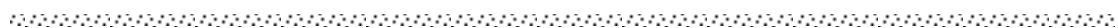
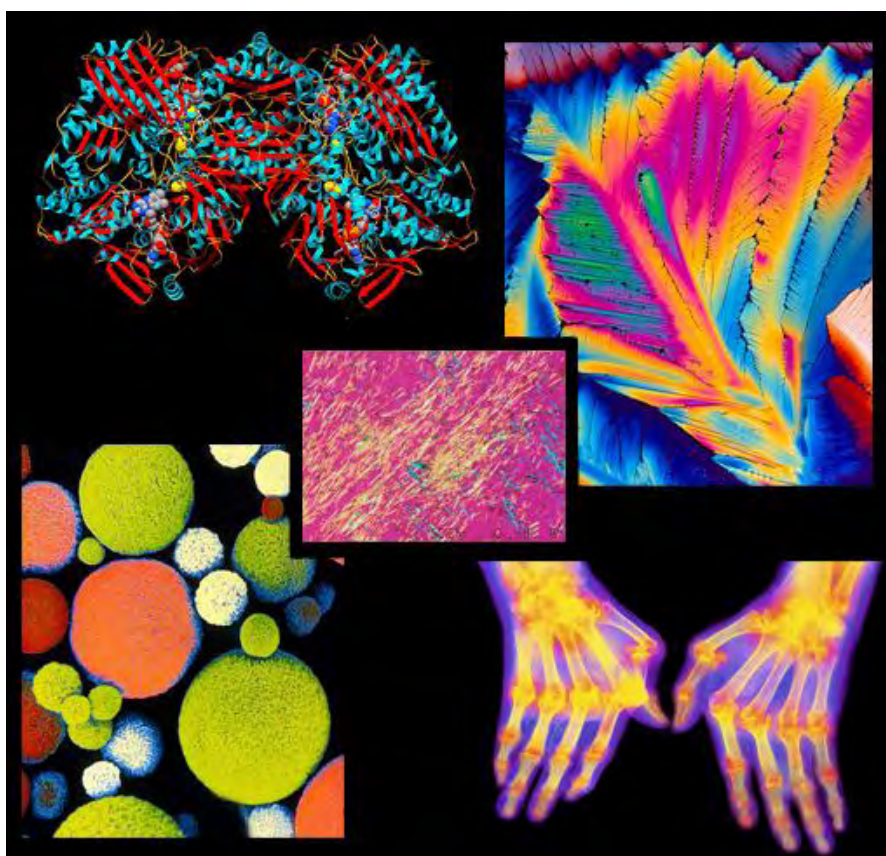




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ



ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΥΦΑΝΤΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012[©]

**«Απομόνωση και κρυστάλλωση της οξειδάσης της
ξανθίνης»**

«Purification and crystallization of xanthine oxidase»

Υπεύθυνη Δήλωση: Βεβαιώνω ότι είμαι η συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια, την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην πτυχιακή εργασία. Επίσης, έχω αναφέρει, τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η πτυχιακή εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά ειδικά για τις απαιτήσεις του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Εικόνες εξώφυλλου (από αριστερά προς τα δεξιά και κέντρο):

1. Μόριο της αφυδρογονάσης της ξανθίνης. Υπολογιστικό μοντέλο, που δείχνει τη μοριακή δομή της αφυδρογονάσης ξανθίνης (XDH).
2. Κρύσταλλοι NAD. Μικρογραφία κρυστάλλων του συνενζύμου NAD (νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο) με πολωμένο φως. Μεγέθυνση: $\times 25$ σε μέγεθος $6 \times 7 \text{ cm}$. $\times 45$ στο 4×5 .
3. Χέρια με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ενισχυμένη-χρωματισμένη εικόνα από ακτίνες X, χεριών με σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Φαίνονται οι επηρεασμένες, διογκωμένες αρθρώσεις (με πορτοκαλί) μεταξύ, των καρπικών, μετακαρπικών και φαλαγγικών οστών των δακτύλων. Οι αρθρώσεις είναι τραχείς και η παραμόρφωση είναι εμφανής.
4. Μικρογραφία σάρωσης σφαιριδίων sephadex με ψευδή χρωματισμό. Μεγέθυνση: $\times 200$ σε μέγεθος $6 \times 4.5 \text{ cm}$.
5. Κρύσταλλοι ουρικού οξέος. Μικρογραφία κρυστάλλων ουρικού οξέος με πολωμένο φως, από ασθενή με ουρική αρθρίτιδα.

Όλες οι εικόνες προέρχονται από το <http://www.sciencephoto.com>.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ): Επίκουρος Κλινικής 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.

Είναι οφειλόμενο χρέος η έκφραση ευγνωμοσύνης προς όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, ειδικότερα προς την Επίκουρο Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Κοντού Μαρία, που όρισε το θέμα, ανέλαβε ως επιβλέπουσα, με κατήυθυσε στην προσπάθεια μου και μου παρείχε τις απαραίτητες χρονικές διευκολύνσεις, που κρίθηκαν αναγκαίες προκειμένου να ολοκληρωθεί κατά το βέλτιστο η παρούσα εργασία. Επιπλέον την ευχαριστώ για την ανοχή και υπομονή, που μου επέδειξε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, κ. Λεωνίδα Δημήτριο, για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, την επιστημονική καθοδήγηση, ενθάρρυνση και τις συμβουλές, που μου προσέφερε.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Σκαμνάκη Βασιλική, για την υποδοχή και τη φιλοξενία στο εργαστήριο της, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω την Βούρκου Εργίνα, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη σημαντική συμβολή της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου, για την άφογη συνεργασία και τη φιλική συνύπαρξή μας εντός του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ΣΚΟΠΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή	14
1.1 Δομή Γονιδίου XOR	15
1.2 Έκφραση και ρύθμιση του XOR γονιδίου	16
1.3 Δομή της XOR πρωτεΐνης	18
1.3.1 Μολυβδαινική περιοχή.....	21
1.3.2 Σιδηροθειούχες περιοχές	22
1.3.3 FAD περιοχή	23
1.4 Μετατροπή XDH σε XO	23
1.5 Ρύθμιση έκφρασης και δραστηριότητας της XOR.....	27
1.6 Φυσιολογικός ρόλος της XO πρωτεΐνης	30
1.6.1 Καταβολισμός πουρινών	30
1.6.2 Αντίδραση αναγωγής και αντίδραση οξειδωσης	32
1.6.3 Αντιοξειδωτική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης.....	33
1.7 Κατανομή της XOR.....	34
1.7.1 Η οξειδάση της ξανθίνης στα θηλαστικά.....	35
1.7.2 Η οξειδάση της ξανθίνης στον άνθρωπο	36
1.7.3 Η οξειδάση της ξανθίνης στα ποντίκια	36
1.8 Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης	38
1.8.1 Οι διαδεδομένοι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης	38
1.8.2 Αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης από φυτικά εκχυλίσματα [Karmella, 2011]	41
1.9 Κλινική σημασία αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης	42
1.9.1 Αναστολείς της οξειδάσης ξανθίνης στη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας και το σύνδρομο λύσης όγκου	42
1.9.2 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στην ισχαιμία- επαναιμάτωση	43
1.9.2.1 Η οξειδάση της ξανθίνης στην ισχαιμία- επαναιμάτωση του μυοκαρδίου	44
1.9.2.2 Η οξειδάση της ξανθίνης στο εγκεφαλικό επεισόδιο	46

1.9.2.3 Η οξειδάση της ξανθίνης στη σπλαχνική ισχαιμία- επαναιμάτωση.....	47
1.9.2.4 Η οξειδάση της ξανθίνης στην ισχαιμία- επαναιμάτωση του ήπατος, των νεφρών, των πνευμόνων και άλλων οργάνων	47
1.9.3 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στην καταπληξία	48
1.9.4 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια	49
1.9.5 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στις αγγειακές νόσους: Υπέρταση, υπερκοληστερολαιμία, αθηροσκλήρωση και διαβήτη	50
1.9.6 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και σε άλλες φλεγμονώδεις νόσους.....	53
1.9.7 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες μορφές τοξικής βλάβης οργάνων	54
1.10 Μελλοντικός σχεδιασμός αναστολέων με θεραπευτική χρήση	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες X.....	57
2.1 Εισαγωγή	57
2.2 Γενικά χαρακτηριστικά κρυσταλλογραφίας	58
2.3 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.....	59
2.4 Η φύση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων.....	60
2.5 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	64
2.6 Στάδια κρυστάλλωσης.....	66
2.6.1 Πυρήνωση.....	67
2.6.2 Ανάπτυξη πυρήνων	68
2.6.3 Αναστολή ανάπτυξης πυρήνων	69
2.7 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών	70
2.8 Παράγοντες καθίζησης.....	71
2.9 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης	73
2.10 Ακτίνες X	74
2.10.1 Πηγές ακτίνων X.....	75
2.10.2 Ανιχνευτές ακτίνων X [Dreath, 2002]	77
2.11 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο	79
2.11.1 Σκέδαση ακτίνων X από σύστημα δυο ηλεκτρονίων [Rossman & Arnold, 2001].....	79
2.11.2 Συνθήκες περίθλασης- Ο νόμος του Bragg.....	81

2.11.3 Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του Ewald.....	83
2.11.4 Σκέδαση από ένα άτομο- ατομικός παράγοντας σκέδασης.....	85
2.11.5 Σκέδαση από μοναδιαία κυψελίδα- Δομικός παράγοντας.....	85
2.12 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Υλικά και μέθοδοι 88

3.1 Υλικά.....	88
3.1.1 Αντιδραστήρια.....	88
3.1.2 Υλικά συμπύκνωσης πρωτεϊνών.....	88
3.1.3 Υλικά χρωματογραφίας.....	88
3.1.4 Όργανα.....	89
3.1.5 Υλικά κρυσταλλώσεων.....	89
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	89
3.2.1 Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα.....	89
3.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας- EAH Sepharose 4B/folic Acid.....	93
3.2.2.1 Δημιουργία στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid.....	93
3.2.2.1.1 Προετοιμασία σφαιριδίων.....	93
3.2.2.1.2 Πρόσδεση φολικού οξέος.....	94
3.2.2.1.3 Απομάκρυνση περίσσειας φολικού οξέος.....	95
3.2.2.1.4 Αναγέννηση στήλης.....	96
3.2.2.2 Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης σε στήλη φολικού οξέος με υποξανθίνη.....	97
3.2.2.3 Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης σε στήλη φολικού οξέος με αλλοπουρινόλη.....	99
3.2.3 Ενεργοποίηση οξειδάσης της ξανθίνης με $K_3Fe(CN)_6$	102
3.2.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	102
3.2.4.1 Προετοιμασία στήλης Sephadex G-25.....	103
3.2.4.2 Διαδικασία καθαρισμού οξειδάσης της ξανθίνης.....	104
3.2.5 Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	104
3.2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου- γλυκίνης παρουσία SDS (SDS- PAGE).....	105
3.2.5.1.1 Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης.....	105
3.2.5.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση.....	106
3.2.5.1.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης.....	107

3.2.6 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	107
3.2.6.1 Χρώση με κυανό του Coomassie	108
3.2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO ₃).....	108
3.2.7 Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών	109
3.2.7.1 Φασματοσκοπικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών	109
3.2.7.2 Χρωματομετρική μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford.....	110
3.2.8 Κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης	111
3.2.8.1 Τεχνική της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)	111
3.2.8.2 Τεχνική «ενπυρήνωσης» (seeding drop)	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα	115
4.1. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα	115
4.2 Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας και τη χρήση υποξανθίνης ως εκλουστικό μέσο.....	117
4.3 Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση αλλοπουρινόλης ως εκλουστικό μέσο	120
4.4 Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης	124
4.5 Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης.....	125
4.5.1 Μέθοδος της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)	125
4.5.2 Μέθοδος «ενπυρήνωσης» (seeding drop).....	126
4.6 Περιθλαση ακτίνων X- Κρυσταλλογραφική μελέτη	127
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	132
I. Αλληλουχία της XDH.....	132
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	134

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO ή XOD, EC 1.17.3.2) και η αφυδρογονάση της ξανθίνης (Xanthine Dehydrogenase, XDH ή XDHA, EC 1.17.1.4) είναι οι δύο μορφές του ενζύμου οξειδοαναγωγάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidoreductase, XOR), προϊόντα του ίδιου γονιδίου. Ανήκουν στην κατηγορία των μολυβδο-φλαβινοενζύμων και αποτελούνται από δύο όμοιες υπομονάδες των 150kDa. Η XOR βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα ζωικά βασίλεια και στις δύο μορφές, όμως στα θηλαστικά συντίθεται με τη μορφή της αφυδρογονάσης (XDH), που μετατρέπεται γρήγορα σε οξειδάση (XO). Η κατανομή της στους ιστούς είναι ποικίλη στα είδη των ζώων και περιλαμβάνει ήπαρ, έντερο, πνεύμονες, ορό αίματος, νεφρούς, καρδιά και εγκέφαλο.

Η XO χρησιμοποιεί το O_2 ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ η XDH χρησιμοποιεί το NAD^+ . Και οι δύο είναι εξίσου ικανές να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Τα φυσιολογικά υποστρώματα είναι η ξανθίνη και η υποξανθίνη, τα οποία προσδένονται στο οξειδωμένο ένζυμο και δίνουν δύο ηλεκτρόνια στο μολυβδαινικό συμπάραγοντα (Mo-pt), τον οποίο ανάγουν από Mo(VI) σε Mo(IV). Τα υποστρώματα υδροξυλιώνονται από μόρια H_2O στο μολυβδαινικό κέντρο, καθώς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω δύο σιδηροθειούχων κέντρων (Fe/S) στη FAD ομάδα. Η ανηγμένη FAD μπορεί να επαναοξειδωθεί είτε δισθενώς από το οξυγόνο και να παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου είτε μονοσθενώς σε δύο βήματα και να παράγει δύο ισοδύναμα ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου.

Υπο φυσιολογικές συνθήκες, XDH και XO συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές οδούς, όπως η υδροξυλίωση πουρινών, περινών, αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση ή την ενεργοποίηση ενδογενών και ξеноβιοτικών ενώσεων. Ο βασικός ρόλος του ενζύμου είναι η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Γι' αυτό, σε κληρονομικές παθήσεις, όπου υπάρχει έλλειψη του ενζύμου, τα άτομα χαρακτηρίζονται από ξανθινουρία και δυσλειτουργία πολλών οργάνων λόγω υπερβολικής συσσώρευσης ξανθίνης σε αυτά. Επιπλέον, η XO συμμετέχει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμία, το εγκεφαλικό, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το αιμορραγικό σοκ, η αθηροσκλήρωση και η δρεπανοκυτταρική αναιμία, λόγω παραγωγής ελεύθερης ρίζας υπεροξειδίου.

Επιπροσθέτως, η παρουσία αυξημένων επιπέδων του ενζύμου έχει βρεθεί στον ορό ανθρώπων με βλάβη στο ήπαρ και το πάγκρεας καθώς και σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, υπερχοληστερολαιμία και υπέρταση.

Λόγω του παθογενετικού ρόλου του ενζύμου, η λεπτομερής διευκρίνιση της δομής της οξειδάσης της ξανθίνης θα συνέβαλε στο μελλοντικό σχεδιασμό ουσιών για θεραπευτική χρήση. Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα και εκτενής καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγένειας και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι συνθήκες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης με τη χρήση των τεχνικών της εντυρήνωσης και της επικαθήμενης σταγόνας και έγιναν προσπάθειες για βελτιστοποίηση της ανάπτυξης κρυστάλλων, έτσι ώστε να δημιουργηθούν κρύσταλλοι ικανοί να περιθλούν τις ακτίνες X σε υψηλή ευκρίνεια. Τέλος, έλαβε χώρα συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο της οξειδάσης της ξανθίνης με αποτέλεσμα ένα περιθλασίγραμμα. Η επίλυση της δομής του ενζύμου είναι σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Xanthine oxidase (XO or XOD, EC 1.17.3.2) and xanthine dehydrogenase (XDH or XDHA, EC 1.17.1.4) are the two forms of enzyme xanthine oxidoreductase (XOR) and they represent different forms of the same gene product. Both belong to the molybdenum flavoprotein family; they are homodimers and each subunit has a molecular mass of about 150 kDa. XOR is found nearly in all animal kingdoms; in mammals, it is synthesized in the dehydrogenase (XDH) form, but can be readily converted to oxidase (XO). The localization of the enzyme has been reported in various tissues from various animal species; including liver, intestine, lungs, blood serum, kidneys and brain.

The XO form uses molecular oxygen as the electron acceptor, whereas the XDH form utilizes NAD⁺ as the preferred electron acceptor, thereby producing reactive oxygen species (ROS). Hypoxanthine and xanthine are thought to be the physiological substrates of the enzymes, which interact with the oxidized enzyme and two electrons are transferred from xanthine to Mo (VI), reducing the metal to Mo (IV). Following the initial reduction of the Mo, electrons are passed via two [2Fe-2S] clusters to an FAD cofactor, from which reducing equivalents pass out of the enzyme. Both forms, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase, generate significant amounts of both hydrogen peroxide and superoxide when reacting with O₂.

In normal conditions, XDH and XO participate in a variety of biochemical pathways, such as hydroxylation of purines, pterins, aliphatic and aromatic aldehydes in order to contribute in detoxification or activation of endogenous and xenobiotics compounds. The dominant role of enzyme is the conversion of hypoxanthine to xanthine and then in uric acid. Because of this role, lack of XO in genetic diseases, leads to xanthinuria and tissue dysfunction. Also, XO is implicated in pathophysiologic conditions as ischemia- reperfusion, stroke, myocardial infraction, hemorrhagic shock, atherosclerosis and sickle cell anemia because of the radical oxygen species it produces. Additionally, the serum levels of XO are elevated in people with liver and pancreas injury, as well as in patients with diabetes type I, hypercholesterolemia and hypertension.

The implication of XO in various pathological conditions suggest that the elucidation of the structure of the enzyme complexed with various inhibitors might contribute in future development of new compounds that can be of therapeutic use. In this context in the present study xanthine oxidase was isolated from bovine milk and was further purified using a combination of affinity and gel filtration chromatography. Subsequently, crystallization conditions for xanthine oxidase were established with screening commercially available crystallization solutions, with the use of a crystallization robot. Initial crystallization conditions were refined using sitting and seeding drop, to grow crystals of suitable size for X-ray diffraction studies at high resolution, from which X-ray diffraction data were collected. The process of the structure solution is in progress.

ΣΚΟΠΟΣ

Η οξειδάση της ξανθίνης και η αφυδρογονάση της ξανθίνης είναι οι δύο μορφές του ενζύμου οξειδοαναγωγάση της ξανθίνης. Πρόκειται για μολυβδοφλαβινοένζυμα, που περιέχουν φλαβινοπρωτεΐνες και αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες μονάδες των 150kDa. Σε φυσιολογικές συνθήκες, αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές οδούς, όπως η υδροξυλίωση πουρινών, περινών, αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση ή την ενεργοποίηση ενδογενών και ξеноβιοτικών ενώσεων. Ωστόσο, η οξειδάση της ξανθίνης φαίνεται ότι διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη αποτελεσματικότερων, ισχυρότερων και με μικρότερο εύρος παρενεργειών, αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης σε σύγκριση με τον τωρινό και ευρέως χρησιμοποιούμενο αναστολέα αλλοπουρινόλη/ οξυπουρινόλη, κρίνεται απαραίτητη.

Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης, η παρούσα προπτυχιακή διατριβή αποτελείται από επιμέρους στόχους, ώστε να επιτευχθεί ο τελικός. Αρχικοί στόχοι ήταν η απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα και ο διεξοδικός καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγένειας, με τη χρήση της στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid και με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, με τη στήλη Sephadex G-25. Μετά τον καθαρισμό και πριν τις δοκιμές κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης, αναγκαία προϋπόθεση ήταν ο έλεγχος της δραστηριότητας του ενζύμου με χρήση του υποστρώματός του, της ξανθίνης. Επόμενος στόχος ήταν η κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης για την εύρεση σημαντικών πληροφοριών της δομής της. Για να πραγματοποιηθεί όμως, αυτός ο στόχος τελέστηκαν μια σειρά από δοκιμές κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης παρουσία διάφορων ουσιών, σε διαφορετικές συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα, ώστε να βρεθούν οι συνθήκες ανάπτυξης κρυστάλλου. Ακολούθως για τη βελτιστοποίηση των κρυστάλλων, ώστε να είναι εφικτή η συλλογή αποτελεσμάτων με ακτίνες X, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και με διαφορετικές τεχνικές κρυστάλλωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας και της ενπυρήνωσης.

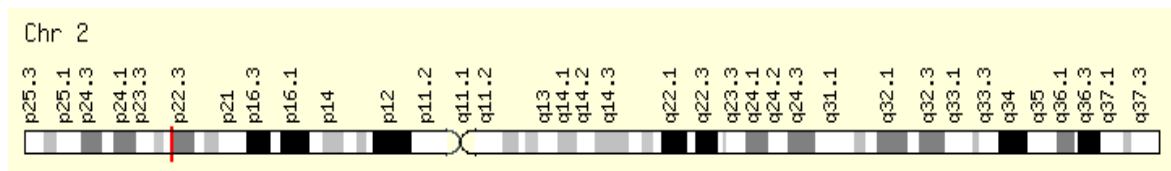
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

Η οξειδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, παρουσία οξυγόνου σε ομογενοποίημα ιστού, παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1899 από τον Spitzer ως ενζυματική διαδικασία [Spitzer, 1899]. Το ένζυμο, που εμπλεκόταν σε αυτή, ονομάστηκε οξειδάση της ξανθίνης από το Burian [Burian, 1905]. Το 1902, ο Schardinger περιέγραψε μία αντίδραση κατά την οποία το μπλε του μεθυλενίου ανάγεται από αλδεΐδη, στο φρέσκο γάλα [Schardinger, 1902]. Το ένζυμο, που κατέλυε την παραπάνω αντίδραση, έγινε γνωστό ως «ένζυμο Schardinger». Οι δύο αυτές ενζυματικές διαδικασίες παρέμειναν μη σχετιζόμενες μεταξύ τους για 20 χρόνια, ωστόσο οι Morgan, Stewart και Hopkins, έδειξαν ότι το φρέσκο γάλα είναι πλούσια πηγή σε οξειδάση της ξανθίνης [Morgan et al., 1922]. Η ανακάλυψη αυτή, δημιούργησε άμεσα το ερώτημα για την ταυτότητα των δύο ενζύμων, της οξειδάσης της ξανθίνης και του «ενζύμου Schardinger». Από τη μελέτη διαφόρων παραγόντων, που επηρεάζουν αυτές τις δύο ενζυματικές διαδικασίες, οι Dixon, Thurlow [Dixon & Thurlow, 1924] και Booth [Booth, 1935], αποφάνθηκαν ότι είναι το ίδιο ένζυμο, που εμπλέκεται και στις δύο. Το 1938 έγινε πρόταση για επίσημη ονομασία του ενζύμου ως οξειδάση της ξανθίνης, από τον Booth [Booth, 1938], ενώ την ίδια χρονιά απομονώθηκε από τον Ball [Ball, 1938]. Πρώτη φορά κρυσταλλώθηκε από τον Avis το 1955 [Avis et al., 1955].

Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης των θηλαστικών καταλύει τα δύο τελευταία βήματα στο σχηματισμό ουρικού οξέος, συντίθεται ως αφυδρογονάση της ξανθίνης, αλλά άμεσα μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης με οξειδωση σουλφυδριλικών ομάδων ή με πρωτεόλυση. Η αφυδρογονάση της ξανθίνης προτιμά το NAD⁺, ως αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ η οξειδάση της ξανθίνης δεν αντιδρά με αυτό και χρησιμοποιεί εξειδικευμένα O₂ ως υπόστρωμα, οδηγώντας στο σχηματισμό ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η οξειδάση της ξανθίνης αποτελεί στόχο φαρμάκων για διάφορες ασθένειες (ουρική αρθρίτιδα, υπερουρικαιμία κ.α.), ταυτόχρονα η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση αποτελεί θέμα υψίστου ενδιαφέροντος, καθώς εμπλέκεται σε ασθένειες, που χαρακτηρίζονται από καταστροφές ιστών, προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (μεταϊσχαιμική βλάβη επαναιμάτωσης κ.α.).

1.1 Δομή Γονιδίου XOR

Το γονίδιο της ανθρώπινης αφυδρογονάσης της ξανθίνης χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 2 [Ichida et al., 1993], ενώ στη συνέχεια, άλλες τρεις ερευνητικές ομάδες τοποθέτησαν το γονίδιο XOR στο χρωμόσωμα 2p22 ή 2p23 [Xu et al., 1994; Minoshima et al., 1995; Rytönen et al., 1995]. Η τοποθέτηση του γονιδίου XOR στο χρωμόσωμα 2 έγινε ύστερα από κλωνοποίηση και αλληλούχηση των cDNAs, που κωδικοποιούν το ένζυμο. Όταν η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος ολοκληρώθηκε, η θέση του γονιδίου XOR επαληθεύτηκε στο χρωμόσωμα 2p23.1 (Εικόνα 1.1) (International Human Genome Sequencing Consortium 2001).



Εικόνα 1.1: Γονιδιωματική τοποθεσία του γονιδίου XOR στον άνθρωπο (2p23.1).

Έχουν αναφερθεί τρεις αλληλουχίες cDNAs της XOR στον άνθρωπο από τρεις ερευνητικές ομάδες (Ichida et al., 1993; Xu et al., 1994; Saksela & Rainio 1996). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία διαθέτει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης με 3999 νουκλεοτίδια, τα οποία κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 1333 αμινοξέων, με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος (Mr) 146,604. Το cDNA, που αναφέρθηκε από την ομάδα Saksela και Rainio κωδικοποιεί για το ενεργό ένζυμο XOR και είναι 99% ταυτόσημο με αυτό, που παρουσιάστηκε από την ομάδα Ichida et al. και 94% ταυτόσημο με της ομάδας Xu et al. Σε μία πρόσφατη επιστολή η ομάδα Xu et al. [Xu et al., 1996], αναφέρει διόρθωση της αλληλουχίας cDNA, η οποία αυξάνει την ταυτοσημότητα με την αλληλουχία της ομάδας Saksela και Rainio στο 99,6%. Η προκύπτουσα αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης XDH, από την ομάδα Ichida et al., είναι ομόλογη με αυτή του ποντικού [Amaya et al., 1990] και της *Drosophila Melanogaster* [Keith et al., 1987] σε ποσοστά 90,2% και 50% αντίστοιχα.

Το γονίδιο, που κωδικοποιεί την οξειδοαναγωγή της ξανθίνης για τον άνθρωπο, αποτελείται από 36 εξόνια και 35 εσόνια, που καλύπτουν τουλάχιστον μήκος 60kb. Το εύρος μεγέθους των εξονίων κυμαίνεται από 53 ως 279 βάσεις,

ενώ των εσωνίων από 0.2 ως 8 kb [Xu et al., 1996]. Ο αριθμός των εξωνίων και των εσωνίων είναι ίδιος στον άνθρωπο και στο ποντίκι, ενώ στον αρουραίο διαφέρει [Xu et al., 1996; Cazzaniga et al., 1994; Chow et al., 1994]. Επιπλέον, το μέγεθος του δεύτερου εσωνίου στον άνθρωπο και τον αρουραίο υπερβαίνει τα 8kb, αλλά είναι σημαντικά μικρότερο, 1.6kb, στο ποντίκι. Στη *Drosophila*, το γονίδιο XOR περιλαμβάνει μόνο 4 εξώνια, παρόλα αυτά παρουσιάζει εντυπωσιακή ομοιότητα στα επίπεδα πρωτεΐνης με αυτή της XOR στα θηλαστικά [Ichida et al., 1993; Keith et al., 1987].

1.2 Έκφραση και ρύθμιση του XOR γονιδίου

Με Southern υβριδισμό βρέθηκε ότι το γονίδιο XOR υπάρχει σε μοναδικό αντίγραφο στο γονιδίωμα του αρουραίου. Υποδεικνύεται η ύπαρξη πολλαπλών θέσεων έναρξης σε ένα παράθυρο 65bp, που τοποθετείται 20- 85bp ανοδικά από την έναρξη της μεταγραφής (ATG). Αλληλουχίες εντός τμήματος 116bp, ανοδικά από την -65bp περιοχή έναρξης της μεταγραφής παρουσιάζουν συγκεντρώσεις *cis*-δραστικών περιοχών πρόσδεσης, που τυπικά εμφανίζονται σε γνωστούς υποκινητές. Κουτί TATA και περιοχή πλούσια σε G·C, δεν παρουσιάζονται σε κοντινή απόσταση από κάποια θέση έναρξης της μεταγραφής. Πολλά πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία, που περιλαμβάνουν NF-IL6 μοτίβο, έχουν τοποθετηθεί ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής [Chow et al., 1994].

Έξι αποτυπώματα από δεσμευτικούς παράγοντες βρέθηκαν στον αρουραίο, από τα οποία, δυο αποδείχτηκαν να είναι περιοχές πρόσδεσης C/EBP. Μέλη των οικογενειών C/EBP-α και C/EBP-β, αλλά όχι C/EBP-δ, βρέθηκε ότι προσδένονται σε αυτές τις 2 θέσεις. Η πρόσδεση C/EBP δεν είναι απαραίτητη για το βασικό επίπεδο έναρξης της μεταγραφής. Μεγάλο ποσοστό της μεταγραφικής δραστηριότητας εδράζεται εντός του -102 ως -7 τμήματος, που περιέχει όλη τη μεταγραφική δραστηριότητα του εκκινητή. Αυτό το τμήμα περιέχει πολλά στοιχεία εκκινητών (Inr 1,2,3,4), που είναι απαραίτητα για την έναρξη της μεταγραφής, συνεπώς η γραμμική ακεραιότητά του είναι κρίσιμη. Διάρρηξη της περιοχής στο -73bp οδηγεί στην ολοκληρωτική απώλεια της βασικής μεταγραφικής ικανότητας. Η παρουσία πολλών εκκινητών αυξάνει την πιθανότητα ρύθμισης μέσω σύνθεσης διαφορετικών mRNA, τα οποία μπορεί να

διαφοροποιούνται μετα-μεταγραφικά, λόγω των διαφορετικών 5' δομών και αλληλουχιών [Chow et al., 1995].

Στον άνθρωπο προσδιορίστηκαν δύο περιοχές έναρξης της μεταγραφής 59 και 82bp ανοδικά από το ATG κωδικόνιο έναρξης. Ένα κουτί TATA βρέθηκε ανοδικά από τη δεύτερη θέση έναρξης της μεταγραφής καθώς και δύο ανεστραμμένες CCAAT αλληλουχίες στις 19 και 42bp. Μια περιοχή πλούσια σε G·C βρέθηκε ανάμεσα στις -55 και -121. Περίπου 2kb της 5' συνοδευτικής περιοχής έχουν αλληλουχηθεί και μία ποικιλία υποθετικών ρυθμιστικών στοιχείων έχει προσδιορισθεί, που περιλαμβάνει θέσεις δέσμησης CsolidusEBP, IL-6 & NF-κB, πιθανά TNF-RE, IFN-γ-RE, και IL-1-RE [Xu et al., 1996].

Ένα καθοδικά τοποθετημένο στοιχείο στην κωδική περιοχή, όπου λείπει το κουτί TATA, στο γονίδιο XOR του αρουραίου (-7 ως -42), παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής και στη μεταγραφική ενεργοποίηση από C/EBP. Το στοιχείο αυτό περιέχει αλληλουχίες απαραίτητες για τη σωστή συχνότητα χρήσης των διάφορων Inrs, από τα οποία ξεκινά η μεταγραφή in vivo. Επιπλέον, οι C/EBP δεσμευτικές περιοχές δεν ασκούν διεγερτική μεταγραφική επίδραση, εν ελλείψει αυτών των αλληλουχιών. Εντός του στοιχείου βρίσκονται, οι περιοχές δέσμησης του YY-1 (-7 έως 7) και ενός άγνωστου παράγοντα (από 30 έως 42) [Clark et al., April 1998].

Πολλοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των TFII-I, NF-1, Oct-1, YY-1, c-Myc και παράγοντες σχετιζόμενοι με USF μπορούν να συνδεθούν στην ανοδική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου XOR του αρουραίου, ενώ έχουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική έναρξη [Clark et al., June 1998].

Η έκφραση του γονιδίου XOR στους ανθρώπους είναι εντυπωσιακά χαμηλότερη από το ποντίκι. Στον άνθρωπο η περιοχή από -258 ως -1 περιέχει θέσεις πρόσδεσης αναστολέα και ενεργοποιητή, που ρυθμίζουν τη βασική δραστικότητα του υποκινητή. Η περιοχή ανάμεσα στις -138 ως -1 είναι απαραίτητη και επαρκής για την έναρξη της μεταγραφής και η περιοχή μεταξύ των -258 και -228 είναι κρίσιμη για τον περιορισμό της βασικής δραστικότητας του υποκινητή. Εντός της μετέπειτα περιοχής, -242 ως -230, υπάρχει ένα TATA στοιχείο και ένα E-κουτί, που προσδένουν έναν καταστολέα, TFIID. Αυτό δείχνει ότι και το E-κουτί και το TATA στοιχείο είναι απαραίτητα για την καταστολή της δράσης του γονιδίου καθώς και ότι χρησιμοποιούνται κατασταλτικοί

μεταγραφικοί μηχανισμοί για τη ρύθμιση της βασικής έκφρασης στους ανθρώπους [Xu et al., 2000].

Η πιο δραστική περιοχή του γονιδίου XOR περιέχει CCAAT μοτίβο στην περιοχή -119 ως -123, σε αυτή δεσμεύεται ο πυρηνικός παράγοντας Y (NF-Y). Αποσιώπηση του μοτίβου CCAAT καταργεί την πρόσδεση NF-Y και μειώνεται σημαντικά η δραστικότητα του υποκινητή. Ο πυρηνικός παράγοντας Y έχει έναν πολύ σημαντικό λειτουργικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση του ανθρώπινου XOR γονιδίου [Martelin et al., 2000].

Τουλάχιστον πέντε πρωτεΐνες εμπλέκονται στο πυρηνικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, που προσδένεται στο E-κουτί και στις παρακείμενες Ku86 θέσεις πρόσδεσης. Τρεις από αυτές είναι η καταλυτική μονάδα της DNA-PK, η Ku86 και η Ku70. Οι άλλες δυο είναι AREB6 πρωτεΐνες, που προσδένονται στο E-στοιχείο. Η δομική απώλεια του Ku86 αυξάνει τη δραστηριότητα του υποκινητή και τη μεταγραφική έκφραση. Η μεταγραφική ρύθμιση του XOR γονιδίου γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων [Xu et al., 2004].

Το πυρηνικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα περιέχει καταστολείς όγκων, όπως SAFB1, BRG1 και SAF-A. Η αποσιώπηση του SAFB1 αυξάνει την έκφραση του XOR. Οι παράγοντες SAFB1, Ku86 και BRG1 σχετίζονται μεταξύ τους. Το σύμπλεγμα του SAFB1 συνδέεται στον υποκινητή του XOR και έχει κρίσιμο ρόλο στον περιορισμό της έκφρασης μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης με το E-κουτί, DNA-PK και τους καταστολείς όγκων [Lin et al., 2008].

1.3 Δομή της XOR πρωτεΐνης

Το μολυβδαίνιο είναι ουσιώδες στα βιολογικά συστήματα, καθώς απαιτείται από ένζυμα, που καταλύουν αντιδράσεις στο μεταβολισμό του άνθρακα, του θείου και του αζώτου. Το μολυβδαίνιο είναι βιολογικά αδρανές εκτός αν συμπλοκοποιείται με κάποιο συμπαράγοντα, έτσι συνδέεται με ένα παράγωγο περίνης, το οποίο ονομάζεται μολυβδοπερίνη (Mo-pt), για να σχηματίσει το μολυβδαινικό συμπαράγοντα (Mo-co), που είναι το δραστικό μέρος της καταλυτικής περιοχής των μολυβδο-ενζύμων [Huber et al., 1996]. Τα μολυβδο-ένζυμα είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και είναι παρόντα στα βακτήρια [Rebello et al., 2000], τις ζύμες [Glatigny & Scazzocchio, 1995], τα φυτά

[Sekimoto et al., 1997; Ori, 1997], τα έντομα και τα ασπόνδυλα [Hille, 1996; Wright, 1999]. Στους ευκαρυώτες τα πιο διακεκριμένα μολυβδο- ένζυμα είναι:

- 1. σουλφιδική οξειδάση:** καταλύει το τελευταίο βήμα στην αποδόμηση θειούχων αμινοξέων και εμπλέκεται στην αποτοξικοποίηση από περίσσεια θειωδών/ σουλφιδίων.
- 2. οξειδοαναγωγή της ξανθίνης:** εμπλέκεται στον καταβολισμό των πουρινών και την παραγωγή οξειδωτικών.
- 3. οξειδάση της αλδεΰδης (AO):** οξειδώνει πλήθος αλδεΰδων και είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση της φυτορμόνης, αμψιζικό οξύ.
- 4. αναγωγή νιτρικού:** καταλύει το βήμα- κλειδί στην ανόργανη αφομοίωση του αζώτου.

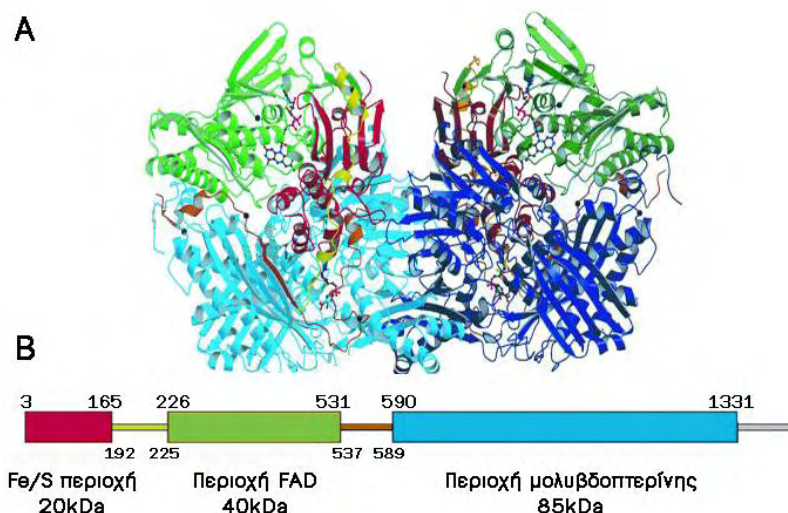
Τα μολυβδο- ένζυμα, εκτός της φυτικής σουλφιδικής οξειδάσης, χρειάζονται τουλάχιστον ένα ακόμη οξειδοαναγωγικό κέντρο και πολλά από αυτά εμπλέκουν το σίδηρο στη μεταφορά ηλεκτρονίων [Mendel & Bittner, 2006; Mendel, 2005; Schwarz & Mendel, 2006; Harrison, 2006; Terao et al., 2000].

Οι XOR και AO έχουν ένα εντυπωσιακό αριθμό από ομοιότητες [Terao et al., 2000]. Δρουν σε ένα μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενο σύνολο υποστρωμάτων, που περιέχει N- ετεροκυκλικές ενώσεις [Krenitsky, 1972], εμφανίζουν ένα υψηλό επίπεδο ομοιότητας σε αμινοξικό επίπεδο [Hille, 1996], έχουν παραπλήσια μοριακά βάρη, καθώς και δευτεροταγείς/ τεταρτοταγείς δομές (Carpani et al., 1990; Yoshihara & Tatsumi, 1985). Τα απαντώμενα γονίδια τους έχουν κοινό πρόγονο, όπως πρόσφατα ταυτοποιήθηκε, από τον υψηλό βαθμό συντήρησης των εξωνίων και των εσωνίων [Cazzaniga et al., 1994; Terao et al., 1998; Demontis et al., 1999].

Η οξειδάση της ξανθίνης και η αφυδρογονάση της ξανθίνης είναι υδροξυλάσες, που ανήκουν στην οικογένεια των μολυβδο- φλαβινοπρωτεϊνών και αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μορφές του ίδιου γονιδιακού προϊόντος [Pritsos, 2000]. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα αντιπροσωπευτικό μέλος της οικογένειας των ενζύμων, που περιέχουν Mo-co [Huber et al., 1996]. Ο ρόλος του μολυβδαινίου στην οξειδάση της ξανθίνης έχει μελετηθεί εκτενώς [Collison et al., 1996; Peive, 1973]. Κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης η οξειδωτική κατάσταση του μολυβδαινίου αλλάζει και έτσι το μολυβδαίνιο

εμπλέκεται στο μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το υπόστρωμα αλληλεπιδρά απευθείας με το μόλυβδο [Berks et al., 1995; Campbell, 1996].

Στα θηλαστικά η XOR είναι ομοδιμερής με μοριακή μάζα περίπου 300kDa [Hille & Nishino, 1995; Harris et al., 1999]. Κάθε μονομερές δρα ανεξάρτητα στην κατάλυση [Enroth et al., 2000], ενώ έχει μοριακό βάρος περίπου 150kDa, περιέχει μία πεπτιδική αλυσίδα 1330 αμινοξέων, η οποία προσδένει ένα συμπαραγόνα μολυβδοπερίνης (Mo-pt), καθώς και δύο φασματοσκοπικά διακριτά κέντρα 2Fe–2S και ένα συμπαραγόνα φλαβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (FAD) [Hille & Nishino, 1995; Bray, 1975]. Κάθε μόριο αποτελείται από μία N-τελική περιοχή 20kDa, που περιέχει 2 σίδηρο/θειούχα κέντρα (Fe-SI και Fe-SII), μία κεντρική περιοχή 40kDa, που περιέχει FAD και μια C-τελική περιοχή 85kDa, που προσδένει τη μολυβδοπερίνη με 4 οξειδοαναγωγικά κέντρα, ευθυγραμμισμένα σχεδόν με γραμμικό τρόπο (Εικόνα 1.2) [Enroth et al., 2000].



Εικόνα 1.2: Κρυσταλλική δομή XDH αρουραίου. (A) Τα 2 μονομερή έχουν συμμετρικά σχετιζόμενες δομές με το ίδιο χρώμα, ανοιχτόχρωμο αριστερά και σκουρόχρωμο δεξιά. Η μοριακή δομή του διμερούς χωρίζεται σε 3 μεγάλες περιοχές και 2 συνδετικούς βρόγχους. (B) Οι δομές Fe-S, FAD και Mo-pt είναι χρωματισμένοι με κόκκινο, πράσινο και μπλε, αντίστοιχα. Από το N στο C άκρο, οι περιοχές είναι: Fe-S (κατάλοιπα 3- 165), FAD περιοχή (κατάλοιπα 226- 531), και Mo-pt περιοχή (κατάλοιπα 590- 1.331). Ο βρόγχος, που ενώνει τη Fe-S περιοχή με αυτή του FAD (κατάλοιπα 192- 225) φαίνεται με κίτρινο, ενώ ο άλλος, που ενώνει τη FAD περιοχή με τη Mo-pt (κατάλοιπα 537- 589) είναι καφέ.

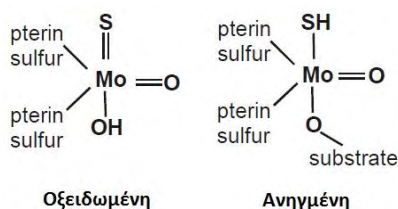
Οι διαστάσεις του διμερούς του ενζύμου είναι $155\text{\AA} \times 90\text{\AA} \times 70\text{\AA}$. Έχει σχήμα πεταλούδας με τη διμερή διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μονομερών στη μικρότερη πλευρά των επιμηκών υπομονάδων. Η πιο κοντινή απόσταση μεταξύ ατόμων συμπαραγόντων από διαφορετικές υπομονάδες είναι μεγαλύτερη του 1\AA

γεγονός, που κάνει αδύνατη τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ υπομονάδων κατά την κατάλυση [Enroth et al., 2000].

Στα θηλαστικά η XOR καταλύει την υδροξυλίωση της υποξανθίνης ή της ξανθίνης στο Mo κέντρο και ανάγονται αντίστοιχα, έτσι ώστε να εισάγονται στο FAD του ενζύμου το NAD⁺ ή το μοριακό οξυγόνο μέσω των δυο [2Fe-2S] κέντρων, όπου γίνεται και η αναγωγή τους [Komai, 1969]. Η XDH δείχνει προτίμηση στην αναγωγή του NAD⁺ στην καταλυτική περιοχή του FAD (παρόλα αυτά εμφανίζει σημαντική δραστικότητα και με το μοριακό οξυγόνο), όπου η XO αποτυγχάνει να αντιδράσει με το NAD⁺ και χρησιμοποιεί αποκλειστικά μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα, που οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου (σουπεροξειδίου) και υπεροξειδίου του υδρογόνου [Nishino, 1994; Hille & Nishino, 1995].

1.3.1 Μολυβδαινική περιοχή

Στην οξείδωση του υποστρώματος το κέντρο Mo της XOR ανάγεται από τα ηλεκτρόνια, που λαμβάνει από το υπόστρωμα και στη συνέχεια οξειδώνεται ξανά καθώς τα ηλεκτρόνια περνούν πρώτα από τα σιδηροθειούχα κέντρα και στη συνέχεια στο FAD κέντρο για να καταλήξουν τελικά στο NAD⁺ ή στο O₂ [Hille & Nishino, 1995]. Στην οξειδωμένη μορφή της XOR τα ιόντα Mo σχηματίζουν δεσμούς με δυο συμπαραγόντες πτερίνης, ένα διπλό δεσμό με θείο, ένα διπλό δεσμό με οξυγόνο και ένα δεσμό με υδροξύλιο, ενώ στην ανηγμένη μορφή ο διπλός δεσμός με το θείο αντικαθίσταται από μια σουλφιδριλική ομάδα (Εικόνα 1.3) [Enroth et al., 2000].



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση δεσμών, που σχηματίζονται με το Mo στην οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή του ενζύμου XOR.

