



Από γενετικά δεδομένα σε δομικά μοντέλα και αντίστροφα: Σχέσεις δομής-λειτουργίας του μεταφορέα πουρινών UraA

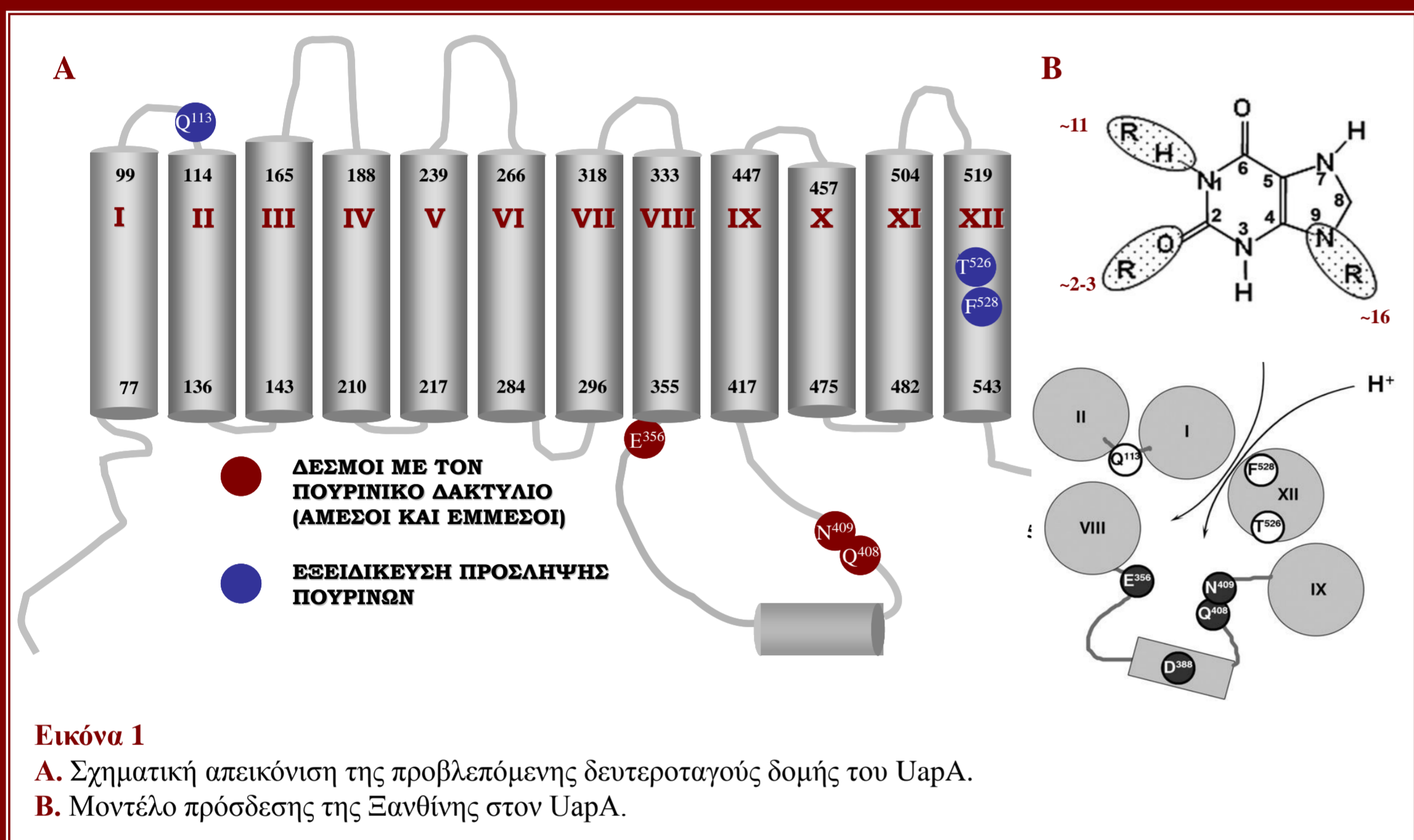
Κωστή Β. *, Λαμπρινίδης Γ. †, Μυριανθόπουλος Β. †, Διαλλινάς Γ. * & Μικρός Ε. †

* Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Αθήνα
† Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αθήνα

Εισαγωγή

Ο UraA ανήκει στην οικογένεια των NAT/NCS2 μεταφορέων (Nucleobase-Ascorbate Transporter). Είναι ένας υψηλής συγγένειας & μεταφορικής ικανότητας μεταφορέας ξανθίνης-ουρικού οξέος που λειτουργεί ως συμμεταφορέας πρωτονίων (H⁺) στον νηματοειδή ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*^{1,2}. Αρχικές προβλέψεις δευτεροταγούς δομής έδειξαν ότι ο UraA αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές α-έλικες με το αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1Α). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα αμινοξέα (E356, Q408, N409) στις διαμεμβρανικές περιοχές 8 και 9 (TMS8-9) αποτελούν στοιχεία του κέντρου πρόσδεσης & μεταφοράς πουρινών, ενώ άλλα στοιχεία, εκτός του πθάνου κέντρου δέσμευσης υποστρωμάτων (TMS1-2, TMS9, TMS10-11 & TMS12) συμμετέχουν στο μηχανισμό εξειδίκευσης για συγκεκριμένα υποστρώματα, υποδεικνύοντας για πρώτη φορά την ύπαρξη εκλεκτικών «θυρών» διαπερατότητας σε μεταφορείς^{3,4}. Εκτεταμένες κινητικές αναλύσεις σε μεταλλαγμένα στελέχη του UraA υποδεικνύουν ότι ο UraA δεσμεύει το υπόστρωμα από τις θέσεις N1 και N9 του πουρινικού δακτυλίου (Εικόνα 1B)^{5,6}. Η περιοχή TMS8-9 συμμετέχει στο μηχανισμό δέσμευσης από τη θέση 9⁶.

Στην παρούσα εργασία, στηριζόμενοι στην πρόσφατα δημοσιευμένη κρυσταλλογραφική δομή του βακτηριακού μεταφορέα ουρακίλης UraA και μέλους της οικογένειας NAT/NCS2⁷, χρησιμοποιήσαμε αλγόριθμους πρόβλεψης διαμόρφωσης πρωτεϊνών προκειμένου να κατασκευάσουμε την τρισδιάστατη δομή του UraA. Βασίζόμενοι στο μοντέλο αυτό πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς πρόσδεσης μοριακής μηχανικής με υπόστρωμα την ξανθίνη (docking calculations). Τέλος, μελετήθηκε ο μηχανισμός πρόσδεσης άλλων υποστρωμάτων και οι θεωρητικοί υπολογισμοί επιβεβαιώνουν τα πειραματικά μας αποτελέσματα.



Εικόνα 1
Α. Σχηματική απεικόνιση της προβλεπόμενης δευτεροταγούς δομής του UraA.
Β. Μοντέλο πρόσδεσης της Ξανθίνης στον UraA.

