

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser582Ala ΕΠΙ
ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ msn2 ΤΟΥ
ΖΥΜΟΜΗΚΥΤΑ
Saccharomyces cerevisiae»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΑΜΙΑΝΑΚΗ ΜΑΡΙΑ ΕΛΕΝΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser582Ala ΕΠΙ
ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ msn2 ΤΟΥ
ΖΥΜΟΜΗΚΥΤΑ
Saccharomyces cerevisiae»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΑΜΙΑΝΑΚΗ ΜΑΡΙΑ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δρ. ΒΑΜΒΑΚΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ-ΣΠΥΡΙΔΩΝ

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 του Οκτωβρίου 2015 έως το Νοέμβριο 2016 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Βαμβακά Σωτηρίου Σπυρίδωνος.

Ολοκληρώνοντας, 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 ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε όλα τα άτομα που δούλεψαν μαζί μου στο εργαστήριο και συνέβαλαν ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η πτυχιακή 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 σακχαρομύκητα *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 συνθήκες και η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες.

Έτσι, η βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων 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 *msn2* 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 *msn2* στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της *msn2* πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα του κυττάρου.

Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της *msn2* με κατάλληλο λογισμικό αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της *msn2* από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 582.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία στελέχους ζύμης το οποίο φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί του γονιδίου MSN2 και η μετέπειτα μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης, στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress όπως η παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αιθανόλης, προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποκάλυψη του ρόλου του αμινοξέος στη συγκεκριμένη θέση και τέλος η διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρια διεργασίες.

Λέξεις κλειδιά : Ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, *msn2*, κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, αλκοολική ζύμωση, PCR, απάντηση στο stress, μεταγραφικός παράγοντας, realtime PCR

ABSTRACT

Yeasts are important in food industry *Saccharomyces cerevisiae* is the most common yeast used in distillery and also has been used as 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. *S.cerevisiae* is rapidly growth in aerobic conditions and in anaerobic conditions it efficiently produces ethanol.

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

When the cell exposed to stress conditions, transcription factor *msn2* is activated via phosphorylation by various protein kinases in order to enter the cell nucleus, where it controls the expression of genes that help cell to respond stress. At the same time the translocation of *msn2* to nucleus is also controlled and inhibited by protein kinase A (PKA) phosphorylation.

In silico protein sequence analysis of *msn2* revealed that a potential crucial site of phosphorylation of *msn2* by PKA, is the amino acid residue Serine at position 582.

This study aims to the creation of a yeast strain carrying the mutation Ser582Ala on MSN2 gene, subsequent study of the effect of this mutation, in yeast response to stress conditions. The growth ability of the mutated strain under the presence of ethanol was evaluated. Gene expression of genes that their expression are altered by the presence of ethanol and play an important role in several intracellular processes was also investigated.

Keywords: Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *msn2*, site-directed mutagenesis, alcohol fermentation, PCR, stress response, transcription factor, real time PCR.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Λίγα λόγια για τους ζυμομύκητες	10
1.2 Το γένος <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και η επικράτησή του.....	10
1.3 Προσαρμογή του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στο εκάστοτε περιβάλλον.....	11
1.4 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> υπό συνθήκες στρες.....	13
1.5 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον.....	15
1.5.1 Η επίδραση της αιθανόλης.....	16
1.5.2 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.....	17
1.5.3 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	18
1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR)).....	18
1.6.1 Αρχή λειτουργίας αντίδρασης PCR.....	18
1.6.2 Στάδια Κύκλου PCR.....	19
1.6.3 Εκκινητές και DNA πολυμεράση.....	20
1.6.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.....	22
1.7 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR.....	23
1.7.1 Μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου <i>DpnI</i>	23
1.8 Εισαγωγή της μετάλλαξης στη ζύμη.....	25
1.9 Η ροή της γενετικής πληροφορίας.....	26
1.10 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	27
1.10.1 Αρχή της μεθόδου.....	27
1.10.2 Στάδια της Real-Time PCR.....	28
1.10.4 Πλεονεκτήματα της real-time PCR.....	32
1.10.5 Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων.....	33
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	34
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1 Υλικά.....	35
3.1.1 Αντιδραστήρια κι εκκινητές.....	35
3.1.2 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.....	40
3.2 Πειραματικές Πορείες.....	44
3.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης.....	44
3.2.2 Καθαρισμός προϊόντων PCR με το kit Gel & PCR clean up.....	44

3.2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. Coli με το kit Nucleospin plasmid.....	45
3.2.4 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό	46
3.2.5 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων.....	47
3.2.6 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού.....	47
3.2.7 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (High efficiency transformation of yeast cells).	48
3.2.8 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v – Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων.	49
3.2.9 Μεταφορά αποικιών με την διαδικασία <i>replica</i>	50
3.2.10 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων.....	50
3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	50
3.4 Καμπύλες αναστολής της ανάπτυξης κυττάρων ζύμης από την αιθανόλη	51
3.5 Συλλογή δειγμάτων για απομόνωση RNA.....	51
3.5.1 Απομόνωση RNA	51
3.5.2 Επεξεργασία RNA δειγμάτων με DNase-I.	52
3.5.3 Ηλεκτροφόρηση RNA	53
3.6 Real-timePCR	54
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης	56
4.1.1 Πέψη με το ένζυμο DpnI.....	56
4.2 Μετασχηματισμός και Ομόλογος Ανασυνδυασμός.....	62
4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress.....	63
4.3.1 Παρουσία αιθανόλης.....	63
4.3.2 Αναστολή της ανάπτυξης.....	64
4.4 Απομόνωση RNA.....	65
4.4.1 Κατεργασία δειγμάτων RNA με DNase-I.....	66
4.4.2 Μελέτη της έκφρασης γονιδίων με Real-Time (RT)PCR.....	67
4.4.3 Υπολογισμοί ποσοτικοποίησης της RealTimePCR	67
4.4.4 Τα υπό μελέτη γονίδια	68
4.5 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων για χρόνος=15min.....	69
4.5.1 ELO1.....	69
4.5.2 ALD4	70
4.5.3 TDH1	71
4.5.4 XK1.....	72
4.6 Αποτελέσματα γονιδίων της RealTimePCR για t=16h.....	73

4.6.1 ELO1.....	73
4.6.2 ALD4	74
4.6.3 TDH1	75
4.6.4 HXK1.....	76
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λίγα λόγια για τους ζυμομύκητες

Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων και 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 αλλά και λόγω της ικανότητάς 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 ευρύτερα 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 Το γένος *Saccharomyces cerevisiae* και η επικράτησή του

Η ονομασία «*Saccharomyces*», μπορεί να διασπαστεί σε δύο λατινικές λέξεις, "*Saccharo*", που σημαίνει ζάχαρη και "*myces*", που σημαίνει μύκητας, ενώ «*cerevisiae*», σημαίνει μύρα, επομένως, μπορεί να μεταφραστεί ως ο "σακχαρούχος μύκητας της μύρας" (VandenLangernberg, 2012).

Αποτελεί το δημοφιλέστερο και με τις περισσότερες εφαρμογές ζυμομύκητα. Είναι μονοκύτταρος και μονοπύρηνος μικροοργανισμός με μήκος κυττάρου 5-10nm.

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

Βασίλειο: Μύκητες

Φύλλο: Μυκόφυτα

Κλάση: Ασκομύκητες

Οικογένεια: *Saccharomycetaceae*

Είδος: *Saccharomyces cerevisiae*

Το είδος *S.cerevisiae*, αποτελεί τον σημαντικότερο μικροοργανισμό που λαμβάνει χώρα στην αλκοολική ζύμωση. Η επικράτησή του οφείλεται σε πολλούς παράγοντες . Το σημαντικότερο του όμως πλεονέκτημα είναι η ταχεία παραγωγή αιθανόλης.

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 παραγωγής 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* στο εκάστοτε περιβάλλον

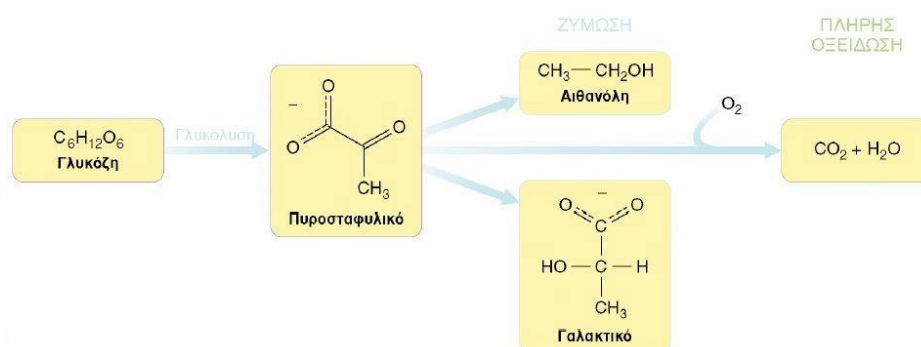
Η αύξηση των ζυμών εξαρτάται απόλυτα από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον γύρω τους. Έτσι, ανάλογα με τις εξωκυτταρικές συνθήκες, οι ζύμες, σαν προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μπορούν να αποκτήσουν την απαραίτητη για την αύξησή τους ενέργεια μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών. Μπορούν 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 πιο από τα δύο μονοπάτια θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο (Carlile *et al.*,2001).

Ως γλυκόλυση νοείται η αλληλουχία των αντιδράσεων στην οποία μετατρέπεται η γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και είναι ανεξάρτητη της παρουσίας του

οξυγόνου. 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 δυο μόρια NADH ή διαφορετικά καταναλώνονται δυο μόρια NAD^+ .

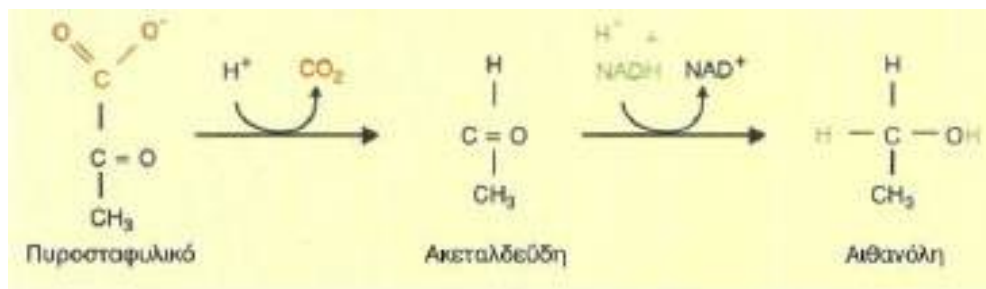
Υπό αερόβιες συνθήκες το NADH που σχηματίζεται κατά την γλυκόλυση μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στο O_2 μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το NAD^+ . Κάτω από αναερόβιες συνθήκες το NAD^+ αναγεννάται κατά τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος ή της αιθανόλης από το πυροσταφυλικό (σχ.1.1). Αυτές οι δύο διεργασίες ονομάζονται ζυμώσεις και συντελούνται σε μερικούς μικροοργανισμούς (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001).



Σχήμα 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 (σχ.1.2).



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

1.4 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του *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) διαδραματίζει 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

φωσφορυλίωσή 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) (σχ.1,3).

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.

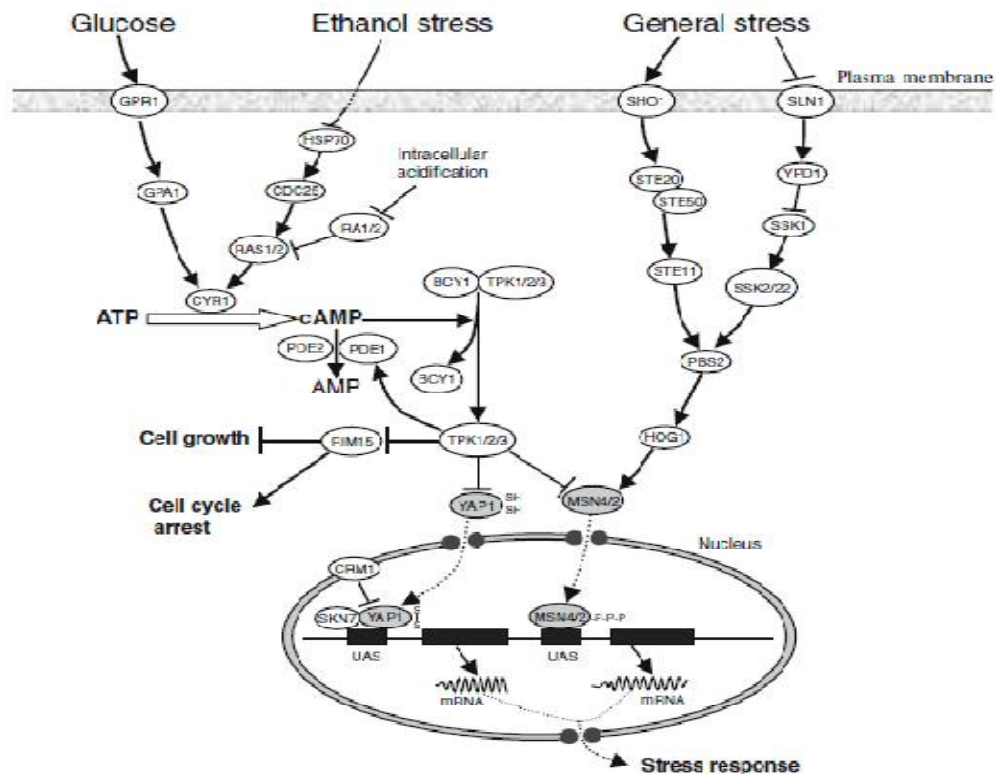
Οι *msn2* και *msn4* είναι δύο ομόλογες, κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική απόκριση σε συνθήκες stress, μεταγράφοντας εκατοντάδες γονίδια μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Görner *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2002; Kandrór *et al.*, 2004).

Η ενεργοποίησή τους συμβαίνει μέσω φωσφορυλίωσης από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως και ο έλεγχος της εισόδου τους στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της *msn2* πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της *msn2* στον πυρήνα του κυττάρου. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες στρες τότε αναστέλλεται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *msn2* από την PKA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την είσοδό της στο πυρήνα του κυττάρου και κατ' επέκταση την ρύθμιση της έκφρασης 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). (σχ.1.3)

Προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά κατάλοιπα αμινοξέων επί της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της *msn2* τα οποία φωσφορυλιώνονται από την PKA,

διεξήχθη ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με κατάλληλο λογισμικό και αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της *msn2* από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 582.



Σχήμα 1.3: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες stress λόγω της γλυκόζης, της αιθανόλης και των γενετικών περιβαλλοντικών συνθηκών στον *S. cerevisiae*. Σκιασμένοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι γραμμές που καταλήγουν με ένα βέλος δείχνουν θετική αλληλεπίδραση, και αυτές που καταλήγουν με μια κάθετη προς το βέλος γραμμή δείχνουν αρνητική αλληλεπίδραση. Αυτό το διάγραμμα προσαρμόζεται με βάση τους Colombo et al. (1998), Estruch (2000), Costa και Moradas-Ferreira (2001), Hohmann (2002), Müller et al. (2003), και Nikolaou et al. (2009).

1.5 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον

Στρεσογόνοι παράγοντες είναι αυτοί οι οποίοι εμποδίζουν τη ζύμη να λειτουργήσει και να αναπτυχθεί βέλτιστα. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες.

1. Φυσικοί παράγοντες

Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υψηλή θερμοκρασία, η ωσμωτική πίεση, η 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, η ωσμωτική πίεση κι η θερμοκρασία.

1.5.1Η επίδραση της αιθανόλης.

Η αιθανόλη είναι μια άκρως τοξική ουσία για τα κύτταρα και 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 αμινοξέων και 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 τη θανάτωση 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. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται μερικοί πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στο ζυμομύκητα.



Σχήμα 1.4: Πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στον *S.cerevisiae* (Walker, 1998)

1.5.2 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης

Έχει παρατηρηθεί (Walker, 1998) ότι η ικανότητα των στελεχών του *S.cerevisiae* να πραγματοποιούν αλκοολική ζύμωση παραμένει υψηλή ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η ικανότητα αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της ενεργότητας της ιμπερτάσης, ενός ενζύμου που εκκρίνει ο σακχαρομύκητας για να υδρολύσει την σακχαρόζη. Με τη διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, η ωσμωτική πίεση αυξάνεται και ως εκ τούτου παρουσιάζονται δυσκολίες στην έκβαση της αλκοολικής ζύμωσης.

