

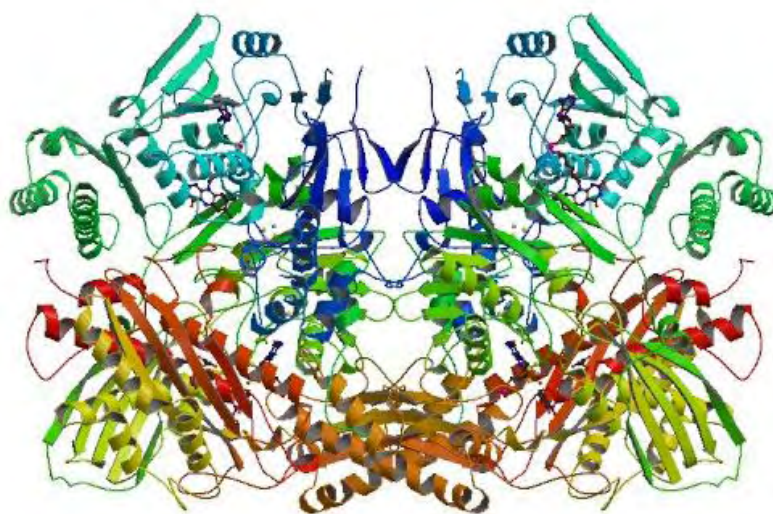


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ



ΒΟΥΡΚΟΥ ΕΡΓΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

**«Απομόνωση, κινητικές μελέτες και κρυστάλλωση της
οξειδάσης της ξανθίνης»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ: Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Λέκτορα Κλινικής Χημείας, Δρ. Μ. Κοντού και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δ. Λεωνίδα, για την αμέριστη εμπιστοσύνη τους στο πρόσωπό μου, την επιστημονική καθοδήγηση, ενθάρρυνση και τις συμβουλές που μου προσέφεραν. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή φυσιολογίας ζώων, Δρ. Δ. Κουρέτα για την ανάθεση της εργασίας στο πρόσωπό μου.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Σκαμνάκη Βασιλική, η οποία μου προσέφερε τη πολύτιμη βοήθειά της.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τη Ζωή Καρούλια, υποψήφια διδάκτορας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη σημαντική συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	iv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. Δομή γονιδίου XOR	5
1.2. Έκφραση και ρύθμιση του XOR γονιδίου.....	7
1.3. Δομή της XOR πρωτεΐνης	8
1.4. Μετατροπή XDH σε XO.....	12
1.5. Ρύθμιση έκφρασης και δραστηριότητας της XOR.....	15
1.6. Φυσιολογικός ρόλος της XO πρωτεΐνης.....	16
1.7. Κατανομή της XOR.....	19
1.8. Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης:	21
1.9. Κλινική σημασία αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης.....	24
1.10. Μελλοντικός σχεδιασμός αναστολέων με θεραπευτική χρήση	28
2. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΑΚΤΙΝΕΣ Χ.....	30
2.1. Εισαγωγή	30
2.2. Γενικά χαρακτηριστικά κρυσταλλογραφίας.....	31
2.3. Κρύσταλλοι πρωτεϊνών	31
2.4. Κρυστάλλωση Πρωτεϊνών	35
2.4.1. Στάδια κρυστάλλωσης.....	36
2.4.1.1. Πυρήνωση	37
2.4.1.2. Ανάπτυξη Πυρήνων	38
2.4.1.3. Αναστολή ανάπτυξης κρυστάλλου.....	39
2.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση	40
2.4.3. Παράγοντες καθίζησης.....	41
2.5. Ακτίνες Χ	42
2.6. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων	46
2.7. Ερμηνεία χαρτών-Βελτίωση Δομής.....	47

3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	48
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
4.1. ΥΛΙΚΑ	49
4.1.1. Αντιδραστήρια.....	49
4.1.2. Υλικά συμπύκνωσης πρωτεϊνών	49
4.1.3. Υλικά χρωματογραφίας.....	49
4.1.4. Όργανα	50
4.1.5. Υλικά κρυσταλλώσεων	50
4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	50
4.2.1. Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα	50
4.2.2. Χρωματογραφία συγγένειας- EAH Sepharose 4B/folic Acid.....	53
4.2.2.1. Δημιουργία στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid.....	53
4.2.2.2. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη φολικού οξέος.....	54
4.2.3. Ενεργοποίηση οξειδάσης της ξανθίνης με $K_3Fe(CN)_6$	57
4.2.4. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	57
4.2.5. Κινητικές μελέτες οξειδάσης της ξανθίνης	59
4.2.6. Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	61
4.2.6.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS- PAGE)	61
4.2.6.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native- PAGE)	63
4.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	65
4.2.7.1. Χρώση με κυανό του Coomassie	65
4.2.7.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο ($AgNO_3$)	66
4.2.8. Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών	66
4.2.8.1. Φασματοσκοπικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών	66
4.2.8.2. Χρωματομετρική μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford.....	67
4.2.9. Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης.....	68
4.2.9.1. Τεχνική της «κρεμάμενης σταγόνας» (hanging drop).....	68
4.2.9.2. Τεχνική της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)	70

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
5.1. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα	72
5.2. Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας.....	74
5.3. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης	80
5.4. Κινητικές μελέτες οξειδάσης της ξανθίνης	82
5.5. Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης	84
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase, XO, EC 1.1.3.22) και η αφυδρογονάση της ξανθίνης (xanthine dehydrogenase, XDH, EC 1.2.1.37) είναι οι δύο μορφές του ενζύμου οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (xanthine oxidoreductase XOR). Πρόκειται για μόλυβδο-ένζυμα, τα οποία αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες μονάδες των 145 kDa. Στα θηλαστικά η XOR συντίθεται στη μορφή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης αλλά μετατρέπεται άμεσα σε οξειδάση με οξείδωση των θειολικών ομάδων ή με πρωτεόλυση. Η XOR βρίσκεται σε διάφορα όργανα όπως το ήπαρ, το έντερο, τους πνεύμονες, τους νεφρούς, την καρδιά, τον εγκέφαλο καθώς και στον ορό του αίματος.

Η XO χρησιμοποιεί το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ η XDH χρησιμοποιεί το NAD^+ . Και οι δύο είναι εξίσου ικανές να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου. Τα φυσιολογικά υποστρώματα είναι η ξανθίνη και η υποξανθίνη, τα οποία προσδένονται στο οξειδωμένο ένζυμο και δίνουν δύο ηλεκτρόνια στον μολυβδαινικό συμπαραγοντα (molybdenum cofactor) τον οποίο ανάγουν από Mo(VI) σε Mo(IV) . Τα υποστρώματα υδροξυλιώνονται από μόρια H_2O στο μολυβδαινικό κέντρο καθώς τα ηλεκτρόνια ταξιδεύουν μέσω δύο σιδηροθειούχων κέντρων στην φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδική ομάδα (flavine adenine dinucleotide, FAD). Η ανηγμένη FAD μπορεί να επαναοξειδωθεί δισθενώς από το οξυγόνο και να παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου ή μονοσθενώς σε δύο βήματα και να παράγει δύο ισοδύναμα της ελεύθερης ρίζας του σουπεροξειδίου.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές οδούς, όπως στην υδροξυλίωση πουρινών, πτερινών, αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών, συμβάλλοντας έτσι στην αποτοξίνωση ή στην ενεργοποίηση ενδογενών ενώσεων και ξενοβιοτικών. Ο πρωταρχικός ρόλος του ενζύμου είναι η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Γι' αυτό, σε κληρονομικές παθήσεις που υπάρχει έλλειψη του ενζύμου, τα άτομα χαρακτηρίζονται από ξανθινουρία και δυσλειτουργία πολλών οργάνων από υπερβολική συσσώρευση ξανθίνης σε αυτά. Επίσης, έχειδειχθεί ότι συμμετέχει σε

διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμία, το αιμορραγικό σοκ, η αθηροσκληρίωση και η δρεπανοκυτταρική αναιμία, λόγω παραγωγής της ελεύθερης ρίζας του σουπεροξειδίου. Επιπλέον, η παρουσία του ενζύμου έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στον ορό ανθρώπων με βλάβη στο ήπαρ και στο πάγκρεας καθώς και σε ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι.

Συνεπώς, 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 και μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι συνθήκες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης με χρήση των τεχνικών της κρεμάμενης και της επικαθήμενης σταγόνας. Τέλος, έγιναν προσπάθειες για βελτιστοποίηση της ανάπτυξης κρυστάλλων, έτσι ώστε να δημιουργηθούν κρύσταλλοι ικανοί να περιθλούν τις ακτίνες Χ σε υψηλή ευκρίνεια.

ABSTRACT

Xanthine oxidase (XO, EC 1.1.3.22) and xanthine dehydrogenase (XDH, EC 1.1.7.1.4) are interconvertible forms of the same enzyme, known as xanthine oxidoreductase (XOR). The enzymes are molybdopterin-containing flavoproteins that consist of two identical subunits of approximately 145 kDa. The enzyme from mammalian sources, including man, is synthesized as the dehydrogenase form, but it can be readily converted to the oxidase form by oxidation of sulfhydryl residues or by proteolysis. XOR is widely distributed throughout various organs including the liver, gut, lung, kidney, heart, and brain as well as the plasma.

The XO form utilizes molecular oxygen as the electron acceptor, whereas the XDH form utilizes NAD^+ as the preferred electron acceptor, thereby producing reactive oxygen species. Xanthine interacts with XO or XDH at the xanthine binding site, which contains molybdopterin. 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, at 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 O_2 .

Physiologically, XO and XDH participate in a variety of biochemical reactions including the hydroxylation of various purines, pterins, and aromatic heterocycles, as well as aliphatic and aromatic aldehydes, thereby contributing to the detoxification or activation of endogenous compounds and xenobiotics. One of XOR's primary roles is the conversion of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. Inherited XOR deficiency leads to xanthinuria and a characteristic multiple organ failure syndrome characterized by the deposition of xanthine in various tissues. It can also act as a circulating mediator that is responsible for remote organ injury in a variety of pathophysiological conditions including hepatic ischemia and reperfusion, hemorrhagic shock, atherosclerosis and sickle cell disease.

Consequently, a detailed clarification of the structure of xanthine oxidase would contribute to the design of compounds with therapeutic potential. Under this approach, in the present study xanthine oxidase, isolated from cow's milk, was purified using affinity chromatography and gel filtration chromatography. The enzyme function was verified with kinetic analysis. Subsequently, crystallization conditions for xanthine oxidase were established screening commercially available crystallization solutions, with the use of a crystallization robot. Initial crystallization conditions were refined using vapor diffusion methods (hanging and sitting drop), to grow crystals of suitable size for X-ray diffraction studies at high resolution.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR) καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στη συνέχεια της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Το ένζυμο πρώτη φορά ανακαλύφθηκε το 1902 από τον αυστριακό βιοχημικό Franz Schardinger, ο οποίος παρατήρησε ότι το μπλε του μεθυλενίου μπορεί να αναχθεί στο φρέσκο γάλα, έπειτα από προσθήκη φορμαλδεΐδης, και ήταν γνωστό ως ένζυμο Schardinger. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε και μελετήθηκε το 1920 από τους Malcolm Dixon και Sylva Thurlow και το 1938 προτάθηκε από τον V.H. Booth το ένζυμο Schardinger να αναφέρεται ως οξειδάση της ξανθίνης. Αργότερα, η XOR βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνη για την οξείδωση αλδεϋδών και της ξανθίνης και είναι το πρωτότυπο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών γνωστών ως υδροξυλάσες μολυβδαινίου.

Αρχικώς, θεωρήθηκε ότι η οξειδάση της ξανθίνης (XO) και η αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) είναι δυο διαφορετικά ένζυμα. Αρχικές προσπάθειες απομόνωσης του ενζύμου από βόειο γάλα έδιναν πάντα τη μορφή XO χρησιμοποιώντας το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ όταν η πηγή ήταν από άλλα είδη όπως κοτόπουλο ή έντομα έδιναν τη μορφή XDH με προτιμώμενο αποδέκτη ηλεκτρονίων το NAD^+ . Ωστόσο, αργότερα ανακαλύφθηκε ότι οι μορφές XDH και XO είναι προϊόντα του ίδιου γονιδίου. Αρχικώς το ένζυμο XOR συντίθεται στη μορφή της αφυδρογονάσης αλλά μετατρέπεται άμεσα σε οξειδάση με οξείδωση των θειολικών ομάδων ή με πρωτεόλυση.

1.1. Δομή γονιδίου XOR

Το γονίδιο XOR στον άνθρωπο αρχικά προσδιορίστηκε στο χρωμόσωμα 2 (Ichida et al. 1993). Στη συνέχεια, τρεις ερευνητικές ομάδες τοποθέτησαν το γονίδιο XOR στο χρωμόσωμα 2p22 ή 2p23 (Xu et al. 1994, Minoshima et al. 1995, Rytönen et al. 1995). Όταν η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος δημοσιεύθηκε, η

θέση του γονιδίου XOR επιβεβαιώθηκε ότι είναι στο χρωμόσωμα 2p23.1 (International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

Έχουν αναφερθεί τρεις αλληλουχίες του cDNA της XOR στον άνθρωπο από τρεις ερευνητικές ομάδες (Ichida et al. 1993, Xu et al. 1994, Saksela και Raivio 1996). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου XOR στον άνθρωπο αποτελείται από 3999bp και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 1333 αμινοξέων. Το cDNA που αναφέρθηκε από την ομάδα Saksela και Raivio (1996) κωδικοποιεί για το ενεργό ένζυμο XOR και είναι 99% ταυτόσημη με αυτή που αναφέρθηκε από την ομάδα Ichida et al. (1993) και 94% ταυτόσημη με την αλληλουχία που αναφέρθηκε από την ομάδα Xu et al. (1994). Η αλληλουχία των αμινοξέων, που προκύπτει από το cDNA της XOR στον άνθρωπο, που αναφέρθηκε από την ομάδα Ichida et al. (1993) ήταν 90% ταυτόσημη με αυτή του αρουραίου (Amaya et al. 1990) και 52% ταυτόσημη με αυτή της *Drosophila* (Keith et al. 1987). Η αλληλουχία των αμινοξέων, που προκύπτει από το cDNA της XOR στον αρουραίο είναι 94% ταυτόσημη με αυτή που προκύπτει από την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης XOR στο ποντίκι (Terao et al. 1992).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη οξειδοαναγωγή της ξανθίνης είναι >60kb και περιλαμβάνει 36 εξώνια (Xu et al. 1996) και 35 εσώνια. Ο αριθμός των εξωνίων και των εσωνίων είναι ίδιος στον άνθρωπο και στο ποντίκι, ενώ στον αρουραίο διαφέρει (Cazzaniga et al. 1994, Chow et al. 1994, Xu et al. 1996). Επιπλέον, το μέγεθος του δεύτερου εσωνίου στο γονίδιο της XOR στον άνθρωπο και στον αρουραίο υπερβαίνει τα 8kb αλλά είναι σημαντικά μικρότερο, 1.6kb, στο ποντίκι. Στη *Drosophila* το γονίδιο XOR περιλαμβάνει μόνο 4 εξώνια, ωστόσο, παρουσιάζει εντυπωσιακή ομοιότητα στα επίπεδα πρωτεΐνης με αυτή της XOR στα θηλαστικά (Keith et al. 1987, Ichida et al. 1993). Τα ένζυμα XOR και AO έχουν πολλές ομοιότητες στη δομή και στις βιοχημικές ιδιότητές τους καθώς και σχεδόν ταυτόσημη δομή των εξωνίων/εσωνίων των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτά τα δυο ένζυμα. Αυτό υποδηλώνει μια κοινή εξελικτική πορεία αυτών των δύο ενζύμων (Terao et al. 1998, Garattini et al. 2003).

1.2. Έκφραση και ρύθμιση του XOR γονιδίου

Η έκφραση του XOR γονιδίου ρυθμίζεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, πολλά μοτίβα ακολουθιών, τοποθετούνται ανοδικά της κωδικής αλληλουχίας της XOR και δεσμεύουν C/EBP, ETS-1, AP-1, AP-2 και TF-IID (Xu et al. 2000). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι ο πυρηνικός παράγοντας Y ενεργοποιεί τη μεταγραφή της XOR (Martelin et al. 2000).

Δυο μεταγραφικές θέσεις, που βρίσκονται στο -59 και -82 από το κωδικόνιο έναρξης ATG της μετάφρασης έχουν εντοπιστεί στην 5'-συνοδευτική αλληλουχία του γονιδίου XOR του ανθρώπου. Η λειτουργία αυτών των δύο πιθανών μεταγραφικών θέσεων δεν είναι γνωστή, αλλά έχει βρεθεί ότι mRNAs με διαφορετικά 5' άκρα διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη μετά-μεταγραφική ρύθμιση ή η έκφρασή τους μπορεί να είναι ιστό-ειδική. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο ποντίκι έχει βρεθεί μόνο μια μεταγραφική θέση έναρξης, ενώ στον αρουραίο έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον τέσσερις θέσεις, συμπεραίνουμε ότι η λειτουργία τους εξαρτάται από τη παρουσία αλληλουχιών δέσμευσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο πρώτο εξώνιο (Cazzaniga et al. 1994, Chow et al. 1994, Chow et al. 1995, Clark et al. 1998).

Με κλωνοποίηση περίπου 2 kb του υποκινητή της XOR του ανθρώπου, βασιζόμενοι στην αλληλουχία του, έχουν εντοπιστεί πολλές πιθανές θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων (Xu et al. 1996). Ωστόσο, υπάρχουν μόνο λίγες αναφορές σχετικά με τη λειτουργία και τη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου XOR του ανθρώπου (Xu et al. 2000). Ανάμεσα στο ποντίκι και στον άνθρωπο υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της XOR στους ιστούς και στην δραστικότητα του ενζύμου. Επίσης, με πειράματα διαμόλυνσης έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα των XOR μεταγράφων στο ήπαρ ποντικού και η δραστικότητα του τμήματος υποκινητή του ποντικού (από -1 έως -588 από το κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης) είναι υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά του ανθρώπινου ήπατος και του αντίστοιχου τμήματος του υποκινητή του ανθρώπου (από -1 έως -463). Η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της XOR του ανθρώπου που αντιστοιχεί στα

νουκλεοτίδια -1 έως -138 από το κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητη και επαρκής για την βασική δράση του υποκινητή, ενώ η περιοχή -258 έως -228 είναι κρίσιμη για την καταστολή της κεντρικής δραστηριότητας του υποκινητή (Xu et al. 2000). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους Xu et al. υποδηλώνουν ότι ο υποκινητής της XOR στον άνθρωπο φέρει ένα στοιχείο όμοιο του TATA, το οποίο δεσμεύει τα στοιχεία της βασικής μεταγραφικής μηχανής (TFIID σύμπλεγμα), συμπεριλαμβανομένων της RNA πολυμεράσης II, που απαιτούνται για τη βασική δραστηριότητα του υποκινητή. Ωστόσο, το E-box, το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύει τόσο ενεργοποιητές όσο και καταστολείς της μεταγραφής, τοποθετείται στο -240 και κανονικά θα έπρεπε μαζί με το στοιχείο TATA να περιορίζουν τη δραστηριότητα του υποκινητή της XOR, αφού τοποθετούνται στη κρίσιμη περιοχή καταστολής δραστηριότητας του υποκινητή.

Ο υποκινητής του γονιδίου της XOR στον αρουραίο έχει κλωνοποιηθεί και έχει διευκρινιστεί η λειτουργία του (Chow et al. 1995, Clark et al. 1998). Σε αντίθεση με τον υποκινητή του γονιδίου της XOR στον άνθρωπο, στον αρουραίο δεν έχει εντοπιστεί κανένα TATA κουτί. Σε αντίθεση, πρωτεΐνες C/EBP έχει δείχθει ότι δεσμεύονται στον υποκινητή και μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα ΥΥ-1, ο οποίος έχει την ικανότητα να κάμπτεται το DNA, είναι αναγκαία για τη βασική δραστηριότητα του υποκινητή (Clark et al. 1998). Επιπλέον, πολλοί άλλοι παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων που σχετίζονται με τα NF-1, Oct-1, c-Myc και USF έχει προταθεί ότι δεσμεύονται στον υποκινητή του γονιδίου της XOR στον αρουραίο.

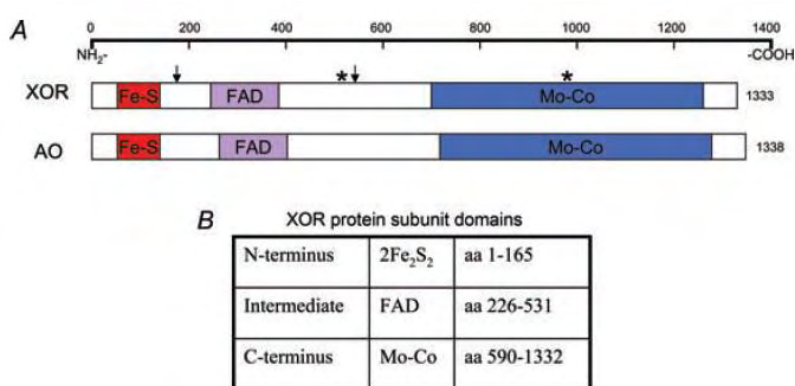
1.3. Δομή της XOR πρωτεΐνης

■ Μόλυβδο-φλαβινο ένζυμα

Τα μόλυβδο-φλαβινοένζυμα απαιτούν τόσο τον συμπαράγοντα μολυβδαινίου όσο και το φλαβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (FAD) για την δραστηριότητά τους. Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί μόνο δυο μολυβδο-

φλαβινοένζυμα, η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR) και η οξειδάση της αλδεύδης (AO). Στα θηλαστικά, η XOR και η AO έχουν υψηλά επίπεδα ομολογίας στο γονίδιο και στα επίπεδα πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας μια κοινή εξελικτική προέλευση (Ichida et al. 1993, Terao et al. 2000). Η XOR καταλύει τα δύο τελευταία στάδια κατά τον καταβολισμό των πουρινών, ενώ ο φυσιολογικός ρόλος της AO δεν είναι σαφής. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η AO διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Η XOR εμφανίζεται σε δύο μορφές, τη μορφή XDH και τη μορφή XO, οι οποίες χρησιμοποιούν το NAD^+ και O_2 , αντίστοιχα, ως αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ η AO υπάρχει μόνο σε μια μορφή, η οποία δίνει ηλεκτρόνια στο O_2 . Η κατανομή αυτών των δυο ενζύμων στους ιστούς διαφέρει αρκετά, ιδιαίτερα στο έντερο όπου τα επίπεδα έκφρασης της XOR είναι υψηλά ενώ της AO χαμηλά και στο πνεύμονα, όπου τα επίπεδα έκφρασης AO είναι υψηλά ενώ της XOR χαμηλά.

Και τα δύο ένζυμα είναι ομοδιμερή με τη κάθε υπομονάδα να είναι 145kDa και να αποτελείται από μια N-τελική περιοχή 20kDa που περιέχει 2 σιδηροθειούχα κέντρα (Fe-SI και Fe-SII), μια κεντρική περιοχή 40kDa που περιέχει FAD, και μια C-τελική περιοχή 85kDa που περιέχει τον συμπαράγοντα μολυβδαινίου και τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος (**εικόνα 1**) (Bray et al., 1996; Hille και Nishino, 1995).

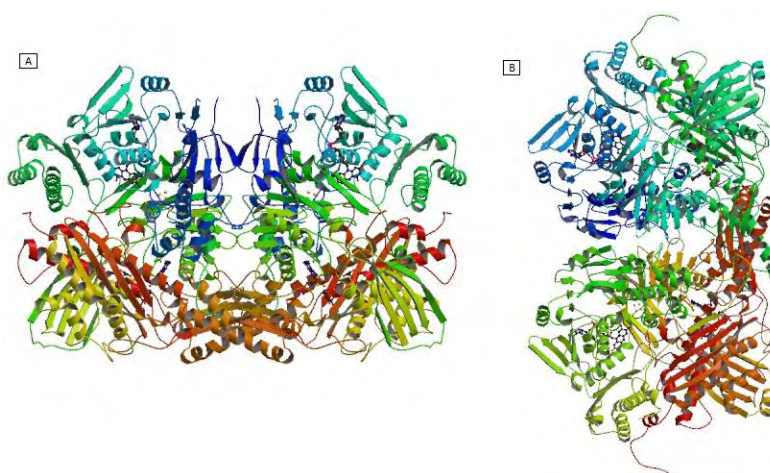


Εικόνα 1. Δομή XOR πρωτεΐνης. Α) Απεικόνιση υπομονάδας της XOR πρωτεΐνης κατά αντιστοιχία με την υπομονάδα της AO. Β) Περιοχές στις οποίες συνίσταται η κάθε υπομονάδα της XOR.

Το ομοδιμερές ένζυμο έχει δυο πανομοιότυπα ενεργά κέντρα, τα οποία ευθυγραμμίζονται από κατάλοιπα και των δυο υπομονάδων. Απόκλιση μεταξύ της αλληλουχίας των αμινοξέων της XOR και της AO γύρω από τον συμπαράγοντα FAD και της θέσης μολυβδοπτερίνης μπορεί να ευθύνεται για τις διαφορές στον αποδέκτη ηλεκτρονίων και της ειδικότητας για το υπόστρωμα του κάθε ενζύμου αντίστοιχα (Calzi et al. 1995, Enroth et al. 2000, Garattini et al. 2003).

