

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ SER558ALA ΕΠΙ ΤΗΣ MSN4
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΤΟΥ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΞΕΝΗ ΧΟΥΛΗ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2018

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ SER558ALA ΕΠΙ ΤΗΣ MSN4
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΤΟΥ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE*»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΞΕΝΗ ΧΟΥΛΗ

Εξεταστική Επιτροπή:

Σωτήριος Σπυρίδων Βαμβακάς (επιβλέπων καθηγητής)

Θεόδωρος Βαρζάκας

Ιωακείμ Σπηλιόπουλος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας & Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, του Α.Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου κατά τη χρονική περίοδο Οκτωβρίου του 2015 έως Δεκεμβρίου του 2016 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σωτήρη Βαμβακά.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Βαμβακά, για την υποστήριξη, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας τόσο στην εκτέλεση του πειραματικού της μέρους όσο και στη συγγραφή της αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε για την ενασχόληση μου με ένα τόσο ενδιαφέρον και εξειδικευμένο θέμα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο μου Μαριαλένα Δαμιανάκη για την καλή συνεργασία που είχαμε κατά την πορεία της πειραματικής μελέτης, καθώς και τον Φώτη Γενναίο αλλά και ολόκληρη την ομάδα φοιτητών του κ. Βαμβακά που συνέβαλαν ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η μελέτη.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου καθώς και τους φίλους μου για την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, αλλά και την κατανόηση που έδειξαν τόσο κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και στο σύνολο των χρόνων φοίτησης μου στην Καλαμάτα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες είναι σημαντικές στην βιομηχανία τροφίμων με σημαντικότερη οικονομικά εφαρμογή αυτή του *Saccharomyces cerevisiae* επειδή χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως στην ποτοποιία αλλά και αποτελεί εδώ και χρόνια μοντέλο για την έρευνα μοριακής βιολογίας και γενετικής. Ο ζυμομύκητας αυτός χρησιμοποιείται ευρέως στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών και την παραγωγή διαφόρων άλλων προϊόντων όπως ενζύμων, βιταμινών κ.α. Τα βασικότερα χρήσιμα χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae* είναι ταχεία ανάπτυξη σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, αποτελεσματική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης και μη παραγωγή ανεπιθύμητων αρωμάτων και γεύσεων.

Έτσι η βελτίωση της απόδοσης των ζυμών αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας μέσω της δημιουργίας ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους ζύμης που θα εμφάνιζε καλύτερα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και θα ήταν ανθεκτικότερο στην αιθανόλη, καθώς και σε άλλες αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Όταν το κύτταρο βρεθεί σε κατάσταση stress ο μεταγραφικός παράγοντας Msn4 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες ώστε να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ελέγχει την έκφραση γονιδίων που βοηθούν το κύτταρο να αποκριθεί στο δυσμενές περιβάλλον. Ταυτόχρονα όμως ο έλεγχος της εισόδου της Msn4 στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της Msn4 πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα του κυττάρου.

Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Msn4 με κατάλληλο λογισμικό αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της Msn4 από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 558.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία στελέχους ζύμης τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη Ser558Ala επί του γονιδίου MSN4 και η μετέπειτα μελέτη της

επίδρασης της μετάλλαξης, σε σύγκριση με του αγρίου τύπου, στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress όπως η παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων αιθανόλης προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποκάλυψη του ρόλου του αμινοξέος στη συγκεκριμένη θέση. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη ήταν α) η απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) από κύτταρα ζύμης β) η περεταίρω κατεργασία των δειγμάτων RNA με DNase-I γ) η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με τη μέθοδο της Real-TimePCR.

Λέξεις κλειδιά: Ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, Msn4, κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, αλκοολική ζύμωση, PCR, απάντηση στο stress, μεταγραφικός παράγοντας

ABSTRACT

Yeasts are important in the food industry with major economic implementation of *Saccharomyces cerevisiae* because it has long been used in distillery and also has been a model for the molecular biology and genetic research. Yeast is widely used in fermentation reactions for the production of alcoholic beverages and the production of several other products such as enzymes, vitamins etc. The main useful features of *S. cerevisiae* is its rapid growth in aerobic and anaerobic conditions, efficient production of carbon dioxide and ethanol and non-production of undesirable aromas and flavors.

Thus, improving the efficiency of fermentation is an important research field. One approach to this goal is the creation of genetically modified yeast strains that would show better characteristics during fermentation and would be resistant to ethanol and other adverse conditions during the fermentation.

When the cell is exposed to stress conditions, transcription factor Msn4 is activated via phosphorylation by various protein kinases, in order for it to enter the cell nucleus and control the expression of genes that help the cell in responding to stress. At the same time, the translocation of Msn4 to nucleus is also controlled and inhibited by protein kinase A (PKA) phosphorylation. In silico protein sequence analysis of Msn4 is revealed that the amino acid residue Serine at position 558 is a potential crucial site of phosphorylation by PKA of Msn4.

The purpose of this work is to create yeast strain which carry the mutation Ser558Ala on MSN4 gene and subsequent study of the effect of this mutation, in yeast response to stress conditions such as the presence of various ethanol or glucose concentrations.

The methods that used in the present study was a) isolation of ribonucleic acid (RNA) from yeast cells b) the further treatment of these samples with DNase-I c) the study of the expression levels of specific genes using Real-Time PCR.

Key words: Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Msn4, site-directed mutagenesis, alcohol fermentation, PCR, stress response, transcription factor

Πίνακας Περιεχομένων

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
1.1.	ΟΙ ΖΥΜΕΣ	11
1.2.	ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	11
1.3.	ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ΣΤΙΣ ΕΚΑΣΤΟΤΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	13
1.4.	Ο <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΡΕΣ	15
1.5.	ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΟΦΕΙΛΟΜΕΝΕΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	17
1.5.1.	Η επίδραση της αιθανόλης	17
1.6.	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	19
1.6.1.	Γενικά	19
1.6.2.	Αρχή της μεθόδου	20
1.6.3.	Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω PCR και περιοριστική ενδονουκλεάση <i>Dpn-I</i>	23
1.6.4.	Real-Time Pcr	25
1.6.5.	Στάδια της Real-Time PCR	28
1.6.6.	Χρωστική SYBR green I	29
1.6.7.	Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων	31
1.7.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	31
1.7.1.	Αρχή Λειτουργίας	31
1.7.2.	Παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό μορίων στην ηλεκτροφόρηση	33
1.7.3.	Είδη ηλεκτροφόρησης	34
1.7.4.	Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ζυμομύκητα	35
2.	ΣΚΟΠΟΣ	36
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
3.1.	ΥΛΙΚΑ	38
3.1.1.	Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	46
3.2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ	51
3.2.1.	Παρασκευή gel αγαρόζης 1 % w/v – Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων	51
3.2.2.	Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό	51
3.2.3.	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	53
3.2.4.	Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού	54
3.2.5.	Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (<i>High efficiency transformation of yeast cells</i>)	55
3.2.6.	Μεταφορά αποικιών με την διαδικασία replica	56
3.2.7.	Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης	57
3.2.8.	Καθαρισμός προϊόντων PCR με το kit Gel & PCR clean up	57
3.2.9.	Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E. Coli</i> με το kit Nucleospin plasmid	59
3.2.10.	Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων	60
3.3.	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ	60
3.3.1.	Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιεργειών	60
3.3.2.	Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης	60
3.4.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	61
3.4.1.	Λήψη δειγμάτων για απομόνωση RNA	61
3.4.2.	Απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη	61
3.5.	ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ DNASE-I	63
3.5.1.	Αντιδραστήρια για κατεργασία δειγμάτων με <i>Dnase-I</i>	63
3.5.2.	Διαδικασία απομάκρυνσης της <i>Dnase-I</i> και καθαρισμός του δείγματος	64
3.6.	REAL-TIME PCR	64

4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
4.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ.....	67
4.1.1	Εισαγωγή μετάλλαξης με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης <i>DPNI</i>	67
4.1.2	Ενσωμάτωση γενετικά τροποποιημένου γονιδίου <i>MSN4_558</i> σε κύτταρα ζύμης.....	71
4.2	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ <i>MSN4</i> ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ.....	74
4.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ	77
4.3.1	Καμπύλες ανάπτυξης.....	78
4.4	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC_{50}	79
4.5	REAL TIME PCR.....	81
4.5.1	Απομόνωση <i>RNA</i> από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη.....	81
4.5.2	Κατεργασία δειγμάτων με <i>Dnase-I</i>	82
4.5.3	Μελέτη του μεταλλαγμένου γονιδίου ως προς την έκφραση των γονιδίων με την μέθοδο της <i>Real-Time(RT) PCR</i>	83
4.5.4	Διαδικασία επεξεργασίας υπολογισμών της <i>Real-Time PCR</i>	83
4.5.5	Τα υπό μελέτη γονίδια	84
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1.1: Γενική απεικόνιση της γλυκόλυσης	14
Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση αλκοολικής ζύμωσης (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001).....	14
Εικόνα 1.3 Πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στον <i>S. cerevisiae</i> (Walker, 1998)	19
Εικόνα 1.4: Απεικόνιση σταδίων PCR	20
Εικόνα 1.5: Βασική αρχή PCR.....	21
Εικόνα 1.6: Οι 4 πρώτοι κύκλοι μιας PCR	22
Εικόνα 1.7: Thermal Cycler (Θερμοκυκλοποιητής) συμβατικής PCR.....	22
Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μεταλλαξεγένεσης για διαγραφή τμήματος του κλωνοποιημένου γονιδίου με πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο DpnI και εισαγωγή του σε βακτηριακά κύτταρα <i>E.coli</i>	24
Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση με τον τρόπο που γίνεται η εισαγωγή της μετάλλαξης με την διαγραφή της αλληλουχίας στόχου (Jingetal., 2007).....	25
Εικόνα 1.10: Μηχάνημα Real Time PCR.....	26
Εικόνα 1.11: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης Real-Time PCR	29
Εικόνα 1.12: Συσκευή Ηλεκτροφόρησης	33
Εικόνα 3.1: Μάρτυρες Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest	44
Εικόνα 3.2: Μάρτυρες 1 kbDNALadderRTU	45
Εικόνα 3.3: Πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην μέθοδο της real-time pcr για τα κύτταρα ζύμης w303-1a και του μεταλλαγμένου κυττάρου MSN4_558 για τις συγκεντρώσεις 0% και 6% αιθανόλης για χρονικές περιόδους t=15 min και t=16 h	66
Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της pcr σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το προϊόν της PCR.....	68
Εικόνα 4.2: Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN4 και οι θέσεις πέψης του ενζύμου Dpn-I	69
Εικόνα 4.3: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το πλασμίδιο pUC19-MSN4 και στην θέση 3το προϊόν της PCR ύστερα από πέψη όπου παρατηρούνται διάφορα τμήματα DNA μικρότερου μεγέθους από το κύριο προϊόν της PCR, ως προϊόντα της πέψης.....	70
Εικόνα 4.4: Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN4 με την μετάλλαξη Ser558Ala	73
Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2το καθαρό προϊόν της PCR	73
Εικόνα 4.6: Αποικίες της μετασηματισμένης ζύμης σε τρυβλίο SC+URA+5-FOA	74

Εικόνα 4.7: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται το προϊόν PCR με εκμαγείο το γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου (δείγμα ελέγχου), στην θέση 2 βρίσκεται 1ο δείγμα DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην θέση 3 βρίσκεται 2ο δείγμα DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην θέση 4 βρίσκεται 3ο δείγμα DNA μετασχηματισμένης ζύμης.	77
Εικόνα 4.8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 2ου μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου (δείγμα ελέγχου), στην θέση 2 βρίσκεται το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN4 εντός του γονιδιώματος της ζύμης και στην θέση 3 βρίσκεται το επιτυχές γενομικό DNA μετασχηματισμένης ζύμης.	77
Εικόνα 4.9: καμπύλη ανάπτυξης του <i>S. Cerevisiae</i> σε θρεπτικό μέσο παρουσία 3% v/v αιθανόλης.	78
Εικόνα 4.10: Καμπύλη ανάπτυξης του <i>S. Cerevisiae</i> σε θρεπτικό μέσο παρουσία 6% v/v αιθανόλης.	79
Εικόνα 4.11: Γραφική απεικόνιση της % αναστολής της ανάπτυξης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης.	80
Εικόνα 4.12: Γραφική απεικόνιση των συγκεντρώσεων αιθανόλης που επιτυγχάνεται 50% αναστολή της ανάπτυξης για κάθε στέλεχος. Η εμφανιζόμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική αφού το εφαρμοζόμενο student's t-test έδειξε ότι $p < 0.05$	81
Εικόνα 4.13: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της απομόνωσης του ριβονουκλείκου οξέος με όξινη φαινόλη σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το w303-1a και στη θέση 3 βρίσκεται το 558 για $t=15\text{min}$	82
Εικόνα 4.14: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της κατεργασίας δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 και 7 βρίσκεται το προϊόν w303-1a για $T=0\text{h}$ και $T=16\text{h}$ αντίστοιχα. Στην θέση 3,8 βρίσκεται το προϊόν 558 για $T=0\text{h}$ και $T=16\text{h}$ σε συγκέντρωση αντίστοιχα.	83
Εικόνα 4.15: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γονιδίου. Στο κατακόρυφο άξονα καταγράφονται οι τιμές του Ct (threshold cycle) και στον οριζόντιο άξονα βρίσκονται οι τιμές των συγκεντρώσεων του γονιδίου σε λογαριθμική μορφή. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο γραμμικός συσχετισμός των δυο τιμών με την βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων.	84
Εικόνα 4.16: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN4_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).	87
Εικόνα 4.17: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=0\text{min}$. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).	88
Εικόνα 4.18: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).	89
Εικόνα 4.19: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$. Στον	

κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). 90

Εικόνα 4.20: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=16$ h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). 91

Εικόνα 4.21: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=16$ h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). 92

Εικόνα 4.22: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=16$ h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). 93

Εικόνα 4.23: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=16$ h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). 94

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 3.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις Πειραματικές Πορείες	38
Πίνακας 3.2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των PCR, συνοδευόμενοι από τις αλληλουχίες τους και από τις θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους	45
Πίνακας 3.3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του YEP	46
Πίνακας 3.4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του SC	47
Πίνακας 3.5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του LB	47
Πίνακας 3.6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Synthetic Complete (-U).....	48
Πίνακας 3.7: Αντιδραστήρια για την Παρασκευή του 50xTAE	50
Πίνακας 3.8: Παρασκευή διαλύματος Tfb1*	52
Πίνακας 3.9: Παρασκευή διαλύματος Tfb2*	52
Πίνακας 3.10: STET buffer.....	55
Πίνακας 3.11: Μείγμα για αντίδραση με DNase-I.....	63
Πίνακας 3.12: Σύσταση μείγματος.....	65
Πίνακας 3.13: Master Mix.....	65
Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια για την PCR	67
Πίνακας 4.2: Το προϊόν της PCR υποβάλλεται σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Dpn-I.	69
Πίνακας 4.3: Αντιδραστήρια για την δημιουργία δείγματος control (εκμαγείου + Dpn-I) και επώαση για 4 ώρες στους 37	71
Πίνακας 4.4: Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου <i>MSN4</i> που φέρει την μετάλλαξη	72
Πίνακας 4.5: Αντιδραστήρια για την PCR με primers της <i>MSN2</i>	75
Πίνακας 4.6: Αντιδραστήρια για την PCR με primers της <i>MSN4</i>	76

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΠΡΟΛΟΓΟΣ

1.1. Οι Ζύμες

Οι ζύμες είναι μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων που ποικίλουν στην φυσιολογία και στην δομή. Πολλαπλασιάζονται ταχύτατα κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ απουσία οξυγόνου μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθυλική αλκοόλη. Αποτελούν την πιο σημαντική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικροοργανισμών στον κλάδο τροφίμων και ποτών λαμβάνοντας μέρος σε διάφορες διεργασίες. Είναι σημαντικοί στην βιομηχανία τροφίμων ως τρόφιμα και λόγω της ικανότητας τους να μετασχηματίζουν κοινά τρόφιμα, μέσω ζυμώσεων, σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας (μαγιά), τη χρήση τους στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως οι βιταμίνες C και D. Μια από τις πιο γνωστές και ευρύτατα διαδεδομένη εφαρμογή από την αρχαία Ελλάδα είναι αυτή της αλκοολικής ζύμωσης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών ενώ τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει την χρήση της για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Ο μικροοργανισμός που διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο κατά την αλκοολική ζύμωση είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, είναι ο πιο καλά μελετημένος και χαρακτηρισμένος ευκαρυωτικός οργανισμός (Μπατρίνου, 2011).

1.2. Αναφορικά με το γένος *Saccharomyces Cerevisiae*

Η ονομασία "*Saccharomyces Cerevisiae*", μπορεί να διασπαστεί σε δύο λατινικές λέξεις, "*Saccharo*", που σημαίνει ζάχαρη και "*myces*", που σημαίνει μύκητας, ενώ "*Cerevisiae*", σημαίνει μπύρα, επομένως, μπορεί να μεταφραστεί ως ο "σακχαρούχος μύκητας της μπύρας" (VandenLangenberg, 2012).

Πρόκειται για την πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, και αποτελεί τον μικροοργανισμό μελέτης στην παρούσα εργασία. Είναι μονοκύτταρος και μονοπύρηνος οργανισμός, με μήκος κυττάρου από 5-10μm.

Η συστηματική κατάταξη του *Saccharomyces Cerevisiae* (Παπανικολάου, 2006) είναι:

Βασίλειο: Μύκητες

Φύλλο: Μυκόφυτα

Κλάση: Ασκομύκητες

Οικογένεια: *Saccharomycetaceae*

Είδος: *Saccharomyces Cerevisiae*

Το γένος *S. cerevisiae*, όπως προαναφέρθηκε, είναι ο κύριος μικροοργανισμός που παίρνει μέρος στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης. Στην επικράτησή του αυτή συνεισφέρουν πολλοί παράγοντες. Η ταχεία παραγωγή αιθανόλης, η οποία είναι μια ισχυρά τοξική ουσία για αρκετούς μικροοργανισμούς, είναι ίσως το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου ζυμομύκητα.

Εκτός από την ικανότητα ταχείας παραγωγής αιθανόλης σε μεγάλες ποσότητες, τα είδη του γένους *Saccharomyces* παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες που είναι δυνατόν να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η άνοδος της θερμοκρασίας είναι αποτέλεσμα της παραγωγή ενέργειας σε μορφή θερμότητας κατά τη ζύμωση. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ορισμένα στελέχη του συγκεκριμένου είδους διατηρούν τη ζωτικότητα τους και συνεχίζουν τη ζύμωση ακόμα και όταν η θερμοκρασία πλησιάζει στους 38 °C ενώ οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αδυνατούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 25°C (Μπέλκα, 2007).

1.3. Προσαρμογή του *Saccharomyces Cerevisiae* στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες

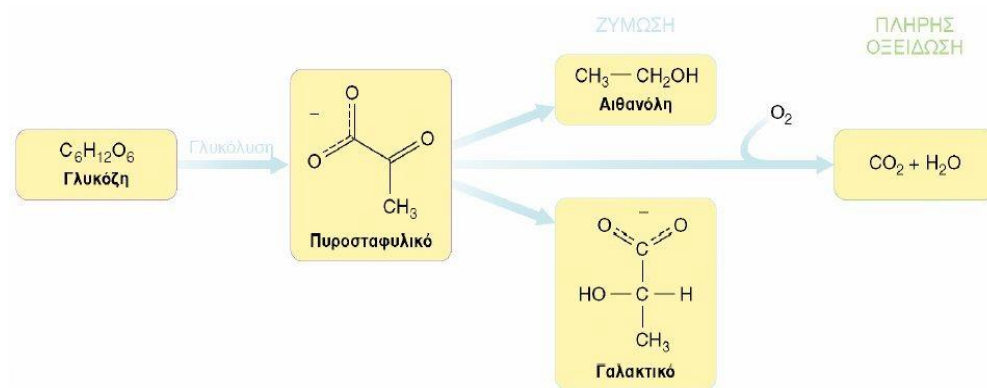
Η αύξηση των ζυμών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις συνθήκες που επικρατούν στον περιβάλλοντα χώρο. Έτσι, ανάλογα με τις εξωκυτταρικές συνθήκες, οι ζύμες, σαν προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μπορούν να αποκτήσουν την απαραίτητη για την αύξησή τους ενέργεια μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών. Μπορούν να ακολουθήσουν το μονοπάτι της αναπνοής, το οποίο ξεκινάει με τη γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, είτε το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο ξεκινάει με τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση. Ο παράγων που θα κρίνει το ποιο από τα δύο μονοπάτια θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο (Carlile et al., 2001).

