

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΩΝ
ΛΙΠΟΞΥΓΕΝΑΣΩΝ ΣΕ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΕΣ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ-ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΒΑΛΣΑΜΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτριος Φ. Γανωτάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

**UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
BIOCHEMISTRY LABORATORY**



**STUDY OF THE ENZYMES OF LIPOXYGENASE
PATHWAY IN CHLOROPLASTS**

ELEFThERIA- ANGELIKI VALSAMI

Supervisor Professor: Demetrios F. Ghanotakis

HERAKLION 2014

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΩΝ
ΛΙΠΟΞΥΓΕΝΑΣΩΝ ΣΕ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΕΣ**

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Τσιώτης

Αν. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε από το 2008 μέχρι και σήμερα, τόσο σε προπτυχιακό όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο, όπως επίσης και για όλη την υλικοτεχνική δομή που μου παρείχε για να μπορέσω να φέρω εις πέρας τη μεταπτυχιακή μου εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δρ. Δημήτριο Γανωτάκη για την ανάθεση του θέματος της παρούσας εργασίας, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε ώστε να μου επιτρέψει να εργαστώ στο εργαστήριο του τα τελευταία τρεισήμισι χρόνια τόσο για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και για τη μεταπτυχιακή μου εργασία. Η συνεχής καθοδήγηση, οι πολύτιμες συμβουλές καθώς επίσης και η αμέριστη συμπαράσταση του ήταν καθοριστικές για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τον Αν. Καθηγητή Δρ. Γεώργιο Τσιώτη και τον Καθηγητή Δρ. Κυριάκο Κοτζαμπάση που δέχθηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους πολύ καλούς συνεργάτες από το εργαστήριο. Αρχικά τον μεταδιδάκτορα Δρ. Δημήτριο Στεφανάκη και τους υποψήφιους διδάκτορες Χάρη Νάζο και Άρη Μίχογλου για τη βοήθεια που μου παρείχαν οποιαδήποτε στιγμή τη χρειαζόμουνα καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν κάνοντας τις ώρες στο εργαστήριο να περνούν πραγματικά ευχάριστα. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ελίζα Μυτιληνάκη για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου προσέφερε όταν ξεκίνησα τα πειράματα καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τους μεταπτυχιακούς Γρηγόρη Γιακουμάκη και Έλλη Φουρναράκη για το ευχάριστο περιβάλλον.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Τσιώτη, Κατερίνα Αρβανίτη, Αντιγόνη Νικολάκη, Ελένη Κασσωτάκη, Έφη Μαναρωλάκη και Δημήτρη Δέδογλου. Ευχαριστώ ιδιαίτερος την Αντιγόνη Νικολάκη και τον Δρ. Γεώργιο Τσιώτη για όλη τη βοήθεια που μου παρείχαν με τη λήψη και επεξεργασία των φασμάτων στο MALDI TOF/TOF MS.

Θα ήταν μεγάλη μου παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου από Ρόδο που με στήριζαν τα τόσα χρόνια που είμαι στο Ηράκλειο και που εξακολουθούν να είναι δίπλα μου καθώς και τους καλούς φίλους που έκανα στο Ηράκλειο οι οποίοι έκαναν την παραμονή μου ευχάριστη και γεμάτη χαρούμενες στιγμές και αναμνήσεις.

Τέλος και πάνω από όλους και από όλα, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, κυρίως τους γονείς μου Νίκο και Κατερίνα , τον αδερφό μου Κυριάκο και την αδελφή μου Χριστίνα γιατί χωρίς την δικιά τους οικονομική και ηθική στήριξη τίποτα από όλα αυτά που έχω καταφέρει τόσα χρόνια δεν θα είχε γίνει πραγματικότητα.

Περίληψη

Η λύση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (HPL), αποτελεί σημαντικό παράγοντα του μονοπατιού της λιποξυγενάσης, δηλαδή της αμυντικής δράσης των φυτών ενάντια σε εξωγενείς παράγοντες. Η δράση της λύσης οδηγεί στην παραγωγή μικρού μοριακού βάρους ενώσεων, μεγάλης σπουδαιότητας για τα φυτά, όπως είναι η 2-(E)-εξανάλη και η εξανάλη, δηλαδή ουσίες που ανήκουν στις «πτητικές ενώσεις των πράσινων φύλλων» αλλά και πρόδρομες ενώσεις σημαντικών βιορυθμιστών για τα φυτά. Παρ' όλες τις μελέτες που έχουν γίνει για το μονοπάτι της λιποξυγενάσης, παραμένει ακόμα ασαφής η τοποθεσία της HPL στους χλωροπλάστες.

Στην παρούσα εργασία, έγιναν μελέτες εντοπισμού του ενζύμου στους χλωροπλάστες καθώς και μελέτες απομόνωσης του από το σπανάκι. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν διαφορετικές μεμβράνες των χλωροπλαστών και στη συνέχεια έγιναν μελέτες για την παρουσία του ενζύμου. Σε όλα τα δείγματα που απομονώθηκαν, διεξήχθησαν μελέτες κινητικής παρουσία του υποστρώματος του ενζύμου 13-υδροϋπεροξειδίου του λινολεϊκού οξέος, μελέτη ανίχνευσης προϊόντων παρουσία 2,4-δινιτρο-φαινυλδραζίνης, ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος και φασματομετρικός προσδιορισμός, και τέλος ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί η παρουσία της HPL. Ο προσδιορισμός της κινητικής του ενζύμου φασματομετρικά έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τέλος, έγιναν μελέτες αναστολής του ενζύμου με την ένωση μπλε του μεθυλενίου, όπου ανέστειλε μόνο το 50% της δράσης της HPL.

Abstract

Fatty acid hydroperoxide lyase (HPL) is an important factor of the lipoxygenase path that is the defense system of plants against exogenous factors. HPL's function leads to small molecular weight compounds production. They are products of great importance, such as 2-(E)-hexenal and hexanal. These substances belong to the "green leaf volatiles" and they are important precursors for plants. Despite all the studies done on the lipoxygenase pathway, the location of HPL in chloroplasts is still not known.

In the current study an effort of identification of the exact site of chloroplasts where the enzyme is placed was carried out. Isolation of the enzyme from spinach leaves was tried as well. For this reason different chloroplast membranes were isolated and tests of enzyme presence were conducted. In all samples that were isolated, kinetic tests were carried out in the presence of the enzyme's substrate, 13- hydroperoxide of linoleic acid, products was tested by the presence of 2,4-dinitro-phenylhydrazine, analysis with thin layer chromatography (TLC), spectroscopic determination, and SDS-PAGE electrophoresis. The main target was the determination of the presence of HPL or not. The spectrometric kinetic determination of the enzyme activity gave us good results. In the end, inhibition studies of the enzyme were carried out by the use of Methylene blue which resulted in 50% HPL's action reduction.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

His : Ηστιδίνη

HPL : Λύση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

P450 : Οικογένεια κυτοχρωμάτων

CYP74 : Μέλος της οικογένειας κυτοχρωμάτων P450

kDa : kilodalton

GLV: Green Leaf Volatile

LOX: Lipoxygenase (enzyme or enzymatic pathway)

AOS: Allene Oxide Synthase

DES: Divinyl Ether Synthase

ADH: Alcohol Dehydrogenase

POX: Peroxygenase

HPO: Hydroperoxy-acids (general term)

9-HPOD: (10E,12E)-9-hydroperoxy-10,12 octadecadienoic acid

9-HPOT: (10E,12E,15Z)-9-hydroperoxy-10,12,15 octadecatrienoic acid

13-HPOD : 13-S-υδροϋπεροξειδιο-9-Z-,11-E-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ

ppm : parts per million

MS : Φασματοσκοπία μάζας

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

TOF : Time Of Flight

EDTA : Αιθυλένο-διάμινο-τετραοξικό οξύ

Na₂HPO₄ : Οξινο φωσφορικό νάτριο

Na₂CO₃ : Ανθρακικό νάτριο

KH₂PO₄ : Δις-όξινο φωσφορικό κάλιο

K₂HPO₄ : Μόνο-όξινο φωσφορικό κάλιο

PMSF : Φαίνυλο-μέθυλ-σουλφόνυλο-φθορίδιο

UV-Vis : Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού

TEMED : N, N, N', N' – τετραμέθυλο-διαμίνη

SDS : Δωδεκανοθειϊκό νάτριο

APS : Υπερθειϊκό αμμώνιο

BSA : Αλβουμίνη

DTT : Διθειοθρεϊτόλη

PEG : Πολυαιθυλενογλυκόλη

IAA : Ιωδοακεταμίδιο

TFA : Τρίφθορο οξικό οξύ

ACN : Ακετονιτρίλιο

PSI: φωτοσύστημα I

PSII: φωτοσύστημα II

Περιεχόμενα

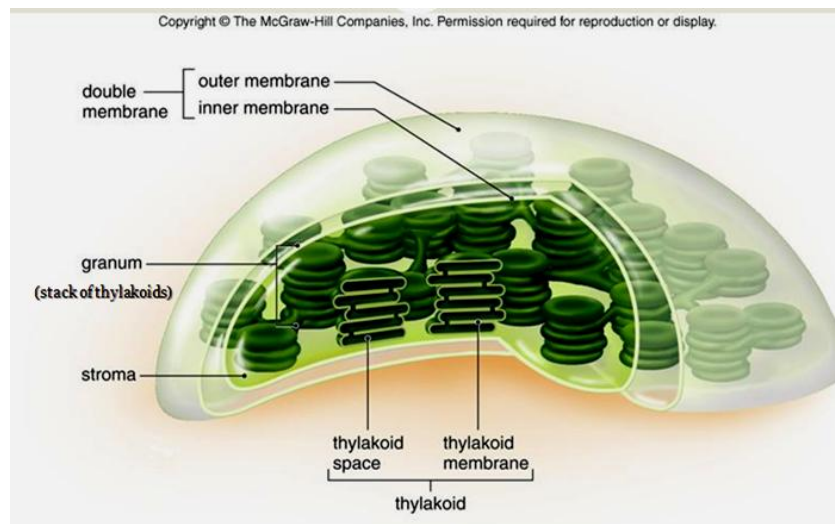
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. Χλωροπλάστες	1
1.2. Μονοπάτι της Λιποξυγενάσης.....	3
1.3. Λύαση του υδρουπεροξειδίου των λιπαρών οξέων.....	5
1.4. Εντοπισμός στους φυτικούς ιστούς.....	9
1.5. Επίδραση αναστολέων στην ενεργότητα της HPL.....	10
1.6. Πτητικές ενώσεις πράσινων φύλλων (GLVs)	11
1.7. Χρήση των GLVs στη βιομηχανία τροφίμων	14
1.8. Ανασυνδυασμός της HPL	16
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	18
3. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
3.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης της χλωροφύλλης	19
3.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.....	19
3.3. Απομόνωση χλωροπλαστών από σπανάκι	20
3.3.1. Βήματα	20
3.3.2. Διαλύματα	21
3.4. Απομόνωση envelope μεμβρανών από σπανάκι	21
3.4.1. Βήματα	21
3.4.2. Διαλύματα	22
3.5. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι I	22
3.5.1. Βήματα	22
3.6. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι II.....	23
3.6.1. Βήματα	23
3.6.2. Διαλύματα	23
3.7. Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανών φωτοσυστήματος II και φωτοσυστήματος I από σπανάκι	24
3.7.1. Βήματα	24
3.7.2. Διαλύματα	25
3.8. Απομόνωση HPL από σπανάκι	25
3.8.1. Βήματα	25
3.8.2. Διαλύματα	26
3.9. Πλύσεις θυλακοειδών μεμβρανών	26
3.9.1. Διάλυμα.....	26
3.10. Κλασματική κατακρήμιση πρωτεϊνών με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)	27
3.11. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων	28

3.11.1. Διαλύματα	29
3.12. Προετοιμασία υποστρώματος	29
3.13. Μελέτη της δραστηριότητας της HPL	30
3.14. Κατακρήμιση πρωτεϊνών.....	31
3.15. Ηλεκτροφόρηση	31
3.16. Δισδιάστατη SDS- Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.....	33
3.17. Ταυτοποίηση πεπτιδίων.....	33
3.17.1. Προετοιμασία δειγμάτων	33
3.17.2. Βήματα	33
3.17.3. Διαλύματα	34
3.17.4. Φασματομετρία MALDI TOF/TOF.....	35
3.18. Ένδειξη παρουσίας HPL- Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη 36	
3.19. Αναστολή της δράσης της HPL	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
4.1. Παρασκευή υποστρώματος της HPL (Υδροϋπεροξειδίου του λινολεϊκού οξέος ή 13- HPOD).....	39
4.2. Πρωτόκολλα πρωτεϊνικών απομονώσεων.....	40
4.2.1. Απομόνωση χλωροπλαστών από σπανάκι	40
4.2.2. Αναστολή της δράσης της HPL	47
4.2.3. Ένδειξη παρουσίας HPL-Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλ- υδραζίνη 47	
4.3. Πρωτεϊνική ανάλυση με MALDI TOF/TOF MS	50
4.3.1. Envelope μεμβράνες χλωροπλαστών	50
4.3.2. Εμπλουτισμένες μεμβράνες PSI.....	52
4.4. Απομόνωση HPL από σπανάκι	56
4.4.1. Ηλεκτροφόρηση- Μελέτη ενεργότητας	56
4.4.2. Πρωτεϊνική ανάλυση με MALDI TOF/TOF MS -Δείγματα έκλυσης από κολώνα χωρίς πλύσεις	59
4.4.3. Πρωτεϊνική ανάλυση με MALDI TOF/TOF MS -Δείγματα έκλυσης από κολώνα με πλύσεις.....	60
4.4.4. Ένδειξη παρουσίας HPL-Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο- φαινυλδραζίνη	62
5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	63
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	66
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

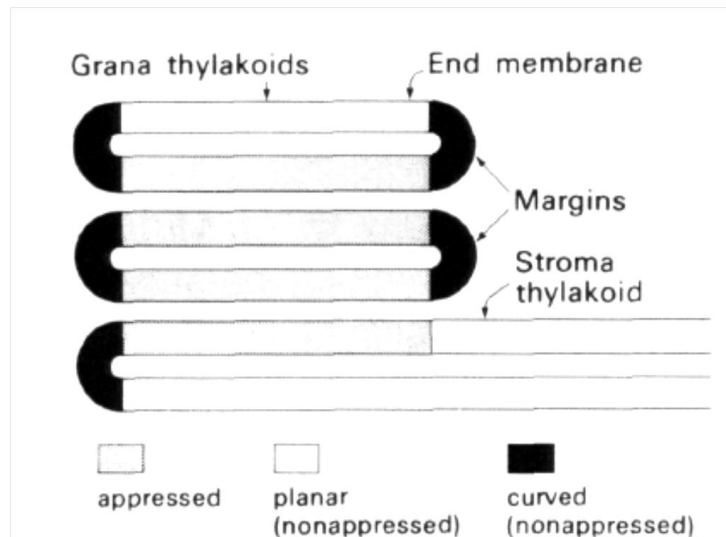
1.1. Χλωροπλάστες

Ο χλωροπλάστης αποτελεί ένα ουσιαστικό οργανίδιο των φωτοσυνθετικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Συλλέγει και μετατρέπει τη φωτεινή ενέργεια σε χημική ενέργεια και παράγει διάφορους μεταβολίτες απαραίτητους για τις κυτταρικές δραστηριότητες [1]. Περιβάλλεται από μία διπλή μεμβράνη (envelope membrane) που αποτελείται από μία εξωτερική και μία εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες περικλείουν ένα διαμεμβρανικό χώρο. Η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή από τα περισσότερα ιόντα και μεταβολίτες. Η εσωτερική μεμβράνη είναι λιγότερο διαπερατή, γεμάτη με πρωτεΐνες μεταφοράς, περικλείει μία υδατική περιοχή που ονομάζεται στρώμα και περιέχει ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης [2, 3]. Στο στρώμα περιέχεται ένα σύστημα εσωτερικών μεμβρανών που ονομάζονται θυλακοειδή και έχουν επίπεδο σχήμα δίσκων. Τα θυλακοειδή διαπλατύνονται και στοιβάζονται σε μορφώματα γνωστά ως κοκκία (grana). Τα κοκκία ενώνονται μεταξύ τους με μεμβρανώδης περιοχές που ονομάζονται θυλακοειδή του στρώματος (stroma lamellae). Ο χώρος που βρίσκεται στο εσωτερικό των θυλακοειδών ονομάζεται lumen. Οι μεμβράνες των θυλακοειδών οι οποίες είναι αδιαπέραστες στα περισσότερα μόρια και ιόντα, περιέχουν τις φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες, τα κέντρα αντίδρασης, τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων και τη συνθάση του ATP [4].



Εικόνα 1. Χλωροπλάστης

Οι θυλακοειδείς μεμβράνες περιέχουν τρεις δομικά διακριτές επικράτειες: τις επίπεδες αρκετά συμπιεσμένες μεμβράνες (the planar appressed membranes) των grana, τις επίπεδες μη συμπιεσμένες μεμβράνες θυλακοειδών του στρώματος (the planar non-appressed stroma thylacoids), και τα πολύ κυρτά, μη συμπιεσμένα περιθώρια των grana (the highly curved, non appressed margins of grana) [5].

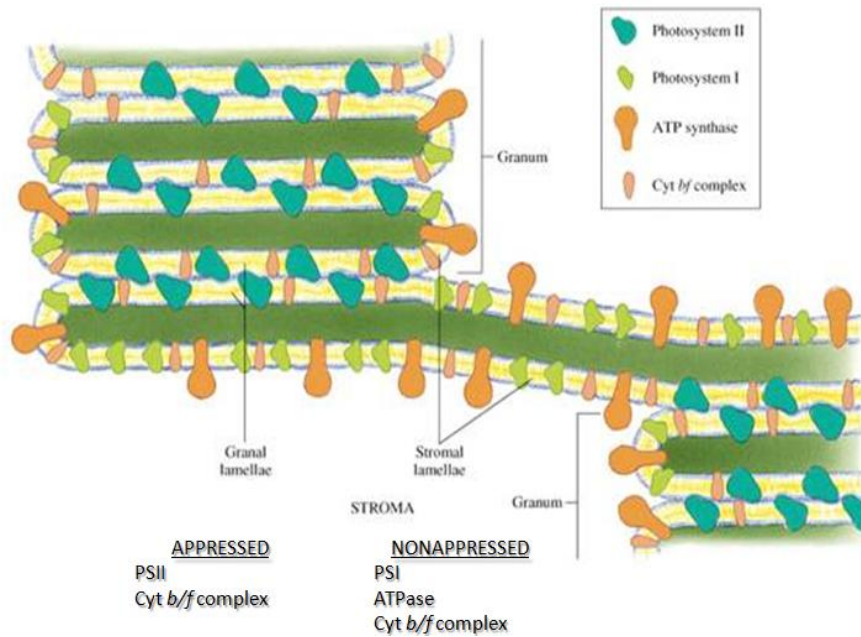


Εικόνα 2. Σχηματικό μοντέλο της εγκάρσιας τομής των grana και του στρώματος των θυλακοειδών δείχνει τρεις δομικά διακριτές συμπιεσμένες (appressed) και μη συμπιεσμένες (non appressed) επικράτειες

Οι στενά συμπιεσμένες στοίβες θυλακοειδών, τα grana, των οποίων οι εξωτερικές επιφάνειες δεν είναι σε άμεση επαφή με το στρώμα, περιέχουν υπομονάδες του πυρήνα του φωτοσυστήματος II, μαζί με τα περισσότερα από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα συλλογής φωτός του φωτοσυστήματος II (LHCP II).

Οι επίπεδες μη- συμπιεσμένες μεμβράνες θυλακοειδών του στρώματος διασυνδέουν τα διαμερίσματα των grana, έχουν άμεση πρόσβαση στο στρώμα και περιέχουν το σύμπλοκο του φωτοσυστήματος I [6], την ATP συνθάση [7, 8].

Τα περιθώρια (margins) περιέχουν το σύμπλοκο του κυτοχρώματος b / f, το σύμπλοκο του φωτοσυστήματος I και την ATP συνθάση.



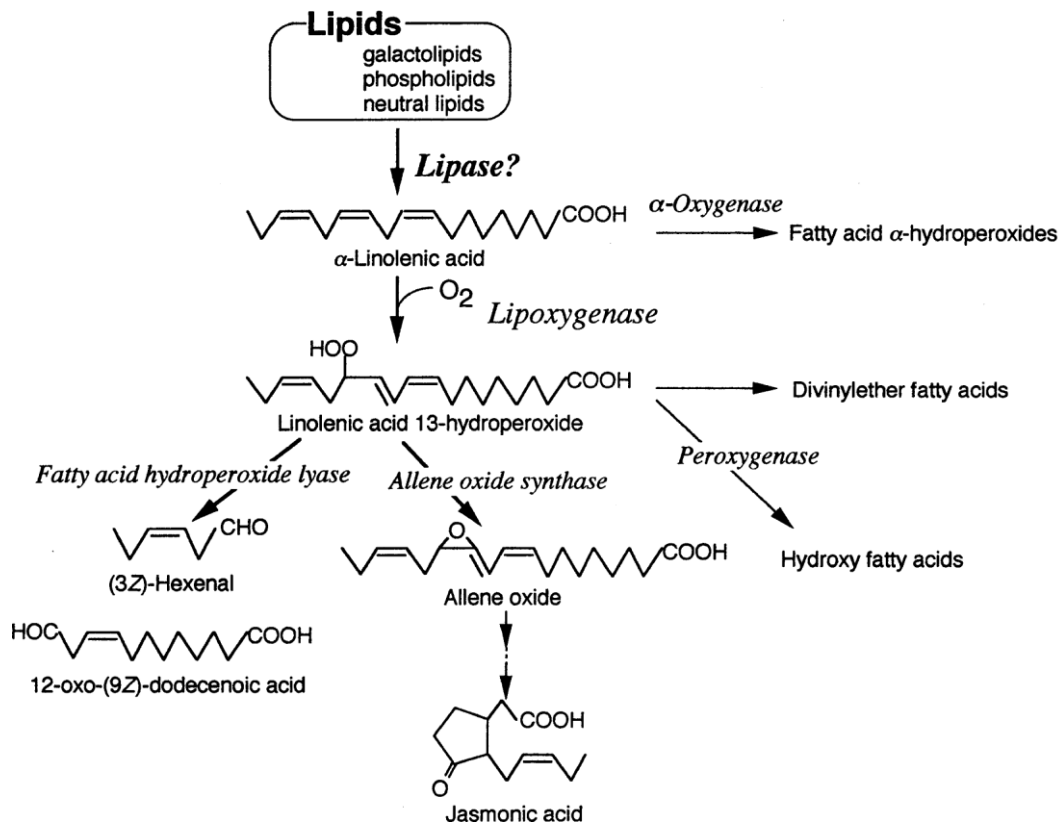
Εικόνα 3. Εμπλουτισμένες σε φωτοσύστημα I και εμπλουτισμένες σε φωτοσύστημα II μεμβράνες των θυλακοειδών

1.2. Μονοπάτι της Λιποξυγενάσης

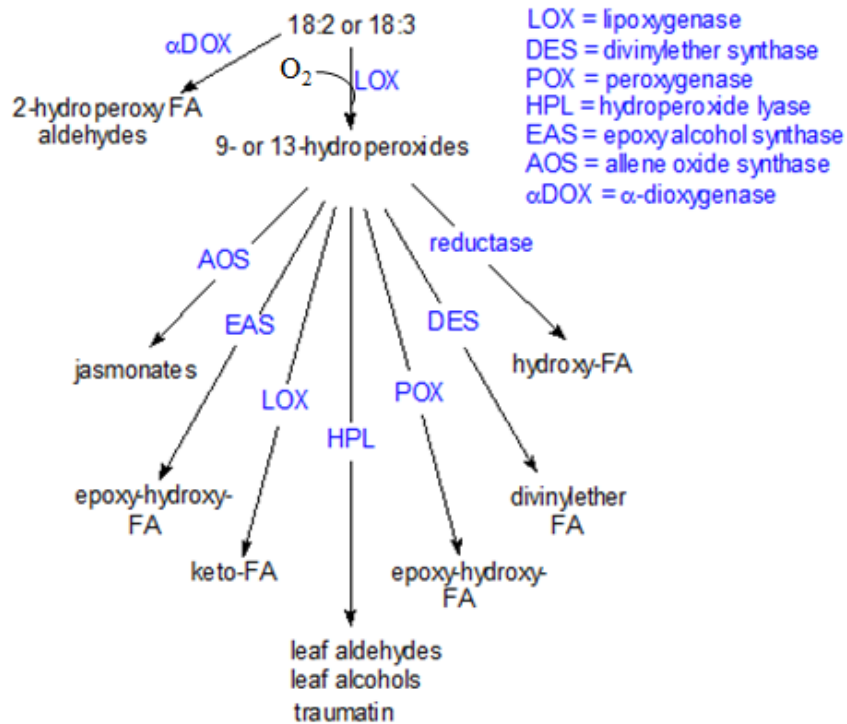
Τα φυτά πρέπει συνεχώς να αμύνονται ενάντια σε απειλητικά για τη ζωή τους γεγονότα όπως είναι ο τραυματισμός, οι ακραίες θερμοκρασίες και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Σήμερα ολοένα και περισσότερες ομοιότητες μεταξύ του μηχανισμού άμυνας των φυτών και των ζώων ανακαλύπτονται. Και στις δύο περιπτώσεις το μονοπάτι της λιποξυγενάσης παίζει σημαντικό ρόλο. Στα φυτά τα προϊόντα αυτού του μονοπατιού εμπλέκονται στην επούλωση των πληγών, στην αντίσταση κατά των παρασίτων, στη σηματοδότηση όπως επίσης παρουσιάζουν αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες [9].