Η έκθεση των στελεχών του *S. cerevisiae* σε υψηλές τιμές ωσμωτικής πίεσης έχει σαν αποτέλεσμα τη ταχεία ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου, λόγω εκροής νερού. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί μέρος ενός συνόλου πολύπλοκων αντιδράσεων (Marechal and Gervais, 1994; Meikle *et al.*, 1988). Ωστόσο, η παρουσία της

γλυκερόλης στο μέσο, μιας ουσίας που παράγεται φυσικά ως δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζυμώσεως, εξισορροπεί την μερικώς ωσμωτική πίεση. Σε περιπτώσεις αυξημένης ωσμωτικής πίεσης, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων που δίνουν σήμα για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκερο-πυροσταφυλική ζύμωση (Brewster *et al.*, 1993; Schuller *et al.*, 1994; Hirayama *et al.*, 1995).

1.5.3 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα. Οι ζυμομύκητες μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, που εάν δεν βρίσκεται η θερμοκρασία σε αυτές τις τιμές μπορεί να προκληθεί κυτταρικός θάνατος.

Η βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης για τα περισσότερα στελέχη είναι 20-30 °C, ενώ έχουν αναφερθεί βασικές αποκλίσεις σε στελέχη άγριων ζυμών. Η μέγιστη θερμοκρασία κυτταρικής ανάπτυξης, παρουσιάζει διακύμανση σε εύρος από 35-43 °C. Ανάλογα με τις θερμοκρασίες κυτταρικής ανάπτυξης γίνεται κατηγοριοποίηση των ζυμών σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες και θερμόφιλες.

Κατά το χειρισμό και τη χρήση των κυττάρων ζύμης είναι προτιμότερο να αποφεύγονται οι απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την εισαγωγή των κυττάρων σε κατάσταση σοκ.(Walker, 1998).

1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR))

1.6.1 Αρχή λειτουργίας αντίδρασης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler) (εικ. 1.1). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να επιτυγχάνεται ταχύτατη εναλλαγή θερμοκρασιών (Βερβερίδης, 2003).



Εικόνα 1.1: Θερμικός κυκλοποιητής(thermocycler)

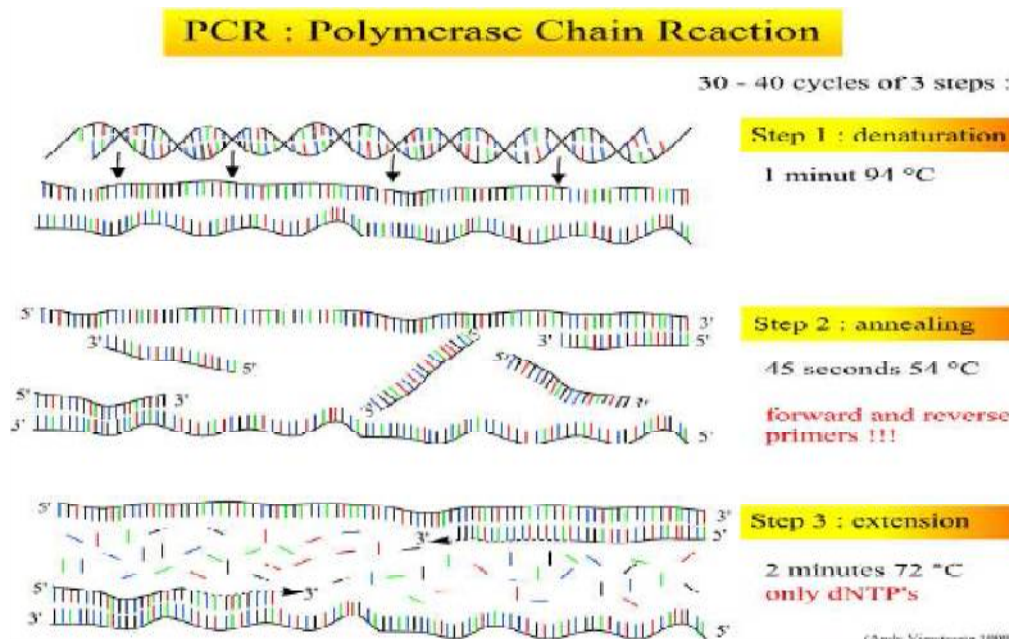
1.6.2 Στάδια Κύκλου PCR

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο της αντίδρασης PCR είναι τα εξής:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation).
- 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου.
- 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).

Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία τουλάχιστον 94°C προσκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Σχ. 1.4). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Σχήμα 1.4). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών

αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (σχ.1.5).



Σχήμα 1.5: Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Στάδιο1 (Step 1):Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): Ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension).

1.6.3 Εκκινητές και DNA πολυμεράση

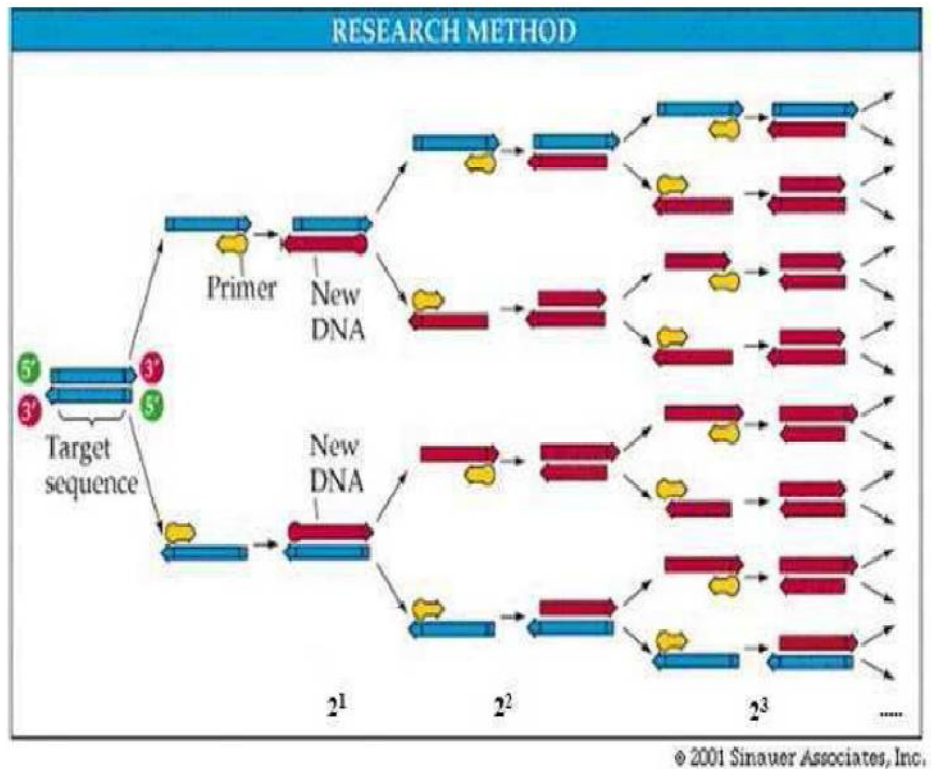
Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές (primers) είναι ολιγονουκλεοτιδία και έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA, αφορούν τις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράση την σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος και έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

Η **DNA πολυμεράση (Taqpolymerase)** είναι το ένζυμο που συνθέτει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα που θα είναι συμπληρωτική της προεπιλεγόμενης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτιδία σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτιδία από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή (Bergetal, 2002). Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermusaquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-

80°C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστικότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη πιστότητα. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreadingactivity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι' αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Bergetal, 2002)

Το διάλυμα της αντίδρασης τηςPCR εκτός των άλλων περιέχει επίσης και: τα dNTP's τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotidetriphosphates) που είναι απαραίτητα νουκλεοτίδια (ATP, TTP, CTP και GTP) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) που απαιτούνται για την εμφάνιση της ενζυμικής δραστικότητας της DNA πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Η διαδικασία της PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε αρκετούς κύκλους, συνήθως όμως 30 με 40 κύκλοι είναι αρκετοί για να συντεθούν εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA και τα αντίγραφα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο. (Λαζανάκη 2010) (σχ.1.6).



Σχήμα 1.6: Παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας της μεθόδου και εκθετικού πολλαπλασιασμού των προϊόντων.

1.6.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή του Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν δεσμεύεται με το DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στη κίνηση του DNA, που είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε πήκτωμα αγαρόζης. Όλα τα μόρια του DNA κινούνται προς την άνοδο δηλαδή τον θετικό πόλο. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει της δυσκολίας που έχουν τα μόρια να κινηθούν μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Όσο πιο μεγάλο είναι το μόριο τόσο πιο πολύ δυσκολεύεται να κινηθεί, οπότε τόσο πιο αργά κινείται.

1.7 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR

1.7.1 Μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου *DpnI*.

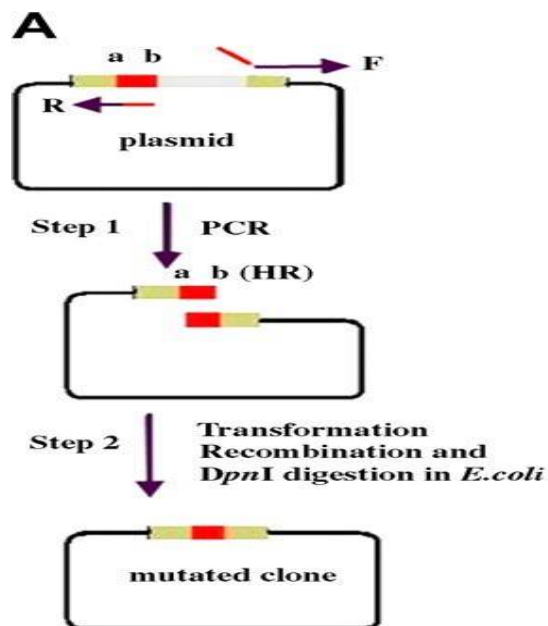
Το ένζυμο *DpnI* αναγνωρίζει και πέπτει πλήρως μεθυλιωμένο τμήμα DNA αφήνοντας παράλληλα ανέπαφο το μη-μεθυλιωμένο DNA. Με βάση αυτή την προσέγγιση, αναπτύχθηκε μία μέθοδος ταχείας μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας μια διπλή έλικα DNA ως εκμαγείο που απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα και πέψη με το ένζυμο *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 *DpnI* αναλόγως με το επιθυμητό αποτέλεσμα τα στάδια που ακολουθούνται με αυτή την μέθοδο είναι τα εξής (σχ.1.7,1.8):

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 1.10. 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 με PCR 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*. (σχ.1.7)

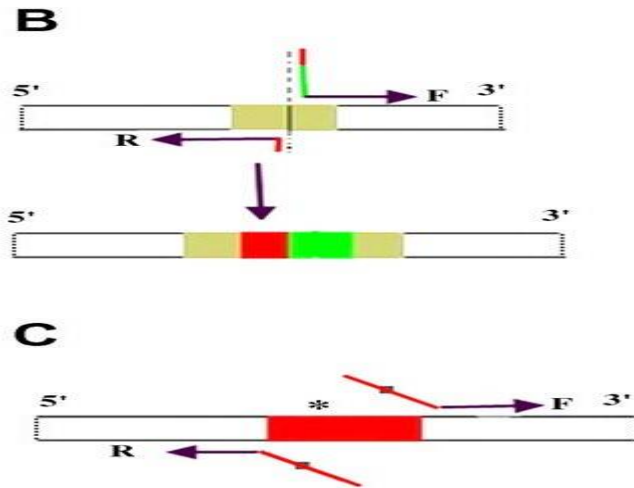


Σχήμα 1.7: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης για διαγραφή τμήματος του κλωνοποιημένου γονιδίου με πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο DpnI και εισαγωγή βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

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 (σχ.1.8). 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 primerF. Στο σχήμα 1.8 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 μεταλλαχτεί 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.



Σχήμα 1.8: Σχηματική απεικόνιση με τον τρόπο που γίνεται η εισαγωγή της μετάλλαξης με την διαγραφή της αλληλουχίας στόχου (Jingetal., 2007).

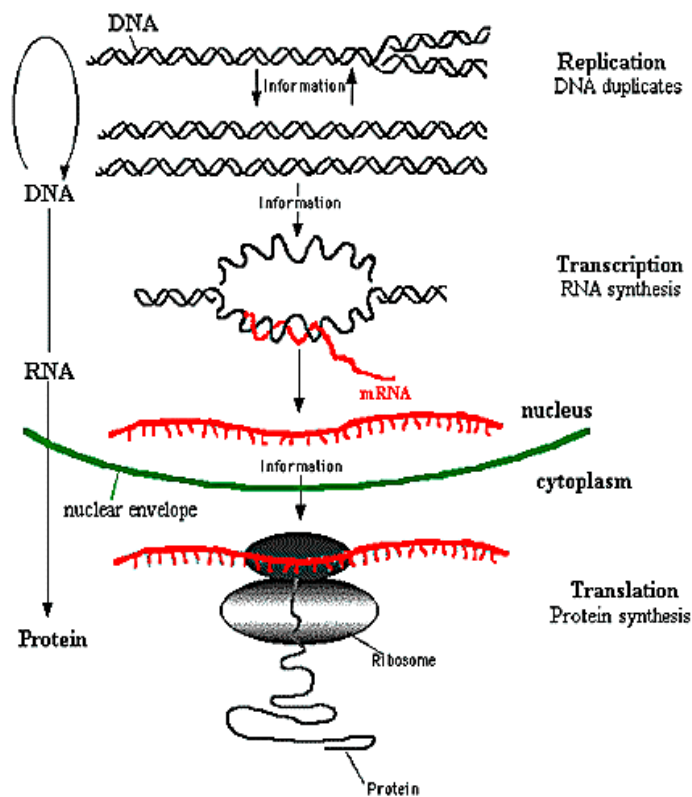
1.8 Εισαγωγή της μετάλλαξης στη ζύμη

Μια μεθοδολογία για την εισαγωγή μιας μεταλλαγμένης μορφής ενός γονιδίου σε κύτταρα ζυμομύκητα είναι αρχικά η καταστροφή κάποιων γονιδίων που συμμετέχουν στις πορείες βιοσύνθεσης απαραίτητων ουσιών όπως νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων. Οι πιο συνηθισμένες βιολογικές πορείες που τροποποιούνται είναι αυτές της βιοσύνθεσης των αμινοξέων λευκίνη (LEU2), τρυπτοφάνη (TRP1), ιστιδίνη (HIS3) και αζωτούχων βάσεων αδενίνης (ADE2), ουρακίλης (URA3). Έχοντας απενεργοποιημένες τις συγκεκριμένες πορείες είναι δυνατόν να απαληφθεί οποιοδήποτε γονίδιο από το γονιδίωμα της ζύμης και να αντικατασταθεί από κάποιο από τα παραπάνω που έχουν απενεργοποιηθεί π.χ. URA3, αρκεί στο 5' και 3' άκρο του URA3 να έχουν εισαχθεί νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ~40 νουκλεοτιδίων όμοιες με αυτές που εντοπίζονται ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου στόχου. Αυτή η αντικατάσταση επαναπροσδίδει στο ζυμομύκητα την χαμένη ικανότητα να βιοσυνθέτει ουρακίλη, οπότε να μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζει η ουρακίλη. Με την αντικατάσταση αυτή έχει επιτευχθεί η απαλοιφή του γονιδίου στόχου.

Στη συνέχεια, το γονίδιο που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη εφόσον ενισχυθεί με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα άκρα του γονιδίου και που φέρουν τις ίδιες αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά με αυτές της περιοχής που έχει εισαχθεί το URA3 στο προηγούμενο βήμα. Υπόστρωμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο URA3 είναι το αντιδραστήριο 5-φθορο-οροτικό οξύ (5-Fluoro-Orotic Acid (5-FOA)). Η δράση αυτής της πρωτεΐνης επί του 5-FOA έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της 5-φθορο-ουρακίλης (5-Fluoro-Uracil (5-FU)) η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα της ζύμης και έχει ως αποτέλεσμα την θανάτωσή τους. Η παρουσία λοιπόν του 5-FOA στο θρεπτικό μέσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης επιλογής των κυττάρων στα οποία έχει γίνει με επιτυχία ο ομόλογος ανασυνδυασμός και η αντικατάσταση του URA3 από τη μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου-στόχου, αφού μόνο αυτά τα κύτταρα που δεν φέρουν το URA3 θα καταφέρουν να επιβιώσουν.