Με τον όρο γλυκόλυση εννοούμε την αλληλουχία των αντιδράσεων η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Η πορεία αυτή είναι όμοια σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και γίνεται στο κυτταρόπλασμα. Στην πραγματικότητα, η μοναδική διαφορά μεταξύ αερόβιας και αναερόβιας διάσπασης της γλυκόζης βρίσκεται στην παραπέρα τύχη του πυροσταφυλικού.

Κατ' αρχάς η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφορική γλυκόζη και, μέσω των ενδιάμεσων 1,6-διφωσφορική γλυκόζη, 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη και φωσφοενολοπυροσταφυλικό, αποικοδομείται σε πυροσταφυλικό. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος αυτής της πορείας είναι δύο μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που διασπάται. Περιλαμβάνει μία μόνο οξειδοαναγωγική αντίδραση, κατά την οποία δημιουργούνται κυτταροπλασματικά μόρια NADH. Η αντίδραση αυτή είναι η μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης σε 1,3-διφωφο-γλυκερικό. Επομένως από ένα μόριο γλυκόζης παράγονται δύο μόρια NADH ή διαφορετικά καταναλώνονται δύο μόρια NAD⁺.

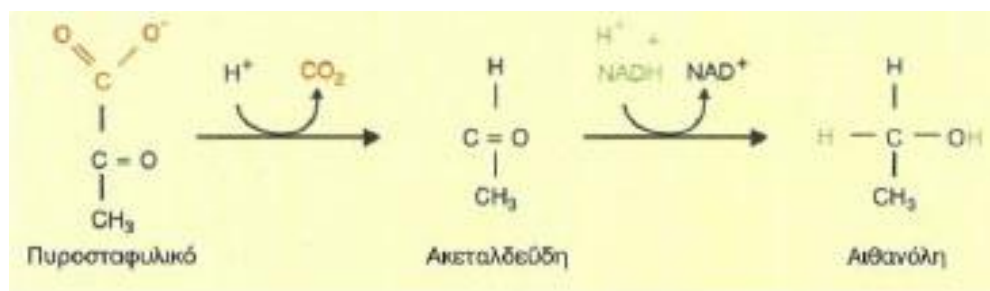
Στους αερόβιους οργανισμούς το NADH που σχηματίζεται κατά την γλυκόλυση μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στο O₂ μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το NAD⁺. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες το NAD⁺

αναγεννάται κατά τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος ή της αιθανόλης από το πυροσταφυλικό (Εικόνα 1.1). Αυτές οι δύο διεργασίες ονομάζονται ζυμώσεις και συντελούνται σε μερικούς μικροοργανισμούς (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001).



Εικόνα 1.1: Γενική απεικόνιση της γλυκόλυσης

Κατά την αλκοολική ζύμωση το πυροσταφυλικό που παράγεται κατά την αναερόβια διάσπαση της γλυκόζης μετατρέπεται, στους ζυμομύκητες και μερικούς άλλους μικροοργανισμούς, σε αιθανόλη. Το πρώτο στάδιο αυτής της διεργασίας είναι η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, οπότε παράγεται ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη με ταυτόχρονη επανοξείδωση του NADH σε NAD⁺. Με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το NAD⁺ και εξασφαλίζεται η συνεχής λειτουργία της γλυκολυτικής πορείας (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση αλκοολικής ζύμωσης (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001)

1.4. Ο *Saccharomyces Cerevisiae* υπό συνθήκες στρες

Όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε ακραίες αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών όταν πρόκειται να απειληθεί η βιωσιμότητά τους. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των αλλαγών αυτών από τα κύτταρα, περιλαμβάνουν αισθητήρες και μονοπάτια μεταγωγής σημάτων, που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Κάτω από ακραίες τέτοιες αλλαγές, συνθήκες στρες, τα κύτταρα προσπαθούν να προσαρμοστούν γρήγορα κάθε φορά στο εκάστοτε περιβάλλον τους (Gaschet al, 2000). Στη ζύμη έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που προωθούν τη μεταγραφή εκατοντάδων διαφορετικών γονιδίων σε απόκριση τους σε ποικίλες συνθήκες stress (Estruch, 2000).

Όταν ο *S. cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφ' ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ' ετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η ρύθμιση της δραστηριότητας του μονοπατιού της cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) /PKA (πρωτεϊνική κινάση A) παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού κυττάρων ζύμης, που συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα.

Η PKA μπορεί να ενεργοποιηθεί σε απόκριση στην γλυκόζη από δύο παράλληλα μονοπάτια σηματοδότησης. Το πρώτο εμπλέκει τις Ras1 και Ras2 μικρές GTPases, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσληψη γλυκόζης και την εν συνεχεία φωσφορυλίωση τους. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την Gpr1 (ένας υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες) και την Gα πρωτεΐνη του Gra2. Και τα δύο αυτά μονοπάτια συγκλίνουν προς την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή του κυκλικού AMP(cAMP) (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Gancedo, 2008).

Η παραγωγή cAMP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η ενεργοποίηση της PKA έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση φωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνες στόχους της. Συνεπώς, αρκετοί μεταγραφικοί

παράγοντες αποτελούν ενδοκυττάριους στόχους της PKA. Δύο από αυτούς είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες *Msn2* και *Msn4*, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των λεγόμενων STRE (στοιχείο απόκρισης στο stress) ελεγχόμενων γονιδίων (Estruch και Carlson, 1993; Martinez-Pastore *et al.*, 1996; Schmitt και McEntee, 1996). Ως STRE ορίζονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στους προαγωγείς των γονιδίων στόχων και οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από τους *Msn2* και *Msn4* μεταγραφικούς παράγοντες, δεσμεύονται πάνω σε αυτές και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

Οι *Msn2* και *Msn4* είναι δύο ομόλογες, κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική απόκριση σε συνθήκες stress, μεταγράφοντας εκατοντάδες γονίδια μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Görner *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2002; Kandrор *et al.*, 2004).

Η ενεργοποίηση τους συμβαίνει μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως και ο έλεγχος της εισόδου τους στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της *Msn4* πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της *Msn4* στον πυρήνα του κυττάρου. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες στρες τότε αναστέλλεται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *Msn4* από την PKA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την είσοδό της στο πυρήνα του κυττάρου και κατ' επέκταση την ρύθμιση της έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες στρες.

Διαφαίνεται λοιπόν ότι η δράση του μονοπατιού cAMP/PKA είναι κατασταλτική έναντι των δραστηριοτήτων των *Msn2/4* (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Görner *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2008).

Προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά κατάλοιπα αμινοξέων επί της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της *MSN4* τα οποία φωσφορυλιώνονται από την PKA, διεξήχθη ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με κατάλληλο λογισμικό και αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της *Msn4* από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 558.

1.5. Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον

Ένας παράγοντας θεωρείται στρεσογόνος όταν επιδρά αρνητικά στην απόδοση και τη λειτουργικότητα των κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες.

1. Φυσικοί παράγοντες

Σε αυτού περιλαμβάνονται η υψηλή θερμοκρασία, η οσμωτική πίεση, οι υψηλή υδροστατική και ατμοσφαιρική πίεση, η έλλειψη νερού και οι διάφορες ακτινοβολίες.

2. Χημικοί παράγοντες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορες χημικές ενώσεις, όπως είναι η αιθανόλη και άλλοι μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να δράσουν αρνητικά επί των κυττάρων, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, το pH και τα χημικά μεταλλαξιγόνα.

3. Βιολογικοί παράγοντες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορα φαινόμενα, όπως η γήρανση των κυττάρων, ο ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς, οι γενοτυπικές αλλαγές κ.α.

Από τους παραπάνω παράγοντες, αυτοί που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα και θεωρούνται οι πιο σημαντικοί είναι η παρουσία της αιθανόλης στο μέσο και η οσμωτική πίεση.

1.5.1. Η επίδραση της αιθανόλης

Η αιθανόλη θεωρείται ως μια άκρως τοξική ουσία για τα κύτταρα. Έτσι, όταν συγκεντρώνεται στο μέσο, δρα ως χημικός στρεσογόνος παράγοντας. Οι συγκεντρώσεις που έχουν αποδειχθεί τοξικές για τα κύτταρα των ζυμών είναι 8-18% αναλόγως το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας. Σε συγκέντρωση 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μειώνεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων καθώς και μερικών

αμινοξέων. Σε συγκεντρώσεις 11% περίπου, η ζύμωση καταστέλλεται πλήρως (Glazer and Nikaido, 1995).

Η ανασταλτική δράση της αιθανόλης ενισχύεται από την υψηλή θερμοκρασία και από την έλλειψη θρεπτικών ουσιών, κυρίως ιόντων Mg^{2+} , καθώς και άλλων μεταβολικών παραπροϊόντων, όπως είναι οι διάφορες αλκοόλες, οι εστέρες, τα λιπαρά οξέα, οι αλδεΐδες, διάφορα οργανικά οξέα, οι καρβονυλικές και οι φαινολικές ενώσεις (Jackson, 1994; Walker, 1998). Οι ανώτερες αλκοόλες είναι πιο ανασταλτικές από την αιθανόλη, ωστόσο η τοξικότητά τους περιορίζεται από τις χαμηλές συγκεντρώσεις τους στο μέσο.

Η κυριότερη ίσως αρνητική επίδραση της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισέρχεται σ' αυτή και διασπά του δεσμούς πρωτεϊνών και λιπιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την όλο και μεγαλύτερη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει σιγά-σιγά και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου (Jackson, 1994).

Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διάφορων στελεχών ζυμών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη (You et al., 2003). Η κυτταρική μεμβράνη είναι ίσως ο σημαντικότερος στόχος της αιθανόλης στα διάφορα στελέχη του *S. cerevisiae*, χωρίς ωστόσο να είναι ο μοναδικός. Στην παρακάτω Εικόνα 1.3 παρουσιάζονται μερικοί πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στο ζυμομύκητα.



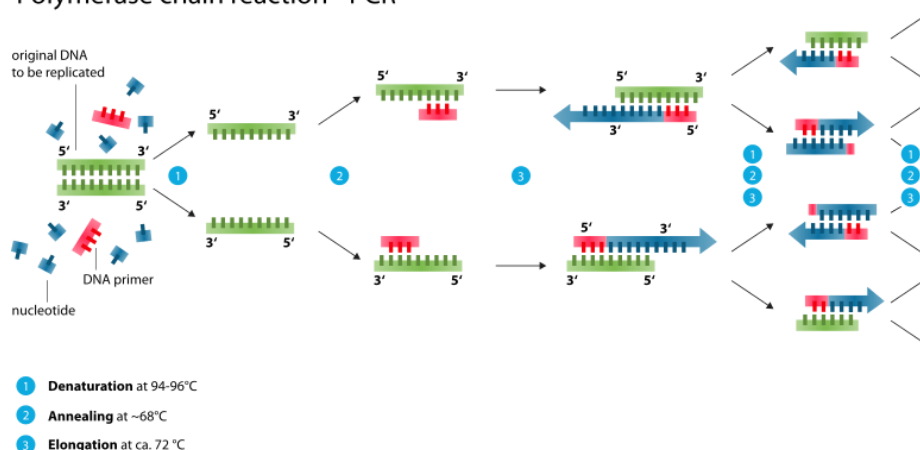
Εικόνα 1.3 Πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στον *S. cerevisiae* (Walker, 1998)

1.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

1.6.1. Γενικά

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) είναι μια επαναστατική μέθοδος την οποία ανακάλυψε ο Kerry Mullis το 1983 στην Καλιφόρνια και δημοσιεύτηκε το 1985. Ο Kerry Mullis με αυτή την ανακάλυψη κέρδισε το 1993 το βραβείο Nobel Χημείας. Η PCR ανήκει σε μια γενικότερη κατηγορία μεθόδων πολλαπλασιασμού του DNA-στόχου (target amplification methods). Οι μέθοδοι αυτές επιδιώκουν τον invitro ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων του DNA, σε τέτοια ποσότητα, ικανή να μπορεί να ανιχνευθεί και να ταυτοποιηθεί εύκολα. Το προϊόν που προκύπτει εν τέλει από αυτή την αντίδραση, είναι πιστό αντίγραφο του DNA που αποτελεί το στόχο. (Βαρθολομαίος,2002). Στην Εικόνα 1.4 απεικονίζονται τα στάδια της PCR.

Polymerase chain reaction - PCR

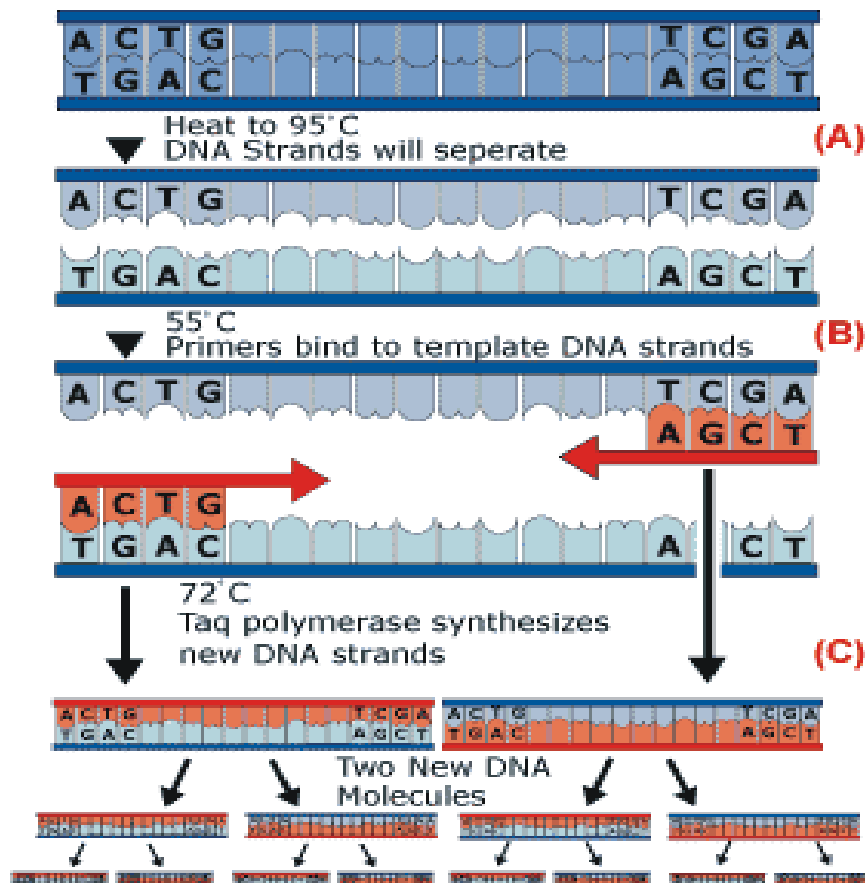


Εικόνα 1.4: Απεικόνιση σταδίων PCR

1.6.2. Αρχή της μεθόδου

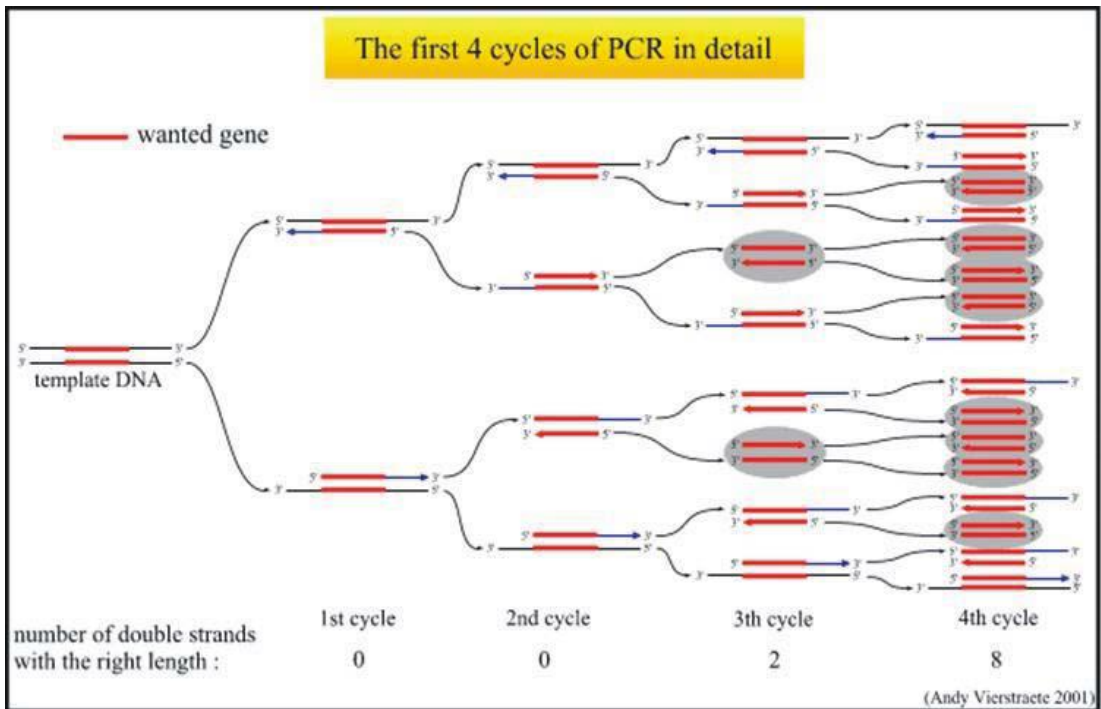
Στην PCR χρησιμοποιούνται θερμικά ανθεκτικές DNA πολυμεράσες, νουκλεοτίδια και ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) σε συνδυασμό και με άλλα αντιδραστήρια τα οποία είναι απαραίτητα για την αντίδραση, για να κατευθύνει το θερμικό πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου, μέσω επανειλημμένων γύρων αποδιάταξης, υβριδοποίησης με εκκινητές και επιμήκυνσης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μια συσκευή που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής (Thermal Cycler) και αποτελείται από τρία στάδια (Εικόνα 1.5) που έχουν ως εξής:

1. Το στάδιο της αποδιάταξης όπου το υπόστρωμα του DNA-στόχου επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 95 °C), με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA.
2. Το στάδιο κατά το οποίο, με τη μείωση της θερμοκρασίας, οι εκκινητές τις αντίδρασης υβριδοποιούνται με τη συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος (μονή έλικα του DNA-στόχου).
3. Το στάδιο της επιμήκυνσης του DNA όπου σε θερμοκρασία (72-74 °C), το τμήμα του DNA μεταξύ εκκινητών συντίθεται με βάση τη συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος, από την Taq πολυμεράση.



Εικόνα 1.5: Βασική αρχή PCR

Αυτά τα 3 στάδια λαμβάνουν χώρα σε ένα θερμικό κύκλο. Συνήθως τα πρωτόκολλα της PCR περιλαμβάνουν 30-50 θερμικούς κύκλους (στο Εικόνα 1.6) παρουσιάζονται οι τέσσερις πρώτοι κύκλοι και τα προϊόντα που προκύπτουν σε αυτούς). Η διαδικασία πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας-στόχου διαρκεί 2-4 ώρες και ο πλήρης έλεγχος με την ανίχνευση του ηλεκτροφορητικά ή χρωματομετρικά με υβριδισμό νουκλεϊνικών οξέων (probes), ολοκληρώνεται σε 48 ώρες.(Βερβερίδης, 2003).



Εικόνα 1.6: Οι 4 πρώτοι κύκλοι μιας PCR

Έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στην ιδέα της συμβατικής PCR (Εικόνα 1.7) και αποτελούν παραλλαγές της αρχικής μεθόδου, όπως είναι η Hot Start PCR, η Multiplex PCR, η Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) και η μέθοδος της Real-Time-PCR.