▪ Ενεργό κέντρο της XOR

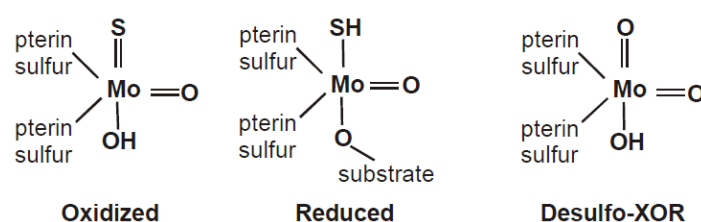
Βασιζόμενοι στις κρυσταλλογραφικές μελέτες της XOR από βόειο γάλα (Enroth et al. 2000) και της AO από *Desulfovibrio gigas* (Romao et al. 1995, Huber et al. 1996), η δομή και η λειτουργία του ενεργού κέντρου του ενζύμου έχει διευκρινιστεί. Οι δομές από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες (εικόνα 2) για τις απομονωμένες από βόειο γάλα XDH (Protein Data Bank (PDB) 1FO4) και XO (PDB, 1FIQ) δείχνουν ότι η υποξανθίνη και η ξανθίνη δεσμεύονται στη C- τελική περιοχή της XOR κοντά στον συμπαράγοντα μολυβδοπτερίνης (molybdopterin).



Εικόνα 2. Τρισδιάστατη απεικόνιση της XOR πρωτεΐνης από βόειο γάλα. Α) Απεικόνιση της οξειδάσης της ξανθίνης (PDB, 1FIQ). Β) Απεικόνιση της αφυδρογονάσης της ξανθίνης (PDB, 1FO4)

Κατά την οξείδωση του υποστρώματος, αρχικά 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 σίδηρο-θειούχα κέντρα και στη συνέχεια στο FAD κέντρο για να καταλήξουν τελικά στο NAD⁺ ή στο O₂ (Hille and 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 αναγμένη μορφή ο διπλός δεσμός με το θείο αντικαθίσταται από μια σουλφιδριλική ομάδα (**εικόνα 3**) (Enroth et al. 2000).



Εικόνα 3. Απεικόνιση δεσμών που σχηματίζονται με το Mo στην οξειδωμένη και αναγμένη μορφή του ενζύμου XOR καθώς και στην desulfo μορφή.

Το άτομο οξυγόνου που είναι συνδεδεμένο με το υπόστρωμα κατά την αντίδραση οξείδωσης προέρχεται από ένα διαλυτό μόριο νερού. Πρόσφατα μια μετάλλαξη στο γονίδιο σουλφουράσης του συμπαραγόντα Mo αναγνωρίστηκε ως η αιτία της έλλειψης δραστηριότητας XOR και AO στην ξανθινουρία τύπου II (Ichida et al. 2001). Αυτή η σουλφουράση εισάγει ένα άτομο θείου στη θέση του οξυγόνου στο κέντρο Mo της XOR και της AO. Σε κύτταρα από ήπαρ αρουραίου έχει ανιχνευθεί μια ανενεργή μορφή XOR, η desulfo, στην οποία απουσιάζει ο διπλός δεσμός του θείου με το μολυβδαίνιο (Ikegami and Nishino 1986). Η σουλφουράση φαίνεται να έχει έναν φυσιολογικό ρόλο κατά την αναγέννηση της δραστητικής μορφής, sulfo μορφή, της XOR. Επίσης, μια ανενεργή μορφή της XOR, demolybdo μορφή, έχει ανιχνευθεί στο γάλα του ανθρώπου (Abadeh et al. 1992) και βοοειδών.

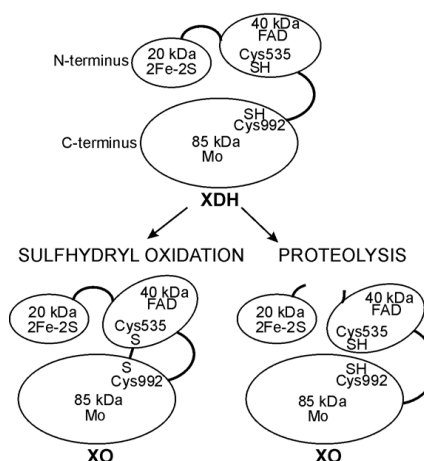
▪ Σίδηρο-θειούχο σύμπλεγμα και κέντρο FAD

Η N- τελική περιοχή της XOR περιέχει πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης σημαντικά για τη δέσμευση των δυο ανόμοιων σίδηρο-θειούχων συμπλεγμάτων. Τα Fe/S συμπλέγματα είναι τύπου φερρεδοξίνης ([2Fe-2S]) και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα σήματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού και το οξειδοαναγωγικό τους δυναμικό (Enroth et al. 2000; Iwasaki et al. 2000; Nishino and Okamoto 2000). Η μεταφορά των ηλεκτρονίων από το αναγμένο κέντρο Mo στα Fe/S συμπλέγματα είναι θερμοδυναμικά ευνοημένη και ακολουθείται από τη ροή των ηλεκτρονίων στο FAD.

Ο συμπαράγοντας FAD βρίσκεται στη 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 O_2 , υπό φυσιολογικές συνθήκες (Harris and Massey 1997). Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες η XDH είναι ικανή να χρησιμοποιήσει το O_2 ως αποδέκτη ηλεκτρονίων. Σε αντίθεση η οξειδάση της ξανθίνης δεν μπορεί να δεσμεύσει καθόλου το NAD^+ (Enroth et al. 2000, Kuwabara et al. 2003).

1.4. Μετατροπή XDH σε XO

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μορφή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης είναι η κυρίαρχη μορφή της οξειδοαναγωγάσης της ξανθίνης στους ιστούς. Μελέτες με απομονωμένη XOR καθώς και οι κρυσταλλικές δομές των XDH και XO βόειο γάλα (Enroth et al. 2000) υποδηλώνουν μια μετατροπή της XDH σε XO είτε αναστρέψιμη με οξείδωση των θειολικών ομάδων είτε αμετάκλητη με πρωτεόλυση (εικόνα 4).

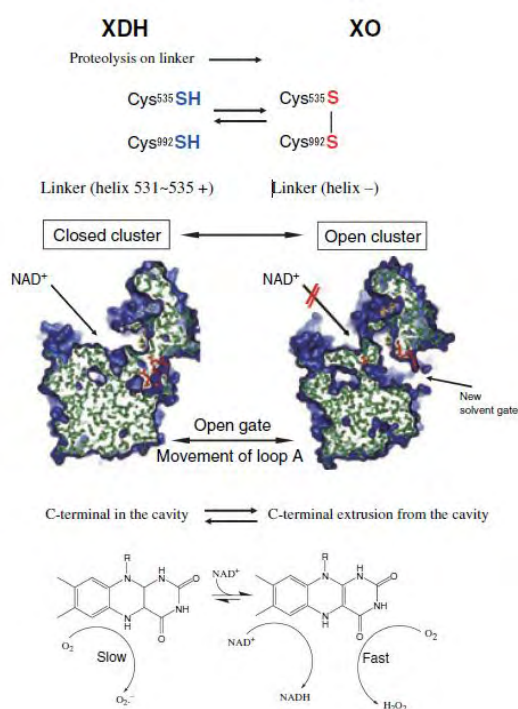


Εικόνα 4. Μηχανισμός μετατροπής XDH σε XO. Η μετατροπή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω οξείδωσης των θειολικών ομάδων είτε μέσω πρωτεόλυσης.

Ο ακριβής μηχανισμός καθώς και ο βαθμός στον οποίο πραγματοποιείται αυτή η μετατροπή στους ιστούς των θηλαστικών δεν είναι πλήρως γνωστός. Οι ομάδες θείου των συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης, Cys535 και Cys992, είναι κρίσιμες για το σχηματισμό δεσμών δισουλφιδίου κατά τη διάρκεια μετατροπής της XDH σε XO, η οποία μπορεί να επανέλθει με χρήση διθειοθρεϊτόλης ή άλλων αναγωγικών ουσιών (Nishino 1997; Enroth et al. 2000; McManaman and Bain 2002). Η αντιστρεπτή αυτή μετατροπή προκύπτει λόγω οξείδωσης των ομάδων θείου των δυο καταλοίπων κυστεΐνης. Εντούτοις, έχει προταθεί ότι υπάρχουν και άλλα κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη μετατροπή αυτή και που δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμα (McManaman and Bain 2002).

Επεξεργασία της XDH με τρυψίνη έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεολυτική πέψη της μετά την Lys-551. Ενώ επεξεργασία με παγκρεατίνη προκαλεί την πέψη της XDH μετά τις Leu219 και Lys569, οι οποίες βρίσκονται στα συνδετικά τμήματα των υπο-περιοχών της XOR και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αμετάκλητη μετατροπή της XDH σε XO (Enroth et al. 2000). Παρά τη διάσπαση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, τα τμήματα παραμένουν ενωμένα εκτός αν εφαρμοστούν αναγωγικές συνθήκες. Η πρωτεάση που είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της XDH σε XO *in vivo* δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα.

Ωστόσο, στη μετατροπή της XDH σε XO φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και κάποια άλλα αμινοξέα. Η XO, όπως είναι γνωστό, μεταφέρει ανηγμένα ισοδύναμα στο οξυγόνο, ενώ η XDH χρησιμοποιεί το NAD^+ σαν τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Η επίλυση της δομής της XOR έδειξε ότι αλλαγές στη θέση του FAD προκαλούν αυτή την αλλαγή προτίμησης του αποδέκτη ηλεκτρονίων ανάμεσα στις δύο μορφές του ενζύμου. Με τη βοήθεια πειραμάτων θέσι-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης εντοπίστηκε μια ομάδα αμινοξέων (Phe549, Arg335, Trp336, Arg427), τα οποία υφίστανται δομικές μεταβολές κατά τη μετατροπή της XDH σε XO, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αλληλεπίδρασης των αμινοξέων Phe549 και Trp336. Η δομική αυτή μεταβολή αλλάζει σημαντικά τη διαμόρφωση του κέντρου σύνδεσης της φλαβίνης και την καθιστά απρόσιτη στο NAD^+ (εικόνα 5). Ταυτόχρονα, δημιουργεί και ένα κανάλι που διευκολύνει τη προσέγγιση του μοριακού οξυγόνου (Kuwabara et al., 2003).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των στοιχείων που εμπλέκονται στη μετατροπή της XDH σε XO

1.5. Ρύθμιση έκφρασης και δραστικότητας της XOR

Η XOR υπόκειται σε μια σειρά από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις (πίνακας 1). Η υποξία είναι ένας από τους πιο γνωστούς παράγοντες που ρυθμίζουν την XOR (Lanzillo et al., 1996). Η δραστικότητα της XOR αλλάζει δραματικά λόγω της υποξίας (μέσα σε 4 ώρες), υποδεικνύοντας έτσι ότι η πρωτεϊνική σύνθεση δεν απαιτείται αρχικώς, ενώ σε μεταγενέστερο επίπεδο (μετά τις 24 ώρες) χρειάζεται. Η κινάση p38 εμπλέκεται στην φωσφορυλίωση της XDH/XO, η οποία ρυθμίζεται από την υποξία. Η δραστικότητα της XOR μπορεί να αυξάνεται κατά την υποξία, ενώ να καταστέλλεται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Αρνητικοί ρυθμιστές	Υπεροξία
Θετικοί ρυθμιστές	Υποξία
	Λιποπολυσακχαρίδια
	Ιντερφερόνη γ
	Ιντερλευκίνη 1
	Ιντερλευκίνη 6
	Παράγοντας α νέκρωσης όγκου
	Κορτιζόλη
	προλακτίνη

Πίνακας 1. Ρυθμιστές έκφρασης και δραστικότητας της XOR

Φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως οι κυτοκίνες και οι λιποπολυσακχαρίτες, έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν την έκφραση της XOR στο ενδοθήλιο (Brandes et al., 1999). Η έκφραση της XOR επάγεται από κυτοκίνες, όπως TNF-α, IL-1β και IFN-γ, υποδηλώνοντας το ρόλο της XOR στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Η IL-3 φαίνεται να συμβάλλει στη μετατροπή της XDH σε XO.

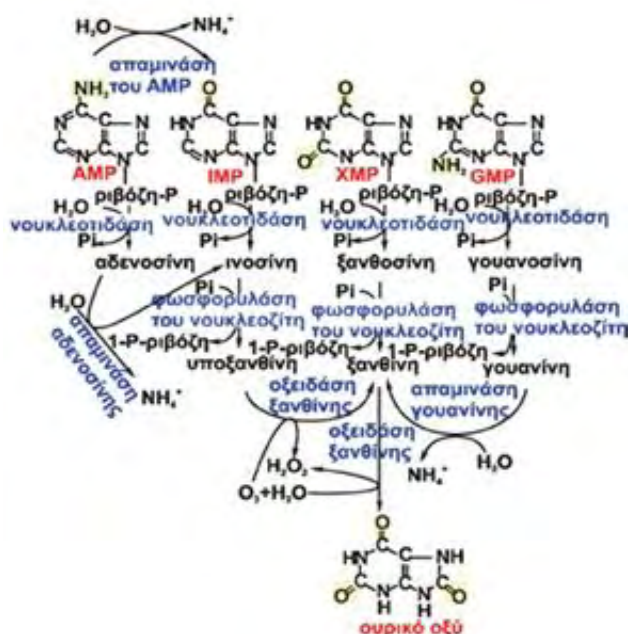
Η XOR είναι μια πρωτεΐνη που είναι άφθονη στο γάλα. Έτσι, η έκφραση της XOR στο μαστικό αδένα ρυθμίζεται από την εκκριτική δραστικότητα (McManaman et al., 2002). Συγκεκριμένα, η προλακτίνη και η κορτιζόλη, αυξάνουν την έκφραση της XOR και της δραστικότητάς της κατά 500%.

1.6. Φυσιολογικός ρόλος της XO πρωτεΐνης

Οι κύριες λειτουργίες της οξειδάσης της ξανθίνης αφορούν το μεταβολισμό των πουρινών και την αντιοξειδωτική της δράση.

- **Καταβολισμός πουρινών**

Οι πουρίνες, αδενίνη και γουανίνη, είναι σημαντικά συστατικά των νουκλεϊκών οξέων, των υψηλής ενέργειας φωσφορικών και τα μόρια κλειδιά σηματοδότησης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Η XO καταλύει τις δυο τελευταίες αντιδράσεις αποικοδόμησης των πουρινών, την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και την μετέπειτα οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (**εικόνα 6**), το οποίο αποβάλλεται από τους νεφρούς υπό φυσιολογικές συνθήκες.



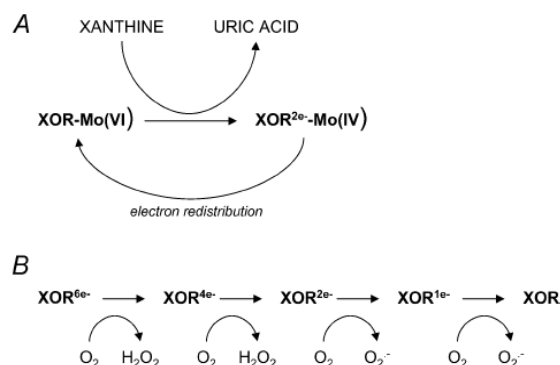
Εικόνα 6. Καταβολισμός πουρινών από την οξειδάση της ξανθίνης

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-φωσφοριβόζη 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 και τα γουανυλικό οξύ (GMP) και 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 τη ξανθίνη σε ουρικό οξύ παράγοντας όχι μόνο υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και ανιόντα υπεροξειδίου του οξυγόνου (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 τη παραπάνω πορεία για να μετατραπεί σε ουρικό οξύ μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης.

- **Αντίδραση αναγωγής και αντίδραση οξείδωσης**

Η αντίδραση αναγωγής (**εικόνα 7A**) συμβαίνει στο Mo-Co, όπου η XOR δέχεται δυο ηλεκτρόνια από την ξανθίνη, ανάγοντας τον 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 στον 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 7. Μηχανισμός της XOR αντίδρασης με το υπόστρωμα ξανθίνης. Α) αντίδραση αναγωγής του ΧΟ ενζύμου κατά την δέσμευση του υποστρώματος. Β) αντίδραση οξειδωσης του ΧΟ ενζύμου στο FAD.

Σε αντίθεση με την αντίδραση αναγωγής, η αντίδραση οξειδωσης λαμβάνει χώρα στο FAD (**εικόνα 7B**). 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, για να είναι αποτελεσματική η αντίδραση. Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια μεταφέρονται από το FAD στο NAD⁺ ή στο O₂ (Olson et al., 1974, Hille & Massey, 1981). Κατά την επανα-οξειδωση της πλήρως ανηγμένης ΧΟ, τα δυο πρώτα βήματα έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά δυο ηλεκτρονίων στο O₂ και συνεπώς τη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Στη συνέχεια, η ΧΟ μεταφέρει τα ηλεκτρόνια που απομένουν σε ξεχωριστά βήματα, με κάθε ηλεκτρόνιο να ανάγει ξεχωριστά το O₂ προς παραγωγή ·O₂⁻. Έτσι, η επαναοξειδωση της ανηγμένης ΧΟ αποδίδει δυο μόρια H₂O₂ και δυο ανιόντα ·O₂⁻. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ΧDH παράγει περισσότερα ανιόντα ·O₂⁻ ανά mole O₂, λόγω τη υψηλότερης θερμοδυναμικής σταθερότητας του FAD, το οποίο αντιδρά με το οξυγόνο (Hunt et al., 1993). Ωστόσο, παρά την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην παραγωγή ανιόντων ·O₂⁻, η ΧDH αντιδρά με πιο αργό ρυθμό με το οξυγόνο με ένα μέγιστο ποσό παραγωγής ανιόντων ·O₂⁻ που αναλογεί στο 25% της V_{max} της ΧΟ (Saito & Nishino, 1989).

- **Αντιοξειδωτική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης**

Το ουρικό οξύ αποτελεί φυσιολογικά ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του πλάσματος, το οποίο οξειδώνεται από διάφορες δραστικές ομάδες και καθίσταται ένα σχετικά σταθερό προϊόν οξείδωσης. Τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά πλάσματος. Είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που προστατεύει αποτελεσματικά τα βιολογικά μόρια- στόχους από οξείδωση από τις ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και του υποχλωριώδους οξέος. Ο ρόλος του ουρικού οξέος είναι ακόμα πιο σημαντικός κατά την περίοδο κύησης, όπου δρα σαν το κύριο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό για τις αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού. Εκτός από τη λειτουργία του ως αντιοξειδωτικό, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ουρικού οξέος παρατηρείται αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης και του σχηματισμού $\cdot\text{O}_2^-$ στο πλάσμα του ανθρώπου. Στα νεογέννητα άτομα, παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο αναστολής της ΧΟ από το ουρικό οξύ ενώ η αναστολή του σχηματισμού $\cdot\text{O}_2^-$ συμβαίνει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με των ενηλίκων (Tan et al., 1993).

1.7. Κατανομή της ΧΟ

Κατανομή της ΧΟ στους ανθρώπινους ιστούς

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για το προσδιορισμό της κατανομής της ενζυμικής δραστηριότητας της ΧΟ, της πρωτεΐνης ΧΟ και του mRNA της στους ανθρώπινους ιστούς. Τα στοιχεία όμως είναι εν μέρει αντιφατικά πιθανόν λόγω των διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού της δραστηριότητας ΧΟ (Parks and Granger 1986, Kooij 1994, Harrison 2002). Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν σταθερά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ΧΟ στο ήπαρ και στο κεντρικό έντερο (Vettenranta and Raivio 1990, Moriwaki et al. 1993, Kooij 1994, Sarnesto et al. 1996, Saksela et al. 1998, Linder et al. 1999). Επίσης υψηλά επίπεδα της ΧΟ εμφανίζονται στο μαστικό αδένα και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια θηλασμού. Το ανθρώπινο γάλα περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις της ΧΟ (Bruder et al. 1984, Sarnesto et al. 1996,

Linder et al. 1999). Ωστόσο, η δραστηριότητα της XOR στο γάλα είναι χαμηλή σε σχέση με αυτή από το ήπαρ ή το έντερο, ενώ ανιχνεύονται σε αυτό και οι δυο μορφές του ανενεργού ενζύμου, δηλαδή η demolybdo- και desulfo- μορφή (Abadeh et al. 1992). Από την άλλη πλευρά, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της XOR στο μαστικό αδένιο θηλασμού, αποδεικνύουν ότι η XOR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την έκκριση γάλακτος (McManaman et al. 1999; McManaman et al. 2002; Vorbach et al. 2002). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κατά τον κακοήγη όγκο του μαστού δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη XOR (Cook et al. 1997).

Τα δεδομένα που αφορούν τον πνεύμονα και τα νεφρά είναι αμφιλεγόμενα. Τα όργανα αυτά παρουσιάζουν αισθητά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της XOR σε σχέση με το ήπαρ και το έντερο. Επίσης έχει προταθεί η παρουσία της XOR στο τριχοειδές και αρτηριακό ενδοθήλιο πολλών οργανισμών και πιθανόν να εξηγείται έτσι η ανίχνευση mRNA της XOR με ευαίσθητες μεθόδους (π.χ. RT-PCR) σε οργανισμούς που δεν έχουν εμφανή ανοσοδραστική πρωτεΐνη XOR (Saksela et al. 1998). Η XOR έχει θεωρηθεί ότι είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (Jarasch et al. 1981, Ichikawa et al. 1992), το οποίο συμφωνεί με το φυσιολογικό της ρόλο στο καταβολισμό των πουρινών, αλλά έχει αναφερθεί ότι εντοπίζεται και στην επιφάνεια καλλιεργούμενων ενδοθηλίων (Rouquette et al. 1998; Harrison 2002). Τέλος, μερικές μελέτες απέδειξαν την δραστηριότητα της XOR και την εμφάνιση αντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό (Bruder et al. 1984, Spiekermann et al. 2003), ενώ άλλες απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτά τα αποτελέσματα (Sarnesto et al. 1996). Εντούτοις, έχει προταθεί ότι η XOR μπορεί περιστασιακά, για παράδειγμα λόγω βλάβης των ιστών σε όργανα με υψηλή περιεκτικότητα σε XOR, να τίθεται στη κυκλοφορία και να δεσμεύεται στο ενδοθήλιο, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στα απομακρυσμένα σημεία βλάβης των οργάνων (Pesonen et al. 1998, Houston et al. 1999, Weinbroum et al. 1999).

■ Έκφραση της XOR σε άλλα είδη

Σε όλα τα θηλαστικά η δραστικότητα της XOR είναι υψηλότερη στο ήπαρ και στο έντερο. Τα ανιχνεύσιμα ποσοστά δραστικότητας της XOR στον άνθρωπο περιορίζονται σε λίγα όργανα, ενώ στον αρουραίο διακρίνονται στους περισσότερους ιστούς. Στο ποντίκι τα υψηλότερα επίπεδα XOR ανιχνεύονται στο λεπτό έντερο, πνεύμονα και ήπαρ, ενώ τα χαμηλότερα στα νεφρά, σπλήνα και στη καρδιά. Η πρωτεΐνη XOR είναι παρούσα στους αντίστοιχους ιστούς εκτός από τα νεφρά στα οποία υπάρχει έλλειψη ανοσοδραστικότητας της. Το mRNA της XOR εκφράζεται ισχυρά στο λεπτό έντερο, πνεύμονα, στομάχι και στη καρδιά αλλά σε χαμηλά επίπεδα σε άλλους ιστούς (Kurosaki et al. 1995). Η XOR που έχει απομονωθεί από βόειο γάλα, εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα και στο τριχοειδές ενδοθήλιο του μαστικού αδένος καθώς και στο τριχοειδές ενδοθήλιο πολλών άλλων ιστών (Jarasch et al. 1981). Σε σύγκριση με τον άνθρωπο, τα επίπεδα δραστικότητας της XOR (συμπεριλαμβανομένου και της δραστικότητας στον ορό) είναι αισθητά υψηλότερα και υπάρχει ευρύτερη κατανομή της στους ιστούς των τρωκτικών και των άλλων θηλαστικών (Kooij 1994).

Δημιουργία ποντικών με μεταλλάξεις που έχουν σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή μη λειτουργικής XOR έδειξε ότι τα ετερόζυγα (+/-) παρότι φαίνονται υγιή αδυνατούν να διατηρήσουν τη γαλουχία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη πείνα και στη συνέχεια το θάνατο των νεογνών. Τα ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια (-/-) πεθαίνουν σε μικρή ηλικία μετά τη γέννηση χωρίς όμως να έχει περιγραφεί ακόμα λεπτομερώς ο φαινότυπός τους. Ωστόσο, με βάση τα ευρήματα στα ετερόζυγα ποντίκια φαίνεται ότι η XOR κατέχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην έκκριση γάλακτος (Vorbach et al. 2002).

1.8. Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης:

Οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης (πίνακας 2) μειώνουν τη παραγωγή του ουρικού οξέος και των ελευθέρων ριζών. Διακρίνονται στους

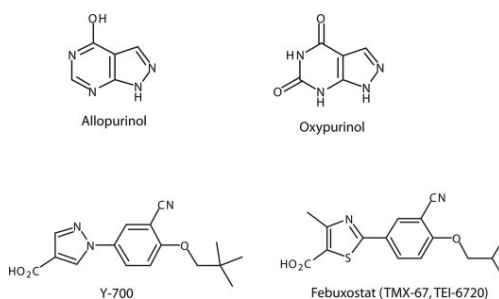
αναστολείς που είναι ανάλογα πουρινών όπως αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη και τισοπουρίνη και σε μόρια όπως πολυφαινόλες.

