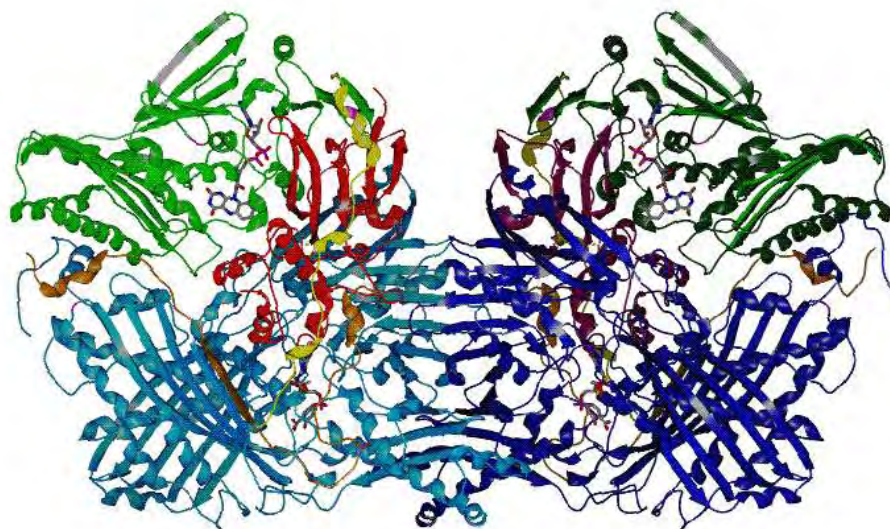




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

# ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΓΑΛΑ

---



**ΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**

**«Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός της οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα.»**

**«Purification and biochemical characterization of xanthine oxidase from bovine milk.»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ):** Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:** Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ:** Μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η εργασία μου ανατέθηκε από την Επίκουρο Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Δρ. Μαρία Κοντού, η οποία επιπλέον με κατεύθυνε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας μου και την οποία οφείλω να ευχαριστήσω θερμά.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα, καθώς και τη Μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη για την επιστημονική καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου προσέφεραν.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κ. Γεώργιο Στραβοδήμο για τη συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, όπως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου και του σωματειακού μου για την άψογη συνεργασία μας εντός του εργαστηρίου.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
Το γονίδιο XOR.....	8
Δομή και μηχανισμός κατάλυσης XOR πρωτεΐνης.....	9
Αντίδραση αναγωγής και αντίδραση οξειδωσης.....	11
Μετατροπή ΧDH σε ΧΟ.....	12
Κατανομή της ΧOR στους ανθρώπινους ιστούς .....	14
Φυσιολογικός ρόλος της ΧΟ .....	15
Κλινική σημασία της ΧΟ .....	17
Ουρική αρθρίτιδα.....	17
Αγγειακές παθήσεις: διαβήτης, υπέρταση, αρτηριοσκλήρωση και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια .....	17
Ισχαιμία/Επαναιμάτωση .....	18
Ξανθινουρία.....	18
Αναστολείς της ΧΟ και η κλινική τους σημασία .....	18
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	22
Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι.....	23
Ανάπτυξη κρυστάλλων .....	25
Στάδια ανάπτυξης κρυστάλλων .....	26
Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση .....	28
ΑΚΤΙΝΕΣ Χ.....	29
Πηγές ακτίνων Χ.....	29
Ανιχνευτές ακτίνων Χ .....	30
Περίθλαση .....	30
Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	32
Ερμηνεία χαρτών-Βελτίωση Δομής.....	33
ΣΚΟΠΟΣ .....	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	35
Αντιδραστήρια .....	35
Υλικά.....	35
Όργανα .....	35

ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα.....	36
Χρωματογραφία συγγένειας .....	38
Δημιουργία στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid.....	38
Αναγέννηση στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid.....	40
Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη EAH Sepharose 4B/folic Acid .....	40
Μελέτη δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης .....	43
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων υπό αποδιατακτικές συνθήκες .....	43
Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης.....	44
Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση .....	45
Ηλεκτροφόρηση .....	45
Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου .....	46
Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών .....	46
Φασματοσκοπικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών .....	46
Μέθοδος Bradford .....	47
Κρυστάλλωση.....	48
Μέθοδος της επικαθήμενης σταγόνας .....	48
Μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας.....	49
Τεχνική ενπυρήνωσης (seeding drop).....	50
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	51
Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα.....	51
Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας .....	51
Μελέτη δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης.....	54
Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης.....	55
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO) ανήκει στα μόλυβδο-φλαβινοένζυμα και καταλύει την οξείδωση της ξανθίνης σε υποξανθίνη και της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ. Το ένζυμο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες μονάδες των 145 kDa, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα συμπαράγοντα μολυβδοπτερίνης, δύο σιδηροθειούχα κέντρα και ένα μόριο FAD. Στον άνθρωπο η XO εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο έντερο και στο ήπαρ, ενώ εκκρίνεται και με το γάλα.

Η XO είναι προϊόν του γονιδίου της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης (Xanthine Oxidoreductase, XOR), από το οποίο παράγεται το ένζυμο με τη μορφή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης (Xanthine Dehydrogenase, XDH) και αυτή μπορεί να μετατραπεί μεταμεταφραστικά σε XO. Η μετατροπή της XDH σε XO μπορεί να γίνει αντιστρεπτά με οξείδωση καταλοίπων κυστεΐνης και μη αντιστρεπτά με πρωτεόλυση. Η XDH και η XO διαφέρουν λειτουργικά ως προς το γεγονός, ότι η πρώτη χρησιμοποιεί το  $\text{NAD}^+$  ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ η XO ανάγει το μοριακό οξυγόνο και παράγει ελεύθερες ρίζες.

Στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών από το ένζυμο οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και η εμπλοκή του σε διάφορες ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η υπέρταση, η αρτηριοσκλήρωση, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και οι βλάβες από την ισχαιμία. Άλλες ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται η XO αφορούν την υπερβολική συγκέντρωση ουρικού οξέος στο αίμα, όπως η ουρική αρθρίτιδα. Επομένως, θεραπευτική προσέγγιση για αυτές τις ασθένειες αποτελεί η χρήση αναστολέων για το ένζυμο.

Η αναζήτηση αναστολέων για την οξειδάση της ξανθίνης έχει κινήσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών και βασίζεται κυρίως στην κατανόηση της δομής της, η οποία μελετάται κρυσταλλογραφικά. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα και καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγένειας, με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Nishino και συνεργάτες (Nishino et al., 1981). Έπειτα, ακολούθησαν

προσπάθειες για κρυστάλλωση του ενζύμου, με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών και σε πληθώρα συνθηκών.

## **ABSTRACT**

Xanthine oxidase (XO) is a molybdo-flavoenzyme, which catalyzes the oxidation of xanthine to hypoxanthine and hypoxanthine to uric acid. The enzyme consists of two 145kDa subunits, each one containing a molybdopterin cofactor, two Fe-S centers and one FAD molecule. In human body, XO is mainly located in intestine and liver and it is also secreted with milk.

XO is product of the xanthine oxidoreductase (XOR) gene, from which the enzyme is produced in the form of xanthine dehydrogenase (XDH), which can be converted post-translationally to XO. The XDH to XO conversion can occur reversibly by oxidation of cysteine residues, or irreversibly by limited proteolysis. The difference between the function of XDH and XO is that the first uses  $\text{NAD}^+$  as the final electron acceptor, while XO reduces molecular oxygen and produces free radicals.

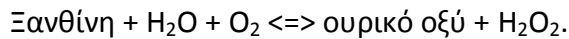
The production of free radicals by the enzyme is largely responsible for its involvement in various diseases, such as diabetes, hypertension, arteriosclerosis, chronic heart failure and ischemia-induced damage. Other diseases XO is involved to are caused by excessive uric acid concentration in blood, like gouty arthritis. Therefore, the usage of XO inhibitors consists a therapeutic approach for these diseases.

The search for xanthine oxidase inhibitors is the target of many researchers and is based on the understanding of the enzyme's structure, which is studied by X-ray crystallography. In the present study xanthine oxidase was isolated from bovine milk and was purified with affinity chromatography, using the method described from Nishino et al. (Nishino et al., 1981). Subsequently, efforts were made for the crystallization of the enzyme using vapor diffusion methods in various conditions.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) (EC 1.17.3.2) είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στην αποικοδόμηση των πουρινών και συγκεκριμένα την οξείδωση της ξανθίνης σε υποξανθίνη και της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ.



Η XO είναι η μια μορφή του ενζύμου οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR), η άλλη μορφή είναι η αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH). Από το γονίδιο της XOR παράγεται αρχικά η XDH, η οποία χρησιμοποιεί το  $\text{NAD}^+$  ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων και μπορεί να μετατραπεί μεταμεταφραστικά σε XO.

Η XO ανακαλύφθηκε το 1899 από τον Spitzer, ο οποίος παρατήρησε την οξείδωση της ξανθίνης και της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ, παρουσία ομογενοποιημένου ιστού και οξυγόνου. Το ένζυμο πήρε το όνομα του αργότερα από τον Burian (Spitzer 1899, Burian 1905). Αρχικά, η XO και η XDH θεωρούνταν δύο διαφορετικά ένζυμα, όμως αργότερα ανακαλύφθηκε πως είναι προϊόντα του ίδιου γονιδίου.

## Το γονίδιο XOR

Το γονίδιο XOR στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (Ichida et al., 1993) και στην περιοχή 2p23.1 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Έχει μέγεθος >60kb και περιέχει 36 εξόνια και 35 ιντρόνια (Xu et al., 1996). Το γονίδιο της αφυδρογονάσης της ξανθίνης μεταγράφεται σε mRNA με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μήκους 3999bp από το οποίο κωδικοποιείται μια πρωτεΐνη 1333 αμινοξέων. Η αλληλούχιση του cDNA έχει πραγματοποιηθεί από τρεις ερευνητικές ομάδες (Ichida et al., 1993; Xu et al., 1994; Saksela and Raivio 1996).

Συγκριτικά με άλλα είδη, η παραγωγή της XOR πρωτεΐνης είναι σημαντικά μειωμένη σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η έκφραση του γονιδίου της ρυθμίζεται αρνητικά. Σε αντίθεση με τους αρουραίους και τα ποντίκια, ο άνθρωπος υποκινητής του γονιδίου περιέχει ένα στοιχείο όμοιο του TATA, στην περιοχή από -138 έως -1, το οποίο δρα κατασταλτικά. Επιπλέον, στη θέση -240

βρίσκεται ένα στοιχείο E-box, το οποίο έχει κατασταλτική δράση στη μεταγραφή του γονιδίου και προσδένεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες AREB6, USF και TFII-I). Γενικά, η περιοχή του υποκινητή που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια -1 έως -138 είναι απαραίτητη και επαρκής για την βασική δράση του υποκινητή, ενώ η περιοχή -258 έως -228 είναι κρίσιμη για την καταστολή της κεντρικής δραστηριότητας του (Xu et al. 2000). Αντίθετα, στην περιοχή -119 ως -123 του γονιδίου XOR που περιέχεται ένα CCAAT μοτίβο, δεσμεύεται ο πυρηνικός παράγοντας Υ (NF-Υ). Ο πυρηνικός παράγοντας Υ έχει έναν πολύ σημαντικό λειτουργικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση του ανθρώπινου XOR γονιδίου [Martelin et al., 2000].

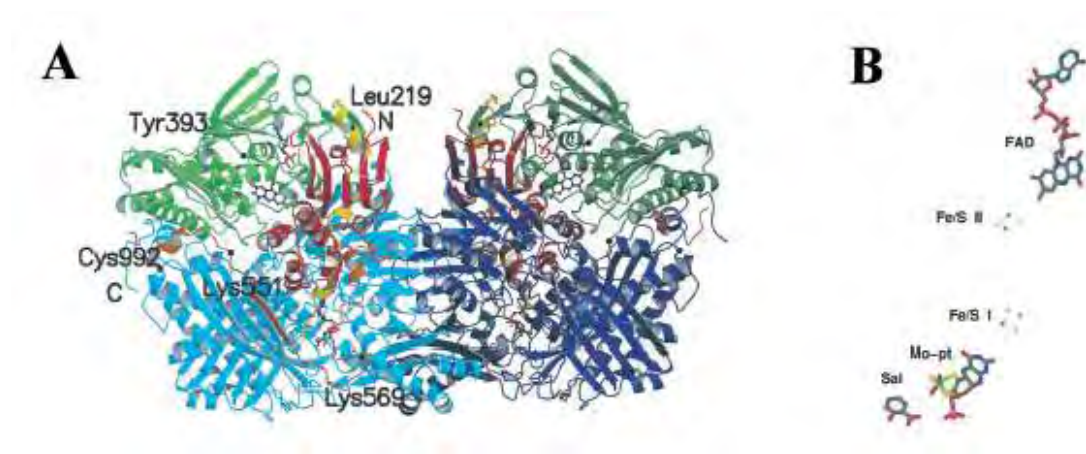
### **Δομή και μηχανισμός κατάλυσης XOR πρωτεΐνης**

Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης ανήκει στα μόλυβδο-φλαβινοένζυμα, δηλαδή τα ένζυμα που απαιτούν το συμπαράγοντα μολυβδαινίου και το φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο (FAD) για την δραστηριότητα τους. Η XOR καθώς και η AO (οξειδάση της αλδεΐδης) είναι τα μοναδικά μόλυβδο-φλαβινοένζυμα που έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο και φέρουν υψηλά επίπεδα ομολογίας.

Η XOR είναι ομοδιμερές ένζυμο και κάθε υπομονάδα της έχει μέγεθος 145kDa. Αυτή μπορεί να διαιρεθεί στη N-τελική περιοχή 20kDa όπου περιέχονται δύο σιδηροθειούχα κέντρα (Fe-SI και Fe-SII), στη κεντρική περιοχή 40kDa όπου προσδένεται FAD και στη C-τελική περιοχή 85kDa που βρίσκεται ο συμπαράγοντας μολυβδαινίου και η θέση δέσμευσης του υποστρώματος (**εικόνα 1**) (Bray et al., 1996; Hille and Nishino, 1995).

Στη N-τελική επικράτεια της XOR δεσμεύονται τα σιδηροθειούχα συμπλέγματα, ύστερα από αλληλεπίδραση τους με κατάλοιπα κυστεΐνης. Τα δύο σιδηροθειούχα συμπλέγματα ονομάστηκαν Fe/S I και Fe/S II, επειδή διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα σήματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού και το οξειδοαναγωγικό τους δυναμικό (Enroth et al., 2000; Iwasaki et al., 2000; Nishino and Okamoto, 2000).

Η κεντρική περιοχή του ενζύμου προσδένεται με το συμπαραγόνα FAD και συγγενεύει με την οικογένεια των φλαβοπρωτεϊνών. Στην XDH, το ηλεκτροστατικό και στερεοχημικό περιβάλλον του κέντρου FAD ευνοούν τη δέσμευση του  $\text{NAD}^+$  και συνεπώς την τελική μεταφορά των ηλεκτρονίων στο  $\text{NAD}^+$ . Αντιθέτως, η XO μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο  $\text{O}_2$ , επειδή δεν μπορεί να δεσμεύσει το  $\text{NAD}^+$  (Harris and Massey, 1997).

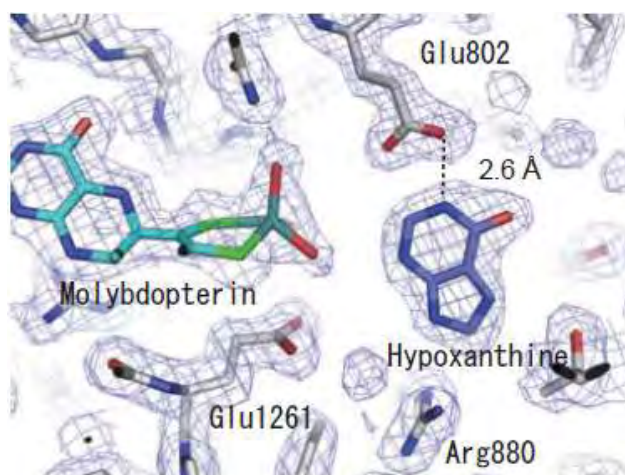


Εικόνα 1. A) Μοριακή δομή της βόειας XDH από κρυσταλλογραφικά δεδομένα, ανάλυση 2,1 Å. B) Κατανομή των συμπαραγόντων στη μια υπομονάδα του ενζύμου. Το ιόν Mo απεικονίζεται με πράσινο, αυτά του σιδήρου με γαλάζιο και τα άτομα του θείου με κίτρινο. Εικόνα από Enroth et al. 2000

Η κεντρική περιοχή του ενζύμου προσδένεται με το συμπαραγόνα FAD και συγγενεύει με την οικογένεια των φλαβοπρωτεϊνών. Στην XDH, το ηλεκτροστατικό και στερεοχημικό περιβάλλον του κέντρου FAD ευνοούν τη δέσμευση του  $\text{NAD}^+$  και συνεπώς την τελική μεταφορά των ηλεκτρονίων στο  $\text{NAD}^+$ . Αντιθέτως, η XO μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο  $\text{O}_2$ , επειδή δεν μπορεί να δεσμεύσει το  $\text{NAD}^+$  (Harris and Massey, 1997).