Εικόνα 1.7: Thermal Cycler (Θερμοκυκλοποιητής) συμβατικής PCR

1.6.3. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω PCR και περιοριστική ενδονουκλεάση *Dpn-I*

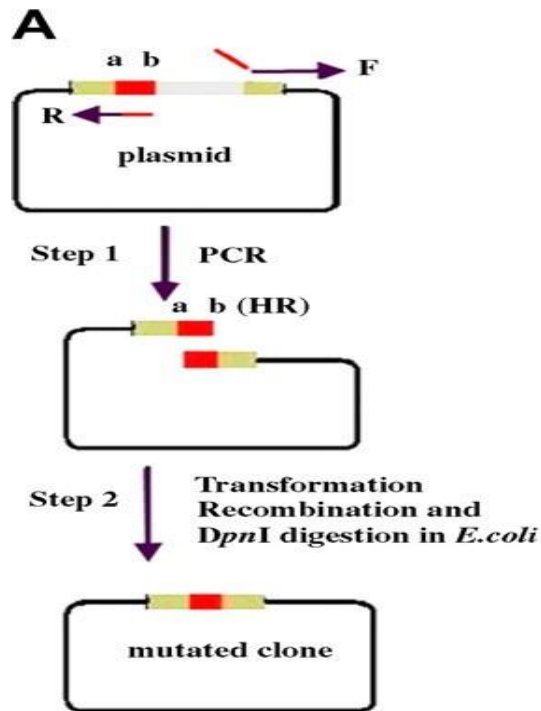
Το ένζυμο *Dpn-I* αναγνωρίζει και πέπτει πλήρως μεθυλιωμένο τμήμα DNA αφήνοντας παράλληλα ανέπαφο το μη-μεθυλιωμένο DNA. Με βάση αυτή την προσέγγιση, αναπτύχθηκε μία μέθοδος ταχείας μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας μια διπλή έλικα DNA ως εκμαγείο που απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα και πέψη με το ένζυμο *DpnI*. Αυτή η μέθοδος συγκρίνεται *ευνοϊκά* ως μια αποδοτική τρέχουσα μέθοδος και αρκετά απλουστευμένη διότι δεν απαιτείται η χρήση μονόκλωνων τμημάτων εκμαγείων ή φορείς φάγων (Jing et al., 2007).

Μέσω της μεθόδου με την χρήση του ενζύμου *Dpn-I* αναλόγως με το επιθυμητό αποτέλεσμα τα στάδια που ακολουθούνται με αυτή την μέθοδο είναι τα εξής (Εικόνα 1.8 Εικόνα 1.9):

- A. Διαγραφή αλληλουχίας. Η αλληλουχία στόχος για διαγραφή συμβολίζεται με γκρι καθώς οι πλευρικές περιοχές συμβολίζονται με ανοιχτό καφέ και κόκκινο. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που υβριδοποιούν την κάθε αλυσίδα του κλώνου ώστε να διαγράψουν την αλληλουχία στόχο συμβολίζονται με βέλη στο σχήμα 1.7. Δεκαπέντε νουκλεοτίδια με 5' άκρο ως προς την αλληλουχία στόχου προς διαγραφή συμβολίζονται με ab και θα πρέπει να περιέχονται στον primerF, αντίστοιχα.

Βήμα 1-Ενίσχυση της αλληλουχίας μεPCR και πέψη με *DpnI*: Το προϊόν της PCR είναι ένα ανοικτό πλασμίδιο από το οποίο λείπει η περιοχή που είναι επιθυμητό να διαγραφεί. Ακολούθως υποβάλλεται σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *DpnI*. Το ένζυμο αυτό δρα μόνο σε συγκεκριμένες αλληλουχίες οι οποίες είναι μεθυλιωμένες. Τέτοιες αλληλουχίες φέρει μόνο το DNA εκμαγείο που προέρχεται από τα βακτηριακά κύτταρα και όχι το προϊόν της PCR. Με αυτή τη πέψη το εκμαγείο κατακερματίζεται και ουσιαστικά παύει να υφίσταται ως πλασμίδιο εντός του μείγματος.

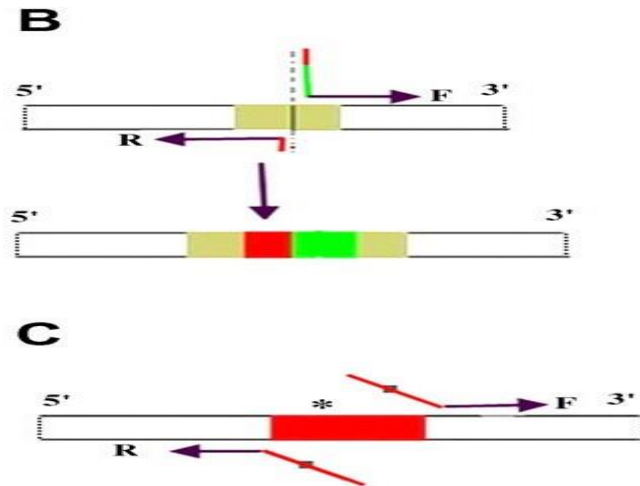
Βήμα 2- Μετασχηματισμός: Το ανοικτό πλασμίδιο που δημιουργήθηκε ως προϊόν της PCR χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli*(Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μεταλλαξεγένεσης για διαγραφή τμήματος του κλωνοποιημένου γονιδίου με πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο DpnI και εισαγωγή του σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*

- B. Εισαγωγή αλληλουχίας στόχου. Για απλοποίηση μόνο οι αρχικές ακολουθίες και τα τελικά προϊόντα εισαγωγής απεικονίζονται. Η αλληλουχία εισαγωγής συμβολίζεται από ένα κόκκινο και πράσινο ορθογώνιο (Εικόνα 1.9). Οι αλληλουχίες των primers που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη και θα υβριδοποιήσουν την κάθε αλυσίδα βρίσκονται στην θέση πρόσδεσης τους αντίστοιχα. Η αλληλουχία που επρόκειτο να εισαχθεί είναι ενσωματωμένη στο 5' άκρο του εκκινητή F. Ο primer R περιέχει στο 5' άκρο συμπληρωματικό ως προς 15 νουκλεοτίδια του primer F. Στην Εικόνα 1.9 υποδεικνύεται από την κόκκινη γραμμή. Το τελικό προϊόν με την εισαγόμενη μετάλλαξη συμβολίζεται με πράσινα και κόκκινα ορθογώνια η οποία δημιουργήθηκε ύστερα του μετασχηματισμού.
- C. Σημειακή μετάλλαξη. Μόνο οι αρχικές θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών παρουσιάζονται. Η περιοχή που επρόκειτο να μεταλλαχθεί συμβολίζεται με ένα κόκκινο ορθογώνιο καθώς και η θέση-στόχος συμβολίζεται με αστερίσκο. Τέλος τα επιθυμητά νουκλεοτίδια που πρόκειται να εισαχθούν, συμβολίζονται με

μαύρες κουκίδες, ενσωματώνονται στην επικαλυπτόμενη περιοχή των εκκινητών. Τα προϊόντα που φέρουν την μετάλλαξη έχουν δημιουργηθεί μέσω ενισχυμένης PCR με την διαγραφή της αλληλουχίας-στόχου.



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση με τον τρόπο που γίνεται η εισαγωγή της μετάλλαξης με την διαγραφή της αλληλουχίας στόχου (Jingetal., 2007)

1.6.4. Real-Time Pcr

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR (Εικόνα 1.10). Στην τελικού σημείου (end-point) PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσκολεύει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση.



Εικόνα 1.10: Μηχάνημα Real Time PCR

Αντιθέτως, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Σε αυτή την περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον αναλυτή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης (Συμμεωνίδου, 2008).

Η μέθοδος της Real-Time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία - στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο της. Η λειτουργία της τεχνολογίας Real-Time PCR βασίζεται στη χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως (λ), όπως η Sybr Green I καθώς και ιχνηθέτων (probes) αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές Real-Time PCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές της Real-Time PCR βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Κουσίδης, 2013).

Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιων φθορίζουσας ουσίας.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), η οποία επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. (Science.gr: Real-Time PCR 2012)

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα).

Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολές. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει ανάμεσα στα δείγματα και εξαρτάται από τις κινητικές αντιδράσεις αυτών.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την

αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background).

Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

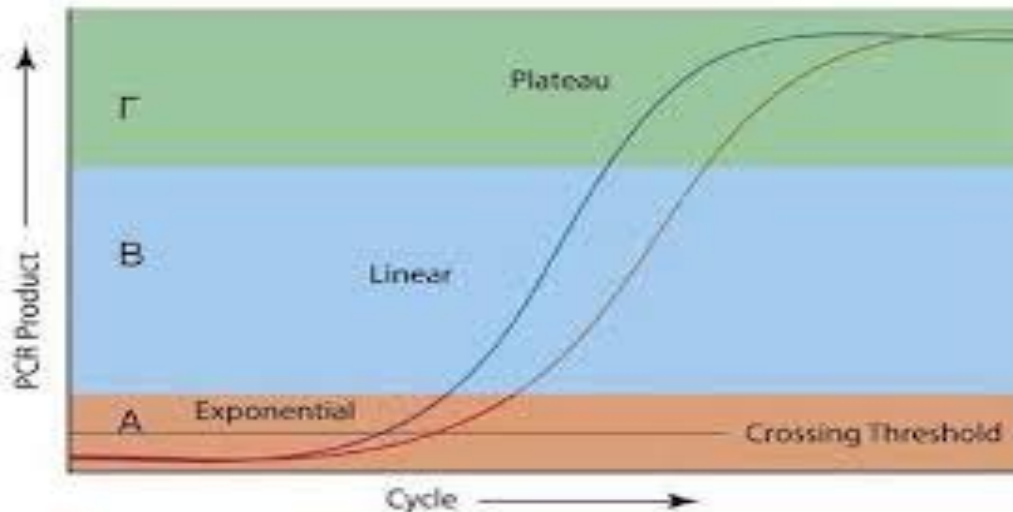
1.6.5. Στάδια της Real-Time PCR

Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (Εικόνα 1.11). Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που

απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).



Εικόνα 1.11: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης Real-Time PCR

1.6.6. Χρωστική SYBR green I

Η απλούστερη μέθοδος ανίχνευσης του προϊόντος της PCR επιτυγχάνεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που εμφανίζουν της ικανότητα δέσμευσης επί του δίκλωνου μορίου DNA. Η SYBR green I είναι μία τέτοια χρωστική. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης χρωστικής είναι ότι όταν βρίσκεται ελεύθερη δεν εμφανίζει καθόλου φθορισμό ενώ όταν είναι δεσμευμένη με δίκλωνο μόριο DNA εμφανίζει. Η ένταση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA. Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό παρέχει μία απλή και αξιόπιστη μέθοδο μέτρησης της προόδου της real-time PCR.

Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση μη τροποποιημένων

εκκινητών, η οποία διευκολύνει τον σχεδιασμό και την σύνθεση τους με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους real-time PCR .

Επιπλέον η SYBR green I επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επομένως ως διαγνωστικό εργαλείο για την εξακρίβωση της μοναδικότητας του προϊόντος της PCR, εφόσον η αναπαραγωγή του πειράματος γίνεται κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες, αφού οι τιμές της θερμοκρασίας τήξης (T_m) επηρεάζονται από:

1. τη συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου,
2. την συγκέντρωση του DMSO,
3. τις συγκεντρώσεις του δείγματος του rna,
4. της SYBR green I
5. το ρυθμό διακύμανσης της θερμοκρασίας κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης.

Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης. Μεγαλύτερη εξειδίκευση στη Real-Time PCR επιτυγχάνεται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher), οι οποίοι υβριδοποιούνται στο εκμαγείο DNA. Σε συνδυασμό με την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα. Η

SYBR green I διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm και δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. (Science.gr: Real-Time PCR 2012).

1.6.7. Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων

Μια Real-Time PCR μπορεί να γίνει σε δύο στάδια ή σε ένα. Στη Real-Time δύο σταδίων το RNA πρώτα κάνει αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA χρησιμοποιώντας ολιγό-dT εκκινητές, τυχαία ολιγομερή ή γονιδιακούς ειδικούς εναρκτήρες . Ένα κλάσμα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής προστίθεται στη συνέχεια της RealTimePCR. Είναι δυνατό να γίνει επιλογή ανάμεσα σε διαφορετικούς τύπους RT εκκινητών, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Η χρήση των ολιγό-dT εκκινητών ή τυχαίων ολιγομερών για αντίστροφη μεταγραφή σημαίνει ότι πολλές διαφορετικές μεταγραφές μπορούν να αναλυθούν με PCR από μία μόνο αντίδραση RT. Επιπλέον τα πολύτιμα δείγματα RNA μπορούν να μεταγραφούν αμέσως σε πιο σταθερά cDNA για μετέπειτα χρήση και μακροχρόνια αποθήκευση.

Στην άλλη μέθοδο του ενός βήματος ή ενός σωλήνα όπως συχνά ονομάζεται, η αντίστροφη μεταγραφή και η Real-Time PCR γίνονται σε ένα σωλήνα, με την αντίστροφη μεταγραφή να προηγείται της RT. Αυτό είναι εφικτό λόγω ειδικευμένων χημικών αντιδράσεων και πρωτόκολλα κυκλοποίησης. Η γρήγορη διαδικασία επιτρέπει την ταχεία επεξεργασία των πολλαπλών δειγμάτων και είναι εύκολο για την αυτοματοποίηση. Ο μειωμένος αριθμός των βημάτων χειρισμού έχει ως αποτέλεσμα υψηλή αναπαραγωγικότητα από δείγμα σε δείγμα και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης επειδή απαιτείται λιγότερη χειραγώγηση (Sample and assay technologies Real Time PCR brochure 2009).

1.7. Ηλεκτροφόρηση

1.7.1. Αρχή Λειτουργίας

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ιδιαίτερως χρήσιμη αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και το RNA, περιγράφοντας τη μετακίνηση ενός

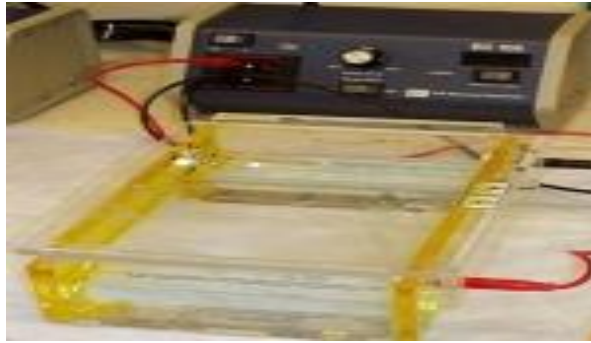
φορτισμένου σωματιδίου κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα παραπάνω μόρια λόγω δυνατότητας ιοντισμού μπορούν σε συγκεκριμένες τιμές pH να κινηθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αντίθετο πόλο. Η ηλεκτροφόρηση έχει πολλές εφαρμογές στη μοριακή βιολογία, βιοχημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κτλ.

Η αρχή λειτουργίας στηρίζεται στο φαινόμενο στο οποίο φορτισμένα σωματίδια και μόρια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Πιο αναλυτικά, όταν σε δύο ηλεκτρόδια που βρίσκονται το ένα απέναντι από το άλλο σε ένα διάλυμα εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού, δημιουργείται μια ένταση πεδίου E , όπου ισούται με το πηλίκο $E=V/d$, όπου V είναι η τάση που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια, ενώ d είναι η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων. Όταν ένα μόριο, έχοντας ολικό φορτίο Q , μετακινείται μέσω ενός πορώδους υλικού, υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου έντασης E , τότε η κινητήριος δύναμη που καθοδηγεί το μόριο στον αντίθετο πόλο είναι ίση με το γινόμενο $E*Q$.

Επιπλέον, υπάρχει μια δύναμη τριβής που εμποδίζει την κίνηση του φορτισμένου μορίου, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, το ιξώδες του διαλύματος και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Τέλος, η ταχύτητα (v) με την οποία θα κινηθεί το φορτισμένο μόριο ισούται με $E*Q/f$, όπου το f είναι ο συντελεστής. Ο συντελεστής τριβής στα διαλύματα δίνεται από τον τύπο $f=6*\pi*r*\eta$, όπου r είναι η ακτίνα του μορίου, ενώ η είναι το ιξώδες του.

Όταν στο σύστημα αυτό εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού, τα μόρια με διαφορετικό καθαρό φορτίο λόγω της διαφορετικής κινητικότητας τους αρχίζουν να διαχωρίζονται. Το ίδιο θα συμβεί και σε μόρια με ίδιο καθαρό φορτίο αλλά με διαφορετικό μέγεθος καθώς λόγω διαφορετικών δυνάμεων τριβής θα έχουν διαφορετική ταχύτητα. Αντίστοιχα, τα μικρού μεγέθους μόρια θα κινούνται ταχύτερα. Έτσι τα περισσότερα φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα απομακρύνονται λιγότερο. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι ρυθμίζοντας το μέγεθος των πόρων, μπορούμε να καθορίσουμε το εύρος του μεγέθους των μορίων

που θα διαχωριστούν καθώς και την κινητικότητα τους (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12: Συσκευή Ηλεκτροφόρησης

1.7.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό μορίων στην ηλεκτροφόρηση

Οι παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται ο διαχωρισμός των μορίων σε μια ηλεκτροφόρηση είναι:

pH: Πολλά μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA είναι αμφολύτες, όπου μια μικρή μεταβολή του pH μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στο συνολικό ηλεκτρικό φορτίο και να επιδράσει στο διαχωρισμό.

Θερμοκρασία: Κατά την ηλεκτροφόρηση, η ροή ρεύματος προκαλεί απελευθέρωση θερμότητας, η οποία προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας. Η αύξηση της θερμοκρασίας αποτελεί μεγάλο κίνδυνο λόγω της μετουσίωσης και της καταστροφής των μορίων που μπορεί να προκαλέσει.

Ένταση του ηλεκτρικού πεδίου: Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος επηρεάζει άμεσα την κινητικότητα των μορίων σε ένα συγκεκριμένο χρόνο. Υπό την επίδραση ισχυρού πεδίου επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός. Τέλος, σε κάθε συσκευή ηλεκτροφόρησης, το μέγιστο δυναμικό που μπορεί να εφαρμοστεί καθορίζεται μέσα σε συγκεκριμένα όρια και η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει με σταθερή τάση ή ένταση ρεύματος.

Είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού: Μερικά ηλεκτροφορητικά υλικά όταν

έρθουν σε επαφή με το νερό φορτίζονται αρνητικά, με αποτέλεσμα να έλκουν θετικά φορτισμένα σωματίδια από το διάλυμα και σχηματίζουν μια διπλοστιβάδα όπου τα θετικά σωματίδια είναι ακινητοποιημένα πάνω στο ηλεκτροφορητικό υλικό. Όταν αρχίσει η ηλεκτροφόρηση τα θετικά αυτά σωματίδια κινούνται προς την άνοδο με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η κίνηση των αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων, το οποία κινούνται και αυτά προς την άνοδο, κάνοντας τα να παραμένουν ακίνητα ή να κινούνται προς την κάθοδο.

Μέγεθος και σχήμα του μορίου: Μόρια μικρότερου μεγέθους μπορούν να μετακινηθούν και να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση από το αρχικό σημείο, ενώ τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους και σχήματος διανύουν μικρότερες αποστάσεις.

Φύση του ρυθμιστικού διαλύματος: Η ιοντική ισχύς και οι χημικές ιδιότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων ασκούν διαφορετική επίδραση στις διάφορες πρωτεΐνες. Η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος επηρεάζει την ταχύτητα κίνησης, ενώ ρυθμιστικά διαλύματα πολύ υψηλής ιοντικής ισχύος προκαλούν την απελευθέρωση μεγάλου ποσού θερμότητας με πιθανό κίνδυνο τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Τα πιο κοινά ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι: α) το TAE (Tris/Acetate/EDTA), το οποίο έχει μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, θέλει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο αλλά φέρει καλύτερα αποτελέσματα, καλό διαχωρισμό σε DNA >4kb και σε υπερελικωμένο DNA και β) το TBE (Tris/Borate/EDTA), το οποίο είναι προβληματικό με το RNA λόγω αλληλεπίδρασης, όμως φέρει καλό διαχωρισμό σε DNA 0.1-3 kb και όταν εφαρμόζουμε τάση >150 V.