1.9 Η ροή της γενετικής πληροφορίας

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 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που πρόκειται να παραχθεί, αρχικά μεταγράφεται και προκύπτει ένα νέο μόριο που καλείται ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA)(σχ.1.9). 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 (transfer RNA (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).



Σχήμα 1.9 :Μεταγραφή DNA σε RNA

1.10 PCR πραγματικού χρόνου (Real-TimePCR)

1.10.1 Αρχή της μεθόδου

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR(Higuchi etal 1993). Η real-time PCR, απλά αναφέρεται στη ενίσχυση του DNA με PCR που όμως η ποσότητα του DNA που παράγεται προσδιορίζεται σε κάθε κύκλο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να μπορεί να ποσοτικοποιήσει με ακρίβεια την ποσότητα του αρχικού DNA στο δείγμα πριν την ενίσχυση με PCR. Η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο. Το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR(Εικ.1.2). Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της ενίσχυσης του DNA από την ένταση του σήματος

του φθορισμού που αντανακλά την ποσότητα του αποσυντιθέμενου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA (Science.gr: RealTimePCR 2012).



Εικόνα1.2:Μηχάνημα RealTimePCR

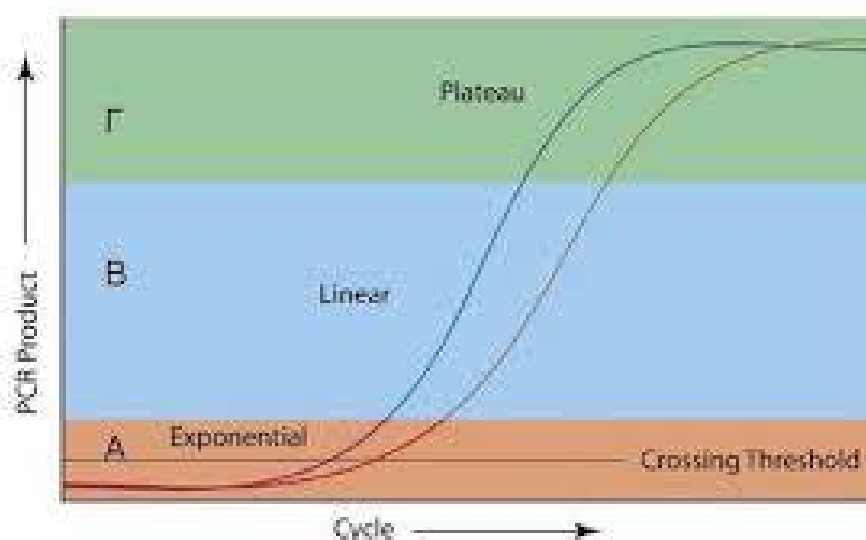
1.10.2 Στάδια της Real-Time PCR

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 μετριέται 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(1.10). 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 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).



Σχήμα 1.10: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης Real Time PCR

1.10.3 Η χρωστική SYBR green

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 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(σχ.1.11).

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 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 θερμοκρασία τήξης (T_m) επηρεάζονται από:

- τη συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου,
- τη συγκέντρωση του DMSO,
- τη συγκέντρωση DNA του δείγματος,
- τη συγκέντρωση της SYBR green και
- το ρυθμό διακύμανσης της θερμοκρασίας κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης (Science.gr: RealTimePCR 2012).

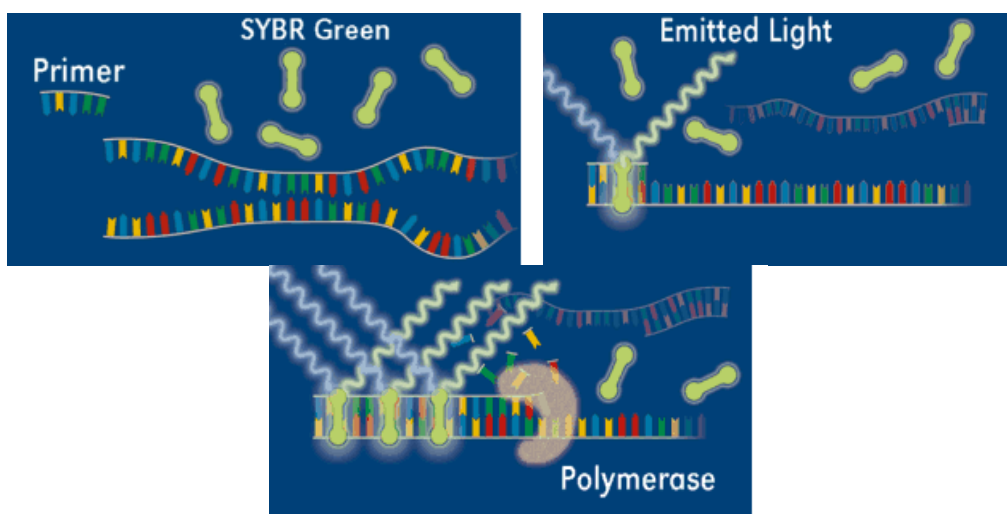
1.10.3.1 Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBRgreenI.

Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η δέσμευσή της με το DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green 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), και υβριδίζονται στο πρότυπο DNA(Συμεωνίδου 2008).

Μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών είναι:

- οι Taqmanprobes
- molecularbeacons
- Scorpionprimers



Σχήμα 1.11 : Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η δέσμευσή της με το DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

1.10.4 Πλεονεκτήματα της real-time PCR

Η εφαρμογή της real-time PCR απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή

- στην ποιότητα του δείγματος,
- στο χειρισμό του οργάνου,
- στην επιλογή της μεθόδου (χημείας),
- στα αντιδραστήρια

Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η μέθοδος, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης.

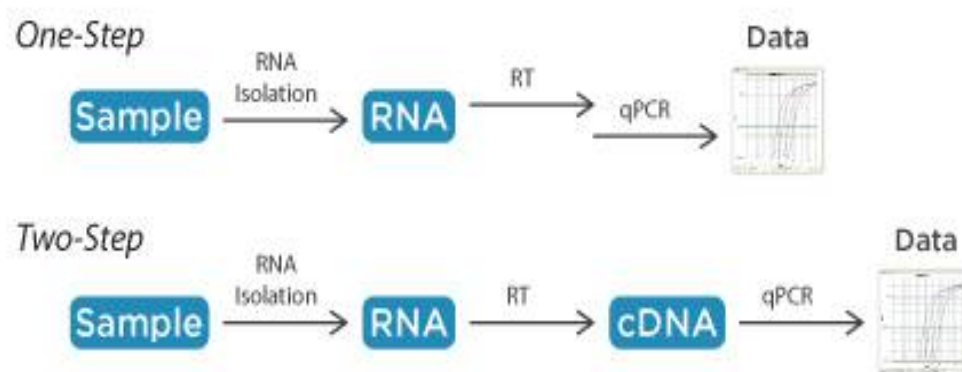
Η real-time PCR μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές, με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA, ανοίγει νέες προοπτικές για νέες εφαρμογές :

- Ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών (π.χ. ιοί).
- Μέτρηση της έκφρασης κάποιων γονιδίων.
- Επαλήθευση πολλαπλασιασμού κάποιων γονιδίων (gene amplification).
- Αποτελεσματικότητα θεραπευτικής αγωγής (π.χ. νέα φάρμακα για τον καρκίνο).
- Ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA.
- Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.
- Προσδιορισμό γονότυπου (genotyping)(Συμεωνίδου 2008).

1.10.5 Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων

Η πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-TimeRT(ReverseTranscription) PCR) μπορεί να γίνει σε δύο στάδια ή σε ένα στάδιο(σχ.1.12). Στη δύο σταδίων το RNA πρώτα υποβάλλεται σε αντίστροφη μεταγραφή και παράγεται cDNA, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης ολιγό-dT εκκινητές, τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (randomprimers). Το προϊόν της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται ως εκμαγείο στη RealTime PCR. 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 ενός σταδίου μέθοδο ή ενός σωλήνα όπως συχνά ονομάζεται, η αντίστροφη μεταγραφή και η RealTimePCR γίνονται σε ένα σωλήνα, με την αντίστροφη μεταγραφή να προηγείται της RealTimePCR. Η γρήγορη διαδικασία επιτρέπει την ταχεία επεξεργασία των πολλαπλών δειγμάτων και είναι εύκολο να αυτοματοποιηθεί. Ο μειωμένος αριθμός των βημάτων χειρισμού έχει ως αποτέλεσμα υψηλή αναπαραγωγικότητα από δείγμα σε δείγμα και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης επειδή απαιτείται λιγότερη παρέμβαση από τον ερευνητή (SampleandassaytechnologiesRealTimePCRbrochure 2009).



Σχήμα 1.12: Σύγκριση της Real Time PCR σε ένα βήμα και σε δύο βήματα.

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 πρωτεΐνη *msn2* όπου είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, κατέχει εξέχοντα ρόλο στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress. Η είσοδος της στον πυρήνα είναι ένα σημείο ελέγχου καθοριστικής σημασίας. Ο έλεγχος της εισόδου της *Msn2* στον πυρήνα γίνεται μέσω φωσφορυλιώσεων συγκεκριμένων αμινοξέων σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (NuclearLocalizationSignal (NLS)). Η φωσφορυλίωση αυτών των αμινοξέων αναστέλλει την είσοδό της στον πυρήνα. Το αμινοξύ Ser582 είναι πιθανώς ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο της *msn2* στον πυρήνα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία της μετάλλαξης Ser582Ala επί του γονιδίου *MSN2* μέσω της μέσωσης με το ένζυμο *DpnI*, η εισαγωγή της συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής του *MSN2* γονιδίου στα κύτταρα του ζυμομύκητα και η μελέτη της μετάλλαξης Ser582Ala επί του γονιδίου *MSN2* ως προς την ικανότητα ανάπτυξης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης 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. Τα γονίδια τα οποία μελετώνται είναι τα ακόλουθα: *ELO 1*, *ALD 4*, *TDH 1*, *HXK1*.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια κι εκκινητές

Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον Πίν. 3.1, όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των PCR βρίσκονται στον Πίν. 3.2 και οι εκκινητές για RealTimePCR στον πίνακα 3.3.

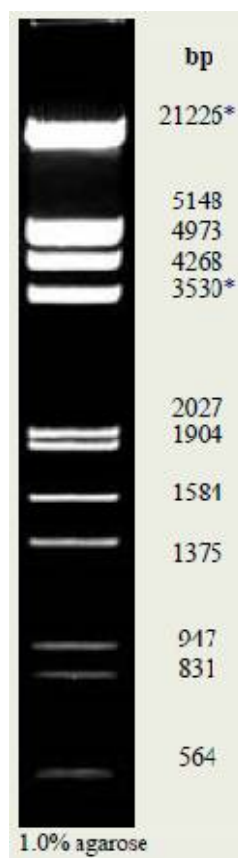
Πίνακας 3.1 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές πορείες

	Αντιδραστήρια	Εταιρεία	Κωδικός
1	Gel red	Biotium	41003
2	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L
4	Οξικόλιθιο (Lithium Acetate dihydrate)	AppliChem	A3478
5	Tris ultrapure	Duchefa Biochemie	T1501.1000
6	Οξικόοξύ (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

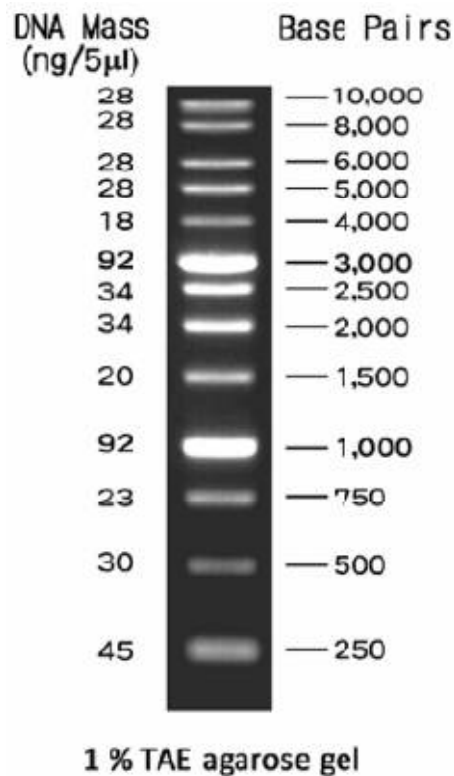
19	Αργινίνη	AppliChem	A3709
20	Αδενίνη	AppliChem	A0939
21	Ισολευκίνη	AppliChem	A3677
22	Θρεονίνη	AppliChem	A3946
23	Κυστεΐνη	AppliChem	A3694
24	Προλίνη	Sigma-Aldrich	81710
25	Τρυπτοφάνη	Sigma-Aldrich	T8941
26	Λυσίνη	Sigma-Aldrich	L9037
27	Μεθιονίνη	Sigma-Aldrich	M5308
28	Γλουταμίνη	AppliChem	A3734
29	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 HotStart 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 Ενδονουκλεάση PstI	Takara	1073A

49	Περιοριστική Ενδονουκλεάση EcoRI	Takara	1040A
50	Περιοριστική Ενδονουκλεάση BamHI	Takara	1010A
51	Περιοριστική Ενδονουκλεάση HindIII	Takara	1060AH
52	Περιοριστική Ενδονουκλεάση DpnI	BioLabs	R0176S
53	5-FOA (5-Fluoroorotic Acid) (5-φθόρο-οροτικόξύ)	Thermo Scientific	R0811
54	SDS (Μετά νατρίου άλας του Θεϊκού 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	pUC19 plasmid		
61	W303-1a Yeast Strain		
62	MOPS	Sigma-Aldrich	M1254
63	RbCl ₂	Sigma-Aldrich	R2252
64	CaCl ₂		
65	MnCl		
66	CH ₃ COOK		
67	Λυσοζύμη		
68	BSA		
69	Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest	Sigma-Aldrich	D9281
70	1 kb DNA Ladder RTU	Nippon Genetics	MWD-1
71	CutSmart	BioLabs	B7204S
72	TES		
73	Όξινη φαινόλη	Riedel-deHaen	A1578
74	C ₂ H ₅ OH 80%	Sigma-Aldich	24194-2.5L-R
75	DNase-I		
76	Trisma Base		

77	Glacial acetic acid		
78	EDTA		
79	Οξικό νάτριο		
80	RNAse free H ₂ O		
81	Buffer	TaKaRa	A6301A
82	BSA		
83	Χλωροφόρμιο	Merck	K38408045806
84	KAPA SYBR FAST qPCR mix	Kapa biosystems	KK4651
85	Primer		
86	ROX LOW	Kapa biosystems	KK2501
87	dUTP	Kapa biosystems	KK2501
88	KAPA RT MIX	Kapa biosystems	KK2501
89	Nuclease-free water	DEMO	1400396



Εικόνα 3.1: Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest



Εικόνα 3.1: 1 kbDNA Ladder RTU

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

Εκκινητές (primers)	Αλληλουχία εκκινητών	Θερμοκρασίες Υβριδοποίησης (°C)
MSN2 Forward(pstI)	5'AAAAC TGCAGATGACGGTCGACCATGAT TTC3'	62
MSN2Reverse(BamHI)	5'CGGGATCCAATGTCTCCATGTTTTTTATGAG3'	60
MSN2 (Ser582Ala)For	5'CGGAAGGCTGCTGTGCC3'	58
MSN2 (Ser582Ala) Rev.	5'GGCACAGCAGCCTTCCG3'	58
Forward_MSN2	5'CTTTTTTCAACTTTTATTGCTCATAGAAGAACTAGATCTAAAATGACGGTCGACCATGAT TTC3'	62
Reverse_MSN2	5'TTATCTTATGAAGAAAGATCTATCGAATTA AAAAAAATGGGGTCTATTA AATGTCTCCATGTTTTTTATGAG3'	60

Πίνακας 3.3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της RealTimePcr, συνοδευόμενοι από τις αλληλουχίες τους και τα γονίδια τους, με τη χρήση της χρωστικής SYBRGreen

Εκκινητές (Primers)	Αλληλουχίες εκκινητών	Γονίδιο
---------------------	-----------------------	---------

Elo1_Reverse	5'GACAGTGTCTGCGAACTCCA3'	<i>ELO1/YJL196C</i>
Elo1_Forward	5'GTATCGCCATGGGCTGTATT3'	
ALG9_Reverse	5'CAGCAGGAAAGAAGCTTGGG3'	<i>ALG9</i>
ALG9_Forward	5'AGTGGCTTTGGTGAACAATTAC3'	
TDH1_Reverse	5'AAGCCTTGGCAACATATTCG3'	<i>TDH1/YJL05W</i>
TDH1_Forward	5'CTCACGCTTCCATCTTCGAT3'	
ALD4_Reverse	5'GATTTACCACCCAGCTCCAA3'	<i>ALD4/YOR374W</i>
ALD4_Forward	5'AGGCCATTTACAAACCATCCA3'	

3.1.2 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.