Το άτομο του οξυγόνου, που είναι συνδεδεμένο με το υπόστρωμα κατά την αντίδραση οξείδωσης προέρχεται από ένα διαλυτό μόριο νερού. Πρόσφατα μια μετάλλαξη στο γονίδιο της σουλφουράσης του συμπαραγόντα Mo αναγνωρίστηκε

ως η αιτία της έλλειψης δραστικότητας XOR και AO στην ξανθινουρία τύπου II [Ichida et al., 2001].

1.3.2 Σιδηροθειούχες περιοχές

Η N- τελική περιοχή της XDH αποτελείται από πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης για την πρόσδεση των 2 Fe/S συμπλεγμάτων. Η N- τελική υπομονάδα περιέχει το Fe/SII σύμπλεγμα, που τοποθετείται στις Cys43, Cys48, Cys51 και Cys73, σε γειτνίαση με 7α,8α-μέθυλο ομάδες του φλαβινικού δακτυλίου και μακριά από το Mo κέντρο. Το Fe/SII σύμπλεγμα μοιάζει με φερρεδοξίνη [Sticht & Rösch, 1998]. Η C- τελική υπομονάδα περιλαμβάνει μια τετραπλή ελικοειδή δέσμη, ενώ το σύμπλεγμα Fe/SI τοποθετείται στις Cys113, Cys116, Cys148, Cys150 και κοντά στη Mo- pt.

Αντικατάσταση της Cys43, η οποία εξυπηρετεί σαν προσδέτης για ένα από τα άτομα σιδήρου του Fe/SII κέντρου με σερίνη, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στο φάσμα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Σε αντίθεση, μια παρόμοια αποσιώπηση στην Cys51, έναν προσδέτη του άλλου ατόμου σιδήρου, δεν επηρεάζει τα παραπάνω χαρακτηριστικά [Iwasaki et al., 2000]. Η γεωμετρική διάταξη και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των Fe/SI & Fe/SII δείχνει ότι τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το Mo στα 2 Fe/S κέντρα με μια θερμοδυναμικά ευνοούμενη διαδικασία. Η διάταξη των συμπαραγόντων δείχνει ότι τα 2 σιδηροθειούχα κέντρα παρέχουν ένα μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων από το μολυβδαίνιο στο FAD. Κινητικές και θερμοδυναμικές μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα 2 σιδηροθειούχα κέντρα δεν έχουν ως ρόλο μόνο τη ροή ηλεκτρονίων, αλλά λειτουργούν και ως αποθήκη ηλεκτρονίων για να τα παρέχουν στο κέντρο του FAD, ώστε η επανενεργοποίηση του FAD με αποδέκτη ηλεκτρονίων το υπόστρωμα, να μπορεί να είναι θερμοδυναμικά ελεγχόμενη από την αναγωγή ενός ηλεκτρονίου ή από την πλήρη αναγωγή [Enroth et al., 2000].

Οι αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής του καταλυτικού κύκλου της XOR είναι χωροταξικά χωρισμένες: η οξειδωτική υδροξυλίωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ λαμβάνει χώρα στο μολυβδαίνιο κέντρο στη μολυβδαίνια περιοχή των 90kDa και ανάγονται αντίστοιχα, με τα εισερχόμενα ηλεκτρόνια στα ένζυμα, που μεταφέρονται γρήγορα μέσω διαμοριακής μεταφοράς στο FAD, τοποθετημένο

μέσα στη 40kDa φλαβινική περιοχή, στην οποία φυσιολογικά γίνεται η οξειδωση [Nishino, 1994; Hille & Nishino, 1995; Hille, 1996]. Για αυτό το λόγο, η διαμοριακή μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ Mo και FAD κέντρων είναι αναπόσπαστο κομμάτι της συνολικής καταλυτικής διαδικασίας τους συμπλέγματος των φλαβινο- μεταλλοπρωτεϊνών [Iwasaki et al., 2000].

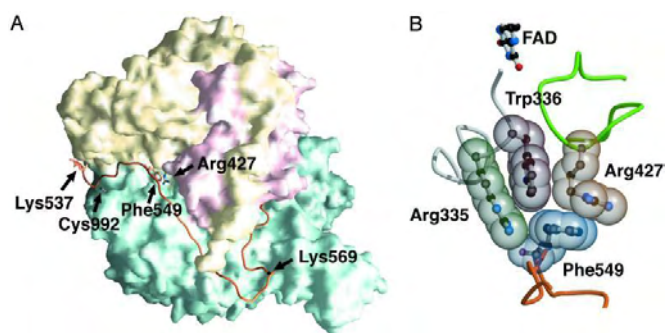
1.3.3 FAD περιοχή

Ο συμπαράγοντας FAD βρίσκεται στην κεντρική περιοχή της XOR. Στην αφυδρογονάση της ξανθίνης, το ηλεκτροστατικό και στερεοχημικό περιβάλλον του κέντρου FAD ευνοούν τη δέσμευση του NAD⁺ και συνεπώς την τελική μεταφορά των ηλεκτρονίων στο NAD⁺ αντί στο O₂, υπό φυσιολογικές συνθήκες [Harris and Massey, 1997].

1.4 Μετατροπή XDH σε XO

Στα θηλασικά η XOR συντίθεται ως αφυδρογονάση, αλλά μπορεί απευθείας να μετατραπεί σε οξειδάση είτε μη αντιστρεπτά με πρωτεόλυση είτε αντιστρεπτά με τροποποίηση των καταλοίπων κυστεΐνης [Kuwabara et al., 2003]. Η μετάβαση από XDH σε XO προσελκύει το ενδιαφέρον από βασικούς και κλινικούς ερευνητές, όχι μόνο λόγω της διαφορετικής αντίδρασης του FAD με το NAD⁺ ή το O₂ [Nishino, 1994; Hille & Nishino, 1995], αλλά και λόγω της βιολογικής και παθολογικής σημασίας του [Simmonds et al., 1995].

Τα σημεία τροποποίησης, υπεύθυνα για την αναστρέψιμη και μη αναστρέψιμη μετατροπή τοποθετούνται πάνω στον πεπτιδικό σύνδεσμο (κατάλοιπα 532–589), που συνδέει τις περιοχές της Mo-pt και του FAD (Εικόνα 1.4.A). Η μετατροπή XDH/XO συνοδεύεται από δομικές αλλαγές [Enroth et al., 2000], ενώ ο αποδέκτης ηλεκτρονίων αλλάζει από NAD⁺ σε O₂ [Garattini et al., 2003].



Εικόνα 1.4: (A) Μοριακή επιφάνεια μονομερούς της XDH: Fe/S κέντρα με κόκκινο, FAD με κίτρινο & Mo-pt με μπλε. Ο σύνδεσμος που συνδέει την περιοχή του FAD με της Mo-pt με πορτοκαλί. Οι θέσεις των Cys-992 και Lys-537, η μία ακόμη ορατή στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, φαίνονται με μοντέλο δεσμών. Οι θέσεις των Lys-551 και Lys-569, υπεύθυνες για την πρωτεόλυση υποδεικνύονται επίσης. (B) Χωροπληρωτικό μοντέλο αμινοξικού συμπλέγματος.

Έρευνες έδειξαν ότι οι Cys535 και Cys992 σε XDH από ήπαρ αρουραίου ή από βόειο γάλα, εμπλέκονται στην αντιστρεπτή μετατροπή, που γίνεται με τροποποίηση των σουλφυδρυλικών καταλοίπων από την 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο ή από το ιωδοακεταμίδιο [Nishino, 1997; Rasmussen et al., 2000]. Θραύση πεπτιδικών δεσμών στην XDH με θρυψίνη μετά τη Lys551 ή με παγκρεατίνη μετά τη Lys569 έχει ως αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή μετατροπή της XDH σε XO [Enroth et al., 2000]. Τα 2 κατάλοιπα Lys551 και Lys569, είναι τοποθετημένα πάνω στο σύνδεσμο, που συνδέει τις FAD και Mo περιοχές. Τροποποίηση των Cys535 και Cys992 ή πρωτεόλυση κατά μήκος του συνδέσμου προκαλεί μετακίνηση τμημάτων της ενεργής περιοχής του βρόγχου (Gln423- Lys433) ως και 20Å μπροστά από το δακτύλιο της ισοαλλοξαζίνης του FAD, οδηγώντας στη μετατροπή XDH/XO [Kuwabara et al., 2003].

Οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Phe549, Arg335, Trp336, και Arg427 αλληλεπιδρούν με δυνάμεις van der Waals και σχηματίζουν ένα πυκνό σύμπλεγμα (Εικόνα 1.4.B). Οι στενές αλληλεπιδράσεις τους είναι κρίσιμες για τη σταθεροποίηση της XDH μορφής. Το σύμπλεγμα βρίσκεται στο κάτω μέρος της κοιλότητας, που φιλοξενεί τον παράγοντα FAD και είναι ερμητικά κλειστό στην XDH, ενώ είναι ανοιχτό στην XO. Τα κατάλοιπα του συμπλέγματος μεταφέρουν τις τροποποιήσεις από το σύνδεσμο, προξενούμενες από οξείδωση ή πρωτεόλυση, στην ενεργή περιοχή του βρόγχου (423- 433), που με τη σειρά τους προκαλούν μια δραματική αλλαγή στη διαμόρφωση του τελευταίου (Εικόνα 1.4.A). Η τροποποίηση του βρόγχου αλλάζει στο ηλεκτροστατικό περιβάλλον του ενεργού κέντρου. Και οι δυο τροποποιήσεις οδηγούν στην απομάκρυνση της Phe549 από

το σύμπλεγμα είτε επάγοντας μια αλλαγή στη διαμόρφωση (οξειδωση) είτε δημιουργώντας κινητικότητα (πρωτεόλυση), γεγονός που φαίνεται στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Η απώλεια αλληλεπίδρασης Phe549- Trp336 οδηγεί σε επαναπροσανατολισμό της αρωματικής πλευρικής αλυσίδας της Trp336, η οποία με τη σειρά της αναγκάζει την Arg427 να μετατοπιστεί (Εικόνα 1.4.A). Ταυτόχρονα, ανοίγει την πύλη σε ένα διαλυτό κανάλι, που οδηγεί στο FAD, το οποίο θα επιτρέψει την πρόσβαση O₂ στο ενεργό κέντρο της XO [Nishino et al., 2008]. Ο προσανατολισμός της Trp336 είναι διαφορετικός μεταξύ των XDH και XO μορφών [Kuwabara et al., 2003].

Οι συνολικές δομές των XDH και XO είναι παρόμοιες και δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα ή γύρω από τα 2 Fe/S κέντρα και της Mo-pt. Η γενική διατήρηση της δομής συμφωνεί με κινητικές μελέτες, που δε δείχνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μορφών ένζυμου για τη δέσμευση και την κατάλυση υποστρωμάτων στο Mo-pt κέντρο [Hille & Nishino, 1995]. Οι περισσότερες δομικές διαφορές μεταξύ XDH και XO οφείλονται σε δομικές αλλαγές στη δεσμευτική περιοχή του NAD⁺ και στα οξειδοαναγωγικά δυναμικά του συμπαραγόνα FAD [Asai et al., 2007; Nishino et al., 2005; Enroth et al., 2000]. Το ενεργό κέντρο του FAD είναι αυτό, που παρουσιάζει τις μεγαλύτερες αλλαγές κατά τη μετατροπή [Massey & Harris, 1997; Hille & Nishino, 1995]. Τα δομικά χαρακτηριστικά στη re-πλευρά του φλαβινικού δακτυλίου μένουν σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστα από τη μετατροπή XDH/XO, με εξαίρεση μια μικρή μετακίνηση του δακτυλίου της Phe337, αντίθετα η si-πλευρά δέχεται μεγάλες αλλαγές [Enroth et al., 2000].

Σε ένζυμο από ήπαρ αρουραίου ή από βόειο γάλα, μετά από οξειδωση με θειόλη ή πρωτεόλυση διαπιστώθηκε ότι σχηματίζονται τέσσερις νέες γέφυρες δισουλφιδίου με τη μετατροπή της XDH σε XO, αν και δεν είναι δυνατόν όλες να εμπλέκονται άμεσα στη μετατροπή [Hunt & Massey, 1992]. Ταυτοποίηση των καταλοίπων Cys, που συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών δισουλφιδίου, οι οποίες συνοδεύουν την αναστρέψιμη μετατροπή XDH σε XO δεν είναι εύκολη. Το ένζυμο περιέχει 37 κατάλοιπα Cys ανά υπομονάδα [Amaya et al., 1990]. Ωστόσο διαπιστώθηκε ότι κατά τη μετατροπή XDH/XO σε ήπαρ αρουραίου [Saito, 1987] και βόειου γάλακτος [Hunt & Massey, 1992], μόνο τέσσερα κατάλοιπα Cys είχαν τροποποιηθεί ώστε να σχηματίσουν δύο δεσμούς

δισουλφιδίου. Γεγονός, που ενισχύεται με μελέτη κατευθυνόμενης μεταλλαξιογένεσης, που τόνισε επίσης τη δημιουργία γεφυρών μεταξύ δισουλφιδίου Cys535 και Cys992, Cys1316 και Cys1324, καθώς προκαλεί την αναστρέψιμη μετατροπή [Nishino et al., 2005]. Όμως σε ήπαρ αρουραίου μόνο δύο κυστεϊνικά κατάλοιπα τεκμηριώθηκαν ως ζωτικής σημασίας- κρίσιμα, Cys535 και Cys992, και επισημάνθηκαν [Nishino & Nishino, 1997].

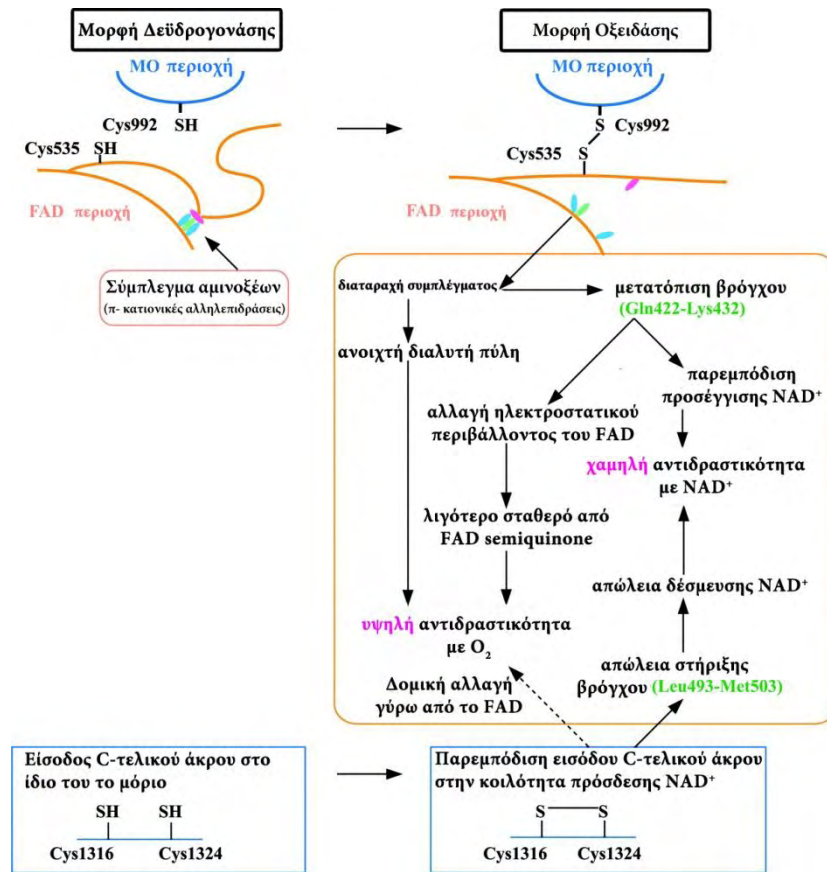
Αν και το δισουλφίδιο προκαλεί τη διάσπαση του αμινοξικού συμπλέγματος, που βρίσκεται στο επίκεντρο της μετάβασης μεταξύ XDH και XO [Kuwabara et al., 2003], φαίνεται ότι ο σχηματισμός δεσμού μεταξύ Cys1316 και Cys1324 μπορεί να παρεμποδίσει την εισαγωγή του C- τελικού τμήματος της πρωτεϊνικής αλυσίδας στην κοιλότητα, που οδηγεί στο σημείο σύνδεσης του FAD, όπου συμβάλλει στη δημιουργία της σωστής δεσμευτικής περιοχής NAD⁺ [Asai et al., 2007]. Επιπλέον, εμποδίζει μόρια NAD από το να πλησιάσουν το συμπράγοντα FAD, σταματώντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων φλαβίνης-νικοτιναμιδίου στην XO [Nishino, 1997]. Το C- τελικό πεπτίδιο συμμετέχει επίσης στη διαμόρφωση ή τη σταθεροποίηση της δεσμευτικής περιοχής του NAD. Εισάγεται στον τομέα FAD αποκτώντας επαφή με το βρόγχο Leu493-Met503 και ολοκληρώνει το σχηματισμό της θέσης δέσμευσης του δινουκλεοτιδίου [Nishino et al., 2008]. Ισοδύναμο αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί με τη μετάλλαξη της Trp335 [Asai et al., 2007].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή του καναλιού στην XDH είναι γεμάτη με υδρόφιλες και ως επί το πλείστον φορτισμένες ομάδες, ενώ στην XO απουσιάζουν. Με μια ανοικτή πύλη και ένα λιγότερο υδρόφιλο κανάλι, η μορφή της XO επιτρέπει την καλύτερη πρόσβαση του O₂ στο φλαβινικό δακτύλιο [Nishino et al., 2008].

Αποδείχθηκε πρόσφατα ότι η μετατροπή από XDH σε XO γίνεται με την παρουσία ουρίας ή με σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις υδροχλωρικής γουανιδίνης με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, προφανώς λόγω της διαταραχής του αμινοξικού συμπλέγματος. Αυτό με τη σειρά του, δείχνει ότι οι XDH και XO μορφές είναι σε θερμοδυναμική ισορροπία με σχετικά χαμηλό ενεργειακό φράγμα μεταξύ των δύο μορφών [Nishino et al., 2008].

Τέλος, λόγω της ετερογένειας στη δομή των δύο υπομονάδων [Tsuji & Nishino, 2008], οι δομικές αλλαγές, που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της

μετατροπής από XDH σε XO μπορεί να μην είναι ίδιες και στις δύο υπομονάδες [Asai et al., 2007].



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού μετατροπής της XDH σε XO.

1.5 Ρύθμιση έκφρασης και δραστηριότητας της XOR

Η XOR είναι ένα πολύ σύνθετο ένζυμο και η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή του ρυθμίζεται δυναμικά σε διάφορα επίπεδα [Kurosaki et al., 1995; Falciani et al., 1994], όπως το mRNA και ο εντοπισμός των πρωτεϊνών [McManaman et al., 2002]. Ο βαθμός της γονιδιακής έκφρασης XOR και το επίπεδο της δραστηριότητάς της ρυθμίζεται από διάφορα είδη ερεθισμάτων και μέσω διαφορετικών μοριακών μηχανισμών [Garattini et al., 2003].

Οι κυτοκίνες είναι γνωστοί ρυθμιστές της πρωτεΐνης XOR και μεταξύ αυτών ξεχωρίζουν οι ιντερφερόνες [Pfeffer et al., 1994; Falciani et al., 1992; Dupont et al., 1992]. Η θεραπεία ποντικών με ιντερφερόνη τύπου I, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή έκφρασης του γονιδίου XOR σε διάφορους ιστούς, με εξαίρεση του δωδεκαδάκτυλου [Terao et al., 1992; Kurosaki et al., 1995]. Το φαινόμενο είναι

συνέπεια αύξησης στη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου XOR [Falciani et al., 1992]. Η IFN- γ είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης και της δραστικότητας των XDH και XO, η επαγωγή οφείλεται σε αυξημένο ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου XOR. Επαγωγή του γονιδίου XOR μέσω IFN- γ δεν απαιτεί σύνθεση νέων πρωτεϊνών [Dupont et al., 1992].

Η θεραπεία μόνο με κυκλοεξιμίδη αυξάνει το mRNA των XDH και XO σε επίπεδο περίπου ίσο με αυτό, που παρατηρείται από την IFN- γ , ενώ συνδυασμός IFN- γ με κυκλοεξιμίδη καταλήγει σε μια συνεργική αύξηση στο επίπεδο του mRNA [Dupont et al., 1992].

Η πίεση του οξυγόνου είναι ένας άλλος κρίσιμος παράγοντας ενδοκυτταρικής δραστικότητας της XOR. Οι υπεροξικές συνθήκες μειώνουν την ενζυμική δραστικότητα XOR, ενώ η υποξία αυξάνει την έκφραση XOR και είναι υπεύθυνη για την ταχεία μετατροπή της XDH σε XO [Poss et al., 1996; Hassoun et al., 1994; Battelli et al., 1998]. Η αυξημένη δραστικότητα XDH και XO σε απάντηση στην υποξία οφείλεται σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση του ενζύμου [Poss et al., 1996].

Δότες νιτρικού οξειδίου (NO), όπως νιτρογλουταθειόνη, αναστέλλουν τη δραστηριότητα XDH και XO [Cote et al., 1996] μέσω αντιδράσεων στο καταλυτικό μολυβδαινικό κέντρο [Ichimori et al., 1999], γεγονός, που αντικατοπτρίζεται από τις αλλαγές στη συγκέντρωση Ca^{2+} [Dedkova et al., 2002]. Το ενδογενές NO έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των XDH και XO τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ενώ επίσης πιθανολογείται να έχει μια ρυθμιστική δράση σε συνθήκες υποξίας και υποξίας-επανοξυγόνωσης [Cote et al., 1996].

Το κιτρικό σιδηρούχο αμμώνιο και ο $FeSO_4$ (θειικός σίδηρος) αυξάνουν τα επίπεδα ενδοκυττάρου σιδήρου και συνεπώς τη δραστηριότητα XOR έως και δύο φορές. Ο σίδηρος αυξάνει την πρωτεΐνη XOR και τα επίπεδα του mRNA. Αποσιδήρωση με δεφεροξαμίνη (DFO) μειώνει τη δραστηριότητα XOR, αλλά όχι την ενδογενή ή τα επίπεδα του mRNA. Επιπλέον, η DFO μειώνει τη δραστικότητα υπερεκφραζόμενης XOR, όχι όμως την ποσότητα της ανοσοδραστικής πρωτεΐνης. Η αύξηση δραστικότητας της XOR προκαλείται μεταγραφικά από το σίδηρο, αλλά μετα-μεταγραφικά αδρανοποιείται από την αποσιδήρωση [Martelin et al., 2002].

Η ενδοθηλιακή έκφραση XO και XDH εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το H₂O₂ και το ασβέστιο. Το H₂O₂ ρυθμίζει τα σχετικά επίπεδα των XO και XDH στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενός μονοπατιού, που απαιτεί ενδοπλασματική απελευθέρωση ασβεστίου. Το ασβέστιο, επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της μετατροπής από XDH σε XO [McNally et al., 2005].

Μια δεύτερη σειρά κυτοκινών, έχουν δείξει να επάγουν την έκφραση της XOR, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α, η IL-1 και η IL-6. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν τη μεταγραφή του γονιδίου XOR [Page et al., 1998; Pfeffer et al., 199; Hassoun, et al., 1998].

Τα κορτικοστεροειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη και η κορτιζόνη, προκαλούν την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου XOR [Garattini et al., 2003]. Η κορτιζόνη σχετίζεται με τη γαλουχία, ενώ η προλακτίνη αυξάνει την έκφραση αρκετών πρωτεϊνών του γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων της XOR [Kurosaki et al., 1996; McManaman et al., 2000]. Ο συνδυασμός προλακτίνης και κορτικοστεροειδών είναι πιο αποτελεσματικός από τις μεμονωμένες ουσίες στην αύξηση της XOR [McManaman et al., 2002]. Τα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της XOR είναι δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενα από δεξαμεθαζόνη, ενώ παρατηρείται συνεργική αύξηση από ταυτόχρονη παρουσία δεξαμεθαζόνης και προλακτίνης. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου XOR είναι λόγω της ενεργοποίησης υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών [Kurosaki et al., 1996].

Η XOR επάγεται και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο επιθήλιο του μαστού ποντικών στη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της εγκυμοσύνης, του τοκετού και καθ' όλη την περίοδο γαλουχίας. Οι μοριακοί μηχανισμοί, που ευθύνονται για την ανοδική ρύθμιση της XOR είναι κυρίως αποτέλεσμα αύξησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου [Kurosaki et al., 1996].

Η θεραπεία ποντικών με λιποπολυσακχαρίτες (LPS) οδηγεί σε στατιστικά σημαντική επαγωγή της δραστηριότητας XOR σε διάφορους ιστούς και όργανα. Η μεγαλύτερη αύξηση (3 φορές) παρατηρείται στους νεφρούς, ακολουθούμενη από του σπλήνα, του ήπατος, του ορθού και του παχέος εντέρου. Η XOR είναι ανθεκτική στην επαγωγή από τα LPS στον οισοφάγο, το στομάχι, τη νήστιδα, τον ειλέο, τους πνεύμονες και την καρδιά [Kurosaki et al., 1995].

Άλλα εξωγενή ερεθίσματα ικανά να προκαλέσουν αύξηση της XOR είναι το PMA (**P**horbol **M**yrystate **A**cetate) [Lin & Shih, 1994; Smith et al., 1991; Kim et al., 2002; Cameron & Pence, 1992; Reiners et al., 1991; Reiners & Rupp, 1989; Pence & Reiners, 1987; Reiners et al., 1987] και η 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-p-διοξίνη (TCDD) [Sugihara et al., 2001; Cantoni et al., 1987]. Δεν είναι σαφές αν το PMA είναι άμεσος επαγωγέας ή διεγείρει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών [Garattini et al., 2003].

Αρνητικοί ρυθμιστές	Υπεροξία NO DFO Ακτινομυκίνη D Υπεροξία
Θετικοί ρυθμιστές	Υποξία Λιποπολυσακχαρίδια Ιντερφερόνη γ Ιντερλευκίνη 1 Ιντερλευκίνη 6 Παράγοντας α νέκρωσης όγκου Κορτιζόνη Προλακτίνη Κυκλοεξαμίδη PMA Κιτρικό σιδηρούχο αμμώνιο FeSO ₄ Δεξαμεθαζόνη

Πίνακας 1.1: Παράγοντες, που ρυθμίζουν την έκφραση και τη δραστικότητα της XOR.

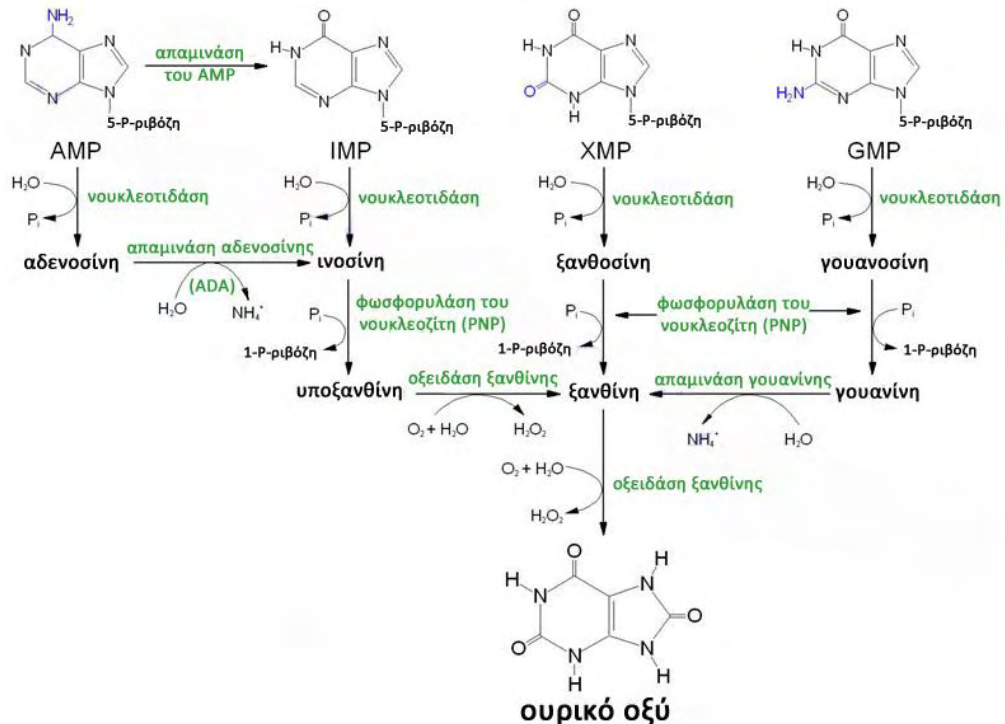
1.6 Φυσιολογικός ρόλος της XO πρωτεΐνης

Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την υδροξυλίωση μιας ευρείας ποικιλίας πουρινών, πυριμιδινών, περινών και αλδεϋδικών υποστρωμάτων [Enroth et al. 2000].

1.6.1 Καταβολισμός πουρινών

Οι πουρίνες, αδενίνη και γουανίνη, είναι συστατικά των νουκλεϊκών οξέων, των υψηλής ενέργειας φωσφορικών και τα μόρια κλειδιά σηματοδότησης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Η XOR καταλύει τις δυο τελευταίες αντιδράσεις

αποικοδόμησης των πουρινών, την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τη μετέπειτα οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Εικόνα 1.6), το οποίο αποβάλλεται από τους νεφρούς υπό φυσιολογικές συνθήκες.



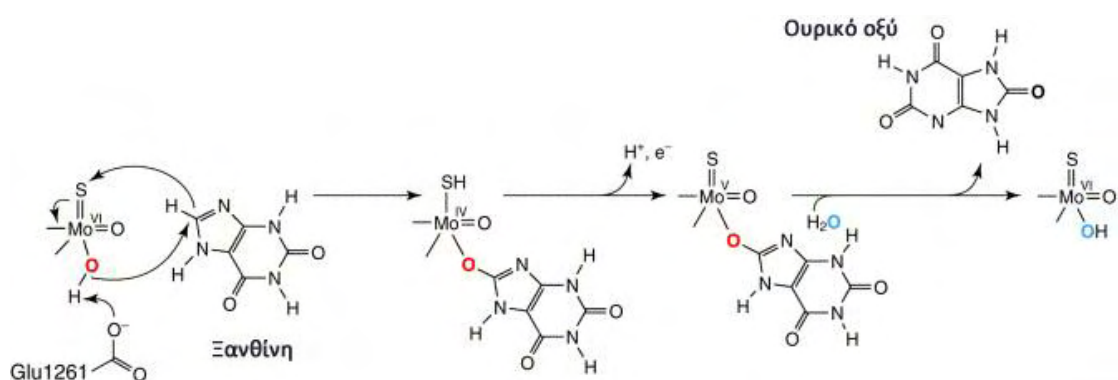
Εικόνα 1.6: Μονοπάτι καταβολισμού πουρινών από την οξειδάση της ξανθίνης.

Το πρώτο στάδιο αποικοδόμησης πουρινών περιλαμβάνει την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας, οπότε μετατρέπονται σε νουκλεοζίτες. Η διεργασία αυτή γίνεται είτε με μια ποικιλία από νουκλεοτιδάσες (εξειδικευμένες στις βάσεις) είτε από μη εξειδικευμένες φωσφατάσες. Οι νουκλεοζίτες, μπορούν να διασπαστούν 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 υπεροξείδιο 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.

1.6.2 Αντίδραση αναγωγής και αντίδραση οξείδωσης

Η αντίδραση αναγωγής (Εικόνα 1.7) συμβαίνει στο Mo-Co, όπου η XOR δέχεται δύο ηλεκτρόνια από την ξανθίνη, ανάγοντας το Mo(VI) σε Mo(IV). Από τη θέση C8 της ξανθίνης, μεταφέρεται ένα υδρογόνο στο θείο του μολυβδαινίου, με αποτέλεσμα το Mo=S να μετατρέπεται σε Mo-SH. Ταυτόχρονα μια πυρηνόφιλη εισβολή μιας ομάδας υδροξυλίου επιτελείται στο C8 της ξανθίνης σχηματίζοντας ουρικό οξύ. Αυτή η ομάδα υδροξυλίου προέρχεται από το νερό, αλλά είναι ακόμα άγνωστο αν αυτή αντιδρά αυτόνομα ή ως προσδέτης Mo. Έπειτα από δομική μελέτη της XOR από βόειο γάλα με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [Enroth et al., 2000], έχουν εντοπιστεί πολλά μόρια ύδατος στο ενεργό της κέντρο, τα οποία είναι δυνατό να εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Επίσης, από τις δομικές μελέτες έχει προκύψει ότι ένα βασικό αμινοξύ (Glu1261) της XOR βοηθάει στην πυρηνόφιλη προσβολή διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μεταφορά πρωτονίων.

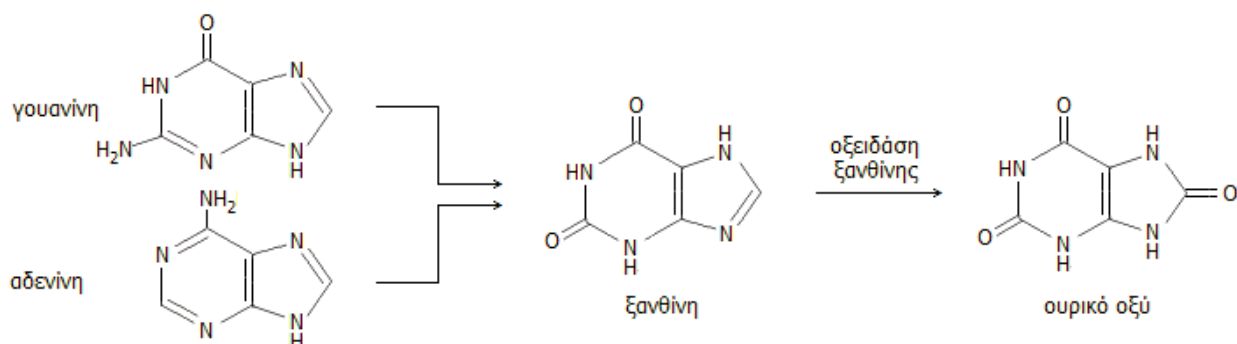


Εικόνα 1.7: Μηχανισμός αντίδρασης της XOR με το υπόστρωμα ξανθίνης (αναγωγή ενζύμου).

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 Fe₂-S₂, τα οποία χρησιμεύουν ως δεξαμενή ηλεκτρονίων για να διατηρήσουν το Mo-Co ως Mo(VI) και τη φλαβίνη ως FADH₂, ώστε να είναι αποτελεσματική η αντίδραση. Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια μεταφέρονται από το FAD στο NAD⁺ ή το O₂ [Olson et al., 1974; Hille & Massey, 1981]. Κατά την επαναοξείδωση της πλήρως ανηγμένης XO, τα δυο πρώτα βήματα έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά δυο ηλεκτρονίων στο O₂ και συνεπώς τη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Στη συνέχεια, η XO μεταφέρει τα ηλεκτρόνια, που απομένουν σε ξεχωριστά βήματα, με κάθε ηλεκτρόνιο να ανάγει ξεχωριστά το O₂ προς παραγωγή ·O₂⁻. Έτσι, η επαναοξείδωση της ανηγμένης XO αποδίδει δύο μόρια H₂O₂ και δύο ανιόντα ·O₂⁻. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η XDH παράγει περισσότερα ανιόντα ·O₂⁻ ανά mole O₂, 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 ·O₂⁻, η XDH αντιδρά πιο αργά με το οξυγόνο έχοντας ένα μέγιστο ποσό παραγωγής ανιόντων ·O₂⁻, που αναλογεί στο 25% της V_{max} της XO [Saito & Nishino, 1989].

1.6.3 Αντιοξειδωτική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης

Στον άνθρωπο, τα θηλαστικά και άλλους ουριοτελικούς οργανισμούς το ουρικό οξύ αποτελεί τελικό προϊόν καταβολισμού των πουρινών (αδενίνη και γουανίνη), είτε αυτές προέρχονται από DNA και RNA είτε από τη φυσιολογική και μη φθορά των κυττάρων. Το ένζυμο- κλειδί είναι η οξειδάση της ξανθίνης.



Εικόνα 1.8: Το καταβολικό σχήμα των πουρινικών βάσεων.

Το ουρικό οξύ μαζί με το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι από τις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ουσίες (ισχυρές αναγωγικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους), που κυκλοφορούν στο αίμα και περιορίζουν τις οξειδωτικές βλάβες από δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS) [Proctor, 1970].

Ο άνθρωπος διαθέτει το γονίδιο ουρικής, αλλά δεν είναι λειτουργικό. Πιστεύεται ότι η απουσία ουρικής (επομένως παρουσία ουρικού οξέος) υπήρξε ευεργετική για την εξέλιξή του, αφού το ουρικό οξύ δεσμεύει τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, προλαμβάνοντας έτσι τις οξειδωτικές βλάβες [Proctor, 1970].

Ο Cutler δείχνει για μεγάλο αριθμό ζώων (ειδικά για τον άνθρωπο) ότι οι συγκεντρώσεις ουρικού στο αίμα συσχετίζονται με τη μακροζωία [Cutler, 1984]. Ορισμένα από τα ερευνητικά συμπεράσματα μελετών πάνω στην αντιοξειδωτική δράση του ουρικού οξέος: το ουρικό ανιόν δεσμεύει όχι μόνο τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, αλλά και το οξυγόνο απλής κατάστασης μια σχετικά σταθερή ενεργειακά διεγερμένη μορφή του μοριακού οξυγόνου οξειδωτικά πολύ δραστικότερου του κανονικού μοριακού οξυγόνου (οξυγόνο τριπλής κατάστασης), η οποία παράγεται κατά την ακτινοβόληση του οξυγόνου π.χ. με έντονο ηλιακό φως [Ames et al., 1981; Kellogg et al., 1977], όπως επίσης την υπεροξυνιτρική ρίζα (O=N-O-O-) [Kean et al., 2000]. Τα ανιόντα του ουρικού οξέος και των μεθυλοπαραγώνων του παρεμποδίζουν την υπεροξείδωση των κυτταρικών μεμβρανών των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ανθρώπου από το όζον [Nishida, 1991], το υπεροξείδιο του υδρογόνου [Smith et al., 1983] και άλλους ριζικούς εκκινητές [Smith et al., 1986]. Τα ουρικά ανιόντα προλαμβάνουν την οξείδωση της οξυαιμογλοβίνης από τα νιτρώδη [Smith et al., 1984], όπως και τη διάσπαση της θυμίνης, γουανίνης και ουρακίλης από το όζον [Meadows & Smith, 1986]. Ακόμη, τα ουρικά ανιόντα αποδείχθηκαν αποτελεσματικά για την πρόληψη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων του αγελαδινού γάλακτος [Ostidal et al., 2000].

1.7 Κατανομή της XOR

Ο εντοπισμός της οξειδάσης της ξανθίνης έχει αναφερθεί σε διάφορους ιστούς από διάφορα είδη ζώων [Moriwaki et al., 1999]. Η κατανομή της XOR στους ιστούς των ζώων διαφέρει από είδος σε είδος [Al-Khalidi and Chaglassian,

1965; Muxfeldt and Schaper, 1987; Wajner and Harkness, 1989]. Η σχετική δραστικότητα του ενζύμου σε διαφορετικούς ιστούς επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, που μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τις διαφορές που παρατηρούνται στις διάφορες μελέτες που διερεύνησαν το μοτίβο κατανομής του ενζύμου [Carro et al., 2009].

1.7.1 Η οξειδάση της ξανθίνης στα θηλαστικά

Τα περισσότερα δεδομένα για την κατανομή της XOR στους ιστούς και τα κύτταρα, έχουν ληφθεί από ποντίκια [Terao, et al., 1992; Kurosaki et al., 1995] και αρουραίους [Moriwaki et al., 1998]. Σε αυτά τα ζώα, τα υψηλότερα ποσά ενζυμικής δραστικότητας βρίσκονται στο πρώτο μέρος του εντερικού σωλήνα. Μια βαθμιδωτή μείωση της έκφρασης της XOR παρατηρείται καθώς προχωράμε από το εγγύς προς το απώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου. Το πλάκωδες επιθήλιο του δωδεκαδάκτυλου και η νήσιδα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε mRNA της XOR και σε πρωτεΐνη [Terao, et al., 1992; Harrison, 2002; Kurosaki et al., 1995]. Παρόμοια κατανομή της XOR στο ανθρώπινο έντερο επιβεβαιώνεται με αναφορές για την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων δραστικότητας στα επιθηλιακά και λαγηνοειδή κύτταρα του εγγύς εντέρου [Linder et al., 1999]. Στα τρωκτικά, το ήπαρ και οι πνεύμονες είναι επίσης πλούσιες πηγές XOR [Terao, et al., 1992; Kurosaki et al., 1995]. Με δεδομένα, που λαμβάνονται από βοειδή [Jarasch, et al., 1981] πιστεύεται ότι η XOR είναι παρούσα στο τριχοειδικό ενδοθήλιο πολλών οργάνων και ιστών, ωστόσο αυτή η ιδέα έχει αμφισβητηθεί. Η XOR είναι παρούσα στο πλάσμα ποντικού [Battelli et al., 2001]. Ο μαστικός αδένας παρουσιάζει ιστό- και στάδιο- εξαρτώμενη έκφραση XOR. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, χαμηλά επίπεδα mRNA της XOR και χαμηλή ενζυμική δραστικότητα συνδέονται με το μαστικό μυοεπιθήλιο [McManaman et al., 2002; McManaman et al., 2000; Kurosaki et al., 1996]. Στην τελική φάση της εγκυμοσύνης και σε ολόκληρο το θηλασμό μια εντυπωσιακή επαγωγή δραστικότητας της XOR, παρατηρείται, ενώ επανέρχεται σε βασικά επίπεδα μετά την υποστροφή του αδένου στο τέλος του θηλασμού. Το φαινόμενο έχει μελετηθεί σε ποντικούς και αρουραίους και πιθανά διεξάγεται με παρόμοιο τρόπο στους ανθρώπους. Στη γαλουχία η XOR είναι ένα βασικό πρωτεϊνικό συστατικό των εκκρινόμενων σταγονιδίων λίπους [Garattini et al., 2003].

Εν κατακλείδι, τα υψηλότερα επίπεδα σε ιστούς θηλαστικών βρέθηκαν στο ήπαρ και στο έντερο [Harrison, 2002; Al-Khalidi & Chaglassian, 1965; Parks & Granger, 1986; Berry & Hare, 2004].

1.7.2 Η οξειδάση της ξανθίνης στον άνθρωπο

Η γονιδιακή έκφραση της XOR είναι υψηλότερη στο έντερο (επιθηλιακά και λαγηνοειδή κύτταρα) και το ήπαρ, ενώ εντοπίστηκαν χαμηλά επίπεδα μεταγραφής στους νεφρούς, τον καρδιακό μυ και τον εγκέφαλο [Saksela et al., 1998; Linder et al., 1999]. Η παρουσία ανιχνεύσιμων ποσοτήτων δραστηριότητας XOR σε όργανα και κύτταρα, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος, έχει αμφισβητηθεί [de Jong et al., 1990; Wajner & Harkness, 1989; Beckman et al., 1989; Hellsten-Westing, 1993]. Η XOR είναι παρούσα στο πλάσμα [Battelli et al., 1999]. Η δραστηριότητα της XOR ακολουθεί την κατανομή του mRNA, που είναι χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη σε ιστούς εκτός του ήπατος και του εντέρου. Στο ήπαρ, μόνο ο περιπυλαιοσ υποπληθυσμός συνθέτει το ένζυμο [Harrison, 2002]. Στο μαστικό αδένα, το πρωτεϊνικό επίπεδο της XOR αυξάνει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας [Linder et al., 1999] και το ένζυμο είναι παρόν στο ανθρώπινο γάλα [Sarnesto et al., 1996]. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι παρούσα στο ανθρώπινο μυομήτριο, τον πλακούντα, τις εμβρυικές μεμβράνες και το φθαρτό υμένα [Telfer et al., 1997].

1.7.3 Η οξειδάση της ξανθίνης στα ποντίκια

Αν και τα θηλαστικά αναλύθηκαν προηγουμένως, θα αναφέρουμε κάποια επιπλέον στοιχεία για τα ποντίκια. Εκτός από τους ιστούς, που ήδη αναφέρθηκαν για τα θηλαστικά, η XOR είναι παρούσα στα εγγύς σωληνάκια του νεφρού, τον πολφό του σπλήνα και τα συστατικά αγγεία της καρδιάς [Kurosaki et al., 1995]. Όσον αφορά το έντερο, το δωδεκαδάκτυλο περιέχει περίπου 2 έως 2,5 φορές περισσότερη δραστηριότητα XOR από την νήσιδα και τον ειλεό και 24 φορές περισσότερο από το παχύ έντερο και το ορθό [Kurosaki et al., 1995]. Επιπλέον, οι Krenitsky και Tuttle κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν δυο XO μορφές στο έντερο του ποντικίου [Krenitsky & Tuttle, 1978].

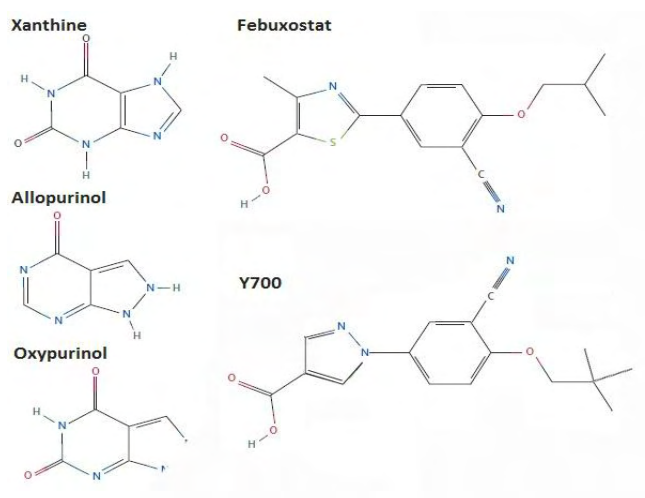
1.8 Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης

Οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 1.2) μειώνουν την παραγωγή του ουρικού οξέος και των ελευθέρων ριζών.