1.7.3. Είδη ηλεκτροφόρησης

Τα κυριότερα είδη ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα:

- Πηκτής αγαρόζης
- Πηκτής πολυακρυλαμιδίου
- Ισοηλεκτρική εστίαση
- Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

- Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

1.7.4. Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ζυμομύκητα

Όπως είναι γνωστό η γενετική πληροφορία βρίσκεται αποθηκευμένη στο δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) του κυττάρου. Προκειμένου η πληροφορία αυτή να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο και να παραχθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες, το τμήμα του DNA του κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που πρόκειται να παραχθεί, αρχικά μεταγράφεται και προκύπτει ένα νέο μόριο που καλείται ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA). Το RNA είναι μια απλή ασταθής έλικα με ισχυρές δευτεροταγείς δομές. Εντός του κυττάρου απαντώνται διαφορετικά είδη RNA τα οποία κατηγοριοποιούνται αναλόγως των λειτουργιών που επιτελούν ή συμμετέχουν (rRNA, tRNA, mRNA, snRNA). Το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA (rRNA)) είναι στην πραγματικότητα αποτελείται από 3-4 διαφορετικά μόρια RNA τα οποία είναι απαραίτητα για την δημιουργία και λειτουργία των ριβοσωμάτων. Το μεταφορικό RNA (transferRNA (tRNA)), συμμετέχει στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης μεταφέροντας τα αμινοξέα που πρόκειται να ενσωματωθούν στην νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα από τα ριβοσώματα ακολουθώντας πάντα το γενετικό κώδικα και λειτουργώντας χάρη στην αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Το μηνυματοφόρο ή αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA (mRNA)) είναι το μόριο εκείνο που φέρει το γενετικό μήνυμα, η μετάφραση του οποίου από τα ριβοσώματα, θα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της νέας πρωτεΐνης).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο ζυμομύκητας όπως και κάθε άλλος ζωντανός οργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζει τις λειτουργίες του ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Γενικά, κάθε συνθήκη η οποία αποκλίνει από τις βέλτιστες συνθήκες επιβίωσης και ανάπτυξης του ζυμομύκητα, χαρακτηρίζεται ως αντίξοη συνθήκη ή συνθήκη stress. Η μεταβολή του pH, της θερμοκρασίας, της ωσμωτικής πίεσης, η παρουσία αιθανόλης είναι οι πιο συνήθεις αντίξοες συνθήκες στις οποίες ο ζυμομύκητας καλείται να επιβιώσει και να λειτουργήσει. Ειδικά η παρουσία της αιθανόλης και η απόκριση της ζύμης σε αυτή είναι καθοριστικής σημασίας για τις εφαρμογές στις οποίες χρησιμοποιείται.

Η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του ζυμομύκητα αποτελεί ένα παράγοντα κυτταρικού στρες, όμως η ενδοκυττάρια σηματοδότηση της αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και τελικά της PKA μέσω των Ras1/2 πρωτεϊνών. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης από τον *S. cerevisiae* χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα θα ήταν χρήσιμο να επιτευχθούν κατάλληλες γενετικές τροποποιήσεις με σκοπό την αποτροπή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Msn2/4 από την PKA. Λόγω του εξέχοντος ρόλου της PKA στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση είναι θα ήταν ανούσια οποιαδήποτε τροποποίησή του.

Είναι λοιπόν κύριος στόχος η γενετική τροποποίηση του γονιδίου MSN4. Η τροποποίηση αυτή έχει ως στόχο την αντικατάσταση ενός καταλοίπου σερίνης με το αμινοξύ Αλανίνη (Ser558Ala) στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)) προκειμένου να κατασταλεί ο έλεγχος της μετανάστευσης του μεταγραφικού παράγοντα Msn4, από την PKA και να επιτευχθεί διαρκής εντοπισμός της στον πυρήνα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία της μετάλλαξης Ser558Ala επί του γονιδίου MSN4 μέσω της πέψης με το ένζυμο Dpn-I, η εισαγωγή της συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής του MSN4 γονιδίου στα κύτταρα του ζυμομύκητα και η πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης και επιβίωσης των

γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης σε σύγκριση πάντα με αυτά που δεν έχουν δεχθεί κάποια γενετική τροποποίηση προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση της απόκρισής τους σε αντίξοες συνθήκες. Επίσης, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες.

Η δημιουργία στελεχών ζύμης ανθεκτικών αφ' ενός στην αιθανόλη, αφ' ετέρου έναντι συνθηκών γενικού στρες αναμένεται να συμβάλει στην αποτελεσματικότερη αξιοποίηση των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων για παραγωγή αιθανόλης.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον Πίνακα 3.1, ενώ όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των PCR βρίσκονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις Πειραματικές Πορείες

	Αντιδραστήρια	Εταιρία	Κωδικός
1	Gel red	Biotium	41003
2	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
4	Οξικόλιθιο (Lithium Acetate dihydrate)	AppliChem	A3478
5	Tris ultrapure	Duchefa Biochemie	T1501.1000
6	Οξικό οξύ (Glacial Acetic Acid)	Penta	607002006
7	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	Lab M	MC001
8	Bacto Peptone		

9	Γλυκόζη (Glucose)	Sigma-Aldrich	G7021
10	Agar Agar	Serva	11392
11	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Sigma-Aldrich	Y0626-250G
12	Ασπαραγίνη	AppliChem	A3721
13	Γλουταμινικό οξύ	AppliChem	A3712
14	Λευκίνη	AppliChem	A3496
15	Τυροσίνη	Sigma-Aldrich	T3379
16	Βαλίνη	Merk	1084950100
17	Φαινιλαλανίνη	Serva	32191
18	Ασπαραγινικό οξύ	AppliChem	A3715
19	Αργινίνη	AppliChem	A3709
20	Αδενίνη	AppliChem	A0939
21	Ισολευκίνη	AppliChem	A3677
22	Θρεονίνη	AppliChem	A3946

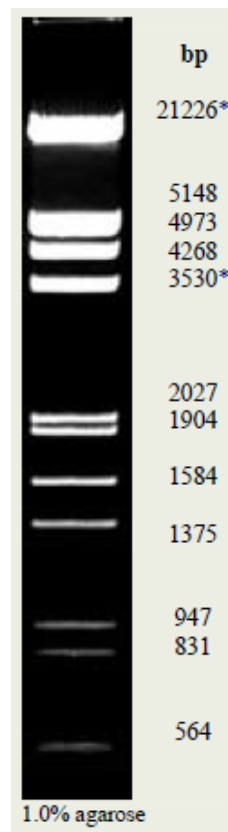
23	Κυστεΐνη	AppliChem	A3694
24	Προλίνη	Sigma-Aldrich	81710
25	Τρυπτοφάνη	Sigma-Aldrich	T8941
26	Λυσίνη	Sigma-Aldrich	L9037
27	Μεθιονίνη	Sigma-Aldrich	M5308
28	Γλουταμίνη	AppliChem	A3734
29	Αλανίνη	Serva	11482
30	Σερίνη	Sigma-Aldrich	84960
31	Ιστιδίνη	AppliChem	A3719
32	Γλυκίνη	Serva	56406
33	Τρυπτόνη	Lab M	MC005
34	Ουρακίλη	AppliChem	A0667
35	Χλωριούχο Νάτριο		
36	Υδροξείδιο του Νατρίου		

37	Αιθυλεν-δι-αμινο- τετραοξικό οξύ (EDTA)		
38	Triton X-100		
39	RNase		
40	Ισοπροπανόλη	Penta	603117000
41	Kapa HiFi Hot Start ReadyMix	Kapa Biosystems	KK2601
42	Taq polymerase ReadyMix	Kapa Biosystems	KK1006
43	MgCl ₂		
44	Dntps		
45	Αμπικιλίνη (Ampicillin sodium salt)	Biochemica	A0839
46	Nucleospin PCR Clean- up & Gel Extraction kit	Macherey-Nagel	740609.50
47	Nucleospin Plasmid kit	Macherey-Nagel	740588.50
48	Περιοριστική	Takara	1073A

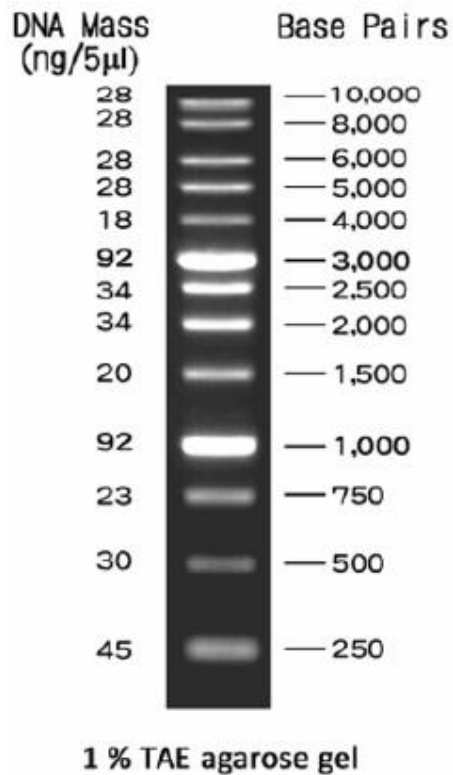
	Ενδονουκλεάση PstI		
49	Περιοριστική Ενδονουκλεάση EcoRI	Takara	1040A
50	Περιοριστική Ενδονουκλεάση BamHI	Takara	1010A
51	Περιοριστική Ενδονουκλεάση HindIII	Takara	1060AH
52	Dpnl	BioLabs	R0176S
53	5-FOA (5-Fluoroorotic Acid) (5-φθόρο-οροτικό οξύ)	Thermo Scientific	R0811
54	SDS (Μετά νατρίου άλας του Θειϊκού Δωδεκακυκλίου)	Sigma-Aldrich	L3771
55	Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 4000)	AppliChem	A1249
56	Carrier dna (Salmon Sperm)		A2160,0001
57	T4 DNA λιγάση	Takara	2011A

58	10X Loading buffer	Takara	
59	Γλυκερόλη	Fisher Scientific	BP229
60	IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)		
61	X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside)		
62	pUC19 plasmid		
63	W303-1a Yeast Strain		
64	MOPS	Sigma-Aldrich	M1254
65	RbCl ₂	Sigma-Aldrich	R2252
66	CaCl ₂		
67	MnCl		
68	CH ₃ COOK		
69	Λυσοζύμη		
70	BSA		

71	Lambda DNA/EcoRI/Hind III Digest	Sigma-Aldrich	D9281
72	1 kb DNA Ladder RTU	Nippon Genetics	MWD-1
73	CutSmart	BioLabs	B7204S



Εικόνα 3.1: Μάρτυρες Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest



Εικόνα 3.2: Μάρτυρες 1 kbDNA Ladder RTU

Πίνακας 3.2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των PCR, συνοδευόμενοι από τις αλληλουχίες τους και από τις θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους

Εκκινητές (primers)	Αλληλουχία εκκινητών	Θερμοκρασίες Υβριδοποίησης
MSN4 Forward(pstI)	5'AAAAC TGCAGATGCTAGTCTTCG GACCTAA 3'	T _m =58
MSN4 Reverse(BamHI)	5'CGGGATCCAAAATCACCGTGCTTT TTGTG 3'	T _m =58
Forward_MSN4	5'CAGTTCGGCTTTTTTTTCTTTTCTT CTTATTA AAAACAATATA3'	T _m =58

Reverse_MSN4	5'CCGTAGCTTGTCTTGCTTTTATTTG CTTTTGACCTTATTTTTT 3'	Tm=54
--------------	--	-------

3.1.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Παρακάτω αναφέρονται τα υλικά και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία των θρεπτικών υλικών. Η προσθήκη άγαρ γίνεται μόνο κατά την δημιουργία τρυβλίων με τα αντίστοιχα θρεπτικά.

3.1.1.1. YEP

Πίνακας 3.3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του YEP

Yeast extract	10 g
BactoPeptone	20 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι όγκου 1 L

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

3.1.1.2. SC

Πίνακας 3.4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του SC

YeastNitrogenBase	6,7 g
Glucose	20 g
SyntheticComplete (-U)	2 g
Agar	20 g
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι όγκου 1 L

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στον αυτόκαυστο.

3.1.1.3. LB

Πίνακας 3.5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του LB

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
NaOH 1M	1 ml
Agar	20 g
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι όγκου 1L

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στον αυτόκαυστο.

3.1.1.4. Synthetic Complete (-U)

Πίνακας 3.6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Synthetic Complete (-U)

Ασπαραγίνη (Asparagine)	2 g
Γλουταμινικό οξύ (Glutamate)	2 g
Λευκίνη (Leucine)	4 g
Τυροσίνη (Tyrosine)	2 g
Βαλίνη (Valine)	2 g
Φαινιλαλανίνη (Phenylalanine)	2 g
Ασπαραγινικό οξύ(Aspartate)	2 g
Αργινίνη (Arginine)	2 g
Αδενίνη (Adenine)	1 g
Ισολευκίνη (Isoleucine)	2 g
Θρεονίνη (Threonine)	2 g
Κυστεΐνη (Cysteine)	2 g

Προλίνη (Proline)	2 g
Τρυπτοφάνη (Tryptophan)	2 g
Λυσίνη (Lysine)	2 g
Μεθειονίνη (Methionine)	2 g
Γλουταμίνη (Glutamine)	2 g
Αλανίνη (Alanine)	2 g
Σερίνη (Serine)	2 g
Ιστιδίνη (Histidine)	2 g
Γλυκίνη (Glycine)	2 g

3.1.1.5. SC+URA+5-FOA

1. Προστίθενται 10 g αγαρ σε 300 ml H₂O σε κωνική φιάλη του 1 L με μαγνήτη και αποστείρωση.
2. Σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 195 ml H₂O ακριβώς Προστίθενται τα ακόλουθα:
 - 3.35 g Yeast Nitrogen base without amino acids
 - 10 g Glucose
 - 1.15 g Amino Acids mix (w/o uracil)
 - 0.5 g 5-FOA

3. Θέρμανση του μείγματος με το 5-FOA πάνω σε θερμαντική πλάκα στους 55-65 °C, μέχρι να διαλυθούν όλα τα συστατικά πλήρως (περίπου 1 h).
4. Στη συνέχεια αποστειρώνεται με φιλτράρισμα μέσω φίλτρου πόρου 0,22 μm και το φιλτραρισμένο υλικό συλλέγεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60 °C.
5. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης με το αποστειρωμένο άγαρ πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και ανάδευση έως ότου η θερμοκρασία του μειωθεί έως τους 65 °C.
6. Προσθήκη του αποστειρωμένου μείγματος 5-FOA καθώς και 5 ml από το αποστειρωμένο διάλυμα 100 X ουρακίλης (2 mg/ml). Όλες αυτές οι μεταγγίσεις υγρών στην κωνική γίνονται υπό στείρες συνθήκες.
7. Ακολουθεί μοίρασμα του υλικού σε τρυβλία petri.

Για την παρασκευή υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων δεν προστίθεται agar.

3.1.1.6. Παρασκευή 50xTAE

Πίνακας 3.7: Αντιδραστήρια για την Παρασκευή του 50xTAE

Trisma base	242 g
Glacial acetic acid	57,1 ml
EDTA	18,6 g
Απιονισμένο H ₂ O	Προσθήκη μέχρι 1L

3.1.1.7. Παρασκευή 1xTAE

Προσθήκη 20 ml 50x TAE buffer και 980 ml απιονισμένου νερού τα οποία σε Duran του 1 L. Ακολουθεί καλή ανάδευση.

3.2. Πειραματικές Πορείες

3.2.1 Παρασκευή gel αγαρόζης 1 % w/v – Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων

1. Αρχικά γίνεται διάλυση σε κωνική φιάλη 0,5 g αγαρόζης με 50 ml 1x TAE και θερμαίνεται μέχρι βρασμό του πηκτώματος. Αφού βράσει το διάλυμα μας προσθέτουμε 2,5 ml gel red και ανακινούμε .
2. Ύστερα τοποθετείται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται ο κατάλληλος applicator για την διάνοιξη μικρών οπών-πηγαδιών επάνω στο gel αγαρόζης. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμά μας τότε είναι έτοιμο για χρήση.
3. Τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος ορού (10 ml), στα οποία έχει προστεθεί η χρωστική ουσία, σε κάθε οπή του πηκτώματος αφού πρώτα γίνει απόχυση 1x TAE μέχρι να καλυφθεί το gel . Αντίστοιχα τοποθετείται και ο μάρτυρας.
4. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό και ακολουθεί η ανάπτυξη της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή ένταση ρεύματος περίπου 60 mA.
5. Έπειτα από 30 λεπτά κατά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται το πήκτωμα και τοποθετείται στο αντίστοιχο μηχάνημα το οποίο εκπέμπει UV ακτινοβολία και μας δίνει τα τελικά αποτελέσματα δηλαδή τον προσδιορισμό του μεγέθους των δειγμάτων που υπολογίζεται με σύγκριση του συντελεστή επιβράδυνσης αυτού σε σχέση με των τμημάτων DNA του μάρτυρα.

3.2.2 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας 100 ml σε LB μέχρι $OD_{550nm} \cong 0,55$. Χρήση κωνικής φιάλης 2 L για καλή ανάδευση.
2. Φυγοκέντριση για συλλογή κυττάρων 3000 x g, 10 min στους 4 °C.
3. Επαναδιάλυση σε 28 ml διαλύματος Tfb1 (Πίνακας 3.8) και αφήνουμε για 25 min στους 4 °C.

4. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντριση 2500 x g για 10 min και επαναδιάλυση σε 6 ml διαλύματος Tfb2 (Πίν. 3.9).
5. Μοίρασμα σε κλάσματα των 400 μl (για δυο μετασχηματισμούς) και τα φύλαξη στους -70 °C.

Πίνακας 3.8: Παρασκευή διαλύματος Tfb1*

100 mM	RbCl ₂	<p>pH: 5,8</p> <p>Ρύθμιση pH με 0,2M CH₃COOH</p>
50 mM	MnCl ₂	
30 mM	CH ₃ COOK	
10 mM	CaCl ₂	
15%	Glycerol	

Πίνακας 3.9: Παρασκευή διαλύματος Tfb2*

10 mM	MOPS pH:7	<p>pH: 7</p> <p>αν όχι προσαρμόστε το διάλυμα με ΚΟΗ</p>
10 mM	RbCl ₂	
80 mM	CaCl ₂	
15%	Glycerol	

* Δεν αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο. Αποστειρώνεται με χρήση φίλτρου 0,22 μm.

3.2.3 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

1. Ξεπάγωμα των competent cells (E.coli) στον πάγο και ακολουθεί η μεταφορά αυτών σε δυο erpendorf, από 100 μl στο καθένα.
2. Σε δύο νέα erpendorf προστίθενται τα εξής:
 - 1) Προϊόν PCR κατεργασμένο με DpnI
 - 10 μl PCR MSN4
 - 2 μl DPN-I
 - 10 μl H₂O
 - 2) PUC 19 MSN4
 - 10 μl PUC MSN4
 - 2μl DPN-I
 - 10 μl H₂O

Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30-45 min.

3. Προσθήκη στα erpendorf με τα competent cells 1μl DNA και επώαση στον πάγο για 20-40 min.
4. Τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (Heat shock) για 90 sec στους 42 °C.
5. Τοποθέτηση των κυττάρων για 1 min στον πάγο, προσθήκη 900 μl θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 1h.
6. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση για 1 min στις 10.000 rpm και αφαίρεση 1 ml του υπερκείμενου υγρού.
7. Επαναδιάλυση κυττάρων στα υπολειπόμενα 100 μl, και τοποθέτησή τους επί θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη).
8. Επώαση 37 °C για 24 h.

3.2.4 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού

1. Εμβολιασμός 10 ml θρεπτικού μέσου LB με μονήρη αποικία (όπου προήλθε από το δεύτερο μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων) και προσθήκη 20 μl αμπικιλίνη και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 30 °C.
2. Φυγοκέντριση 1,5 ml καλλιέργειας 10.000 rpm, 1 min, RT.
3. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού.
4. Επαναδιάλυση σε 0,7 ml διαλύματος STET (Πίνακας 3.10).
5. Έντονη ανάδευση (vortex).
6. Προσθήκη 10 μl λυσοζύμης 1 mg/ml.
7. Τοποθέτηση εppendorfs στους 100 °C για 1 min.
8. Φυγοκέντριση στα 10.000 rpm για 10 min σε RT.
9. Επανάληψη φυγοκέντρισης στα 12.000 rpm για 10 min σε RT.
10. Μεταφορά 430 μl του υπερκειμένου σε νέα εppendorf.
11. Προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης.
12. Τοποθέτηση των εppendorf στους -80 °C για 10 min.
13. Φυγοκέντριση σε 12.000 rpm για 20 min σε RT.
14. Πλήρης απομάκρυνση υπερκειμένου και πλύσιμο ιζήματος με 80% Ethanol.
15. Φυγοκέντριση για 5 min.
16. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη 20 μl (H₂O + RNAse (100 ng/μl)).
17. Επώαση σε RT για 5-10 min.

