

# ΜΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΚΥΤΟΣΙΝΗΣ-ΠΟΥΡΙΝΩΝ FcyB

Κρυπτού Α.<sup>1</sup>, Κωστή Β.<sup>1</sup>, Μυριανθόπουλος Β.<sup>2</sup>, Μικρός Ε.<sup>2</sup>, Αμίλλης Σ.<sup>1</sup>, Διαλλινάς Γ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

<sup>2</sup> Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

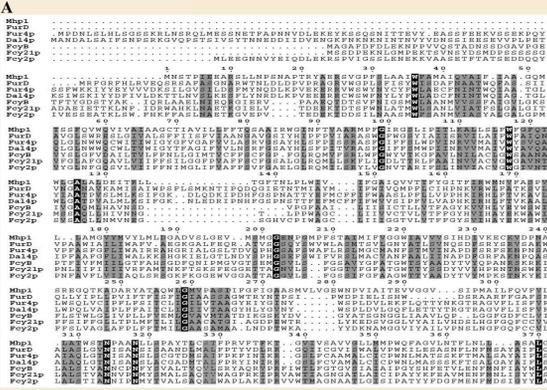
## Εισαγωγή:

Η οικογένεια Nucleotide Cation Symporters-1 (NCS1) περιέχει μεταφορείς από βακτήρια και μύκητες εξειδικευμένους στην πρόσληψη πουρινών και πυριμιδινών, αλλά και δομικά όμοιοι μεταβολιτών (π.χ. αλλαντοΐνη, υδατοΐνη, πυριδοξίνη, θειαμίνη)<sup>1</sup>. Ο μεταφορέας FcyB του *Aspergillus nidulans* έχει χαρακτηριστεί σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο και έχει προσδιοριστεί το κινητικό του προφίλ ως προς τη συγγένεια δέσμευσης ( $K_m$ ), την ταχύτητα μεταφοράς (V) και την εξειδίκευση για τα διάφορα υποστρώματα<sup>2</sup>. Βρέθηκε ότι μεταφέρει με υψηλή συγγένεια κυτοσίνη, αδενίνη, υποξανθίνη, γουανίνη και με μέτρια συγγένεια το τοξικό ανάλογο 5-φθοροκυτοσίνη, το οποίο χρησιμοποιείται ως αντιμυκητιασικό.

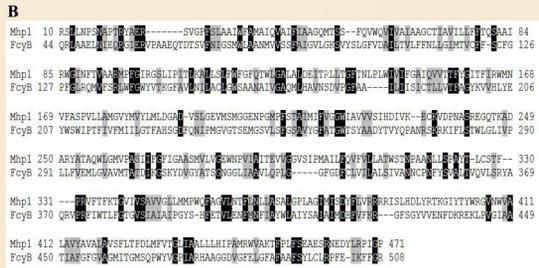
Στην παρούσα εργασία στηρίζομεν στην ομολογία του FcyB με τον κρυσταλλογραφικά λυμένο μεταφορέα υδατοΐνης του *Microbacterium liquefaciens*, Mhp1<sup>3</sup>, κατασκευάσαμε την τρισδιάστατη δομή του πρότυπου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του μεταφορέα και των υποστρωμάτων του μελετήθηκε μέσω υπολογισμών πρόσδεσης (docking). Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν ορθολογικά σχεδιασμένες αντικαταστάσεις συντηρημένων στην οικογένεια NCS1 αμινοξέων. Οι μεταλλαγμένες μορφές του FcyB χαρακτηρίστηκαν μέσω δοκιμασιών ανάπτυξης, αναλυτικών κινητικών μελετών και μικροσκοπικής ανάλυσης επιβιωσιμότητας. Οι δύο προσεγγίσεις, υπολογιστική και γενετική, μέχρι τώρα βρίσκονται σε συμφωνία επιβεβαιώνοντας την ορθότητα του θεωρητικού μοντέλου, αλλά και τη σημασία των επιλεγμένων αμινοξέων στην πρόσδεση ή/και τη μεταφορά των υποστρωμάτων.