1.8.1 Οι διαδεδομένοι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

Η αλλοπουρινόλη οξειδώνεται γρήγορα από την οξειδάση της ξανθίνης στον ενεργό μεταβολίτη της, οξυπουρινόλη, που αναστέλλει επίσης την XO. Αλλοπουρινόλη και οξυπουρινόλη είναι δομικά ισομερή της υποξανθίνης και της ξανθίνης αντίστοιχα [Pál Pacher et al., 2006]. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η αλλοπουρινόλη είναι συναγωνιστικός αναστολέας, ενώ σε υψηλότερες μη συναγωνιστικός. Η οξυπουρινόλη είναι ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου. Ο σχηματισμός αυτής της ένωσης μαζί με τη σταθερότητά της στους ιστούς, είναι υπεύθυνοι για μεγάλο μέρος της φαρμακολογικής δράσης της αλλοπουρινόλης.

Όσον αφορά τη φαρμακοκινητική, η αλλοπουρινόλη απορροφάται ταχέως, επιτυγχάνοντας μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα μέσα σε 30 με 60 λεπτά, μετά από per os χορήγηση. Έχει σχετικά μικρό χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα (2-3 ώρες), ενώ η οξυπουρινόλη πολύ μεγαλύτερο (14 έως 30 ώρες). Αν και η αλλοπουρινόλη είναι πολύ αποτελεσματικό φάρμακο, είναι ένας σχετικά αδύναμος αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης. Σε δοκιμασίες in vitro, οι τιμές IC₅₀ είναι 0,2 έως 50 μM [Pál Pacher et al., 2006].



Εικόνα 1.9: Δομή χρησιμοποιούμενων αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης.

Η αναζήτηση για νέους αναστολείς της ΧΟ επικεντρώθηκε σε συνθετικά παράγωγα πουρίνης και πυριμιδίνης. Το φαρμακευτικό δομικό πλαίσιο με βάση τα μοτίβα πουρίνης και πυριμιδίνης είναι υπεύθυνο για κάποιες παρενέργειες της αλλοπουρινόλης. Αυτό προκάλεσε μια αναζήτηση νέων αναστολέων, που είναι δομικά διαφορετικοί [Borges et al., 2002], καθώς το δομικό πλαίσιο «σαν της ξανθίνης» δεν αποτελεί προϋπόθεση για την υψηλή ανασταλτική δραστηριότητα.

Την τελευταία δεκαετία, ανακαλύφθηκαν νέοι ισχυροί αναστολείς από διάφορες κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των αναλόγων πουρινών, ιμιδαζολικά και τριαζολικά παράγωγα, φλαβονοειδή και πολλά άλλα [Borges et al., 2002]. Δύο από αυτούς είναι πολύ ισχυρές νέες ενώσεις, η φεβουξοστάτη και η Υ-700 (Εικόνα 1.9). Έχουν ευνοϊκό τοξικολογικό προφίλ, υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και πιο ισχυρή και μακροχρόνια αντι-υπερουριχαιμική δράση από την αλλοπουρινόλη.

Η φεβουξοστάτη είναι ένας ισχυρός *per os* αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης και μειώνει τη συγκέντρωση ουρικού οξέος στον ορό [Okamoto et al., 2003; Becker et al., 2004]. Είναι παράγωγο της 2-αρυλικής θειαζόλης και αναστέλλει μόνο την ΧΟ και όχι άλλα ένζυμα του μεταβολισμού της πουρίνης και πυριμιδίνης [Takano et al., 2005]. Με ποσοστό απορρόφησης 85%, σε 1 ώρα μετά τη χορήγηση *per os* και χρόνο ημιζωής 4-18 ώρες, η άπαξ ημερησίως δόση είναι αποτελεσματική [Komoriya et al., 2004; Mayer et al., 2005]. Ο μεταβολισμός γίνεται κυρίως στο ήπαρ μέσω σχηματισμού γλυκουρονιδίου και οξείδωσης, ενώ απεκκρίνεται 50% στα κόπρανα και 50% στα ούρα, είτε αμετάβλητη είτε ως μεταβολικό προϊόν [Becker et al., 2004].

Φεβουξοστάτη και αλλοπουρινόλη έχουν παρόμοια προφίλ ασφάλειας, αν και δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις υπερευαισθησίας με τη φεβουξοστάτη [Burns & Wortmann, 2011]. Οι ασθενείς με αντιδράσεις υπερευαισθησίας στην αλλοπουρινόλη, που τους δόθηκε φεβουξοστάτη ανέχονταν καλά το φάρμακο [Terkeltaub et al., 2006]. Κατά συνέπεια, η φεβουξοστάτη θεωρείται κύριο φάρμακο για ασθενείς με δυσανεξία στην αλλοπουρινόλη, για εκείνους των οποίων η ουρική αρθρίτιδα δεν ελέγχεται με άλλες θεραπείες μείωσης ουρικού οξέος και για εκείνους με νεφρική ανεπάρκεια [Burns & Wortmann, 2011]. Πριν από την προσπάθεια απευαισθητοποίησης στην αλλοπουρινόλη, μία συχνά

ανεπιτυχή στρατηγική για την αντιμετώπιση ήπιων αντιδράσεων αλλοπουρινόλης, πρέπει να δοκιμαστεί η φεβουξοστάτη.

Μερικά γνωστά και νέα αντιοξειδωτικά και μη φαινολικές ενώσεις, κουμαρίνες, φλαβονοειδή και στεροειδή βρέθηκαν να έχουν σχετικά υψηλή ανασταλτική δραστικότητα. Η ποικιλία δέσμευσης υποστρωμάτων, που οξειδώνονται από την XO περιλαμβάνει και απλές αλειφατικές, αρωματικές και ετεροαρωματικές αλδεΐδες [Xia et al., 1999].

Αναστολείς	Ενώσεις
Παράγωγα πουρινών	8 azaadenine 9-phenylguanine 9-phenyl-6-guanine 2-amino-6-hydroxy-8-mercaptapurine 2-amino-6-purine thiol
Παράγωγα πυριμιδίνης	4 amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine 4 amino-6- mercaptopyrazolo[3,4-d] pyrimidine 4 aminopyrazolo[3,4-d] pyrimidine 1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one
Κιναζολίνες	2-amino-4-mercaptoquinazoline 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylquinazoline 2-amino-4-hydroxyquinazoline-6-carboxaldehyde
Ανάλογα βενζοθιαζινών	2-amino- 4H-1,3- benzothiazin-4 one 2-guanidino-4H-1,3- benzothiazin-4 one
Παράγωγο θειαζόλης	2-[3-cyano-4-(2-methylpropoxy)phenyl]-4-methylthiazole-5-carb oxylic acid
Φλαβονοειδή	Quercetin, Baicalein, Apigenin
Κουμαρίνες	7-hydrocumarin esculetin
Ξανθόνες	Norathyriol
Αουρόνες	Sulfuretin

Πίνακας 1.2: Ενώσεις, που λειτουργούν ως αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης.

Υπάρχουν δομικές κατηγορίες ενώσεων, που είναι πολλές εκατοντάδες φορές πιο ισχυρές από την αλλοπουρινόλη in vitro (τόσο παράγωγα πουρίνης

όσο και μη πουρίνης). Πολλά υποψήφια φάρμακα είναι είτε στη φάση της ανάπτυξης είτε κινούνται προς τις κλινικές δοκιμές.

1.8.2 Αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης από φυτικά εκχυλίσματα

[Karmella, 2011]

Εκχυλίσματα από 14 επιλεγμένα είδη φυτών των Φιλιππίνων, τα οποία χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους, εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης. Ο βαθμός αναστολής των φυτικών εκχυλισμάτων καθορίστηκε με τη μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης στα 295nm, η οποία συνδέεται με το σχηματισμό ουρικού οξέος. Το υψηλότερο ποσοστό αναστολής παρουσίασε το φυτό *Blumea balsamifera* 79.67%, ενώ ακολουθεί το *Mimosa pudica* με 62.36%. Η αλλοπουρινόλη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος με τιμή IC₅₀, που προσδιορίστηκε στο 6.1.

Είδος φυτού	Αναστολή 100μg/ml	IC ₅₀
<i>Adenantha payonina</i>	47.15	-
<i>Antegonon leptopus</i>	59.0	65.3
<i>Blumea balsamifera</i>	79.67	192.1
<i>Calophyllum inophyllum</i>	25.63	-
<i>Cassia alata</i>	24.81	-
<i>Cassia fistula</i>	61.9	-
<i>Gliricidia sepium</i>	6.94	-
<i>Michelia alba</i>	22.49	-
<i>Mimosa pudica</i>	62.36	32.8
<i>Portulaca olercea</i>	39.0	-
<i>Pogostemon cablin</i>	33.16	-
<i>Solanum tornum</i>	38.45	-
<i>Tinosphora rumphii</i>	39.99	-
<i>Vitex negundo</i>	50.42	-
Allopurinol	-	6.1

Πίνακας 1.3: Το επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής και IC₅₀ των 14 φυτικών εκχυλισμάτων.

Τα φυτικά εκχυλίσματα πέρασαν από ποιοτικό έλεγχο για τερπενοειδή, σαπωνίνες, τανίνες, φλαβονοειδή, στεροειδή, φαινολικές ενώσεις, αλκαλοειδή και

καρδιακές γλυκοσίδες, ώστε να δημιουργηθεί το φυτοχημικό προφίλ του εκάστοτε φυτού.

Τα φυτά *A. leptopus*, *B. balsamifera*, *C. fistula*, *M. pudica*, *V. Negundo* παρουσίασαν αναστολή δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης πάνω από 50% και ήδη βρίσκονται σε εξέλιξη περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό των ενώσεων, που είναι υπεύθυνες για την παρατηρούμενη βιοδραστικότητα. Στη συνέχεια, οι απομονωμένες και καθαρισμένες ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την παρασκευή φυτικών προϊόντων ή προτύπων ώστε να αναπτυχθούν αποτελεσματικά φάρμακα με λιγότερες παρενέργειες.

1.9 Κλινική σημασία αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης

1.9.1 Αναστολείς της οξειδάσης ξανθίνης στη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας και το σύνδρομο λύσης όγκου

Η κύρια χρήση των αναστολέων της XO είναι η θεραπεία της υπερουρικαιμίας και της ουρικής αρθρίτιδας. Η ουρική αρθρίτιδα είναι μία συχνή νόσος με συχνότητα >2% στους άνδρες ηλικίας άνω των 30 ετών και σε γυναίκες άνω των 50 ετών [Kramer & Curhan, 2002; Choi & Curhan, 2005]. Η συχνότητα αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας, φθάνοντας το 9% στους άνδρες και 6% σε γυναίκες άνω των 80 ετών [Choi & Curhan, 2005]. Η ουρική αρθρίτιδα εμφανίζεται σε άτομα, που έχουν υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό, ως αποτέλεσμα καθίζησης κρυστάλλων ουρικού μονονατρίου σε διάφορους ιστούς, που ακολουθείται από φλεγμονώδη αντίδραση.

Τυπικά συμπτώματα της ουρικής αρθρίτιδας περιλαμβάνουν οξεία υποτροπιάζουσα ουρική αρθρίτιδα, οζώδης τόφους όξινων κρυστάλλων ουρικού οξέος και νεφρολιθίαση ουρικού οξέος. Η πρόληψη και αντιμετώπιση της ουρικής αρθρίτιδας γίνεται είτε με αντι-υπερουρικαιμική θεραπεία είτε με ουρικοζουρικά φάρμακα ή με αναστολείς της XO.

Το σύνδρομο λύσης του όγκου περιλαμβάνει τις μεταβολικές διαταραχές, που συμβαίνουν κατά τη λύση των βλαστών πριν ή συχνότερα μετά την έναρξη της κυτταροτοξικής θεραπείας κακοηθών νοσημάτων. Θεωρείται αποτέλεσμα καταστροφής καρκινικών κυττάρων και απελευθέρωσης ενδοκυττάρων ιόντων, νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και των μεταβολιτών τους στον εξωκυττάριο χώρο.

Όταν οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί κορεστούν, εκδηλώνεται το σύνδρομο λύσης όγκου, που συνοδεύεται από υπερουρικαιμία, υπερκαλιαιμία, υποασβεστιαμία και ουραιμία. Μια επιπλέον, σημαντική κλινική χρήση της αλλοπουρινόλης και πιθανόν των μελλοντικών αναστολέων της XO είναι το σύνδρομο λύσης όγκου, που σχετίζονται με τη χημειοθεραπεία [Maurer et al., 1988; Smalley et al., 2000].

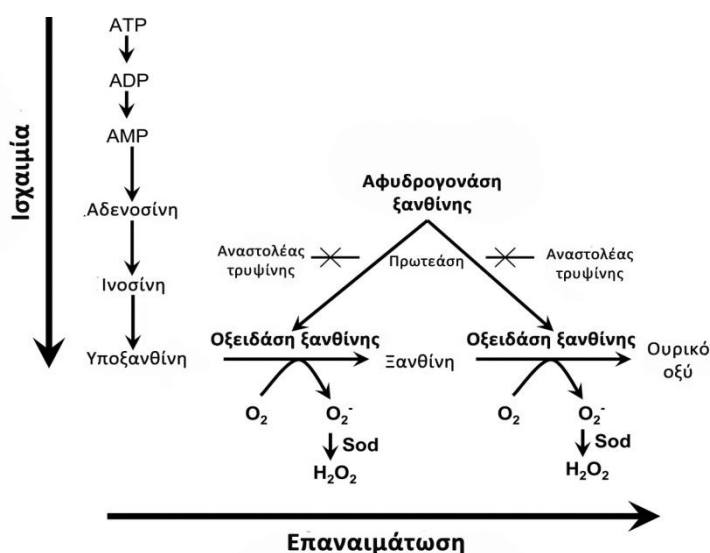
Η αλλοπουρινόλη με την οξυπουρινόλη, αναστέλλει αμετάκλητα την XO. Μολονότι η θεραπευτική δόση αλλοπουρινόλης είναι υψηλή, η χορήγηση μεγάλης δόσης από μόνη της, δεν αποτελεί πρόβλημα. Τα προβλήματα και η ανάγκη για νέους, βελτιωμένους αναστολείς της XO σχετίζονται κυρίως με την υψηλή συχνότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών, που παρατηρούνται με την αλλοπουρινόλη σε ασθενείς με ουρική αρθρίτιδα. Στις παρενέργειες συγκαταλέγονται οξεία προβλήματα (πυρετός και εξάνθημα), καθώς και η σταδιακή λευκοκυττάρωση, ηωσινοφιλία, αγγειίτιδα, άσηπτη μηνιγγίτιδα, νεφρίτιδα, νεφρική δυσλειτουργία και ηπατική δυσλειτουργία [Jarzobski et al., 1970; Boyer et al., 1977; Wolkenstein & Revuz, 1995; Parra et al., 1995; Duchene et al., 2000; Khoo & Leow, 2000; Greenberg et al., 2001]. Το «σύνδρομο υπερευαισθησίας αλλοπουρινόλης» μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο [Arellano & Sacristan, 1993].

Οι εναλλακτικές λύσεις για την αλλοπουρινόλη είναι περιορισμένες. Η απευαισθητοποίηση στην αλλοπουρινόλη είναι χρήσιμη ιδιαίτερα για εκείνους στους οποίους οι άλλες μέθοδοι θεραπείας έχουν αποτύχει. Αν διατίθεται benzbromarone, μπορεί να είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με ουρική αρθρίτιδα και ήπια έως μέτρια νεφρική ανεπάρκεια. Η ανασυνδυασμένη ουρική οξειδάση δεν είναι ευρέως διαθέσιμη, αλλά έχει δώσει υπόσχεση για τη βραχυπρόθεσμη προφύλαξη και την αντιμετώπιση της υπερουρικαιμίας, που σχετίζεται με χημειοθεραπεία, σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικές και μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές [Fam, 2001].

1.9.2 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στην ισχαιμία-επαναιμάτωση

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 ο Granger et al. έδειξαν ότι η ισχαιμική βλάβη του εντέρου λαμβάνει χώρα κατά την φάση της επαναιμάτωσης και

μειώνεται από τη δράση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Με βάση αυτή την παρατήρηση, υπέθεσαν ότι δραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου (ROS), που προέρχονται από την XO συμβάλλουν στην ισχαιμική βλάβη μέσω καταβολισμού ATP κατά τη διάρκεια της υποξίας και της αυξημένης διαθεσιμότητας δεκτών ηλεκτρονίων στην επαναιμάτωση (Εικόνα 1.10). Από την εισαγωγή της έννοιας «βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης» [Granger et al., 1981; McCord, 1985], αρκετά γεγονότα συνηγορούν στο ρόλο των ROS, προερχόμενα από XO, και στις ευεργετικές επιδράσεις των αναστολέων της XO ενάντια στην ισχαιμική βλάβη της καρδιάς, του εγκεφάλου, του εντέρου, του ήπατος, των νεφρών, των πνευμόνων και άλλων ιστών.



Εικόνα 1.10: Υπόθεση δημιουργίας βλάβης σε ισχαιμία- επαναιμάτωση. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, οι βαθμιδώσεις των διαμεμβρανικών ιόντων εκμηδενίζονται, επιτρέποντας κυτταροσολικές συγκεντρώσεις ασβεστίου να αυξάνονται, που με τη σειρά τους, ενεργοποιούν μια πρωτεάση, η οποία μετατρέπει μη αντιστρεπτά την XDH σε XO. Ταυτόχρονα, κυτταρική ATP καταβλίζεται σε υποξανθίνη, η οποία συσσωρεύεται. Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, η XO χρησιμοποιεί τα επανεισερχόμενα οξυγόνα και υποξανθίνη για να παράγει υπεροξείδιο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. [Granger et al., 1981, 1986; McCord, 1985]

1.9.2.1 Η οξειδάση της ξανθίνης στην ισχαιμία- επαναιμάτωση του μυοκαρδίου

Μία από τις μεγαλύτερες μελέτες και αμφιλεγόμενους τομείς έρευνας στον τομέα της οξειδάσης της ξανθίνης έχει σχέση με τον παθογενετικό ρόλο της XO στο έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Μελέτες πριν από δύο δεκαετίες ανέφεραν ότι η χορήγηση αλλοπουρινόλης έχει σωτήρια αποτελέσματα στην ισχαιμική επαναιμάτωση της καρδιάς [McCord, 1985; Schrader, 1985; Berry & Hare 2004]. Ο Manning το 1984, έδειξε ότι η επαναιμάτωση, που προκαλείται από αρρυθμίες, όπως και το μέγεθος του εμφράγματος μειώνονται με χορήγηση αλλοπουρινόλης στους αρουραίους. Παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν και από άλλους ερευνητές σε κουνέλι, σκύλο, και χοίρο. Παράλληλα, υπήρξε μια σειρά από ομάδες, που δεν μπορούσαν να επιβεβαιώσουν την προστατευτική επίδραση της αλλοπουρινόλης σε μυοκαρδιακή ισχαιμία και επαναιμάτωση, ιδίως σε πιο σοβαρές καταστάσεις ισχαιμίας.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η ΧΟ είναι παρούσα στην καρδιά [MacGowan et al., 1995; Berry & Hare 2004] και η συσσώρευση υποστρώματος συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, που οδηγεί στην παραγωγή των ελεύθερων ριζών στο στάδιο της επαναιμάτωσης [Xia & Zweier, 1995].

Αν και ο μηχανισμός δράσης παραμένει αμφισβητήσιμος, οι έρευνες επιβεβαίωσαν την καρδιοπροστατευτική δράση της αλλοπουρινόλης και την επέκτειναν στην υποξία, τις συνθήκες καρδιοπληγίας [Bergsland et al., 1987; Vinten-Johansen et al., 1988], την καρδιοπνευμονική χειρουργική επέμβαση [Coghlan et al., 1994; Castelli et al., 1995] και την οξεία απόρριψη του καρδιακού αλλομοσχεύματος (Akizuki et al., 1985).

Η καρδιοπροστατευτική δράση της αλλοπουρινόλης είναι κλινικά εκμεταλλεύσιμη. Η αλλοπουρινόλη μείωσε σημαντικά τη θνησιμότητα μετά από επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (bypass), βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία [Johnson et al., 1991], μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων [Coghlan et al., 1994], τις αρρυθμίες, την ανάγκη για ινοτρόπα και τα περιεχειρητικά εμφράγματα του μυοκαρδίου [Rashid & Olsson, 1991].

Σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, η συνδυασμένη θεραπεία με αλλοπουρινόλη και erinit οδήγησε σε σημαντική μείωση στον ορό και στα ούρα των επιπέδων του ουρικού οξέος και της λιπιδικής υπεροξειδωσης [Kaliakin & Mit'kin, 1993]. Σε άλλη μελέτη θεραπείας ασθενών με ισχαιμική καρδιακή νόσο, η αλλοπουρινόλη αύξησε εντυπωσιακά την επίπτωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, γεγονός, που υποδηλώνει ότι μπορεί να αντενδείκνυται σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιακή νόσο [Parmley et al., 1992].

Έτσι, τα δεδομένα είναι μάλλον αντιφατικά, χωρίς μεγάλης κλίμακας δεδομένα διαθέσιμα. Απαιτούνται μεγαλύτερες τυχαιοποιημένες μελέτες για να καθορίσουν την τελική χρησιμότητα της αλλοπουρινόλης στο οξύ έμφραγμα σε συνθήκες επαναιμάτωσης.

1.9.2.2 Η οξειδάση της ξανθίνης στο εγκεφαλικό επεισόδιο

Η αλλοπουρινόλη βρέθηκε να είναι προστατευτική ενάντια στη θνησιμότητα και στη νευρολογική βλάβη από εγκεφαλικό επεισόδιο σε μοντέλο υπερτασικού αρουραίου [Itoh et al., 1986]. Σε μόνιμη απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας σε αρουραίους, που προχορηγήθηκε αλλοπουρινόλη, το μέγεθος του εμφράγματος μειώνεται περίπου 35% [Martz et al., 1989]. Η αλλοπουρινόλη είναι επίσης αποτελεσματική σε εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία [Akdemir et al., 2001] και υποξική-ισχαιμική βλάβη [Palmer et al, 1990, 1993; Shadid et al., 1998]. Σε σχετικά ήπιο εγκεφαλικό επεισόδιο, η οξυπουρινόλη βελτίωσε τα κυτταρικά επίπεδα ATP [Phillis et al., 1995]. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες μελέτες η οξυπουρινόλη δεν έχει σημαντική προστατευτική δράση [Arai et al., 1998; Nakashima et al., 1999] και οι λόγοι για τις διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών είναι ασαφείς.

Μέχρι στιγμής, η ανθρώπινη θεραπευτική εμπειρία με αλλοπουρινόλη περιορίζεται σε μία μελέτη, που πραγματοποιήθηκε σε βρέφη με σοβαρή ασφυξία [Van Bel et al., 1998]. Η αλλοπουρινόλη έτεινε να αυξήσει την επιβίωση και ασκεί ευεργετικά αποτελέσματα στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών, τον όγκο εγκεφαλικής αιματικής ροής και την ηλεκτρική δραστηριότητα του εγκεφάλου.

Μια μελέτη έδειξε ότι η αυξημένη δραστικότητα οξειδάσης της ξανθίνης είναι, εν μέρει, υπεύθυνη για την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου σε μοντέλο αρουραίων με κρανιοεγκεφαλική κάκωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναστολή της XO μπορεί να είναι πιθανά θεραπευτική [Solaroglu et al., 2005].

1.9.2.3 Η οξειδάση της ξανθίνης στη σπλαχνική ισχαιμία- επαναιμάτωση

Η προχορήγηση αλλοπουρινόλης είναι προστατευτική σε ισχαιμική επαναιμάτωση του εντέρου και επηρεάζει ευεργετικά τις αλλαγές στην αγγειακή διαπερατότητα [Parks et al., 1982; Parks & Granger, 1983; Granger et al., 1986; Kulah et al., 2004], τη διήθηση ουδετερόφιλων [Grisham et al., 1986; Riaz et al., 2002], τα επίπεδα φλεγμονωδών εντερικών χημειοκινών [Riaz et al., 2003], την κινητικότητα [Hakguder et al., 2002], και τη θνησιμότητα [Megison et al., 1990]. Η παραγωγή υπεροξειδίου από την οξειδάση της ξανθίνης μπορεί να προκαλέσει απελευθέρωση ισταμίνης στην επαναιμάτωση του εντέρου [Boros et al., 1989]. Προστασία από εντερική βλάβη επαναιμάτωσης μπορεί να επιτευχθεί με την αναστολή της XO από βολφράμιο [Pitt et al., 1991].

Παρόμοια με την καρδιά, αμφιβολίες διατυπώθηκαν σχετικά με τη δράση της αλλοπουρινόλης για προστασία του ισχαιμικού εντέρου [Garcia et al., 1990; Boros et al., 1991; Nilsson et al., 1994]. Υπάρχουν επίσης διαφωνίες σχετικά με το χρόνο και τη σημασία της μετατροπής της XO σε XDH κατά τη διάρκεια της εντερικής ισχαιμίας [Parks et al., 1988; Vatistas et al., 1998].

1.9.2.4 Η οξειδάση της ξανθίνης στην ισχαιμία- επαναιμάτωση του ήπατος, των νεφρών, των πνευμόνων και άλλων οργάνων

Υπάρχει πειραματική απόδειξη για το ρόλο της οξειδάσης της ξανθίνης στην ισχαιμία και επαναιμάτωση του ήπατος και των νεφρών. Η XO, που παράγει δραστικά είδη οξυγόνου έχει προταθεί ως μεσολαβητής σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος φλεγμονώδους γονιδιακής έκφρασης [Matsumura et al., 1998; Matsui et al., 2000]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της XO, που απελευθερώνεται από το κατεστραμμένο ήπαρ είναι ότι με τη σειρά της, ενεργεί ως μεσολαβητής για να προκαλέσει βλάβη σε απομακρυσμένο όργανο ή ιστό.

Όσον αφορά τη βλάβη επαναιμάτωσης στους νεφρούς, οι Owens et al. (1974) ανέφεραν σημαντική προστασία ενάντια στην καταστροφή μοσχεύματος νεφρού, από την αλλοπουρινόλη. Αν και τα στοιχεία για τη διατήρηση και αποθήκευση ανθρώπινων νεφρών δεν είναι πειστική [Toledo-Pereyra et al., 1977], η αλλοπουρινόλη έγινε βασικό συστατικό για την αποθήκευση οργάνων.

Υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την προστατευτική επίδραση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης στη βλάβη ισχαιμικής- επαναιμάτωσης του πνεύμονα [Lynch et al., 1988; AIBA et al., 1992; Okuda et al., 1993], αλλά όχι στο σκελετικό μυ [Dorion et al., 1993].

1.9.3 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στην καταπληξία

Το μεγαλύτερο μέρος της πειραματικής εμπειρίας σε σχέση με την οξειδάση της ξανθίνης, την αλλοπουρινόλη και την καταπληξία, σχετίζεται με μοντέλα αιμορραγικού σοκ. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, επειδή το αιμορραγικό σοκ παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τις διάφορες μορφές της ισχαιμίας- επαναιμάτωσης και μάλιστα θεωρείται από πολλούς ερευνητές ως μια μορφή ισχαιμίας- επαναιμάτωσης σε ολόκληρο το σώμα. Στα τέλη του 1960 ο Smith και οι συνεργάτες του καθώς και άλλες ομάδες απέδειξαν πως η θεραπεία με αλλοπουρινόλη προστατεύει από τη θνησιμότητα και τη βλάβη οργάνων, που συνδέονται με διάφορα μοντέλα σοβαρού αιμορραγικού σοκ [Crowell et al., 1969; Baker, 1972; Et Lazarus al., 1974; Hopkins et al., 1975]. Η αλλοπουρινόλη προστατεύει από ηπατική βλάβη, μειώνει το βαθμό βλάβης του DNA και διατηρεί υψηλά τα φωσφορικά ενεργειακά επίπεδα του ιστού [Cunningham & Keaveny, 1978]. Πρόσθετος προστατευτικός ρόλος της αλλοπουρινόλης περιλαμβάνει προστασία κατά της αγγειακής βλάβης και της προοδευτικής αιμοδυναμικής ανεπάρκειας [Parks et al., 1983; Allan et al., 1986; Bond et al., 1988; Flynn et al., 1997, 1999]. Η μετατροπή της XDH σε XO εμφανίζεται σε αιμορραγικό σοκ. Η κυκλοφορούσα XO φαίνεται να εμπλέκεται στη βλάβη απομακρυσμένων οργάνων, που σχετίζονται με την αιμορραγική καταπληξία.

Υπάρχουν μερικές πειραματικές αποδείξεις όσον αφορά την αυξημένη έκφραση XO και τα περιορισμένα ευεργετικά αποτελέσματα της αλλοπουρινόλης σε άλλες μορφές σοκ (σηψαιμικό, σηπτικό, τραυματικό, αναφυλακτικό και προκαλούμενο από έγκαυμα) [Parker & Smith, 1972; Shatney et al., 1980; Saez et al., 1984; McKechnie et al., 1986; Novotny et al., 1988; Lochner et al., 1989; Ahn et al., 1990; Castillo et al., 1991; Ward et al., 1992; Mainous et al., 1993; Xu et al., 1993; Takeyama et al., 1996; Cetinkale et al., 1999; Khadour

et al., 2002; Wang et al., 2002]. Δυστυχώς, οι παραπάνω βασικές παρατηρήσεις, που αναφέρονται δεν μεταφράζεται σε κλινικές παρατηρήσεις.

1.9.4 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ένα ρόλο για την οξειδάση της ξανθίνης στην παθογένεια της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας (**Congestive Heart Failure, CHF**) [Landmesser & Drexler, 2002; Berry & Hare, 2004; Doehner & Anker, 2005; Kittleson, 2005; Pacher et al., 2005; Ungvari et al., 2005]. In vitro μελέτες σε απομονωμένες καρδιές έχουν δείξει ότι η προοδευτική ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα XO του μυοκαρδίου, τα οποία συμβάλουν στην ενίσχυση του οξειδωτικού στρες στην καρδιά [Ferdinandy et al., 1999, 2000]. Σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, έχουν σημειωθεί αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος καθώς και αύξηση δραστηριότητας της XO του μυοκαρδίου [Leyva et al., 1998; Cappola et al., 2001]. Υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του ουρικού οξέος και της σοβαρότητας της χρόνιας φλεγμονής [Leyva et al., 1998].

Επειδή η οξειδάση της ξανθίνης στο μυοκάρδιο είναι αυξημένη [Ekelund et al., 1999; De Jong et al., 2000; Cappola et al., 2001], η κανονική αλληλεπίδραση μεταξύ NO και XO μπορεί να διαταραχθεί στη CHF.

Σε μια πρόσφατη μελέτη από τον Kögler, η οξυπουρινόλη ενίσχυσε την καρδιακή συσταλτικότητα και βελτίωσε τη μηχανοενεργική ζεύξη σε αρουραίους με καρδιακή ανεπάρκεια. Οι ινοτρόπες δράσεις της οξυπουρινόλης ήταν εντονότερες σε αρουραίους με ανεπάρκεια του μυοκαρδίου, ένας ιστός, που παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα XOR. Επιπλέον, η οξυπουρινόλη δεν επηρέασε το δυναμικό ηρεμίας και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} , έτσι η λειτουργία του μυοκαρδίου δεν επηρεάζεται [Kögler et al., 2003], η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη θεραπευτική χρήση της οξυπουρινόλης σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια [Freudenberger et al., 2004]. Αυτά και άλλα παρόμοια προκλινικά αποτελέσματα ενθάρρυναν την κλινική δοκιμή για την οξυπουρινόλη στη CHF, όμως μία μελέτη φάσης II δεν κατόρθωσε να εμφανίσει σημαντικά οφέλη του αναστολέα.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι πηγές των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου είναι πολλές στην καρδιακή ανεπάρκεια [Sorescu & Griendling, 2002], είναι πιθανό ότι οι ευεργετικές επιδράσεις της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης μπορεί να ενισχυθούν όταν αναστολείς της XO χρησιμοποιούνται ως μέρος συνδυαστικής θεραπευτικής προσέγγισης. Παρ' όλα αυτά, η θεραπεία με αναστολή της XO σε έμφραγμα του μυοκαρδίου και καρδιακή ανεπάρκεια είναι ελκυστική για τρεις λόγους. Πρώτον, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος σχετίζονται έντονα με τα ποσοστά θνησιμότητας σε συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [Cicoira et al., 2002; Doehner et al., 2002; Anker et al., 2003] και οι αναστολείς της XO ασκούν ορισμένες θετικές επιδράσεις, σε ζώα και ανθρώπους με καρδιακή ανεπάρκεια. Δεύτερον, η αλλοπουρινόλη και ο ενεργός μεταβολίτης της είναι γνωστές και σχετικά ασφαλή φάρμακα, που έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας. Τρίτον, ο μηχανισμός δράσης είναι μοναδικός και έτσι αναμένεται να ενισχύσει τα ευεργετικά αποτελέσματα των συμβατικών θεραπευτικών παραγόντων (π.χ. β-αναστολείς και αναστολείς μετατροπής αγγειοτενσίνης).

1.9.5 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στις αγγειακές νόσους: Υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, αθηροσκλήρωση και διαβήτη

Το ουρικό οξύ στον ορό είναι ένας σημαντικός, ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακές και νεφρικές παθήσεις, ιδιαίτερα σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, διαβήτη και υπέρταση [Alderman, 2002; Alderman & Aiyer, 2004; Doehner & Anker 2005]. Σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια ή διαβήτη, αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος είναι εξαιρετικά προγνωστικά θνησιμότητας. Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους το ουρικό οξύ παίζει παθογενετικό ρόλο σε καρδιαγγειακές νόσους είναι ελάχιστα κατανοητοί, η υπερουριχαιμία συνδέεται με καταστροφικές συνέπειες για την αγγειακή λειτουργία. Σχετικά πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς με υπερουριχαιμία είχαν μειωμένη ροή με μεσολάβηση διαστολής, η οποία ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα πριν από 3 μήνες λόγω θεραπείας με αλλοπουρινόλη [Mercurio et al., 2004]. Επιπλέον, το ουρικό οξύ βρέθηκε ότι αναστέλλει τόσο το βασικό όσο και τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα ανάπτυξης, που επάγεται από την παραγωγή νιτρικού οξειδίου [Khosla et al., 2005].

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί ένα κυρίαρχο χαρακτηριστικό της πρόωρης αθηροσκλήρωσης, διαβήτη, υπέρτασης και καρδιακής ανεπάρκειας και καθιστά τα άτομα επιρρεπή σε καρδιαγγειακές επιπλοκές και σχηματισμό μικροθρόμβων. Έχει αποδειχθεί ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που σχετίζεται με τις διαταραχές αυτές συνδέεται με τον τοπικό σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου στην περιοχή του αγγειακού ενδοθηλίου [Li & Shah, 2004]. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις, που υποδηλώνουν ότι το υπεροξειδίο, που προέρχεται από XO, συμβάλλει σημαντικά στην αγγειακή νόσο σε ορισμένες από τις προαναφερθείσες καταστάσεις και η αναστολή της XO μπορεί να ασκήσει ευεργετική επίδραση στη μειωμένη αγγειακή λειτουργία [Berry & Hare, 2004].

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, δεν υπάρχει κλινική απόδειξη ότι η αλλοπουρινόλη βελτιώνει την ενδοθηλιοεξαρτώμενη λειτουργία των αγγείων σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια [Doehner et al., 2002; Farquharson et al., 2002], στους οποίους η δραστικότητα της δεσμευμένης XO στο ενδοθήλιο αυξάνεται και συσχετίζεται αντιστρόφως με την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή [Landmesser & Drexler, 2002]. Η αναστολή XO με αλλοπουρινόλη αντιστρέφει επίσης την NO-εξαρτώμενη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε δεινούς καπνιστές [Guthikonda et al., 2003, 2004]. Είναι ενδιαφέρον, ότι ο καπνός ρυθμίζει προς τα πάνω την XO και αυξάνει τη δραστικότητά της στα πνευμονικά ενδοθηλιακά κύτταρα [Kayyali et al., 2003].

Η οξειδάση της ξανθίνης εμπλέκεται στην παθογένεια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, που σχετίζεται με **υπερχοληστερολαιμία** και **αθηροσκλήρωση**. Η διατημητική καταπόνηση, η οποία εμφανίζεται σε περιοχές της κυκλοφορίας, που είναι ευάλωτες σε αρτηριοσκλήρυνση, προκαλούμενη από την επαγωγή υπεροξειδίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναφέρθηκε να εξαρτάται από τη δραστικότητα της XO [McNally et al., 2003]. Στο αγγειακό σύστημα των κουνελιών με υπερχοληστερολαιμία, θεραπεία με οξυπουρινόλη οδήγησε σε μείωση της αγγειακής παραγωγής ελεύθερων ριζών [Ohara et al., 1993; Mugge et al., 1994; White et al., 1996]. Η δραστικότητα της XO στο αγγειακό σύστημα οφείλεται στην εναπόθεση της κυκλοφορούσας XO στις θεικές γλυκοζαμινογλυκάνες στην επιφάνεια της έσω πλευράς των ενδοθηλιακών

κυττάρων [White et al., 1996]. Η αρχική πηγή της κυκλοφορούσας ΧΟ στην υπερκολληστερολαιμία είναι ασαφής. Είναι ενδιαφέρον ότι η τοπική συγκέντρωση του ουρικού οξέος είναι αυξημένη σε αθηρωματικές πλάκες από καρωτιδικά δείγματα ενδαρτηρεκτομής, ενώ η ΧΟ και η κολληστερόλη συνεντοπίζονται [Patetsios et al., 2001].

Υπάρχουν πρόσφατα στοιχεία για τον παθογενετικό ρόλο της οξειδάσης της ξανθίνης στην αγγειακή δυσλειτουργία, που σχετίζεται με το **διαβήτη**: υπάρχει μια αύξηση των επιπέδων της ΧΟ στο πλάσμα και το ήπαρ σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I [Desco et al., 2002]. Η ηπαρίνη απελευθερώνει τη δεσμευμένη ΧΟ από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επίσης μειώνει την παραγωγή υπεροξειδίου από τους αορτικούς δακτυλίους διαβητικών κουνελιών [Desco et al., 2002]. Ο διαβήτης προκαλεί επίσης αύξηση δραστηριότητας της ΧΟ στο ήπαρ αρουραίων και η ΧΟ απελευθερώνεται από το ήπαρ των ζώων [Desco et al., 2002]. Η δραστηριότητα της ΧΟ του πλάσματος ως εκ τούτου αυξάνεται σε διαβητικά ποντίκια και συσχετίζεται με τα επίπεδα του υπεροξειδίου. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, η αλλοπουρινόλη μείωσε το βαθμό του οξειδωτικού στρες [Desco et al., 2002], ενώ σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II και ήπια υπέρταση, η παρατεταμένη θεραπεία με αλλοπουρινόλη οδήγησε σε σημαντικές βελτιώσεις στην περιφερική ενδοθηλιοεξαρτώμενη λειτουργία [Butler et al., 2000]. Συλλογικά, φαίνεται ότι η ΧΟ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών στο διαβήτη. Δεδομένης της σημασίας του οξειδωτικού στρες στην ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών, οι αναστολές της ΧΟ θα μπορούσαν να έχουν σημαντικό θεραπευτικό όφελος σε διαβητικούς ασθενείς.

Υπάρχουν επίσης στοιχεία, που εμπλέκουν την οξειδάση της ξανθίνης στην παθογένεια της **υπέρτασης**. Στις καρδιές υπερτασικών αρουραίων, αναφέρθηκε αυξημένη δραστηριότητα ΧΟ. Επίσης αναφέρθηκε η αυξημένη δραστηριότητα ΧΟ στους μεσεντερικούς ιστούς σε αυθόρμητα υπερτασικούς αρουραίους [SHRs] καθώς και η ομαλοποίηση της λειτουργίας του ενδοθηλίου και της αρτηριακής πίεσης μετά την αναστολή της ΧΟ από βολφράμιο. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στο πλάσμα συνδέονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε υπερτασικούς ασθενείς [Alderman, 1999; Alderman et al., 1999]. Σε ασθενείς με ήπια υπέρταση, που σχετίζεται με διαβήτη τύπου II, χρόνια θεραπεία με

αλλοπουρινόλη βελτιώνει την περιφερική αγγειακή λειτουργία [Butler et al., 2000].

Αν και η φυσιολογική γήρανση είναι γνωστό ότι σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες στο αγγειακό σύστημα [Van der Loo et al., 2000; Pacher et al., 2002; Csiszar et al., 2002], η αυξημένη XO δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο αυξημένο οξειδωτικό στρες [Csiszar et al., 2002].

1.9.6 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και σε άλλες φλεγμονώδεις νόσους

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για τον παθογενετικό ρόλο της οξειδάσης της ξανθίνης σε ορισμένα μοντέλα ποντικών με κολίτιδα, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και δωδεκαδακτυλικό έλκος. Η αλλοπουρινόλη αποδείχτηκε αποτελεσματική σε συνδυασμό με τη συνήθη θεραπεία με 5-αμινοσαλικυλικό οξύ, σε ανθρώπινες δοκιμές [Salim, 1992; Jarnerot et al., 2000].

Ωστόσο, σε μία μελέτη, η αύξηση της χημειοφωταύγειας, που παρατηρήθηκε στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου ασθενών με κολίτιδα δεν αναστάλθηκε με αλλοπουρινόλη [Sedghi et al., 1993]. Σε ασθενείς είναι πιθανό τα βασικά επίπεδα της XO, με την παρουσία άλλων πηγών οξειδωτικού στρες και NO-επαγόμενο στρες κατά την κολίτιδα, να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου, ακόμη και εν απουσία της προς τα πάνω ρύθμισης της XO. Εναλλακτικά, είναι επίσης δυνατό οι ευεργετικές επιδράσεις της αλλοπουρινόλης στην κολίτιδα να μην έχουν σχέση με την αναστολή της XO, αλλά με την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών. Η τελευταία αυτή πρόταση υποστηρίζεται από μια πειραματική μελέτη του Keshavarzian (1990), στην οποία η μείωση της XO με βολφράμιο ήταν αναποτελεσματική στην ελάττωση των συμπτωμάτων της κολίτιδας, ενώ η αλλοπουρινόλη ήταν αποτελεσματική.

Υπάρχουν ενδείξεις για αυξημένα κυκλοφορούντα επίπεδα της XO σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [Miesel & Zuber, 1993]. Η αλλοπουρινόλη βελτιώνει τα συμπτώματα της αρθρίτιδας σε ζωικά μοντέλα με ρευματοειδή αρθρίτιδα [Miesel et al., 1994; Yossif et al., 1995].

Υπάρχουν επίσης ορισμένα στοιχεία για το ρόλο της ΧΟ στην παθογένεια της δρεπανοκυτταρικής νόσου, μία ασθένεια με μια ποικιλία συμπτωμάτων συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, ισχαιμίας- επαναιμάτωσης, καθώς επίσης και μια υψηλή συχνότητα υπερουρικαιμίας και ουρικής αρθρίτιδας [Reynolds, 1983]. Υπάρχει ένας σημαντικός βαθμός μετατροπής της ΧDH σε ΧΟ και απελευθέρωση της ΧΟ στη συστηματική κυκλοφορία [Osarogiagbon et al., 2000].

Επιπλέον φλεγμονώδεις νόσοι στις οποίες εμπλέκεται η ΧΟ ή η ευεργετική επίδραση των αναστολέων της περιλαμβάνουν: πνευμονία [Akaike et al., 1990; Ikeda et al., 1992; Miyakawa et al., 2002; Wright et al., 2004], σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας [Mabley et al., 2003], χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [Komaki et al., 2005], νεφρίτιδα [Roberts et al., 1990; Gwinner et al., 1999], παγκρεατίτιδα [Niederau et al., 1992; Czako et al., 2000; Folch et al., 2001; Zeki et al., 2002], περιτονίτιδα και το περιτόναιο [Rijhwani et al., 1995; Cavallari et al., 2000], ραγοειδίτιδα [Augustin et al., 1994, 1999] και δερματίτιδα [Deliconstantinos et al., 1996].

1.9.7 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες μορφές τοξικής βλάβης οργάνων

Η οξειδάση της ξανθίνης εμπλέκεται σε ποικιλία τοξικών βλαβών σε όργανα, ενώ η θεραπεία με αλλοπουρινόλη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε αυτές. Τα μοντέλα τοξικής βλάβης περιλαμβάνουν διάφορες μορφές ηπατικής βλάβης, που προκαλούνται από ιονίζουσες ακτινοβολίες [Srivastava et al., 1999, 2002], αιθανόλη [Lieber, 1997; Kono et al., 2000], κοκαΐνη [Aoki et al., 1997], θειοακεταμίδιο [Ali et al., 2001], ακεταμινοφαίνη [Knight et al., 2001] και αλουμίνιο [Moumen et al., 2001]. Στην περίπτωση της ακτινοβολίας, της αιθανόλης και του αλουμινίου, εντοπίστηκε η ενίσχυση ηπατικών επιπέδων ΧΟ και / ή διαρροή της ΧΟ στην κυκλοφορία. Στην περίπτωση της παρακεταμόλης, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η ΧΟ συμμετέχει άμεσα στο μεταβολισμό του φαρμάκου, με την παραγωγή τοξικών υποπροϊόντων [Van Steveninck et al., 1989]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο μοντέλο ηπατοτοξικότητας από ακεταμινοφαίνη, χαμηλότερες δόσεις αλλοπουρινόλης [αρκούν για αναστολή της ΧΟ] δεν μπόρεσαν να παρέχουν προστασία, ενώ οι υψηλότερες [αντιοξειδωτικές]

ήταν αποτελεσματικές, δείχνοντας ότι ο τρόπος δράσης της αλλοπουρινόλης είναι αντιοξειδωτικός [Knight et al., 2001]. Σε πολλές άλλες έρευνες, χαμηλές και υψηλές δόσεις αλλοπουρινόλης δεν συγκρίθηκαν, αλλά οι δόσεις της ένωσης ήταν σε γενικές γραμμές επαρκής για να προκαλέσουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Η 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη, η νευροτοξικότητα, που προκαλείται από μαγγάνιο [Miele et al., 1995; Desole et al., 1996; Obata et al., 2001], η ωτοτοξικότητα και η νεφροτοξικότητα, που προκαλούνται από σισπλατίνη [Lynch et al., 2005], το paraquat και η νιτροφουραντοΐνη, που προκαλούν βλάβη στους πνεύμονες [Kitazawa et al., 1991; Bernard et al., 1997] καταστέλλονται με αλλοπουρινόλη βάσει μελετών σε ποντικούς και αρουραίους.