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στη C-τελική περιοχή (**εικόνα 2**). Αρχικά, ηλεκτρόνια του υποστρώματος ανάγουν το κέντρο Mo και από αυτό μεταφέρονται στα δύο σιδηροθειούχα κέντρα και στη συνέχεια στο κέντρο FAD. Από εκεί η XDH μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο  $\text{NAD}^+$ , ενώ η XO μορφή του ενζύμου χρησιμοποιεί το  $\text{O}_2$  ως αποδέκτη ηλεκτρονίων (Hille and Nishino, 1995). Όταν η XOR είναι

οξειδωμένη, τα ιόντα Mo σχηματίζουν διπλούς δεσμούς με ένα μόριο θείου και ένα μόριο οξυγόνου και απλούς δεσμούς με δυο συμπαράγοντες πτερίνης και ένα υδροξύλιο, ενώ στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου ο διπλός δεσμός με το θείο αντικαθίσταται από μια σουλφιδρική ομάδα (Enroth et al., 2000).



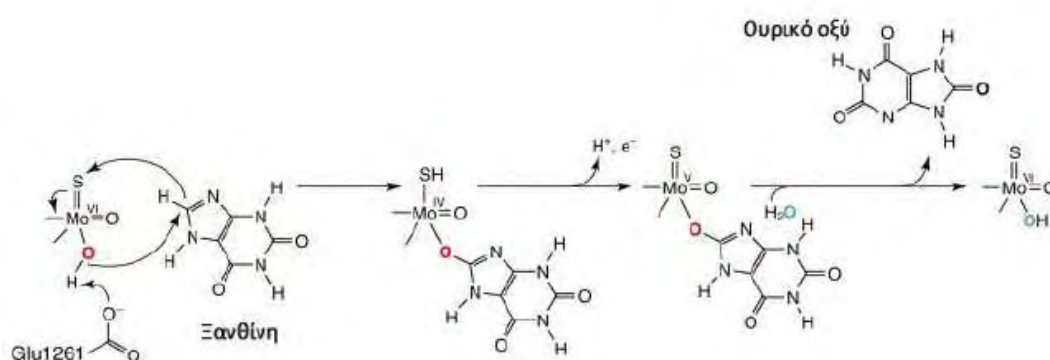
Εικόνα 2. Μοριακή δομή υποξανθίνης προσδεμένης με βόεια desulfo (χωρίς θείο, απενεργοποιημένη) XOR, ανάλυση 2.0 Å. Εικόνα από Okamoto et al., (2013).

### Αντίδραση αναγωγής και αντίδραση οξείδωσης

Δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την ξανθίνη στο Mo-Co κέντρο της XOR, ανάγοντας το Mo(VI) σε Mo(IV). Επιπλέον, ένα υδρογόνο από τη θέση C8 της ξανθίνης, μεταφέρεται στο θείο του μολυβδαινίου, με αποτέλεσμα το Mo=S να μετατρέπεται σε Mo-SH. Στη συνέχεια στο C8 της ξανθίνης επιτελείται μια πυρηνόφιλη εισβολή μιας ομάδας υδροξυλίου, σχηματίζοντας ουρικό οξύ (εικόνα 3). Αυτή η ομάδα υδροξυλίου προέρχεται από το νερό, αλλά είναι ακόμα άγνωστο αν αυτή αντιδρά αυτόνομα ή ως προσδέτης Mo.

Σε αντίθεση με την αντίδραση αναγωγής, η αντίδραση οξείδωσης λαμβάνει χώρα στο FAD. Η ενδομοριακή μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ Mo-Co και FAD γίνεται με τη μεσολάβηση των κέντρων Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, τα οποία χρησιμεύουν ως δεξαμενή ηλεκτρονίων για να διατηρήσουν το Mo-Co ως Mo(VI) και τη φλαβίνη ως FADH<sub>2</sub>, ώστε να είναι αποτελεσματική η αντίδραση. Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια μεταφέρονται από το FAD στο NAD<sup>+</sup> ή το O<sub>2</sub> [Olson et al., 1974; Hille and Massey, 1981]. Κατά την επαναοξείδωση της πλήρως ανηγμένης XO, τα δυο πρώτα βήματα

έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά δυο ηλεκτρονίων στο  $O_2$  και συνεπώς τη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Στη συνέχεια, η ΧΟ μεταφέρει τα ηλεκτρόνια, που απομένουν σε ξεχωριστά βήματα, με κάθε ηλεκτρόνιο να ανάγει ξεχωριστά το  $O_2$  προς παραγωγή  $\cdot O_2^-$ . Έτσι, η επαναοξειδωση της ανηγμένης ΧΟ αποδίδει δύο μόρια  $H_2O_2$  και δύο ανιόντα  $\cdot O_2^-$ . Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ΧDH παράγει περισσότερα ανιόντα  $\cdot O_2^-$  ανά mole  $O_2$ , λόγω της υψηλότερης θερμοδυναμικής σταθερότητας του FAD, το οποίο αντιδρά με το οξυγόνο (Hunt et al., 1993). Ωστόσο, παρά τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην παραγωγή ανιόντων  $\cdot O_2^-$ , η ΧDH αντιδρά πιο αργά με το οξυγόνο έχοντας ένα μέγιστο ποσό παραγωγής ανιόντων  $\cdot O_2^-$ , που αναλογεί στο 25% της  $V_{max}$  της ΧΟ (Saito and Nishino, 1989).



Εικόνα 3. Μετατροπή ξανθίνης σε ουρικό οξύ και αναγωγή του κέντρου Mo της ΧΟR.

### Μετατροπή ΧDH σε ΧΟ

Η αφυδρογονάση της ξανθίνης, δηλαδή η μορφή του ενζύμου που ανάγει  $NAD^+$ , είναι αυτή που βρίσκεται ως επί το πλείστον στους ιστούς των θηλαστικών, σε αντίθεση με την οξειδάση της ξανθίνης, η οποία ανάγει το  $O_2$ . Παρόλα αυτά, η ΧΟR μπορεί να μετατραπεί αντιστρεπτά ή μη σε ΧΟ (Della Corte et al., 1968; Nishino et al., 1997). Οι κρυσταλλικές δομές των ΧDH και ΧΟ, που απομονώθηκαν από βόειο γάλα, έδειξαν μεγάλες δομικές διαφορές μεταξύ των ενζύμων, γύρω από την περιοχή πρόσδεσης του FAD (Enroth et al., 2000).

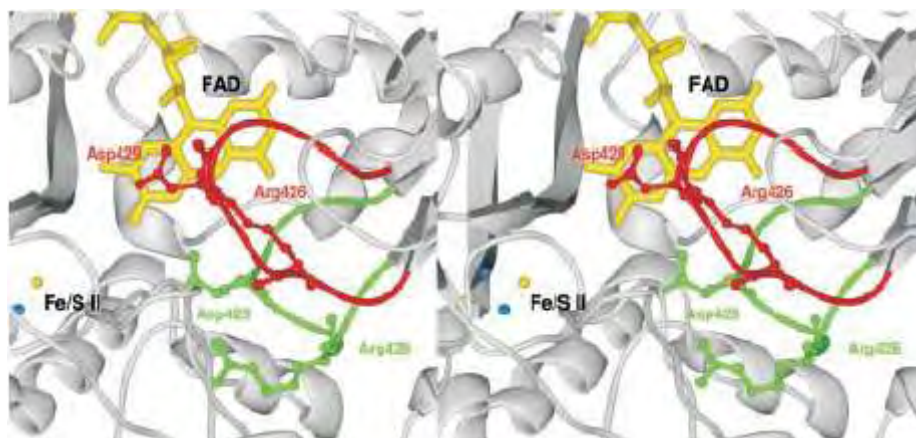
Η μετατροπή της XDH σε XO μπορεί να συμβεί αντιστρεπτά, με οξείδωση καταλοίπων κυστεΐνης και μη αντιστρεπτά, με πρωτεόλυση. Στην αντιστρεπτή μετατροπή, τα κατάλοιπα Cys<sup>535</sup> και Cys<sup>992</sup> (δεδομένα από XOR αρουραίου και βοδιού) οξειδώνονται και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Αυτά τα αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την αποκαλούμενη γρήγορη μετατροπή της XDH σε XO, αλλά υπάρχει άλλο ένα ζευγάρι κυστεϊνών, που ευθύνεται για την αργή μετατροπή. Τα κατάλοιπα αυτά είναι η Cys<sup>1316</sup> και η Cys<sup>1324</sup> (αρίθμηση αρουραίου), και η οξείδωση τους προκαλεί την αργή μετατροπή της XDH σε XO. (Nishino et al., 2005)

Όσον αφορά την πρωτεόλυση της XDH, η πρωτεάση που είναι υπεύθυνη in vivo δεν έχει βρεθεί ακόμα, αλλά είναι γνωστό πως η πέψη με τρυψίνη και παγκρεατίνη μπορεί να προκαλέσει τη μετατροπή. Η τρυψίνη κόβει το ένζυμο μετά τη Lys<sup>551</sup> (Hille R. 1996), και η παγκρεατίνη μετά τις Lys<sup>219</sup> και Lys<sup>569</sup> (Nishino et al., 2005). Μετά τη διάσπαση τα τμήματα του ενζύμου παραμένουν ενωμένα και η μετατροπή της XDH σε XO με πρωτεόλυση δεν είναι αντιστρεπτή.

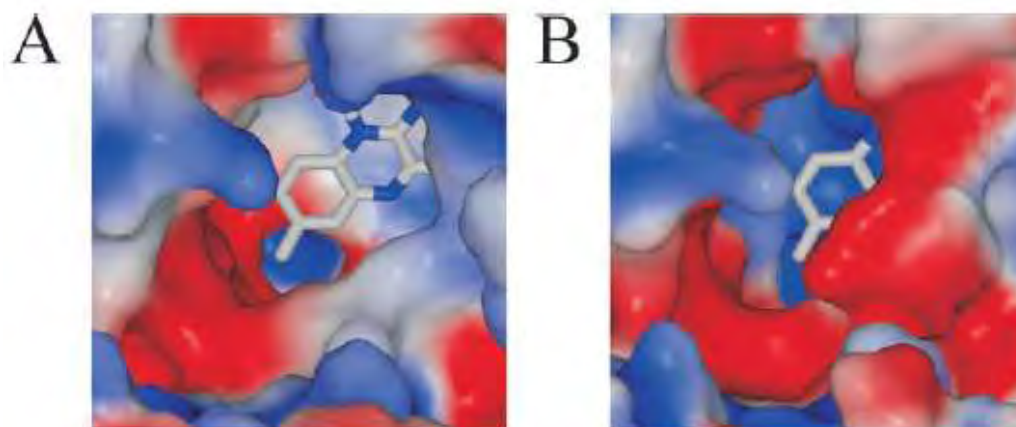
Η ανάπτυξη δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών που αναφέρθηκαν και η πρωτεόλυση της XDH, προκαλούν δομικές αλλαγές στο ένζυμο και συνεπώς τη μετατροπή του. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα από το βόειο ένζυμο αποκάλυψαν πως η Cys<sup>992</sup> εντοπίζεται την επιφάνεια του μορίου, ενώ η Cys<sup>535</sup> πιθανότατα στο μακρύ συνδετικό πεπτίδιο μεταξύ των περιοχών του FAD και της μολυδοπτερίνης. Επιπλέον, η ομάδα αμινοξέων Phe<sup>549</sup>, Arg<sup>335</sup> (334 για τον αρουραίο), Trp<sup>336</sup> (335 για τον αρουραίο) και Arg<sup>427</sup> (426 για τον αρουραίο) βρίσκεται στο κέντρο ενός συστήματος αναμετάδοσης, που μεταδίδει τροποποιήσεις του συνδετικού πεπτιδίου, λόγω οξείδωσης κυστεϊνών ή πρωτεόλυσης, στο βρόγχο του ενεργού σημείου (Gln<sup>423</sup>-Lys<sup>433</sup>) (Kuwabara et al., 2003). Η μετακίνηση του βρόγχου ενεργού σημείου θεωρείται η αιτία της διαφοράς στη χημική συμπεριφορά μεταξύ των XDH και XO (**εικόνα 4**) (Enroth et al., 2000).

Οι διαφορές στο στερεοχημικό και ηλεκτροστατικό περιβάλλον του κέντρου FAD, μεταξύ των XDH και XO, ευθύνονται για τη διαφορετική προτίμηση τους σε αποδέκτη ηλεκτρονίων. Η περιοχή του FAD στην XDH είναι εύκολα προσιτή από το

NAD<sup>+</sup>, σε αντίθεση με αυτήν της ΧΟ. Για τον λόγο αυτόν, η οξειδάση της ξανθίνης μπορεί να ανάγει μόνο το O<sub>2</sub> και όχι το NAD<sup>+</sup> (**εικόνα 5**) (Harris and Massey, 1997).



Εικόνα 4. Στέρεο αναπαράσταση της αλλαγής στο βρόγχο ενεργού σημείου, κατά τη μετατροπή της ΧDH σε ΧΟ. Η θέση του βρόγχου στην ΧDH απεικονίζεται με πράσινο και της ΧΟ με κόκκινο χρώμα. Enroth et al. 2000



Εικόνα 5. Το ηλεκτροστατικό περιβάλλον στην περιοχή του FAD. Οι ηλεκτροαρνητικές περιοχές απεικονίζονται με κόκκινο και οι ηλεκτροθετικές με μπλε. Α) ΧDH, Β) ΧΟ. Enroth et al. 2000

### Κατανομή της ΧΟR στους ανθρώπινους ιστούς

Τα όργανα με το μεγαλύτερο βαθμό έκφρασης της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης είναι το ήπαρ, το έντερο και ο μαστικός αδένας (Vettenranta and Raivio, 1990; Sarnesto et al., 1996; Saksela et al., 1998; Linder et al., 1999). Στο ήπαρ η πρωτεΐνη εκφράζεται στα περιπυλαία κύτταρα, ενώ στο έντερο στα επιθηλιακά (Linder et al.,

1999). Η έκφραση της XOR στο ήπαρ είναι αναμενόμενη, αφού αυτό είναι ένα από τα κύρια όργανα που εμπλέκονται στον καταβολισμό των πουρινών και στην αποβολή του αζώτου. Από την άλλη, η ύπαρξη της XOR στο γάλα πολλών θηλαστικών, δεν έχει μια τόσο προφανή εξήγηση.

Είναι γνωστό εδώ και πολλές δεκαετίες ότι το γάλα είναι μια πλούσια πηγή σε XOR (Bray, 1975). Στο γάλα, το ένζυμο εντοπίζεται στη μεμβράνη των σφαιριδίων λίπους (Mather, 1987; Keenan and Patton, 1995). Κατά το μέσο της εγκυμοσύνης, η έκφραση της XOR στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου αρχίζει να αυξάνεται και κορυφώνεται στην έναρξη της γαλακτογονίας. Ενώ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης το ένζυμο κατανέμεται διάχυτα στο κυτταρόπλασμα, με το ξεκίνημα της έκκρισης μετακομίζει στις μεμβράνες των κυττάρων. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, είναι πιθανό η ύπαρξη της XOR στις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων να ρυθμίζει το πακετάρισμα των λιπιδίων σε αυτές, κατά την έκκριση των λιπιδίων του γάλακτος (McManaman et al., 2002). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται και από το γεγονός ότι στο ανθρώπινο γάλα το ένζυμο βρίσκεται κυρίως χωρίς μόλυβδο, δηλαδή με σημαντικά μειωμένη ικανότητα οξειδωσης της ξανθίνης και επομένως ο ρόλος του στο μαστικό αδένου διαφέρει από αυτόν στην αποικοδόμηση των πουρινών (Abadeh et al., 1992; Godber et al., 1997).

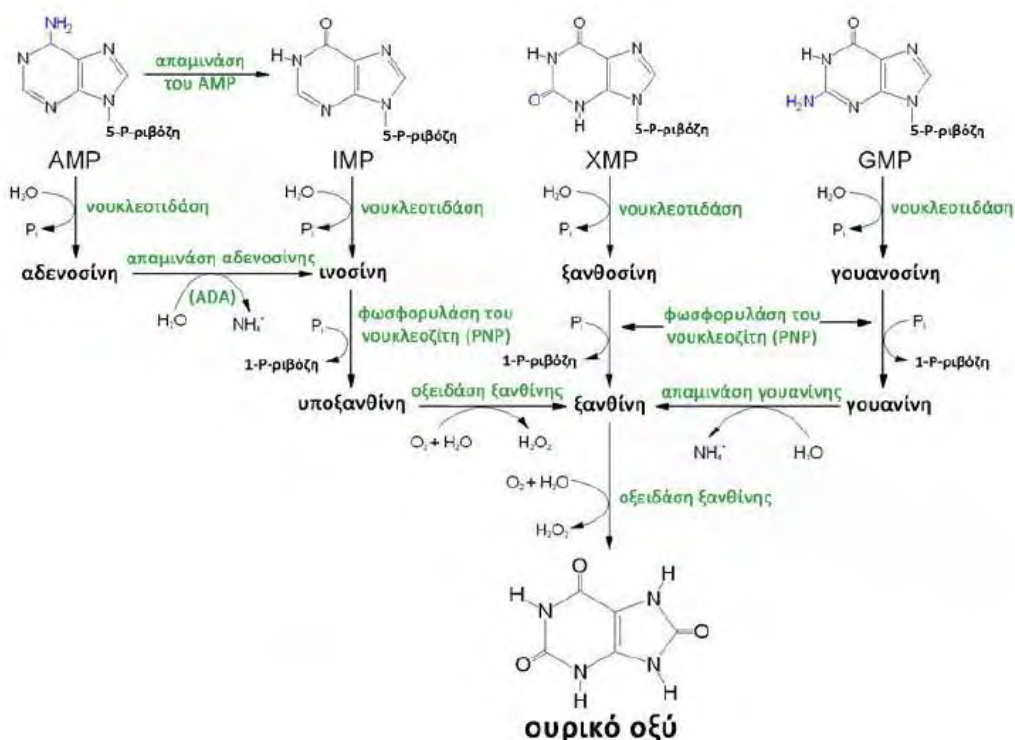
### Φυσιολογικός ρόλος της XO

Οι πουρίνες είναι σημαντικά μόρια του οργανισμού, αφού είναι δομικά συστατικά του DNA (αδενίνη, γουανίνη), αλλά και συστατικά μορίων υψηλής ενέργειας (ATP, GTP). Η οξειδάση της ξανθίνης συμμετέχει στην αποικοδόμηση των πουρινών και συγκεκριμένα, στην οξειδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, σχηματίζεται κυρίως στο ήπαρ και αποβάλλεται από τους νεφρούς μέσω των ούρων.

