεις.

Η εξελικτική ανάλυση προσεγγίζεται με τη μέθοδο της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών. Πρόκειται για μια μέθοδο «κάθετης» εξελικτικής ανάλυσης που εξετάζει τον τρόπο με τον οποίο οι πρωτεΐνες μιας οικογένειας άλλαξαν κατά την πάροδο του χρόνου. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής σε σχέση με την «οριζόντια» ανάλυση σύγχρονων πρωτεϊνών είναι ότι εστιάζει στην διερεύνηση των προγονικών αλληλουχιών οι οποίες είναι απαλλαγμένες από την πληθώρα των ουδέτερων μεταλλάξεων που έχουν συσσωρευθεί στα σημερινά γονίδια και, επομένως, αποτελούν ένα μοριακό υπόβαθρο που διευκολύνει την αναγνώριση των καθοριστικών αλλαγών που οδήγησαν στις σημερινές αλλαγές της εξειδίκευσης. Επιπλέον με την προσέγγιση της Ανασύστασης λαμβάνεται υπόψιν το φαινόμενο της διαμορφωτικής επίστασης και αποκαλύπτονται αλληλεπιδράσεις που δεν μπορούν να αποκαλυφθούν από τις οριζόντιες αναλύσεις.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε αρχικά σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς πουρινών και συγκεκριμένα σε μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος για τη διερεύνηση της μοριακής βάσης της διαφοράς της εξειδίκευσης μεταξύ των δύο υποστρωμάτων. Έτσι, έγινε ανασύσταση του προγονικού μεταφορέα ApcX1 στον υποκλάδο X1 του κλάδου μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος. Στον κλάδο X1 ανήκουν μεταφορείς ξανθίνης, όπως ο XanQ του *E. coli* (και ομόλογοι του) και μεταφορείς με διπλή εξειδίκευση για ξανθίνη και ουρικό οξύ, όπως ο PsyXUacT του *P. cryohalolentis*. Η λειτουργική ανάλυση του ApcX1 έδειξε ότι είναι πολύ χαμηλής ενεργότητας μεταφορέας ξανθίνης με ευρύ προφίλ εξειδίκευσης καθώς αναγνωρίζει τόσο πουρίνες (με εξαίρεση το ουρικό οξύ) όσο και πυριμιδίνες (εκτός από θυμίνη).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε μεταφορείς πυριμιδινών, ειδικότερα ουρακίλης και θυμίνης. Είχε ήδη πραγματοποιηθεί ανασύσταση του προγονικού μεταφορέα ApcR1 του υποκλάδου R1 του κλάδου μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης, ο οποίος περιλαμβάνει χαρακτηρισμένους μεταφορείς ουρακίλης όπως ο AcS572 του *A. calcoaceticus* (ομόλογος του UraA του *E. coli* που ανήκει στον ευρύτερο κλάδο ουρακίλης/θυμίνης) αλλά και μεταφορείς ουρακίλης και θυμίνης, όπως ο RutG του *E. coli*. Η λειτουργική ανάλυση του ApcR1 έδειξε ότι είναι μεταφορέας ουρακίλης, όπως ο AcS572, αλλά με ευρεία εξειδίκευση, όπως ο RutG, καθώς αναγνωρίζει επίσης θυμίνη, κυτοσίνη αλλά και ξανθίνη.

Ο μεταφορέας ApcR1 έχει τα ίδια αμινοξικά κατάλοιπα με τους AcS572 και UraA στο κέντρο δέσμευσης του. Επομένως η διαφορά στην εξειδίκευση θα πρέπει να καθορίζεται από θέσεις εκτός του κέντρου δέσμευσης. Αυτό το διερευνήσαμε μέσω μεταλλαξιγένεσης σε θέσεις πιθανώς σημαντικές βάσει προηγούμενων μελετών σε μεταφορείς του κλάδου ουρακίλης/θυμίνης αλλά και της ευρύτερης οικογένειας NAT/NCS2. Οι περισσότερες αλλαγές οδήγησαν σε ανενεργούς μεταφορείς με εξαίρεση το μετάλλαγμα ApcR1(G354T/A365T) με αλλαγές σε δύο θέσεις που βρίσκονται στην μεσεπιφάνεια των δύο δομικών περιοχών του μεταφορέα. Οι αλλαγές αυτές διατηρούν την ενεργότητα χωρίς να περιορίζουν όμως το προφίλ εξειδίκευσης καθώς ο μεταφορέας αναγνωρίζει επίσης θυμίνη και ξανθίνη όπως και οι ApcR1 και RutG (διατηρεί δηλαδή το ευρύτερο προφίλ εξειδίκευσης). Μελέτες συνδυαστικής μεταλλαξιγένεσης θα μπορούσαν ίσως να δώσουν μια καλύτερη εικόνα όσον αφορά τη σημαντικότητα των θέσεων αυτών για την εξειδίκευση.

ABSTRACT

The study focuses on understanding the differences in specification of purine or pyrimidine transmembrane transporters, which are important because they provide information about the transport mechanisms and how their function is linked to their structure. Investigation of specification differences is carried out through evolutionary analysis, which shows how different specifications arise in organisms alongside their adaptation to their environment.

Specifically, the analysis in this study focuses on transmembrane transporters of nucleotide bases belonging to the NAT/NCS2 family. The NAT/NCS2 family is found in almost all taxa of organisms and includes transporters with many different specifications.

The evolutionary analysis is approached through the method of Ancestral Sequence Reconstruction. This is a "vertical" method of evolutionary analysis that examines how proteins of a family have changed over time. The advantage of this method compared to "horizontal" analysis of contemporary proteins is that it focuses on exploring ancestral sequences, which are free from the plethora of neutral mutations accumulated in present-day genes. Consequently, it provides a molecular background that facilitates the identification of key changes that led to the current specification changes. Additionally, with the Reconstruction approach, the phenomenon of epistasis is taken into account, revealing interactions that cannot be uncovered by horizontal analyses.

The method was initially applied on purine, xanthine and uric acid specifically, transporters to investigate the molecular basis of the difference in specificity between the two substrates. The ancestral transporter AncX1, of the X1 sub-clade of the xanthine/uric acid transporter clade, was reconstructed. The X1 clade includes xanthine transporters, such as *E. coli*'s XanQ (and its homologs), and transporters with double specificity for xanthine and uric acid, such as PsyXUacT of *P. cryohalolentis*. The functional analysis of AncX1 showed that it is a very low activity xanthine transporter with a broad specificity profile as it recognizes both purines (except for uric acid) and pyrimidines (except for thymine).

The method was also applied on pyrimidine transporters, specifically for uracil and thymine. The ancestral transporter AncR1 of the R1 sub-clade of the uracil/thymine transporter clade had already been reconstructed. The R1 clade includes characterized uracil transporters such as AcS572 of *A. calcoaceticus* (a homolog of *E. coli*'s UraA that belongs in the uracil/thymine clade) as well as transporters for both uracil and thymine, like RutG of *E. coli*. The functional analysis of AncR1 showed that it is an uracil transporter, like AcS572, but with a broad specificity, like RutG, as it also recognizes thymine, cytosine, and even xanthine.

AncR1 has the same amino acid residues as AcS572 and UraA a2t its binding site. Therefore, the difference in specificity must be determined by residues outside the binding site. We investigated this through mutagenesis at potentially significant sites (based on previous studies on transporters of the uracil/thymine clade and other NAT/NCS2 family members). Most changes led to inactive transporters, except for the AncR1(G354T/A365T) mutant with changes at two residues located at the interface of the transporter's two domains. These changes maintain activity without affecting the specificity profile, as the transporter also recognizes thymine and xanthine, just like AncR1 and RutG (therefore retaining the broader specialization profile). Further studies that include combinational mutagenesis on these residues, could perhaps provide a better picture regarding their significance.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς

Οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς είναι πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν στην μετακίνηση διαλυτών ουσιών από τη μια πλευρά της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων στην άλλη. Η διαδικασία αυτή παίζει σημαντικό ρόλο σε διεργασίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η νευροδιαβίβαση, η κυτταρική επικοινωνία, η πρόσληψη ή η απομάκρυνση φαρμάκων από τα κύτταρα. Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Transporter Classification (TC) system (Saier et al., 2021) οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς χωρίζονται σε διαύλους (channels) και μεταφορείς/περμεάσες/πρωτεΐνες-φορείς (transporters, permeases, carriers).

Οι διάυλοι διαμεσολαβούν στην μετακίνηση κυρίως μικρών διαλυτών μορίων (π.χ. νερό, ουρία, αμμώνιο, γλυκερόλη) και σχηματίζουν ένα συνεχή πόρο ο οποίος ελέγχεται από χημικά σήματα και ανοίγει και κλείνει επιλεκτικά ως απόκριση σε αυτά. Σε αντίθεση με τους μεταφορείς, οι διάυλοι είναι ανοιχτοί ταυτόχρονα και στις δύο πλευρές μιας μεμβράνης έτσι ώστε ένα ή περισσότερα μόρια μπορούν να διέλθουν σύμφωνα με την βαθμίδωση της συγκέντρωσης τους (Diallinas, 2014).

Οι μεταφορείς (ή περμεάσες ή πρωτεΐνες-φορείς) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που καταλύουν τη μετατόπιση υποστρωμάτων από τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Περιλαμβάνουν μια θέση δέσμευσης υποστρώματος που αλληλεπιδρά ειδικά με ένα μόριο υποστρώματος σε κάθε κύκλο μεταφοράς. Συνεπώς, ακολουθούν τη θεωρία Michaelis-Menten και χαρακτηρίζονται από την εξειδίκευση προς το υπόστρωμα και τη συγγένεια προς αυτό (K_M), την ικανότητα μεταφοράς και τη μέγιστη ταχύτητα μεταφοράς (V_{max}). Η πρόσδεση του υποστρώματος προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν σε μια διαμόρφωση όπου ο μεταφορέας είναι ανοιχτός μόνο προς την μια πλευρά της μεμβράνης, αντίθετη από αυτή που έγινε η πρόσδεση του υποστρώματος (Diallinas, 2014).

Οι μεταφορείς καταλύουν τόσο αντιδράσεις διευκολυνόμενης διάχυσης (facilitated diffusion) όσο και αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς (active transport). Όταν η ενέργεια για την αντίδραση παρέχεται από πρωτογενείς πηγές ενέργειας (π.χ. ενέργεια που απελευθερώνεται από μια χημική αντίδραση) οι μεταφορείς ονομάζονται πρωτογενούς ενεργού μεταφοράς. Όταν η ενέργεια για τη μεταφορά του υποστρώματος παρέχεται έμμεσα από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση κάποιου άλλου χημικού μορίου, ο μεταφορέας είναι δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς. Οι μεταφορείς δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς λειτουργούν είτε ως συμμεταφορείς που καταλύουν την μεταφορά δύο διαφορετικών μορίων διαμέσου της μεμβράνης προς την ίδια κατεύθυνση, είτε ως

αντιμεταφορείς που καταλύουν τη μεταφορά δύο διαφορετικών μορίων προς αντίθετες κατευθύνσεις (Yan, 2017).

1.2 Μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων

Από όλες τις πρωτεΐνες-μεταφορείς, στην εργασία αυτή εστιάζουμε στους μεταφορείς δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς που είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά νουκλεοτιδικών βάσεων, μια από τις σημαντικότερες ομάδες βιομορίων.

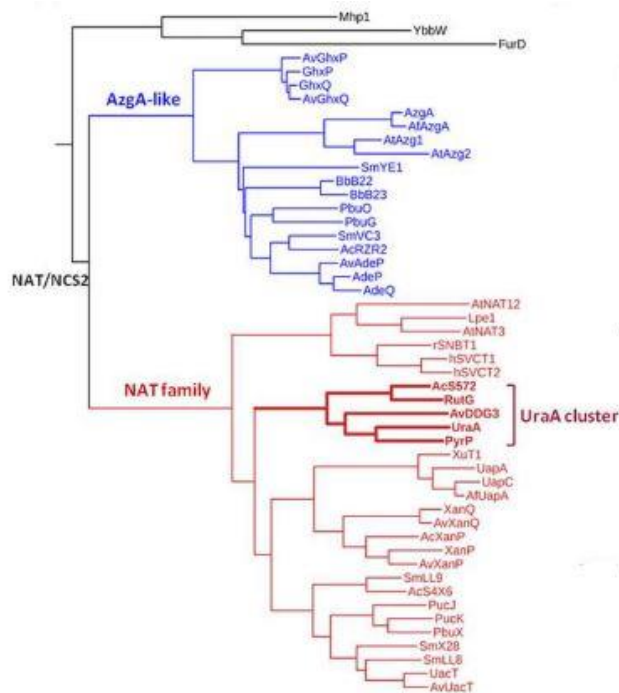
Τα νουκλεοτίδια είναι σημαντικά ως μονομερή για την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων μέσω των οποίων διατηρείται, αναπαράγεται και εκφράζεται η γενετική πληροφορία αλλά και ως μόρια με ρόλο σε πορείες σηματοδότησης και μεταβολισμού. Για αυτόν τον λόγο, η επιβίωση ενός κυττάρου εξαρτάται από την ικανότητα του να συνθέτει ή/και να μεταφέρει νουκλεοτίδια. Η βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων μπορεί να επιτευχθεί είτε με *de novo* πορείες που αξιοποιούν αμινοξέα ως πρόδρομα μόρια είτε με πορείες περίσωσης (*salvage*) που επαναχρησιμοποιούν νουκλεοτιδικές βάσεις και νουκλεοσίδια ή που τροφοδοτούνται με νουκλεοτιδικές βάσεις εξωγενώς. Σε κύτταρα όπου δεν λειτουργούν οι *de novo* πορείες σύνθεσης, η εξωγενής παροχή νουκλεοτιδικών βάσεων είναι πολύ σημαντική. Η μεταφορά τους εξαρτάται από ειδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-μεταφορείς.

Τέτοιοι μεταφορείς έχουν βρεθεί σε βακτήρια, αρχαία, μύκητες, φυτά αλλά και ζώα (Gournas et al., 2008). Στον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά εντοπίζονται κυρίως μεταφορείς νουκλεοσιδίων των οικογενειών CNT (Concentrative Nucleoside Transporter ή SLC28) και ENT (Equilibrative Nucleoside Transporter ή SLC29) (Young, 2016) ενώ στα φυτά περιλαμβάνεται ένα μεγάλο φάσμα πιθανών μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων που ανήκουν στις οικογένειες ENT, NCS1, NAT/NCS2 ή σε ξεχωριστές οικογένειες που έχουν εξελιχθεί μόνο στα φυτά, τις POP/PUP και NBUT/UPS (Girke et al., 2014). Σε βακτήρια και μύκητες η μεταφορά νουκλεοτιδικών βάσεων γίνεται από μεταφορείς που ανήκουν σε δύο κυρίως οικογένειες, την NCS1 (Nucleobase:Cation Symporters-1) και την NAT/NCS2 (Nucleobase-Ascorbate Transporters/Nucleobase:Cation Symporters-2) που εντάσσονται στην υπεροικογένεια APC (Amino acid-Polyamine-Organocation Family) (Wong et al., 2012).

Παρακάτω, αναλύεται εκτενέστερα η οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 με την οποία ασχολούμαστε στην παρούσα εργασία. Η οικογένεια αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς εντοπίζεται σε όλα τα φύλα οργανισμών (εκτός από τα Πρωτόζωα) και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μεταφορέων με πολλές διαφορετικές εξειδικεύσεις όπως μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και L-ασκορβικού οξέος (στα ομόλογα της στον άνθρωπο) (Frillingos, 2012).

1.3 Η οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2

Η οικογένεια συµμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων NAT/NCS2 είναι η µεγαλύτερη και ευρύτερη εξελικτικά οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων η οποία µε βάση την κατάταξη COG (Cluster of Orthology Groups) (Saier et al., 2021) διαιρείται σε δύο φυλογενετικές οµάδες, την COG2233 ή NAT και την COG2252 ή AzgA-like (**Εικόνα 1.1**).



Εικόνα 1.1 Φυλογενετικό δέντρο των χαρακτηρισµένων µελών της οικογένειας NAT/NCS2. Αποτελείται από δύο διακριτές φυλογενετικές οµάδες: την COG2252 ή AzgA-like και την COG2233 ή NAT family (Botou et al., 2018).

Η φυλογενετική οµάδα COG2252 ή AzgA-like περιλαµβάνει μεταφορείς αδενίνης, γουανίνης και υποξανθίνης από βακτήρια, µύκητες, αρχαία και φυτά (Cecchetto et al., 2004; Girke et al., 2014). Μεταξύ των χαρακτηρισµένων οµολόγων αυτής της φυλογενετικής υποοµάδας βρίσκονται ο μεταφορέας ξανθίνης/αδενίνης/γουανίνης AzgA του *A. nidulans* (Cecchetto et al., 2004), οι βακτηριακοί μεταφορείς αδενίνης AdeP (PurP) και AdeQ (YicO) και υποξανθίνης/γουανίνης GhxP (YjcD) και GhxQ (YgfQ) του *E. coli* (Papakostas et al., 2013) και ο μεταφορέας αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης SmVC3 του *S. meliloti* (Botou et al., 2020).

Η φυλογενετική οµάδα COG2233 ή NAT περιλαµβάνει μεταφορείς από όλες τις ταξινοµικές οµάδες οργανισµών µε εξαίρεση τα Πρωτόζωα και τον µύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Οι μεταφορείς της φυλογενετικής οµάδας NAT είναι κυρίως μεταφορείς ουρακίλης, ξανθίνης, ουρικού οξέος και L-ασκορβικού οξέος (όταν πρόκειται για μεταφορείς που προέρχονται από θηλαστικά). Η φυλογενετική οµάδα NAT υποδιαιρείται σε τρεις µεγάλους κλάδους µε βάση τη φυλογενετική ανάλυση των λειτουργικά χαρακτηρισµένων οµολόγων. Ένας από

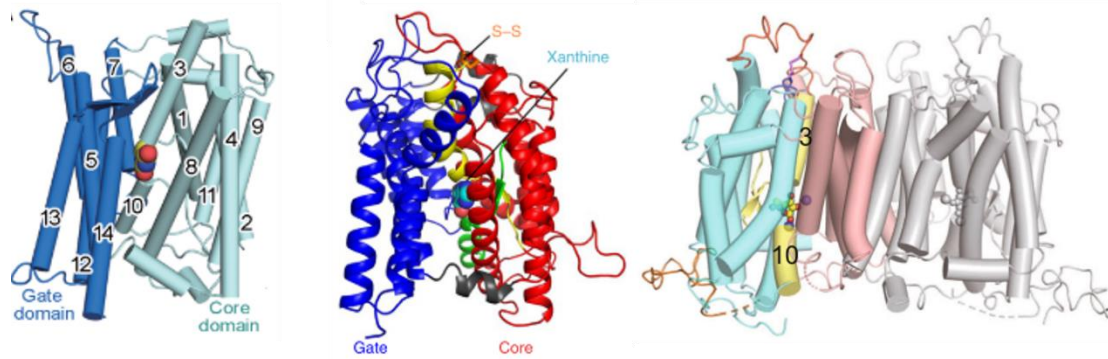
τους κλάδους περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος από βακτήρια και μύκητες, ο δεύτερος μεταφορείς ουρακίλης/πυριμιδινών από βακτήρια και ο τελευταίος περιλαμβάνει μεταφορείς ουρακίλης/πυριμιδινών από ζώα και φυτά και μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος από θηλαστικά (Frillingos, 2012).

Αν και ο αριθμός των ομόλογων μεταφορέων που ανήκουν στην οικογένεια NAT/NCS2 είναι πολύ μεγάλος, αυτοί που έχουν αναλυθεί ως προς τη σχέση δομής-λειτουργίας τους έως και σήμερα είναι λίγοι. Μεταξύ αυτών είναι: ο μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος UapA του μύκητα *A. nidulans* (Diallinas & Scazzocchio, 1989), ο μεταφορέας ουρακίλης UraA από *E. coli*, ο ευρείας εξειδίκευσης RutG που μεταφέρει ουρακίλη, θυμίνη και ξανθίνη με χαμηλή συγγένεια (Botou et al., 2018; Lu et al., 2011; Yu et al., 2017), ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ (Karatza & Frillingos, 2005) και ουρικού οξέος UacT από *E. coli* (Parakostas & Frillingos, 2012), ο μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος SmXUacT του συμβιωτικού ριζόβιου *S. meliloti* (Botou et al., 2020), καθώς και οι μεταφορείς L-ασκορβικού οξέος SVCT1/2 που εντοπίζονται σε θηλαστικά (Bürzle et al., 2013).

1.3.1 Κοινή δομή και μηχανισμός λειτουργίας των μεταφορέων της NAT/NCS2

Παρά τις διαφορετικές τους εξειδικεύσεις, οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 μοιράζονται συντηρημένα μοτίβα και φαίνεται να έχουν το ίδιο πρότυπο τριτοταγούς δομής. Πρότυπο της δομικής τους οργάνωσης αποτελούν οι κρυσταλλικές δομές που έχουν αναλυθεί για τους μεταφορείς UraA του *E. coli* (Lu et al., 2011;; Yu et al., 2017) και UapA του μύκητα *A. nidulans* (Alguel et al., 2016) και η δομή από ηλεκτρονική μικροσκοπία cryoEM του SVCT1 του ποντικού (Wang et al., 2023) (**Εικόνα 1.2**) (Alguel et al., 2016; Lu et al., 2011; Wang et al., 2023; Yu et al., 2017).

Με βάση αυτές τις δομές, γνωρίζουμε ότι οι μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 έχουν 14 διαμεμβρανικά τμήματα (TMs) με αντίστροφη εσωτερική συμμετρία (7+7 inverted repeat) που οργανώνονται στο χώρο σε δύο δομικές περιοχές (domains), την core/transport domain και την gate/scaffold domain. Η core/transport domain συγκροτείται από τα TMs 1-4 και 8-11 και είναι η περιοχή του ενεργού κέντρου που περιέχει όλα τα κατάλοιπα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα. Η gate/scaffold domain συγκροτείται από τα TMs 5-7 και 12-14 και περιέχει δομικά στοιχεία που παίζουν ρόλο στον έλεγχο της πρόσβασης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο και στις διαμορφωτικές αλλαγές του μεταφορέα (Frillingos, 2012). Οι μεταφορείς αυτοί φαίνεται να λειτουργούν σε διμερή τα οποία σχηματίζονται μέσω αλληλεπίδρασης των gate domains (Diallinas, 2016; Yu et al., 2017).



Εικόνα 1.2 Οι δομές των μεταφορέων UraA, UraP, SVCT1 της οικογένειας NAT/NCS2 . Α) Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα UraA της *E. coli*, με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται οι δομικές περιοχές πυρήνα (core domain) (ανοιχτό μπλε) και εισόδου (gate domain) (μπλε) (Lu et al., 2011) Β) Κρυσταλλική δομή του μεταφορέα UraP του *A. nidulans*, με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται οι περιοχές του πυρήνα (κόκκινο), της εισόδου (μπλε). Ο μεταφορέας απεικονίζεται με προσδεμένο το υπόστρωμα της ξανθίνης (Alguet et al., 2016). Γ) Δομή cryoEM του μεταφορέα SVCT1 του ποντικού, απεικονίζεται σε μορφή διμερούς. Με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται οι περιοχές πυρήνα (μπλε) και εισόδου (κόκκινο) στο μονομερές του μεταφορέα στα αριστερά (Wang et. al, 2023).

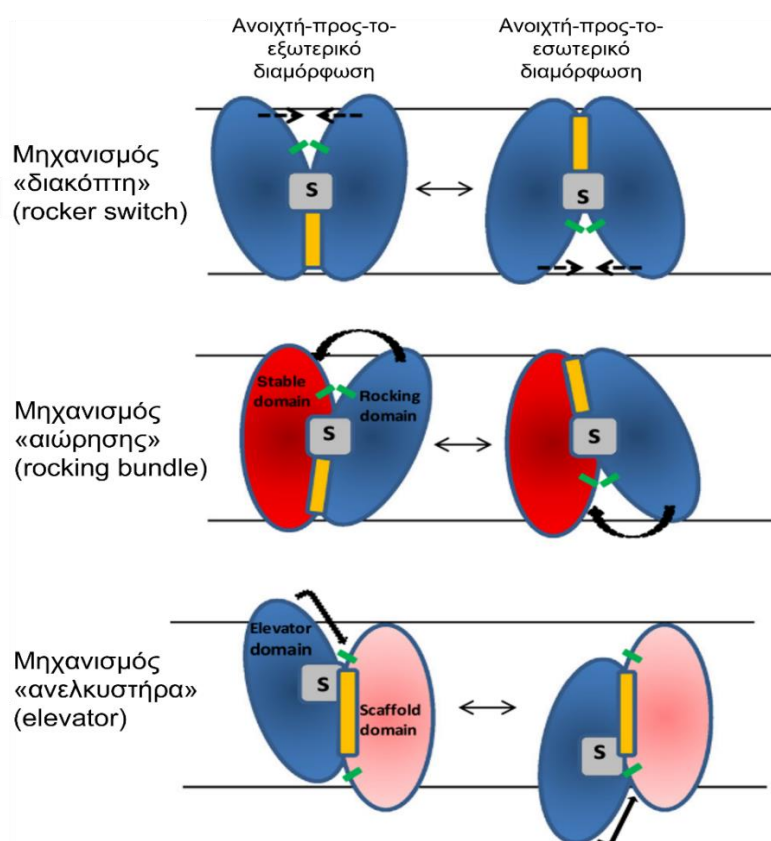
Ο γενικός μηχανισμός λειτουργίας που ισχύει για τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς είναι αυτός της εναλλασσόμενης πρόσβασης. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, ο μεταφορέας αλλάζει διαμορφωτικές καταστάσεις για να επιτρέψει την έκθεση της θέσης δέσμευσης του υποστρώματος στις δύο αντίθετες πλευρές μιας μεμβράνης. Ένας κύκλος μεταφοράς αποτελείται από μια σειρά διαφορετικών διαμορφωτικών καταστάσεων του μεταφορέα: αρχικά είναι προσβάσιμος ή ανοιχτός προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης (outward open) προκειμένου να δεσμεύσει το υπόστρωμα, έπειτα περνάει από ένα ενδιάμεσο στάδιο κατά το οποίο είναι κλειστός και ως προς τις δύο πλευρές (occluded state) ώστε τέλος να απελευθερώσει το υπόστρωμα στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης (inward open). Ένας κύκλος λειτουργίας ολοκληρώνεται με την επαναφορά του μεταφορέα στην αρχική, ανοιχτή προς το εξωτερικό διαμόρφωση (Kaback, 2015).

Για την περιγραφή αυτού του τρόπου λειτουργίας, έχουν προταθεί τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί εναλλασσόμενης πρόσβασης: α) ο μηχανισμός «διακόπτη» (rocker switch) β) ο μηχανισμός «αίωρησης» (rocking bundle) και γ) ο μηχανισμός «ανεγκυστήρα» (elevator) (**Εικόνα 1.3**) (Drew & Boudker, 2016).

Πιο συγκεκριμένα, για τους μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 προτείνεται ο μηχανισμός τύπου «ανεγκυστήρα» (elevator type) (Alguet et al., 2016; Yu et al., 2017). Στον μηχανισμό «ανεγκυστήρα» (elevator), η μια από τις δύο δομικές περιοχές που ονομάζεται core ή transport domain ολισθαίνει πάνω στην άλλη δομική περιοχή που ονομάζεται gate ή scaffold domain και παραμένει ακίνητη στη μεμβράνη. Κατ' αυτόν τον τρόπο, το transport

domain οδηγεί το υπόστρωμα στη θέση πρόσδεσης στο κέντρο δέσμευσης που βρίσκεται στην μεσεπιφάνεια των δύο δομικών περιοχών.

Οι περισσότεροι από τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς που χρησιμοποιούν αυτόν τον μηχανισμό για την μετατόπιση του υποστρώματος, λειτουργούν σε διμερή ή τριμερή. Ο σχηματισμός των ολιγομερών γίνεται μέσω των δομικών περιοχών scaffold (Drew & Boudker, 2016).