Αναστολείς	Ενώσεις
Παράγωγα πουρινών	8 azaadenine 9-phenylguanine 9-phenyl-6-guanine
Παράγωγα πυριμιδίνης	4amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine 4 amino-6- mercaptopyrazolo[3,4-d] pyrimidine 4 aminopyrazolo[3,4-d] pyrimidine
Ανάλογα βενζοθιαζινών	2-amino- 4H-1,3- benzothiazin-4 one 2-guanidino-4H-1,3- benzothiazin-4 one
Φλαβονοειδή	Quercetin, Baicalein, Apigenin
Κουμαρίνες	7-hydrocumarin
Ξανθόνες	Norathyriol
Αουρόνες	Sulfuretin

Πίνακας 2. Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης.

Ο πιο γνωστός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης είναι η αλλοπουρινόλη (1,5-dihydro- 4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) (**εικόνα 8**) της οποίας η χρόνια χορήγηση είναι κλινικά αποτελεσματική ενάντια στην υπερουριχαιμία. Η αλλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ισομερές της υποξανθίνης και ο καλύτερα μελετημένος αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης. Ουσιαστικά, η οξειδάση της ξανθίνης προκαλεί την οξείδωση της αλλοπουρινόλης στον ενεργό μεταβολίτη της οξυπουρινόλη, ο οποίος είναι επίσης αναστολέας του ενζύμου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η αλλοπουρινόλη αποτελεί έναν συναγωνιστικό αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι μη συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου. Η οξυπουρινόλη αποτελεί μη συναγωνιστικό αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης και ο σχηματισμός της σε συνδυασμό με την μεγάλη υπομονή της στους ιστούς είναι αυτή που είναι υπεύθυνη για ένα μεγάλο μέρος της φαρμακευτικής δράσης της αλλοπουρινόλης. Όσο αφορά τη φαρμακοκινητική δυναμική του αναστολέα, η αλλοπουρινόλη απορροφάται ταχέως, φθάνοντας τις

μέγιστες τιμές στο πλάσμα μέσα σε 30-60 λεπτά μετά από χορήγηση από το στόμα. Η οξυπουρινόλη έχει χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα από την αλλοπουρινόλη. Η αλλοπουρινόλη έχει σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής στο πλάσμα (2-3 ώρες), ενώ η οξυπουρινόλη έχει πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (14-30 ώρες) λόγω της νεφρικής επαναρρόφησης (Pea F., 2005). Η αλλοπουρινόλη χρησιμοποιείται ως φάρμακο σε διάφορες παθήσεις και έχει δειχθεί πως μειώνει τους δείκτες οξειδωτικού στρες, σε μοντέλα όπως αυτό του αποφρακτικού ίκτερου αλλά και σε μοντέλα αρουραίων με διαβήτη και ισχαιμία-επαναιμάτωση.



Εικόνα 8. Δομή αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης.

Παρόλο που η αλλοπουρινόλη αποτελεί ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο, είναι ένας σχετικά ασθενής αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (IC₅₀ τιμές από 0.2 έως 50μM). Η αναζήτηση νέων αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης έχει στραφεί περισσότερο σε συνθετικά ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών καθώς και σε флаβονοειδή, φαινολικές ενώσεις, κουμαρίνες και στερεοειδή.

Κάποια флаβονοειδή είναι γνωστό ότι δρουν *in vitro* ως ισχυρά αντιοξειδωτικά με το να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Πολλά από αυτά έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν και ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης. Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι флаβόνες εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερη ανασταλτική δράση από τις флаβονόλες. Τέλος, οι φυτικές флаβόνες και флаβονόλες είναι περισσότερο ανασταλτικές της οξειδάσης της ξανθίνης από τις μη φυτικές.

Δύο από τους πιο ισχυρούς αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης που έχουν ανακαλυφθεί τελευταίως είναι το febuxostat [2-[3-cyano-4-(2-methylpropoxy)phenyl]-4-methylthiazole-5-carboxylic acid; TMX-67, TEI-6720] και το Y-700 (**εικόνα 8**). Οι αναστολείς αυτοί έχουν ευνοϊκό τοξικολογικό προφίλ, υψηλή

βιοδιαθεσιμότητα και ισχυρότερη και πιο μακροχρόνια δράση ενάντια της υπερουριχαιμίας σε σύγκριση με την αλλοπουρινόλη. Και οι δύο αυτές ενώσεις βρίσκονται υπό κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο για την αντιμετώπιση της υπερουριχαιμίας και της ουρικής αρθρίτιδας.

1.9. Κλινική σημασία αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης

■ Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης για αντιμετώπιση της ουρικής αρθρίτιδας και του συνδρόμου λύσης όγκου

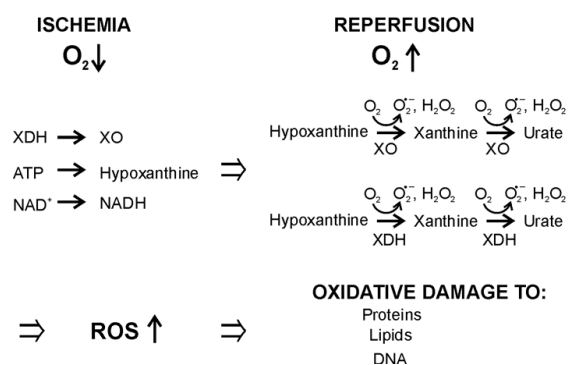
Η ουρική αρθρίτιδα εμφανίζεται σε άτομα που έχουν υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος, ως απάντηση στο σχηματισμό κρυσταλλικού ουρικού μονονατρίου σε διάφορους ιστούς. Τα τυπικά συμπτώματα της ουρικής αρθρίτιδας περιλαμβάνουν οξείες επαναλαμβανόμενες ουρικές αρθρίτιδες, σχηματισμό κρυστάλλων στους αρθρικούς υμένες και το αρθρικό υγρό, νεφρόλιθους και τόφους. Η πρόληψη και η θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας είναι μια αντι-υπερουριχαιμική θεραπεία είτε με ουρικοζουρικά φάρμακα είτε με αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης, όπως η αλλοπουρινόλη.

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. Αποτελεί αποτέλεσμα της καταστροφής των καρκινικών κυττάρων και της 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 υπερουριχαιμία, υπερκαλιαιμία, υποασβεστιαιμία και ουραιμία. Η υπερουριχαιμία είναι το αποτέλεσμα απελευθέρωσης και καταβολισμού ενδοκυττάρων νουκλεϊκών οξέων. Από το καταβολισμό των πουρινών σχηματίζεται ουρικό οξύ μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης. Συνεπώς, η αλλοπουρινόλη, αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του συνδρόμου λύσης όγκου που σχετίζεται με τη χημειοθεραπεία του όγκου (Smalley et al., 2000). Ωστόσο, η ανάγκη

εύρεση νέων βελτιωμένων αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης είναι μεγάλη καθώς η χορήγηση αλλοπουρινόλης σχετίζεται με πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες (πυρετό, ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία).

■ Οξειδάση της ξανθίνης και ισχαιμία/σύνδρομο επαναιμάτωσης

Οι ιστικές βλάβες που σχετίζονται με την παροδική διακοπή της αιματικής ροής διαμέσου ενός ιστού φαίνεται ότι σχετίζονται περισσότερο με την περίοδο επαναιμάτωσης παρά την ισχαιμία αυτή καθαυτή. Το σύνολο των βλαβών που παρατηρούνται σε ιστούς μετά την επαναιμάτωση, έπειτα από παρατεταμένη ισχαιμία, έχει ονομαστεί Σύνδρομο Επαναιμάτωσης. Κατά την ισχαιμία, η αφυδρογονάση της ξανθίνης μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης, η οποία χρησιμοποιεί το O_2 ως αποδέκτη ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να δημιουργείται $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 . Σε ισχαιμικούς ιστούς, ελαττώνονται τα επίπεδα ATP και το ποσό των υποστρωμάτων της XOR αυξάνεται. Με βάση αυτό, θεωρείται ότι η XOR και ιδιαίτερα η μετατροπή της XDH σε XO διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της ισχαιμίας και των βλαβών από επαναιμάτωση (εικόνα 9). Ωστόσο, παρόλο που το NAD^+ είναι ο αποδέκτης ηλεκτρονίων υπό φυσιολογικές συνθήκες, η XDH είναι ικανή να παράγει εξίσου $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 δίνοντας ηλεκτρόνια στο O_2 όταν τα επίπεδα NAD^+ είναι χαμηλά (Hille and Nishino 1995, Harris and Massey 1997). Η σημασία των ROS που παράγονται από την XDH *in vivo* δεν είναι σαφής αλλά επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες π.χ. κατά την επανοξυγόνωση που ακολουθεί της ισχαιμίας.



Εικόνα 9. Ρόλος της XOR πρωτεΐνης κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση.

■ Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες

Έχει βρεθεί ότι η οξειδάση της ξανθίνης εμπλέκεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης και συνεπώς στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ATP διασπάται σε AMP και ADP λόγω αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων. Αν η παροχή οξυγόνου είναι ανεπαρκής, τα επίπεδα του AMP αυξάνονται συνεχώς με αποτέλεσμα να ευνοείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης στην οξειδωμένη της μορφή, την οξειδάση της ξανθίνης, και την αποικοδόμηση του AMP σε υποξανθίνη. Η υποξανθίνη αποτελεί το υπόστρωμα της οξειδάσης της ξανθίνης και μέσω της δράσης της μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά παράγεται ουρικό οξύ και ROS. Στη συνέχεια, το ουρικό οξύ διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην προκαλούμενη από ROS οξείδωσή τους (Hellsten Y. et al., 1998).

■ Οξειδάση της ξανθίνης και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδάση της ξανθίνης σχετίζεται με τη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια (Berry και Hare, 2004, Doehner και Anker, 2005, Kittleson και Hare, 2005). In vitro μελέτες σε καρδιά έχουν δείξει ότι η προοδευτική ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας σχετίζεται με τα υψηλά επίπεδα της

οξειδάσης της ξανθίνης στο μυοκάρδιο, η οποία συμβάλλει στην αύξηση του οξειδωτικού στρες στην καρδιά (Ferdinandy et al., 1999). Η χορήγηση αλλοπουρινόλης, προκαλεί τη μείωση κατανάλωσης οξυγόνου από το μυοκάρδιο και οδηγεί σε αύξηση της συσταλτικότητας της καρδιάς. Αξιοσημείωτο είναι επίσης, ότι τα οφέλη της αλλοπουρινόλης στη καρδιακή ανεπάρκεια μπορούν να αντισταθμιστούν με τη χορήγηση αναστολέων της συνθετάσης NOS, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ανιόντα σουπεροξειδίου που παράγονται από την οξειδάση της ξανθίνης μπορούν να παρέμβουν στην ρύθμιση του NO. Επίσης, η αλλοπουρινόλη φαίνεται να μειώνει τη διαστολή της αριστερής κοιλιακής κοιλότητας και την υπερτροφία του μυοκαρδίου (Engberding et al., 2004).

■ Οξειδάση της ξανθίνης και αγγειακές παθήσεις: υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, αθηροσκλήρωση και διαβήτης.

Σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια ή με διαβήτη παρατηρούνται υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό. Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητοί οι μηχανισμοί με τους οποίους το ουρικό οξύ παρουσιάζει παθογενετικό ρόλο στις καρδιαγγειακές νόσους, η υπερουριχαιμία φαίνεται να σχετίζεται με αρνητικές επιπτώσεις στις καρδιακή λειτουργία. Επιπλέον, το ουρικό οξύ βρέθηκε ότι αναστέλλει τον ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα που επάγεται από τη παραγωγή νιτρικού οξειδίου στα βόεια ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αποτελεί ένα κυρίαρχο πρόωρο χαρακτηριστικό της αθηροσκλήρωσης, του διαβήτη και της υπέρτασης και καθιστά το πληθυσμό επιρρεπή σε καρδιακές επιπλοκές και σε σχηματισμό θρόμβων. Έχει αποδειχθεί ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που συνδέεται με αυτές τις διαταραχές σχετίζεται με τον τοπικό σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου στη περιοχή του αγγειακού ενδοθηλίου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η παραγωγή ιόντων σουπεροξειδίου που επάγεται από την οξειδάση της ξανθίνης μπορεί να σχετίζονται με τις αγγειακές νόσους και η αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να έχει θετικές επιδράσεις σε αυτές τις διαταραχές. Η αλλοπουρινόλη φαίνεται να βελτιώνει την αγγειακή

λειτουργία σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, στους οποίους παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης.

Η οξειδάση της ξανθίνης έχει σχετιστεί επίσης, με τη παθογένεια της ενδοθηλιακής λειτουργίας που σχετίζεται με αρτηριοσκλήρυνση και υπερχοληστερολαιμία. Σε πειράματα σε κουνέλια με υπερχοληστερολαιμία, παρατηρήθηκε ότι μετά από θεραπεία με οξυπουρινόλη, μειώθηκαν τα αγγειακά επίπεδα ελευθέρων ριζών (Ohara et al., 1993, White et al., 1996). Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο αγγειακό σύστημα οφείλεται στην εναπόθεση της κυκλοφορούντος ΧΟ σε θεικές γλυκοσαμινογλυκάνες στην επιφάνεια του ενδοθηλίου.

1.10. Μελλοντικός σχεδιασμός αναστολέων με θεραπευτική χρήση

Η οξειδάση της ξανθίνης φαίνεται ότι διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη πολλών ασθενειών. Η ανάπτυξη αναστολέων αποτελεσματικότερων, πιο ισχυρών και με καλύτερο φαρμακοδυναμικό προφίλ σε σύγκριση με την αλλοπουρινόλη/οξυπουρινόλη έχει προσελκύσει αρκετό ενδιαφέρον. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι οι αναστολείς της ΧΟ, συμπεριλαμβανόμενης και της αλλοπουρινόλης, εκτός από την αναστολή της δραστικότητας του ενζύμου μπορούν να μειώσουν σημαντικά το ένζυμο με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι σουπεροξειδίο (Miyamoto et al., 1996). Συνεπώς, η ανάπτυξη αναστολέων της ΧΟ στον μέλλον στοχεύει στην δημιουργία αναστολέων που θα έχουν και αντιοξειδωτικά αποτελέσματα.

Ένας άλλος τομέας που χρήζει βελτίωσης είναι η δημιουργία αναστολέων με σαφώς λιγότερες παρενέργειες σε σύγκριση με την αλλοπουρινόλη. Θεωρητικά, αναστολείς που δεν είναι ανάλογα πουρινών όπως η αλλοπουρινόλη, δεν θα παρουσιάζουν αυτές τις παρενέργειες, αν και θα εγκυμονεί ο κίνδυνος εμφάνισης νέων τοξικών δράσεων. Όσο αφορά την ανάπτυξη αναστολέων για τη θεραπεία άλλων παθολογικών καταστάσεων εκτός της ουρικής αρθρίτιδας (επαναιμάτωση,

καρδιακή ανεπάρκεια) θα πρέπει πρώτα να απαντηθούν τα εξής ερωτήματα: αν υπάρχει υπέρ-ρύθμιση της οξειδάσης της ξανθίνης στην ανθρώπινη ασθένεια και αν η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου από την ΧΟ σχετίζεται με την παθογένεια της νόσου. Προς το παρόν είναι ασαφές αν οι νέοι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης που αναπτύσσονται θα είναι αποτελεσματικοί για τη θεραπεία της ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης, των φλεγμονωδών παθήσεων, της καρδιακής ανεπάρκειας και του διαβήτη. Μια σειρά από αυτούς τους αναστολείς βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές και αναμφίβολα υπάρχει τεράστιο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων. Τέλος, ενδιαφέρον έχει η εύρεση των προφίλ αποτελεσματικότητας σε σχέση με τις παρενέργειες των νέων αναστολέων σε σύγκριση με αυτό της αλλοπουρινόλης.

2. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΑΚΤΙΝΕΣ Χ

2.1. Εισαγωγή

Για να γίνει κατανοητή η φύση του χημικού δεσμού, οι λειτουργίες των μορίων σε βιολογικά πλαίσια, οι μηχανισμοί και η δυναμική των αντιδράσεων, η γνώση της μοριακής δομής είναι απαραίτητη. Οι χημικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις ατόμων ή μορίων, τα οποία δεν είναι τίποτε άλλο από τρισδιάστατα αντικείμενα- δομές. Προκειμένου να γίνει πλήρως κατανοητός ο τρόπος αλληλεπίδρασης σε μια αντίδραση είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τις δομές των μορίων που παίρνουν μέρος. Αυτή η προσέγγιση ισχύει και για τα μεγάλα βιολογικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.

Αν και οι πρωτεΐνες είναι πολύ σημαντικά μόρια για όλες τις διεργασίες των κυττάρων και είναι υπεύθυνες για τη σωστή λειτουργία του, για ένα μόνο μικρό ποσοστό είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης τους. Για να διαλευκανθεί ο τρόπος λειτουργίας μιας πρωτεΐνης είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τη δομή της. Με τον όρο δομή μιας πρωτεΐνης εννοούμε τη σχετική διευθέτηση στον τρισδιάστατο χώρο των ατόμων της πρωτεΐνης από τα οποία αποτελείται. Από τη στιγμή που προσδιοριστεί η δομή μιας πρωτεΐνης, είμαστε σε θέση 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.

Το αντικείμενο της κρυσταλλογραφίας τα πρώτα χρόνια 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 χρήση των ακτίνων Χ. Με τη βοήθεια των ακτίνων Χ άρχισε σταδιακά να γίνεται προσδιορισμός της δομής των πρωτεϊνών. Στα πρώτα χρόνια ο προσδιορισμός αυτός ήταν μια διαδικασία που απαιτούσε πολύ χρόνο. Οι ανακλάσεις προέρχονταν από ασθενείς πηγές ακτίνων Χ και καταγράφονταν σε φιλμ. Κατόπιν οι ανακλάσεις έπρεπε να φωτομετρηθούν και να υπολογιστούν οι

εντάσεις τους μια- μία. Οι δυνατότητες των υπολογιστών ήταν περιορισμένες και δεν μπορούσαν να καλύψουν τις ανάγκες των πρώτων κρυσταλλογράφων. Έτσι, ο προσδιορισμός της δομής μιας μικρής πρωτεΐνης έπαιρνε αρκετά χρόνια. Αντιθέτως, σήμερα οι πηγές ακτίνων Χ έχουν βελτιωθεί και οι ανακλάσεις καταγράφονται από ηλεκτρονικούς ανιχνευτές με ηλεκτρονικούς υπολογιστές που μεταφράζουν και επεξεργάζονται αμέσως τα δεδομένα.

2.2. Γενικά χαρακτηριστικά κρυσταλλογραφίας

Μια τυπική κρυσταλλογραφική ανάλυση μιας πρωτεΐνης είναι μια σειρά πειραματικών ή αναλυτικών διεργασιών (**εικόνα 10**). Αρχικώς, αναπτύσσονται κρύσταλλοι της πρωτεΐνης, συλλέγονται τα δεδομένα της περίθλασης ακτίνων Χ, προσδιορίζονται οι φάσεις και υπολογίζεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Στη συνέχεια, στο εσωτερικό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας τοποθετείται ένα ατομικό μοντέλο και τελικά αυτό το μοντέλο βελτιστοποιείται.



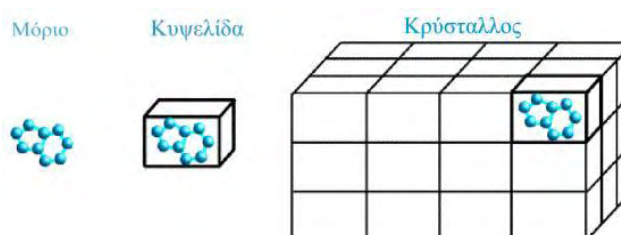
Εικόνα 10. Βήματα κρυσταλλογραφίας για εύρεση τη δομής μια πρωτεΐνης.

2.3. Κρύσταλλοι πρωτεϊνών

Οι κρύσταλλοι είναι μια φάση της στερεάς κατάστασης, στην οποία τα μόρια (ή άτομα) που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι περιοδικά διευθετημένα στο χώρο.

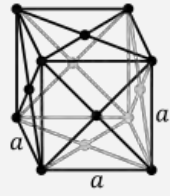
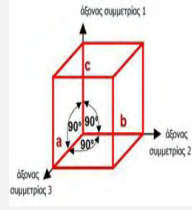
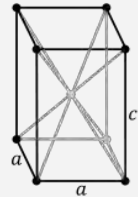
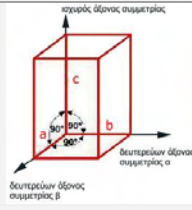
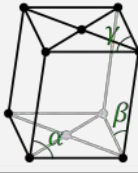
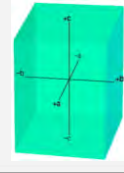
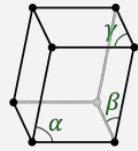
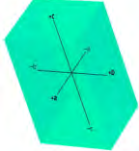
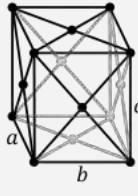
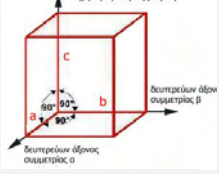
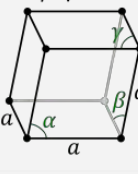
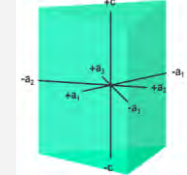
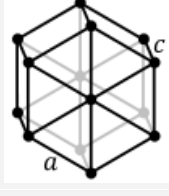
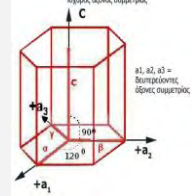
Τα κυριότερα γνωρίσματα των κρυστάλλων είναι η συμμετρία, η περιοδικότητα και το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ανάλογα με την διευθέτησή τους, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ανισότροπα.

Η βασική δομική μονάδα του κρυστάλλου είναι η στοιχειώδης κυψελίδα. Σαν στοιχειώδης κυψελίδα ορίζεται η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα, η οποία αντιπροσωπεύει πλήρως την κρυσταλλική δομή. Ένας κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα (**εικόνα 11**). Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.



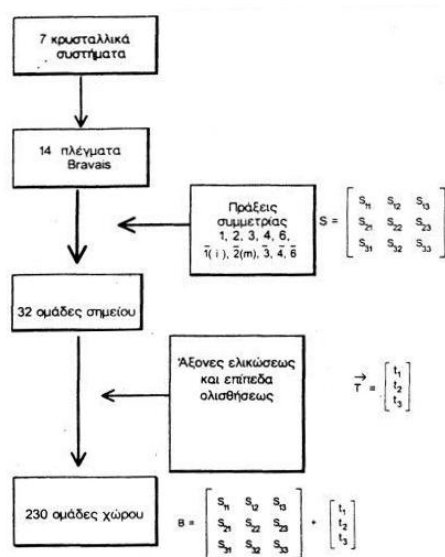
Εικόνα 11. Απεικόνιση στοιχειώδους κυψελίδας. Ο κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό.

Το μέγεθος και η δομή της στοιχειώδους κυψελίδας περιγράφεται από τρία διανύσματα a , b και c , τα οποία έχουν ένα κοινό σημείο επαφής, μια γωνία της κυψελίδας. Τα διανύσματα αυτά σχηματίζουν τους άξονες, οι οποίοι καλούνται κρυσταλλογραφικοί άξονες. Κάθε διάνυσμα σχηματίζει με κάποιο άξονα αναφοράς μια γωνία (α , β , γ). Συνεπώς, το σύνολο των διανυσμάτων a , b , c και των γωνιών α , β , γ που σχηματίζουν μεταξύ τους, ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα. Αντίστοιχα, το σημειακό πλέγμα του κρυστάλλου της πρωτεΐνης είναι δυνατόν να ορισθεί με ακρίβεια αν μετατοπιστούν διαδοχικά τα διανύσματα a , b , c . Υπάρχουν 14 είδη πλεγμάτων, τα πλέγματα Bravais, τα οποία κατανέμονται σε 7 κρυσταλλικά συστήματα (**πίνακας 3**).

Κρυσταλλικό Σύστημα	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά	Πλέγματα Bravais	Σχηματική Απεικόνιση	
Κυβικό	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I F		
Τετραγωνικό	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I		
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$ και $\beta > 90^\circ$	P C		
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	P		
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I C F		
Τριγωνικό ή ρομβοεδρικό	$a = b = c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	R		
Εξαγωνικό	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	P		

Πίνακας 3. 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 (εικόνα 12). Κάθε ομάδα χώρου σχετίζεται με μια κρυσταλλική τάξη. Ωστόσο, τα βιολογικά μακρομόρια (πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) επειδή εμφανίζουν μόνο ένα οπτικό ισομερές, κρυσταλλώνονται σύμφωνα με 65 ομάδες συμμετρίας χώρου.



Εικόνα 12. Από τα 7 κρυσταλλικά συστήματα στις 230 ομάδες 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 επίπεδου 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 .

2.4. Κρυστάλλωση Πρωτεϊνών

Η κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι το καθοριστικό βήμα στο προσδιορισμό της δομής της με κρυσταλλογραφία. 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 επιτευχθεί κρυστάλλωση είναι να δημιουργηθούν συνθήκες υπερκορεσμού. Αυτές οδηγούν σε μια κατάσταση ισορροπίας στην οποία η προς διάλυση ουσία διαφοροποιείται σε διαλύτη και στερεά φάση. 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.

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών βασίζεται κατά μεγάλο μέρος σε εμπειρικές παρατηρήσεις, επειδή δεν υπάρχει ακόμα θεωρία ικανή να ερμηνεύσει τον ακριβή μηχανισμό της κρυσταλλογένεσης. Η μείωση της διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης που προϋποθέτει η κρυσταλλογένεση μπορεί να γίνει με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

A) 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.