Το πρώτο βήμα στο μονοπάτι της Λιποξυγενάσης είναι η αντίδραση του λινολεϊκού ή του λινολενικού οξέος, δηλαδή λιπαρών οξέων που περιέχουν ένα σύστημα (cis, cis) -1,4-πενταδιενίου, με μοριακό οξυγόνο που καταλύεται από το ένζυμο λιποξυγενάση. Το οξυγόνο μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε άκρο του συστήματος του πενταδιενίου με υψηλή στερεοειδικότητα, και στην περίπτωση του λινολεϊκού και α-λινολενικού οξέος, οδηγεί είτε στο σχηματισμό 9 (S) - ή 13 (S)-υδροϋπερόξυ- παραγώγων ή και το σχηματισμό και των δύο, ανάλογα με την ειδική ισο-μορφή του ενζύμου. Τα ακόρεστα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων που

σχηματίζονται είναι εξαιρετικά δραστικά και επικίνδυνα για το φυτό και ως εκ τούτου μεταβολίζονται περαιτέρω από τουλάχιστον επτά διαφορετικά ένζυμα όπως είναι η λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Hydroperoxide lyase, HPL), η υπεροξυγενάση (Peroxygenase -PES) και η συνθάση των οξειδίων του αλλενίου (Allene Oxide Synthase - AOS) (εικόνα 5) [10].



Εικόνα 4. Μονοπάτι της λιποξυγενάσης



Εικόνα 5. Επτά διαφορετικές πορείες των υδροϋπεροξειδίων

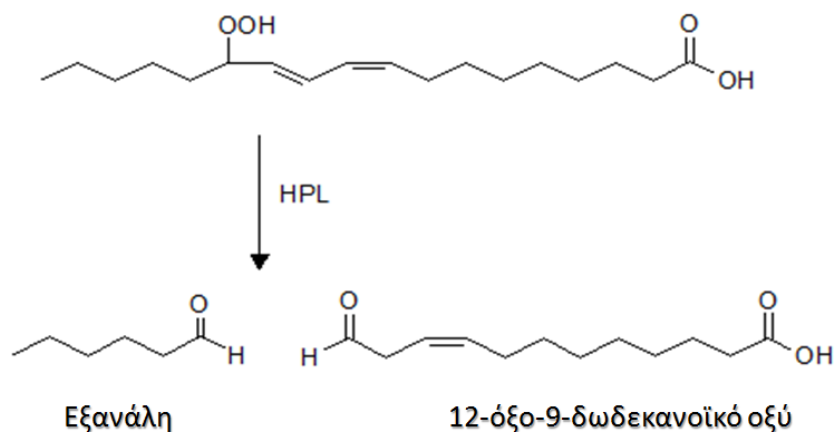
Στα φυτά τα παράγωγα του μονοπατιού αυτού ονομάζονται οξυλιπίνες και η ονομασία αυτή αναφέρεται σε όλα τα προϊόντα της οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων ανεξάρτητα από το μήκος της αλυσίδας και τις διάφορες δομικές ιδιαιτερότητες τους [11].

Οι οξυλιπίνες μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν δυο σημαντικές ομάδες: τα γιασμονοειδή (δηλαδή το γιασμονικό οξύ & τα συγγενή κυκλοπεντανονικά παράγωγα δώδεκα ανθρακατόμων) και τις πτητικές ενώσεις των πράσινων φύλλων (green leaf volatiles) που αποτελούνται από αλδεΐδες και αλκοόλες και διβινυλεστέρες. Τα γιασμονοειδή, με σημαίνοντες βιολογικούς ρόλους, συμβάλλουν στην αμυντική ικανότητα και την επικοινωνία των φυτών.

1.3. Λύση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

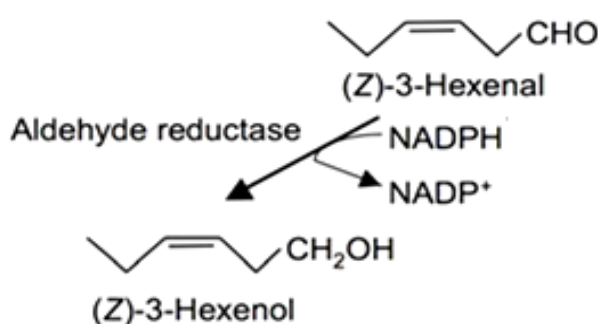
Η λύση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (fatty acid hydroperoxide lyase, HPL ή HPO lyase) είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και σημαντικά ένζυμα που καταλύει την διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των λιπαρών οξέων στο δεσμό που βρίσκεται μεταξύ του άνθρακα που φέρει την ομάδα του υδροϋπεροξειδίου και του παρακείμενου διπλού trans (E) δεσμού όπως φαίνεται στην εικόνα 6.

Συγκεκριμένα η HPL καταλύει τη διάσπαση του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος, δύο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που φέρουν την υδροϋπεροξυ ομάδα στον C-13 ή στον C-9, παράγοντας μικρής αλυσίδας αλδεϋδες και ω-οξο-οξέα [12-16].



Εικόνα 6. Αντίδραση που καταλύει η HPL. Σχηματισμός μικρού μοριακού βάρους αδεϋδών

Οι αλδεϋδες αυτές αποτρέπουν τους εχθρούς του φυτού και γι αυτό το λόγο παράγονται σε τελείως διαταραγμένους ιστούς. Παρόλα αυτά, είναι τοξικές και για το ίδιο το φυτό που τις παράγει, καθώς μειώνουν τη δραστηριότητα του φωτοσυστήματος II. Έτσι, όταν διαχυθούν σε γειτονικούς υγιείς ιστούς, ανάγονται σε αλκοόλες με μία αντίδραση που καταλύεται από μία NADPH εξαρτώμενη αναγωγή (aldehyde reductase) [17].

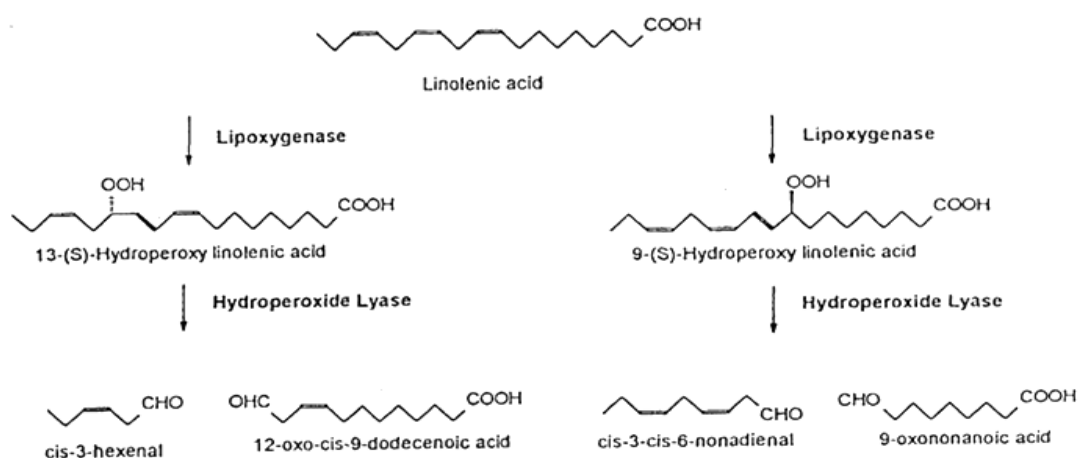


Εικόνα 7. Μετατροπή αλδεϋδών σε αλκοόλες, καταλυόμενη από μία NADPH εξαρτώμενη αναγωγή.

Το ένζυμο σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς συνήθως είναι πιο ενεργό με υδροπεροξειδία που προέρχονται από το λινολεϊκό οξύ, ενώ σε φωτοσυνθετικούς

ιστούς συνήθως δείχνει υψηλή ενεργότητα με υδρουπεροξείδια που προέρχονται από το λινολενικό οξύ [18].

Από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να παραχθούν τόσο 9- όσο και 13- υδρουπεροξείδια, ανάλογα με την τοποειδικότητα της λιποξυγενάσης που διατίθεται στο φυτό. Με τη δράση της HPL τα 13 – υδρουπεροξείδια μετατρέπονται σε αλδεΐδες με έξι άτομα άνθρακα και αλδοξέα με δώδεκα άτομα άνθρακα ενώ, τα 9- υδρουπεροξείδια σε αλδεΐδες και αλδοξέα εννέα ανθρακατόμων (εικόνα 8). Οι περισσότερες HPL δρουν τοποειδικά χρησιμοποιώντας είτε το 13- ή το 9- υδρουπεροξείδιο ενώ φαίνεται ότι η τοποειδικότητα αυτή του ενζύμου συναντά εκείνη της αντίστοιχης λιποξυγενάσης του ίδιου ιστού. Η HPL από το αγλάδι χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το 9- υδρουπεροξείδιο [19] ενώ από καρπούς καρπουζιού, φύλλα τσαγιού, καλλιέργειες καπνού, ντομάτα, τριφύλλι, πιπεριά και σπανάκι χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το 13- υδρουπεροξείδιο. Στα φύλλα φασολιού, στο αγγούρι και στη σόγια η HPL χρησιμοποιεί και τα δύο υποστρώματα ανάλογα με τα διαφορετικά ισόενζυμα που είναι παρόντα στο φυτό.

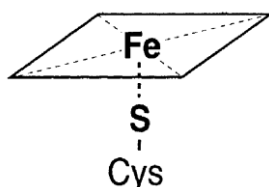


Εικόνα 8. Δράση της HPL σε 13- και 9- Υδροϋπεροξείδια.

Η HPL είναι ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο και έχει απομονωθεί και καθαριστεί από διάφορους φυτικούς ιστούς όμως λίγα είναι γνωστά για τη δομή, το μηχανισμό δράσης της και τη θέση της στους ιστούς. Αρχικά υποπτεύθηκε η ύπαρξη της στη μπανάνα το 1973 [20], όμως οι ερευνητές δεν κατάφεραν να απομονώσουν το ενζυμικό σύστημα που ήταν υπεύθυνο για την παραγωγή των αλδευδών [18]. Η HPL απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1976 από καρπούς

καρπουζιού [21], και από το αγγούρι [22]. Άλλοι οργανισμοί από τους οποίους απομονώθηκε η HPL είναι η ντομάτα [23], τα φύλλα φασολιού [24], το τριφύλλι [25], το αχλάδι [19], το μήλο [26], τα φύλλα τσαγιού [27], οι καλλιέργειες καπνού [28], από σπόρους σόγιας [29], *Arabidopsis thaliana* [30], καθώς και από φύλλα σπανακιού [31].

Όσον αφορά την HPL από πιπεριά έχει μοριακό βάρος 170 kDa και πρόκειται για μία ομοτριμερή πρωτεΐνη, όπου αποτελείται από 480 αμινοξέα και κάθε υπομονάδα της έχει μοριακό βάρος 55 kDa [12, 32-34]. Στη σόγια έχει μοριακό βάρος ανάμεσα σε 240 kDa με 260 kDa και πρόκειται για μία ομοτετραμερή πρωτεΐνη που αποτελείται από υπομονάδες 62 kDa [34]. Η HPL από φύλλα σπανακιού έχει μοριακό βάρος 220 kDa όπως εκτιμήθηκε με την τεχνική της χρωματογραφίας διηθήσεως με πηκτή (Gel filtration) ενώ στην ντομάτα έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 200 kDa [26]. Είναι μια πρωτεΐνη που εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την οικογένεια των κυτοχρωμάτων P450 (CYP74) [35]. Όπως και τα κυτοχρώματα P450, έτσι και η HPL, είναι μία αιμοπρωτεΐνη, η οποία φέρει μια πρωτοαίμη IX ως προσθετική ομάδα. Η αμινοξική αλληλουχία έδειξε 40% ομολογία με την AOS, μέλος της οικογένειας των κυτοχρωμάτων (CYP74A). Όπως η AOS έτσι και η HPL (CYP74B) προσδένει την αίμη χρησιμοποιώντας μια κυστεΐνη, και δεν απαιτεί μοριακό οξυγόνο ή κάποιον άλλο αναγωγικό παράγοντα για να δράσει. Αυτό συμβαίνει διότι δεν ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο αλλά την ομάδα του υδροϋπεροξειδίου η οποία είναι ανηγμένη κατά $2e^-$ σε σχέση με το μοριακό οξυγόνο.



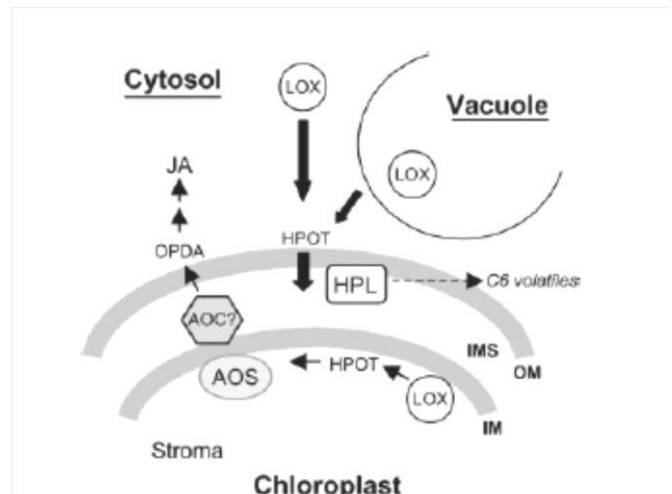
Εικόνα 9. Σύνδεση του Fe της αίμης με την κυστεΐνη

1.4. Εντοπισμός στους φυτικούς ιστούς

Η HPL γενικά εμφανίζεται ως μεμβρανική πρωτεΐνη, εκτός από τους σπόρους καρπουζιού και μερικά είδη από άλγη όπως το μονοκύταρο άλγος *Chlorella pyrenoidosa* και *Oscilliforia* sp. όπου εμφανίζεται ως υδατοδιαλυτή [36-38]. Σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς πιστεύεται ότι βρίσκεται στο πλάσμα, στις μεμβράνες του συστήματος Golgi και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε φωτοσυνθετικούς ιστούς η HPL φαίνεται να συνδέεται με τους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων. Για αρκετά χρόνια ωστόσο, διάφορες μελέτες οδήγησαν σε διαφορετικά συμπεράσματα σχετικά με τον ακριβή εντοπισμό των ενζύμων του μονοπατιού της λιποξυγενάσης εντός των χλωροπλαστών.

Το 1996 οι Blee και Joyard ανέφεραν τις εξωτερικές μεμβράνες των χλωροπλαστών (envelope membranes), και συγκεκριμένα την εξωτερική envelope μεμβράνη, ως θέση για τον μεταβολισμό των οξυλιπινών [39]. Μάλιστα, από πρωτεομική μελέτη των envelope μεμβρανών των χλωροπλαστών του *Arabidopsis thaliana* που έγινε από την ομάδα των Froehlich et.al το 2003 προέκυψε ως θέση της AOS (At5g42650) και της HPL (At4g15440) η εσωτερική envelope μεμβράνη και η εξωτερική envelope μεμβράνη αντίστοιχα [40]. Αντίθετα, σε πρωτεομική μελέτη των ίδιων μεμβρανών που έγινε από την ομάδα του Ferro την ίδια χρονιά, ανιχνεύτηκε μόνο η AOS στο κλάσμα των envelope μεμβρανών [41]. Ωστόσο, μελέτη της ομάδα του Peltier το 2004 έδειξε ότι η AOS εντοπίζεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες του *A. thaliana* [42]. Επίσης και σε άλλες μελέτες, φαίνεται ότι η HPL βρίσκεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες [31, 38, 43, 44].

Οι λόγοι για τα συγκρουόμενα αποτελέσματα που ελήφθησαν στο παρελθόν από τις διάφορες ομάδες μπορεί, εν μέρει, να σχετίζονται με τη χρήση διαφορετικών ειδών φυτών σε αυτές τις μελέτες, και στο γεγονός ότι τα περισσότερα από τα ένζυμα του μονοπατιού της λιποξυγενάσης κωδικοποιούνται σε οικογένειες γονιδίων [45].



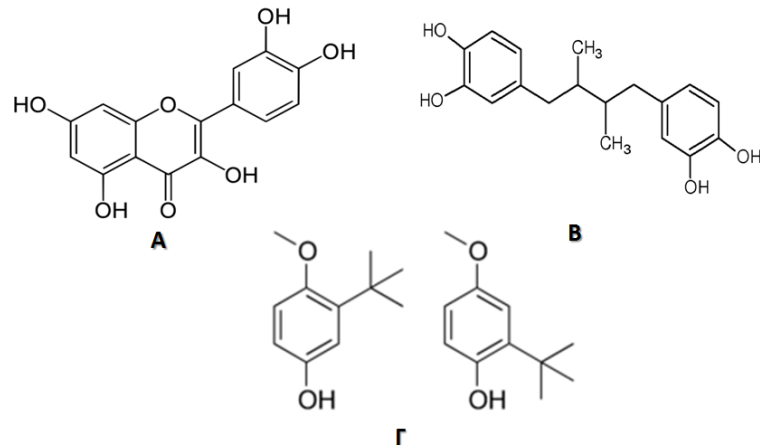
Εικόνα 10. Πιθανή θέση της HPL στην envelope μεμβράνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Blee et.al.

Το 2007 η ομάδα της Φαρμάκη υποστήριξε ότι η HPL πιθανόν βρίσκεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες κοντά στο φωτοσύστημα I [46]. Οι μεμβράνες αυτές περιλαμβάνουν τα περιθώρια (margins) και τις επίπεδες μη-συμπιεσμένες μεμβράνες θυλακοειδών που επικοινωνούν με το στρώμα. Όσον αφορά την AOS εντοπίστηκε στα στοιβαγμένα grana των θυλακοειδών. Στη μελέτη αυτή έγινε κλασμαματοποίηση των χλωροπλαστών, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία confocal με επισημασμένες πρωτεΐνες με GFP και αμυνοανίχνευση με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Επιπλέον, διεξήχθησαν πειράματα Western blot με τις αντίστοιχες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και επιβεβαίωσαν την εξειδίκευση των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις πρωτεΐνες έναντι των οποίων τέθηκαν.

Επίσης, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε πως ένα μεγάλο μέρος της λιποξυγενάσης και της AOC εντοπίστηκε στο διαλυτό κλάσμα του στρώματος των χλωροπλαστών ή είναι χαλαρά συνδεδεμένες με τις θυλακοειδείς μεμβράνες.

1.5. Επίδραση αναστολέων στην ενεργότητα της HPL

Η δράση της HPL φαίνεται να αναστέλλεται από ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αρκετές ομάδες υδροξειδίου. Καλύτερος αναστολέας φαίνεται να είναι η κερκετίνη (Quercetin). Ενώσεις που θεωρούνται επίσης ισχυροί αναστολείς για την HPL είναι nor-dihydroguaiaretic acid (NDGA) και butylated hydroxyanisole (BHA) (εικόνα 11) [36, 47]. Άλλες ενώσεις που αναστέλλουν ή περιορίζουν τη δράση της HPL παρατίθενται στον πίνακα στην εικόνα 12. Όπως είναι αναμενόμενο, τα οργανικά υδροϋπεροξειδία αναστέλλουν τη δράση ανταγωνιστικά. Όμως το cumene hydroperoxide αναστέλλει ελαφρώς μόνο ενώ το tert-butyl hydroperoxide δεν την αναστέλλει καθόλου σύμφωνα με την ομάδα των Matsui et al [47].



Εικόνα 11.Α: δομή Quercetin, Β: δομή nor-dihydroguaiararetic acid (NDGA), Γ: butyl hydroxyanisole (BHA).

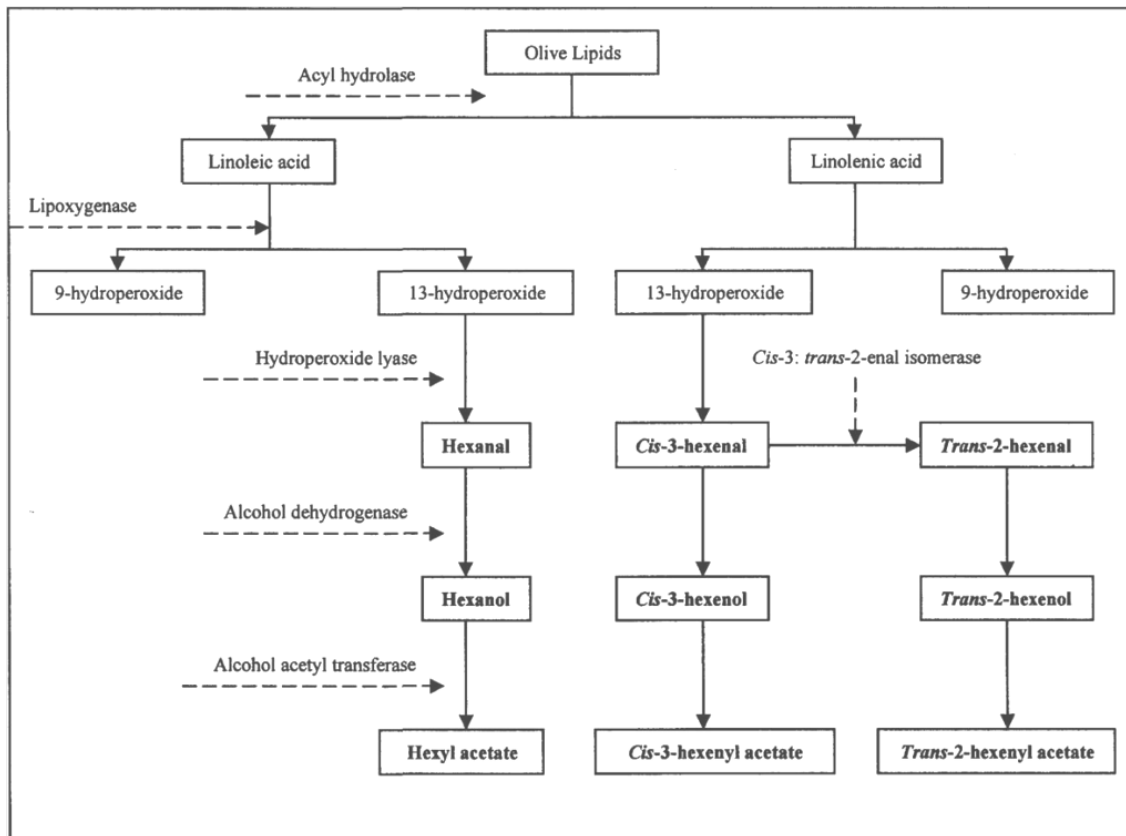
Reagents	Remaining activity (%)	
	0.2 mM	1 mM
Cumene hydroperoxide		71.4
<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide		94.1
Methylene blue	19.4	
Butylated hydroxyanisole	69.6	14.4
Butylated hydroxytoluene	102.4	89.4
<i>nor</i> -Dihydroguaiaretic acid	13.4	0
Esculetin	88.8	66.3
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate	74.7	44.0
HgCl ₂	3.6	0
Monoiodoacetate	87.9	60.7
Diethyldithiocarbamate	84.3	70.2

Εικόνα 12. Επίδραση αντιδραστηρίων στη δραστηκότητα της HPL.

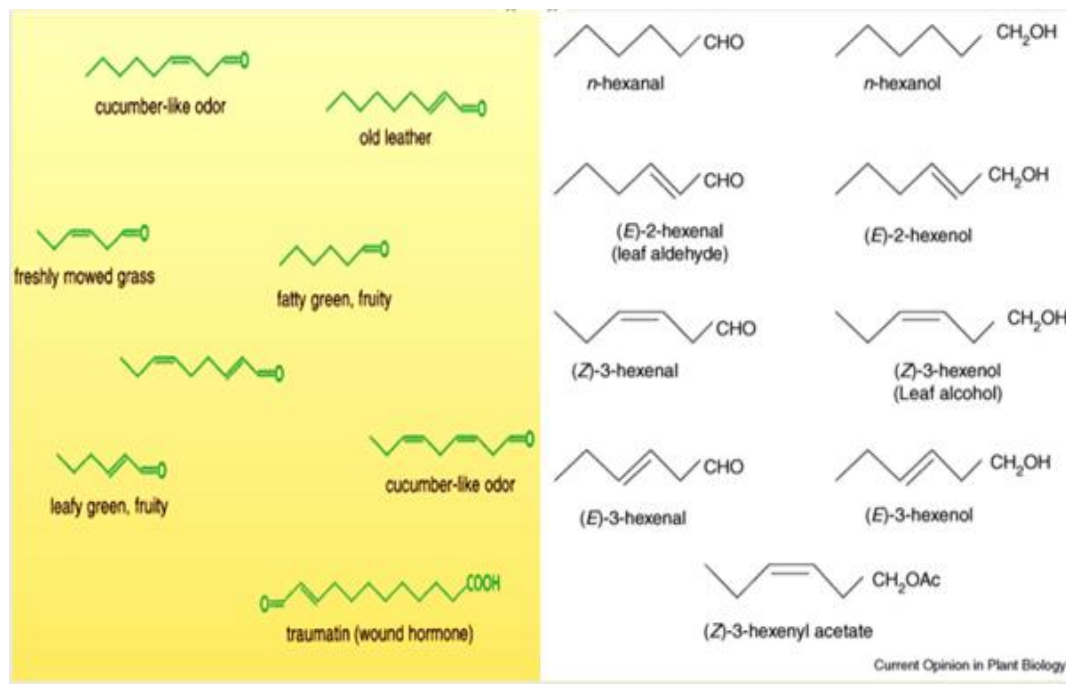
1.6. Πτητικές ενώσεις πράσινων φύλλων (GLVs)

Οι GLVs (Green Leaf Volatile) είναι σηματοδοτικά μόρια και σχηματίζονται αμέσως μετά τη διατάραξη των ιστών των φύλλων των φυτών έπειτα από επιθέσεις από φυτοφάγα και μηχανική φθορά. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην άμυνα κατά των παρασίτων που προσπαθούν να εισβάλλουν, στην επούλωση των πληγών και παρουσιάζουν ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα. Αποτελούνται από αλκοόλες και αλδεΐδες με έξι ή εννέα άτομα άνθρακα, και τους εστέρες τους [48, 49].