Lysozyme Stock

10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH: 8

Πίνακας 3.10: STET buffer

NaCl	100 mM
Tris-HCl pH: 8	10 mM
EDTA pH: 8	1 mM
Triton X-100	5%

3.2.5 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (High efficiency transformation of yeast cells).

1. Εμβολιασμός 13ml καλλιέργειας ζύμης SC-U αργά το απόγευμα.
2. Επόμενο πρωί, όταν $OD_{600} = 0.4-0.6 \sim 10^7 \text{ cells/ml} - 5 \cdot 10^8 \text{ cells/ml}$ φυγοκέντριση 9 ml σε erppendorf στις 8.000 rpm για 5 min στους 4 °C.
3. Επαναδιάλυση σε 1.5ml αποστειρωμένο H₂O και φυγοκέντριση στους 4 °C.
4. Επαναδιάλυση σε 1 ml 10 mM LiOAc (Οξικό Λίθιο), στον πάγο.
5. Φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 30 sec-1 min στους 4 °C.
6. Επαναδιάλυση σε 100 mM LiOAc. Τελικός όγκος=500 μl (κύτταρα+διάλυμα).
7. Σύntonμη φυγοκέντριση (10 sec/4.000 rpm).
8. Επαναδιάλυση ιζήματος σε:
 - a. 240 μl PEG(4000) 50%

- b. 36 μl 1M LiOAc
 - c. 10 μl carrier DNA (10 μg/μl) (αφού τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 100 °C/5 min)
 - d. 74 μl H₂O+DNA (0.1-1 μg)
9. Vortex 1 min.
10. Επώαση στους 30 °C για 30 min.
11. Επώαση στους 42 °C για 15 min (JULABO).
12. Φυγκέντριση στις 4.000 rpm για 1 min.
13. Προσθήκη 200 μl αποστειρωμένου H₂O και ήπια επαναδιάλυση.
14. Τοποθέτηση επί κατάλληλου στερεού θρεπτικού μέσου (YEP) σε τρυβλία petri, στην αρχική συγκέντρωση και σε αραιώση 10%.
15. Επώαση στους 30 °C για 48 h.

3.2.6 Μεταφορά αποικιών με την διαδικασία *replica*

Στο τρυβλίο YEP ύστερα από τον μετασχηματισμό των κυττάρων ζύμης, για την επιλογή των κυττάρων που έχει γίνει επιτυχημένα ο μετασχηματισμός, χρειάστηκε να γίνει αντιγραφή σε τρυβλίο SC+U+5FOA με την χρήση ενός αποστειρωμένου τετράγωνου κομματιού υφάσματος από βελούδο. Το κομμάτι υφάσματος, τοποθετήθηκε στην επιφάνεια με την αναπτυγμένη περιοχή (πιάτο YEP), και κατευθείαν εφαρμόστηκε πάνω σε τρυβλίο SC+U+5FOA.

3.2.7 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης

1. Φυγοκέντριση 400 μl υγρής καλλιέργειας στις 12.000 rpm για 1min σε RT, απομακρύνοντας στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό (O.D.600≈0.4).
2. Επαναδιάλυση κυττάρων σε 100 μl διαλύματος (200 mM LiOAc, 1% SDS).
3. Επώαση για 5 min στους -80 °C και έπειτα για 30 min στους 70 °C.
4. Προσθήκη 300 μl απόλυτης αιθανόλης και ισχυρή ανάδευση (vortex).
5. Φυγοκέντριση του DNA και των κυτταρικών υπολειμμάτων στα 15000 xg για 3 min.
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 200 μl 70% αιθανόλης για έκπλυση ιζήματος.
7. Φυγοκέντριση για 2 min στα 15.000 xg. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
8. Στέγνωμα ιζήματος για 2 min και στη συνέχεια προσθήκη 100 μl H₂O και επαναδιάλυση ιζήματος.
9. Φυγοκέντριση στα 15.000 xg για 15 sec ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
10. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και φύλαξη αυτού στους -20°C.
11. 1 μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.

3.2.8 Καθαρισμός προϊόντων PCR με το kit Gel & PCR clean up

3.2.8.1. PCR Clean-up

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου του δείγματος από το buffer NTI (π.χ. για 100 μl δείγματος PCR προσθέτουμε 200 μl buffer NTI).
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε ένα CollectionTube (2 mL) και μεταφορά 700μl αντίδρασης pcr.

3. Φυγοκέντριση δείγματος για 30 sec στις 11000 x g (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700 μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).
4. Προσθήκη 700 μl buffer NT3 και φυγοκέντριση για 30 sec στις 11000 x g.
5. Φυγοκέντριση για 1 min στις 11000 x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων buffer NT3.
6. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5 ml). Προσθήκη 15-30 μl buffer NE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000 x g.

3.2.8.2 Απομόνωση DNA από πηκτώματα αγαρόζης

1. Προσθήκη 200 μl buffer NT1 για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης <2% και θέρμανση του δείγματος για 5-10 min στους 50 °C. Vortex έως ότου η πηκτή αγαρόζης διαλυθεί πλήρως.
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε ένα CollectionTube (2 mL) και μεταφορά 700 μl αντίδρασης pcr. Φυγοκέντριση δείγματος για 30 sec στις 11000 x g. (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700 μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).
3. Προσθήκη 700 μl buffer NT3 και φυγοκέντριση για 30 sec στις 11000 x g.
4. Φυγοκέντριση 1 min, 11000 x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων buffer NT3.
5. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5 ml). Προσθήκη 15-30 μl buffer NE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Φυγοκέντριση για 1 min στις 11000 x g.

3.2.9 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. Coli* με το kit Nucleospin plasmid

1. Φυγοκέντριση 1-5 ml καλλιέργειας *E. coli* σε θρεπτικό LB για 30 sec στις 11000 x g. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
2. Προσθήκη 250 µl buffer A1 και vortex.
3. Προσθήκη 250 µl buffer A2 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Προσθήκη 300 µl buffer A3 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές.
5. Φυγοκέντριση για 5 min στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου (επαναλαμβάνουμε εάν το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό).
6. Τοποθετούμε μια στήλη NucleoSpin® Plasmid σε ένα CollectionTube (2 mL) και μεταφέρουμε το υπερκείμενο από το βήμα 3. Φυγοκέντριση για 1 min στις 11000 x g. (εάν ο όγκος του υπερκείμενου ξεπερνάει τα 750 µl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα).
7. Προσθήκη 500 µl buffer AW (προθέρμανση στους 50 °C) και φυγοκέντριση για 1 min στις 11000 x g.
8. Προσθήκη 600 µl buffer A4 και φυγοκέντριση για 1 min στις 11000 x g.
9. Φυγοκέντριση για 2 min στις 11000 x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων.
10. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Plasmid σε νέο Eppendorf και προσθήκη 50 µl buffer AE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
11. Φυγοκέντριση για 1 min στις 11000 x g.

3.2.10 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων

Σε ένα erpendorf γίνεται προσθήκη 800 μl από την καλλιέργεια ζύμης ή βακτηρίων και 200 μl γλυκερόλης. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και φύλαξη στους -80 °C. Η παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης

3.3.1 Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιιεργειών

Με την χρήση μικροσκοπίου μπορούμε να διαπιστώσουμε την καθαρότητα των ανεπτυγμένων καλλιιεργειών. Υπό ασηπτικές συνθήκες λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα καλλιιεργειας και ελέγχεται με το μικροσκόπιο. Αυτό που επιθυμούμε να διακρίνουμε στο μικροσκόπιο είναι κύτταρα των οποίων τα μορφολογικά χαρακτηριστικά υποδηλώνουν ότι είναι κύτταρα εκβλαστάνουσας ζύμης καθώς και η απουσία άλλων μικροοργανισμών.

3.3.2 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης

Για την κάθε συγκέντρωση αιθανόλης που χρησιμοποιούνται στις παρακάτω πειραματικές πορείες χρησιμοποιούνται και διαφορετικές ποσότητες. Για την δημιουργία των διαλυμάτων χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό, γερ και καθαρή αιθανόλη 100%. Οι συγκεντρώσεις όπου επεξεργαζόμαστε τα δείγματα, είναι 3%, 6%, 9%.

Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής:

Σε κωνικές φιάλες των 100 ml τοποθετείται θρεπτικό μέσο διαφόρων συγκεντρώσεων αιθανόλης. Οι κωνικές εμβολιάζονται με κατάλληλη ποσότητα των στελεχών και επωάζονται στους 30 °C υπό ανάδευση. Προκειμένου να καταγραφεί η ανάπτυξη των κυττάρων με την πάροδο του χρόνου λαμβάνεται και καταγράφεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 600 nm.

Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται κύτταρα αγρίου τύπου (W303-1a) και κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη Ser558Ala της πρωτεΐνης Msn4 (W303-1a_MSN4_Ser558Ala).

3.4 Απομόνωση RNA

3.4.1 Λήψη δειγμάτων για απομόνωση RNA

Ελήφθησαν δείγματα για την απομόνωση RNA από καλλιέργειες των υπό εξέταση στελεχών (W303-1a, W303-1a_MSN4_558) που υπεβλήθησαν σε ανάπτυξη εντός θρεπτικού μέσου YEP που περιείχε 6% v/v αιθανόλη για χρονικό διάστημα 15 min και 16 h. Στις καλλιέργειες παρουσία 6% αιθανόλης, προκειμένου να ληφθεί ικανοποιητική ποσότητα κυττάρων για την περαιτέρω απομόνωση του RNA, τα θρεπτικά μέσα εμβολιάστηκαν με κύτταρα που προέρχονταν από 1,5 ml καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο για τους απαιτούμενους χρόνους.

3.4.2 Απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη

1. Από την καλλιέργεια μεταφέρεται 1.5 ml σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10000 rpm για 3 min στους 4 °C
2. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
3. Αναδιαλύεται το ίζημα των κυττάρων σε 200 μl διαλύματος TES.

Η σύνθεση του TES εμφανίζεται παρακάτω :

- 10 mM 1 M Tris-HCl pH: 7.5
- 10 mM 250 mM EDTA
- 0.5% w/v 10% w/v SDS
- RNase-free H₂O

4. Εν συνεχεία προστίθεται 200 μl όξινη φαινόλη, και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10 sec και επωάζουμε για 60 min σε θερμοκρασία 65 °C με περιστασιακή έντονη ανάδευση.
5. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 min και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4 °C.
6. Η υδατική φάση ~200 μl (επάνω φάση) μεταφέρεται σε νέο errendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl όξινη φαινόλη και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10 sec και επώαση στον πάγο για 5 min. Ακολούθως γίνεται φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5 min στους 4 °C.
7. Επαναλαμβάνεται το βήμα 6, συνεπώς γίνονται δύο εκχυλίσεις με όξινη φαινόλη.
8. Λαμβάνεται η υδατική φάση και τοποθετείται σε νέο errendorf
9. Έπειτα προστίθενται 200 μl χλωροφορμίου (CHCl₃).
10. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10 sec και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5 min στους 4 °C και μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέο Errendorf. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά 2 φορές.
11. Ακολουθεί προσθήκη, στη τελευταία υδατική φάση που συλλέχθηκε, 3 M οξικού νατρίου (CH₃COONa) με pH 5.2 και όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης και 2.5 φορές του όγκου 100% αιθανόλη (EtOH) και επωάζεται για τουλάχιστον 1 h στο πάγο
12. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15 min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500 μl 80 % v/v Αιθανόλης.
13. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση για 5 min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C και απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
14. Το ίζημα αφήνεται για 5 min να στεγνώσει.

15. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl H_2O RNase-free και φυλάσσεται σε θερμοκρασία $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Ακολουθήσε ηλεκτροφόρηση και φωτομέτρηση του δείγματος.

3.5 Κατεργασία δειγμάτων με Dnase-I

3.5.1 Αντιδραστήρια για κατεργασία δειγμάτων με Dnase-I

10 X διάλυμα αντίδρασης:

- 500 mM Tris HCl pH=7.5
- 100 mM MgCl_2 (1M)
- 50 mM CaCl_2 (0,5M)

Μείγμα για αντίδραση με DNase-I (Πίνακας 3.11)

Πίνακας 3.11: Μείγμα για αντίδραση με DNase-I

RNA	10 μl
10 X Buffer	5 μl
DNase	1 μl
H_2O RNase-free	34 μl
ΣΥΝΟΛΟ	50 μl

Επώαση της αντίδρασης για 20 min σε θερμοκρασία $37\text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.2 Διαδικασία απομάκρυνσης της Dnase-I και καθαρισμός του δείγματος

1. Προσθήκη 150 μl H₂O RNase-Free και 200 μl όξινης φαινόλης και έντονη ανάδευση (vortex) για 2 min.
2. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 min και φυγοκέντρωση στις 6000 rpm. για 5min σε θερμοκρασία 4 °C.
3. Μεταφορά της υδατικής φάσης (επάνω) και προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10 sec και φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 5 min στους 4 °C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές.
4. Ακολουθεί προσθήκη, στη τελευταία υδατική φάση που συλλέχθηκε, 3 M οξικού νατρίου (CH₃COONa) με pH 5.2 και όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης και 2.5 φορές του όγκου 100% αιθανόλη (EtOH) και επωάζεται για τουλάχιστον 1 h στο πάγο ή για 15 min σε θερμοκρασία -20 °C.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500 μl 80% v/v αιθανόλης.
6. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρωση για 15 min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C και απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
7. Το ίζημα αφήνεται για 5 min να στεγνώσει.
8. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 25 μl H₂O RNase-Free και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -70 °C.

Ακολουθεί έλεγχος του δείγματος με ηλεκτροφόρηση.

3.6 Real-Time PCR

Οι μελέτη της έκφρασης γονιδίων της ζύμης έγινε με τη χρήση του KAPA SYBR FAST one-step qRT-PCR Kit Universal.

Αφού γίνει αραίωση του RNA (1:100), ελέγχουμε αν έχει καθαριστεί από το DNA. Για τον έλεγχο αυτό σε κάθε αντίδραση προστίθενται τα παρακάτω ακολουθώντας τις οδηγίες της Εταιρείας κατασκευής του kit (Πίνακας 3.12).

Πίνακας 3.12: Σύσταση μείγματος

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	10 μ l
Primer (Elo-1)	0,4 μ l
ROXLow	0,4 μ l
H ₂ O (DNase / RNase-Free)	7.2 μ l
RNA (κατεργασμένο με DNase)	2 μ l
ΣΥΝΟΛΟ	20 μ l

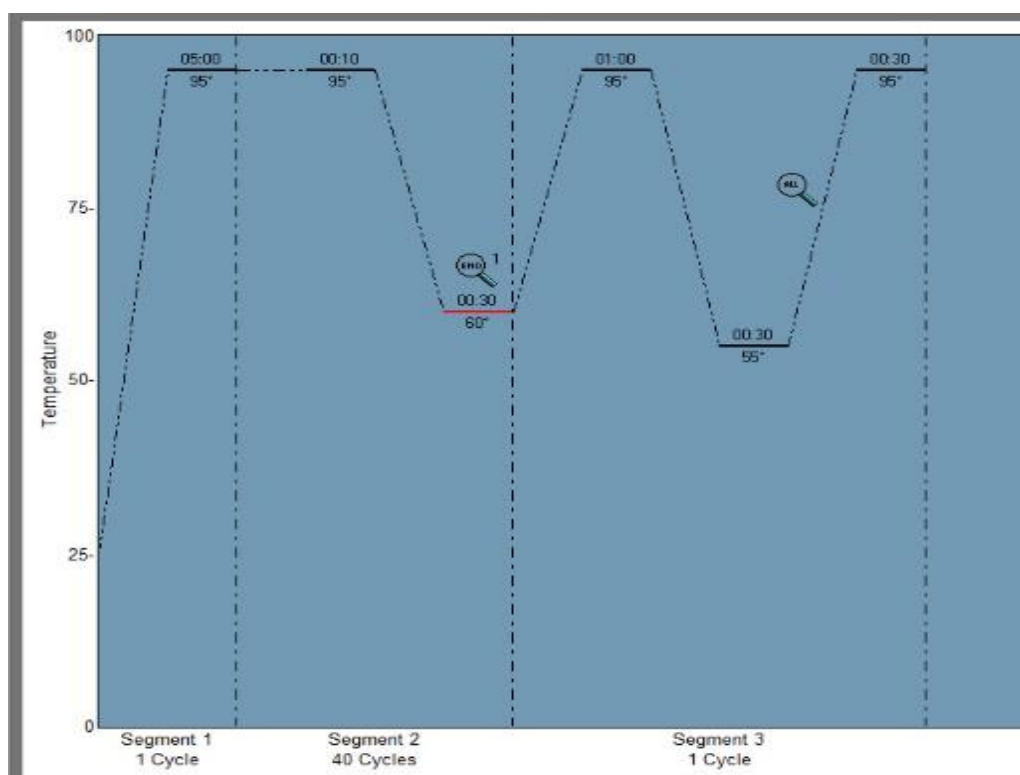
Στη συνέχεια ετοιμάζεται ένα MasterMix (x 25) για την qRT-PCR (Πίνακας 3.13).

Πίνακας 3.13: Master Mix

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	10 μ l
Μείγμα εκκινήτων	0,4 μ l
ROX Low	0,4 μ l
dUTP	0,4 μ l

ΚΑΡΑ RTmix	0,2 μl
H ₂ O (DNase / RNase-Free)	6,6 μl
RNA (κατεργασμένο με DNase)	2 μl
ΣΥΝΟΛΟ	20 μl

Κάθε ένα δείγμα αναλύεται τουλάχιστον δυο φορές (δύο αντιδράσεις) ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία. Ως μείγμα εκκινητών ορίζεται το μείγμα που έχει προκύψει από την ανάμειξη του Forward και του Reverse εκκινητή για κάθε υπό μελέτη γονίδιο. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην μέθοδο της real-time pcr για τα κύτταρα ζύμης w303-1a και του μεταλλαγμένου κυττάρου MSN4_558 για τις συγκεντρώσεις 0% και 6% αιθανόλης για χρονικές περιόδους t=15 min και t=16 h

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να επιτευχθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης Ser558Ala στην *Msn4* πρωτεΐνη, απαιτείται η τροποποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου MSN4 τροποποιώντας την τριπλέτα που αντιστοιχεί στο αμινοξύ Ser558Ala.

4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης

4.1.1 Εισαγωγή μετάλλαξης με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης DPNI

Αρχικά το απομονωθέν πλασμίδιο pUC19_MSN4 χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την δημιουργία του πλασμιδίου pUC19_MSN4_558 με PCR. Χρησιμοποιούνται ως εκκινητές οι MSN4_558_F και MSN4_558_R (Πίνακας 4.1). Το προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μέγεθος ~4200 bp.