3.1.2.1. YEP

Πίνακας 3.4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή YEP

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

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

3.1.2.2 SC

Πίνακας 3.5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του SC

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

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στον αυτόκαυστο.

3.1.2.3 LB

Πίνακας 3.6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του LB

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

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στον αυτόκαυστο.

3.1.2.4 Synthetic Complete (-U):

Πίνακας 3.7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του syntheticcomplete(-U)

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

Λυσίνη (Lysine):	2g
Μεθειονίνη (Methionine):	2g
Γλουταμίνη (Glutamine):	2g
Αλανίνη (Alanine):	2g
Σερίνη (Serine):	2g
Ιστιδίνη (Histidine):	2g
Γλυκίνη (Glycine):	2g

3.1.2.5 SC+URA+5-FOA

1. Προστίθενται 10 g άγαρ 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 θερμομαντική 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 διαμοιρασμός του υλικού σε τρυβλία petri.

Για την παρασκευή υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων δεν προστίθεται agar.

3.1.2.6 Παρασκευή 50xTAE

Πίνακας 3.8: Αντιδραστήρια για την παρασκευή 50xTAE

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

3.1.2.7 Παρασκευή 1xTAE

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

3.2 Πειραματικές Πορείες

3.2.1. Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης

1. Λήψη μιας μονήρους αποικίας από τρυβλίο petri ή φυγοκέντριση 200 μl υγρής καλλιέργειας στα 15.000 xg για 3 min, 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 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 υπερκειμένου.
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 eppendorf και φύλαξη αυτού στους -20°C.
11. 1-4 μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.

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

3.2.2.1 PCR Clean-up

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου του δείγματος από το bufferNTI. (π.χ. για 100μl δείγματος PCR προσθέτουμε 200μl bufferNTI).
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε ένα Collection Tube (2 mL) και μεταφορά 700μl αντίδρασης pcr. Φυγοκέντριση δείγματος για 30sec στις 11000xg. (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το

υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).

3. Προσθήκη 700μlbufferNT3 και φυγοκέντριση για 30sec στις 11000xg.
4. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg για απομάκρυνση υπολειμμάτων bufferNT3.
5. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5ml). Προσθήκη 15-30μlbufferNE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.

3.2.2.2 Απομόνωση DNA από πηκτώματα αγαρόζης

1. Προσθήκη 200μlbufferNTI για κάθε 100mg πηκτής αγαρόζης <2% και
 - i. θέρμανση του δείγματος για 5-10min στους 50°C. Vortex έως ότου η πηκτή αγαρόζης διαλυθεί πλήρως.
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column
 - i. σε ένα CollectionTube (2 mL)) και μεταφορά 700μl αντίδρασης pcr. Φυγοκέντριση δείγματος για 30sec στις 11000xg. (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).
3. Προσθήκη 700μlbufferNT3 και φυγοκέντριση για 30sec στις 11000xg.
4. Φυγοκέντριση 1min, 11000xg για απομάκρυνση υπολειμμάτων bufferNT3.
5. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5ml). Προσθήκη 15-30μlbufferNE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.

3.2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. Coli με το kit

Nucleospin plasmid

1. Φυγοκέντριση 1-5 ml καλλιέργειας *E. coli* σε θρεπτικό LB για 30s στις 11000xg. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
2. Προσθήκη 250μl buffer A1 και vortex.
3. Προσθήκη 250μlbufferA2 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.

4. Προσθήκη 300μlbufferA3 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές.
5. Φυγοκέντριση για 5min στις 11000xg 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 1min στις 11000xg. (εάν ο όγκος του υπερκείμενου ξεπερνάει τα 750μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα).
7. Προσθήκη 500μlbufferAW (προθέρμανση στους 50°C) και φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.
8. Προσθήκη 600μlbufferA4 και φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.
9. Φυγοκέντριση για 2min στις 11000xg για απομάκρυνση υπολειμμάτων.
10. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Plasmid σε νέο Eppendorf και προσθήκη 50μlbufferAE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
11. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.

3.2.4 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 xg, 10 min στους 4°C.
3. Επαναδιάλυση σε 28ml διαλύματος Tfb1 (Πίν. 3.8) και αφήνουμε για 25 min στους 4°C.
4. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντριση 2500 xg 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 3.9: Παρασκευή διαλύματος Tfb1*

100 mM	RbCl ₂	pH: 5,8 ΡύθμισηpHμε
50 mM	MnCl ₂	

30 mM	CH ₃ COOK	0,2MCH ₃ COOH
10 mM	CaCl ₂	
15%	Glycerol	

Πίνακας 3.10: Παρασκευή διαλύματος Tfb2*

10 mM	MOPS pH:7	pH: 7 αν όχι προσαρμόζεται με 1M KOH
10 mM	RbCl ₂	
80 mM	CaCl ₂	
15%	Glycerol	

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

3.2.5 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων

1. Ξεπάγωμα των competentcells στον πάγο και ακολουθεί μοίρασμα τους σε δυο eppendorf.
2. Προσθήκη <100 ngDNA και επώαση στον πάγο για 20-40 min.
3. Τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (Heatshock) για 90 sec στους 42°C.
4. Τοποθέτηση των κυττάρων για 1 min στον πάγο, προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 1h.
5. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση για 30 sec στις 10.000 xg και αφαίρεση 1 ml του υπερκείμενου υγρού.
6. Επαναδιάλυση κυττάρων στα υπολειπόμενα 200 μl, και τοποθέτησή τους επί θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη).

3.2.6 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού

1. Εμβολιασμός 5 ml θρεπτικού μέσου με μονήρη αποικία και ολονύκτια επώαση.
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 (Πίν. 3.10).
5. Έντονη ανάδευση.
6. Προσθήκη 10 μl λυσοζύμης 1 mg/ml.

7. Τοποθέτηση eppendorfs στους 100°C για 1 min.
8. Φυγοκέντριση στα 10.000 rpm για 10min ή λιγότερο σε RT.
9. Μεταφορά 430 µl του υπερκειμένου σε νέα eppendorfs.
10. Προσθήκη 400 µl ισοπροπανόλης.
11. Τοποθέτηση των eppendorfs στους -80°C για 10 min.
12. Φυγοκέντριση σε 10.000 rpm για 30 min στους 4°C.
13. Πλήρης απομάκρυνση υπερκειμένου και πλύσιμο ιζήματος με 70% Ethanol.
14. Φυγοκέντριση για 5 min.
15. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη 20 µl (H₂O + RNase (100 ng/µl)).
16. Επώαση σε RT για 5-10 min.

Lysozyme Stock

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

Πίνακας 3.11: Παρασκευή STET buffer

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

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

1. Εμβολιασμός 50 ml καλλιέργειας ζύμης αργά το απόγευμα (για 5 μετασχηματισμούς).
2. Επόμενο πρωί όταν OD₆₀₀=0.4-0.6 ~10⁷ cells/ml-5*10⁸ cells/ml φυγοκέντριση σε 2.000 rpm για 5 min στους 4°C.
3. Επαναδιάλυση σε 25 ml αποστειρωμένο H₂O και φυγοκέντριση στους 4°C.
4. Επαναδιάλυση σε 1 ml 10 mMLiOAc (Οξικό Λίθιο), στον πάγο.
5. Μεταφορά σε eppendorf.
6. Φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 30 sec-1 min στους 4°C.
7. Επαναδιάλυση σε 100 mMLiOAc Τελικός όγκος=500 µl (κύτταρα+διάλυμα).
8. Μοίρασμα σε 5 eppendorfs (100 µl).
9. Σύντομη φυγοκέντριση (4-5 sec).
10. Επαναδιάλυση ιζήματος σε:

- a. 240 μ l PEG(4000) 50%,
 - b. 36 μ l 1M LiOAc,
 - c. 10 μ l carrier DNA (10 μ g/ μ l),
 - d. 74 μ l H₂O+DNA (0.1-1 μ g).
11. Vortex 1 min.
 12. Επώαση στους 30°C για 30 min.
 13. Επώαση στους 42°C για 15 min.
 14. Φυγκέντριση στις 2.000 rpm για 1 min.
 15. Προσθήκη 200 μ l αποστειρωμένου H₂O και ήπια επαναδιάλυση.
 16. Τοποθέτηση επί κατάλληλου στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία petri

3.2.8 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 1xTAE και θερμαίνεται μέχρι βρασμό του πηκτώματος. Αφού βράσει το διάλυμα μας προσθέτουμε 2,5 μ l gelred 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 μ l), στα οποία έχει προστεθεί η χρωστική ουσία, σε κάθε οπή του πηκτώματος αφού πρώτα γίνει απόχυση 1xTAE 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.

3.2.9 Μεταφορά αποικιών με την διαδικασία *replica*.

Στο τρυβλίο LB-U ύστερα από τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων, λόγω την μη ανάπτυξη διαυγών αποικιών, χρειάστηκε να γίνει αντιγραφή σε τρυβλίο SC+U+5FOA με την χρήση ενός τετράγωνου κομματίου υφάσματος από βελούδο.

Το κομμάτι υφάσματος, τοποθετήθηκε στην επιφάνεια με την αναπτυγμένη περιοχή (πιάτο LB-U), και κατευθείαν εφαρμόστηκε πάνω στο τρυβλίο, στην περιοχή όπου υπήρχε θρεπτικό υλικό (πιάτο SC+U+5FOA).

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 υπο ασηπτικές συνθήκες.

3.2.11 Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιεργείων

Με την χρήση μικροσκοπίου μπορούμε να διαπιστώσουμε την καθαρότητα των ανεπτυγμένων καλλιεργείων. Υπό ασηπτικές συνθήκες λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα καλλιέργειας και ελέγχεται με το μικροσκόπιο. Αυτό που επιθυμούμε να διακρίνουμε στο μικροσκόπιο είναι μικρή ανάπτυξη, δηλαδή μετρήσιμων αριθμών κυττάρων καθώς και την ύπαρξη της επιθυμητής ζύμης και όχι άλλων μικροοργανισμών.

3.3 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 οι εξής : 3%, 6%, 9%.

Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής :

Σε κωνικές φιάλες των 100ml 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 600nm.

Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται κύτταρα αγρίου τύπου (W303-1a) και κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη Ser582Ala της πρωτεΐνης msn2 (W303-1a_MSN2_Ser582Ala).

3.4 Καμπύλες αναστολής της ανάπτυξης κυττάρων ζύμης από την αιθανόλη

Σε αποστειρωμένα φιαλίδια όγκου 50ml (falcon) τοποθετούνται 10ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης (0, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5 %(v/v)). Εμβολιάζονται και εν συνεχεία αναπτύσσονται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 30⁰C. Μετά από περίπου 16 ώρες φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 600nm. Οι οπτικές απορροφήσεις χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς την καλλιέργεια με 0% v/v αιθανόλη μετατρέπονται σε ποσοστό % ανάπτυξης. Μέσω κατάλληλου λογισμικού υπολογίζεται η εξίσωση της καμπύλες αναστολής και η συγκέντρωση της αιθανόλης όπου επιτυγχάνεται η 50% αναστολή της ανάπτυξης.

3.5 Συλλογή δειγμάτων για απομόνωση RNA

Οι συγκεντρώσεις και της αιθανόλης σε 0%v/v και 6%v/v σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, δηλαδή σε t=15min και σε t=16hours.

3.5.1 Απομόνωση RNA

1. Από καλλιέργεια, μεταφέρονται 1,5 ml σε Eppendorf και φυγοκέντριση στις 10000 rpm για 3min στους 4°C. Πλήρη απομάκρυνση υπερκειμένου. Φύλαξη στους -80⁰C ή συνέχιση την ίδια μέρα.
2. Αναδιάλυση ιζήματος κυττάρων σε 400μl TES και 400μl όξινης φαινόλης. Ακολουθεί vortex για 10sec και τοποθέτηση τους για 60min στους 65⁰C με περιστασιακό vortex, περίπου ανά 20 min.
3. Επώαση για 5 min στον πάγο και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C.
4. Μεταφορά της υδατικής φάσης ~ 400μl, σε νέο Eppendorf και προσθήκη 400μl όξινης φαινόλης. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω.
5. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνολικά δύο φορές, ουσιαστικά γίνονται δύο εκχυλίσματα με όξινη φαινόλη.

6. Προσθήκη 400μλ γλωροφόρμιο, vortex για 10sec και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C.
7. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο Eppendorf με ιδιαίτερη προσοχή. Επαναλαμβάνεται για άλλη μια φορά.
8. Στην τελευταία υδατική φάση γίνεται προσθήκη 3M NaOAc (οξικό νάτριο) pH 5,2 όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης, και 2,5 όγκους της υδατικής φάσης απόλυτη αιθανόλη EtOH (αιθανόλη). Τοποθέτηση για 1h στον πάγο ή για 15 min στους -70°C βαθμούς.
9. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στις 10000rpm στους 4°C.
10. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 500μl 80% EtOH.
11. Φυγοκέντριση για 5 min στις 10000 rpm στους 4°C.
12. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και αναμονή μέχρι να στεγνώσει το ίζημα αλλά όχι πλήρως.
13. Αναδιάλυση ιζήματος σε 30μl H₂O RNase free, και αποθήκευση στους -70°C.

3.5.2 Επεξεργασία RNA δειγμάτων με DNase-I.

Η επεξεργασία των δειγμάτων DNase-I πραγματοποιείται την απαλλαγή του δείγματος από τυχόν υπολείμματα DNA.

1. Τα δείγματα αποψύχονται και ακολουθεί η προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων:
 - 1) 2μl 10X DNase buffer.
 - 2) 16 μl RNA (~2μg).
 - 3) 1 μl BSA.
 - 4) 1 μl DNase.
2. Τα eppendorf τοποθετούνται για 1h στους 37°C.
3. Ακολουθεί προσθήκη 200μl όξινης φαινόλης και 180μl RNase Free H₂O υποβάλλονται σε έντονη ανάδευση (vortex).
4. Επώαση στον πάγο για 5min, και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 6000rpm για 5min στους 4°C.
5. Η υδατική φάση (~400 μl), μεταφέρεται σε καθαρό Eppendorf και προστίθεται 400μl γλωροφόρμιο και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10sec. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 6000rpm για 5min στους 4°C. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλη μια φορά.

6. Στην τελευταία υδατική φάση γίνεται προσθήκη 3MNaOAc (οξικό νάτριο) pH 5,2 όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης, και 2,5 όγκους της υδατικής φάσης απόλυτη αιθανόλη EtOH (αιθανόλη). Τοποθέτηση για 1h στον πάγο ή για 15 min στους -70°C βαθμούς.
7. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στις 10000rpm στους 4°C .
8. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 500μl 80% EtOH.
9. Φυγοκέντριση για 5 min στις 10000 rpm στους 4°C .
10. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και αναμονή μέχρι να στεγνώσει το ίζημα αλλά όχι πλήρως.
11. Αναδιάλυση ιζήματος σε 30μl $\text{H}_2\text{ORNasefree}$, και αποθήκευση στους -70°C .