Αρχικά στην αποικοδόμηση των πουρινών, οι νουκλεοτιδάσες (εξειδικευμένες φωσφατάσες νουκλεοτιδίων) απομακρύνουν μια φωσφορική ομάδα από τις πουρίνες, μετατρέποντας τις σε νουκλεοζίτες (**εικόνα 6**). Έπειτα, οι νουκλεοζίτες διασπώνται περαιτέρω σε ελεύθερη βάση και ριβόζη με τις νουκλεοζιδάσες ή σε



ελεύθερη βάση και 1-P-ριβόζη με τις φωσφορυλάσες των νουκλεοζιτών. Συγκεκριμένα, το ινοσινικό οξύ (IMP) με απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας δίνει ινοσίνη και μετά από απομάκρυνση της ριβόζης δίνει την ελεύθερη βάση υποξανθίνη. Ανάλογη μεταβολική πορεία ακολουθούν το γουανυλικό οξύ (GMP) και το ξανθυλικό οξύ (XMP). Δηλαδή το γουανυλικό οξύ μπορεί να δώσει ξανθίνη, μέσω γουανοσίνης και γουανίνης. Το ξανθυλικό οξύ μπορεί να μεταβολισθεί σε ξανθοσίνη και ξανθίνη. Στη συνέχεια, δρα η οξειδάση της ξανθίνης οξειδώνοντας την υποξανθίνη σε ξανθίνη και μετέπειτα την ξανθίνη σε ουρικό οξύ παράγοντας όχι μόνο υπεροξειδίο του υδρογόνου, αλλά και ανιόντα υπεροξειδίου του οξυγόνου ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Το αδενυλικό οξύ (AMP) ακολουθεί λίγο διαφορετική πορεία, αφού δεν αποικοδομείται (στα θηλαστικά) από την αντίστοιχη φωσφορυλάση των νουκλεοζιτών. Μπορεί όμως να μετατραπεί σε αδενοσίνη και ινοσίνη με την απαμινάση της αδενοσίνης, είτε να μετατραπεί σε ινοσινικό οξύ με την απαμινάση του αδενυλικού. Τέλος, το IMP ακολουθεί την παραπάνω πορεία για να μετατραπεί σε ουρικό οξύ μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης.



Εικόνα 6. Αντιδράσεις αποικοδόμησης των πουρινών. Εικόνα από Michael W King, PhD [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org)

## **Κλινική σημασία της XO**

Η οξειδάση της ξανθίνης έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, αφού εμπλέκεται σε πολλές ασθένειες, κυρίως λόγω της ιδιότητας της να παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species).

## **Ουρική αρθρίτιδα**

Οι ασθενείς της ουρικής αρθρίτιδας υποφέρουν από περιοδικές προσβολές οξείας φλεγμονώδους αρθρίτιδας, όπου μερικές αρθρώσεις πρήζονται, κοκκινίζουν και είναι ευαίσθητες στον πόνο. Η ουρική αρθρίτιδα προκαλείται από υπερουριχαιμία, δηλαδή αύξηση της συγκέντρωσης ουρικού οξέος στο αίμα, η οποία αν υπερβεί τα 6,8 mg/dL μπορεί να οδηγήσει σε κατακρήμνιση κρυστάλλων ουρικού μονονατρίου (Becker et al., 2010). Οι κρύσταλλοι αυτοί εναποτίθενται γύρω από τις αρθρώσεις και αν απελευθερωθούν μέσα στο χώρο των αρθρώσεων προκαλείται φλεγμονή. Κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση, εκκρίνονται πολλές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και στρατολογούνται ουδετερόφιλα στην άρθρωση (Gonzalez, 2012). Η κύρια θεραπευτική προσέγγιση για την ουρική αρθρίτιδα είναι ο έλεγχος της υπερουριχαιμίας με χρήση αναστολέων οξειδάσης της ξανθίνης, όπως αυτοί που αναφέρονται παρακάτω.

## **Αγγειακές παθήσεις: διαβήτης, υπέρταση, αρτηριοσκλήρωση και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια**

Οι ασθενείς που πάσχουν από καρδιαγγειακές νόσους έχουν υψηλά ποσοστά ουρικού οξέος στο αίμα. Αυτή ήταν η παρατήρηση που συνέδεσε την αυξημένη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης, με την ανάπτυξη αυτών των ασθενειών (Bakhtiarov et al., 1989; Landmesser et al., 2002). Η XO είναι μια από τις κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα αγγεία. Οι ελεύθερες ρίζες οδηγούν σε μειωμένη αγγειοδιασταλτική ικανότητα, μετατρέποντας το NO του ενδοθηλίου σε NO<sub>2</sub>, με αποτέλεσμα ένα καταρράκτη περαιτέρω σχηματισμού ριζών. Η μειωμένη αγγειοδιασταλτική ικανότητα έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη αιμάτωση ιστών και αποτελεί σημαντική πτυχή της παθοφυσιολογίας των καρδιαγγειακών νόσων. Επομένως, η χορήγηση αναστολέων της XO διερευνάται ως θεραπευτική προσέγγιση έναντι αυτών των νόσων (Gavin and Struthers, 2005).

### Ισχαιμία/Επαναιμάτωση

Η επαναιμάτωση των ιστών μετά από μία περίοδο ισχαιμίας προκαλεί ιστικές βλάβες (Granger, 1988). Οι βλάβες αυτές οφείλονται σε φλεγμονή και στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, από ένζυμα των ιστών, όπως η οξειδάση της ξανθίνης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων επηρεάζονται από την ισχαιμία και κατά την επαναιμάτωση απελευθερώνουν την XO μορφή του ενζύμου, η οποία σε αντίθεση με την XDH παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Friedl et al., 1990). Επιπλέον, κατά την ισχαιμική περίοδο το ATP αποικοδομείται και συνεπώς αυξάνεται το υπόστρωμα της XO, όπως και η παραγωγή ROS (Achterberg et al., 1988).

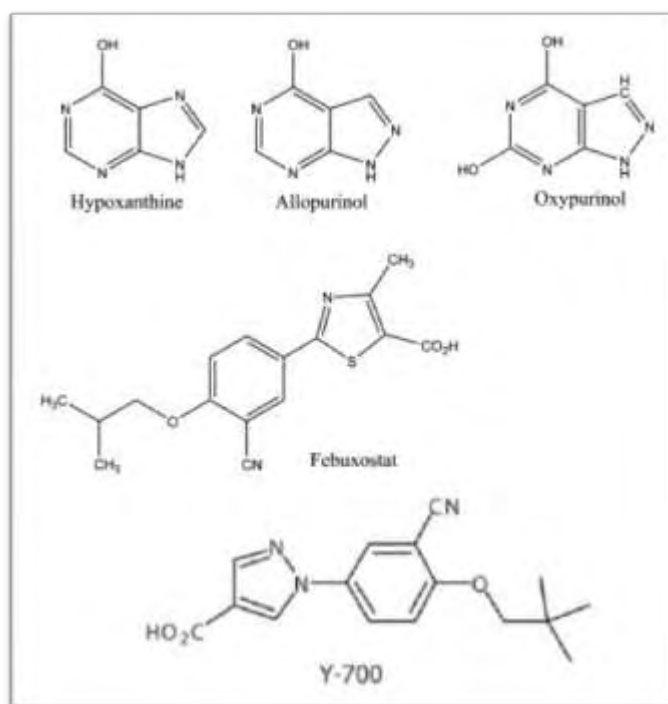
### Ξανθινουρία

Η ξανθινουρία είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την έκκριση μεγάλων ποσοτήτων ξανθίνης στα ούρα και από τη τάση για σχηματισμό πετρών ξανθίνης (Dent and Philpot, 1954). Επιπλέον, τα επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα και στα ούρα του ασθενούς είναι μηδενικά. Υπάρχουν δύο τύποι ξανθινουρίας, η ξανθινουρία τύπου I που προκαλείται από ανεπάρκεια της XOR και η τύπου II στην οποία ευθύνεται τόσο η έλλειψη της XOR όσο και της AO (οξειδάση της αλδεΐδης). Οι ασθενείς υποφέρουν κυρίως από τις πέτρες που αναπτύσσονται, ως επί το πλείστον στους νεφρούς και σπάνια μπορούν να προκαλέσουν ρήξη. Δεν υπάρχει ειδική θεραπεία για την ξανθινουρία και στους ασθενείς συστήνεται η υψηλή πρόσληψη υγρών και η αποφυγή φαγητών πλούσιων σε πουρίνες.

### Αναστολείς της XO και η κλινική τους σημασία

Οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία, αφού αποτελούν θεραπευτική προσέγγιση για τις νόσους που αναφέρθηκαν. Ο πιο διαδεδομένος αναστολέας της XO είναι το δομικό ισομερές της ξανθίνης, αλλοπουρινόλη (**εικόνα 7**). Η αλλοπουρινόλη συντέθηκε για πρώτη φορά στα μέσα τις δεκαετίας του 1950, από τους Gertrude B. Elion και George H. Hitchings, σε μια προσπάθεια ανεύρεσης φαρμάκων κατά του καρκίνου. Το 1966 ο οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ ενέκρινε τη χρήση αλλοπουρινόλης για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας.

Η αλλοπουρινόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρα ως υπόστρωμα και συναγωνιστικός αναστολέας της ΧΟ, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι μη συναγωνιστικός αναστολέας. Το προϊόν της οξείδωσης της αλλοπουρινόλης από την ΧΟ είναι η οξυπουρινόλη, η οποία είναι μη συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου. Μετά από του στόματος χορήγηση η αλλοπουρινόλη απορροφάται ταχέως και φτάνει στις μέγιστες τιμές της στο πλάσμα ύστερα από 30-60 λεπτά. Από την άλλη, η οξυπουρινόλη έχει μικρότερη βιοδιαθεσιμότητα ύστερα από per os χορήγηση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της αλλοπουρινόλης στο πλάσμα είναι 2-3 ώρες, σημαντικά μικρότερος σε σχέση με της οξυπουρινόλης (14-30 ώρες) (Pea, 2005). Παρά το γεγονός ότι η αλλοπουρινόλη είναι ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο, είναι ένας ασθενής αναστολέας με την  $IC_{50}$  να υπολογίζεται in vitro από 0,2 έως 50  $\mu$ M.



Εικόνα 7. Υποξανθίνη και οι αναστολείς της ΧΟ, αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη, φεβουξοστάτη και Y-700.

Οι κύριες παρενέργειες της αλλοπουρινόλης είναι η γαστρεντερική δυσφορία, αντιδράσεις υπερευαισθησίας και δερματικά εξανθήματα. Ακόμα, η χορήγηση αλλοπουρινόλης δεν συνιστάται σε άτομα με μειωμένη νεφρική λειτουργία. Η λήψη αλλοπουρινόλης μπορεί να διαταράξει τη δράση άλλων φαρμάκων που λαμβάνονται ταυτόχρονα, όπως η κυκλοφωσφαμίδη, η προβενεσίδη και τα πηκτικά που χορηγούνται από το στόμα (Bieber and Terkeltaub, 2004; Pea, 2005).

Τα τελευταία χρόνια αναζητούνται νέοι αναστολείς της ΧΟ, με λιγότερες παρενέργειες και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από την αλλοπουρινόλη. Αρχικά, οι έρευνες στράφηκαν στα συνθετικά παράγωγα πουρινών και πυριμιδινών, όπως είναι η αλλοπουρινόλη, τα οποία όμως έχουν τις ίδιες παρενέργειες με αυτήν και κυρίως τα εξανθήματα. Μερικές άλλες ομάδες αναστολέων της ΧΟ ανακαλύφθηκαν, όταν βρέθηκε πως η αντιοξειδωτική ικανότητα διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων οφείλεται εν μέρει σε αυτές (McCord and Fridovich, 1969). Τέτοια μόρια ήταν φαινολικές ενώσεις, κουμαρίνες, φλαβονοειδή και στεροειδή (Spanou et al., 2012). Την τελευταία δεκαετία η κατανόηση της δομής της ΧΟ οδήγησε στην ανακάλυψη δύο ισχυρών αναστολέων της, της φεβουξοστάτης και του Υ-700. Επιπλέον, οι κρυσταλλογραφικές τεχνικές επιτρέπουν το χαρακτηρισμό της πρόσδεσης οποιασδήποτε ενδιαφέρουσας ουσίας με το ένζυμο.

Η φαρμακευτική χρήση της φεβουξοστάτης εγκρίθηκε το 2008 από τον ευρωπαϊκό οργανισμό φαρμάκων και το 2009 από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ. Η φεβουξοστάτη (2-[3-cyano-4-(2-methylpropoxy)-phenyl]-4-methylthiazole-5-carboxylic acid) δεν είναι ανάλογο των πουρινών και είναι 10-30 φορές πιο δραστικός αναστολέας από την αλλοπουρινόλη (Horiuchi et al., 1999). Επιπλέον, έχει μηδαμινή επίδραση σε άλλα ένζυμα του μεταβολισμού των πουρινών και πυριμιδινών (Takano et al., 2005).

Η χορήγηση φεβουξοστάτης δεν έχει σοβαρές παρενέργειες. Όσον αφορά τη συγχορήγηση φεβουξοστάτης με άλλα φάρμακα, αυτή φαίνεται να επηρεάζει μόνο τη δράση των φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα της ΧΟ (αζαθειοπρίνη, μερκαπτοπουρίνη, θεοφυλλίνη). Σε σύγκριση με την αλλοπουρινόλη, η φεβουξοστάτη προκαλεί μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων ουρικού οξέος, σε

μικρότερες δόσεις. Παρόλα αυτά, η μείωση στη συχνότητα εξάρσεων αρθρίτιδας και στο μέγεθος και τον αριθμό των ουρικών τοφών, είναι παρόμοια και για τους δύο αναστολείς (Becker et al., 2005). Η φεβουξοστάτη παρέχει μια εναλλακτική στους ασθενείς με δυσανεξία στην αλλοπουρινόλη, ή στις περιπτώσεις που αυτή έχει ανεπαρκή δράση.

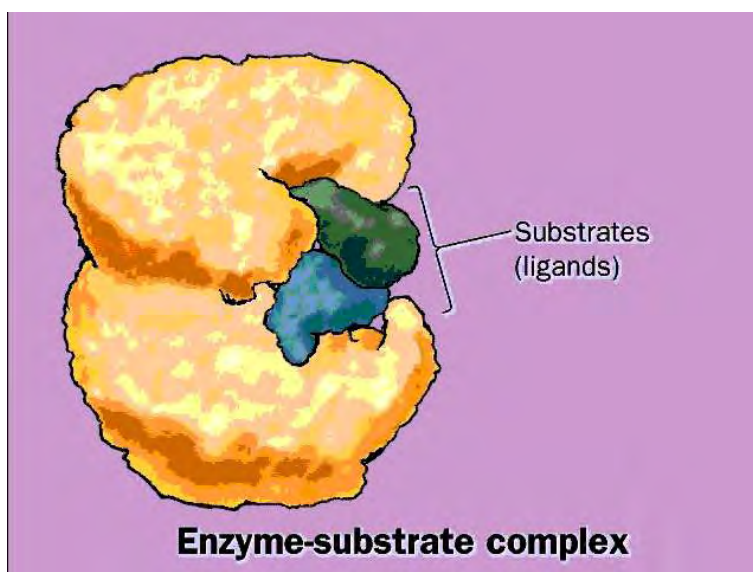
## ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες είναι μία από τις σημαντικότερες ομάδες μορίων όλων των οργανισμών, με πλήθος λειτουργιών. Οι λειτουργίες τους εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τη τρισδιάστατη δομή τους, αφού αυτή καθορίζει τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μόρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ένζυμα, τα οποία εξαιτίας της δομής τους, έχουν ιδιαίτερα υψηλό βαθμό εξειδίκευσης στην επιλογή των υποστρωμάτων τους και ορισμένες φορές απόλυτο **(εικόνα 8)**. Ένας στόχος της μελέτης των ενζύμων αποτελεί ο σχεδιασμός αναστολέων ή ενεργοποιητών, οι οποίοι όπως και τα υποστρώματα προσδένονται εκλεκτικά στο κάθε ένζυμο. Επομένως, ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης είναι απαραίτητος, σε ένα πρώτο επίπεδο για την κατανόηση της λειτουργίας της και τελικά ίσως για τη ρύθμιση της.