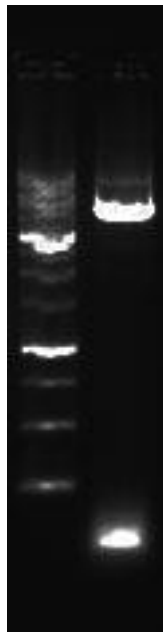
Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια για την PCR

pUC19_MSN4	1 μ l
Primer MSN4_558_F	1 μ l
Primer MSN4_558_R	1 μ l
2x Kapa HiFi Hot Start Ready Mix	12.5 μ l
H ₂ O	9.5 μ l
Σύνολο :	25 μ l

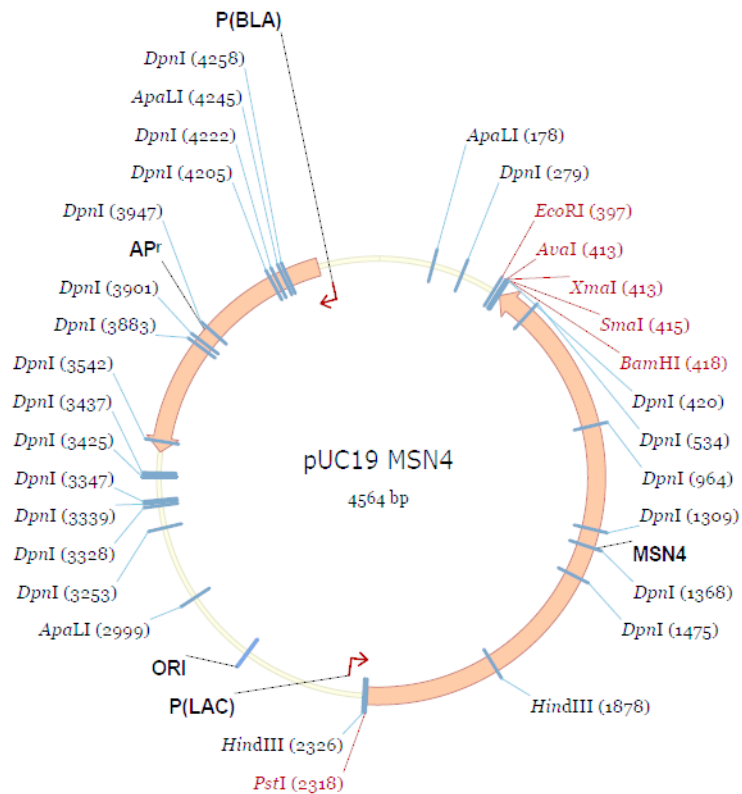
Πρόγραμμα για PCR:

1. 95 °C → 3 min
2. 98 °C → 10 sec
3. 56 °C → 10 sec
4. 72 °C → 2 min 20 sec Βήμα 2, #25
5. 72 °C → 4min
6. 4 °C → ∞

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορεύεται σε gel αγαρόζης 1%, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το προϊόν της PCR



Εικόνα 4.2: Πλασμδιακός χάρτης του pUC-19_MSN4 και οι θέσεις πέψης του ενζύμου Dpn-I

Από το προϊόν αυτό της PCR 10 μl θα υποβληθούν σε πέψη με το ένζυμο Dpn-I (Εικόνα 4.2).

Πίνακας 4.2: Το προϊόν της PCR υποβάλλεται σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Dpn-I.

Προϊόν PCR	10 μl
<i>Dpn-I</i>	1 μl
H ₂ O	10 μl

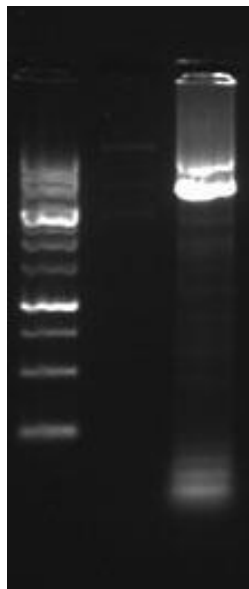
Επώαση στους 37 °C για 4 h.

Στο εκμαγείο που χρησιμοποιούμε PUC19_MSN4 υπάρχουν κάποιες Dpn-I θέσεις στις οποίες υπάρχουν μεθυλώσεις διότι το πλασμίδιο αυτό έχει

απομονωθεί από βακτήρια. Το προϊόν της παραπάνω PCR παρόλο που φέρει ακριβώς τις ίδιες θέσεις δράσης του ενζύμου Dpn-I δεν υπάρχουν μεθυλιώσεις διότι κατά την PCR δεν συμβαίνουν μεθυλιώσεις.

Η Dpn-I δρα μόνο επί μεθυλιωμένου DNA ενώ το μη μεθυλιωμένο μένει ανέπαφο. Το αποτέλεσμα είναι το εκμαγείο DNA που δεν φέρει την μετάλλαξη να καταστραφεί ενώ το προϊόν που φέρει την μετάλλαξη να αφήνεται ανέπαφο διότι δεν είναι μεθυλιωμένο.

Η ακεραιότητα των προϊόντων της πέψης ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το πλασμίδιο pUC19-MSN4 και στην θέση 3 το προϊόν της PCR ύστερα από πέψη όπου παρατηρούνται διάφορα τμήματα DNA μικρότερου μεγέθους από το κύριο προϊόν της PCR, ως προϊόντα της πέψης

Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων 2 μl του προϊόντος της αντίδρασης και ακολούθησε τοποθέτηση αυτών επί στερεού θρεπτικού μέσου LB παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (100 μg/ml) για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με το pUC19_MSN4_Ser_558_Ala από εκείνα που δεν μετασχηματίστηκαν. Ο μετασχηματισμός έγινε χρησιμοποιώντας ως δείγμα ελέγχου, εκμαγείο της PCR (pUC19_MSN4) το οποίο προηγουμένως έχει υποβληθεί σε πέψη με την

περιοριστική ενδονουκλεάση Dpn-I (Πίνακας 4.3 Πίνακας 4.3: Αντιδραστήρια για την δημιουργία δείγματος control (εκμαγείου + Dpn-I) και επώαση για 4 ώρες στους 37) και το οποίο δεν έδωσε καμία αποικία μετά τον μετασχηματισμό, όπως άλλωστε αναμένονταν.

Πίνακας 4.3: Αντιδραστήρια για την δημιουργία δείγματος control (εκμαγείου + Dpn-I) και επώαση για 4 ώρες στους 37

ρUC19_MSN4	10 μl
Dpn-I	2 μl
H ₂ O	10 μl

Μικρός αριθμός αποικιών χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου LB και επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα ακολουθεί η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες με τη μέθοδο βρασμού και έλεγχος της παρουσίας του αναμενόμενου πλασμιδίου με την πέψη του με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

4.1.2 Ενσωμάτωση γενετικά τροποποιημένου γονιδίου MSN4_558 σε κύτταρα ζύμης

Προκειμένου να εισαχθεί η γενετικά τροποποιημένη μορφή του MSN4 γονιδίου (MSN4_558) στα κύτταρα ζύμης απαιτείται η ενίσχυσή του με PCR (Πίνακας 4.4), προκειμένου το προϊόν της PCR να αποκτήσει τις κατάλληλες αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η εισαγωγή του στο γενομικό DNA της ζύμης μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι MSN4-F και MSN4-R. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο ρUC19_MSN4_558. Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται το μεταλλαγμένο γονίδιο της MSN4 το οποίο έχει ίδια άκρα με την περιοχή που εντοπίζεται στο γενομικό DNA της ζύμης (αγρίου τύπου).

Πίνακας 4.4: Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου *MSN4* που φέρει την μετάλλαξη

DNA (pUC19_MSN4_558)	2 μ l
Primer MSN4_EGFD_F	1 μ l
Primer MSN4_R	1 μ l
2x Kapa HiFi Hot Start Ready Mix	10 μ l
H ₂ O	6 μ l
Σύνολο :	20 μ l

Πρόγραμμα PCR :

1. 95 \rightarrow 3 min
2. 98 \rightarrow 10 sec
3. 56 \rightarrow 10 sec
4. 72 \rightarrow 1 min 20 sec, Βήμα 2, #25
5. 72 \rightarrow 5 min
6. 4 \rightarrow ∞

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέον γονιδίου MSN4-Ser558Ala προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του.

Το προϊόν αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για μετασχηματισμό στα κύτταρα ζύμης ώστε να προκύψει το στέλεχος W303-1a που θα φέρει τη μετάλλαξη Ser_558_Ala της πρωτεΐνης *Msn4*.

4.2 Εισαγωγή μεταλλαγμένης μορφής *Msn4* στα κύτταρα ζύμης

Κατά το δεύτερο μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης που ακολουθεί, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου *MSN4-Ser-558-Ala* στη ζύμη, η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με τον πρώτο μετασχηματισμό, μόνο που σαν DNA αυτή τη φορά χρησιμοποιείται το *MSN4_Ser558Ala* και το στερεό θρεπτικό μέσο όπου γίνεται η επίστρωση είναι το SC+URA+5-FOA. Η επώαση γίνεται στους 30 °C.



Εικόνα 4.6: Αποικίες της μετασχηματισμένης ζύμης σε τρυβλίο SC+URA+5-FOA

Αφού η ανάπτυξη των αποικιών της μετασχηματισμένης ζύμης είναι επαρκής στα τρυβλία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6 γίνεται μεταφορά των αποικιών και καλλιέργεια αυτών σε υγρό θρεπτικό μέσο SC+URA+5-FOA. Η επώαση γίνεται στους 30 °C υπό ανάδευση. Από τις καλλιέργειες αυτές γίνεται απομόνωση του γενομικού DNA τους με τη μέθοδο απομόνωσης γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης.

Ο έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού αυτού γίνεται στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν με την χρήση της PCR που περιγράφεται

στον Πίνακα 4.5 και Πίνακα 4.6. Τα αποτελέσματα γίνονται εμφανή στην ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης (Εικόνα 4.7). Σε αυτή την PCR αναμένεται να εμφανίσουν προϊόν μόνο το δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου) που περιέχει το γονίδιο MSN4 και τα δείγματα ελέγχου, στα οποία έχει πετύχει ο ομόλογος ανασυνδυασμός και δεν περιέχουν το γονίδιο URA3 πλέον, αλλά το γονίδιο *MSN4_Ser558Ala*. Το μόνο δείγμα που δεν εμφανίζει προϊόν στην ηλεκτροφόρηση είναι αυτό που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN4 εντός του γονιδιώματος της ζύμης (Εικόνα 4.8). Τα δείγματα τα οποία έχουν δεχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο *MSN4_Ser558Ala* γίνονται stock και φυλάσσονται στους -80 °C. Τοποθετήθηκε το δείγμα DNA να γίνει PCR και με τους primers της MSN2 και MSN4.

Πίνακας 4.5: Αντιδραστήρια για την PCR με primers της MSN2

Αντιδραστήρια	Ποσότητες / αντίδραση	Master Mix (x8)
DNA	2	-
5XKAPA HIFI Buffer (Fidelity)	4	32
10 mM KAPA dNTP mix	0.6	4.8
MSN2_EGFP_F	0.6	4.8
MSN2_REVERSE	0.6	4.8
KAPA HIFI hot start polymerase	0.4	3.2

H ₂ O	11.8	94.4
------------------	------	------

Πίνακας 4.6: Αντιδραστήρια για την PCR με primers της MSN4

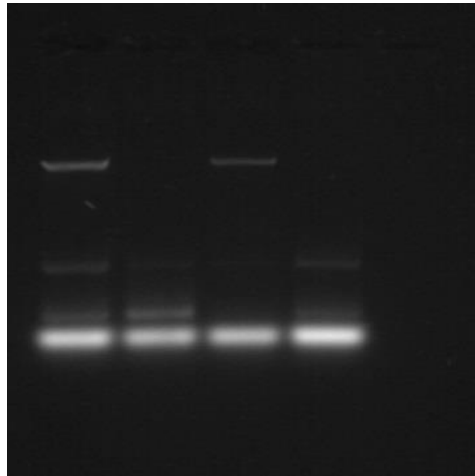
Αντιδραστήρια	Ποσότητες / αντίδραση	Master Mix (x8)
DNA	2	-
5x KAPA HIFI Buffer (Fidelity)	4	32
10 mM KAPA dNTP mix	0.6	4.8
MSN4_EGFP_F	0.6	4.8
MSN4_REVERSE	0.6	4.8
KAPA HIFI hot start polymerase	0.4	3.2
H ₂ O	11.8	94.4

Σε κάθε ένα από τα erpendorf τοποθετήθηκαν 18 μl από το MasterMix.

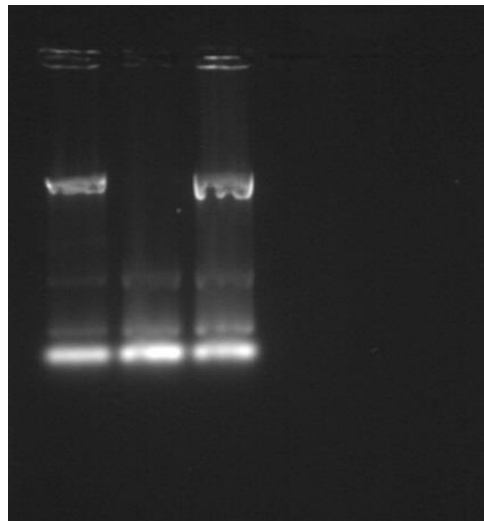
Πρόγραμμα PCR

1. 95°C 3'
2. 98°C 15''
3. 65°C 15''
4. 72°C 1' 10'' →2 #30

5. 72⁰C 2'
6. 4⁰C ∞



Εικόνα 4.7: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται το προϊόν PCR με εκμαγείο το γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου (δείγμα ελέγχου), στην θέση 2 βρίσκεται 1ο δείγμα DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην θέση 3 βρίσκεται 2ο δείγμα DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην θέση 4 βρίσκεται 3ο δείγμα DNA μετασχηματισμένης ζύμης.



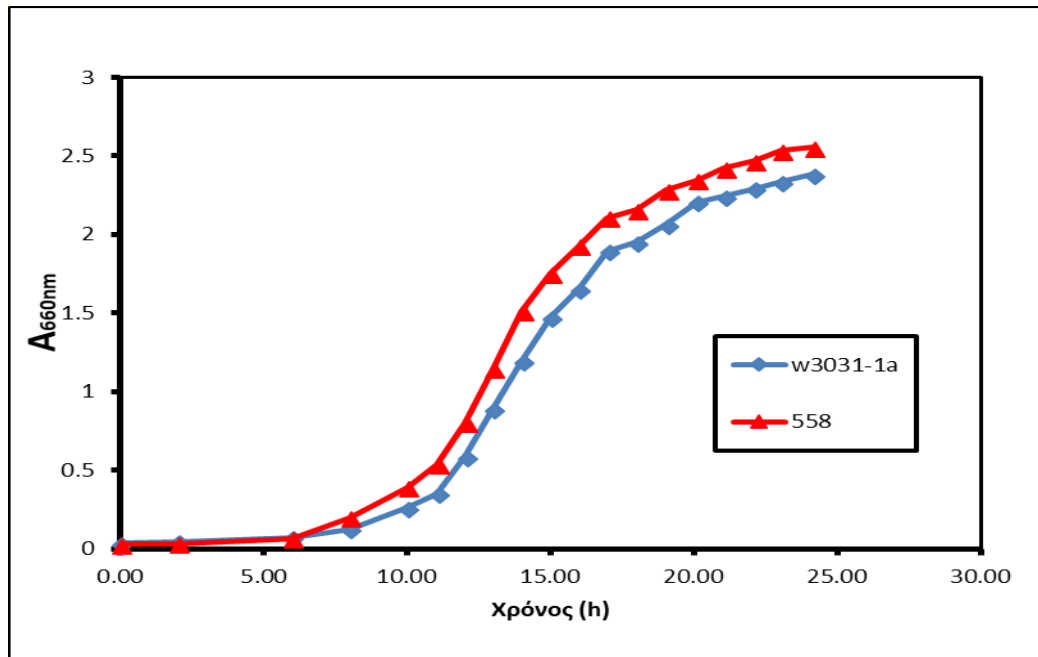
Εικόνα 4.8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 2ου μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου (δείγμα ελέγχου), στην θέση 2 βρίσκεται το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN4 εντός του γονιδιώματος της ζύμης και στην θέση 3 βρίσκεται το επιτυχές γενομικό DNA μετασχηματισμένης ζύμης.

4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης

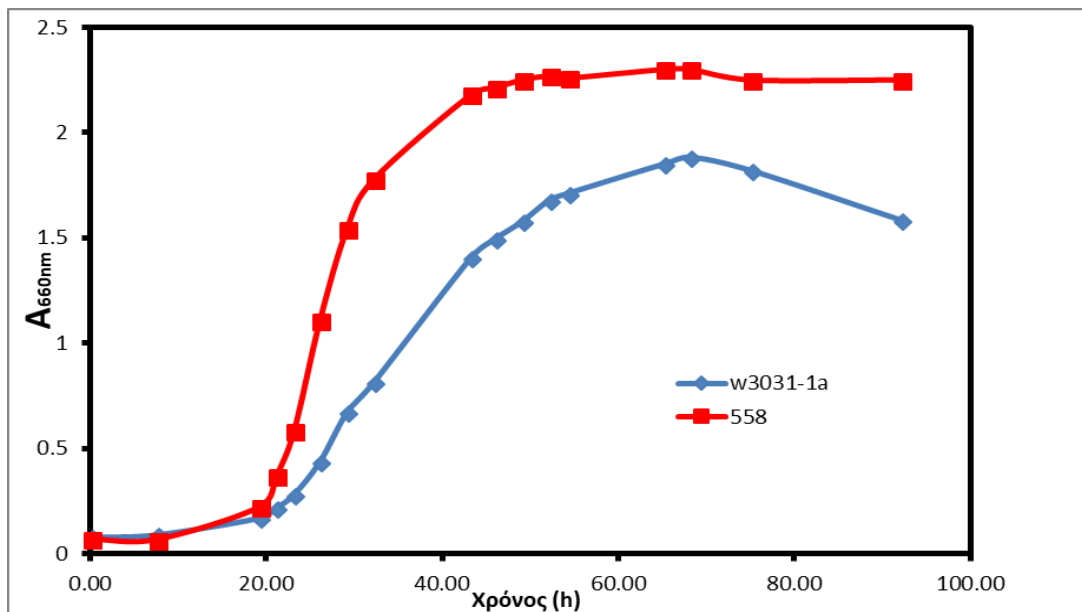
Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a-MSN4_558) σε συνθήκες stress, επιλέχθηκε ως παράγοντας μελέτης η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του σακχαρομύκητα.

4.3.1 Καμπύλες ανάπτυξης

Μετά από μελέτη που έγινε για την ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser558Ala επί της πρωτεΐνης *Msn4* του ζυμομύκητα μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του στα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης. Σε χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (3%) η συγκεκριμένη γενετική τροποποίηση δεν φαίνεται να διαφοροποιεί την ικανότητα ανάπτυξης του ζυμομύκητα (Εικόνα 4.9). Αντιθέτως, παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης αιθανόλης (6% v/v) η γενετική τροποποίηση *Ser558Ala* επί του μεταγραφικού παράγοντα *Msn4* προσδίδει στον ζυμομύκητα τόσο την ικανότητα ταχύτερου ρυθμού ανάπτυξης, όσο και ανάπτυξη σε μεγαλύτερο βαθμό και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9: καμπύλη ανάπτυξης του *S. Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 3% v/v αιθανόλης

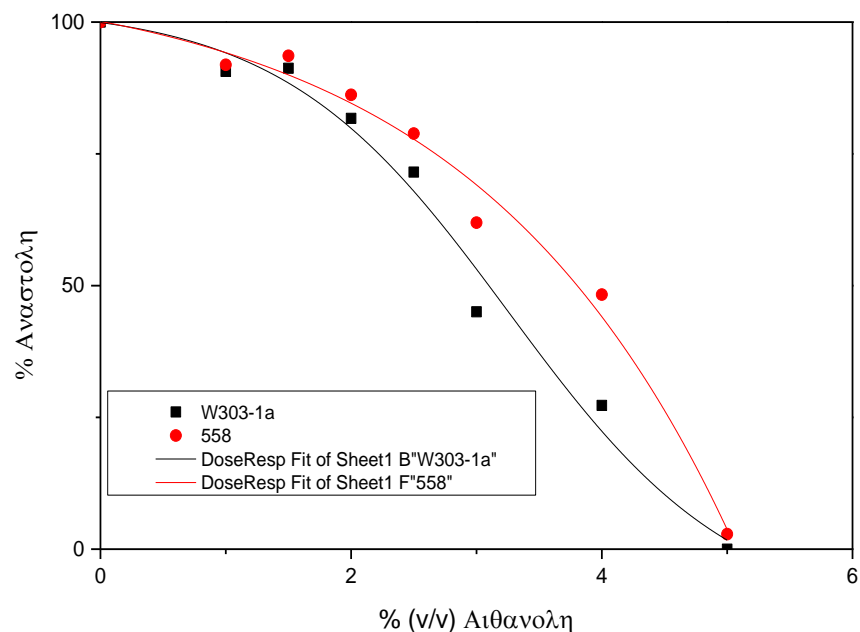


Εικόνα 4.10: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 6% v/v αιθανόλης

4.4 Αναστολή ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης - Προσδιορισμός IC₅₀

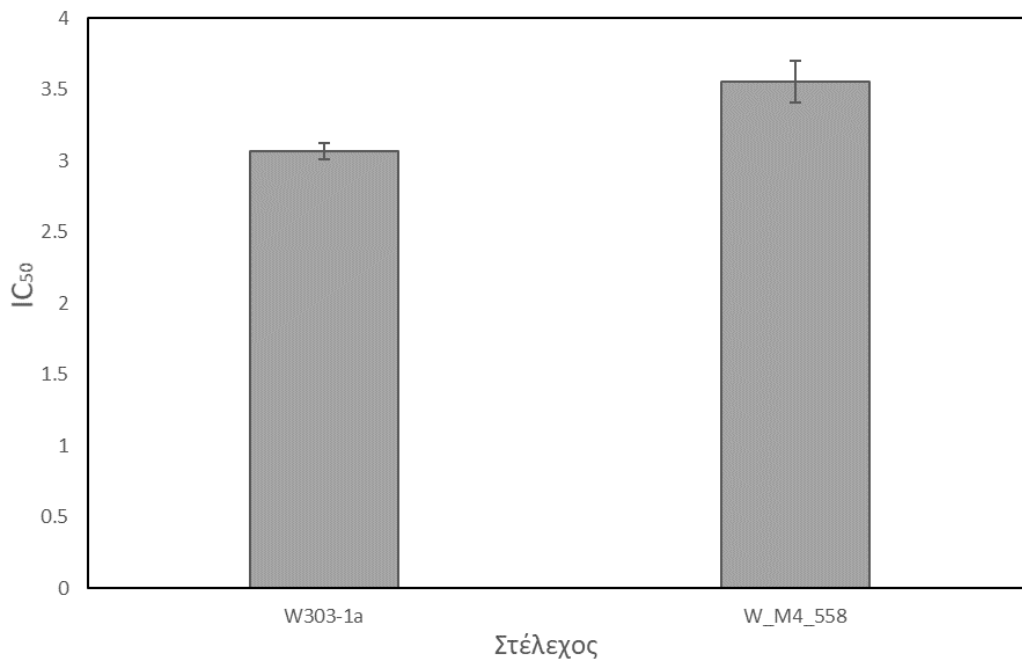
Προκειμένου να ελεγχθεί η αναστολή ανάπτυξης κυττάρων παρουσία

αιθανόλης τα κύτταρα του αγρίου τύπου και του γενετικά τροποποιημένου στελέχους χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό θρεπτικών μέσων διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης. Μετά την επώαση για ~16 h στους 30 °C μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών σε μήκος κύματος 660 nm προκειμένου να προσδιοριστεί η έκταση της ανάπτυξής τους. Η γραφική παράσταση των μετρούμενων τιμών οπτικής απορρόφησης έναντι των διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης, μετά από σιγμοειδή σύγκλιση (Εικόνα 4.11) έδειξε ότι 50% αναστολή της ανάπτυξης (IC_{50}) για το αγρίου τύπου στέλεχος επιτυγχάνεται παρουσία 3,06% v/v αιθανόλη ενώ για το στέλεχος που φέρει την μετάλλαξη Ser558Ala επί του μεταγραφικού παράγοντα Msn4 η τιμή IC_{50} είναι 3,55% (v/v).