3.5.3 Ηλεκτροφόρηση RNA

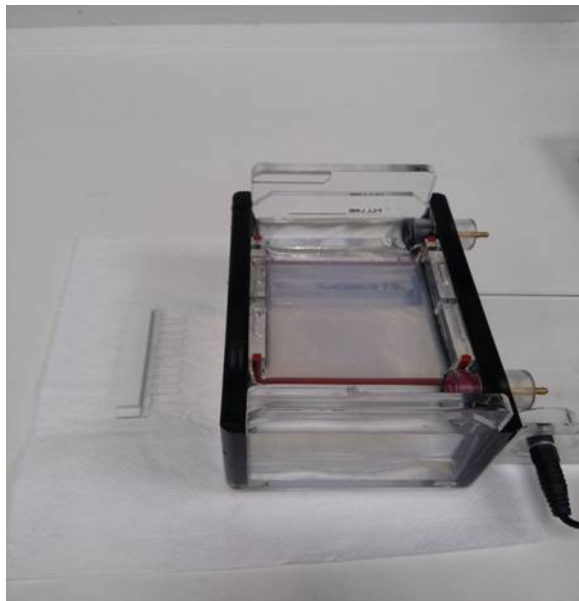
Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού και εφαρμόζεται σε δείγματα που περιέχουν χημικές ενώσεις που φέρουν φορτίο. Τα φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πήκτωμα αγαρόζης. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται εάν βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο. (Madigan et al., 2005)(Εικ.3.3)



Εικόνα 3.2: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

1. Σε κωνική φιάλη 250ml τοποθετούνται 0,5 g αγαρόζης και 50 ml 1xTAE buffer και θερμαίνεται μέχρι βρασμού του πηκτώματος. Αφού η θερμοκρασία του υγρού μειωθεί στους $\sim 60^{\circ}\text{C}$, προστίθεται 2,5μl gelred.

2. Αμέσως το διάλυμα αποχύνεται στην ειδική βάση ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για το σχηματισμό των πηγαδίων στο γελαγαρόζης. Όταν στερεοποιηθεί το gel αγαρόζης είναι έτοιμο προς χρήση. (Εικ.3.4)
3. 2μl του προς εξέταση δείγματος αναμειγνύονται με 1μl 10 X διαλύματος χρωστικής OrangeG και 7μl H₂O.
4. Κάθε ένα από τα παραπάνω παρασκευάσματα (10μl) τοποθετείται εντός των πηγαδίων, αφού πρώτα γίνει πλήρωση της συσκευής ηλεκτροφόρησης με 1xTAE buffer.
5. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό ακολουθεί η ανάπτυξη της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή ένταση ρεύματος περίπου 60 mA για ~30min.
6. Ακολούθως, το πήκτωμα απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται εντός της συσκευής απεικόνισης η οποία αποτελείται από πηγή UV ακτινοβολίας και λαμβάνεται φωτογραφία του πηκτώματος.



Εικόνα 3.3: η βάση της ηλεκτροφόρησης όπου βρίσκεται το πήκτωμα αγαρόζης και το ρυθμιστικό διάλυμα στα δύο άκρα της πηκτής. Επίσης, αριστερά της βάσης, βρίσκεται το λεγόμενο 'χτενάκι' με το οποίο δημιουργούνται οι εσοχές στο πήκτωμα.

3.6 Real-timePCR

- Τα γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχθηκε είναι: ALG9, TDH1, ALD4, ELO1, HXK1. Το γονίδιο ALG9 χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς

- Σε κάθε αντίδραση η οποία πραγματοποιήθηκε σε Eppendorf των 200μl προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες για κάθε διαφορετικό γονίδιο και διαφορετικό δείγμαRNA.
- Οι ποσότητες που τοποθετούνται αναγράφονται παρακάτω (πίνακας 3.12) Τοποθετούμε τις παρακάτω ποσότητες:

Πίνακας 3.12: Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη δημιουργία μιας αντίδρασης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ(μl)
RNA (<100ng)	4
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	10
Primer	0.4
ROX Low	0.4
dUTP	0.4
KAPA RT Mix	0.4
Nuclease-free water	4.4

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το ακόλουθο:

- 5 min στους 42 °C
 - 5 min στους 95 °C
 - 10 sec στους 95 °C
 - 30 sec στους 60 °C
 - 1 min στους 95° C
 - 30 sec στους 55° C
 - 30 sec στους 95° C
- } 45 κύκλοι
-

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να επιτευχθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης Ser582Ala στην *msn2* πρωτεΐνη, απαιτείται η τροποποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου MSN2 τροποποιώντας την τριπλέτα που αντιστοιχεί στο αμινοξύ Ser582Ala.

4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης

4.1.1 Πέψη με το ένζυμο DpnI.

το απομονωθέν πλασμίδιο pUC19_MSN2 χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την δημιουργία του πλασμιδίου pUC19_MSN2_582 με PCR. Χρησιμοποιούνται ως εκκινητές οι MSN2_582_F και MSN2_582_R (πίνακας 3.2). Το προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μέγεθος ~4200bp.

Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια για την PCR

pUC19_MSN2	4μl
PrimerMSN2_582_F	1μl
PrimerMSN2_582_R	1μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H2O	4μl
Σύνολο :	20μl

Πρόγραμμα PCR :

1.95 → 3min

2.98 → 15sec

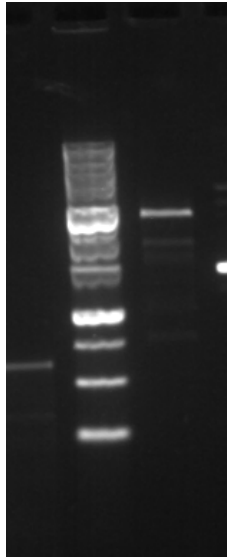
3.64 → 10sec

4.72 → 2min15sec, Βήμα 2,#25

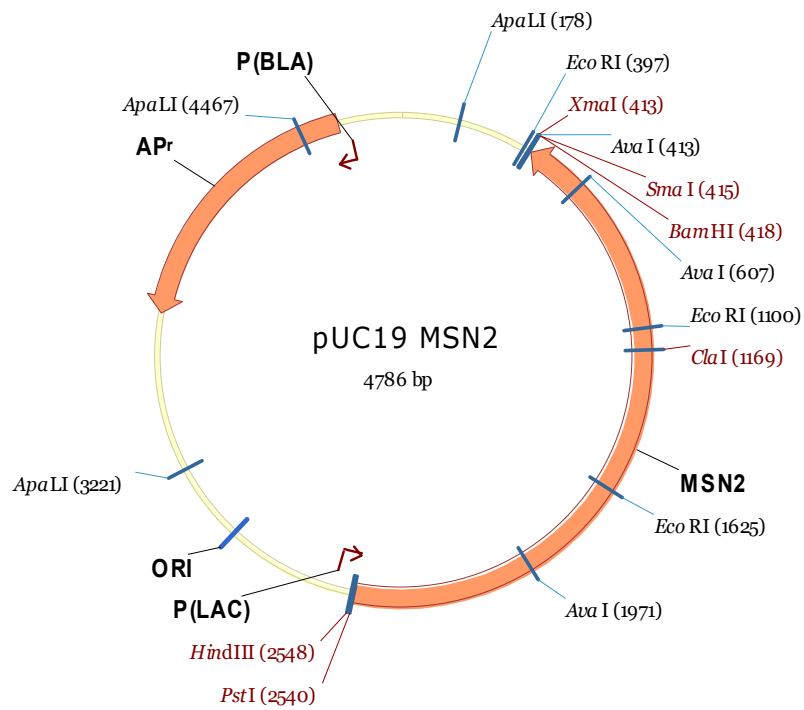
5.72 → 4min

6.4 → ∞

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορεύεται σε gel αгарόζης 1%, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR.



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



Σχήμα 4.1 :Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN2και οι θέσεις πέψης του ενζύμου *DpnI*.

Από το προϊόν αυτό της PCR 15μl θα υποβληθούν σε πέψη με το ένζυμο *DpnI*(πίνακας 4.2).

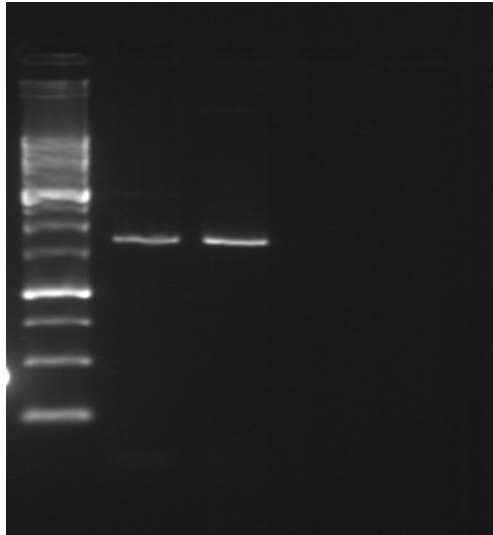
Πίνακας 4.2: Το προϊόν της PCR υποβάλλεται σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *DpnI*. Επώαση στους 37oC για 1 h.

Προϊόν PCR	15μl
<i>DpnI</i>	1μl

Στο εκμαγείο που χρησιμοποιούμε PUC19_MSN2 υπάρχουν κάποιες *DpnI* θέσεις στις οποίες υπάρχουν μεθυλιώσεις διότι το πλασμίδιο αυτό έχει απομονωθεί από βακτήρια. Το προϊόν της παραπάνω PCR παρόλο που φέρει ακριβώς τις ίδιες θέσεις δράσης του ενζύμου *DpnI* δεν υπάρχουν μεθυλιώσεις διότι κατά την PCR δεν συμβαίνουν μεθυλιώσεις.

Η *DpnI* δρα μόνο σε μεθυλιωμένο DNA ενώ το αμεθυλιωτο 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 4.2).



Εικόνα 4.2 : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2,3 το πλασμίδιο pUC19-MSN2.

Ακολούθησε μετασχηματισμός competent βακτηριακών κυττάρων 2 μl του προϊόντος της αντίδρασης και ακολούθησε τοποθέτηση αυτών σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνη (100 μg/ml) για να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με το pUC19_MSN2_Ser_582_Ala από εκείνα που δεν μετασχηματίστηκαν. Ο μετασχηματισμός έγινε χρησιμοποιώντας ένα δείγμα control εκμαγείου και την χρήση του *DpnI* (πίν. 4.3) το οποίο δεν μας έδωσε αποικίες κατά τον μετασχηματισμό.

Πίνακας 4.3 : Αντιδραστήρια για την δημιουργία δείγματος control (εκμαγείου + *DpnI*) και επώαση για 2ώρες στους 37°C.

pUC19_MSN2	1μl
<i>DpnI</i>	1μl
CutSmart Buffer	2μl
H ₂ O	16μl
Σύνολο :	20μl

Μικρός αριθμός άσπρων 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.

Ύστερα χρειάστηκε να γίνει πολλαπλασιασμός του μεταλλαγμένου γονιδίου της MSN2 που φέρει την μετάλλαξη μέσω της παρακάτω PCR (πίνακας 4.4). Προκειμένου το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN2 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, έλαβε χώρα μια ακόμα αντίδραση PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pUC19_MSN2_582 και ως εκκινητές οι MSN2-EGFP-F και MSN2-R (πίν. 3.2). Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται το μεταλλαγμένο γονίδιο της MSN2 το οποίο έχει ίδια άκρα με την περιοχή που εντοπίζεται στο γενομικό DNA της ζύμης (αγρίου τύπου).

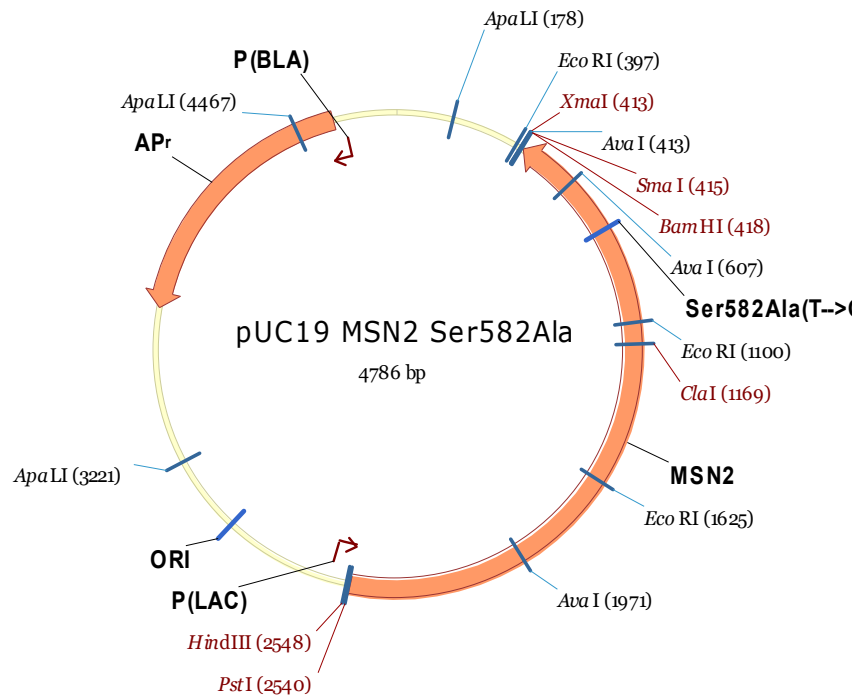
Πίνακας 4.4: Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου MSN2 που φέρει την μετάλλαξη

DNA (pUC19_MSN2_582)	2μl
Primer MSN2_F	1μl
Primer MSN2_R	1μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H ₂ O	6μl
Σύνολο :	20μl

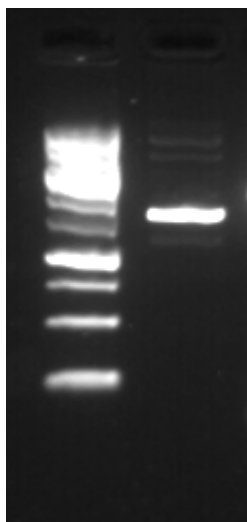
Πρόγραμμα PCR :

1. 95 → 3min
2. 98 → 10sec
3. 56 → 10sec
4. 72 → 1min20sec, Βήμα 2, #25
5. 72 → 5min
6. 4 → ∞

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέον γονιδίου MSN2-Ser582Ala προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του.



Σχήμα 4.2: Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN2 με την μετάλλαξη Ser582Ala.



Εικόνα 4.3 : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το καθαρό προϊόν της PCR.

Το προϊόν αυτό θα χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό στα κύτταρα ζύμης ώστε να προκύψει το στέλεχος W303-1a με την μετάλλαξη Ser_582_Ala της πρωτεΐνης *msn2*.

4.2 Μετασχηματισμός και Ομόλογος Ανασυνδυασμός.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου MSN2-Ser-582-Ala στο γενομικό DNA της ζύμης απαιτεί την τέλεση ενός μετασχηματισμού και ομόλογων ανασυνδυασμών..

Το καθαρισμένο γονίδιο MSN2-Ser-582-Ala χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου MSN2-Ser-582-Ala στο γενομικό DNA της ζύμης. Τα κύτταρα που υπεβλήθησαν στην διαδικασία του μετασχηματισμού, αρχικά αναπτύχθηκαν επί περιοριστικού θρεπτικού μέσου από το οποίο απουσίαζε το αμινοξύ ουρακίλη (SC-URA) σε θερμοκρασία 30°C. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν επί του περιοριστικού θρεπτικού μέσου είναι αυτά που έχει γίνει η αντικατάσταση του αγρίου τύπου MSN2 από το URA3.

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού και του ομόλογου ανασυνδυασμού τα κύτταρα υποβάλλονται σε ανάπτυξη επί περιοριστικού θρεπτικού μέσου (SC+URA+5-FOA). Το θρεπτικό αυτό μέσο επιλέγεται διότι από τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει ο ομόλογος ανασυνδυασμός, για να μπορέσουν να αναπτυχθούν, χρειάζονται να προσλαμβάνουν ουρακίλη από το θρεπτικό μέσο αφού τα ίδια δεν μπορούν να την συνθέσουν. Το 5-FOA χρησιμοποιείται ως αρνητικός δείκτης επιλογής. Τα κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει ο μετασχηματισμός - και δεν επιθυμείται να αναπτυχθούν - το γονίδιο URA3 όπου φέρουν κωδικοποιεί ένα ένζυμο το οποίο αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το 5-FOA και το τροποποιεί σε 5-FU, η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα και τα θανατώνει.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού και του ομόλογου ανασυνδυασμού αποικίες από το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου SC+URA+5-FOA και επώαστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση. Σε αυτή την PCR αναμένεται να εμφανίσουν προϊόν μόνο το δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου) που περιέχει το γονίδιο MSN2 και τα δείγματα ελέγχου, στα οποία έχει πετύχει ο ομόλογος ανασυνδυασμός και δεν περιέχουν το γονίδιο URA3 πλέον, αλλά το γονίδιο MSN2_Ser582Ala. Το μόνο δείγμα που δεν εμφανίζει προϊόν στην ηλεκτροφόρηση είναι αυτό που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN2 εντός του γονιδιώματος της ζύμης (Εικ. 4.6). Τα δείγματα τα οποία έχουν δεχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN4_Ser532Ala γίνονται stock και φυλάσσονται στους -80°C.