Οι ενώσεις αυτές αποτελούν σημαντικά συστατικά του αρώματος πολλών φρούτων, λαχανικών και πράσινων φύλλων, παράγοντας το λεγόμενο “fresh green odor” δηλαδή το άρωμα του φρεσκοκομμένου όπως είναι το γρασίδι ή το αγγούρι [9, 14, 50, 51].



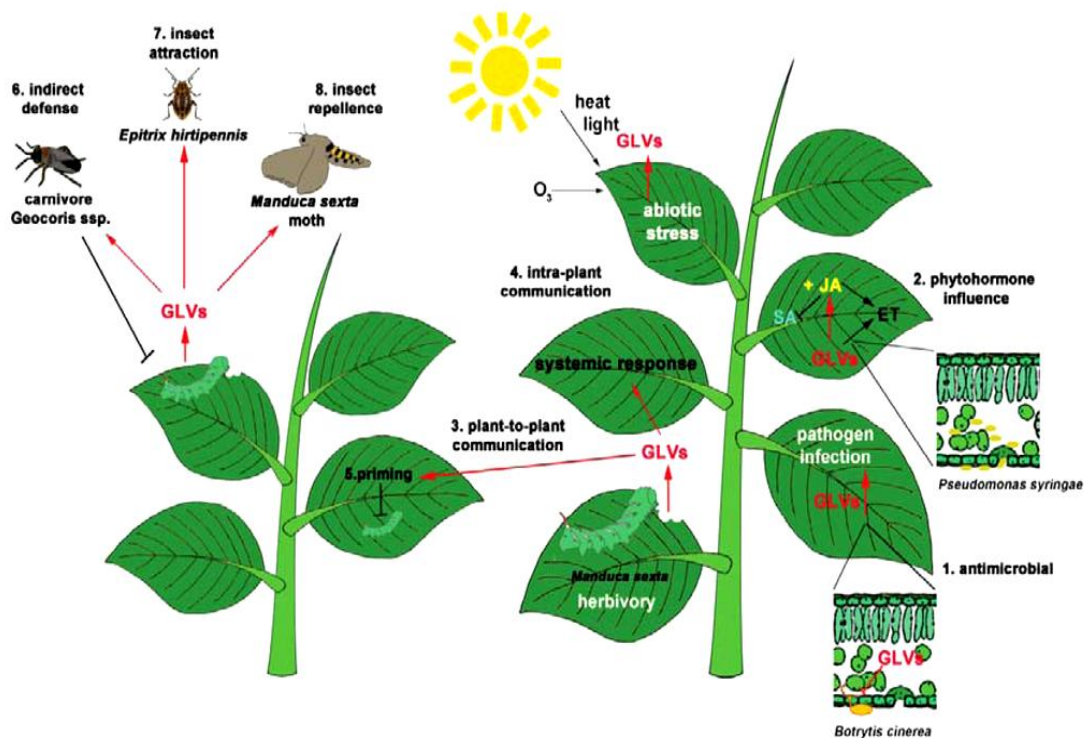
Εικόνα 13.Μονοπάτι για το σχηματισμό των περισσότερων πτητικών ενώσεων στα παρθένα ελαιόλαδα. Οι πτητικές ενώσεις εμφανίζονται με έντονη γραφή, Τα ένζυμα εμφανίζονται με διακεκομμένα βέλη [52].



Εικόνα 14. Green leaf volatiles που παράγονται από τη δράση της HPL

Είναι γνωστό ότι οι ενώσεις αυτές, κατέχουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες, όπως η μεταφορά ουσιών μεταξύ φυτών (αλληλοπάθεια), μεταξύ φυτών και εντόμων (φερομόνες), μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών (φυτοκτόνα) και τέλος μεταξύ φυτών και ανθρώπων (αρωματοθεραπεία).

Από την αρχαιότητα είναι γνωστές οι αντισηπτικές ιδιότητες βοτάνων και μπαχαρικών, καθώς και αρωματικών φυτών, οι οποίες σήμερα έχει βρεθεί ότι οφείλονται στις ενώσεις αυτές. Διαφορετικές αναλογίες C₆ και C₉ αλδεϋδών οδηγούν σε διαφορετικές γεύσεις και αρώματα. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε C₆ αλδεϋδες παρέχει ένα άρωμα πιο κοντά σε αυτό του φρεσκοκουρεμένου γρασιδιού, ενώ C₉ αλδεϋδες παρέχουν ένα άρωμα πιο κοντά σε αυτό του κομμένου αγγουριού [53].



Εικόνα 15. Οι GLVs εκκρίνονται κατά την επίθεση από φυτοφάγα και έπειτα από αβιοτικό στρες. Έχουν αντιμικροβιακή δράση (1), επηρεάζουν την παραγωγή και τα επίπεδα φυτοορμονών (2) και εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ των φυτών (3). Μπορούν να προκαλέσουν μια συστηματική απόκριση άμυνας σε φύλλα του ίδιου φυτού που δεν έχουν δεχτεί επίθεση (4) και επάγουν την άμυνα σε γειτονικά φυτά τα οποία δεν έχουν δεχτεί επίθεση, προετοιμάζοντας τα για πιθανή επίθεση από φυτοφάγα ή παθογόνους μικροοργανισμούς (5). Κάποια σαρκοφάγα π.χ. *Geocoris* spp., προτιμούν τα φυτά που παράγουν GLVs, αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα παράδειγμα έμμεσης άμυνας (6). Οι GLVs μπορούν να συμμετέχουν στην προσέλκυση φυτοφάγων εντόμων, π.χ., *Epirix hirtipennis* (7) ή την απώθηση άλλων φυτοφάγων εντόμων, π.χ. *M. quinquemaculata* (8) [54].

1.7. Χρήση των GLVs στη βιομηχανία τροφίμων

Οι GLVs χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα τροφίμων και ποτών, ως ενισχυτικό γεύσης ώστε να προσδώσει ένα άρωμα φρεσκάδας αλλά και για τη συντήρησή τους λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους [51, 55, 56]. Στην εικόνα 16 φαίνονται ορισμένα παραδείγματα αυτών των ενώσεων και οι χρήσεις τους στα τρόφιμα. Τα τελευταία χρόνια, η παγκόσμια αγορά για τα προϊόντα αυτά ανήλθε στα 30 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως, συμπεριλαμβανομένων των 18 δισ. δολαρίων για αυτά που ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών γεύσεων [57, 58]. Εξαιτίας των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους ορισμένες GLVs έξι και εννέα ατόμων άνθρακα, όπως είναι η εξανάλη και η (*E*)-2-

εξανάλη έχουν εφαρμογές στη βιομηχανία για την αποθήκευση και συντήρηση των τροφίμων [59].

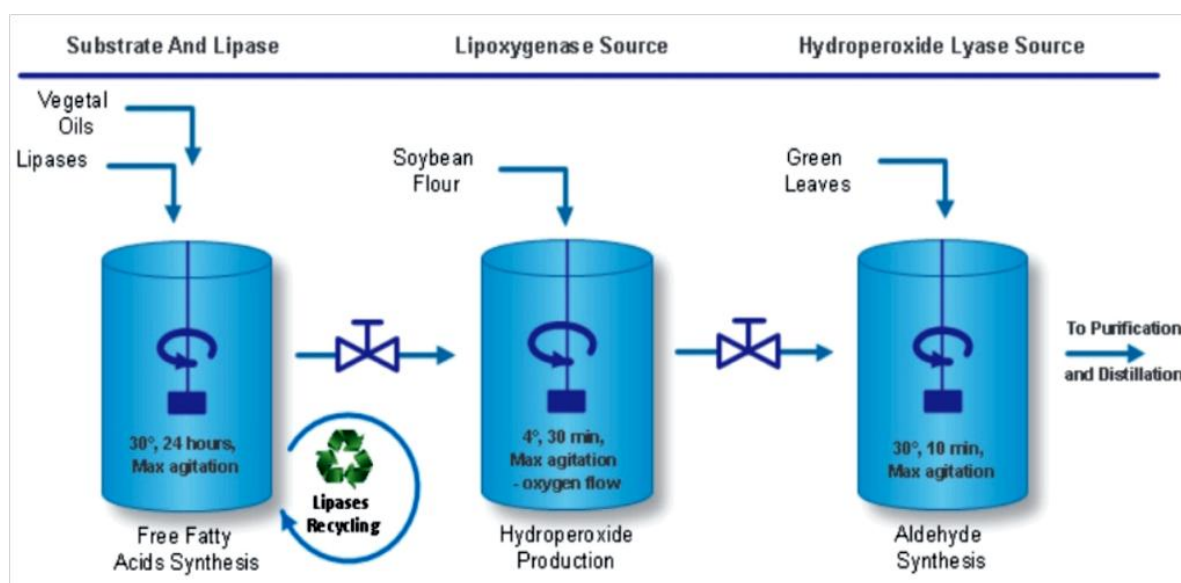
Table 1. Commonly used green leaf flavors with their odor description and fragrance application — *Molécules à notes vertes utilisées comme aromes avec leur description et leur application.*

Name	Odor description	Application
(E)-2-hexenol	Sharp, green, leafy, fruity, unripe banana odor	Used in apple, berry, orange and pear flavors and as an alcohol enhancer
(E)-3-hexenol	Intensely green, somewhat bitter, earthy, fatty odor	Good for green, leafy vegetable flavors like various lettuces
(Z)-2-hexenol	Powerful, fresh, green grass odor, with a brandy nuance	This material has a fresher greenness than trans-2-hexenol and can also be used to enhance brandy flavors
(Z)-3-hexenol	Powerful, fresh, green grass odor	Many applications including strawberry, tomato, pineapple, orange, pear, berries, cherry, grape and apple flavors
(E)-2-hexenal	Green, citrusy, orange, pungent odor	Many uses including green fruits, kiwi, peach, green apple, berry, strawberry, fresh blueberry, cherry, tea, orange, citrus and raspberry
Hexanal	Intense green, fruity, aldehydic odor	Extremely versatile material. In dilution it is used in many fruit and vegetable flavors as well as butter and rum
(Z)-3-nonenol	Fresh, waxy, green melon odor	Used for fresh, tropical, melon notes
(E)-2-nonenol	Waxy, green odor	Used in melon and cucumber flavors. Also can be used for "fried" fatty effect

Εικόνα 16. Οι πιο κοινές GLVs που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων

Ο ευκολότερος τρόπος για να παραχθούν μεγάλες ποσότητες σταθερών αλδευδών και αλκοολών με έξι ή εννέα άτομα άνθρακα είναι η χημική σύνθεση. Ωστόσο για την προσθήκη τους στα τρόφιμα, οι καταναλωτές δείχνουν μία ισχυρή προτίμηση για πρόσθετα και αρώματα φυσικής προέλευσης. Ως εκ τούτου, ανταγωνιστικές βιοκαταλυτικές παραγωγές έχουν αναπτυχθεί για να ανταποκριθούν στην υψηλή ζήτηση των γεύσεων αυτών με φυσική προέλευση [60]. Φυτικά έλαια, τα οποία περιέχουν C_{18:2} και C_{18:3} λιπαρά οξέα, συνήθως ελαιόλαδο ή ηλιέλαιο, υδρολύονται και έπειτα μετατρέπονται από την λιποξυγενάση που απομονώθηκε από σόγια και την φυτικής προέλευσης HPL σε φυσικής προέλευσης εξανάλη και (E) -2 - ή (Z)-3-εξανάλη. Το πρώτο στάδιο, δηλαδή η μετατροπή των λιπαρών οξέων σε υδροϋπεροξειδία με παροχή οξυγόνου σε μεγάλη κλίμακα έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία [61, 62]. Ωστόσο η μετατροπή των υδροϋπεροξειδίων των λιπαρών οξέων είναι πιο δύσκολη στο χειρισμό δεδομένου ότι ως πηγή του ενζύμου HPL χρησιμοποιούνται φυτικά εκχυλίσματα, συνήθως εκχυλίσματα γλωροπλαστών, ή καλλιέργειες κυττάρων [63]. Στα φυτικά εκχυλίσματα η HPL βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση και μάλλον είναι ασταθής με αποτέλεσμα η αντίδραση να έχει μικρή απόδοση (χαμηλότερη από 15%) [64, 65].

Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί διφασικοί αντιδραστήρες που συνδυάζουν τις αντιδράσεις που καταλύουν οι λιπάση και η λιποξυγενάση. Σε αυτά τα συστήματα, η αντίδραση που καταλύεται από τη λιπάση εκτελείται στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που παράγονται παραμένουν στην οργανική φάση. Αυτή η φάση δρα ως υπόστρωμα για τη λιποξυγενάση, ενώ τα υδρουπεροξειδία (HPOs) αποθηκεύονται στην υδατική φάση [66]. Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί επιτυχώς σε μικκυλιακά συστήματα αρκετές διαδικασίες ακινητοποίησης και προσδίδουν στη λιποξυγενάση μεγαλύτερη αντοχή στη θερμοκρασία [67].



Εικόνα 17. Βιοκαταλυτική διαδικασία με δύο βήματα ενζυματικής παραγωγής σε βιοαντιδραστήρα.

1.8. Ανασυνδυασμός της HPL

Λόγω της χαμηλής σταθερότητας και της δυσκολίας στον καθαρισμό της, η HPL είναι το περιοριστικό συστατικό για την παραγωγή των GLVs ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων. Επομένως, έχουν γίνει σημαντικές μελέτες για την κλωνοποίηση του γονιδίου και την παραγωγή αυτού του ενζύμου με αυξημένη σταθερότητα και δραστηριότητα. Γονίδια της HPL από καρπούς ντομάτας [68], τριφύλλι [69], φύλλα ντομάτας [70] και πράσινη πιπεριά [71] έχουν κλωνοποιηθεί με επιτυχία. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παράγονται από τους οργανισμούς *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolitica* και *Escherichia coli* που οδηγούν σε διαφορετικές αποδόσεις καθαρισμένου ενζύμου. Η τεχνική του ανασυνδυασμού της HPL έχει δύο πλεονεκτήματα. Πρώτον, δεν εξαρτάται από την καλλιέργεια

φυτών και είναι διαθέσιμη όλο το χρόνο, και δεύτερον, το ένζυμο λαμβάνεται καθαρό χωρίς την παρουσία άλλων ενζύμων του μονοπατιού όπως η AOS, DES και POX, αποφεύγοντας έτσι το σχηματισμό ανεπιθύμητων προϊόντων και την κατανάλωση του υποστρώματος.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός της τοποθεσίας της HPL στους χλωροπλάστες και η απομόνωση της. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν διαφορετικές μεμβράνες των χλωροπλαστών και έγιναν μελέτες για τον εντοπισμό του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν ολόκληροι χλωροπλάστες, οι εξωτερικές περιβάλλουσες μεμβράνες των χλωροπλαστών (envelope membranes), θυλακοειδής μεμβράνες, εμπλουτισμένες μεμβράνες σε φωτοσύστημα I και εμπλουτισμένες σε μεμβράνες φωτοσύστημα II. Ως φυσική πηγή επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το σπανάκι, το οποίο έχει μεγάλο αριθμό χλωροπλαστών και αποτελεί πρότυπο οργανισμό για τη φωτοσύνθεση. Παρόλα αυτά έχουν γίνει ελάχιστες μελέτες για το μονοπάτι της λιποξυγενάσης στο σπανάκι. Τέλος μελετήθηκε και η μείωση της κατανάλωσης του υποστρώματος παρουσία της ένωσης μπλε του μεθυλενίου ως ένδειξη της δράσης της HPL.

3. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα διάφορα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Serva, Sigma, ενώ τα απορρυπαντικά ήταν Sigma και Bio-Rad. Η ποιότητα των αντιδραστηρίων ήταν analytical grade. Το νερό για τα διαλύματα απομόνωσης ήταν απιονισμένο με στήλη ιονανταλλακτικών ρητίνων. Για την ηλεκτροφόρηση και τη διαδικασία της θρυψινοποίησης χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό. Για τις κινητικές χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2700 spectrophotometer. Τα διαγράμματα και η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Origin 6.0.

3.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης της χλωροφύλλης

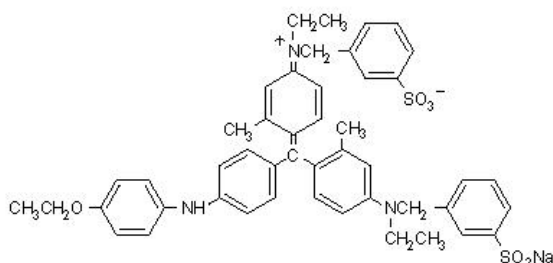
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης των θυλακοειδών μεμβρανών έγινε φασματοσκοπικά λαμβάνοντας υπόψη τη μέθοδο του Arnon [72]. Η συγκέντρωση χλωροφύλλης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$[chl]_{\text{mg/ml}} = \frac{(20.2 * Abs_{645}) + (8.02 * Abs_{663})}{5}$$

3.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης

Η σχετική συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford [73]. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται μια άλλη γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνη, με την βοήθεια της οποίας κατασκευάζεται γραφικά, μια πρότυπη καμπύλη. Αναλυτικότερα, το διάλυμα “working solution”, προστίθεται σε αρκετά δείγματα της γνωστής πρωτεΐνης (BSA), και λαμβάνονται οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 595nm.

Ο συσχετισμός της απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον δεσμό που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και του Serva Blue G. Ο δεσμός του Serva Blue G με μια πρωτεΐνη προκαλεί μια μετατόπιση της απορρόφησης της βαφής από τα 465nm στα 595nm.



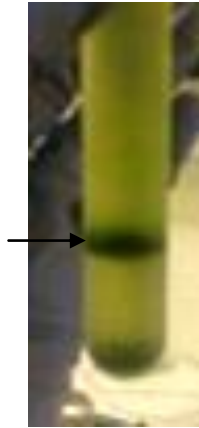
Εικόνα 18. Η χρωστική Serva Blue G

3.3. Απομόνωση χλωροπλαστών από σπανάκι

Σημειώνεται ότι από την προηγούμενη ημέρα τα φύλλα σπανακιού πλένονται σχολαστικά και τοποθετούνται στο σκοτάδι για να καταναλωθεί το άμυλο διευκολύνοντας έτσι την απομόνωση. Επίσης, χρειάζεται χαμηλή θερμοκρασία για τη διατήρηση των πρωτεϊνών. Τέλος, ακριβώς πριν την απομόνωση, απομακρύνεται ο μίσχος από κάθε φύλλο.

3.3.1. Βήματα

1. Τα φύλλα αλέθονται στο μπλέντερ σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer I, σε αναλογία 10:1 (ml διαλύματος : gr σπανακιού)
2. Το μίγμα φιλτράρεται από 8πλό φύλλο γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα κομμάτια των φύλλων
3. Το διήθημα φυγοκεντρείται στα 3.000 g για 20 λεπτά στους 4°C ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τα μεγάλα οργανίδια
4. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαλυτοποιείται ήπια σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer II (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα
5. Το δείγμα διαχωρίζεται με ασυνεχή διαβάθμιση σουκρόζης (1,5 M – 1,0 M – 0,75 M) στα 4.000 g για 35 λεπτά στους 4°C
6. Συλλέγεται η πράσινη ζώνη μεταξύ των στρωμάτων 1,5 M – 1,0 M (Εικόνα 19) όπου περιέχονται οι χλωροπλάστες
7. Προστίθεται ίσου όγκου Buffer II και φυγοκεντρείται στα 8.000 g για 5λεπτά στους 4°C
8. Το ίζημα επαναιωρείται σε μικρή ποσότητα Buffer_II και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C



Εικόνα 19. Διαβάθμιση σουκρόζης. Η μπάνα που σημειώνεται με το βέλος υποδεικνύει τους χλωροπλάστες

3.3.2. Διαλύματα

1. Buffer I: 100 mM Tricine, 1 mM $MgCl_2$, 450 mM Sucrose, 0,1% BSA, pH=7,6
2. Buffer II: 100 mM Tricine, 1 mM $MgCl_2$, 450 mM Sucrose, pH=7,6
3. Τα διαλύματα των διαβαθμίσεων έχουν τη σύσταση του Buffer II με μοναδική διαφορά τη σύσταση της σουκρόζης

3.4. Απομόνωση envelope μεμβρανών από σπανάκι

Για την απομόνωση των envelope μεμβρανών πρώτα συλλέγουμε χλωροπλάστες και ακολουθούμε στη συνέχεια την παρακάτω διαδικασία. Η διαδικασία βασίζεται στο πρωτόκολλο των Cline et.al [74].

3.4.1. Βήματα

1. Αραιώνεται το δείγμα των χλωροπλαστών με το ρυθμιστικό διάλυμα A ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να είναι 0,5 mg/ml.
2. Το διάλυμα μένει για 30 λεπτά στον πάγο με ήπια ανάδευση.
3. Έπειτα φυγοκεντρείται στα 7.500 g για 20 λεπτά στους 4°C.
4. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 35.000 g για μία ώρα στους 4°C. Το χρώμα του δείγματος πρέπει να είναι κίτρινο.

5. Το ίζημα που καταβυθίστηκε επαναιωρείται ήπια σε ρυθμιστικό διάλυμα B (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα.
6. Το δείγμα διαχωρίζεται με γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης (0,6 M – 1,2 M) στα 113.000 g για 14 ώρες στους 4°C.
7. Στη ζώνη ανάμεσα στις συγκεντρώσεις σουκρόζης 0,46 M - 0,8 M βρίσκεται η εξωτερική envelope μεμβράνη, ενώ ανάμεσα στις συγκεντρώσεις σουκρόζης 0,8 M – 1,0 M βρίσκεται η εσωτερική envelope μεμβράνη [75].

3.4.2. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα A: 1 mM MgCl₂, 100 mM Tricine, pH=7,6.
- Ρυθμιστικό διάλυμα B: 100 mM Tricine, 200 mM Sucrose, 1 mM MgCl₂, 1 μl Triton X-100, pH=7,6.
- Τα διαλύματα των διαβαθμίσεων έχουν τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος B με μοναδική διαφορά τη σύσταση της σουκρόζης.

3.5. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι I

Για την απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών πρώτα συλλέγουμε χλωροπλάστες και ακολουθούμε στη συνέχεια την παρακάτω διαδικασία. Η διαδικασία απομόνωσης βασίζεται στο πρωτόκολλο των Andreasson et.al[76].

3.5.1. Βήματα

1. Οι χλωροπλάστες επαναιωρούνται και σπάνε οσμωτικά σε διάλυμα 1 mM MgCl₂, 100 mM Tricine, pH=7,6.
2. Οι θυλακοειδείς μεμβράνες που λαμβάνονται ξεπλένονται δύο φορές με buffer 8mM Tricine, 1 mM MgCl₂, 450 mM Sucrose, pH=7,6.

3.6. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι II

Η διαδικασία απομόνωσης βασίζεται στο πρωτόκολλο των Berthold et al[77]. Σημειώνεται ότι από την προηγούμενη ημέρα τα φύλλα σπανακιού πλένονται σχολαστικά και τοποθετούνται στο σκοτάδι για να καταναλωθεί το άμυλο διευκολύνοντας έτσι την απομόνωση. Επίσης, χρειάζεται χαμηλή θερμοκρασία για τη διατήρηση των πρωτεϊνών. Τέλος, ακριβώς πριν την απομόνωση, απομακρύνεται ο μίσχος από κάθε φύλλο.

3.6.1. Βήματα

1. Τα φύλλα αλέθονται στο μπλέντερ σε ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως, σε αναλογία 2:1 (ml διαλύματος : gr σπανακιού).
2. Το μίγμα φιλτράρεται από 8πλό φύλλο γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα κομμάτια των φύλλων.
3. Το διήθημα φυγοκεντρείται στα 700 g για 2 λεπτά στους 4°C ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τα μεγάλα οργανίδια.
4. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 7.500 g για 20 λεπτά στους 4°C.
5. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαλυτοποιείται ήπια σε ρυθμιστικό διάλυμα IRB (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα.
6. Φυγοκεντρείται στα 7.500 g για 20 λεπτά στους 4°C.
7. Το ίζημα διαλυτοποιείται ήπια σε μικρό όγκου ρυθμιστικό διάλυμα IRB (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα.
8. Η διατήρηση του δείγματος γίνεται στους -80°C.

**Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται στο σκοτάδι.

3.6.2. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως: 20 mM Tricine, 300 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 1 mM PMSF, pH=7,8.
- Ρυθμιστικό διάλυμα IRB: 20 mM Tricine, 70 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂ pH=7,8.

3.7. Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανών φωτοσυστήματος II και φωτοσυστήματος I από σπανάκι

Για την απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανών φωτοσυστήματος II πρώτα συλλέγουμε θυλακοειδής μεμβράνες και ακολουθούμε στη συνέχεια την παρακάτω διαδικασία.

3.7.1. Βήματα

1. Χρησιμοποιείται Triton x-100 για τη διαλυτοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών. Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων ακολουθούνται οι εξής τύποι:

$$V_{\text{final}} = [\text{Chl}]_{\text{total}} / 2$$

$$V_{\text{Triton 25\%}} = [\text{Chl}]_{\text{total}} / 10$$

$$V_{\text{IRB}} = V_{\text{final}} - V_{\text{sample}} - V_{\text{Triton}}, \quad \text{όπου:}$$

V_{final} : τελικός όγκος διαλύματος διαλυτοποίησης

$[\text{Chl}]_{\text{total}}$: τα ολικά mg χλωροφύλλης του προς διαλυτοποίηση δείγματος

$V_{\text{Triton 25\%}}$: όγκος του διαλύματος Triton που θα χρησιμοποιηθεί

V_{IRB} : ο όγκος του IRB διαλύματος που θα προστεθεί ώστε να επιτευχθεί η σωστή αναλογία δείγματος – απορρυπαντικού.