Εικόνα 4.11: Γραφική απεικόνιση της % αναστολής της ανάπτυξης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης

Οι υπολογισμοί αυτοί προήλθαν από την επεξεργασία 5 διαφορετικών πειραμάτων και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 4.12)

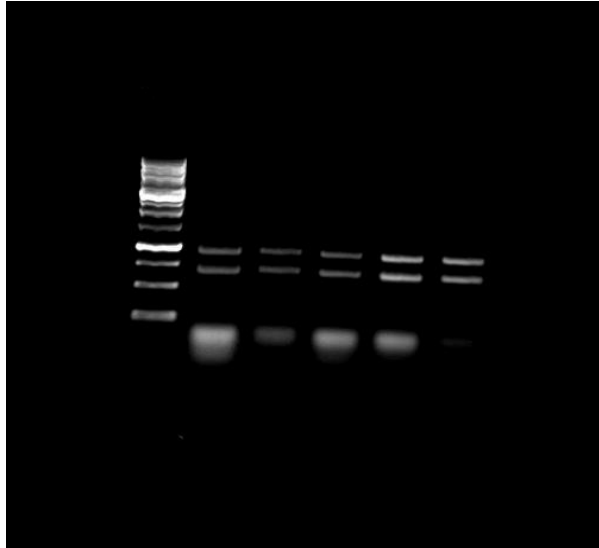


Εικόνα 4.12: Γραφική απεικόνιση των συγκεντρώσεων αιθανόλης που επιτυγχάνεται 50% αναστολή της ανάπτυξης για κάθε στέλεχος. Η εμφανιζόμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική αφού το εφαρμοζόμενο student's t-test έδειξε ότι $p < 0.05$.

4.5 Real Time PCR

4.5.1 Απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη

Μετά την διαδικασία της απομόνωσης του RNA από τα στελέχη w303/-1a και w303-1a_MS4_558 στις επιθυμητές συγκεντρώσεις αιθανόλης, στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα $t=15$ min και $t=16$ h περιμένουμε να δούμε την ακεραιότητα των προϊόντων της απομόνωσης. Η ακεραιότητά τους ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Περιμένοντας την εμφάνιση των δυο χαρακτηριστικών κύριων μεταγραφμάτων του ριβοσωμικού rRNA. Η εικόνα Εικόνα 4.13 είναι μια ενδεικτική εικόνα που εμφανίζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης RNA.

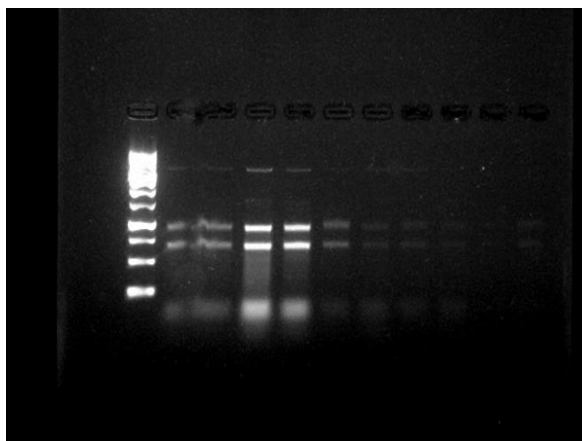


Εικόνα 4.13: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της απομόνωσης του ριβονουκλεϊκού οξέος με όξινη φαινόλη σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το w303-1a και στη θέση 3 βρίσκεται το 558 για t=15min.

Ακριβώς η ίδια διαδικασία εμφάνισης των αποτελεσμάτων της απομόνωσης του RNA με όξινη φαινόλη έχει γίνει για όλα τα προϊόντα (w303-1a και 558 των απαιτούμενων συγκεντρώσεων και χρόνων) και έχει γίνει η παραλαβή των αποτελεσμάτων (αντιπροσωπευτικές εικόνες με εμφανή τα προϊόντα) ώστε να συνεχιστεί η μελέτη των γονιδίων.

4.5.2 Κατεργασία δειγμάτων με Dnase-I

Η συνέχεια της μελέτης γίνεται με την κατεργασία των δειγμάτων με Dnases-I. Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζονται με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης με την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1,5%. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων γίνεται με εμφάνιση 2 παράλληλων μπάντων που αντιπροσωπεύει την ποσότητα των προϊόντων και η αναμενόμενη παρουσίαση τους γίνεται σε ποσότητα 3.000 έως 2.000 bp. Η Εικόνα 4.14 είναι ενδεικτική εικόνα που εμφανίζει τα αποτελέσματα της κατεργασίας με Dnases-I στον απαιτούμενο χρόνο και με την αναμενόμενη ποσότητα καθαρού ριβονουκλεϊκού οξέος.



Εικόνα 4.14: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της κατεργασίας δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 και 7 βρίσκεται το προϊόν w303-1a για T=0h και T=16 h αντίστοιχα. Στην θέση 3,8 βρίσκεται το προϊόν 558 για T=0 h και T=16 h σε συγκέντρωση αντίστοιχα.

4.5.3 Μελέτη του μεταλλαγμένου γονιδίου ως προς την έκφραση των γονιδίων με την μέθοδο της Real-Time(RT) PCR

Προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση γονιδίων στο μεταλλαγμένο στέλεχος ser633a1a, έχουν χρησιμοποιηθεί δείγματα για την διεξαγωγή Real-Time (RT) PCR. Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα: ΗΧΚ1, ΕΛΟ1, ΤDΗ1, ΑΛD4. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ΑΛG9.

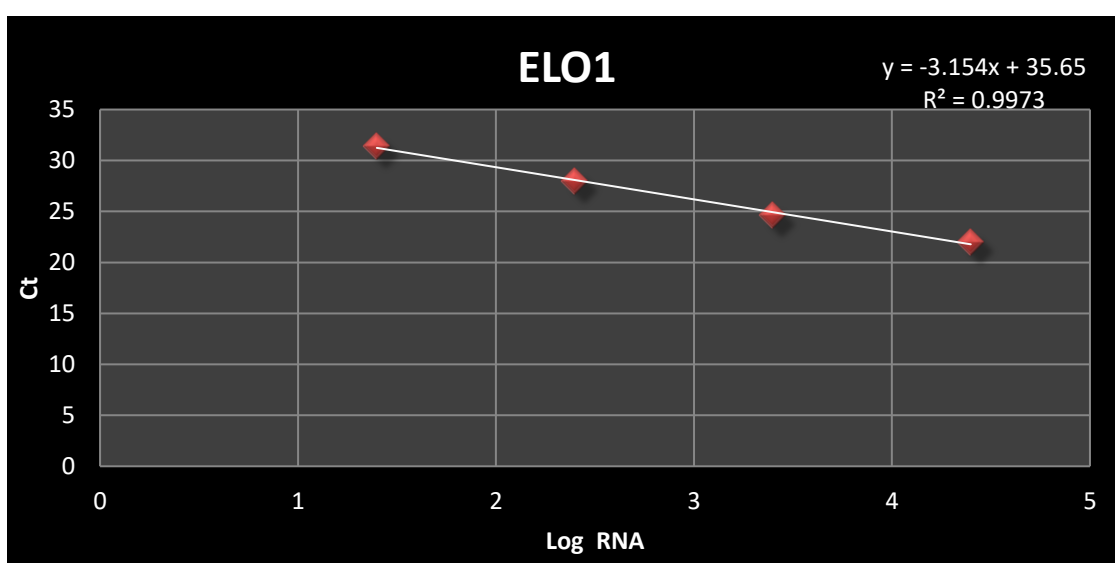
4.5.4 Διαδικασία επεξεργασίας υπολογισμών της Real-Time PCR

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο ΑΛG9 ως γονίδιο αναφοράς για να διορθώσει διαφορές που οφείλονται σε διακυμάνσεις στις αρχικές ποσότητες των δειγμάτων, στα ποσοστά ανάκτησης των νουκλεϊκών οξέων, στη φόρτωση των δειγμάτων ή σφάλματα κατά την διαδικασία διεξαγωγής του πειράματος.

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η

τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

Προκειμένου να είναι εφικτή η ποσοτικοποίησης γονιδιακής έκφρασης μέσω της Real-Time PCR θα πρέπει πρώτα να δημιουργήσουμε πρότυπες καμπύλες για το γονίδιο αναφοράς (ALG9) αλλά και για όλα υπό εξέταση. Όλες οι πρότυπες καμπύλες έχουν τη μορφή που εμφανίζεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γονιδίου. Στο κατακόρυφο άξονα καταγράφονται οι τιμές του Ct (threshold cycle) και στον οριζόντιο άξονα βρίσκονται οι τιμές των συγκεντρώσεων του γονιδίου σε λογαριθμική μορφή. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο γραμμικός συσχετισμός των δυο τιμών με την βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων.

Μέσω της πρότυπης καμπύλης που αντιστοιχεί σε κάθε γονίδιο υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA η οποία στη συνέχεια διαιρείται με την συγκέντρωση του γονιδίου.

4.5.5. Τα υπό μελέτη γονίδια

Τα γονίδια τα οποία μελετώνται είναι τα εξής:

- ALG 9

Γενικά θεωρείται ότι η έκφρασή του παραμένει σταθερή και για αυτό το χρησιμοποιούμε ως γονίδιο αναφοράς.

- ELO 1

Κύρια πρωτεΐνη του μηχανισμού επιμήκυνσης μέσου μήκους αλυσίδας λιπαρών οξέων Δεσμεύει λιπαρά οξέα με μέγεθος αλειφατικής αλυσίδας μέσου μήκους (12-16 άτομα άνθρακα) με τη μορφή των άκυλο-CoA, κατά την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, και με την προσθήκη μηλότυλο-CoA τα μετατρέπει σε λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (14-18 άτομα άνθρακα). Φαίνεται ότι αυξάνεται η έκφραση του παρουσία αιθανόλης. Αυτή αύξηση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των μακριάς αλύσου λιπαρών οξέων που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης παρουσία της αιθανόλης.

- ALD4

Το κάλιο θέτει σε λειτουργία την αφυδρογονάση αλδεΐδης που εμπλέκεται στο σχηματισμό οξικού οξέος κατά τη διάρκεια αναερόβιας ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη. Εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και αποτελεί μηχανισμό προστασίας του κυττάρου από την τοξική ακεταλδεΐδη που παράγεται από το πυροσταφυλικό αλλά ανταγωνίζεται το σχηματισμό αιθανόλης.

- HXK 1

Η εξοκινάση-I είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στην πορεία της γλυκόλυσης και καταλύει την φωσφορυλίωση της γλυκόζης κατά τον μεταβολισμό της. Η έκφρασή της και η ενεργοποίηση της διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην εκκίνηση του καταβολισμού των εξοζών και ιδιαιτέρως της γλυκόζης.

- TDH 1

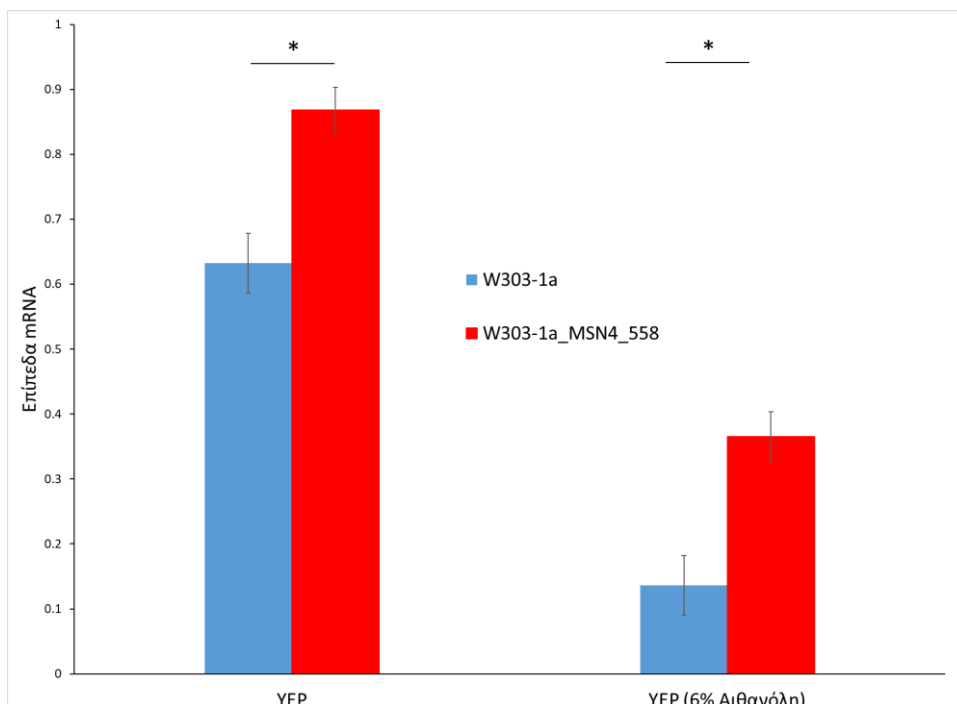
Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης η οποία συμμετέχει στην πορεία της γλυκόλυσης οξειδώνοντας την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη σε 3-φώσφο-γλυκερικό.

4.5.4.1. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους για χρόνο $t=0\text{min}$

Από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετώνται στην παρούσα εργασία μεταξύ του αγρίου τύπου στελέχους ζύμης (w303-1a) και του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της Msn4 πρωτεΐνης (w303-1a_MSN4_558) για χρόνο έκθεσης $t=15\text{ min}$ σε θρεπτικό υλικό YEP περιεκτικότητας σε γλυκόζη 2% w/v, 15% w/v και σε θρεπτικό υλικό YEP περιεκτικότητας 2% w/v σε γλυκόζη και 6% v/v σε αιθανόλη ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

ELO1

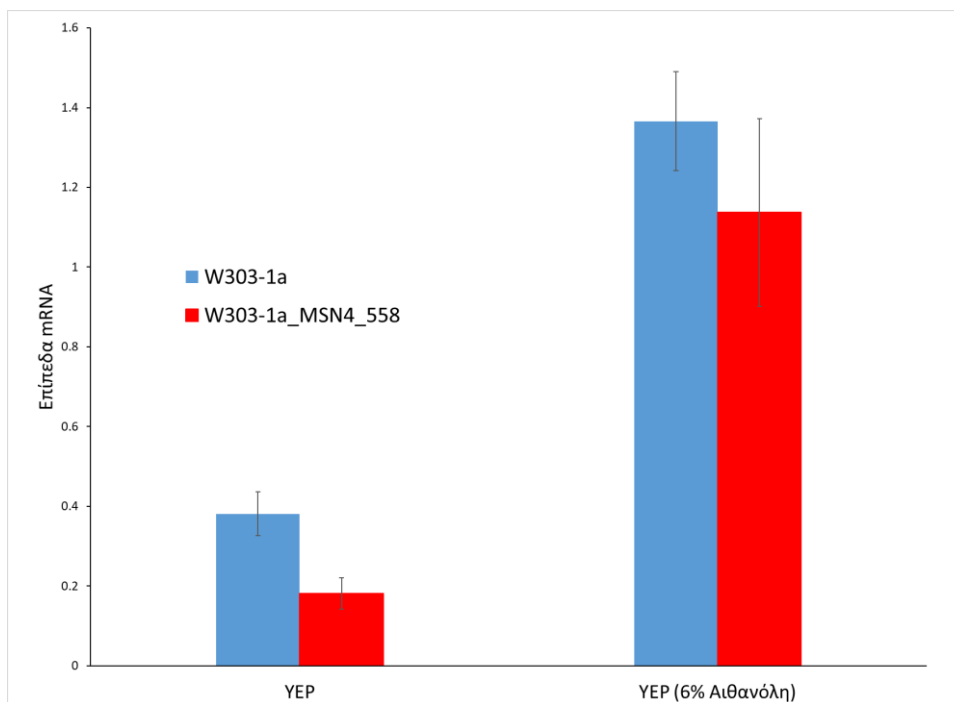
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της Msn4, ακόμα και όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15 min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2% w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης), και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 6% v/v αιθανόλης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δυο περιπτώσεις (Εικόνα 4.16). Το γεγονός αυτό πιθανόν να συμβάλει στην αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης που εμφανίζει το υπό μελέτη στέλεχος.



Εικόνα 4.16: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN4_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15$ min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).

ALD4

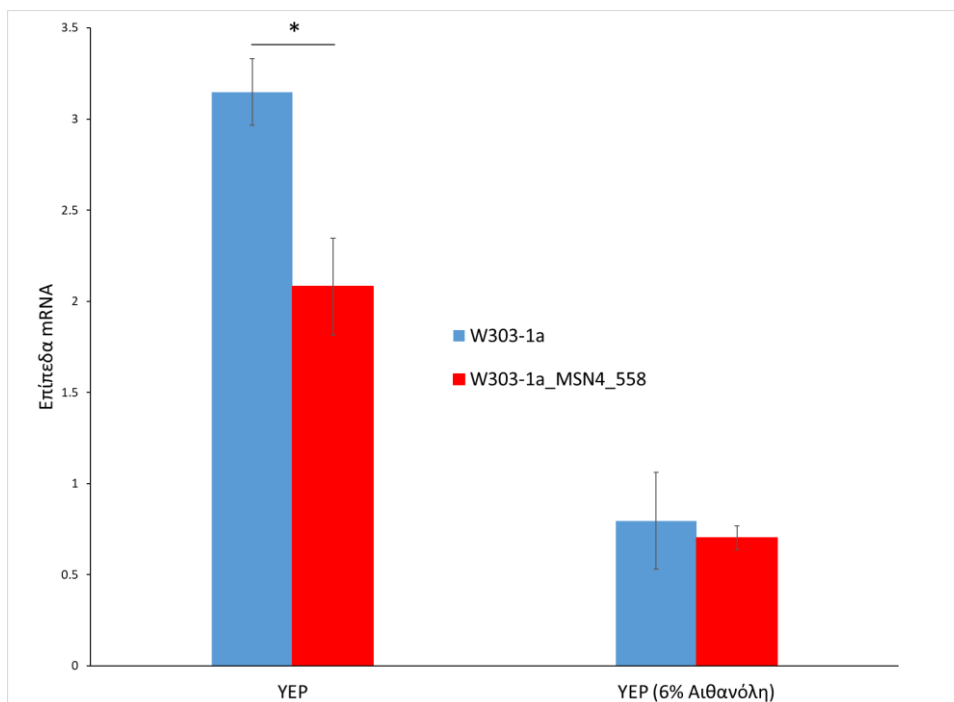
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά με την παρουσία της μετάλλαξης Ser558Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15 min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2% w/v γλυκόζη, αλλά και σε YEP με 2% w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης (Εικόνα 4.17).