Εικόνα 1.3 Μηχανισμοί εναλλασσόμενης πρόσδεσης. Οι τρεις τύποι του μηχανισμού για την εναλλαγή των μεταφορέων από την ανοικτή προς τα έξω στην ανοικτή προς τα μέσα διαμόρφωση. Α) Μηχανισμός «διακόπτη» (rocker-switch): Δύο δομικά παρόμοιες περιοχές (μπλε) κινούνται για την πρόσδεση ή απελευθέρωση των υποστρωμάτων (S). Η θέση δέσμευσης του υποστρώματος διαμορφώνεται από κατάλοιπα που βρίσκονται και στις δύο περιοχές. Β) Μηχανισμός «αιώρησης» (rocking-bundle): Η μία από τις δύο δομικές περιοχές (rocking domain) (μπλε) κινείται γύρω από την άλλη που είναι σταθερή (stable domain) (κόκκινο), εξασφαλίζοντας την πρόσδεση και την απελευθέρωση του υποστρώματος (S). Η θέση δέσμευσης του υποστρώματος δημιουργείται από κατάλοιπα που βρίσκονται στην μεσεπιφάνεια των δύο δομικών περιοχών. Γ) Μηχανισμός «ανεγκυστήρα» (elevator): Η μία από τις δύο δομικές περιοχές (elevator domain) (μπλε), στην οποία βρίσκεται και η θέση δέσμευσης του υποστρώματος, ολισθαίνει πάνω στην άλλη που παραμένει άκαμπτη (scaffold domain) (ροζ), ώστε να μετατοπιστεί το υπόστρωμα (Diallinas, 2021).

1.3.2 Κατανόηση των διαφορετικών εξειδικεύσεων των μεταφορέων της NAT/NCS2

Όσο αφορά τη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας και την κατανόηση των διαφορετικών εξειδικεύσεων των μεταφορέων της οικογένειας NAT/NCS2 σε μοριακό επίπεδο, τα δεδομένα μέχρι στιγμής είναι σχετικά περιορισμένα. Στο εργαστήριό μας, η μελέτη αυτή έχει εστιάσει σε δύο φυλογενετικούς υποκλάδους της οικογένειας: στον υποκλάδο των

ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος με χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli* και στον υποκλάδο μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης με αντιπροσωπευτικούς μεταφορείς τον UraA που μεταφέρει ουρακίλη και τον RutG που μεταφέρει ουρακίλη, θυμίνη και ξανθίνη της *E. coli* (Botou et al., 2018; Karatza & Frillingos, 2005). Αντίστοιχες λειτουργικές μελέτες έχουν γίνει και στον μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UarA του *A. nidulans* (Alguel et al., 2016; Diallinas, 2014).

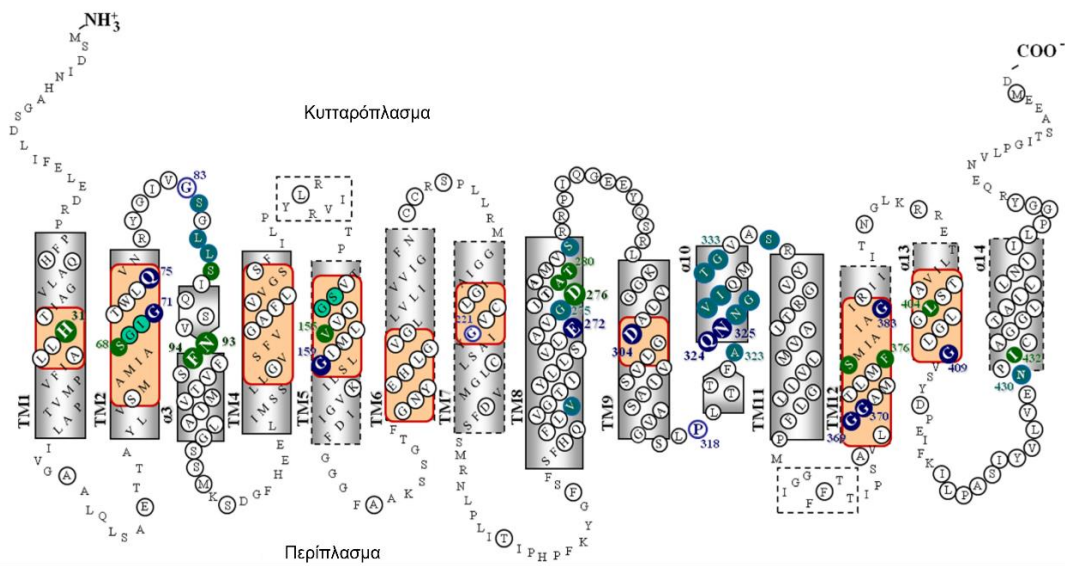
Ο μεταφορέας XanQ της *E. coli* έχει χαρακτηριστεί ως υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης (Karatza & Frillingos, 2005). Ανήκει στην υποομάδα COG2233 της οικογένειας NAT/NCS2 (Chaliotis et al., 2018) και ακολουθεί το δομικό πρότυπο του μεταφορέα UraA της ίδιας οικογένειας (Lu et al., 2011; Yu et al., 2017). Στην αλληλουχία εντοπίζεται το χαρακτηριστικό μοτίβο-υπογραφή (NAT signature motif) της οικογένειας NAT/NCS2, (A/G/S)(Q/E/P)NXGXXXXT(R/K/G), μια συντηρημένη αλληλουχία 11 αμινοξέων που βρίσκεται μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων TM9a και TM9b (Georgoroulou et al., 2010). Οι αναλύσεις του XanQ έχουν στηριχθεί σε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης και σε in vitro μεταλλαξιγένεση στο σύνολο σχεδόν του μορίου (Karena et al., 2015).

Οι αναλύσεις αυτές, σε συνδυασμό και με δεδομένα από τα δομικά πρότυπα, υποδεικνύουν ένα σύνολο σημαντικών θέσεων αμινοξέων που θεωρούνται είτε αναντικατάστατα για τη λειτουργία είτε υπόκεινται σε περιορισμούς αντικατάστασης ως προς το χαρακτήρα του αμινοξέος. Οι θέσεις αυτών των αμινοξέων βρίσκονται τόσο στο κέντρο δέσμευσης όσο και περιφερειακά αυτού (**Εικόνα 1.4**).

Συγκεκριμένα για την εξειδίκευση του μεταφορέα XanQ, οι θέσεις των σημαντικών αμινοξέων εντοπίστηκαν κυρίως στο TM3. Αυτά είναι τα Phe94 και το λιγότερο συντηρημένο Asn93 που αντικαθίσταται από Ser ή Thr σε άλλους ομόλογους μεταφορείς του κλάδου. Ειδικότερα, η Asn93 φαίνεται να παίζει κομβικό ρόλο στην εξειδίκευση για ξανθίνη και τον αποκλεισμό του ουρικού οξέος ως υποστρώματος, όπως έχει φανεί από μελέτες μεταλλαξιγένεσης όχι μόνο στον XanQ (Karena & Frillingos, 2011) αλλά και σε συγγενικούς μεταφορείς ομόλογους του XanQ (Papakostas & Frillingos, 2012; Botou et al., 2020). Σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση και ειδικότερα στην υψηλή συγγένεια πρόσδεσης της ξανθίνης φαίνεται να παίζει και το συντηρημένο κατάλοιπο His31 (Karena & Frillingos, 2009, 2011).

Οι αναλύσεις του XanQ υπέδειξαν επίσης θέσεις στο κέντρο δέσμευσης (Georgoroulou et al., 2010; Karena & Frillingos, 2009) και περιφερειακά αυτού (Mermelekas et al., 2010) που

είναι σημαντικές για την πρόσδεση του υποστρώματος και την υψηλή ενεργότητα του μεταφορέα.

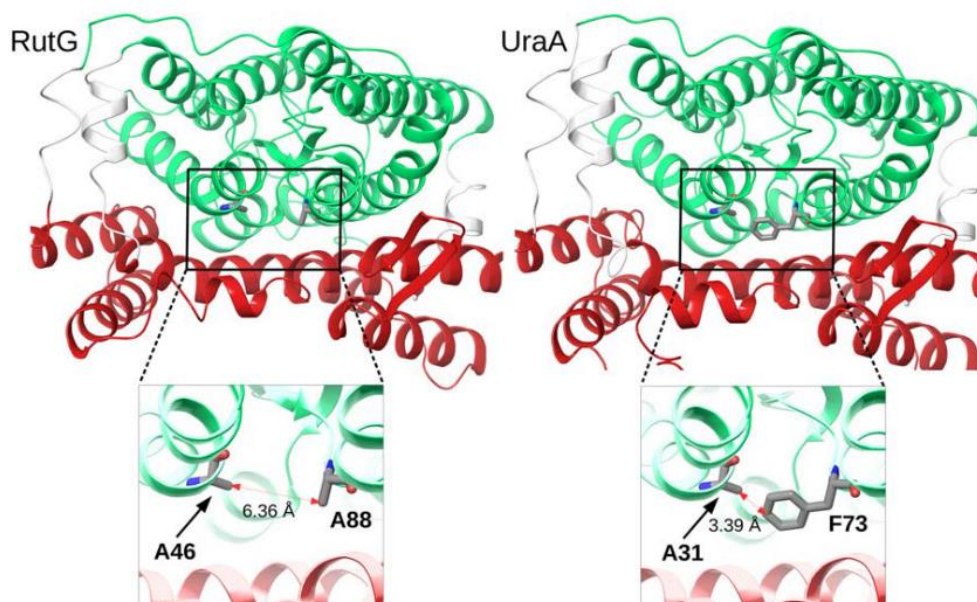


Εικόνα 1.4 Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα ξανθίνης XanQ. Τα αμινοξέα που έχουν μελετηθεί με μεταλλαξιγένεση είναι κυκλωμένα και όσα έχουν χαρακτηριστεί αναντικατάστατα για τη λειτουργία του XanQ είναι αριθμημένα και σε μπλε χρώμα, αυτά που η αντικατάστασή τους οδηγεί σε μη έκφραση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη είναι κυκλωμένα με μπλε και όσα αμινοξέα σχετίζονται με τον μηχανισμό λειτουργίας αλλά δεν είναι αναντικατάστατα, με πράσινους κύκλους (Kargena et al., 2015).

Αντίστοιχες αναλύσεις έχουν γίνει και για τους μεταφορείς UraA και RutG της *E. coli* που ανήκουν σε διαφορετικό κλάδο της ίδιας οικογένειας μεταφορέων. Ο μεταφορέας UraA έχει χαρακτηριστεί ως μεταφορέας ουρακίλης (Andersen et al., 1995; Lu et al., 2011; Botou et al., 2018) ενώ ο RutG είναι ευρύτερης εξειδίκευσης καθώς μεταφέρει εκτός από ουρακίλη, θυμίνη και, με χαμηλή συγγένεια, ξανθίνη (Botou et al., 2018). Αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης στους δύο μεταφορείς σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες κρυσταλλικές δομές για τον UraA, υπέδειξαν ως σημαντικό για την εξειδίκευση το κατάλοιπο Phe73 στον μεταφορέα UraA. Παρά την γενικότερη ομοιότητα του RutG με τον UraA, το κατάλοιπο Phe73 αντικαθίσταται στον μεταφορέα RutG από Ala88. Η μικρότερου μήκους και μικρού όγκου πλευρική αλυσίδα της Ala δημιουργεί κενό χώρο στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος και επιτρέπει την πρόσβαση σε υποστρώματα μεγαλύτερου μεγέθους (**Εικόνα 1.5**). Αυτό εξηγεί και την ευρύτερη εξειδίκευση του μεταφορέα RutG σε σχέση με τον μεταφορέα UraA, στον οποίο η παρουσία του πιο ογκώδους καταλοίπου Phe73 παρεμποδίζει στερεοχημικά την πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης σε άλλα υποστρώματα (π.χ. θυμίνη ή ξανθίνη) πέραν την ουρακίλης (Botou et al., 2018).

Η συγκριτική ανάλυση των μεταφορέων UraA και RutG υπέδειξε και άλλα κατάλοιπα σημαντικά για την λειτουργία των μεταφορέων που θεωρούνται αναντικατάστατα και

συντηρούνται στον ευρύτερο υποκλάδο της οικογένειας NAT/NCS2. Τα κατάλοιπα αυτά στον μεταφορέα UraA είναι τα Gly289 (Ala308 στον RutG), Glu290 (Glu309 στον RutG) και Glu241 (Glu262 στον RutG) τα οποία, όπως και το Phe73 (Ala88), δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με το υπόστρωμα της ουρακίλης. Αναντικατάστατα ως προς τη λειτουργία θεωρούνται επίσης τα κατάλοιπα His245 (His266) και Ser72 (Ser87) (Botou et al., 2018).



Εικόνα 1.5 Δομική σύγκριση των μεταφορέων RutG και UraA για την κατανόηση της σημασίας των καταλοίπων Ala88/Phe73. Οι δύο μεταφορείς απεικονίζονται χωρίς προσδεμένο σε αυτούς υπόστρωμα. Σημειώνονται τα κατάλοιπα Ala88 (RutG) και Phe73 (UraA) για την απεικόνιση του χώρου που υπάρχει στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος στην κάθε περίπτωση. Οι περιοχές δομικές περιοχές πυρήνα (core) και εισόδου (gate) επισημαίνονται με πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα (Botou et al., 2018).

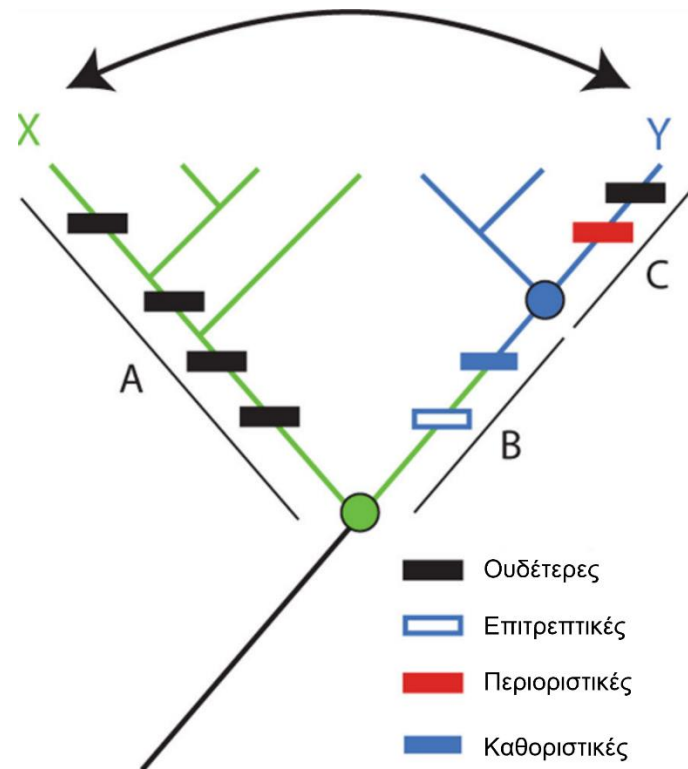
Συνολικά, από τις έως τώρα μελέτες σχέσεων δομής-λειτουργίας έχουν προκύψει ενδείξεις για ορισμένες σημαντικές θέσεις αμινοξέων οι οποίες όμως δεν αρκούν για να δώσουν μια πλήρη εικόνα για το πως καθορίζονται οι διαφορετικοί τύποι εξειδίκευσης ή για το πως αυτοί έχουν εξελιχθεί. Για να προσεγγιστούν τα ερωτήματα αυτά, είναι απαραίτητη η εισαγωγή νέων ερευνητικών μεθοδολογιών που δεν θα στηρίζονται μόνο σε αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης των σύγχρονων αλληλουχιών, αλλά θα συνεκτιμούν και την εξελικτική τους πορεία. Μια τέτοια στρατηγική είναι η Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών η οποία βασίζεται σε εξαγωγή, ανασύνθεση, λειτουργική ανάλυση και μεταλλαξιγένεση προγονικών πρωτεϊνικών αλληλουχιών και περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

1.4 Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών

Ένα ερευνητικό ερώτημα όσο αφορά τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των πρωτεϊνών είναι το πως αναπτύσσονται οι διαφορετικές λειτουργικές εξειδικεύσεις ανάμεσα σε ομόλογες πρωτεΐνες που ανήκουν σε οικογένειες με ευρεία διάδοση και υψηλό

βαθμό εξελικτικής συντήρησης και δεν διαφέρουν ουσιαστικά ούτε στο γενικό μοτίβο δομής, ούτε σε σημαντικά αμινοξέα του ενεργού τους κέντρου. Ένας τρόπος να απαντηθεί το ερώτημα αυτό είναι η «οριζόντια» σύγκριση των αλληλουχιών σημερινών ομόλογων πρωτεϊνών. Στην οριζόντια ανάλυση μια πρωτεΐνη ενδιαφέροντος συγκρίνεται με μια τουλάχιστον ομόλογη πρωτεΐνη που έχει σημαντική ομοιότητα στη δομή και την αλληλουχία αλλά διαφορετική λειτουργία. Για να προσδιοριστούν οι καθοριστικές αλλαγές στην αλληλουχία που είναι υπεύθυνες για τη λειτουργική παραλλαγή, αμινοξέα της μιας πρωτεΐνης αντικαθίστανται με αντίστοιχα της άλλης, μέσω πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης. Στην περίπτωση που εντοπιστούν αντικαταστάσεις καταλοίπων που αλλάζουν την λειτουργία σε εκείνη του άλλου ομολόγου, μπορούν να χαρτογραφηθούν στο δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης για να εντοπιστούν τα δομικά στοιχεία που ευθύνονται για τη διαφορά στη λειτουργία (Hochberg & Thornton, 2017).

Στην πράξη, ωστόσο, τα πειράματα οριζόντιας ανάλυσης συχνά αποτυγχάνουν να εντοπίσουν διαφορές στην αλληλουχία που ευθύνονται για τις λειτουργικές διαφορές. Αυτό συμβαίνει γιατί οι διαφορές που εντοπίζονται στις αλληλουχίες των δύο ομολόγων με την οριζόντια σύγκριση δεν είναι απαραίτητα υπεύθυνες για την αλλαγή της εξειδίκευσης και επιπλέον με την προσέγγιση αυτή δεν λαμβάνεται υπόψη το φαινόμενο της δομικής (διαμορφωτικής) επίστασης (conformational epistasis) (Starr & Thornton, 2016). Κατά την πορεία της εξέλιξης συσσωρεύονται στα σημερινά ομόλογα παράλληλες μεταλλαγές εκτός αυτών που ήταν καθοριστικές για την αλλαγή στην εξειδίκευση και, λόγω διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με αμινοξέα σε άλλες θέσεις του μορίου, ένα αμινοξύ μπορεί να αποκτά διαφορετικό ρόλο από αυτόν που είχε αρχικά στο διαφορετικό «περιβάλλον» μεταλλαγών που συνυπάρχουν σε άλλες θέσεις. Δηλαδή, αλλαγές αμινοξέων που υπήρξαν σημαντικές κατά την εξέλιξη για την εδραίωση μιας νέας λειτουργίας δεν μπορούν πλέον να αναδειχθούν στο υπόβαθρο των σημερινών μορίων, γιατί σε αυτά προκαλούν αρκετά διαφορετικές επιπτώσεις, λόγω αλληλεπίδρασης με ορισμένες από τις άλλες θέσεις μεταλλαγών που έχουν εισαχθεί παράλληλα. Αυτές οι παράλληλες μεταλλαγές που επηρεάζουν τον λειτουργικό ρόλο των σημαντικών θέσεων αμινοξέων χωρίς να είναι καθοριστικές από μόνες τους ονομάζονται επιστατικές, και μπορεί να είναι επιτρεπτικές (permissive) ή περιοριστικές (restrictive). Οι επιτρεπτικές αλλαγές προαπαιτούνται για την εδραίωση των καθοριστικών μεταλλαγών ενώ οι περιοριστικές αποτρέπουν την αλλαγή εξειδίκευσης που θα επέφερε μια καθοριστική μεταλλαγή (**Εικόνα 1.6**) (Hochberg & Thornton, 2017).



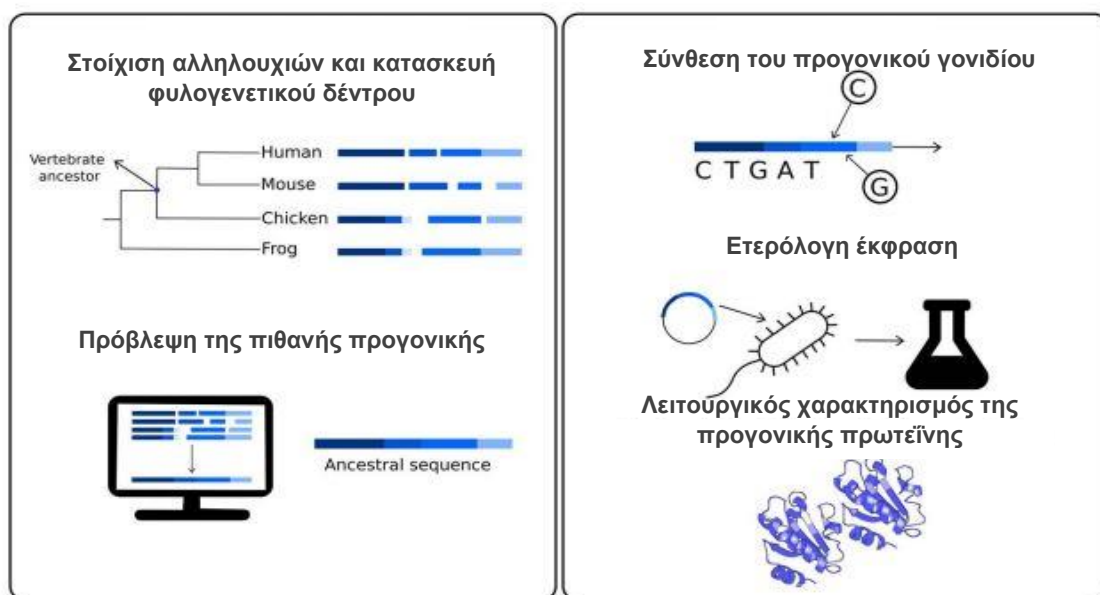
Εικόνα 1.6 Οριζόντια και κάθετη ανάλυση των σχέσεων αλληλουχίας- λειτουργίας. Για τον εντοπισμό διαφορών στην αλληλουχία, που οδηγούν σε διαφοροποίηση στη λειτουργία (πράσινο ή μπλε) μεταξύ των παράλογων πρωτεϊνών X και Y, με οριζόντια σύγκριση (βέλος) θα λαμβάνονταν υπόψιν όλες οι αλλαγές στους κλάδους A, B, C (ορθογώνια με τα αντίστοιχα χρώματα). Επιτρεπτικές μεταλλάξεις από μόνες τους δεν επηρεάζουν τη λειτουργία, αλλά επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να δεχθεί μια νέα λειτουργία. Έτσι, αλλαγή αμινοξέων, σημαντικών για τη λειτουργία, μεταξύ των πρωτεϊνών X και Y οδηγεί σε μη λειτουργική πρωτεΐνη, γιατί δεν υπάρχουν οι απαραίτητες επιτρεπτικές μεταλλάξεις. Περιοριστικές μεταλλάξεις στην προγονική πρωτεΐνη επίσης δεν επιτρέπουν τέτοιες αλλαγές στις σύγχρονες X και Y. Με κάθετη ανάλυση καθορίζεται η λειτουργία της προγονικής πρωτεΐνης (κύκλος) και απομονώνει την τροποποίησή της προς τον κλάδο B, μειώνοντας τις αλλαγές που λαμβάνονται υπόψιν και περιορίζοντας την επίδραση της επίστασης (Hochberg and Thornton, 2017).

Οι περιορισμοί της οριζόντιας σύγκρισης μπορούν να αντιμετωπιστούν με την εξελικτική «κάθετη» ανάλυση που στηρίζεται στην Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών εξετάζοντας τον τρόπο με τον οποίο οι αλληλουχίες, οι δομές και οι λειτουργίες μιας οικογένειας πρωτεϊνών άλλαξαν με την πάροδο του χρόνου.

Με την ανασύσταση διαδοχικών κοινών προγόνων σε μια οικογένεια πρωτεϊνών, μπορεί να εντοπισθούν οι αλλαγές αμινοξέων που προκαλούν αλλαγή στην λειτουργία ή τη δομή σε ένα συγκεκριμένο φυλογενετικό κλάδο. Οι υποψήφιες μεταλλαγές που καθόρισαν την αλλαγή της εξειδίκευσης μπορούν να ελεγχθούν πειραματικά με την εισαγωγή τους στην προγονική πρωτεΐνη που ανασυστάθηκε. Αυτή η προσέγγιση μειώνει δραματικά τον αριθμό των διαφορών αλληλουχίας μεταξύ πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργίες, διευκολύνοντας την αναγνώριση των καταλοίπων που ευθύνονται για την αλλαγή της λειτουργίας και των δομικών στοιχείων που την επηρεάζουν. Επιπλέον, μειώνει την επίδραση της επίστασης καθώς οι καθοριστικές υποκαταστάσεις επανεισάγονται μέσω της

μεταλλαξιγένεσης στην προγονική αλληλουχία καθιστώντας το υπόβαθρο αλληλουχίας ίδιο ή παρόμοιο με αυτό στο οποίο πράγματι συνέβησαν (Hochberg & Thornton, 2017).

Η μέθοδος της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών (Ancestral Sequence Reconstruction, ASR) αποτελείται από πέντε βήματα (**Εικόνα 1.7**). Πρώτα, ένα σύνολο σημερινών αλληλουχιών, ομόλογες με την υπό μελέτη προγονική πρωτεΐνη, στοιχίζονται και χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Από τα φυλογενετικά δέντρα μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την εξελικτική σχέση των σύγχρονων πρωτεϊνών με την προγονική. Με βάση αυτές τις εξελικτικές σχέσεις εφαρμόζονται, στο επόμενο βήμα, οι τεχνικές της ανασύστασης προγονικών πρωτεϊνών για να εξαχθεί η πιθανότερη αλληλουχία για κάθε προγονική πρωτεΐνη. Οι τεχνικές της ανασύστασης συμπεριλαμβάνουν υπολογιστικά εργαλεία που χρησιμοποιούν διάφορους αλγορίθμους. Στη συνέχεια, η προτεινόμενη αλληλουχία για την προγονική πρωτεΐνη μπορεί να συντεθεί, μέσω γονιδιακής σύνθεσης (gene synthesis). Μετά την σύνθεση της, η αλληλουχία κλωνοποιείται σε ετερόλογο σύστημα και η πρωτεΐνη εκφράζεται και απομονώνεται. Στο τελευταίο βήμα, επομένως, η προγονική πρωτεΐνη μπορεί να χαρακτηριστεί πειραματικά και να μελετηθεί όπως οποιαδήποτε άλλη, σημερινή πρωτεΐνη (Carletti et al., 2020).



Εικόνα 1.7 Στρατηγική της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών. Απεικονίζονται σχηματικά τα βήματα που απαιτούνται για την ανασύσταση και τον χαρακτηρισμό μιας προγονικής πρωτεΐνης (Carletti et al., 2020).

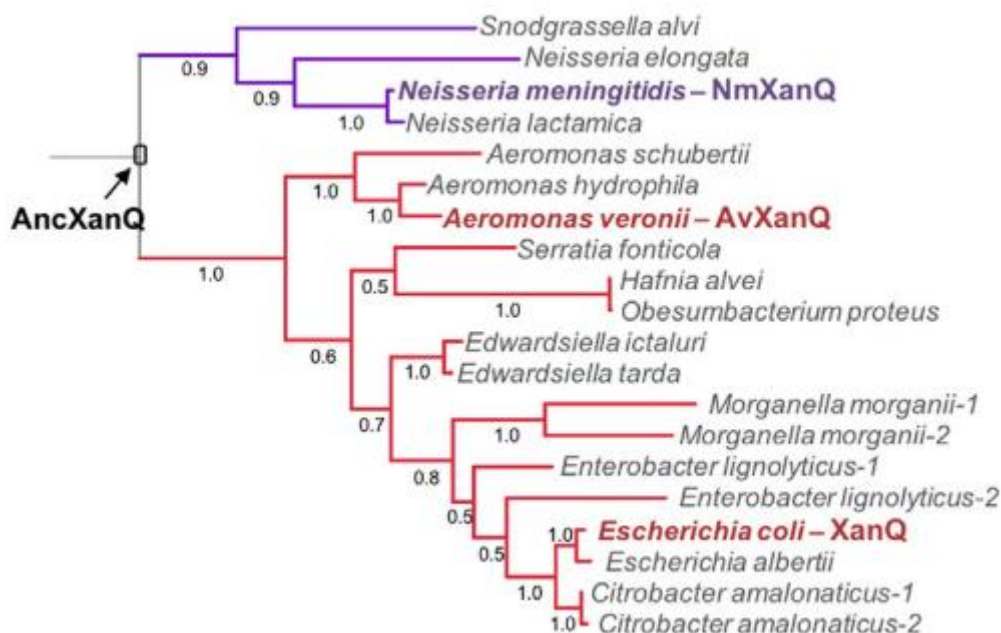
Η στρατηγική αυτή έχει εφαρμοστεί σε αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών όπως υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Ortlund et al., 2007), οψίνες (Yokoyama & Bernhard, 2001), GFP-like πρωτεΐνες (Field & Matz, 2010), κινάσες (Wilson et al., 2015) κ.α. Καθώς το ενδιαφέρον για την μέθοδο της ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών αυξάνεται, έχει δημιουργηθεί μια

βάση δεδομένων για τις πρωτεΐνες που έχουν ανασυσταθεί. Αυτή η βάση δεδομένων ονομάζεται Revenant και περιέχει έως σήμερα περισσότερες από 200 προγονικές πρωτεΐνες (Carletti et al., 2020).