2. Υπολογίζοντας τις αναλογίες, αναμειγνύεται το IRB στο δείγμα των θυλακοειδών μεμβρανών και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην το διάλυμα Triton σε ήπια ανάδευση. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητα αφήνεται για 30 λεπτά υπό ανάδευση
3. Φυγοκεντρείται στα 48.000 g για 45 λεπτά στους 4°C.
4. Διαλυτοποιείται το ίζημα σε ρυθμιστικό διάλυμα SMN και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες.
5. Διαλυτοποιείται σε πολύ μικρό όγκο στο διάλυμα SMN και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C.

Το υπερκείμενο που λαμβάνεται στο βήμα 2 περιέχει εμπλουτισμένες μεμβράνες σε φωτοσύστημα I ενώ το ίζημα περιέχει εμπλουτισμένες μεμβράνες φωτοσυστήματος II.

3.7.2. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα IRB: 20 mM Tricine, 70 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂ pH=7,8.
- Διάλυμα Triton 25%: 25% v/v Triton X-100 σε διάλυμα IRB.
- Ρυθμιστικό διάλυμα SMN: 25 mM MES, 400 mM Sucrose, 15 mM NaCl, pH=6,0.

3.8. Απομόνωση HPL από σπανάκι

Η διαδικασία απομόνωσης βασίζεται στο πρωτόκολλο των Matsui et.al. οι οποίοι απομόνωσαν HPL από φύλλα τσαγιού [78].

3.8.1. Βήματα

1. Τα φύλλα αλέθονται στο μπλέντερ σε ρυθμιστικό διάλυμα TB , σε αναλογία 2:1 (ml διαλύματος : gr σπανακιού).
2. Το μίγμα φιλτράρεται από 8πλό φύλλο γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα κομμάτια των φύλλων.
3. Το διήθημα φυγοκεντρείται στα 1.000 g για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τα μεγάλα οργανίδια.
4. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 100.000 g για 60 λεπτά στους 4°C.
5. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαλυτοποιείται ήπια σε ρυθμιστικό διάλυμα TB 50 mM K-Pi (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα.
6. Η συγκέντρωση χλωροφύλλης του δείγματος φέρετε στα 50 µg/ml.
7. Στο μεμβρανικό κλάσμα προστέθηκε 0,15 % (w/v) Triton X-100 και επώαστηκε υπό ανάδευση στον πάγο για 60 λεπτά.
8. Έπειτα φυγοκεντρείται στα 100.000 g για 60 λεπτά στους 4° C.
9. Λαμβάνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 13% στερεό PEG 6.000 και επώάζεται στον πάγο με ανάδευση για 60 λεπτά.

10. Έπειτα φυγοκεντρείται στα 10.000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C.
11. Λαμβάνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 30% στερεό PEG 6.000 και επωάζεται στον πάγο με ανάδευση για 60 λεπτά.
12. Έπειτα φυγοκεντρείται στα 10.000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C.
13. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε πολύ μικρό όγκο στο διάλυμα TT και επωάζεται για 30 λεπτά υπό ανάδευση στον πάγο.
14. Έπειτα φυγοκεντρείται στα 15.000 rpm για 20 λεπτά.
15. Λαμβάνεται το υπερκείμενο (crude HPL).

3.8.2. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα TB : 100 mM K-Pi, 4% PVP K-30, 3 mM Glutathione, 5 mM Vitamin C, 3 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH=7.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TB 50 mM K-Pi: έχει την ίδια σύσταση με το Ρυθμιστικό διάλυμα TB με τη μόνη διαφορά στη συγκέντρωση του K-Pi.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TT: 20 mM tris HCl, 0,1% Triton X-100, pH=8,5.

3.9. Πλύσεις θυλακοειδών μεμβρανών

Το δείγμα των θυλακοειδών φυγοκεντρείται στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4°C δύο φορές. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kieselbach et.al [79] με αυτό τον τρόπο γίνεται εν μέρει απομάκρυνση της ATP-συνθάσης και του μεμβρανικά συνδεδεμένου τμήματος της RuBisCo.

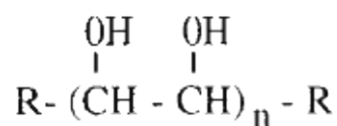
Οι πλύσεις γίνονται στα θυλακοειδή και μετά το βήμα 4 στο πρωτόκολλο απομόνωσης της HPL.

3.9.1. Διάλυμα

- 2 mM Tricine, 300mM Sucrose, pH=7,8.

3.10. Κλασματική κατακρήμνιση πρωτεϊνών με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) είναι ένα υδρόφιλο πολυμερές. Είναι εμπορικά διαθέσιμη ως παρασκευάσματα με διαφορετικά μοριακά βάρη, όπως 6.000, 8.000 και χρησιμοποιείται για απομονώσεις πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για κλασματική κατακρήμνιση πρωτεϊνών σε ένα υδατικό διάλυμα.



Η πολυαιθυλενογλυκόλη δεν μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και η ικανότητα της να τις καθιζάνει από ένα υδατικό διάλυμα μπορεί να θεωρηθεί ως "κατακρήμνιση μοριακού αποκλεισμού". Με την αύξηση της συγκέντρωσης PEG η πρωτεΐνη φέρεται τελικά στο όριο διαλυτότητας της. Έχει εμπειρικά παρατηρηθεί ότι, σε ισομοριακές συγκεντρώσεις, οι μεγάλες πρωτεΐνες καθιζάνουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις PEG από τις μικρές πρωτεΐνες. Η αύξηση στη συγκέντρωση PEG που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί μια δεδομένη μείωση της διαλυτότητας είναι μοναδική για ένα δεδομένο ζεύγος πρωτεΐνης-πολυμερούς και κατά κύριο λόγο εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης και του πολυμερούς [80, 81].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε PEG 8.000 για την κλασματοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος που περιέχει διαλυτοποιημένες εμπλουτισμένες σε φωτόςστημα I μεμβράνες. Οι μεμβράνες αυτές περιλαμβάνουν τα περιθώρια και τις επίπεδες μη-συμπιεσμένες μεμβράνες θυλακοειδών του στρώματος. Προστέθηκε PEG 8.000 σε συγκεντρώσεις 10%, 20%, 30% και 50%. Τα δείγματα επώαστηκαν στον πάγο μισή ώρα υπό ανάδευση και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στα 40.000 g για 40 λεπτά, στους 4°C. Επίσης χρησιμοποιήθηκε PEG 6.000 στο πρωτόκολλο για την απομόνωση της HPL.

3.11. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων

Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ή IEX) είναι μια διαδικασία που επιτρέπει τον διαχωρισμό ιόντων και πολικών μορίων με βάση την συγγενεία τους προς τον εναλλάκτη ιόντων [82].

IEX βασίζεται στην αντιστρεπτή αλληλεπίδραση μεταξύ μιας φορτισμένης πρωτεΐνης και ενός αντίθετα φορτισμένου μέσου χρωματογραφίας. Βιομόρια με ακόμα και μικρές διαφορές σε καθαρό φορτίο επιφανείας μπορούν να διαχωριστούν, και πολύ υψηλή ανάλυση επιτυγχάνεται με την επιλογή του βέλτιστου ανταλλάκτη ιόντων και συνθήκες διαχωρισμού. Χρησιμοποιείται συχνά για τον καθαρισμό μιας πρωτεΐνης.

Το καθαρό φορτίο επιφανείας μιας πρωτεΐνης ποικίλλει ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος. Τυπικά, όταν το pH είναι πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης τότε αυτή συνδέεται με ένα θετικά φορτισμένο ανταλλάκτη ανιόντων. Κάτω από το pI της, η πρωτεΐνη συνδέεται με ένα αρνητικά φορτισμένο ανταλλάκτη κατιόντων.

Οι εναλλάκτες ανιόντος και κατιόντος ταξινομούνται ως ισχυροί ή ασθενείς, ανάλογα με το πόσο η κατάσταση ιονισμού των λειτουργικών ομάδων ποικίλλει ανάλογα με το pH. Ένας ισχυρός εναλλάκτης ιόντων (π.χ., Q, S, ή SP) έχει την ίδια πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια του σε μία ευρεία περιοχή pH, ενώ η πυκνότητα φορτίου ενός ασθενούς ανταλλάκτη ιόντων(π.χ., DEAE ή CM) μεταβάλλεται με το pH.



Εικόνα 20. Στήλη

Στην IEX, οι πρωτεΐνες προσδένονται όπως αυτές φορτώνονται στη στήλη σε χαμηλή ιοντική ισχύ. Οι συνθήκες στη συνέχεια μεταβάλλονται έτσι ώστε οι δεσμευμένες ουσίες να εκλύονται διαφορετικά. Η έκλυση πραγματοποιείται συνήθως με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος ή αλλαγή του pH σε βαθμίδωση ή σταδιακά.

Η έκλυση πιο συχνά εκτελείται από μια συνεχή διαβάθμιση ή αύξηση κλιμακωτή σε ιονική ισχύ, συνήθως χρησιμοποιώντας NaCl, αλλά κι άλλα άλατα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

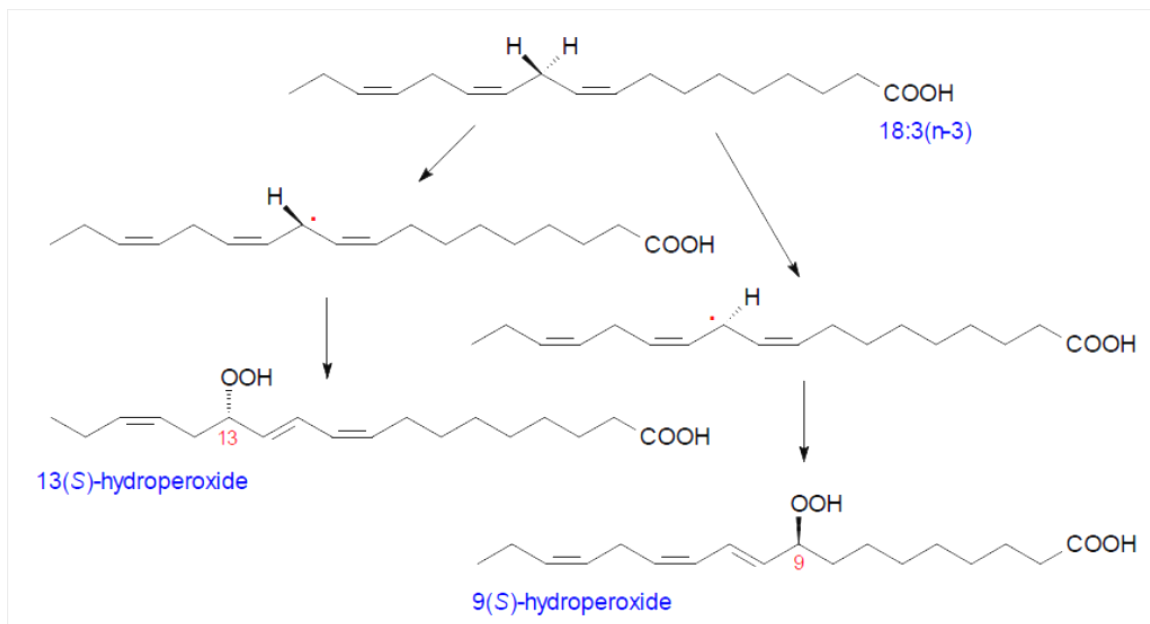
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε υλικό πλήρωσης της στήλης η Q-Sepharose. Το πακετάρισμα της στήλης έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα TT και η έκλυση έγινε με αυξανόμενη συγκέντρωση KCl σε ρυθμιστικό διάλυμα TT. Ταχύτητα ροής 0,5 ml/ min.

3.11.1. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα TT: 20 mM tris HCl, 0,1% Triton X-100, pH=8,5.
- Τα διαλύματα της έκλυσης αποτελούνται από Ρυθμιστικό διάλυμα TT και 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 700 mM, 1 M, 1,5 M και 2 M KCl.

3.12. Προετοιμασία υποστρώματος

Το υπόστρωμα 13-HPOD δεν είναι διαθέσιμο στο εμπόριο οπότε παρασκευάζεται μέσω της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέος. Κατά τη διαδικασία αυτή, σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 5μL λινολεϊκού οξέος 5mL βορικού οξέος pH=9 και 1mg εμπορικού παρασκευάσματος λιποξυγενάσης από σόγια. Το διάλυμα τοποθετείται σε πάγο, ενώ κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται παράλληλη διοχέτευση οξυγόνου. Μετά από 1 ώρα περίπου θεωρούμε ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί, σταματάει η διοχέτευση οξυγόνου και το pH ρυθμίζεται στο 3 με σκοπό την παύση της αντίδρασης. Στη συνέχεια γίνεται κορεσμός με NaCl, διήθηση και εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Μετά από 3 επαναλήψεις το διάλυμα ξηραίνεται με προσθήκη Na₂SO₄ και η οργανική στοιβάδα τοποθετείται κάτω από ροή αζώτου προκειμένου για να εξατμιστεί ο διαλύτης. Αφού απομακρυνθεί ο διαιθυλαιθέρας, το υπεροξείδιο επαναδιαλύεται σε 2 mL αιθανόλης και φυλάσσεται σε σκούρο φιαλίδιο σε ατμόσφαιρα αζώτου στους - 80°C. Ο συντελεστής απόσβεσης του 13-HPOD είναι 25000 M⁻¹



Εικόνα 21. Οξείδωση του λινολεϊκού οξέος με τελικό προϊόν το αντίστοιχο υδροϋπεροξειδίο

3.13. Μελέτη της δραστηριότητας της HPL

Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίζεται φασματομετρικά, μετρώντας την μείωση της απορρόφησης στα 234 nm μετά από ανάμιξη του ενζυμικού εκχυλίσματος με το υπόστρωμα της HPL (13-HPOD ή 13- υδροϋπεροξειδίο του λινολεϊκού οξέος), στους 25 °C. Συγκεκριμένα το υπόστρωμα 13-HPOD εμφανίζει solet κορυφή στα 234 nm λόγω του συζυγιακού συστήματος που διαθέτει. Με τη δράση της HPL επιτυγχάνεται λύση του δεσμού άνθρακα-άνθρακα με αποτέλεσμα την εξαφάνιση του συζυγιακού συστήματος και την επακόλουθη μείωση της οφειλόμενης σε αυτό απορρόφησης στα 234 nm.

Η αντίδραση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας κυψελίδα Quartz σε τελικό όγκο 2 ml με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Na₂HPO₄, 1 M NaCl, pH=7.0 και του υποστρώματος 13-HPOD σε συγκέντρωση 10-90 μM και πρωτεϊνικό διάλυμα.

Μελέτη της δραστηριότητας της HPL έγινε σε όλα τα κλάσματα μεμβρανών που απομονώθηκαν.

3.14. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Η φόρτωση ενός πρωτεϊνικού δείγματος στην πηκτή ακρυλαμιδίου απαιτεί συγκεκριμένη πρωτεϊνική συγκέντρωση. Λόγω του ότι κάποια δείγματα έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση από την απαιτούμενη, υπόκεινται συμπύκνωση με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος (TCA).

Σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται υποδεκαπλάσιος όγκος TCA και το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 16 ώρες. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 13.000 g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στη συνέχεια, προστίθεται παγωμένη ακετόνη, σε ίσο όγκο με αυτόν του πρωτεϊνικού δείγματος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 13.000 g για 15 λεπτά και απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο. Η διαδικασία της πλύσης με παγωμένη ακετόνη επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Το ίζημα που προκύπτει αφήνεται να στεγνώσει. Έπειτα επαναδιαλυτοποιείται στην απαιτούμενη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης SDS- Tricine (sample buffer), επωάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά περίπου, με ενδιάμεσα διαλύματα των 5 λεπτών, και το δείγμα τέλος φορτώνεται στην πηκτή ακρυλαμιδίου.

3.15. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση σωματιδίων σε ένα υγρό κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Στην βιοχημεία η ηλεκτροφόρηση πηκτής χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μιγμάτων ουσιών.

Στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE χρησιμοποιούνται πηκτές ακρυλαμιδίου για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (t).

$$U=E*z/t$$

Κατά τη διαδικασία αυτή το διάλυμα μέσα στο οποίο βρίσκονται τα μόρια των πρωτεϊνών κατεργάζεται με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer) που τις μετουσιώνει και τις φορτίζει αρνητικά. Όταν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια των πρωτεϊνών βρεθούν στο ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται κινούνται κατευθυνόμενα προς την κάθοδο διαμέσου της πηκτής ακρυλαμιδίου. Η πηκτή που έχει πόρους ορισμένου μεγέθους επιτρέπει στα μικρότερα μόρια να κινηθούν

γρηγορότερα ενώ τα μεγαλύτερα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Η πηκτή κοσκινίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα μόρια των πρωτεϊνών οδηγεί στη δημιουργία περιοχών με συσσωρευμένα τα όμοια μόρια μιας πρωτεΐνης σε ένα σημείο, μοναδικό για κάθε πρωτεΐνη, μέσα στο πήγμα που εμφανίζονται ως «μπάντες» έπειτα από την κατάλληλη χρώση.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι αποτέλεσμα συμπολιμερισμού του ακρυλαμιδίου με N, N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίο. Οι δυο αυτές ενώσεις σχηματίζουν πολυμερές κατάλληλο για χρήση σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, με την προσθήκη ενός εκκινήτη ελευθέρων ριζών, του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS), και ενός διαδοτή της N,N-τετραμεθυλαθυλενοδιαμίνης (TEMED). Στην πηκτή προστίθεται ακόμη SDS, ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, με σκοπό την αποδιάταξη της πρωτεΐνης αφού καταστρέφει κάθε αλληλεπίδραση μέσα στο μόριο αυτής πλην των ομοιοπολικών. Η πηκτή αποτελείται από δύο διαφορετικά στρώματα το ένα εκ των οποίων έχει μικρότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και βρίσκεται πλησίον της περιοχής τοποθέτησης του δείγματος (stacking gel). Σκοπό έχει να συγκεντρώσει και να στοιβάξει το δείγμα πριν αρχίσει ο διαχωρισμός του στο δεύτερο και μεγαλύτερο κομμάτι της πηκτής που περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου αλλά και την αποδιατακτική ουρία (running gel). Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν τοποθετηθούν στις ειδικά διαμορφωμένες θέσεις της πηκτής αναμειγνύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (sample buffer), επωάζονται για 0,5-24 ώρες και φυγοκεντρώνονται. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η συσκευή αποσυναρμολογείται και η πηκτή τοποθετείται στο κατάλληλο διάλυμα χρώσης.

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε μία και δύο διαστάσεις (SDS-PAGE 1D, 2D). Για την παρασκευή των gels χρησιμοποιήθηκε gel ουρίας [83].

Η χρώση με την οποία εμφανίστηκαν οι πρωτεΐνες είναι η Blue Silver, η οποία έχει μεγάλη ευαισθησία [84] και είναι συμβατή με την διαδικασία ταυτοποίησης πεπτιδίων με φασματομετρία MALDI.

Για πολύ αραιά δείγματα που δεν εμφανίζονται στο gel με την Blue Silver χρησιμοποιείται η χρώση αργύρου η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι και αυτή συμβατή με την διαδικασία ταυτοποίησης πεπτιδίων με φασματομετρία MALDI.

3.16. Δισδιάστατη SDS- Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο συνδυάστηκαν δύο Tricine-SDS πηκτές σε ένα δισδιάστατο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Από την Tricine-SDS πηκτή της πρώτης διάστασης κόπηκαν οι επιθυμητές λωρίδες (3-10 mm) και επώστηκαν για 30 λεπτά σε όξινο διάλυμα 100 mM Tris- HCl με pH 2 [85]. Με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού απορροφήθηκε η υγρασία και οι λωρίδες τοποθετήθηκαν σκόπιμα με μία μικρή κλίση ώστε να αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες που θα σχηματιστούν κατά τον πολυμερισμό της πηκτής της δεύτερης διάστασης.

3.17. Ταυτοποίηση πεπτιδίων

3.17.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται στο πρωτόκολλο των Shevchenko et al.[86]. Στόχος της διαδικασίας είναι η αποτελεσματική θρυψινοποίηση πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται σε αποδιατακτικό gel, ώστε να ταυτοποιηθεί η αλληλουχία πεπτιδίων με φασματοσκοπία μάζας.

3.17.2. Βήματα

1. Οι μπάντες προς ταυτοποίηση κόβονται με νυστέρι, αφαιρούνται από το gel και κόβονται περαιτέρω σε μικρούς κύβους.
2. Τοποθετούνται σε αποστειρωμένα erpendorf.
3. Καλύπτονται με διάλυμα αποχρωματισμού και αναδεύονται για 15 λεπτά.
4. Αφαιρείται το διάλυμα, τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα ABS και αναδεύονται για 15 λεπτά.
5. Το διάλυμα αφαιρείται και το βήμα 3 και 4 επαναλαμβάνεται ακόμα 2 φορές (αν κάποιο δείγμα δεν έχει αποχρωματιστεί, τότε συνεχίζεται ξανά ο ίδιος κύκλος).
6. Προστίθεται 100% Acetonitrile και τα δείγματα αναδεύονται για 15 λεπτά (παρατηρούνται λευκά κομμάτια, συρρικνωμένα).
7. Αφαιρείται το διάλυμα και αφήνεται σε ροή αέρα προς ξήρανση.

8. Τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα 10 mM DTT και αναδεύονται για 45 λεπτά στους 56°C, ώστε να αναχθούν πλήρως οι πρωτεΐνες και να αποδιατακτούν.
9. Αφαιρείται το διάλυμα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3, 4, 6 και 7.
10. Προστίθεται διάλυμα 55 mM IAA και αναδεύεται για 45λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πραγματοποιηθεί αλκυλίωση των πρωτεϊνών.
11. Αφαιρείται το διάλυμα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3,4,5,6 και 7.
12. Στα κομμάτια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης (125ng/δείγμα) και αφήνεται όλο το βράδυ στους 37°C (αν δεν έχουν καλυφθεί προστίθεται λίγο ακόμα διάλυμα θρυψίνης ή διάλυμα ABS).
13. Μεταφέρεται το διάλυμα σε νέο, αποστειρωμένο erpendorf.
14. Τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα 0,1% TFA σε διάλυμα αποχρωματισμού και αναδεύονται για 30 λεπτά.
15. Το διάλυμα μεταφέρεται στο νέο erpendorf του βήματος 13.
16. Προστίθεται 100% στα κομμάτια και αναδεύονται για 30λεπτά.
17. Το διάλυμα μεταφέρεται στο νέο erpendorf του βήματος 13.
18. Τα δείγματα στα καινούργια erpendorf παγώνονται με υγρό άζωτο.
19. Χρησιμοποιείται το Speed Vac για να εξατμιστεί ο παγωμένος διαλύτης και να παραμείνουν μόνο τα πεπτίδια στη μορφή σκόνης.
20. Στα πεπτίδια προστίθεται διάλυμα μήτρας και τοποθετούνται στον ειδικό στόχο για να ταχτοποιηθούν μέσω φασματομετρίας μάζας MALDI.

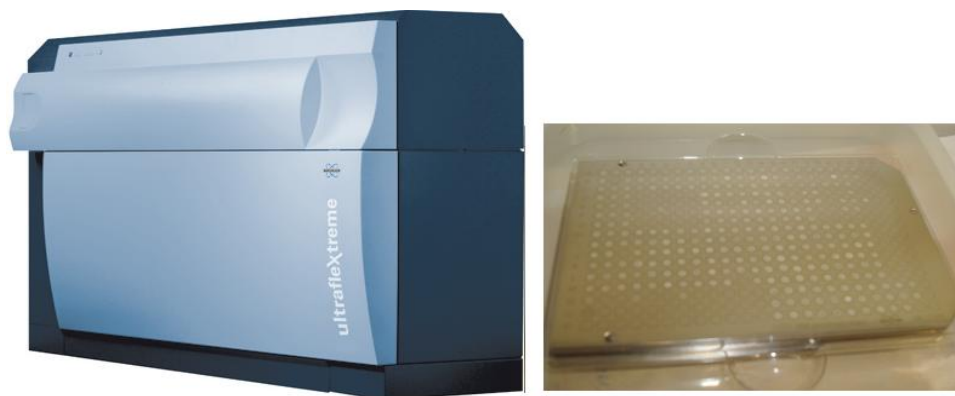
3.17.3. Διαλύματα

- Διάλυμα αποχρωματισμού: 50% Acetonitrile.
- Διάλυμα ABS: 50 mM Ammonium bicarbonate (φιλτραρισμένο).
- Διάλυμα DTT: 10 mM Dithiothreitol σε διάλυμα ABS.
- Διάλυμα IAA: 55 mM Iodoacetamide σε διάλυμα ABS.

**Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να είναι φρέσκα και να έχει χρησιμοποιηθεί νερό καθαρότητας nanopure. Επίσης, η διαδικασία έγινε σε αποστειρωμένο περιβάλλον (laminar flow).

3.17.4. Φασματομετρία MALDI TOF/TOF

Ο φασματογράφος μάζας είναι της εταιρίας Bruker Daltonics (εικόνα 22). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αργής εξαγωγής (delayed extraction) και με τη χρήση του ανακλαστήρα. Το laser smartbeam II είναι συχνότητας 200Hz. Για τα φάσματα MS χρησιμοποιήθηκε τάση επιτάχυνσης 20,15kV για την Πηγή Ιοντισμού 1 και 18,10kV για την Πηγή Ιοντισμού 2, 90ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 600kDa. Αντίστοιχα, για τα φάσματα MS/MS (LIFT) χρησιμοποιήθηκε τάση επιτάχυνσης 19,06kV για την Πηγή Ιοντισμού 1 και 3,80kV για την Πηγή Ιοντισμού 2. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2,3 και ελήφθησαν φάσματα με εύρος μαζών από 700-3900 kDa.