Φυσικά, η απόκτηση της 3D δομής ενός αντικειμένου με μέγεθος μορίου δεν είναι απλή διαδικασία. Η χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για την οπτικοποίηση αντικειμένων απαιτεί, η ακτινοβολία να έχει μήκος κύματος συγκρίσιμο με τα μικρότερα χαρακτηριστικά που θέλουμε να διακρίνουμε. Οι αποστάσεις των ατόμων στα μόρια είναι της τάξεως του  $1\text{\AA}$ , όμως το μήκος κύματος του ορατού φωτός είναι μεταξύ 400 και 800 nm. Για τον λόγο αυτό, η απεικόνιση μορίων γίνεται με χρήση ακτίνων Χ, που καλύπτουν το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από 0,1 έως  $100\text{\AA}$ . Για τις ακτίνες Χ δεν υπάρχουν φακοί, όμως με αυτές μπορούμε να αποκτήσουμε το περιθλασίγραμμα ενός μορίου και η ανασυγκρότηση του ειδώλου να γίνει υπολογιστικά με χρήση του μετασχηματισμού Fourier.

Ακόμα όμως και με τη χρήση ακτίνων Χ, η οπτικοποίηση ενός μόνο μορίου πρωτεΐνης παραμένει ιδιαίτερα δύσκολη. Το μόριο σκεδάζει τις ακτίνες Χ υπερβολικά ασθενικά και η ανίχνευση της σκέδασης είναι αδύνατη πάνω από το επίπεδο του θορύβου, που προκαλεί η σκέδαση του νερού και του αέρα. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με την ανάπτυξη κρυστάλλων των πρωτεϊνών, οι οποίοι αποτελούνται από πολλά μόρια μιας πρωτεΐνης περιοδικά διευθετημένα στο χώρο. Σαν αποτέλεσμα, τα σκεδαζόμενα κύματα όλων των μορίων συμβάλουν εν φάσει

και ανεβάζουν το σήμα σε μετρήσιμο επίπεδο, δηλαδή ο κρύσταλλος λειτουργεί ως ενισχυτής.



Εικόνα 8. Σύμπλεγμα ενζύμου υποστρώματος. Εικόνα από [www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/images/substratesarelig.6.gif](http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/c2005/images/substratesarelig.6.gif)

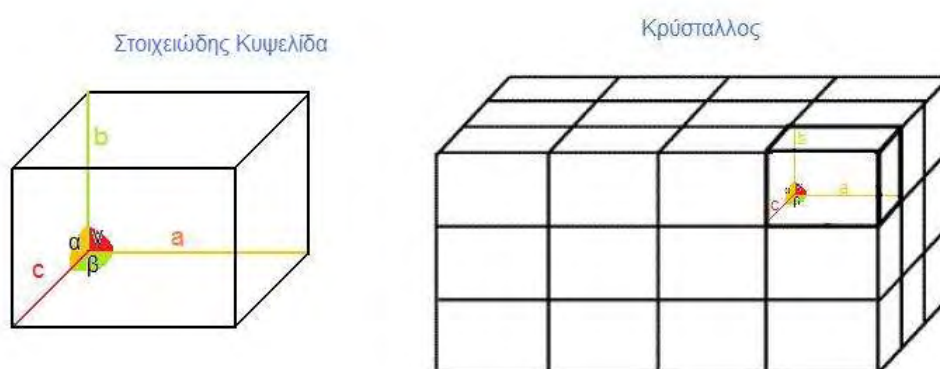
### Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι

Για να σχηματίσουν πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται αργά σε ένα υδατικό διάλυμα. Στον κρύσταλλο, όλα τα μόρια πρωτεΐνης αποκτούν έναν ή μερικούς πανομοιότυπους προσανατολισμούς και διατάσσονται τρισδιάστατα, συγκρατούμενα μεταξύ τους από μη ομοιοπολικές δυνάμεις. Σε αντίθεση με τους ανόργανους κρυστάλλους, που τα μόρια έρχονται σε επαφή λόγω ηλεκτροστατικών έλξεων πλήρως φορτισμένων ιόντων, τα μόρια πρωτεϊνών συγκρατούνται με ασθενέστερες δυνάμεις, κυρίως δεσμούς υδρογόνου μεταξύ ενυδατωμένων πρωτεϊνικών επιφανειών. Δηλαδή, ανάμεσα στα μόρια πρωτεΐνης ενός κρυστάλλου παρεμβάλλονται πολλά μόρια νερού. Για τον λόγο αυτό, οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι πολύ πιο εύθραυστοι από τους κρυστάλλους ανόργανων μορίων και η απαλή πίεση με μια βελόνα είναι ικανή να τους συντρίψει (Rhodes 2006).

Ένας κρύσταλλος αποτελείται από πολλές πανομοιότυπες μονάδες που ονομάζονται στοιχειώδεις κυψελίδες και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις του χώρου, για να δημιουργήσουν το κρυσταλλικό πλέγμα. Μια στοιχειώδης



κυψελίδα μπορεί να αποτελείται από ένα, ή περισσότερα μόρια, τα οποία καλούνται ασύμμετρες μονάδες και διατάσσονται συμμετρικά στην κυψελίδα. Οι διαστάσεις μιας στοιχειώδους κυψελίδας μπορούν να οριστούν από 6 νούμερα, τα μήκη των τριών ακμών ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) και τις γωνίες που αυτά σχηματίζουν ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), τα νούμερα αυτά ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι (**εικόνα 9**). Τα  $a$ ,  $b$  και  $c$  σχηματίζουν τους κρυσταλλογραφικούς άξονες.



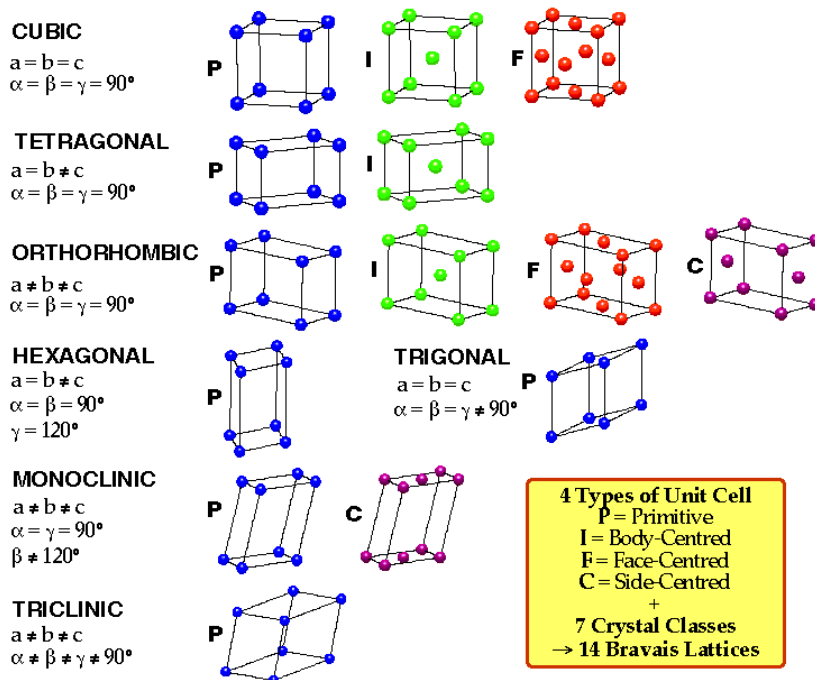
Εικόνα 9. Κρύσταλλος και στοιχειώδης κυψελίδα.

Τα κρυσταλλικά πλέγματα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη συμμετρία τους. Ο Bravais τα κατέταξε σε 14 κατηγορίες, τα πλέγματα Bravais, τα οποία εμπίπτουν σε 7 κρυσταλλικά συστήματα (**εικόνα 10**).

Κάθε εσωτερικό επίπεδο του κρυστάλλου μπορεί να περιγραφεί από τις συντεταγμένες των σημείων, όπου τέμνει τους κρυσταλλογραφικούς άξονες. Όταν ένα επίπεδο είναι παράλληλο σε κάποιον κρυσταλλογραφικό άξονα, το σημείο τομής αυτών βρίσκεται στο άπειρο. Ο κρυσταλλογράφος Miller για να αποτρέψει την έννοια του άπειρου, όρισε τους δείκτες  $h$ ,  $k$ ,  $l$ , με τέτοιο τρόπο, ώστε οι συντεταγμένες των σημείων τομής του επιπέδου με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες να ισοδυναμούν με  $1/h$ ,  $1/k$ ,  $1/l$  και οι αντίστοιχες αποστάσεις των σημείων τομής από την αυθαίρετα ορισμένη αρχή των αξόνων να είναι  $a/h$ ,  $b/k$ ,  $c/l$ .

Ο προσδιορισμός της συμμετρίας του πλέγματος αποτελεί βασική προϋπόθεση της κρυσταλλογραφικής μελέτης. Η συμμετρία ελαττώνει τον αριθμό των πειραματικών δεδομένων τα οποία πρέπει να συλλεχθούν και τις προς προσδιορισμό ατομικές

παραμέτρους. Το κρυσταλλικό πλέγμα μπορεί να έχει μόνο 10 στοιχεία συμμετρίας: άξονες 1ης, 2ης, 3ης, 4ης και 6ης τάξεως, καθώς και τους αντίστοιχους άξονες αναστροφής. Ο συνδυασμός τους δίνει τις 32 κρυσταλλικές τάξεις. Το κρυσταλλικό πλέγμα, όμως χαρακτηρίζεται και από τη συμμετρία μεταφοράς  $T$  ως προς τις τρεις διαστάσεις του χώρου. Αν στις παραπάνω πράξεις προσθέσουμε και τη συμμετρία μεταφοράς, δημιουργούνται νέα στοιχεία συμμετρίας, οι άξονες ελικώσεως και τα επίπεδα ολισθήσεως. Έτσι από τις 32 κρυσταλλικές τάξεις προκύπτουν 230 ομάδες χώρου. Κάθε ομάδα χώρου σχετίζεται με μια κρυσταλλική τάξη. Ωστόσο, τα βιολογικά μακρομόρια (πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) επειδή εμφανίζουν μόνο ένα οπτικό ισομερές, κρυσταλλώνονται σύμφωνα με 65 ομάδες συμμετρίας χώρου.



Εικόνα 10. Πλέγματα Bravais. Εικόνα από Dr S.J. Heyes (1999) First of Four Lectures in the 1st Year Inorganic Chemistry Course

### Ανάπτυξη κρυστάλλων

Οι περισσότερες μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών βασίζονται στην αργή κατακρήμνιση των μορίων από ένα υδατικό διάλυμα. Η καθαρή από προσμίξεις πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει έναν κατακρημνιστικό παράγοντα, η συγκέντρωση του οποίου είναι λίγο μικρότερη από αυτήν στην οποία

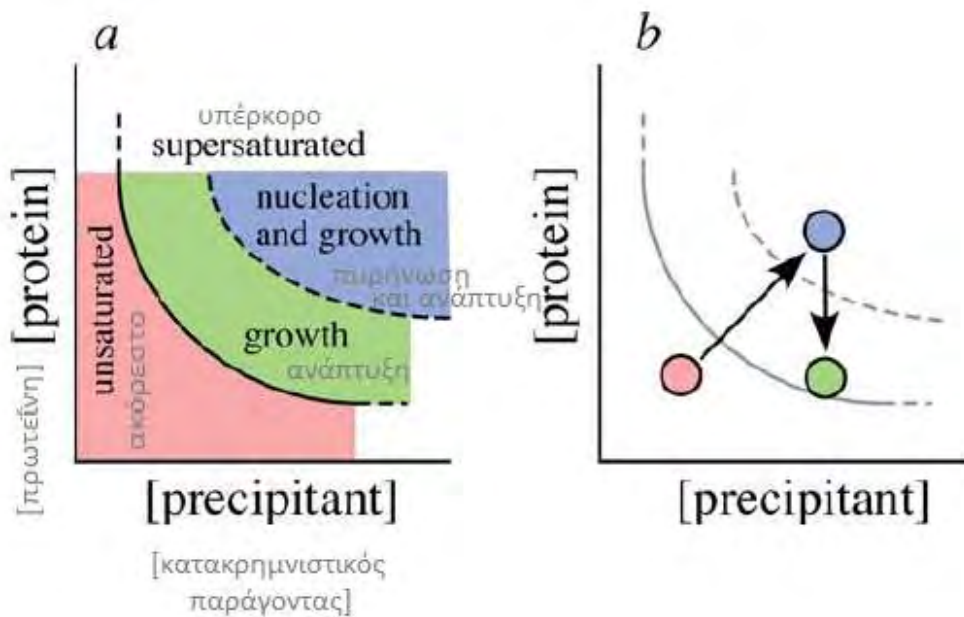
η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται. Έπειτα, αφαιρείται νερό από το διάλυμα με εξάτμιση, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστικού παράγοντα να αυξάνονται, οδηγώντας σε κατακρήμνιση. Όταν η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται αργά παράγονται μεγάλοι κρύσταλλοι, ενώ στην ταχεία κατακρήμνιση προκύπτουν μικρού μεγέθους κρύσταλλοι, ή ίζημα.

Οι κατακρημνιστικοί παράγοντες μπορούν να είναι άλατα, οργανικοί διαλύτες ή πολυμερή. Τα άλατα δρουν είτε με τη διαδικασία της εξαλάτωσης (salting out), είτε με αυτή της εφάλατωσης (salting in). Κατά τη διαδικασία της εξαλάτωσης η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα πυκνό ηλεκτρολυτικό διάλυμα, όπου η συγκέντρωση των ιόντων σταδιακά αυξάνεται. Το άλας συναγωνίζεται την πρωτεΐνη για την πρόσδεση του στο νερό, επομένως η ικανότητα του νερού να διαλύει την πρωτεΐνη μειώνεται. Αντίθετα στην εφάλατωση το πρωτεϊνικό διάλυμα είναι φτωχό σε ιόντα και η περεταίρω μείωση τους μειώνει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, αφού κανονικά δεσμεύονται σε αυτήν και αυξάνουν την υδροφιλικότητα της. Το ποιός από τους δύο κατακρημνιστικούς μηχανισμούς θα επιλεγθεί εξαρτάται από την φύση της πρωτεΐνης.

Οι οργανικοί διαλύτες δρουν μειώνοντας τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος και κατά συνέπεια τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης στο νερό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το πολυμερές PEG, που δρα τόσο σαν οργανικός διαλύτης όσο και σαν άλας.

#### Στάδια ανάπτυξης κρυστάλλων

Για να κατακρημνιστεί μια πρωτεΐνη ώστε να σχηματιστούν κρύσταλλοι, πρέπει η συγκέντρωση της όσο και η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα να αυξηθούν στο διάλυμα. Το γεγονός αυτό μπορεί να περιγραφεί με ένα διάγραμμα φάσης, που σχετίζει την αύξηση των [πρωτεΐνη], [κατακρημνιστικός παράγοντας] με τη διαδικασία της κρυστάλλωσης (**εικόνα 11**). Στο διάγραμμα διακρίνονται τρεις ζώνες, η **ζώνη υποκορεσμού** όπου η πρωτεΐνη δεν κατακρημνίζεται, η **ζώνη της πυρήνωσης και ανάπτυξης** όπου τα μόρια συγκροτούνται σε ομάδες και η **ζώνη ανάπτυξης** όπου οι πυρήνες αυξάνονται σε μέγεθος για να σχηματίσουν μεγάλους κρυστάλλους.



Εικόνα 11. α) Διάγραμμα φάσης για την ανάπτυξη κρυστάλλων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και κατακρημιστικού παράγοντα. Με ροζ απεικονίζεται η ζώνη υποκορεσμού, με πράσινο η ζώνη ανάπτυξης και με γαλάζιο η ζώνη πυρήνωσης και ανάπτυξης. β) Η πορεία που πρέπει να ακολουθηθεί ώστε να παραχθούν μεγάλοι κρύσταλλοι πρωτεΐνης. Εικόνα από Rhodes, (2006).

Από το διάγραμμα φάσης μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ανάπτυξη κρυστάλλων πραγματοποιείται σε δύο στάδια, την πυρήνωση και την ανάπτυξη των πυρήνων. Κατά την πυρήνωση, τα μόρια πρωτεΐνης συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν συσσωματώματα. Το στάδιο αυτό απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης – κατακρημιστικού παράγοντα, οι οποίες αν συνεχίσουν να υφίστανται οδηγούν στο σχηματισμό πολλών πυρήνων και κατά συνέπεια ενός άμορφου ιζήματος ή μικρών κρυστάλλων.

Στη ζώνη ανάπτυξης οι συνθήκες είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των πυρήνων σε μεγάλους κρυστάλλους. Τα μόρια πρωτεΐνης επικάθονται στο σχηματισμένο πυρήνα, ενώ ταυτόχρονα προκαλείται μείωση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο διάλυμα λόγω διάχυσης των πρωτεϊνικών μορίων. Η μείωση αυτή είναι μεγαλύτερη στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς το σχηματιζόμενο κρύσταλλο και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας [Kam et al., 1978]. Επομένως, η ιδανική στρατηγική θα ήταν κατά τα αρχικά στάδια της κρυστάλλωσης, οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης – κατακρημιστικού παράγοντα να

αντιστοιχούν στη ζώνη πυρήνωσης και αργότερα όταν οι πυρήνες θα έχουν σχηματιστεί, να μετατοπιστούν στη ζώνη ανάπτυξης.

Τελικά, η ταχύτητα ανάπτυξης του κρυστάλλου μειώνεται με το χρόνο και μηδενίζεται. Με βάση τον νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης  $D$  είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης του κρυστάλλου  $K$ , τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση, η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Βάσει πειραματικών μελετών η αναστολή ανάπτυξης κρυστάλλων δεν είναι αποτέλεσμα εξάντλησης της υπάρχουσας πρωτεΐνης στο διάλυμα, αλλά οφείλεται στη μεταβολή κάποιων ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου [Kam et al., 1978]. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δηλητηρίαση των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται είτε λόγω της εναπόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά είτε λόγω της αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων.