Όσο αφορά τις πρωτεΐνες-μεταφορείς, που είναι και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, η μέθοδος της ανασύστασης προγονικής αλληλουχίας έχει εφαρμοστεί στην περίπτωση μεταφορέων καρβοξυλικού οξέος (Savory et al., 2018) και μεταφορέων νουκλεοτιδίων NTT (Dean et al., 2018) και, πρόσφατα, μεταφορέων ασπαρτικού (Reddy et al., 2024). Η μέθοδος ανασύστασης προγονικής αλληλουχίας έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, όπως περιγράφεται παρακάτω, σε μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων της οικογένειας NAT/NCS2 (Tatsaki et al., 2021).

1.4.1 Ανασύσταση προγονικών μεταφορέων στην οικογένεια NAT/NCS2

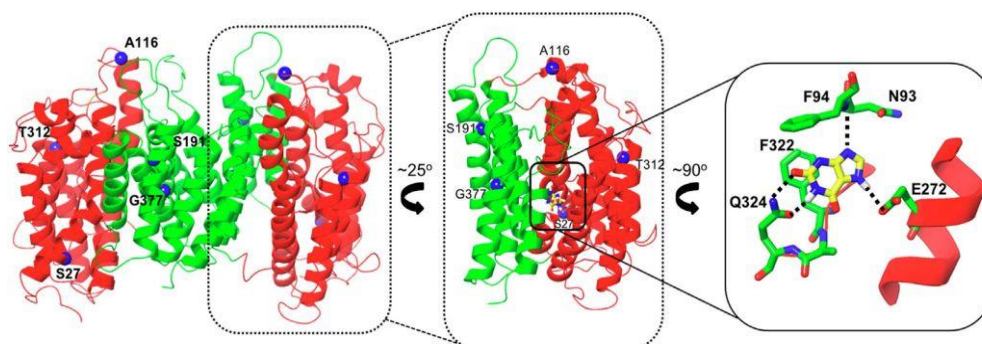
Η μέθοδος της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών εφαρμόστηκε σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας σε μια προσπάθεια κατανόησης του ρόλου συγκεκριμένων αμινοξέων στην εξέλιξη των εξειδικεύσεων πρωτεϊνών ενεργού διαμεμβρανικής μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων. Με εφαρμογή της μεθόδου ανασυστάθηκε ο μεταφορέας AncXanQ, που αποτελεί τον κοινό πρόγονο σε ένα μονοφυλετικό κλάδο της οικογένειας NAT/NCS2 που αντιπροσωπεύεται από τον χαρακτηρισμένο μεταφορέα ξανθίνης XanQ του *E. coli* (**Εικόνα 1.8**).



Εικόνα 1.8 Φυλογενετικό δέντρο των ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης στα Πρωτεοβακτήρια. Οι μεταφορείς ανήκουν στον κλάδο ξανθίνης της οικογένειας NAT/NCS2 και συγκεκριμένα στον υποκλάδο που αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα XanQ της *E. coli* (Tatsaki et al., 2021).

Μετά την ανασύσταση, η πρωτεΐνη-μεταφορέας AncXanQ εκφράστηκε με επιτυχία σε κύτταρα *E. coli* K-12 και αναλύθηκε πειραματικά. Η ανάλυση έδειξε ότι ο AncXanQ είναι ευρύτερης εξειδίκευσης και μεταφέρει ξανθίνη και γουανίνη, σε αντίθεση με τον XanQ που μεταφέρει μόνο ξανθίνη. Όσο αφορά το προφίλ εξειδίκευσης φαίνεται πως ο AncXanQ αναγνωρίζει ένα ευρύ φάσμα αναλόγων, μεταξύ των οποίων και ανάλογα όπως η αδερίνη που δεν αναγνωρίζονται από τους μεταφορείς ξανθίνης XanQ και γουανίνης-υποξανθίνης GhxP της *E. coli* (Parakostas et al., 2013).

Ο επόμενος στόχος που προέκυψε μετά την λειτουργική ανάλυση του προγονικού μεταφορέα AncXanQ, ήταν να εντοπιστούν τα κατάλοιπα εκείνα που είναι πιθανώς υπεύθυνα για τη διαφορετική, ευρύτερη εξειδίκευση του σε σχέση με τον μεταφορέα XanQ. Εκτός από κάποιες συντηρημένες αλλαγές υδρόφοβων καταλοίπων, ο AncXanQ διαφέρει με τον XanQ μόνο σε πέντε θέσεις αμινοξέων που βρίσκονται σε διαμεμβρανικά τμήματα. Οι θέσεις αυτές στον AncXanQ είναι οι Ser27, Ala116, Ser191, Thr312 και Gly377 (**Εικόνα 1.9**). Μέσω πειραμάτων μεταλλαγμένης, δείχθηκε ότι τα αμινοξέα στις θέσεις αυτές παίζουν πιθανώς ρόλο στην διαφορετική εξειδίκευση του AncXanQ καθώς μετάλλαγμα του AncXanQ με αλλαγές στις πέντε αυτές θέσεις παρουσίασε εξειδίκευση για τη ξανθίνη και παρόμοιο λειτουργικό προφίλ με τον μεταφορέα XanQ (Tatsaki et al., 2021).



Εικόνα 1.9 Απεικόνιση του δομικού προτύπου του AncXanQ. Η δομική περιοχή του «πυρήνα» (core domain) σημειώνεται με κόκκινο χρώμα και η δομική περιοχή της «εισόδου» (gate domain) με πράσινο. Οι θέσεις των καταλοίπων S27, A116, T312, S191 και G377 παρουσιάζονται ως μπλε σφαίρες, ενώ σε μεγέθυνση επισημαίνεται και ο προβλεπόμενος προσανατολισμός και οι αλληλεπιδράσεις της ξανθίνης στο κέντρο δέσμευσης (Tatsaki et al., 2021).

Με τον ίδιο τρόπο, έχει ήδη ξεκινήσει (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021) και συνεχίζεται στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η εφαρμογή της μεθόδου και σε έναν ακόμη υποκλάδο (υποκλάδο R1) της οικογένειας NAT/NCS2 με μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης ο οποίος περιλαμβάνει τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς RutG της *E. coli* και AcS572 του *A. calcoaceticus* (Botou et al., 2018) για την ανασύσταση του πιθανότερου κοινού τους προγόνου, που ονομάστηκε AncR1. Η αλληλουχία που

προσδιορίστηκε ως η πιθανότερη για τον AncR1, συντέθηκε και η πρωτεΐνη-μεταφορέας εκφράστηκε επιτυχώς.

ΣΚΟΠΟΣ

Στο εργαστήριο μας εστιάζομαστε στη μελέτη μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και στην σχέση δομής-λειτουργίας αυτών των μεταφορέων. Έχουν ήδη μελετηθεί μεταφορείς της οικογένειας NAT/NCS2 που είναι η ευρύτερα διαδεδομένη οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων. Μεταξύ αυτών είναι ο μεταφορέας ξανθίνης XanQ της *E. coli* και συγγενικοί μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος, ο μεταφορέας ουρακίλης UraA και ο μεταφορέας ουρακίλης/θυμίνης/ξανθίνης RutG της *E. coli* καθώς και συγγενικοί μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης.

Οι αναλύσεις αυτές έχουν αξία για την κατανόηση των μηχανισμών διαμεμβρανικής μεταφοράς σημαντικών μεταβολιτών και φαρμάκων στο μικροβίωμα καθώς και για τη μελέτη αυτών καθαυτών των μηχανισμών με τους οποίους εξελίσσονται οι εξειδικεύσεις των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων σε συνάρτηση με αντίστοιχες προσαρμογές των μικροοργανισμών στο περιβάλλον τους.

Ειδικά για την κατανόηση των διαφορετικών προφίλ εξειδίκευσης των σημερινών μεταφορέων, αρχίσαμε να αξιοποιούμε μια εξελικτική στρατηγική που βασίζεται στην Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών στους κλάδους που μελετάμε και στην μεταλλαξιγένεση αυτών σε σχέση με τα σύγχρονα ομόλογα.

Συνεχίζοντας, λοιπόν, με αυτή τη στρατηγική ο στόχος στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ήταν να αναζητήσουμε και να συνθέσουμε προγονικές αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν τους πιθανότερους κοινούς προγόνους τόσο στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος όσο και στον κλάδο των μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης και, στη συνέχεια, να συγκρίνουμε το λειτουργικό τους προφίλ με αυτό των σύγχρονων μεταφορέων των κλάδων που είναι ομόλογοι του XanQ και των UraA/RutG αντίστοιχα, ώστε να διερευνήσουμε την μοριακή βάση των διαφορών στην εξειδίκευση τους. Πιο συγκεκριμένα, στον κλάδο των ομολόγων του XanQ, σκοπός μας ήταν να διαλευκάνουμε τη μοριακή βάση της διαφοράς εξειδίκευσης μεταξύ ουρικού και ξανθίνης και στον κλάδο των UraA/RutG, τη μοριακή βάση της διαφοράς εξειδίκευσης μεταξύ ουρακίλης και θυμίνης. Για την περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας των μεταφορέων στους κλάδους αυτούς, σκοπός μας ήταν να εστιάσουμε στις θέσεις αμινοξέων στο υπόβαθρο των προγονικών μεταφορέων που σχετίζονται με την εξειδίκευση και να διερευνήσουμε τον ρόλο τους μέσω μεταλλαξιγένεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Όργανα

Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5415 D

Επωαστικός κλίβανος Forma Direct Heat CO2 Incubator, Thermo Scientific

Ηθμοί διήθησης (Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2 μm) για την κατακράτηση του κυτταρικού κλάσματος

Λάμπα UV (UV transilluminator, Canon, Europe)

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

Μετρητής υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (Liquid Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, Connecticut) του Λειτουργικού-Κλινικοεργαστηριακού Τομέα της Ιατρικής Σχολής (εργαστήριο Φαρμακολογίας)

Σύριγγα φόρτωσης δειγμάτων (Microliter Syringes), Hamilton (Bonaduz, Switzerland)

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

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

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

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

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

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)

Φωτόμετρο Ultraspec-2001 (Biochrom, Cambridge, England)

Για την επαλήθευση της αλληλουχίας DNA, μετά την μεταλλαξιγένεση, δείγμα DNA στάλθηκε στην εταιρία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο

του F. Sanger (ενζυμική αντίδραση πολυμερισμού και τερματισμός με 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια) σε Αυτόματο Αναλυτή Αλληλουχίας (Applied Biosystems).

2.2 Χημικά Αναλώσιμα

Αναγωγικά αντιδραστήρια: Διθειοθρεϊτολη (DTT, Invitrogen)

Αναστολείς πρωτεασών: 4-2-αμινοαιθυλο βενζολ-σουλφονικό φθοριο υδροχλωρίου (AEBSF, pefabloc SC, Fluka)

Αντισώματα (antibodies): Σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP, Millipore, California, USA)

Δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών: GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus, ready to use (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)

Ένζυμα (enzymes) κλωνοποίησης και ανασυνδυασμού του DNA: Αλκαλική φωσφατάση alkaline phosphatase (Takara, BIO INC., Japan), DNA πολυμεράση Kapa HiFi DNA polymerase (KapaBiosystems, Boston, United States), Περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI, ApaI (Takara, BIO INC., Japan), DNA λιγάση (συνδετάση) του βακτηριοφάγου T4 T4 DNA ligase (Takara, BIO INC., Japan)

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

Οργανικοί διαλύτες: αιθανόλη (ethanol absolute, Sigma Aldrich), βενζόλιο (benzene, Panreac), διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide-DMSO, Fluka), μεθανόλη (methanol, Sigma Aldrich)

Πακέτα υλικών (kits): πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Nucleospin Plasmid Macherey-Nagel mini-prep, Duren, Germany), πακέτο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL™ Western Blotting Detection Reagents Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), πακέτο προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης (BCA Protein assay reagent kit, Pierce, Thermo Scientific, USA), πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II Macherey-Nagel, Duren, Germany)

Ραδιενεργά Υποστρώματα της εταιρείας Moravek Biochemicals (Brea, California): [8- ³H] ξανθίνη (22.8Ci/mmol), [2,8- ³H] υποξανθίνη (27.7 Ci/mmol), [8- ³H] γουανίνη (21.2

Ci/mmol), [2,8- ^3H] αδενίνη (31.8 Ci/mmol), [8- ^{14}C] ουρικό οξύ (58 Ci/mmol) [5,6- ^3H] ουρακίλη (32.5 Ci/mmol)

2.3 Διαλύματα

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

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

Διάλυμα επαναιώρησης (Resuspension buffer): Tris- HCl 50mM (pH 8), NaCl 100mM, Na₂EDTA 1mM

Διάλυμα επαναιώρησης TB, pH 6.7: PIPES 10Mm, MnCl₂ 55mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250mM

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

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

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

Διάλυμα σακχαρόζης (Sucrose buffer): Tris-HCl 25mM (pH 8), σακχαρόζη 45% (w/v), Na₂EDTA 1mM

Διάλυμα TBST 10x: Tris-HCl 0.1mM (pH 7.4), NaCl 1M, Triton X-100 2% (v/v)

Διάλυμα τερματισμού: KPi (pH 7.5) 0.1M, LiCl 0.1M

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(φαιλυλοξαζολο-2-υλο)βενζόλιο (POPOP) 0.04% (w/v)

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)

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

Πλήρες θρεπτικό υλικό LB, pH 7.2: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), τρυπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v)

Πλήρες θρεπτικό υλικό LB και άγαρ, pH 7.2: Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v), τρυπτόνη 1% (w/v), NaCl 1% (w/v), άγαρ 1.5%

Ρυθμιστικό διάλυμα KPi, pH 7.5: KH₂PO₄ 0.1M, K₂HPO₄ 0.1M

Ρυθμιστικό διάλυμα MK, pH 6.5: MES 5mM, KCl 0.15M

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE, pH 8: Tris-acetate 40mM, Na₂EDTA 1mM

Ραδιενεργά Διαλύματα: Διάλυμα [³H] Ξανθίνης 25μM: 10μL [³H] ξανθίνης (22.8 Ci/mol), 82.4μL μη ραδιενεργού ξανθίνης 25μM, 7.6μL ddH₂O, Διάλυμα [¹⁴C] ουρικού οξέος (100μM): 10μL [¹⁴C] ουρικό οξύ, 237.5μL ddH₂O, Διάλυμα [5,6- ³H] ουρακίλης (2.5μM): [5,6- ³H] ουρακίλης (32.5 Ci/mmol) 10 μL, 113μl ddH₂O

2.4 Βακτηριακά Στελέχη και Πλασμίδια

2.4.1 Βακτηριακά Στελέχη:

E. coli T184 [*lacI* + O+ Z-Y- (A), *prnL*, *met*-, *thr*-, *recA*, *hsdM*, *hsdR/F'*, *lacI* q O+ ZD118 (Y+ A+)] (Teather et al., 1978): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β, D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Το γονιδίωμα του στελέχους T184 δεν περιέχει ενδογενή γονίδια που να επάγονται με IPTG (*lacZ*- Y-). Σε *E. coli* T184 γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ξανθίνης και ουρικού οξέος (Karatza & Frillingos, 2005).

E. coli JW3692 (F-, Δ(*araD-araB*)567, Δ*lacZ*4787(::rrnB-3), λ- , *rph*-1, Δ*pur*P745::kan, Δ(*rhaD-rhaB*)568, *hsdR*514) **ΔadeP** (Keio collection; Baba et al., 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* ΔadeP γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς αδενίνης και υποξανθίνης (Parakostas et al., 2013).

E. coli JW4025 (F-, Δ(*araD-araB*)567, Δ*lacZ*4787(::rrnB-3), λ- , *rph*-1, , Δ(*rhaD-rhaB*)568, Δ*ycj*DP758::kan *hsdR*514) **ΔghxP** (Keio collection; Baba et al., 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* ΔghxP γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς γουανίνης (Parakostas et al., 2013).

E. coli JW2482 (F-, Δ(*araD-araB*)567, Δ*lacZ*4787(::rrnB-3), λ- , *rph*-1, , Δ(*rhaD-rhaB*)568, Δ*ura*A745::kan *hsdR*514) **ΔuraA** (Keio collection; Baba et al., 2006): χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης περμεασών εξωχρωμοσωμικά, μέσω του υποκινητή/χειριστή του οπερονίου λακτόζης, *lacZ*(p/o), υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Σε *E. coli* ΔuraA γίνονται τα πειράματα ελέγχου ενεργού μεταφοράς ουρακίλης και θυμίνης (Botou et al., 2018; Parakostas et al., 2013).

2.4.2 Πλασμίδια:

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-Tóth et al., 1995)].

pT7-5/*xanQ*-BAD (Karatzá & Frillingos, 2005): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*xanQ*) του XanQ φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984).

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

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

pT7-5/*SmLL9*-BAD (Botou et al., 2020): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο του μεταφορέα SmLL9 φυσικού τύπου (wt) , και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*uraA*-BAD (Botou et al., 2018): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*uraA*) του μεταφορέα UraA φυσικού τύπου (wt), και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκα-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*ancxanQ*-BAD (Tatsaki et al., 2021): ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *ancxanQ* υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*psychT*-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο (*psychT*) του μεταφορέα PsychT (ή PsychUacT) φυσικού τύπου (wt) του *Psychrobacter cryohalolentis* K5, και την

περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό δωδεκαπεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο (Παπακώστας Κ., Διαδακτορική Διατριβή, 2011).

pT7-5/ancR1-BAD (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021): ανασυνδυασμένο pT7-5 το οποίο φέρει το προγονικό γονίδιο *ancR1* υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ(p/o)* και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν είναι:

pT7-5/ancX1-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το προγονικό γονίδιο *ancX1* υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ(p/o)* και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της αποκαρβοξυλάσης οξαλοξικού της *Klebsiella pneumoniae* (Consler et al., 1991), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco, 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/ancR1(A308G)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *ancR1* (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021) με αλλαγή στη θέση 308 (A308G) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ(p/o)* και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler, 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/ancR1(A162T)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *ancR1* (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021) με αλλαγή στη θέση 162 (A162T) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ(p/o)* και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler, 1993), ακολουθούμενη από το C-τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/ancR1(2M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *ancR1* (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021) με αλλαγές στις θέσεις 354 (G354T) και 365 (A365T) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ(p/o)* και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler, 1993),

ακολουθούμενη από το C- τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*ancR1*(3M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *ancR1* (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021) με αλλαγές στις θέσεις 162 (A162T), 354 (G354T) και 365 (A365T) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler, 1993), ακολουθούμενη από το C- τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

pT7-5/*ancR1*(8M)-BAD: ανασυνδυασμένο pT7-5 που φέρει το γονίδιο *ancR1* (Τατσάκη Α., Διδακτορική Διατριβή, 2021) με αλλαγές στις θέσεις 41 (V41F), 162 (A162T), 294 (M294T), 329 (A329G), 354 (G354T), 365 (A365T), 389 (A389S) και 417 (G417A) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *lacZ*(p/o) και την περιοχή δέσμησης βιοτίνης (Biotin Acceptor Domain) της οξαλοξικής αποκαρβοξυλάσης της *Klebsiella pneumoniae* (Consler, 1993), ακολουθούμενη από το C- τελικό 12-πεπτίδιο της LacY (LSLLRRQVNEVA) (Carrasco et al., 1984) στο C-τελικό του άκρο.

2.5 Φυλογενετική Ανάλυση

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είχε πραγματοποιηθεί εκτενής φυλογενετική ανάλυση στον κλάδο των μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος και στον κλάδο των μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης της οικογένειας NAT/NCS2. Η φυλογενετική ανάλυση εστιάστηκε στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, τόσο για τον κλάδο ξανθίνης/ουρικού οξέος όσο και για τον κλάδο ουρακίλης/θυμίνης, καθώς σε αυτά ανήκουν τα περισσότερα χαρακτηρισμένα ομόλογα της οικογένειας NAT/NCS2. Τα ομόλογα των Πρωτεοβακτηρίων υποβλήθηκαν σε συστηματική φυλογενετική ανάλυση και ταξινομήθηκαν σε α, β, γ, δ και ε-πρωτεοβακτήρια. Σε δεύτερη φάση ο αριθμός των αλληλουχιών μειώθηκε επιλέγοντας ομόλογα από ένα στέλεχος ανά είδος κι έπειτα από ένα στέλεχος ανά γένος. Έτσι κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα όλων των ομολόγων του κλάδου ξανθίνης/ουρικού οξέος και ουρακίλης/θυμίνης (Botou et al., 2018; Tatsaki et al., 2021).

2.6 Ανασύσταση Προγονικών Αλληλουχιών

Για την ανασύσταση προγονικών γονιδίων ακολουθούνται τα βασικά βήματα της μεθόδου (Thornton, 2004). Με βάση τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν από την εκτενή φυλογενετική ανάλυση που είχε γίνει στο παρελθόν στο εργαστήριο μας (Tatsaki et al., 2021), πραγματοποιήθηκε ανασύσταση της προγονικής αλληλουχίας του κοινού προγόνου της ομάδας ομολόγων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος που αντιπροσωπεύεται από τους μεταφορείς XanQ του *E. coli*, NmXanQ του *N. Meningitidis*, AvXanQ του *A. Veronii* (και τον κοινό τους πρόγονο AncXanQ) και τον PsyXUacT του *P. cryohalolentis*. Ο κοινός πρόγονος ονομάστηκε AncX1. Για την εκτίμηση της προγονικής αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Το πρόγραμμα δίνει το πιθανότερο αμινοξύ για κάθε θέση της προγονικής πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα δίνει και τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης των αμινοξέων για κάθε θέση έτσι ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η αξιοπιστία της προγονικής αλληλουχίας. Στη συνέχεια, ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA, με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για βελτιστοποίηση της έκφρασης στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli*. Στα άκρα της προγονικής αλληλουχίας προστέθηκαν, επίσης, οι αλληλουχίες των περιοριστικών ενζύμων BamHI και ApaI ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση τους σε επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα (**Εικόνα 2.3**). Η αλληλουχία DNA για το προγονικό γονίδιο AncX1 παράχθηκε με γονιδιακή σύνθεση (gene synthesis) από την εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Μετά τη σύνθεση, το προγονικό γονίδιο μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5, που περιέχει την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-

acceptor domain για σήμανση στο C-τελικό άκρο, βιοτινυλίωση in vivo και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με Western αβιδίνης. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε τελικά σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* για περαιτέρω πειράματα για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του. Τα βήματα της μεθόδου ανασύστασης προγονικών αλληλουχιών περιγράφονται στην Ενότητα 1.3.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε στο εργαστήριο μας για την ανασύσταση του προγονικού γονιδίου του μεταφορέα ApcR1 στον υποκλάδο R1 του κλάδου ουρακίλης/θυμίνης (Botou et al., 2018) που περιλαμβάνει τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς RutG του *E. coli* και AcS572 του *A. calcoaceticus* (Τατσάκη Α., Διακτορική Διατριβή, 2021).

2.7 Τεχνικές Ανασυνδυασμένου DNA

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

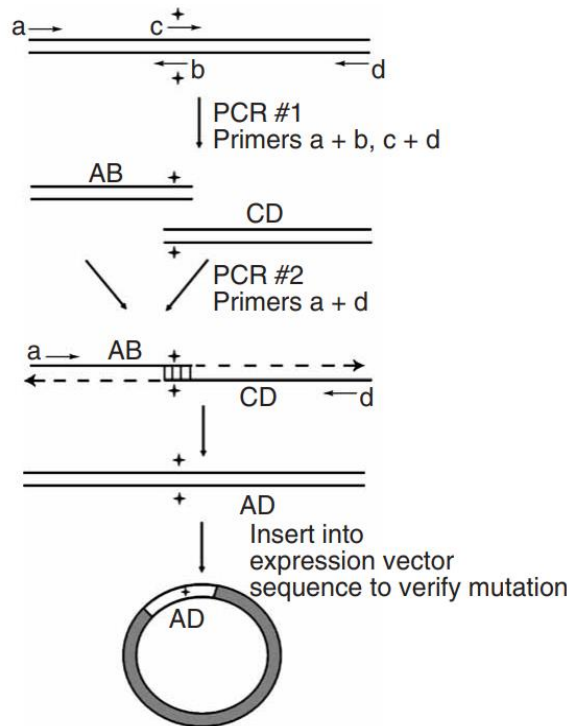
Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα μεταλλάγματα του προγονικού μεταφορέα ApcR1 (σημειακά και πολλαπλά μεταλλάγματα στο φυσικού τύπου γονίδιο *apcR1*), χρησιμοποιήθηκε η PCR δύο σταδίων (Heckman & Pease, 2007).

Στην PCR δύο σταδίων χρησιμοποιούνται δύο εξωτερικοί εκκινητές (primers) συμπληρωματικοί για τα 5' άκρα της κάθε νουκλεοτιδικής αλυσίδας και εσωτερικοί συμπληρωματικοί εκκινητές για να δημιουργηθούν από τα γονίδια-στόχους συγκεκριμένα τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα μεταξύ τους άκρα (1^ο Στάδιο). Τα προϊόντα του 1^{ου} σταδίου συνδυάζονται και χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε επόμενη αντίδραση PCR. Λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους τα τμήματα του 1^{ου} σταδίου υβριδίζουν μεταξύ τους και μαζί με την χρήση των ίδιων εξωτερικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο 1^ο στάδιο, επεκτείνονται και δίνουν ως προϊόν μια συνθετική αλληλουχία που αποτελείται από όλα τα τμήματα του προηγούμενου σταδίου (2^ο Στάδιο). Η διαδικασία περιγράφεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.1**.

Στην παρούσα διατριβή η PCR δύο σταδίων χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των εξής μεταλλαγμάτων στο φυσικού τύπου γονίδιο *apcR1*:

- **Μετάλλαγμα *apcR1*(A162T)** με αλλαγή στη θέση 162 (A162T)
- **Μετάλλαγμα *apcR1*(A308G)** με αλλαγή στη θέση 308 (A308G)
- **Μετάλλαγμα *apcR1*(2M)** με αλλαγές στις θέσεις 354 (G354T) και 365 (A365T)
- **Μετάλλαγμα *apcR1*(3M)** με αλλαγές στις θέσεις 162 (A162T), 354 (G354T) και 365 (A365T)

- **Μετάλλαγμα *ancR1(8M)*** με αλλαγές στις θέσεις στις θέσεις 41 (V41F), 162 (A162T), 294 (M294T), 329 (A329G), 354 (G354T), 365 (A365T), 389 (A389S) και 417 (G417A)



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου PCR δύο σταδίων. Οι αλυσίδες του DNA και τα συνθετικά νουκλεοτιδικά τμήματα απεικονίζονται με γραμμές με κατεύθυνση από το 5'- στο 3'- άκρο. Η θέση εισαγωγής της μετάλλαξης συμβολίζεται ως (+) και οι εκκινητές σημειώνονται με γράμματα: a και d είναι οι εξωτερικοί ενώ b και c είναι οι εσωτερικοί συμπληρωματικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή της μετάλλαξης (Heckman & Pease, 2007).