Εικόνα 4.17: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=0$ min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$).

HKX1

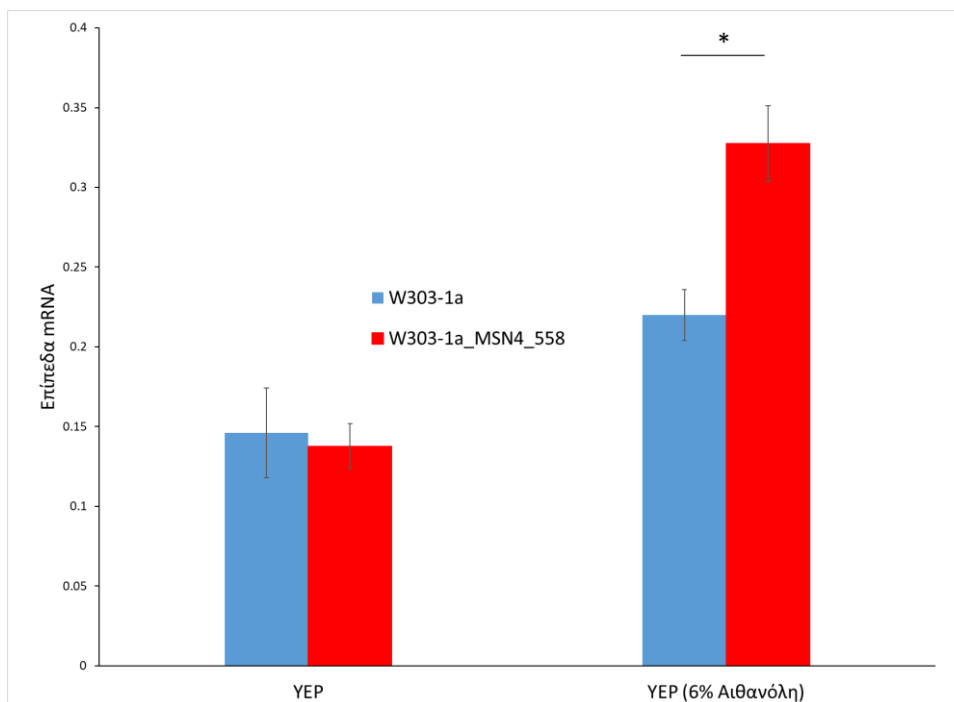
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HKX1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15 min σε θρεπτικό υλικό YEP με 15% w/v γλυκόζη ενώ η έκθεση του σε YEP με 2% w/v γλυκόζη παρουσία 6% αιθανόλης δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του μελετούμενου γονιδίου (Εικόνα 4.18). Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της HKX1 παρουσία της αιθανόλης πιθανόν να αντανακλά μειωμένη ενεργοποίηση της πορείας της γλυκόλυσης.



Εικόνα 4.18: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15$ min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$)

TDH1

Τα επίπεδα mRNA του ετέρου ενζύμου που συμμετέχει στη γλυκόλυση, την αλδολάση TDH1, το οποίο συμβάλει στην διατήρηση της οξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου, φαίνονται στατιστικά σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15 min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2% w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Η παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης πιθανότατα προάγει την ρύθμιση του οξειδωτικού φορτίου του κυττάρου και συνάδει με την αυξημένη ανθεκτικότητα του κυττάρου στην αιθανόλη (Εικόνα 4.19).



Εικόνα 4.19: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15$ min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$).

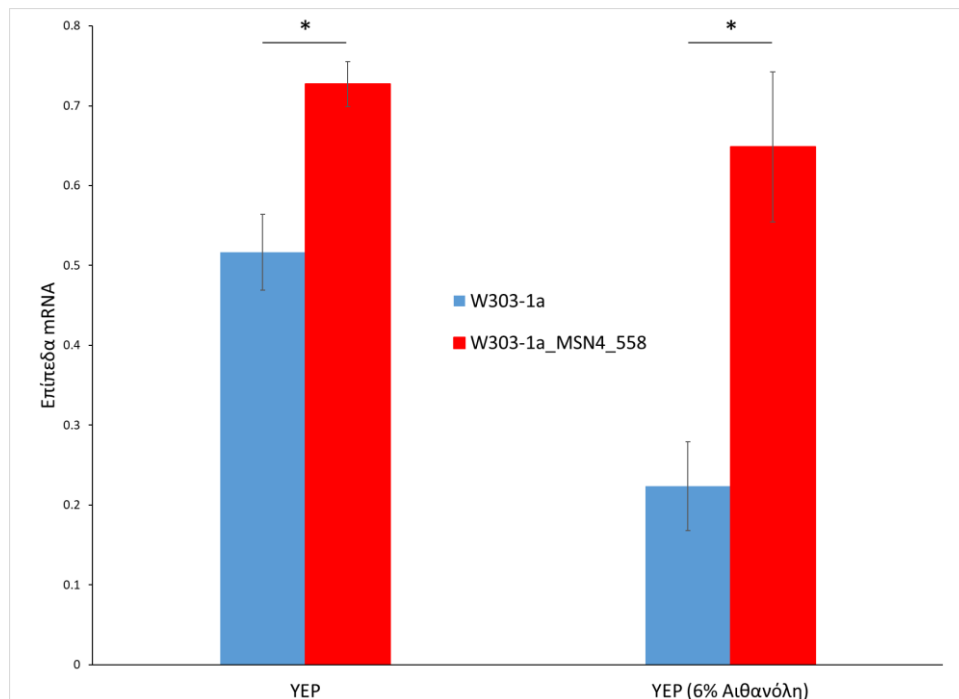
4.5.4.2. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους για χρόνο $t=16$ h

Στην συνέχεια, εμφανίζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στο αγρίου τύπου στέλεχος w303-1a και το στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 με την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου για χρονικό διάστημα έκθεσης $t=16$ h σε καθορισμένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης (2%, γλυκόζη, 6% αιθανόλη).

ELO1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της πρωτεΐνης Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 ωρών σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 6% αιθανόλης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της

έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 4.20). Η παρατηρούμενη αύξηση πιθανόν να αντανάκλα την αυξημένη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακρίας αλύσου που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης όταν εκτεθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αυτή.

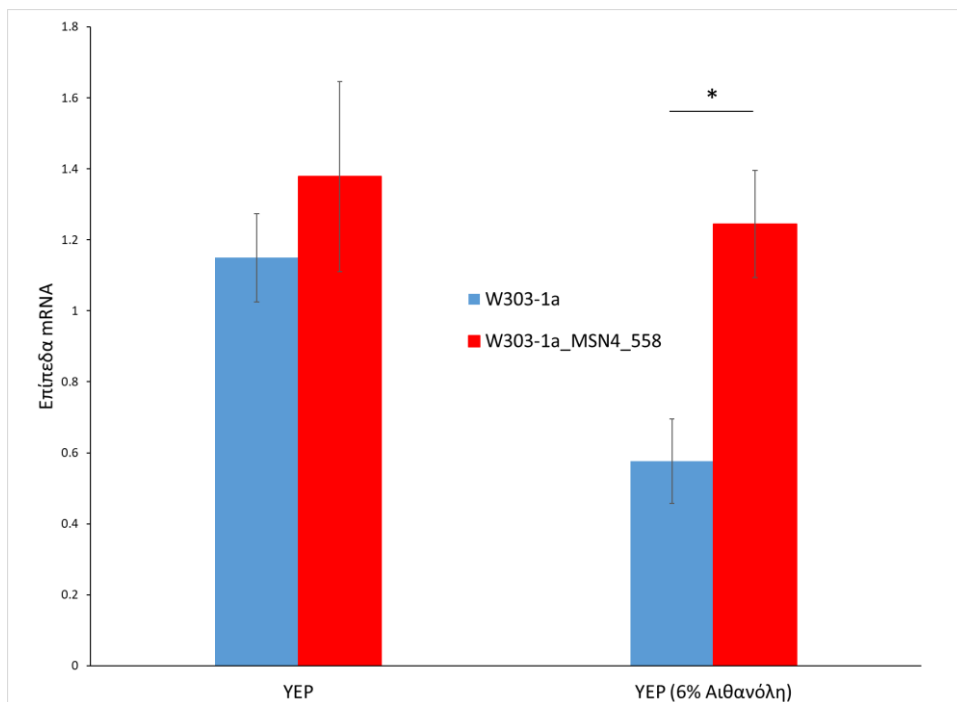


Εικόνα 4.20: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16 h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

ALD4

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά στατιστικώς αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 h σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 6% v/v αιθανόλη

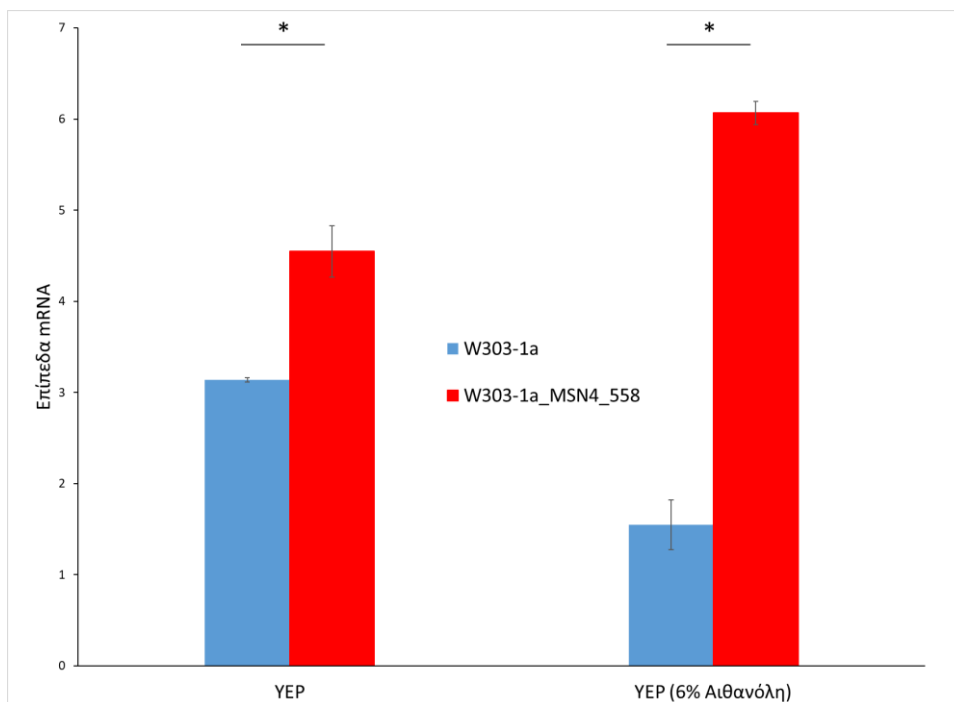
(Εικόνα 4.21). Η παρατηρούμενη αύξηση πιθανόν να έχει συμβάλει στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου.



Εικόνα 4.21: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16 h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

HKK1

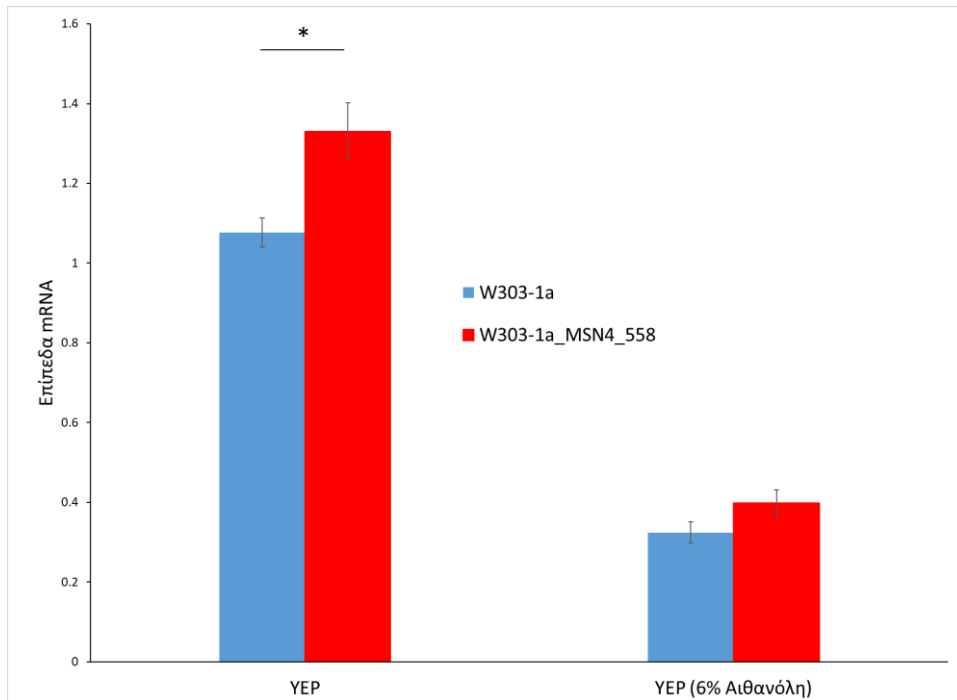
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HKK1 φαίνεται ότι είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, και στα δυο θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 4.22). Η εμφανιζόμενη αύξηση των επιπέδων της εξοκινάσης-1 πιθανόν να υποδηλώνει καλύτερη λειτουργία του συγκεκριμένου στελέχους παρουσία αιθανόλης.



Εικόνα 4.22: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16 h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

TDH1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 φαίνεται ότι είναι αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 h απουσία της αιθανόλης ενώ παρουσία αυτής δεν εμφανίζονται διαφορές (Εικόνα 4.23). Η παρουσία λοιπόν της υπό μελέτη μετάλλαξης δεν επηρεάζει τα επίπεδα της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης παρουσία αιθανόλης.



Εικόνα 4.23: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_558) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16 h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η κατασκευή ενός στελέχους ζύμης που θα φέρει την γενετική τροποποίηση Ser558Ala επί του μεταγραφικού παράγοντα Msn4. Η αντικατάσταση του συγκεκριμένου αμινοξέος έγινε με γνώμονα την *insilico* μελέτη πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης του από την πρωτεϊνική κινάση A. Ακολούθως το νέο στέλεχος που δημιουργήθηκε μελετήθηκε ως προς την ικανότητά του να αναπτύσσεται παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αιθανόλης και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης που επιφέρει 50% αναστολή της ανάπτυξης IC₅₀. Το συγκεκριμένο στέλεχος επέδειξε αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης αφού η τιμή IC₅₀ που υπολογίστηκε ήταν 3,55 v/v έναντι 3,06 v/v του αγρίου τύπου στελέχους.

Ακολούθως έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των επιπέδων συγκεκριμένων γονιδίων που έχει δειχθεί ότι η έκφρασή τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης με σκοπό αφ' ενός την μελέτη της έκφρασης αυτών των γονιδίων και αφ' εταίρου την πιθανή συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την εμφανιζόμενη αύξηση της ανθεκτικότητας στην αιθανόλη κατά την αερόβια ανάπτυξη που εμφανίζει το στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser558Ala επί του μεταγραφικού παράγοντα Msn4. Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ELO1, ALD4 και HXK1 για μακροχρόνια έκθεση σε 6% v/v αιθανόλη (t=16 h) πιθανόν να συσχετίζεται θετικά με την αύξηση της ανθεκτικότητας του γενετικά τροποποιημένου στελέχους αφού η πρωτεΐνη Elo1 έχει βρεθεί ότι πιθανόν να συμβάλει στην ακεραιότητα και ανθεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης έναντι της αιθανόλης, η πρωτεΐνη Ald4 συμβάλει στην ρύθμιση και διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου και η Hxk1 αποτελεί ένα από τα κύρια σημεία ελέγχου της γλυκόλυσης όπου ο ζυμομύκητας όχι μόνο παράγει αιθανόλη αλλά και αντλεί ενέργεια προκειμένου να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες ανάπτυξης αλλά και επιβίωσης υπό αντίξοες συνθήκες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

Βαρζάκας Χ.Θ., Αρβανιτογιάννης Ι. (2006). Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Βερβερίδης Φ. (2003). Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών. ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο. Σελ. 60-66.

Λαζανάκη Β. (2010). Η χρήση της Real-Time PCR για την Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Στελεχών Βακτηρίου (*Escherichia Coli*). Διπλωματική Εργασία, Ηράκλειο Κρήτης.

Μπαμπίλης Ν. και Οικονόμου Κ. (2001). Βιοχημεία Γ' Γενικού Λυκείου –Τεχνολογικής κατεύθυνσης: Κύκλος Τεχνολογίας και Παραγωγής. Αθήνα: Πατάκης.

Μπατρίνου Α.Μ. (2011). Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων-γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης.

Μπέλκα Α. (2007). Επίδραση υπολειμάτων φυτοφαρμάκων στη βιοχημική συμπεριφορά στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη.

Παπανικολάου Β. (2006). Μέθοδοι και Υλικά Ακινητοποίησης Βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου. Πάτρα: s.n.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). *msn2p* and *msn4p* control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 180, pp. 1044–1052.

- Brewster J.L., De Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*. vol. 259 pp. 1760-1763.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Goodday G.W. (2001). *The Fungi*. 2nd rd. London: Academic Press.
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24, pp. 469–486.
- Estruch F. and Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 3872–3881.
- Gancedo J.M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., StorzG., Botstein D., Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 11, pp. 4241–4257.
- GlazerA.N. and Nikaido H. (1995). *Microbial Biotechnology – Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*, 21, pp. 135–144.
- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the *msn2/4* transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*. vol. 249 pp.127-138.
- Hunt M. (2006). Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina.

- Jackson R.S. (1994). Wine Science-Principles and applications. Carolina: Academic Press.
- Jing L., Chunhua L., Wei X., Dongxia Y., Gang W., Linxin M. (2007). Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and Dpn-I digestion of the plasmid template in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 373. pp. 389-391.
- Kammann M., Laufs J., Schell J. and Gronenborn B. (1989). *Nucleic Acids Res.*, 17. pp. 5404.
- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/*msn2,4*-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*, 13, pp. 771–781.
- Landt O., Grunert H.P. and Hahn U. (1990). *Gene*, 96. pp. 125–128.
- Lee P., Cho B.R., Joo H.S., Hahn J.S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and *msn2/msn4*. *Mol Microbiol*, 70, pp. 882–895.
- Marechal P.A., Gervais P. (1994). Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 42 pp. 617-622.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and Estruch F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger protein *msn2p* and *msn4p* are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15, pp. 2227–2235.
- Meikle A.J., Reed R.H., Gadd G.M. (1988). Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. vol. 134 pp. 3049-3060.

- PCR Primer- A laboratory manual Cold Spring Harbor Press (1995). pp 603-611.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985). *Science*, 230. pp. 1350–1354.
- Santangelo G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1990). *Bio Techniques*, 8. pp. 404–407.
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1992). *Nucleic Acids Res.*, 20. pp. 4937–4938
- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). *msn2p*, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, pp. 5777–5782.
- Schuller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruis H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO Journal*. vol. 13 pp. 4382-4389.
- Smith A., Ward M.P. and Garrett S. (1998). Yeast PKA represses *msn2p/msn4p* dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17, pp. 3556–3564.
- Thevelein J.M. and Winde J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904–918.
- VandenLangenberg B. (2012). Baker's and Brewer's Yeast. Available at: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/vandenla_beth/contact.htm.
- Walker G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons.

You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and environmental microbiology*.