1.10 Μελλοντικός σχεδιασμός αναστολέων με θεραπευτική χρήση

Από το μικρό αριθμό παραδειγμάτων για την ανάπτυξη νέων αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης, που έχουν εισέλθει σε κλινική φάση φαίνεται ότι η υπερουριχαιμία και ουρική αρθρίτιδα παραμένουν οι κύριες ενδείξεις για την ανάπτυξη νέων αναστολέων της XO, με επιπλέον αυξανόμενο ενδιαφέρον και στις καρδιακές ενδείξεις, όπως η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Οι νέοι αναστολείς της XO θα πρέπει να είναι πιο ισχυροί, πιο αποτελεσματικοί και να διαθέτουν καλύτερο φαρμακοδυναμικό προφίλ από την αλλοπουρινόλη. Λαμβάνοντας υπόψη τα τρέχοντα εργαλεία για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη μικρών μορίων, η επίτευξη των στόχων δεν φαίνεται να είναι πολύ φιλόδοξη. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι η οξυπουρινόλη ως μη αναστρέψιμος αναστολέας της XO, μπορεί να έχει πλεονεκτήματα σε σχέση με τους νέους, εξαιρετικά ισχυρούς, συναγωνιστικούς αναστολείς της XO.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι αναστολείς της XO, όπως η αλλοπουρινόλη, αν και αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου, μπορεί να ανάγει το ένζυμο με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι υπεροξείδιο [Miyamoto et al., 1996]. Άλλοι αναστολείς της XO, όπως το AHPP, δε συμερίζεται αυτή την αντιοξειδωτική ικανότητα της αλλοπουρινόλης. Αν και δεν είναι σαφές αν το εύρημα αυτό είναι κατάλληλο για *in vivo* συνθήκες,

είναι μάλλον προτιμότερο να αναπτυχθούν μελλοντικά, αναστολείς της XO, που δεν ασκούν προ-οξειδωτικά αποτελέσματα.

Μια πιο σημαντική περιοχή στην οποία οι αναστολείς της XO απαιτούν σαφή βελτίωση είναι η μείωση των παρενεργειών τους. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η αλλοπουρινόλη έχει μια σειρά από σοβαρές παρενέργειες, ενώ οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί αυτών των παρενεργειών είναι ελλιπώς κατανοητοί. Ορισμένα πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η νεφρική τοξικότητα της αλλοπουρινόλης σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του μεταβολισμού πυριμιδίνης [Horiuchi et al., 2000]. Δεν υπάρχουν αξιόπιστα ή γρήγορα εργαλεία ανίχνευσης, που να προβλέπουν το προφίλ ασφάλειας των νέων αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης, από άποψη αντιδράσεων υπερευαισθησίας ή τοξικότητας στα όργανα. Διαισθητικά, κάποιος θα προέβλεπε ότι οι αναστολείς της XO, που θα απομακρυνθούν από τη βασική δομή της πουρίνης, μπορεί να έχουν λιγότερες παρενέργειες από τις «παρενέργειες σαν αυτές της αλλοπουρινόλης», αλλά φυσικά μπορούν να εισαγάγουν νέους τύπους παρενεργειών ή τοξικότητας. Πρέπει επίσης οι ερευνητές να είναι προσεκτικοί με τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μακροπρόθεσμες δοκιμές ασφάλειας, ειδικά σε τρωκτικά, καθώς τα τρωκτικά και τα πρωτεύοντα θηλαστικά έχουν διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια για το χειρισμό πουρινών [Wu et al., 1994].

Συνοψίζοντας, η αλλοπουρινόλη παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της τρέχουσας κλινικής διαχείρισης της υπερουρικής αιμίας και της ουρικής αρθρίτιδας, παρά το προβληματικό προφίλ των παρενεργειών της. Υπάρχει χώρος για την ανάπτυξη νέων αναστολέων της XO για την πειραματική θεραπεία της υπερουρικής αιμίας και της ουρικής αρθρίτιδας, οι οποίες αποτελούν σημαντικές ιατρικές ενδείξεις και μεγάλες αγορές φαρμάκων σε παγκόσμιο επίπεδο. Δεν είναι προς το παρόν σαφές εάν νέοι αναστολείς της XO θα είναι αποτελεσματικοί (και / ή ανταγωνιστικές με άλλες αντιοξειδωτικές προσεγγίσεις) για την πειραματική θεραπεία της ισχαιμίας, φλεγμονωδών νόσων, CHF και διάφορων μορφών βλάβης οργάνων. Πολλές σειρές νέων αναστολέων της XO έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές και αναμφίβολα, υπάρχει ενδιαφέρον για την ανάπτυξη επιπλέον νέων σειρών αναστολέων της XO. Θα είναι ενδιαφέρον να δούμε πώς τα προφίλ αποτελεσματικότητας και ασφάλειας αυτών των νέων φαρμάκων συγκρίνονται με εκείνα της αλλοπουρινόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες X

2.1 Εισαγωγή

Η δομή και οι λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών εξαρτώνται από τις ιδιότητες των μορίων από τα οποία αποτελούνται και από τον τρόπο, που αλληλεπιδρούν τα μόρια μεταξύ τους. Παραδείγματα, που δείχνουν ότι κάτι τέτοιο πραγματικά ισχύει είναι: η αλληλεπίδραση των ενζύμων με τα υποστρώματά τους, των ορμονών με τους υποδοχείς τους, των αντισωμάτων με τα αντιγόνα τους. Η λειτουργικότητα ενός μορίου και η αλληλεπίδρασή του με γειτονικά μόρια δεν είναι δυνατό να κατανοηθούν από τη χημική του σύσταση και μόνο. Εξαρτώνται κυρίως από την τρισδιάστατη δομή (στερεοδιάταξη) του.

Οι πρωτεΐνες είναι πολύ σημαντικά μόρια για όλες τις διεργασίες των κυττάρων και είναι υπεύθυνες για τη σωστή λειτουργία και επιβίωσή τους, όμως μόνο ένα μικρό ποσοστό μηχανισμού δράσης τους είναι πλήρως κατανοητό. Για να διευκρινιστεί ο τρόπος λειτουργίας μιας πρωτεΐνης είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τη τρισδιάστατη δομή της, δηλαδή τη σχετική διευθέτηση στον τρισδιάστατο χώρο των ατόμων της πρωτεΐνης, από τα οποία αποτελείται. Με τον προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης, μπορούμε άμεσα να εντοπίσουμε τις αλληλεπιδράσεις, που σχηματίζουν τα μόριά της και να αναλύσουμε το μηχανισμό δράσης. Επίσης, μας δίνεται η δυνατότητα να σχεδιάσουμε αναστολείς ή ενεργοποιητές της, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει φαρμακευτικές ουσίες.

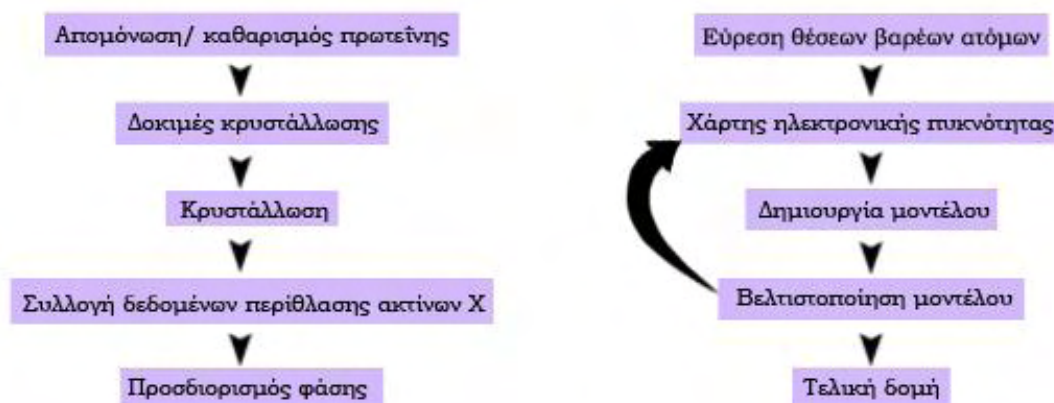
Τα πρώτα χρόνια το αντικείμενο μελέτης της κρυσταλλογραφίας περιοριζόταν στην ανάπτυξη κρυστάλλων και τη μελέτη της γεωμετρίας, των εξωτερικών μορφών και των φυσικών ιδιοτήτων τους. Το γεγονός, που συντέλεσε στην αλματώδη ανάπτυξη αυτού του τομέα ήταν η ανακάλυψη των ακτίνων X από το Röntgen το 1895. Ο M. V. Laue το 1912 προέβλεψε ότι οι ακτίνες X θα μπορούσαν να υποστούν περίθλαση από κρυστάλλους, αν οι κρύσταλλοι αποτελούνται από κανονική επανάληψη ατόμων. Η επιβεβαίωση ήρθε με τη λύση της πρώτης κρυσταλλικής δομής, αυτής του επιτραπέζιου άλατος το 1913, ενώ το 1946 ο James B. Sumner ανακάλυψε ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να κρυσταλλωθούν. Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της μυοσφαιρίνης

από τον John Kendrew, της αιμοσφαιρίνης από το Max Perutz και της λυσοζύμης από τον David Philips στις δεκαετίες 1950- 1960 επαλήθευσαν τον James B. Sumner. Με τη βοήθεια των ακτίνων X άρχισε σταδιακά να γίνεται προσδιορισμός της δομής των πρωτεϊνών και φτάνουμε μέχρι σήμερα, όπου πάνω από 40.000 πρωτεϊνικές δομές έχουν κατατεθεί σε πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων, όπως η PDB, συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων ιών και ριβοσωμάτων.

Στις μέρες μας η περίθλαση ακτίνων X θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα, αν όχι το σημαντικότερο, εργαλεία προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών αλλά και άλλων μακρομορίων. Το πλεονέκτημα της περίθλασης ακτίνων X είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε κρυσταλλικά συστήματα, που το μέγεθός τους φτάνει τα 10^6 Da. Εντούτοις, έχει ένα μεγάλο μειονέκτημα, που είναι η δυσκολία στην κρυστάλλωση μακρομορίων.

2.2 Γενικά χαρακτηριστικά κρυσταλλογραφίας

Μια κρυσταλλογραφική ανάλυση μιας πρωτεΐνης βασίζεται μια σειρά πειραματικών σταδίων (Εικόνα 2.1). Αρχικώς, απομονώνεται και καθαρίζεται η πρωτεΐνη σε ποσοστό >90%. Έπειτα γίνονται δοκιμές σε ποικίλες συνθήκες κρυστάλλωσης και έπειτα αναπτύσσονται κρύσταλλοι της πρωτεΐνης. Οι κρύσταλλοι υπόκεινται σε ακτινοβολία ακτίνων X και συλλέγονται τα δεδομένα της περίθλασης. Προσδιορίζονται οι φάσεις και οι θέσεις των βαρέων ατόμων, ενώ στη συνέχεια υπολογίζεται ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας. Βάσει της ηλεκτρονικής πυκνότητας σχηματίζεται ένα ατομικό μοντέλο, το οποίο βελτιστοποιείται. Με την πραγμάτωση διορθώσεων και βελτιστοποιήσεων παράγεται το τελικό μοριακό μοντέλο.



Εικόνα 2.1: Βήματα κρυσταλλογραφίας για την εύρεση της δομής μιας πρωτεΐνης.

Συνήθη προβλήματα, που προκύπτουν μετά το βήμα της κρυστάλλωσης είναι: η «αταξία» των κρυστάλλων, οι δυσκολίες στη μέτρηση ασθενών ανακλάσεων, ο μεγάλος αριθμός ανακλάσεων καθώς και η καταστροφή των κρυστάλλων από τις ακτίνες Χ.

2.3 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Ένας κρύσταλλος αναπτύσσεται όταν ένα σύστημα ασύμμετρων αντικειμένων επιλέξει αυθόρμητα να μειώσει τους βαθμούς ελευθερίας του και να διαταχθεί με ακρίβεια σε ένα σταθερό πλέγμα. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση είναι η επίτευξη κατάστασης υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης. Λόγω των μεταφορικών κινήσεων, τα μεμονωμένα μόρια χάνουν βαθμούς ελευθερίας και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εντροπίας του συστήματος. Ταυτόχρονα όμως, σχηματίζονται πολλοί νέοι δεσμοί με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Αυτή η ελάττωση είναι η κινητήρια δύναμη, που δικαιολογεί τη διεργασία σχηματισμού των κρυστάλλων [Χαμόδρακας, 2002]. Το χημικό δυναμικό κάθε συστατικού είναι ίδιο και για τις δυο φάσεις και δίνεται από τη σχέση:

$$\mu_{ic} = \mu_{is} = \mu_{io} + RT \ln \gamma c_i$$

Όπου: μ_{ic} : το χημικό δυναμικό στον κρύσταλλο

μ_{is} : το χημικό δυναμικό στο διάλυμα
 μ_{io} : το πρότυπο χημικό δυναμικό
 γ : η ενεργότητα
 c_i : η συγκέντρωση

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό του συστατικού i στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο απ' ότι στον κρύσταλλο και εκφράζεται με την παράμετρο β , που ονομάζεται βαθμός υπερκορεσμού και εκφράζεται από τον τύπο:

$$\beta = \frac{c}{c_s}$$

Όπου: c : η συγκέντρωση
 c_s : η διαλυτότητα στο συγκεκριμένο διάλυμα

Τα πρωτεϊνικά διαλύματα, που προορίζονται για κρυστάλλωση έχουν βαθμό κορεσμού εύρους 2 ως 10, ενώ για την κρυστάλλωση μικρομορίων είναι τις περισσότερες φορές αρκετά μικρότερος [Mikol & Giege, 1992]. Η κατάσταση υπερκορεσμού διακρίνεται σε δυο στάδια:

- **Μετασταθής κατάσταση:** αναπτύσσονται οι προϋπάρχοντες κρύσταλλοι, αλλά δε δημιουργούνται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης.
- **Ασταθής κατάσταση:** επιτυγχάνεται αυθόρμητη δημιουργία πυρήνων και η ανάπτυξή τους.

Στη διάρκεια της κρυστάλλωσης πάντα υπάρχει κίνδυνος να σχηματιστεί ένα άμορφο ίζημα, αντί ενός κανονικού κρυστάλλου. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα, έτσι ώστε τα πρωτεϊνικά μόρια δεν έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα στο χώρο [McPherson, 1999].

2.4 Η φύση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων

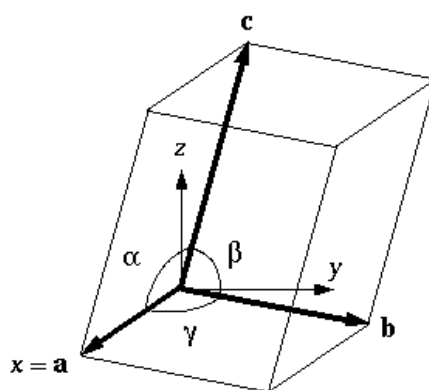
Η μέθοδος διάθλασης ακτίνων X απαιτεί τη χρήση κρυστάλλων και όχι ενός μόνο μορίου, διότι οι κρύσταλλοι αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό μορίων διευθετημένων κανονικά στο χώρο και σκεδάζουν τις ακτίνες X ισχυρά.

Η κρυσταλλική κατάσταση είναι η φυσική κατάσταση των στερεών, στην οποία τα μόρια, που αποτελούν τον κρύσταλλο έχουν κανονική επαναλαμβανόμενη διευθέτηση και στις τρεις διαστάσεις.

Τα βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, έχουν πολύπλοκα σχήματα με αποτέλεσμα να μη μπορούν να διευθετηθούν κανονικά, παρόλα αυτά μπορούν να σχηματίσουν καλούς κρυστάλλους με την προϋπόθεση ότι ένα υγρό συμπληρώνει τα κενά μεταξύ τους.

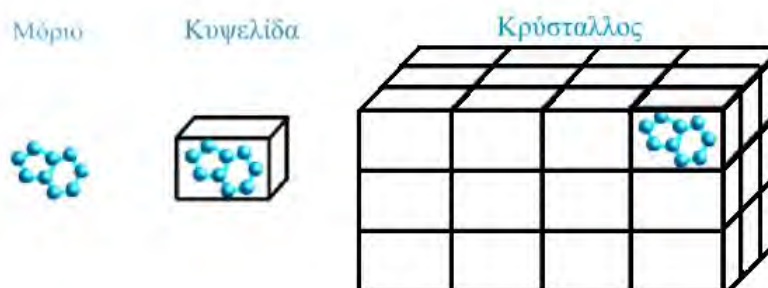
Τα κυριότερα γνωρίσματα των κρυστάλλων είναι η συμμετρία, η περιοδικότητα και το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη διευθέτησή τους, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ανισότροπα.

Η βασική δομική μονάδα του κρυστάλλου είναι η στοιχειώδης κυψελίδα (unit cell). Σαν στοιχειώδης κυψελίδα ορίζεται το μικρότερο παραλληλεπίπεδο, το οποίο όταν επαναλαμβάνεται περιοδικά κατά μήκος αξόνων παράλληλων προς τις τρεις ακμές του δημιουργεί το κρυσταλλικό πλέγμα. Τα μήκη των πλευρών a , b , c καθώς και οι γωνίες α , β , γ , που σχηματίζουν μεταξύ τους οι κρυσταλλικοί άξονες είναι οι σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας (Εικόνα 2.2). Το μέγεθος και η δομή της στοιχειώδους κυψελίδας περιγράφεται από τα a , b και c και έχουν ένα κοινό σημείο επαφής, μια γωνία της κυψελίδας. Το σύνολο των διανυσμάτων a , b , c και των γωνιών α , β , γ ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα.



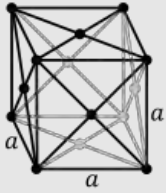
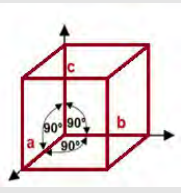
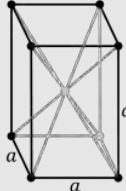
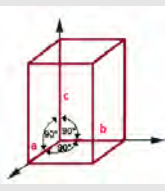
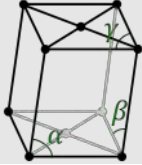
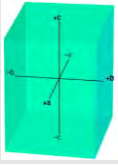
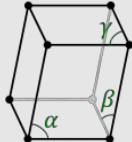
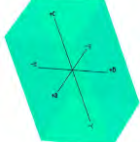
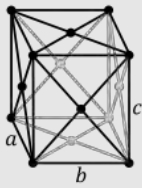
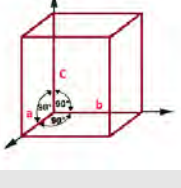
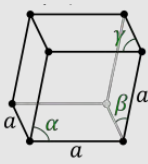
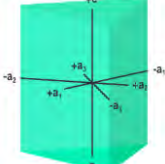
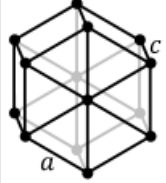
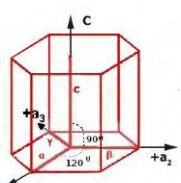
Εικόνα 2.2: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά στοιχειώδους κυψελίδας.

Αντίστοιχα, το σημειακό πλέγμα του κρυστάλλου της πρωτεΐνης είναι δυνατόν να ορισθεί με ακρίβεια αν μετατοπιστούν διαδοχικά τα διανύσματα a , b , c . Η στοιχειώδης κυψελίδα μπορεί να αποτελείται από ένα, δύο ή και περισσότερα μόρια συνδεδεμένα με ένα είδος συμμετρίας (περιστροφή, μετατόπιση, συνδυασμό και των δυο ή ανάκλαση). Τα μοναδιαία αυτά μόρια ονομάζονται ασύμμετρες μονάδες (asymmetric units) και όταν επαναλαμβάνονται με ένα είδος συμμετρίας σχηματίζουν τη στοιχειώδη κυψελίδα. Ένας κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες κυψελίδες, που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα (Εικόνα 2.3). Οι αλληλεπιδράσεις, που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων, που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση στοιχειώδους μορίου, κυψελίδας και κρυστάλλου. Ο κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες κυψελίδες, που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό.

Σύμφωνα με τον κρυσταλλογράφο Bravais, μπορούμε να δημιουργήσουμε 14 σημειακά πλέγματα ή πλέγματα Bravais. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα 7 κρυσταλλικά συστήματα και τα αντίστοιχα σημειακά πλέγματα. Τα πλέγματα Bravais χαρακτηρίζονται με τα σύμβολα P (primitive, θεμελιώδης ή R, ειδικά για το ρομβοεδρικό σύστημα), I (body-centered, χωροκεντρωμένη) και F (face-centered, εδροκεντρωμένη), αν υπάρχουν μόνο σημεία στα σημεία τομής των επιπέδων των κρυσταλλικών συστημάτων, αν υπάρχουν επιπλέον σημεία στο κέντρο του σημειακού πλέγματος και αν υπάρχουν επιπλέον σημεία στις έδρες του σημειακού πλέγματος αντίστοιχα [Παπαϊωάννου, 2004].

Κρυσταλλικό Σύστημα	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά	Πλέγματα Bravais	Σχηματική Απεικόνιση		Παραδείγματα
Κυβικό	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I F			NaCl
Τετραγωνικό	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I			Zn
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$ και $\beta > 90^\circ$	P C			Μονοκλινές S
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	P			$K_2Cr_2O_7$
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I C F			Ρομβικό S
Τριγωνικό ή ρομβοεδρικό	$a = b = c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	R			$CaCO_3$
Εξαγωνικό	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	P			Γραφίτης, Χαλαζίας

Πίνακας 2.1: Κρυσταλλικά συστήματα και τα αντίστοιχα σημειακά πλέγματα (πλέγματα Bravais).

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 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης}, 4^{ης} και 6^{ης} 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.

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 .

2.5 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Το πιο σημαντικό και καθοριστικό βήμα στην κρυσταλλογραφία με ακτίνες X είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Ένας «καλός» κρύσταλλος θεωρείται αυτός, ο οποίος είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, απόλυτα συμμετρικός και έχει επαναλαμβανόμενη τρισδιάστατη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να διαφέρουν από τέλειους κύβους ως μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος, που απαιτείται να παρέλθει ώστε να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι πολύ μικρός μέχρι και πολύ μεγάλος (μερικές εβδομάδες ή και κάποιους μήνες) γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον

οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους [Acharya & Rees, 1997].

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε εμπειρικές παρατηρήσεις, επειδή δεν υπάρχει ακόμα θεωρία ικανή να ερμηνεύσει τον ακριβή μηχανισμό της κρυσταλλογένεσης. Συνηθισμένοι μέθοδοι κρυστάλλωσης μικρών μορίων είναι η αργή εξάτμιση, η αργή ψύξη και η διάχυση. Η μείωση της διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης, που προϋποθέτει η κρυσταλλογένεση μπορεί να γίνει με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- **εξαλάτωση (salting out):** στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα η διαλυτότητα των πρωτεϊνών ελαττώνεται όσο αυξάνει η συγκέντρωση των ιόντων. Αυτή η διαδικασία βασίζεται στον υδρόφοβο χαρακτήρα της πρωτεΐνης, η οποία, σε αυτές τις συνθήκες, συμπεριφέρεται ως ουδέτερο δίπολο. Ένα πολύ διαλυτό άλας προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Η διαλυτότητά του είναι μεγαλύτερη από αυτή της πρωτεΐνης, συνεπώς ελαττώνει την ικανότητα του διαλύτη να διαλύει την πρωτεΐνη [Χαμόδρακας, 1993].
- **εφαλάτωση (salting in):** για πολύ χαμηλές τιμές ιονικής ισχύος η διαλυτότητα των βιομορίων μειώνεται όσο ελαττώνεται η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μείωση των μη ειδικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φορτίων των βιομορίων και των ιόντων, που βρίσκονται στο διάλυμα. Μερικές πρωτεΐνες είναι περισσότερο διαλυτές παρουσία αλάτων, επειδή τα ιόντα αλάτων δεσμεύονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και αυξάνουν την υδροφιλικότητά της [Χαμόδρακας, 1993].
- **προσθήκη οργανικών διαλυτών:** η διαλυτότητα των πρωτεϊνών ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών διαλυτών λόγω μείωσης της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος. Τα διαλύματα πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), η οποία αποτελεί έναν από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους παράγοντες κατακρήμνισης, είναι μια ειδική περίπτωση, γιατί δρα τόσο σαν οργανικός διαλύτης όσο και σαν άλας. Επίσης στη δράση της συντελεί και το ότι η προσθήκη PEG στο διάλυμα μειώνει τον ωφέλιμο όγκο του διαλύτη.

2.6 Στάδια κρυστάλλωσης

Τα διαγράμματα διαλυτότητας των πρωτεϊνών (Εικόνα 2.4) συναρτήσει διαφόρων παραγόντων, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση μπορούν να αποβούν πολύ χρήσιμα στην παραγωγή κρυστάλλων, αλλά έχουν το μειονέκτημα ότι απαιτούν πολύ χρόνο και κυρίως πολύ μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης. Ένα τέτοιο διάγραμμα συνήθως χωρίζεται σε δυο ζώνες: τη ζώνη υποκορεσμού για χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης ή παράγοντα κατακρήμνισης, όπου η πρωτεΐνη είναι διαλυτή και τη ζώνη υπερκορεσμού για υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και παράγοντα κατακρήμνισης, όπου τα μόρια του βιομορίου εγκαταλείπουν την υγρή φάση και δημιουργούν συσσωματώματα.



Εικόνα 2.4: Διάγραμμα διαλυτότητας.

Στην περίπτωση, που οι συνθήκες ευνοούν την κρυσταλλογένεση, η ζώνη υπερκορεσμού (Εικόνα 2.5) μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις υποπεριοχές:

- **τη ζώνη πυρήνωσης:** στην οποία δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων, δηλαδή μικροσκοπικές οργανωμένες μορφές βιομοριακών συσσωματωμάτων.
- **τη μετασταθερή ζώνη:** στην οποία δεν μπορούν να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλων, αλλά μπορούν να μεγαλώνουν ήδη προϋπάρχοντες πυρήνες.
- **τη ζώνη κατακρήμνισης:** όπου δημιουργείται άμορφο ίζημα.

Η διαδικασία πυρήνωσης ευνοείται θερμοδυναμικά αν υπάρχουν στο διάλυμα μερικά ξένα σωματίδια, που λειτουργούν ως κέντρα πυρήνωσης. Για αυτό το λόγο η πρωτεΐνη, που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλό βαθμό καθαρότητας.



Εικόνα 2.5: Στάδια κρυστάλλωσης.

2.6.1 Πυρήνωση

Σε ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους και είναι ικανά να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Η συνολική ελεύθερη ενέργεια καθορίζεται από το μέγεθος του συσσωματώματος και μπορεί να αποκτήσει τη μέγιστη τιμή της όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή όταν το συσσωμάτωμα αποκτήσει ένα κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη κρυστάλλου στο υπέρκορο διάλυμα, το σύστημα θα πρέπει να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα, που ονομάζεται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης και δίνεται από τη σχέση [Kam et al., 1978]:

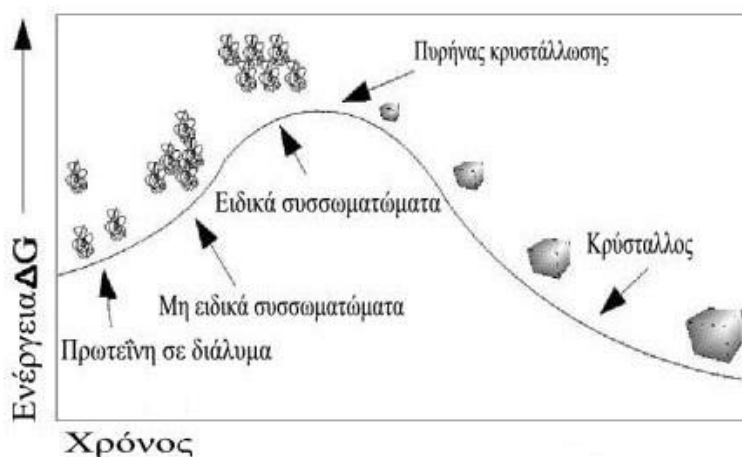
$$\Delta G_g = \left\{ \frac{-[KT(4r^3\pi)]}{V \ln \beta} \right\} + 4r^2\pi\gamma$$

Όπου:

- K: η σταθερά Boltzman
- T: η απόλυτη θερμοκρασία
- r: η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου
- V: ο όγκος ενός μορίου στον κρύσταλλο
- β : ο βαθμός υπερκορεσμού
- γ : η διεφασική ενέργεια του διαλύματος κρυστάλλου

Αν ο βαθμός υπερκορεσμού είναι χαμηλός τότε το εύρος των ενεργειακών διακυμάνσεων δε θα είναι αρκετά μεγάλο ώστε να ξεπεραστεί το ενεργειακό

φράγμα και να αναπτυχθεί κρύσταλλος [Mikol & Giege, 1992]. Αφού δημιουργηθεί ο πυρήνας τότε ξεκινά η αυθόρμητη ανάπτυξη του συσσωματώματος (Εικόνα 2.6), ενώ μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν [Kam et al., 1978]. Ανάλογα με την κρυσταλλική δομή ο πυρήνας αποτελείται από 10 έως 200 μόρια, ενώ ο χρόνος, που απαιτείται για να σχηματιστεί ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες [Blundell & Johnson, 1976].



Εικόνα 2.6: Απεικόνιση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης.

Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σε ένα υπέρκορο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δύο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στο στάδιο της πυρήνωσης, η μία οδηγεί στη δημιουργία κρυσταλλικής δομής, ενώ η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος.

2.6.2 Ανάπτυξη πυρήνων

Μετά το στάδιο ανάπτυξης πυρήνων ακολουθεί η διαδικασία ανάπτυξης των κρυστάλλων. 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]. Ο ρυθμός εναπόθεσης των πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου ορίζεται σύμφωνα με το νόμο του Fick ως εξής:

$$\frac{dM}{dt} = D \left(\frac{dC}{dt} \right)_0 S$$

Όπου: $\left(\frac{dC}{dt} \right)_0$: η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου

S: είναι η επιφάνεια της κρυσταλλικής περιοχής

D: ο μέσος συντελεστής διάχυσης

Θεωρώντας ότι η ανάπτυξη προχωράει μέσω σύνδεσης μονομερών, η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$\frac{dM}{dt} = K(C_{i0} - C_i)Sd$$

Όπου : C_{i0} : η συγκέντρωση στην κατάσταση κορεσμού

C_i : η συγκέντρωση του διαλύματος

K: ο συντελεστής ταχύτητας ανάπτυξης

Το στάδιο ανάπτυξης των κρυστάλλων μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια της φωτομικροσκοπίας υπεριώδους ακτινοβολίας [Kam et al., 1978]. Τέλος, όσο πιο γρήγορα αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι τόσο αυξάνει ο αριθμός των πυρήνων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν στο τελικό διάλυμα περισσότεροι κρύσταλλοι μικρότερου μεγέθους.

2.6.3 Αναστολή ανάπτυξης πυρήνων

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. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δεν προστίθεται πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. 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. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία πυρήνωσης και για αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι η γρήγορη ανάπτυξη κρυστάλλων, μικρού μεγέθους, γεγονός, που είναι ανεπιθύμητο.

2.7 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Η ανάπτυξη κρυστάλλων είναι το σημαντικότερο και ταυτόχρονα το πιο δύσκολο στάδιο στην κρυσταλλογραφική μελέτη, λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόντων, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των κρυστάλλων και της περιορισμένης γνώσης για την πορεία ανάπτυξής τους (Πίνακας 2.2).

Η μέθοδος, που εφαρμόζεται ως επί το πλείστον είναι αυτή της δοκιμής-σφάλματος, δοκιμάζοντας τις γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης. Στις μέρες μας έχουν αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών, αλλά και την ελαχιστοποίηση της χρησιμοποιούμενης πρωτεΐνης.

Φυσικοί Παράγοντες	Χημικοί Παράγοντες	Βιοχημικοί Παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις θερμοκρασίας	Είδος παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Γενετικές τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Καθαρότητα
Πίεση	Μεταλλικά ιόντα	Επίδραση προσδέτη
Βαρύτητα	pH	Συμμετρία
Ιξώδες	Ιοντική ισχύς	Σταθερότητα
Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Αναγωγικό/ οξειδωτικό περιβάλλον	Μετα- μεταγραφικές τροποποιήσεις

Δονήσεις/ ήχος/ μηχανική διαταραχή	Απορρυπαντικά/ επιφανειοδραστικές ουσίες	Χημική τροποποίηση
Ηλεκτρικό/ μαγνητικό πεδίο	Σταυροδεσμοί	Ισοηλεκτρικό σημείο
Ομοιογένεια/ ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση/ υδρόλυση
Κατάσταση ισορροπίας	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Ιστορικό δείγματος
-	Προσμίξεις	-

Πίνακας 2.2: Παράγοντες, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

- **Θερμοκρασία:** η αύξηση της θερμοκρασία έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση αταξίας των διαλυμένων μορίων, συνεπώς γίνονται επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, εφόσον οι παράμετροι εντροπίας τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας.
- **pH:** αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητά της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Ταυτόχρονα σε αυτό το σημείο, η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων [McMurry, 2001].

2.8 Παράγοντες καθίζησης

Οι παράγοντες καθίζησης είναι απαραίτητο συστατικό της διαδικασίας κρυστάλλωσης. Τους παράγοντες καθίζησης μπορούμε να τους κατατάξουμε με βάση το μηχανισμό μέσω του οποίου προάγουν την κρυστάλλωση σε πέντε κατηγορίες:

- **Άλατα** (θειικά, φωσφορικά και κιτρικά άλατα)

Τα άλατα μπορούν να δράσουν με πολλαπλούς τρόπους, μερικοί από τους οποίους αναφέρονται παρακάτω:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.

2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμινικό) στην επιφάνεια πρωτεϊνών.

3. Δρουν με διπολικές- μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.

4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) [McMurry, 2001].

- **Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου** (ουρία, φορμαμίδιο)

Σε υψηλές συγκεντρώσεις ($C \geq 4M$) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης, δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες. Αντίθετα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς [McMurry, 2001].

- **Πτητικοί οργανικοί διαλύτες**

Τροποποιούν τη διηλεκτρική σταθερά προκαλώντας αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις. Με μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς παρουσιάζεται αύξηση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ ανόμοιων φορτίων με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Οι οργανικοί διαλύτες πρέπει να χρησιμοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά και με προσοχή διότι συχνά μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό θα πρέπει διατηρείται η ιοντική ισχύς σε χαμηλά επίπεδα, ώστε να αποφευχθεί η αποδιάταξη με ανεπιθύμητα αποτελέσματα [McMurry, 2001].

- **Μακρομοριακά πολυμερή** (πολυαιθυλενική γλυκόλη 1000- 8000)

Οι πολυμερικοί παράγοντες καθίζησης, αντίθετα με τις πρωτεΐνες, δεν έχουν κάποια σταθερή διαμόρφωση, συσπώνονται και περιπλέκονται τυχαία στο διάλυμα και καταλαμβάνουν πολύ χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα άλλα μόρια να παρέχεται πολύ λιγότερος χώρος για τη διαλυτοποίησή τους συνεπώς διαχωρίζονται και να σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία τελικά οδηγούν σε κρυστάλλους. Το εύρος συγκέντρωσης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα PEGs κυμαίνεται μεταξύ 2%- 20% και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι τόσο κρίσιμη όσο η συγκέντρωση των αλάτων και των οργανικών διαλυτών. Οι πολυαιθυλενικές γλυκόλες με μεγάλο μοριακό βάρος αποτυγχάνουν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του κρυστάλλου ή να συγκρυσταλλωθούν. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο να υπάρχουν μόνο μόρια νερού και ρυθμιστικού διαλύματος στο εσωτερικό του κρυστάλλου, το οποίο είναι επιθυμητό για έναν κρυσταλλογράφο [McPherson, 1976].

- **Μικρού μοριακού βάρους πολυμερή και μη πτητικοί οργανικοί διαλύτες**

Παραδείγματος χάρη, πολυαιθυλενικές γλυκόλες (PEGs) με μοριακό βάρος μικρότερο από 1000 και η 3,4-μέθυλο-πεντενδιόλη (MPD). Το MPD είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο χημικό πρόσθετο στις κρυσταλλώσεις βιολογικών μακρομορίων, παρόλα αυτά ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι πλήρης κατανοητός. Από μελέτες έχει γίνει γνωστό, ότι η πλειοψηφία των μορίων 3,4-μέθυλο-πεντενδιόλης προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές και δείχνει προτίμηση στις πλευρικές αλυσίδες της λευκίνης [Anand et al., 2002].

2.9 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

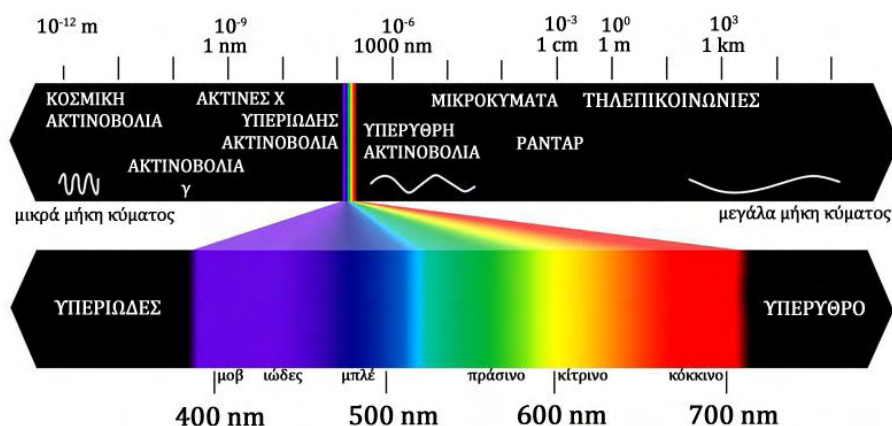
Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων, που σχηματίζουν τα μικρότερα- μόρια είναι ότι οι κρυσταλλοί πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη. Οι κρυσταλλοί γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που περιλαμβάνει τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το ανοικτό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη, που βρίσκονται κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια είναι οργανωμένα και συνδέονται

με επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης μέσω ισχυρών αλληλεπιδράσεων, ενώ εκείνα, που εισχωρούν στα κανάλια και σχηματίζονται από την πρωτεΐνη, είναι αποδιοργανωμένα [Blundell & Johnson, 1976].

2.10 Ακτίνες X

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών γίνεται με τη βοήθεια των ακτίνων X. Οι ακτίνες X χρησιμοποιούνται διότι το μήκος κύματός τους είναι τέτοιο, που επιτρέπει να επιτύχουμε ατομική διακριτικότητα της δομής. Η ακτινοβολία ακτίνων X, η οποία προσπίπτει σε κρυστάλλους της πρωτεΐνης, σκεδάζεται και λόγω της ισχυρής φωτοχημικής δράσης αμαυρίζει τις φωτογραφικές πλάκες. Τα δεδομένα (spots) συλλέγονται και με κατάλληλη επεξεργασία μέσω ηλεκτρονικών προγραμμάτων προκύπτει η δομή της πρωτεΐνης. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες X και ουσιαστικά βασίζεται στο γεγονός ότι οι ακτίνες X περιθλώνται από τους κρυστάλλους των πρωτεϊνών.

Οι ακτίνες X ανακαλύφθηκαν το 1895 από το Wilhelm Conrad Röntgen. Είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος 0,1-100Å και αποτελούν σημαντικό μέρος του συνολικού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

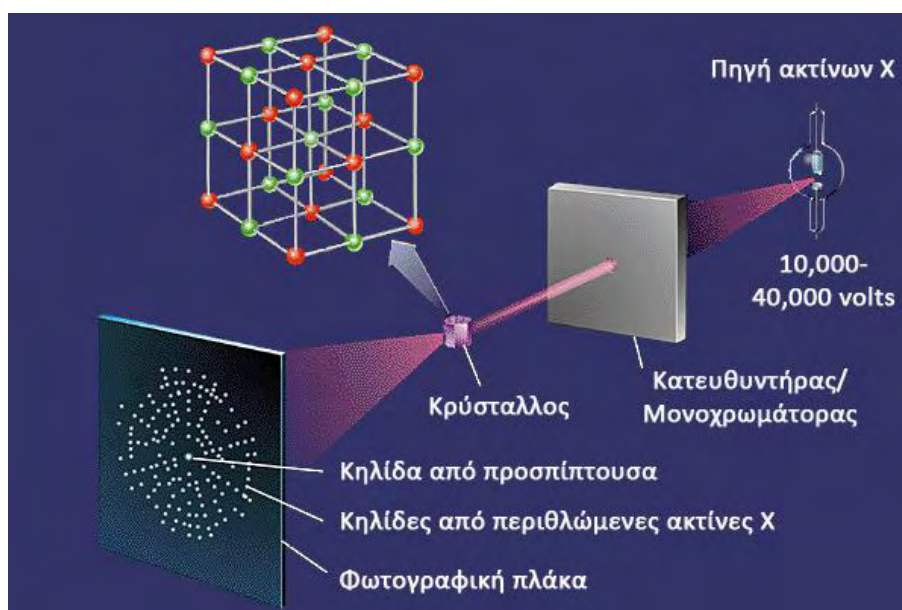


Εικόνα 2.7: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Οι ακτίνες X παράγονται όταν ηλεκτρόνια, που κινούνται με μεγάλες ταχύτητες προσκρούουν σε μεταλλικό στόχο, έτσι ώστε ένα μέρος της κινητικής τους ενέργειας μετατρέπεται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ακτίνων X και το υπόλοιπο μετατρέπεται σε θερμότητα.

Μπορούν να προκαλέσουν εγκαύματα και οι πολύ σκληρές ακτινοβολίες μπορούν να προκαλέσουν μεταβολή στις κληρονομικές ιδιότητες προσβάλλοντας γονίδια χρωμοσωμάτων του πυρήνα των κυττάρων [Τσαγκάρης, 1999].

Η περίθλαση ακτίνων X απαιτεί δυο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων X. Μια τυπική διάταξη σε πείραμα περίθλασης ακτίνων X φαίνεται στην εικόνα 2.8.



Εικόνα 2.8: Παρουσίαση της διάταξης κατά το πείραμα περίθλασης ακτίνων X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτίνες, που προσπίπτουν στον κρύσταλλο (κρυσταλλικό πλέγμα), τα ηλεκτρόνια περιθλούν ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων.

2.10.1 Πηγές ακτίνων X

Υπάρχουν δύο είδη πηγών, οι συμβατικές πηγές, που ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από επιτάχυνση ηλεκτρονίων (εντός ηλεκτρικού πεδίου) και μετάπτωση ηλεκτρονίων μετάλλου και οι συγχροτρονικές πηγές, όπου επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων) προκαλούν σωματίδια να κινούνται σχεδόν με ταχύτητα φωτός και να αποδίδουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατά την αλλαγή κατεύθυνσης.

Στις συμβατικές εργαστηριακές πηγές, οι ακτίνες X από μία λυχνία με υψηλό κενό ($\approx 10^{-7}$ mmHg), η οποία περιέχει μια κάθοδο ηλεκτρικά θερμαινόμενη και μια άνοδο από κατάλληλο υλικό (συνήθως Cu, Mo). Μια πηγή υψηλής τάσης (20-70kV) συνδέει την άνοδο με την κάθοδο, ενώ το θετικό

δυναμικό της πηγής συνδέεται με την άνοδο. Η άνοδος ψύχεται διότι η υψηλή τάση θερμαίνει γρήγορα το μεταλλικό έλασμα. Ο συνηθέστερος τρόπος ψύξης της ανόδου είναι με τη χρήση νερού, ενώ αποτελεσματική ψύξη επιτυγχάνεται και με τη χρήση περιστρεφόμενης ανόδου, όπου το μέταλλο περιστρέφεται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για να αποφεύγεται η άνοδος της θερμοκρασίας σ' ένα σημείο και μόνο [Τσαγκάρης, 1999].

Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της ανόδου και της καθόδου επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργεια της τάξης των 10^5 eV (όπου $1\text{eV} = 1.6 \times 10^{-19}$ joule) ικανές να παράγουν ακτίνες X στην άνοδο [Τσαγκάρης, 1999].

Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας αποτελούν μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτύλιο επιτάχυνσης σωματιδίων από 10 ως μερικές εκατοντάδες μέτρα. Τα ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια διατηρούνται σε μια κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά.

Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της, που είναι περίπου δυο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τις συμβατικές πηγές. Η ισχυρή αυτή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα, που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα.

Επιπλέον, λόγω της χαμηλής απόκλισης της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές.

Μια άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η ρύθμιση μήκους κύματος (tunability). Μπορεί να επιλεγεί οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή των υπερύθρων μέχρι αυτή των ακτίνων X. Αυτό το γεγονός εκμεταλλεύεται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Επί το πλείστον επιλέγονται ακτίνες X με μήκος κύματος 1\AA ή και μικρότερο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας, αλλά και εντός του κρυστάλλου,

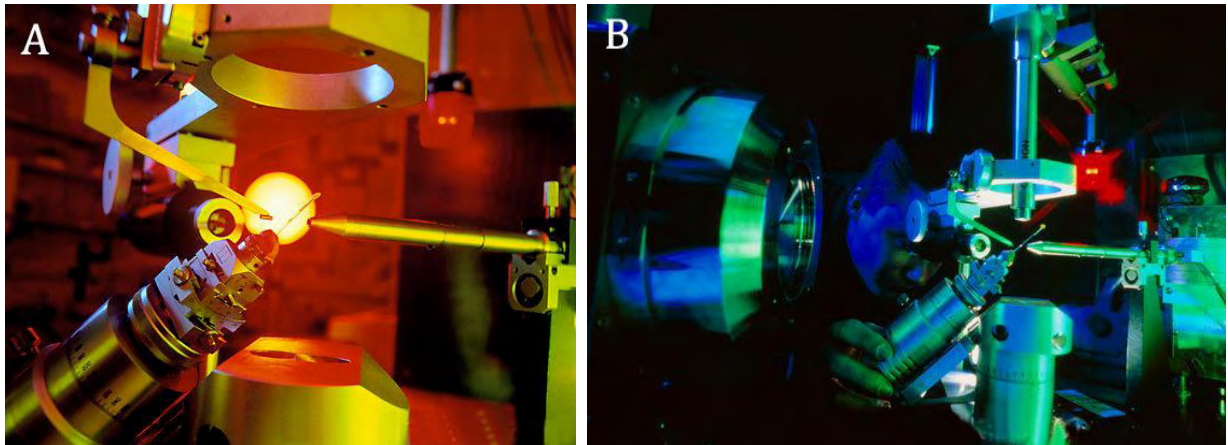
ενώ περιορίζεται και η καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου [Rhodes, 1993].