#### **Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση**

Πέρα από την συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστικού παράγοντα, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση. Οι παράγοντες αυτοί είναι: 1) η καθαρότητα της πρωτεΐνης, 2) το pH, 3) η θερμοκρασία και 4) οι χημικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης. 1) Η καθαρότητα της πρωτεΐνης έχει τη μεγαλύτερη σημασία και ιδανικά πρέπει να πλησιάζει το 100%. Οι προσμίξεις άλλων πρωτεϊνών, ή προϊόντων αποικοδόμησης της ίδιας, μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη κρυστάλλων. 2) Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι το pH. Μερικές πρωτεΐνες είναι ικανές να κρυσταλλωθούν σε μεγάλο εύρος pH, αλλά οι περισσότερες προτιμούν φυσιολογικό pH γύρω στο 7,5. 3) Όσον αφορά τη θερμοκρασία, οι κρυσταλλώσεις πραγματοποιούνται κυρίως στους 4 °C ή στους 18-22 °C. Γενικά, όταν χρησιμοποιούνται άλατα ως κατακρημνιστικοί παράγοντες, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης αυξάνει σε χαμηλές θερμοκρασίας. Το αντίθετο ισχύει για τους παράγοντες PEG και MPD. 4) Σημαντικό ρόλο στην κρυστάλλωση παίζει και η κατανομή του φορτίου στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Επομένως, χημικές

τροποποιήσεις στην επιφάνεια μπορούν να δώσουν κρυστάλλους οι οποίοι οδηγούν σε καλύτερα κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

## **ΑΚΤΙΝΕΣ Χ**

Όπως αναφέρθηκε, για τον προσδιορισμό της 3D δομής μια πρωτεΐνης γίνεται χρήση ακτίνων Χ, επειδή το μήκος κύματος τους είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με την απόσταση των ατόμων στα μόρια. Οι ακτίνες Χ εκπέμπονται από μεταλλικούς στόχους, οι οποίοι βομβαρδίζονται με υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια. Κατά την ανάλυση, ακτίνες Χ που παράγονται από μια πηγή προσπίπτουν σε κρυστάλλους της πρωτεΐνης, σκεδάζονται και αμαυρώνουν ένα φιλμ. Σε αυτό το φιλμ φαίνονται σκούρες κηλίδες εκεί που προσέπεσαν οι δέσμες ακτίνων.

Στη συνέχεια, ένας οπτικός σαρωτής μετρά με ακρίβεια τη θέση και την ένταση κάθε κηλίδας και τα δεδομένα μεταφέρονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή σε ψηφιακή μορφή. Βασιζόμενος σε αυτά τα δεδομένα, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής ανακατασκευάζει μια εικόνα της κατανομής των ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου.

## **Πηγές ακτίνων Χ**

Υπάρχουν τρία κοινά είδη πηγών ακτίνων Χ, ο σωλήνας ακτίνων Χ, ο περιστρεφόμενος σωλήνας και οι συγχροτρονικές πηγές. Στο σωλήνα ακτίνων Χ, ηλεκτρόνια από ένα καυτό νήμα πυρακτώσεως (κάθοδος) επιταχύνονται από ηλεκτρικά φορτισμένες πλάκες και συγκρούονται με την άνοδο του μετάλλου στόχου, η οποία ψύχεται με νερό. Η λειτουργία του σωλήνα ακτίνων Χ περιορίζεται από την ποσότητα θερμότητας που μπορεί να απομακρυνθεί από την άνοδο, μέσω του νερού που κυκλοφορεί. Οι περιστρεφόμενοι σωλήνες έχουν βελτιωμένη λειτουργία, αφού η άνοδος αποτελείται από ένα περιστρεφόμενο μέταλλο και η θερμότητα διαχέεται σε ένα πολύ μεγαλύτερο κομμάτι μετάλλου. Οι πηγές με περιστρεφόμενη άνοδο είναι πάνω από δέκα φορές ισχυρότερες από τις πηγές με σταθερές ανόδους.

Οι συγχροτρονικές πηγές χρησιμοποιούν επιταχυντές σωματιδίων, οι οποίοι είναι γιγαντιαίοι δακτύλιοι. Σε αυτούς τους δακτυλίους, πομποί ραδιοσυχνότητας

οδηγούν ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια να περιστρέφονται με ταχύτητες κοντά σε αυτή του φωτός και ισχυροί μαγνήτες τα εξαναγκάζουν σε κυκλική κίνηση. Φορτισμένα σωματίδια, όπως τα ηλεκτρόνια, που εξαναγκάζονται σε κυκλική κίνηση εκλύουν ενέργεια (συγχροτρονική ακτινοβολία) και στους επιταχυντές αυτή η ενέργεια εκλύεται ως ακτίνες Χ. Συστήματα εστίασης με καθρέπτες και μονοχρωμάτορες οδηγούν σε παραγωγή μονοχρωματικών ακτίνων Χ, με μήκος κύματος που μπορεί να επιλεγθεί (Rhodes 2006).

### **Ανιχνευτές ακτίνων Χ**

Η βασική αρχή των ανιχνευτών ακτίνων Χ είναι ένα υλικό που απορροφά τα φωτόνια ακτίνων Χ, που σκεδάζονται από τον κρύσταλλο και παράγει αναλαμπές. Ένα σύστημα μετρά αυτές τις αναλαμπές.

Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με ακτίνες Χ από μεγάλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες απαιτεί την χρήση ανιχνευτών περιοχής (area detectors), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να συλλέγουν πολλές ανακλάσεις ταυτόχρονα. Ο πρώτος ανιχνευτής αυτού του είδους που χρησιμοποιήθηκε και ο απλούστερος είναι το ευαίσθητο σε ακτίνες Χ φιλμ. Από τότε όμως έχουν εφευρεθεί διάφοροι ανιχνευτές περιοχής, όπως οι image plate detectors, multiwire area detectors και οι πιο σύγχρονοι CCDs (charge-coupled devices). Στους ανιχνευτές CCDs το σήμα από την περίθλαση μιας δέσμης ακτίνων Χ προκαλεί τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο κέντρο ενός pixel και τα δεδομένα μπορούν να μεταφερθούν άμεσα σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή.

### **Περίθλαση**

Τα ηλεκτρόνια της πρωτεΐνης κάθε στοιχειώδους κυψελίδας στον κρύσταλλο σκεδάζουν τις προσπίπτουσες δέσμες ακτίνων Χ. Συνήθως οι σκεδαζόμενες ακτίνες Χ αλληλοαναιρούνται, όμως όταν προέρχονται από ορισμένες γωνίες πρόσπτωσης αλληλοενισχύονται και παράγουν δέσμες περιθλώμενης ακτινοβολίας, οι οποίες μπορούν να καταγραφούν και να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή.

Ο W.L. Bragg έδειξε ότι οι γωνίες με τις οποίες οι διαθλώμενες δέσμες αναδύονται από ένα κρύσταλλο, μπορούν να υπολογιστούν αντιμετωπίζοντας την περίθλαση σαν να ήταν αντανάκλασεις από ομάδες ισοδύναμων, παράλληλων επιπέδων στον κρύσταλλο. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg η περίθλαση συμβαίνει μόνο όταν για

δύο γειτονικά επίπεδα, η διαφορά στην διαδρομή των ακτίνων είναι ίση με το μήκος κύματος της δέσμης των ακτίνων  $\lambda$ . Αυτή η απόσταση εξαρτάται από την γωνία της ανάκλασης μεταξύ της κύριας δέσμης και των επιπέδων και δίνεται από τη σχέση:

$$2d\sin\theta = n\lambda.$$

όπου,  $\lambda$ : μήκος κύματος ακτίνων  $X$

$n$ : η τάξη των ανακλάσεων και λαμβάνει ακέραιες τιμές ( $n = 1, 2, 3, \dots$ )

$\theta$ : η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας

$d$ : η ισαπόσταση δικτυωτών επιπέδων

Όταν οι σκεδαζόμενες ακτίνες, από όλα τα άτομα του δικτυωτού επιπέδου, είναι σε φάση, ενισχύονται. Το ίδιο συμβαίνει σε κάθε δικτυωτό επίπεδο χωριστά. Με τη σχέση αυτή καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους της στοιχειώδους κυψελίδας. Ένα πλήρες διάγραμμα περίθλασης μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από ένα τρισδιάστατο πλέγμα ανακλάσεων, το οποίο ονομάζεται αντίστροφο πλέγμα, επειδή οι παράμετροί του είναι αντιστρόφως ανάλογοι των παραμέτρων του πραγματικού κρυσταλλικού πλέγματος. Κάθε ανάκλαση του αντιστρόφου πλέγματος χαρακτηρίζεται από τρεις δείκτες  $h, k, l$ , έτσι ώστε σύμφωνα με το νόμο του Bragg, να προέρχεται από ανάκλαση των ακτίνων  $X$  από τα επίπεδα ( $h k l$ ) του πραγματικού πλέγματος. Από αυτό το μοντέλο της περίθλασης των ακτίνων  $X$  φαίνεται ότι οι θέσεις και ο αριθμός των ανακλάσεων καθώς και η συμμετρία του διαγράμματος περίθλασης εξαρτάται μόνο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις διαστάσεις και τη συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας. Κάθε ανάκλαση μπορεί να θεωρηθεί ως το άθροισμα των “συνεισφορών” από όλες τις περιοχές της επαναλαμβανόμενης κυψελίδας. Η κάθε συνεισφορά είναι ένα κύμα και μπορεί να εκφραστεί ως μία σειρά Fourier:

$$F_{hkl} = f(\rho_1) + f(\rho_2) + \dots + f(\rho_n) = \sum_x \sum_y \sum_z \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)}$$

↑ Παράγοντες δομής;
 ↑ Συνεισφορά από μία περιοχή  $\rho_2$ 
} κυματική συνάρτηση



Άρα, ο παράγων δομής  $F_{hkl}$  στο σημείο  $(h,k,l)$  του χώρου των ανακλάσεων είναι μετασχηματισμός Fourier της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ουσιαστικά, το περιθλασίγραμμα αποτελεί το μετασχηματισμό Fourier της ηλεκτρονιακής πυκνότητας και αντίστροφα, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα αποτελεί το μετασχηματισμό Fourier του περιθλασιγράμματος. Ο παράγων δομής όμως δεν είναι ένας απλός αριθμός. Είναι και αυτός μία κυματική συνάρτηση, η οποία έχει, όπως κάθε κύμα, ένταση, συχνότητα και φάση. Η συχνότητα είναι γνωστή και είναι αυτή της αρχικής μας ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας ( $hkl$ ) είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του δομικού παράγοντα  $F_{hkl}$ . Ωστόσο, οι φάσεις δεν μπορούν να προκύψουν κατευθείαν από το περιθλασίγραμμα (πρόβλημα φάσεων).

#### Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των δεδομένων πρέπει να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, για να αποφευχθεί η καταστροφή του κρυστάλλου. Αρχικός στόχος είναι να καταγραφούν οι εντάσεις και να υπολογιστούν οι δείκτες Miller. Επειδή δεν υπάρχει κατάλληλος φακός ώστε να συγκεντρώνει τις ακτίνες  $X$  και να έχουμε την απεικόνιση του μορίου, χρησιμοποιούνται κατάλληλοι ανιχνευτές. Έτσι, το πρότυπο των περιθλάσεων αποτυπώνεται στα περιθλασιγράμματα. Από τα περιθλασιγράμματα υπολογίζονται η διεύθυνση και το πλάτος των κυμάτων, με τη χρήση νόμων και εξισώσεων. Για τον προσδιορισμό των φάσεων όμως πρέπει να ακολουθηθούν διάφορες μέθοδοι. Στη συνέχεια όλα τα δεδομένα συνδυάζονται και με τη χρήση των μετασχηματισμών Fourier υπολογίζεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μορίου, με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών.

Ωστόσο, υπάρχει ένα βασικό πρόβλημα. Προκειμένου να υπολογιστεί η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας πρέπει να είναι γνωστά τόσο το πλάτος όσο και η φάση του παράγοντα δομής. Από το περιθλασίγραμμα μπορούν να ληφθούν μόνο οι μετρήσεις του πλάτους. Όλες οι πληροφορίες για τη φάση χάνονται, γεγονός που αποτελεί πρόβλημα. Έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των φάσεων και είναι η μέθοδος 'δοκιμή και σφάλμα', άμεσοι μέθοδοι, η συνάρτηση

Patterson, η μέθοδος βαριού ατόμου, μέθοδος ισόμορφης αντικατάστασης και η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης.

### **Ερμηνεία χαρτών-Βελτίωση Δομής**

Στο στάδιο αυτό συνδυάζονται οι πληροφορίες που δίνει ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας με αυτές της δευτεροταγούς και πρωτοταγούς δομής του μακρομορίου για να κατασκευαστεί ένα ατομικό ή μοριακό μοντέλο. Στη συνέχεια, ακολουθούν διορθώσεις της δομής, με διαδοχικές συσχετίσεις με διάφορους συντελεστές ακριβείας που καταλήγουν στη βελτίωση της προτεινόμενης δομής. Η αύξηση της υπολογιστικής ικανότητας των σύγχρονων υπολογιστών έχει συμβάλλει θεαματικά στην επιτάχυνση των διαδικασιών ερμηνείας- βελτίωσης της δομής μακρομορίων και στην ανάπτυξη ευκολότερου στη χρήση λογισμικού για την τεχνική της περίθλασης των ακτίνων Χ σε βιοδομές.

## ΣΚΟΠΟΣ

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο με μεγάλο ενδιαφέρον, αφού ευθύνεται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών και εμπλέκεται σε διάφορες νόσους, όπως αυτές αναφέρθηκαν. Θεραπευτική προσέγγιση για αυτές τις νόσους αποτελεί η αναστολή του ενζύμου με αλλοπουρινόλη, ο οποίος είναι ο πιο διαδεδομένος αναστολέας της εδώ και μισό αιώνα περίπου. Όμως, η αλλοπουρινόλη προκαλεί παρενέργειες, όπως γαστρεντερική δυσφορία, αντιδράσεις υπερευαισθησίας, δερματικά εξανθήματα και επιπλέον ορισμένοι ασθενείς εμφανίζουν δυσανεξία στο μόριο. Για τον λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της δομής του ενζύμου, καθώς και η ικανότητα διαφόρων μορίων να το αναστέλλουν. Ως πηγή οξειδάσης της ξανθίνης χρησιμοποιήθηκε βόειο γάλα, το οποίο είναι γνωστό εδώ και πολλές δεκαετίες ότι περιέχει σημαντική ποσότητα του ενζύμου.

Η μέθοδος απομόνωσης του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται σε αυτήν που αναπτύχθηκε από τον Ball και βελτιώθηκε από τους Nishino και συνεργάτες, οι οποίοι ανέπτυξαν και τη μέθοδο με την οποία πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός της ΧΟ σε στήλη EAH Sepharose 4B/folic Acid (Ball, 1938; Nishino et al., 1981). Ο καθαρισμός εκτελέστηκε με το μηχάνημα υγρής χρωματογραφίας ÄKTApurifier UPC 10. Μετά τον καθαρισμό του, το ένζυμο ελέγχθηκε ως προς τη δραστικότητα του και έγιναν δοκιμές κρυστάλλωσης σε πληθώρα συνθηκών, με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια από τις παρακάτω εταιρίες. AppliChem: ammonium sulfate, L-cystein, sodium pyrophosphate decahydrate. Pancreac: coomassie brilliant blue R250, EDTA. SIGMA: folic acid, SDS, sodium salicylate. SERVA: glycine. SDS: glycerol, PEG-40000. MERCK: di-potassium hydrogen phosphate, potassium di-hydrogen phosphate, sodium acetate tri-hydrate, sodium chloride, sodium di-hydrogen phosphate –monohydrate, sodium hydroxide pellets. Research Organics: bromophenol blue. Bio-Rad: Quick Start™ Bradford

### Υλικά

- i. **Συμπύκνωση πρωτεϊνών:** Polyethylene glycol, PEG 40000, της εταιρίας Serva, φίλτρα μη περατά από μόρια μεγαλύτερα των 10 kDa, της εταιρίας VIVASPIN.
- ii. **Χρωματογραφία:** Στήλη Sephadex G-25 σε κολώνα C26/40, της εταιρείας GE Healthcare.
- iii. **Κρυστάλλωση πρωτεϊνών:** Πλάκες Linbro για την τεχνική της καθήμενης και της κρεμάμενης σταγόνας (sitting drop και hanging drop) και γυάλινες καλυπτρίδες.

### Όργανα

Ζυγοί 420-3NM και 440-47N (KERN), αναδευτήρες yellow line MSC basic C (IKA®) και GFL 3015, πεχάμετρο 827 pH Lab Meter (Metrohm®), Vortex MS2 Minishaker (IKA®) και V-1 plus (G.KISKER), φυγόκεντρος centrifuge 5810R (eppendorf), ψυχώμενη φυγόκεντρος sorvall RC5-C (DuPont, Wilmington-USA), μίνι- φυγόκεντρος centrifuge 5415D (eppendorf), αντλία κενού Buchner (Pall, Live Sciences), φωτόμετρο Spectronic Unicam 4001/4 (Spectronic®), φωτόμετρο UV Spectronic Unicam Genesys 10UV (Spectronic®), συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini- PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), μηχανήμα υγρής χρωματογραφίας ÄKTApurifier UPC 10, αυτόματο μηχανήμα κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments), στερεοσκόπιο Leica MZ16 εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα.