Αποτελέσματα

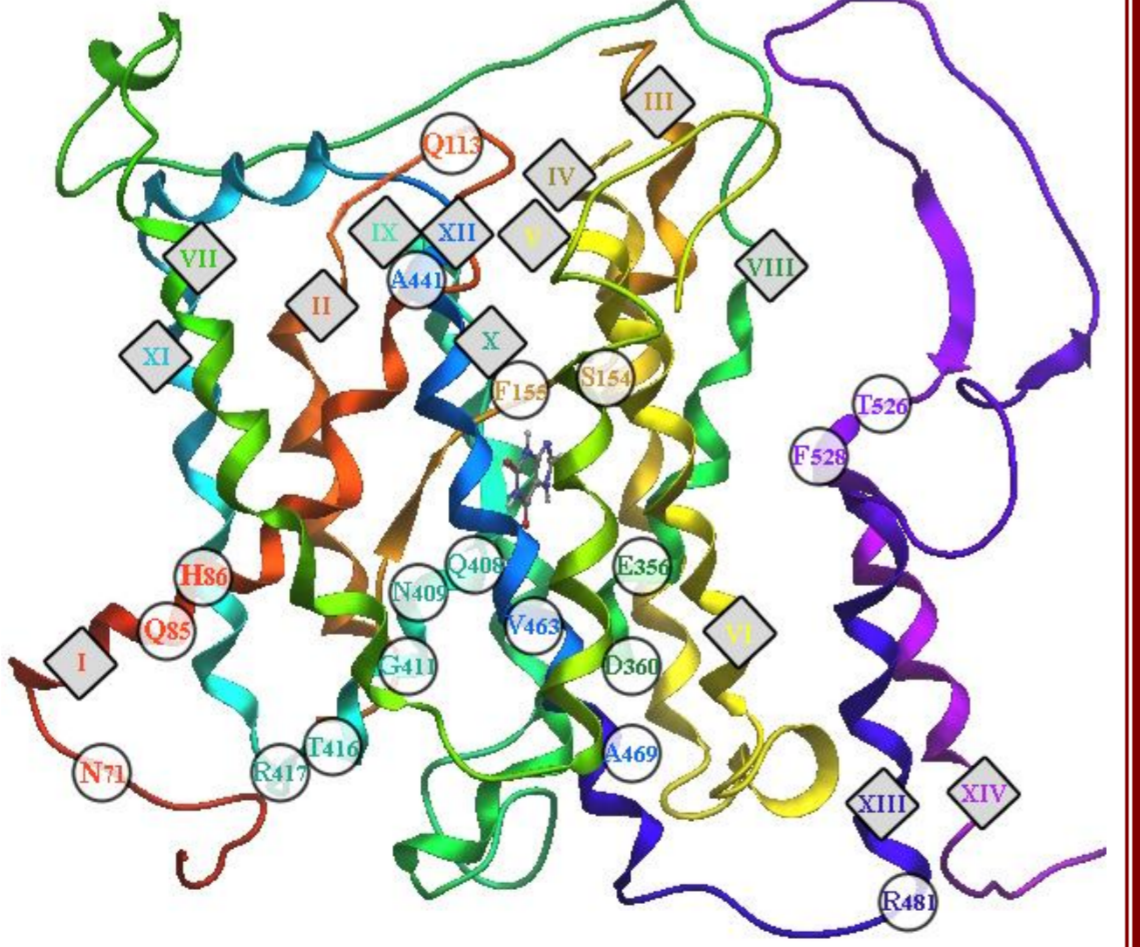
1. Μοντέλο ομολογίας του UraA

Για την δημιουργία της τρισδιάστατης δομής του μοντέλου του UraA χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Modeller 9v8. Ως πρότυπη δομή αξιοποιήσαμε την κρυσταλλογραφική δομή του πρόσφατα δημοσιευμένου μεταφορέα ουρακίλης - UraA (κωδικός PDB: 3QE7) και με τη στοίχιση που φαίνεται στην Εικόνα 2⁷.

Το αποτέλεσμα του μοντέλου ομολογίας φαίνεται στην Εικόνα 3. Η τρισδιάστατη απεικόνιση του UraA περιλαμβάνει 14 TMSs με κυτταροπλασματικά N- και C- άκρα. Όπως και στον UraA, οι 14 έλικες είναι διατεταγμένες σε δύο ανεστραμμένες και περιπελεγμένες επαναλήψεις (TMS1-TMS7 και TMS8-TMS14). Τα TMS1-TMS4 και TMS8-TMS11 σχηματίζουν μία κεντρική περιοχή (core domain), η οποία φιλοξενεί το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος.

Table with sequence alignment of UraA and UraA (3QE7) showing conserved residues and gaps. Residues are numbered from 327 to 498.

Εικόνα 2 Πρωτοταγής στοίχιση των πρωτεϊνών UraA (3QE7) και UraA. Με μαύρο επισημειώνονται τα ταυτόσημα αμινοξέα και με γκρι οι συντηρητικές αλλαγές.



Εικόνα 3 Μοντέλο ομολογίας του UraA.