Αναλυτικά σε κάθε στάδιο PCR χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή προϊόντων PCR μετά από καθαρισμό
- 10 μM από κάθε εκκινητή
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης που περιέχει $MgCl_2$
- 10 mM dNTPs mix (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
- 1 U/μL DNA πολυμεράσης (Καρα HiFi DNA polymerase)
- ddH₂O

Κατά κανόνα η PCR εφαρμόστηκε στις εξής συνθήκες για καθένα από τα δύο στάδια:

30 κύκλοι	{	1 ^ο Στάδιο	2 ^ο Στάδιο	Αποδιάταξη δίκλωνου DNA (denaturation) Πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων (annealing) Επμήκυνση DNA (extension)
		98° C για 3min	98° C για 3min	
		98° C για 1min	98° C για 1min	
		55°-65° C για 1min	59° C για 2min	
		72° C για 0,5/ 1/ 1,5 min	72° C για 2min	
		72° C για 7min	72° C για 7min	

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

lacZ50 sense 5'- GCT/TCC/GGC/TCG/TAT/GTT/GTG/TGG-3'

Υ_k(pT7-5)-His₁₀ antisense 5'-GAC/GGG/GAG/TCA/GGC/AAC/TAT/GG-3'

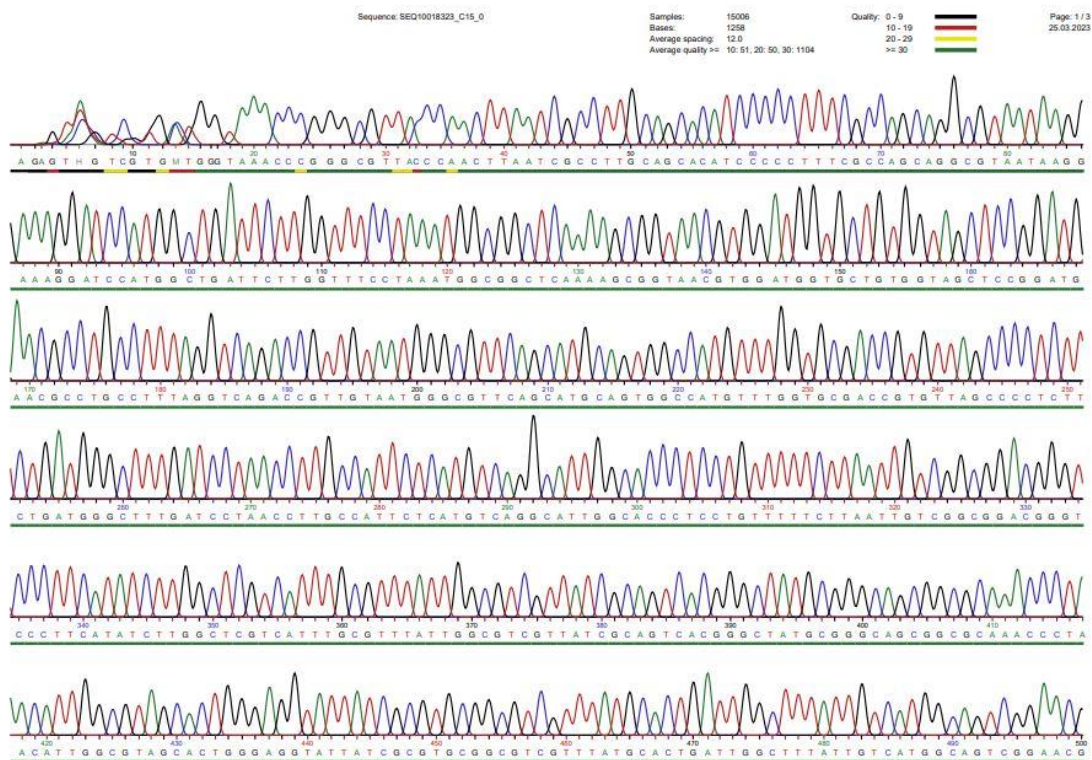
Οι εσωτερικοί εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση για τις αντιδράσεις PCR, αναγράφονται στον **Πίνακα 2.1**.

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (<i>sense primer sequence 5'- 3'</i>)
AncR1 V41F	GTT/CAG/CAC/GCA/TTT/GCA/ATG/TTT/G
AncR1 A162T	G/AAC/CTG/GCA/CCT/ATT/ACA/GTC/AAA/GGC
AncR1 M294T	CA/GAT/GGG/CTG/GCT/ACT/ACT/CTT/TCA/GGC/TCA/G
AncR1 A329G	CA/ACG/TTA/GTT/TTT/GTA/GTC/GCA/GGA/GTT/ATT/ GCA/ATT/TTA/CTC/GG
AncR1 2M (G354T/ A365T)	CCC/GTA/TTA/ACT/GGA/GCA/TCA/ATG/GTA/GTG/TTT/GGT/ CTC/ATC/ACC/GTA/GCT/GGC/GCA/CG
AncR1 A308G	CC/ACG/TAC/GGT/GAG/AAT/ATC/GGT/GTT/ATG/GCG/GTT/AC
AncR1 A389S	GAT/AAT/CGC/AAT/CTC/ATC/GTC/GTC/TCA/GTC/ACC/TTA/GTC
AncR1 G417A	GCT/ACT/TTC/GCC/GCT/ATC/ATC/TTA/AAC/G

Πίνακας 2.1 Εσωτερικοί εκκινητές νοηματικού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίστοιχη αντίδραση για αλλαγές επιλεγμένων καταλοίπων στην αλληλουχία φυσικού τύπου (wt) AncR1. Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι τριπλέτες βάσεων με τις οποίες εισάγονται οι αλλαγές στη θέση των επιλεγμένων αμινοξέων του υποστρώματος.

Στο τέλος κάθε σταδίου, τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης (1%) και ανακτώνται με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).

Για την επαλήθευση της αλληλουχίας DNA στα μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν με *in vitro* μεταλλαξιγένεση, δείγματα DNA στάλθηκαν στην εταιρεία MWG-Biotech (Ebersberg, Germany), όπου και αναλυθήκαν, με την μέθοδο του F. Sanger (ενζυμική αντίδραση πολυμερισμού και τερματισμός με 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδία) σε Αυτόματο Αναλυτή Αλληλουχίας (Applied Biosystems) όπως φαίνεται ενδεικτικά στην **Εικόνα 2.2** για το μετάλλαγμα ancR1(A162T).



Εικόνα 2.2 Ανάγνωση αλληλουχίας της κατασκευής *AncR1(A162T)-BAD* από τον αυτόματο αναλυτή αλληλούχισης της εταιρίας *MWG-Biotech*. Στην εικόνα παρουσιάζεται τμήμα της αλληλουχίας της κατασκευής *AncR1(A162T)-BAD*, ύστερα από ανάγνωση με τον εκκινητή *LacZp/o*. Η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται με τους εκκινητές *LacZp/o* (ATGATTACGGATTCACTGGCCGTC) και *pTanti* (GGGAGTCAGGCAACTATGG) (αντίθετη κατεύθυνση, reverse complement). Η επιβεβαίωση της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε για όλες τις κατασκευές της παρούσας διατριβής.

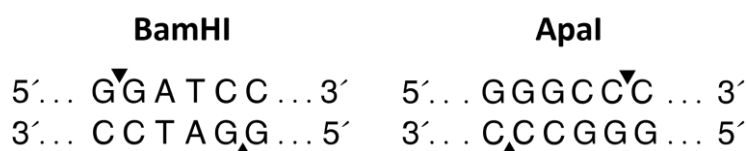
2.7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης

Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορούνται μετά από κάθε αντίδραση PCR (ή περιοριστική πέψη) ώστε να ανιχνευθούν, να ταυτοποιηθούν και να καθαριστούν διάφορα τμήματα DNA. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήγμα αγαρόζης 1% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Τα δείγματα DNA αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης 10x και προστίθενται και μάρτυρες μοριακών μεγεθών (1000bp DNA ladder). Εμφάνιση των ζωνών DNA γίνεται με έκθεση του πήγματος σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-transilluminator).

2.7.3 Κατασκευή Ανασυνδυασμένου DNA: Περιοριστική πέψη (restriction) και Ανασύνδεση (ligation)

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων επώαστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Apa*I ο πλασμιδιακός φορέας *pT7-5/BAD* και τα προς ένθεση (insertion) μεταλλάγματα του *ancR1* που είχαν προκύψει ως προϊόντα από τις αντιδράσεις PCR. Τα ένζυμα *Bam*HI και *Apa*I αναγνωρίζουν μοναδικές περιοριστικές θέσεις τόσο στον φορέα *pT7-5/BAD* όσο και στα ως προς ένθεση τμήματα DNA (**Εικόνα 2.3**).

Με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα επωάστηκε και το πλασμίδιο που φέρει το προγονικό γονίδιο *ancX1*. Το προγονικό γονίδιο λαμβάνεται ανασυνδυασμένο σε πλασμιδιακό φορέα pEX-A258, μετά τη σύνθεση του (gene synthesis) από την εταιρία MWG-Biotech. Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν μοναδικές περιοριστικές θέσεις στα άκρα του προγονικού γονιδίου *ancX1*, όπως αυτές είχαν προστεθεί κατά τον σχεδιασμό της DNA αλληλουχίας του.



Εικόνα 2.3 Θέσεις αναγνώρισης αλληλουχίας των περιοριστικών ενζύμων BamHI και Apal

Στο τέλος της περιοριστικής πέψης ο φορέας κλωνοποίησης (vector) επωάστηκε με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση ώστε να γίνει αποφωσφορυλίωση των ελεύθερων 5' άκρων και να αποφευχθεί ανασύνδεση των ανοιχτών άκρων του φορέα πριν την αντίδραση της ανασύνδεσης (ligation).

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1% και καθαρίστηκαν με το πακέτο υλικών καθαρισμού DNA (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).

Ακολούθησε η αντίδραση δεσμοποίησης (ligation) ώστε να γίνει ένθεση τόσο των μεταλλαγμάτων του προγονικού γονιδίου *ancR1* όσο και του προγονικού γονιδίου *ancX1* στον πλασμιδιακό φορέα (vector) pT7-5-BAD. Η αντίδραση έγινε με το ένζυμο T4 DNA λιγάση, στους 16 °C, για 15h, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL με ποσότητες ένθεσης και φορέα σε γραμμομοριακή αναλογία 3:1.

2.7.4 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών μετασχηματισμού

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ώστε να γίνουν επιδεκτικά τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* T184 είναι η εξής: έγινε καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB όγκου 10ml στους 37°C για 16h κι έπειτα η καλλιέργεια αραιώθηκε σε διάλυμα SOB τελικού όγκου 250ml. Η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *E. coli* T184 έγινε παρουσία του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 0.1 mg/ml στο θρεπτικό διάλυμα SOB, στο οποίο το στέλεχος παρουσιάζει ανθεκτικότητα. Η ανάπτυξη συνεχίστηκε στους 37°C και υπό ανάδευση (200rpm) σε επωαστήρα έως ότου η οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ να φτάσει την τιμή 0,6. Τότε, τα κύτταρα επωάστηκαν στον πάγο για 10min και στη συνέχεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 10min στις 3000rpm και 4°C σε φυγόκεντρο Heraeus Megafuge 1.0R και επαναιωρήθηκαν σε 40ml διαλύματος TB. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με 10ml διαλύματος

TB στο τέλος των οποίων έγινε τελική επαναιώρηση των κυττάρων σε 1ml διαλύματος TB που περιείχε DMSO σε συγκέντρωση 7%. Τα επιδεκτικά πλέον κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Με την ίδια διαδικασία έγιναν επιδεκτικά και κύτταρα *E. coli* ΔUraA/ΔAdeP/ΔGhxP με τη μοναδική διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 0.05 mg/mL.

2.7.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA που προκύπτει από την αντίδραση δεσμοποίησης (ligation) προστίθεται σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* T184 και γίνεται επώαση στον πάγο για 5min. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και άγαρ που περιέχει και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (0.1 mg/mL). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 16h και στην συνέχεια οι αποικίες επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητα τους σε αμπικιλίνη και πραγματοποιείται απομόνωση του DNA τους σε μικρή κλίμακα με βάση πρωτόκολλο πακέτου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

Σε κάθε περίπτωση, γίνεται η επιβεβαίωση της αλληλουχίας του DNA (sequencing) που βρίσκεται ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις των ενζύμων BamHI και ApaI, σε Αυτόματο Αναλυτή Αλληλουχίας (MWG-Biotech) όπως έχει ήδη αναφερθεί (Ενότητα 2.7.1).

Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας, μετασχηματίζονται εκ νέου, με το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε, επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* ΔUraA και αποθηκεύονται σε LB που περιέχει γλυκερόλη (30%) στους -80°C για περαιτέρω πειράματα.

2.7.6 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε μικρή κλίμακα (10mL)

Κύτταρα *E. coli* που φέρουν τα κατάλληλα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 3mL θρεπτικού μέσου LB για 16h στους 37°C, σε αερόβιες συνθήκες και υπό ανάδευση. Το θρεπτικό μέσο περιέχει αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) και στρεπτομυκίνη (0.1 mg/mL) όταν πρόκειται για κύτταρα T184 ή αμπικιλίνη (0.1 mg/mL) και καναμυκίνη (0.05 mg/mL) όταν πρόκειται για κύτταρα ΔUraA. Μετά το πέρας των 16h γίνεται αραιώση της καλλιέργειας σε LB (1mL καλλιέργειας + 9mL LB) πάλι παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών. Η ανάπτυξη συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για 2h. Προστίθεται ισοπροπυλο - θειο - β, D -γαλακτοπυρανοσιδίο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM για επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών και η ανάπτυξη συνεχίζεται για ακόμη 1h και 45min. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση.

2.7.7 Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

Μετά την ανάπτυξη και την επαγωγή σε καλλιέργεια 10mL τα κύτταρα *E. coli* συλλέγονται και φυγοκεντρώνται (6000rpm/10min/4°C). Επαναιωρούνται σε 10mL διαλύματος επαναιώρησης (resuspension buffer). Φυγοκεντρώνται για ακόμη μια φορά στις ίδιες συνθήκες και 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 μεταφέρεται σε σωληνάρια erpendorf και φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 5min σε 13000rpm. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται, στη συνέχεια, σε 1mL διαλύματος σακχαρόζης (Sucrose buffer) με Pefabloc στην ίδια αναλογία. Ακολουθεί επώαση στους 4°C για 20min.

Μετά το πέρας των 20min τα δείγματα φυγοκεντρώνται άλλη μια φορά για 5min σε 13000rpm σε επιτραπέζια φυγόκεντρο, επαναιωρούνται σε 800μL ddH₂O και επιάζονται για 10min στους 4°C. Στη συνέχεια προστίθενται 10μL λυσοζύμης (αρχική συγκέντρωση 10mg/mL) και ακολουθεί εκ νέου επώαση για 30min στους 4°C. Αμέσως μετά, γίνεται θραύση των κυττάρων μέσω συσκευής υπερήχων (sonication) με 2 ώσεις των 15sec για κάθε δείγμα σε ένταση 40% στη συσκευή Branson 250-D.

Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνται και πάλι για 5min σε 13000rpm σε επιτραπέζια φυγόκεντρο ώστε να απομακρυνθούν τα άθραυστα κύτταρα και το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρείται για 30min σε 90000rpm στους 4°C. Μετά την υπερφυγοκέντρωση, το ίζημα διαλυτοποιείται σε 40μL ddH₂O. Στο σημείο αυτό τα δείγματα είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση ή αποθήκευση στους 4°C.

2.8 Αναλύσεις πρωτεϊνών

2.8.1 Προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης έγινε με βάση το πρωτόκολλο BCA Protein Assay Reagent Kit. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης και βάσει αυτής υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

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

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου- δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πήγμα διαχωρισμού 12% και πήγμα επιστοιβάξης 5% που κατασκευάζονται σύμφωνα με τον παρακάτω **Πίνακα 2.2**.

Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθεται ποσότητα ddH₂O έτσι ώστε τα μεμβρανικά δείγματα να εξισορροπηθούν σε συγκεκριμένη ποσότητα µg πρωτεΐνης ανά 50µL καθώς και διάλυμα φόρτωσης (Sample buffer) σε αναλογία 4:1 (δείγμα: διάλυμα φόρτωσης).

	Πήγμα Επιστοιβαξης 5% (30mL)	Πήγμα Διαχωρισμού 12% (100mL)
30% Ακρυλαμίδιο	4.5mL	42mL
Διάλυμα Διαχωρισμού	-	25mL
Διάλυμα Επιστοιβαξης	7.5mL	-
SDS 10% w/v	0.3mL	1mL
APS 10% w/v	0.3mL	1mL
TEMED	0.03mL	0.05mL
ddH₂O	17.4mL	32mL

Πίνακας 2.2 Πρωτόκολλο για την παρασκευή πήγματος διαχωρισμού και πήγματος επιστοιβαξης (Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)).

2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Μετά τον διαχωρισμό στο πήγμα ηλεκτροφόρησης ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολύ-βινθλιδενικού διφθοριδίου (PVDF) σε διάλυμα μεταφοράς για 4h στα 400mA. Με το τέλος της μεταφοράς η μεμβράνη επωάζεται σε Διάλυμα Αποκλεισμού (Blocking buffer: 5% BSA (αλβουμίνη ορού βοός) σε TBST 1x) για τη δέσμευση των κενών θέσεων.

Στη συνέχεια ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με το σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-HRP) σε αραιώση 1:50000 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 ενισχυμένης χημειοφωτάυγειας (ECL).

2.8.4 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς (Transport assay)

Κύτταρα *E. coli* T184, ΔUraA, ΔAdeP και ΔGhxP μετασχηματισμένα με τα κατάλληλα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε μικρή κλίμακα. Μετά την ανάπτυξη και τη συλλογή των κυττάρων από τα 10mL καλλιέργειας, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος KPi όταν πρόκειται για κύτταρα T184 ή MK όταν πρόκειται για τα knock-out στελέχη. Η επαναιώρηση και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνονται δύο φορές. Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης τα δείγματα επαναιωρούνται σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος, φωτομετρούνται στα 420nm και εξισορροπούνται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος ώστε OD_{420nm}= 10.

Μετά την εξισορρόπηση 50μL κυττάρων επωάζονται με τα ραδιενεργά υποστρώματα [³H] ξανθίνης, [³H] υποξανθίνης, [¹⁴C] ουρικού οξέος, [³H] αδενίνης, [³H] γουανίνης, [³H] ουρακίλης και [³H] θυμίνης σε τελικές συγκεντρώσεις 1μM, 1μM, 4μM, 0.1μM, 0.1μM, 0.1μM και 0.1μM αντίστοιχα για διάφορους χρόνους από 5sec ως 2min. Στην περίπτωση που το μελετώμενο ραδιενεργό υπόστρωμα είναι ουρακίλη ή θυμίνη, τα κύτταρα επωάζονται με 2μL γλυκερόλης 0.5M (τελικής συγκέντρωσης 20mM) για 3min κι έπειτα προστίθεται το ραδιενεργό υπόστρωμα στους διάφορους χρόνους.

Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 6ml διαλύματος τερματισμού και αμέσως γίνεται διήθηση του διαλύματος υπό κενό σε ηθμό διήθησης Whatman GF/C, 25 mm-circle, με διάμετρο πόρων 1.2μm. Ο ηθμός μεταφέρεται σε σωληνάρια σπινθηρισμού στα οποία προστίθενται 6ml υγρού σπινθηρισμού. Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού σωματιδίων β (β counter).

2.8.5 Δοκιμασία διαμεμβρανικής μεταφοράς για κινητική ανάλυση

Στη δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης για κινητική ανάλυση χρησιμοποιείται ραδιενεργό υπόστρωμα σε εύρος τελικών συγκεντρώσεων 0.1-40μM για χρόνο 15sec, μετά από επώαση των κυττάρων για 3min με γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 20mM.

Οι σταθερές V_{max} και K_M εξάγονται από τα διαγράμματα Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism 7 (<http://www.graphpad.com>).

2.8.6 Πειράματα ανταγωνισμού

Στα πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης [³H] ουρακίλης από άλλες πουρίνες, πυριμιδίνες ή ανάλογα αυτών, προστίθενται διαδοχικά τα μη σημασμένα πιθανά μόρια-ανταγωνιστές σε εύρος συγκεντρώσεων 0.1μM έως 1mM και έπειτα το ραδιενεργό υπόστρωμα ουρακίλης σε συγκέντρωση 0.1μM. Οι αρχικές ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15sec και οι τιμές IC_{50} (συγκεντρώσεις υποστρώματος στις οποίες παρατηρείται 50% αναστολή) υπολογίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα Prism7. 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 [³H] ουρακίλης.

2.9 In silico αναλύσεις

Η στοίχιση των αλληλουχιών των ομόλογων μεταφορέων έγινε με το πρόγραμμα Multalin (Multiple sequence alignment with hierarchical clustering) (Corpet, 1988).

Η δομική μοντελοποίηση των μεταφορέων ApcR1 και ApcX1 έγινε με το πρόγραμμα SWISS-MODEL ενώ η απεικόνιση και η επεξεργασία των μοντέλων έγινε με το πρόγραμμα PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, v1.5.0.4 Schrodinger, LLC).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

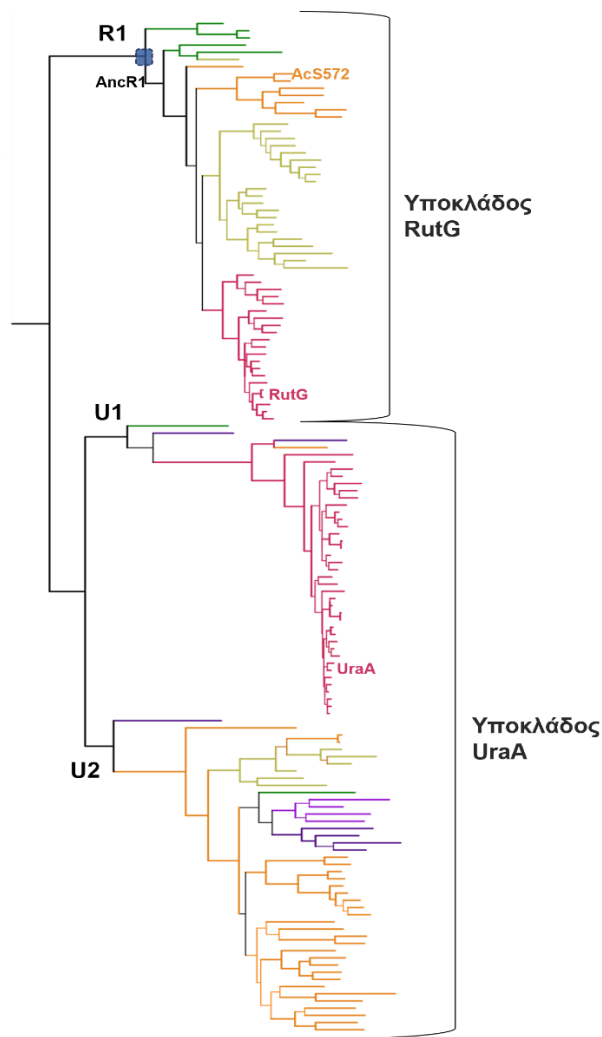
3.1 Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης

3.1.1 Εύρεση του κοινού προγόνου (AncR1) των μεταφορέων του υποκλάδου RutG

Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E. coli* που έχει μελετηθεί εκτενώς και αναλυθεί με κρυσταλλογραφία (Lu et al., 2011; Yu et al., 2017) καθώς και από τους λειτουργικά γνωστούς μεταφορείς RutG της *E. coli* που μεταφέρει ουρακίλη, θυμίνη και ξανθίνη και AcS572 του *A. calcoaceticus* που μεταφέρει ουρακίλη (Botou et al., 2018).

Για τους ομόλογους μεταφορείς Πρωτεοβακτηρίων που εμπίπτουν στον κλάδο μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης, είχε ήδη πραγματοποιηθεί εκτενής φυλογενετική ανάλυση (Botou et al., 2018) και κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο όλων των ομόλογων μεταφορέων (**Εικόνα 3.1**). Από τη φυλογενετική ανάλυση προκύπτει ότι τα ομόλογα αυτά διαφοροποιούνται σε δύο διακριτούς υποκλάδους από τους οποίους ο ένας περιλαμβάνει τον μεταφορέα UraA και ο άλλος τον μεταφορέα RutG της *E. coli*. Ο υποκλάδος UraA περιλαμβάνει έναν κύριο φυλογενετικό κλάδο με όλα τα ομόλογα που σχετίζονται με το μεταφορέα ουρακίλης UraA και απαντώνται κυρίως σε Enterobacterales (κλάδος U1), αλλά και έναν ακόμη φυλογενετικό κλάδο, στον οποίο κατατάσσονται ομόλογα του UraA που ανήκουν σε στελέχη μη-εντεροβακτηρίων, αλλά και σε β-, δ- και ε-πρωτεοβακτήρια (κλάδος U2). Ο υποκλάδος του μεταφορέα RutG (κλάδος R1) περιλαμβάνει όλα τα ομόλογα του RutG τα οποία απαντώνται στα Enterobacterales αλλά και σε ορισμένα γ-, β- και α-πρωτεοβακτήρια (Botou et al., 2018).

Για περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκε ο κλάδος R1 καθώς παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι περιλαμβάνει μεταφορείς διαφορετικών εξειδικεύσεων: τον ευρείας εξειδίκευσης RutG που μεταφέρει ουρακίλη, θυμίνη και ξανθίνη και τον πιο εξειδικευμένο μεταφορέα ουρακίλης AcS572 του οποίου το προφίλ εξειδίκευσης μοιάζει περισσότερο με αυτό του μεταφορέα UraA του κλάδου U1 παρά με αυτό του RutG του ίδιου κλάδου (R1). Με βάση τη φυλογένεση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ουρακίλης/θυμίνης, έγινε εξαγωγή της αλληλουχίας του κοινού προγόνου του κλάδου, που ονομάστηκε AncR1.



Εικόνα 3.1 Φυλογενετική ανάλυση της ομάδας ομολόγων των μεταφορέων ουρακίλης /θυμίνης στα Πρωτεοβακτήρια. Φυλογενετικό δενδρόγραμμα αντιπροσωπευτικών ομολόγων της ομάδας UraA από Πρωτεοβακτήρια, στο οποίο διακρίνονται οι κλάδοι U1, U2 και R1. Σε αυτούς ανήκουν οι γνωστοί μεταφορείς UraA και RutG της *E. coli*, και ο AcS572 του *A. calcoaceticus*. Τα διαφορετικά χρώματα στο φυλογενετικό δέντρο υποδεικνύουν διαφορετικές τάξεις των πρωτεοβακτηρίων: πράσινο για τα α-, κίτρινο για τα β-, κόκκινο για τα γ- και συγκεκριμένα της τάξης των Enterobacteriales και πορτοκαλί για τις υπόλοιπες τάξεις των γ-πρωτεοβακτηρίων. Σημειώνονται οι δύο υποκλάδοι (RutG και UraA) του κλάδου και ο προγονικός μεταφορέας AncR1 (Botou et al., 2018).

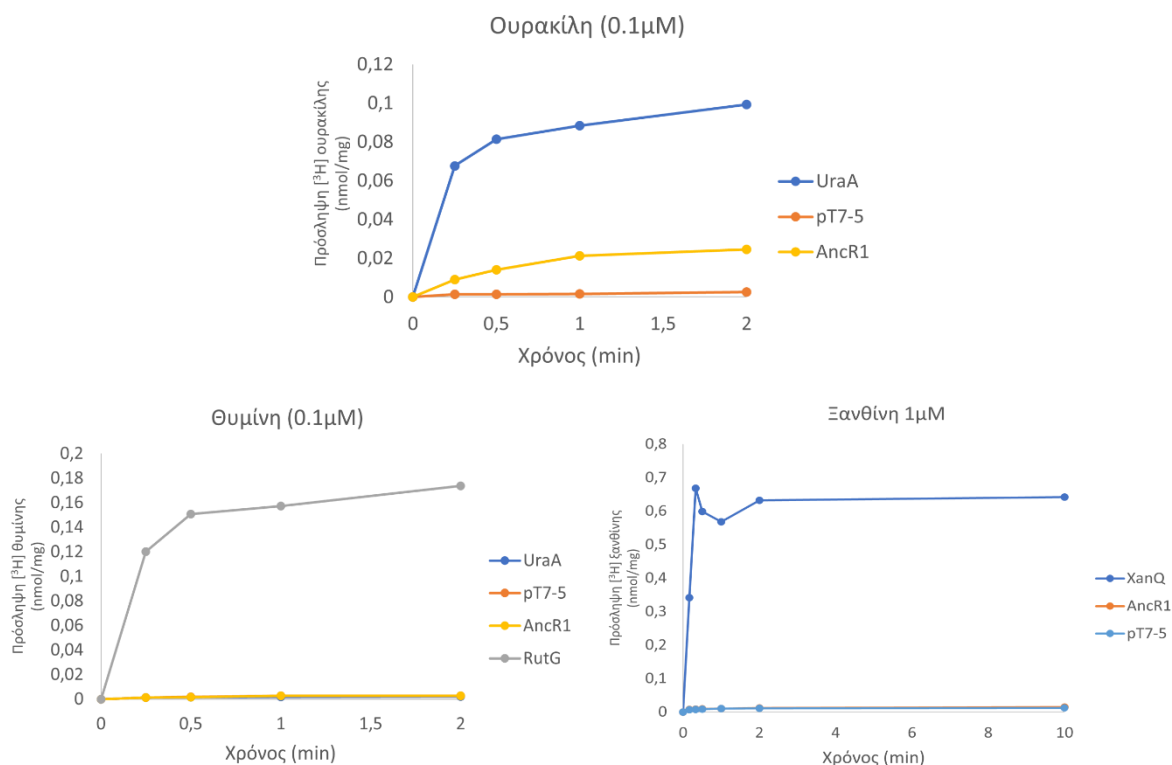
3.1.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του προγονικού μεταφορέα AncR1

3.1.2.1 Ο AncR1 είναι υψηλής συγγένειας μεταφορέας ουρακίλης

Μετά την εξαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας, ο προγονικός μεταφορέας AncR1 συντέθηκε και εκφράστηκε επιτυχώς στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων *E. coli* στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου μας (Α. Τατσάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Μετά τον έλεγχο της έκφρασης του AncR1 στη μεμβράνη, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ενεργού μεταφοράς ραδιενεργών υποστρωμάτων ουρακίλης, θυμίνης και ξανθίνης (**Εικόνα 3.2**). Από τα υποστρώματα αυτά, ο AncR1 παρουσιάζει ενεργότητα μόνο για την ουρακίλη. Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι ο AncR1 μεταφέρει ουρακίλη με υψηλή συγγένεια ($K_m = 2,3 \pm 0,5 \mu M$). Σε σύγκριση, πάντως, με τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς του κλάδου R1,

RutG και AcS572, αλλά και τον UraA, η συγγένεια του AncR1 για την ουρακίλη είναι 3-10 φορές χαμηλότερη. Η ενεργότητα του AncR1 είναι πολύ χαμηλότερη από των σημερινών μεταφορέων ουρακίλης RutG, AcS572 και UraA (10-40 φορές μικρότερη V_{max}) (**Πίνακας 3.1**).