B) εφאלάτωση (salting in): για πολύ χαμηλές τιμές ιονικής ισχύος η διαλυτότητα των βιομορίων μειώνεται όσο ελαττώνεται η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη. Το γεγονός

αυτό οφείλεται στην μείωση των μη ειδικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φορτίων των βιομορίων και των ιόντων που βρίσκονται στο διάλυμα.

Γ) 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 στην δράση της συντελεί και το ότι η προσθήκη PEG στο διάλυμα μειώνει τον ωφέλιμο όγκο του διαλύτη.

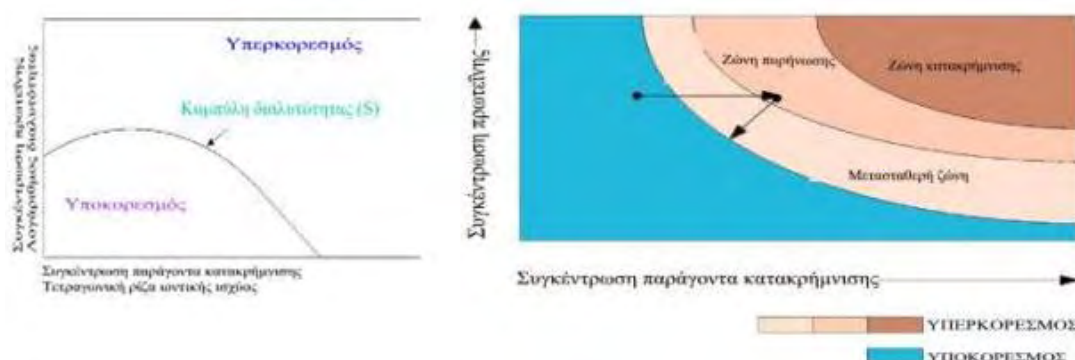
2.4.1. Στάδια κρυστάλλωσης

Τα διαγράμματα διαλυτότητας των πρωτεϊνών (**εικόνα 13**) συναρτήσει των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση (συγκέντρωση βιομορίου και παράγοντα κατακρήμνισης, θερμοκρασία, pH κτλ.) μπορούν να αποβούν πολύ χρήσιμα στην προσπάθεια παραγωγής κρυστάλλων αλλά έχουν το μειονέκτημα ότι απαιτούν πολύ χρόνο και κυρίως πολύ μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης. Ένα τέτοιο διάγραμμα συνήθως χωρίζεται σε δυο ζώνες: την ζώνη υποκορεσμού για χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης ή παράγοντα κατακρήμνισης, όπου η πρωτεΐνη είναι διαλυτή, και την ζώνη υπερκορεσμού για υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και παράγοντα κατακρήμνισης, όπου τα μόρια του βιομορίου εγκαταλείπουν την υγρή φάση και δημιουργούν συσσωματώματα. Στην περίπτωση που οι συνθήκες ευνοούν την κρυσταλλογένεση, η ζώνη υπερκορεσμού (**εικόνα 13**) μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις υποπεριοχές:

α) τη ζώνη πυρήνωσης, στην οποία δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων, δηλαδή μικροσκοπικές οργανωμένες μορφές βιομοριακών συσσωματωμάτων.

β) τη μετασταθερή ζώνη στην οποία δεν μπορούν να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλων, αλλά μπορούν να μεγαλώνουν ήδη προϋπάρχοντες πυρήνες, και

γ) τη ζώνη κατακρήμνισης, όπου δημιουργείται άμορφο ίζημα, δηλαδή άτακτη οργάνωση των βιομοριακών συσσωματωμάτων.



Εικόνα 13. Α) Διάγραμμα διαλυτότητας. Β) Στάδια κρυστάλλωσης

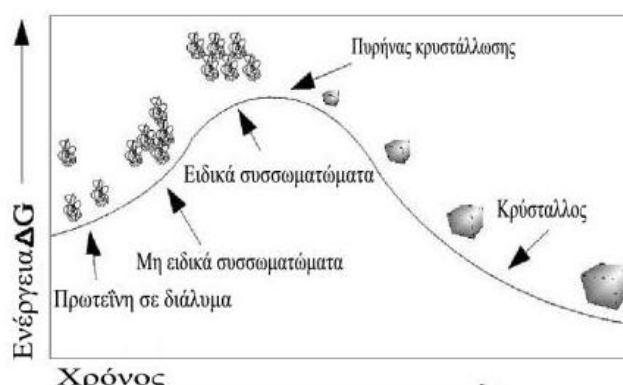
Η διαδικασία της πυρήνωσης ευνοείται θερμοδυναμικά αν υπάρχουν στο διάλυμα μερικά ξένα σωματίδια, που λειτουργούν ως κέντρα πυρήνωσης. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται να έχει υψηλό βαθμό καθαρότητας.

2.4.1.1. Πυρήνωση

Στο στάδιο αυτό 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. Συνεπώς, προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη κρυστάλλου στο υπέρκορο διάλυμα, το σύστημα θα πρέπει να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα που ονομάζεται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης (Kam et al., 1978).

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. Μόλις όμως δημιουργηθεί πυρήνας τότε ξεκινά η αυθόρμητη ανάπτυξη του συσσωματώματος (**εικόνα 14**). Παράλληλα

μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν (Kam et al., 1978). Ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστεί ο πυρήνας ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες και την κρυσταλλική δομή. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στο στάδιο της πυρήνωσης, η μια οδηγεί στη δημιουργία κρυσταλλικής δομής ενώ η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος.



Εικόνα 14. Απεικόνιση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης.

2.4.1.2. Ανάπτυξη Πυρήνων

Σε αυτό το στάδιο αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης των κρυστάλλων. Τα μόρια πρωτεΐνης επικάθονται από το διάλυμα στο σχηματισμένο πυρήνα, ενώ ταυτόχρονα προκαλείται μείωση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο διάλυμα λόγω διάχυσης των πρωτεϊνικών μορίων. Η μείωση αυτή είναι εντονότερη στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς το σχηματιζόμενο κρύσταλλο (Kam et al., 1978). Ο ρυθμός εναπόθεσης των πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου ορίζεται σύμφωνα με το νόμο του Fick:

$$\frac{dM}{dt} = D \left. \frac{dC}{dx} \right|_0 S$$

όπου,

$\frac{dC}{dx}|_0$: η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου

S: 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:

$$\frac{dM}{dt} = K[C_1(0) - C_1] S d$$

όπου,

$C_1(0)$: η συγκέντρωση στην κατάσταση κορεσμού

C_1 : η συγκέντρωση του διαλύματος

K: ο συντελεστής ταχύτητας ανάπτυξης

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι όσο πιο γρήγορα αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι τόσο αυξάνει ο αριθμός των πυρήνων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν στο τελικό διάλυμα περισσότεροι κρύσταλλοι μικρότερου μεγέθους.

2.4.1.3. Αναστολή ανάπτυξης κρυστάλλου

Η ταχύτητα ανάπτυξης κρυστάλλου ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Η αναστολή της ανάπτυξης είναι αποτέλεσμα της εξάντλησης της πρωτεΐνης στο διάλυμα αλλά πιθανόν να οφείλεται και σε κάποια μεταβολή στις ιδιότητες της επιφάνειας του κρυστάλλου (Kam et al., 1978).

2.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών (**πίνακας 4**) και συγκεκριμένα τη πιθανότητα εμφάνισής τους, το ρυθμό και την πιθανότητα εμφάνισης πυρήνων κρυστάλλωσης καθώς και το μέγεθος και την ποιότητά τους. Ένας ακόμη καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη κρυστάλλων είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Σε πολλές περιπτώσεις, η ύπαρξη στο διάλυμα υποστρώματος, συνενζύμου ή αναστολέα, συμβάλλει στο πιο συμπαγές και σταθερό πακετάρισμα του ενζύμου.

Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι	Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι	Καθαρότητα των μακρομορίων
Υπερκορεσμός (συγκέντρωση πρωτεΐνης και παραγόντων κατακρήμνισης)	Ευαισθησία της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες).	Μακρομοριακές επιμολύνσεις (με άλλα μακρομόρια ή άλλα μικρά μόρια)
Θερμοκρασία, pH (μεταβολές)		
Χρόνος (ρυθμοί εξισορρόπησης και αύξησης)		
Ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες)	Δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συμπαράγοντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα)	Δομική (μικρο)ετερογένεια (βαθμός και τρόπος πολυμερισμού, συσσωματώματα, αποδιάταξη)
Όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευών (επιφάνεια των συσκευών κρυστάλλωσης)		
Στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες (ομοιογενής, ετερογενής πυρήνωση)		
Φαινόμενα εξαρτημένα από την πυκνότητα ή το ιξώδες (διαφορές μεταξύ κρυστάλλου και μητρικού υγρού)	Ιδιότητες των πρωτεϊνών (οξειδωση, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα)	(Μικρο)ετερογένεια της ακολουθίας (πέψη από πρωτεάσες ή νουκλεάσες -τα κλάσματα μακρομορίων μπορεί να κρυσταλλώνουν ευκολότερα)
Πίεση, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία		
Δονήσεις και ήχος		
Σειρά των γεγονότων, επαναληψιμότητα (ερευνητής ή ρομπότ)	Γήρανση του δείγματος (οξειδοαναγωγικές μεταβολές, αποδιάταξη, αποικοδόμηση)	

Πίνακας 4. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

2.4.3. 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 τέσσερις κατηγορίες:

➤ **Άλατα** π.χ θειικά, φωσφορικά και κιτρικά άλατα

Τα άλατα δρουν κυρίως αφυδατώνοντας τις πρωτεΐνες σε ένα συναγωνισμό για μόρια νερού που προκύπτουν στο διάλυμα και τα οποία είναι απαραίτητα για τη διαλυτοποίηση. Όταν η συγκέντρωση των αλάτων γίνει αρκετά μεγάλη δεν θα υπάρχουν μόρια διαλύτη για να διαλυτοποιηθούν τα μακρομόρια. Οπότε, τα μακρομόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και είναι πιθανή η εμφάνιση κρυστάλλων ή άμορφου ιζήματος.

➤ **Πτητικοί οργανικοί διαλύτες** π.χ αιθυλενική αλκοόλη

Οι οργανικοί διαλύτες πρέπει να χρησιμοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Συχνά μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, για αυτό θα πρέπει διατηρείται η ιονική ισχύς σε χαμηλά επίπεδα, ώστε να αποφευχθεί η αποδιάταξη.

➤ **Μακρομοριακά πολυμερή** π.χ πολυαιθυλενική γλυκόλη 6000

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 τα άλλα μόρια να διαθέτουν πολύ λιγότερο χώρο για τη διαλυτοποίηση με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται και να σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία τελικά σχηματίζουν κρυστάλλους.

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

π.χ πολυαιθυλενικές γλυκόλες με μοριακό βάρος μικρότερο από 1000 και η 3,4-μέθυλο πεντενδιόλη (MPD)

2.5. Ακτίνες Χ

Για να προσδιοριστεί η δομή μιας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η χρήση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος, η οποία αφού προσπίπτει στην πρωτεΐνη να μπορεί να δώσει ανιχνεύσιμο σήμα, από το οποίο και θα λάβουμε τη δομή. Η ακτινοβολία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι οι ακτίνες Χ, οι οποίες προσπίπτουν σε κρυστάλλους της πρωτεΐνης, σκεδάζονται και δίνουν τα απαραίτητα δεδομένα. Με κατάλληλη επεξεργασία με ηλεκτρονικά προγράμματα προκύπτει η δομή της πρωτεΐνης. Οι ακτίνες Χ χρησιμοποιούνται διότι το μήκος κύματός τους είναι τέτοιο που επιτρέπει να επιτύχουμε ατομική διακριτικότητα της δομής. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με ακτίνες Χ και ουσιαστικά εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι οι ακτίνες Χ περιθλώνται από τους κρυστάλλους των πρωτεϊνών.

Το τμήμα του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που καλύπτουν οι ακτίνες Χ είναι 0,1-100 Å μήκος κύματος. Οι ακτίνες Χ παράγονται όταν ηλεκτρόνια μεταπίπτουν από ένα υψηλότερο σε ένα χαμηλότερο ενεργειακό δυναμικό. Για την κρυσταλλογραφία αυτό που απαιτείται είναι όσο το δυνατόν πιο ισχυρή, παράλληλη, μονοχρωματική και ομοιογενής δέσμη ακτίνων Χ. Το συνεχές πολυχρωματικό φάσμα δεν είναι κατάλληλο για κρυσταλλογραφικά πειράματα και αφαιρείται με χρήση φίλτρων. Η μονοχρωματικότητα είναι απαραίτητη διότι η διάμετρος της σφαίρας ανάκλασης είναι $1/\lambda$, οπότε η πηγή που παράγει δυο διακριτά μήκη κύματος δίνει δυο σφαίρες ανάκλασης και δυο διάσπαρτα σύνολα ανακλάσεων με αποτέλεσμα να γίνεται σχεδόν αδύνατος ο προσδιορισμός των δεικτών λόγω των επικαλυπτόμενων ανακλάσεων (Rhodes, 1999).

Οι εργαστηριακές πηγές ακτίνων Χ χρησιμοποιούν την ακτινοβολία που παράγεται όταν ηλεκτρόνια κατάλληλης ενέργειας προσκρούουν σε μεταλλικό στόχο. Ηλεκτρόνια παράγονται έπειτα από θέρμανση της καθόδου. Λόγω της υψηλής τάσης τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται και προσπίπτουν στον μεταλλικό στόχο-άνοδο. Στην άνοδο χρησιμοποιείται μέταλλο κατάλληλου ατομικού αριθμού, συνήθως χαλκός και κοβάλτιο. Στη συνέχεια, λόγω των τυχαίων συγκρούσεων με τα

άτομα του στόχου, τα ηλεκτρόνια επιβραδύνονται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ενός συνεχούς πολυχρωματικού φάσματος. Όταν η ενέργεια των ηλεκτρονίων είναι κατάλληλη, προκαλούνται μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εσωτερικών στοιβάδων του μετάλλου-στόχου. Η αποδιέγερση αυτών των ατόμων γίνεται με εκπομπή μονοχρωματικής ακτινοβολίας, η συχνότητα της οποίας εξαρτάται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των στοιβάδων, δηλαδή είναι χαρακτηριστικές των ατόμων του μετάλλου-στόχου (Blundel & Johnson, 1976).

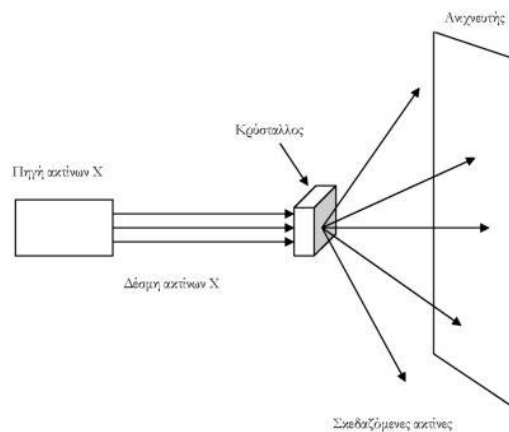
Υπάρχουν δυο κύρια είδη πηγών ακτίνων Χ, οι συμβατικές και οι συγχροτρονικές πηγές. Οι συμβατικές πηγές ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από επιτάχυνση ηλεκτρονίων και στη συνέχεια μετάπτωση ηλεκτρονίων εσωτερικών στοιβάδων του μετάλλου-στόχου. Οι πιο συνηθισμένες είναι οι σωλήνες ακτίνων Χ και οι σωλήνες με περιστρεφόμενη άνοδο. Στους σωλήνες ακτίνων Χ αντιμετωπίζεται πρόβλημα υπερθέρμανσης του μεταλλικού στόχου λόγω της υψηλής τάσης. Συνεπώς, το σύστημα θα πρέπει να ψύχεται συνεχώς. Το ίδιο πρόβλημα αντιμετωπίζεται και με τους σωλήνες με περιστρεφόμενη άνοδο.

Στις συγχροτρονικές πηγές χρησιμοποιούνται επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων), οι οποίοι προκαλούν τη κίνηση των σωματιδίων σχεδόν σε ταχύτητα φωτός. Κατά την αλλαγή κατεύθυνσής τους παράγεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Οι επιταχυντές σωματιδίων είναι γιγάντιοι δακτύλιοι, όπου τα ηλεκτρόνια υποκινούνται από ενέργεια, η οποία προέρχεται από πομπούς ραδιοσυχνότητας. Η κίνηση τους διατηρείται σε μια κυκλική τροχιά με τη βοήθεια πανίσχυρων μαγνητών εκπέμποντας ενέργεια με τη μορφή συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Με χρήση πηγών συγχροτρονικής ακτινοβολίας, η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων γίνεται μέσα σε λίγα λεπτά. Επίσης, με τη δυνατότητα παραγωγής πολύ ισχυρής δέσμης, σε σχέση με αυτή των συμβατικών πηγών, κατέστη δυνατή η συλλογή δεδομένων από περίπλοκες δομές ή μικρούς κρυστάλλους, οι οποίοι είναι δύσκολο να δώσουν επαρκή περίθλαση.

■ Βασικές αρχές περίθλασης ακτίνων Χ:

Οι ακτίνες Χ κατά την πρόσπτωσή τους αυξάνουν τη θερμοκρασία του κρυστάλλου, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες από τα μόρια του διαλύτη και έτσι καταστρέφεται ο κρύσταλλος. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί αν η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιηθεί κάτω από κρυοσκοπικές συνθήκες, δηλαδή σε θερμοκρασία $\sim 100^\circ\text{K}$.

Στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, ένας κρύσταλλος βομβαρδίζεται από ακτίνες Χ τις οποίες και περιθλά (**εικόνα 15**). Περίθλαση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το φως ή οποιοδήποτε άλλο κύμα αποκλίνει από την ευθύγραμμη πορεία του όταν συναντήσει εμπόδιο. Στην περίπτωση που το εμπόδιο στο οποίο προσπίπτουν οι ακτίνες Χ είναι κρύσταλλος εμφανίζονται κάποιες ιδιαιτερότητες. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ακτίνες Χ αλληλοαναιρούνται. Όταν όμως προέρχονται από ορισμένες γωνίες πρόσπτωσης αλληλοενισχύονται και παράγουν δέσμες περιθλώμενης ακτινοβολίας, οι οποίες μπορούν να καταγραφούν και να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή.



Εικόνα 15. Περίθλαση ακτίνων Χ έπειτα από βομβαρδισμό του κρυστάλλου.

Η περίθλαση από έναν κρύσταλλο αντιστοιχεί σε ανακλάσεις από σύνολα παράλληλων επιπέδων. Ο Bragg έδειξε ότι η περίθλαση συμβαίνει μόνο όταν για δυο γειτονικά επίπεδα, η διαφορά στην διαδρομή των ακτίνων είναι ίση με το μήκος κύματος της δέσμης των ακτίνων Χ. Αυτή η απόσταση εξαρτάται από την

γωνία της ανάκλασης μεταξύ της κύριας δέσμης και των επιπέδων και δίνεται από τη σχέση:

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

όπου, λ : μήκος κύματος ακτίνων X

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

θ : η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας

d : η ισαπόσταση δικτυωτών επιπέδων

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

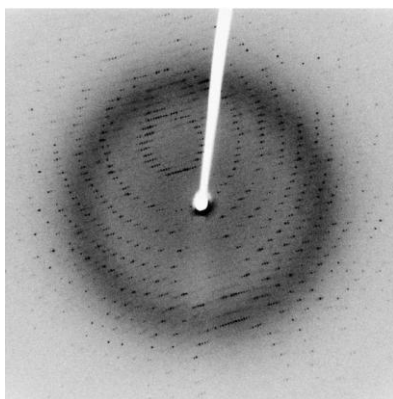
$$F_{hkl} = f(\rho_1) + f(\rho_2) + \dots + f(\rho_n) = \sum_x \sum_y \sum_z \rho(x, y, z) \underbrace{e^{2\pi i(hx+ky+lz)}}_{\text{κυματική συνάρτηση}}$$

\uparrow Παράγων δομής \uparrow Συνεισφορά από μία περιοχή ρ_2

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

2.6. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των δεδομένων πρέπει να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, για να αποφευχθεί η καταστροφή του κρυστάλλου. Αρχικός στόχος είναι να καταγραφούν οι εντάσεις και να υπολογιστούν οι δείκτες Miller. Επειδή δεν υπάρχει κατάλληλος φακός ώστε να συγκεντρώνει τις ακτίνες X και να έχουμε την απεικόνιση του μορίου, χρησιμοποιούνται κατάλληλοι ανιχνευτές. Έτσι, το πρότυπο των περιθλάσεων αποτυπώνεται στα περιθλασιγράμματα (**εικόνα 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 ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μορίου, με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών.



Εικόνα 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', άμεσοι μέθοδοι, η συνάρτηση Patterson, η μέθοδος βαριού ατόμου, μέθοδος ισόμορφης αντικατάστασης και η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης.

2.7. Ερμηνεία χαρτών-Βελτίωση Δομής

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

3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η οξειδάση της ξανθίνης και η αφυδρογονάση της ξανθίνης είναι οι δύο μορφές του ενζύμου οξειδοαναγωγή της ξανθίνης. Πρόκειται για μόλυβδο-ένζυμα που περιέχουν φλαβινοπρωτεΐνες και αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες μονάδες των 145 kDa. Σε φυσιολογικές συνθήκες, αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές οδούς όπως η υδροξυλίωση πουρινών, πτερινών, αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση ή στην ενεργοποίηση ενδογενών ενώσεων και ξενοβιοτικών. Ωστόσο, η οξειδάση της ξανθίνης φαίνεται ότι διαδραματίζει και ένα πολύ σημαντικό ρόλο σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Συνεπώς, η ανάπτυξη αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης αποτελεσματικότερων, πιο ισχυρών και με καλύτερο φαρμακοδυναμικό προφίλ σε σύγκριση με του αναστολέα αλλοπουρινόλη/οξυπουρινόλη είναι απαραίτητη.

Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης, στη παρούσα εργασία πραγματοποιούνται προσπάθειες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης για εύρεση σημαντικών πληροφοριών για τη δομή της. Αρχικός στόχος ήταν η απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα και ο εκτενής καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγένειας με χρήση της στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid και με χρωματογραφία μοριακής διήθησης με στήλη Sephadex G-25. Απαραίτητη προϋπόθεση πριν τις δοκιμές κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης αποτέλεσε η εύρεση της δραστηρότητας του ενζύμου με χρήση του υποστρώματός του, της ξανθίνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμές κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης παρουσία του αναστολέα της, την αλλοπουρινόλη, σε διαφορετικές συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα ώστε να βρεθούν οι συνθήκες ανάπτυξης κρυστάλλου. Για την βελτιστοποίηση των κρυστάλλων, ώστε να είναι εφικτή η συλλογή αποτελεσμάτων με ακτίνες Χ, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και με διαφορετικές τεχνικές κρυστάλλωσης. Συγκεκριμένα, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας και της επικαθήμενης σταγόνας.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΥΛΙΚΑ

4.1.1. Αντιδραστήρια

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο ύδωρ και HPLC ύδωρ 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, Fermentas, Lennox και Riedel-de Haen. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Quick Start™ Bradford της εταιρείας Bio-Rad. Η οξειδάση της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για σύγκριση με την XO που απομονώθηκε από γάλα ήταν της εταιρείας SIGMA (grade III).

4.1.2. Υλικά συμπύκνωσης πρωτεϊνών

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

4.1.3. 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. Ενώ, η πραγματοποίηση χρωματογραφίας έγινε με χρήση της αντλίας Peristaltic Pump P-1 και του κλασματοσυλλέκτη SuperFrac™ Fraction Collector της εταιρείας GE Healthcare.

4.1.4. Όργανα

Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R erppendorf, ψυχώμενη φυγόκεντρος τύπου sorvall, RC5-C (DuPont, Wilmington-USA), μινι- φυγόκεντρος τύπου erppendorf centrifuge 5415D, συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad), φωτόμετρο (Spectronic Instruments, Spectronic® 20 Genesys), φωτόμετρο UV (Spectronic Unicam Genesys 10UV), Vortex (MS2 Minishaker, IKA®), αναδευτήρας τύπου GFL 3015, πεχάμετρο (744 pH Meter, Ω. Metrohm), αντλία κενού Buchner (Pall, Live Sciences) και ζυγός (KERN, Ew).

4.1.5. Υλικά κρυσταλλώσεων

Για τη πραγματοποίηση των κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήθηκαν πλάκες Linbro, καλυπτρίδες σιλικόνης 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 κρυογονικό σύστημα διπλού ομοκεντρικού ρεύματος αζώτου, του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας, ΕΙΕ.

4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα

Για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή το βόειο γάλα. Το γάλα πριν χρησιμοποιηθεί φιλτράρεται μέσω γάζας για να απομακρυνθούν διάφορα υπολείμματα και σκόνες που μπορεί να περιέχει. Η διαδικασία διακρίνεται στα ακόλουθα στάδια:

Στάδιο 1: Αρχικώς, το γάλα φυγοκεντρείται στις 2000g, 4°C για 30 λεπτά και συλλέγεται με προσοχή η λευκή κρέμα που σχηματίζεται στην επιφάνεια του γάλακτος. Αν η θερμοκρασία κατά την φυγοκέντρωση πέσει κάτω των 4°C παρατηρείται ο σχηματισμός βουτύρου ανάμεσα στην κρέμα με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός τους. Σε αυτή τη περίπτωση απαιτείται η θέρμανση στους 30°C έως ότου διαλυθεί το βούτυρο και μπορεί να απομονωθεί η κρέμα. Η αναλογία κρέμας ανά lt γάλακτος είναι: 120gr κρέμα/ lt γάλα. Στη συνέχεια, η κρέμα επαναδιαλύεται σε τρεις όγκους (100gr κρέμα σε 300ml διάλυμα) διαλύματος (0,2M K_2HPO_4 , 0,2mM EDTA, 5mM cysteine-HCl, 1mM sodium salicylate) υπό ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού η κρέμα επαναδιαλυθεί ρυθμίζεται το pH=8-8,3 και επωάζεται υπό απαλή ανάδευση (85rpm) για 2 ώρες στους 38°C. Έπειτα, προστίθεται παγκρεατίνη σε αναλογία 1,6gr παγκρεατίνης/1lt διαλύματος κρέμας και αφήνεται να διαλυθεί υπό ανάδευση με μαγνητάκι σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολουθεί επώαση της κρέμας στους 37,5°C υπό ανάδευση (85rpm) για 3 ώρες. Η κρέμα φυλάσσεται στους 4°C για 12-16 ώρες.