Το κέντρο δέσμευσης σχηματίζεται από τις β-πτυχωτές επιφάνειες των TMS3 και 10 και από τα TMS1 και 8. Τα TMS5-7 και TMS12-14 σχηματίζουν μία περιοχή ελεγχόμενης εισόδου του υποστρώματος (gate domain). Τα σχηματικά για την λειτουργία αμινοξέα E356, Q408 & N409 εντοπίζονται στα TMS8 & TMS10 αντίστοιχα, με προσανατολισμό των πλευρικών αλυσίδων προς το αναμενόμενο κέντρο πρόσδεσης του υποστρώματος⁸. Αμινοξέα όπως τα G411, T416, R417, V463 και A469, τα οποία από προηγούμενες μελέτες έχει δείξει να επηρεάζουν την συγγένεια δέσμευσης του υποστρώματος. Επίσης η H86 η οποία έχει δείξει ότι επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης φαίνεται ότι βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με την N409, σε άμεση συνάρεια με το κέντρο πρόσδεσης.

2) Μοντέλο αλληλεπίδρασης UraA – Ξανθίνης στο κέντρο δέσμευσης

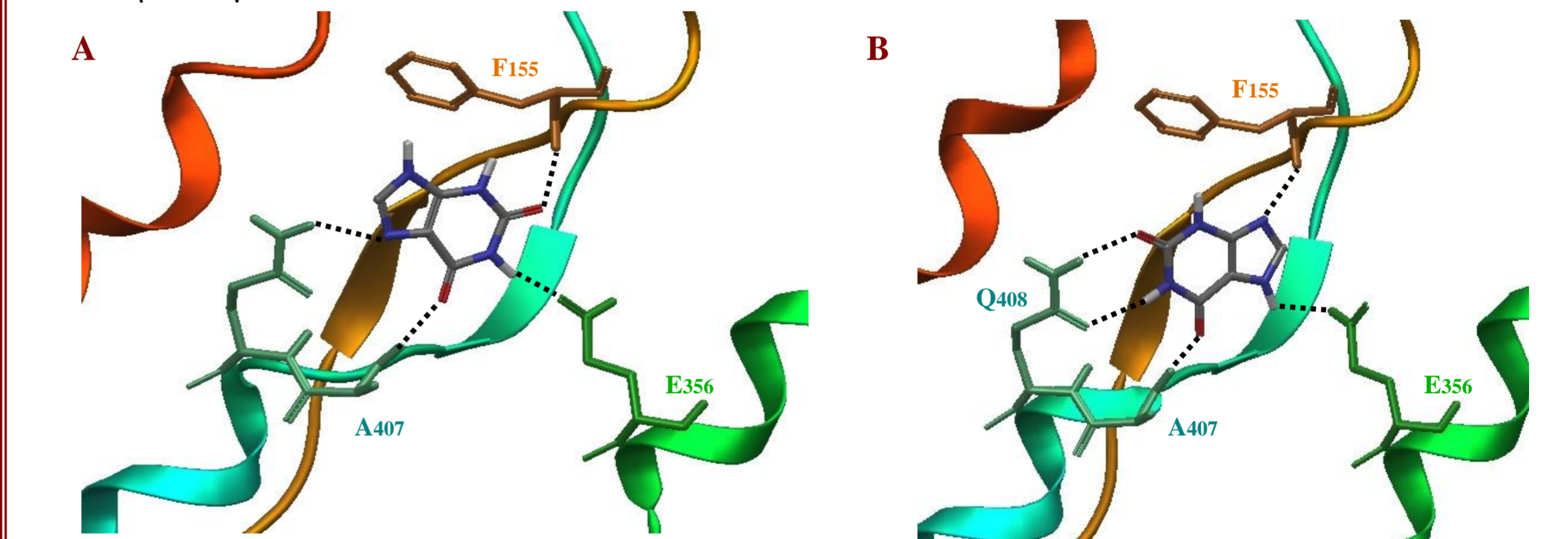
Υπολογισμοί Πρόσδεσης (docking calculations)

Έχοντας δημιουργήσει το μοντέλο του UraA έγιναν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking calculations) ώστε να διερευνηθεί ο τρόπος πρόσδεσης του μορίου της Ξανθίνης στο ενεργό κέντρο. Ως ενεργό κέντρο ορίσαμε την περιοχή που σχηματίζεται ανάμεσα στα αμινοξέα F155, A407, Q408 και E356.