Εικόνα 22. Ο φασματογράφος μάζας Ultraflex Xtreme (Bruker Daltonics) και ο μεταλλικός στόχος

Τα φάσματα που ελήφθησαν βαθμονομήθηκαν εξωτερικά με το μίγμα εννέα πεπτιδίων Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH), καθώς επίσης έγινε και εσωτερική βαθμονόμηση με δύο πεπτίδια (Bradykinin Fragment 1-7: 756,3997 Da και ACTH Fragment 18-39: 2454,1989 Da, Sigma) χρησιμοποιώντας το λογισμικό flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics). Για κάθε τελικό φάσμα μάζας αθροίστηκαν 1000 έως και 2000 επιμέρους φάσματα. Όλα τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonics) για την εξομάλυνσή τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή των μονοισοτοπικών κορυφών, ενώ μέσω του λογισμικού BioTools version 3.2 (Sequence editor version) έγινε η αναζήτηση στο Mascot server χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων για τα πράσινα φυτά στο NCBI και τη μηχανή αναζήτησης Mascot δείχνει την ομολογία της πρωτεΐνης σε σχέση με άλλες ήδη γνωστές. Το περιθώριο

λάθους ορίστηκε στα 30rpm, ο μέγιστος αριθμός αποτυχημένων πρωτεολύσεων σε 1 και οι πιθανές τροποποιήσεις αμινοξέων ορίστηκαν οι καρβαμιδομεθυλίωση των κυστεϊνών και η οξείδωση των μεθειονινών.

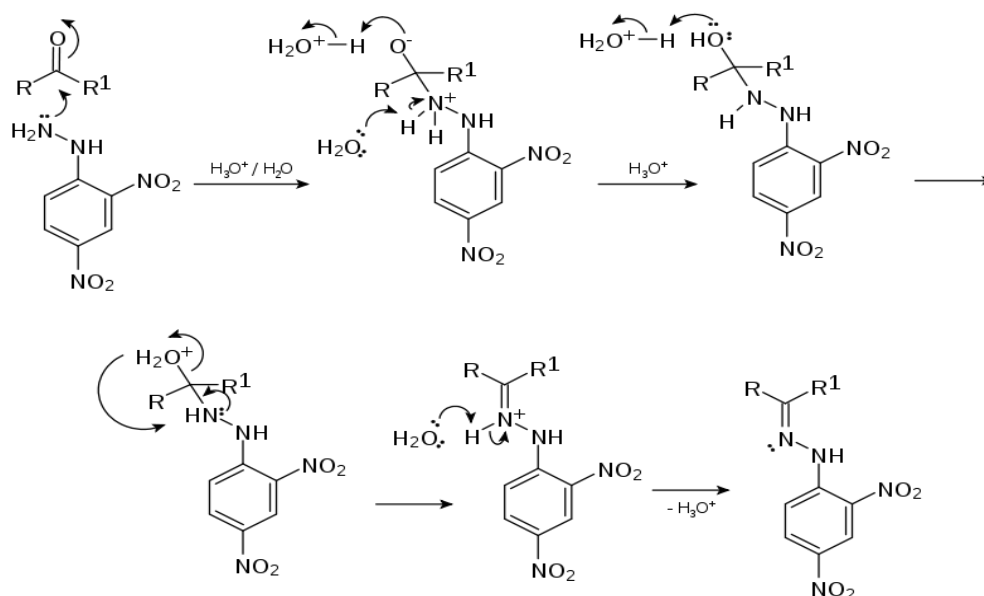
Το σύνολο της διαδικασίας (λήψη και επεξεργασία φασμάτων, αναζήτηση πεπτιδίων) πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Τσιώτη.

3.18. Ένδειξη παρουσίας HPL- Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη

Παράλληλα με τις μελέτες κινητικότητας και την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έγινε και έμμεσος προσδιορισμός της HPL βασισμένος στην ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης. Συγκεκριμένα με το Brady's test η 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη αντιδράει με τα αλδεϋδικά προϊόντα που παράγονται από τη HPL και δίνουν ένα έντονο χρώμα [50].

Για κάθε ένα από τα πιθανώς ενεργά δείγματα της πρωτεΐνης παρασκευάστηκε ένα μίγμα σε τελικό όγκο 1mL που περιείχε: το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο γίνονται οι κινητικές, 90 μM 13-HPOD και πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Παράλληλα προετοιμάστηκε ένα λευκό που περιείχε υποστρώμα (13-HPOD) χωρίς προσθήκη πρωτεϊνικού εκχυλίσματος καθώς και δύο θετικοί μάρτυρες με ανάμιξη ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7) και 5 μL εξανάλης και 5 μL trans-2-εξανάλης. Τα δείγματα επώασθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά, ενώ στη συνέχεια, προστέθηκε όγκος 0,25mL 0,1% 2,4- δινιτρο φαινυλδραζίνης σε 5N HCl και όλα τα μίγματα θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 80°C, προκειμένου να σχηματιστούν τα παράγωγα της 2,4- δινιτρο φαινυλδραζίνης με τις υπάρχουσες αλδεϋδες. Τα δείγματα αφέθηκαν να κρυσώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με 0,5 mL χλωροφορμίου 3 φορές. Στα εκχυλίσματα, συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση του διαλύτη σε ροή αζώτου και στα ξηρά δείγματα προστέθηκαν 10μL-50μL διαλύτη ώστε να γίνει δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός τους με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F254 TLC & μίγμα διαλυτών εξάνιο – διαιθυλαιθέρας - μεθανικό οξύ (50:50:1) ως

κινητή φάση. Τα αποτελέσματα του διαχωρισμού του μίγματος που περιείχε τα προϊόντα της αντίδρασης έγιναν ορατά κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Το σημείο απομακρύνεται από την πλάκα του TLC και τα παράγωγα της 2,4- δίνιτρο φαινυλδραζίνης με τις υπάρχουσες αλδεύδες εκχυλίζονται με μεθανόλη και λαμβάνεται φάσμα ορατού-υπεριώδους. Τα παράγωγα της 2,4- δίνιτρο φαινυλδραζίνης με τις υπάρχουσες αλδεύδες εμφανίζουν κορυφή στα 254 nm.



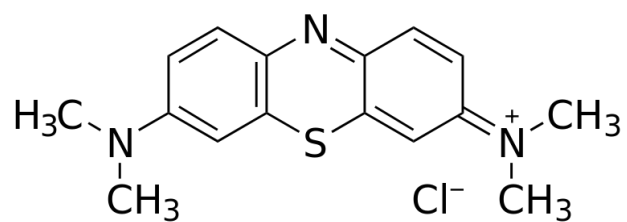
Εικόνα 23. Μηχανισμός της αντίδρασης αλδευδών με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη

3.19. Αναστολή της δράσης της HPL

Όπως αναφέρεται και στη θεωρία, υπάρχουν επιπλέον έξι τουλάχιστον ένζυμα τα οποία καταλύουν το ίδιο υπόστρωμα. Άρα μόνο με τις κινητικές δεν εξάγεται ασφαλές συμπέρασμα για τη δράση της HPL. Ένας επιπλέον τρόπος να εξεταστεί η παρουσία της HPL είναι με τη χρήση ειδικών αναστολέων.

Για τη μελέτη της αναστολής της δράσης της HPL χρησιμοποιήθηκε η ένωση Methylene blue (εικόνα 26). Σύμφωνα με τους Matsui et al. η ένωση αυτή σε συγκέντρωση 0,2 mM αναστέλλει πάνω από το 80% της δραστηριότητας της HPL [47].

Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 20% PEG από τις εμπλουτισμένες σε φωτοσύστημα I μεμβράνες. Σε αυτό προστέθηκε 0,2 mM μπλε του μεθυλενίου και έγιναν μελέτες κινητικής.



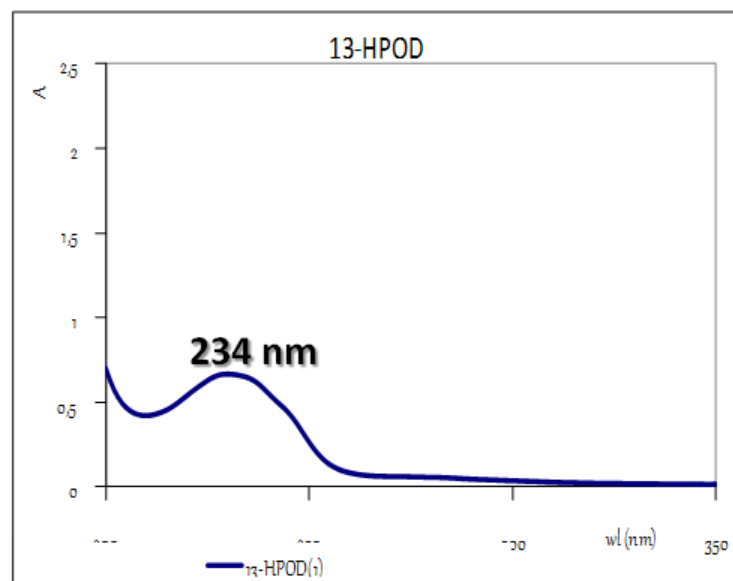
Εικόνα 24. Δομή της ένωσης μπλε του μεθυλενίου.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Παρασκευή υποστρώματος της HPL (Υδροϋπεροξειδίου του λινολεϊκού οξέος ή 13-HPOD)

Η παρασκευή του υποστρώματος επιτεύχθηκε μέσω της ενζυμικής αντίδρασης της εμπορικής λιποξυγενάσης από σόγια στο υπόστρωμα του λινολεϊκού οξέος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η προσθήκη της υπεροξειδικής ομάδας στο μόριο του λινολεϊκού οξέος και ταυτόχρονα δημιουργείται το συζυγιακό σύστημα στο οποίο οφείλει στην κορυφή στην απορρόφηση του στα 234 nm το μόριο.

Στην εικόνα 27 φαίνεται το φάσμα του 13- HPOD με την κορυφή στα 234 nm.

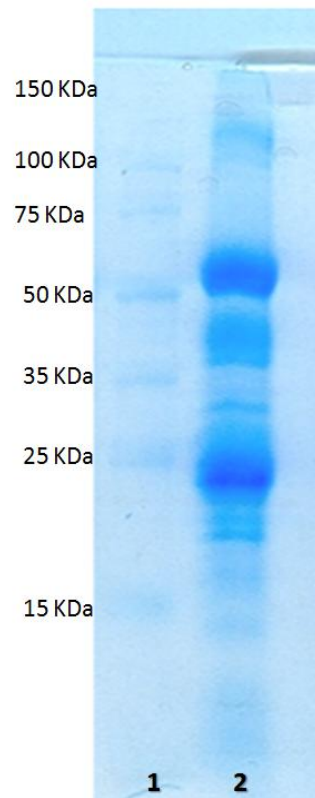


Εικόνα 25. Φάσμα υποστρώματος 13-HPOD.Εμφάνιση κορυφής στα 234 nm.

4.2. Πρωτόκολλα πρωτεϊνικών απομονώσεων

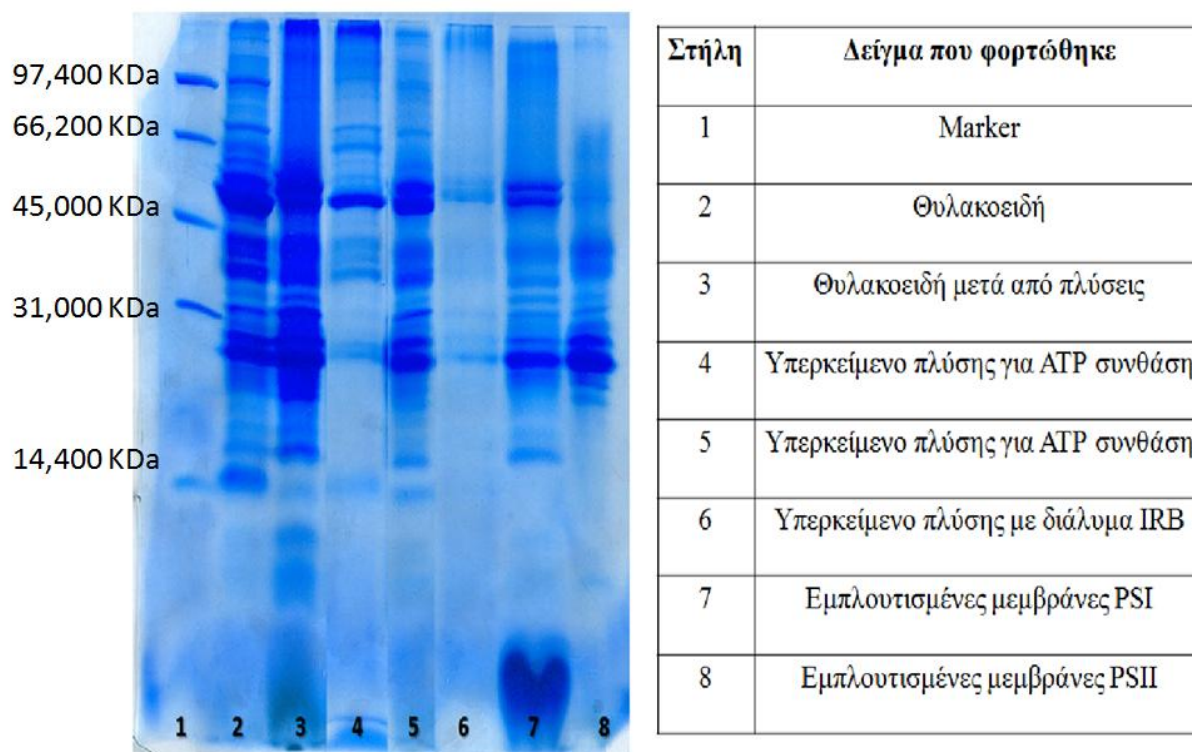
4.2.1. Απομόνωση χλωροπλαστών από σπανάκι

Το πρώτο βήμα της παρούσας εργασίας περιλάμβανε την απομόνωση χλωροπλαστών από σπανάκι. Οι πρωτεΐνες των χλωροπλαστών μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση με SDS-PAGE (εικόνα 28).



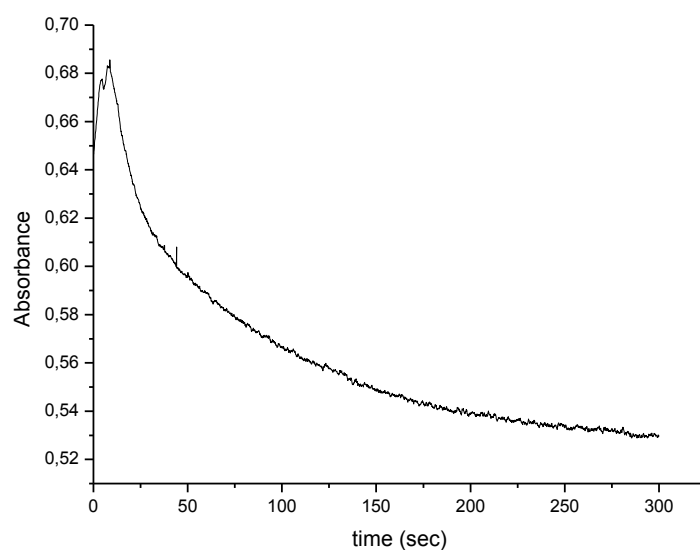
Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση πηκτής. Στήλη 1 marker, στήλη 2 χλωροπλάστες

Στην πηκτική ηλεκτροφόρησης που φαίνεται στην εικόνα 29 εμφανίζονται τα δείγματα κατεργασίας των θυλακοειδών μεμβρανών. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας που χρησιμοποιείται ώστε συγκριτικά να μπορεί να βγει συμπέρασμα για το μοριακό βάρος των δειγμάτων.



Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση πηκτής θυλακοειδών και εμπλουτισμένων μεμβρανών PSI και εμπλουτισμένων μεμβρανών PSII

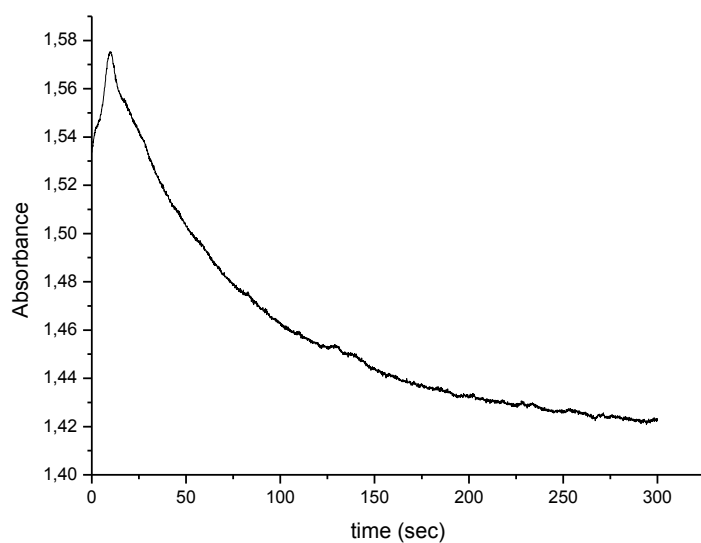
Στους χλωροπλάστες και στα δείγματα κατεργασίας των θυλακοειδών μεμβρανών έγιναν μελέτες της ενζυμικής ενεργότητας τους. Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της HPL έγινε φασματοσκοπικός προσδιορισμός στα 234 nm, που αποτελεί τη solet κορυφή του υποστρώματος 13-HPOD. Όσον αφορά τους απομονωμένους χλωροπλάστες παρατηρήθηκε μείωση της απορρόφησης του υποστρώματος, πιθανόν αποτέλεσμα της διάσπασής του στα προϊόντα του από την HPL (εικόνα 30). Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους 25°C.



Εικόνα 28. Διάγραμμα κινητικής χλωροπλαστών. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

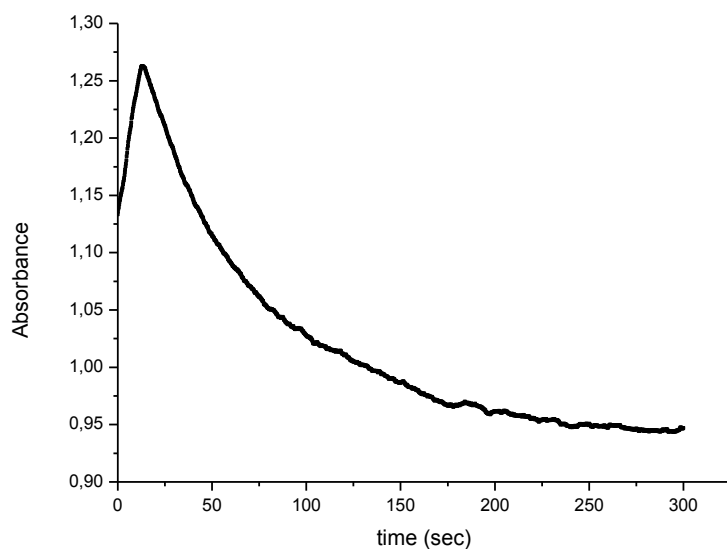
Η ενεργότητα των χλωροπλαστών υποδεικνύει την πιθανή παρουσία του ενζύμου της HPL. Έτσι, πραγματοποιήθηκε διάσπαση των χλωροπλαστών με σκοπό την περαιτέρω απομόνωση των διαφόρων μεμβρανών τους. Αρχικά, απομονώθηκαν οι περιβάλλουσες μεμβράνες των χλωροπλαστών (envelope) οι οποίες δεν παρουσίασαν σημαντική ενεργότητα. Δηλαδή, η απορρόφηση του υποστρώματος 13-HPOD παρέμεινε σταθερή με την προσθήκη ποσότητας δείγματος των μεμβρανών αυτών. Για το λόγο αυτό, το δείγμα των μεμβρανών αυτών δεν εξετάστηκε περαιτέρω.

Έπειτα, απομονώθηκαν θυλακοειδής μεμβράνες και έγινε μελέτη της ενεργότητας τους. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα στην εικόνα 31, με την προσθήκη μικρής ποσότητας θυλακοειδών μεμβρανών παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αυτή η ενεργότητα φανερώνει την πιθανή ύπαρξη της HPL στις μεμβράνες αυτές.



Εικόνα 29. Διάγραμμα κινητικής θυλακοειδών μεμβρανών. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

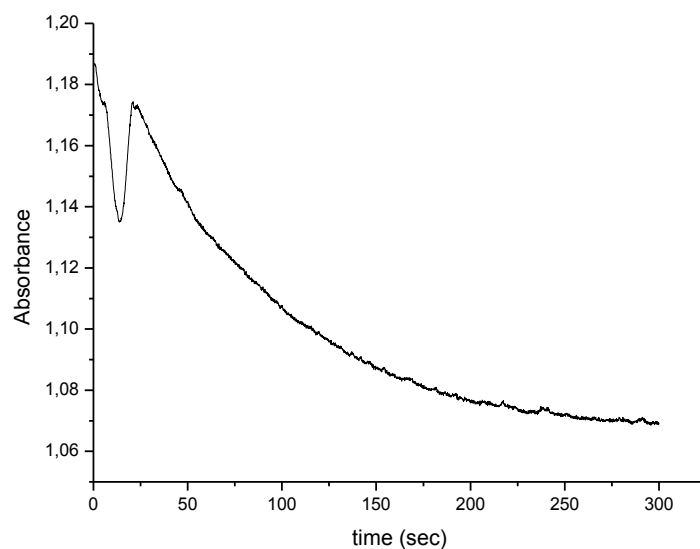
Επίσης, μεγάλη μείωση της απορρόφησης παρατηρείται και στα θυλακοειδή μετά τις εκπλύσεις (εικόνα 32). Το υπερκείμενο των πλύσεων που περιέχει ένα ποσοστό της ATP-συνθάσης καθώς και της RuBisCo δεν εμφάνισε ενεργότητα.



Εικόνα 30. Διάγραμμα κινητικής θυλακοειδών μεμβρανών μετά τις πλύσεις. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

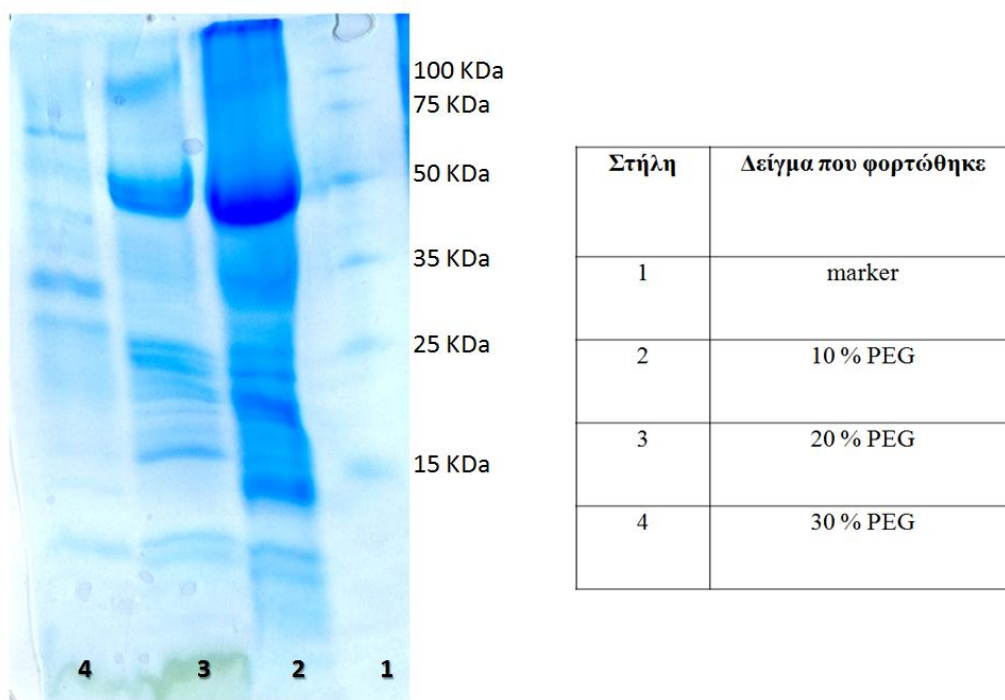
Στη συνέχεια έγινε απομόνωση των μεμβρανών που είναι εμπλουτισμένες σε φωτοσύστημα I και σε φωτοσύστημα II και μελέτη της ενεργότητάς τους. Οι στενά συμπιεσμένες στοίβες θυλακοειδών, τα grana, των οποίων οι εξωτερικές επιφάνειες

δεν είναι σε άμεση επαφή με το στρώμα, και είναι εμπλουτισμένες σε φωτοσύστημα II δεν προκάλεσαν κάποια μείωση στο υπόστρωμα. Έτσι απορρίφθηκαν και ελέγχθηκε η ενεργότητα των μεμβρανών που είναι εμπλουτισμένες σε φωτοσύστημα I, δηλαδή τα περιθώρια και τις επίπεδες μη- συμπιεσμένες μεμβράνες των θυλακοειδών του στρώματος. Το δείγμα αυτό προκάλεσε μείωση της απορρόφησης του υποστρώματος όπως φαίνεται και στο διάγραμμα στην εικόνα 33.



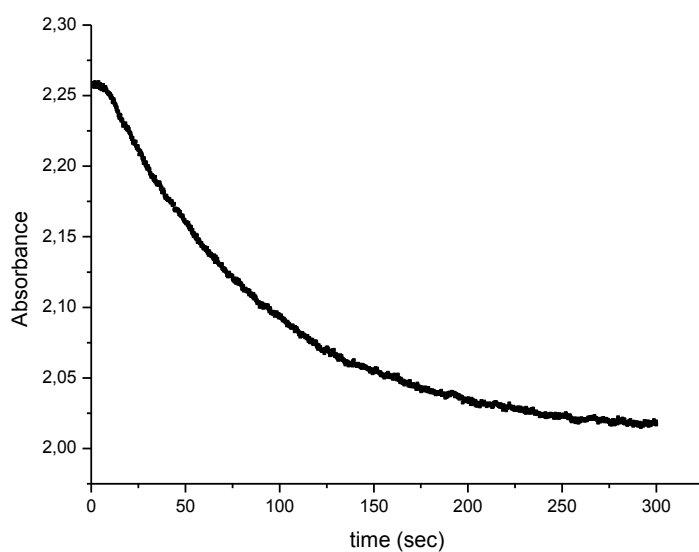
Εικόνα 31. Διάγραμμα κινητικής εμπλουτισμένων μεμβρανών PSI. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

Στο δείγμα των εμπλουτισμένων μεμβρανών σε φωτοσύστημα I προστίθεται PEG 8.000 σε συγκεντρώσεις 10 %, 20 % και 30 %. Στην εικόνα 34 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση πηκτής των δειγμάτων αυτών.