Στάδιο 2: Όλα τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται στους 4°C. Η κρέμα μετά την φύλαξή της στους 4°C παρατηρείται ότι πήζει. Για το λόγο αυτό προστίθεται στη κρέμα ένας όγκος διαλύματος (0,2M K_2HPO_4 , 0,2mM EDTA, 5mM cysteine-HCl, 1mM sodium salicylate) και αφήνεται να επαναδιαλυθεί. Στη συνέχεια, υπό πολύ γρήγορη ανάδευση προστίθεται 15%v/v 1-βουτανόλη (παγωμένη στους -20°C). Η προσθήκη της βουτανόλης πραγματοποιείται μέσα σε 10-20 λεπτά. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητα της βουτανόλης η κρέμα αφήνεται υπό απαλή ανάδευση για 10 λεπτά. Τέλος, προστίθεται θειικό αμμώνιο σε αναλογία 15gr /100ml κρέμας υπό απαλή ανάδευση. Το θειικό αμμώνιο είναι σημαντικό να προστίθεται στη κρέμα με πολύ αργό ρυθμό και να έχει διαλυθεί όλη η ποσότητά του πριν προστεθεί η επόμενη. Τέλος, η κρέμα αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση για 50 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια σε ηρεμία για 12-16 ώρες.

Στάδιο 3: Έπειτα από φυγοκέντρηση στα 5000g, 4°C για 30 λεπτά παρατηρείται ο σχηματισμός 3 φάσεων. Στο επάνω μέρος σχηματίζεται η φάση του οργανικού διαλύτη (βουτανόλη), στην ενδιάμεση φάση το λίπος και στο κάτω μέρος σχηματίζεται η υδατική φάση. Με προσοχή αφαιρείται με αντλία κενού η επάνω φάση του οργανικού διαλύτη και με ένα κουτάλι η μεγαλύτερη ποσότητα λίπους. Ωστόσο, δεν είναι δυνατή η απομάκρυνση όλου του στερεού λίπους με αυτό τον τρόπο διότι κατά την φυγοκέντρηση μέρος του λίπους εισέρχεται μέσα στην υδατική φάση. Για το σκοπό αυτό, τα υπολείμματα λίπους απομακρύνονται από την υδατική φάση έπειτα από φιλτράρισμα μέσω υαλοβάμβακα. Αν το λίπος είναι σε πολύ μεγάλη ποσότητα απαιτείται η υδατική φάση να διέλθει μέσω υαλοβάμβακα και δεύτερη φορά. Στη συνέχεια, προστίθεται με αργό ρυθμό και υπό χαμηλή ανάδευση θειικό αμμώνιο σε αναλογία 20gr /100ml υδατικής φάσης. Τέλος, η κρέμα αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση για 30 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια σε ηρεμία για 8 ώρες.

Στάδιο 4: Έπειτα από την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες επιπλέουν στην επιφάνεια του διαλύματος (σχηματισμός λευκής κρούστας στην επιφάνεια). Με ένα ποτήρι ζέσεως συλλέγονται οι πρωτεΐνες που επιπλέουν (μαζί με ελάχιστο από το διάλυμα που βρίσκεται από κάτω) και φυγοκεντρούνται στις 9500g, 4°C για 30 λεπτά. Παρατηρείται ο σχηματισμός 3 φάσεων. Επάνω βρίσκεται η φάση του οργανικού διαλύτη και κάτω η υδατική φάση. Ενδιάμεσα βρίσκεται το καφέ ίζημα στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες. Με προσοχή αποχύνονται οι φάσεις του οργανικού διαλύτη και της υδατικής και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα A (40mM Tris-HCl pH 7,8, 20mM sodium pyrophosphate pH 8,5, 0,2mM EDTA). Κατόπιν, το πρωτεϊνικό διάλυμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του ιδίου διαλύματος, με συχνές αλλαγές του διαλύματος, για 24 ώρες στους 4°C. Τέλος, το πρωτεϊνικό διάλυμα φυγοκεντρείται στις 14000g, 18°C για 30 λεπτά και συλλέγεται με προσοχή το υπερκείμενο. Το δείγμα φυλάσσεται στους 4°C και ελέγχεται ως προς την ύπαρξη

δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης σε αυτό, πριν απομονωθεί με χρωματογραφία συγγένειας.

4.2.2. Χρωματογραφία συγγένειας- EAH Sepharose 4B/folic Acid

Για περαιτέρω καθαρισμό και απομόνωση μόνο της επιθυμητής πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται 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. Ουσιαστικά, η αλλοπουρινόλη ανταγωνίζεται το φολικό οξύ ως προς τη δέσμευση της οξειδάσης της ξανθίνης.

4.2.2.1. Δημιουργία στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid

Η δημιουργία της στήλης συγγένειας για την οξειδάση της ξανθίνης απαιτεί αρχικώς την ενεργοποίηση των σφαιριδίων EAH Sepharose 4B με φολικό οξύ και στην συνέχεια την απομάκρυνση της περίσσειας φολικού οξέος για να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση πρωτεϊνών.

▪ Ενεργοποίηση σφαιριδίων με φολικό οξύ:

Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη από 14ml στήλης EAH Sepharose 4B πραγματοποιείται έκπλυσή της με 10 όγκους στήλης dH₂O, pH=4,5 και στη συνέχεια με 1lt 0,5M NaCl, το οποίο προστίθεται σταδιακά ανά έναν όγκο στήλης. Έπειτα, αφού η στήλη καλυφθεί με αλουμινόχαρτο προστίθεται σε αυτή διάλυμα φολικού οξέος (πίνακας 5) και στη συνέχεια προστίθενται 187,5mg EDC.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DMF 100%	10ml
dH ₂ O	10ml
Φολικό οξύ	57μmol
Ρύθμιση pH=6 (με πεχαμετρικό χαρτί) με 10N NaOH	

Πίνακας 5. Διάλυμα ενεργοποίησης σφαιριδίων EAH Sepharose 4B με φολικό οξύ

Η στήλη αφήνεται υπό χαμηλή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Μέσα στη πρώτη ώρα ελέγχεται το pH και σε περίπτωση που έχει ελαττωθεί ρυθμίζεται στο pH=6 με 1N NaOH. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 2500g, 4°C για 10 λεπτά και απομακρύνεται με προσοχή το υποκίτρινο υπερκείμενο και στα σφαιρίδια προστίθενται άλλα 20ml διαλύματος φολικού οξέος (**πίνακας 5**) με 187,5mg EDC και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Κατόπιν, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 2500g, 4°C για 10 λεπτά και αποχύνεται το υπερκείμενο. Σε περίπτωση που το υπερκείμενο παραμένει υποκίτρινο η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες 3 ώρες με φρέσκο διάλυμα φολικού οξέος. Σε κάθε επώαση με φολικό οξύ είναι απαραίτητος ο έλεγχος και η ρύθμιση του pH=6 με 1N NaOH μέσα στη πρώτη ώρα ενώ σε όλη τη διαδικασία αποφεύγεται η έκθεση του εναιωρήματος στο φως.

▪ Απομάκρυνση περίσσειας φολικού οξέος

Για την απομάκρυνση της περίσσειας φολικού οξέος είναι απαραίτητη η διαδοχική διαβίβαση από τη στήλη 3 όγκων στήλης διαλύματος 1 (0,1M Acetate, 0,5M NaCl, 50%DMF με pH=4) και στη συνέχεια 3 όγκων στήλης διαλύματος 2 (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 50%DMF με pH=8). Η διαδικασία εναλλαγής των pH επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές. Τέλος, πραγματοποιείται έκπλυση της στήλης με 5 όγκους στήλης 50%DMF και στη συνέχεια με 10 όγκους στήλης dH₂O. Η στήλη φολικού οξέος αφήνεται στους 4°C για να αποκτήσει τη θερμοκρασία στην οποία θα πραγματοποιηθεί και το πακετάρισμά της στην άδεια κολώνα.

4.2.2.2. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη φολικού οξέος

Πριν τη εισαγωγή του πρωτεϊνικού δείγματος που απομονώθηκε από το γάλα (ενότητα 4.2.1) στη στήλη φολικού οξέος απαιτείται η φυγοκέντρωσή του στις 12000g, 4°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια, η διαβίβαση του υπερκειμένου μέσω

φίλτρου με 0,22μm διάμετρο πόρων. 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 την διαπερνούν. Η έκλουσή της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται με αλλοπουρινόλη. Κατά το δεύτερο στάδιο, η οξειδάση της ξανθίνης που είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη διαβιβάζεται ξανά από στήλη φολικού οξέος. Το πολύ ενεργό ένζυμο διαπερνά τη στήλη, ενώ το χαμηλής ενεργότητας ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη.

Στάδιο 1: Αρχικά πριν τη χρήση της στήλης φολικού οξέος για τον καθαρισμό της οξειδάσης της ξανθίνης απαιτείται η εξισορρόπηση της με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος Α (**πίνακας 6**). Εν συνεχεία, διαβιβάζεται με αργό ρυθμό το πρωτεϊνικό δείγμα στη στήλη και συλλέγονται κλάσματα του 1,5ml (flowthrough). Παρατηρείται ότι καθώς διέρχεται από τη στήλη το δείγμα, η στήλη αποκτά ελαφρώς καφέ χρώμα. Όταν το καφέ χρώμα καλύψει το 1/3 του όγκου της στήλης (στο επάνω τμήμα της) σταματά η εισαγωγή δείγματος και αρχίζει η πλύση της στήλης με τουλάχιστον 4 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος Β (**πίνακας 6**). Κατά την διαδικασία πλύσεων παρακολουθείται η απορρόφηση των κλασμάτων που συλλέγονται (wash κλάσματα) στα 280nm. Τα κλάσματα αυτά περιέχουν πρωτεΐνες που κατακρατούνται ασθενώς στη στήλη. Η πλύση της στήλης συνεχίζεται έως ότου η απορρόφηση των κλασμάτων είναι μηδενική. Έπειτα, για την έκλυση της οξειδάσης της ξανθίνης από τη στήλη (elution κλάσματα) διαβιβάζονται 2 όγκοι στήλης διαλύματος C (**πίνακας 6**) και στη συνέχεια σταματά η ροή για 1 ώρα. Κατόπιν, επαναφέρεται η ροή στη στήλη και αφήνεται να διέλθει διάλυμα C, τουλάχιστον άλλοι 3 όγκοι, μέχρις ότου η απορρόφηση των κλασμάτων στα 280nm να είναι μηδέν. Τέλος, στη στήλη διαβιβάζονται 5 όγκοι διαλύματος D (**πίνακας 6**) και στη συνέχεια 10 όγκοι dH₂O.

Διάλυμα Α	Διάλυμα Β	Διάλυμα C	Διάλυμα D
80% 50mM Tris-HCl, 0,2mM EDTA (pH 7,8)	70% 50mM Tris-HCl, 0,2mM EDTA (pH 7,8)	70% 50mM Tris-HCl, 0,2mM EDTA (pH 7,8)	0,1M sodium pyrophosphate pH 8,5
20% 0,1M sodium pyrophosphate, 0,2mM EDTA (pH 8,5)	30% 0,1M sodium pyrophosphate, 0,2mM EDTA (pH 8,5)	30% 0,1M sodium pyrophosphate, 0,2mM EDTA (pH 8,5)	-
-	-	2,5mM allopurinol	-

Πίνακας 6. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων στήλης φολικού οξέος.

Όλα τα στάδια καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης ελέγχονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ή 12%. Τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και υποβάλλονται σε O/N διαπίδυση στους 4°C σε διάλυμα Α (πίνακας 6).

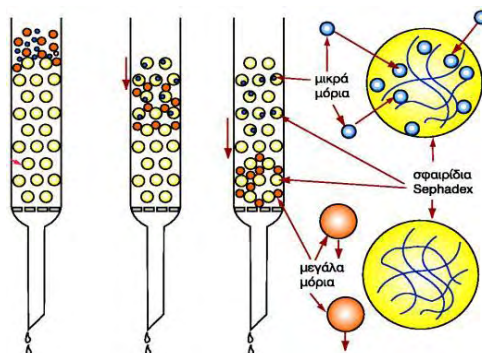
Στάδιο 2: Αρχικώς, η οξειδάση της ξανθίνης που είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη από το στάδιο 1 συμπυκνώνεται με χρήση PEG40000 σε όγκο που αντιστοιχεί στο 10-20% του όγκου στήλης φολικού οξέος. Αφού η στήλη εξισορροπηθεί με 10 όγκους διαλύματος Α, διαβιβάζεται σε αυτήν το δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης. Έπειτα, πραγματοποιείται πλύση της στήλης με διάλυμα Β έως ότου η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280nm να είναι μηδενική και συλλέγονται κλάσματα όγκου 1,5ml. Η υψηλής ενεργότητας οξειδάση της ξανθίνης που βρίσκεται συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη δεν δεσμεύεται στην στήλη. Το χαμηλής δραστηριότητας ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη και εκλούεται μόνο μετά τη διαβίβαση διαλύματος C. Όλα τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης ελέγχονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ή 12% και εξετάζονται για την ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας. 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 από αυτή.

4.2.3. Ενεργοποίηση οξειδάσης της ξανθίνης με $K_3Fe(CN)_6$

Στην οξειδάση της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη που απομονώθηκε κατά το στάδιο 2 της χρωματογραφίας συγγένειας φολικού οξέος προστίθεται 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% θειικό αμμώνιο υπό ήπια ανάδευση στους 4°C. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 14000g, 4°C για 30 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύεται στον ελάχιστο όγκο διαλύματος Α (πίνακας 6), ώστε να καταστεί έτοιμο για το επόμενο βήμα καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

4.2.4. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration), οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος κατά τη διέλευσή τους από υλικό με συγκεκριμένη διάμετρο πόρων. Μόρια με μέγεθος μεγαλύτερο από τη διάμετρο των πόρων δεν διέρχονται από το υλικό πλήρωσης της στήλης και εκλούνται πρώτα. Μόρια με μικρότερα μεγέθη, καθυστερούν περισσότερο μέσα στο υλικό πλήρωσης και εκλούνται αργότερα (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

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

▪ Προετοιμασία στήλης Sephadex G-25

Για να χρησιμοποιηθεί η στήλη Sephadex G-25 για χρωματογραφία μοριακής διήθησης απαιτείται η προετοιμασία των σφαιριδίων και το πακετάρισμα 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.

▪ Διαδικασία καθαρισμού οξειδάσης της ξανθίνης

Απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση καθαρισμού των πρωτεϊνών με τη στήλη Sephadex G-25 είναι η απαέρωση όλων των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν. Αρχικώς, η στήλη μοριακής διήθησης εξισορροπείται με 5 όγκους διαλύματος A (πίνακας 6) πριν χρησιμοποιηθεί. Μικρός όγκος οξειδάσης της ξανθίνης (0,1-1% του όγκου στήλης) φορτώνεται στην επιφάνεια της στήλης και αφήνεται να εισέλθει στους πόρους της. Στη συνέχεια, το επάνω μέρος της στήλης συνδέεται με την αντλία και το κάτω μέρος με τον κλασματοσυλλέκτη και πραγματοποιείται έκλουση με 2 όγκους διαλύματος A υπό ροή 0,7ml/min. Τα κλάσματα που συλλέγονται έχουν όγκο 1,4ml και φωτομετρούνται στα 280nm ώστε να εντοπιστούν τα κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνες. Η καθαρότητα της

οξειδάσης της ξανθίνης επιβεβαιώνεται ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ή 12%.

4.2.5. Κινητικές μελέτες οξειδάσης της ξανθίνης

Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίζεται με βάση την παραγωγή ουρικού οξέος λόγω οξείδωσης της ξανθίνης. Η ταχύτητα οξείδωσης του υποστρώματος μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά με την αύξηση της απορρόφησης λόγω παραγωγής ουρικού οξέος και να υπολογιστεί η Km του ενζύμου με διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (**πίνακας 7**). Αρχικώς, πραγματοποιείται μηδενισμός του φωτόμετρου με ρυθμιστικό διάλυμα (33mM KH_2PO_4 , 33mM Na_2HPO_4 , 0,1mM EDTA, pH=7,5) σε μήκος κύματος 295nm. Έπειτα, καταγράφεται η απορρόφηση του τυφλού του υποστρώματος και του ενζύμου. Το τυφλό υποστρώματος πραγματοποιείται στις ίδιες συγκεντρώσεις ξανθίνης (5μM, 10μM, 20μM, 30μM και 50μM) που θα πραγματοποιηθούν και οι δοκιμές δραστικότητας της XO. Τέλος, στη κυψελίδα προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα και η ξανθίνη και ακολουθεί ανάδευση. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ίδια ποσότητα ενζύμου και ίση με 5,264μg και ακολουθεί καταγραφή των απορροφήσεων σε μήκος κύματος 295nm ανά 10 δευτερόλεπτα για 10 λεπτά.

Αντιδραστήρια	Τυφλό ενζύμου	5μM ξανθίνη	10μM ξανθίνη	20μM ξανθίνη	30μM ξανθίνη	50μM ξανθίνη
Ρυθμιστικό διάλυμα	484μl	471,5μl	459μl	434μl	409μl	359μl
Διάλυμα ξανθίνης 200μM	-	12,5μl	25μl	50μl	75μl	125μl
Οξειδάση της ξανθίνης 0,329mg/ml	16μl	16μl	16μl	16μl	16μl	16μl

Πίνακας 7. Υπολογισμός δραστικότητας οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος- ξανθίνης.

Από τις οπτικές απορροφήσεις των δειγμάτων όπου έγινε η αντίδραση αφαιρείται το τυφλό υποστρώματος και το τυφλό ενζύμου. Για κάθε αντίδραση συλλέγεται ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης. Για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι, με τη χρήση του προγράμματος Grafit μπορεί να προσδιοριστεί η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης σύμφωνα με τον τύπο:

$$V = \frac{\text{όγκος κυψελίδας (0,5ml)} \times \text{ρυθμός αλλαγής απορρόφησης/ min}}{\text{Μοριακή απορροφητικότητα προϊόντος}}$$

Όπου,

Συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ουρικού οξέος: 9600 L/mol·cm

Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της K_m και της V_{max} . Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της μη γραμμικής παλινδρόμησης (non-linear fit), η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις (σ^2) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών της K_m και της V_{max} γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα για την κάθε μια. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα και το γράφημα Lineweaver-Burk.

4.2.6. 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) ή χωρίς (Native-PAGE ηλεκτροφόρηση).

4.2.6.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Κατά την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιείται το SDS, το οποίο είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στις πρωτεΐνες. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται πλήρως με τη θέρμανση των δειγμάτων για 5min στους 100°C, παρουσία των αποδιατακτικών παραγόντων. Για την διαδικασία ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (discontinuous PAGE) σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (Laemmli, 1970).

- Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή ακρυλαμιδίου/bis- ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δυο επιμέρους μέρη. Το πρώτο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή επιστοίβαξης (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 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

Πίνακας 8. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης συγκέντρωσης 5%.

Το δεύτερο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel, running gel), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδιου εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό (πίνακας 9).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση 8%	Συγκέντρωση 10%	Συγκέντρωση 12%
	Όγκος (ml)		
Ακρυλαμίδιο 30%	1,3	1,7	2,0
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3	1,3	1,3
SDS 10%	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,002	0,002
APS 10%	0,05	0,05	0,05
dH ₂ O	2,3	1,9	1,6

Πίνακας 9. Σύσταση πηκτής διαχωρισμού ανάλογα με το ποσοστό ακρυλαμίδιου.

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

- **Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων**

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά (loading buffer, 4x) (πίνακας 10) και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η αποδιάταξη επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 5 λεπτά.

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα/ Συγκέντρωση
Tris-HCl, (pH 6,8)	62,5mM
SDS 10%	2%
Γλυκερόλη	10%
β- Μερκαπτοαιθανόλη	2%
Bromophenol blue	0,05%

Πίνακας 10. Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer, 4x).

- **Διαδικασία ηλεκτροφόρησης**

Αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους φορτώνονται στις ειδικές αύλακες της πηκτής. Τέλος, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (**πίνακας 11**) , έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Γλυκίνη	14,41g
Tris	3,0275g
SDS	1g
dH ₂ O	Έως 1L

Πίνακας 11. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την 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.

4.2.6.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)

Η τεχνική αυτή διαφέρει κατά πολύ με την ηλεκτροφόρηση SDS- PAGE. Στην SDS ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το απορρυπαντικό SDS για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ στην Native-PAGE οι πρωτεΐνες δεν υποβάλλονται σε καμία επεξεργασία, βρίσκονται στη φυσική τους κατάσταση. Στη Native-PAGE ηλεκτροφόρηση τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών παραμένουν όσο το δυνατόν περισσότερο ενωμένα, όπως ακριβώς βρίσκονται στο κύτταρο.

- **Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης**

Στη Native-PAGE ηλεκτροφόρηση η πηκτή ακρυλαμιδίου/bis- ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δυο επιμέρους μέρη, όπως και στην SDS- PAGE. Το πρώτο τμήμα

αποτελείται από τη πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), όπου τα δείγματα των πρωτεϊνών πακετάρονται υπό σταθερά mA. Η πηκτή αυτή έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδιου (%), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών (πίνακας 12). Το δεύτερο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδιου εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό (πίνακας 12).

Αντιδραστήρια	Stacking gel Συγκέντρωση 4%	Separating gel Συγκέντρωση 7,5%
	Όγκος (ml)	
Ακρυλαμίδιο 30%	0,375	1,875
1,0M Tris-HCl (pH 6,8)	0,375	-
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	-	1,875
TEMED	0,004	0,004
APS 10%	0,025	0,04
ddH ₂ O	2,23	3,7

Πίνακας 12. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης και πηκτής διαχωρισμού της native ηλεκτροφόρησης.

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

- **Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων**

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά (loading buffer, 5x) (πίνακας 13)

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα/ Συγκέντρωση
Tris-HCl, (pH 6,8)	0,31M
Γλυκερόλη	50%
Bromophenol blue	0,05%

Πίνακας 13. Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer, 5x).

- **Διαδικασία ηλεκτροφόρησης**

Αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, τα δείγματα φορτώνονται στις ειδικές αύλακες της πηκτής. Τέλος, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (πίνακας 14) , έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος,

συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται σταθερή ένταση ρεύματος 20mA σε θερμοκρασία 4°C.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Γλυκίνη	14,4g
Tris	3g
dH ₂ O	Έως 1L
Ρύθμιση pH=8,3-8,5	

Πίνακας 14. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η χρώση της πηκτής ακρυλαμιδίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με Coomassie Brilliant Blue ή με νιτρικό άργυρο, ανάλογα με τον επιθυμητό βαθμό ευαισθησίας στην ανίχνευση πρωτεϊνών.

4.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

4.2.7.1. Χρώση με κυανό του Coomassie

Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωματισμού (staining solution: 40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 0,2%w/v Coomassie Brilliant Blue G-250) για 30 λεπτά υπό ανάδευση, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution: 40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ), μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.

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.

4.2.7.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO_3)

Η βαφή των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται αντί της πιο απλής μεθόδου με Coomassie Brilliant Blue για την 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.

Αρχικά, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα που αποτελείται από 50% μεθανόλη και 5% οξικό οξύ και αναδεύεται για 20 λεπτά (στάδιο καθήλωσης). Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος πραγματοποιείται έκπλυση της πηκτής με 50% μεθανόλη για 10 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθούν 5 πλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μια με dH_2O . Στη συνέχεια, η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (διάλυμα sensitize) και αναδεύεται για 30sec. Ακολουθούν 3 πλύσεις του ενός λεπτού με dH_2O και κατόπιν η πηκτή επωάζεται με 0,1% AgNO_3 (staining διάλυμα, 4°C) υπό απαλή ανάδευση για 20 λεπτά. Αφού απομακρυνθεί το staining διάλυμα πραγματοποιούνται 3 πλύσεις του ενός λεπτού με dH_2O . Κατόπιν, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα developer (2% Na_2CO_3 , 0,04% HCHO) και αναδεύεται απαλά έως ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες. Τέλος, για τον τερματισμό της αντίδρασης εμφάνισης, η πηκτή μεταφέρεται σε 5% οξικό οξύ (διάλυμα stopper) για 30 λεπτά. Η πηκτή αφού ξεπλυθεί με dH_2O φυλάσσεται στους 4°C.

4.2.8. Ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών

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

4.2.8.1. 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, μετριέται η απορρόφηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280nm και υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με βάση τον τύπο:

$$Molarity = (A_{280} \times \text{αραίωση}) / (5500 \text{ NW} + 4910 \text{ NY} + 125 \text{ NS-S})$$

ο οποίος λαμβάνει υπόψη την περιεκτικότητα σε κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσίνης (NW και NY οι αριθμοί των καταλοίπων τρυπτοφάνης και τυροσίνης αντίστοιχα) στη μετρούμενη πρωτεΐνη και NS-S ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών.