Χρησιμοποιήσαμε δύο μεθόδους υπολογισμού πρόσδεσης. Η πρώτη θεωρεί τον υποδοχέα ως ακίνητο σύνολο σημείων (rigid docking) και βρίσκει τη χαμηλότερη ενεργειακή θέση του προσδέματος σε σχέση με τον υποδοχέα. (Λογισμικό Glide). Η δεύτερη μέθοδος θεωρεί τον υποδοχέα ευκίνητο, οπότε υπολογίζει τη βέλτιστη θέση του προσδέματος στον υποδοχέα, 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 αλλαγών σε μια πρωτεΐνη κατά τη σύνδεση ενός υποστρώματος. Στους υπολογισμούς ελήφθησαν υπόψη οι δύο ταυτομερείς μορφές της Ξανθίνης 7H και 9H.

i) Δύο πιθανοί τρόποι σύνδεσης

Οι υπολογισμοί πρόσδεσης σταθερής δομής πρωτεΐνης (rigid docking) έδωσαν ως ενεργειακά χαμηλότερη δομή την 9H Ξανθίνη (Εικόνα 5Α), ενώ οι υπολογισμοί πρόσδεσης με ευκίνητη την πρωτεΐνη στο ενεργό κέντρο, έδωσαν ως δομή ενεργειακού ελαχίστου την 7H-Ξανθίνη (Εικόνα 5Β). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5Α στην περίπτωση της 9H-Ξανθίνης το Q408 αλληλεπιδρά με το N7, το E356 με το N1, η F155 με το O2 και η A407 με το O6. Στην 7H-Ξανθίνη (Εικόνα 5Β) το Q408 αλληλεπιδρά με το H1 και το O2, η A407 με το O6, το E356 με το 7H και η F155 με το N9.