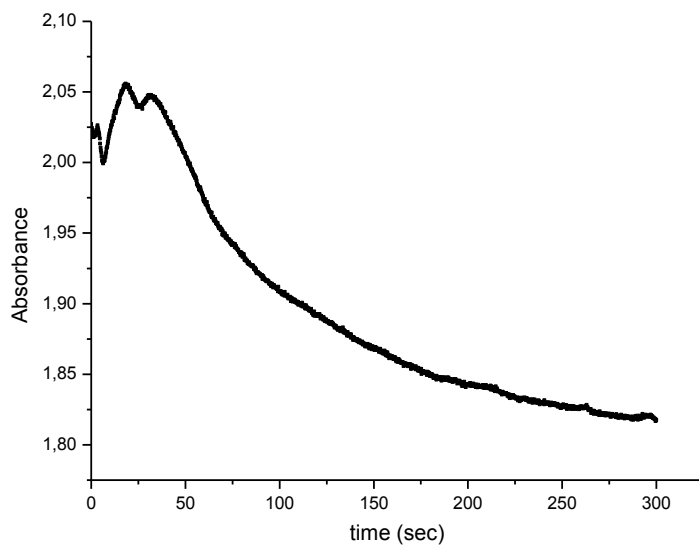


Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση πηκτικής κλασματοποίησης εμπλουτισμένων σε φωτοσυστήμα Ι μεμβρανών με PEG

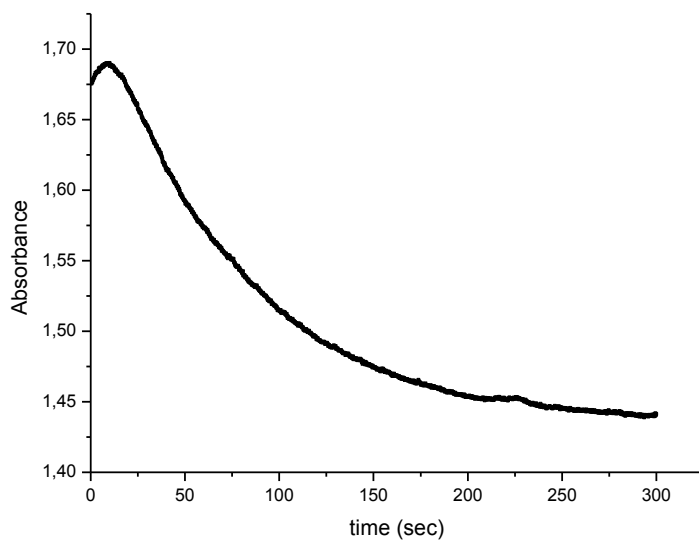
Έγινε μελέτη της ενεργότητας καθενός από τα δείγματα των εμπλουτισμένων μεμβρανών σε φωτοσυστήμα Ι με PEG. Στα διαγράμματα που φαίνονται στις εικόνες 35, 36, 37 εμφανίζεται η ενεργότητα του δείγματος των μεμβρανών με 10 % PEG8.000, 20 % PEG 8.000 και 30 % PEG 8.000 αντίστοιχα.



Εικόνα 33. Διάγραμμα κινητικής εμπλουτισμένων σε φωτοσυστήμα Ι μεμβρανών με 10%PEG 8.000. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.



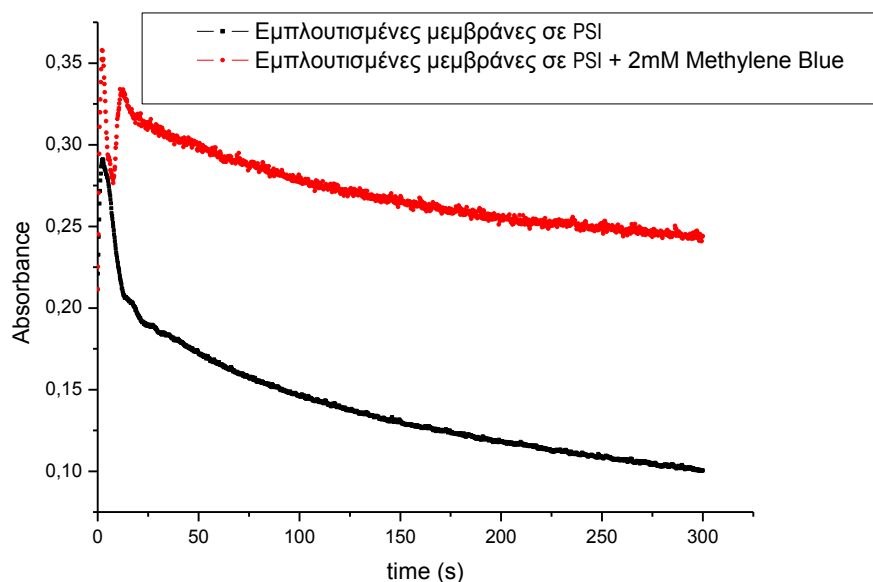
Εικόνα 34. Διάγραμμα κινητικής εμπλουτισμένων σε φωτοσύστημα Ι μεμβρανών με 20% PEG 8.000. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.



Εικόνα 35. Διάγραμμα κινητικής εμπλουτισμένων σε φωτοσύστημα Ι μεμβρανών με 30% PEG 8.000. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

4.2.2. Αναστολή της δράσης της HPL

Στην εικόνα 38 φαίνεται ότι παρουσία της ένωσης μπλε του μεθυλενίου αναστέλλεται η δράση της HPL περίπου 50%. Με μαύρο φαίνεται το διάγραμμα κινητικής του δείγματος των εμπλουτισμένων σε PSI μεμβρανών ενώ με κόκκινο η κινητική του ίδιου δείγματος παρουσία της ένωσης μπλε του μεθυλενίου.

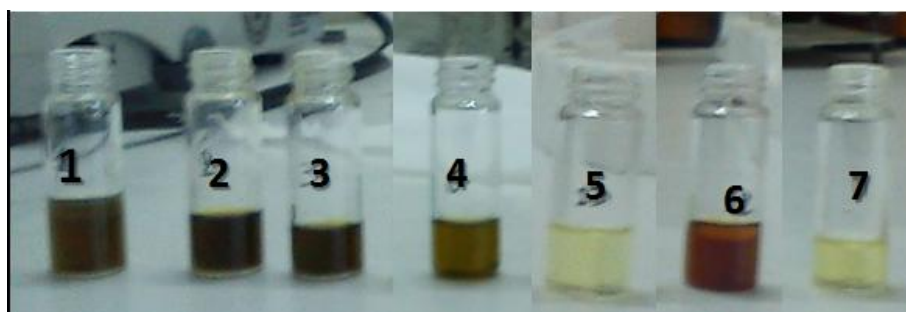


Εικόνα 36. Διάγραμμα κινητικής δείγματος των εμπλουτισμένων σε φωτοσυστήματος I μεμβρανών. Με κόκκινο φαίνεται η μελέτη κινητικής που έγινε παρουσία Methylene blue. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

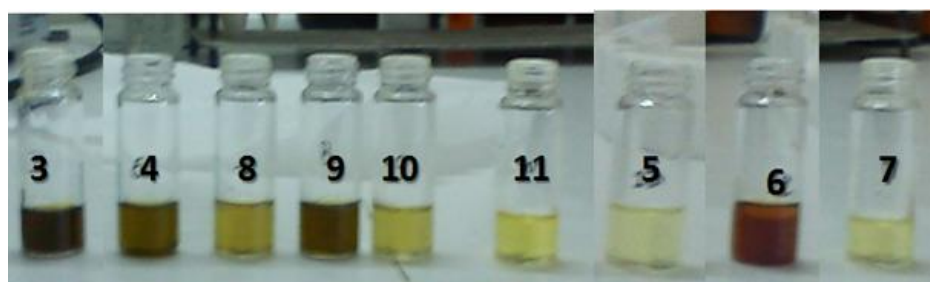
4.2.3. Ένδειξη παρουσίας HPL-Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλ-υδραζίνη

Τα διάφορα δείγματα μεμβρανών των χλωροπλαστών που έδειξαν ενεργότητα μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να σχηματίζουν τα δύο κύρια προϊόντα της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο. Το σημείο στο ύψος των στάνταρ εμφάνισαν τα δείγματα από θυλακοειδή (1), θυλακοειδή μετά από τις πλύσεις (2) και (3), οι εμπλουτισμένες μεμβράνες PSI (4) καθώς και τα κλάσμα με 20 % PEG 8.000 από αυτές (9). Το δείγμα από 10% PEG 8.000 (8) εμφάνισε ένα μικρό σημείο στο ύψος των εμπορικών αλδευδών ενώ τα δείγματα 30% (10) και 50% PEG 8.000 (11) δεν εμφάνισαν. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές εξανάλη (5) και εξανάλη (6) καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα όπου έγιναν οι κινητικές με ποσότητα υποστρώματος (7) (εικόνες 41, 42).

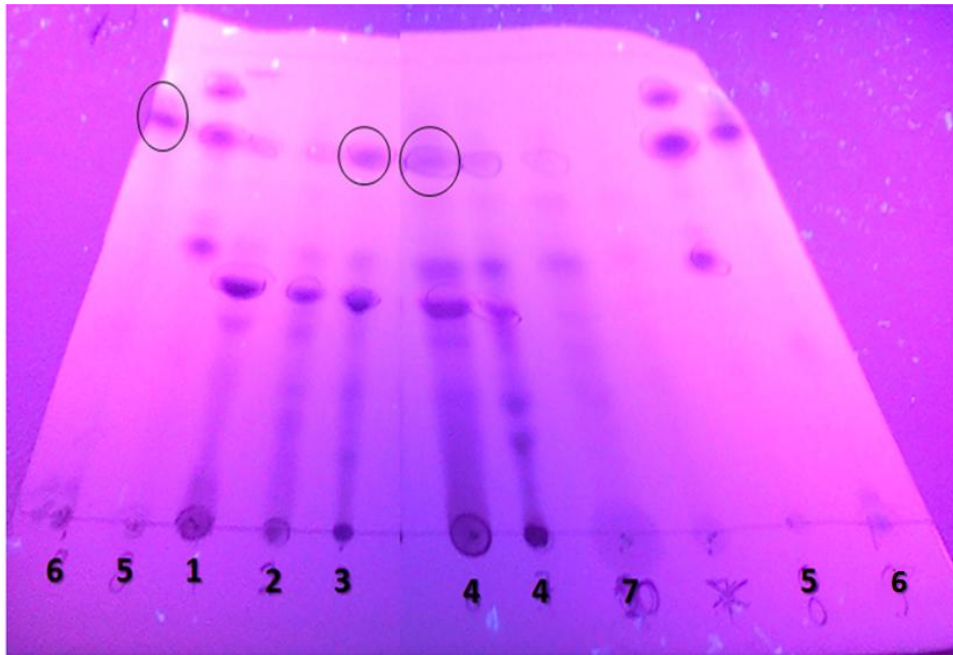
Αριθμός	Δείγμα
1	Θυλακοειδή
2	Θυλακοειδή μετά από πλύσεις
3	Θυλακοειδή μετά από πλύσεις
4	Εμπλουτισμένες μεμβράνες σε PSI
5	Εμπορική εξανάλη
6	Εμπορική εξανάλη
7	Ρυθμιστικό διάλυμα για κινητικές +Υπόστρωμα
8	10 % PEG 8.000
9	20 % PEG 8.000
10	30 % PEG 8.000
11	50 % PEG 8.000



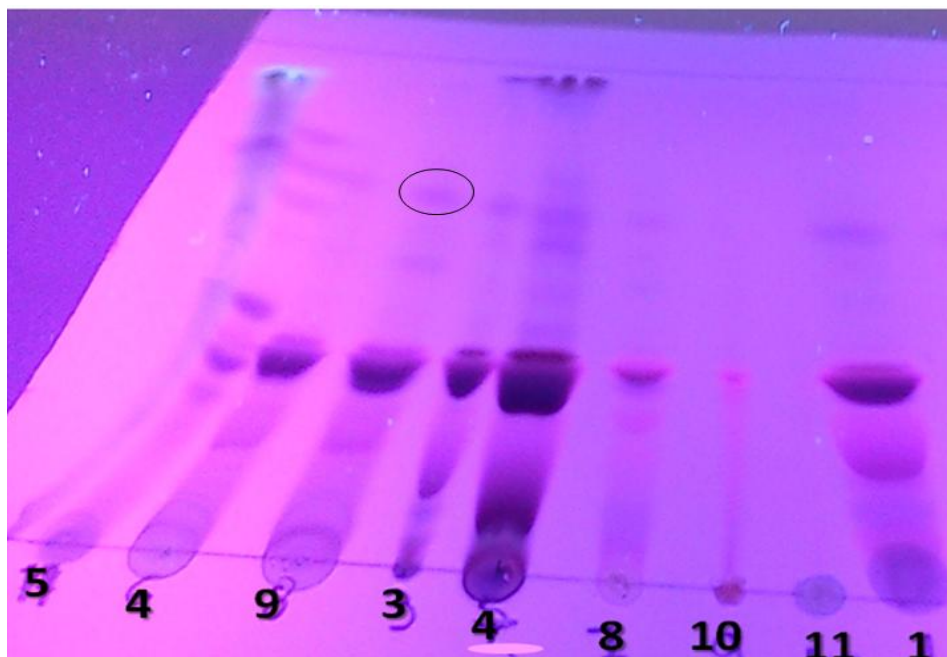
Εικόνα 37. Μελέτη αντίγνωσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλοδραζίνη



Εικόνα 38. Μελέτη αντίγνωσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλοδραζίνη.

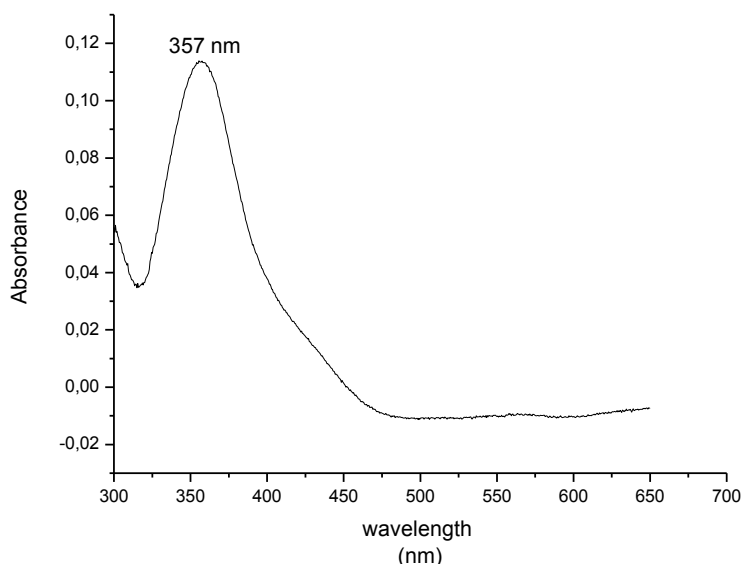


Εικόνα 39. TLC - Μελέτη αντίδρασης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη



Εικόνα 40. TLC - Μελέτη αντίδρασης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη.

Με εκχύλιση του σημείου με μεθανόλη και με λήψη φάσματος ορατού-υπεριώδους μόνο το σημείο από το δείγμα των θυλακοειδών μετά τις πλύσεις έδωσε ικανοποιητικό φάσμα με κορυφή στα 357 nm όπως φαίνεται στην εικόνα 43.



Εικόνα 41. Διάγραμμα μελέτης ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη σε δείγμα θυλακοειδών.

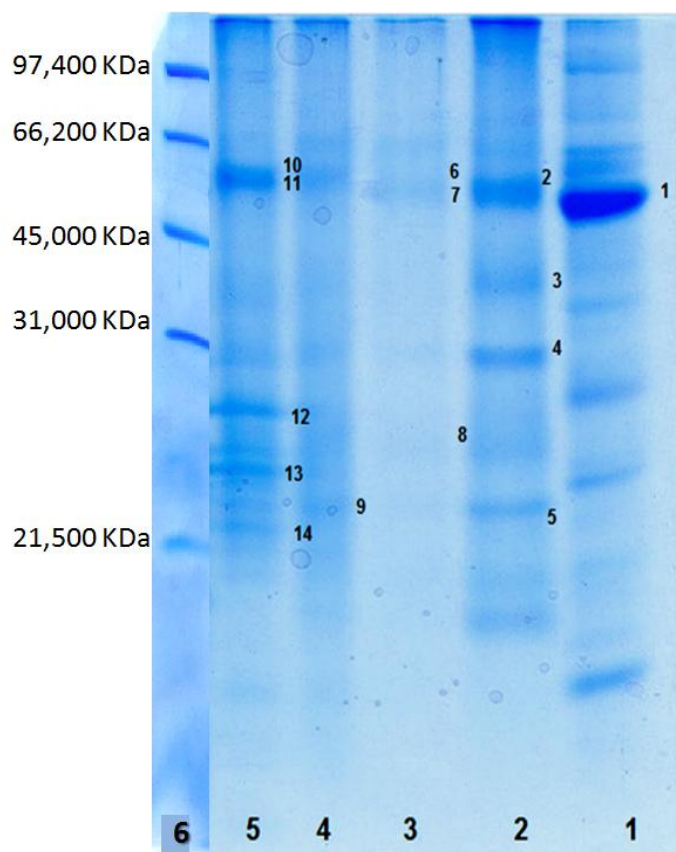
4.3. Πρωτεϊνική ανάλυση με MALDI TOF/TOF MS

Οι επισημασμένοι αριθμοί πάνω στην κάθε εικόνα ηλεκτροφόρησης πηκτής υποδηλώνουν τις πρωτεϊνικές ζώνες που αποκόπηκαν και μετά από πρωτεόλυση τους με θρυψίνη, αναλύθηκαν με φασματοσκοπία MALDI TOF/TOF MS, με σκοπό την ανάλυση τους και την πιθανή ταυτοποίηση της HPL σε κάποια από αυτές τις μεμβράνες.

4.3.1. Envelope μεμβράνες χλωροπλαστών

Αρχικά έγινε πρωτεϊνική ανάλυση των δειγμάτων των envelope μεμβρανών. Στην εικόνα 47 στη στήλη 1 εμφανίζεται το δείγμα από απομονωμένη HPL, υπερεκφρασμένη από τροποποιημένα βακτήρια *E. Coli* με το γονίδιο της HPL από πιπεριά. Στη 2 στήλη εμφανίζεται το δείγμα από την εξωτερική envelope μεμβράνη, και στη στήλη 5 το δείγμα από την εσωτερική envelope μεμβράνη. Στις στήλες 3 και 4 εμφανίζονται μίγματα από τα δείγματα των εξωτερικών και εσωτερικών envelope

μεμβρανών. Στη στήλη 6 φαίνεται ο marker. Στο συγκεκριμένο gel διακρίθηκαν 14 πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες αναλύθηκαν με φασματοσκοπία MALDI TOF/TOF MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 10 διαφορετικών πρωτεϊνών. Δύο πρωτεϊνικές ζώνες δεν ταυτοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Εικόνα 42. Ηλεκτροφόρηση πηκτής για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στις Envelope μεμβράνες χλωροπλαστών. Με αριθμούς φαίνονται οι ζώνες που αποκόπηκαν.

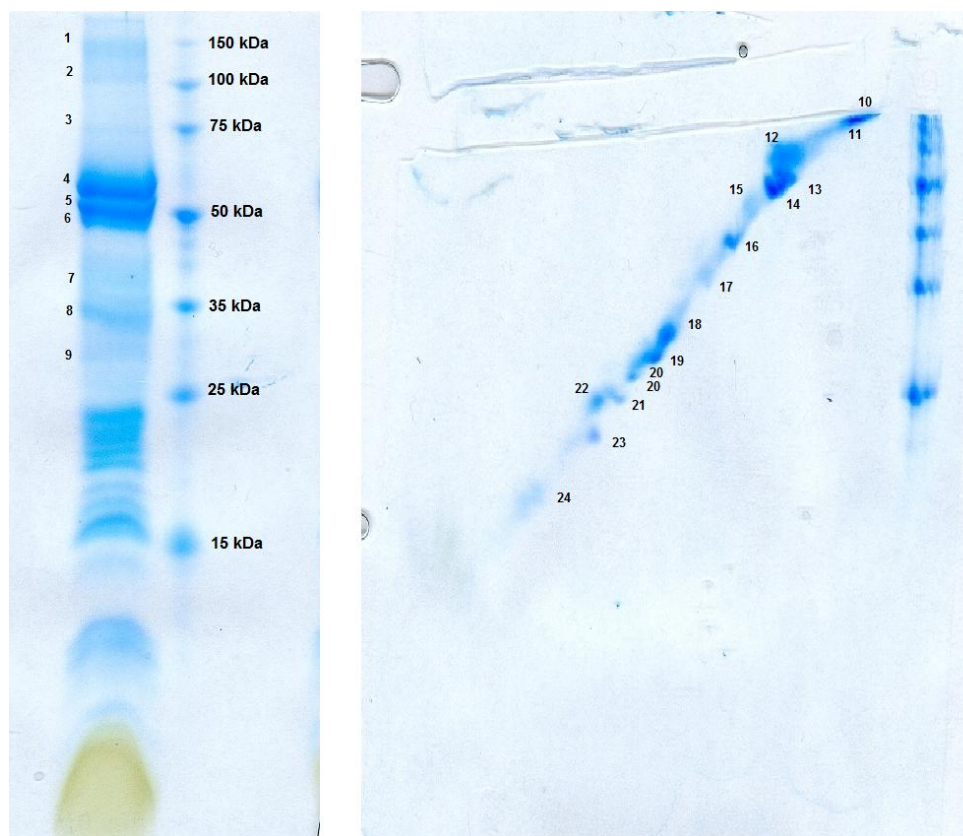
Spot number	Identified proteins	Accession number	Mascot Score	Protein MW
1	fatty acid hydroperoxide lyase [<i>Capsicum annuum</i>]	Q39443	298	54307
2	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P00875	103	53220
3	Ferredoxin--NADP reductase	P00455	65	41447
	Fructose-bisphosphate	P16096	25	42727

	aldolase			
4	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P12359	167	35377
5	Oxygen-evolving enhancer protein 3	P12301	254	24838
7	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P00875	98	53220
8	Oxygen-evolving enhancer protein 2	P12302	16	28614
9	Oxygen-evolving enhancer protein 3	P12301	94	24838
10	ATP synthase subunit alpha	P06450	133	55474
	ATP synthase subunit beta	P00825	101	53768
11	ATP synthase subunit beta	P00825	53	53768
12	Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1	D2T2F7	43	28522
14	Photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic	P12355	86	25568
	ATP synthase subunit b, chloroplastic	P06453	20	21034

4.3.2. Εμπλουτισμένες μεμβράνες PSI

Στη συνέχεια έγινε πρωτεϊνική ανάλυση των δειγμάτων των εμπλουτισμένων μεμβρανών σε PSI με τις διάφορες συγκεντρώσεις PEG 8.000.

Στην εικόνα 48 φαίνονται οι ζώνες που αποκόπηκαν και αναλύθηκαν με φασματοσκοπία MALDI TOF/TOF MS από το δείγμα με 20% PEG 8.000 καθώς και η πηκτή από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση του. Στις δύο πηκτές αποκόπηκαν συνολικά 24 πρωτεϊνικές ζώνες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν οι 18.

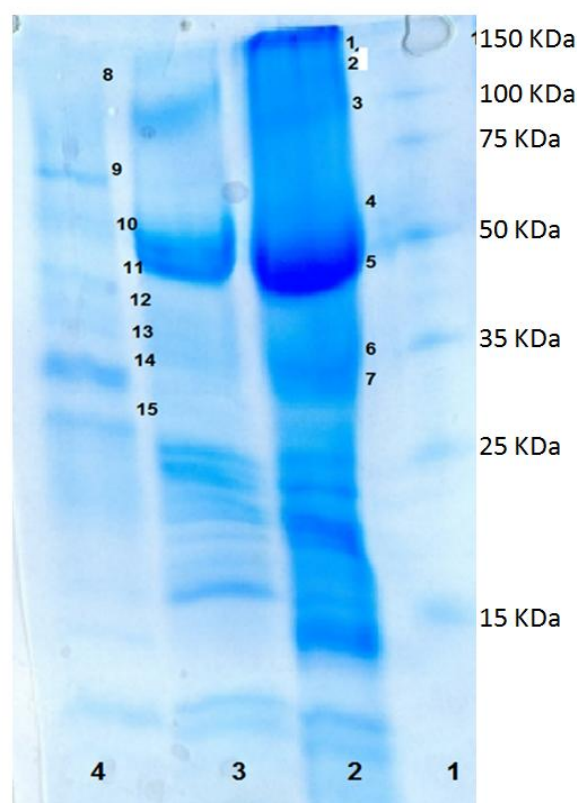


Εικόνα 43. Ηλεκτροφόρηση πηκτής μονοδιάστατης και διδιάστατης ηλεκτροφόρησης στο κλάσμα 20% PEG 8.000 των εμπλουτισμένων σε φωτοσύστημα I μεμβρανών. Με αριθμούς φαίνονται οι ζώνες που αποκόπηκαν.