## Μοντέλο ομολογίας του FcyB

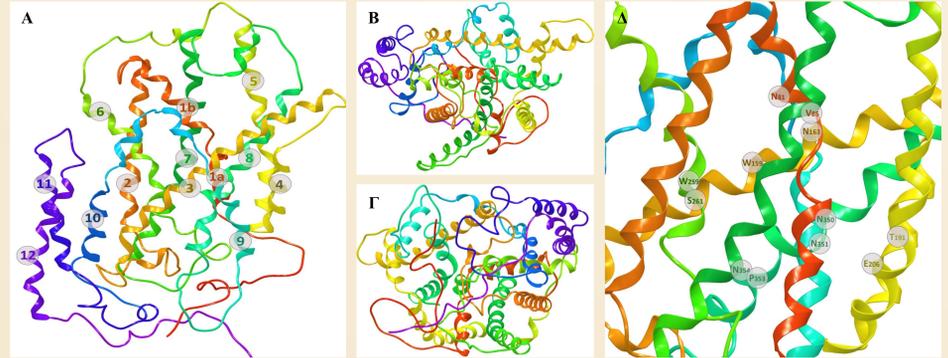
Στην οικογένεια NCS1 κατατάσσονται μεταφορείς που αναγνωρίζουν δομικά πολύ διαφορετικά υποστρώματα. Επομένως, η ομοιότητα των μεταφορέων αυτών σε πρωταρχία αμινοξική αλληλουχία αναμένεται να είναι μικρή. Από την παρατήρηση της πρωτοταγούς στοίχισης αντιπροσωπευτικών μεταφορέων της οικογένειας, η χαμηλή αυτή ταυτότητα επιβεβαιώνεται. Παρόλα αυτά, εντοπίζονται απολύτως συντηρημένα αμινοξέα στα οποία αποδίδεται η λειτουργία της πρόσδεσης του υποστρώματος και της δομικής σταθερότητας της πρωτεΐνης. Η συντήρηση των αμινοξέων αυτών φαίνεται στην Εικόνα 1Α.



Για την δημιουργία της τρισδιάστατης δομής του μοντέλου του FcyB χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Modeller 9v8. Ως πρότυπη δομή χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλογραφική δομή του πρόσφατα δημοσιευμένου μεταφορέα υδατοΐνης – Mhp1 (κωδικός PDB: 2JLO) και η στοίχιση που φαίνεται στην Εικόνα 1B.



**Εικόνα 1**  
Α. Πολλαπλή στοίχιση της πρωτοταγούς αλληλουχίας εκπροσώπων της οικογένειας μεταφορέων NCS1. Με κόκκινο επισημαίνονται τα ταυτόσημα αμινοξέα και με γκρι οι συντηρημένες αλλαγές.  
Β. Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας των μεταφορέων Mhp1 και FcyB, πάνω στην οποία στηρίχτηκε η κατασκευή του μοντέλου FcyB.

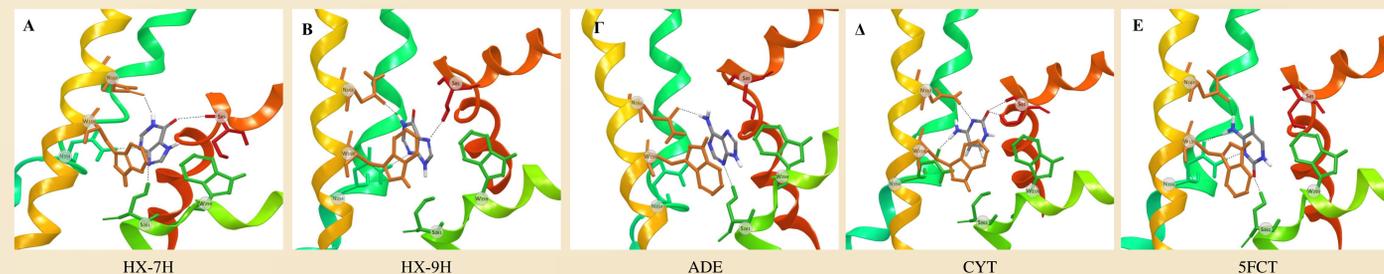


**Εικόνα 2** Μοντέλο ομολογίας του FcyB. Α. Πρόσθια όψη, Β. Άνω όψη, Γ. Κάτω όψη, Δ. Λεπτομέρεια του προβλεπόμενου κέντρου δέσμευσης.