Η ύπαρξη συγχροτρονικών ακτίνων X είναι πολύ σημαντική γιατί το μήκος κύματός τους είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις. Συνεπώς παρίσταται δυνατή η περίθλαση ακτίνων X από δείγματα κρυστάλλων και οι δομές τους μπορούν να αναλυθούν σε ατομική κλίμακα. Το γεγονός αυτό κάνει τη συμβολή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών να είναι θεμελιώδης. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με περιστρεφόμενη ανοδική πηγή παλαιότερα απαιτούσε την έκθεση του κρυστάλλου στην ακτινοβολία για αρκετές ώρες, ενώ σήμερα αρκούν μόνο λίγα λεπτά. Η δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος της ακτινοβολίας συμβάλλει σημαντικά στην επίλυση του προβλήματος φάσης. Τα μικρά μήκη κύματος μειώνουν τόσο την απορρόφηση του κρυστάλλου όσο και του αέρα, με αποτέλεσμα την καλύτερη σχέση σήματος- θορύβου. Η χρήση μικρών γωνιών επιτρέπει την καταγραφή περισσότερων δεδομένων στο ίδιο φιλμ. Η νεκρή περιοχή του πλέγματος, η οποία είναι απρόσιτη κατά την περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από ένα μοναδικό άξονα, είναι αναλογικά μικρότερη από ότι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος [Ζωγράφος, 2000].

2.10.2 Ανιχνευτές ακτίνων X [Dreath, 2002]

Ο προσδιορισμός της δομής μιας πρωτεΐνης με περίθλαση ακτίνων X απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ενός μεγάλου ποσοστού) των σκεδαζόμενων ακτίνων. Για να είναι αυτό εφικτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του ανάστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης με περιστροφή του κρυστάλλου εντός της σφαίρας ανάκλασης με ακτίνα $1/\lambda$ (σφαίρα Ewald). Συνεπώς μια κρυσταλλογραφική μελέτη απαιτεί την ύπαρξη δυο συσκευών:

1. το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου
2. μια συσκευή μέτρησης της θέσης και της έντασης της κάθε περιθλώμενης δέσμης

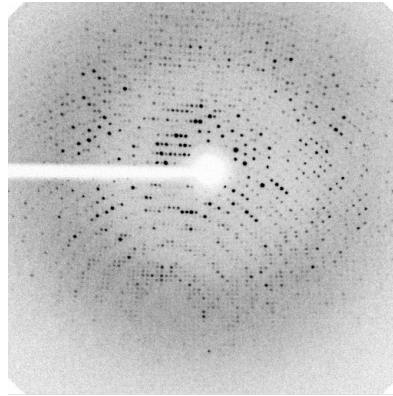


Εικόνα 2.9: Περιθλασίμετρο ακτίνων X. (Α) Γωνιόμετρο, (Β) ολόκληρο το περιθλασίμετρο.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Παλαιότερα η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ. Σήμερα γίνεται από συστήματα, μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου.

Οι ανιχνευτές πεδιάς¹ (area detectors) αποτελούν ηλεκτρονικές συσκευές, που ανιχνεύουν φωτόνια σε μία επιφάνεια και η επεξεργασία του σήματος γίνεται αμέσως μετά την ανίχνευση φωτονίων. Η βασική διαφορά είναι ότι οι ανιχνευτές πεδιάς μπορούν να καταγράφουν ταλάντωση 0.1° , δίνοντας την τρισδιάστατη εικόνα της κηλίδας, αντίθετα από το φιλμ και τους image plate ανιχνευτές, που καταγράφουν πολύ μεγαλύτερη ταλάντωση. Οι ανιχνευτές αυτοί στηρίζονται στην τεχνολογία του θαλάμου ιονισμού αερίων και του πολλαπλασιαστή εικόνας συνδεδεμένο με σύστημα video ή CCD (Charge Couple Device).

¹ Ο όρος χρησιμοποιείται για ηλεκτρονικές συσκευές, αν και κανονικά το φωτογραφικό φιλμ και οι τύπου image plate ανιχνευτές, ανιχνεύουν περιοχή.



Εικόνα 2.10: Περιθλασίγραμμα. Το συγκεκριμένο περιθλασίγραμμα προέκυψε από περίθλαση ακτίνων X κρυστάλλου της οξειδάσης της ξανθίνης με τον αναστολέα της, αλλοπουρινόλη.

2.11 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο

Το φαινόμενο της περίθλασης γίνεται εμφανές όταν φως ή οποιοδήποτε κύμα συναντήσει εμπόδιο με περιοδικότητα συγκρίσιμη με το μήκος κύματός του και αποκλίνει από την ευθύγραμμη πορεία του. Οι ακτίνες X, που είναι ακτινοβολία με μήκος κύματος 1\AA καθιστούν την περίθλασή τους αδύνατη να μελετηθεί, διότι δεν μπορούμε να δημιουργήσουμε φράγμα με τόσο μικρό εύρος. Το 1913 ο Max von Laue παρουσίασε την ιδέα της χρήσης κρυστάλλου ως φράγμα για τη μελέτη της περίθλασης ακτίνων X. Ο Laue απέδειξε την ορθότητα της ιδέας του, αλλά και αποτέλεσε την αρχή για τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών δομών με χρήση ακτίνων X, γεγονός, που του χάρισε το βραβείο Nobel φυσική το 1914.

2.11.1 Σκέδαση ακτίνων X από σύστημα δυο ηλεκτρονίων [Rossman & Arnold, 2001]

Η σκέδαση αποτελεί το φαινόμενο αλληλεπίδρασης των ακτίνων X, ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, με τα ηλεκτρόνια. Όταν ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα επιδρά πάνω σε ένα σύστημα ηλεκτρονίων, η ηλεκτρική και μαγνητική συνιστώσα του κύματος ασκούν δύναμη στα ηλεκτρόνια. Σαν αποτέλεσμα, είναι η δόνηση των ηλεκτρονίων και η εκπομπή ακτινοβολίας του ίδιου μήκους κύματος με το αρχικό. Σύμφωνα με την ηλεκτρομαγνητική θεωρία, που διατυπώθηκε από τον J.J. Thomson, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία 2θ ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ορίζεται ίση με:

$$I_{2\theta} = I_0 \left(\frac{ne^4}{2r^2 m_e^2 c^4} \right) (1 + \cos^2 2\theta) \quad (1.1)$$

Όπου: I_0 : ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας
 n : αριθμός σκεδαζόμενων ηλεκτρονίων
 r : απόσταση παρατηρητή από το ηλεκτρόνιο
 e : φορτίο ηλεκτρονίου
 m_e : μάζα ηλεκτρονίου
 c : ταχύτητα του φωτός

Η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη του τετραγώνου της μάζας του σωματιδίου, με συνέπεια το πρωτόνιο ($m_p = 2000m_e$) να σκεδάζει ασήμαντα και για αυτό δε θεωρείται σκεδαστής ακτινοβολίας.

Έστω ένα σύστημα δυο ηλεκτρονίων (e_1 & e_2), που βρίσκονται σε απόσταση r (Εικόνα 2.11.α). Η ηλεκτρομαγνητική προσπίπτουσα ακτινοβολία s_0 έχει μήκος κύματος λ και προσπίπτει στο σύστημα. Τα ηλεκτρόνια υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιου μήκους κύματος προς κάθε κατεύθυνση (εικόνα μόνο η ανακλώμενη ακτινοβολία s). Η διαδρομή, που ακολουθεί η ακτινοβολία, που προσπίπτει στο e_2 είναι μεγαλύτερη κατά το άθροισμα των p και q αποστάσεων. Τα s_0 και s είναι διανύσματα με μήκος κύματος λ και οι διαδρομές p, q ορίζονται $p = \lambda \cdot r \cdot s_0$ και $q = -\lambda \cdot r \cdot s$. Η διαφορά διαδρομής των σκεδαζόμενων ακτινοβολιών (κύμα 1 και 2) είναι ίση με $p+q = \lambda \cdot r \cdot (s - s_0)$. Το κύμα 2 που σκεδάζεται από το e_2 έχει διαφορά φάσης (ακτίνια) σε σχέση με το κύμα 1 ίση με:

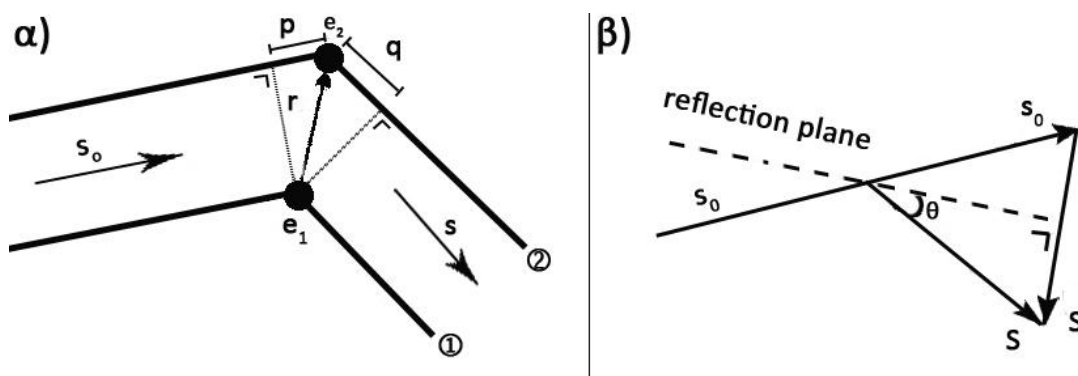
$$\frac{-[2\pi r (s - s_0) \lambda]}{\lambda} = 2\pi S \quad (\text{διάνυσμα σκέδασης}) \quad (1.2)$$

Όπου: $S = s - s_0$

Δεδομένου ότι οι σκεδαζόμενες ακτινοβολίες έχουν τα ίδια μέτρα, ίσα με $1/\lambda$ ($|s|, |s_0|$), τότε γεωμετρικώς ισχύει ότι:

$$|S| = |s - s_0| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad (1.3)$$

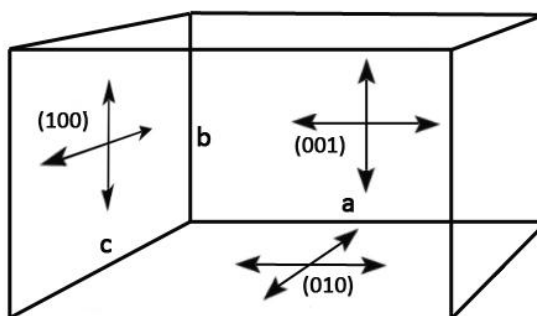
Όπου: θ : η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων s, s_0 και του νοητού επιπέδου κάθετου στο διάνυσμα S και καλείται επίπεδο ανάκλασης (Εικόνα 2.11. β).



Εικόνα 2.11: α) Σύστημα σκέδασης από δυο ηλεκτρόνια και β) διάνυσμα σκέδασης S κάθετο στο επίπεδο ανάκλασης (reflecting plane).

2.11.2 Συνθήκες περίθλασης- Ο νόμος του Bragg

Ο W.L. Bragg στην προσπάθειά του να ερμηνεύσει το φαινόμενο περίθλασης ακτινών X, υπέθεσε ότι τα προσπίπτοντα κύματα ανακλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα, που σχηματίζουν τα άτομα, τα οποία αποτελούν τον κρύσταλλο (γι' αυτό οι περιθλώμενες ακτινοβολίες καλούνται και ανακλάσεις). Όπως έχουμε αναφέρει οι στοιχειώδεις κυψελίδες ορίζονται από τρία ζεύγη επιπέδων. Τα επίπεδα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν από τρεις δείκτες h , k και l (γνωστοί και ως δείκτες Miller, από το όνομα του κρυσταλλογράφου Miller, που εισήγαγε το σύστημα). Κάθε επίπεδο μπορεί να περιγράψει από τις συντεταγμένες των σημείων τομής τους με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες a , b και c , οι οποίες και αποτελούν πολλαπλάσια των a , b και c με ακέραιους ή κλασματικούς αριθμούς. Όταν το επίπεδο είναι παράλληλο με τον κρυσταλλογραφικό άξονα τότε το σημείο τομής είναι το άπειρο. Προς αποφυγή αυτού, ο Miller εισήγαγε τους αντίστροφους αριθμούς των συντεταγμένων τομής. Παραδείγματος χάρη, αν οι δείκτες Miller επιπέδου είναι h , k και l , τότε οι συντεταγμένες των σημείων αυτού με τους άξονες a , b και c είναι $1/h$, $1/k$ και $1/l$, και οι αντίστοιχες αποστάσεις από τους άξονες είναι a/h , b/k και c/l . Στην Εικόνα 2.12 παρουσιάζεται μια ορθορομβική στοιχειώδης κυψελίδα και οι δείκτες Miller των κύριων επιπέδων, που τη σχηματίζουν.



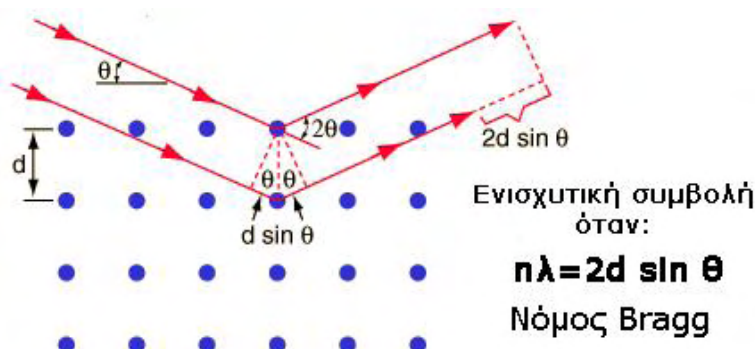
Εικόνα 2.12: Ορθορομβική στοιχειώδης κυψελίδα ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) και δείκτες Miller των επιπέδων, που την ορίζουν [Rhodes].

Στο μοντέλο του Bragg για την περίθλαση των ακτινών X (ως ανάκλαση) στα κρυσταλλογραφικά επίπεδα, οποιοδήποτε σύνολο παράλληλων κρυσταλλογραφικών επιπέδων μπορεί να αποτελέσει πηγή μιας περιθλώμενης ακτινοβολίας (δηλαδή ολόκληρο το σύνολο των παραλλήλων επιπέδων δρουν σαν μοναδικός σκεδαστής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, προσδίδοντας μια ενισχυμένη ανακλώμενη ακτινοβολία).

Ο νόμος του Bragg ορίζει ότι παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα με δείκτες h , k , l και διεπιφανειακή απόσταση d_{hkl} παράγουν ανάκλαση, όταν ακτίνα X μήκους κύματος λ προσπίπτει στα επίπεδα υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία, όταν η γωνία θ υπακούει στην συνθήκη:

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \quad (1.4) \quad (\text{Νόμος του Bragg})$$

Όπου: n : ακέραιος αριθμός, που καλείται και τάξη ανάκλασης



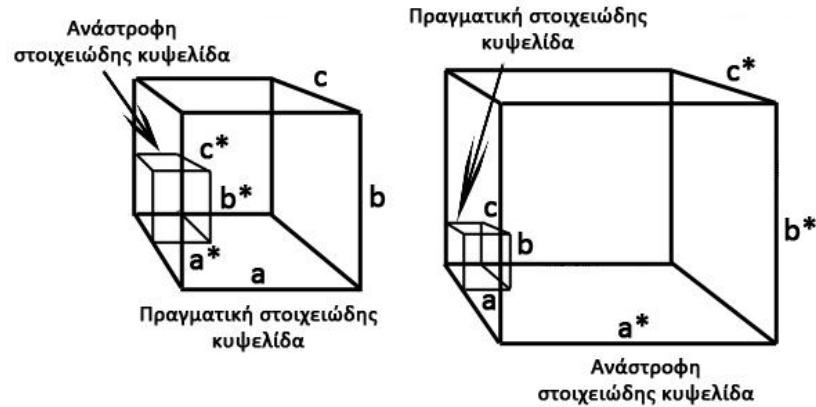
Εικόνα 2.13: Ο νόμος του Bragg σχηματικά.

Στην πραγματικότητα ο νόμος του Bragg αναφέρεται στην ενισχυτική και καταστρεπτική συμβολή των κυμάτων όταν πληρούν ή όχι την πιο πάνω

συνθήκη, δηλ. όταν η διαφορά διαδρομής των κυμάτων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος ή όταν η διάφορα φάσης τους είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π θα έχουμε ενισχυτική συμβολή. Η διεπιφανειακή απόσταση d_{hkl} των επιπέδων χαρακτηρίζεται ως μέτρο της ευκρίνειας (διακριτικής ικανότητας) σε ένα πείραμα περίθλασης ακτίνων X. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της διεπιφανειακής απόστασης τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η ευκρίνεια και λεπτομερέστερος ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής.

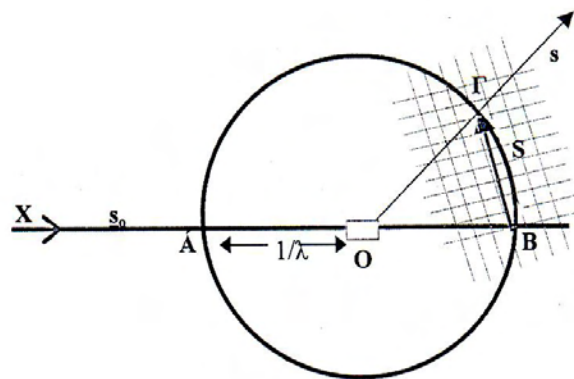
2.11.3 Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του Ewald

Το περιθλασίγραμμα χαρακτηρίζεται από κηλίδες, που έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία, συμμετρία και ένταση. Η κάθε κηλίδα (αντιστοιχεί σε μια ανάκλαση) χαρακτηρίζεται από τρεις συντεταγμένες h,k,l ώστε σύμφωνα με το νόμο του Bragg, να προέρχεται από ανάκλαση των ακτίνων X από τα επίπεδα hkl του πραγματικού πλέγματος. Οι κηλίδες έχουν συντεταγμένες, που ανήκουν σε ένα υποθετικό σύστημα συντεταγμένων, το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα, που βοηθά στον καθορισμό της διεύθυνσης των κυμάτων. Το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε γεωμετρικά, όπως και το πραγματικό, αφού οι παράμετροί του είναι αντιστρόφως ανάλογοι του πραγματικού κρυσταλλικού πλέγματος. Με βάση αυτό το μοντέλο περίθλασης ακτίνων X φαίνεται ότι οι θέσεις και ο αριθμός των ανακλάσεων καθώς και η συμμετρία του διαγράμματος περίθλασης, εξαρτώνται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, τις διαστάσεις και τη συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας, αλλά όχι από το περιεχόμενό της (μακρομόριο) [Κοντού,1999]. Στην εικόνα 2.14 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά μιας ανάστροφης στοιχειώδους κυψελίδας σύμφωνα με αυτά της πραγματικής.



Εικόνα 2.14: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ανάστροφης (reciprocal) μοναδιαίας και διαστάσεις σύμφωνα με μια μεγάλη και μια μικρή πραγματική (real) μοναδιαία κυψελίδα [Rhodes].

Το 1921, ο Ewald εισήγαγε για τη περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης, τη χρήση μιας γεωμετρικής κατασκευής η οποία απλοποιεί σε μεγάλο ποσοστό την περιγραφή του φαινομένου. Η κατασκευή αυτή συνίσταται από μια σφαίρα με κέντρο, O , τον κρύσταλλο (Εικόνα 2.15) Στο σημείο B βρίσκεται η αρχή του ανάστροφου πλέγματος όπου η προσπίπτουσα δέσμη ακτινών XAO συναντάει τη σφαίρα. Η συνθήκη για να παριστάνει μια ακτίνα της σφαίρας OG τη διεύθυνση των περιθλώμενων ακτινών X , ικανοποιείται εφόσον το σημείο Γ είναι σημείο του αντίστροφου πλέγματος (h,k,l) . Το διάνυσμα $B\Gamma$ σε αυτή τη περίπτωση είναι το διάνυσμα της σκέδασης S .



Εικόνα 2.15: Η σφαίρα του Ewald.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για την παρατήρηση μιας περίθλασης το σημείο hkl του ανάστροφου πλέγματος πρέπει να ανήκει στη σφαίρα ανάκλασης. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφή του κρυστάλλου.

2.11.4 Σκέδαση από ένα άτομο- ατομικός παράγοντας σκέδασης

Το ηλεκτρονικό νέφος ενός ατόμου σκεδάζει τις ακτίνες X και η σκέδαση των ακτίνων εξαρτάται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων και τις θέσεις τους στο νέφος. Επεκτείνοντας τη θεωρήση για τη σκέδαση δυο ηλεκτρονίων ορίζουμε τον ατομικό παράγοντα σκέδασης:

$$f = \int p(r) \exp[2\pi i r S] dr \quad (1.5)$$

Όπου: $p(r)$: ηλεκτρονική πυκνότητα με διάνυσμα θέσης r από τον πυρήνα

Ο ατομικός παράγοντας εξαρτάται από τον αριθμό ηλεκτρονίων του ατόμου καθώς και από την κατανομή τους σε αυτό, ενώ εκφράζει τη δύναμη σκέδασης του ατόμου. Επίσης, λόγω της σφαιρικής συμμετρίας του ατόμου, είναι ανεξάρτητος της διεύθυνσης του διανύσματος S , αλλά εξαρτάται από το μέτρο αυτού (εξίσωση 1.3). Όταν η γωνία σκέδασης είναι μηδέν ($\theta=0$), τότε ο ατομικός παράγοντας σκέδασης ισούται με τον ατομικό αριθμό Z . Καθώς η γωνία σκέδασης αυξάνεται, αυξάνονται και οι διαφορές των σκεδαζόμενων κυμάτων, όποτε ο ατομικός παράγοντας σκέδασης θα μειώνεται.

2.11.5 Σκέδαση από μοναδιαία κυψελίδα- Δομικός παράγοντας

Υποθέτουμε ότι στη μοναδιαία κυψελίδα περιέχονται n άτομα (με ατομικό παράγοντα σκέδασης, f_i) σε διάνυσμα θέσης r_i ($i= 1,2,3,\dots,n$) με αρχή το σημείο O (Εικόνα 2.15). Τα άτομα σκεδάζουν σύμφωνα με τον ατομικό παράγοντα σκέδασης (f) και το άθροισμα των ατομικών παραγόντων δίνει το δομικό παράγοντα, που ορίζεται από τη σχέση:

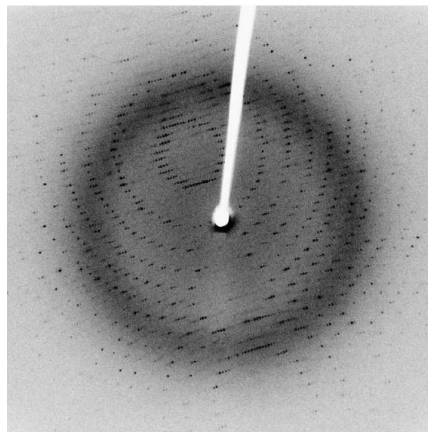
$$F(S) = \sum_{i=1}^n f_i \exp(2\pi i r_i S) \quad (1.6)$$

Ο παράγοντας δομής περιγράφει την ανάκλαση hkl είναι μια σύνθεση Fourier, στην οποία κάθε όρος περιγράφει τη συνεισφορά ενός ατόμου, το οποίο θεωρείται μια απλή σφαίρα ηλεκτρονικής πυκνότητας. Επομένως η συνεισφορά του κάθε ατόμου i στον $F(S)$ εξαρτάται από:

1. Το στοιχείο στο οποίο ανήκει, γεγονός, που καθορίζει το πλάτος (f_i) της συνεισφοράς.
2. Τη θέση του στη στοιχειώδη κυψελίδα (x_i, y_i, z_i), η οποία καθορίζει τη φάση της συνεισφοράς [Κοντού, 1999].

2.12 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των δεδομένων 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 απευθείας απεικόνιση του μορίου, χρησιμοποιούνται κατάλληλοι ανιχνευτές (Παράγραφος 2.10.2). Έτσι, το πρότυπο των περιθλάσεων αποτυπώνεται στα περιθλασιγράμματα (Εικόνα 2.16). 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 ηλεκτρονικής πυκνότητας του μορίου, με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών.



Εικόνα 2.16: Αποτύπωση του προτύπου περιθλάσεων- περιθλασίγραμμα.

Ωστόσο, υπάρχει ένα βασικό πρόβλημα. Προκειμένου να υπολογιστεί η συνάρτηση ηλεκτρονικής 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», οι «απευθείας» μέθοδοι (άμεσοι), η συνάρτηση Patterson, η μέθοδος «βαριού» ατόμου, η μέθοδος ισόμορφης αντικατάστασης και η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο ύδωρ και HPLC ύδωρ (MERCK) για την παρασκευή των διαλυμάτων. Τα χημικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν, προήλθαν από τις εταιρείες SIGMA, Aldrich, Merck, Scharlau, Research Organics, New England Biolabs, Fluka, Serva, Panreac, AppliChem, Chemlab και SDS. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Quick Start™ Bradford της εταιρείας Bio-Rad καθώς και αντιδραστήριο Bradford, που κατασκευάστηκε εντός του εργαστηρίου. Η οξειδάση της ξανθίνης, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για σύγκριση με την XO, απομονώθηκε από γάλα σε προηγούμενα πειράματα.

3.1.2 Υλικά συμπύκνωσης πρωτεϊνών

Για τις συμπυκνώσεις πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε Polyethylene glycol, PEG 40000, της εταιρείας Serva και φίλτρα κυτταρίνης με όγκο 500μl, 4ml και 20ml μη περατά από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10kDa της εταιρείας VIVASPIN™.

3.1.3 Υλικά χρωματογραφίας

Στήλη EAH-Sepharose 4B και Sephadex G-25 της εταιρείας GE Healthcare. Για το πακετάρισμα των στηλών χρησιμοποιήθηκαν άδειες κολώνες XK16/20 και C26/40 της εταιρείας GE Healthcare. Η πραγματοποίηση χρωματογραφίας έγινε με τη βοήθεια αντλίας Peristaltic Pump P-1 και του κλασματοσυλλέκτη SuperFrac™ Fraction Collector της εταιρείας GE Healthcare.

3.1.4 Όργανα

Φυγόκεντρος centrifuge 5810R (Eppendorf), ψυχόμενη φυγόκεντρος sorvall RC-5C (DuPont, Wilmington-USA), μίνι- φυγόκεντρος centrifuge 5415D (Eppendorf), συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini- PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), φωτόμετρο Spectronic Unicam 4001/4 (Spectronic®), φωτόμετρο UV Spectronic Unicam Genesys 10UV (Spectronic®), Vortex MS2 Minishaker (IKA®) και V-1 plus (G.KISKER) , αναδευτήρες yellow line MSC basic C (IKA®) και GFL 3015, πεχάμετρο 827 pH Lab Meter (Metrohm®), αντλία κενού Buchner (Pall, Live Sciences) και ζυγοί 420-3NM και 440-47N (KERN).

3.1.5 Υλικά κρυσταλλώσεων

Για τη πραγματοποίηση των κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήθηκαν πλάκες Linbro για sitting drop και πιπέτα Gilson MICROMAN M50. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν, το αυτόματο μηχάνημα κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments) και το στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα και σύστημα πολωμένου φωτός. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με ακτίνες X πραγματοποιήθηκε με χρήση γεννήτριας ακτίνων X, Oxford Diffraction, με κρουγονικό σύστημα διπλού ομοκεντρικού ρεύματος αζώτου, του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Ε.Ι.Ε.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα

Για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης χρησιμοποιήθηκε βόειο γάλα, ως πηγή πρωτεΐνης. Το γάλα μετά την παραλαβή του και πριν τις πειραματικές διαδικασίες, φιλτράρεται μέσω γάζας για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα και πρόσθετα, που μπορεί να περιέχει. Η διαδικασία καθαρισμού του γάλακτος διακρίνεται στα ακόλουθα βήματα, που χωρίζονται σε τέσσερις ημέρες:

Ημέρα 1^η:

1. Το γάλα φυγοκεντρείται στα 2000g και στους 4°C για 30 λεπτά. Συλλέγεται με προσοχή η λευκή κρέμα, που σχηματίζεται στην επιφάνεια του δοχείου φυγοκέντρησης και τοποθετείται σε δεύτερο δοχείο, του οποίου πριν έχουμε ζυγίσει το απόβαρο.

Σημείωση:

- Αν η θερμοκρασία στη διάρκεια της φυγοκέντρησης πέσει χαμηλότερα από τους 4°C, παρατηρείται σχηματισμός βουτύρου ανάμεσα στην κρέμα και το γάλα. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ο δύσκολος διαχωρισμός τους. Σε αυτή τη περίπτωση απαιτείται θέρμανση στους 30°C μέχρι να διαλυθεί το βούτυρο και να μπορεί να απομονωθεί η κρέμα.
- Η αναλογία μάζας κρέμας ανά lt γάλακτος είναι: 130gr κρέμα/ lt γάλα.

2. Έπειτα η κρέμα επαναδιαλύεται σε τρεις όγκους διαλύματος (0,2M K₂HPO₄, 0,2mM EDTA, 5mM cysteine-HCl, 1mM sodium salicylate), δηλαδή 100gr κρέμας σε 300ml διάλυμα, υπό ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου.

Σημείωση:

- Παρατηρείται ένα παχύρευστο υπόλευκο διάλυμα.

3. Αφού η κρέμα επαναδιαλυθεί, ελέγχεται το pH με πεχαμετρικό χαρτί και αν χρειάζεται, ρυθμίζεται περίπου στο 8- 8.3 με τη βοήθεια NaOH.

4. Στη συνέχεια, επωάζεται υπό απαλή ανάδευση (85rpm) για 2 ώρες στους 38°C.

5. Μετά την επώαση προστίθεται παγκρεατίνη με αναλογία: 1,6gr παγκρεατίνης/ 1lt διαλύματος κρέμας και αφήνεται να διαλυθεί υπό ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Ακολουθεί επώαση του διαλύματος κρέμας στους 37,5°C υπό απαλή ανάδευση (85rpm) για 3 ώρες.

7. Τέλος, η κρέμα φυλάσσεται στους 4°C για 12-16 ώρες.

Ημέρα 2^η: Το διάλυμα κρέμας μετά τη φύλαξή του στους 4°C πήζει πλήρως, για αυτό αφήνεται λίγη ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχίζουμε με το βήμα 8.

8. Προστίθεται στο διάλυμα κρέμας ένας όγκος διαλύματος (0,2M K_2HPO_4 , 0,2mM EDTA, 5mM cysteine-HCl, 1mM sodium salicylate) και αφήνεται να επαναδιαλυθεί σε θερμοκρασία δωματίου με απαλή ανάδευση και μαγνήτη.

Σημείωση:

- Η cysteine-HCl προστίθεται τελευταία και εκ νέου στο διάλυμα.

9. Στη συνέχεια, σε απαγωγό και υπό πολύ γρήγορη ανάδευση προστίθεται 15% v/v 1-βουτανόλη (παγωμένη στους $-20^{\circ}C$). Η προσθήκη βουτανόλης πραγματοποιείται αργά, εντός 10-20 λεπτών. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητά της, το διάλυμα κρέμας μεταφέρεται στους $4^{\circ}C$ και αφήνεται υπό απαλή ανάδευση για 10 λεπτά.

Σημείωση:

- Η ανάδευση πρέπει να είναι τέτοια, ώστε το διάλυμα να είναι ομοιογενές και να μην σχηματίζει φάση η βουτανόλη στην επιφάνεια του.
- Το χρώμα αρχίζει να παίρνει μια κίτρινη απόχρωση, ενώ το διάλυμα είναι θολό.

10. Κατόπιν προστίθεται θειικό αμμώνιο με αναλογία 15gr / 100ml κρέμας υπό απαλή ανάδευση. Αφού προστεθεί όλο το άλας, το διάλυμα κρέμας αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση για ακόμη 30 λεπτά στους $4^{\circ}C$.

Σημείωση:

- Το θειικό αμμώνιο πρέπει να προστίθεται στο διάλυμα κρέμας σε μικρές ποσότητες και να έχει διαλυθεί όλη η ποσότητά του πριν προστεθεί η επόμενη! Δεν πρέπει να σχηματίζονται τοπικά υψηλές συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου.

11. Τέλος, αφήνεται σε ηρεμία για 12-16 ώρες στους $4^{\circ}C$.

Ημέρα 3^η: Με το πέρας 12-16 ωρών ηρεμίας, το διάλυμα έχει δημιουργήσει 2 φάσεις. Για το λόγο αυτό ομογενοποιούμε με μια γυάλινη ράβδο.

12. Το σύνολο του διαλύματος κρέμας φυγοκεντρείται στα 5000g, $4^{\circ}C$ για 30 λεπτά και παρατηρείται ο σχηματισμός 3 φάσεων. Στο επάνω μέρος σχηματίζεται η φάση του οργανικού διαλύτη (έντονη κίτρινη- διαυγής), στην ενδιάμεση φάση το λίπος (λευκή- στερεή) και στο κάτω μέρος σχηματίζεται η υδατική φάση (υποκίτρινη- σχετικά διαυγής).

13. Με αντλία κενού αφαιρείται γρήγορα η φάση του οργανικού διαλύτη και με ένα κουτάλι η μεγαλύτερη ποσότητα λίπους.

Σημείωση:

- Προσοχή να μην αφαιρείται με την αντλία υδατική φάση.

14. Τα υπολείμματα λίπους απομακρύνονται από την υδατική φάση έπειτα από φιλτράρισμα μέσω υαλοβάμβακα.

Σημείωση:

- Αν το λίπος βρίσκεται σε πολύ μεγάλη ποσότητα επαναλαμβάνουμε δεύτερη φορά τη διέλευση από υαλοβάμβακα. Σε περίπτωση, που η υδατική φάση έχει περάσει ήδη 2 φορές από υαλοβάμβακα, αλλά παρόλα αυτά στην επιφάνεια σχηματίζεται λευκή φάση, επαναλαμβάνουμε τη διέλευση από υαλοβάμβακα.

15. Στη συνέχεια, προστίθεται υπό χαμηλή ανάδευση στους 4°C, θειικό αμμώνιο σε αναλογία 20gr/ 100ml υδατικής φάσης. Όταν προστεθεί όλο το άλας, η κρέμα αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση για ακόμη 30 λεπτά στους 4°C

16. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες στους 4°C.

17. Μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες επιπλέουν στην επιφάνεια του διαλύματος (υπόλευκη κρούστα σε όλη την επιφάνεια). Με προσοχή συλλέγονται οι πρωτεΐνες, που επιπλέουν.

Σημείωση:

- Παρατηρήθηκε ότι το πάχος της κρούστας σχετίζεται με την ποσότητα πρωτεΐνης, που θα λάβουμε μετά το τέλος της απομόνωσης.

18. Φυγοκεντρούνται στα 9500g, 4°C για 30 λεπτά. Παρατηρείται σχηματισμός 3 φάσεων. Επάνω βρίσκεται η φάση του οργανικού διαλύτη (έντονη κίτρινη-διαυγής) και κάτω η υδατική φάση (υποκίτρινη- διαυγής), ενώ ενδιάμεσα βρίσκεται καφέ ίζημα, στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες.

Σημείωση:

- Πλέον οι φυγοκεντρήσεις γίνονται σε Corex και όχι σε centrifuge bottles.

19. Προσεκτικά αποχύνονται οι φάσεις του οργανικού διαλύτη και της υδατικής και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα A.

Σημείωση:

- Χρησιμοποιείται τόση ποσότητα διαλύματος A, ώστε να μην υπάρχει μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας ιζήματος κατά τη διαπίδυση, αλλά ούτε να ξεπερνά ο συνολικός όγκος προς διαπίδυση, τα 120-130 ml.

20. Τέλος, το πρωτεϊνικό διάλυμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του ιδίου διαλύματος, με συχνές αλλαγές του διαλύματος, για 24 ώρες υπό απαλή ανάδευση, στους 4°C.

Σημείωση:

- Λόγω ύπαρξης του θειικού αμμωνίου, αφήνουμε περίσσεια κενού χώρου, μεταξύ πρωτεΐνης και δεσμάτος της μεμβράνης!

Ημέρα 4^η:

21. Το πρωτεϊνικό διάλυμα φυγοκεντρείται στα 17000g, 4°C για 30 λεπτά. Συλλέγεται με προσοχή το υπερκείμενο (καφεπορτοκαλί- διαυγές), ενώ το ίζημα απορρίπτεται (λευκό ως υπόλευκο).

22. Το υπερκείμενο, που συλλέχτηκε φιλτράρεται μέσω φίλτρου 0.45nm και φυλάσσεται στους 4°C.

Σημείωση:

- *Εάν είναι επιθυμητό, πριν απομονωθεί με χρωματογραφία συγγένειας, ελέγχεται ως προς την ύπαρξη δρασικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης.*

3.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας- EAH Sepharose 4B/folic Acid

Ο καθαρισμός και η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης, απαιτεί στήλη συγγένειας με συζευγμένο φολικό οξύ. Η στήλη αυτή κατακρατά την οξειδάση της ξανθίνης μέσω σύνδεσής της με το φολικό, ενώ αφήνει τις υπόλοιπες πρωτεΐνες να τη διαπεράσουν. Η έκλουση της οξειδάσης της ξανθίνης από τη στήλη πραγματοποιείται με τη διαβίβαση αλλοπουρινόλης ή υποξανθίνης. Ουσιαστικά, η αλλοπουρινόλη και η υποξανθίνη, ανταγωνίζονται το φολικό οξύ ως προς τη δέσμευση της οξειδάσης της ξανθίνης.

3.2.2.1 Δημιουργία στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid

Η δημιουργία της στήλης συγγένειας για την οξειδάση της ξανθίνης απαιτεί αρχικώς την προετοιμασία και ενεργοποίηση των σφαιριδίων EAH Sepharose 4B, έπειτα την πρόσδεση φολικού οξέος και τέλος την απομάκρυνση της περίσσειας φολικού οξέος για να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση πρωτεϊνών.

3.2.2.1.1 Προετοιμασία σφαιριδίων

Τα σφαιρίδια είναι αποθηκευμένα σε 20% αιθανόλη (εμπορικό σκεύασμα). Για τη δημιουργία της στήλης χρησιμοποιήθηκαν 30ml EAH Sepharose 4B, από τα οποία αφήνεται η αιθανόλη να περάσει ανάμεσά τους. Έπειτα γίνεται έκπλυση με 10 όγκους στήλης dH₂O ρυθμισμένο σε pH=4,5 και ακολούθως 2.4lt 0.5M NaCl (80ml/ 1ml στήλης). Όταν περάσει όλος ο όγκος του NaCl από τη σεφαρόζη, στήλη και μικρή εναπομένουσα ποσότητα NaCl φυγοκεντρούνται

στα 2500g για 10 λεπτά. Στο πάνω μέρος βρίσκεται το NaCl και στο κάτω τα σφαιρίδια σεφαρόζης, για αυτόν το λόγο με προσοχή αποχύνουμε το υπερκείμενο.

3.2.2.1.2 Πρόσδεση φολικού οξέος

Από εδώ και στο εξής απαιτείται η κάλυψη της στήλης με αλουμινόχαρτο για όλα τα μετέπειτα στάδια. Στη στήλη προστίθεται διάλυμα φολικού οξέος, με την σύσταση, που φαίνεται στον Πίνακα 3.1.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	25ml
dH ₂ O	25ml
Φολικό οξύ	0.049gr
Ρύθμιση pH≈5.8- 6 (πεχαμετρικό χαρτί) με 10M NaOH	

Πίνακας 3.1: Διάλυμα πρόσδεσης φολικού οξέος στα σφαιρίδια EAH Sepharose 4B.

Το διάλυμα πρόσδεσης φολικού οξέος προστίθεται στη στήλη και στη συνέχεια 0.375gr EDC. Η στήλη αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Στο τέλος της 1^{ης} ώρας, ελέγχεται το pH και σε περίπτωση, που έχει ελαττωθεί ρυθμίζεται σε pH≈6 με NaOH. Μετά το πέρας των τριών ωρών, το διάλυμα με τη στήλη φυγοκεντρώνεται στα 2500g για 20 λεπτά και απομακρύνεται με προσοχή το υποκίτρινο υπερκείμενο. Στα σφαιρίδια προστίθενται εκ νέου 50ml διαλύματος φολικού οξέος (Πίνακας 3.1) με 0.375gr EDC και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Κατόπιν, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 2500g για 20 λεπτά και αποχύνεται το υπερκείμενο. Σε περίπτωση, που το υπερκείμενο παραμένει υποκίτρινο η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες 3 ώρες με φρέσκο διάλυμα φολικού οξέος, ενώ αν είναι έντονο κίτρινο η διαδικασία πρόσδεσης σταματά. Σε κάθε επώαση με φολικό οξύ είναι απαραίτητος ο έλεγχος (με πεχαμετρικό χαρτί) και η ρύθμιση του pH≈6 με NaOH εντός της πρώτης ώρας, ενώ πάντα αποφεύγεται η έκθεση του εναιωρήματος στο φως.

Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση δεν αποχύνεται όλο το διάλυμα φολικού οξέος, ώστε να βοηθήσει στη μεταφορά των σφαιριδίων σεφαρόζης στην κολώνα.

Πρώτα ενυδατώνεται το κάτω εσωτερικό μέρος της κολώνας με ελάχιστο dH₂O και στη συνέχεια προστίθεται η στήλη. Κατά τη διάρκεια μεταφοράς στην κολώνα, αν χρειαστεί υγρό μέσο, χρησιμοποιείται μικρός όγκος από το διάλυμα 1 (Πίνακας 3.2).

3.2.2.1.3 Απομάκρυνση περίσσειας φολικού οξέος

Η απομάκρυνση περίσσειας φολικού οξέος είναι απαραίτητη για την αποφυγή μη ειδικής πρόσδεσης πρωτεϊνών στη στήλη και γίνεται με τη διαδοχική διαβίβαση από τη στήλη 2 όγκων στήλης Διαλύματος 1 (Πίνακας 3.2) και στη συνέχεια 2 όγκων στήλης Διαλύματος 2 (Πίνακας 3.3). Πρώτα πρέπει να περάσει από τη στήλη το χαμηλό pH και μετά το υψηλό. Η διαδικασία εναλλαγής των pH επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές, δηλαδή συνολικά γίνονται 3 εναλλαγές pH.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	90 ml
dH ₂ O	90 ml
NaCl	5.259 gr
Sodium Acetate	1.476 gr
Ρύθμιση pH= 4 (πεχαμετρικό χαρτί) με 10M HCl	

Πίνακας 3.2: Σύσταση Διαλύματος 1 (0,1M Acetate, 0,5M NaCl, 50%DMF με pH=4).

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	90ml
dH ₂ O	90ml
NaCl	5.259 gr
Tris- HCl	2.180 gr
Ρύθμιση pH= 8.5 (πεχαμετρικό χαρτί) με 10M NaOH	

Πίνακας 3.3: Σύσταση Διαλύματος 1 (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 50%DMF με pH=8.5).

Τέλος, πραγματοποιείται έκπλυση της στήλης με 4 όγκους στήλης DMF 50% και στη συνέχεια με 10 όγκους στήλης dH₂O. Η στήλη μεταφέρεται στους

4°C για να αποκτήσει τη θερμοκρασία, στην οποία θα πραγματοποιηθεί η απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης.

3.2.2.1.4 Αναγέννηση στήλης

Μετά το πέρας πολλών πρωτεϊνικών δειγμάτων, η στήλη απαιτεί αναγέννηση. Αυτό γίνεται αντιληπτό από τη μειωμένη απόδοση σε καθαρότητα πρωτεΐνης, καθώς και από το εξασθετισμένο χρώμα των σφαιριδίων. Το στάδιο της αναγέννησης περιλαμβάνει το διαδοχικό πέραςμα από τη στήλη 2 όγκων στήλης Διαλύματος 1 (Πίνακας 3.4) και στη συνέχεια 2 όγκων στήλης Διαλύματος 2 (Πίνακας 3.5). Στην αναγέννηση πρώτα διαβιβάζεται το υψηλό pH και έπειτα το χαμηλό. Η διαδικασία εναλλαγής των pH επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές. Έπειτα ακολουθούνται με τη σειρά τα βήματα προετοιμασίας των σφαιριδίων (από το πέραςμα του NaCl 0.5M και έπειτα), πρόσδεσης φολικού, καθώς και η απομάκρυνσή του, όπως περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	90ml
dH ₂ O	90ml
NaCl	5.259 gr
Tris- HCl	2.180 gr
Ρύθμιση pH= 8.5 (πεχαμετρικό χαρτί) με 10M NaOH	

Πίνακας 3.4: Σύσταση Διαλύματος 1 (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 50%DMF με pH=8.5).

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	90 ml
dH ₂ O	90 ml
NaCl	5.259 gr
Sodium Acetate	1.476 gr
Ρύθμιση pH= 4 (πεχαμετρικό χαρτί) με 10M HCl	

Πίνακας 3.5: Σύσταση Διαλύματος 1 (0,1M Acetate, 0,5M NaCl, 50%DMF με pH=4).