Spot number	Identified proteins	Accession number	Mascot Score	Protein MW
1	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	P06512	81	82941
2	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	P06511	48	83161
4	ATP synthase subunit alpha	P06450	162	55474
6	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P00875	47	53220
7	unnamed			
8	unnamed			
9	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P12359	117	35377
11	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	P06512	120	82941
	Photosystem I P700		192	83161

	chlorophyll a apoprotein A1	P06511		
	ATP synthase subunit alpha	P06450	54	55474
12	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	P06512	118	82941
	ATP synthase subunit alpha	P06450	116	55474
	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	P06511	192	83161
13	ATP synthase subunit alpha	P06450	148	55474
14	ATP synthase subunit beta	P00825	283	53768
16	ATP synthase gamma chain	P05435	70	40391
17	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P12359	124	35377
18	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P12359	88	35377
19	Photosystem I reaction center subunit II	P12353	275	23145
20	ATP synthase delta chain	P11402	292	27664
21	Photosystem I reaction center subunit III	P12355	253	25568
	Oxygen-evolving enhancer protein 3	P12301	240	24838
22	Photosystem I reaction center subunit III	P12355	380	25568
	Photosystem I reaction center subunit XI	Q41385	350	23036
23	ATP synthase epsilon chain	P00833	91	14748
24	Photosystem I reaction center subunit IV	P22179	173	15315
	Photosystem I iron- sulfur center	P10098	142	9531

Στην πηκτή στην εικόνα 49 στη στήλη 1 εμφανίζεται ο μάρτυρας, στις στήλες 2,3,4 οι εμπλουτισμένες σε φωτοσυστήματος I μεμβράνες με 10% PEG, 20% PEG και 30% PEG αντίστοιχα. Αποκόπηκαν 15 πρωτεϊνικές ζώνες από τα κλάσματα 10% PEG και 30% PEG και αναλύθηκαν με φασματοσκοπία MALDI TOF/TOF MS. Από αυτά ταυτοποιήθηκαν οι 12.



Εικόνα 44. Ηλεκτροφόρηση πηκτικής δειγμάτων 10% (στήλη 2), 20% (στήλη 3) και 30% PEG (στήλη 4) των εμπλουτισμένων σε φωτόςστημα Ι μεμβρανών. Με αριθμούς φαίνονται οι ζώνες που αποκόπηκαν.

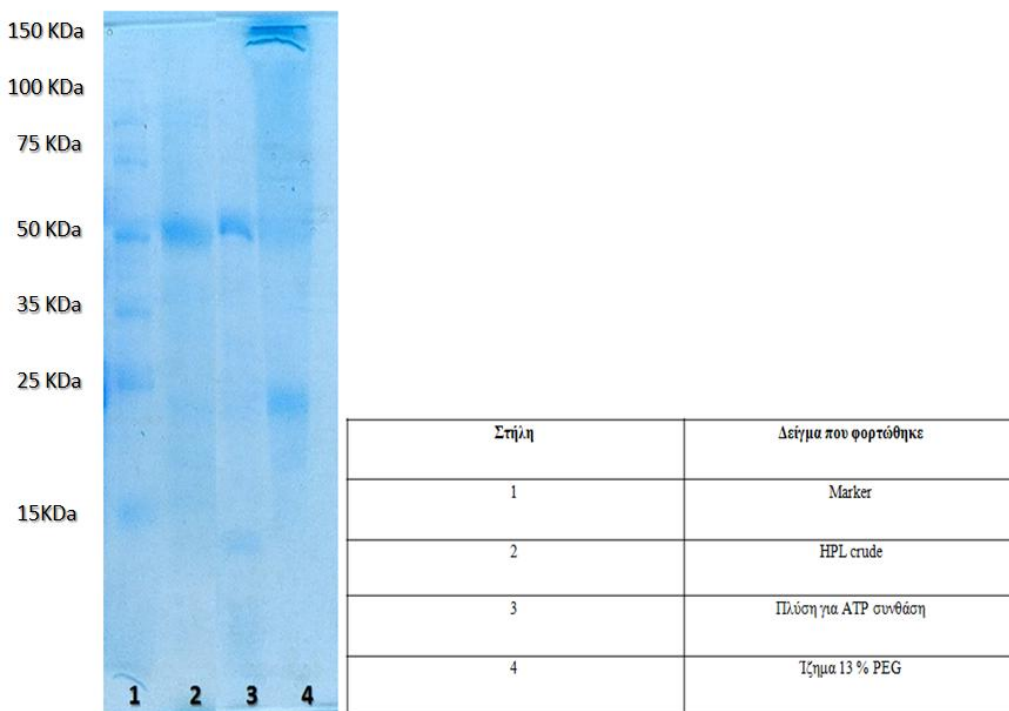
Spot number	Identified proteins	Accession number	Mascot Score	Protein MW
1	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	P10871	94	51811
2	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P00875	203	53220
	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	P10871	77	51811
3	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P00875	167	53220
5	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P00875	255	53220
	ATP synthase subunit beta	P00825	115	53768
6	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase	P05414	134	40317
	Apocytochrome f	P16013	90	35411
7	Apocytochrome f	P16013	117	35411
9	Transketolase	O20250	233	80744
10	Ribulose biphosphate	P00875	84	53220

	carboxylase large chain			
	ATP synthase subunit beta	P00825	60	53768
11	Phosphoglycerate kinase	P29409	162	45658
13	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P12359	459	35377
14	Oxygen-evolving enhancer protein 1	P12359	459	35377
15	Chlorophyll A-B binding protein	F2Z293	135	26752.00

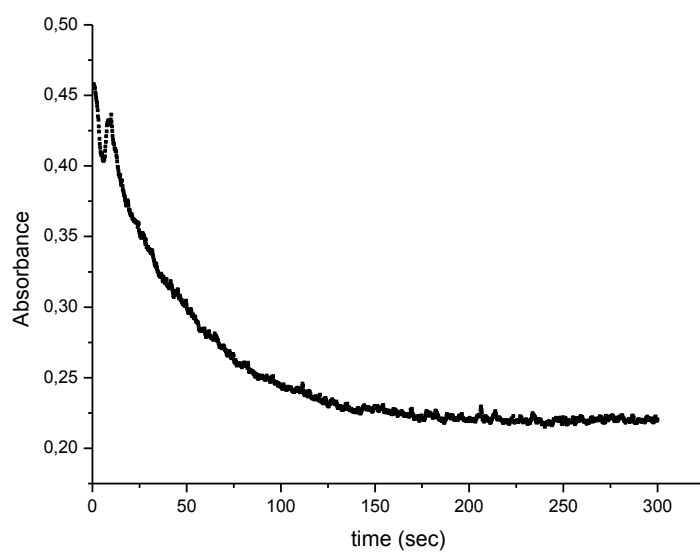
4.4. Απομόνωση HPL από σπανάκι

4.4.1. Ηλεκτροφόρηση- Μελέτη ενεργότητας

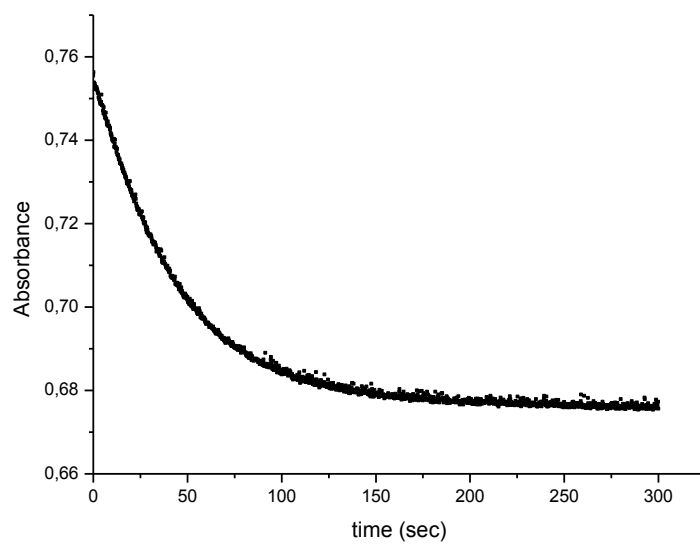
Έγιναν μελέτες για ενεργότητα στα δείγματα με την κατεργασία με PEG και το μόνο ενεργό δείγμα ήταν το ίζημα από 30 % PEG και το υπερκείμενο από το βήμα 15 (HPL crude) στο πρωτόκολλο της απομόνωσης όπως φαίνεται και στα διαγράμματα στις εικόνες 51, 52 αντίστοιχα. Η ηλεκτροφόρηση πηκτής των δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 50.



Εικόνα 45. Ηλεκτροφόρηση πηκτής από απομόνωση HPL από σπανάκι.

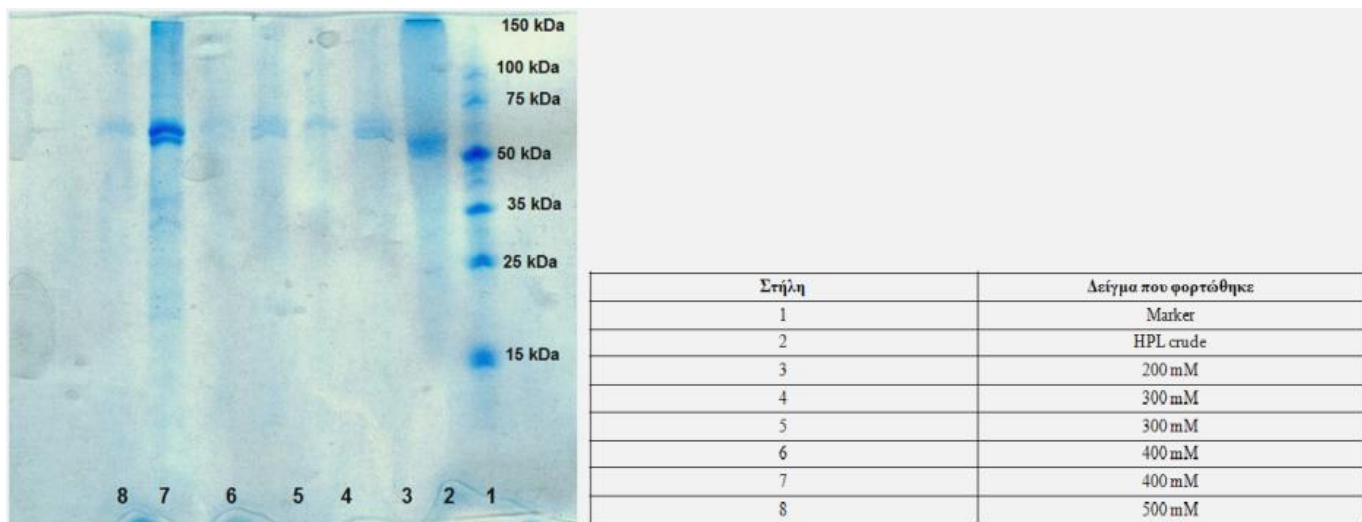


Εικόνα 46. Διάγραμμα κινητικής ιζήματος 30% PEG. Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

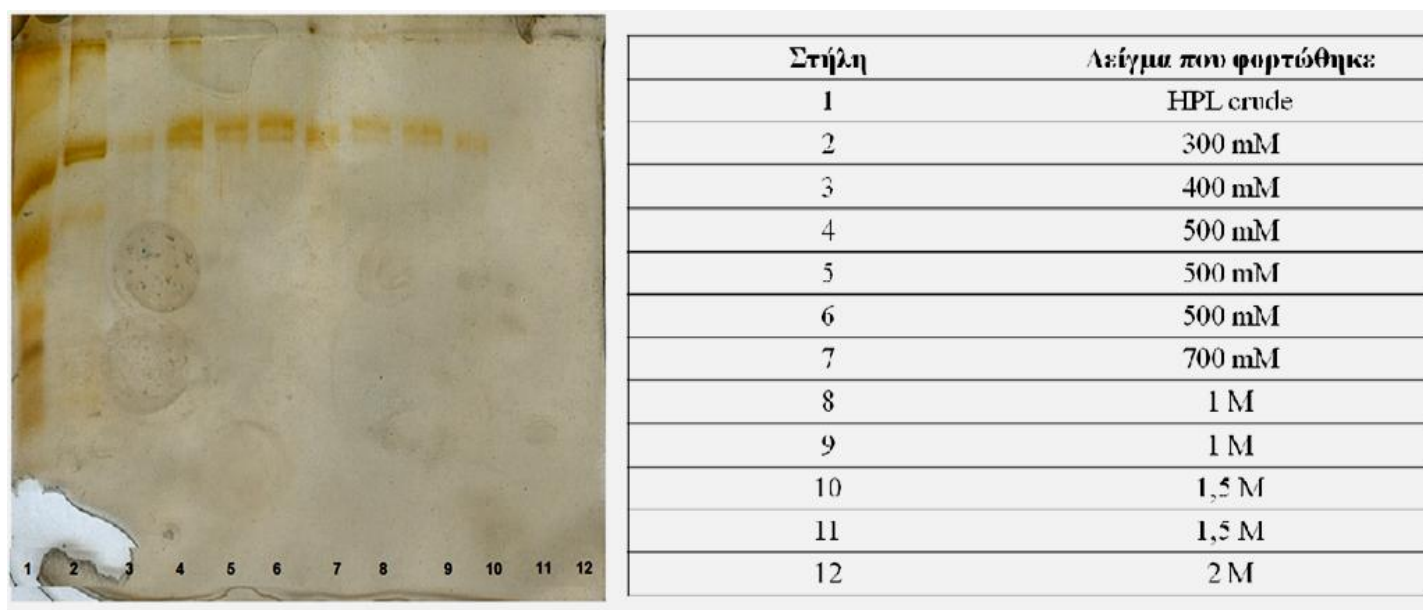


Εικόνα 47. Διάγραμμα κινητικής υπερκειμένου από το βήμα 15 (HPL crude). Η μέτρηση έγινε στα 234 nm.

Έπειτα το δείγμα πέρασε από στήλη ανταλλαγής ιόντων για την απομόνωση της HPL. Στις εικόνες 53, 54 φαίνονται τα δείγματα έκλυσης από τη στήλη χωρίς και με τις εκπλύσεις για την απομάκρυνση της ATP συνθάσης, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε η HPL εκλύεται με 500 mM KCl. Τα δείγματα που εκλούστηκαν από τη στήλη δεν εμφάνισαν ενεργότητα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι το ένζυμο απενεργοποιείται τη στιγμή που περνάει από τη στήλη.



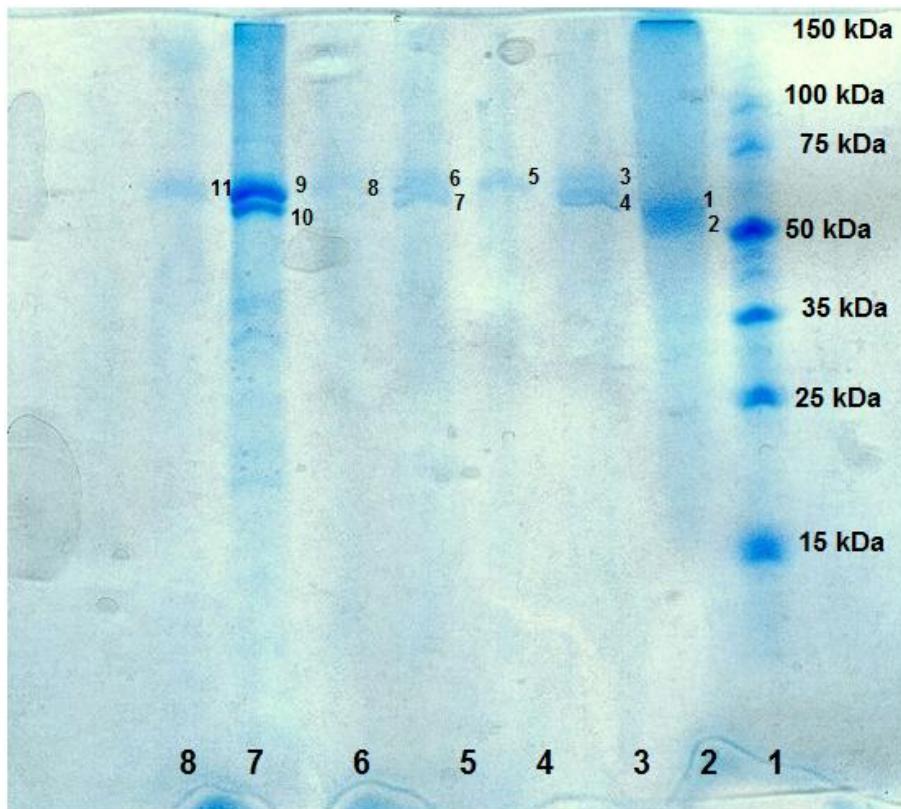
Εικόνα 48. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων από κολόνα του δείγματος HPL crude χωρίς τις πλύσεις.



Εικόνα 49. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων από κολόνα του δείγματος HPL crude με τις πλύσεις.

4.4.2. Πρωτεϊνική ανάλυση με MALDI TOF/TOF MS -Δείγματα έκλουσης από κολώνα χωρίς πλύσεις

Στην εικόνα 55 εμφανίζονται οι ζώνες των δειγμάτων έκλουσης από τη στήλη που αποκόπηκαν και αναλύθηκαν με φασματοσκοπία MALDI TOF MS/MS. Στη στήλη 1 φαίνεται ο μάρτυρας, στη στήλη 2 το δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη δηλαδή το δείγμα HPL crude, στη στήλη 3 η έκλουση από τη στήλη με 200 mM KCl, στις στήλες 4 και 5 η έκλουση με 300 mM KCl, στις στήλες 6 και 7 η έκλουση με 400 mM KCl και στη στήλη 8 η έκλουση με 500 mM KCl όπου και αναμένεται η έκλουση της HPL. Στην πηκτή φορτώθηκαν τα κλάσματα της στήλης του δείγματος HPL crude χωρίς τις πλύσεις. Αποκόπηκαν συνολικά 11 πρωτεϊνικές ζώνες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν μόνο οι 7. Οι υπόλοιπες 4 δεν ταυτοποιήθηκαν.

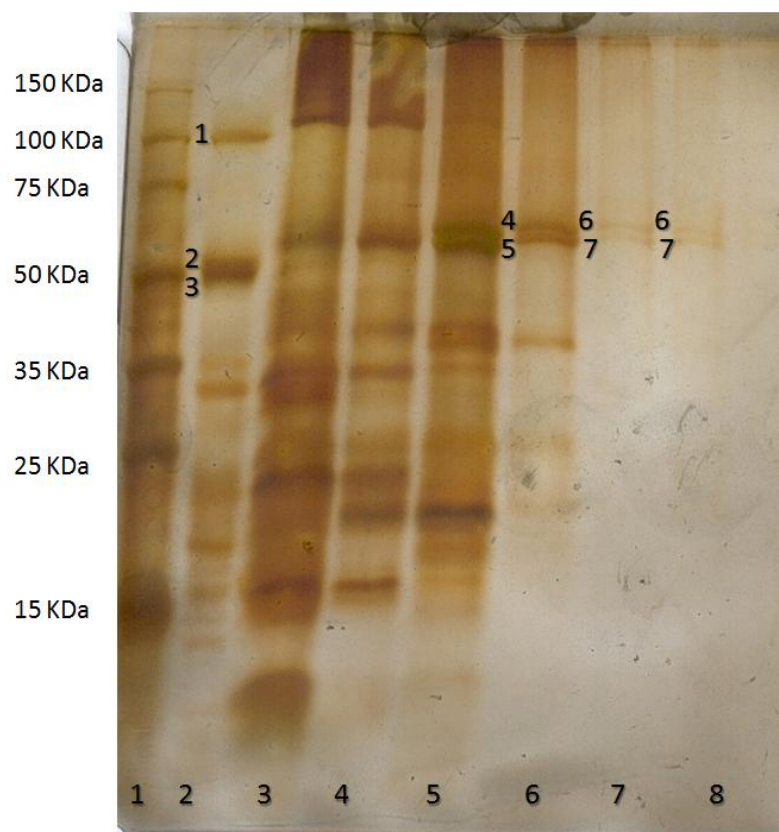


Εικόνα 50. Ηλεκτροφόρηση πηκτής κλασμάτων από στήλη του δείγματος HPL crude χωρίς τις πλύσεις. Με αριθμούς φαίνονται οι ζώνες που αποκόπηκαν.

Spot number	Identified proteins	Accession number	Protein MW
1	ATP synthase subunit alpha	P06450	55474
2	ATP synthase subunit beta	P00825	53768
4	ATP synthase subunit beta	P00825	53768
6	ATP synthase subunit alpha	P06450	55474
7	ATP synthase subunit beta	P00825	53768
9	ATP synthase subunit alpha	P06450	55474
10	ATP synthase subunit beta	P00825	53768

4.4.3. Πρωτεϊνική ανάλυση με MALDI TOF/TOF MS -Δείγματα έκλουσης από κολώνα με πλύσεις

Στην εικόνα 56 εμφανίζονται οι ζώνες από τα δείγματα έκλουσης από τη στήλη που αποκόπηκαν και αναλύθηκαν με φασματοσκοπία MALDI TOF/TOF MS. Στη στήλη 1 φαίνεται ο μάρτυρας, στη στήλη 2 το δείγμα που φορτώθηκε στην στήλη δηλαδή το δείγμα HPL crude, στη στήλη 3 η έκλουση από τη στήλη με 100 mM KCl, στη στήλη 4 η έκλουση με 200 mM KCl, στη στήλη 5 η έκλουση με 300 mM KCl, στη στήλη 6 η έκλουση με 400 mM KCl και στις στήλες 7 και 8 η έκλουση με 500 mM KCl όπου και αναμένεται η έκλουση της HPL. Στην πηκτή φορτώθηκαν τα κλάσματα έκλουσης της στήλης του δείγματος HPL crude μετά από τις πλύσεις για την απομάκρυνση της ATP συνθάσης και της RuBisCo. Αποκόπηκαν συνολικά 7 πρωτεϊνικές ζώνες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν οι 6.



Εικόνα 51. Ηλεκτροφόρηση πηκτής κλασμάτων από στήλη του δείγματος HPL crude με πλύσεις. Με αριθμούς φαίνονται οι ζώνες που αποκόπηκαν.

Spot number	Identified proteins	Accession number	Mascot Score	Protein MW
2	ATP synthase subunit alpha	P06450	211	55474
3	ATP synthase subunit beta	P00825	78	53768
4	ATP synthase subunit alpha	P06450	234	55474
5	ATP synthase subunit beta	P00825	360	53768
6	ATP synthase subunit alpha	P06450	147	55474
7	ATP synthase subunit beta	P00825	61	53768

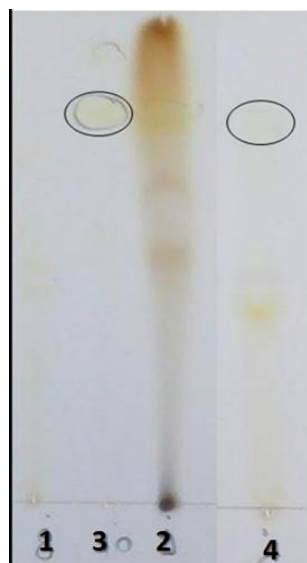
4.4.4. Ένδειξη παρουσίας HPL-Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη

Χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο από το βήμα 15 (HPL crude) (4) , το οποίο ήταν και το μόνο που εμφάνισε ενεργότητα για ανίχνευση των δύο κύριων προϊόντων της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο. Το δείγμα εμφάνισε σημείο με το ίδιο RF με τις εμπορικές αλδεύδες στην πλάκα TLC. Ως τυφλά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές εξανάλη (3) και εξανάλη (2) καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα όπου έγιναν οι κινητικές με ποσότητα υποστρώματος (1).

Με εκχύλιση του σημείου με μεθανόλη δεν επιτεύχθηκε η λήψη ικανοποιητικού φάσματος ορατού-υπεριώδους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα προϊόντα που σχηματίστηκαν να είναι πολύ αραιά.



Εικόνα 52. Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη στο κλάσμα HPL crude.



Εικόνα 53. TLC - Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη

5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην εργασία αυτή επιχειρήθηκε ο εντοπισμός του ενζύμου της HPL από σπανάκι. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η HPL είναι μεμβρανική πρωτεΐνη στα περισσότερα φυτά και στο σπανάκι γι αυτό το λόγο απομονώθηκαν διαφορετικές μεμβράνες των χλωροπλαστών και έγινε έλεγχος για την παρουσία του ενζύμου. Έπειτα επιχειρήθηκε η απομόνωση του ενζύμου σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Matsui et.al.

Οι Μελέτες που έγιναν σε κάθε κλάσμα που απομονώθηκε βασίστηκαν στον άξονα:

- 1) Μελέτη κινητικής
- 2) Ηλεκτροφόρηση PAGE-SDS
- 3) Μελέτη ανίχνευσης προϊόντων

Αρχικά, απομονώθηκαν ολόκληροι χλωροπλάστες οι οποίοι ήταν ενεργοί με το υπόστρωμα της HPL. Έπειτα απομονώθηκαν οι εξωτερικές μεμβράνες των χλωροπλαστών (envelope membranes) και έγινε μελέτη της ενεργότητας τους. Τα δείγματα δεν ήταν ενεργά γι' αυτό και στη συνέχεια απομονώθηκαν θυλακοειδή, τα οποία έδειξαν ενεργότητα. Επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανών σε φωτοσύστημα I καθώς και εμπλουτισμένων μεμβρανών σε φωτοσύστημα II. Ενεργότητα εμφάνισαν μόνο οι εμπλουτισμένες μεμβράνες σε φωτοσύστημα I, οι οποίες υπέστησαν επιπλέον κλασμαματοποίηση των πρωτεϊνών με PEG σε συγκεντρώσεις 10%, 20%, 30% και 50%. Όλα τα κλάσματα PEG ήταν ενεργά εκτός από το 50 % PEG.

Όπως αναφέρθηκε και στη θεωρία το υπόστρωμα 13-HPOD αποτελεί υπόστρωμα και για άλλα 6 ένζυμα που ανήκουν στο ίδιο μονοπάτι. Οπότε μόνο η μείωση της απορρόφησης - συγκέντρωσης του υποστρώματος με την παρουσία των δειγμάτων δεν αποτελεί ένδειξη για την παρουσία της HPL. Για το λόγο αυτό έγινε ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο στα κλάσματα που έδειξαν ενεργότητα. Με τη διαδικασία ανίχνευσης των αλδευδών με 2,4 δινιτροφαινυλδραζίνη φάνηκε ότι σχηματίζονται αλδεύδες στα δείγματα των θυλακοειδών πριν και μετά τις εκπλύσεις, των εμπλουτισμένων σε φωτοσύστημα I μεμβρανών και στο κλάσμα με 20% PEG.