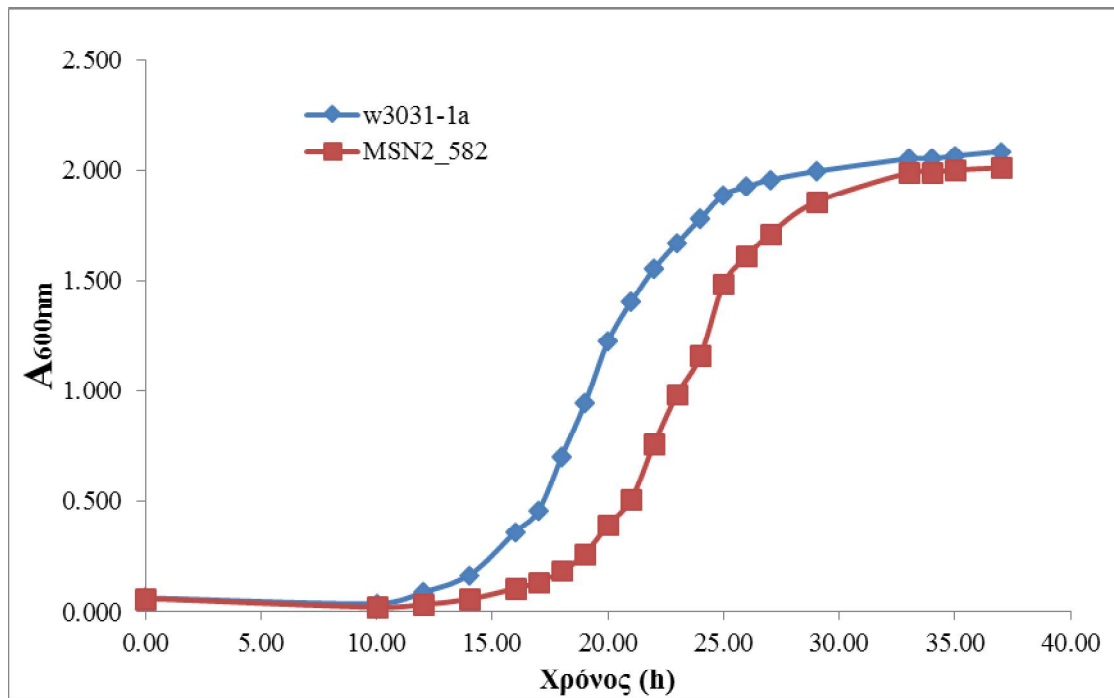
Εικόνα 4.4 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN2 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας της εισαγωγής του μεταλλαγμένου γονιδίου MSN2-Ser-582-Ala. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας, στην θέση 2,3,4 βρίσκεται δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην 5^η θέση βρίσκεται το $\Delta msn2$.

4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress.

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a-MSN8_582) σε συνθήκες stress, επιλέχθηκε ως παράγοντας μελέτης η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του σακχαρομύκητα.

4.3.1 Παρουσία αιθανόλης

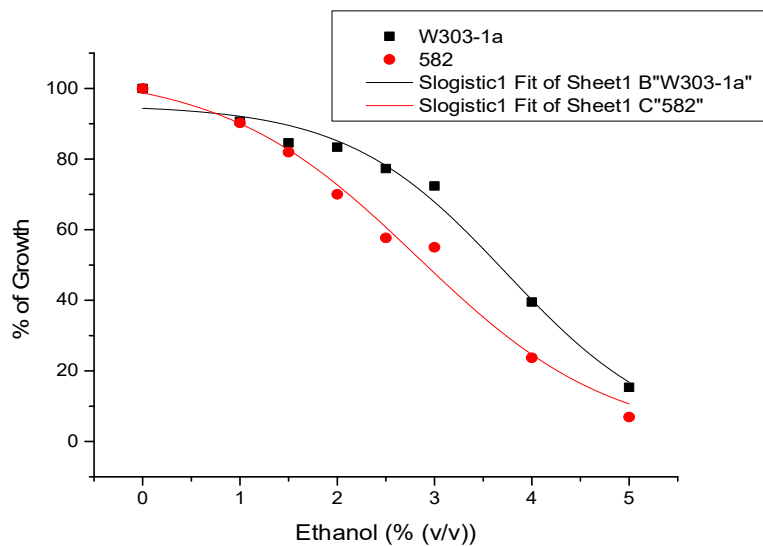
Μετά από μελέτη που έγινε για την ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της πρωτεΐνης *msn2* του ζυμομύκητα μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του στα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης. Σε χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (3%) η συγκεκριμένη μετάλλαξη προκαλεί καθυστέρηση της ανάπτυξης (σχ.4.3).



Σχήμα 4.3: καμπύλη ανάπτυξης των στελεχών του *S. cerevisiae* σε θρεπτικό υλικό παρουσία 3% v/v αιθανόλης.

4.3.2 Αναστολή της ανάπτυξης

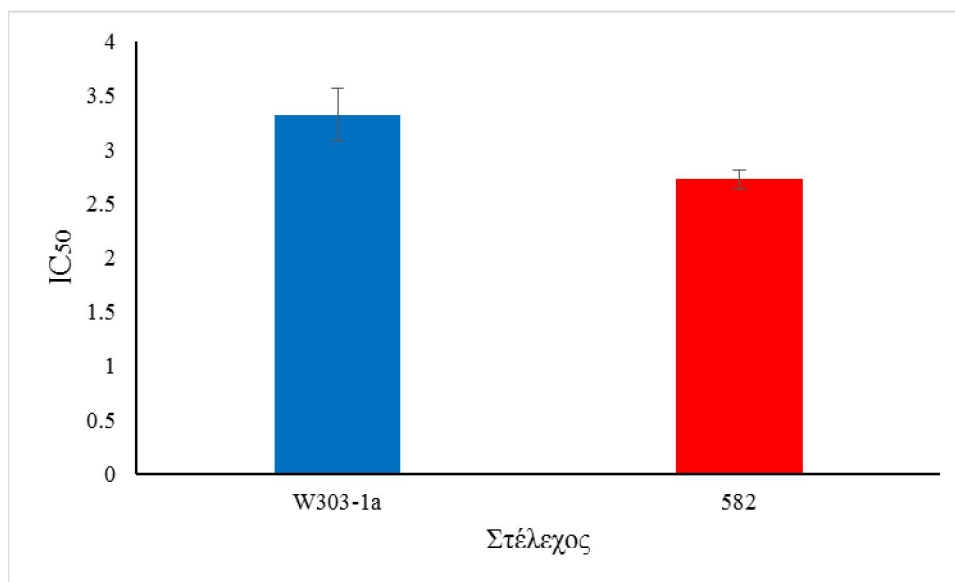
Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της αιθανόλης στην οποία επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης κατά 50% IC₅₀ ακολουθώντας τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στα «Υλικά – πειραματικές πορείες» ελήφθη το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4.4: ενδεικτικές καμπύλες αναστολής της ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης.

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές και από τα πειραματικά δεδομένα υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των καμπυλών αναστολής χρησιμοποιώντας την

προσαρμογή σιγμοειδούς καμπύλης. Ακολούθως υπολογίστηκε η τιμή της αιθανόλης όπου επιτυγχάνεται 50% αναστολή της ανάπτυξης που παρουσιάζονται στο σχ. 4.5.



Σχήμα 4.5: Διάγραμμα IC₅₀ της αιθανόλης. Η διαφορά που εμφανίζεται είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

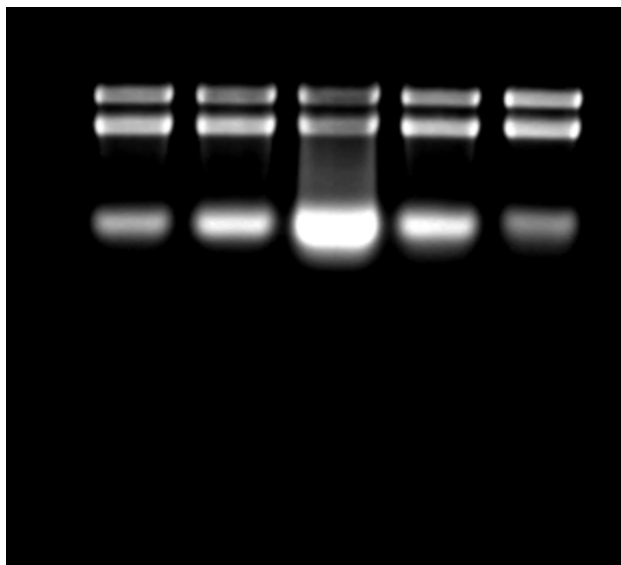
Όπως παρατηρείται, για το στέλεχος που φέρει την μετάλλαξη Ser582Ala επί της *msn2* αναστέλλεται η ανάπτυξη του κατά 50% σε τιμή συγκέντρωσης αιθανόλης χαμηλότερη από αυτή του αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό ίσως και να ήταν αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη ότι ο μεταγραφικός παράγοντας *msn2* όταν εισέρχεται στον πυρήνα εκτός από την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που αποκρίνονται στο stress αναστέλλει ως ένα βαθμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

4.4 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA από δείγματα που συλλέχθηκαν τόσο του αγρίου τύπου όσο και του μεταλλαγμένου στελέχους έγινε με την μέθοδο της απομόνωσης RNA με όξινη φαινόλη. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποβληθεί σε επώαση σε θρεπτικό υλικό του οποίου η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 0%v/v και 6%v/v. Η λήψη των δειγμάτων έγινε σε χρόνους $t=15\text{min}$ και $t=16\text{h}$.

Μετά την απομόνωση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης για να εξεταστεί η ποιότητα του RNA που ελήφθη. Αναμένεται να εμφανιστούν δυο έντονα ίχνη που αντιστοιχούν στα μόρια του ριβοσωμικού RNA

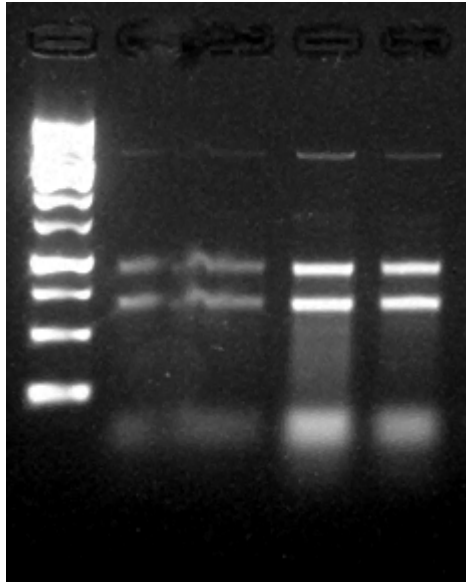
(rRNA) 18S και 26S. Παρακάτω εμφανίζεται ενδεικτική εικόνα της ηλεκτροφόρησης του απομονωθέντος ολικού RNA. (Εικ.4.5).



Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA

4.4.1 Κατεργασία δειγμάτων RNA με DNase-I.

Τα δείγματα RNA που ελήφθησαν τις περισσότερες φορές περιέχουν και ίχνη DNA. Για την λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων κατά την Real-Time (RT) PCR που θα ακολουθήσει απαιτείται η πλήρης απουσία του DNA από τα δείγματα RNA. Για το λόγο αυτό ακολούθησε η κατεργασία των δειγμάτων RNA με DNase-I. Ιόπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.12.2. Εφόσον τα δείγματα καθαρίστηκαν εκ νέου για την απομάκρυνση της DNase-I ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για να βεβαιωθούμε για την ποιότητα του απομονωθέντος RNA (Εικ 4.6).



Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την κατεργασία με DNAase.

4.4.2 Μελέτη της έκφρασης γονιδίων με Real-Time (RT)PCR

Προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση γονιδίων στο μεταλλαγμένο στέλεχος, που έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες, τα δείγματα που ελήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή Real-Time (RT) PCR. Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα: ELO1, ALD4, TDH1. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ALG9.

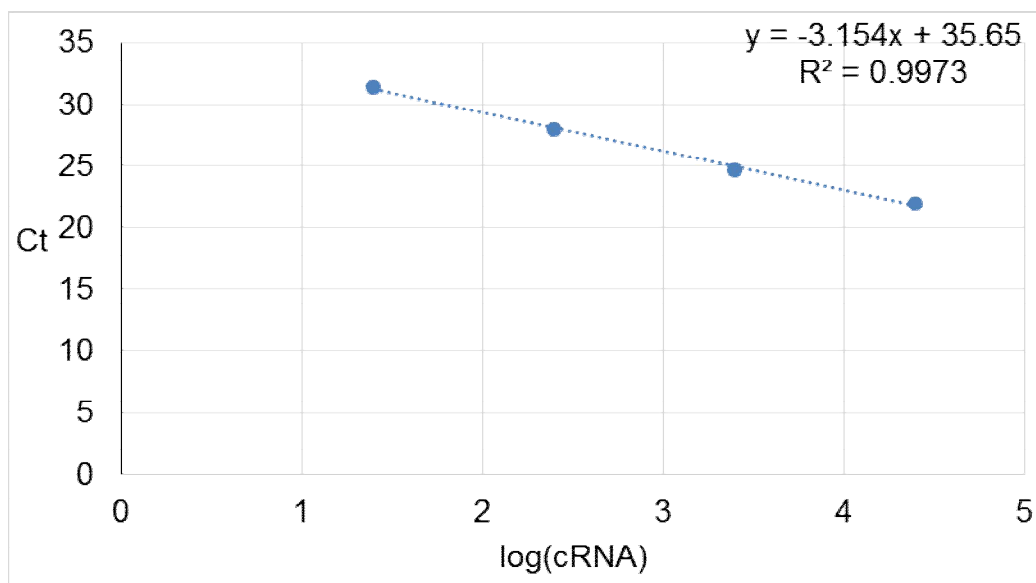
4.4.3 Υπολογισμοί ποσοτικοποίησης της RealTimePCR

Για τους υπολογισμούς των αποτελεσμάτων της RealTimePCR χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο ALG9 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.

Σημαντική παράμετρος 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.

Για να γίνει εφικτή η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση των αποτελεσμάτων της RealTimePCR απαιτείται πρώτα η δημιουργία πρότυπων καμπυλών τόσο για το γονίδιο αναφοράς(ALG9) και για όλα τα υπό μελετη γονίδια. Η μορφή των πρότυπων καμπυλών εμφανίζεται ενδεικτικά στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 4.6).



Σχήμα 4.6: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γονιδίου. Στον 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 αναφοράς.

4.4.4 Τα υπό μελέτη γονίδια

- ALG9

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

- ELO1

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 αλδεϋδης που εμπλέκεται στο σχηματισμό οξικού οξέος κατά τη διάρκεια αναερόβιας ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσω που περιέχει γλυκόζη. Εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και αποτελεί μηχανισμό προστασίας του κυττάρου από την τοξική ακεταλδεϋδη που παράγεται από το πυροσταφυλικό αλλά ανταγωνίζεται το σχηματισμό αιθανόλης.

- HXK1

Η εξοκινάση-I είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στην πορεία της γλυκολυσης 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 ιδιαίτερος της γλυκόζης.