3.2.2.2 Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης σε στήλη φολικού οξέος με υποξανθίνη

Η διαδικασία καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη συγγένειας πραγματοποιείται στους 4°C και διακρίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από το γάλα διαβιβάζεται μέσω στήλης φολικού οξέος και η οξειδάση της ξανθίνης δεσμεύεται στη στήλη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες τη διαπερνούν. Η έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται με υποξανθίνη. Κατά το δεύτερο στάδιο, η οξειδάση της ξανθίνης, που προέρχεται από την πρώτη στήλη φολικού οξέος, διαβιβάζεται ξανά από αυτή.

Στάδιο 1: Αρχικά πριν τη χρήση της στήλης φολικού οξέος για τον καθαρισμό της οξειδάσης της ξανθίνης απαιτείται η εξισορρόπησή της με ≈ 10 όγκους ρυθμιστικού Διαλύματος A (ροή: 2ml/min) (Πίνακας 3.6). Εν συνεχεία, διαβιβάζεται με αργό ρυθμό (0.5ml/min) το πρωτεϊνικό δείγμα στη στήλη και συλλέγονται κλάσματα των 10ml σε falcon (flow through). Παρατηρείται ότι καθώς διέρχεται από τη στήλη το δείγμα, η στήλη αποκτά ελαφρώς καφέ χρώμα από το πάνω μέρος προς το κέντρο της. Όταν το καφέ χρώμα καλύψει το $1/3$ του όγκου της στήλης, σταματά η εισροή δείγματος (≈ 25 ml δείγματος) και αρχίζει η πλύση της στήλης με ≈ 5 όγκους ρυθμιστικού Διαλύματος B (2ml/min) (Πίνακας 3.6). Κατά τη διαδικασία πλύσης συλλέγονται κλάσματα (wash) σε falcon των 50ml. Δεν παρακολουθείται η απορρόφηση των κλασμάτων στα 280nm, παρά μόνο οπτικά το χρώμα τους. Αν τα κλάσματα είναι σχεδόν άχρωμα, τότε η οξειδάση της ξανθίνης έχει δεσμευτεί επιτυχώς στη στήλη, εάν όμως χρωματίζονται κίτρινα, τότε η πρωτεΐνη έχει διαφύγει της στήλης. Τα κλάσματα αυτά περιέχουν κυρίως πρωτεΐνες, που κατακρατούνται ασθενώς στη στήλη. Η πλύση της στήλης συνεχίζεται έως ότου περάσει ο απαιτούμενος όγκος του ρυθμιστικού Διαλύματος B. Έπειτα, για την έκλουση της οξειδάσης της ξανθίνης από τη στήλη (elution κλάσματα) διαβιβάζονται ≈ 3 όγκοι στήλης Διαλύματος C_H με ροή 1ml/min (Πίνακας 3.6). Συλλέγονται 25 κλάσματα όγκου 2ml έκαστο, τα οποία φωτομετρούνται στα 280nm, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συλλέγεται σε falcon. Η οξειδάση της ξανθίνης κάνει την εμφάνισή της, κατά κανόνα, μετά το πέρασμα του πρώτου όγκου στήλης του Διαλύματος C_H, ενώ γίνεται ορατή και οπτικά λόγω του υποκίτρινου χρώματος, που αποκτούν τα κλάσματα. Κατόπιν,

διαβιβάζονται 5 όγκοι Διαλύματος D (Πίνακας 3.6) και στη συνέχεια 10 όγκοι dH₂O με τη ροή στα 2ml/min.

- Όλα τα ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, πρέπει να είναι ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΑ και ΑΠΑΕΡΩΜΕΝΑ. Για το φιλτράρισμα χρησιμοποιείται φίλτρο κυτταρίνης με διάμετρο 0.22μm.

Διάλυμα Α	80%: 50mM Tris-HCl 0.2mM EDTA pH 7,8	20%: 0.1M sodium pyrophosphate 0.2mM EDTA pH 8.5	-
Διάλυμα Β	70%: 50mM Tris-HCl 0.2mM EDTA pH 7.8	30%: 0.1M sodium pyrophosphate 0.2mM EDTA pH 8.5	-
Διάλυμα C_H	70%: 50mM Tris-HCl 0.2mM EDTA pH 7.8	30%: 0.1M sodium pyrophosphate 0,2mM EDTA pH 8.5	0.5mM hypoxanthine
Διάλυμα D	-	0.1M sodium pyrophosphate pH 8.5	-

Πίνακας 3.6: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων για τον καθαρισμό της οξειδάσης σε στήλη φολικού οξέος με υποξανθίνη.

Το πρώτο στάδιο καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης ελέγχεται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12%. Τα κλάσματα, που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και πραγματοποιείται κατακρήμνιση της οξειδάσης της ξανθίνης με 60-70% θειικό αμμώνιο υπό ήπια ανάδευση στους 4°C και σκοτάδι. Το θειικό αμμώνιο πρέπει να προστίθεται στο διάλυμα σε μικρές ποσότητες και να έχει διαλυθεί όλη η ποσότητά του πριν προστεθεί η επόμενη! Όταν προστεθεί η απαιτούμενη ποσότητα θειικού αμμωνίου, αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση O/N στους 4°C. Έπειτα, το πρωτεϊνικό δείγμα φυγοκεντρείται στα 14000g, 4°C για 30 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύεται σε Διάλυμα Α (Πίνακας 3.6). Τέλος, η επαναδιαλυτοποιημένη πρωτεΐνη υποβάλλεται σε διαπίδυση στους 4°C έναντι Διαλύματος Α, ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο στάδιο.

Στάδιο 2: Η οξειδάση της ξανθίνης από το στάδιο 1 δεν είναι πλέον συνδεδεμένη με υποξανθίνη, αφού πέρασε από το στάδιο της διαπίδυσης,

συνεπώς μπορεί να προσδεθεί και πάλι στη στήλη φολικού οξέος. Αφού η στήλη εξισορροπηθεί εκ νέου με ≈ 10 όγκους Διαλύματος A (2ml/min), διαβιβάζεται σε αυτήν το δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης, που προέρχεται από το στάδιο 1 (0.5ml/min) και συλλέγονται κλάσματα σε falcon (flow through). Έπεται η πλύση της στήλης με ≈ 5 όγκους ρυθμιστικού Διαλύματος B (2ml/min) (Πίνακας 3.6), ενώ συλλέγονται κλάσματα (wash) σε falcon. Και στο στάδιο 2, δεν παρακολουθείται η απορρόφηση των κλασμάτων στα 280nm, παρά μόνο το χρώμα τους. Η πλύση της στήλης συνεχίζεται έως ότου περάσει ο απαιτούμενος όγκος του ρυθμιστικού Διαλύματος B. Έπειτα, για την έκλουση της οξειδάσης της ξανθίνης από τη στήλη (elution κλάσματα) διαβιβάζονται ≈ 3 όγκοι στήλης διαλύματος C_H με ροή 1ml/min (Πίνακας 3.6). Συλλέγονται 25 κλάσματα όγκου 2ml το καθένα, τα οποία φωτομετρούνται στα 280nm, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συλλέγεται σε falcon. Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται πάλι μετά το πέρασμα του πρώτου όγκου στήλης του Διαλύματος C_H (Πίνακας 3.6), ενώ γίνεται αντιληπτή και οπτικά λόγω του υποκίτρινου χρώματος, που αποκτούν τα κλάσματα. Κατόπιν, διαβιβάζονται 5 όγκοι Διαλύματος D (Πίνακας 3.6) και στη συνέχεια 10 όγκοι dH₂O με τη ροή στα 2ml/min.

Και το δεύτερο στάδιο καθαρισμού της πρωτεΐνης ελέγχεται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και εξετάζεται για την ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας. Στη συνέχεια, η οξειδάση της ξανθίνης, που είναι συνδεδεμένη με υποξανθίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κρυστάλλωση αφού πρώτα συμπυκνωθεί ή μπορεί να υποστεί διαπίδυση, ώστε να απομακρυνθεί η υποξανθίνη και να συμπυκνωθεί.

3.2.2.3 Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης σε στήλη φολικού οξέος με αλλοπουρινόλη

Η διαδικασία καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη πραγματοποιείται στους 4°C και διακρίνεται, όπως και ο καθαρισμός με υποξανθίνη, σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από το γάλα διαβιβάζεται μέσω στήλης φολικού οξέος και η οξειδάση της ξανθίνης δεσμεύεται στη στήλη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες διαφεύγουν. Το διάλυμα έκλουσης αυτή τη φορά περιέχει αλλοπουρινόλη, αντί υποξανθίνης, που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως. Στο δεύτερο στάδιο, η

οξειδάση της ξανθίνης, που είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη διαβιβάζεται ξανά από τη στήλη φολικού οξέος. Το εξαιρετικά ενεργό ένζυμο διαπερνά τη στήλη, ενώ το χαμηλής ενεργότητας ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη.

Στάδιο 1: Όπως και στον καθαρισμό της οξειδάσης της ξανθίνης με υποξανθίνη, απαιτείται εξισορρόπηση της στήλης με ≈ 10 όγκους ρυθμιστικού Διαλύματος A (2ml/min) (Πίνακας 3.7). Εν συνεχεία, διαβιβάζεται με αργό ρυθμό (0.5ml/min) το πρωτεϊνικό δείγμα στη στήλη και συλλέγονται κλάσματα των 10ml σε falcon (flow through). Σαφώς, και στον καθαρισμό με αλλοπουρινόλη παρατηρείται ο ελαφρύς καφέ χρωματισμός της στήλης με το πέρασ του δείγματος, Όταν το $1/3$ του όγκου της στήλης χρωματιστεί, σταματά η εισροή δείγματος (≈ 25 ml δείγματος) και αρχίζει η πλύση της στήλης με ≈ 5 όγκους ρυθμιστικού Διαλύματος B (2ml/min) (Πίνακας 3.7). Κατά τη διαδικασία πλύσης συλλέγονται κλάσματα (wash) σε falcon των 50ml. Τα κλάσματα δεν παρακολουθούνται με φασματοσκοπική μέτρηση, παρά μόνο με οπτική παρατήρηση. Τα κλάσματα αυτά περιέχουν κυρίως πρωτεΐνες, που κατακρατούνται ασθενώς στη στήλη. Η πλύση της στήλης συνεχίζεται έως ότου περάσει ο απαιτούμενος όγκος του ρυθμιστικού Διαλύματος B. Έπειτα, για την έκλυση της οξειδάσης της ξανθίνης από τη στήλη (elution κλάσματα) διαβιβάζονται ≈ 3 όγκοι στήλης Διαλύματος C_A (1ml/min) (Πίνακας 3.7). Συλλέγονται 25 κλάσματα όγκου 2ml έκαστο και φωτομετρούνται στα 280nm, ενώ ο υπόλοιπος όγκος συλλέγεται μαζικά σε falcon. Η οξειδάση της ξανθίνης παρουσιάζεται στα κλάσματα έκλυσης, μετά το πέρασμα του πρώτου όγκου στήλης του Διαλύματος C_A. Κατόπιν, διαβιβάζονται ≈ 5 όγκοι Διαλύματος D (Πίνακας 3.7) και στη συνέχεια 10 όγκοι dH₂O με τη ροή στα 2ml/min.

- Όλα τα ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, πρέπει να είναι ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΑ και ΑΠΑΕΡΩΜΕΝΑ. Για το φιλτράρισμα χρησιμοποιείται φίλτρο κυτταρίνης με διάμετρο 0.22μm.

Διάλυμα Α	80%: 50mM Tris-HCl 0.2mM EDTA pH 7,8	20%: 0.1M sodium pyrophosphate 0.2mM EDTA pH 8.5	-
Διάλυμα Β	70%: 50mM Tris-HCl 0.2mM EDTA pH 7.8	30%: 0.1M sodium pyrophosphate 0.2mM EDTA pH 8.5	-
Διάλυμα C_A	70%: 50mM Tris-HCl 0.2mM EDTA pH 7.8	30%: 0.1M sodium pyrophosphate 0,2mM EDTA pH 8.5	2.5mM allopurinol
Διάλυμα D	-	0.1M sodium pyrophosphate pH 8.5	-

Πίνακας 3.7: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων για τον καθαρισμό της οξειδάσης σε στήλη φολικού οξέος με αλλοπουρινόλη.

Όλα τα στάδια καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης ελέγχονται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12%. Τα κλάσματα, που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και υποβάλλονται σε O/N διαπίδυση στους 4°C σε διάλυμα Α (Πίνακας 3.7), ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο στάδιο.

Στάδιο 2: Η οξειδάση της ξανθίνης, που είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη από το στάδιο 1 ακόμη και μετά τη διαπίδυση, συμπυκνώνεται με χρήση PEG40000 σε όγκο, που αντιστοιχεί στο 10-20% του όγκου στήλης φολικού οξέος ($\approx 3-6$ ml). Αφού η στήλη εξισορροπηθεί εκ νέου με ≈ 10 όγκους Διαλύματος Α (2ml/min), διαβιβάζεται σε αυτήν το δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης, που προέρχεται από το στάδιο 1 (0.5ml/min). Η υψηλής ενεργότητας οξειδάση της ξανθίνης, που βρίσκεται συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη δε δεσμεύεται στη στήλη, για αυτό συλλέγονται απευθείας κλάσματα των 2ml (flow through). Έπειτα, πραγματοποιείται πλύση της στήλης με διάλυμα Β έως ότου διέλθουν από αυτή 5 όγκοι και συλλέγονται κλάσματα σε falcon (2ml/min). Το χαμηλής δραστηριότητας ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη και εκλούεται μόνο μετά τη διαβίβαση Διαλύματος C_A (1ml/min). Τέλος, διαβιβάζονται στη στήλη ≈ 5 όγκοι Διαλύματος D και στη συνέχεια 10 όγκοι dH₂O.

Όλα τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης ελέγχονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και εξετάζονται για την ύπαρξη ενζυμικής δραστικότητας. Στη συνέχεια, η οξειδάση της ξανθίνης, η οποία είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κρυστάλλωση ή μπορεί να επεξεργαστεί με $K_3Fe(CN)_6$, ώστε να απομακρυνθεί η αλλοπουρινόλη.

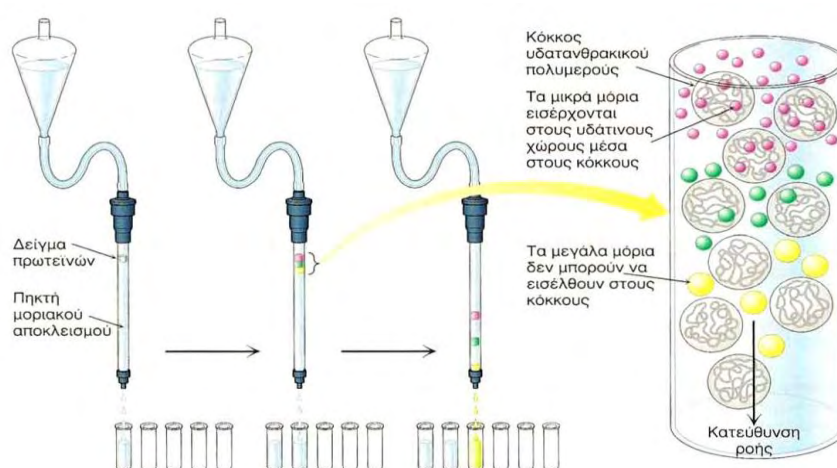
3.2.3 Ενεργοποίηση οξειδάσης της ξανθίνης με $K_3Fe(CN)_6$

Η οξειδάση της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη, που απομονώθηκε και συλλέχτηκε κατά το στάδιο 2 της χρωματογραφίας συγγένειας φολικού οξέος επεξεργάζεται με προσθήκη 1mM Sodium salycilate (τελική συγκέντρωση) και $K_3Fe(CN)_6$, σε αναλογία 15mmol $K_3Fe(CN)_6$ ανά 1mmol οξειδάση της ξανθίνης. Το $K_3Fe(CN)_6$ προστίθεται υπό μορφή σκόνης στο διάλυμα του ενζύμου και η αντίδραση ενεργοποίησης πραγματοποιείται στο σκοτάδι για 22 ώρες υπό ήπια ανάδευση στους 4°C. Τέλος, πραγματοποιείται κατακρήμνιση της οξειδάσης της ξανθίνης με 60-70% θειικό αμμώνιο υπό ήπια ανάδευση στους 4°C. Το θειικό αμμώνιο πρέπει να προστίθεται στο διάλυμα σε μικρές ποσότητες και να έχει διαλυθεί όλη η προηγούμενη ποσότητα πριν προστεθεί η επόμενη! Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 14000g, 4°C για 30 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύεται σε ελάχιστο όγκο (2-4ml) Διαλύματος A (Πίνακας 3.6 ή 3.7), ώστε να καταστεί έτοιμο για το επόμενο βήμα καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (G25).

3.2.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Ο καλύτερος διαχωρισμός βάσει του μοριακού μεγέθους των μορίων επιτυγχάνεται με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration). Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή μιας στήλης, που αποτελείται από πορώδεις κόκκους αδιάλυτου πολυμερούς, το οποίο μπορεί να συγκρατήσει πολύ νερό, όπως π.χ. δεξτράνη, αγαρόζη, πολυακρυλαμίδιο. Τα ονόματα Sephadex, Sepharose και Biogel είναι οι κλασικές εμπορικές ονομασίες αυτών των υλικών, που έχουν τυπική διάμετρο 100μm. Μικρά μόρια περνούν μέσα από αυτούς τους κόκκους, αλλά τα μεγάλα δε μπορούν να περάσουν. Αποτέλεσμα είναι ότι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδατικό περιβάλλον μέσα στους κόκκους και μεταξύ τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Τα

μεγάλα μόρια περνούν πιο εύκολα μέσα από τη στήλη και εμφανίζονται πρώτα διότι βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού. Τα μόρια με μέγεθος, που τους επιτρέπει να περνούν περιστασιακά μέσα από τους κόκκους θα εκλουστούν σε ενδιάμεσο χρόνο, ενώ τα μικρά θα εκλουστούν τελευταία διότι ακολουθούν μια δαιδαλώδη διαδρομή μέσα από τους κόκκους (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (Gel Filtration Chromatography).

Για τους καθαρισμούς της πρωτεΐνης οξειδάσης της ξανθίνης, που πραγματοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η στήλη Sephadex G-25.

3.2.4.1 Προετοιμασία στήλης Sephadex G-25

Για να χρησιμοποιηθεί η στήλη Sephadex G-25 στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης απαιτείται η προετοιμασία των σφαιριδίων και το πακετάρισμά της σε άδεια κολώνα C26/40. Αρχικώς, 50gr σφαιριδίων Sephadex G-25 τοποθετούνται σε 700ml dH₂O και αφήνονται στους 70°C για 1 ώρα. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης πραγματοποιείται απαλή ανάδευση με μια γυάλινη ράβδο ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες και έπειτα πραγματοποιείται απαέρωση. Τέλος, αφού η στήλη αποκτήσει τη θερμοκρασία στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός των πρωτεϊνών (4°C) πακετάρεται σε μια άδεια κολώνα C26/40. Το πακετάρισμα πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας αντλίας παροχής διαλύματος

(Peristaltic Pump P-1) σε ροή υψηλότερη από αυτήν, που θα πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός των πρωτεϊνών.

3.2.4.2 Διαδικασία καθαρισμού οξειδάσης της ξανθίνης

Απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση καθαρισμού της πρωτεΐνης με τη στήλη Sephadex G-25 είναι η χρήση απαερωμένων διαλυμάτων! Πριν τον καθαρισμό του ενζύμου, η στήλη μοριακής διήθησης εξισορροπείται με 5 όγκους Διαλύματος Α (Πίνακας 3.7). Μικρός όγκος οξειδάσης της ξανθίνης (0,1-1% του όγκου στήλης, δηλ. 0.5-2ml) φορτώνεται στην επιφάνεια της στήλης και αφήνεται να εισέλθει στους πόρους της. Έπειτα η επιφάνεια πληρώνεται 2 ως 3 φορές με Διάλυμα Α και αφήνεται να περάσει στο εσωτερικό. Δεν επιτρέπεται να στεγνώσει η επιφάνεια της στήλης μεταξύ πληρώσεων με διαλύματα. Πριν τοποθετήσουμε το πάνω μέρος της στήλης, το συνδέουμε με την αντλία, και η στήλη φορτώνεται τελευταία φορά με Διάλυμα Α. Υπό ροή, βιδώνεται το πάνω μέρος στην κολώνα και το κάτω μέρος συνδέεται με τον κλασματοσυλλέκτη. Πραγματοποιείται έκλουση με 2 όγκους (400ml) Διαλύματος Α υπό ροή 0,7ml/min. Τα κλάσματα, που συλλέγονται έχουν όγκο 1,4ml και φωτομετρούνται στα 280nm, ώστε να εντοπιστούν τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη. Πρώτα εκλούεται η πρωτεΐνη και ύστερα από το πέρας μεγάλου όγκου διαλύματος, το σιδηροκυανούχο κάλιο. Η καθαρότητα της οξειδάσης της ξανθίνης επιβεβαιώνεται ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου 12%.

3.2.5 Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφορητικές τεχνικές

Στα πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS- PAGE ηλεκτροφόρηση).

3.2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-γλυκίνης παρουσία SDS (SDS- PAGE)

Σε μη αποδιατακτικές συνθήκες PAGE, τα πολυπεπτίδια διατηρούν τις ανώτερες δομές τους και τις αλληλεπιδράσεις, που μπορεί να έχουν με διαφορετικά πολυπεπτίδια. Η μετανάστευση των πρωτεϊνών εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: α. το μέγεθος, β. το σχήμα και γ. το φυσικό φορτίο. Ωστόσο, η ανάλυση σε τέτοιου είδους ηλεκτροφορήσεις δεν είναι τόσο υψηλή όσο στην SDS-PAGE. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης, όπως αυτό εκτιμάται από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, για την εκτίμηση της ομοιογένειας του πληθυσμού των μορίων όπως αυτά εκκλύονται στην παραπάνω χρωματογραφία, για τον έλεγχο της καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων, αλλά και για τον έλεγχο απογλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Για τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (discontinuous PAGE) σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli [Laemmli, 1970].

3.2.5.1.1 Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή ακρυλαμιδίου/bis- ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δυο επιμέρους τμήματα. Το πρώτο τμήμα αποτελείται από την πηκτή επιστοιβαξης (stacking gel), όπου τα δείγματα των πρωτεϊνών πακετάρονται υπό σταθερή τάση. Η πηκτή αυτή έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμιδίου (5%), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών (Πίνακας 3.8).

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml)
Ακρυλαμίδιο 30%	0.5
1.0M Tris-HCl (pH 6.8)	0.38
SDS 10%	0.03
dH ₂ O	2.1
TEMED	0.003
APS 10%	0.03
Σύνολο	3

Πίνακας 3.8: Σύσταση πηκτής επιστοιβαξης (stacking gel) συγκέντρωσης 5% για SDS- PAGE ηλεκτροφόρηση.

Το δεύτερο τμήμα αποτελείται από την πηκτική διαχωρισμού (separating gel, running gel), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμιδίου εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό (Πίνακας 3.9). Στο συγκεκριμένο πείραμα, για την οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιούνται πηκτώματα με ποσοστό ακρυλαμιδίου 10% ή 12%.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση 10% Συγκέντρωση 12%	
	Όγκος (ml)	
Ακρυλαμίδιο 30%	1.7	2.0
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.3	1.3
SDS 10%	0.05	0.05
TEMED	0.002	0.002
APS 10%	0.05	0.05
dH ₂ O	1.9	1.6
Σύνολο	5	5

Πίνακας 3.9: Σύσταση πηκτικής διαχωρισμού (separating) ανάλογα με το ποσοστό ακρυλαμιδίου, για SDS- PAGE ηλεκτροφόρηση.

Το APS και το TEMED προστίθενται τελευταία, αφού αναμιχθούν όλα τα άλλα αντιδραστήρια, διότι είναι αυτά που, ευθύνονται για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου (πήξη του πηκτώματος).

3.2.5.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτική περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά (loading buffer 4x) (Πίνακας 3.10) και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η αποδιάταξη επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 3- 5 λεπτά.

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα
Tris-HCl pH 6.8	62.5mM
SDS 10%	2%
Γλυκερόλη	10%
β- Μερκαπτοαιθανόλη	2%
Bromophenol blue	0.05%

Πίνακας 3.10: Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer 4x), το οποίο προστίθεται στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση.

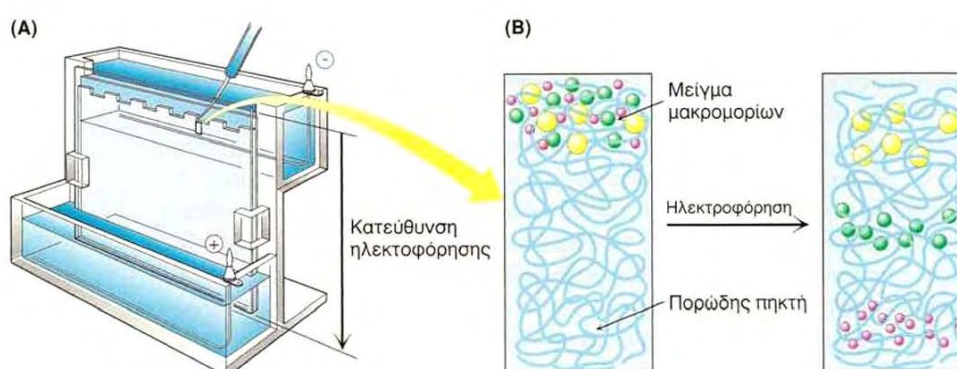
3.2.5.1.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη (πολυμερισμένη), τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους φορτώνονται στα βοθρία της πηκτής (πηγάδια). Έπειτα, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (Πίνακας 3.11) εσωτερικά των γυάλινων πλακιδίων, έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την κορυφή της πηκτής, αλλά και εξωτερικά στη δεξαμενή, ώστε να καλύπτει το κάτω μέρος του πηκτώματος (Εικόνα 3.2).

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Γλυκίνη	14.41gr
Tris	3.0275gr
SDS	1gr
dH ₂ O	εώς 1L

Πίνακας 3.11: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος (running buffer) ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με τη συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 180V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοίβαξης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

3.2.6 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου έγινε με τη χρήση δύο μεθόδων, χρώση με κυανό του Coomassie και χρώση με νιτρικό άργυρο (silver stain).

3.2.6.1 Χρώση με κυανό του Coomassie

Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωματισμού (staining solution) (Πίνακας 3.12) για 30 λεπτά υπό ανάδευση, ώστε να χρωματιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής υπό ανάδευση, με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) (Πίνακας 3.12), μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες και αποχρωματιστεί τελείως το υπόστρωμα.

Διάλυμα χρωματισμού	Διάλυμα αποχρωματισμού
40% μεθανόλη 10% οξικό οξύ 0.2% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250 dH ₂ O	40% μεθανόλη 10% οξικό οξύ dH ₂ O -

Πίνακας 3.12: Διάλυμα χρωματισμού και αποχρωματισμού.

Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών, εξαιτίας της μπλε χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους της BioRad.

Η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί για αρκετές βδομάδες στους 4°C με διάλυμα, που περιέχει 5% οξικό οξύ και dH₂O.

3.2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO₃)

Η βαφή των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται αντί της πιο απλής μεθόδου με Coomassie Brilliant Blue, για τη μεγαλύτερη ευαισθησία της στην ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών, που μπορεί να ανιχνεύσει αυτή η μέθοδος είναι μέχρι 1ng έχοντας 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη χρωστική Coomassie.

1. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε Διάλυμα Α και αναδεύεται για 1 ώρα (στάδιο καθήλωσης).

2. Μετά την απομάκρυνση του Διαλύματος A, πραγματοποιείται έκπλυση της πηκτής με Διάλυμα B για 20 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές.
3. Στη συνέχεια, η πηκτή τοποθετείται σε Διάλυμα C (διάλυμα sensitize) και αναδεύεται για 1 λεπτό.
4. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 20sec με dH₂O.
5. Κατόπιν η πηκτή επωάζεται με Διάλυμα D (staining διάλυμα, τουλάχιστον 1 ώρα πριν στους 4°C) υπό απαλή ανάδευση για 30 λεπτά.
6. Αφού απομακρυνθεί το Διάλυμα D, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 20sec με dH₂O.
7. Κατόπιν, η πηκτή εμβαπτίζεται σε Διάλυμα E (developer) και αναδεύεται απαλά έως ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες (≈2 λεπτά).
8. Τέλος, για τον τερματισμό της αντίδρασης εμφάνισης, η πηκτή μεταφέρεται σε Διάλυμα F (διάλυμα stopper) για 20 λεπτά υπό ανάδευση.
9. Η πηκτή αφού ξεπλυθεί με dH₂O φυλάσσεται στους 4°C.

3.2.7 Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται φασματοσκοπικές ή χρωματομετρικές τεχνικές.

3.2.7.1 Φασματοσκοπικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση μια πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα προσδιορίζεται βάση εμπειρικών τύπων, που αποδίδουν την απορρόφηση του πρωτεϊνικού διαλύματος, στην περιοχή του υπεριώδους ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου και απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η μέθοδος απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος, είναι γρήγορη και δεν είναι καταστροφική για το δείγμα. Αρχικά, μετράται η απορρόφηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280nm και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης από τον τύπο:

$$Molarity = \frac{O.D_{280} \times \alpha \rho \acute{\alpha} \omega \sigma \eta}{5500N_W + 4910N_Y + 125N_{S-S}}$$

Λαμβάνεται υπόψη η περιεκτικότητα σε κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσίνης (N_w και N_y οι αριθμοί των καταλοίπων τρυπτοφάνης και τυροσίνης αντίστοιχα) στη μετρούμενη πρωτεΐνη και N_{s-s} ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών.

Ένας δεύτερος τρόπος για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε μήκος κύματος 280nm είναι η χρήση του συντελεστή αποσβέσεως για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η οξειδάση της ξανθίνης έχει $E^{1\%} = 11.7$. Συνεπώς, 1mg/ml οξειδάση της ξανθίνης δίνει $\epsilon = 1.17$.

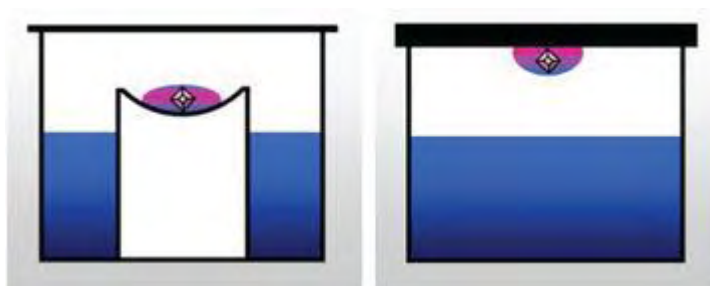
3.2.7.2 Χρωματομετρική μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford με τη χρήση του αντιδραστηρίου Quick Start™ Bradford της εταιρείας Bio-Rad. Η προς μέτρηση πρωτεΐνη αντιδρά με τη χρωστική σε περίσσεια προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης. Πιο συγκεκριμένα η χρωστική δεσμεύεται σε κατάλοιπα λυσίνης πάνω στις πρωτεΐνες, παράγοντας έγχρωμο προϊόν, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων, στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης, η ένταση της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος με τη μέθοδο αυτή, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Αρχικά, μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin) σε μήκος κύματος 595nm. Συγκεκριμένα, σε 20μl από το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (0.2- 1.4 mg/ml) προστίθενται 980μl διαλύματος Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595nm έπειτα από αναμονή 7 λεπτών. Ακολούθως, μετράται η οπτική απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος και με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

3.2.8 Κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών (vapour diffusion) είναι η πιο διαδεδομένη χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνικού διαλύματος, γεγονός πολύ σημαντικό, τουλάχιστον για τις αρχικές προσπάθειες εύρεσης των συνθηκών κρυστάλλωσης. Η βασική της αρχή είναι η εξής: μια ποσότητα πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ενός κατακρημνιστικού παράγοντα συγκέντρωσης α , εξισορροπείται, σε κλειστό σύστημα, με δεξαμενή, όπου η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα είναι β ($\beta > \alpha$). Η σταδιακή μεταβολή της συγκέντρωσης του παράγοντα καθίζησης, λόγω διάχυσης ατμών διαλύτη από την πρωτεΐνη στη δεξαμενή, οδηγεί το πρωτεϊνικό διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού, με αποτέλεσμα τη σταδιακή εναπόθεση των πρωτεϊνικών μορίων σε πυρήνες κρυστάλλωσης. Το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια, ώστε να είναι απαλλαγμένο από σωματίδια σκόνης και άλλα αιωρούμενα στερεά σωματίδια, με τη βοήθεια της φυγοκέντρωσης. Υπάρχουν δύο παραλλαγές της μεθόδου διάχυσης ατμών, η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας και η τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας (Εικόνα 3.3), αλλά μόνο η μία χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 3.3: Οι δύο ευρέως γνωστές τεχνικές της μεθόδου «Διάχυσης ατμών». Τεχνική επικαθήμενης σταγόνας (αριστερά) και Τεχνική κρεμάμενης σταγόνας (δεξιά).

3.2.8.1 Τεχνική της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)

Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θέση, που υπάρχει στις πλάκες Linbro και ονομάζεται βοθρίο (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Πλάκα 24 θέσεων 'Linbro', η οποία χρησιμοποιήθηκε.

Η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με διάλυμα κατακρήμνισης, το οποίο έχει προηγουμένως τοποθετηθεί στη δεξαμενή (reservoir). Στη συνέχεια, η πλάκα κλείνεται ερμητικά με ένα διαφανές πλαστικό αυτοκόλλητο και αφήνεται σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°C και 25°C). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης με τη βοήθεια του αυτόματου μηχανήματος OryxNano (Douglas Instruments) στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ε.Ι.Ε στην Αθήνα (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Ρομποτικό μηχανήμα κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments) του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας, ΕΙΕ.

Πριν τη χρήση του ρομπότ έλαβαν χώρα μια σειρά από χειροκίνητες κρυστάλλώσεις σε ποικίλες συνθήκες και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (5mg/ml έως 14mg/ml), αλλά μόνο στους 16°C.

Το ρομπότ τοποθετεί αυτόματα σε κάθε υποδοχή 200nl οξειδάση της ξανθίνης γνωστής συγκέντρωσης και 200nl διάλυμα εξισορρόπησης σε περιβάλλον 16°C. Τα διαλύματα εξισορρόπησης, που δοκιμάστηκαν ήταν από τα

εμπορικά προπαρασκευασμένα διαλύματα (kits) PEG SUIT της εταιρείας QIAGEN καθώς και τα structure screen I και II της Molecular Dimensions.

Για τη βελτιστοποίηση των κρυστάλλων, που αναπτύχθηκαν σε ορισμένες από τις συνθήκες, που δοκιμάστηκαν με το OryxNano, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον δοκιμές με διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Οι νέες κρυσταλλώσεις έγιναν χειροκίνητα, με εύρος συγκεντρώσεων 7mg/ml έως 21mg/ml και σε θερμοκρασίες 16°C και 25°C.

3.2.8.2 Τεχνική «ενπυρήνωσης» (seeding drop)

Ένα από τα παράδοξα στην κρυστάλλωση είναι η εύρεση των ιδανικών συνθηκών για το σχηματισμό κρυστάλλων, οι οποίες όμως δεν είναι οι ιδανικές για να υποστηρίξουν την εν συνεχεία ανάπτυξη τους. Αυτό συμβαίνει επειδή η αυθόρμητη πυρήνωση συμβαίνει όταν τα επίπεδα του υπερκορεσμού είναι υψηλά, ενώ η αργή, οργανωμένη ανάπτυξη σε μεγάλους κρυστάλλους ευνοείται από χαμηλότερα επίπεδα. Το ιδανικό πείραμα, πρέπει με κάποιον τρόπο «αποσυνδέσει» την πυρήνωση από την ανάπτυξη, για να ικανοποιήσει τις διαφορετικές απαιτήσεις των δύο ευδιάκριτων γεγονότων. Η ενπυρήνωση είναι ένα ισχυρό εργαλείο για το διαχωρισμό της πυρήνωσης και της ανάπτυξης. Στην τεχνική αυτή, προηγούμενοι πυρηνωμένοι κρύσταλλοι, χρησιμοποιούνται ως «σπόροι» και εισάγονται σε νέες σταγόνες ισορροπημένες σε χαμηλότερα επίπεδα υπερκορεσμού. Οι τεχνικές ενπυρήνωσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες με βάση το μέγεθος των σπόρων:

- **Microseeding:** μεταφορά υπομικροσκοπικών σπόρων, πολύ μικροί για να διακρίνονται μεμονωμένα.
- **Macroseeding:** μεταφορά ένας ενιαίου κρυστάλλου, συνήθως 5-50 μm .

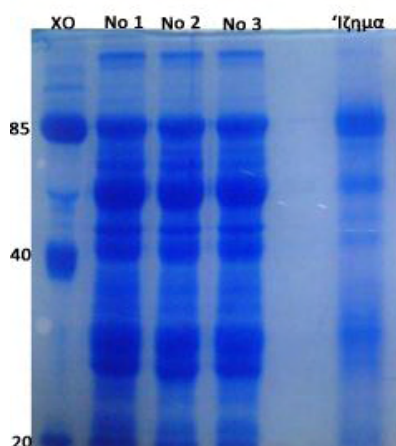
Προηγούμενοι, κακώς σχηματισμένοι κρύσταλλοι θραύονται με τη βοήθεια γυάλινου ακροδέκτη και αναδευτήρα. Στη συνέχεια δημιουργούνται αραιώσεις με τη χρήση μερικών μl κατακρημνιστικού διαλύματος, που θα χρησιμοποιηθεί στην κρυστάλλωση. Τέλος τα αραιωμένα και μη θραύσματα πυρήνων τοποθετούνται στα βοηθία των πλακών μαζί με την πρωτεϊνική σταγόνα.

Οι αραιώσεις θραυσμένων πυρήνων, που χρησιμοποιήθηκαν είναι: μη αραιωμένο, 1:10, 1:100 και 1:1000. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κυμαινόταν σε μεγάλο εύρος, από 7mg/ml έως και 21mg/ml, ενώ η θερμοκρασία ήταν αποκλειστικά 25°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα

4.1. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα

Για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης στη παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή απομόνωσης το βόειο γάλα. Η συνολική ποσότητα γάλακτος προήλθε μόνο από **μια** αγελάδα, ώστε να αποφευχθεί το πρόβλημα ετερογένειας του ενζύμου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πρωτεϊνών από το γάλα σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.1. Κατά τη διαδικασία αυτή, η πηγή της οξειδάσης της ξανθίνης ήταν η κρέμα γάλακτος, που σχηματίζεται κατόπιν φυγοκέντρησης του γάλακτος. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται το λίπος, το οποίο θα αποτελούσε πρόβλημα κατά τα επόμενα βήματα καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας. Το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από 6lt γάλακτος ήταν συγκέντρωσης 5.6mg/ml (μέσος όρος τριών δειγμάτων) και συνολικά 666.5mg (συνολικά τα τρία δείγματα και το υπερκείμενο. Μετά τη διαπίδυση κατά το τελικό στάδιο απομόνωσης των πρωτεϊνών (ενότητα 3.2.1, Ημέρα 3^η) πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 18°C. Το ίζημα, που σχηματίστηκε περιείχε 21.1mg πρωτεΐνης, ενώ το υπερκείμενο 645.4mg (τρία δείγματα υπερκειμένου). Και τα τέσσερα δείγματα, συνολικά, αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12%. Για τη διαπίστωση ύπαρξης οξειδάσης της ξανθίνης στα πρωτεϊνικά δείγματα, που απομονώθηκαν από το γάλα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας οξειδάση της ξανθίνης από προηγούμενο καθαρισμό. Η επιτυχής απομόνωση πρωτεϊνών ταυτοποιείται μετά από χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 4.1).



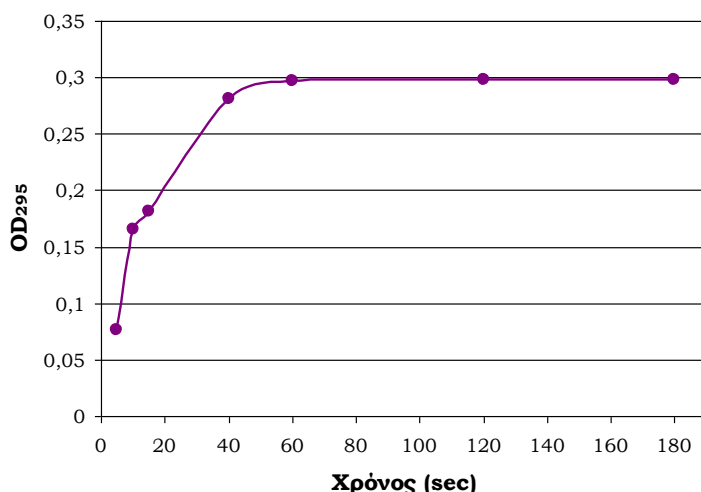
Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: XO, 1.4μg παλαιά οξειδάση της ξανθίνης. Διαδρομές 2-4: No1- 3, 1.4μg, 1.5μg και 1.5μg πρωτεϊνικό δείγμα αντίστοιχα (υπερκείμενο). Διαδρομή 6: Ίζημα, 0.4μg πρωτεϊνικό δείγμα ιζήματος από βόειο γάλα.

Η οξειδάση της ξανθίνης κατά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE διαχωρίζεται στις τρεις υπομονάδες της (85kDa, 40kDa και 20kDa) και σπάνια στη μορφή των 145kDa. Στην οξειδάση της ξανθίνης από προηγούμενο καθαρισμό εύκολα διακρίνουμε και τις τρεις ζώνες, ενώ στα υπερκείμενα και το ίζημα του πρωτεϊνικού δείγματος, που απομονώθηκε από το γάλα, διαπιστώθηκε πως η ζώνη των 40kDa λίγο μετατοπισμένη. Η μικρή ύπαρξη XO στο ίζημα δεν μας αφορά αφού αντιστοιχεί στην ανενεργή της μορφή, την οποία ούτως ή άλλως θέλουμε να απομακρύνουμε. Για την πλήρη ταυτοποίηση της ύπαρξης οξειδάσης της ξανθίνης στο πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από το βόειο γάλα (υπερκείμενο) πραγματοποιήθηκε μελέτη δραστηκότητας του ενζύμου με το υπόστρωμά του, την ξανθίνη. Πιο αναλυτικά, σε ρυθμιστικό διάλυμα (33mM KH_2PO_4 , 33mM Na_2HPO_4 , 0.1mM EDTA, pH=7.5) με 20 μM ξανθίνη προστέθηκαν 5 μg πρωτεϊνικού δείγματος, που απομονώθηκε από το γάλα και παρακολούθηθηκε η αύξηση απορρόφησης στα 295nm για 3 λεπτά (Πίνακας 4.1, Διάγραμμα 4.1).

Χρόνος (sec)	Απορρόφηση (295nm)
5	0.076
10	0.165
15	0.181
40	0.281
60	0.297
120	0.298
180	0.298

Πίνακας 4.1: Μεταβολή απορρόφησης στα 295nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Η μεταβολή οφείλεται στην παραγωγή ουρικού οξέος από την οξειδάση της ξανθίνης με υπόστρωμα την ξανθίνη. Συνεπώς διαπιστώνουμε ότι υπάρχει το ένζυμο και ότι είναι δραστικό.

Η αύξηση στην απορρόφηση οφείλεται στην παραγωγή ουρικού οξέος και συνεπώς στο πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από το γάλα διαπιστώνεται η ύπαρξη οξειδάσης της ξανθίνης. Για την περαιτέρω απομόνωση, αποκλειστικά της επιθυμητής πρωτεΐνης από το πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας.

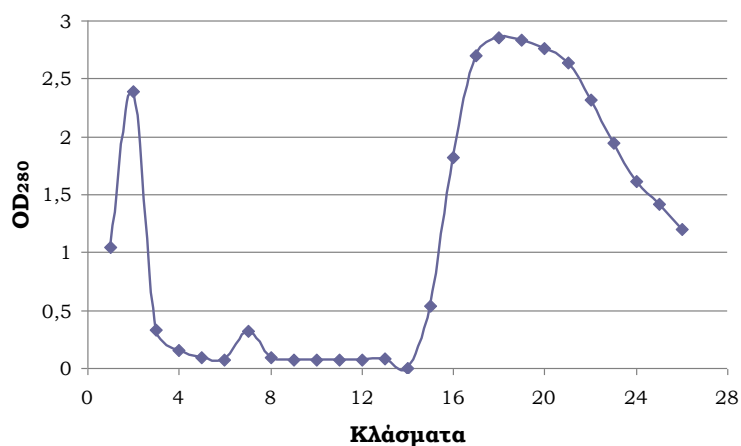


Διάγραμμα 4.1: Διάγραμμα μεταβολής απορρόφησης στα 295nm σε συνάρτηση με το χρόνο.

4.2 Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας και τη χρήση υποξανθίνης ως εκλουστικό μέσο

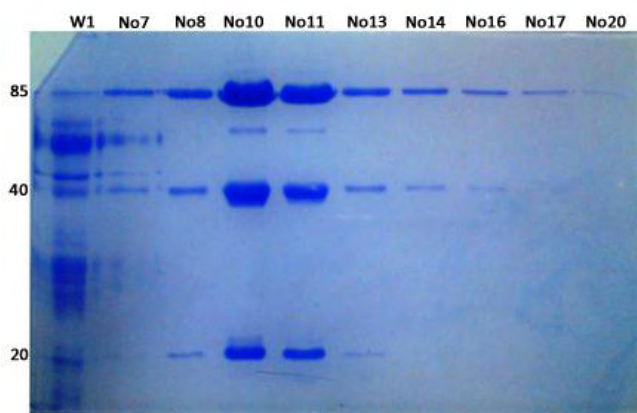
Η διαδικασία καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη συγγένειας πραγματοποιήθηκε στους 4°C, ενώ διακρίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε διαβιβάστηκε μέσω στήλης φολικού οξέος και απομονώθηκε η οξειδάση της ξανθίνης από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του δείγματος. Κατά το δεύτερο στάδιο, η οξειδάση της ξανθίνης, που προέρχεται από το πρώτο στάδιο και είναι ελεύθερη από υποξανθίνη διαβιβάζεται ξανά από στήλη φολικού οξέος.