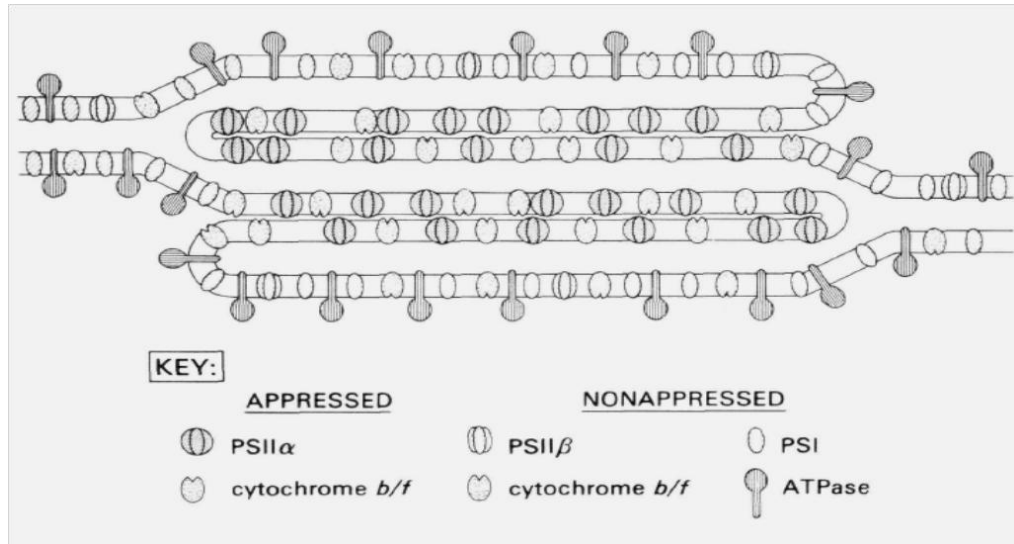
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μοριακό βάρος της HPL αναμένεται από 62-48 kDa. Σύμφωνα και με το πρωτόκολλο απομόνωσης από φύλλα τσαγιού των Matsui et.al. το ένζυμο έχει μοριακό βάρος 55 kDa. Όλα τα παραπάνω ενεργά δείγματα εμφάνισαν στίγμα στη πηκτή ηλεκτροφόρησης σε αυτή την περιοχή. Όμως όταν τα στίγματα αυτά αποκόπηκαν, επεξεργάστηκαν με θρυψίνη και ταυτοποιήθηκαν με MALDI TOF/TOF MS έδειξαν με αρκετά καλό σκορ ότι εκεί βρίσκονται οι α και β υπομονάδες της ATP συνθάσης και η μεγάλη αλυσίδα της RuBisCo. Παρά τις εκπλύσεις που έγιναν για την απομάκρυνση αυτών των πρωτεϊνών, δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση του ενζύμου της HPL με MALDI TOF/TOF MS. Επίσης, η HPL από σπανάκι δεν έχει καταχωρηθεί σε κάποια τράπεζα δεδομένων από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των δειγμάτων, οπότε έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης της με ομολογία με άλλα πράσινα φυτά, γεγονός που δυσχεραίνει περισσότερο την ταυτοποίηση της.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η ένωση μπλε του μεθυλενίου η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μειώνει τη δράση της HPL. Στην παρούσα εργασία φάνηκε πως η ένωση αυτή αναστέλλει την κατανάλωση του υποστρώματος κατά 50% περίπου. Αυτό αποτελεί μία ένδειξη για τη δράση της HPL.

Συνεπώς, τα δείγματα ενώ εμφανίζουν ενεργότητα και ανιχνεύονται τα προϊόντα με τη μελέτη ανίχνευσης με 2,4 δινιτρο-φαινυλδραζίνη, δεν είναι εφικτή η ταυτοποίηση του ενζύμου με MALDI TOF/TOF MS. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι η ποσότητα του ενζύμου είναι αρκετή για να καταλύσει την αντίδραση αλλά πολύ μικρή ώστε να ταυτοποιηθεί. Επίσης, η ποσότητα της ATP-συνθάσης στη φύση είναι πολύ μεγάλη και παρά τις πλύσεις, όπου απομακρύνεται ένα μεγάλο ποσοστό της, είναι δύσκολο να απομακρυνθεί τελείως. Έτσι επικαλύπτει την HPL στις αναλυτικές μεθόδους δυσκολεύοντας ακόμα περισσότερο την ταυτοποίηση της. Επιπλέον, η αμινοξική αλληλουχία της HPL από σπανάκι δεν είναι γνωστή και καταχωρημένη στις πρωτεομικές βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση. Ένας τρόπος για την ταυτοποίηση της είναι με ομολογία με άλλα φυτά των οποίων η αμινοξική αλληλουχία της HPL έχει βρεθεί και καταχωρηθεί. Όμως αυτό δυσκολεύει ακόμα περισσότερο την ταυτοποίηση του ενζύμου.

Με βάση λοιπόν τα πειράματα για την ενεργότητα της HPL, τις μελέτες ανίχνευσης των προϊόντων καθώς και τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία μάζας για την ανίχνευση των προϊόντων το ένζυμο πιθανόν να βρίσκεται στις θυλακοειδής μεμβράνες κοντά στο φωτοσύστημα I, δηλαδή στα περιθώρια

(margins) και τις επίπεδες μη- συμπίεσμένες (planar non appressed) μεμβράνες θυλακοειδών που επικοινωνούν με το στρώμα, οι οποίες φαίνονται στην εικόνα 59[5].



Εικόνα 54. Εμπλουτισμένες σε φωτοσυστήματος II μεμβράνες και εμπλουτισμένες σε φωτοσυστήματος I μεμβράνες.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο χώρος δράσης της HPL στους χλωροπλάστες. Με βάση τα αποτελέσματα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Με βάση τις μελέτες κινητικής, ενεργότητα εμφάνισαν τα δείγματα των ολόκληρων χλωροπλαστών, οι θυλακοειδής μεμβράνες και οι εμπλουτισμένες σε φωτόςστημα I μεμβράνες. Οι εξωτερικές περιβάλλουσες μεμβράνες των χλωροπλαστών (envelope membranes) και οι εμπλουτισμένες σε φωτόςστημα II μεμβράνες δεν εμφάνισαν ενεργότητα. Το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με αυτό που προέκυψε από τη Φαρμάκη και την ομάδα της.
- Από τη μελέτη ανίχνευσης των προϊόντων της αντίδρασης που καταλύει η HPL με τη 2,4-Dinitrophenylhydrazine, τα δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκαν τα προϊόντα είναι τα θυλακοειδή πριν και μετά τις εκπλύσεις, οι εμπλουτισμένες σε φωτόςστημα I μεμβράνες και το κλάσμα με 20% PEG. Επίσης, τα προϊόντα ανιχνεύτηκαν και στο δείγμα HPL crude από το πρωτόκολλο για την απομόνωση της HPL.
- Δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση του ενζύμου με φασματομετρία μάζας MALDI TOF MS/MS. Στο μοριακό βάρος που αναμένεται η HPL ταυτοποιήθηκαν οι υπομονάδες α και β της ATP-συνθάσης και η μεγάλη υπομονάδα της RubiSCo. Με τις πλύσεις που έγιναν απομακρύνθηκε η μεγάλη υπομονάδα της RubiSCo όμως δεν κατέστη δυνατή η ολική απομάκρυνση της ATP συνθάσης καθώς παρέμειναν οι υπομονάδες α και β. Η ATP-συνθάση πιθανόν επικαλύπτει την HPL η οποία υπάρχει σε ικανοποιητική ποσότητα ώστε να εμφανίσει ενεργότητα αλλά σε πολύ μικρή ώστε να ταυτοποιηθεί με φασματομετρία μάζας MALDI TOF MS/MS.
- Με βάση τις μελέτες κινητικής και ανίχνευσης των προϊόντων αλλά και την ανίχνευση των προϊόντων με φασματομετρία μάζας LCQ καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η HPL βρίσκεται στις εμπλουτισμένες σε φωτόςστημα I μεμβράνες, δηλαδή στα περιθώρια (margins) και στις επίπεδες μη-συμπιεσμένες (planar nonappressed) μεμβράνες θυλακοειδών του στρώματος.

- Η ένωση Methylene blue σε συγκέντρωση 2mM αναστέλλει τη δράση της HPL κατά 50% περίπου, όπως δείχνουν οι δοκιμές κινητικής. Πράγμα το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία και αποτελεί μία ένδειξη ότι η μείωση της απορρόφησης του υποστρώματος οφείλεται στη δράση της HPL.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Inoue, K., *Emerging roles of the chloroplast outer envelope membrane*. Trends in Plant Science, 2011. **16**(10): p. 550-557.
2. Heldt, H. and F. Sauer, *The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport*. Biochimica et Biophysica Acta 1971. **234**(1): p. 83-91
3. Inoue, K., *The chloroplast outer envelope membrane: The edge of light and excitement*. Journal of Integrative Plant Biology, 2007. **49**(8): p. 1100-1111.
4. Wolfe, S.L., *Biology of the cell*. Wadsworth Publishing Company, Inc., 1972: p. 130.
5. Anderson, J.M., *The Grana Margins of Plant Thylakoid Membranes*. Physiologia Plantarum, 1989. **76**(2): p. 243-248.
6. Andersson, B. and J.M. Anderson, *Lateral Heterogeneity in the Distribution of Chlorophyll-Protein Complexes of the Thylakoid Membranes of Spinach-Chloroplasts*. Biochimica et Biophysica Acta, 1980. **593**(2): p. 427-440.
7. Miller, K. and S. LA, *Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions*. J Cell Biol., 1976. **68**(1): p. 30-47.
8. Melis, A. and J.M. Anderson, *Structural and Functional-Organization of the Photosystems in Spinach-Chloroplasts - Antenna Size, Relative Electron-Transport Capacity, and Chlorophyll Composition*. Biochimica et Biophysica Acta, 1983. **724**(3): p. 473-484.
9. Noordermeer, M.A., G.A. Veldink, and J.F.G. Vliegthart, *Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance*. Chembiochem, 2001. **2**(7-8): p. 494-504.
10. Yuanxin, Y., B. Eli, and V.K. Michael, *Chapter 16: Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses*. 2013.
11. Grechkin, A., *Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway*. Progress in Lipid Research, 1998. **37**(5): p. 317-352.
12. Psylinakis, E., E.M. Davoras, N. Ioannidis, M. Trikeriotis, V. Petrouleas, and D.F. Ghanotakis, *Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2001. **1533**(2): p. 119-127.
13. Matsui, K., M. Shibutani, T. Hase, and T. Kajiwara, *Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B)*. FEBS letters, 1996. **394**(1): p. 21-24.
14. Matsui, K., *Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism*. Current Opinion in Plant Biology, 2006. **9**(3): p. 274-280.
15. Grechkin, A.N. and M. Hamberg, *The "heterolytic hydroperoxide lyase" is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal*. Biochimica et Biophysica Acta, 2004. **1636**: p. 47-58.
16. Grechkin, A.N. and e. al., *Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the hemolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals*. Biochimica et Biophysica Acta, 2006. **1761**: p. 1419-1428.
17. Matsui, K., K. Sugimoto, J. Mano, R. Ozawa, and J. Takabayashi, *Differential Metabolisms of Green Leaf Volatiles in Injured and Intact Parts of a Wounded Leaf Meet Distinct Ecophysiological Requirements*. Plos One, 2012. **7**(4).
18. Fauconnier, M.L. and M. Marlier, *Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A review*. Grasas Y Aceites, 1997. **48**(1): p. 30-37.
19. Kim, I.S. and W. Grosch, *Partial-Purification and Properties of a Hydroperoxide Lyase from Fruits of Pear*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981. **29**(6): p. 1220-1225.

20. Tressl, R. and F. Drawert, *Biogenesis of Banana Volatiles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1973. **21**(4): p. 560-565.
21. Vick, B.A. and D.C. Zimmerman, *Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase in Germinating Watermelon Seedlings*. Plant Physiology, 1976. **57**(5): p. 780-788.
22. Galliard, T. and D.R. Philips, *The enzymic cleavage of linoleic acid to C9 carbonyl fragments in extracts of cucumber (Cucumis sativus) fruit and the possible role of lipoxygenase*. Biochim. Biophys. Acta. , 1976(431): p. 278-287
23. Galliard, T., J.A. Matthew, A.J. Wright, and M.J. Fishwick, *The enzymic breakdown of lipids to volatile and nonvolatile carbonyl fragments in disrupted tomato fruits*. J. Sci. Food Agric. , 1977(28): p. 863-868
24. Matthew, J.A. and T. Galliard, *Enzymic Formation of Carbonyls from Linoleic-Acid in Leaves of Phaseolus-Vulgaris*. Phytochemistry, 1978. **17**(6): p. 1043-1044.
25. Sekiya, J., T. Kajiwara, and A. Hatanaka, *Volatile C-6 aldehyde formation via hydroperoxides from C-18 unsaturated fatty acids in etiolated alfalfa and cucumber seedlings*. Aghc. Biol. Chem., 1979. **48**(969-980).
26. Schreier, P. and G. Lorenz, *Separation, Partial-Purification and Characterization of a Fatty-Acid Hydroperoxide Cleaving Enzyme from Apple and Tomato Fruits*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 1982. **37**(3-4): p. 165-173.
27. Hatanaka, A., T. Kajiwara, J. Sekiya, and S. Inoue, *Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-1- hydroperoxilinolenic acid in tea leaves*. Phytochemistry 1982(21): p. 13-17.
28. Sekiya, J., S. Tanigawa, T. Kajiwara, and A. Hatanaka, *Fatty acid hydroperoxide lyase in tobacco cells cultured in vitro*. Phytochemistry 1984(23): p. 2439-2443
29. Matoba, T., H. Hidaka, K. Kitamura, N. Kaizuma, and M. Kito, *Contribution of hydroperoxide lyase activity to n-hexanal formation in soybean*. J. Agric. Food Chem. , 1985(33): p. 856-858.
30. Bate, N.J., S. Sivasankar, C. Moxon, J.M.C. Riley, J.E. Thompson, and S.J. Rothstein, *Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible*. Plant Physiology, 1998. **117**(4): p. 1393-1400.
31. Vick, B.A. and D.C. Zimmerman, *Pathways of Fatty-Acid Hydroperoxide Metabolism in Spinach Leaf Chloroplasts*. Plant Physiology, 1987. **85**(4): p. 1073-1078.
32. Fauconnier, M.L., A.G. Perez, C. Sanz, and M. Marlier, *Purification and characterization of tomato leaf (Lycopersicon esculentum Mill.) hydroperoxide lyase*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(11): p. 4232-4236.
33. Shibata, Y., K. Matsui, T. Kajiwara, and A. Hatanaka, *Purification and Properties of Fatty-Acid Hydroperoxide Lyase from Green Bell Pepper Fruits*. Plant and Cell Physiology, 1995. **36**(1): p. 147-156.
34. Olias, J.M., J.J. Rios, M. Valle, R. Zamora, L.C. Sanz, and B. Axelrod, *Fatty-Acid Hydroperoxide Lyase in Germinating Soybean Seedlings*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990. **38**(3): p. 624-630.
35. Nam, W., *Cytpchrome P450*. Comprehensive Coordination Chemistry II, 2004: p. 281-307.
36. Andrianarison, R.H., J.L. Beneytout, and M. Tixier, *An Enzymatic Conversion of Lipoxygenase Products by a Hydroperoxide Lyase in Blue-Green-Algae (Oscillatoria Sp)*. Plant Physiology, 1989. **91**(4): p. 1280-1287.
37. Vick, B.A. and D.C. Zimmerman, *Metabolism of Fatty-Acid Hydroperoxides by Chlorella-Pyrenoidosa*. Plant Physiology, 1989. **90**(1): p. 125-132.
38. Gardner, H.W., *Recent Investigations into the Lipoxygenase Pathway of Plants*. Biochimica et Biophysica Acta, 1991. **1084**(3): p. 221-239.

39. Blee, E. and J. Joyard, *Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides*. Plant Physiology, 1996. **110**(2): p. 445-454.
40. Froehlich, J.E., C.G. Wilkerson, W.K. Ray, R.S. McAndrew, K.W. Osteryoung, D.A. Gage, and B.S. Phinney, *Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis*. Journal of Proteome Research, 2003. **2**: p. 413- 425.
41. Ferro, M., D. Salvi, S. Brugiare, S. Miras, S. Kowalski, M. Louwagie, J. Garin, J. Joyard, and N. Rolland, *Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana*. Molecular Cell Proteomics, 2003. **2**: p. 325–345.
42. Peltier, J.B., A.J. Ytterberg, Q. Sun, and K.J. Wijk, *New functions of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana revealed by a simple, fast and versatile fractionation strategy*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**: p. 49367–49383.
43. Gotzschmidt, E.M., M. Wenzel, and P. Schreier, *C-6-Volatiles in Homogenates from Green Leaves - Localization of Hydroperoxide Lyase Activity*. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 1986. **19**(2): p. 152-155.
44. Hatanaka, A. and e. al., *Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-1-hydroperoxilinolenic acid in tea leaves*. Phytochemistry, 1982(21): p. 13-17.
45. A, L. and F. I., *Lipoxygenases: occurrence, function and catalysis*. . Journal of Plant Physiology, 2006. **163**: p. 348–357.
46. Farmaki, T., M. Sanmartin, P. Jimenez, M. Paneque, C. Sanz, G. Vancanneyt, J. Leon, and J.J. Sanchez-Serrano, *Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts*. Journal of Experimental Botany, 2007. **58**(3): p. 555-568.
47. Matsui, K., H. Toyota, T. Kajiwara, T. Kakuno, and A. Hatanaka, *Fatty-Acid Hydroperoxide Cleaving Enzyme, Hydroperoxide Lyase, from Tea Leaves*. Phytochemistry, 1991. **30**(7): p. 2109-2113.
48. Nakashima, A., S.H. von Reuss, H. Tasaka, M. Nomura, S. Mochizuki, Y. Iijima, K. Aoki, D. Shibata, W. Boland, J. Takabayashi, and K. Matsui, *Traumatolipin- and Dinortraumatolipin-containing Galactolipids in Arabidopsis THEIR FORMATION IN TISSUE-DISRUPTED LEAVES AS COUNTERPARTS OF GREEN LEAF VOLATILES*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(36): p. 26078-26088.
49. Noordermeer, M.A., G.A. Veldink, and J.F.G. Vliegthart, *Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z : 2E-enal isomerase*. FEBS letters, 1999. **443**(2): p. 201-204.
50. Salas, J.J. and J. Sanchez, *Hydroperoxide lyase from olive (Olea europaea) fruits*. Plant Science, 1999. **143**(1): p. 19-26.
51. Lanciotti, R., A. Gianotti, F. Patrignani, N. Belletti, M.E. Guerzoni, and F. Gardini, *Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits*. Trends in Food Science & Technology, 2004. **15**(3-4): p. 201-208.
52. Kalua, C.M., M.S. Allen, D.R.B. Jr, A.G. Bishop, P.D. Prenzler, and K. Robards, *Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review*. Food Chemistry, 2007. **100**: p. 273–286.
53. Wan, X.H., S.X. Chen, C.Y. Wang, R.R. Zhang, S.Q. Cheng, H.W. Meng, and X.Q. Shen, *Isolation, Expression, and Characterization of a Hydroperoxide Lyase Gene from Cucumber*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(11): p. 22082-22101.
54. Scala, A., S. Allmann, R. Mirabella, M.A. Haring, and R.C. Schuurink, *Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(9): p. 17781-811.

55. Newberne, P., R.L. Smith, J. Doull, V.J. Feron, J.I. Goodman, I.C. Munro, P.S. Portoghese, W.J. Waddell, B.M. Wagner, C.S. Weil, T.B. Adams, and J.B. Hallagan, *GRAS flavoring substances 19*. Food Technology, 2000. **54**(6): p. 66-+.
56. Fukushige, H. and D.F. Hildebrand, *Watermelon (Citrullus lanatus) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves*. J. J. Agric. Food Chem., 2005. **53**(6): p. 2046-2051.
57. Schrader, J., M.M.W. Etschmann, D. Sell, J.M. Hilmer, and J. Rabenhorst, *Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds current industrial processes and future prospects*. Biotechnology Letters, 2004. **26**(6): p. 463-472.
58. Whitehead, I.M., B.L. Muller, and C. Dean, *Industrial Use of Soybean Lipoxygenase for the Production of Natural Green Note Flavor Compounds*. Cereal Foods World, 1995. **40**(4): p. 193-&.
59. Hubert, J., Z. Munzbergova, M. Nesvorna, P. Poltronieri, and A. Santino, *Acaricidal effects of natural six-carbon and nine-carbon aldehydes on stored-product mites*. Experimental and Applied Acarology, 2008. **44**(4): p. 315-321.
60. Gigot, C., M. Ongena, M.-L. Fauconnier, J.-P. Wathelet, P.D. Jardin, and P. Thonart, *The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 2010. **14**(3): p. 451-460.
61. Drouet, P., D. Thomas, and M.D. Legoy, *Production of 13 (s)-hydroperoxy-9 (z), 11 (e)-octadecadienoic acid using soybean lipoxygenase 1 in a biphasic octanewater system*. Tetrahedron Lett., 1994. **35**(23): p. 3923-3926.
62. Fauconnier, M.L. and M. Marlier, *An efficient procedure for the production of fatty acid hydroperoxides from hydrolyzed flax seed oil and soybean lipoxygenase*. Biotechnology Techniques, 1996. **10**(11): p. 839-844.
63. Husson, F. and J.M. Belin, *Purification of hydroperoxide lyase from green bell pepper (Capsicum annuum L.) fruits for the generation of C6-aldehydes in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(7): p. 1991-1995.
64. Almosnino, A.M., M. Bensoussan, and J.M. Belin, *Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomace enzyme system. Factors influencing the production of aroma compounds*. Food Chemistry, 1996. **55**(4): p. 327-332.
65. Cass, B.J., F. Schade, C.W. Robinson, J.E. Thompson, and R.L. Legge, *Production of tomato flavor volatiles from a crude enzyme preparation using a hollow-fiber reactor*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **67**(3): p. 372-377.
66. Kaewthong, W., S. Sirisansaneeyakul, P. Prasertsan, and A. H-Kittikun, *Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase*. Process Biochemistry, 2005. **40**(5): p. 1525-1530.
67. Kermasha, S., N. Dioum, B. Bisakowski, and M. Vega, *Biocatalysis by immobilized lipoxygenase in a ternary micellar system*. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2002(19): p. 305-317.
68. Matsui, K., C. Miyahara, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, and T. Kajiwara, *Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: Cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in Escherichia coli*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000. **64**(6): p. 1189-1196.
69. Noordermeer, M.A., D. van, A. J. H., S.C.M. Smeekens, G.A. Veldink, and J.F.G. Vliegthart, *Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(9): p. 2473-2482.
70. Atwal, A.S., B. Bisakowski, S. Richard, N. Robert, and B. Lee, *Cloning and secretion of tomato hydroperoxide lyase in Pichia pastoris*. Process Biochemistry, 2005. **40**(1): p. 95-102.

71. Bourel, G., J.M. Nicaud, B. Nthangeni, P. Santiago-Gomez, J.M. Belin, and F. Husson, *Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in Yarrowia lipolytica and biogenesis of volatile aldehydes*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. **35**(4): p. 293-299.
72. Arnon, D.I., *Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris*. *Plant Physiology*, 1949. **24**(1): p. 1-15.
73. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
74. Cline, K., J. Andrews, B. Mersey, E.H. Newcomb, and K. Keegstra, *Separation and Characterization of Inner and Outer Envelope Membranes of Pea-Chloroplasts*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1981. **78**(6): p. 3595-3599.
75. Froehlich, J.E., A. Itoh, and G.A. Howe, *Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope*. *Plant Physiology*, 2001. **125**(1): p. 306-317.
76. Andreasson, E., P. Svensson, C. Weibull, and P.A. Albertsson, *Separation and Characterization of Stroma and Grana Membranes - Evidence for Heterogeneity in Antenna Size of Both Photosystem-I and Photosystem-II*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988. **936**(3): p. 339-350.
77. Berthold, D.A., G.T. Babcock, and C.F. Yocum, *A Highly Resolved, Oxygen-Evolving Photosystem-II Preparation from Spinach Thylakoid Membranes - Electron-Paramagnetic-Res and Electron-Transport Properties*. *FEBS letters*, 1981. **134**(2): p. 231-234.
78. Matsui, K., H. Toyota, T. Kajiwara, T. Kakuno, and A. Hatanaka, *Fatty Acid Hydroperoxide Cleaving Enzyme, Hydroperoxide Lyase, From Tea Leaves*. *Phytochemistry*, 1991. **30**(7): p. 2109-2113.
79. Kieselbach, T., A. Hagman, B. Andersson, and W.P. Schroder, *The thylakoid lumen of chloroplasts - Isolation and characterization*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(12): p. 6710-6716.
80. Ingham, K.C., *Precipitation of Proteins with Polyethylene-Glycol*. *Methods in Enzymology*, 1990. **182**: p. 301-306.
81. Dennison, C., *A Guide to Protein Isolation*. Kluwer Academic Publishers, 2002.
82. Williams, A., K. Taylor, K. Dambuleff, and R.M. Kennedy, *Packing high-performance sepharose ion-exchange media in large-scale, 80-and 120-cm-diameter columns: Robust protocol*. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2000. **219**: p. U191-U191.
83. Schagger, H. and G. Vonjagow, *Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda*. *Analytical Biochemistry*, 1987. **166**(2): p. 368-379.
84. Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P.G. Righetti, *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(9): p. 1327-1333.
85. Rais, I., M. Karas, and H. Schagger, *Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification*. *Proteomics*, 2004. **4**(9): p. 2567-2571.
86. Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, and M. Mann, *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. *Nature Protocols*, 2006. **1**(6): p. 2856-2860.