Ένας άλλος τρόπος για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε μήκος κύματος 280nm είναι η χρήση του συντελεστή αποσβέσεως για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η οξειδάση της ξανθίνης έχει $E^{1\%} = 11,7$. Συνεπώς, 1mg/ml οξειδάση της ξανθίνης δίνει $\epsilon = 1,17$.

4.2.8.2.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 το αντιδραστήριο σε περίσσεια προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα 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 συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, 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 5 λεπτά. Ακολούθως, μετράται η οπτική απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος και με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

4.2.9.Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών (vapour diffusion) είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος στη κρυστάλλωση πρωτεϊνών. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνικού διαλύματος, στοιχείο 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 την σταδιακή εναπόθεση των πρωτεϊνικών μορίων σε πυρήνες κρυστάλλωσης. Το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να έχει την μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια και να είναι απαλλαγμένο από σωματίδια σκόνης και άλλα αιωρούμενα στερεά σωματίδια με φυγοκέντρωση. Υπάρχουν δυο παραλλαγές της μεθόδου διάχυσης ατμών, η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας και η τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας που χρησιμοποιούνται στη παρούσα εργασία.

4.2.9.1. Τεχνική της «κρεμάμενης σταγόνας» (hanging drop)

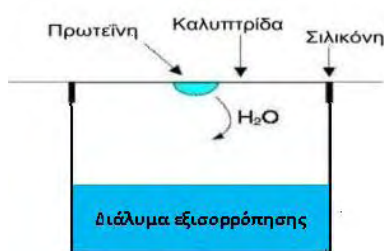
Στη τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πλάκα 24 θέσεων 'Linbro', στην οποία τα χείλη του κάθε φρεατιδίου έχουν επαλειφθεί με σιλικόνη. Σε κάθε φρεατίδιο

(δεξαμενή) τοποθετείται 0,7ml διαλύματος του κατακρημνιστικού παράγοντα στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (πίνακας 15).

Δοκιμή	Salt	Buffer	Precipitant
1	50mM KH_2PO_4 pH6,5	0,2 mM EDTA	6% (w/v) PEG 8000
2	50mM KH_2PO_4 pH6,5	0,2 mM EDTA	7% (w/v) PEG 8000
3	50mM KH_2PO_4 pH6,5	0,2 mM EDTA	8% (w/v) PEG 8000
4	50mM KH_2PO_4 pH6,5	0,2 mM EDTA	10% (w/v) PEG 8000
5	50mM KH_2PO_4 pH6,5	30% (v/v) glycerol, 0,2 mM EDTA	4,5% (w/v) PEG 4000
6	50mM KH_2PO_4 pH6,5	30% (v/v) glycerol, 0,2 mM EDTA	5,5% (w/v) PEG 4000
7	50mM KH_2PO_4 pH6,5	30% (v/v) glycerol, 0,2 mM EDTA	6,5% (w/v) PEG 4000
8	50mM KH_2PO_4 pH6,5	30% (v/v) glycerol, 0,2 mM EDTA	7,5% (w/v) PEG 4000

Πίνακας 15. Σύσταση διαλυμάτων εξισορρόπησης για τις δοκιμές κρυσταλλώσεως της ΧΟ.

Σε καλυπτρίδα σιλικόνης τοποθετείται σταγόνα του πρωτεϊνικού διαλύματος, όγκου 1,5μl και συγκέντρωσης 14mg/ml, και αναμιγνύεται με ίσο όγκο κατακρημνιστικού παράγοντα από την δεξαμενή (διάλυμα εξισορρόπησης). Η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 7mg/ml. Η καλυπτρίδα αναστρέφεται και εφαρμόζει ερμητικά στα χείλη του φρεατιδίου, έτσι ώστε η σταγόνα, η οποία συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας στη καλυπτρίδα, να αιωρείται πάνω από την δεξαμενή (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Κρυστάλλωση με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας.

Η πλάκα Linbro τοποθετείται σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°C) και παρακολουθείται συχνά για πιθανή εμφάνιση κρυστάλλων και άλλων μεταβολών στη σταγόνα (σχηματισμός μικροκρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος κτλ.). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων εμφανίζεται μέσα σε 3 μέρες. Για

βελτιστοποίηση των κρυστάλλων πραγματοποιούνται δοκιμές με μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης (τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης ίση με 4,6mg/ml).

4.2.9.2. Τεχνική της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)

Η διαφορά της μεθόδου αυτής από τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας έγκειται στο γεγονός ότι το πρωτεϊνικό διάλυμα δεν τοποθετείται σε καλυπτρίδα αλλά σε ειδική υποδοχή που υπάρχει στις πλάκες Linbro (**εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Πλάκα 96 θέσεων 'Linbro'.

Η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με διάλυμα κατακρήμνισης το οποίο έχει προηγουμένως τοποθετηθεί στην δεξαμενή. Στη συνέχεια, η πλάκα κλείνεται ερμητικά με ένα διαφανές πλαστικό αυτοκόλλητο και αφήνεται σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°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 ΕΙΕ στην Αθήνα (**εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Ρομποτικό μηχάνημα κρυσταλλώσεων OryxNano (Douglas Instruments) του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας, ΕΙΕ.

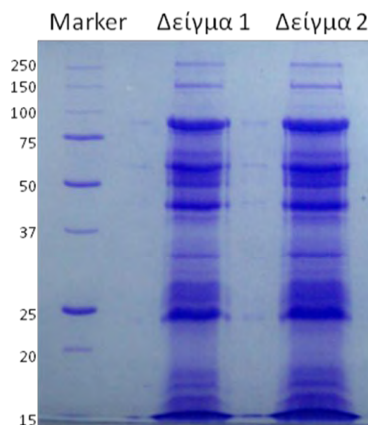
Το ρομπότ αυτόματα τοποθετεί σε κάθε υποδοχή 200nl οξειδάση της ξανθίνης 14mg/ml και 200nl διάλυμα εξισορρόπησης. Τα διαλύματα εξισορρόπησης που δοκιμάστηκαν ήταν από τα εμπορικά προσυσκευασμένα διαλύματα (kits) PEG SUIT της εταιρείας QIAGEN (**παράρτημα, πίνακας 18**) και τα structure screen I (**παράρτημα, πίνακας 19**) και II (**παράρτημα, πίνακας 20**) της molecular dimensions.

Για την βελτιστοποίηση των κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν σε ορισμένες από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον δοκιμές με μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης με χρήση του αυτόματου μηχανήματος. Συγκεκριμένα το ρομπότ τοποθετεί σε κάθε υποδοχή 100nl οξειδάση της ξανθίνης 14mg/ml και 300nl διαλύματος εξισορρόπησης. Οι κρύσταλλοι αφήνονται να αναπτυχθούν σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°C).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

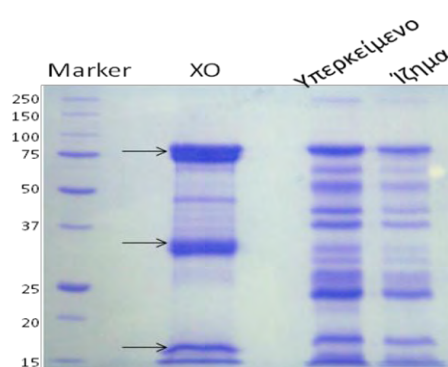
5.1. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης από βόειο γάλα

Για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή το βόειο γάλα. Το γάλα προήλθε μόνο από μια αγελάδα, ώστε να αποφευχθεί το πρόβλημα ετερογένειας της οξειδάσης της ξανθίνης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πρωτεϊνών από το γάλα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.1. Κατά τη διαδικασία αυτή, η πηγή της οξειδάσης της ξανθίνης ήταν η κρέμα γάλακτος που σχηματίζεται έπειτα από φυγοκέντρηση του γάλακτος. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται το λίπος, το οποίο θα αποτελούσε πρόβλημα κατά τα επόμενα βήματα καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας. Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη πρωτεϊνών στο δείγμα που απομονώθηκε έπειτα από τη δεύτερη κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12%. Η επιτυχής απομόνωση πρωτεϊνών ταυτοποιείται μετά από χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Δείγμα 1: 15μg μίγμα πρωτεϊνών που απομονώθηκε από το γάλα. Δείγμα 2: 20μg μίγματος πρωτεϊνών που απομονώθηκε από το βόειο γάλα.

Το πρωτεϊνικό δείγμα που απομονώθηκε από 6lt γάλακτος ήταν συγκέντρωσης 21mg/ml και συνολικά 515mg. Μετά τη διαπίδυση κατά το τελικό στάδιο απομόνωσης των πρωτεϊνών (ενότητα 4.2.1., στάδιο 4) πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 18°C. Το ίζημα που σχηματίστηκε περιείχε 160mg πρωτεΐνη ενώ το υπερκείμενο 355mg. Και τα δύο δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12%. Για την διαπίστωση ύπαρξης οξειδάσης της ξανθίνης στο πρωτεϊνικό δείγμα που απομονώθηκε από το γάλα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας εμπορική οξειδάση της ξανθίνης (Sigma, grade III). Η επιτυχής απομόνωση πρωτεϊνών ταυτοποιείται μετά από χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 22).



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. XO (με βελάκια): 16μg εμπορική οξειδάση της ξανθίνης (Sigma, grade III). Υπερκείμενο: 13μg πρωτεϊνικό δείγμα από το υπερκείμενο. Ίζημα: 12μg 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 στην μορφή των 145kDa. Στο δείγμα της εμπορικής XO διαπιστώθηκε η ύπαρξη της υπομονάδας των 85kDa, ωστόσο οι δύο άλλες υπομονάδες διαχωρίζονται σε μικρότερο μοριακό βάρος (33kDa και 17kDa). Στο υπερκείμενο και στο ίζημα του πρωτεϊνικού δείγματος που απομονώθηκε από το γάλα, διαπιστώθηκε η ύπαρξη ζωνών στο αντίστοιχο μοριακό βάρος για τις υπομονάδες των 85kDa και 17kDa αλλά όχι στο μοριακό βάρος των 33kDa. Ωστόσο, στο δείγμα που απομονώθηκε από το γάλα υπάρχει μια ζώνη σε μοριακό βάρος 40kDa, η οποία θα μπορούσε να αντιστοιχεί

στην υπομονάδα των 40kDa της οξειδάσης της ξανθίνης. Η ύπαρξη XO στο ίζημα δεν μας αφορά καθότι αντιστοιχεί στην ανενεργή της μορφή. Για την πλήρης ταυτοποίηση της ύπαρξης οξειδάσης της ξανθίνης στο πρωτεϊνικό δείγμα που απομονώθηκε από το βόειο γάλα (υπερκεείμενο) πραγματοποιήθηκε μελέτη δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με το υπόστρωμά της, την ξανθίνη. Συγκεκριμένα, σε ρυθμιστικό διάλυμα (33mM KH_2PO_4 , 33mM Na_2HPO_4 , 0,1mM EDTA, pH=7,5) με 20μM ξανθίνη προστέθηκαν 0,24mg πρωτεϊνικού δείγματος που απομονώθηκε από το γάλα και παρακολουθήθηκε η αύξηση απορρόφησης στα 295nm για 3 λεπτά (πίνακας 16).

<i>Χρόνος (sec)</i>	<i>Απορρόφηση (295nm)</i>
5	0,073
10	0,103
15	0,167
40	0,172
60	0,172
120	0,172
180	0,171

Πίνακας 16. Μεταβολή απορρόφησης στα 295nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στη παραγωγή ουρικού οξέος από την οξειδάση της ξανθίνης με υπόστρωμα την ξανθίνη.

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 μόνο της επιθυμητής πρωτεΐνης, της XO, από το πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας.

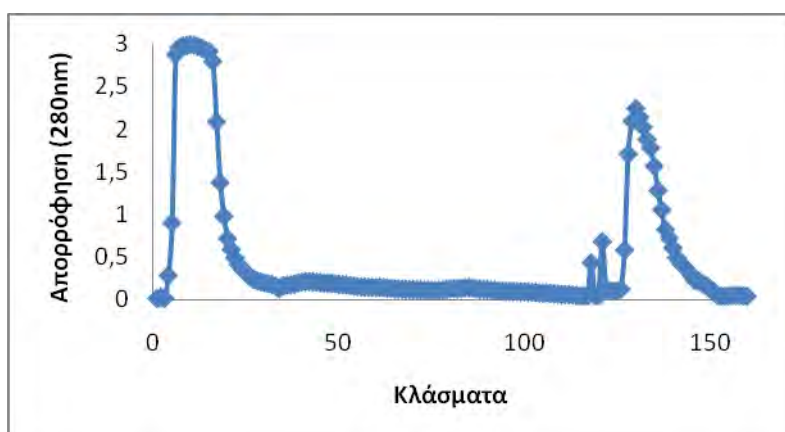
5.2. Απομόνωση οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία συγγένειας

Η διαδικασία καθαρισμού της οξειδάσης της ξανθίνης με στήλη συγγένειας πραγματοποιήθηκε στους 4°C και διακρίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο το πρωτεϊνικό δείγμα που απομονώθηκε από το γάλα 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 είναι συνδεδεμένη με αλλοπουρινόλη διαβιβάζεται ξανά από στήλη φολικού οξέος. Το πολύ ενεργό ένζυμο διαπερνά τη στήλη, ενώ το χαμηλής ενεργότητας ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη.

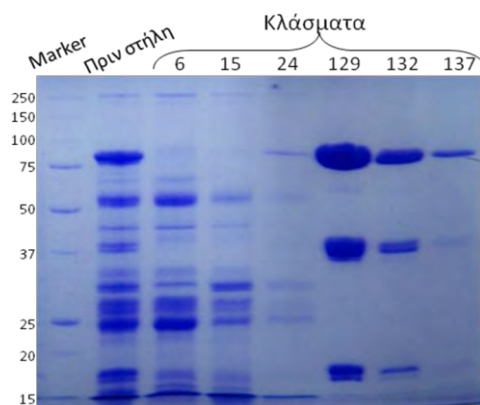
Στάδιο 1:

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 4.2.2.2. (στάδιο 1). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 0,7ml/min και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ήταν όγκου 1,5ml. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολουθήθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 23).



Εικόνα 23. Χρωματογράφημα στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης. Κλάσματα 1- 10: κλάσματα (flowthrough), κλάσματα 11-120: κλάσματα πλύσεως (wash), κλάσματα 121-150: κλάσματα έκλουσης (elution) οξειδάσης της ξανθίνης, κλάσματα 151-160: κλάσματα πλύσεως με διάλυμα D.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12% και χρώση με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 24).

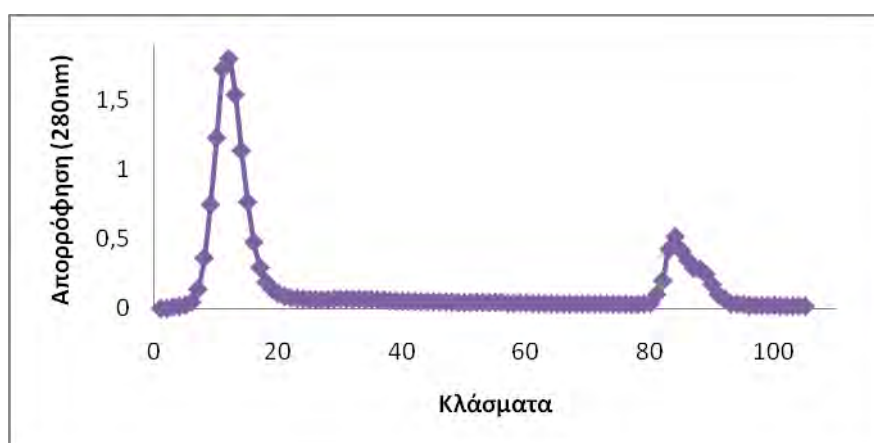


Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους. Διαδρομή 2: πρωτεϊνικό δείγμα πριν διαπεράσει τη στήλη. Διαδρομή 3: Δείγμα flowthrough. Διαδρομές 4-5: δείγματα κλασμάτων πλύσεως. Διαδρομές 6-8: δείγματα έκλουσης ΧΟ.

Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας σε μοριακό βάρος 85kDa, 40kDa και 17kDa, ζώνες που αντιστοιχούν στις τρεις υπομονάδες της. Η έκλουσή της από τη στήλη πραγματοποιήθηκε με 2,5mM αλλοπουρινόλη και τα κλάσματα που την περιείχαν ήταν τα κλάσματα 126-141. Στη συνέχεια, τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε O/N διαπίδυση στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα (40mM Tris-HCl pH 7,8, 20mM sodium pyrophosphate pH 8,5, 0,2mM EDTA). Η ποσότητα της ΧΟ που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε 59mg. Τέλος, η οξειδάση της ξανθίνης συμπυκνώθηκε με PEG40000 σε όγκο που αντιστοιχεί στο 20% του όγκου στήλης φολικού οξέος, δηλαδή στα 3ml, πριν υποβληθεί σε καθαρισμό με δεύτερη χρωματογραφία συγγένειας φολικού οξέος.

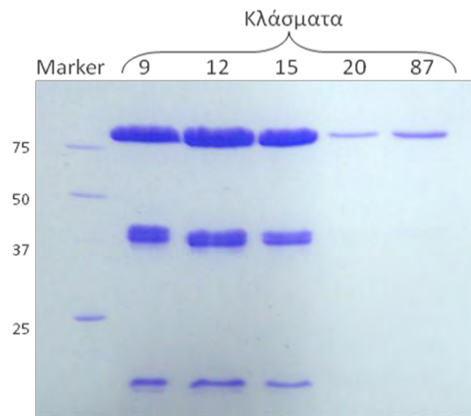
Στάδιο 2:

Το δείγμα οξειδάσης της ξανθίνης που απομονώθηκε κατά τη πρώτη χρωματογραφία συγγένειας διαβιβάστηκε σε δεύτερη στήλη φολικού οξέος και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της 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 την λιγότερο ενεργή. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 0,7ml/min και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ήταν όγκου 1,5ml. Η οπτική απορρόφηση των κλασμάτων παρακολουθήθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 25).



Εικόνα 25. Χρωματογράφημα στήλης EAH Sepharose 4B/folic Acid για την απομόνωση της οξειδάσης της ξανθίνης. Κλάσματα 1- 3: κλάσματα (flowthrough), κλάσματα 4-75: κλάσματα πλύσεως (wash) που περιέχουν την υψηλής δραστηριότητας XO, κλάσματα 76-105: κλάσματα έκλουσης (elution) οξειδάσης της ξανθίνης χαμηλής ενεργότητας.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου, SDS-PAGE 12%. Η ύπαρξη πρωτεΐνης επιβεβαιώνεται μετά από χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 26).

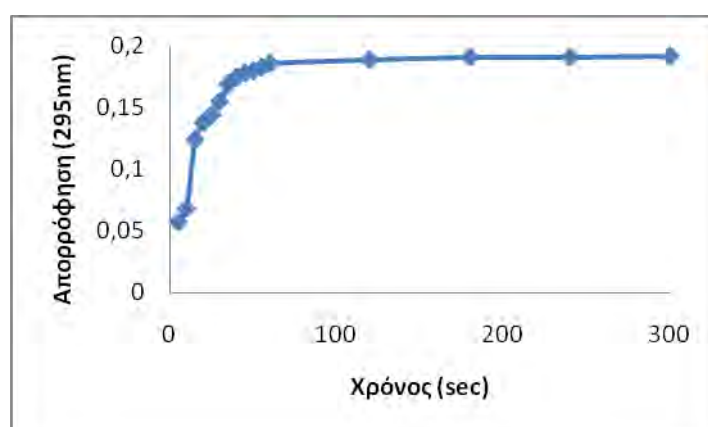


Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους. Διαδρομές 2-5: κλάσματα πλύσεως, που έχουν την υψηλής δραστηριότητας ΧΟ. Διαδρομή 6: κλάσματα έκλουσης οξειδάσης της ξανθίνης χαμηλής δραστηριότητας.

Η οξειδάση της ξανθίνης εμφανίζεται με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Με την ηλεκτροφόρηση και τη παρατήρηση των απορροφήσεων στα 280nm διαπιστώθηκε ότι στα κλάσματα πλύσεως συλλέχθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης που αντιστοιχεί θεωρητικά στην υψηλής δραστηριότητας ΧΟ. Στα κλάσματα έκλουσης με χρήση αλλοπουρινόλης απομακρύνθηκε μικρότερο ποσοστό ΧΟ. Τα κλάσματα πλύσεως 7-21 ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με χρήση φίλτρων όγκου 4ml, μη περατών από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10KDa. Η ποσότητα της ΧΟ που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε 30mg. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με το υπόστρωμά της, την ξανθίνη, για να διαπιστωθεί αν η ΧΟ είναι ενεργή. Συγκεκριμένα, σε ρυθμιστικό διάλυμα (33mM KH_2PO_4 , 33mM Na_2HPO_4 , 0,1mM EDTA, pH=7,5) με 20μM ξανθίνη προστέθηκαν 0,061mg ΧΟ που απομονώθηκε με τη χρωματογραφία συγγένειας και παρακολουθήθηκε η αύξηση απορρόφησης στα 295nm για 5 λεπτά (**πίνακας 17, εικόνα 27**).

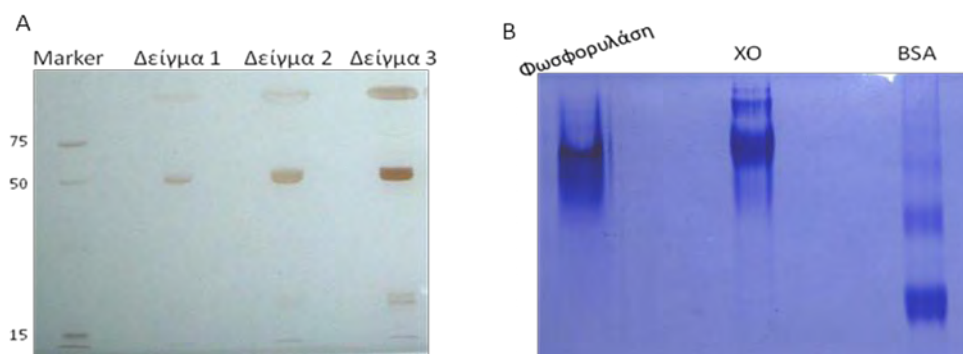
Χρόνος (sec)	Απορρόφηση (295nm)	Χρόνος (sec)	Απορρόφηση (295nm)
5	0,057	45	0,178
10	0,068	50	0,180
15	0,124	55	0,183
20	0,138	60	0,186
25	0,144	120	0,189
30	0,155	180	0,191
35	0,169	240	0,191
40	0,175	300	0,192

Πίνακας 17. Μεταβολή απορρόφησης στα 295nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στη παραγωγή ουρικού οξέος από την οξειδάση της ξανθίνης με υπόστρωμα την ξανθίνη.



Εικόνα 27. Διάγραμμα μεταβολής απορρόφησης στα 295nm σε συνάρτηση με το χρόνο (sec).

Η αύξηση στην απορρόφηση οφείλεται στην παραγωγή ουρικού οξέος και συνεπώς η οξειδάση της ξανθίνης είναι δραστική στο δείγμα που απομονώθηκε με τη χρωματογραφία συγγένειας. Για να διαπιστωθεί ο βαθμός καθαρότητας του δείγματος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 10% και χρώση με νιτρικό άργυρο (**εικόνα 28A**). Η τεχνική αυτή έχει μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση της οξειδάσης της ξανθίνης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE) για να διερευνηθεί ο διαχωρισμός του ενζύμου στη φυσική του διμερή μορφή (**εικόνα 28B**).



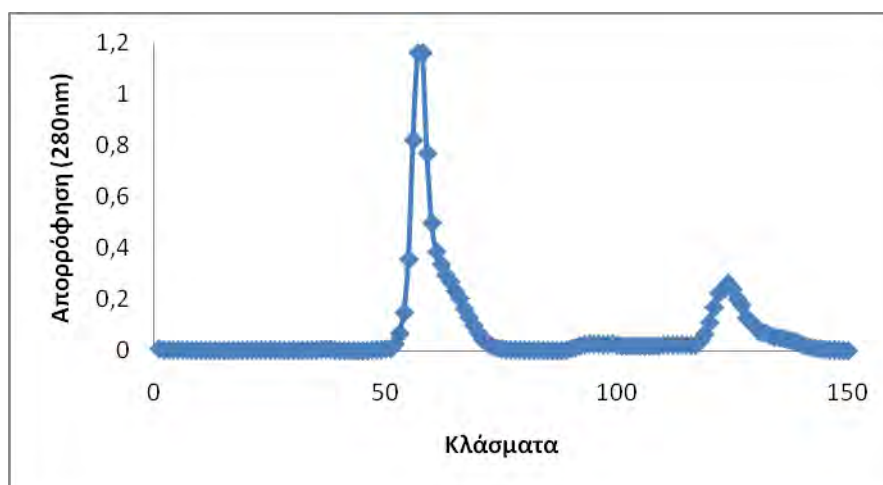
Εικόνα 28. Α) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 10% και χρώση με νιτρικό άργυρο. Δείγμα 1: 5μg XO, Δείγμα 2: 7μg XO, Δείγμα 3: 14μg XO. **Β)** Native-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 7,5%. Η φωσφορυλάση (195KDa) και το BSA (67KDa) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μοριακού βάρους.

Με την ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης διαχωρίζεται στη διμερή της μορφή, δηλαδή στα 290KDa. Από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και την επικείμενη χρώση με νιτρικό άργυρο διαπιστώθηκε ότι ο βαθμός καθαρότητας της οξειδάσης της ξανθίνης που απομονώθηκε ήταν πολύ υψηλός. Στη συνέχεια, μέρος του δείγματος της XO χρησιμοποιήθηκε για κρυστάλλωση, ενώ το υπόλοιπο επεξεργάστηκε με $K_3Fe(CN)_6$, ώστε να απομακρυνθεί η αλλοπουρινόλη από το ένζυμο.