## ΜΕΘΟΔΟΙ

Η απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης πραγματοποιήθηκε από βόειο γάλα, το οποίο δεν υπέστη καμία προηγούμενη επεξεργασία (όπως παστερίωση) και προήλθε από μία μόνο αγελάδα, ώστε να αποφευχθεί η ετερογένεια του ενζύμου. Η διαδικασία απομόνωσης που περιγράφεται παρακάτω ξεκίνησε λίγη μόνο ώρα μετά το άρμεγμα και μπορεί να χωριστεί σε 4 ημέρες.

### Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα

#### 1<sup>η</sup> ημέρα

- Το γάλα φυγοκεντρείται στα 2000g και στους 4 °C, για 30 λεπτά και η κρέμα που σχηματίζεται στην επιφάνεια του γάλακτος συλλέγεται. Στην περίπτωση που η θερμοκρασία της φυγοκέντρωσης πέσει χαμηλότερα από τους 4 °C, παρατηρείται ο σχηματισμός βουτύρου και είναι απαραίτητη η θέρμανση του γάλακτος στους 30 °C, ώσπου να διαλυθεί το βούτυρο και να είναι εφικτός ο διαχωρισμός της κρέμας.
- Η κρέμα ζυγίζεται και επαναδιαλύεται σε τρεις όγκους (100gr κρέμα σε 300ml διάλυμα) διαλύματος (0,2M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2mM EDTA, 5mM cysteine-HCl, 1mM sodium salicylate), υπό ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το pH ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί και αν χρειάζεται ρυθμίζεται με NaOH στο 8 – 8,3.
- Το διάλυμα της κρέμας επωάζεται υπό ανάδευση, 85rpm, για 2 ώρες στους 38°C.
- Προστίθεται παγκρεατίνη με αναλογία: 1,6gr παγκρεατίνης / 1lt διαλύματος κρέμας και αφήνεται να διαλυθεί υπό ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα κρέμας επωάζεται, 85rpm, 3ώρες, 37,5°C.
- Το διάλυμα της κρέμας φυλάσσεται στους 4°C για 12-16 ώρες.

#### 2<sup>η</sup> ημέρα

- Στο διάλυμα κρέμας προστίθεται ένας όγκος (ίσος με την αρχική μάζα κρέμας που συλλέχθηκε) διαλύματος (0,2M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2mM EDTA, 5mM

cysteine-HCl, 1mM sodium salicylate) και αφήνεται να επαναδιαλυθεί, υπό απαλή ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προστίθεται 15% v/v 1-βουτανόλη (παγωμένη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ ), υπό πολύ γρήγορη ανάδευση και σε απαγωγό. Η προσθήκη της βουτανόλης πραγματοποιείται αργά, εντός 10-20 λεπτών και στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται υπό απαλή ανάδευση με μαγνήτη, στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά.
- Προστίθεται θειικό αμμώνιο με αναλογία 15gr / 100ml κρέμας. Το άλας προστίθεται πολύ αργά, ώστε να αποφεύγονται η τοπικά υψηλές συγκεντρώσεις, υπό απαλή ανάδευση στους  $4^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση στις ίδιες συνθήκες για ακόμα 30 λεπτά.
- Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 12-16 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$

### **3<sup>η</sup> ημέρα**

- Το διάλυμα κρέμας φυγοκεντρείται στα 5000g,  $4^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται τρεις φάσεις, επάνω η φάση του οργανικού διαλύτη (έντονη κίτρινη, διαυγής), ενδιάμεσα το λίπος (λευκό, στερεό) και κάτω η υδατική φάση (υποκίτρινη, σχετικά διαυγής).
- Με αντλία κενού αφαιρείται η φάση του οργανικού διαλύτη και με ένα κουτάλι η μεγαλύτερη ποσότητα λίπους.
- Τα υπολείμματα λίπους που παρέμειναν στην υδατική φάση απομακρύνονται με φιλτράρισμα μέσω υαλοβάμβακα. Εάν χρειαστεί το φιλτράρισμα επαναλαμβάνεται.
- Προστίθεται θειικό αμμώνιο με αργό ρυθμό, σε αναλογία 20gr / 100ml υδατικής φάσης, υπό απαλή ανάδευση στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Έπειτα, το διάλυμα αφήνεται υπό απαλή ανάδευση για ακόμα 30 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Οι πρωτεΐνες τώρα επιπλέουν στην επιφάνεια του διαλύματος και συλλέγονται προσεκτικά με ένα ποτήρι ζέσεως.
- Οι πρωτεΐνες φυγοκεντρούνται σε σωληνάκια Corex στα 9500g,  $4^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται τρεις φάσεις, επάνω η φάση

του οργανικού διαλύτη (έντονη κίτρινη, διαυγής), ενδιάμεσα καφέ ίζημα και κάτω η υδατική φάση (υποκίτρινη, διαυγής).

- Αποχύνονται με προσοχή οι φάσεις του οργανικού διαλύτη και της υδατικής φάσης και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα Α (σελ. 42).
- Το πρωτεϊνικό διάλυμα υποβάλλεται σε 24ώρη διαπίδυση σε διάλυμα Α, υπό απαλή ανάδευση και με συχνές αλλαγές του διαλύματος.

#### **4<sup>η</sup> ημέρα**

- Το πρωτεϊνικό διάλυμα φυγοκεντρείται σε σωληνάκια Corex, στα 17000g, 4°C για 30 λεπτά. Από τη φυγοκέντρηση προκύπτει καφεπορτοκαλί, διαυγές υπερκείμενο και λευκό ίζημα.
- Το υπερκείμενο φιλτράρεται μέσω φίλτρου 0,45μm και φυλάσσεται στους 4°C, ενώ το ίζημα απορρίπτεται.

#### **Χρωματογραφία συγγένειας**

Για να καθαριστεί η οξειδάση της ξανθίνης από το σύνολο των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από το γάλα πραγματοποιείται χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη EAH Sepharose 4B με συζευγμένο φολικό οξύ. Το φολικό οξύ συνδέεται ειδικά με την οξειδάση της ξανθίνης, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες διαπερνούν τη στήλη. Στη συνέχεια η οξειδάση της ξανθίνης εκλούεται από τη στήλη, ύστερα από τη διαβίβαση αλλοπουρινόλης, η οποία είναι προσδέτης της.

#### **Δημιουργία στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid**

Για τη δημιουργία της ρητίνης αγχιστείας φολικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν 30ml σφαιριδίων EAH Sepharose, τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα σε αιθανόλη.

- Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, τα σφαιρίδια εκπλένονται με 10 όγκους στήλης dH<sub>2</sub>O, pH=4,5 και στη συνέχεια με 2,4lt 0,5M NaCl (80ml / 1ml στήλης).
- Η ρητίνη καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και σε αυτήν προστίθεται το διάλυμα του πίνακα 1 και 0,375gr EDC.

Πίνακας 1. Διάλυμα πρόσδεσης φολικού οξέος στα σφαιρίδια

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	25ml
dH <sub>2</sub> O	25ml
Φολικό οξύ	0,049gr
pH=6 (πεχαμετρικό χαρτί) 10M NaOH	

- Η ρητίνη αφήνεται υπό απαλή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Αφότου περάσει μία ώρα το pH της στήλης ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί και αν έχει ελαττωθεί ρυθμίζεται σε pH=6 με NaOH.
- Μετά τις τρεις ώρες η ρητίνη φυγοκεντρείται στα 2500g για 20 λεπτά και απομακρύνεται προσεκτικά το υποκίτρινο υπερκείμενο.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται από την προσθήκη του διαλύματος και μετά. Στην περίπτωση που το υπερκείμενο παραμένει υποκίτρινο η διαδικασία επαναλαμβάνεται ξανά, έως ότου το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης να καταλήξει με έντονο κίτρινο χρώμα.
- Τελικά η ρητίνη πακετάρεται σε άδεια στήλη.
- Για να απομακρυνθεί η περίσσεια φολικού οξέος από τη ρητίνη γίνεται πλύση της με 2 όγκους στήλης διαλύματος 1 (0,1M Sodium Acetate Tri-Hydrate, 0,5M NaCl, 50%DMF, pH=4) και έπειτα 2 όγκους στήλης διαλύματος 2 (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 50%DMF, pH=8) (το pH στα διαλύματα DMF ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί).
- Η έκπλυση της ρητίνης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, με εναλλαγή των pH από χαμηλό σε υψηλό.
- Στη στήλη διαβιβάζονται 4 όγκοι στήλης DMF 50% και 10 όγκοι στήλης dH<sub>2</sub>O.
- Η στήλη μεταφέρεται στους 4°C, θερμοκρασία στην οποία θα πραγματοποιηθεί η χρωματογραφία.



### **Αναγέννηση στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid**

Μετά από επανειλημμένες χρήσεις η ικανότητα της ρητίνης να κατακρατά την οξειδάση της ξανθίνης μειώνεται, καθώς εξασθενεί και το κίτρινο χρώμα της. Σε αυτή την περίπτωση απαιτείται αναγέννηση της ρητίνης, δηλαδή εκ νέου πρόσδεση φολικού οξέος στα σφαιρίδια της.

- Στη στήλη διαβιβάζονται 2 όγκοι στήλης διαλύματος 2 (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 50%DMF, pH=8) και στη συνέχεια 2 όγκοι στήλης διαλύματος 1 (0,1M Sodium Acetate Tri-Hydrate, 0,5M NaCl, 50%DMF, pH=4). Σε αντίθεση με την απομάκρυνση της περίσσειας φολικού οξέος παραπάνω, στην αναγέννηση διαβιβάζεται πρώτα το υψηλό pH και έπειτα το χαμηλό.
- Η έκπλυση της στήλης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, με εναλλαγή των pH από υψηλό σε χαμηλό.
- Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία δημιουργίας της στήλης από το δεύτερο βήμα και μετά (Η στήλη καλύπτεται με αλουμινόχαρτο...), όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

### **Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη EAH Sepharose 4B/folic Acid**

Ο καθαρισμός της οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το πρωτεϊνικό δείγμα που απομονώθηκε από το γάλα διαβιβάζεται από τη στήλη φολικού οξέος, με αποτέλεσμα η οξειδάση της ξανθίνης να κατακρατείται στη στήλη, και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες να τη διαπερνούν. Στη συνέχεια η οξειδάση της ξανθίνης εκλύεται από τη στήλη, μετά τη διαβίβαση διαλύματος αλλοπουρινόλης, η οποία ανταγωνίζεται το φολικό για την πρόσδεση της στο ένζυμο. Κατά το δεύτερο στάδιο η οξειδάση της ξανθίνης που απομονώθηκε και είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη διαβιβάζεται από τη στήλη. Το πολύ ενεργό ένζυμο τη διαπερνά, ενώ το χαμηλής ενεργότητας δεσμεύεται στη στήλη και εκλύεται όπως προηγουμένως.

Η χρωματογραφία πραγματοποιείται στους 4°C και όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται (πίνακας 2) είναι φιλτραρισμένα (0,22μm) και απαερωμένα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρακολουθείται το pH, η αγωγιμότητα και η

απορρόφηση στα 280nm της υγρής φάσης που εξέρχεται από τη στήλη. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχάνημα ÄKTApurifier UPC 10

#### Στάδιο 1:

- Η στήλη φολικού οξέος εξισορροπείται με 10 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος A με ροή 2ml/min.
- Διαβιβάζεται το πρωτεϊνικό δείγμα με ροή 0,5ml/min και συλλέγονται κλάσματα (flow through). Καθώς το δείγμα διέρχεται της στήλης αυτή αποκτά ελαφρώς καφέ χρώμα. Η εισαγωγή του δείγματος σταματά όταν το καφέ χρώμα καλύψει το 1/3 της στήλης.
- Ακολουθεί πλύση της στήλης με 5 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος B και ροή 2ml/min, συλλέγονται κλάσματα (wash).
- Η έκλουση της οξειδάσης της ξανθίνης γίνεται με 3 όγκους στήλης διαλύματος C, 1ml/min και συλλέγονται τα κλάσματα (elution).
- Τελικά, διαβιβάζονται στη στήλη 5 όγκοι διαλύματος D και έπειτα 10 όγκοι dH<sub>2</sub>O, 2ml/min.

Η οξειδάση της ξανθίνης περιέχεται σε ορισμένα από τα κλάσματα έκλουσης. Η ύπαρξη του ενζύμου σε αυτά τα κλάσματα επιβεβαιώνεται από την αυξημένη απορρόφηση τους στα 280nm, καθώς και από το ελαφρώς καφέ χρώμα που διαθέτουν (η οξειδάση της ξανθίνης είναι καφέ). Τα κλάσματα αυτά συγκεντρώνονται και υποβάλλονται σε O/N διαπίδυση έναντι διαλύματος A στους 4°C.

Πίνακας 2. Διαλύματα χρωματογραφίας

Διάλυμα Α	<b>80%:</b>	<b>20%:</b>
	50mM Tris-HCl 0,2mM EDTA pH= 7,8	0,1M sodium pyrophosphate 0,2mM EDTA pH= 8,5
Διάλυμα Β	<b>70%:</b>	<b>30%:</b>
	50mM Tris-HCl 0,2mM EDTA pH= 7,8	0,1M sodium pyrophosphate 0,2mM EDTA pH= 8,5
Διάλυμα C  2,5mM allopurinol	<b>70%:</b>	<b>30%:</b>
	50mM Tris-HCl 0,2mM EDTA pH= 7,8	0,1M sodium pyrophosphate 0,2mM EDTA pH= 8,5
Διάλυμα D	0,1 sodium pyrophosphate pH= 8,5	

Στάδιο 2:

- Το δείγμα οξειδάσης της ξανθίνης, που απομονώθηκε από το 1<sup>ο</sup> στάδιο, συμπυκνώνεται σε όγκο που αντιστοιχεί στο 10-20% του όγκου στήλης, με χρήση PEG40000.
- Η στήλη φολικού οξέος εξισορροπείται με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος Α, με ροή 2ml/min.
- Στη στήλη διαβιβάζεται το δείγμα οξειδάσης της ξανθίνης, με ροή 0,5ml/min και συλλέγονται κλάσματα (flow through).
- Έπειτα, στη στήλη διαβιβάζονται 5 όγκοι διαλύματος Β, με ροή 2ml/min και συνεχίζουν να συλλέγονται κλάσματα (wash).

- Η έκλυση πραγματοποιείται με 3 όγκους διαλύματος C, 1ml/min και τα κλάσματα που συλλέγονται περιέχουν το χαμηλής δραστηριότητας ένζυμο.
- Τελικά, γίνεται πλύση της στήλης με 5 όγκους στήλης διαλύματος D και στη συνέχεια 10 όγκους στήλης dH<sub>2</sub>O, 2ml/min.

Το υψηλής ενεργότητας ένζυμο, που μας ενδιαφέρει, βρίσκεται σε ορισμένα κλάσματα flow through και wash και ταυτοποιείται όπως πρωτύτερα, λόγω της αυξημένης απορρόφησης (280nm) και του καφέ χρώματος των κλασμάτων.

### **Μελέτη δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης**

Η μελέτη δραστηριότητας της XO πραγματοποιήθηκε με το υπόστρωμα της, την ξανθίνη και όσο το ένζυμο ήταν ακόμα συνδεδεμένο με αλλοπουρινόλη. Από την οξείδωση της ξανθίνης παράγεται ουρικό οξύ, το οποίο απορροφά στα 295nm. Επομένως, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου, με παρακολούθηση της αύξησης της απορρόφησης (295nm) σε σχέση με το χρόνο. Στο δείγμα αντίδρασης περιέχονται 20μM ξανθίνης, 0,06mg XO και ρυθμιστικό διάλυμα (33mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 33mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1mM EDTA, pH=7,5) σε τελικό όγκο 500μl. Αρχικά, πραγματοποιείται μηδενισμός του φωτόμετρου με το ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση του τυφλού ενζύμου και του τυφλού υποστρώματος. Στην κυψελίδα προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα με τη ξανθίνη και τελευταίο το ένζυμο και η απορρόφηση μετράται στα 295nm, ανά 5 δευτερόλεπτα έως ότου σταθεροποιηθεί. Από τις οπτικές απορροφήσεις του δείγματος αντίδρασης αφαιρείται το τυφλό υποστρώματος και το τυφλό ενζύμου και κατασκευάζεται καμπύλη απορρόφησης-χρόνου.

### **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων υπό αποδιατακτικές συνθήκες**

Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες γίνεται χρήση SDS (SDS-PAGE), το οποίο είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αποτέλεσμα αυτής της πρόσδεσης είναι η αποδιάταξη των

πρωτεϊνών και η απόκτηση ενός αρνητικού φορτίου. Κατά συνέπεια με την SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάση του μεγέθους τους.

#### Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή στην οποία πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή επιστοίβαξης (πίνακας 3) έχει ποσοστό ακρυλαμίδιου 5% και σε αυτήν πακετάρονται οι πρωτεΐνες υπό σταθερή τάση.