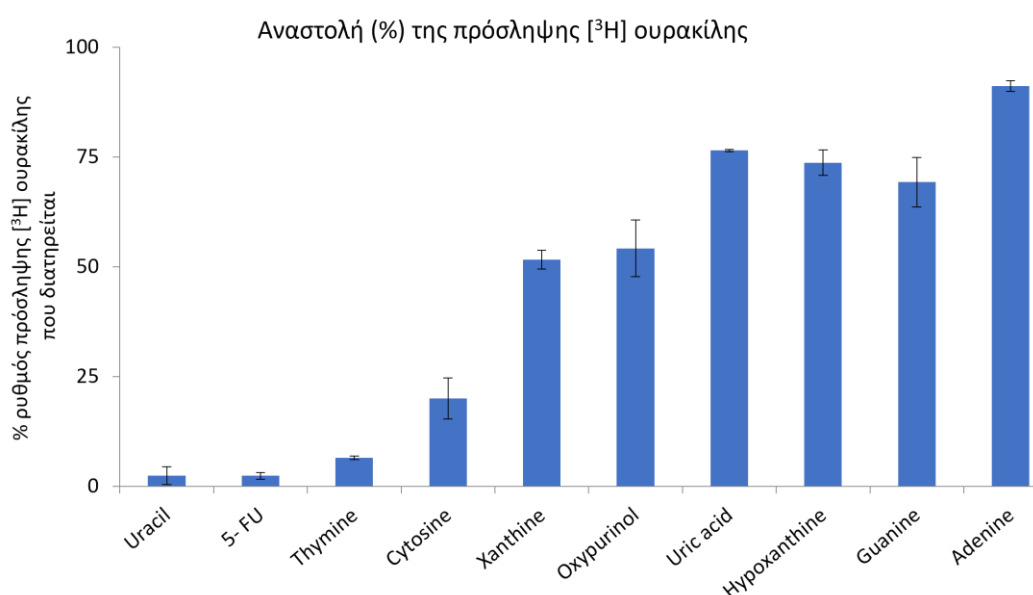
Εικόνα 3.2 Ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς υποστρωμάτων ουρακίλης, θυμίνης και ξανθίνης για τον μεταφορέα AncR1. Κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς A) [^3H] ουρακίλης (0.1 μM) B) [^3H] θυμίνης (0.1 μM) Γ) [^3H] ξανθίνης (1 μM) στους 25 °C για χρόνους 5sec-2min για ουρακίλη και θυμίνη και έως 10min για ξανθίνη. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση οι γνωστοί μεταφορείς UraA (Andersen et al., 1995), RutG (Botou et al., 2018) και XanQ (Karatzá & Frillingos, 2005) του *E. coli*. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα pT7-5 προκύπτουν σε κάθε περίπτωση από κύτταρα *E. coli* μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5.

	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\text{mL min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
UraA	0.21±0.04	3.0±0.1	14.3
RutG	0.56±0.08	13.2±0.5	23.6
AcS572	0.85± 0.09	7.1± 0.2	8.4
AncR1	2.3±0.5	0.35±0.02	0.15

Πίνακας 3.1 Τιμές K_m και V_{max} των μεταφορέων UraA, RutG, AcS572 και AncR1 για την ουρακίλη. Κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν τον μεταφορέα AncR1 από πλασμίδια pT7-5/BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [^3H] ουρακίλης (0.01-40 μM). Η αρχική ταχύτητα του μεταφορέα υπολογίζεται στα 15sec. Οι τιμές K_m και V_{max} είναι γνωστές από προηγούμενες μελέτες για τους μεταφορείς AcS572, RutG, UraA (Botou et al., 2018). Οι τιμές K_m και V_{max} ελήφθησαν από διάγραμμα Michaelis-Menten μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Prism7 με τις αντίστοιχες αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα.

3.1.2.2 Ο *AncR1* έχει ευρύ προφίλ εξειδίκευσης παρόμοιο με αυτό του *RutG*

Για να διερευνηθεί το προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα *AncR1* και να συγκριθεί με αυτά των μεταφορέων *RutG* και *AcS572* του κλάδου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ραδιενεργά σημασμένης ουρακίλης με μια σειρά μη σημασμένων αναλόγων πουρινών-πυριμιδινών από τα οποία προέκυψε ότι ο προγονικός μεταφορέας *AncR1*, εκτός από την ουρακίλη, αναγνωρίζει 5-φθοροουρακίλη, θυμίνη και κυτοσίνη, ενώ αναγνωρίζει με χαμηλή συγγένεια την ξανθίνη (και την οξυπουρινόλη, που είναι ισομερές ανάλογο της ξανθίνης) και δεν αναγνωρίζει τις άλλες πουρίνες (**Εικόνα 3.3**).



Εικόνα 3.3 Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα *AncR1* με ανταγωνισμό ως προς την ουρακίλη. Κύτταρα *E. coli* που είχαν επαχθεί με IPTG υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης (0.1μM, 25°C) μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (0.6mM). Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από μετρήσεις του ίδιου πειράματος.

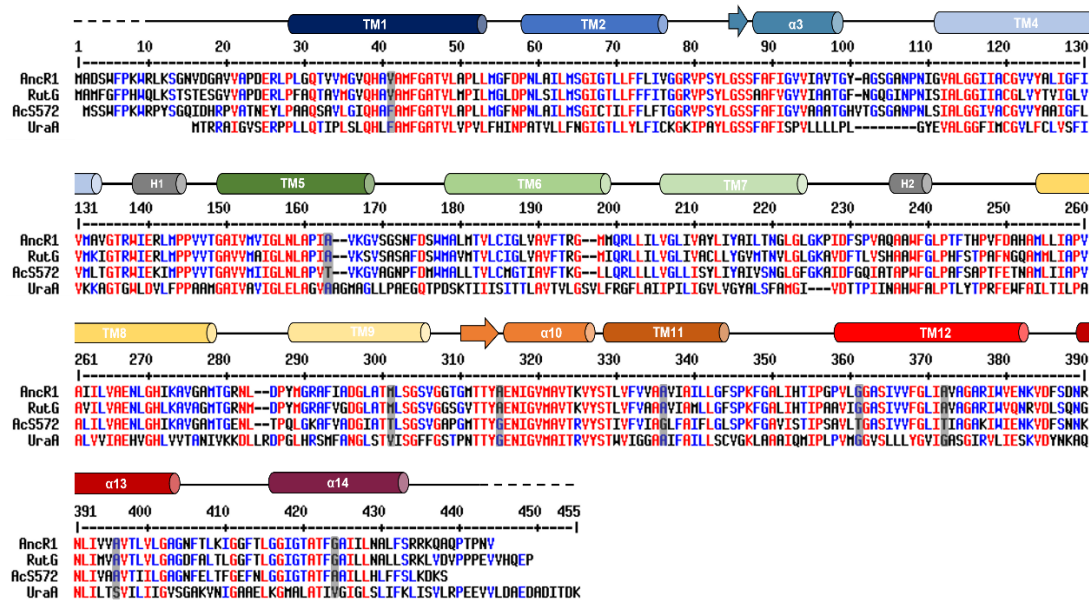
Κινητική ανάλυση της αναστολής της πρόσληψης ουρακίλης έδειξε ότι ο *AncR1* αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια 5-FU, θυμίνη και κυτοσίνη και με σχετικά χαμηλή συγγένεια την ξανθίνη, εμφανίζοντας ένα προφίλ εξειδίκευσης παρόμοιο με αυτό του *RutG*, αλλά με συγκριτικά πολύ χαμηλότερες συγγένειες για όλους αυτούς τους προσδέτες (**Πίνακας 3.2**).

	<i>K_i</i> (μM) για την αναστολή πρόσληψης [³H] ουρακίλης			
	5-FU	Θυμίνη	Κυτοσίνη	Ξανθίνη
AncR1	7.79 ±1.37	8.67 ±4.32	17.63 ±6.03	204.8 ±70.12
UraA	1.8 ±0.2	ND	0.34 ±0.02	ND
RutG	0.7 ±0.1	1.6 ±0.1	0.51 ±0.09	55.7 ±12.9

Πίνακας 3.2 Τιμές *K_i* κατά την αναστολή πρόσληψης ουρακίλης από τον *AncR1*. Κύτταρα *E. coli* T184, που έχουν μετασηματιστεί με την κατασκευή, υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης (0.1μM) μετά από έκθεση σε μη σημασμένους προσδέτες (0.1μM-1mM). Από τις αρχικές ταχύτητες αφαιρούνται οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (T184 με κενό φορέα pT7-5). Οι τιμές IC₅₀ προκύπτουν από την δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδή καμπύλη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism7. Το *K_i* υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Cheng και Prusoff $K_i = IC_{50}/(1+(L/K_M))$ (Cheng and Prusoff, 1973).

3.1.3 Μεταλλαξιγένεση του μεταφορέα AncR1 για την κατανόηση των διαφορών εξειδίκευσης

Η στοίχιση της αλληλουχίας του προγονικού μεταφορέα AncR1 με τις αλληλουχίες των λειτουργικά γνωστών σύγχρονων μεταφορέων RutG, AcS572 και UraA αποκάλυψε ορισμένα κατάλοιπα του AncR1 που διαφέρουν από τα αντίστοιχα των εξειδικευμένων μεταφορέων ουρακίλης AcS572 και UraA (που δεν αναγνωρίζουν θυμίνη ή ξανθίνη) ενώ είναι ίδια με αυτά του RutG (που έχει παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης με τον AncR1) (**Εικόνα 3.4**).



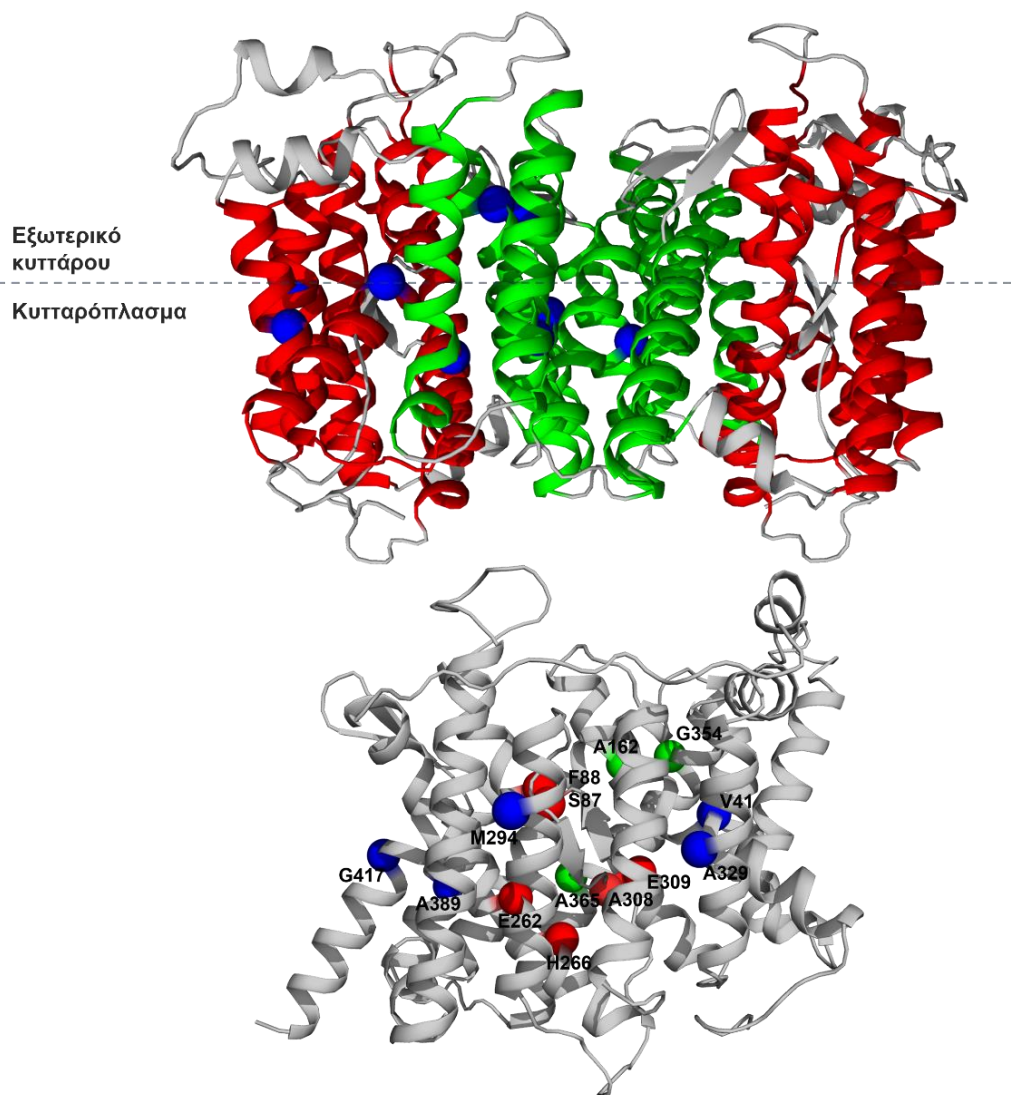
Εικόνα 3.4 Ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών του προγονικού μεταφορέα AncR1 και των χαρακτηρισμένων σύγχρονων μεταφορέων UraA, RutG και AcS572 Τα κατάλοιπα που σημειώνονται με κόκκινο χρώμα βρίσκονται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (συντήρηση σε >90% των αλληλουχιών) ενώ τα κατάλοιπα που σημειώνονται με μπλε χρώμα είναι σε θέσεις χαμηλότερης συντήρησης (>50%). Με γκρι φόντο σημειώνονται οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ της προγονικής αλληλουχίας AncR1 και του μεταφορέα ουρακίλης AcS572 του υποκλάδου R1 (Botou et al., 2018) οι οποίες αναλύθηκαν με μεταλλαξιγένεση. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν από την ανάλυση του μεταφορέα UraA της *E. coli* που είναι το δομικό πρότυπο της οικογένειας NAT/NCS2 (Yu et al., 2017), σημειώνονται πάνω από τις αντίστοιχες αλληλουχίες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988).

Οι παραπάνω διαφορές είναι: οι μεταφορείς AncR1 και RutG έχουν Val (V) αντί Phe (F) που έχει ο AcS572 στη θέση 41 (TM1), καθώς και Ala (A) αντί Thr (T) στη θέση 162 (TM5), Met (M) αντί Thr (T) στη θέση 294 (TM9), Ala (A) αντί Gly (G) στη θέση 308 (TM10) και στη θέση 329 (TM11), Gly (G) αντί Thr (T) στη θέση 354 και Ala (A) αντί Thr (T) στη θέση 365 (TM12), και Gly (G) αντί Ala (A) στη θέση 417 (TM14). Στις περισσότερες από τις θέσεις αυτές, διαφέρει από τους AncR1/RutG και ο UraA, με εξαίρεση τις 162 (Ala), 329 (Ala) και 354 (Gly). Οι διαφορές που αναφέρθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.3**.

Θέσεις που μελετήθηκαν με μεταλλαξινέωση στον AncR1			
Θέση καταλοίπου	Μεταφορέας		
	AncR1	AcS572	RutG
41	V	F	V
162	A	T	A
294	M	T	M
308	A	G	A
329	A	G	A
354	G	T	G
365	A	T	A
389	A	S	A
417	G	A	G

Πίνακας 3.3 Αμινοξικές διαφορές του προγονικού μεταφορέα AncR1 και του μεταφορέα RutG με τον μεταφορέα AcS572 του υποκλάδου R1 του κλάδου ουρακίλης/θυμίνης. Οι θέσεις αυτές αναλύθηκαν με μεταλλαξινέωση. Η αρίθμηση της θέσης του κάθε καταλοίπου έχει γίνει με βάση την αλληλουχία του AncR1

Οι παραπάνω θέσεις αμινοξέων είναι έξω από το κέντρο δέσμησης ουρακίλης (βάσει της δομής του UraA), εκτός από την Ala/Gly308 (TM10) η οποία βρίσκεται στο κέντρο δέσμησης και αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα μέσω δεσμού υδρογόνου από το N της κυρίως αλυσίδας του καταλοίπου αυτού (Lu et al., 2011; Yu et al., 2017). Από τις άλλες θέσεις, οι Ala/Thr162 (TM5), Gly/Thr354 (TM12) και Ala/Thr365 (TM12) βρίσκονται στη μεσεπιφάνεια μεταξύ του core/transport domain και του gate/scaffold domain η οποία μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο για τον μηχανισμό λειτουργίας των μεταφορέων αυτών (Yu et al., 2017, Diallinas, 2020; Tatsaki et al., 2021). Για την κατανόηση της τοπολογίας των αντίστοιχων θέσεων αμινοξέων, κατασκευάστηκε δομικό μοντέλο για τον προγονικό μεταφορέα AncR1. Το δομικό μοντέλο κατασκευάστηκε με πρότυπο τη δομή του μεταφορέα UraA της *E. coli* (Lu et al., 2011; Yu et al., 2017). Στη δομή που προκύπτει (**Εικόνα 3.5**), φαίνονται οι θέσεις των επιλεγμένων καταλοίπων στα διαμεμβρανικά τμήματα που απαρτίζουν την πρωτεΐνη-μεταφορέα καθώς και η θέση τους σε σχέση με το κέντρο δέσμησης του υποστρώματος.



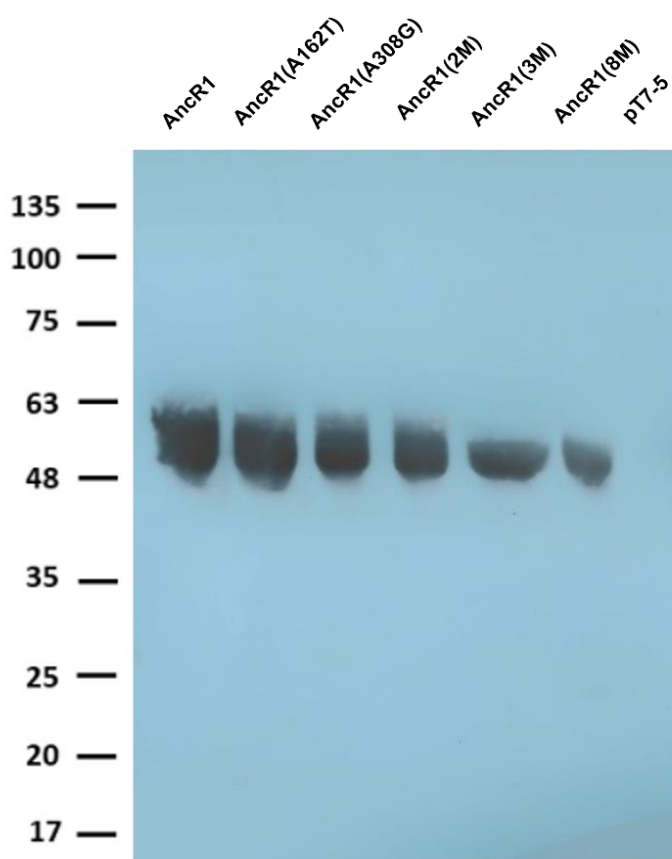
Εικόνα 3.5 Απεικόνιση του δομικού μοντέλου του ApcR1 και η θέση των καταλοίπων που μελετώνται με μεταλλαξίγνεση. Πάνω, απεικονίζεται η δομή του μεταφορέα ApcR1 σε μορφή διμερούς. Με κόκκινο σημειώνεται η δομική περιοχή του πυρήνα, με πράσινο η δομική περιοχή της εισόδου. Με μπλε σφαίρες επισημαίνονται οι θέσεις των καταλοίπων που μελετήθηκαν με μεταλλαξίγνεση. Κάτω, σημειώνονται τα κατάλοιπα που αποτέλεσαν στόχο της μεταλλαξίγνεσης στον μεταφορέα ApcR1 (σε μονομερή μορφή). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα κατάλοιπα A162, G354, A365 που βρίσκονται στην μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο δομικών περιοχών πυρήνα και εισόδου, με ανοιχτό κόκκινο το κατάλοιπο A308 που βρίσκεται στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος και με μπλε τα κατάλοιπα V41, M294, A329, A389 και G417 που βρίσκονται περιφερειακά του κέντρου δέσμευσης. Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην δέσμευση του υποστρώματος σημειώνονται με κόκκινο. Το δομικό μοντέλο έγινε με πρότυπο τη δομή του μεταφορέα UraA (<https://doi.org/10.2210/rpdb3qe7/rpdb>). Κατασκευάστηκε με το υπολογιστικό εργαλείο SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) και η επεξεργασία του έγινε με το πρόγραμμα PyMOL.

Θεωρώντας ότι κάποιες από αυτές τις διαφορές ή ο συνδυασμός τους μπορεί να είναι σημαντικές για τη διαφορά εξειδίκευσης μεταξύ ApcR1 και AcS572/UraA, προχωρήσαμε σε *in vitro* μεταλλαξίγνεση στις θέσεις αυτές. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, κατασκευάστηκαν πέντε διαφορετικά μεταλλάγματα στο ίδιο μοριακό υπόβαθρο, την αλληλουχία του προγόνου ApcR1. Τα μεταλλάγματα ήταν τα εξής: δύο μονά μεταλλάγματα **ApcR1(A162T)** και **ApcR1(A308G)** στις θέσεις 162 και 308 αντίστοιχα, ένα διπλό μέταλλαγμα

AncR1(2M) με αλλαγές G354T και A365T, ένα τριπλό μετάλλαγμα **AncR1(3M)** με αλλαγές A162T, G354T και A365T και ένα οκταπλό μετάλλαγμα **AncR1(8M)** με αλλαγές V41F, A162T, M294T, A329G, G354T, A365T, A389S, G417A σε όλες τις θέσεις εκτός από την 308.

Αφού κατασκευάστηκαν μέσω PCR δύο σταδίων, τα μεταλλάγματα του AncR1 μεταφέρθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς pT7-5. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με μετασχηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* και ακολούθησε η λειτουργική τους ανάλυση.

Η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά western έδειξε ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα μεταλλάγματα του AncR1 εκφράζονται όλες σε σημαντικά επίπεδα στη μεμβράνη της *E. coli*, με τα πολλαπλά μεταλλάγματα να εμφανίζουν σχετικά χαμηλότερα επίπεδα (**Εικόνα 3.6**).

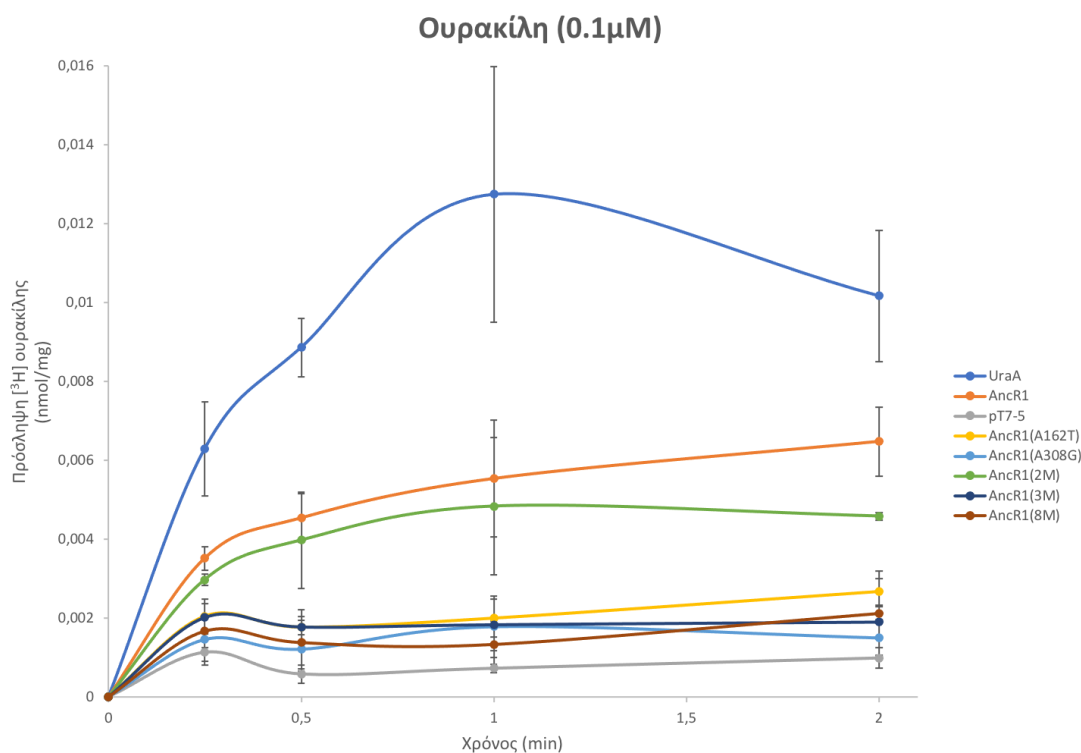


Εικόνα 3.6 Ανάλυση των επιπέδων των μεταλλαγμάτων του AncR1 στην μεμβράνη *E. coli* κυττάρων. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση των μεταφορέων που προκύπτουν από τα μεταλλάγματα του AncR1. Τα δείγματα μεμβρανών αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-conjugated streptavidin). Οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης της υπεροξειδάσης έγινε με ενισχυμένη χημειοφωτάυγεια (ECL). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε κλάσμα μεμβρανών από κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν τον μεταφορέα AncR1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε κλάσμα μεμβρανών από κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν κενό φορέα pT7-5.

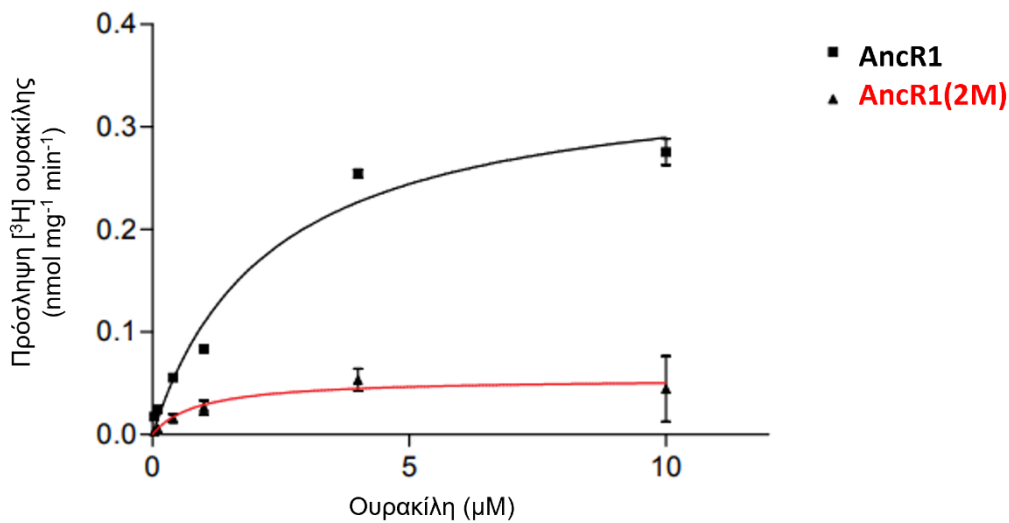
3.1.3.1 Οι αντικαταστάσεις A162T, A308G, και οι συνδυαστικές αντικαταστάσεις τριών ή οκτώ καταλοίπων οδηγούν σε ανενεργούς μεταφορείς ενώ η G354T/A365T οδηγεί σε μεταφορέα ουρακίλης με παρόμοιο K_m και προφίλ εξειδίκευσης με τον AncR1

Μετά τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταλλαγμάτων στη μεμβράνη, έγιναν δοκιμασίες μεταφοράς [3 H]ουρακίλης. Οι δοκιμασίες μεταφοράς έγιναν σε κάθε περίπτωση με θετικούς μάρτυρες τον μεταφορέα ουρακίλης UraA και τον AncR1 (**Εικόνα 3.7**). Από τα πέντε μεταλλάγματα του AncR1 το μόνο που παρουσιάζει ενεργότητα μεταφοράς ουρακίλης είναι το AncR1(2M), δηλαδή το διπλό μετάλλαγμα στις δύο θέσεις του TM12 (G354T/A365T).