5.3. Καθαρισμός οξειδάσης της ξανθίνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

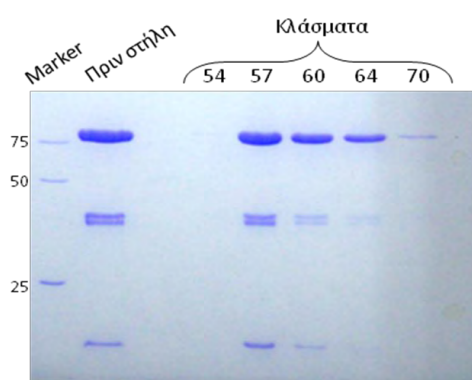
Έπειτα από επεξεργασία της οξειδάσης της ξανθίνης με $K_3Fe(CN)_6$ σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.3. πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης για να απομακρυνθεί η αλλοπουρινόλη και το $K_3Fe(CN)_6$ από το δείγμα XO. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης πραγματοποιήθηκε με στήλη Sephadex G-25 σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.4. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ροή 0,7ml/min και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ήταν όγκου 1,4ml. Η οπτική

απορρόφηση των κλασμάτων παρακολουθήθηκε στα 280nm και το αποτέλεσμα εμφανίζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 29)



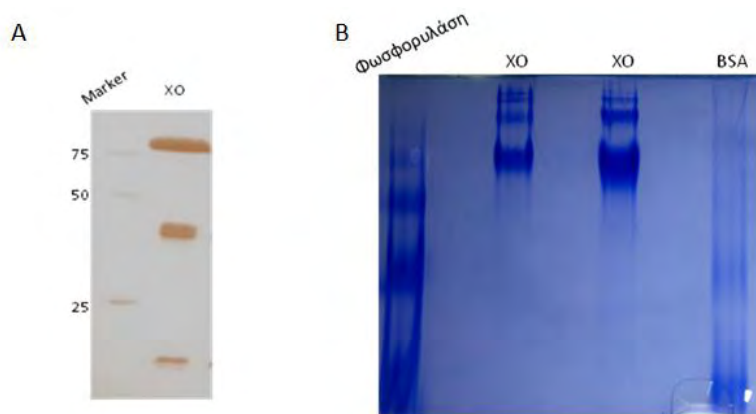
Εικόνα 29. Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης G-25 για την οξειδάση της ξανθίνης.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της οξειδάσης της ξανθίνης και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, SDS-PAGE 12% και χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 30).



Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους. Διαδρομή 2: Δείγμα ΧΟ πριν τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Διαδρομές 4-8: κλάσματα από χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε η ύπαρξη οξειδάσης της ξανθίνης στα κλάσματα 54-71. Τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με χρήση φίλτρων όγκου 4ml, μη περατών από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10KDa. Ο βαθμός καθαρότητας του ενζύμου διαπιστώθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% και χρώση με νιτρικό άργυρο. Ταυτόχρονα το δείγμα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (**εικόνα 31**).



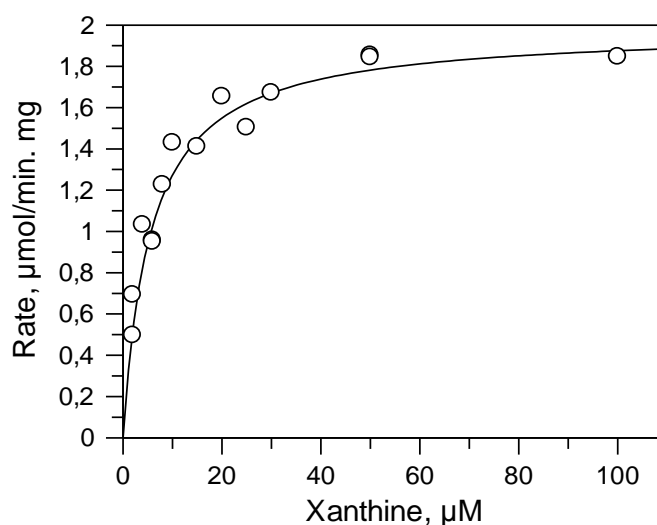
Εικόνα 31. Α) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 10% και χρώση με νιτρικό άργυρο. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, Διαδρομή 2: 12μg XO. Β) Native-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 7,5%. Η φωσφορυλάση (195KDa) και το BSA (67KDa) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μοριακού βάρους. Διαδρομή 1: 25μg φωσφορυλάση, Διαδρομή 2: 20μg XO, Διαδρομή 3: 25μg XO, Διαδρομή 4: 20μg BSA.

Από την χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου με νιτρικό άργυρο παρατηρήθηκε ότι η οξειδάση της ξανθίνης που απομονώθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης έχει πολύ υψηλό βαθμό καθαρότητας και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

5.4. Κινητικές μελέτες οξειδάσης της ξανθίνης

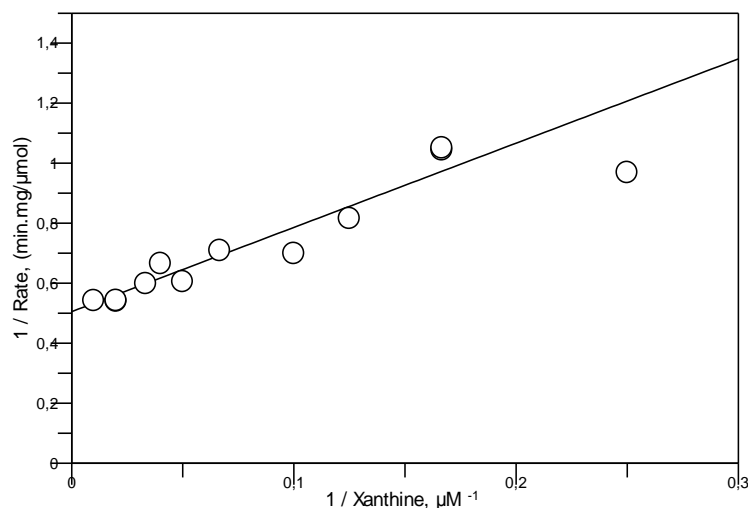
Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό

εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Για τον προσδιορισμό της K_m και V_{max} έγινε χρήση του προγράμματος *grafit* σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.5. Για μικρό χρονικό διάστημα (2min) η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι, με τη χρήση του προγράμματος μπορεί να προσδιοριστεί η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία. Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της μη γραμμικής παλινδρόμησης (non-linear fit), η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις των τιμών (εικόνα 32).



Εικόνα 32. Διάγραμμα κινητικής μελέτης οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (ξανθίνη).

Ο υπολογισμός των τιμών της K_m και της V_{max} γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα για την κάθε μια. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα και το γράφημα Lineweaver-Burk (εικόνα 33).



Εικόνα 33. Διάγραμμα Lineweaver-Burk για την οξειδάση της ξανθίνης.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι $K_m = 5,5592 \pm 0,7389 \mu\text{M}$ και $V_{max} = 1,9799 \pm 0,037 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$.

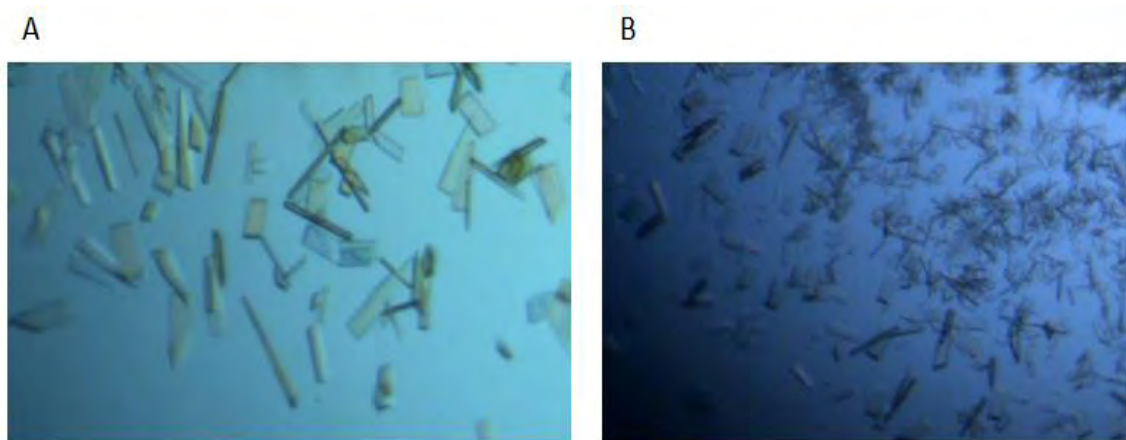
5.5. Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης

Για την κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας και της επικαθήμενης σταγόνας (ενότητα 4.2.9).

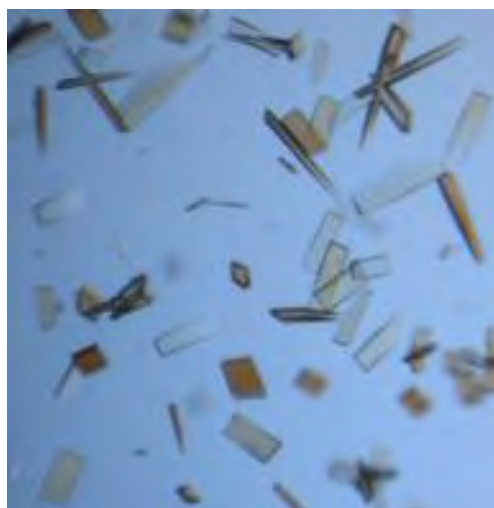
■ Μέθοδος της «κρεμάμενης σταγόνας» (hanging drop)

Με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας έγιναν προσπάθειες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα (**πίνακας 15**). Αρχικώς, πριν την κρυστάλλωση προστέθηκε στο δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης 6,67mM DTT. Στη συνέχεια, για κάθε δοκιμή τοποθετήθηκε 1,5μl XO και ίσος όγκος κατακρημνιστικού παράγοντα από την δεξαμενή. Η τελική συγκέντρωση της XO στη σταγόνα ήταν 7mg/ml και η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°C). Ο σχηματισμός κρυστάλλων έγινε εμφανής με στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, με

εφοδιασμένο σύστημα πολωμένου φωτός μετά από τρεις μέρες. Η φωτογράφιση των κρυστάλλων έγινε μέσω ψηφιακής κάμερας (εικόνες 34 και 35).



Εικόνα 34. 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 Α) 8% (w/v) PEG 8000, 0,2 mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6,5. Β) 10% (w/v) PEG 8000, 0,2 mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6,5.

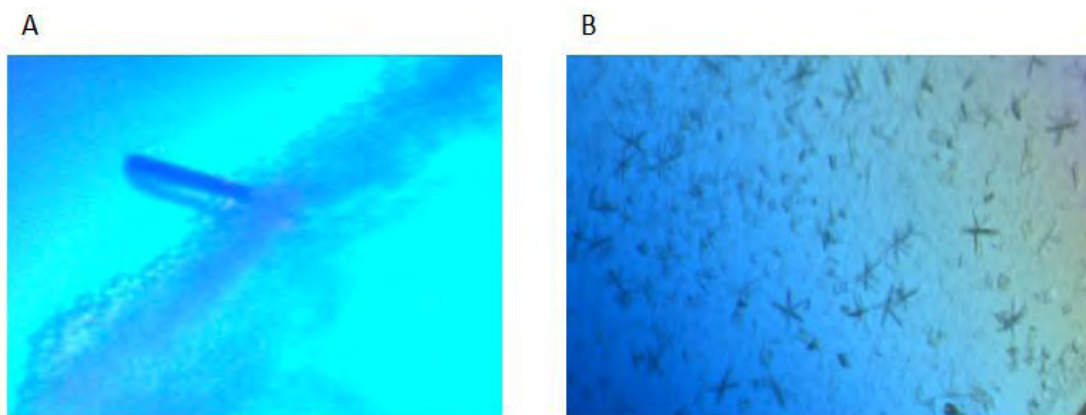


Εικόνα 35. Παρακολούθηση κρυστάλλων με στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, εφοδιασμένο με σύστημα πολωμένου φωτός και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα. Κρυστάλλωση οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη σε συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα: 7% (w/v) PEG 8000, 0,2 mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6,5.

Από τις δοκιμές κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη παρατηρήθηκε η ανάπτυξη κρυστάλλων σε συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα 7% (w/v) PEG 8000, 0,2 mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6,5. Ενώ με αύξηση της συγκέντρωσης του PEG 8000 σε 8% (w/v) παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μικρότερου μεγέθους κρυστάλλων. Σε συνθήκες 10% (w/v) PEG 8000 παρατηρήθηκε ανάπτυξη μικροκρυστάλλων, ενώ ταυτόχρονα μέρος της πρωτεΐνης έπεσε ίζημα. Συνεπώς, οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη κρυστάλλου είναι 7% (w/v) PEG 8000, 0,2 mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6,5.

Μέθοδος της «επικαθήμενης σταγόνας» (sitting drop)

Με την μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας έγιναν προσπάθειες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης σε διάφορες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα (**παράρτημα, πίνακες 18, 19 και 20**). Αρχικώς, πριν την κρυστάλλωση προστέθηκε στο δείγμα της οξειδάσης της ξανθίνης 6,67mM DTT. Στη συνέχεια, για κάθε δοκιμή τοποθετήθηκαν 200nl ΧΟ και ίσος όγκος κατακρημνιστικού παράγοντα από την δεξαμενή με τη βοήθεια αυτόματου μηχανήματος. Η τελική συγκέντρωση της ΧΟ στη σταγόνα ήταν 7mg/ml και η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (16°C). Ο σχηματισμός κρυστάλλων έγινε εμφανής με στερεοσκόπιο Leica MZ16 μέσα σε μια μέρα. Η φωτογράφιση των κρυστάλλων έγινε μέσω ψηφιακής κάμερας (**εικόνα 36**).



Εικόνα 36. Παρακολούθηση κρυστάλλων με στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, εφοδιασμένο με σύστημα πολωμένου φωτός και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα. Κρυστάλλωση 7mg/ml οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη σε συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα: Α) 0.1M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 8000 και Β) 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD.

Κατά την εξέταση ενός πολύ μεγάλου αριθμού διαλυμάτων εξισορρόπησης με τη βοήθεια του ρομπότ, οι συνθήκες που έδωσαν κρυστάλλους της οξειδάσης της ξανθίνης (7mg/ml) ήταν οι συνθήκες 0.1M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 8000 και 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD. Ωστόσο, στη πρώτη συνθήκη παρά το γεγονός ότι ο κρύσταλλος που αναπτύχθηκε πολώνει το φως, η ανάπτυξη μόνο ενός μικρού μεγέθους κρυστάλλου θέτει ερωτήματα για το αν είναι κρύσταλλος οξειδάσης της ξανθίνης ή κρύσταλλος που αναπτύχθηκε λόγω του οξικού νατρίου που περιέχει το διάλυμα κατακρήμνισης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επανάληψη στις ίδιες συνθήκες καθώς και σε συνθήκες με μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης (τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης ίση με 4,6mg/ml). Κατά την επανάληψη δεν παρατηρήθηκε η ανάπτυξη κανενός κρυστάλλου και επομένως, ο κρύσταλλος που είχε αναπτυχθεί αρχικώς, πιθανόν να οφειλόταν στο οξικό νάτριο. Στη δεύτερη συνθήκη διαλύματος εξισορρόπησης (0.1 M Na HEPES pH 7.5, 10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD) παρατηρήθηκε η ανάπτυξη πολλών μικροκρυστάλλων οξειδάσης της ξανθίνης. Η επανάληψη του πειράματος στις ίδιες συνθήκες κρίθηκε απαραίτητη για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Επίσης, για την βελτίωση του σχηματισμού του κρυστάλλου πραγματοποιήθηκε

δοκιμή στις ίδιες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα με μικρότερη συγκέντρωση οξειδάσης της ξανθίνης (τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στη σταγόνα ίση με 4,6mg/ml). Ο σχηματισμός κρυστάλλων έγινε εμφανής με στερεοσκόπιο Leica MZ16 μέσα σε τρεις μέρες. Η φωτογράφιση των κρυστάλλων έγινε μέσω ψηφιακής κάμερας (**εικόνα 37**).



Εικόνα 37. Παρακολούθηση κρυστάλλων με στερεοσκόπιο Leica MZ16, 160X, εφοδιασμένο με σύστημα πολωμένου φωτός και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα. Κρυστάλλωση 4,6mg/ml οξειδάσης της ξανθίνης με αλλοπουρινόλη σε συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα: 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD.

Η επανάληψη του πειράματος έδωσε τα ίδια αποτελέσματα, δηλαδή την ανάπτυξη πολλών μικροκρυστάλλων, ενώ οι δοκιμές με μικρότερη συγκέντρωση οξειδάσης της ξανθίνης σε ίδια συγκέντρωση κατακρημνιστικού παράγοντα έδωσε κρυστάλλους αρκετά μεγαλύτερους και ικανούς για να συλλεχθούν και να επεξεργαστούν με ακτίνες Χ.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οξειδάση της ξανθίνης πρόκειται για ένα μόλυβδο-ένζυμο, το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες μονάδες των 145 kDa. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια N-τελική περιοχή 20kDa που περιέχει 2 σιδηροθειούχα κέντρα (Fe-SI και Fe-SII), μια κεντρική περιοχή 40kDa που περιέχει FAD, και μια C-τελική περιοχή 85kDa που περιέχει τον συμπαράγοντα μολυβδαινίου και τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές οδούς, όπως στην υδροξυλίωση πουρινών, πτερινών, αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών, συμβάλλοντας έτσι στην αποτοξίνωση ή στην ενεργοποίηση ενδογενών ενώσεων και ξενοβιοτικών ουσιών. Ο πρωταρχικός ρόλος του ενζύμου είναι η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Γι' αυτό, σε κληρονομικές παθήσεις που υπάρχει έλλειψη του ενζύμου, τα άτομα χαρακτηρίζονται από ξανθινουρία και δυσλειτουργία πολλών οργάνων από υπερβολική συσσώρευση ξανθίνης σε αυτά.

Επίσης, η ΧΟ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα, η δράση της σχετίζεται με καταστάσεις ισχαιμίας, υποξίας, υπέρτασης καθώς και με τη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, την αθηροσκλήρωση, το διαβήτη και διάφορες μορφές καρκίνου. Ωστόσο, η δράση της σχετίζεται και με παθολογικές καταστάσεις εξαιτίας της συμμετοχής της στην παραγωγή του ουρικού οξέος. Υπέρμετρη παραγωγή ουρικού οξέος οδηγεί στην κρυστάλλωσή του και στην εναπόθεσή του στις αρθρώσεις, τους συνδετικούς ιστούς και τους νεφρούς. Έτσι, η αναστολή της δράσης της ΧΟ δεν έχει μόνο ενδιαφέρον ως προς την παρεμπόδιση της παραγωγής ελευθέρων ριζών αλλά έχει και θεραπευτική σημασία. Η επίλυση της δομής της οξειδάσης της ξανθίνης μπορεί να δώσει πληροφορίες τόσο για τον μηχανισμό κατάλυσης της αντίδρασης των φυσικών υποστρωμάτων της, όσο και πληροφορίες για την συμμετοχή της σε πολλές από αυτές τις παθολογικές καταστάσεις.

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 EAH Sepharose 4B/folic Acid σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η οξειδάση της ξανθίνης απομονώθηκε από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του γάλακτος με στήλη φολικού οξέος καθηλωμένου σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη). Το ένζυμο εκλύεται από τη στήλη με χρήση αλλοπουρινόλης με πολύ υψηλό βαθμό καθαρότητας. Για τον 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 δεν δεσμεύεται στη στήλη και διαχωρίζεται με αυτό τον τρόπο από το ένζυμο που είναι λιγότερο ενεργό και δεσμεύεται σε αυτή.

Στη συνέχεια, για να απομακρυνθεί από την οξειδάση της ξανθίνης η αλλοπουρινόλη πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του ενζύμου με $K_3Fe(CN)_6$ και καθαρισμός του με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Για την εύρεση της δραστηριότητας του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις ξανθίνης, δηλαδή του υποστρώματος του ενζύμου, και παρατηρήθηκαν οι διαφορές απορρόφησης στα 295nm. Η αύξηση στην απορρόφηση οφείλεται στην παραγωγή ουρικού οξέος από την ξανθίνη με δράση του ενζύμου οξειδάσης της ξανθίνης. Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι $K_m = 5,5592 \pm 0,7389 \mu M$ και $V_{max} = 1,9799 \pm 0,037 \mu mol/min \cdot mg$. Η K_m που βρέθηκε αποδεικνύει ότι το ένζυμο είναι πολύ δραστικό.

Τελικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν οι προσπάθειες κρυστάλλωσης της οξειδάσης της ξανθίνης μαζί με τον αναστολέα της, την αλλοπουρινόλη. Οι δοκιμές κρυσταλλώσεων πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας και της επικαθήμενης σταγόνας. Με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας παρατηρήθηκε η ανάπτυξη κρυστάλλων ικανοποιητικού μεγέθους σε συνθήκες κατακρημνιστικού

παράγοντα 7% (w/v) PEG 8000, 0,2 mM EDTA, 50mM KH_2PO_4 pH6,5. Ενώ με αύξηση της συγκέντρωσης του PEG 8000 σε 8% (w/v) παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μικρότερου μεγέθους κρυστάλλων και σε συνθήκες 10% (w/v) PEG 8000 παρατηρήθηκε ανάπτυξη μικροκρυστάλλων με ταυτόχρονη επικάλυψη της πρωτεΐνης ως ίζημα. Με τη μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μικροκρυστάλλων σε συνθήκες 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD, όταν χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση οξειδάσης της ξανθίνης 7mg/ml. Για βελτιστοποίηση του μεγέθους ανάπτυξης των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε μικρότερη συγκέντρωση XO (4,6mg/ml) παρουσία του ίδιου κατακρημνιστικού παράγοντα. Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν μέσα σε μια μέρα σε αυτές τις συνθήκες ήταν ικανοποιητικού μεγέθους, ενώ παρατηρήθηκε ότι οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν περισσότερο με τη πάροδο των ημερών.

Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα 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

Πίνακας 18. Σύσταση διαλυμάτων κρυσταλλώσεων –PEG SUIT kit.

<i>Number</i>	<i>Salt</i>	<i>Buffer</i>	<i>Precipitant</i>
1		0.1M Sodium acetate pH 4.6	40% (v/v) PEG 200
2		0.1M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) PEG 300
3		0.1M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) PEG 400
4		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (v/v) PEG 550 MME
5		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 1000
6		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 2000 MME
7		0.1M MES pH 6.5	40% (v/v) PEG 200
8		0.1M MES pH 6.5	30% (v/v) PEG 300
9		0.1M MES pH 6.5	30% (v/v) PEG 400
10		0.1M MES pH 6.5	25% (v/v) PEG 550 MME
11		0.1M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 1000
12		0.1M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 2000 MME
13		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	40% (v/v) PEG 200
14		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 300
15		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 400
16		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (v/v) PEG 550 MME
17		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 1000
18		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 2000 MME
19		0.1M Tris-HCl pH 8.5	40% (v/v) PEG 200
20		0.1M Tris-HCl pH 8.5	30% (v/v) PEG 300
21		0.1M Tris-HCl pH 8.5	30% (v/v) PEG 400
22		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (v/v) PEG 550 MME
23		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 1000
24		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 2000 MME
25		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 3000
26		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 4000
27		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 6000
28		0.1M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 8000
29		0.1M Sodium acetate pH 4.6	20% (w/v) PEG 10000
30		0.1M Sodium acetate pH 4.6	15% (w/v) PEG 20000
31		0.1M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 3000

32		0.1M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 4000
33		0.1M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 6000
34		0.1M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 8000
35		0.1M MES pH 6.5	20% (w/v) PEG 10000
36		0.1M MES pH 6.5	15% (w/v) PEG 20000
37		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3000
38		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 4000
39		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 6000
40		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 8000
41		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	20% (w/v) PEG 10000
42		0.1M Sodium HEPES pH 7.5	15% (w/v) PEG 20000
43		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 3000
44		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 4000
45		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 6000
46		0.1M Tris-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 8000
47		0.1M Tris-HCl pH 8.5	20% (w/v) PEG 10000
48		0.1M Tris-HCl pH 8.5	15% (w/v) PEG 20000
49	0.2M Sodium Fluoride		20% (w/v) PEG 3350
50	0.2M Potassium Fluoride		20% (w/v) PEG 3350
51	0.2M Ammonium Fluoride		20% (w/v) PEG 3350
52	0.2M Lithium Chloride		20% (w/v) PEG 3350
53	0.2M Magnesium Chloride		20% (w/v) PEG 3350
54	0.2M Sodium Chloride		20% (w/v) PEG 3350
55	0.2M Calcium Chloride		20% (w/v) PEG 3350
56	0.2M Potassium Chloride		20% (w/v) PEG 3350
57	0.2M Ammonium Chloride		20% (w/v) PEG 3350
58	0.2M Sodium Iodide		20% (w/v) PEG 3350
59	0.2M Potassium Iodide		20% (w/v) PEG 3350
60	0.2M Ammonium Iodide		20% (w/v) PEG 3350
61	0.2M Sodium Thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350
62	0.2M Potassium Thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350
63	0.2M Lithium Nitrate		20% (w/v) PEG 3350
64	0.2M Magnesium Nitrate		20% (w/v) PEG 3350
65	0.2M Sodium Nitrate		20% (w/v) PEG 3350
66	0.2M Potassium Nitrate		20% (w/v) PEG 3350
67	0.2M Ammonium Nitrate		20% (w/v) PEG 3350

68	0.2M Magnesium Formate		20% (w/v) PEG 3350
69	0.2M Sodium Formate		20% (w/v) PEG 3350
70	0.2M Potassium Formate		20% (w/v) PEG 3350
71	0.2M Ammonium Formate		20% (w/v) PEG 3350
72	0.2M Lithium Acetate		20% (w/v) PEG 3350
73	0.2M Magnesium Acetate		20% (w/v) PEG 3350
74	0.2M Zinc Acetate		20% (w/v) PEG 3350
75	0.2M Sodium Acetate		20% (w/v) PEG 3350
76	0.2M Calcium Acetate		20% (w/v) PEG 3350
77	0.2M Potassium Acetate		20% (w/v) PEG 3350
78	0.2M Ammonium Acetate		20% (w/v) PEG 3350
79	0.2M Lithium Sulfate		20% (w/v) PEG 3350
80	0.2M Magnesium Sulfate		20% (w/v) PEG 3350
81	0.2M Sodium Sulfate		20% (w/v) PEG 3350
82	0.2M Potassium Sulfate		20% (w/v) PEG 3350
83	0.2M Ammonium Sulfate		20% (w/v) PEG 3350
84	0.2M di-Sodium Tartrate		20% (w/v) PEG 3350
85	0.2M K/Na Tartrate		20% (w/v) PEG 3350
86	0.2M di-Ammonium Tartrate		20% (w/v) PEG 3350
87	0.2M Sodium Phosphate		20% (w/v) PEG 3350
88	0.2M di-Sodium Phosphate		20% (w/v) PEG 3350
89	0.2M Potassium Phosphate		20% (w/v) PEG 3350
90	0.2M di-Potassium Phosphate		20% (w/v) PEG 3350
91	0.2M Ammonium Phosphate		20% (w/v) PEG 3350
92	0.2M di-Ammonium Phosphate		20% (w/v) PEG 3350
93	0.2M tri-Lithium citrate		20% (w/v) PEG 3350
94	0.2M tri-Sodium citrate		20% (w/v) PEG 3350
95	0.2M tri-Potassium citrate		20% (w/v) PEG 3350
96	0.2M tri-Ammonium citrate		20% (w/v) PEG 3350

Πίνακας 19. Σύσταση διαλυμάτων κρυσταλλώσεων – Structure screen I kit.