Στάδιο 1: Για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από το πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε αρχικώς χρωματογραφία συγγένειας με στήλη EAH Sepharose 4B/folic Acid. Το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από το γάλα διαβιβάστηκε σε στήλη φολικού οξέος και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της οξειδάσης της ξανθίνης σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.2 (στάδιο 1). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 1ml/min και τα κλάσματα, που συλλέχτηκαν ήταν όγκου 2ml το καθένα. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολουθήθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (Διάγραμμα 4.2).



Διάγραμμα 4.2: Χρωματογράφημα στήλης για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης με χρήση 0.5mM υποξανθίνη. Κλάσμα No1: flow through, κλάσματα No2- 6: wash, κλάσματα No7-26: elution.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12% και χρώση με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 4.2).

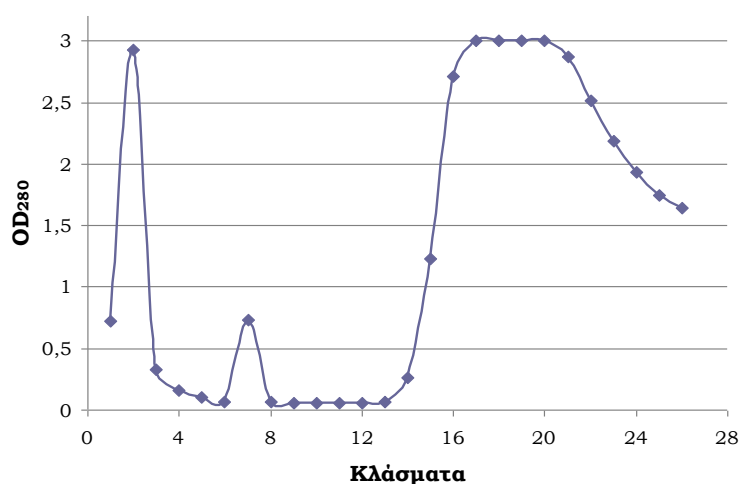


Εικόνα 4.2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: wash. Διαδρομές 2- 10: elution.

Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας και σε μεγάλη ποσότητα (μοριακό βάρος 85kDa, 40kDa και 20kDa ζώνες). Η έκλουση του ενζύμου από τη στήλη πραγματοποιήθηκε με 0.5mM υποξανθίνη και τα κλάσματα, που την περιείχαν ήταν τα κλάσματα No7- 14 (Εικόνα 4.2). Στη συνέχεια, τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε O/N διαπίδυση στους 4°C σε ρυθμιστικό Διάλυμα Α. Η ποσότητα της XO, που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε ≈21mg. Τέλος, η οξειδάση της ξανθίνης συμπυκνώθηκε με

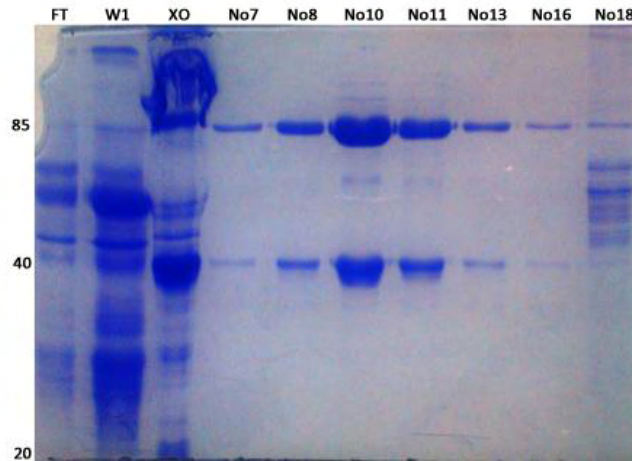
PEG40000 σε όγκο, που αντιστοιχεί στο 20% του όγκου στήλης φολικού οξέος, δηλαδή στα 6ml, πριν υποβληθεί σε καθαρισμό με δεύτερη χρωματογραφία συγγένειας φολικού οξέος.

Στάδιο 2: Το δείγμα οξειδάσης της ξανθίνης, που απομονώθηκε κατά την πρώτη χρωματογραφία συγγένειας διαβιβάστηκε σε δεύτερη στήλη φολικού οξέος και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.2.2. (στάδιο 2). Με τη δεύτερη χρωματογραφία συγγένειας επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της πολύ ενεργής οξειδάσης της ξανθίνης από τη λιγότερο ενεργή. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 1ml/min και τα κλάσματα, που συλλέχτηκαν ήταν όγκου 2ml. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολούθηθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (Διάγραμμα 4.3).



Διάγραμμα 4.3: Χρωματογράφημα στήλης για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης με χρήση 0.5mM υποξανθίνη. Κλάσμα No1: flow through, κλάσματα No2- 6: wash, κλάσματα No7-26: elution.

Για να βεβαιωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12%. Η ύπαρξη πρωτεΐνης επιβεβαιώνεται μετά τη χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 4.3).



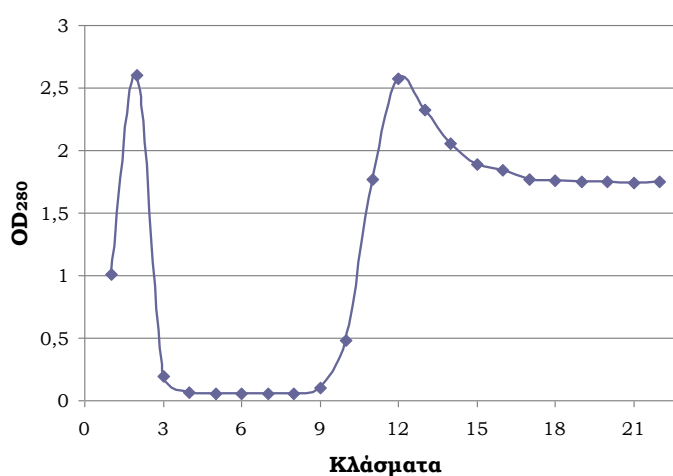
Εικόνα 4.3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: flow through. Διαδρομή 2: wash. Διαδρομή 3: XO. Διαδρομές 4- 10: elution

Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Με την ηλεκτροφόρηση και την παρατήρηση των απορροφήσεων στα 280nm διαπιστώθηκε ότι στα κλάσματα πλύσεως υπάρχει υψηλό πρωτεϊνικό φορτίο, το οποίο φυσικά θέλαμε να αφαιρέσουμε. Στα κλάσματα έκλυσης με χρήση υποξανθίνης απομακρύνθηκε μεγάλο ποσοστό XO. Στο κλάσμα έκλυσης No18 υπάρχει μεγάλη απορρόφηση στα 280nm, αλλά το πήκτωμα δείχνει πρωτεϊνικό φορτίο εκτός της XO για λόγους, που δε γνωρίζουμε. Τα κλάσματα έκλυσης, που ενώθηκαν ήταν τα No7- 13 και συμπυκνώθηκαν με χρήση φίλτρου όγκου 4ml, μη περατού από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10kDa. Η ποσότητα της XO, που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε $\approx 10\text{mg}$.

4.3 Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση αλλοπουρινόλης ως εκλουστικό μέσο

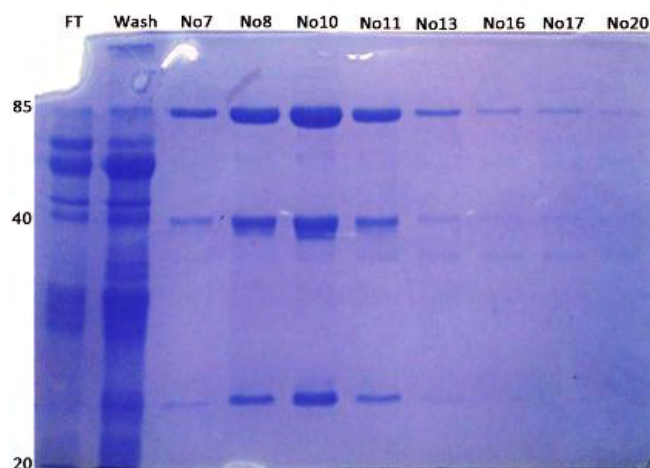
Η διαδικασία καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη συγγένειας πραγματοποιήθηκε στους 4°C , ενώ διακρίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε διαβιβάστηκε μέσω στήλης φολικού οξέος και απομονώθηκε η οξειδάση της ξανθίνης από τις μη επιθυμητές πρωτεΐνες του δείγματος. Κατά το δεύτερο στάδιο, η οξειδάση της ξανθίνης, που είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη διαβιβάζεται ξανά από τη στήλη φολικού οξέος. Το πολύ ενεργό ένζυμο διαπερνά τη στήλη, ενώ το χαμηλής ενεργότητας ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη.

Στάδιο 1: Για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από το πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε αρχικώς χρωματογραφία συγγένειας με στήλη EAH Sepharose 4B/folic Acid. Το πρωτεϊνικό δείγμα, που απομονώθηκε από το γάλα διαβιβάστηκε σε στήλη φολικού οξέος και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της οξειδάσης της ξανθίνης σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.3 (στάδιο 1). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 1ml/min και τα κλάσματα, που συλλέχτηκαν ήταν όγκου 2ml. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολούθηθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (Διάγραμμα 4.4).



Διάγραμμα 4.4: Χρωματογράφημα στήλης για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης με χρήση 2.5mM αλλοπουρινόλη. Κλάσμα No1: flow through, κλάσματα No2- 6: wash, κλάσματα No7- 22: elution.

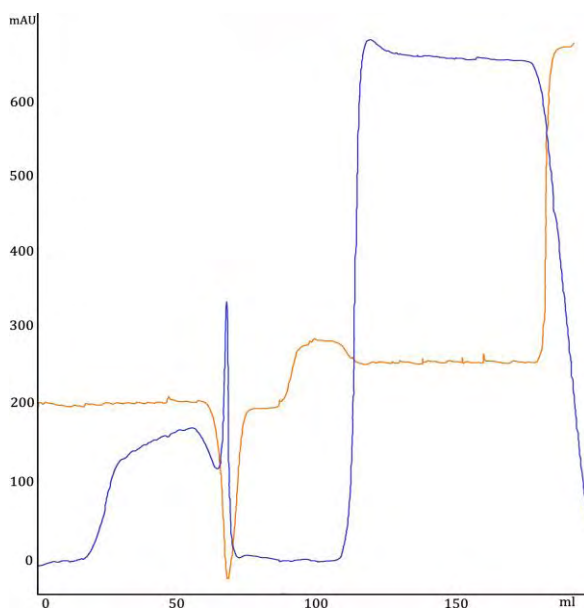
Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητας της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12% και χρώση με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: flow through. Διαδρομή 2: wash. Διαδρομές 3-10: elution.

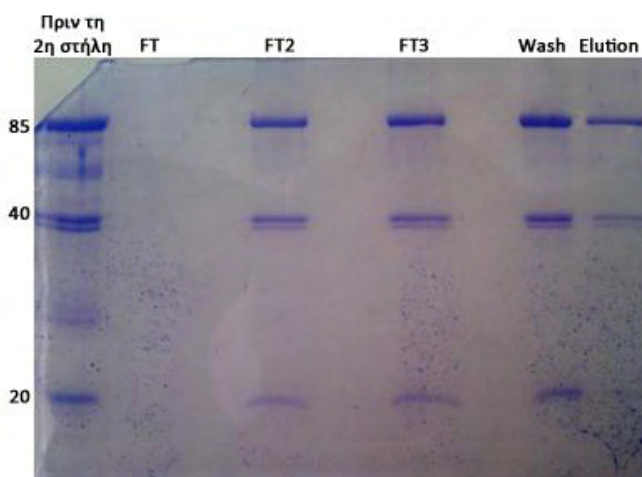
Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας σε μοριακό βάρος 85kDa, 40kDa και 20kDa ζώνες, που αντιστοιχούν στις τρεις υπομονάδες της. Η έκλουση του ενζύμου από τη στήλη πραγματοποιήθηκε με 2.5mM αλλοπουρινόλη και τα κλάσματα, που την περιείχαν ήταν τα κλάσματα No7- 13. Στη συνέχεια, τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε O/N διαπίδυση στους 4°C σε ρυθμιστικό Διάλυμα Α. Η ποσότητα της XO, που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε $\approx 13\text{mg}$. Τέλος, η οξειδάση της ξανθίνης συμπυκνώθηκε με PEG40000 σε όγκο, που αντιστοιχεί στο 20% του όγκου στήλης φολικού οξέος, δηλαδή στα 6ml, πριν υποβληθεί σε καθαρισμό με δεύτερη χρωματογραφία συγγένειας φολικού οξέος.

Στάδιο 2: Το δείγμα οξειδάσης της ξανθίνης, που απομονώθηκε κατά την πρώτη χρωματογραφία συγγένειας διαβιβάστηκε σε δεύτερη στήλη φολικού οξέος και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.3 (στάδιο 2). Με τη δεύτερη χρωματογραφία συγγένειας επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της πολύ ενεργής οξειδάσης της ξανθίνης από τη λιγότερο ενεργή. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 1ml/min και τα κλάσματα, που συλλέχτηκαν ήταν όγκου 2ml. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολούθηθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (Διάγραμμα 4.5).



Διάγραμμα 4.5: Συνολικό χρωματογράφημα στήλης για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης με χρήση 2.5mM αλλοπουρινόλη.

Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12%. Η ύπαρξη πρωτεΐνης επιβεβαιώνεται μετά από χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 4.5).



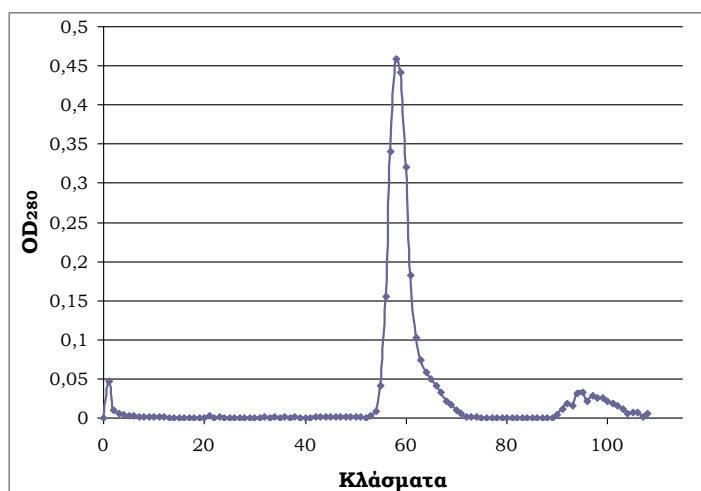
Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: XO μετά από 1^η στήλη (μετά από διαπίδυση). Διαδρομή 2: flow through. Διαδρομή 4: flow through 2. Διαδρομή 6: flow through 3. Διαδρομή 8: wash. Διαδρομή 9: elution.

Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Με την ηλεκτροφόρηση και την παρατήρηση των απορροφήσεων στα 280nm διαπιστώθηκε ότι στα κλάσματα πλύσεως, και όχι στα εκλούσεως, συλλέχθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης, που αντιστοιχεί στην υψηλής

δραστικότητας ΧΟ. Στα κλάσματα έκλουσης με χρήση αλλοπουρινόλης απομακρύνθηκε μικρότερο ποσοστό ΧΟ. Τα κλάσματα έκλουσης, που ενώθηκαν ήταν τα 7- 13 (όπως και στο στάδιο 1) και συμπυκνώθηκαν με χρήση φίλτρου όγκου 4ml, μη περατού από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10kDa. Η ποσότητα της ΧΟ, που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε $\approx 7\text{mg}$.

4.4 Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

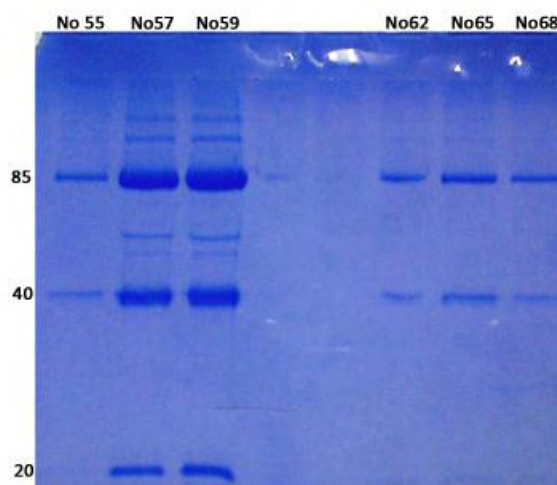
Έπειτα από επεξεργασία της οξειδάσης της ξανθίνης με $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.3 πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης για να απομακρυνθεί η αλλοπουρινόλη και το $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ από το δείγμα ΧΟ. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης πραγματοποιήθηκε με στήλη Sephadex G-25 σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.4.2. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή $0,7\text{ml}/\text{min}$ και τα κλάσματα, που συλλέχτηκαν ήταν όγκου $1,4\text{ml}$. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολουθήθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (Διάγραμμα 4.6).



Διάγραμμα 4.6: Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης G-25 για την απομάκρυνση του σιδήρου από την οξειδάση της ξανθίνης και παραλαβή αυτής ως αμιγή.

Για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου,

SDS-PAGE 12% και χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue G-250 (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Κλάσματα από χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομές 1-3: κλάσματα No55, 57, 59. Διαδρομές 6-8: κλάσματα 62, 65, 68.

Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε η ύπαρξη οξειδάσης της ξανθίνης στα κλάσματα 55-68. Τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με χρήση φίλτρου όγκου 4ml, μη περατό από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10kDa.

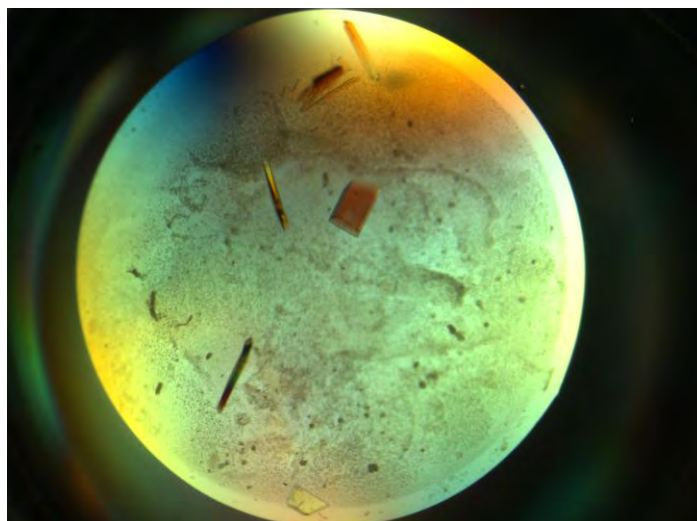
4.5 Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης

Για την κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης με ή χωρίς αλλοπουρινόλη, καθώς και με ή χωρίς υποξανθίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενπυρήνωσης και της επικαθήμενης σταγόνας (ενότητα 3.2.8).

4.5.1 Μέθοδος της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)

Με τη μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας έγιναν προσπάθειες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα (με προπαρασκευασμένα εμπορικά kit), καθώς και σε ποικίλες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (5mg/ml έως 21mg/ml). Πριν από την κρυστάλλωση (≈ 1 ώρα) προστέθηκε στο δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης 5mM έως 10mM DTT. Στη συνέχεια, για κάθε δοκιμή τοποθετήθηκαν 2μl XO και ίσος όγκος κατακρημνιστικού παράγοντα από τη δεξαμενή, χειροκίνητα. Η τελική συγκέντρωση της XO στη σταγόνα ήταν 14mg/ml και η κρυστάλλωση

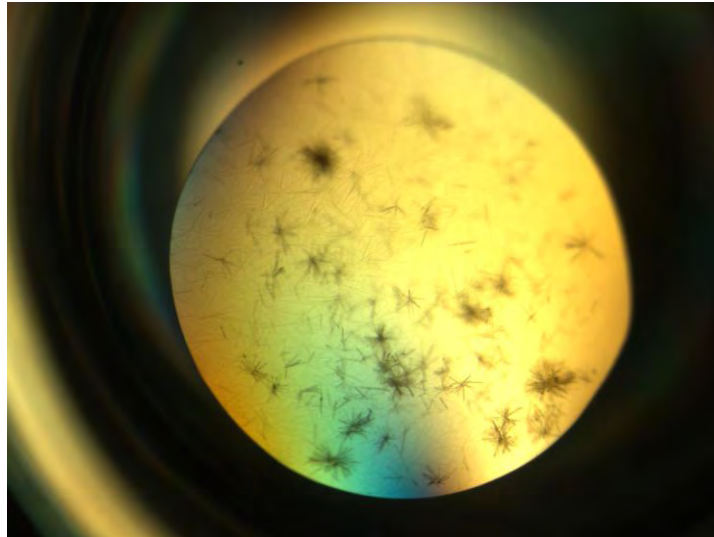
πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°C και 25°C). Η συνθήκη, που παρήγαγε κρυστάλλους (Εικόνα 4.7) ήταν: XO 14 mg/ml, 50mM Potassium Phosphate pH=6.5, 7.5% (w/v) PEG 4000, 20% glycerol, 0.2mM EDTA και 5mM DTT στους 25°C. Παρόλα αυτά, οι κρύσταλλοι δεν ήταν ικανοί να περιθλούν τις ακτίνες, για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την τεχνική της ενπυρήνωσης.



Εικόνα 4.7: Παρακολούθηση κρυστάλλων με στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, εφοδιασμένο με σύστημα πολωμένου φωτός και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα. Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη σε συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα: 7.5% (w/v) PEG 4000, 0.2mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6.5, 20% glycerol.

4.5.2 Μέθοδος «ενπυρήνωσης» (seeding drop)

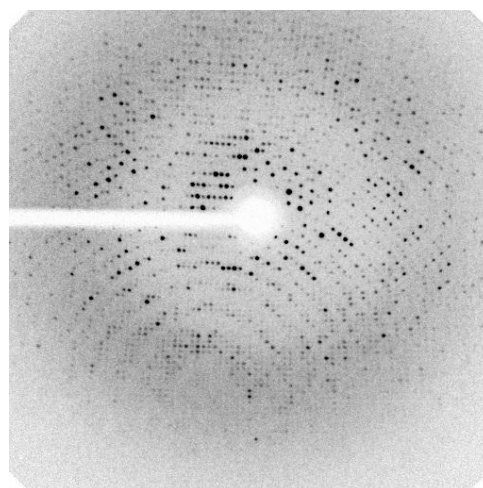
Η συνθήκη, που έδωσε κρυστάλλους οξειδάσης της ξανθίνης, ήταν η ίδια με αυτή της μεθόδου της «επικαθήμενης» σταγόνας (XO 14 mg/ml, 50mM Potassium Phosphate pH=6.5, 7.5% (w/v) PEG 4000, 20% glycerol, 0.2mM EDTA και 5mM DTT στους 25°C). Κρύσταλλοι, που προέκυψαν από αυτή τη συνθήκη ήταν ικανοί να περιθλούν τις ακτίνες X και να δημιουργούν περιθλασίγραμμα (Εικόνα 4.8). Παρόλα αυτά, η επανάληψη του πειράματος στις ίδιες συνθήκες δεν επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα.



Εικόνα 4.8: Παρακολούθηση κρυστάλλων με στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, εφοδιασμένο με σύστημα πολωμένου φωτός και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα. Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη σε συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα: 7.5% (w/v) PEG 4000, 0.2mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6.5, 20% glycerol.

4.6 Περίθλαση ακτίνων X- Κρυσταλλογραφική μελέτη

Οι κρύσταλλοι, που παρήχθησαν από τη μέθοδο της «επικαθήμενης» σταγόνας, όπως ήδη διατυπώθηκε, δεν ήταν ικανοί να περιθλούν τις συμβατικές ακτίνες X, αλλά ούτε και τις συγχροτρονικές. Με τη μέθοδο ενπυρήνωσης σχηματίστηκαν κρύσταλλοι, οι οποίοι στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στην περίθλαση συμβατών ακτίνων X και η προσπάθεια ευοδώθηκε (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9: Περιθλασίγραμμα ακτίνων X από κρυστάλλους οξειδάσης της ξανθίνης.

Παρόλα αυτά τα επόμενα στάδια έρευνας της παρούσας προπτυχιακής διατριβής, δηλαδή η λύση της κρυσταλλικής δομής και κρυσταλλογραφική μελέτη είναι σε εξέλιξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα μολυβδο-φλαβινοένζυμο με μοριακό βάρος 300kDa, το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 150kDa. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια N-τελική περιοχή 20kDa, που περιέχει 2 σιδηροθειούχα κέντρα (Fe-SI και Fe-SII), μια κεντρική περιοχή FAD 40kDa και μια C-τελική περιοχή 85kDa, που περιέχει το μολυβδαινικό συμπράγοντα (Mo-pt) και τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Συμμετέχει σε πολλά βιοχημικά μονοπάτια, όπως στην υδροξυλίωση πουρινών, πτερινών, πυριμιδινών, αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών, συμβάλλοντας έτσι στην αποτοξίνωση ή την ενεργοποίηση ενδογενών ενώσεων και ξενοβιοτικών ουσιών. Ο πρωταρχικός ρόλος του ενζύμου είναι η κατάλυση της μετατροπής της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, δηλαδή τα δύο τελευταία βήματα στο μονοπάτι καταβολισμού των πουρινών. Γι' αυτό, σε κληρονομικές παθήσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έλλειψη ενζύμου, τα άτομα υποφέρουν από ξανθινουρία και δυσλειτουργία πολλών οργάνων από την υπερβολική συσσώρευση ξανθίνης σε αυτά.

Επιπλέον, η XO αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Πιο αναλυτικά, η δραστηριότητά της σχετίζεται με ισχαιμία (καρδιάς, εγκεφάλου, νεφρών, εντέρου, ήπατος και πολλών άλλων ιστών), υποξία, υπέρταση, αιμορραγικό σοκ, βλάβη σε ήπαρ και πάγκρεας, υπερχοληστερολαιμία, φλεγμονώδη νόσο εντέρου και άλλες φλεγμονώδεις νόσους, εγκεφαλικό, έμφραγμα του μυοκαρδίου, χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, αθηροσκλήρωση, διαβήτη καθώς και με διάφορες μορφές καρκίνου. Ωστόσο, η δράση της σχετίζεται και με παθολογικές καταστάσεις εξαιτίας της συμμετοχής της στην παραγωγή του ουρικού οξέος, όπως υπερουρική αιμία (ουρική αρθρίτιδα). Υπέρμετρη παραγωγή ουρικού οξέος οδηγεί στη δημιουργία κρυστάλλων μονοναντρίου και στην εναπόθεσή του στις αρθρώσεις, τους συνδετικούς ιστούς και τους νεφρούς.

Συνεπώς, η αναστολή δραστηριότητας της XO δεν έχει ενδιαφέρον μόνο ως προς την παρεμπόδιση της παραγωγής ελευθέρων ριζών, αλλά και ως προς την παραγωγή ουρικού οξέος, διότι και τα δύο συμβάλλουν στην παθογένεση. Οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης έχουν θεραπευτική χρήση, ενώ προς το παρόν ο ευρέως χρησιμοποιούμενος κλινικά αναστολέας είναι η αλλοπουρινόλη.

Ένα φάρμακο με ιδιαίτερες παρενέργειες στους ασθενείς και γενικότερη δυσανεξία, για αυτό το λόγο κρίνεται επιτακτική ανάγκη η ανεύρεση νέων, πιο δυνατών και αποτελεσματικών αναστολέων με βελτιωμένο φαρμακοδυναμικό προφίλ. Στο σχεδιασμό νέων αναστολέων απαιτείται η εξαιρετική γνώση της μοριακής δομής της ΧΟ, ώστε να παρέχονται οι κατάλληλες πληροφορίες για την κατάλυση και πρόσδεση των υποστρωμάτων της.

Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης, έγιναν προσπάθειες εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης, ώστε να δημιουργηθούν κρύσταλλοι ικανοί να περιθλούν τις ακτίνες Χ. Πρωταρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας ΕΑΗ Sepharose 4B/folic Acid σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η οξειδάση της ξανθίνης απομονώνεται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του γάλακτος με στήλη φολικού οξέος καθηλωμένου σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη). Το ένζυμο εκλούεται από τη στήλη με χρήση αλλοπουρινόλης με πολύ υψηλό βαθμό καθαρότητας. Για το διαχωρισμό του πολύ ενεργού ενζύμου από το λιγότερο ενεργό, πραγματοποιείται ένας δεύτερος καθαρισμός της οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας φολικού οξέος. Κατά το στάδιο αυτό το σύμπλοκο οξειδάσης της ξανθίνης/ αλλοπουρινόλη δε δεσμεύεται στη στήλη και διαχωρίζεται με αυτό τον τρόπο το πολύ ενεργό ένζυμο από το λιγότερο ενεργό.

Στη συνέχεια, για να απομακρυνθεί από το ένζυμο, η αλλοπουρινόλη πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του ενζύμου με $K_3Fe(CN)_6$ και καθαρισμός με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (G25). Για την ανίχνευση της παρουσίας και δραστηριότητας του ενζύμου με βεβαιότητα, χρησιμοποιήθηκε μία μόνο συγκέντρωση ξανθίνης (ενδεικτικά), του υποστρώματος, και παρατηρήθηκαν οι διαφορές απορρόφησης στα 295nm.

Τελικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν οι προσπάθειες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης μαζί και χωρίς τον αναστολέα της, αλλοπουρινόλη. Οι δοκιμές κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα με τη μέθοδο της ενπυρήνωσης και της επικαθήμενης σταγόνας. Με τη μέθοδο της ενπυρήνωσης παρατηρήθηκε η ανάπτυξη κρυστάλλων ικανοποιητικού μεγέθους, ικανών να περιθλούν τις ακτίνες Χ και έδωσαν περιθλασίγραμμα, όμως η κρυσταλλική δομή δε λύθηκε.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος μιας συνολικότερης έρευνας, που ως απώτερο στόχο έχει τη διερεύνηση της δομής της οξειδάσης της ξανθίνης καθώς και τη μελέτη σύνδεσης αναστολέων σε αυτήν, με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Η διευκρίνιση του τρόπου σύνδεσης των αναστολέων στην οξειδάση της ξανθίνης θα συνέβαλε στο κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων (structure-based drug design), καθώς το ένζυμο φαίνεται να εμπλέκεται σε μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. Αλληλουχία της XDH

10	20	30	40	50	60
MTADKLVFFV	NGRKVVEKNA	DPETLLLAYL	RRKLGLSGTK	LGCGEggCGA	CTVMLSKYDR
70	80	90	100	110	120
LQNKIVHfSA	NACLAPICSL	HHVAVTTVEG	IGSTKTRLHP	VQERIAKSHG	SQCGFCTPGI
130	140	150	160	170	180
VMSMYTLLRN	QPEPTMEEIE	NAFQGNLCRC	TGYRPILQGF	RTFARDGGCC	GGDGNPNCC
190	200	210	220	230	240
MNQKKDHSVS	LSPSLFKPEE	FTPLDPTQEP	IFPPELLRLK	DTPRKQLRFE	GERVTWIQAS
250	260	270	280	290	300
TLKELLDLKA	QHPDAKLvVG	NTEIGIEMKF	KNMLFPMIVC	PAWIPELNSV	EHGPDGISFG
310	320	330	340	350	360
AACPLSIVEK	TLVDAVAKLP	AQKTEVFRGV	LEQLRWFAGK	QVKSVASVGG	NIITASPID
370	380	390	400	410	420
LNPVFMASGA	KLTLVSRGTR	RTVQMDHTFF	PGYRKTLSP	EEILLSIEIP	YSREGEYFSA
430	440	450	460	470	480
EKQASREDD	IAKVTSGMRV	LFKPGTTEVQ	ELALCYGGMA	NRTISALKTT	QRQLSKLWKE
490	500	510	520	530	540
ELLQDVCAGL	AEELHLPPDA	PGGMVDFRCT	LTLsFFFKFY	LTVLQKLGQE	NLEDKCGKLD
550	560	570	580	590	600
PTFASATLLF	QKDPADVQL	FQEVpKGQSE	EDMVGRPLPH	LAADMQASGE	AVYCDDIPRY
610	620	630	640	650	660
ENELSLRLVT	STRAHAKIKS	IDTSEAKKVP	GFVCFISADD	VPGSNITGIC	NDETVFAKDK
670	680	690	700	710	720
VTCVGHIIIGA	VVADTPEHTQ	RAAQGVKITY	EELPAIITIE	DAIKNNSFYG	PELKIEKGD
730	740	750	760	770	780
KKGfSEADNV	VSGEIIYIGGQ	EHFYLETHCT	IAVPKGEAGE	MELFVSTQNT	MKTQSFVAKM
790	800	810	820	830	840
LGVPANRIVV	RVKRMGGGFG	GKETRSTVVS	TAVALAAYKT	GRPVRCMLDR	DEDMLITGGR
850	860	870	880	890	900
HPFLARYKVG	FMKTGTVVAL	EVDHFSNVGN	TQDLSQSIME	RALFHMDNCY	KIPNIRGTGR
910	920	930	940	950	960
LCKTNLPSNT	AFRGFGGPQG	MLIAECWMSE	VAVTCGMPAE	EVRRNLYKE	GDLTHFNQKL
970	980	990	1000	1010	1020
EGFTLPRCWE	ECLASSQYHA	RKSEVDKFNK	ENCWKKRGLC	IIPTKFGISF	TVPFLNQAGA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
LLHVYTDGSV	LLTHGGTEMG	QGLHTKMVQV	ASRALKIPTS	KIYISETSTN	TVPNTSPTAA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
SVSADLNGQA	VYAACQTILK	RLEPYKKKNP	SGSWEDWVTA	AYMDTVSLSA	TGFYRTPNLG

1150 1160 1170 1180 1190 1200
YSFETNSGNP FHYFSYGVAC SEVEIDCLTG DHKNLRTDIV MDVGSSLNPA IDIGQVEGAF

1210 1220 1230 1240 1250 1260
VQGLGLFTLE ELHYSPEGSL HTRGPSTYKI PAFGSIPIEF RVSLLRDCPN KKAIYASKAV

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GEPPLFLAAS IFFAIKDAIR AARAQHTGNN VKELFRLDSP ATPEKIRNAC VDKFTTLCVT

1330
GVPENCKPWS VRV

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Acharya R, & Rees AR, (1997).** «Encyclopedia of Molecular Biology & Molecular Medicine». Volume 6, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Federal Republic of Germany, 275-282.
- **Ahn SY, Sugi K, Talke P, Theissen JL, Linares HA, Traber LD, Herndon DN, & Traber DL, (1990).** «Effects of allopurinol on smoke inhalation in the ovine model». *J Appl Physiol* 68: 228-234.
- **Aiba M, Yokoyama Y, Snow TR, Novitzky D, & McKeown PP, (1992).** «Effects of allopurinol pretreatment with pulmonary flush on lung preservation». *J Heart Lung Transplant* 11: 1025-1030.
- **Akaike T, & Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, & Maeda H, (1990)** «Dependence on O₂-generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice». *J Clin Investig* 85: 739-745.
- **Akdemir H, Asik Z, Pasaoglu H, Karakucuk I, Oktem IS, & Koc RK, (2001).** «The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits». *Neurosurg Rev* 24: 131-135.
- **Akizuki S, Yoshida S, Chambers DE, Eddy LJ, Parmley LF, Yellon DM, & Downey JM, (1985).** «Infarct size limitation by the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, in closed-chest dogs with small infarcts». *Cardiovasc Res* 19: 686-692.
- **Alderman M, (1999).** «Uric acid in hypertension & cardiovascular disease». *Can J Cardiol* 15(Suppl F): 20-22.
- **Alderman MH, (2002).** «Uric acid & cardiovascular risk». *Curr Opin Pharmacol* 2: 126-130.
- **Alderman M, & Aiyer KJ, (2004).** «Uric acid: role in cardiovascular disease & effects of losartan». *Curr Med Res Opin* 20: 369-379.
- **Alderman MH, Cohen H, Madhavan S, & Kivlighn S, (1999).** «Serum uric acid & cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients». *Hypertension* 34: 144-150.
- **Ali S, Diwakar G, Pawa S, Siddiqui MR, Abdin MZ, Ahmad FJ, & Jain SK, (2001).** «Xanthine oxidase-derived reactive oxygen metabolites contribute to liver necrosis: protection by 4-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine». *Biochim Biophys Acta* 1536: 21-30.
- **Al-Khalidi UA, & Chaglassian TH, (1965).** «The species distribution of xanthine oxidase». *Biochem J.* 97(1): 318-20.
- **Allan G, Cambridge D, Lee-Tsang-Tan L, Van Way CW, & Whiting MV, (1986).** «The protective action of allopurinol in an experimental model of haemorrhagic shock & reperfusion». *Br J Pharmacol* 89: 149-155.
- **Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, & Nishino T, (1990).** «Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase & identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin». *J Biol Chem* 265(24): 14170-14175.
- **Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P, (1981).** «Uric acid provides an antioxidant defense in human against oxidant- & radical-caused aging & cancer: A hypothesis». *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6858-6862.
- **Andrews P, Bray RC, Edwards P, & Shooter KV, (1964).** «The Chemistry of Xanthine Oxidase. 11. Ultracentrifuge and gel-filtration studies on the milk enzyme». *Biochem. J.*, 93, 627.
- **Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, Davos CH, Ciccoira M, Shamim W, Kemp M, et al. (2003).** «Uric acid & survival in chronic heart failure: validation & application in metabolic, functional & hemodynamic staging». *Circulation* 107: 1991-1997.
- **Aoki K, Ohmori M, Takimoto M, Ota H, & Yoshida T, (1997).** «Cocaine-induced liver injury in mice is mediated by nitric oxide & reactive oxygen species». *Eur J Pharmacol* 336: 43-49.
- **Arai T, Mori H, Ishii H, Adachi T, Endo N, Makino K, & Mori K, (1998).** «Oxypurinol, a xanthine oxidase inhibitor & a superoxide scavenger, did not attenuate ischemic neuronal damage in gerbils». *Life Sci* 63: 107-112.
- **Arellano F, & Sacristan JA, (1993).** «Allopurinol hypersensitivity syndrome: a review». *Ann Pharmacother* 27: 337-343.

- **Asai R, Nishino T, Matsumura T, Okamoto K, Igarashi K, Pai EF, & Nishino T (2007).** «Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase». *J Biochem (Tokyo)* 141: 525-534.
- **Augustin AJ, Boker T, Blumenroder SH, Lutz J, & Spitznas M, (1994).** «Free radical scavenging & antioxidant activity of allopurinol & oxypurinol in experimental lens-induced uveitis». *Investig Ophthalmol Vis Sci* 35: 3897-3904.
- **Augustin AJ, Loeffler KU, Sekundo W, Grus FH, & Lutz J, (1999).** «Effects of systemically applied allopurinol & prednisolone on experimental autoimmune uveitis». *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237: 508-512.
- **Avis PG, Bergel F, & Bray RC, (1955).** «Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part I. The preparation of a crystalline xanthine oxidase from cow's milk». *J Chem Soc*, 1100-1105.
- **Ball EG, (1938).** «Xanthine oxidase: Purification & Properties». *Science*, 88, 131.
- **Battelli MG, Abbondanza A, Musiani S, Buonamici L, Strocchi P, Tazzari PL, Gramantieri L, Stirpe F, (1999).** «Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)». *Clin Chim Acta*. 281(1-2):147-158.
- **Battelli MG, Buonamici L, Virgili M, Abbondanza A, Contestabile A, (1998).** «Simulated ischaemia-reperfusion conditions increase xanthine dehydrogenase & oxidase activities in rat brain slices». *Neurochem Int*. 32(1):17-21.
- **Battelli MG, Musiani S, Valgimigli M, Gramantieri L, Tomassoni F, Bolondi L, & Stirpe F, (2001).** «Serum xanthine oxidase in human liver disease». *Am. J. Gastroenterol*. 96: 1194-1199.
- **Becker MA, Kisicki J, Khosravan R, Wu J, Mulford D, Hunt B, MacDonald P, & Joseph-Ridge N, (2004).** «Febuxostat (TMX-67), a novel, non-purine, selective inhibitor of xanthine oxidase, is safe & decreases serum urate in healthy volunteers». *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 8-9: 1111-1116.
- **Beckman JS, Parks DA, Pearson JD, Marshall PA, Freeman BA, (1989).** A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase & oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med*. 6(6): 607-615.
- **Ben J, Lim TM, Phang VP, Chan WK, (2003).** «Cloning & tissue expression of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase & xanthine dehydrogenase from *Poecilia reticulata*». *Mar Biotechnol* 5(6):568-78.
- **Bergsland J, LoBalsamo L, Lajos P, Feldman MJ, & Mookerjee B, (1987).** «Allopurinol in prevention of reperfusion injury of hypoxically stored rat hearts». *J Heart Transplant* 6: 137-140.
- Berks BC, Ferguson SJ, Moir JWB, & Richardson DJ, (1996). «**Enzymes & associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides & oxyanions.** *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1232, 97.
- **Bernard CE, Magid AA, Yen TS, & Hoener BA, (1997).** «Mitigation of nitrofurantoin-induced toxicity in the perfused rat lung». *Hum Exp Toxicol* 16: 727-732.
- **Berry CE, & Hare JM, (2004).** «Xanthine oxidoreductase & cardiovascular disease: molecular mechanisms & pathophysiological implications». *J. Physiol*. 555: 589-606.
- **Booth VH, (1935).** «The identity of xanthine oxidase & the Schardinger enzyme. *Biochem. J.*, 29, 1732.
- **Booth VH, (1938).** «The specificity of xanthine oxidase». *Biochem J.*, 29, 1732 & 32, 494.
- **Borges F, Fernandes E, & Roleira F, (2002).** «Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors». *Curr Med Chem* 9: 195-217.
- **Boros M, Kaszaki J, & Nagy S, (1989).** «Oxygen free radical-induced histamine release during intestinal ischemia & reperfusion». *Eur Surg Res* 21: 297-304.
- **Boros M, Bako L, & Nagy S, (1991).** «Effect of antioxidant therapy on cyclooxygenase-derived eicosanoid release during intestinal ischemia-reperfusion». *Eur Surg Res* 23: 141-150.
- **Boyer TD, Sun N, & Reynolds TB, (1977).** Allopurinol-hypersensitivity vasculitis & liver damage». *West J Med* 126: 143-147.
- **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.

- **Burns CM, Wortmann RL, (2011).** «Gout therapeutics: new drugs for an old disease. *Lancet*». 377(9760): 165-77.
- **Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, & Struthers AD, (2000).** «Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension». *Hypertension* 35: 746-751.
- **Cameron GS, & Pence BC, (1992).** «Effects of multiple applications of tumor promoters & ultraviolet radiation on epidermal proliferation & antioxidant status». *J Invest Dermatol.* 99(2): 189-192.
- **Campbell WH, (1996).** «Nitrate Reductase Biochemistry Comes of Age». *Plant Physiology* 111, 355.
- **Cantoni L, Rizzardini M, Graziani A, Carugo C, Garattini S, (1987).** «Effects of chlorinated organics on intermediates in the heme pathway & on uroporphyrinogen decarboxylase». *Ann N Y Acad Sci.* 514: 128-140.
- **Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, Marban E, & Hare JM, (2001).** «Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy». *Circulation* 104: 2407-11.
- **Carro MD, Falkenstein E, Blemings KP, Klandorf H, (2009).** «Determination of xanthine oxidoreductase activity in broilers: effect of pH & temperature of the assay & distribution in tissues». *Poult Sci.* 88(11): 2406-14.
- **Carpani G, Racchi M, Ghezzi P, Terao M, Garattini E, (1990).** «Purification & characterization of mouse liver xanthine oxidase». *Arch Biochem Biophys.* 279(2): 237-41.
- **Castelli P, Condemi AM, Brambillasca C, Fundaro P, Botta M, Lemma M, Vanelli P, Santoli C, Gatti S, & Riva E, (1995).** «Improvement of cardiac function by allopurinol in patients undergoing cardiac surgery» *J Cardiovasc Pharmacol* 125: 119-125.
- **Castillo M, Toledo-Pereyra LH, Gutierrez R, Prough D, & Shapiro E, (1991).** «Peritonitis after cecal perforation: an experimental model to study the therapeutic role of antibiotics associated with allopurinol & catalase». *Am Surg* 57: 313-316.
- **Cavallari N, Polistena A, & Cavallaro A, (2000).** «Inability of University of Wisconsin solution to reduce postoperative peritoneal adhesions in rats». *Eur J Surg* 166: 650-653.
- **Cazzaniga G, Terao M, Lo Schiavo P, Galbiati F, Segalla F, Seldin MF, Garattini E, (1994).** «Chromosomal mapping, isolation, & characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene». *Genomics* 23(2): 390-402.
- **Choi HK, & Curhan G, (2005).** Gout: epidemiology & lifestyle choices. *Curr Opin Rheumatol* 17: 341-345.
- **Chow CW, Clark MP, Rinaldo JE, Chalkley R, (1994).** «Identification of the rat xanthine dehydrogenase/oxidase promoter». *Nucleic Acids Res* 22(10): 1846-1854.
- **Chow CW, Clark MP, Rinaldo JE, Chalkley R, (1995).** «Multiple initiators & C/EBP binding sites are involved in transcription from the TATA-less rat XDH/XO basal promoter». *Nucleic Acids Res* 23(16): 3132-3140.
- **Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, Golia G, Franceschini L, Brighetti G, Zeni P, & Zardini P (2002).** «Elevated serum uric acid levels are associated with diastolic dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy». *Am Heart J* 143: 1107-1111.
- **Clark MP, Chow CW, Rinaldo JE, Chalkley R, (1998).** «Correct usage of multiple transcription initiation sites & C/EBP-dependent transcription activation of the rat XDH/XO TATA-less promoter requires downstream elements located in the coding region of the gene». *Nucleic Acids Res* 26(7): 1801-1806.
- **Clark MP, Chow CW, Rinaldo JE, Chalkley R, (1998).** «Multiple domains for initiator binding proteins TFII-I & YY-1 are present in the initiator & upstream regions of the rat XDH/XO TATA-less promoter». *Nucleic Acids Res* 26(11): 2813-2820.
- **Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, P&a R, Daly R, Wright G, Ilsley CD, & Slater TF, (1994).** «Allopurinol pretreatment improves postoperative recovery & reduces lipid peroxidation in patients undergoing coronary artery bypass grafting». *J Thorac Cardiovasc Surg* 107: 248-256.
- **Collison D, Garner CD, & Joule JA, (1996).** «The structure & mode of action of the cofactor of the oxomolybdoenzymes». *Chem. Soc. Rev.*, 25, 25.
- **Cote CG, Yu FS, Zulueta JJ, Vosatka RJ, & Hassoun PM, (1996).** «Regulation of intracellular xanthine oxidase by endothelial-derived nitric oxide». *AJP - Lung Physiol* 27(5): 869-874.