Η κινητική ανάλυση της ενεργότητας του AncR1(2M) (**Εικόνα 3.8, Πίνακας 3.3**) έδειξε ότι ο AncR1(2M) έχει υψηλή συγγένεια για την ουρακίλη (K_m 2.3 μ M, όπως και ο AncR1) αλλά σημαντικά μειωμένη ικανότητα μεταφοράς (υποτριπλάσια V_{max}) σε σχέση με τον AncR1. Στον Πίνακα 3.4 φαίνονται οι τιμές K_m και V_{max} σε σύγκριση με αυτές του AncR1 αλλά και των υπόλοιπων μεταφορέων του κλάδου.



Εικόνα 3.7 Ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς ουρακίλης από τα μεταλλάγματα του προγονικού μεταφορέα AncR1. Κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [3 H] ουρακίλης (0.1 μ M) στους 25 °C για χρόνους 15sec-2min. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση οι μεταφορείς UraA (Botou et al., 2018; Yu et al., 2017) και AncR1. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα pT7-5 προκύπτουν σε κάθε περίπτωση από κύτταρα *E. coli* μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5. Οι τυπικές αποκλίσεις (S.D.) προκύπτουν από 3-5 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 3.8 Διάγραμμα κινητικής ανάλυσης των μεταφορέων AncR1 και AncR1(2M) για την ουρακίλη. Το διάγραμμα ελήχθη με βάση την εξίσωση Michaelis-Menten μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Prism7 με τις αντίστοιχες αποκλίσεις (S.D.) από δύο πειράματα. Από τα δεδομένα έχουν αφαιρεθεί οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* με κενό φορέα pT7-5).

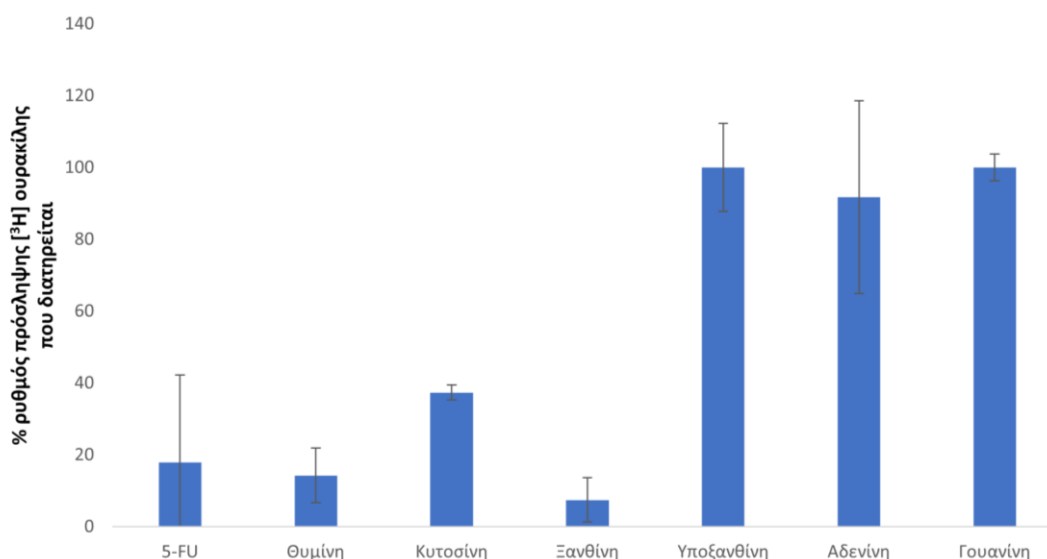
Κινητική ανάλυση μεταφοράς [³ H] ουρακίλης			
	K_m (μM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (μL min ⁻¹ mg ⁻¹)
AncR1(2M)	2.3 ± 0.4	0.1 ± 0.01	0.043
AncR1	2.3 ± 0.5	0.35 ± 0.02	0.15
AcS572	0.85 ± 0.09	7.1 ± 0.2	8.4
RutG	0.56 ± 0.08	13.2 ± 0.5	23.6
UraA	0.21 ± 0.04	3 ± 0.1	14.3

Πίνακας 3.4 Τιμές K_m και V_{max} των μεταφορέων AncR1(2M), AncR1, AcS572, RutG και UraA για την ουρακίλη. Κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν τον μεταφορέα AncR1(2M) από πλασμίδια pT7-5/BAD υποβάλλονται σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης (0.01-40μM). Η αρχική ταχύτητα του μεταφορέα υπολογίζεται στα 5sec. Οι τιμές K_m και V_{max} για τους μεταφορείς AcS572, RutG, UraA είναι γνωστές από προηγούμενες μελέτες (Botou et al., 2018). Οι τιμές K_m και V_{max} ελήχθησαν από διάγραμμα Michaelis-Menten μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Prism7 με τις αντίστοιχες αποκλίσεις (S.D.) από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.1.3.2 Ο μεταφορέας AncR1(G354T/A365T) έχει παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης με αυτό του AncR1 και του RutG

Για τη διερεύνηση της επίπτωσης των δύο αμινοξικών αλλαγών του TM12 (G354T/A365T) στο προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα AncR1, έγιναν πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης [³H]ουρακίλης 0.1μM από μη σημασμένες νουκλεοτιδικές βάσεις, όπως παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 3.9**.

Αναστολή (%) πρόσληψης [³H] ουρακίλης



Εικόνα 3.9 Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα ApcR1(2M) με ανταγωνισμό ως προς την ουρακίλη. Κύτταρα *E. coli* που είχαν επαχθεί με IPTG υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ουρακίλης (0.1μM, 25°C) μετά από επώαση των κυττάρων με τους μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (0.6mM). Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με προσδέτες, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις από δύο μετρήσεις (όπου υπάρχουν) του ίδιου πειράματος.

Η πρόσληψη ουρακίλης φαίνεται να αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό από την παρουσία 5-φθοροουρακίλης, θυμίνης, κυτοσίνης και ξανθίνης, πράγμα που σημαίνει ότι ο μεταφορέας είναι ικανός να αναγνωρίσει τα υποστρώματα αυτά. Τα παραπάνω αποτελούν ένδειξη ότι οι δύο αμινοξικές αλλαγές του ApcR1(2M) στις θέσεις 354 και 365 δεν επηρεάζουν σημαντικά το προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα ApcR1, ο οποίος επίσης αναγνωρίζει αυτά τα υποστρώματα. Αν και φαίνεται ότι ο ApcR1(2M) αναστέλλεται από την ξανθίνη σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι ο ApcR1 (Εικόνα 3.6, Πίνακας 3.2), δεν μπορούμε να εξαγάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για τη συγγένεια του ApcR1(2M) με τη ξανθίνη, λόγω της χαμηλής ενεργότητας του ApcR1(2M) (Εικόνα 3.8) που δεν επιτρέπει επιτυχή πειράματα ανταγωνισμού της πρόσληψης ουρακίλης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων των αναστολέων που χρησιμοποιούνται.

Επομένως, τόσο ο προγονικός μεταφορέας ApcR1 όσο και το μετάλλαγμα ApcR1(2M) παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ εξειδίκευσης με τον γνωστό μεταφορέα RutG που έχει την ικανότητα αναγνώρισης πυριμιδινών (ουρακίλη, 5-φθοροουρακίλη, κυτοσίνη, θυμίνη) αλλά και ξανθίνης (Botou et al., 2018).

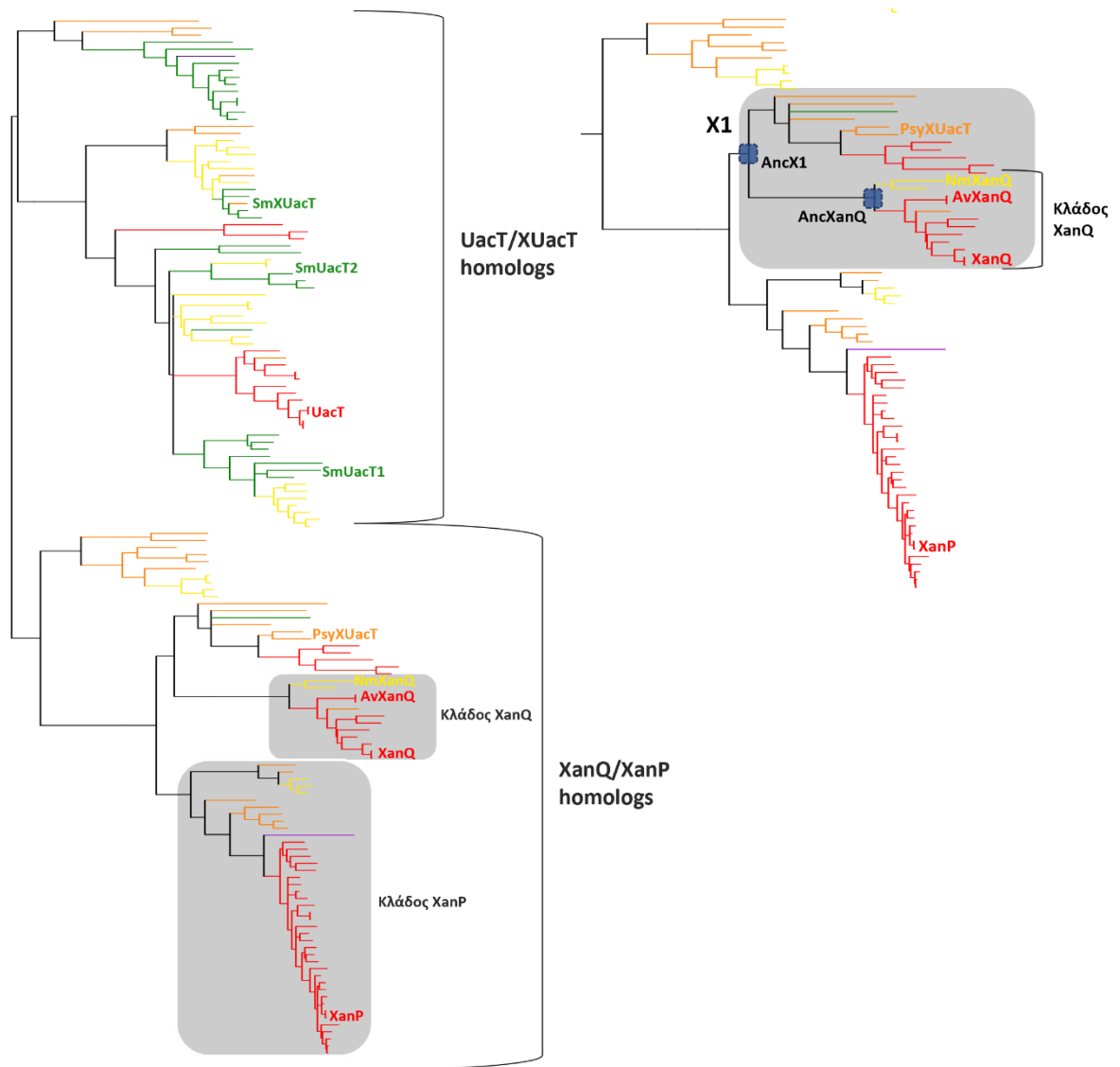
3.2 Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος

3.2.1 Εύρεση του κοινού προγόνου (ApcX1) των μεταφορέων στον υποκλάδο X1

Ο κλάδος των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης/ουρικού οξέος της οικογένειας NAT/NCS2 αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος UapA του *A. nidulans* (Alguet et al., 2016) καθώς και από τους λειτουργικά χαρακτηρισμένους μεταφορείς ξανθίνης XanQ και XanP (Karatza & Frillingos, 2005) και ουρικού οξέος UacT του *E. coli* (Papakostas & Frillingos, 2012). Στον κλάδο αυτό κατατάσσονται επίσης ο διπλής εξειδίκευσης μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος SmXUacT και οι μεταφορείς ουρικού οξέος SmUacT1 (SmLL8) και SmUacT2 (SmX28) του *Sinorhizobium meliloti* (Botou et al., 2020), οι μεταφορείς ξανθίνης NmXanQ του *N. meningitidis* και AvXanQ του *A. veronii*, όπως αυτό βρέθηκε από τις πιο πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας (Tatsaki et al., 2021) καθώς και ο διπλής εξειδίκευσης μεταφορέας ξανθίνης/ουρικού οξέος PsyXUacT του ψυχρόφιλου *Psychrobacter cryohalolentis* (Παπακώστας Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011).

Για τους ομόλογους μεταφορείς Πρωτεοβακτηρίων που εμπίπτουν στον κλάδο ξανθίνης/ουρικού οξέος, είχε ήδη πραγματοποιηθεί εκτενής φυλογενετική ανάλυση (Tatsaki et al., 2021) και κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο όλων των ομόλογων ξανθίνης/ουρικού οξέος. Από τη φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι τα ομόλογα της ομάδας αυτής χωρίζονται σε δύο διακριτές υποομάδες: μία που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης (XanP/XanQ homologs) και μία που περιλαμβάνει τους γνωστούς μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος (UacT/XUacT homologs) (**Εικόνα 3.10**).

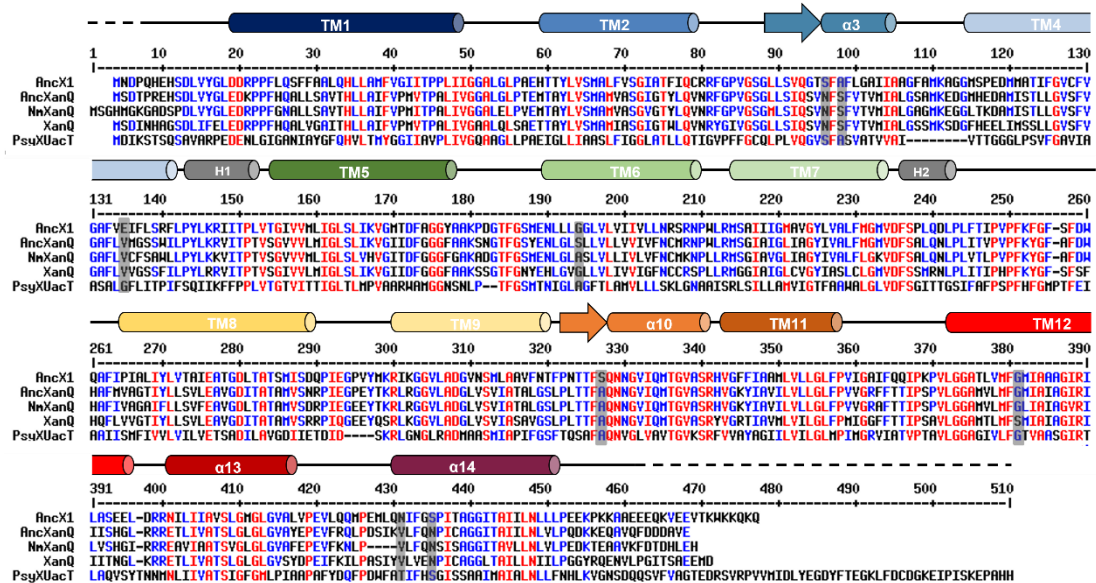
Η ανασύσταση και ανάλυση του κοινού προγόνου ApcXanQ στον κλάδο XanQ των μεταφορέων ξανθίνης, έδειξε ότι ο προγονικός ApcXanQ μεταφέρει επιπλέον της ξανθίνης και τη γουανίνη παρά το γεγονός ότι κανένας από τους σύγχρονους, χαρακτηρισμένους μεταφορείς του κλάδου δεν τη μεταφέρει (Tatsaki et al., 2021) και ότι διαθέτει το κατάλοιπο Asn93 (αρίθμηση XanQ) που έχει σχετιστεί με την εξειδίκευση ως προς ξανθίνη (Karena & Frillingos, 2009). Στην προσπάθεια να διερευνήσουμε περαιτέρω αυτές τις διαφορές των εξειδικεύσεων, επιλέξαμε να μελετήσουμε τον κοινό πρόγονο στον κλάδο X1 που, εκτός από τους μεταφορείς ξανθίνης του κλάδου XanQ, περιλαμβάνει και τον διπλής εξειδίκευσης μεταφορέα PsyXUacT και να δούμε αν διατηρείται και σε αυτόν το κατάλοιπο Asn/Ser93. Με βάση τη φυλογένεση που περιγράφηκε για τους μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος, έγινε εξαγωγή της αλληλουχίας του κοινού προγόνου το κλάδου που ονομάστηκε ApcX1.



Εικόνα 3.10 Φυλογενετική ανάλυση του κλάδου ξανθίνης/ουρικού οξέος της οικογένειας μεταφορέων NAT/NCS2. Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με αντιπροσωπευτικές αμινοξικές αλληλουχίες των Πρωτεοβακτηρίων. Αριστερά, τα διαφορετικά χρώματα στο φυλογενετικό δέντρο υποδεικνύουν διαφορετικές τάξεις των πρωτεοβακτηρίων: πράσινο για τα α-, κίτρινο για τα β-, κόκκινο για τα γ- και συγκεκριμένα της τάξης των Enterobacteriales και πορτοκαλί για τις υπόλοιπες τάξεις των γ- πρωτεοβακτηρίων. Με γκρι σκίαση επισημαίνονται οι κλάδοι XanQ και XanP του υποκλάδου των ομόλογων ξανθίνης. Δεξιά, παρουσιάζεται ο υποκλάδος των ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης. Με γκρι σκίαση σημειώνεται ο υποκλάδος X1 στον οποίο εφαρμόστηκε η μέθοδος ανασύστασης προγονικής αλληλουχίας για την εξαγωγή της αλληλουχίας του μεταφορέα AncX1. Σημειώνεται επίσης ο κλάδος XanQ και ο κοινός πρόγονος των ομόλογων του, AncXanQ

Έχοντας διαθέσιμη την προγονική αλληλουχία AncX1, μήκους 437 αμινοξέων (Παράρτημα), πραγματοποιήσαμε στοίχιση της με τις αλληλουχίες σύγχρονων χαρακτηρισμένων μεταφορέων του υποκλάδου (XanQ, NmXanQ, PsyXUacT) καθώς και με τον AncXanQ, τον κοινό πρόγονο του κλάδου XanQ (**Εικόνα 3.11**). Από την ανάλυση της στοίχισης διαπιστώθηκε ότι η προγονική αλληλουχία AncX1 έχει 55% ταυτότητα αμινοξικών

καταλοίπων με τον μεταφορέα XanQ της *E. coli*, 59% με τον NmXanQ του *N. meningitidis*, 35% με τον PsyXUacT του *P. cryohalolentis* και 78% με τον προγονικό μεταφορέα AncXanQ.



Εικόνα 3.11 Ανάλυση στοίχισης των αλληλουχιών του προγονικού μεταφορέα AncX1 και των χαρακτηρισμένων σύγχρονων XanQ, NmXanQ, PsyXUacT και του προγονικού AncX1 του κλάδου XanQ. Τα κατάλοιπα που σημειώνονται με κόκκινο χρώμα βρίσκονται σε θέσεις υψηλής συντήρησης (συντήρηση σε >90% των αλληλουχιών) ενώ τα κατάλοιπα που σημειώνονται με μπλε χρώμα είναι σε θέσεις χαμηλότερης συντήρησης (>50%). Οι θέσεις που έχουν χαρακτηριστεί σημαντικές για την εξειδίκευση και τη λειτουργία στον XanQ και στις ποικίες εντοπίζονται διαφορές ως προς το αμινοξικό κατάλοιπο, σημειώνονται με γκρι σκίαση. Οι περιοχές των διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως αυτά προκύπτουν από τον μεταφορέα UraA της *E. coli* που είναι το δομικό πρότυπο της οικογένειας NAT/NCS2 (Yu et al., 2017), σημειώνονται πάνω από τις αντίστοιχες αλληλουχίες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet, 1988).

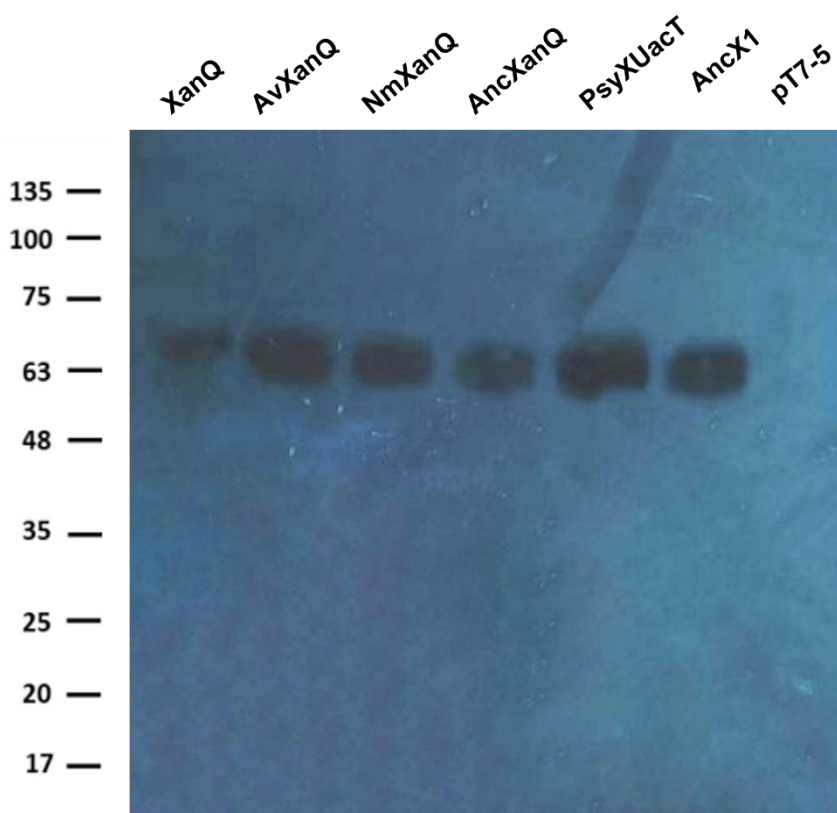
3.2.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα AncX1

3.2.2.1 Ο AncX1 είναι χαμηλής ενεργότητας μεταφορέας ξανθίνης

Μετά την εξαγωγή της προγονικής αλληλουχίας μήκους 437 αμινοξέων, ακολούθησε σχεδιασμός της αντίστοιχης αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί για την προγονική πρωτεΐνη με βάση τον γενετικό κώδικα και με κατάλληλη χρήση συνώνυμων κωδικονίων για τη βελτιστοποίηση της έκφρασης της στο ετερόλογο σύστημα της *E. coli*. Η αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί για το προγονικό γονίδιο AncX1 παράχθηκε με γονιδιακή σύνθεση και μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pT7-5, που περιέχει την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενός biotin-acceptor domain. Αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί για σήμανση στο C-τελικό άκρο, βιοτινύλωση in vivo και ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με western αβιδίνης. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε με μετασηματισμό σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* και ακολούθησε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του.

Στα πλαίσια της λειτουργικής ανάλυσης της προγονικής αλληλουχίας AncX1, πραγματοποιήθηκε πρώτα ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η ανάλυση

ανοσοαποτύπωσης κατά western έδειξε ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί τον AncX1 εμφανίζει σημαντικά επίπεδα έκφρασης στην μεμβράνη της *E. coli* (**Εικόνα 3.12**).

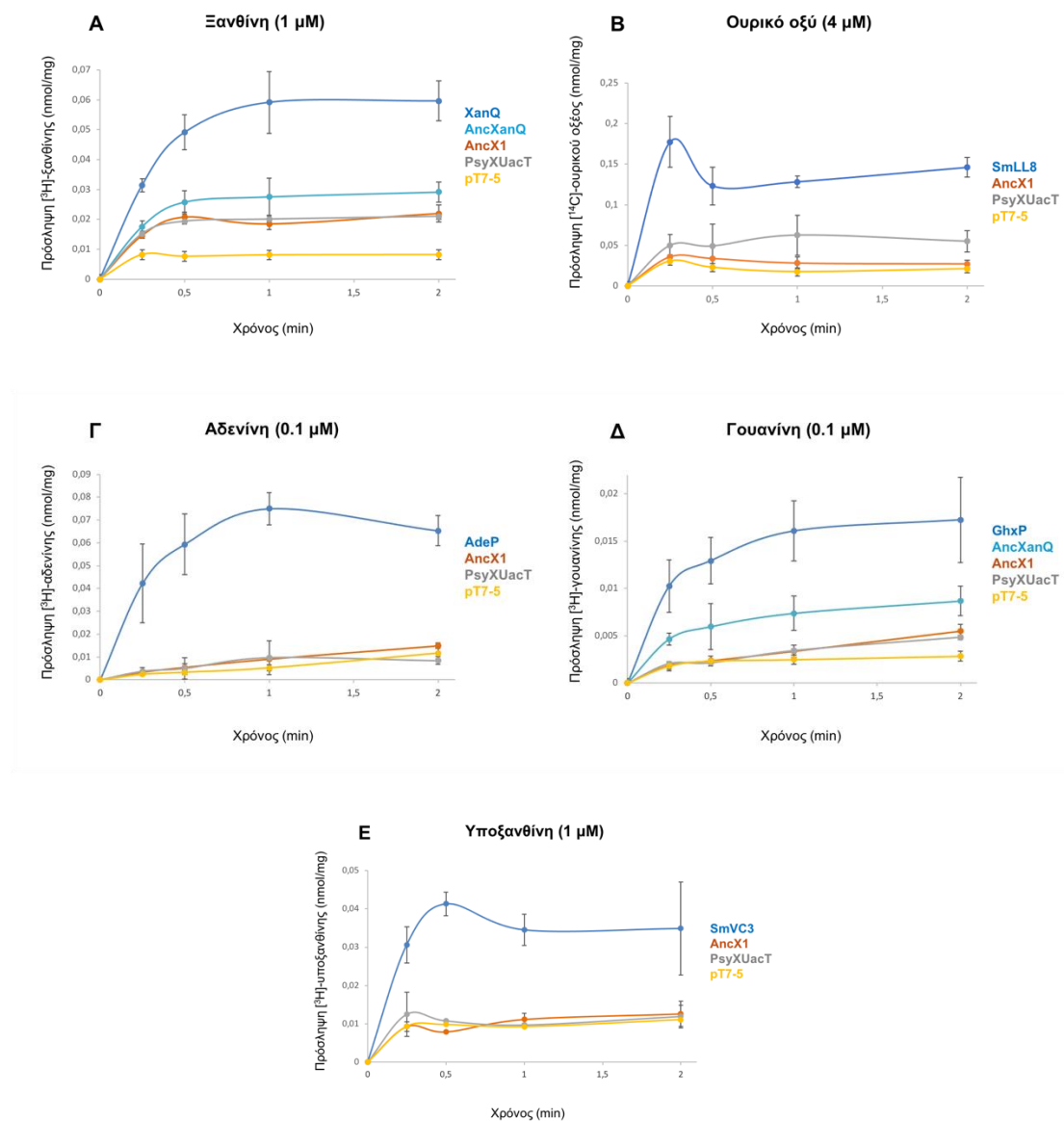


Εικόνα 3.12 Ανάλυση των επιπέδων του AncX1 στην μεμβράνη κυττάρων *E. coli*. Κλάσματα μεμβρανών παρασκευάστηκαν από κύτταρα *E. coli* T184 που είχαν επαχθεί με IPTG για την έκφραση του μεταφορέα AncX1 από πλασμίδια pT7-5/BAD. Τα δείγματα μεμβρανών αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12%) και ανοσοαποτύπωση με χρήση του συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (HRP-cojugated streptavidin). Οπτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης της υπεροξειδάσης έγινε με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL). Κλάσματα μεμβρανών από κύτταρα *E. coli* K-12 που εκφράζουν τους μεταφορείς XanQ, AvXanQ, NmXanQ, PsyXUacT και AncXanQ χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες.

Μετά τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταλλαγμάτων στη μεμβράνη, ακολούθησαν δοκιμασίες μεταφοράς των υποστρωμάτων [³H]ξανθίνης, [¹⁴C]ουρικού οξέος, [³H]αδενίνης, [³H]γουανίνης και [³H]υποξανθίνης. Οι δοκιμασίες μεταφοράς των υποστρωμάτων έγιναν σε κάθε περίπτωση με θετικούς μάρτυρες τους ανάλογους σύγχρονους μεταφορείς του κάθε υποστρώματος. Από τα υποστρώματα αυτά, ο μεταφορέας AncX1 παρουσιάζει ενεργότητα μόνο όσο αφορά την ξανθίνη. Η ενεργότητα αυτή βρίσκεται, ωστόσο, σε χαμηλά επίπεδα (**Εικόνα 3.13**).

Σε κάθε περίπτωση οι δοκιμασίες μεταφοράς των ραδιενεργών υποστρωμάτων γίνονται, επίσης, σε σύγκριση με τον σύγχρονο μεταφορέα PsyXUacT του *P. cryohalolentis*. Για τον μεταφορέα PsyXUacT υπήρχαν από παλιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας (Παπακώστας Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011), κάποια προκαταρκτικά αποτελέσματα που πρότειναν ότι

μεταφέρει ξανθίνη και ουρικό οξύ. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, της παρούσας εργασίας μπορούν να επιβεβαιώσουν μόνο την ικανότητα του PsyXUacT να μεταφέρει ξανθίνη με ενεργότητα αντίστοιχη με του προγονικού μεταφορέα AncX1 (**Εικόνα 3.13**).