- TDH1

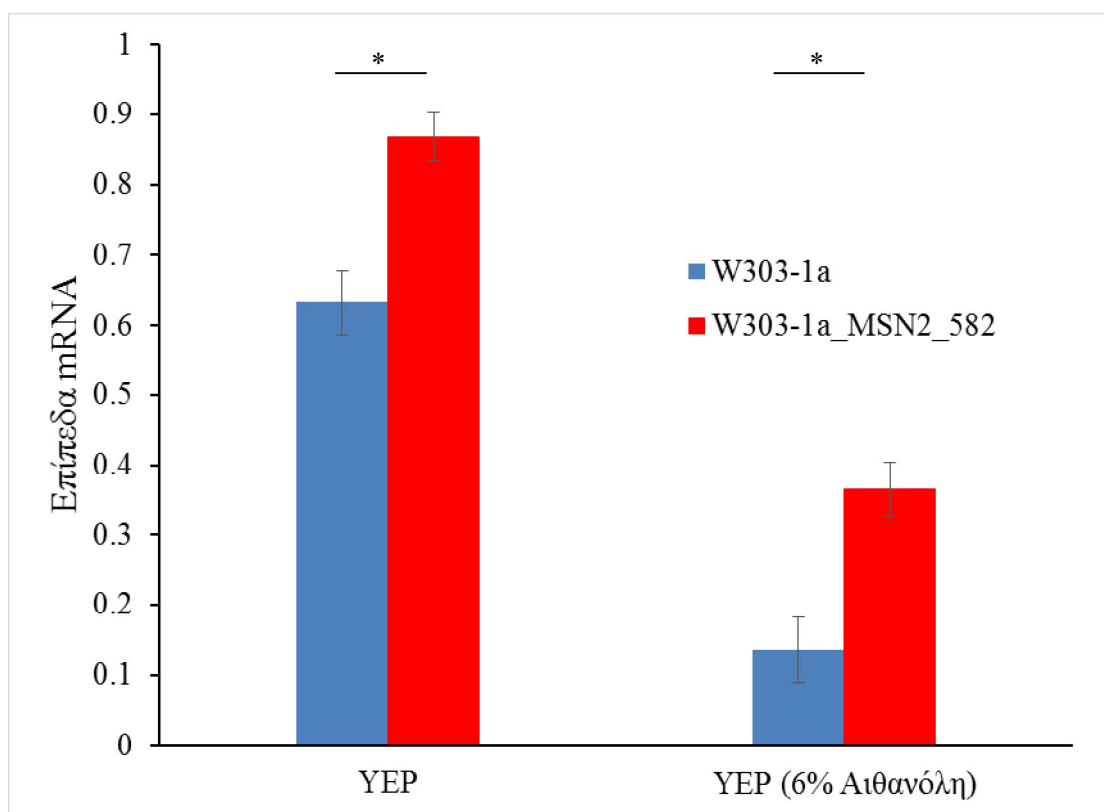
Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης η οποία συμμετέχει στην πορεία της γλυκόλυσης οξειδώνοντας την 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη σε 3-φώσφο-γλυκερικό.

4.5 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων για χρόνο=15min

4.5.1 ELO1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP παρουσία 6% (v/v) αιθανόλης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική. (Σχ.4.7). Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων mRNA πιθανόν να

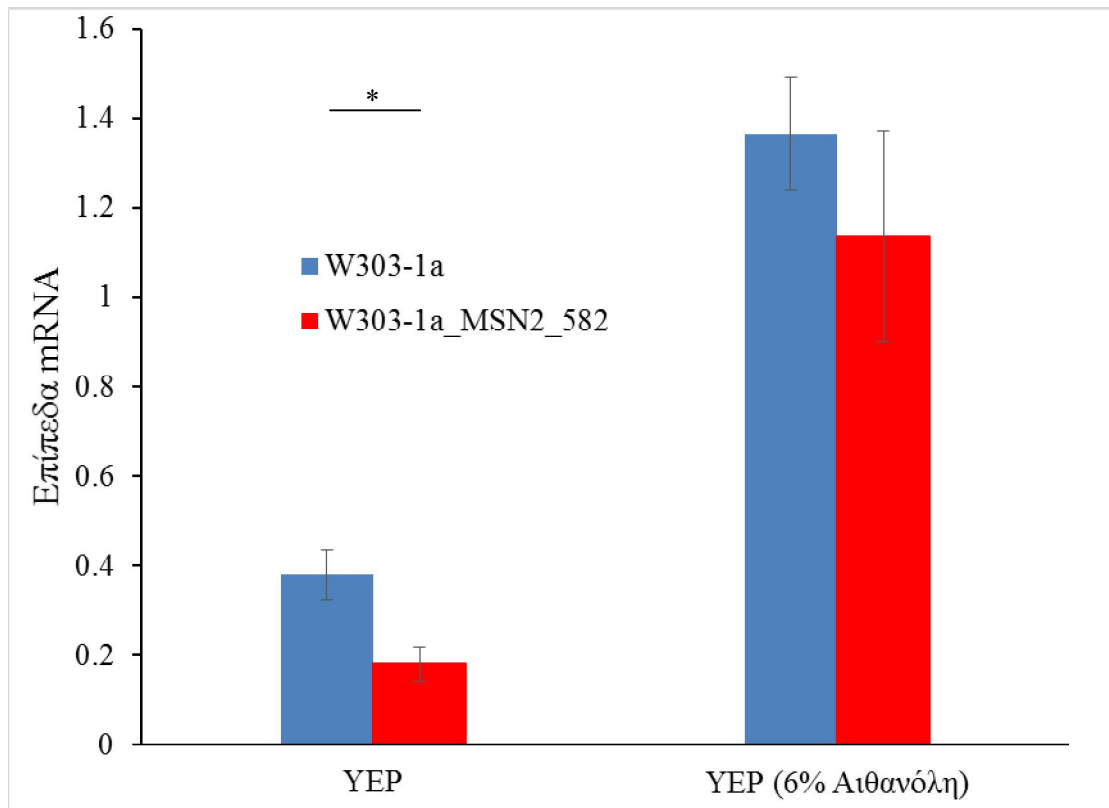
αντανακλά την αυξημένη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακριάς αλύσου που πιθανολογείται ότι βοήθα στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος αυξημένη ικανότητα επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης.



Σχήμα 4.7: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφονται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Οι διαφορές που εμφανίζονται είναι στατιστικά σημαντικές ($p<0.05$).

4.5.2 ALD4

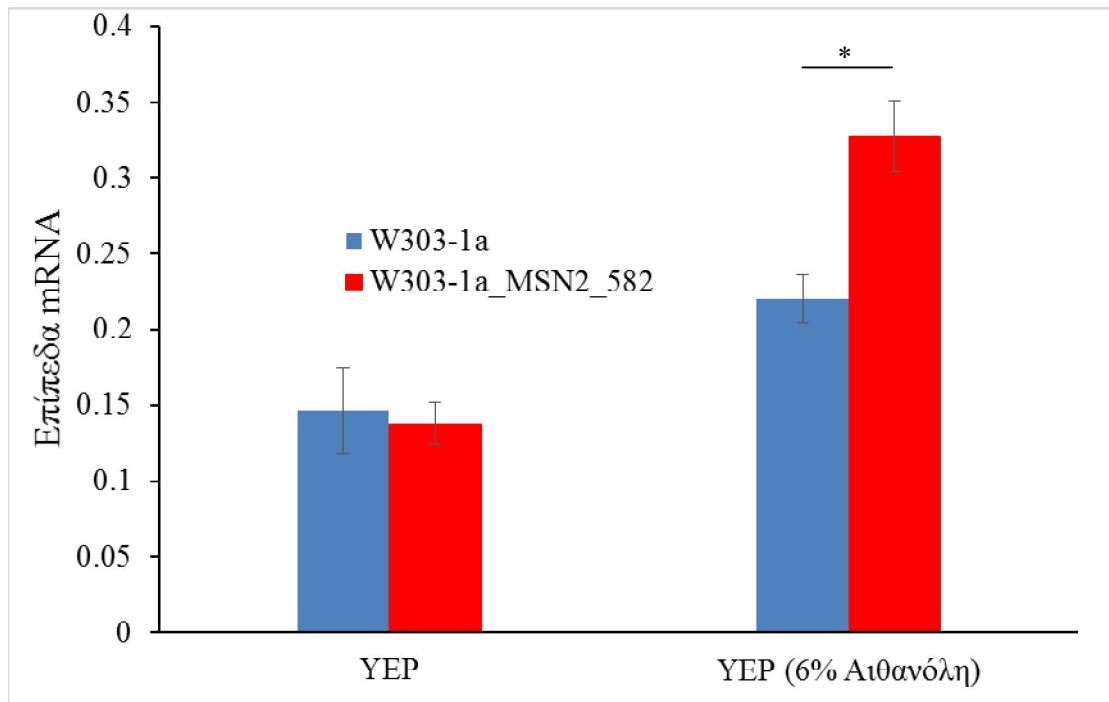
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά στατιστικώς σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP (Σχ.4.8) Όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, αυτό το γονίδιο εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και αποτελεί μηχανισμό προστασίας του κυττάρου από την τοξική ακεταλδεΰδη που παράγεται από το πυροσταφυλικό μετατρέποντάς τη σε οξικό οξύ. Η μείωση των επιπέδων μπορεί να υποδηλώνει είτε μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης είτε μεγαλύτερη ευαισθησία.



Σχήμα 4.8: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) 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 ($p<0.05$).

4.5.3TDH1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 φαίνεται ότι είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε YEP παρουσία 6% (v/v) αιθανόλης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του TDH1 γονιδίου πιθανώς να υποδηλώνει καλύτερη και ταχύτερη λειτουργία της γλυκόλυσης και πιθανόν της παραγωγής αιθανόλης (Σχ.4.9).

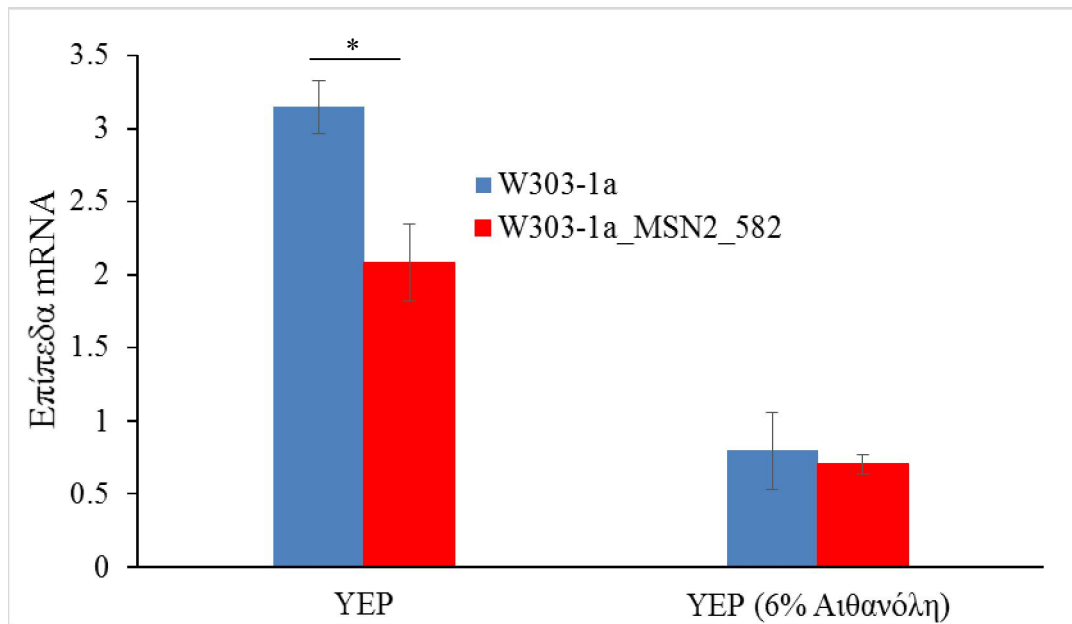


Σχήμα 4.9: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=15min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

4.5.4HXK1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HXK1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του HXK1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική. (Σχ.4.10).

Είναι γνωστό ότι 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 είναι μεγαλύτερη όταν αναπτύσσεται σε υποστρώματα με άνθρακα και απουσία γλυκόζης.

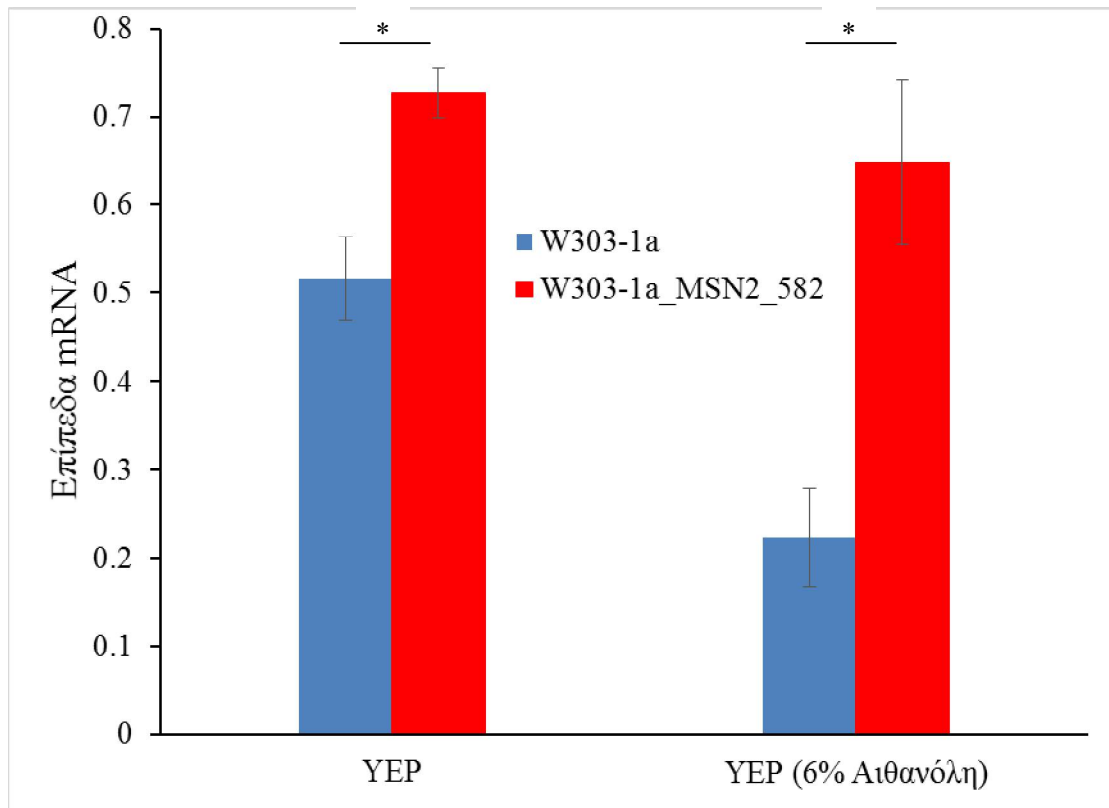


Σχήμα 4.10: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=15min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

4.6 Αποτελέσματα γονιδίων της RealTimePCR για t=16h

4.6.1 ELO1

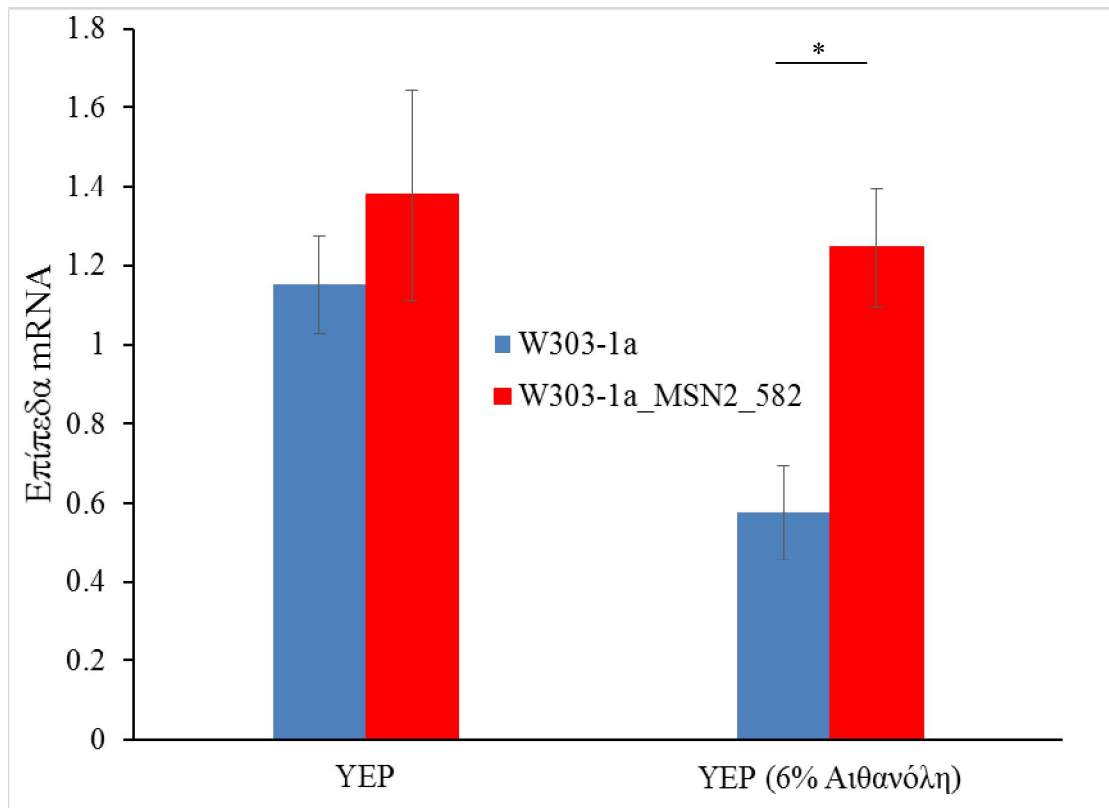
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της Msn2, μετά την πάροδο 16h. Η αύξηση είναι επιπλέον μεγαλύτερη παρουσία 6% (v/v) αιθανόλης (Σχ.4.11). Η παρατηρούμενη αύξηση πιθανόν να αντανακλά την αυξημένη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακριάς αλύσου που πιθανολογείται ότι βοήθα στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης ακόμα μετά και από μακροχρόνια έκθεση στην αιθανόλη.