- **Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, & Kaley G, (2002).** «Aging-induced phenotypic changes & oxidative stress impair coronary arteriolar function». *Circ Res* 90: 1159-1166.
- **Cutler RG, (1984).** «Urate & ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species». *Archives of Gerontology & Geriatrics* 3: 321-348
- **Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, & Lonovics J, (2000).** «Oxidative stress in distant organs & the effects of allopurinol during experimental acute pancreatitis». *Int J Pancreatol* 27: 209-216.
- **Dedkova EN, Blatter LA, (2002).** «Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry & enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells». *J Physiol* 539: 77-91.
- **Doehner W, & Anker SD, (2005).** «Xanthine oxidase inhibition for chronic heart failure: is allopurinol the next therapeutic advance in heart failure». *Heart* 91: 707-709.
- **Doehner W, & Anker SD, (2005).** «Uric acid in chronic heart failure». *Semin Nephrol* 25: 61-66.
- **de Jong JW, Schoemaker RG, de Jonge R, Bernocchi P, Keijzer E, Harrison R, Sharma HS, & Ceconi C, (2000).** «Enhanced expression & activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart». *J Mol Cell Cardiol* 32: 2083-2089.
- **de Jong JW, van der Meer P, Nieukoop AS, Huizer, T, Stroeve RJ, & Bos E, (1990).** «Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans». *Circ. Res.* 67: 770-773.
- **Deliconstantinos G, Villiotou V, & Stavrides JC, (1996).** «Alterations of nitric oxide synthase & xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation: potential role for peroxynitrite in skin inflammation». *Biochem Pharmacol* 51: 1727-1738.
- **Demontis S, Kurosaki M, Saccone S, Motta S, Garattini E, Terao M (1999).** «The mouse aldehyde oxidase gene: molecular cloning, chromosomal mapping & functional characterization of the 5' flanking region». *BBA-GENE ST* 1489(2-3): 207-222.
- **Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, Sastre J, & Vina J, (2002).** «Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol». *Diabetes* 51: 1118-1124.
- **Desole MS, Esposito G, Fresu L, Migheli R, Sircana S, Delogu R, Miele M, & Miele E, (1996).** «Further investigation of allopurinol effects on MPTP-induced oxidative stress in the striatum & brain stem of the rat». *Pharmacol Biochem Behav* 54: 377-383.
- **Dixon M, & Thurlow S, (1924).** «The Effect of Cyanide on the Schardinger Enzyme». *Biochem. J.*, 18, 976.
- **Doehner W, & Anker SD, (2005).** «Uric acid in chronic heart failure». *Semin Nephrol* 25: 61-66.
- **Doehner W, & Anker SD, (2005).** «Xanthine oxidase inhibition for chronic heart failure: is allopurinol the next therapeutic advance in heart failure». *Heart* 91: 707-709.
- **Doehner W, Schoene N, Rauchhaus M, Leyva-Leon F, Pavitt DV, Reaveley DA, Schuler G, Coats AJ, Anker SD, & Hambrecht R, (2002).** «Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function & peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies». *Circulation* 105: 2619-2624.
- **Duchene DA, Smith CP, & Goldfarb RA, (2000).** «Allopurinol induced meningitis». *J Urol* 164: 2028.
- **Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, & Hoidal JR, (1992).** «Regulation of xanthine dehydrogenase & xanthine oxidase activity & gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells». *J. Clin. Invest.* 89: 197-202.
- **Eger BT, Okamoto K, Enroth C, Sato M, Nishino T, Pai EF, & Nishino T, (2000).** «Purification, crystallization & preliminary X-ray diffraction studies of xanthine dehydrogenase & xanthine oxidase isolated from bovine milk». *Acta Cryst.* D56, 1656-1658.
- **Ekelund UE, Harrison RW, Shokek O, Thakkar RN, Tunin RS, Senzaki H, Kass DA, Marban E, & Hare JM, (1999).** «Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption & increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure». *Circ Res* 85: 437-445.
- **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.

- **Falciani F, Ghezzi P, Terao M, Cazzaniga G, & Garattini E, (1992).** «Interferons induce xanthine dehydrogenase gene expression in L929 cells». *Biochem. J.* 285: 1001-1008.
- **Falciani F, Terao M, Goldwurm S, Ronchi A, Gatti A, Minoia C, Li Calzi M, Salmona M, Cazzaniga G, Garattini E, (1994).** «Molybdenum (VI) salts convert the xanthine oxidoreductase apoprotein into the active enzyme in mouse L929 fibroblastic cells». *Biochem J.* 298(Pt 1): 69-77.
- **Fam AG, (2001).** «Difficult gout & new approaches for control of hyperuricemia in the allopurinol-allergic patient». *Curr Rheumatol Rep* 3: 29-35.
- **Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, & Struthers AD, (2002).** «Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure». *Circulation* 106: 221-226.
- **Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, & Schulz R, (2000).** «Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure». *Circ Res* 87: 241-47.
- **Ferdinandy P, Panas D, & Schulz R, (1999).** «Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts». *Am J Physiol* 276: 1861-1867.
- **Folch E, Gelpi E, Rosello-Catafau J, & Closa D, (2001).** «Free radicals generated by xanthine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure». *Dig Dis Sci* 276: 14359-14365.
- **Freudenberger RS, Schwarz RP Jr, Brown J, Moore A, Mann D, Givertz MM, Colucci WS, & Hare JM, (2004).** «Rationale, design & organisation of an efficacy & safety study of oxypurinol added to standard therapy in patients with NYHA class III-IV congestive heart failure». *Expert Opin Investig Drugs* 13: 1509-1516.
- **Garattini E, Mendel R, Romao MJ, Wright R, & Terao M, (2003).** «Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function & pathophysiology». *Biochem J* 372(Pt 1): 15-32.
- **Garcia Garcia J, Martin Rollan C, Refoyo Enrriquez MA, Holgado Madruga M, Marino, Hernandez E, Macias Nunez JF, Gomez Alonso A, (1990).** «Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine-oxidase inhibition». *J Surg Res* 48: 144-146.
- **Glatigny A & Scazzocchio C, (1995).** «Cloning & Molecular Characterization of hxA, the Gene Coding for the Xanthine Dehydrogenase (Purine Hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*». *J. Biol. Chem.* 270: 3534-3550.
- **Granger DN, McCord JM, Parks DA, & Hollwarth ME, (1986).** «Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine». *Gastroenterology* 90: 80-84.
- **Granger DN, Rutili G, & McCord JM, (1981).** «Superoxide radicals in feline intestinal ischemia». *Gastroenterology* 81: 22-29.
- **Greenberg LE, Nguyen T, & Miller SM, (2001).** «Suspected allopurinol-induced aseptic meningitis». *Pharmacotherapy* 21: 1007-1009.
- **Grisham MB, Hernandez LA, & Granger DN, (1986).** «Xanthine oxidase & neutrophil infiltration in intestinal ischemia». *Am J Physiol* 251: 567-574.
- **Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, & Haynes WG, (2003).** «Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers». *Circulation* 107: 416-421.
- **Gwinner W, Plasger J, Brandes RP, Kubat B, Schulze M, Regele H, Kerjaschki D, Olbricht CJ, & Koch KM, (1999).** «Role of xanthine oxidase in passive Heymann nephritis in rats». *J Am Soc Nephrol* 10: 538-544.
- **Hakguder G, Akgur FM, Ates O, Olguner M, Aktug T, & Ozer E (2002).** «Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition». *Dig Dis Sci* 47: 1279-1283.
- **Harrison R, (2002).** «Structure & function of xanthine oxidoreductase: where are we now». *Free Radical Biol. Med.* 33: 774-797.
- **Harrison R, (2006).** «Milk xanthine oxidase: Properties & physiological roles». *Inter. Dairy J.* 16: 546-554.
- **Harris CM, & Massey V, (1997).** «The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics & measurement of superoxide radical». *J Biol Chem* 272: 8370-8379.
- **Harris CM, & Massey V, (1997).** «The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics & steady-state mechanism». *J Biol Chem* 272: 28335-28341.

- **Harris CM, Sanders SA, & Massey V, (1999).** «Role of the flavin midpoint potential & NAD binding in determining NAD versus oxygen reactivity of xanthine oxidoreductase». *J Biol Chem* 274: 4561-4569.
- **Hartsook EW, Boucher RV, Hershberger TV, (1959).** «The effect of dietary antibiotics upon hepatic & renal xanthine dehydrogenase activity in chicks». *Arch Biochem Biophys.* 82(2): 310-318.
- **Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, Zulueta JJ, Sawhney R, Skinner KA, Skinner HB, Parks DA, Lanzillo JJ, (1998).** «Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, & hypoxia. Role in acute lung injury». *Am J Respir Crit Care Med.* 158(1):299-305.
- **Hassoun PM, Yu FS, Shedd AL, Zulueta JJ, Thannickal VJ, Lanzillo JJ, Fanburg BL, (1994).** «Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension». *Am J Physiol.* 266(2 Pt 1): 163-171.
- **Hellsten-Westing Y, (1993).** «Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac & skeletal muscle». *Histochemistry.* 100(3): 215-222.
- **Hille R, (1996).** «The mononuclear molybdenum enzymes». *Chem. Rev.* 96: 2757-2816.
- **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.
- **Horiuchi H, Ota M, Nishimura S, Kaneko H, Kasahara Y, Ohta T, & Komoriya K, (2000).** «Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice». *Life Sci* 66: 2051-2070.
- **Huber R, Hof P, Duarte R, Moura JJG, Liu MY, Legall J, Hille R, Archer, & Romão MMJ, (1996).** «A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8846-8851.
- **Hunt J, & Massey V, (1992).** Purification & properties of milk xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem* 267, 21479-21485.
- **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.
- **Ichida K, Matsumura T, Sakuma R, Hosoya T, Nishino T, (2001).** «Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II». *Biochem Biophys Res Commun.* 282(5): 1194-200.
- **Ichimori K, Fukahori M, Nakazawa H, Okamoto K, Nishino T, (1999).** «Inhibition of xanthine oxidase & xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form». *J Biol Chem.* 274: 7763-7768.
- **Ikeda T, Shimokata K, Daikoku T, Fukatsu T, Tsutsui Y, & Nishiyama Y, (1992).** «Pathogenesis of cytomegalovirus-associated pneumonitis in ICR mice: possible involvement of superoxide radicals». *Arch Virol* 127: 11-24.
- **Itoh T, Kawakami M, Yamauchi Y, Shimizu S, & Nakamura M, (1986).** «Effect of allopurinol on ischemia & reperfusion-induced cerebral injury in spontaneously hypertensive rats». *Stroke* 17: 1284-1287.
- **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.
- **Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, & Franke WW, (1981).** «Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium & capillary endothelium». *Cell* 25: 67-82.
- **Jarnerot G, Strom M, Danielsson A, Kilander A, Loof L, Hultcrantz R, Lofberg R, Floren C, Nilsson A, & Brostrom O, (2000).** «Allopurinol in addition to 5-aminosalicylic acid based drugs for the maintenance treatment of ulcerative colitis». *Aliment Pharmacol Ther* 14: 1159-1162.
- **Jarzowski J, Ferry J, Wombolt D, Fitch DM, & Egan JD, (1970).** «Vasculitis with allopurinol therapy». *Am Heart J* 79: 116-121.

- **Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB, & Saedi SF, (1991).** «A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery». *Am Heart J* 121: 20-24.
- **Kaliakin IE, & Mit'kin AF, (1993).** «Effects of allopurinol on uric acid metabolism & lipid peroxidation in ischemic heart disease patients with stable angina». *Kardiologiya* 33: 15-17.
- **Karmella L, Apaya & Christine L, Chichioco-Hernandez, (2011).** «Xanthine oxidase inhibition of selected Philippine medical plants». *Journal of Medicinal Plants Research* 5(2): 289-292.
- **Kayyali US, Budhiraja R, Pennella CM, Cooray S, Lanzillo JJ, Chalkley R, & Hassoun PM, (2003).** «Upregulation of xanthine oxidase by tobacco smoke condensate in pulmonary endothelial cells». *Toxicol Appl Pharmacol* 188: 59-68.
- **Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, Scott GS, Hooper DC, (2000).** «The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity». *The Journal of Immunology* 165: 6511-6518.
- **Keith TP, Riley MA, Kreitman M, Lewontin RC, Curtis D, & Chambers G, (1987).** «Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (rosy locus) in *Drosophila melanogaster*». *Genetics* 116(1): 67-73.
- **Kellogg EW, Fridovich I, (1977).** «Liposome oxidation & erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide & hydrogen peroxide». *J. Biol. Chem* 252: 6721-6728.
- **Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, & Doria M, (1990).** «Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis». *Gut* 31: 786-790.
- **Khadour FH, Panas D, Ferdin&y P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, & Schulz R, (2002).** «Enhanced NO & superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats». *Am J Physiol* 283: 108-115.
- **Khoo BP, & Leow YH, (2000).** «A review of inpatients with adverse drug reactions to allopurinol». *Singapore Med J* 41: 156-160.
- **Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, & Johnson RJ, (2005).** «Hyperuricemia-induces endothelial dysfunction». *Kidney Int* 67: 1739-1742.
- **Kim Ha W, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H, (2002).** «Screening of edible Japanese plants for suppressive effects on phorbol ester-induced superoxide generation in differentiated HL-60 cells & AS52 cells». *Cancer Lett.* 176(1): 7-16.
- **Kitazawa Y, Matsubara M, Takeyama N, & Tanaka T, (1991).** «The role of xanthine oxidase in paraquat intoxication». *Arch Biochem Biophys* 288: 220-224.
- **Knight TR, Kurtz A, Bajt ML, Hinson JA, & Jaeschke H, (2001).** «Vascular & hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress». *Toxicol Sci* 62: 212-220.
- **Kögler H, Fraser H, McCune S, Altschuld R, & Marban E, (2003).** «Disproportionate enhancement of myocardial contractility by the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol in failing rat myocardium». *Cardiovasc Res* 59: 582-592.
- **Komai H, Massey V, & Palmer G, (1969).** «The preparation & properties of deflavo xanthine oxidase». *J Biol Chem* 244: 1692-1700.
- **Komaki Y, Sugiura H, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Akita T, Hattori T, & Ichinose M, (2005).** «Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways». *Pulm Pharmacol Ther* 18: 297-302.
- **Komoriya K, Hoshide S, Takeda K, Kobayashi H, Kubo J, Tsuchimoto M, Nakachi T, Yamanaka H, & Kamatani N, (2004).** «Pharmacokinetics & pharmacodynamics of febuxostat (TMX-67), a non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase (NPSIXO) in patients with gout &/or hyperuricemia». *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23: 1119-1122.
- **Kono H, Rusyn I, Bradford BU, Connor HD, Mason RP, & Thurman RG, (2000).** «Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats». *J Pharmacol Exp Ther* 293: 296-303.
- **Kooij, A, (1994).** «A re-evaluation of the tissue distribution & physiology of xanthine oxidoreductase». *Histochem J.* 26(12): 889-915.
- **Kramer HM, & Curhan G, (2002).** «The association between gout & nephrolithiasis: the National Health & Nutrition Examination Survey III, 1988-1994». *Am J Kidney Dis* 40: 37-42.

- **Krenitsky TA, Neil SM, Elion GB, & Hitchings GH, (1972).** «Comparison of the specificities of xanthine oxidase & aldehyde oxidase». *Archs Biochem. Biophys.* 150: 585-599.
- **Krenitsky TA, Tuttle JV, (1978).** «Xanthine oxidase activities: evidence for two catalytically different types». *Arch Biochem Biophys.* 185(2): 370-5.
- **Kulah B, Besler HT, Akdag M, Oruc T, Altinok G, Kulacoglu H, Ozmen MM, & Coskun F, (2004).** «The effects of verapamil vs. allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats: “an experimental study”». *Hepatogastroenterology* 51: 401-407.
- **Kurosaki M, Li Calzi M, Scanziani E, Garattini E, & Terao M, (1995).** «Tissue- & cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide». *Biochem. J.* 306: 225-234.
- **Kurosaki M, Zanotta S, Li Calzi M, Garattini E, & Terao M, (1996).** «Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy & lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids & prolactin». *Biochem. J.* 319: 801-810.
- **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.
- **Leyva F, Anker SD, Godsil IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, Poole-Wilson PA, & Coats AJ, (1998).** «Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation». *Eur Heart J* 19: 1814-1822.
- **Li JM & Shah AM, (2004).** «Endothelial cell superoxide generation: regulation & relevance for cardiovascular pathophysiology». *Am J Physiol* 287: 1014-1030.
- **Lieber CS, (1997).** «Role of oxidative stress & antioxidant therapy in alcoholic & nonalcoholic liver diseases». *Adv Pharmacol* 38: 601-628
- **Lin J, Xu P, LaVallee P, Hoidal JR, (2008).** «Identification of proteins binding to E-Box/ Ku86 sites & function of the tumor suppressor SAFB1 in transcriptional regulation of the human xanthine oxidoreductase gene». *J Biol Chem.* 283(44): 29681-9.
- **Lin JK, Shih CA, (1994).** «Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells». *Carcinogenesis.* 15(8): 1717-1721.
- **Linder N, Rapola J, & Raivio KO, (1999).** «Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues». *Lab. Invest.* 79: 967-974.
- **Lochner F, Sangiah S, Burrows G, Shawley R, McNew R, & Walker J (1989).** «Effects of allopurinol in experimental endotoxin shock in horses». *Res Vet Sci* 47: 178-184.
- **Lynch ED, Gu R, Pierce C, & Kil J, (2005).** «Reduction of acute cisplatin ototoxicity & nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol & ebselen». *Hear Res* 201: 81-89.
- **Mabley JG, Nivorozhkin A, Southan GJ, Szabó C, & Salzman AL (2003).** «Pathogenetic role of xanthine oxidase in a murine model of acute lung injury». *FASEB J* 17: 247.
- **MacGowan SW, Regan MC, Malone C, Sharkey O, Young L, Gorey TF, & Wood AE, (1995).** «Superoxide radical & xanthine oxidoreductase activity in the human heart during cardiac operations». *Ann Thorac Surg* 60: 1289-1293.
- **Mainous MR, Xu D, & Deitch EA, (1993).** «Role of xanthine oxidase & prostaglandins in inflammatory-induced bacterial translocation». *Circ Shock* 40: 99-104.
- **Manning AS, Coltart DJ, & Hearse DJ, (1984).** «Ischemia & reperfusion-induced arrhythmias in the rat: effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol». *Circ Res* 55: 545-548.
- **Martelin E, Lapatto R, & Raivio KO, (2002).** «**Regulation of xanthine oxidoreductase by intracellular iron**». *J Physiol Cell Physiol.* 283(6): 1722-1728.
- **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.
- **Martz D, Rayos G, Schielke GP, & Betz AL, (1989).** «Allopurinol & dimethylthio-urea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats». *Stroke* 20: 488-494.
- **Massey V, & Harris CM, (1997).** «Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans* 25, 750-755.

- **Matsui N, Satsuki I, Morita Y, Inaizumi K, Kasajima K, Kanoh R, Fukuishi N, & Akagi M, (2000).** «Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species activate nuclear factor κ B during hepatic ischemia in rats». *Jpn J Pharmacol* 84: 363-366.
- **Matsumura F, Yamaguchi Y, Goto M, Ichiguchi O, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Liang J, Ohshiro H, Iwamoto T, et al. (1998).** «Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver». *Hepatology* 28: 1578-1587.
- **Maurer HS, Steinherz PG, Gaynon PS, Finklestein JZ, Sather HN, Reaman GH, Bleyer WA, & Hammond GD, (1988).** «The effect of initial management of hyperleukocytosis on early complications & outcome of children with acute lymphoblastic leukemia». *J Clin Oncol* 6: 1425-1432.
- **Mayer MD, Khosravan R, Vernillet L, Wu JT, Joseph-Ridge N, & Mulford DJ, (2005).** «Pharmacokinetics & pharmacodynamics of febuxostat, a new non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase in subjects with renal impairment». *Am J Ther* 12: 22-34.
- **McCord JM, (1985).** «Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury». *N Engl J Med* 312: 159-163.
- **McKechnie K, Furman BL, & Parratt JR, (1986).** «Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic & cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats». *Circ Shock* 19: 429-439.
- **McManaman JL, Hanson L, Neville MC, & Wright RM, (2000).** «Lactogenic hormones regulate xanthine oxidoreductase & beta-casein levels in mammary epithelial cells by distinct mechanisms». *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 318-327.
- **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.
- **McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, & Harrison DG, (2003).** Role of xanthine oxidoreductase & NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol* 285: 2290-2297.
- **McNally JS, Saxena A, Cai H, Dikalov S, Harrison DG, (2005).** «Regulation of Xanthine Oxidoreductase Protein Expression by Hydrogen Peroxide & Calcium». *Arteriosclerosis, Thrombosis, & Vascular Biology.* 25: 1623-1628.
- **Meadows J, Smith RC, (1986).** «Uric acid protection of nucleobases from ozone-induced degradation». *Archives of Biochemistry & Biophysics* 246: 838-845.
- **Megison SM, Horton JW, Chao H, & Walker PB, (1990).** «High dose versus low dose enteral allopurinol for prophylaxis in mesenteric ischemia». *Circ Shock* 30: 323-329.
- **Mendel RR, (2005).** «Molybdenum: biological activity & metabolism». *Dalton Transactions* 3404-3409.
- **Mendel RR, & Bittner F, (2006).** «Cell biology of molybdenum, *Biochimica et Biophysica*» *Acta-Molecular Cell Research* 1763: 621-635.
- **Mercuro G, Vitale C, Cerquetani E, Zoncu S, Deidda M, Fini M, & Rosano GM, (2004).** «Effect of hyperuricemia upon endothelial function in patients at increased cardiovascular risk». *Am J Cardiol* 94: 93293-93295.
- **Miele M, Esposito G, Migheli R, Sircana S, Zangani D, Fresu GL, & Desole MS, (1995).** «Effects of allopurinol on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurochemical changes in the striatum & in the brainstem of the rat». *Neurosci Lett* 3: 155-159.
- **Miesel R, & Zuber M, (1993).** «Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory & autoimmune rheumatic diseases». *Inflammation* 17: 551-561.
- **Miesel R, Zuber M, Sanocka D, Graetz R, & Kroeger H, (1994).** «Effects of allopurinol on in vivo suppression of arthritis in mice & ex vivo modulation of phagocytic production of oxygen radicals in whole human blood». *Inflammation* 18: 597-612.
- **Minoshima S, Wang Y, Ichida K, Nishino T, & Shimizu N, (1995).** «Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase (oxidase) (XDH) to b& p23 of chromosome 2». *Cytogenet Cell Genet* 68(1-2): 52-53.

- **Miyakawa H, Sato K, Shinbori T, Okamoto T, Gushima Y, Fujiki M, & Suga M, (2002).** «Effects of inducible nitric oxide synthase & xanthine oxidase inhibitors on SEB-induced interstitial pneumonia in mice». *Eur Respir J* 19: 447-457.
- **Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, & Maeda H, (1996).** «Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors». *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 366-373.
- **Morgan EJ, Stewart CP, & Hopkins FG, (1922).** «On the anaerobic & aerobic oxidation of xanthine & hypoxanthine by tissues & by milk». *Proc. Roy. Soc. Lond.* 94: 109-31.
- **Moriwaki Y, Yamamoto T, Yamakita J, Takahashi S, & Higashino K, (1998).** «Comparative localization of aldehyde oxidase & xanthine oxidoreductase activity in rat tissues». *Histochem. J.* 30: 69-74.
- **Moumen R, Ait-Oukhtar N, Bureau F, Fleury C, Bougle D, Arhan P, Neuville D, & Viader F, (2001).** «Aluminium increases xanthine oxidase activity & disturbs antioxidant status in the rat». *J Trace Elem Med Biol* 15: 89-93.
- **Mugge A, Brandes RP, Boer RH, Denver A, Bode-Boer S, Koneke S, Frolic JC, & Lighten PR, (1994).** «Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemia rabbits». *J Cardiovasc Pharmacol* 24: 994-998.
- **Muxfeldt M, Schaper W, (1987).** «The activity of xanthine oxidase in heart of pigs, guinea pigs, rabbits, rats, & humans». *Basic Res Cardiol.* 82(5): 486-92.
- **Niagara N, Nishino T, Kennesaw M, Tsushima K, (1987).** «Effect of dietary protein on purine nucleoside phosphorylase & xanthine dehydrogenase activities of liver & kidney in chicken & pigeon». *Comp Biochem Physiol B.* 88(2): 589-93.
- **Nakashima M, Niwa M, Iwai T, & Uematsu T, (1999).** «Involvement of free radicals in cerebral vascular reperfusion injury evaluated in a transient focal cerebral ischemia model of rat». *Free Radic Biol Med* 26: 722-729.
- **Niederer C, Niederer M, Borchard F, Ude K, Luthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, & Grendell JH, (1992).** «Effects of antioxidants & free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis». *Pancreas* 7: 4864-4896.
- **Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger HG, & Lundgren O, (1994).** «Free radicals & pathogenesis during ischemia & reperfusion of the cat small intestine». *Gastroenterology* 106: 629-636.
- **Nishida Y, (1991).** «Inhibition of lipid peroxidation by methylated analogues of uric acid». *J Pharm Pharmacol.*, 43(12): 885-887.
- **Nishino T, (1994).** «The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase & the role of the enzyme in reperfusion injury». *J Biochem (Tokyo)* 116:1-6.
- **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, Eger BT, Pai EF, Nishino T, (2008).** «Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase». *FEBS Journal*, 275(13): 3278-3289.
- **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.
- **Nishino T, & Tsujii A, (2008).** «The mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: effect of guanidine-HCl or urea on the activity». *Nucleoside, Nucleotide Nucleic Acid* (6): 881-7.
- **Novotny MJ, Laughlin MH, & Adams HR, (1988).** «Evidence for lack of importance of oxygen free radicals in Escherichia coli endotoxemia in dogs». *Am J Physiol* 254: 954-962.
- **Obata T, Kubota S, & Yamanaka Y, (2001).** «Allopurinol suppresses para-nonylphenol & 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced hydroxyl radical generation in rat striatum». *Neurosci Lett* 1-2: 9-12.
- **Ohara Y, Peterson TE, & Harrison DG, (1993).** «Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production». *J Clin Investig* 91: 2546-2551.

- **Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, & Nishino T, (2003).** «An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex & mechanism of inhibition». *J. Biol. Chem.* 278: 1848-1855.
- **Olson JS, Ballou DP, Palmer G, & Massey V, (1974).** «The mechanism of action of xanthine oxidase». *J. Biol. Chem.* 249: 4363-4382.
- **Ori N, Eshed Y, Pinto P, Paran I, Zamir D, & Fluhr R, (1997).** «, a Representative of the Molybdenum Cofactor Containing Hydroxylases from Tomato». *J. Biol. Chem.* 272: 1019-1025.
- **Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, & Hebbel RP (2000).** «Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice». *Blood* 96: 314-320.
- **Ostdal H, Andersen HJ, Nielsen JH, (2000).** «Antioxidative activity of urate in bovine milk». *J Agric Food Chem.* 48(11): 5588-92
- **Owens ML, Lazarus HM, Wolcott MW, Maxwell JG, & Taylor JB, (1974).** «Allopurinol & hypoxanthine pretreatment of canine kidney donors». *Transplantation* 17: 424-427.
- **Pacher P, Liaudet L, Mabley J, Komjati K, & Szabó, (2000).** «Pharmacologic inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic heart. *J Am Coll Cardiol* 40: 1006-1016.
- **Pacher P, Mabley JG, Soriano FG, Liaudet L, Komjati K, & Szabó C (2002).** «Endothelial dysfunction in aging animals: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation». *Br J Pharmacol* 135: 1347-1350.
- **Pacher P, Nivorozhkin A, & Szabó C, (2006).** «Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* 58: 87-114.
- **Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, & Szabó C, (2005).** «Role of nitrosative stress & peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications: emerging new therapeutical strategies». *Curr Med Chem* 12: 267-275.
- **Pacher P, Schulz R, Liaudet L, & Szabó, (2005).** «Nitrosative stress & pharmacological modulation of heart failure». *Trends Pharmacol Sci* 26: 302-310.
- **Page S, Powell D, Benboubetra M, Stevens CR, Blake DR, Selase F, Wolstenholme AJ, & Harrison R, (1998).** «Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines». *Biochim. Biophys. Acta* 1381: 191-202.
- **Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, & Heitjan DF, (1993).** «Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats». *Pediatr Res* 33: 405-411.
- **Palmer C, Vannucci RC, & Towfighi J, (1990).** «Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol». *Pediatr Res* 27: 332-336.
- **Parker JC, & Smith EE, (1972).** «Effects of xanthine oxidase inhibition in cardiac arrest». *Surgery* 71: 339-344.
- **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, & McCord JM, (1982)** «Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals». *Gastroenterology* 82: 9-15
- **Parks DA, & Granger DN, (1983).** «Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase & hydroxyl radicals». *Am J Physiol* 245: 285-289.
- **Parks DA, & Granger DN, (1986).** «Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution & physiology». *Acta Physiol. Sc&*. 548: 87-99.
- **Parks DA, Williams TK, & Beckman JS, (1988).** «Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation». *Am J Physiol* 254: 768-774.
- **Parmley LF, Mufti AG, & Downey JM, (1992).** «Allopurinol therapy of ischemic heart disease with infarct extension». *Can J Cardiol* 8: 280-286.
- **Parra E, Gota R, Gamen A, Moros M, & Azuara M, (1995).** «Granulomatous interstitial nephritis secondary to allopurinol treatment». *Clin Nephrol* 43: 350.
- **Patetsios P, Song M, Shutze WP, Pappas C, Rodino W, Ramirez JA, & Panetta TF, (2001).** «Identification of uric acid & xanthine oxidase in atherosclerotic plaque». *Am J Cardiol* 88: 188-191.
- **Peive YV, Ivanova NN, (1973).** «Nitrate reduction by higher plant peroxidase». *FEBS Lett.* 31(2): 229-232.
- **Pence BC, Reiners JJ, (1987).** «Jr Murine epidermal xanthine oxidase activity: correlation with degree of hyperplasia induced by tumor promoters». *Cancer Res.* 47(23): 6388-6392.

- Pfeffer KD, Huecksteadt TP, Hoidal JR, (1994). «**Xanthine dehydrogenase & xanthine oxidase activity & gene expression in renal epithelial cells. Cytokine & steroid regulation**». *J Immunol.* **153(4): 1789-1797.**
- Phillis JW, Perkins LM, Smith-Barbour M, & O'Regan MH, (1995). «Oxypurinol-enhanced postischemic recovery of the rat brain involves preservation of adenine nucleotides». *J Neurochem* **64: 2177-2184.**
- Pitt RM, McKelvey TG, Saenger JS, Shah AK, Jones HP, Mancini EA, & Powell RW, (1991). «A tungsten-supplemented diet delivered by transplacental & breast-feeding routes lowers intestinal xanthine oxidase activity & affords cytoprotection in ischemia-reperfusion injury to the small intestine». *J Pediatr Surg* **26: 930-935.**
- Poss WB, Huecksteadt TP, Panus PC, Freeman BA, Hoidal JR, (1996). «Regulation of xanthine dehydrogenase & xanthine oxidase activity by hypoxia». *Am J Physiol.* **270(6 Pt 1): 941-946.**
- Pritsos CA, (2000). «Cellular distribution, metabolism & regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system». *Chem Biol Interact.* **129(1-2):195-208**
- Proctor P, (1970). «Similar functions of uric acid & ascorbate in man». *Nature* **228: 868-869.**
- Rashid MA & William-Olsson G, (1991). «Influence of allopurinol on cardiac complications in open heart operations». *Ann Thorac Surg* **52: 127-130.**
- Rasmussen JT, Rasmussen MS, & Petersen TE, (2000). «Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase & oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase». *J. Dairy Sci.* **83: 499-506.**
- Rebelo J, Macieira S, Dias JM, Huber R, Ascenso CS, Rusnak F, Moura JJ, Moura I, Romão MJ, (2000). «Gene sequence & crystal structure of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774». *J. Mol. Biol.* **297: 135-146.**
- Reiners JJ, Jr, Pence BC, Barcus MC, Cantu AR, (1987). «12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent induction of xanthine dehydrogenase & conversion to xanthine oxidase in murine epidermis». *Cancer Res.* **47(7): 1775-1779.**
- Reiners JJ, Jr, Rupp T, (1989). «Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase occurs during keratinocyte differentiation: modulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate». *J Invest Dermatol.* **93(1): 132-135.**
- Reiners JJ, Jr, Thai G, Rupp T, Cantu AR, (1991). «Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate & throughout the ontogeny of skin cancer. Part I: Quantitation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase & xanthine oxidase». *Carcinogenesis.* **12(12): 2337-2343.**
- Remy C, Westerfeld WW, (1951). «The effect of diet on xanthine dehydrogenase in chicken tissues». *J Biol Chem.* **193(2): 659-67.**
- Reynolds MD, (1983). «Gout & hyperuricemia associated with sickle-cell anemia». *Semin Arthritis Rheum* **12: 404-413.**
- Riaz AA, Schramm R, Sato T, Menger MD, Jeppsson B, & Thorlacius H, (2003). «Oxygen radical-dependent expression of CXC chemokines regulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the mouse colon». *Free Radic Biol Med* **35: 782-789.**
- Riaz AA, Wan MX, Schafer T, Dawson P, Menger MD, Jeppsson B, & Thorlacius H, (2002). «Allopurinol & superoxide dismutase protect against leukocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion». *Br J Surg* **89: 1572-1580.**
- Rijhwani A, Sen S, Gunasekaran S, Ponnaiya J, Balasubramanian KA, & Mammen KE, (1995). «Allopurinol reduces the severity of peritoneal adhesions in mice». *J Pediatr Surg* **30: 533-537.**
- Roberts JA, Kaack MB, & Baskin G, (1990). «Treatment of experimental pyelonephritis in the monkey». *J Urol* **143: 150-154.**
- Rytönen EMK, Halila R, Laan M, Saksela M, Kallioniemi OP, Palotie A & Raivio KO, (1995). «The human gene for xanthine dehydrogenase (XDH) is localized on chromosome b& 2q22». *Cytogenet Cell Genet* **68(1-2): 61-63.**
- Saez JC, Ward PH, Gunther B, & Vivaldi E (1984) Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock. *Circ Shock* **12: 229-239**
- Saito T, (1987). «The properties of sulfhydryl groups involved in the interconversion between the NAD⁺-dependent & O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase». *Yokohama Med Bull* **38, 151-168.**

- **Saito T, & Nishino T, (1989).** «Differences in redox & kinetic properties between NAD-dependent & O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase». *J. Biol. Chem.* 264, 10015-10022.
- **Saksela M, Lapatto R, Raivio KO, (1998).** «Xanthine oxidoreductase gene expression & enzyme activity in developing human tissues». *Biol Neonate.* 74(4): 274-280.
- **Saksela M, & Raivio KO, (1996).** «Cloning & expression in vitro of human xanthine dehydrogenase/oxidase». *Biochem J* 315(Pt 1): 235-239.
- **Salim AS, (1992).** «Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach». *J Lab Clin Med* 119: 710-717.
- **Sarnesto A, Linder N, Raivio KO, (1996).** «Organ distribution & molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein». *Lab Invest* 74: 48-56.
- **Schardinger FZ, (1902).** «Untersuch. Nahrungs- u. Gennussmittel, 5: 1113.
- **Schrader J, (1985).** «Mechanisms of ischemic injury in the heart». *Basic Res Cardiol.* 80(2): 135-139.
- **Schwarz G, & Mendel RR, (2006).** «Molybdenum cofactor biosynthesis & molybdenum enzymes». *Annual Review of Plant Biology* 57: 623-647.
- **Sedghi S, Fields JZ, Klamut M, Urban G, Durkin M, Winship D, Fretland D, Olyae M, & Keshavarzian A, (1993).** «Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis». *Gut* 34: 1191-1197.
- **Sekimoto H, Seo M, Dohmae N, Takio K, Kamiya Y, & Koshiha T, (1997).** «Cloning & Molecular Characterization of Plant Aldehyde Oxidase». *J. Biol. Chem.* 1997 272: 15280-15285.
- **Shadid M, Moison R, Steendijk P, Hiltermann L, Berger HM, & van Bel F, (1998).** «The effect of antioxidative combination therapy on post hypoxic-ischemic perfusion, metabolism & electrical activity of the newborn brain». *Pediatr Res* 44: 119-124.
- **Shatney CH, Toledo-Pereyra LH, & Lillehei RC, (1980).** «Experiences with allopurinol in canine endotoxin shock». *Adv Shock Res* 4: 119-137.
- **Simmonds A, Reiter S, & Nishino T, (1995).** «The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease» eds. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (McGraw-Hill, New York), 7th Ed., Vol. II, pp. 1781-1798.
- **Smalley RV, Guaspari A, Haase-Statz S, Anderson SA, Cederberg D, & Hohneker JA, (2000).** «Allopurinol: intravenous use for prevention & treatment of hyperuricemia». *J Clin Oncol* 18: 1758-1763.
- **Smith JK, Carden DL, Korthuis RJ, (1991).** «Activated neutrophils increase microvascular permeability in skeletal muscle: role of xanthine oxidase». *J Appl Physiol.* 70(5): 2003-2009.
- **Smith RC, Lawing L, (1983).** «Antioxidant activity of uric acid & 3-N-ribosyluric acid with unsaturated fatty acids & erythrocyte membranes». *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 223(1): 166-172
- **Smith RC, Nunn V, (1984).** «Prevention by 3-N-ribosyluric acid of the oxidation of bovine hemoglobin by sodium nitrite». *Arch Biochem Biophys.* 232(1): 348-353.
- **Smith RC, Nunn V, (1986).** «Prevention by antioxidants of the hemolysis of erythrocytes of cattle, pigs & humans treated with t-butyl hydroperoxide». *Comp Biochem Physiol C.* 84(1): 79-82.
- **Solaroglu I, Okutan O, Kaptanoglu E, Beskonakli E, & Kilinc K, (2005).** «Increased xanthine oxidase activity after traumatic brain injury in rats». *J Clin Neurosci* 12: 273-275.
- **Sorescu D, & Griendling KK, (2002).** «Reactive oxygen species, mitochondria & NAD(P)H oxidases in the development & progression of heart failure». *Congest Heart Fail* 8: 132-140.
- **Spitzer W, (1899).** «Die Ueberführung von Nucleinbasen in Harnsäure durch die sauerstoffübertragende Wirkung von Gewebsauszügen». *Arch. ges. Physiol.*, 78, 192.
- **Srivastava M, Chandra D, & Kale RK, (2002).** «Modulation of radiation-induced changes in the xanthine oxidoreductase system in the livers of mice by its inhibitors». *Radiat Res* 157: 290-297.
- **Srivastava M, & Kale RK, (1999).** «Effect of radiation on the xanthine oxidoreductase system in the liver of mice». *Radiat Res* 152: 257-264.
- **Sticht H, Rösch P, (1998).** «The structure of iron-sulfur proteins». *Prog Biophys Mol Biol.*;70(2): 95-136.

- **Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, (2001).** «Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin». *Biochem Biophys Res Commun.* 281(5): 1093-1099.
- **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.
- **Takeyama N, Shoji Y, Ohashi K, & Tanaka T, (1996).** «Role of reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-mediated hepatic injury in the rat». *J Surg Res* 60: 258-262.
- **Telfer JF, Thomson AJ, Cameron IT, Greer IA, Norman JE, (1997).** «Expression of superoxide dismutase & xanthine oxidase in myometrium, fetal membranes & placenta during normal human pregnancy & parturition». *Hum Reprod.* 12(10): 2306-12.
- **Terao M, Cazzaniga G, Ghezzi P, Bianchi M, Falciani F, Perani P, & Garattini E, (1992).** «Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. Regulation of its transcript by interferons in vivo». *Biochem. J.* 283: 863-870.
- **Terao M, Kurosaki M, Demontis S, Zanotta S, & Garattini E, (1998).** «Isolation & characterization of the human aldehyde oxidase gene: conservation of intron/exon boundaries with the xanthine oxidoreductase gene indicates a common origin». *Biochem J* 332(Pt 2): 383-393.
- **Terao M, Kurosaki M, Saltini G, Demontis S, Marini M, Salmona M, & Garattini E, (2000).** «Cloning of the cDNAs Coding for Two Novel Molybdo-flavoproteins Showing High Similarity with Aldehyde Oxidase & Xanthine Oxidoreductase». *J. Biol. Chem.* 275: 30690-30700.
- **Terkeltaub R, Bushinsky DA, Becker MA, (2006).** «Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia & the development of novel antihyperuricemic therapeutics». *8 Suppl 1: S4.*
- **Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Olson LC, & Najarian JS, (1977).** «Clinical effect of allopurinol on preserved kidneys: a randomized double-blind study». *Ann Surg* 185: 128-131.
- **Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, Van De Bor M, & Berger HM, (1998).** «Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics & electrical brain activity». *Pediatrics* 101: 185-193.
- **Van Der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, et al. (2000).** «Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging». *J Exp Med* 192: 1731-1744.
- **Van Steveninck J, Koster JF, & Dubbelman TM, (1989).** «Xanthine oxidase-catalysed oxidation of paracetamol». *Biochem J* 259: 633-637.
- **Vatistas NJ, Snyder JR, Nieto J, Hildebrand SV, Woliner MJ, Harmon FA, Barry SJ, & Drake C, (1998).** «Morphologic changes & xanthine oxidase activity in the equine jejunum during low flow ischemia & reperfusion». *Am J Vet Res* 59: 772-776.
- **Vinten-Johansen J, Chiantella V, Faust KB, Johnston WE, McCain BL, Hartman M, Mills SA, Hester TO, & Cordell AR, (1988).** «Myocardial protection with blood cardioplegia in ischemically injured hearts: reduction of reoxygenation injury with allopurinol». *Ann Thorac Surg* 45: 319-326.
- **Wajner M, & Harkness RA, (1989).** «Distribution of xanthine dehydrogenase & oxidase activities in human & rabbit tissues». *Biochim. Biophys. Acta* 991: 79-84.
- **Ward PH, Maldonado M, & Vivaldi E, (1992).** «Oxygen-derived free radicals mediate liver damage in rats subjected to tourniquet shock». *Free Radic Res Commun* 17: 313-325.
- **White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, & Freeman BA, (1996).** «Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits». *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8745-8749.
- **Wolkenstein P, & Revuz J, (1995).** «Drug-induced severe skin reactions: incidence, management & prevention». *Drug Saf* 13: 56-68.
- **Wright RM, Ginger LA, Kosila N, Elkins ND, Essary B, McManaman JL, & Repine JE, (2004).** «Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury». *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 479-490.
- **Wright RM, Repine JE, (1997).** «The human molybdenum hydroxylase gene family: co-conspirators in metabolic free-radical generation & disease». *Biochem. Soc. Trans.* 25: 799-804.

- **Wu X, Wakamiya M, Vaishnav S, Geske R, Montgomery CJr, Jones P, Bradley A, & Caskey CT, (1994).** «Hyperuricemia & urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice». *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 742-746.
- **Xia M, Dempski R, & Hille R, (1999).** «The reductive half-reaction of xanthine oxidase: reaction with aldehyde substrates & identification of the catalytically labile oxygen». *J Biol Chem* 274: 3323-3330.
- **Xia Y, & Zweier JL, (1995).** «Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart». *J Biol Chem* 270: 18797-18803.
- **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.
- **Xu P, LaVallee PA, Lin JJ & Hoidal JR, (2004).** «Characterization of Proteins Binding to E-box/Ku86 Sites & Function of Ku86 in Transcriptional Regulation of the Human Xanthine Oxidoreductase Gene». *J Biol Chem*, 279: 16057- 16063.
- **Xu D, Qi L, Guillory D, Cruz N, Berg R, & Deitch EA, (1993).** «Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis». *J Trauma* 34: 676-682.
- **Xu P, Zhu XL, Huecksteadt TP, Brothman AR, Hoidal JR, (1994).** «Assignment of human xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22». *Genomics*. 23: 289-291.
- **Yoshihara S, Tatsumi K, (1985).** «Guinea pig liver aldehyde oxidase as a sulfoxide reductase: its purification & characterization». *Arch Biochem Biophys*. 242(1): 213-24.
- **Yossif AM, Ibrahim TM, Salem HA, Gamil NM, & el-Sayed LM, (1995).** «Effect of high lipid diet & allopurinol on the development of experimentally induced arthritis in rats. *Pharmacology* 51: 160-164.
- **Zeki S, Miura S, Suzuki H, Watanabe N, Adachi M, Yokoyama H, Horie Y, Saito H, Kato S, & Ishii H, (2002).** «Xanthine oxidase-derived oxygen radicals play significant roles in the development of chronic pancreatitis in WBN/Kob rats». *J Gastroenterol Hepatol* 17: 606-616.

- **Βούρκου Ε, (2011).** Απομόνωση, κινητικές μελέτες και κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης. Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Κοντού Μ, (1999).** Κρυσταλλογραφική και Βιοχημική μελέτη των Fab τμημάτων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του μυικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Διδακτορική διατριβή.
- **Γρηγοροπούλου Ε, & Φιλιππόπουλος Κ, (1998).** Τεχνική Χημικών Διεργασιών, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- **Καντσάδη Α, (2011).** Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως ενδυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα. Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **McMurry J, (2001).** Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- **Παπαϊωάννου Ι, (2004).** Σημειώσεις Χημείας Στερεάς Καταστάσεως, Αθήνα.
- **Ρακιντζής ΘΝ, (1994).** Φυσικοχημεία, Έκδοση 3^η, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- **Stryer L, (1997).** Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- **Τσαγκάρης Γ, (1999).** Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- **Χαμόδρακας ΣΙ, (1993).** Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.