Το αποτέλεσμα του μοντέλου ομολογίας φαίνεται στις Εικόνες 2Α-Γ. Η τρισδιάστατη απεικόνιση του FcyB περιλαμβάνει 12 TMSs με κυτταροπλασματικά N- και C- άκρα. Όπως και στον Mhp1, οι 10 έλικες είναι διατεταγμένες σε δύο αναστραμμένες επαναλήψεις (TMS1-TMS5 και TMS6-TMS10). Οι έλικες TMS11 και 12 διαχωρίζονται δομικά, αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος παραμένει ασαφής. Έχει προταθεί ότι οι έλικες αυτές πιθανά σχετίζονται με διμερισμό. Οι έλικες TMS1, 3, 6 και 8 σχηματίζουν δύο δομές σχήματος V περιπλεγμένες μεταξύ τους, όπου εντοπίζεται το κέντρο δέσμευσης υποστρωμάτων. Οι έλικες 1 και 6 διακρίνονται σε α και β με μικρό ενδιάμεσο μεταξύ τους. Σύμφωνα με τον Mhp1, στον FcyB τα σημαντικά για την λειτουργία αμινοξέα είναι τα W159, N163, W259, S261 και N354 που εντοπίζονται στα TMS3, 6 και 8 αντίστοιχα, με προσανατολισμό των πλευρικών αλυσίδων προς το προβλεπόμενο κέντρο πρόσδεσης του υποστρώματος.

## Μοντέλο αλληλεπίδρασης του FcyB με τα υποστρώματα του - Υπολογισμοί Πρόσδεσης (docking calculations)

Έχοντας δημιουργήσει το μοντέλο του FcyB έγιναν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking calculations) ώστε να διερευνηθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης των υποστρωμάτων του (υποξανθίνη, αδενίνη, κυτοσίνη και το τοξικό ανάλογο 5-φθοροκυτοσίνη) με αμινοξικά κατάλοιπα του κέντρου δέσμευσης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε δύο μεθόδους υπολογισμού πρόσδεσης. Στην πρώτη, ο μεταφορέας αναπαρίσταται ως ένα τρισδιάστατο πλέγμα (grid), κάτι που συνεπάγεται την άκαμτη απεικόνιση του. Εντός του πλέγματος, και πιο συγκεκριμένα εντός της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος, πραγματοποιείται δειγματοληψία για την εύρεση πιθανών θέσεων και προσανατολισμών των υπό μελέτη υποστρωμάτων. Στη συνέχεια το λογισμικό αποτιμά την ενέργεια αλληλεπίδρασης καθενός από τα μελετώμενα υποστρώματα με την πρωτεΐνη, προτείνοντας για καθένα τη βέλτιστη γεωμετρία και συγγένεια πρόσδεσης. Η δειγματοληψία της μεθόδου μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο προσομοίωσης της επαγόμενης προσαρμογής (induced fit), στον οποίο η ακαμψία της πρωτεΐνης αίρεται μερικώς μέσω της ελεύθερης περιστροφής των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, τα οποία βρίσκονται στην περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Η δεύτερη μέθοδος θεωρεί τον μεταφορέα πλήρως εύκαμπτο, υπολογίζοντας τη βέλτιστη θέση του προσδέματος στον μεταφορέα, αφού προηγηθεί μετακίνηση των πλευρικών αλυσίδων του ενεργού κέντρου, ώστε να λάβουν ευνοϊκότερες ενεργειακά διαμορφώσεις σε σχέση με το πρόδεμα (λογισμικό MacroModel-LMCS). Η πρώτη μέθοδος είναι γρήγορη και χρησιμοποιείται συνήθως για τη σάρωση ψηφιακών βιβλιοθηκών, ενώ η δεύτερη είναι πιο χρονοβόρος και χρησιμοποιείται για την μελέτη των διαμορφωτικών αλλαγών της πρωτεΐνης κατά τη σύνδεση ενός υποστρώματος. Στους υπολογισμούς ελήφθησαν υπόψη οι δύο ταυτομερείς μορφές της υποξανθίνης 7H και 9H.



**Εικόνα 3 Α-Ε.** Τρόπος δέσμευσης των υποστρωμάτων του FcyB στο ενεργό του κέντρο με βάση υπολογισμούς πρόσδεσης. Κάτω από κάθε εικόνα αναφέρεται το υποστρώμα που έχει χρησιμοποιηθεί στους υπολογισμούς.