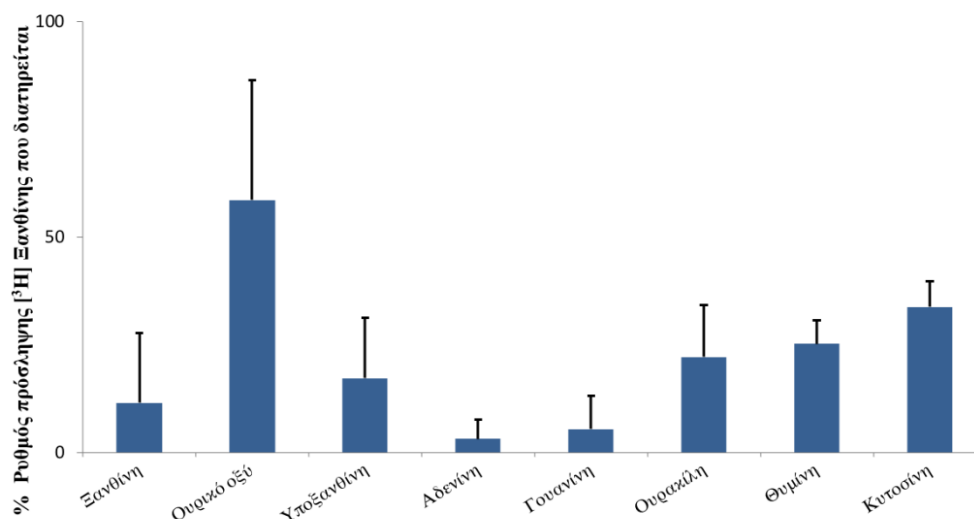


Εικόνα 3.13 Ανάλυση της ενεργότητας μεταφοράς υποστρωμάτων πουρινών για τον μεταφορέα AncX1. Κύτταρα *E. coli* που εκφράζουν τους αντίστοιχους μεταφορείς υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς Α) [^3H] ξανθίνης (1 μM) Β) [^{14}C] ουρικού οξέος (4 μM) Γ) [^3H] αδενίνης (0.1 μM) Δ) [^3H] γουανίνης (0.1 μM) και Ε) [^3H] υποξανθίνης (1 μM) στους 25 °C για χρόνους 5sec-2min. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση οι γνωστοί μεταφορείς XanQ (Karatzá & Frillingos, 2005), AncXanQ (Tatsaki et al., 2021), SmLL8 (Botou et al., 2020), AdeP, GhxP (Botou et al., 2018) και SmVC3 (Botou et al., 2020). Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα pT7-5 προκύπτουν σε κάθε περίπτωση από κύτταρα *E. coli* μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5 και τυπικές αποκλίσεις από δύο ή περισσότερες πειραματικές μετρήσεις.

3.2.2.2 Ο προγονικός μεταφορέας AncX1 έχει ευρύ προφίλ εξειδίκευσης

Για να διερευνηθεί το προφίλ εξειδίκευσης του προγονικού μεταφορέα AncX1 και να συγκριθεί με αυτά των μεταφορέων XanQ και AncXanQ του κλάδου, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανταγωνισμού της πρόσληψης ραδιοενεργά σημασμένης ξανθίνης με μια σειρά μη

σημασμένων υποστρωμάτων πουρινών και πυριμιδινών από τα οποία προέκυψε ότι ο προγονικός μεταφορέας ApcX1, εκτός από την ξανθίνη, αναγνωρίζει αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, ουρακίλη, θυμίνη και κυτοσίνη και σε μικρότερο βαθμό ουρικό οξύ (**Εικόνα 3.14**).



Εικόνα 3.14 Προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα ApcX1 με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* που είχαν επαχθεί με IPTG υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από επώαση των κυττάρων με μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM). Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* μετασηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με προσδέτες.

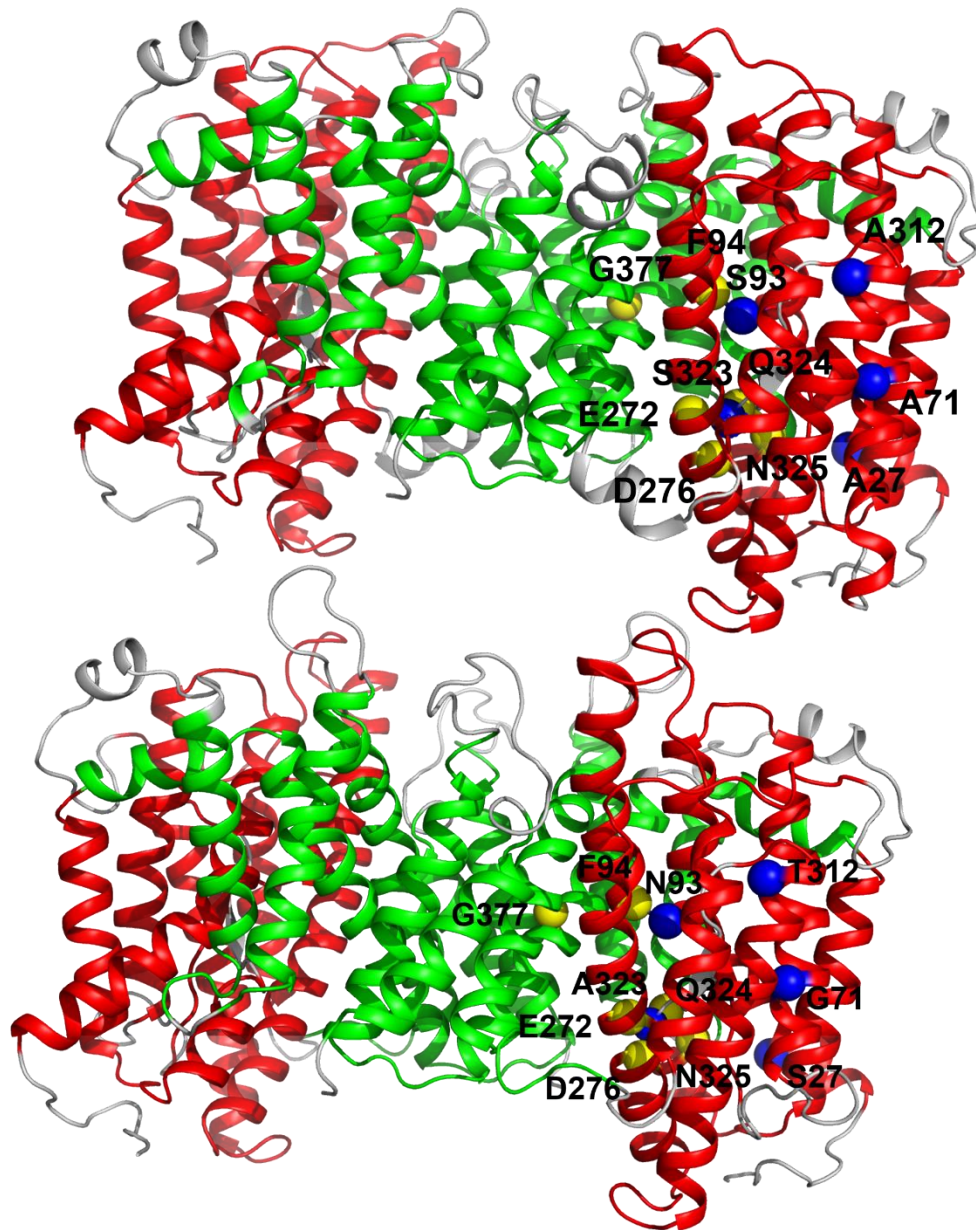
Παρά το γεγονός ότι ο ApcX1 μεταφέρει ξανθίνη όπως και οι χαρακτηρισμένοι μεταφορείς του κλάδου του, XanQ, NmXanQ και ApcXanQ (Tatsaki et al., 2021), και έχει 78% ομοιότητα στην αλληλουχία του με τον ApcXanQ (**Εικόνα 3.11**), το προφίλ εξειδίκευσης του ApcX1 παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με του ApcXanQ ή των άλλων ομόλογων μεταφορέων ξανθίνης.

Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση ότι οι αλλαγές που ευθύνονται για τη διαφοροποίηση της εξειδίκευσης των μεταφορέων βρίσκονται μεταξύ των λίγων διαφορών στην αλληλουχία τους (στο 22% που διαφέρει). Συγκεκριμένα οι υπεύθυνες για τη διαφοροποίηση αλλαγές μπορεί να είναι αυτές που βρίσκονται σε δυνητικώς σημαντικές θέσεις όπως αυτές αποκαλύφθηκαν από τη μελέτη του ApcXanQ και του XanQ. Τέτοιες διαφορές εντοπίζονται στη θέση 93 όπου η παρουσία Asn καθορίζει την εξειδίκευση για ξανθίνη (Karena & Frillingos, 2009), στις θέσεις 27 και 312 που μέσω επιστατικών αλληλεπιδράσεων καταστέλλουν το ρόλο του καταλοίπου S377 στη διεύρυνση της εξειδίκευσης (Tatsaki et al., 2021), στη θέση 323 της οποίας το κατάλοιπο δημιουργεί

διαμορφωτικές αλλαγές κατά την πρόσδεση του υποστρώματος (Georgoroulou et al., 2010) και στην θέση 71 που έχει συσχετιστεί με την ενεργότητα των μεταφορέων (Karena et al., 2015). Οι αμινοξικές διαφορές στις θέσεις αυτές στις αλληλουχίες των AncX1 και AncXanQ αναφέρονται στον **Πίνακα 3.5** και η τοπολογία των θέσεων γίνεται κατανοητή από το δομικό μοντέλο που κατασκευάστηκε για τον μεταφορέα AncX1 (**Εικόνα 3.15**).

Αμινοξικές διαφορές των προγονικών μεταφορέων AncX1 και AncXanQ		
Θέση καταλοίπου	Μεταφορέας	
	AncX1	AncXanQ
27	A	S
71	A	G
93	S	N
312	A	T
323	S	A

Πίνακας 3.5 Αμινοξικές διαφορές μεταξύ των προγονικών μεταφορέων AncX1 και AncXanQ. Οι διαφορές εντοπίστηκαν με βάση τις σημαντικές θέσεις για τη λειτουργία και την εξειδίκευση στον XanQ. Η αρίθμηση της θέσης του κάθε καταλοίπου έχει γίνει με βάση την αλληλουχία του XanQ.

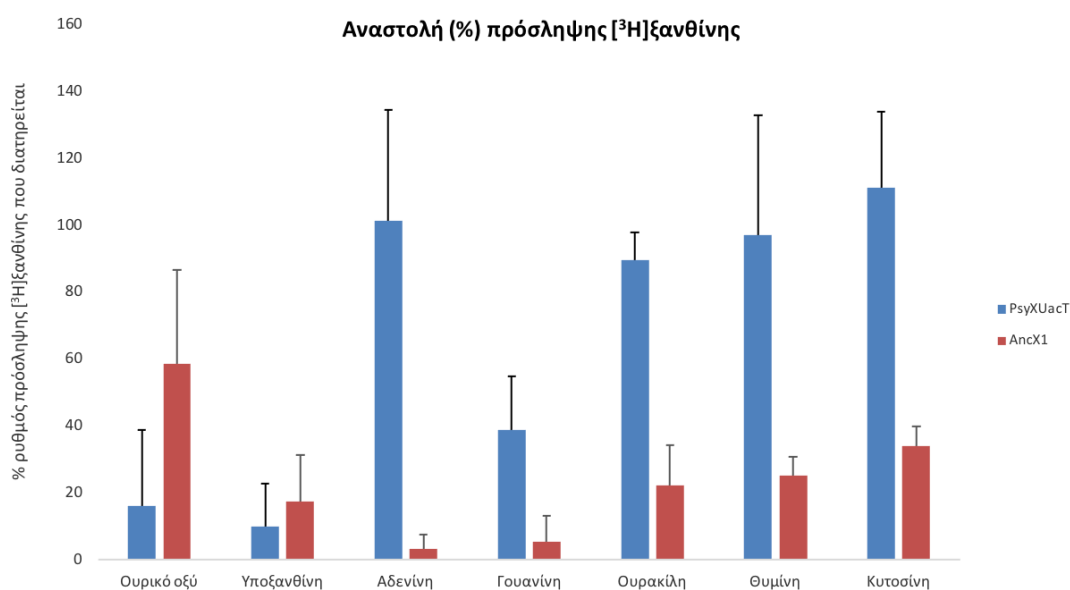


Εικόνα 3.15 Απεικόνιση του δομικού μοντέλου του προγονικού μεταφορέα ApcX1 σε σύγκριση με τον προγονικό μεταφορέα ApcXanQ. Πάνω, απεικονίζεται ο μεταφορέας ApcX1 σε μορφή διμερούς. Κάτω, αποεικονίζεται ο μεταφορέας ApcXanQ. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται η δομική περιοχή του πυρήνα (core/transport domain) και με πράσινο η δομική περιοχή της εισόδου (gate/scaffold domain). Με μπλε σφαίρες σημειώνονται τα κατάλοιπα που διαφέρουν στους δύο μεταφορείς των οποίων οι θέσεις θεωρούνται σημαντικές (Karena et al., 2015) με βάση τον XanQ. Με κίτρινες σφαίρες επισημαίνονται σημαντικά κατάλοιπα συντηρούνται στους δύο μεταφορείς. Το δομικό μοντέλο του ApcX1 κατασκευάστηκε με πρότυπο την δομή του μεταφορέα UapA (Alguet et al., 2016) (<https://doi.org/10.2210/pdb516C/pdb>). Κατασκευάστηκε με το υπολογιστικό εργαλείο SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) και η επεξεργασία του έγινε με το πρόγραμμα PyMOL.

3.2.2.3 Ο μεταφορέας PsyXUacT αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το ουρικό οξύ

Στον κλάδο X1 ανήκει εκτός από τους χαρακτηρισμένους μεταφορείς του κλάδου XanQ και ο μεταφορέας PsyXUacT. Σε παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας ο PsyXUacT είχε συσχετιστεί με τη μεταφορέα ξανθίνης και ουρικού οξέος (Παπακώστας Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011) ενώ τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να επιβεβαιώσουν

μόνο τη μεταφορά ξανθίνης (**Εικόνα 3.13**). Ωστόσο ο PsyXUacT ανήκει σε έναν υποκλάδο του κλάδου X1 που δεν έχει διερευνηθεί ακόμα λειτουργικά. Αξίζει, επομένως, να μελετήσουμε το προφίλ εξειδίκευσης του. Για να διερευνηθεί το προφίλ εξειδίκευσης του μεταφορέα PsyXUacT και να συγκριθεί με αυτό του προγονικού μεταφορέα AncX1 που μελετήσαμε προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανταγωνισμού της πρόσληψης ραδιενεργά σημασμένης ξανθίνης με μια σειρά μη σημασμένων υποστρωμάτων πουρινών και πυριμιδινών από τα οποία προέκυψε ότι ο μεταφορέας PsyXUacT αναγνωρίζει το ουρικό οξύ και την υποξανθίνη (**Εικόνα 3.16**).



Εικόνα 3.16 Προφίλ εξειδίκευσης των μεταφορέων PsyXUacT και AncX1 με ανταγωνισμό ως προς την ξανθίνη. Κύτταρα *E. coli* που είχαν επαχθεί με IPTG υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ενεργού μεταφοράς [³H] ξανθίνης (1μM, 25°C) μετά από επώαση των κυττάρων με μη ραδιενεργά σημασμένους προσδέτες (1mM). Οι ταχύτητες πρόσληψης του ραδιενεργού υποστρώματος μετρήθηκαν στα 15sec. Οι τιμές του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα *E. coli* μετασχηματισμένα με κενό φορέα pT7-5) έχουν αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων σε κάθε περίπτωση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά % επί των τιμών των αντίστοιχων κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με προσδέτες.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο μεταφορέας PsyXUacT έχει ένα πολύ πιο περιορισμένο προφίλ εξειδίκευσης σε σχέση με αυτό του προγονικού μεταφορέα AncX1. Οι διαφορές αυτές μπορούν να εξηγηθούν από το χαμηλό ποσοστό ταυτότητας των αλληλουχιών των δύο μεταφορέων (35%) και πιθανώς να οφείλονται σε αμινοξικές αλλαγές στο κέντρο δέσμησης ή/και περιφερειακά αυτού. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται διαφορές στις θέσεις 27 και 312 οι οποίες όπως έχει αποδειχθεί (Tatsaki et al., 2021) συμμετέχουν σε επιστατικές αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν το ρόλο της G377 στον καθορισμό της διευρυμένης εξειδίκευσης. Μια ακόμα δυνητικώς σημαντική διαφορά εντοπίζεται στη θέση 409 για την οποία προηγούμενα δεδομένα έχουν δείξει ότι η Gly στη

θέση αυτή είναι αναντικατάστατη για τη λειτουργία (Karena et al., 2015). Οι αμινοξικές διαφορές αυτές αναφέρονται στον **Πίνακα 3.6**.

Αμινοξικές διαφορές των μεταφορέων AncX1 και PsyXUacT του κλάδου X1			
Θέση καταλοίπου	Μεταφορέας		
	PsyXUacT	AncX1	AncXanQ
27	Y	A	S
312	P	A	T
409	L	G	G

Πίνακας 3.6 Αμινοξικές διαφορές μεταξύ των μεταφορέων AncX1 και PsyXUacT του κλάδου X1. Οι διαφορές εντοπίστηκαν με βάση τις σημαντικές θέσεις για τη λειτουργία και την εξειδίκευση στον XanQ. Αναφέρονται επίσης τα κατάλοιπα του προγονικού μεταφορέα AncXanQ στις θέσεις αυτές. Η αρίθμηση της θέσης του κάθε καταλοίπου έχει γίνει με βάση την αλληλουχία του XanQ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

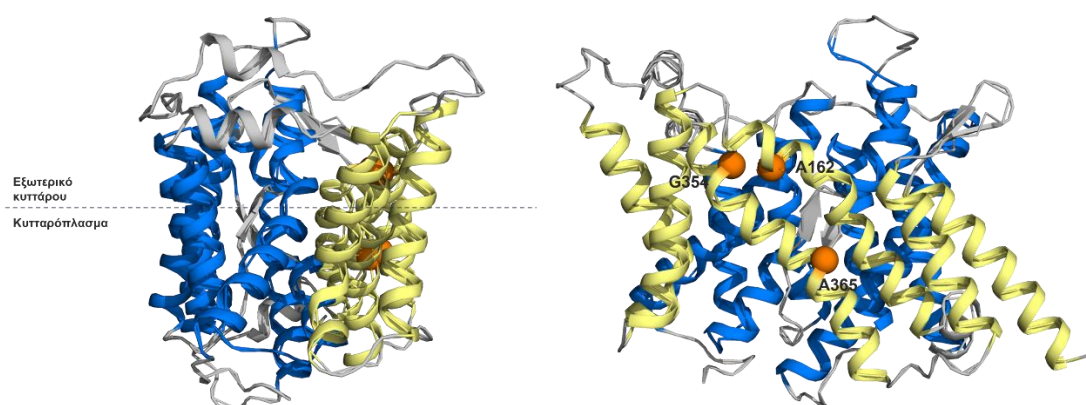
Εφαρμόζοντας μια εξελικτική προσέγγιση με τη μέθοδο της Ανασύστασης Προγονικών Αλληλουχιών προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε τη μοριακή βάση συγκεκριμένων διαφορών εξειδίκευσης σε μεταφορείς πουρινών-πυριμιδινών της οικογένειας NAT/NCS2.

Ως προς τον στόχο της κατανόησης της διαφοράς εξειδίκευσης μεταξύ ουρακίλης και θυμίνης σε μεταφορείς του κλάδου UraA/RutG πετύχαμε ανασύσταση του κοινού προγόνου AncR1 των μεταφορέων ουρακίλης/θυμίνης RutG της *E. coli* και ουρακίλης AcS572 του *A. Calcoaceticus*. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι ο AncR1 μεταφέρει ως υπόστρωμα την ουρακίλη αλλά όχι την θυμίνη και την ξανθίνη, όπως και ο σύγχρονος μεταφορέας RutG του κλάδου. Συγκεκριμένα, ο μεταφορέας AncR1 παρουσιάζει εξίσου υψηλή συγγένεια ($K_M = 2.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$) αλλά χαμηλότερη αποτελεσματικότητα ($V_{\max}/K_M = 0.15 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) στη μεταφορά της ουρακίλης σε σχέση με τον AcS572 ($K_M = 0.85 \mu\text{M}$, $V_{\max}/K_M = 8.4 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Παράλληλα, τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν την ικανότητα του AncR1 να αναγνωρίζει ένα ευρύ σύνολο υποστρωμάτων (5-φθοροουρακίλη, θυμίνη, κυτοσίνη, ξανθίνη), παρόμοιο με το σύνολο των υποστρωμάτων που αναγνωρίζει ο σύγχρονος μεταφορέας RutG του κλάδου, καθιστώντας τον έτσι μεταφορέα ευρείας εξειδίκευσης.

Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τη θεωρία ότι οι σύγχρονες εξειδικευμένες πρωτεΐνες αποτελούν απογόνους πρωτεϊνών με ευρύτερη εξειδίκευση (Wheeler et al., 2016). Ακόμη, η ικανότητα του AncR1 να μεταφέρει μόνο ουρακίλη σε συνδυασμό με την παρουσία Phe στην θέση 73 (με βάση την αρίθμηση στον UraA) στην προγονική αλληλουχία, ενισχύουν τα στοιχεία προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου μας που αποδεικνύει τη σημασία του καταλοίπου Phe73 στον αποκλεισμό της πρόσβασης της θυμίνης στο κέντρο πρόσδεσης των μεταφορέων (Botou et al., 2018).

Τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης του AncR1, επομένως, δεν δίνουν νέα στοιχεία για την κατανόηση της διαφοράς της εξειδίκευσης μεταξύ ουρακίλης/θυμίνης. Έτσι, προχωρήσαμε σε σύγκριση των αλληλουχιών των σύγχρονων μεταφορέων RutG της *E. coli* και AcS572 του *A. calcoaceticus* από την οποία εντοπίστηκαν κατάλοιπα του AncR1 που διαφέρουν από τα αντίστοιχα του εξειδικευμένου μεταφορέα AcS572 ενώ ταυτόχρονα παραμένουν ίδια στον ευρύτερης εξειδίκευσης RutG. Τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται εκτός του ενεργού κέντρου και θεωρούνται πιθανώς σημαντικά για την εξειδίκευση βάσει προηγούμενων αναλύσεων για τον μεταφορέα XanQ της ίδιας οικογένειας (Karena et al., 2015). Για την καλύτερη κατανόηση της θέσης των καταλοίπων αυτών στην τριτοταγή δομή του μεταφορέα, κατασκευάστηκε δομικό μοντέλο του AncR1 (με βάση τη δομή του ομόλογου μεταφορέα UraA) **(Εικόνα 3.5)**.

Μεταλλάξεις στις θέσεις αυτές στο υπόβαθρο του προγονικού μεταφορέα AncR1 οδηγούν σε ανενεργούς μεταφορείς με εξαίρεση το διπλό μετάλλαγμα AncR1(G354T/A365T). Οι θέσεις 354 και 365 βρίσκονται στο 12ο διαμεμβρανικό τμήμα του μεταφορέα AncR1 και συγκεκριμένα στην μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο δομικών περιοχών πυρήνα και εισόδου. Οι θέσεις αυτές θεωρήθηκαν πιθανώς σημαντικές καθώς είναι γνωστές περιπτώσεις μεταφορέων που λειτουργούν με μηχανισμό «ανελκυστήρα» (elevator) για τη μεταφορά του υποστρώματος στους οποίους μεταλλάξεις στη μεσεπιφάνεια πυρήνα-εισόδου διεύρυναν την εξειδίκευση τους ώστε να αναγνωρίζουν ή/και να μεταφέρουν επιπλέον υποστρώματα. Αυτό φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αλλαγών στην δυναμική της ολίσθησης της δομικής περιοχής του πυρήνα (George Diallinas, 2021; Tatsaki et al., 2021). Η τοπολογία των καταλοίπων αυτών παρουσιάζεται στον δομικό μοντέλο του AncR1 στην **Εικόνα 4.1**.



Εικόνα 4.1 Τοπολογία των καταλοίπων A162 (TM5), G354 (TM12), και A365 (TM12) στο δομικό μοντέλο του AncR1. Σημειώνονται με διαφορετικά χρώματα οι περιοχές πυρήνα (μπλε) και εισόδου (κίτρινο). Σημειώνονται επίσης οι θέσεις A162, G354, A365 (πορτοκαλί σφαίρες) που βρίσκονται στην μεσεπιφάνεια των δύο δομικών περιοχών και αποτέλεσαν στόχο της μεταλλαξιγένεσης. Το δομικό μοντέλο έγινε με πρότυπο τη δομή του μεταφορέα UraA (<https://doi.org/10.2210/rdb3qe7/pdb>). Κατασκευάστηκε με το υπολογιστικό εργαλείο SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) και η επεξεργασία του έγινε με το πρόγραμμα PyMOL.

Παρόλο που οι αλλαγές G354T και A365T του διπλού μεταλλάγματος δεν φαίνεται να επηρεάζουν την εξειδίκευση του μεταφορέα και δεν αποκαλύπτουν την μοριακή βάση της διαφοράς της εξειδίκευσης μεταξύ ουρακίλης και θυμίνης, αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι τα κατάλοιπα Gly354 και Ala365 επηρεάζουν την συγγένεια με την οποία ο μεταφορέας αναγνωρίζει ορισμένα υποστρώματα καθώς η μεταφορά της ουρακίλης από τον AncR1(G354T/A365T) αναστέλλεται από την ξανθίνη σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι στον AncR1.

Μιας και η παρούσα μελέτη δεν αποκαλύπτει θέσεις που ευθύνονται για τη διαφορά στην εξειδίκευση μεταξύ θυμίνης και ουρακίλης, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν μέσω

μεταλλαξιγένεσης και άλλες πιθανώς σημαντικές θέσεις τόσο αυτές καθ' αυτές όσο και συνδυαστικά μεταξύ τους. Ακόμη, θα μπορούσαν οι αλλαγές αυτές να μελετηθούν και στο μοριακό υπόβαθρο του μεταφορέα Acs572 ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχουν επιστατικές αλλαγές που προέκυψαν κατά την εξέλιξη και επηρεάζουν τη λειτουργία του.

Ως προς τον στόχο κατανόησης της διαφοράς εξειδίκευσης μεταξύ ξανθίνης και ουρικού οξέος στον κλάδο XanQ, πραγματοποιήσαμε ανασύσταση του κοινού προγόνου ApcX1 των μεταφορέων ξανθίνης XanQ της *E. coli* και PsyXUacT του *P. cryohalolentis* στον κλάδο X1 της οικογένειας. Ιδιαίτερης σημασίας κατάλοιπο για την εξειδίκευση των μεταφορέων του κλάδου είναι αυτό της θέσης 93. Είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας ότι η παρουσία Asn στη θέση 93 είναι καθοριστικής σημασίας για συγγένεια και την εξειδίκευση των μεταφορέων του κλάδου ως προς την ξανθίνη (Karena & Frillingos, 2009) ενώ η παρουσία της Ser στη θέση αυτή παίζει πιθανώς ρόλο στην διπλή εξειδίκευση των μεταφορέων για ξανθίνη/ουρικό οξύ.

Στόχος μας ήταν να μελετήσουμε στο απλούστερο μοριακό υπόβαθρο του προγονικού μεταφορέα ApcX1 αν η διευρυμένη, διπλή εξειδίκευση των μεταφορέων παρουσία της Ser93 προϋπήρχε και οδήγησε μέσω της εξέλιξης σε πιο εξειδικευμένους μεταφορείς με την αλλαγή από Ser σε Asn ή αν προέκυψε ως νέα λειτουργία κατά την πορεία της εξέλιξης όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις πρωτεϊνών (Siddiq et al., 2017).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι ο ApcX1 μεταφέρει ως υπόστρωμα την ξανθίνη αλλά όχι το ουρικό οξύ παρά την παρουσία Ser στη θέση 93 (Botou et al., 2020) αλλά ούτε και γουανίνη όπως ο προγονικός μεταφορέας ApcXanQ του κλάδου XanQ (Tatsaki et al., 2021). Παράλληλα τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την ικανότητά του ApcX1 να αναγνωρίζει ένα ευρύ σύνολο υποστρωμάτων που αποτελείται από ξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, ουρακίλη, θυμίνη και κυτοσίνη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ικανότητα μεταφοράς άλλων υποστρωμάτων, όπως ουρικό οξύ ή γουανίνη, που δεν υπάρχει στον ApcX1, πιθανώς προέκυψε ως νέα λειτουργία μεταγενέστερα στην πορεία της εξέλιξης όπως έχει αποδειχθεί, για παράδειγμα, για τις αφυδρογονάσες μηλικού και γαλακτικού οξέος σε μια ομάδα πρωτίστων (Boucher et al., 2014; Siddiq et al., 2017).

Για την κατανόηση της μοριακής βάσης της διαφοράς στην εξειδίκευση του ApcX1 με τους πιο σύγχρονους μεταφορείς του κλάδου προχωρήσαμε σε σύγκριση των αλληλουχιών τους. Στη σύγκριση ApcX1 με ApcXanQ εκτός από τη διαφορά Ser/Asn93 εντοπίστηκαν και άλλες δυνητικώς σημαντικές διαφορές σε θέσεις εκτός του κέντρου δέσμευσης που όμως μπορεί να επηρεάζουν μέσω επιστατικών αλληλεπιδράσεων τον ρόλο αμινοξέων σε άλλες θέσεις.

Τέτοιες θέσεις είναι οι 27 και 312 που όπως έχει προταθεί αλληλεπιδρούν επιστατικά με το κατάλοιπο 377 που παίζει ρόλο στη διευρυμένη εξειδίκευση των μεταφορέων (Tatsaki et al., 2021). Στις θέσεις αυτές εντοπίζονται οι αλλαγές Ala/Ser27 και Ala/Thr312 μεταξύ των ApcX1 και ApcXanQ που αξίζει μελλοντικά να διερευνηθούν μέσω μεταλλαξιγένεσης στο υπόβαθρο του ApcX1 ώστε να πάρουμε πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο τους στη διαφορά εξειδίκευσης με τον ApcXanQ. Το κατάλοιπο G377 ωστόσο φαίνεται ότι συντηρείται και στους δύο προγονικούς μεταφορείς και ο ρόλος της Gly στη διευρυμένη εξειδίκευση που αποδείχθηκε από προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας (Tatsaki et al., 2021) ενισχύεται από τα παρόντα αποτελέσματα που δείχνουν ότι ο ApcX1 αναγνωρίζει μια σειρά πολλών υποστρωμάτων.

Δεδομένου ότι ο αρχικός μας στόχος μέσω της μελέτης του ApcX1 ήταν να προσδιορίσουμε τη μοριακή βάση της διαφοράς στην εξειδίκευση μεταξύ ξανθίνης και ουρικού οξέος, πραγματοποιήσαμε εκ νέου τη λειτουργική ανάλυση του μεταφορέα PsyXUacT ο οποίος, σύμφωνα με προηγούμενα δεδομένα από μελέτη του εργαστηρίου μας (Παπακώστας Κ., Διδακτορική Διατριβή, 2011), είναι διπλής εξειδίκευσης και μεταφέρει και τα δύο υποστρώματα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι ο PsyXUacT μπορεί να μεταφέρει ξανθίνη αλλά όχι ουρικό οξύ όπως είχαν δείξει τα προηγούμενα αποτελέσματα της λειτουργικής του ανάλυσης. Ωστόσο, δείξαμε ότι, πράγματι, ο μεταφορέας PsyXUacT, σε αντίθεση με τον πρόγονό του ApcX1, μπορεί να αναγνωρίσει το ουρικό οξύ ως υπόστρωμα, ενώ δεν έχει ευρεία εξειδίκευση όπως ο ApcX1 και φαίνεται να είναι ειδικός για ουρικό, ξανθίνη και υποξανθίνη. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων προχωρήσαμε σε σύγκριση της αλληλουχίας του τόσο με τον ApcX1 όσο και με τον ApcXanQ, που επίσης παρουσιάζει ευρύτερη εξειδίκευση (Tatsaki et al., 2021), ώστε να διερευνήσουμε τις πιθανώς υπεύθυνες αλλαγές. Και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές εντοπίζονται στις θέσεις 27 και 312. Στην περίπτωση του PsyXUacT έχουμε αλλαγή των Ser/Ala27 σε Tyr και Thr/Ala312 σε Pro (δηλαδή, πιο ογκώδες, αρωματικό κατάλοιπο και κατάλοιπο που εισάγει κάμψη, αντίστοιχα). Οι αλλαγές αυτές θα μπορούσαν να οδηγούν στον περιορισμό της εξειδίκευσης κάτι που πιθανώς αξίζει να μελετηθεί μελλοντικά μέσω μεταλλαξιγένεσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alguel, Y., Amillis, S., Leung, J., Lambrinidis, G., Capaldi, S., Scull, N. J., Craven, G., Iwata, S., Armstrong, A., Mikros, E., Diallinas, G., Cameron, A. D., & Byrne, B. (2016). Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nature Communications*, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms11336>
- Andersen, P. S., Frees, D., Fast, R., & Mygind, B. (1995). Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *Journal of bacteriology*, *177*(8), 2008–2013. <https://doi.org/10.1128/jb.177.8.2008-2013.1995>
- Botou, M., Lazou, P., Papakostas, K., Lambrinidis, G., Evangelidis, T., Mikros, E., & Frillingos, S. (2018). Insight on specificity of uracil permeases of the NAT/NCS2 family from analysis of the transporter encoded in the pyrimidine utilization operon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *108*(2), 204–219. <https://doi.org/10.1111/mmi.13931>
- Botou, M., Yalelis, V., Lazou, P., Zantza, I., Papakostas, K., Charalambous, V., Mikros, E., Flemetakis, E., & Frillingos, S. (2020). Specificity profile of NAT/NCS2 purine transporters in *Sinorhizobium* (Ensifer) *meliloti*. *Molecular Microbiology*, *114*(1), 151–171. <https://doi.org/10.1111/mmi.14503>
- Boucher, J. I., Jacobowitz, J. R., Beckett, B. C., Classen, S., & Theobald, D. L. (2014). An atomic-resolution view of neofunctionalization in the evolution of apicomplexan lactate dehydrogenases. *ELife*, *3*, 1–25. <https://doi.org/10.7554/elife.02304>
- Bürzle, M., Suzuki, Y., Ackermann, D., Miyazaki, H., Maeda, N., Cléménçon, B., Burrier, R., & Hediger, M. A. (2013). The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Molecular aspects of medicine*, *34*(2-3), 436–454. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.002>
- Carletti, M. S., Monzon, A. M., Garcia-rios, E., Benitez, G., Hirsh, L., Fornasari, M. S., Parisi, G., Colombo, V. G., & Ingeniería, D. De. (2020). *Revenant : a database of resurrected proteins*. *Figure 1*, 1–7. <https://doi.org/10.1093/database/baaa031>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(15), 4672–4676. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.15.4672>
- Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., & Drevet, C. (2004). The AzgA Purine Transporter of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(5), 3132–3141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308826200>
- Chaliotis, A., Vlastaridis, P., Ntountoumi, C., Botou, M., Yalelis, V., Lazou, P., Tatsaki, E., Mossialos, D., Frillingos, S., & Amoutzias, G. D. (2018). NAT/NCS2-hound: a webserver for the detection and evolutionary classification of prokaryotic and eukaryotic nucleobase-cation symporters of the NAT/NCS2 family. *GigaScience*, *7*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy133>
- Consler, G. T., Tsolas, O., & Kaback, H. R. (1991). Role of proline residues in the structure and function of a membrane transport protein. *Biochemical Education*, *23*(3), 172–173. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(95\)00069-F](https://doi.org/10.1016/0307-4412(95)00069-F)
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, *16*(22), 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>

- Dean, P., Sendra, K. M., Williams, T. A., Watson, A. K., Major, P., Nakjang, S., Kozhevnikova, E., Goldberg, A. V., Kunji, E. R. S., Hirt, R. P., & Embley, T. M. (2018). Transporter gene acquisition and innovation in the evolution of Microsporidia intracellular parasites. *Nature Communications*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03923-4>
- Diallinas, G. (2016). Dissection of Transporter Function: From Genetics to Structure. *Trends in Genetics*, *32*(9), 576–590. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.003>
- Diallinas, G., & Scazzocchio, C. (1989). A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. *Genetics*, *122*(2), 341–350. <https://doi.org/10.1093/genetics/122.2.341>
- Diallinas G. (2014). Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Frontiers in pharmacology*, *5*, 207. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00207>
- Diallinas, George. (2021). Transporter Specificity: A Tale of Loosened Elevator-Sliding. *Trends in Biochemical Sciences*, *46*(9), 708–717. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.03.007>
- Drew, D., & Boudker, O. (2016). Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annual Review of Biochemistry*, *85*, 543–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014520>
- Field, S. F., & Matz, M. V. (2010). Retracing evolution of red fluorescence in GFP-like proteins from faviina corals. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(2), 225–233. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp230>
- Frillingos, S. (2012). Insights to the evolution of nucleobase-ascorbate transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *3*(3), 250–272.
- Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E., & Frillingos, S. (2010). Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the YgfO xanthine permease ASN-325 binds and ALA-323 senses substrate. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(25), 19422–19433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120543>
- Girke, C., Daumann, M., Niopek-witz, S., & Möhlmann, T. (2014). *Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism*. *5*(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00443>
- Gournas, C., Papageorgiou, I., & Diallinas, G. (2008). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Molecular BioSystems*, *4*(5), 404–416. <https://doi.org/10.1039/b719777b>
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, *2*(4), 924–932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
- Hochberg, G. K. A., & Thornton, J. W. (2017). Reconstructing Ancient Proteins to Understand the Causes of Structure and Function. *Annu Rev Biophys.*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033631>.Reconstructing
- Kaback, H. R. (2015). A chemiosmotic mechanism of symport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(5), 1259–1264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419325112>
- Karatza, P., & Frillingos, S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial

- members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Molecular Membrane Biology*, 22(3), 251–261. <https://doi.org/10.1080/09687860500092927>
- Karena, E., & Frillingos, S. (2009). Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease. HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24257–24268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030734>
- Karena, E., & Frillingos, S. (2011). The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 39595–39605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299164>
- Karena, E., Tatsaki, E., Lambrinidis, G., Mikros, E., & Frillingos, S. (2015). Analysis of conserved NCS2 motifs in the *Escherichia coli* xanthine permease XanQ. *Molecular Microbiology*, 98(3), 502–517. <https://doi.org/10.1111/mmi.13138>
- Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Deng, D., Dang, S., Zhang, X., Wang, J., & Yan, N. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, 472(7342), 243–247. <https://doi.org/10.1038/nature09885>
- Mermelekas, G., Georgopoulou, E., Kallis, A., Botou, M., Vlantos, V., & Frillingos, S. (2010). Cysteine-scanning analysis of helices TM8, TM9a, and TM9b and intervening loops in the YgfO xanthine permease: A carboxyl group is essential at ASP-276. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 35011–35020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.170415>
- Ortlund, E. A., Bridgham, J. T., Redinbo, M. R., & Thornton, J. W. (2007). Crystal structure of an ancient protein: Evolution by conformational epistasis. *Science*, 317(5844), 1544–1548. <https://doi.org/10.1126/science.1142819>
- Papakostas, K., Botou, M., & Frillingos, S. (2013). Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 36827–36840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523340>
- Papakostas, K., & Frillingos, S. (2012). Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15684–15695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355818>
- Reddy, K.D., Rasool, B., Akher, F.B., Kutlesic, N., Pant, S., & Boudker, O. (2024). Uncoupled substrate binding underlies the evolutionary switch between Na⁺ and H⁺-coupled prokaryotic aspartate transporters. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.12.03.569786>
- Sahin-Tóth, M., Frillingos, S., Lengeler, J. W., & Kaback, H. R. (1995). Active transport by the CscB permease in *Escherichia coli* K-12. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 208, Issue 3, pp. 1116–1123). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1449>
- Saier, M. H., Reddy, V. S., Moreno-Hagelsieb, G., Hendargo, K. J., Zhang, Y., Iddamsetty, V., Lam, K. J. K., Tian, N., Russum, S., & Medrano-Soto, J. W. and A. (2021). *The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 update*. 49(November 2020), 461–467. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1004>
- Savory, F. R., Milner, D. S., Miles, D. C., & Richards, T. A. (2018). Ancestral function and diversification of a horizontally acquired oomycete carboxylic acid transporter. *Molecular Biology and Evolution*, 35(8), 1887–1900.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msy082>

- Siddiq, M. A., Hochberg, G. K. A., & Thornton, J. W. (2017). Evolution of protein specificity: insights from ancestral protein reconstruction. *Current Opinion in Structural Biology*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.07.003>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tatsaki, E., Anagnostopoulou, E., Zantza, I., Lazou, P., Mikros, E., & Frillingos, S. (2021). Identification of New Specificity Determinants in Bacterial Purine Nucleobase Transporters based on an Ancestral Sequence Reconstruction Approach. *Journal of Molecular Biology*, 433(24), 167329. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167329>
- Thornton, J. W. (2004). Resurrecting ancient genes: Experimental analysis of extinct molecules. *Nature Reviews Genetics*, 5(5), 366–375. <https://doi.org/10.1038/nrg1324>
- Wang, M., He, J., Li, S., Cai, Q., Zhang, K., & She, J. (2023). Structural basis of vitamin C recognition and transport by mammalian SVCT1 transporter. *Nature Communications*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37037-3>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., Beer, T. A. P. De, Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL : homology modelling of protein. 46(May), 296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wheeler, L. C., Lim, S. A., Marqusee, S., & Harms, M. J. (2016). The thermostability and specificity of ancient proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.05.015>
- Wilson, C., Agafonov, R. V., Hoemberger, M., Kutter, S., Zorba, A., Halpin, J., Buosi, V., Otten, R., Waterman, D., Theobald, D. L., & Kern, D. (2015). Using ancient protein kinases to unravel a modern cancer drug's mechanism. *Science*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1823.Using>
- Wong, F. H., Chen, J. S., Reddy, V., Day, J. L., Shlykov, M. A., Wakabayashi, S. T., & Saier, M. H. (2012). The amino acid-polyamine-organocation superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 105–113. <https://doi.org/10.1159/000338542>
- Yan, N. (2017). A Glimpse of Membrane Transport through Structures—Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *Journal of Molecular Biology*, 429(17), 2710–2725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.07.009>
- Yokoyama, S., & Bernhard, F. (2001). The molecular genetics and evolution of red and green color vision in vertebrates. *Genetics*, 158(4), 1697–1710. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.4.1697>
- Young, J. D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: A 30-year collaborative odyssey. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 869–876. <https://doi.org/10.1042/BST20160038>
- Yu, X., Yang, G., Yan, C., Baylon, J. L., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Hasegawa, K., Okumura, H., Wang, T., Tajkhorshid, E., Li, S., & Yan, N. (2017). Dimeric structure of the uracil:proton symporter UraA provides mechanistic insights into the SLC4/23/26 transporters. *Cell Research*, 27(8), 1020–1033. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.83>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αλληλουχία του προγονικού μεταφορέα AncR1 του υποκλάδου R1 του κλάδου ουρακίλης/θυμίνης

AncR1

ATG	GCT	GAT	TCT	TGG	TTT	CCT	AAA	TGG	CGG	CTC	AAA	AGC	GGT	42
M	A	D	S	W	F	P	K	W	R	L	K	S	G	14
AAC	GTG	GAT	GGT	GCT	GTG	GTA	GCT	CCG	GAT	GAA	CGC	CTG	CCT	84
N	V	D	G	A	V	V	A	P	D	E	R	L	P	28
TTA	GGT	CAG	ACC	GTT	GTA	ATG	GGC	GTT	CAG	CAT	GCA	GTG	GCC	126
L	G	Q	T	V	V	M	G	V	Q	H	A	V	A	42
ATG	TTT	GGT	GCG	ACC	GTG	TTA	GCC	CCT	CTT	CTG	ATG	GGC	TTT	168
M	F	G	A	T	V	L	A	P	L	L	M	G	F	56
GAT	CCT	AAC	CTT	GCC	ATT	CTC	ATG	TCA	GGC	ATT	GGC	ACC	CTC	210
D	P	N	L	A	I	L	M	S	G	I	G	T	L	70
CTG	TTT	TTC	TTA	ATT	GTC	GGC	GGA	CGG	GTC	CCT	TCA	TAT	CTT	252
L	F	F	L	I	V	G	G	R	V	P	S	Y	L	84
GGC	TCG	TCA	TTT	GCG	TTT	ATT	GGC	GTC	GTT	ATC	GCA	GTC	ACG	294
G	S	S	F	A	F	I	G	V	V	I	A	V	T	98
GGC	TAT	GCG	GGC	AGC	GGC	GCA	AAC	CCT	AAC	ATT	GGC	GTA	GCA	336
G	Y	A	G	S	G	A	N	P	N	I	G	V	A	112
CTG	GGA	GGT	ATT	ATC	GCG	TGC	GGC	GTC	GTT	TAT	GCA	CTG	ATT	378
L	G	G	I	I	A	C	G	V	V	Y	A	L	I	126
GGC	TTT	ATT	GTC	ATG	GCA	GTC	GGA	ACG	CGG	TGG	ATC	GAA	CGG	420
G	F	I	V	M	A	V	G	T	R	W	I	E	R	140
CTC	ATG	CCC	CCT	GTT	GTC	ACG	GGT	GCA	ATC	GTG	ATG	GTC	ATC	462
L	M	P	P	V	V	T	G	A	I	V	M	V	I	154
GGC	CTG	AAC	CTG	GCA	CCT	ATT	GCA	GTC	AAA	GGC	GTC	AGC	GGC	504
G	L	N	L	A	P	I	A	V	K	G	V	S	G	168
AGC	AAC	TTT	GAT	AGC	TGG	ATG	GCC	CTG	ATG	ACG	GTC	CTG	TGC	546
S	N	F	D	S	W	M	A	L	M	T	V	L	C	182
ATC	GGC	TTA	GTT	GCC	GTT	TTT	ACT	CGC	GGA	ATG	ATG	CAG	CGC	588
I	G	L	V	A	V	F	T	R	G	M	M	Q	R	196
TTA	TTG	ATC	CTG	GTT	GGC	CTC	ATC	GTT	GCC	TAC	TTG	ATC	TAT	630

L	L	I	L	V	G	L	I	V	A	Y	L	I	Y	210
GCC	ATC	CTA	ACG	AAC	GGG	CTA	GGC	TTA	GGC	AAA	CCG	ATC	GAT	672
A	I	L	T	N	G	L	G	L	G	K	P	I	D	224
TTC	AGC	CCG	GTG	GCC	CAG	GCC	GCA	TGG	TTC	GGC	CTG	CCG	ACG	714
F	S	P	V	A	Q	A	A	W	F	G	L	P	T	238
TTT	ACC	CAT	CCG	GTG	TTC	GAT	GCC	CAT	GCA	ATG	TTA	TTG	ATC	756
F	T	H	P	V	F	D	A	H	A	M	L	L	I	252
GCA	CCG	GTG	GCC	ATT	ATC	CTG	GTG	GCA	GAA	AAT	CTG	GGC	CAT	798
A	P	V	A	I	I	L	V	A	E	N	L	G	H	266
ATC	AAA	GCC	GTC	GGC	GCA	ATG	ACC	GGT	CGC	AAT	CTC	GAT	CCC	840
I	K	A	V	G	A	M	T	G	R	N	L	D	P	280
TAT	ATG	GGT	CGG	GCA	TTT	ATT	GCA	GAT	GGG	CTG	GCC	ACC	ATG	882
Y	M	G	R	A	F	I	A	D	G	L	A	T	M	294
CTG	TCT	GGC	TCA	GTT	GGC	GGC	ACC	GGC	ATG	ACC	ACG	TAC	GCT	924
L	S	G	S	V	G	G	T	G	M	T	T	Y	A	308
GAA	AAT	ATC	GGT	GTT	ATG	GCG	GTT	ACC	AAA	GTT	TAC	TCA	ACG	966
E	N	I	G	V	M	A	V	T	K	V	Y	S	T	322
TTA	GTT	TTT	GTT	GTC	GCA	GCT	GTT	ATT	GCG	ATT	TTA	CTC	GGC	1008
L	V	F	V	V	A	A	V	I	A	I	L	L	G	336
TTT	TCG	CCC	AAA	TTT	GGC	GCG	TTA	ATC	CAT	ACC	ATT	CCC	GGT	1050
F	S	P	K	F	G	A	L	I	H	T	I	P	G	350
CCC	GTA	TTA	GGA	GGC	GCA	TCT	ATT	GTT	GTA	TTC	GGT	CTG	ATT	1092
P	V	L	G	G	A	S	I	V	V	F	G	L	I	364
GCA	GTT	GCT	GGC	GCA	CGC	ATC	TGG	GTA	GAA	AAC	AAA	GTT	GAT	1134
A	V	A	G	A	R	I	W	V	E	N	K	V	D	378
TTT	TCT	GAT	AAT	CGC	AAT	CTT	ATC	GTC	GTA	GCC	GTC	ACA	TTA	1176
F	S	D	N	R	N	L	I	V	V	A	V	T	L	392
GTC	CTT	GGT	GCC	GGG	AAC	TTT	ACA	CTT	AAA	ATC	GGG	GGT	TTT	1218
V	L	G	A	G	N	F	T	L	K	I	G	G	F	406
ACA	CTT	GGA	GGC	ATT	GGG	ACT	GCT	ACT	TTT	GGC	GCT	ATT	ATC	1260
T	L	G	G	I	G	T	A	T	F	G	A	I	I	420
TTA	AAC	GCG	CTG	TTC	TCT	CGC	CGT	AAA	CAA	GCT	CAA	CCT	ACT	1302
L	N	A	L	F	S	R	R	K	Q	A	Q	P	T	434
CCT					AAT					GTG				TAA
1311														
P								N						V
(437)														

Αλληλουχία του προγονικού μεταφορέα AncX1 του υποκλάδου X1 του κλάδου ξανθίνης/ουρικού οξέος

AncX1

ATG	AAC	GAT	CCT	CAG	CAT	GAG	CAT	TCT	GAC	CTT	GTG	TAT	GGT	42
M	N	D	P	Q	H	E	H	S	D	L	V	Y	G	14
CTG	GAT	GAT	CGC	CCT	CCC	TTT	CTC	CAG	TCT	TTT	TTC	GCA	GCC	84
L	D	D	R	P	P	F	L	Q	S	F	F	A	A	28
TTG	CAG	CAT	CTG	TTG	GCA	ATG	TTC	GTT	GGC	ATC	ATT	ACC	CCT	126
L	Q	H	L	L	A	M	F	V	G	I	I	T	P	42
CCT	TTA	ATC	ATT	GGT	GGT	GCC	TTA	GGT	CTT	CCG	GCA	GAA	CAT	168
P	L	I	I	G	G	A	L	G	L	P	A	E	H	56
ACT	ACC	TAT	CTT	GTT	TCT	ATG	GCG	CTC	TTC	GTC	TCT	GGT	ATT	210
T	T	Y	L	V	S	M	A	L	F	V	S	G	I	70
GCG	ACC	TTT	ATT	CAA	TGT	CGT	CGC	TTT	GGC	CCT	GTC	GGT	TCT	252
A	T	F	I	Q	C	R	R	F	G	P	V	G	S	84
GGC	CTA	CTC	TCA	GTC	CAG	GGC	ACG	TCA	TTT	GCA	TTT	CTC	GGC	294
G	L	L	S	V	Q	G	T	S	F	A	F	L	G	98
GCA	ATC	ATT	GCG	GCA	GGC	TTC	GCG	ATG	AAA	GCA	GGC	GGT	ATG	336
A	I	I	A	A	G	F	A	M	K	A	G	G	M	112
AGC	CCT	GAG	GAT	ATG	ATG	GCA	ACG	ATC	TTC	GGC	GTC	TGT	TTC	378
S	P	E	D	M	M	A	T	I	F	G	V	C	F	126
GTT	GGC	GCA	TTT	GTT	GAG	ATC	TTC	TTG	TCA	CGC	TTC	TTG	CCC	420
V	G	A	F	V	E	I	F	L	S	R	F	L	P	140
TAT	CTC	AAA	CGG	ATC	ATT	ACG	CCT	TTG	GTC	ACG	GGT	ATC	GTG	462
Y	L	K	R	I	I	T	P	L	V	T	G	I	V	154
GTA	ATG	TTG	ATC	GGC	TTA	AGC	CTG	ATT	AAA	GTC	GGC	ATG	ACG	504
V	M	L	I	G	L	S	L	I	K	V	G	M	T	168
GAT	TTT	GCA	GGA	GGA	TAT	GCA	GCC	AAA	CCC	GAT	GGT	ACG	TTC	546
D	F	A	G	G	Y	A	A	K	P	D	G	T	F	182
GGC	AGC	ATG	GAA	AAC	CTC	CTA	TTA	GGA	GGT	TTG	GTT	TTA	GTG	588
G	S	M	E	N	L	L	L	G	G	L	V	L	V	196
ATC	ATT	GTG	CTA	TTG	AAC	CGC	AGC	CGC	AAC	CCG	TGG	CTA	CGC	630
I	I	V	L	L	N	R	S	R	N	P	W	L	R	210
ATG	AGC	GCC	ATC	ATC	ATT	GGG	ATG	GCC	GTG	GGC	TAT	TTA	GTG	672

M	S	A	I	I	I	G	M	A	V	G	Y	L	V	224
GCC	TTA	TTC	ATG	GGC	ATG	GTG	GAT	TTC	AGC	CCT	CTG	CAG	GAT	714
A	L	F	M	G	M	V	D	F	S	P	L	Q	D	238
TTG	CCG	TTA	TTC	ACC	ATC	CCG	GTG	CCG	TTC	AAA	TTC	GGC	TTT	756
L	P	L	F	T	I	P	V	P	F	K	F	G	F	252
TCC	TTT	GAT	TGG	CAG	GCC	TTC	ATT	CCA	ATC	GCC	CTG	ATT	TAT	798
S	F	D	W	Q	A	F	I	P	I	A	L	I	Y	266
CTG	GTG	ACC	GCC	ATC	GAA	GCA	ACC	GGC	GAT	TTA	ACC	GCC	ACG	840
L	V	T	A	I	E	A	T	G	D	L	T	A	T	280
TCC	ATG	ATT	TCC	GAT	CAG	CCC	ATT	GAA	GGG	CCA	GTC	TAT	ATG	882
S	M	I	S	D	Q	P	I	E	G	P	V	Y	M	294
AAA	CGG	ATC	AAA	GGC	GGA	GTG	CTG	GCA	GAT	GGT	GTC	AAT	TCT	924
K	R	I	K	G	G	V	L	A	D	G	V	N	S	308
ATG	TTA	GCC	GCT	GTC	TTC	AAT	ACC	TTC	CCA	AAT	ACC	ACG	TTT	966
M	L	A	A	V	F	N	T	F	P	N	T	T	F	322
AGC	CAA	AAT	AAT	GGG	GTT	ATT	CAG	ATG	ACT	GGC	GTC	GCT	TCA	1008
S	Q	N	N	G	V	I	Q	M	T	G	V	A	S	336
CGT	CAT	GTC	GGG	TTT	TTC	ATC	GCG	GCA	ATG	CTG	GTT	TTA	CTC	1050
R	H	V	G	F	F	I	A	A	M	L	V	L	L	350
GGC	TTA	TTT	CCG	GTA	ATC	GGC	GCA	ATC	TTC	CAA	CAA	ATT	CCC	1092
G	L	F	P	V	I	G	A	I	F	Q	Q	I	P	364
AAA	CCA	GTT	CTG	GGA	GGC	GCA	ACT	TTG	GTA	ATG	TTT	GGT	ATG	1134
K	P	V	L	G	G	A	T	L	V	M	F	G	M	378
ATT	GCC	GCT	GCA	GGG	ATT	CGC	ATC	CTC	GCA	TCT	GAA	GAA	TTA	1176
I	A	A	A	G	I	R	I	L	A	S	E	E	L	392
GAT	CGC	CGT	AAC	ATC	CTT	ATC	ATT	GCC	GTC	TCT	TTA	GGT	ATG	1218
D	R	R	N	I	L	I	I	A	V	S	L	G	M	406
GGG	CTT	GGC	GTC	GCC	TTA	GTT	CCC	GAA	GTC	TTA	CAA	CAA	ATG	1260
G	L	G	V	A	L	V	P	E	V	L	Q	Q	M	420
CCA	GAA	ATG	TTA	CAA	AAC	ATC	TTC	GGC	TCT	CCT	ATT	ACT	GCT	1302
P	E	M	L	Q	N	I	F	G	S	P	I	T	A	434
GGC	GGG	ATT	ACT	GCG	ATT	ATC	TTA	AAT	CTG	TTA	CTC	CCT	GAA	1344
G	G	I	T	A	I	I	L	N	L	L	L	P	E	448
GAA	AAG	CCC	AAA	AAA	GCC	GCT	GAA	GAA	GAA	CAA	AAA	GTC	GAA	1386
E	K	P	K	K	A	A	E	E	E	Q	K	V	E	462
GAA	GTC	ACT	AAA	TGG		AAA		AAA		CAA		AAA	CAG	TAA
E	V	T.	K	W		K		K		Q		K	Q	
1416														