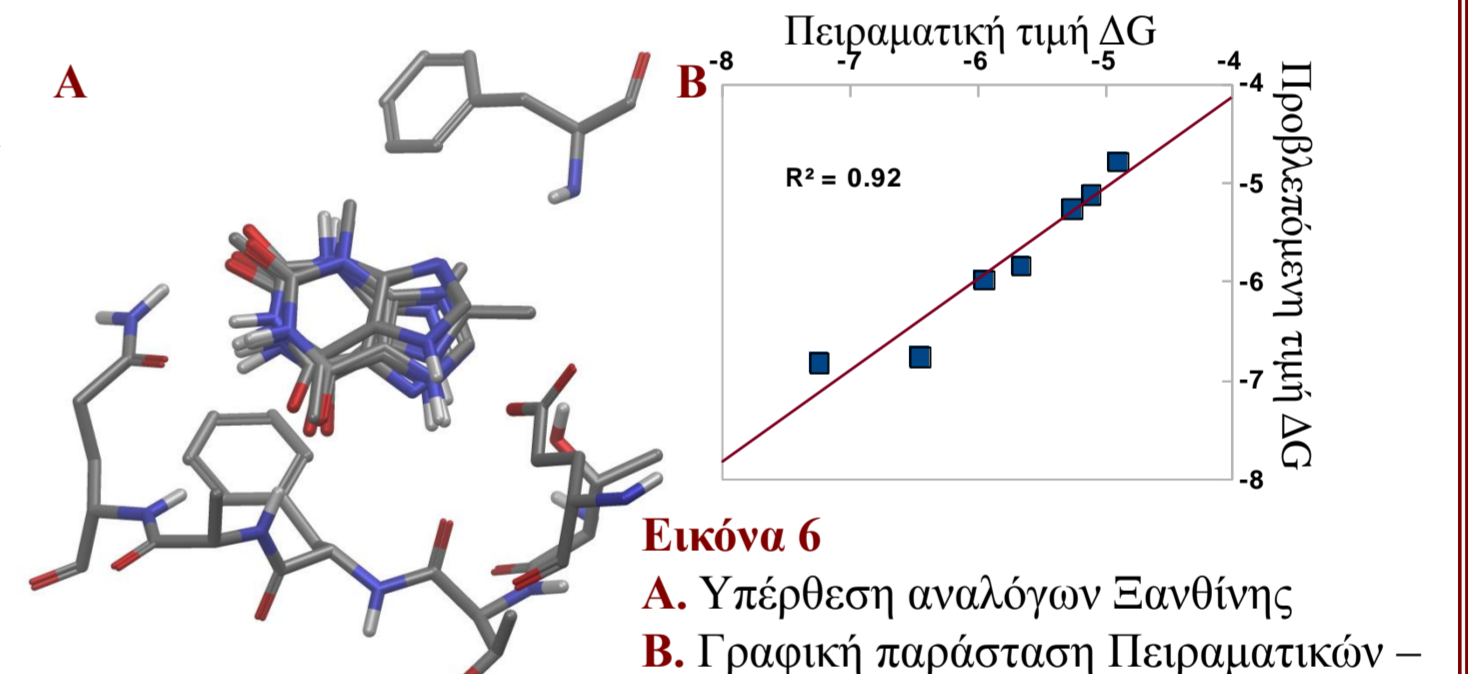


Εικόνα 5 Εναλλακτικοί τρόποι σύνδεσης των αναλόγων ξανθίνης στο κέντρο δέσμευσης του UraA (με μαύρη στικτή γραμμή εμφανίζονται οι δεσμοί υδρογόνου).

A. Αλληλεπιδράσεις της 9H-Ξανθίνης με τον UraA
B. Αλληλεπιδράσεις της 7H-Ξανθίνης με τον UraA

ii) Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης

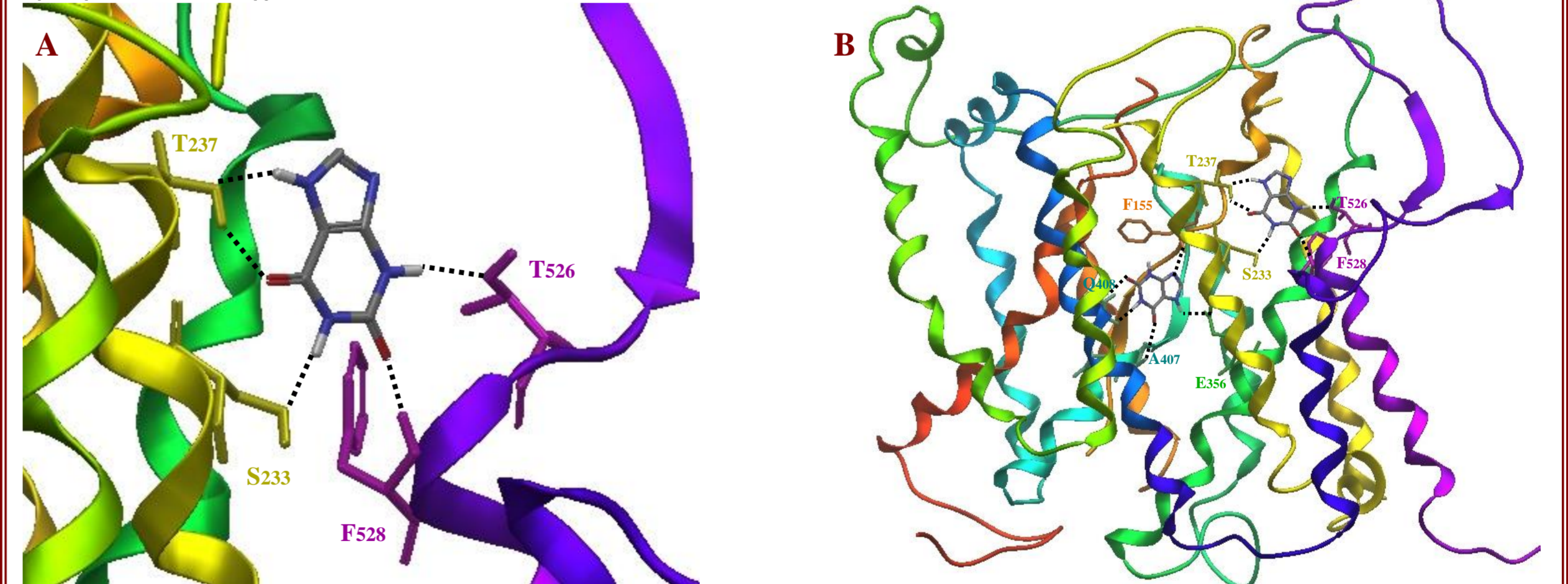
Με βάση το μοντέλο του UraA πραγματοποιήθηκαν Ποσοτικές Σχέσεις Δομής Δράσης για μια σειρά αναλόγων της Ξανθίνης (Εικόνα 6Α) συσχετίζοντας την υπολογισμένη ενέργεια αλληλεπίδρασης με πειραματικά υπολογισμένη ελεύθερη ενέργεια με τη βοήθεια του λογισμικού PrGen (Εικόνα 6B). Οι υπολογισμοί αυτοί μας δίνουν τη δυνατότητα καλύτερης κατανόησης των αλληλεπιδράσεων του μεταφορέα με τα υποστρώματα.