Number	Salt	Buffer	pH	Precipitant
1	0.02 M calcium chloride	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	30 % v/v MPD
2	0.2 M ammonium acetate	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	30 % w/v PEG 4K
3	0.2 M ammonium sulfate	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	25 % w/v PEG 4K
4	None	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	2.0 M sodium formate
5	None	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	2.0 M ammonium sulfate
6	None	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	8 % w/v PEG 4K
7	0.2 M ammonium acetate	0.1 M tri-sodium citrate	pH 5.6	30 % w/v PEG 4K
8	0.2 M ammonium acetate	0.1 M tri-sodium citrate	pH 5.6	30 % v/v MPD
9	None	0.1 M tri-sodium citrate	pH 5.6	20 % v/v 2-propanol, 20%w/v PEG 4K
10	None	0.1 M tri-sodium citrate	pH 5.6	1.0 M ammonium dihydrogen phosphate
11	0.2 M calcium chloride	0.1M Sodium acetate	pH 4.6	20 % v/v 2-propanol
12	None	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	1.4 M sodium acetate
13	0.2 M tri-sodium citrate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	30 % v/v 2-propanol
14	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	30 % w/v PEG 8K
15	0.2 M magnesium acetate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	20 % w/v PEG 8K
16	0.2 M magnesium acetate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	30 % v/v MPD
17	None	0.1 M imidazole	pH 6.5	1.0 M sodium acetate
18	0.2 M sodium acetate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	30 % w/v PEG 8K
19	0.2 M zinc acetate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	18 % w/v PEG 8K
20	0.2 M calcium acetate	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.5	18 % w/v PEG 8K
21	0.2 M tri-sodium citrate	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	30 % v/v MPD
22	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	30 % v/ v 2-propanol
23	0.2 M calcium chloride	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	28 % v/v PEG 400
24	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	30 % v/v PEG 400
25	0.2 M tri-sodium citrate	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	20 % v/v 2-propanol
26	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	0.8 M K/Na tartrate
27	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	1.5 M lithium sulfate
28	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	0.8 M sodium dihydrogen phosphate/ 0.8 M K dihydrogen phosphate
29	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	1.4 M tri-sodium citrate
30	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	2 % v/v PEG 400, 2.0 M ammonium sulfate

31	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	10 % v/v 2-propanol, 20% w/v PEG 4K
32	None	0.1 M Tris	pH 8.5	2.0 M ammonium sulfate
33	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Tris	pH 8.5	30 % w/v PEG 4K
34	0.2 M tri-sodium citrate	0.1 M Tris	pH 8.5	30 % v/v PEG 400
35	0.2 M lithium sulfate	0.1 M Tris	pH 8.5	30 % w/v PEG 4K
36	0.2 M ammonium acetate	0.1 M Tris	pH 8.5	30 % v/v 2-Propanol
37	0.2 M sodium acetate	0.1 M Tris	pH 8.5	30 % w/v PEG 4K
38	None	0.1 M Tris	pH 8.5	8 % w/v PEG 8K
39	None	0.1 M Tris	pH 8.5	2.0 M ammonium dihydrogen phosphate
40	None	None	-	0.4 M K/Na Tartrate
41	None	None	-	0.4 M ammonium dihydrogen phosphate
42	0.2 M ammonium sulfate	None	-	30 % w/v PEG 8K
43	0.2 M ammonium sulfate	None	-	30 % w/v PEG 4K
44	None	None	-	2.0 M ammonium sulfate
45	None	None	-	4.0 M sodium formate
46	0.05 M potassium dihydrogen phosphate	None	-	20 % w/v PEG 8K
47	None	None	-	30 % w/v PEG 1.5K
48	None	None	-	0.2 M magnesium formate

Πίνακας 20. Σύσταση διαλυμάτων κρυσταλλώσεων – Structure screen II kit.

<i>Number</i>	<i>Salt</i>	<i>Buffer</i>	<i>pH</i>	<i>Precipitant</i>
1	0.1 M sodium chloride	0.1 M Bicine	pH 9.0	30 % v/v PEG 550 MME
2	None	0.1 M Bicine	pH 9.0	2.0 M magnesium chloride
3	None	0.1 M Bicine	pH 9.0	2 % v/v 1,4-Dioxane/10 % w/v PEG 20,000
4	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Tris	pH 8.5	3.4 M 1,6-hexanediol
5	None	0.1 M Tris	pH 8.5	25 % v/v tert-butanol
6	0.01 M nickel chloride	0.1 M Tris	pH 8.5	1.0 M lithium sulfate
7	1.5 M ammonium sulfate	0.1 M Tris	pH 8.5	12 % v/v glycerol
8	0.2 M ammonium dihydrogen phosphate	0.1 M Tris	pH 8.5	50 % v/v MPD
9	None	0.1 M Tris	pH 8.5	20 % v/v ethanol

10	0.01 M nickel chloride	0.1 M Tris	pH 8.5	20 % w/v PEG 2000 MME
11	0.5 M ammonium sulfate	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	30 % v/v MPD
12	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD
13	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	20 % v/v Jeffamine M-600
14	0.1 M sodium chloride	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	1.6 M ammonium sulfate
15	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	2.0 M ammonium formate
16	0.05 M cadmium sulfate	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	1.0 M sodium acetate
17	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	70 % v/v MPD
18	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	4.3 M sodium chloride
19	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	10 % w/v PEG 8000, 8 % v/v ethylene glycol
20	None	0.1 M MES	pH 6.5	1.6 M magnesium sulfate
21	0.1 M potassium phosphate, 0.1 M sodium phosphate	0.1 M MES	pH 6.5	2.0 M sodium chloride
22	None	0.1 M MES	pH 6.5	12 % w/v PEG 20,000
23	1.6 M ammonium sulfate	0.1 M MES	pH 6.5	10 % v/v Dioxane
24	0.05 M caesium chloride	0.1 M MES	pH 6.5	30 % v/v Jeffamine M-600
25	0.01 M cobalt chloride	0.1 M MES	pH 6.5	1.8 M ammonium sulfate
26	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M MES	pH 6.5	30 % w/v PEG 5000 MME
27	0.01 M zinc sulfate	0.1 M MES	pH 6.5	25 % v/v PEG 550 MME
28	None	0.1 M Na HEPES	pH 7.5	20 % w/v PEG 10,000
29	0.2 M potassium sodium tartrate	0.1 M Na citrate	pH 5.6	2.0 M ammonium sulfate
30	0.5 M ammonium sulfate	0.1 M Na citrate	pH 5.6	1.0 M lithium sulfate
31	0.5 M sodium chloride	0.1 M Na citrate	pH 5.6	4 % v/v polyethyleneimine
32	None	0.1 M Na citrate	pH 5.6	35 % v/v tert-butanol
33	0.01 M ferric chloride	0.1 M Na citrate	pH 5.6	10 % v/v Jeffamine M-600
34	0.01 M manganese chloride	0.1 M Na citrate	pH 5.6	2.5 M 1,6-hexanediol
35	None	0.1 M Na acetate	pH 4.6	2.0 M sodium chloride
36	0.2 M sodium chloride	0.1 M Na acetate	pH 4.6	30 % v/v MPD
37	0.01 M cobalt chloride	0.1 M Na acetate	pH 4.6	1.0 M 1,6-hexanediol
38	0.1 M cadmium chloride	0.1 M Na acetate	pH 4.6	30 % v/v PEG 400
39	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M Na acetate	pH 4.6	30 % w/v PEG 2000 MME
40	2.0 M sodium chloride	None	None	10 % w/v PEG 6000
41	0.01 M CTAB	None	None	0.5 M sodium chloride, 0.1 M magnesium chloride
42	None	None	None	25 % v/v ethylene glycol
43	None	None	None	35 % v/v dioxane

44	2.0 M ammonium sulfate	None	None	5 % v/v 2-propanol
45	None	None	None	1.0 M imidazole pH 7.0
46	None	None	None	10 % w/v PEG 1000, 10 % w/v PEG 8000
47	1.5 M sodium chloride	None	None	10 % v/v ethanol
48	None	None	None	1.6 M sodium citrate pH 6.5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Amaya Y., Yamazaki K., Sato M., Noda K. and 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 and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. J Biol Chem 265(24): 14170-14175.
- **Andrews, P., Bray, R.C., Edwards, P., and Shooter, K. V., (1964).** The Chemistry of Xanthine Oxidase. 11. Ultracentrifuge and gel-filtration studies on the milk enzyme. Biochem. J., 93, 627.
- **Ball, E. G., (1939).** Xanthine oxidase: Purification and properties. J. Biol. Chem. 128, 51-67.
- **Battelli M.G., Lorenzoni E. and Stirpe F., (1973).** Mik Xanthine Oxidase Type D (Dehydrogenase) and Type O (Oxidase). Purification, interconversion and some properties. Biochem. J. 131, 191-198.
- **Berry CE., and Hare JM., (2004).** Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. J. Physiol. 555: 589–606.
- **Blundell, T.L., and Johnson, N.L., (1976).** Protein crystallography. Academic Press, London.
- **Brandes, R.P., Koddensberg, G., Gwinner, W., Kim, D., Kruse, H.J., Busse, R. & Mugge, A., (1999).** Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. Hypertension, 33, 1243–9.
- **Bray, R. C., and Watts, D. C., (1966).** The Chemistry of Xanthine Oxidase. Reaction with iodoacetamide. Biochem. J. 98, 142-148.

- **Bray, R. C., Bennett, B., Burke, J. F., Chovnick, A., Doyle, W. A., Howes, B. D., Lowe, D. J., Richards, R. L., Turner, N. A., Ventom, A., and Whittle, J. R. (1996)** Recent studies on xanthine oxidase and related enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 24(1):99–105.
- **Cao, H., Paufl, J.M., and Hille R., (2010).** Substrate Orientation and Catalytic Specificity in the Action of Xanthine Oxidase: The sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid. *J. Biol. Chem.* 285: 28044-28053.
- **Cazzaniga G., Terao M., Lo Schiavo P., Galbiati F., Segalla F., Seldin MF., Garattini E., (1994).** Chromosomal mapping, isolation, and characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene. *Genomics* 23(2): 390-402.
- **Chow CW., Clark M., Rinaldo J., 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 and C/EBP binding sites are involved in transcription from the TATA-less rat XDH/XO basal promoter. *Nucleic Acids Res* 23(16): 3132-3140.
- **Clark MP., Chow CW., Rinaldo JE., Chalkley R., (1998).** Correct usage of multiple transcription initiation sites and 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., and Chalkley R. (1998).** Multiple domains for initiator binding proteins TFII-I and YY-1 are present in the initiator and upstream regions of the rat XDH/XO TATA-less promoter. *Nucleic Acids Res* 26(11): 2813-2820.
- **DoehnerWand Anker SD., (2005).** Xanthine oxidase inhibition for chronic heart failure: is allopurinol the next therapeutic advance in heart failure? *Heart* 91:707–709.

- **Eger, B. T., Okamoto, K., Enroth, C., Sato, M., Nishino, T., Pai, E. F., and Nishino, T., (2000).** Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase isolated from bovine milk. *Acta Cryst.* D56, 1656-1658.
- **Engberding N., Spiekermann S., Schaefer A., Heineke A., Wiencke A., Muller M., Fuchs M., Hilfiker-Kleiner D., Hornig B., Drexler H., et al., (2004).** Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug? *Circulation* 110:2175–2179.
- **Engerson, T. D., McKelvey, T. G., Rhyne, D. B., Boggio, E. B., Snyder, S. J., and Jones, H. P., (1987).** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues, *J. Clin. Invest.* 79:1564–1570.
- **Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., and Pai, E. F., (2000).** Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10723–10728.
- **Ferdinandy P., Panas D., and Schulz R., (1999).** Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am J Physiol* 276: H1861–H1867.
- **Fukunari, A., Okamoto, K., Nishino, T., Eger, B.T., Pai, E.F., Kamezawa, M., Yamada, I., and Kato, N., (2004).** Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1Hpyrazole- 4-carboxylic Acid]: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor with Hepatic Excretion. *JPET* 311:519–528.
- **Garattini E, Mendel R, Romao MJ, Wright R and Terao M. (2003).** Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. *Biochem J* 372(Pt 1): 15-32.

- **Gardlik S., and Rajagopalan K. V., (1990).** The State of Reduction of Molybdopterin in Xanthine Oxidase and Sulfite Oxidase. *J. Biol. Chem.* 265, X3047-13054.
- **Gilbert, D.A., (1964).** The Chemistry of Xanthine Oxidase. 10. The inhibition of the bovine enzyme by purine 6-aldehyde. *Biochem. J.*, 93, 214-219.
- **Harrison R., (2006).** Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *Inter. Dairy J.*16, 546–554.
- **Hart, L.I., McGartoll, M.A., Chapman, H.R., and Bray, R. C., (1970).** The Composition of Milk Xanthine Oxidase. *Biochem. J.* 116, 851-864.
- **Hassoun, P. M., Yu, F. S., Zulueta, J. J., White, A. C., and Lanzillo, J. J., (1995).** Effect of nitric oxide and cell redox status on the regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase, *Am. J. Physiol.* 268(5 Pt. 1):L809–817.
- **Hellsten Y., Sjödin B., Richter E. A., Bangsbo J. (1998).** Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *American Journal of Physiology* 274:E600-E606.
- **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).** Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 9, 995-1003.
- **Hille R., and Anderson R.F., (2001).** Coupled Electron/Proton Transfer in Complex Flavoproteins. Solvent kinetic isotope effect studies of electron transfer in xanthine oxidase and trimethylamine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 276, 31193–31201.
- **Hille R., and Nishino T., (1995).** Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* 9, 995-1003.

- **Hille, R., and Nishino, T., (1995).** Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase [review], *FASEB J.* 9(11):995–1003.
- **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 and chromosomal location of the gene. *Gene* 133, 279-284.
- **Jarasch, E. D., Bruder, G., and Heid, H. W., (1986).** Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells, *Ada Physiol. Scand.* 548: 39–46.
- **Jarasch, E. D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W., and Franke, W. W., (1981).** Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium, *Cell* 25(1):67–82.
- **Kam, Z., Shore, H.B., and Feher, G., (1978).** Crystallization of proteins. *J. Mol. Biol.* 123: 539-555.
- **Keith TP, Riley MA, Kreitman M, Lewontin RC, Curtis D and Chambers G. (1987).** Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (rosy locus) in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 116(1): 67-73.
- **Keith, T. P., Riley, M. A , Kreitman, M., Lewontin, R. C., Curtis, D., and Chambers, G., (1987).** Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (rosy locus) in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 116(1):67–73.
- **Kim, J.H., and Hille, R., (1993).** Reductive Half-reaction of Xanthine Oxidase with Xanthine. Observation of a spectral intermediate attributable to the molybdenum center in the reaction of enzyme with xanthine. *J. Biol. Chem.* 268, 44-51.

- **Kim, J.H., Ryan, M.G., Knaut, H., and Hille, R., (1996).** The Reductive Half-reaction of Xanthine Oxidase. The involvement of prototropic equilibria in the course of the catalytic sequence. *J. Biol. Chem.* 271, 6771–6780.
- **Kittleson MM. and Hare JM., (2005).** Xanthine oxidase inhibitors: an emerging class of drugs for heart failure. *Eur Heart J* 26:1458–1460.
- **Kooij A., (1994).** A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase [review], *Histochem. J.* 26(12) 889–915.
- **Kooij, A., Schiller, H. J , Schijns, M., Van Noorden, C. F. J., and Frederiks, W. M., (1994).** Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia, *Hepatology* 19:1488–1495.
- **Kuwabara, Y., Nishino, T., Okamoto, K., Matsumura, T., Eger, B. T., Pai, E. F., and 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.
- **Lanzillo, J.J., Yu, F.S., Stevens, J. & Hassoun, P.M. (1996).** Determination of xanthine dehydrogenase mRNA by a reverse transcription-coupled competitive quantitative polymerase chain reaction assay: regulation in rat endothelial cells by hypoxia and hyperoxia. *Arch Biochem Biophys*, 335, 377–80.
- **Martí, R., Varela, E., Pascual, C., Segura R.M., (2001).** Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions. *Clinica Chimica Acta* 303, 117–125.
- **Massey, V., Brumby, P. E., Komai, H. & Palmer, G. (1969).** Studies on Milk Xanthine Oxidase. Some spectral and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 244, 1682-1691.

- **McManaman, J.L., Palmer, C.A., Wright, R.M. & Neville, M.C. (2002).** Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. *J Physiol*, 545, 567–79.
- **Minoshima S., Wang Y., Ichida K., Nishino T. and Shimizu N., (1995).** Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase (oxidase) (XDH) to band p23 of chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet* 68(1-2): 52-53.
- **Miyamoto Y., Akaike T., Yoshida M., Goto S., Horie H., and Maeda H., (1996).** Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med* 211:366–373.
- **Moochhala, S. M., and Renton, K. W., (1991).** A role for xanthine oxidase in the loss of cytochrome P-450 evoked by interferon, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69(7):944–950.
- **Nishino, T. and Tsushima K., (1986).** Interaction of Milk Xanthine Oxidase with Folic Acid. Inhibition of milk xanthine oxidase by folic acid and separation of the enzyme into two fractions on sepharose 4B/folate gel. *J Biol Chem* 261 (24): 11242-11246.
- **Nishino, T., Nishino T. and Tsushima K., (1981).** Purification of highly active milk xanthine oxidase by affinity chromatography on sepharose 4B/folate gel. *FEBS* 131, 369-372.
- **Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T., Pai E.F., and Nishino, T., (2008).** Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS* 275, 3278–3289.
- **Ohara Y., Peterson TE., and Harrison DG., (1993).** Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Investig* 91:2546–2551.

- **Okamoto, K., Eger, B.T., Nishino, T., Kondo, S., Pai, E.F., and Nishino T., (2003).** An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* 278, 1848–1855.
- **Okamoto, K., Matsumoto, K., Hille, R., Eger, B.T., Pai, E.F. and Nishino T., (2004).** The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *PNAS* 101, 7931–7936.
- **Olson JS., Ballou DP., Palmer G. & Massey V., (1974).** The mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 249, 4363-4382.
- **Olson JS., Ballou DP., Palmer G. & Massey V., (1974).** The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen. *J Biol Chem* 249, 4350-4362.
- **Pacher, P., Nivorozhkin, A., and Szabo C., (2006).** Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* 58: 87–114.
- **Parks, D. A., and Granger, D. N., (1986).** Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology, *Acta Physiol. Scand.* 548:87–99.
- **Pauff, J. M., and Hille R., (2009).** Inhibition Studies of Bovine Xanthine Oxidase by Luteolin, Silibinin, Quercetin, and Curcumin. *J. Nat. Prod.* 72, 725–731.
- **Pauff, J. M., Cao H., and Hille R., (2009).** Substrate Orientation and Catalysis at the Molybdenum Site in Xanthine Oxidase. Crystal structures in complex with xanthine and lumazine. *J. Biol. Chem.* 284, 8760–8767.
- **Pauff, J. M., Zhang, J., Bell, C. E., and Hille R., (2008).** Substrate Orientation in Xanthine Oxidase. Crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine. *J. Biol. Chem.* 283, 4818–4824.

- **Pea F. (2005).** Pharmacology of drugs for hyperuricemia: mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib Nephrol* 147:35–46.
- **Rhodes, G., (1999).** Crystallography Made Crystal Clear. Academic Press, New York, pp.286
- **Rytkönen EMK, Halila R, Laan M, Saksela M, Kallioniemi OP, Palotie A and Raivio KO. (1995).** The human gene for xanthine dehydrogenase (XDH) is localized on chromosome band 2q22. *Cytogenet Cell Genet* 68(1-2): 61-63.
- **Saksela M. and Raivio KO., (1996).** Cloning and expression in vitro of human xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem J* 315(Pt 1): 235-239.
- **Sato, A., Nishino, T., Noda, K., and Amaya, Y., (1995).** The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. cDNA cloning and the domain structure, *J. Biol. Chem.* 270:2818–2826.
- **Smalley RV., Guaspari A., Haase-Statz S., Anderson SA., Cederberg D., and Hohneker JA., (2000).** Allopurinol: intravenous use for prevention and treatment of hyperuricemia. *J Clin Oncol* 18:1758–1763.
- **Tan, S., Gelman, S., Wheat, J. K., and Parks, D. A., (1995)** Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion, *South. Med. J.* 88(4):479–482.
- **Tan, S., Radi, R., Gaudier, F, Evans, R. A., Rivera, A., Kirk, K. A., and Parks, D. A., (1993).** Physiologic levels of uric acid inhibit xanthine oxidase in human plasma, *Pediatr. Res.* 34(3):303–307.
- **Tan, S., Radi, R., Gaudier, F, Evans, R. A., Rivera, A., Kirk, K. A., and Parks, D. A., (1993).** Physiologic levels of uric acid inhibit xanthine oxidase in human plasma, *Pediatr. Res.* 34(3):303–307.
- **Terao M, Cazzaniga G, Ghezzi P, Bianchi M, Falciani F, Perani P and 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(Pt 3): 863-870.

- **Terao M., Kurosaki M., Demontis S., Zanotta S., and Garattini E., (1998).** Isolation and 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., Cazzaniga, G., Ghezzi, P., Bianchi, M., Falciani, F., Perani, P., and 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.
- **Ventom, A.M., Deistung J., and Bray R.C., (1988).** The isolation of demolybdo xanthine oxidase from bovine milk. *Biochem. J.* 255, 949-956.
- **White CR., Darley-Usmar V., Berrington WR., McAdams M., Gore JZ., Thompson JA., Parks DA., Tarpey MM., and Freeman BA., (1996).** Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8745–8749.
- **White, C. R., Darley-Usmar, V, Berrington, W. R., McAdams, M., Thompson, J. A., Parks, D. A., Tarpey, M. M., and Freeman, B. A. (1996).** Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8745–8749.
- **Wiezorek, J. S., Brown, D. H., Kupperman, D. E., and Brass, C. A., (1994).** Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia, *J. Clin. Invest.* 94(6):2224–2230.
- **Wright, R. M., Vaitaitis, G. M., Wilson, C. M., Repine, T. B., Terada, L. S., and Repine, J. E., (1993).** cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10690–10694.
- **Χατζόπουλος Γ., (2004).** Κινητική και κρυσταλλογραφική ανάλυση της 5'-μονοφωσφορικής ινοσίνης ως αναστολέα των παγκρεατικών ριβονουκλεασών. Διδακτορική διατριβή, Αθήνα.

- **Xu P., Huecksteadt T. and Hoidal JR., (1996).** Molecular Cloning and Characterization of the Human Xanthine Dehydrogenase Gene (XDH). *Genomics* 34, 173-180.
- **Xu P., Huecksteadt TP., Harrison R., Hoidal JR., (1995).** Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 215, 429.
- **Xu P, LaVallee P and Hoidal JR. (2000).** Repressed expression of the human xanthine oxidoreductase gene. E-box and TATA-like elements restrict ground state transcriptional activity. *J Biol Chem* 275(8): 5918-5926.
- **Xu P, Zhu XL, Huecksteadt TP, Brothman AR, Hoidal JR (1994).** Assignment of human xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22. *Genomics.* 23, 289-291.
- **Yokoyama, Y., Beckman, J. S., Beckman, T. K., Wheat, J. K., Cash, T. G., Freeman, B. A., and Parks, D. A., (1990).** Circulating xanthine oxidase: Potential mediator of ischemic injury, *Am. J. Physiol.* 258:G564–G570.