Πίνακας 3. Πηκτή επιστοίβαξης 5%

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)
ακρυλαμίδιο 30%	0,5
1M Tris-HCl (pH=6,8)	0,38
SDS 10%	0,03
TEMED	0,003
APS 10%	0,03
dH <sub>2</sub> O	2,1

Το ποσοστό ακρυλαμίδιου της πηκτής διαχωρισμού εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών που αναλύονται. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού με περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο 12% (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Πηκτή διαχωρισμού 12%

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)
ακρυλαμίδιο 30%	2
1,5M Tris-HCl (pH=8,8)	1,3
SDS 10%	0,05
TEMED	0,002
APS 10%	0,05
dH <sub>2</sub> O	1,6

### Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Στα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer 4x) (πίνακας 5). Στη συνέχεια, τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Πίνακας 5. Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού 4X

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris-HCl (pH=6,8)	62,5mM
SDS 10%	2%
γλυκερόλη	10%
B-μερκαπτοαιθανόλη	2%
bromophenol blue	0,05%

### Ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους φορτώνονται στα βοθρία (πηγαδάκια) της πολυμερισμένης πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (running buffer) (πίνακας 6), το οποίο εξασφαλίζει τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος της πηκτής.

Πίνακας 6. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
γλυκίνη	14,41gr
Tris	3,0275gr
SDS	1gr
dH <sub>2</sub> O	έως 1L

Στο σύστημα εφαρμόζεται τάση ίση με 180V, έως ότου τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοίβαξης και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 200V.

### Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση των πηκτών πραγματοποιήθηκε με κυανό του Coomassie. Αρχικά, η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωματισμού (staining solution) (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 0,2% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250, dH<sub>2</sub>O) για 30 λεπτά υπό χαμηλή ανάδευση. Έπειτα, το διάλυμα χρωματισμού απομακρύνεται και στην πηκτή προστίθεται διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, dH<sub>2</sub>O). Η πηκτή αφήνεται υπό ανάδευση έως ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες και μπορεί να διατηρηθεί σε υδατικό διάλυμα 5% οξικού οξέος.

### Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα υπολογίστηκε τόσο με μέτρηση της απορρόφησης τους στα 280nm, όσο και με τη μέθοδο Bradford.

### Φασματοσκοπικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών

Τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Επομένως, αν η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε αυτά τα αμινοξέα είναι γνωστή, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Αφού μετρηθεί η απορρόφηση του πρωτεϊνικού δείγματος στα 280nm, γίνεται χρήση του παρακάτω εμπειρικού τύπου για να υπολογισθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

$$Molarity = \frac{OD_{280} \times \text{αραίωση}}{5500N_w + 4910N_\gamma + 125N_{S-S}}$$

Όπου:

$N_w$ : ο αριθμός καταλοίπων τρυπτοφάνης

$N_\gamma$ : ο αριθμός καταλοίπων τυροσίνης

$N_{S-S}$ : ο αριθμός δισουλφιδικών δεσμών

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο νόμος Beer-Lambert, που συνδέει την απορρόφηση του φωτός με τις ιδιότητες του μέσου το οποίο διασχίζει.

$$OD_{280} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου:

$OD_{280}$ : η απορρόφηση του δείγματος στα 280nm

$\varepsilon$ : ο συντελεστής αποσβέσεως της πρωτεΐνης  $cm^{-1} \cdot (mg/ml)^{-1}$

$b$ : το μήκος της κυψελίδας  $cm$

$c$ : η συγκέντρωση της πρωτεΐνης  $mg/ml$

Ο συντελεστής αποσβέσεως για την οξειδάση της ξανθίνης είναι  $\varepsilon = 1,17 \text{ cm}^{-1} \cdot (mg/ml)^{-1}$ .

### Μέθοδος Bradford

Στη μέθοδο Bradford οι πρωτεΐνες που περιέχονται σε ένα δείγμα αντιδρούν με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία βρίσκεται στο αντιδραστήριο Bradford. Η αντίδραση αυτή προκαλεί τη μετατροπή του κόκκινου χρώματος της χρωστικής σε μπλε και κατά συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης του δείγματος στα 595nm. Για ένα ορισμένο εύρος τιμών, η συγκέντρωση του δείγματος σε πρωτεΐνη είναι ανάλογη της οπτικής απορρόφησης, μετά την αντίδραση, και μπορεί να προσδιορισθεί μέσω μιας πρότυπης καμπύλης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιείται διάλυμα της πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin) γνωστής συγκέντρωσης. Παρασκευάζεται μια σειρά αντιδράσεων για διαφορετικές συγκεντρώσεις BSA:

Το αντιδραστήριο Bradford προστίθεται τελευταίο, τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Έπειτα μετράται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 595nm και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη.

Με τον ίδιο τρόπο η δοκιμασία πραγματοποιείται για το δείγμα πρωτεΐνης και από την οπτική απορρόφηση του προσδιορίζεται η συγκέντρωση, με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.



Πίνακας 7. Σχεδιασμός αντιδράσεων για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης BSA

<b>[BSA] (mg/ml)</b>	<b>Διάλυμα BSA 500mg/ml (μl)</b>	<b>Buffer* (μl)</b>	<b>Αντιδραστήριο Bradford (μl)</b>
<b>0 (τυφλό)</b>	-	20	980
<b>0,2</b>	0,4	19,6	980
<b>0,4</b>	0,8	19,2	980
<b>0,6</b>	1,2	18,8	980
<b>0,8</b>	1,6	18,4	980
<b>1</b>	2	18	980
<b>1,2</b>	2,4	17,6	980

\* Το buffer είναι ίδιο με αυτό του διαλύματος πρωτεΐνης, η συγκέντρωση της οποίας ερευνάται.

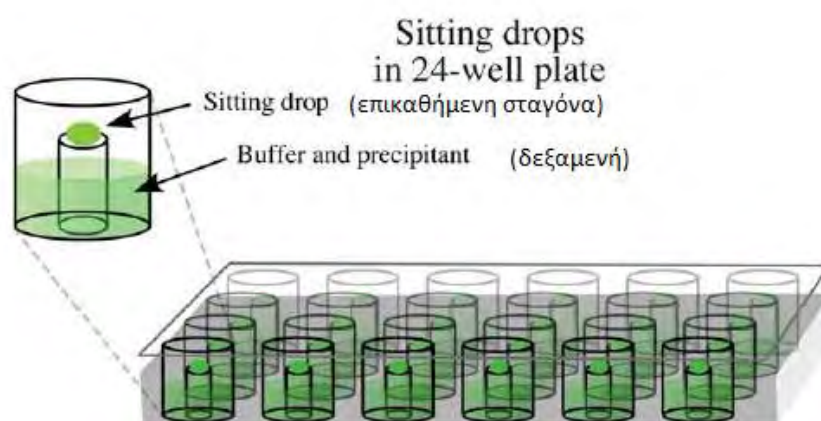
### Κρυστάλλωση

Για την κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, αυτή της επικαθήμενης σταγόνας (sitting drop) και η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop). Και οι δύο αυτές μέθοδοι ανήκουν στην κατηγορία της διάχυσης ατμών. Γενικά, στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών μέσω διάχυσης ατμών, μια σταγόνα που περιέχει πρωτεΐνη, ρυθμιστικό διάλυμα και κατακρημνιστικό παράγοντα αφήνεται να εξισορροπηθεί με μια μεγαλύτερη δεξαμενή, που περιέχει παρόμοια ρυθμιστικά διαλύματα και κατακρημνιστικούς παράγοντες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Σαν αποτέλεσμα, το νερό εξατμίζεται από τη σταγόνα και μεταφέρεται στη δεξαμενή, ενώ η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα αυξάνεται σταδιακά στη σταγόνα. Τελικά, η σταγόνα καθίσταται υπέρκορη και η πρωτεΐνη εναποτίθεται σε κρυστάλλους.

### Μέθοδος της επικαθήμενης σταγόνας

Στη μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας χρησιμοποιείται μια πλάκα Linbro, η οποία διαθέτει μια ειδική υποδοχή ή βοθρίο, στην οποία τοποθετείται η σταγόνα. Το ρυθμιστικό διάλυμα και ο παράγοντας κατακρήμνισης προστίθενται στη δεξαμενή.

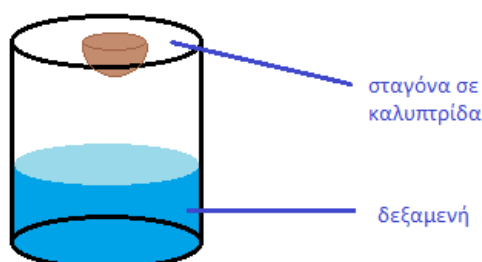
Ορισμένα  $\mu\text{l}$  οξειδάσης της ξανθίνης αναμιγνύονται με κάποια ποσότητα διαλύματος από τη δεξαμενή και τοποθετούνται στο βοθρίο (**εικόνα 12**). Η πλάκα κλείνεται ερμητικά με διάφανη ταινία και αφήνεται σε σταθερή θερμοκρασία. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για προετοιμασία κρυσταλλώσεων και με το ρομπότ κρυσταλλώσεων OryxNano (Douglas Instruments).



Εικόνα 12. Πλάκα Linbro για τη μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας. Εικόνα από Gale Rhodes, *Crystallography made crystal clear*, (2006).

### Μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας

Η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας χρησιμοποιεί την ίδια αρχή με αυτή της επικαθήμενης σταγόνας, με μόνη διαφορά ότι η σταγόνα τοποθετείται σε καλυπτρίδα. Αρχικά, η περιοχή γύρω από τις δεξαμενές της πλάκας Linbro επαλείφεται με σιλκόνη (η πλάκα αυτή δεν περιέχει βοθρία). Ορισμένος όγκος πρωτεΐνης αναμιγνύεται με μερικά  $\mu\text{l}$  διαλύματος από τη δεξαμενή και τοποθετούνται σε καλυπτρίδα. Έπειτα η καλυπτρίδα προσκολλάται στην πλάκα, έτσι ώστε η σταγόνα να αιωρείται πάνω από τη δεξαμενή (**εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας.

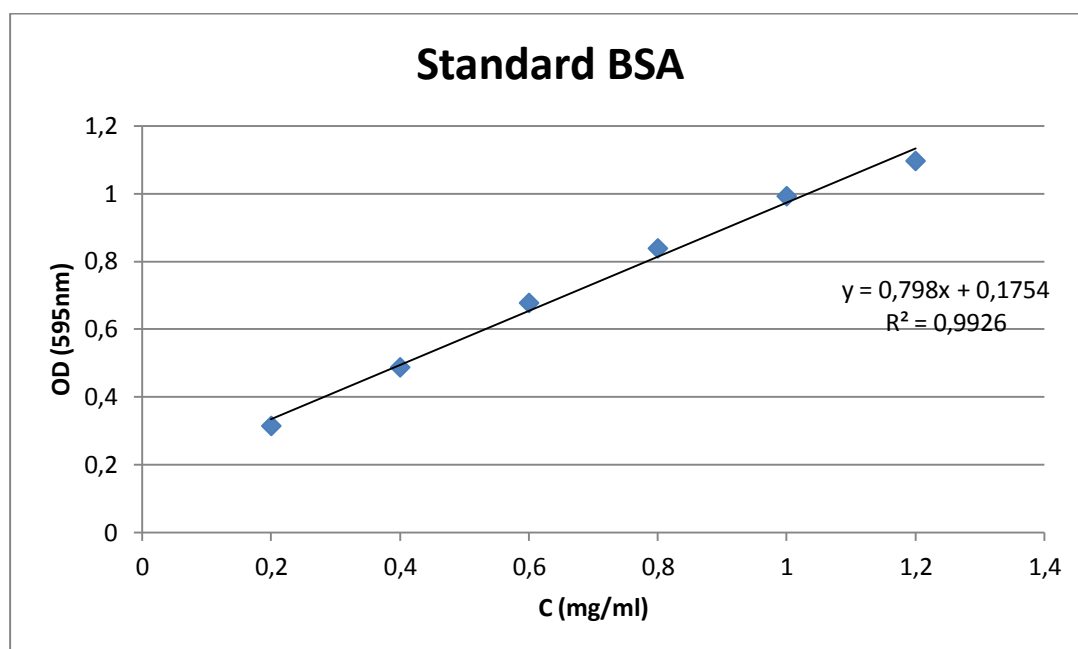
### **Τεχνική ενπυρήνωσης (seeding drop)**

Κατά τις προσπάθειες κρυστάλλωσης της ΧΟ χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική της ενπυρήνωσης. Στην ενπυρήνωση, προηγούμενοι μικροί κρύσταλλοι πρωτεΐνης θραύονται με τη βοήθεια γυάλινου ακροδέκτη και αναδευτήρα και τοποθετούνται στη σταγόνα μαζί με την πρωτεΐνη (σε κρεμάμενη ή επικαθήμενη σταγόνα). Το πλεονέκτημα που προσφέρει η ενπυρήνωση είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων μεγαλύτερου μεγέθους.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα

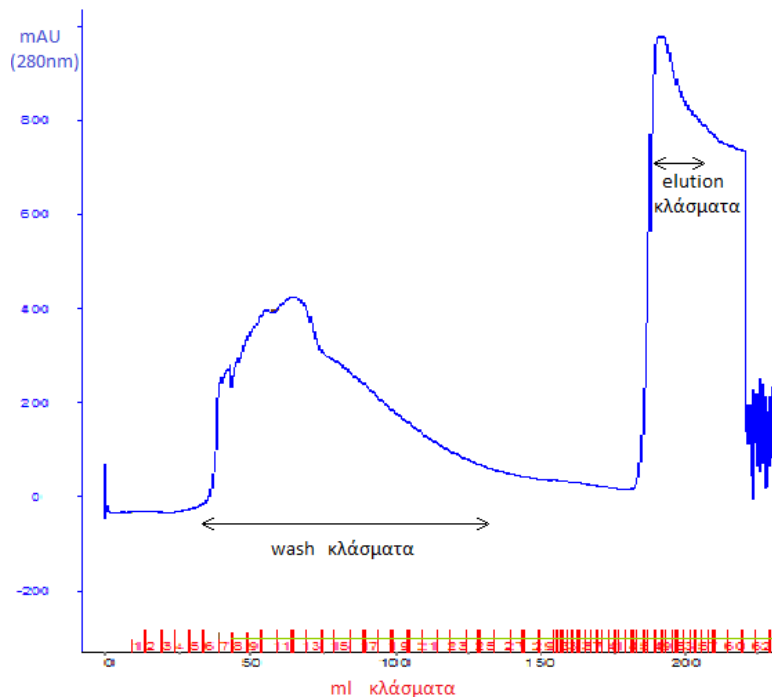
Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε από 6 lt γάλακτος, τα οποία έδωσαν 517gr κρέμας. Μετά την τέταρτη μέρα της απομόνωσης το σύνολο των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από το γάλα αντιστοιχούσε σε 380mg, που υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford (**εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Πρότυπη καμπύλη BSA για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τη μέθοδο Bradford.

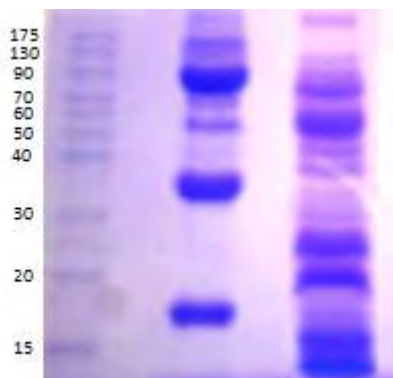
### Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας

Το πρωτεϊνικό δείγμα που απομονώθηκε από το γάλα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία συγγένειας, με εκλουστικό μέσο την αλλοπουρινόλη. Το χρωματογράφημα περιγράφει την απορρόφηση των κλασμάτων στα 280 nm, με τη σειρά που αυτά προέκυψαν.

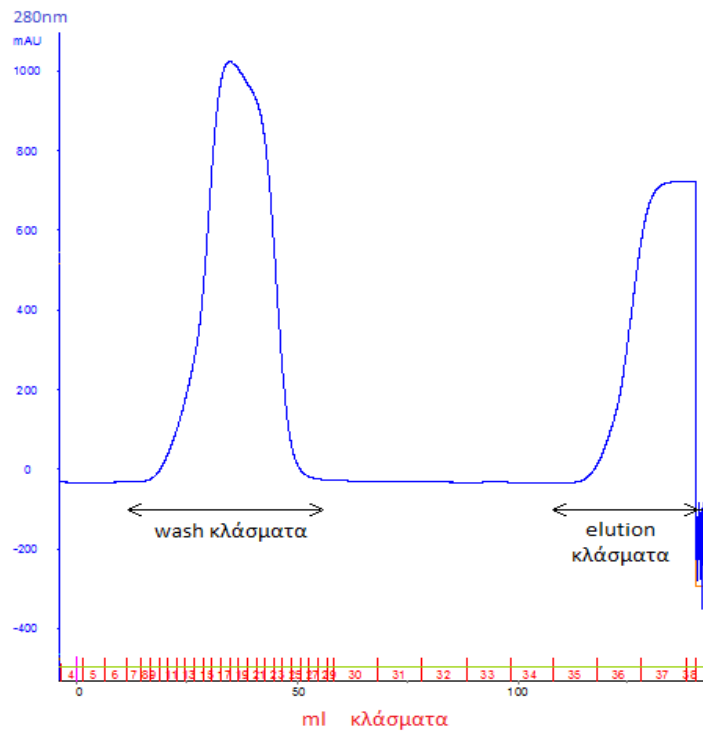


Εικόνα 15. Χρωματογράφημα 1<sup>ου</sup> σταδίου του καθαρισμού.