Εικόνα 6
Α. Υπέρθωση αναλόγων Ξανθίνης
B. Γραφική παράσταση Πειραματικών – Προβλεπόμενων τιμών ΔG σύνδεσης

3. Εκλεκτικές θύρες εισόδου του υποστρώματος

Στο παρελθόν έχει δείξει ότι τα αμινοξέα T526 και F528 συμμετέχουν στην εκλεκτική πρόσβαση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του UraA. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών πρόσδεσης ενισχύουν τα βιολογικά αποτελέσματα, δίνοντας ένα μοντέλο σύνδεσης της ξανθίνης με το UraA στην περιοχή αυτή, όπου τα T526 και F528 αλληλεπιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα (Εικόνα 7Α). Η περιοχή αυτή φαίνεται να είναι η περιοχή εισόδου του υποστρώματος στον μεταφορέα. Στην Εικόνα 7B φαίνεται η σχετική θέση του κέντρου δέσμευσης με τη θύρα εκλεκτικής εισόδου.



Εικόνα 7 Η πιθανή περιοχή επιλεκτικής εισόδου υποστρωμάτων του UraA (με μαύρη στικτή γραμμή εμφανίζονται οι δεσμοί υδρογόνου).

A. Στιγμιότυπο δομής όπου η Ξανθίνη κατά την εισόδο της στον UraA αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα S233, T237, T526 και F528.
B. Σχετική θέση του σημείου εκλεκτικής εισόδου της Ξανθίνης [1] και του κέντρου δέσμευσης της [2].

Συμπεράσματα - Προοπτικές

Στην παρούσα εργασία:

- Κατασκευάστηκε αξιόπιστο μοντέλο τρισδιάστατης δομής του UraA.
 - Υπολογισμοί Πρόσδεσης αναδεικνύουν τον τρόπο πρόσδεσης της Ξανθίνης και επιβεβαιώνουν την συμμετοχή των E356 και Q408 στην αλληλεπίδραση μετάφορέα – υποστρώματος.
 - Πραγματοποιήθηκαν Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης για σειρά αναλόγων Ξανθίνης.
- Μελλοντικοί Στόχοι:
- Διερεύνηση τρόπου σύνδεσης της στις μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης E356D και Q408E
 - Διερεύνηση τρόπου σύνδεσης του Ουρικού Οξέος στον μεταφορέα και θα συγκριθεί με αυτόν της Ξανθίνης.

Βιβλιογραφία

1. H. De Koning and G. Diallinas (2000) Nucleobase transporters. Mol Membr Biol. 17: 75-94.
2. C. Gourmas, I. Papageorgiou and G. Diallinas (2008) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. Mol Biosyst. 4: 404-416.
3. G. Diallinas and C. Gourmas (2008) Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: lessons from model microbial genetic systems. Channels (Austin), 2: 363-72.
4. V. Kosti, Papageorgiou I. and Diallinas G. (2010) Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UraA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. J Mol Biol. 397: 1132-43.
5. S. Goudela, P. Karataz, M. Koukaki, S. Frillingos and G. Diallinas (2005) Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. Mol Membr Biol. 22: 263-275.
6. Papageorgiou et al (2008) Specific interdomain synergy in the UraA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. J Mol Biol. 382:1121-35.
7. F. Lu, S. Li, Y. Jiang, J. Jiang, H. Fan, G. Lu, D. Deng, S. Dang, X. Zhang, J. Wang and N. Yan (2011) Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. Nature. 472: 243-6.
8. S. Amillis, V. Kosti, A. Pantazopoulou and G. Diallinas (2011) Mutational Analysis and Modeling Reveal Functionally Critical Residues in Transmembrane Segments 1 and 3 of the UraA Transporter. J. Mol. Biol. 411:567-580.



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