Από τα αποτελέσματα των υπολογισμών πρόσδεσης παρατηρούμε τα εξής:

- Στον FcyB συμμετέχουν τα ίδια αμινοξέα για την πρόσδεση των υποστρωμάτων με αυτά που συμμετέχουν στον Mhp1 για την πρόσδεση της υδατοΐνης.
- Στο κέντρο δέσμευσης τα υποστρώματα εντοπίζονται ανάμεσα στα αμινοξικά κατάλοιπα W159 - W259 και συνδέονται με τα αμινοξέα S85, N163, S261 και N354.
- Η πρωτονίωση της υποξανθίνης αλλάζει τον τρόπο σύνδεσής της στο κέντρο δέσμευσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε pH 6.8 (πειραματικές συνθήκες) υπάρχει ισορροπία ταυτομερών της πρωτονιωμένης υποξανθίνης στις θέσεις 7 και 9 (HX-7H και HX-9H αντίστοιχα)<sup>4</sup>. Οι υπολογισμοί πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν και με τα δύο ταυτομερή, δίνοντας όμως διαφορετική γεωμετρία πρόσδεσης για το καθένα. Πιο συγκεκριμένα, για την HX-7H συμμετέχουν όλα τα παραπάνω αμινοξέα, ενώ για την HX-9H δε συμμετέχει το N354 (Εικόνα 3Α, Β).
- Στην δέσμευση της αδενίνης συμμετέχουν τα W159, N163, W259 και N354 (Εικόνα 3Γ).
- Η κυτοσίνη και το τοξικό ανάλογο 5-φθοροκυτοσίνη εμφανίζουν διαφορετικό τρόπο σύνδεσης με τον μεταφορέα. Συγκεκριμένα, στην πρόσδεση της κυτοσίνης συμμετέχουν τα S85, W159, N163, W259 και N354, ενώ στην περίπτωση της 5-φθοροκυτοσίνης τα W159, N163, W259, S261 και N354 (Εικόνα 3Δ, Ε).
- Τα προσδεμένα υποστρώματα προσανατολίζονται για έξοδο προς τις έλικες TMS4 – TMS5, όπως προτείνεται και για τον Mhp1 (Εικόνες 2Δ, 4Α, Β).

## Γενετική προσέγγιση της λειτουργίας του FcyB μέσω ορθολογικά σχεδιασμένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στο κέντρο πρόσδεσης υποστρωμάτων

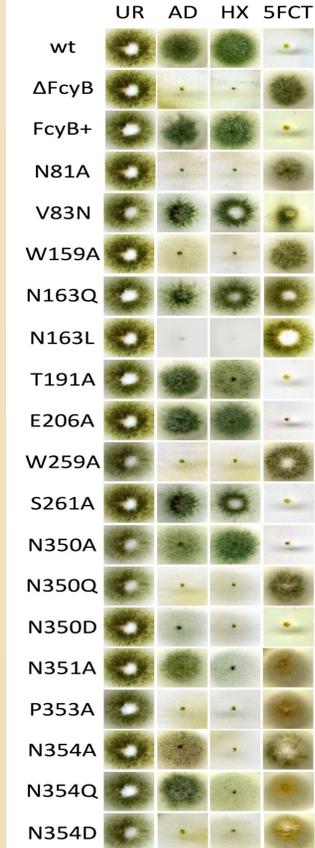
• Με βάση την αμινοξική στοίχιση μελών της οικογένειας NCS1, αλλά και με το μοντέλο του FcyB που κατασκευάστηκε, επιλέχθηκαν αμινοξέα που προβλέπονται να έχουν σημαντικό ρόλο έμμεσα ή άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος (N81, V83, W159, N163, T191, E206, W259, S261, N350, N351, P353, N354). Τα αμινοξέα αυτά αντικαταστάθηκαν με άλλα που είχαν είτε όμοιες, είτε τελείως διαφορετικές ιδιότητες.

• Μελετήθηκαν τα στελέχη που έφεραν τις μεταλλαγμένες μορφές του FcyB ως προς την ανάπτυξη τους σε θρεπτικά με μοναδική πηγή αζώτου πουρινών αλλά και την ανθεκτικότητα ως προς 5-φθοροκυτοσίνη. Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση για τη δέσμευση των υποστρωμάτων από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες σε σχέση με την πρωτεΐνη φυσικού τύπου, μέσω πειραμάτων πρόσδεσης ραδιοσημασμένης υποξανθίνης.

• Τα πειράματα αυτά μας υπέδειξαν τη σημασία του εκάστοτε αμινοξέος για τη μεταφορά ή/και την πρόσδεση κάθε υποστρώματος. Έτσι, εντοπίστηκαν απολύτως απαραίτητα για τη λειτουργία του μεταφορέα αμινοξέα (N81, W159, N163, W259, P353, N354), σημαντικά αμινοξέα για την εξειδίκευσή του (N350, N354) και σημαντικά για την ικανότητα πρόσδεσης των υποστρωμάτων (N163, N350, N351, N354, T191).

• Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν περιπτώσεις όπου οι αντικαταστάσεις που κάναμε δεν επέδρασαν στον τρόπο δέσμευσης όλων των υποστρωμάτων, π.χ. N350D και N354Q (Πίνακας 1, Εικόνα 5), υποδεικνύοντας τον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης κάθε υποστρώματος στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης του FcyB.

**Εικόνα 5** Δοκιμασίες ανάπτυξης των μεταλλαγμένων μορφών του FcyB σε θρεπτικά υποστρώματα με μοναδική πηγή αζώτου την αδενίνη (AD) και την υποξανθίνη (HX) και έλεγχος ανθεκτικότητας στο τοξικό ανάλογο 5-φθοροκυτοσίνη (5-FCT).



**Πίνακας 1** Κινητικό προφίλ των μεταλλαγμένων μορφών του FcyB. Με V συμβολίζεται η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της υποξανθίνης. Με  $K_m$  συμβολίζουμε τις σταθερές πρόσδεσης/συναγωνισμού. HX: υποξανθίνη, AD:αδενίνη, CY: κυτοσίνη, GU: γουανίνη, 5FC: 5-φθοροκυτοσίνη, n/m: not measurable.

\*Uptake capacity: ικανότητα πρόσληψης των υποστρωμάτων του μεταφορέα σε σχέση με την αρχική πρωτεΐνη (wt: wild type)  
\*\*Uptake specificity: εξειδίκευση του μεταφορέα ως προς τα υποστρώματα που μεταφέρει

	V % (HX)	HX		AD		GUA	CYT	5FC	Uptake capacity*	Uptake specificity**
		Growth at 500 μM	$K_m$ (μM)	Growth at 500 μM	$K_i$ (μM)	$K_i$ (μM)	$K_i$ (μM)	Growth (resistance)		
<b>FcyB</b>	100	+++	11	+++	7	17	20	-	Wt	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>N81A</b>	0	-	n/m	-	n/m	n/m	n/m	++	Loss	-
<b>V83N</b>	53	+++	16	+++	2	7	18	-	wt	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>W159A</b>	0	-	n/m	+/-	n/m	n/m	n/m	+++	Loss	-
<b>N163Q</b>	15	++	47	++	2	>500	73	+	Partial loss	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>N163L</b>	1	-	n/m	-	n/m	n/m	n/m	+++	loss	-
<b>T191A</b>	30	++	9	++	11	4	3	-	Partial loss	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>E206A</b>	150	+++	6	+++	7	10	14	-	wt	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>W259A</b>	0	-	n/m	-	n/m	n/m	n/m	+++	loss	-
<b>S261A</b>	33	++	4	++	6	50	17	-	Partial loss	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>N350Q</b>	0	-	n/m	-	n/m	n/m	n/m	++	loss	-
<b>N350D</b>	4	+/-	5	+	8	31	6	+/-	Specific loss	5FC
<b>N350A</b>	67	+++	6	+	>1000	25	5	-	Specific loss	Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>N351A</b>	4	+	3	++	1	4	16	+	Partial loss	Ad, Hx, Gua, Cyt, 5FC
<b>P353A</b>	0	-	n/m	-	n/m	n/m	n/m	++	loss	-
<b>N354A</b>	0	-	n/m	++	n/m	n/m	n/m	+++	Specific loss	Ad
<b>N354Q</b>	2	+/-	n/m	+++	n/m	n/m	n/m	++	Specific loss	Ad
<b>N354D</b>	6	+/-	3	+/-	1.4	>500	4	++	Specific loss	Ad, Hx, Cyt, 5FC

Βιβλιογραφία:  
1. Pantopoulos A. and Dallians G. (2007) Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol Rev* 31: 657-675.  
2. Weyand S., Shimamura T., Yajima S., Suzuki S., Mirza O., Knausong K., Carpenter E., Rutherford N., Hadden J., O'Reilly J., Ma P., Saidjani M., Paching S., Hope R., Norbertczak H., Peter C., Roach J., Iwata S., Henderson P. and Cameron D. (2008) Structure and Molecular Mechanism of a Nucleobase Cation Symporter 1 Family Transporter. *Science* 322:709-715.  
3. Viani A. and Dallians G. (2008) The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol Microbiol* 68: 959-977.  
4. Kuchonka E., Kuchonka B. and David Stuart (2004) X-ray structure, function and its nucleobase: solution structures of neutral and zwitterion forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *Acta Biochimica Polonica* 51: 493-531.