Από το στάδιο 1 τα υπογραμμισμένα κλάσματα wash περιείχαν τις πρωτεΐνες που δεν κατακρατήθηκαν από τη στήλη, ενώ τα κλάσματα elution την οξειδάση της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης που απομονώθηκε από το 1ο στάδιο αντιστοιχούσε σε 27mg και το δείγμα της υποβλήθηκε στο 2ο στάδιο της χρωματογραφίας. Τα κλάσματα wash και elution υποβλήθηκαν σε SDS ηλεκτροφόρηση (εικόνα 16). Η οξειδάση της ξανθίνης κατά την ηλεκτροφόρηση της διαχωρίζεται σε τρεις ζώνες 85, 40 και 20 kDa, δηλαδή στις τρεις τις υπομονάδες.



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Στην πρώτη διαδρομή έτρεξε δείγμα elution και στη δεύτερη δείγμα wash.



Εικόνα 17. Χρωματογράφημα 2<sup>ου</sup> σταδίου του καθαρισμού.

Στο στάδιο 2 τα υπογραμμισμένα κλάσματα wash περιείχαν την υψηλής ενεργότητας οξειδάση της ξανθίνης, ενώ τα υπογραμμισμένα κλάσματα elution το χαμηλής ενεργότητας ένζυμο (**εικόνα 18**). Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι η απορρόφηση των κλασμάτων elution οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία αλλοπουρινόλης, αφού τα κλάσματα αυτά περιείχαν πολύ μικρή ποσότητα ΧΟ. Η ποσότητα της υψηλής ενεργότητας ΧΟ που απομονώθηκε από το δεύτερο στάδιο αντιστοιχούσε σε 20mg.



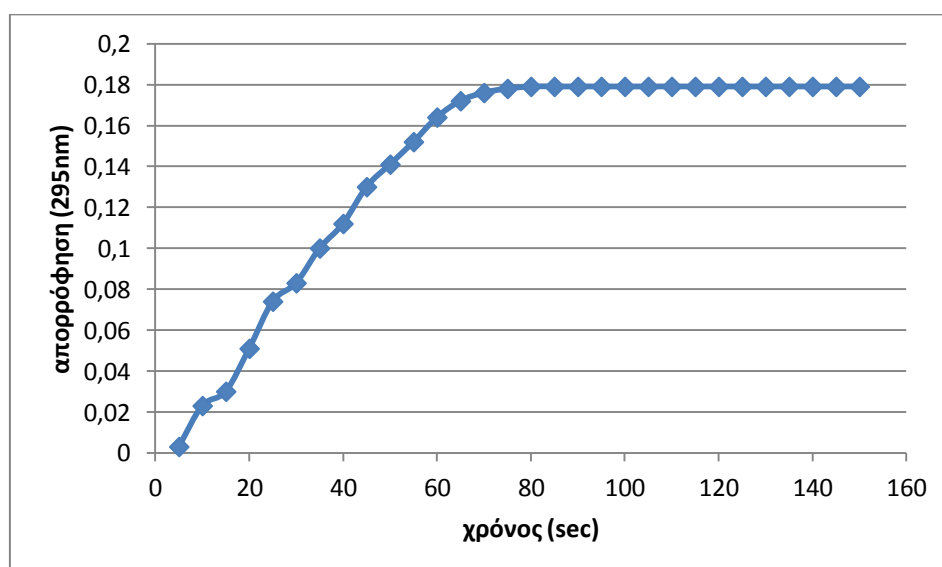
Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%. Δείγμα wash από το 2<sup>ο</sup> στάδιο της χρωματογραφίας.

## Μελέτη δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης

Στο δείγμα της ΧΟ που απομονώθηκε με χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε μελέτη της δραστικότητας του ενζύμου, με το υπόστρωμα της την ξανθίνη. Η συγκέντρωση της ξανθίνης στην αντίδραση ήταν 20μΜ και της ΧΟ 0,12mg/ml. Η αύξηση της απορρόφησης στα 295nm και συνεπώς η παραγωγή ουρικού οξέος, παρακολουθήθηκαν ανά 5 δευτερόλεπτα για 2,5 λεπτά.

Χρόνος (sec)	Απορρόφηση (295nm)	Χρόνος (sec)	Απορρόφηση (295nm)
5	0,003	80	0,179
10	0,023	85	0,179
15	0,03	90	0,179
20	0,051	95	0,179
25	0,074	100	0,179
30	0,083	105	0,179
35	0,1	110	0,179
40	0,112	115	0,179
45	0,13	120	0,179
50	0,141	125	0,179
55	0,152	130	0,179
60	0,164	135	0,179
65	0,172	140	0,179
70	0,176	145	0,179
75	0,178	150	0,179

Εικόνα 19. Μελέτη δραστικότητας ΧΟ. Τιμές απορρόφησης στα 295nm σε σχέση με το χρόνο.

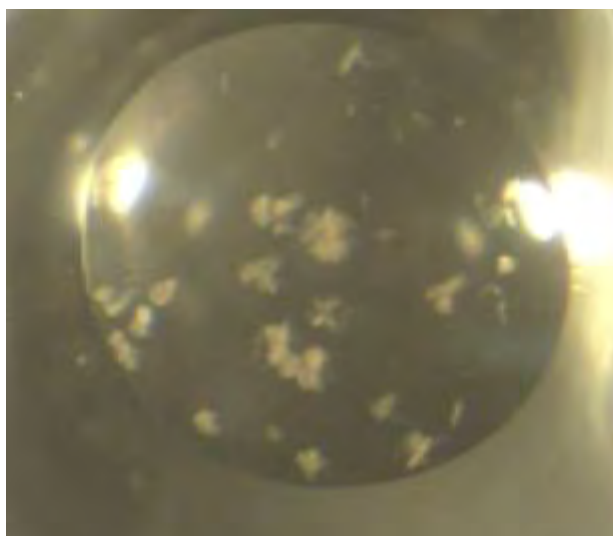


Εικόνα 20. Μελέτη δραστικότητας ΧΟ. Διάγραμμα αύξησης της απορρόφησης στα 295nm σε σχέση με το χρόνο.

Η αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, υποδηλώνει την παραγωγή ουρικού οξέος, επομένως το ένζυμο είναι δραστικό και καταλύει την αντίδραση.

### **Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης**

Έγιναν προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης σε διάφορες συνθήκες. Κάθε φορά, μία ώρα πριν από την κρυστάλλωση προστέθηκαν 5mM DTT στο δείγμα πρωτεΐνης. Στις δοκιμές αυτές οι πρωτεΐνη κατακρημνίστηκε είτε ως ίζημα, είτε σε μικρούς κρυστάλλους ανίκανους να περιθλούν τις ακτίνες Χ. Μικροί κρύσταλλοι της πρωτεΐνης προέκυψαν στους 25°C, με 17mg/ml συγκέντρωση ΧΟ και 8% v/v ethylene glycol, 10% w/v PEG 8000, 0,1 M sodium HEPES pH=7,5. Παρόλα αυτά οι επανάληψη των δοκιμών σε ίδιες ή παρόμοιες συνθήκες δεν οδήγησε στην ανάπτυξη μεγαλύτερων κρυστάλλων.



**Εικόνα 21.** Παρακολούθηση κρυστάλλων με στερεοσκόπιο Leica MZ16 και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα. Συνθήκες: 25°C, 17mg/ml ΧΟ και 8% v/v ethylene glycol, 10% w/v PEG 8000, 0,1 M sodium HEPES pH=7,5.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα μόλυβδο-φλαβινοένζυμο που συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών και συγκεκριμένα στα δύο τελευταία βήματα. Δηλαδή, την οξείδωση της ξανθίνης σε υποξανθίνη και της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ. Η ΧΟ χρησιμοποιεί το μοριακό οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων και ευθύνεται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών από το ένζυμο εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η υπέρταση, η αρτηριοσκλήρωση, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και οι βλάβες από την ισχαιμία. Επιπλέον, το ουρικό οξύ που παράγει η ΧΟ ευθύνεται για άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η ουρική αρθρίτιδα. Επομένως, η ανάπτυξη αναστολέων για το ένζυμο έχει θεραπευτική σημασία. Ο πιο διαδεδομένος αναστολέας της, η αλλοπουρινόλη, εμφανίζει σημαντικές παρενέργειες και δεν είναι ανεκτός από όλους τους ασθενείς. Στις μέρες μας, οι προσπάθειες για ανάπτυξη νέων αναστολέων της ΧΟ στρέφεται στην κατανόηση της δομής του ενζύμου. Ακόμα, η επίλυση της δομής της ΧΟ θα δώσει πληροφορίες για το μηχανισμό κατάλυσης των φυσικών της υποστρωμάτων, αλλά και για την εμπλοκή της σε παθολογικές καταστάσεις.

Προς αυτή την κατεύθυνση ήταν και ο στόχος της παρούσας εργασίας. Η ΧΟ απομονώθηκε από βόειο γάλα, με πρωτόκολλο βασισμένο σε αυτό που αναπτύχθηκε από τον Ball και βελτιώθηκε από τους Nishino και συνεργάτες (Ball, 1938; Nishino et al., 1981). Οι τελευταίοι ανέπτυξαν και τη μέθοδο με την οποία πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός της ΧΟ σε στήλη EAH Sepharose 4B/folic Acid. ). Ο καθαρισμός εκτελέστηκε με το μηχάνημα υγρής χρωματογραφίας ÄKTApurifier UPC 10.

Το ένζυμο που απομονώθηκε ήταν δραστικό και αυτό επιβεβαιώθηκε σε δοκιμή με το υπόστρωμα της ξανθίνης. Ακολούθησαν προσπάθειες για την κρυστάλλωση της ΧΟ με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών και για διάφορες συνθήκες. Σε όλες τις προσπάθειες, η πρωτεΐνη κατακρημνίστηκε μόνο σε μικρούς κρυστάλλους που δεν ήταν ικανοί να περιέλθουν τις ακτίνες Χ, ή σε ίζημα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abadeh S, Case PC, Harrison R (1992). Demonstration of xanthine oxidase in human heart. PMID: 1487010
- Achterberg PW, Nieukoop AS, Schoutsen B, de Jong JW (1988). Different ATP-catabolism in reperfused adult and newborn rat hearts. PMID: 3164169
- Bakhtiarov ZA (1989). Changes in xanthine oxidase activity in patients with circulatory failure. PMID: 2781495
- Ball EG, (1938). Xanthine oxidase: Purification & Properties. *Science*, 88, 131.
- Becker MA, Schumacher HR Jr, Wortmann RL, MacDonald PA, Eustace D, Palo WA, Streit J, Joseph-Ridge N (2005). Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. PMID: 16339094
- Becker MA, Schumacher HR, Espinoza LR, Wells AF, MacDonald P, Lloyd E, Lademacher C (2010). The urate-lowering efficacy and safety of febuxostat in the treatment of the hyperuricemia of gout: the CONFIRMS trial. PMID:20370912
- Bieber J, Terkeltaub R (2004). The role of hypertension in cyclosporine-induced hyperuricemia. PMID: 15134600
- Bray MR, Deeth RJ (1996). A Density Functional Study of Active Site Models for Xanthine Oxidase. PMID: 11666767
- Bray RC, (1975). Molybdenum iron–sulfur flavin hydroxylases & related enzymes. In *The Enzymes XII* (Boyer PD, ed.), 300-419.
- Burian RZ, (1905). Über die oxydative und die vermeintliche synthetische Bildung von Harnsäure in Rinderleberauszug. *Physiol. Chem.*, 43, 497.
- Della Corte E, Stirpe F (1968).The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. PMID:11946275
- Dent CE, Philpot GR (1954). Xanthinuria, an inborn error (or deviation) of metabolism. PMID: 13118765
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, & Pai EF, (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase & xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(20): 10723-10728.
- Friedl IP, Guerra EE, Cramer T, Giacherio D, Toledo-Pereyra LH, Till GO (1990). Histamine and xanthine oxidase in hepatic ischemia-reperfusion injury. PMID:2326971

- Gavin AD, Struthers AD (2005). Allopurinol reduces B-type natriuretic peptide concentrations and haemoglobin but does not alter exercise capacity in chronic heart failure.
- Godber B, Sanders S, Harrison R, Eisenthal R, Bray RC (1997). > or = 95% of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin. PMID:9388735
- Gonzalez EB (2012). An update on the pathology and clinical management of gouty arthritis. PMID:22069122
- Granger DN (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. PMID: 3059826
- Hille R & Massey V, (1981). Studies on the oxidative half- reaction of xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 256: 9090-9095.
- Hille R, & Nishino T, (1995). Flavoprotein structure & mechanism. 4. Xanthine oxidase & xanthine dehydrogenase. FASEB J 9: 995-1003.
- Hille R, (1996). The mononuclear molybdenum enzymes. Chem. Rev. 96: 2757-2816.
- Horiuchi H, Ota M, Kobayashi M, Kaneko H, Kasahara Y, Nishimura S, Kondo S, Komoriya K (1999). A comparative study on the hypouricemic activity and potency in renal xanthine calculus formation of two xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase inhibitors: TEI-6720 and allopurinol in rats. PMID: 10741381
- Hunt J, Massey V, Dunham WR, & Sands RH, (1993). Redox potentials of milk xanthine dehydrogenase: room temperature measurement of the FAD & 2 Fe/2 S center potentials. J. Biol. Chem. 268: 18685-18691.
- Ichida K, Amaya Y, Noda K, Minoshima S, Hosoya T, Sakai O, Shimizu N, Nishino T, (1993). Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein & chromosomal location of the gene. Gene 133(2): 279-84.
- Iwasaki T, Okamoto K, Nishino T, Mizushima J, Hori H & Nishino T (2000). Sequence motif-specific assignment of two [2Fe–2S] clusters in rat xanthine oxidoreductase studied by site-directed mutagenesis. J Biochem (Tokyo) 127: 771-778.
- Kam Z, Shore HB, Feher G (1978). On the crystallization of proteins. PMID: 691056
- Keenan T.W and Patton S (1995). The structure of milk: implications for sampling and storage. A. The milk lipid globule membrane. In Handbook of Milk Composition, ed. JENSEN, R. G., pp. 5–49. Academic Press, San Diego.

- Kuwabara Y, Nishino T, Okamoto K, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, & Nishino T, (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 8170-8175.
- Landmesser U, & Drexler H, (2002.) Allopurinol & endothelial function in heart failure: future or fantasy *Circulation* 106: 173-175.
- Linder N, Rapola J, & Raivio KO, (1999). Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab. Invest.* 79: 967–974.
- Martelin E, Palvimo JJ, Lapatto R, Raivio KO, (2000). Nuclear factor Y activates the human xanthine oxidoreductase gene promoter. *FEBS Lett.* 480(2-3): 84-8.
- Massey V, & Harris CM, (1997). Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans* 25, 750-755.
- Mather, I. H. (1987). Proteins of the milk-fat-globule membrane as markers of mammary epithelial cells and apical plasma membrane. In *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*, ed. NEVILLE, M. C. & DANIEL, C. W., pp. 217–268. Plenum Press, New York.
- McCord JM, Fridovich I (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. PMID: 4981789
- McManaman JL, Palmer CA, Wright RM, & Neville MC, (2002). Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression & localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. *J. Physiol.* 545: 567-579.
- Nishino T, & Nishino T, (1997). The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem* 272: 29859-29864.
- Nishino T, Okamoto K (2000). The role of the [2Fe-2s] cluster centers in xanthine oxidoreductase. PMID:11132637
- Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Hori H, Matsumura T, Eger BT, Pai EF & Nishino T, (2005). Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds & crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J Biol Chem* 280: 24888-24894.
- Olson JS, Ballou DP, Palmer G, & Massey V, (1974). The mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 249: 4363-4382.
- Pea F (2005). Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions. PMID: 15604604
- Rhodes (2006). Crystallography Made Crystal Clear

- Saito T, & Nishino T, (1989). Differences in redox & kinetic properties between NAD-dependent & O<sub>2</sub>-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264, 10015-10022.
- Saksela M, & Raivio KO, (1996). Cloning & expression in vitro of human xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem J* 315(Pt 1): 235-239.
- Saksela M, Lapatto R, Raivio KO, (1998). Xanthine oxidoreductase gene expression & enzyme activity in developing human tissues. *Biol Neonate.* 74(4): 274-280.
- Sarnesto A, Linder N, Raivio KO, (1996). Organ distribution & molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab Invest* 74: 48–56.
- Spanou C, Veskoukis AS, Kerasioti T, Kontou M, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D (2012). Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. PMID:22396752
- Spitzer W, (1899). Die Ueberführung von Nucleinbasen in Harnsäure durch die sauerstoffübertragende Wirkung von Gewebssauszügen. *Arch. ges. Physiol.*, 78, 192.
- Takano Y, Hase-Aoki K, Horiuchi H, Zhao L, Kasahara Y, Kondo S, & Becker MA, (2005). Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sci* 76: 1835-1847.
- Takeshi Nishino, Tomoko Nishino and Keizo Tsushima (1981). Purification of highly active milk xanthine oxidase by affinity chromatography on sepharose 4B/folate gel.
- Vettenranta K, Raivio KO (1990). Xanthine oxidase during human fetal development. PMID:2320397
- Xu P, Huecksteadt T, & Hoidal JR, (1996). Molecular Cloning & Characterization of the Human Xanthine Dehydrogenase Gene (XDH). *Genomics* 34: 173-180.
- Xu P, LaVallee P, & Hoidal JR, (2000). Repressed expression of the human xanthine oxidoreductase gene. E-box & TATA-like elements restrict ground state transcriptional activity. *J Biol Chem* 275(8): 5918-5926.
- Βούρκου Εργίνα (2011). Απομόνωση, κινητικές μελέτες και κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.
- Υφαντή Ευαγγελία (2012). Απομόνωση και κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.