Σχήμα4.11:Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

4.6.2 ALD4

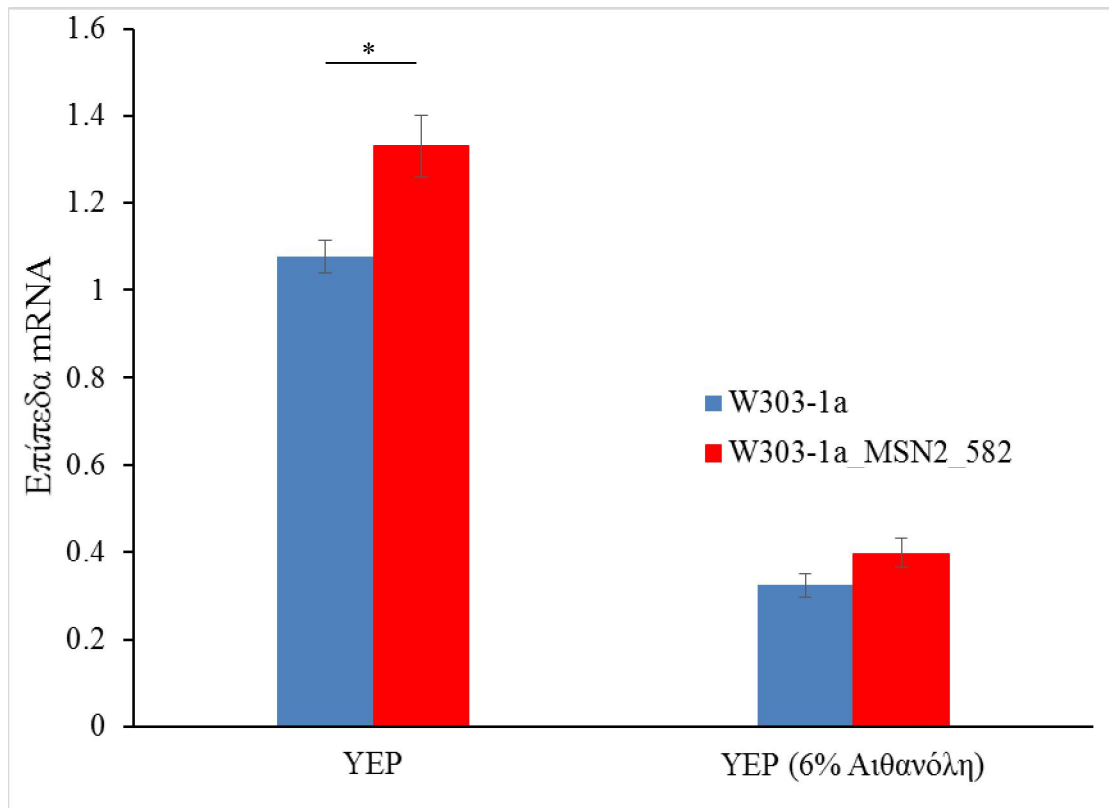
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h σε θρεπτικό υλικό YEP που περιέχει 6%(v/v) αιθανόλη για χρόνο 16h υποδηλώνοντας καλύτερη λειτουργία του μιτοχονδρίου.



Σχήμα 4.12: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=16h$. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$).

4.6.3 TDH1

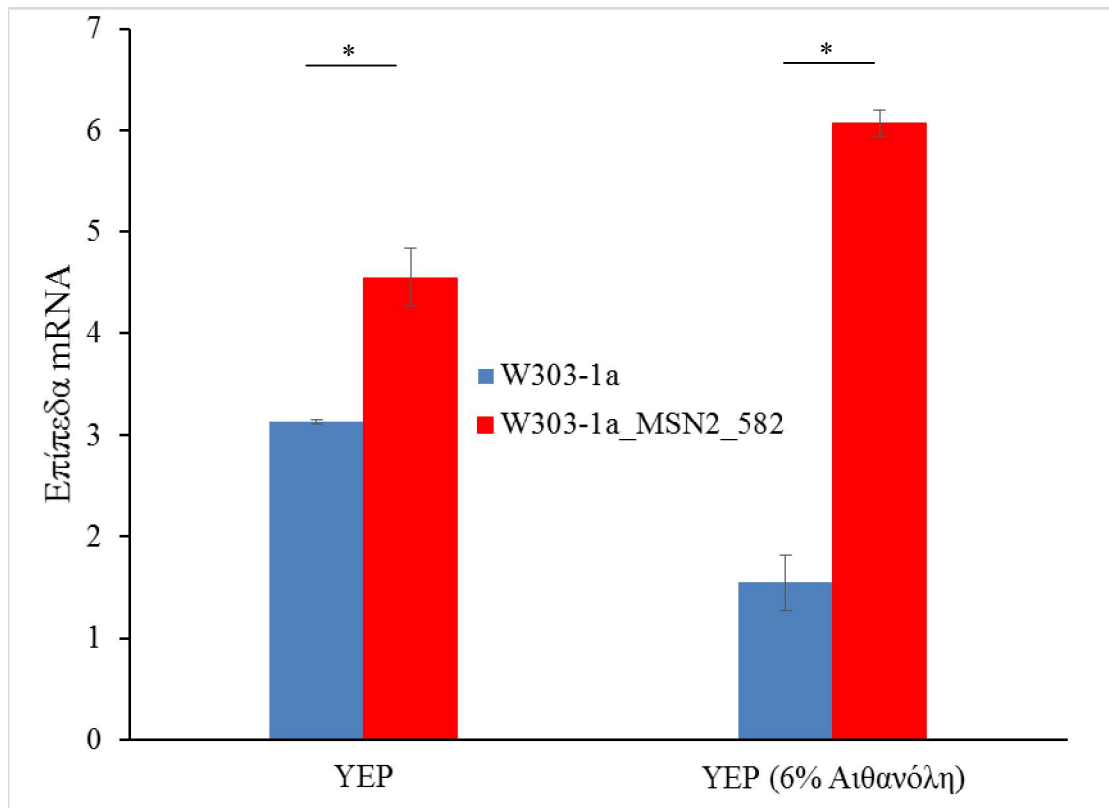
Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 μετά την πάροδο 16h πιθανόν να οφείλεται σε εξάντληση της γλυκόζης από το θρεπτικό υλικό (Σχ.4.13).



Σχήμα 4.13: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης $t=16h$. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με * εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$).

4.6.4 HXK1

Η μακροχρόνια έκθεση του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί της Msn2 σε 6% (v/v) αιθανόλη, φαίνεται ότι αυξάνει επιπροσθέτως την έκφραση των επιπέδων της έκφρασης του HXK1 γονιδίου (Σχ.4.14).υποδεικνύοντας πιθανόν τη καλύτερη λειτουργία της πορείας της γλυκόλυσης αφού η εξοκινάση-I είναι το κυριότερο σημείο ελέγχου της γλυκόλυσης.



Σχήμα 4.14: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a_MSN2_582) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. 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

Η βελτίωση της απόδοσης της αλκοολικής ζύμωσης είναι ένα από τα κρίσιμα ζητήματα που αφορά τόσο τον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών, όσο και το τομέα της περιβαλλοντικής διαχείρισης αποβλήτων. Το συγκεκριμένο γεγονός λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ως έναυσμα για την δημιουργία και μελέτη γενετικά τροποποιημένων στελεχών του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Πρωταρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η δημιουργία της μετάλλαξης Ser582Ala επί του γονιδίου MSN2, η αντικατάσταση του αγρίου τύπου γονιδίου των κυττάρων ζύμης, με αυτό που φέρει τη μετάλλαξη, και η πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης. Η σύγκριση των ληφθέντων αποτελεσμάτων έγινε έναντι των μητρικών κυττάρων αγρίου τύπου, προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση της απόκρισής τους σε αντίξοες συνθήκες.

Αρχικά εισήχθη η μετάλλαξη T1746G επί του γονιδίου MSN2 που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος σερίνη σε αλανίνη στη θέση 582 (Ser582Ala), ακολουθώντας την μέθοδο πέψης με το ένζυμο *DpnI*. Κατόπιν, η μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου της MSN2 ενισχύθηκε με PCR και εισήχθη σε κύτταρα ζύμης W303-1a_ΔMSN2::URA3 από τα οποία έχει απαληφθεί το αγρίου τύπου γονίδιο της MSN2. Ακολούθως του μετασχηματισμού και του ακολουθούμενου ομόλογου ανασυνδυασμού, το στέλεχος που προέκυψε είναι το W303-1a_MSN2_582.

Το ληφθέν στέλεχος υποβλήθηκε σε δοκιμασίες ανάπτυξης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης. Η παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης επιδρά αρνητικά στο ρυθμό ανάπτυξη και όταν συγκεντρώνεται στο θρεπτικό υλικό, δρα ως χημικός στρεσογόνος παράγοντας. Συγκεκριμένα, σε θρεπτικό μέσο με σχετικά χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης (3% v/v) παρατηρείται ότι η κυτταρική ανάπτυξη του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα διαφέρει αισθητά με αυτή του αγρίου τύπου διότι υπάρχει αυξημένη υστέρηση στην είσοδο των κυττάρων στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Ακολούθησε μελέτη της αναστολής της ανάπτυξη από την αιθανόλη και προσδιορισμός της συγκέντρωσης ημίσειας ανάπτυξης (IC_{50}), από όπου φάνηκε ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς την ανάπτυξη παρουσία αιθανόλης. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο διότι είσοδος της

msn2 στον πυρήνα του κυττάρου επάγει την άρση της λειτουργίας του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Επίσης, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μελετάται είναι τα ακόλουθα: ELO1, ALD4, TDH1, και HXK1.

Κύτταρα από τα στελέχη w303-1a και w303-1a_MSN2_582 που εκτέθηκαν στις συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA. Εν συνεχεία στα απομονωθέντα RNA εξετάστηκαν τα επίπεδα της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων με την μέθοδο της Real-TimePCR.

Από την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων προκύπτει ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ELO1 και HXK1 πιθανόν να βελτιώνουν την κυτταρική λειτουργία και απόκριση του μεταλλαγμένου στελέχους W303-1a_MSN2_582

Περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας επιβίωσης αλλά και της ικανότητας ζύμωσης του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη θα αποκαλύψουν τελικά την κρισιμότητα του αμινοξέος σερίνης στη θέση 582 της πρωτεΐνης Msn2.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Barik S. (1996). Site- Directed Mutagenesis in Vitro by Megaprimer PCR, Methods in Molecular Biology vol.57- In vitro Mutagenesis protocols. pp. 203-215

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Barik, 1996)

- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002). Biochemistry, 5th edition. New York: W.H. Freeman and Company.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Bergetal., 2002)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Boy- Marcotteetal., 1998)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Brewsteretal., 1993)

- Carlile M.J., Watkinson S.C., Goodday G.W. (2001). The Fungi. 2ndrd.London : Academic Press.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Carlileetal., 2001)

- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 24, pp. 469–486.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Estruch, 2000)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (EstruchandCarlson, 1993)

- Gancedo J.M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704.

Αναφοράμέσαστοκείμενο : (Gancedo, 2008)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο :(Gaschetal., 2000)

- GlazerA.N. and NikaidoH. (1995).*MicrobialBiotechnology-Fundamentals of Applied Microbiology.* New York:W.H. Freeman and Company.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (GlazerandNikaido, 1995)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Gorneretal., 2002)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Hasanetal., 2002)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Hirayama *et al.*, 1995)

- Hunt M. (2006). Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Hunt, 2006)

- Jackson R.S. (1994). *Wine Science-Principles and applications*. Carolina: Academic Press.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Jackson, 1994)

- Jing L., Chunhua L., Wei X., Dongxia Y., Gang W., Linxin M. (2007). Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and DpnI digestion of the plasmid template in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 373. pp. 389-391.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Jing *et al.*, 2007)

- Kammann M., Laufs J., Schell J. and Gronenborn B. (1989). *Nucleic Acids Res.*, 17. pp. 5404.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Kammann *et al.*, 1989)

- Kandrór 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Kandrór *et al.*, 2004)

- Landt O., Grunert H.P. and Hahn U. (1990). *Gene*, 96. pp. 125–128.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Landt *et al.*, 1990)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Lee *et al.*, 2008)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Marechal and Gervais, 1994)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Martinez- Pastore *et al.*, 1996)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Meikle *et al.*, 1988)

- PCR Primer- A laboratory manual Cold Spring Harbor Press (1995). pp 603-611.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (PCR- A laboratory manual. (1995)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Saiki *et al.*, 1985)

- Santangelo G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Santangelo, 2006)

- Sarkar G. and Sommer S.S. (1990). *BioTechniques*, 8, pp. 404–407.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (SarkarandSommer 1990, 1992)

- Sarkar G. and Sommer S.S. (1992). *Nucleic Acids Res.*, 20, pp. 4937–4938

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (SarkarandSommer 1990, 1992)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (SchmittandMcEntee, 1996)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Schulleretal., 1994)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Smithetal., 1998)

- 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.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (TheveleinandWinde, 1999)

- VandenLangernberg B. (2012). *Baker's and Brewer's Yeast*. Available at:

http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/vandenla_beth/contact.htm. Τελευταία επίσκεψη 21/5/2016.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (VandenLangernberg, 2012)

- Walker G. M. (1998). Yeast Physiology and Biotechnology. New York: John Wiley and Sons.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Walker, 1998)

- 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](#).

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (You *et al.*, 2003)

- Science.gr : Real Time PCR (2012). Ημερομηνία ανάκτησης 10 Μαΐου 2016, από <http://www.science.gr/main/>.

- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.

- Sample and assay technologies - Real Time PCR brochure (05/2009): Critical factors for successful Real Time PCR, 64:9.

Ελληνική βιβλιογραφία

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006)

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Βερβερίδης. 2003)

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Λαζανάκη, 2010)

- Μπαμπίλης Ν. και Οικονόμου Κ. (2001). Βιοχημεία Γ' Γενικού Λυκείου –Τεχνολογικής κατεύθυνσης: Κύκλος Τεχνολογίας και Παραγωγής. Αθήνα: Πατάκης.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001)
- Μπατρίνου Α.Μ. (2011). Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων-γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Αθήνα : Π.Χ. Πασχαλίδης.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Μπατρινού, 2011)
- Μπέλκα Α. (2007). Επίδραση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στη βιοχημική συμπεριφορά στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Μπέλκα, 2007)
- Παπανικολάου Β. (2006). Μέθοδοι και Υλικά Ακίνητοποίησης Βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου. Πάτρα: s.n.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Παπανικολάου, 2006)
- Συμεωνίδου Ιωάννα Ελένη (2008) « Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς » Ανέκδοτη διπλωματική εργασία , Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής