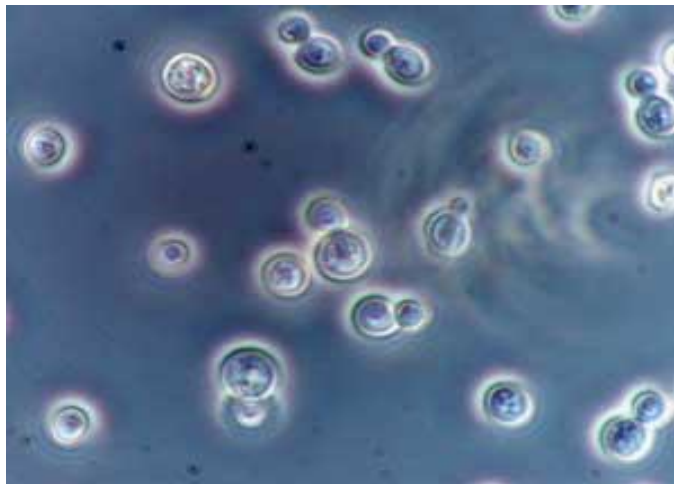


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Μελέτη σε μεταγραφικό επίπεδο της έκφρασης γονιδίων σε στέλεχος του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, που φέρει την πρωτεΐνη MSN4 μεταλλαγμένη στη θέση 531»



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΜΠΡΑΚΟΥ ΚΑΝΕΛΛΗ

Επιβλέπων καθηγητής:
Σωτήρης Σπυρίδων Βαμβακάς

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.2 ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΕΣ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΡΕΣ	5
1.2 PCR και Real time PCR	11
1.2.1 Αρχή μεθόδου της PCR	11
1.3 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	14
1.3.1 Αρχή της μεθόδου	14
1.3.2 Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων	19
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1.1 ΥΛΙΚΑ.....	21
ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές πορείες.	21
2.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΠΟ STOCK ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	23
2.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	23
2.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	24
2.6 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	24
2.7 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ	26
2.8 RNA	26
2.8.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	26
2.8.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΜΕ ΟΞΙΝΗ ΦΑΙΝΟΛΗ.....	27
2.8.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA ΜΕ DNase	28
2.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	32
3.1.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ 2% ΓΛΥΚΟΖΗΣ	32
3.1.2 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ 15% ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	33
3.2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	33
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	35
3.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ DNases-I.....	35
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....	36
3.5.1 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ.....	36
3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ Real-Time PCR.....	37

3.6.1 ELO1	37
3.6.2 ALD4	38
3.6.3 GND2	40
3.6.4 TDH1.....	42
3.6.5 ΗΧΚ1	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	47
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
5.1 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *S. Cerevisiae* είναι ένας από τους κύριους μικροοργανισμούς της κατηγορίας των ζυμών που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Η βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας και αφορά ή την τροποποίηση των συνθηκών ζύμωσης ή τη γενετική βελτίωση του μικροοργανισμού.

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

Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Msn4 βρέθηκε ότι το αμινοξύ Ser στη θέση 531 αποτελεί μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από την PKA.

Μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη Ser531Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 καθώς και η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε μεταβολικές κυρίως διεργασίες του κυττάρου με σκοπό να καταδειχθεί η σημαντικότητα του εν λόγω καταλοίπου σερίνης.

ABSTRACT

S. cerevisiae is one of the major organisms of the class of yeasts used extensively in the food and beverage industry. Improving the efficiency of fermentation is an important subject of research and concerns, via either changing the conditions of fermentation or genetic improvement of the microorganism.

When the cell exposed in a stress environment, the protein MSN4 activated through phosphorylation by various protein kinases in order to enter the cell's nucleus. MSN4, which is a transcription factor, controls the expression of genes that help the cell to respond to stress. Simultaneously, however, the translocation of MSN4 to the nucleus is controlled through phosphorylation by the complex of the protein kinase A (PKA). Specifically, MSN4 protein phosphorylation by PKA have the effect of preventing the entry of MSN4 in the cell's nucleus.

Through analysis of the protein sequence of MSN4 found that the amino acid Ser at position 531 is a potential site of phosphorylation by PKA.

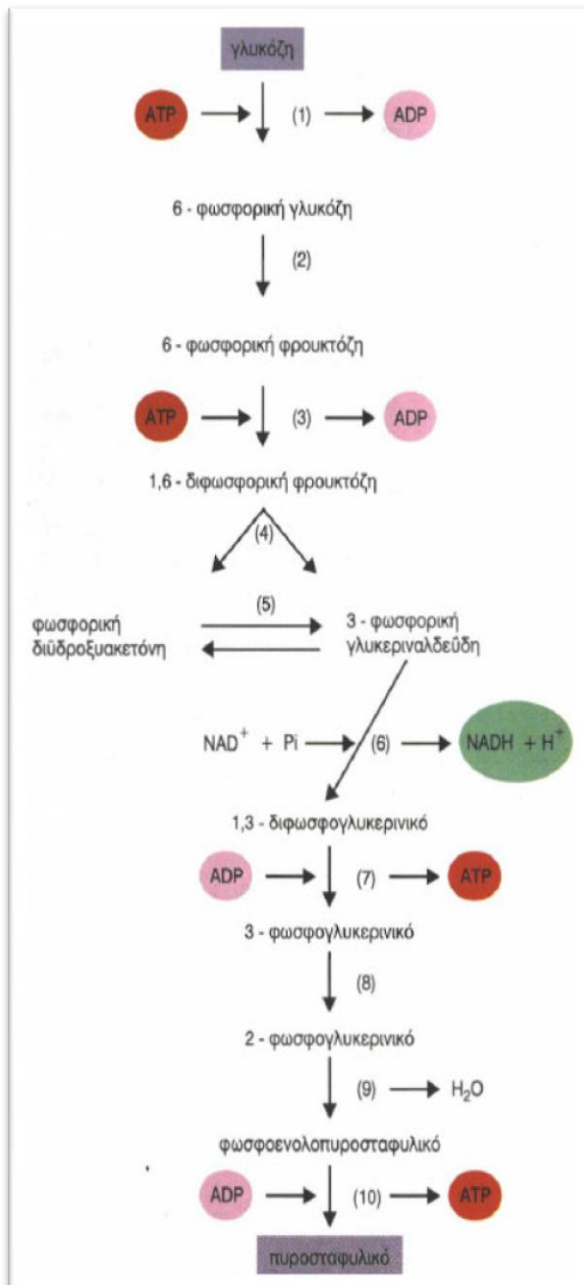
We studied the development ability of the strain carrying the mutation *Ser531Ala* on the protein MSN4 and the expression of genes which is involved in metabolic processes of the primarily cell in order to demonstrate the significance of the ratio serine residue.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.2 ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΕΣ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΡΕΣ

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών λαμβάνοντας μέρος σε διάφορες διαδικασίες, με πιο γνωστή αυτή της αλκοολικής ζύμωσης. Η αλκοολική ζύμωση 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 χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων όπως καλλιεργήσιμα φυτά, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων κ.α.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται ευρέως για την αλκοολική ζύμωση είναι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Παρουσία οξυγόνου, σάκχαρα όπως η γλυκόζη μεταβολίζονται σε CO₂ και νερό, ενώ απουσία αυτού σε CO₂ και αιθανόλη. Η πορεία η οποία χρησιμοποιείται από το κύτταρο είναι αυτή της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhoff) κατά την οποία τα σάκχαρα όπως η γλυκόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ. Πιο αναλυτικά, με τον όρο γλυκόλυση εννοούμε την αλληλουχία των αντιδράσεων η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Η πορεία διάσπασης της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό γίνεται σε δέκα επιμέρους βήματα. Οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες, τα ένζυμα καθώς και τα συνένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία αυτή, παρουσιάζονται στην εικ.1.



Εικόνα 1.1: Σχηματική πορεία γλυκολυσης

Η αποικοδόμηση της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ γίνεται με τη διαδοχική δράση 10 ενζύμων, το καθένα από τα οποία έχει απομονωθεί από διαφορετικές πηγές και έχει μελετηθεί λεπτομερώς.

Αρχικά η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφογλυκόζη παρουσία του ενζύμου εξοκινάσης. Στη συνέχεια η 6-φωσφογλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφοφρουκτόζη. Αυτό αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης και στα δυο άκρα της και είναι απαραίτητο γιατί η ενέργεια σχηματισμού ενός πυροφωσφορικού δεσμού είναι μικρότερη από την ενέργεια σχηματισμού ενός φωσφορικού εστέρα με ημιακεταλικό

υδροξύλιο. Επόμενη αντίδραση είναι η φωσφορυλίωση της 6-φωσφο-φρουκτόζης στη θέση 1 προς 1,6-διφωσφο-φρουκτόζη. Καταλύεται από τη φωσφο-φρουκτοκινάση-1 με κατανάλωση ενός μορίου ATP. Το ένζυμο που είναι από τα πιο πολύπλοκα ένζυμα με αλλοστερικές ιδιότητες, έχει αλλοστερικούς αναστολείς το ATP, τα λιπαρά οξέα κ.λπ., και ενεργοποιητές το ADP και AMP. Η αντίδραση είναι από τις σημαντικότερες ρυθμιστικές πορείες της γλυκόλυσης. Η διφωσφορυλιωμένη εξόζη είναι πλέον ενεργοποιημένη για να διχοτομηθεί και να σχηματισθούν δυο τριόζες, διεργασία που φέρεται σε πέρας με το ένζυμο αλδολάση. Στη συνέχεια με ένα πολύ δραστικό ένζυμο, την ισομεράση της φωσφο-τριόζης, η φωσφο-διυδροξυ-ακετονη ισομεριώνεται προς 3-φωσφογλυκεριναλδεύδη. Επειδή όμως η 3-φωσφο-γλυκεριναλδεύδη συνεχώς απομακρύνεται, αφού συμμετέχει στην επόμενη αντίδραση, η ισορροπία της ισομερίωσης μετακινείται προς σχηματισμό της. Η επόμενη αντίδραση είναι μια οξειδοαναγωγική αντίδραση κατά την οποία σχηματίζεται μία ένωση υψηλής ενέργειας 1,3-διφωσφο-γλυκερικό οξύ χωρίς κατανάλωση ATP. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη και καταλύεται από την αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκεριναλδεύδης. Η αντίδραση καταλύεται από μία κινάση με τη βοήθεια του ATP. Εδώ γίνεται η φωσφορυλίωση του 3-φωσφο-γλυκερινικού οξέος από το ATP. Το 3-φωσφο-γλυκερικό οξύ παρουσία του ενζύμου φωσφομουτάση του φωσφογλυκερικού μετατρέπεται σε 2-φωσφογλυκερικό οξύ. Στη συνέχεια, με αφυδάτωση του 2-φωσφο-γλυκερικού οξέος, παρουσία του ενζύμου ενολάση, προκύπτει το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ, μία ένωση υψηλής ενέργειας. Η απώλεια ενός μορίου νερού από το 2-φωσφο-γλυκερικό οξύ, προκαλεί ανακατανομή του φορτίου στο φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ, αυξάνοντας την ενέργεια υδρόλυσης της φωσφορικής ομάδας. Τέλος το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό μπορεί να μεταφέρει τη φωσφορική του ομάδα σε 1 ADP και να το φωσφορυλιώσει προς ATP. Κατ' αυτόν τον τρόπο, προκύπτει το πυροσταφυλικό οξύ που είναι και το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης.

Όταν ο *S. cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, μια επιπλέον δράση των μορίων των σακχάρων εκτός του μεταβολισμού τους, είναι η δράση τους επί της ενεργοποίησης ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η ρύθμιση της

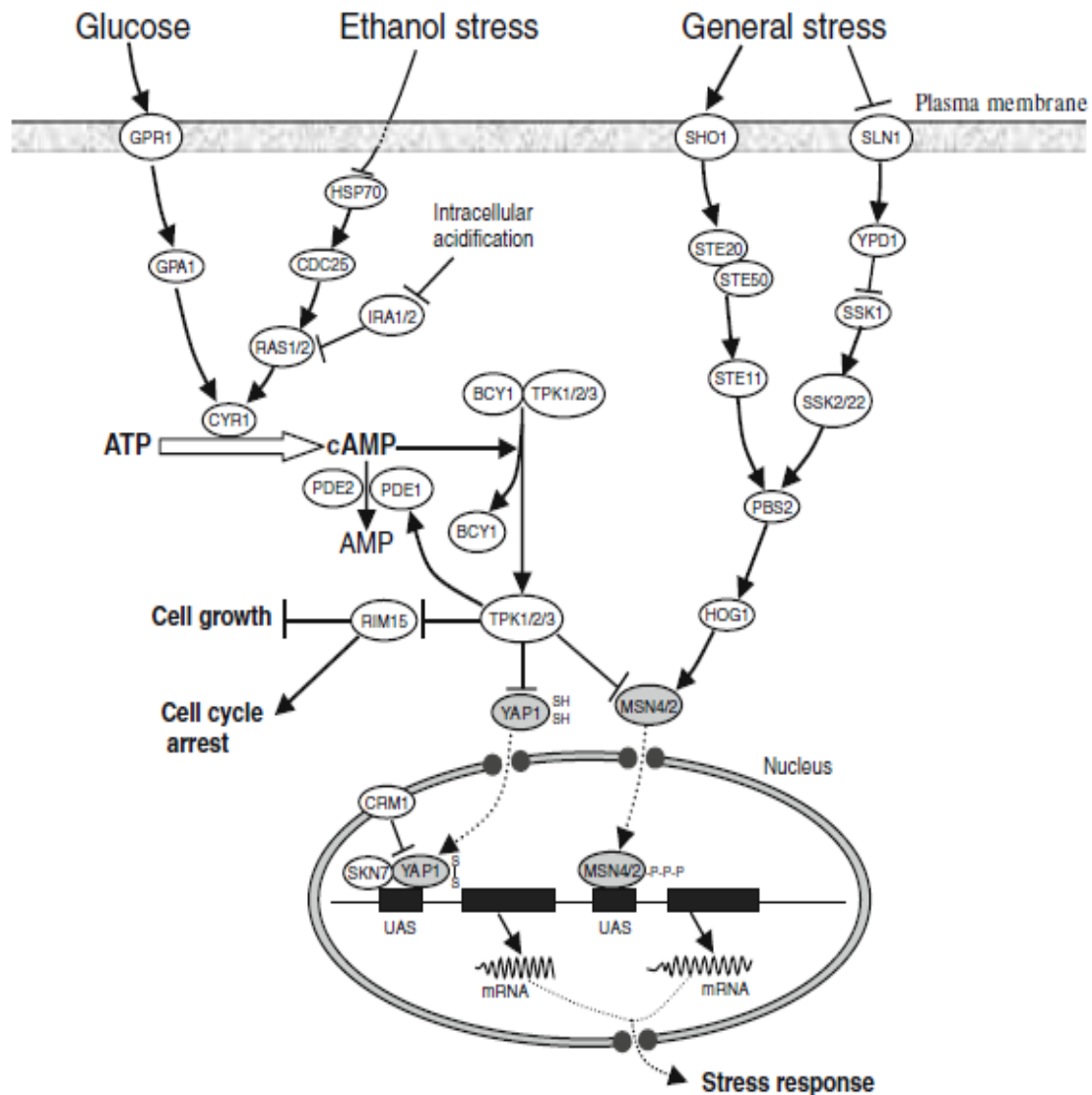
δραστηριότητας του μονοπατιού της cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) /PKA (πρωτεϊνική κινάση A) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού κυττάρων ζύμης, που συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα. Στον *S. cerevisiae*, σε απάντηση σε μια ραγδαία ζυμώσιμη πηγή άνθρακα όπως είναι η γλυκόζη, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Cyp1 (αδενυλική κυκλάση). Η δράση της αδενυλικής κυκλάσης έχει ως αποτέλεσμα την παροδική αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης, cAMP. Η Πρωτεϊνική κινάση A (PKA) είναι ένα ετεροτετραμερές που αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Οι καταλυτικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από τρία γονίδια (TPK1, TPK2 και TPK3), ενώ οι ρυθμιστικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο (BCY1). Η cAMP δρα ως αγγελιοφόρο μόριο δεσμεύοντας και απομακρύνοντας τις ρυθμιστικές υπομονάδες έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η αποκατάσταση των επιπέδων της cAMP ελέγχεται από τις φωσφοδιεστεράσες χαμηλής και υψηλής συγγένειας, που κωδικοποιούνται από τις PDE1 και PDE2 αντίστοιχα, οι οποίες υδρολύουν την cAMP σε AMP. Ακολούθως, η ενεργοποιημένη PKA επηρεάζει διάφορους στόχους συχνά στο επίπεδο της μεταγραφής γονιδίων, όπως τη διέγερση της κυτταρικής ανάπτυξης και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή της γλυκόλυσης, την αναστολή της γλυκονεογένεσης, και την κινητοποίηση του γλυκογόνου και της τριαλόζης (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Gancedo, 2008; Smets et al., 2010).

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

Η ενεργοποίηση της PKA έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση. 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 γονιδίων που ελέγχονται από τις αλληλουχίες απόκρισης στο stress (Stress Responsive Elements (STRE)) (Estruch και Carlson, 1993; Martinez-Pastor 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; Kandror et al., 2004). Οι Msn2/4 βρίσκονται στην καρδιά ενός πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει πολλές φυσικές και γενετικές αλληλεπιδράσεις με διάφορες κινάσες, φωσφατάσες, μεταφορείς και αναδιαμορφωτές χρωματίνης.



Εικόνα 1.2: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες stress λόγω της αιθανόλης στο *S. Cerevisiae*. Σκιασμένοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι γραμμές που καταλήγουν με ένα βέλος δείχνουν θετική αλληλεπίδραση, και αυτές που καταλήγουν με μία 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).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας υπέροχος παραγωγός αιθανόλης ανάμεσα σε πολυάριθμους μικροοργανισμούς ζύμωσης. Αν και είναι ένα παραδοσιακό μικρόβιο παραγωγής αιθανόλης, ο ζυμομύκητας είναι επίσης ευαίσθητος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, ειδικά σε συνθήκες ζύμωσης πολύ υψηλής βαρύτητας. Η συσσώρευση της αιθανόλης αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα, επηρεάζει διαφορετικά συστήματα μεταφοράς και μειώνει τίτλο αιθανόλης στην

καλλιέργεια. Τα υψηλά επίπεδα αιθανόλης επηρεάζουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλούν καταστροφή διαπερατότητας. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, έχει δειχθεί επίσης ότι η αιθανόλη διαταράζει την πρωτεϊνική διαμόρφωση, προκαλώντας μετουσίωση της πρωτεΐνης και δυσλειτουργία, για παράδειγμα, η κινάση και η εξοκινάση που είναι γλυκολυτικά ένζυμα, το κλειδί του πυροσταφυλικού.

Αρκετά εκατοντάδες γονίδια ταυτοποιήθηκαν ότι συνδέονται με την ανοχή αιθανόλης που αφορούν ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών κατηγοριών, συμπεριλαμβανομένων τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, το μεταβολισμό αμινοξέων, το μεταβολισμό νουκλεοτιδίων, το μεταβολισμό των λιπιδίων, το μεταβολισμό λιπαρών οξέων τη σύνθεση μεμβράνης και οργάνωσης του κυτταρικού τοιχώματος, βιοσύνθεση προλίνης και βιοσύνθεση τρυπτοφάνης. Καθώς ταξινομήθηκαν από διαφορετικές λειτουργικές κατηγορίες, κάθε γονίδιο που προκαλείται από την αιθανόλη έχει περισσότερες από μια λειτουργίες. Αν και έχουν γίνει εκτενείς προσπάθειες, οι μηχανισμοί της ανοχής αιθανόλης δεν είναι πλήρως κατανοητές. Ο μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται, πολλαπλά στρώματα λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων, πολυπλοκότητα της απόκρισης του δικτύου ζύμης και συχνά επαναπρογραμματίστηκαν τα μονοπάτια που έκαναν δύσκολη την εργασία, ανεξάρτητα από το πώς η ανοχή ορίζεται κατά τρόπο αμφισβητούμενο (αμφιλεγόμενο). Συνθέσεις και λειτουργίες της πλασματικής μεμβράνης που έχουν συνοψιστεί πρόσφατα σχετίζονται με την ανοχή αιθανόλης σε ζύμες, καθώς και λόγω άγχους ορισμένων γονιδίων.

1.2 PCR και Real time PCR

1.2.1 Αρχή μεθόδου της 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.1.3). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να επιτυγχάνει ταχύτατη εναλλαγή θερμοκρασιών (Βερβερίδης, 2003).



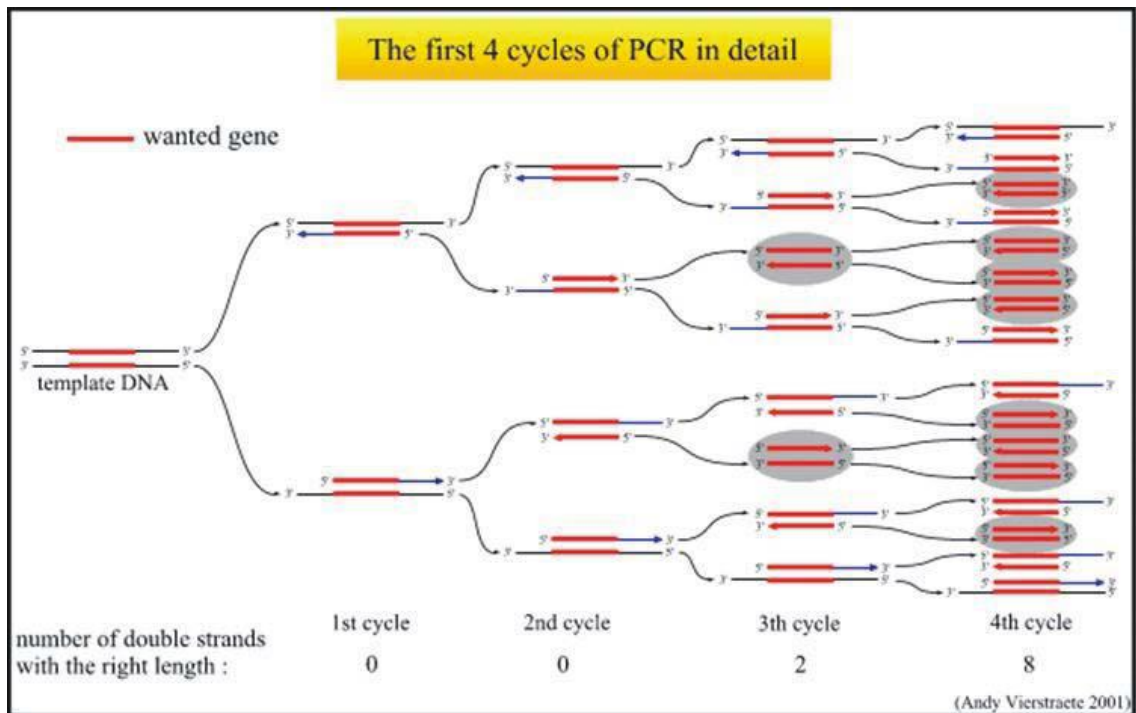
Εικόνα 1.3: Θερμικός κυκλοποιητής (thermal cycler).

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

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

Αυτά τα 3 στάδια λαμβάνουν χώρα σε ένα θερμικό κύκλο. Συνήθως τα πρωτόκολλα της PCR περιλαμβάνουν 30-50 θερμικούς κύκλους (Εικ.1.4). Η διαδικασία πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας-στόχου διαρκεί 2-4 ώρες

και ο πλήρης έλεγχος με την ανίχνευση του ηλεκτροφορητικά ή χρωματομετρικά με υβριδισμό νουκλεϊνικών οξέων (probes), ολοκληρώνεται σε 48 ώρες.



Εικόνα 1.4: Οι 4 πρώτοι κύκλοι μιας PCR

1.3 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

1.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR (Higuchi et al 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.1.5). Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της ενίσχυσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά την ποσότητα του νεοσυντιθέμενου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA (Science.gr: Real Time PCR 2012).



Εικόνα 1.5: Μηχάνημα Real Time PCR

1.3.1.1 Στάδια της Real-Time PCR

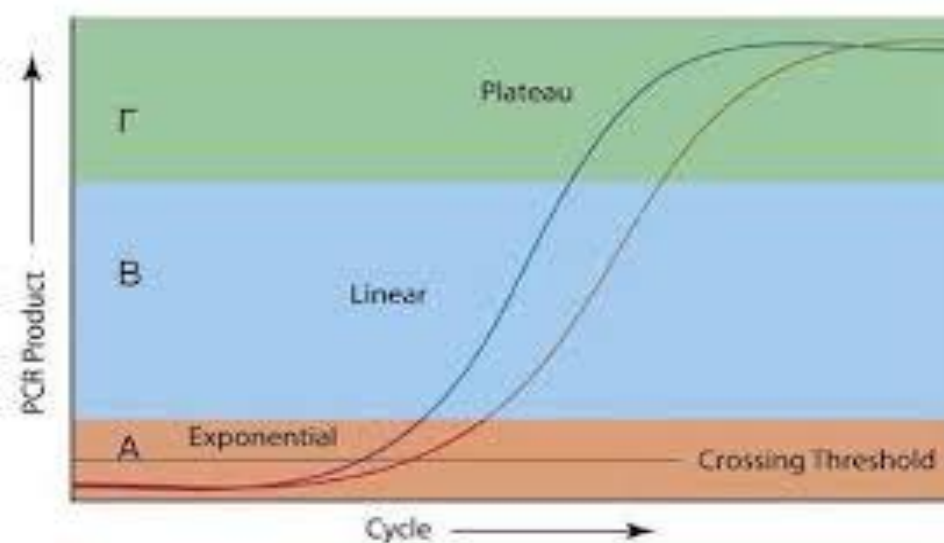
Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (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(Εικ.1.6). Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

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

συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 200

6).



Εικόνα 1.6: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης Real Time PCR

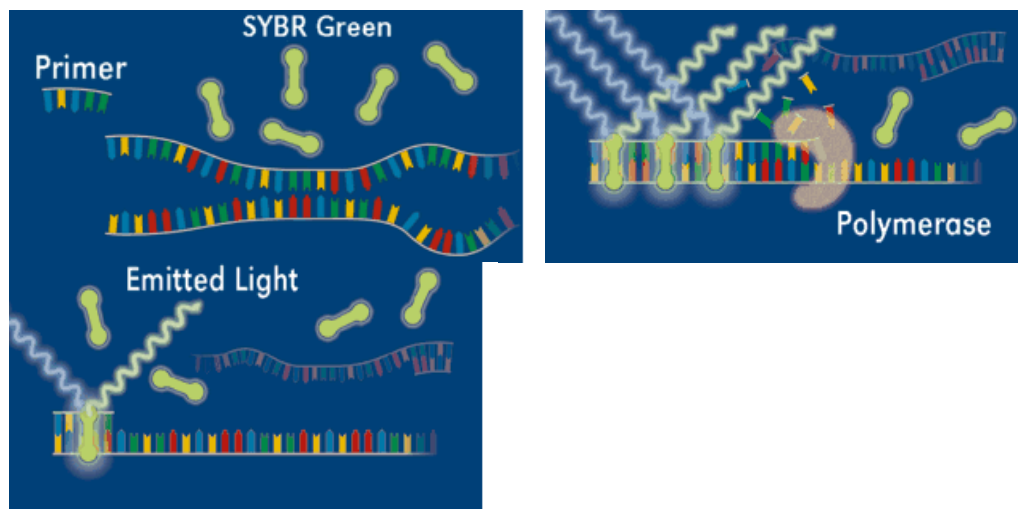
1.3.1.2 Η χρωστική SYBR green

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(Εικ.1.7). 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: Real Time PCR 2012).



Εικόνα 1.7 : 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.

1.3.1.3 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. 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 Taqman probes
- molecular beacons
- Scorpion primers

1.3.1.4 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 :

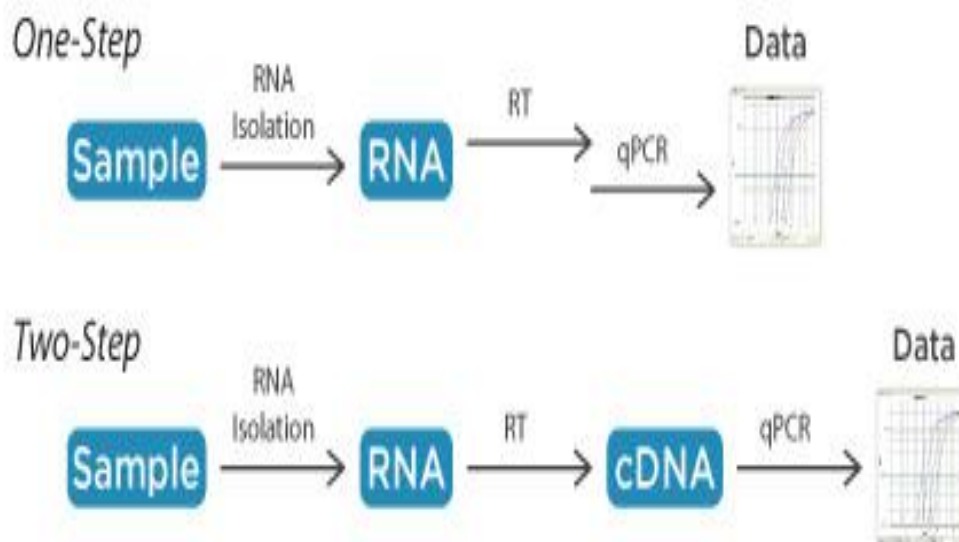
- Ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών (π.χ. ιοί).
- Μέτρηση της έκφρασης κάποιων γονιδίων.
- Επαλήθευση πολλαπλασιασμού κάποιων γονιδίων (gene amplification).
- Αποτελεσματικότητα θεραπευτικής αγωγής (π.χ. νέα φάρμακα για τον καρκίνο).
- Ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA.
- Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.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

1.3.2 Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων

Η πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-Time RT(Reverse Transcription) PCR) μπορεί να γίνει σε δύο στάδια ή σε ένα στάδιο(Εικ.1.8). Στη δύο σταδίων το RNA πρώτα υποβάλλεται σε αντίστροφη μεταγραφή και παράγεται cDNA, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης ολιγό-dT εκκινητές, τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (random primers). Το προϊόν της

αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται ως εκμαγείο στη Real Time PCR. Η χρήση των ολιγό-dT εκκινήτων 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 Real Time PCR γίνονται σε ένα σωλήνα, με την αντίστροφη μεταγραφή να προηγείται της Real Time PCR. 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 αναπαραγωγιμότητα από δείγμα σε δείγμα και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης επειδή απαιτείται λιγότερη παρέμβαση από τον ερευνητή (Sample and assay technologies Real Time PCR brochure 2009).



Εικόνα 1.8: Σύγκριση της Real Time PCR σε ένα βήμα και σε δύο βήματα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 ΥΛΙΚΑ

Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον πίνακα 2.1. Στον πίνακα 2.2 βρίσκονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην Real Time PCR

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές πορείες.

	Αντιδραστήρια	Εταιρία	Κωδικός
1.	W303-1a Yeast Strain		
2.	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3.	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
4.	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	Lab M	MC001
5.	Bacto Peptone		
6.	Γλυκόζη (Glucose)	Sigma-Aldrich	G7021
7.	Agar Agar	Serva	11392
8.	Tris Base		
9.	Glacial Acetic Acid		
10.	Αιθυλεν-δι-αμινο- τετραοξικό οξύ (EDTA)		
11.	Γλυκερόλη	Fisher Scientific	BP229
12.	Χρωστική orange G		
13.	Gel red	Biotium	41003
14.	Tris- Hcl		
15.	Μετά νατρίου άλας του Θειικού Δωδεκακυκλίου (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771

16.	Όξινη Φαινόλη		
17.	Χλωροφόρμιο		
18.	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
19.	Οξικό Νάτριο		
20.	MgCl ₂		
21.	Ca Cl ₂		
22.	BSA		
23.	KAPA SYBR FAST one-step qRT-PCR Kit Universal	Kapa Biosystem	KK4651
27.	Msn4_Elo1_Forward	Gtatacgccatgggctgtatt	ELO1/YJL196C
28.	Msn4_Elo1_Reverse	Gacagtgtctgcaactcca	
29.	Msn4_ALG9_Forward	Agtggctttgggaacaattac	ALG9
30.	Msn4_ALG9_Reverse	Cagcaggaaagaactggg	
31.	Msn4_TDH1_Forward	Ctcacgcttccatcttcgat	TDH1/YJL052W
32.	Msn4_TDH1_Reverse	Aagccttggaacatattcg	
33.	Msn4_ALD4_Forward	Aggccattacaacatcca	ALD4/YOR374W
34.	Msn4_ALD4_Reverse	Gattaccacccagctccaa	
35.	Msn4_HXK1_Forward	Tgctgtcgacgaacaatctc	HXK1/YFR053C
36.	Msn4_HXK1_Reverse	Caacatcaagcccttctcgt	
37.	Msn4_GND2_Forward	Ggtaagccattggtgaaaa	GND2/YGR256W
38.	Msn4_GND2_Reverse	Ctgacaaacaacgagcgaaa	

YEP

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

- Υγρό θρεπτικό YEP

- Στερεό θρεπτικό YEP σε τρυβλίο

Το Yep αποτελείται από τα εξής υλικά:

- Yeast extract 10g
- Bacto Peptone 20g
- Glucose 20g
- Agar 20g
- Προσθήκη νερού μέχρι 1L

Τοποθετούμε το θρεπτικό υλικό για αποστείρωση για να μην υπάρξει επιμόλυνση. Η διαδικασία για την παρασκευή του Yep πραγματοποιείται μέσα σε Duran 1L και πάνω σε θερμαντική πλάκα με ήπια θέρμανση και ανάδευση

TES

Αντιδραστήριο	V(ml)	Τελικές Συγκεντρώσεις
1M Tris-HCL pH: 7.5	0.5ml	10mM
250mM EDTA	2ml	10mM
10%w/v SDS	2.5ml	0.5%w/v
Water for Injection	Μέχρι όγκου 50ml	

2.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΠΟ STOCK ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Από το stock της καλλιέργειας του 531 που βρίσκεται σε Eppendorf στη βαθιά κατάψυξη (-80°C), παίρνουμε ικανοποιητική ποσότητα δείγματος και την τοποθετούμε σε Falcon των 50ml που περιέχει υγρό θρεπτικό υλικό Yep. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κάτω από ασηπτικές συνθήκες (με χρήση φλόγας), έτσι ώστε να αποφύγουμε την επιμόλυνση της καλλιέργειας. Το Falcon στη συνέχεια τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων.

2.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Ο έλεγχος της ανάπτυξης μιας καλλιέργειας, πραγματοποιείται με την μέτρηση της οπτικής της απορρόφησης, με την χρήση φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης.

Σε 2 κυψελίδες προσθέτουμε από 2ml από τις καλλιέργειες που έχουμε βάλει για ανάπτυξη στον επωαστικό θάλαμο. Στη συνέχεια τοποθετούμε τις κυψελίδες στο μηχάνημα έτσι ώστε να μετρήσουμε την απορρόφησή τους. Από την τιμή που θα πάρουμε βλέπουμε πόσο έχει αναπτυχθεί μια καλλιέργεια.

2.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ο έλεγχος καθαρότητας μια ανεπτυγμένης καλλιέργειας γίνεται με την χρήση του μικροσκοπίου.

Από την καλλιέργεια που έχουμε τοποθετήσει στον επωαστικό θάλαμο για ανάπτυξη, παίρνουμε μια μικρή ποσότητα ($\approx 30-40\mu\text{l}$), με την χρήση μιας πιπέτας και κάτω από ασηπτικές συνθήκες, και την τοποθετούμε πάνω στην γυάλινη πλάκα μικροσκοπίου. Στη συνέχεια τοποθετούμε πάνω στην ποσότητα την καλυπτρίδα και το δείγμα τοποθετείτε στο μικροσκόπιο για εξέταση.

Για να είναι καθαρή μια καλλιέργεια θα πρέπει στο μικροσκόπιο να δούμε μόνο κύτταρα ζύμης.

2.6 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Η διαδικασία για τις καμπύλες ανάπτυξης των δειγμάτων που έχουμε θα πραγματοποιηθεί στο φωτόμετρο ELISA READER.

Το μηχάνημα αυτό έχει την δυνατότητα να επεξεργάζεται δύο διαφορετικές λειτουργίες. Να λειτουργεί ως φωτόμετρο και ταυτόχρονα ως επωαστικός θάλαμος. Αυτό του δίνει την δυνατότητα να κρατάει σταθερή την θερμοκρασία που επιθυμούμε να επεξεργαστούμε τα δείγματα μας και έχει την εμβέλεια να τοποθετηθούν πολλά δείγματα αφού διαθέτει χωρητικότητα 95 δειγμάτων.

Οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για το πείραμα είναι: **2%, 5%, 10%, 12%, 15%** γλυκόζη. Χρησιμοποιώντας το Νόμο της Ανάμειξης:

$$c_1V_1+c_2V_2=c_3V_3$$

φτιάχνουμε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που χρειαζόμαστε από 2% και 50% γλυκόζη. Όπου:

c_1 =η συγκέντρωση του 2%

V_1 =ο όγκος που ψάχνουμε από το 2%

c_2 =η συγκέντρωση του 50%

V_2 =ο όγκος που ψάχνουμε από το 50%

c_3 =η τελική συγκέντρωση που θέλουμε στο δείγμα μας

V_3 =ο τελικός όγκος που θέλουμε στο δείγμα μας

Διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων - διεξαγωγή πειράματος

- Μέσα στον επωαστικό θάλαμο τοποθετούμε μία καλλιέργεια να αναπτυχθεί, από το στέλεχος που εξετάζουμε (531). Θα την αφήσουμε να αναπτυχθεί για περίπου 16h.
- Την επόμενη μέρα σε 2 κυψελίδες ρίχνουμε γερ, έτσι ώστε να μετρήσουμε στο φωτόμετρο διπλής δέσμης την απορρόφηση τους στα 600nm και μηδενίζουμε το μηχάνημα. Στη συνέχεια τοποθετούμε μέσα τις κυψελίδες που περιέχουν την καλλιέργειά μας, για να μετρήσουμε την απορρόφησή της.
- Με το Νόμο της Αραίωσης: $c_1V_1=c_2V_2$ κάνουμε τις πράξεις έτσι ώστε να βρούμε ποια είναι η τιμή του όγκου που χρειάζεται να εμβολιάσουμε στη συνέχεια τα erpendorf, για να φτάσουμε την συγκέντρωση της καλλιέργειας στην τιμή που θέλουμε. Όπου:
 c_1 = τιμή φωτομέτρησης
 V_1 =ο όγκος που ψάχνουμε
 c_2 =η συγκέντρωση που θέλουμε να έχουμε
 V_2 =τελικός όγκος που έχει το δείγμα μας
- Μέσα σε falcon φτιάχνουμε τις συγκεντρώσεις που χρειαζόμαστε συνολικού όγκου 1,500μl (1,5ml). Στη συνέχεια μεταφέρουμε στο αντίστοιχο erpendorf 350μl και εμβολιάζουμε με την τιμή που έχουμε βρει ότι χρειάζεται από την αραίωση της καλλιέργεια με το στέλεχος για να φτάσουμε στη συγκέντρωση που θέλουμε. Χρησιμοποιούμε το vortex έτσι ώστε να γίνει καλή ανάδευση.

- Παίρνουμε την πλάκα της Elisa και στις εξωτερικές οπές προσθέτουμε με την πιπέτα νερό.
- Ύστερα από το κάθε erpendorf παίρνουμε με την πιπέτα από 100μl και γεμίζουμε τις οπές ανά δυο(2).
- Αφού τελειώσουμε με όλες τις συγκεντρώσεις τοποθετούμε την πλάκα στο μηχάνημα και το θέτουμε σε λειτουργία.

2.7 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Για τις καμπύλες ανάπτυξης με αιθανόλη θα χρησιμοποιήσουμε το φασματοφωτόμετρο διπλή δέσμης.

Οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν είναι: 3%, 6%, 9% αιθανόλη.

Διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων – διεξαγωγή πειράματος

- Μέσα σε κωνικές φιάλες φτιάχνουμε τις συγκεντρώσεις που χρειαζόμαστε, βάσει του Νόμου της Αραίωσης, τελικού όγκου 50ml.
- Από την φωτομέτρηση της καλλιέργειας που έχουμε βάλει για ανάπτυξη, βρίσκουμε ποια είναι η τιμή που χρειαζόμαστε για να εμβολιάσουμε τις κωνικές φιάλες.
- Αφού εμβολιάσουμε, κάνουμε καλή ανάδευση με το χέρι μας και φωτομετρούμε. Η τιμή που θα πάρουμε αντιστοιχεί στο T=0h.
- Τοποθετούνται οι κωνικές φιάλες στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C και μετά από 2 ώρες παίρνουμε πάλι μέτρηση, οπότε έχουμε το T=2h.
- Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι να φτάσει ο ζυμομύκητας στη φάση θανάτου.

2.8 RNA

2.8.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Η απομόνωση του RNA θα γίνει σε 2 χρονικές στιγμές και για 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Χρόνος: t=10min ακριβώς και

t=16h ακριβώς

Συγκεντρώσεις: 2% γλυκόζη

15% γλυκόζη

9% αιθανόλη

Η συλλογή των εξεταζόμενων κυττάρων ακολουθεί την εξής διαδικασία:

- Σε έξι falcon διαφορετικών συγκεντρώσεων, συνολικού όγκου 10ml, εμβολιάζουμε με 200μl από καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί στον επωαστικό.
- Τα falcon τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C.
- Μετά από 10 λεπτά ακριβώς παίρνουμε τα τρία falcon των συγκεντρώσεων 2%glu, 15%glu και 9%EtOH και σε RNA erpendorf προσθέτουμε από 2ml και κάνουμε φυγοκέντριση.
- Πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε άλλα 2ml.
- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να μαζευτεί ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων.
- Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στην βαθιά κατάψυξη (-80°C).
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά από 16 ώρες ακριβώς για τα άλλα 3 falcon των συγκεντρώσεων 2%glu, 15%glu και 9%EtOH

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται με την χρήση γαντιών.

2.8.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΜΕ ΟΞΙΝΗ ΦΑΙΝΟΛΗ

- Από την καλλιέργεια μεταφέρουμε 1.5ml σε Eppendorf και φυγοκέντριση στις 1000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C. Πλήρη απομάκρυνση υπερκείμενου.
- Τοποθετήστε στους -80°C αμέσως ή προχωρήστε στο επόμενο βήμα.
- Αναδιαλύστε το ίζημα των κυττάρων σε 400μl TES και προσθέστε 400μl όξινης φαινόλης. Vortex 10 sec, επώαστε για ~60min στους 65°C με περιστασιακό vortex.
- Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.

- Μεταφέρουμε την υδατική φάση ~400μl (επάνω φάση) σε καθαρό Eppendorf, χωρίς να πάρουμε από την κάτω φάση ή την διεπιφάνεια. Προσθέτουμε 400μl όξινης φαινόλης. Vortex 10 sec. επανάληψη βήματος 4.
- Επανάληψη βήματος 5. Άρα κάνουμε 2 εκχυλίσεις με όξινη φαινόλη.
- Προσθέτουμε 400μl CHCl₃ (χλωροφόρμιο), vortex για 10 sec, φυγοκέντριση 6000 rpm, 5min, στους 4°C. Μεταφέρουμε την υδατική φάση (επάνω φάση) σε νέο Eppendorf. (2 φορές).
- Προσθέτουμε στην τελευταία υδατική φάση που συλλέγουμε το 10% του όγκου της 3M NaOAc, pH5,2 (όξινο νάτριο) και 2,5 όγκους 100% EtOH (αιθανόλη) και επωάζουμε για τουλάχιστον 1h στον πάγο ή για 15 λεπτά στο -20°C. (Ανακινούμε πάρα πολύ καλά πριν τοποθετηθεί στον πάγο).
- Φυγοκεντρούμε για 15min στις 10000 rpm στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500μl 80%EtOH.
- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 10000 rpm στους 4°C.
- Απομακρύνουμε πλήρως το υπερκείμενο και αφήνουμε για 5min το ίζημα να στεγνώσει τοποθετώντας το Eppendorf ανάποδα πάνω σε ένα κομμάτι χαρτί.
- Επαναδιαλύστε το ίζημα σε 30μl H₂O RNasefree. Κρατήστε 4μl για φωτομέτρηση και gel αгарόζης. Το υπόλοιπο φυλάξτε το στους -80°C.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιούμε γάντια, που τα πλένουμε με αιθανόλη, έτσι ώστε να μην επηρεαστεί το RNA από τα χέρια μας.

2.8.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA ΜΕ DNase

- Σε Eppendorf μέσα βάζουμε:

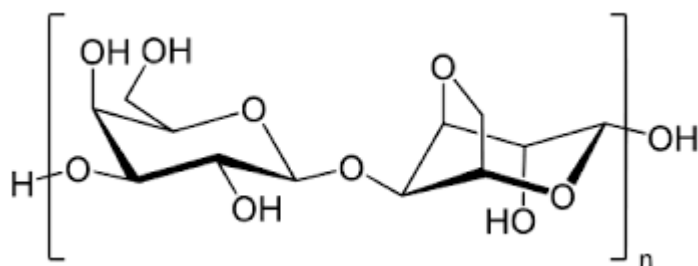
16μl		RNA
2μl		Buffer
1μl	BSA	και

1μl DNase και τοποθετούμε το eppendorf για επώαση στους 37°C για 1h. Ανά 20min κάνουμε vortex.

- Προσθέτουμε 180μl H₂O RNasefree και 200μl όξινη φαινόλη. Vortex 10sec
- Επώαση στον πάγο για 5min. Φυγοκέντριση στις 6000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση (επάνω φάση) σε καθαρό eppendorf χωρίς να πάρουμε από την κάτω φάση ή την διεπιφάνεια. Προσθέτουμε 200μl όξινης φαινόλης. Vortex 10sec.
- Επώαση στον πάγο για 5min. Φυγοκέντριση στις 6000rpm για 5min στους 4°C.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε καθαρό eppendorf χωρίς να πάρουμε από την διεπιφάνεια ή την κάτω φάση.
- Προσθέτουμε 200μl CHCl₃ (χλωροφόρμιο), vortex για 10sec, φυγοκέντριση στις 6000rpm για 5min στους 4°C. Μεταφέρω την υδατική φάση σε νέο eppendorf. (2 φορές)
- Προσθέστε στην τελευταία υδατική φάση που συλλέξατε το 10% του όγκου της 3M NaOAc, pH 5,2 (οξικό νάτριο), και 2,5 όγκους 100% EtOH (αιθανόλη), και επωάστε για τουλάχιστον 1h στον πάγο ή για 15min στους -20°C.
- Φυγοκεντρίστε για 15min στις 10000 rpm στους 4°C. Απομακρύνετε το υπερκείμενο και προσθέστε 500μl 80% EtOH.
- Φυγοκεντρίστε για 5min στις 10000 rpm στους 4°C.
- Απομακρύνετε πλήρως το υπερκείμενο και αφήστε για 5min το ίζημα να στεγνώσει τοποθετώντας το Eppendorf ανάποδα πάνω σε ένα κομμάτι χαρτί.
- Επαναδιαλύστε το ίζημα σε 30μl H₂O RNasefree. Κρατήστε 4μl για φωτομέτρηση και gel αγαρόζης. Το υπόλοιπο φυλάξτε το στους -80°C.

2.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ηλεκτροφόρηση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας φορτισμένα μόρια κινούνται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και ο ρυθμός κίνησής τους προσδιορίζεται από το φορτίο και το μέγεθος του μορίου. Το φαινόμενο αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης αναλυτικής μεθοδολογίας για το διαχωρισμό, καθαρισμό και την ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) καθώς και νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλοκών. Αυτά τα μόρια φέρουν ομάδες που έχουν τη δυνατότητα ιονισμού και κατ'επέκταση σε συγκεκριμένες συνθήκες pH καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο μπορεί να τα κάνει να κινηθούν μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αντίθετο πόλο. Το RNA που θα εξετάσουμε είναι ένα γραμμικό πολυνουκλεοτίδιο που τα μονομερή του νουκλεοτίδια αποτελούνται από την πουρινική ή την πυριμιδινική βάση και την 5'-φωσφο-ριβόζη. Είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό, το οποίο όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τον θετικό πόλο, με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθός του και το σχήμα του. Για το RNA θα κάνουμε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης, που σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Το πήκτωμα αποτελείται από ένα περίπλοκο πλέγμα ινιδίων και το μέγεθος των πόρων του, που θα καθορίσει τον διαχωρισμό, μπορεί να ρυθμιστεί από τον χειριστή του πειράματος. Το άγαρ απομονώνεται από φύκη (red algae) και αποτελείται από αγαρόζη και αγαροπηκτίνη. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολύμερές (D-galactose και L-galactopyranose).



Εικόνα 1.9: Συντακτικός τύπος αγαρόζης

Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων, άρα και το μέγεθος των κομματιών RNA που μπορούν να διαχωρισθούν.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ειδικό εξοπλισμό που συνίσταται από δυο μέρη: τη μονάδα τάσης ή τροφοδοτικό και τη μονάδα ηλεκτροφόρησης, η οποία στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης RNA είναι συνήθως οριζόντια διάταξης.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για να παρέχουν τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται μεταφορά ρεύματος και να διατηρούν το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή. Τα πιο κοινά διαλύματα είναι:

- ✓ **TAE** (Tris/Acetate/EDTA) (μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, θέλει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο)
- ✓ **TBE** (Tris/Borate/EDTA) (προβληματικό με το RNA, λόγω αλληλεπίδρασης, καλό διαχωρισμό σε DNA 0.1-3 kb και όταν εφαρμόζουμε τάση >150V).

50x TAE: Σε 900ml αποσταγμένου H₂O προσθέτουμε:

Tris Base	242g
Glacial Acetic Acid	57.1ml
EDTA	18.6g
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι το 1L

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

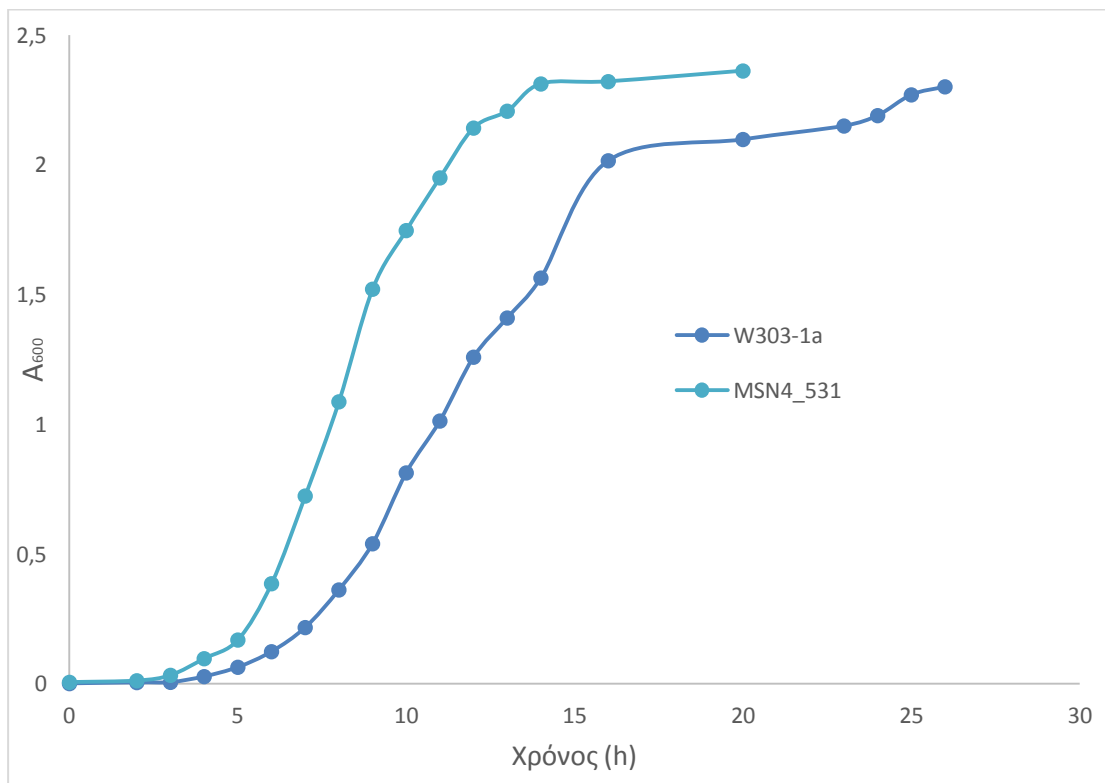
Ο ζυμομύκητα καλείται να αναπτυχθεί και να λειτουργήσει στο μέγιστο μέσα σε θρεπτικό μέσο που περιέχει συγκέντρωση γλυκόζης και στη συνέχεια σε θρεπτικό μέσο που είναι αυξημένο σε συγκέντρωση αιθονόλης.

3.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Ελέγχεται η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους σε σύγκριση με το φυσιολογικό στέλεχος αγρίου τύπου.

3.1.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ 2% ΓΛΥΚΟΖΗΣ

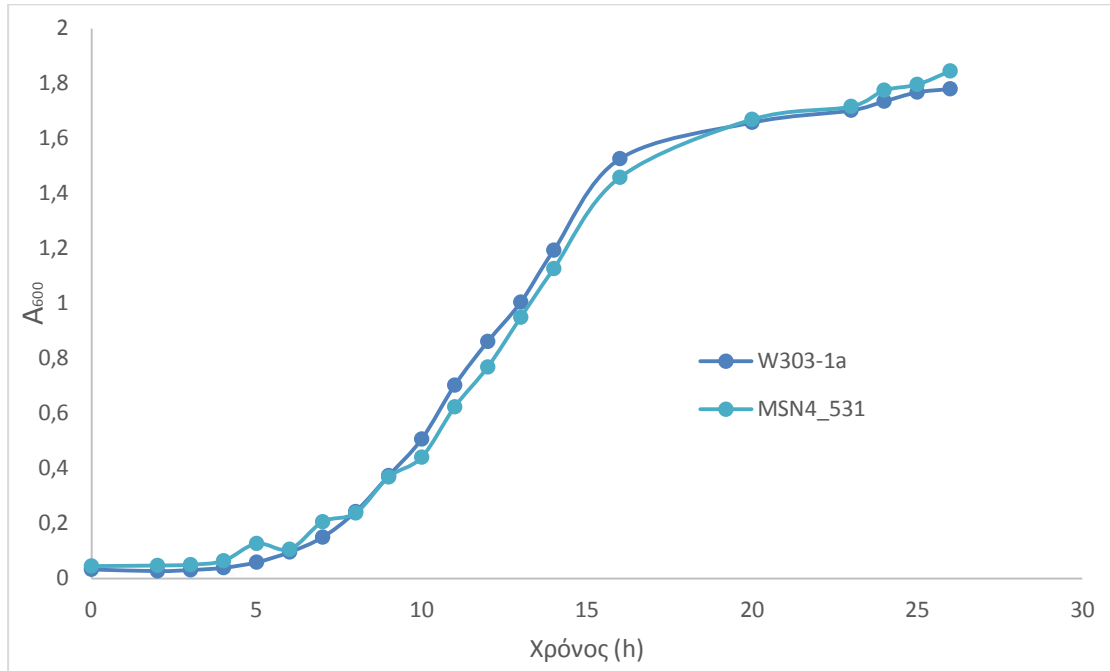
Μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους έναντι του αγρίου τύπου και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης. Αυτό που παρατηρείται στο παρακάτω σχήμα είναι ότι η καμπύλη του μεταλλαγμένου στελέχους της πρωτεΐνης MSN4 αναπτύσσεται πιο γρήγορα κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης έναντι στην καμπύλη του αγρίου τύπου.



Σχήμα 1: Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης του μεταλλαγμένου στελέχους σε σύγκριση με το αγρίου τύπου. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600nm και στον οριζόντιο ο χρόνος σε h.

3.1.2 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ 15% ΓΛΥΚΟΖΗΣ

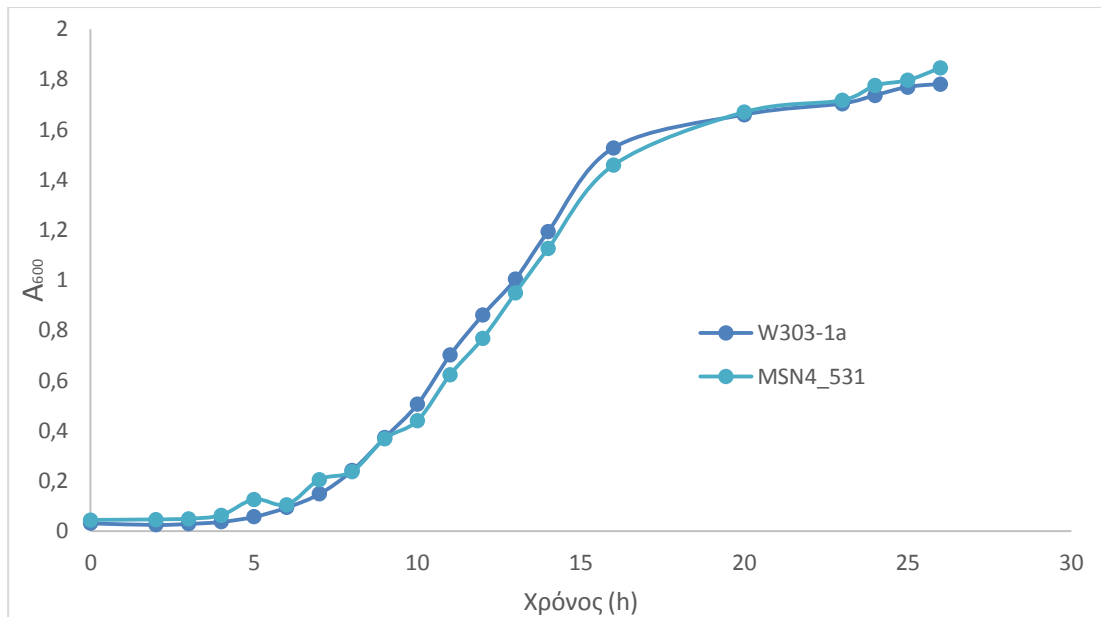
Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ότι η ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους σε θρεπτικό μέσο μεγάλης συγκέντρωσης σε γλυκόζη δεν παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά συγκρινόμενη με αυτή του αγρίου τύπου.



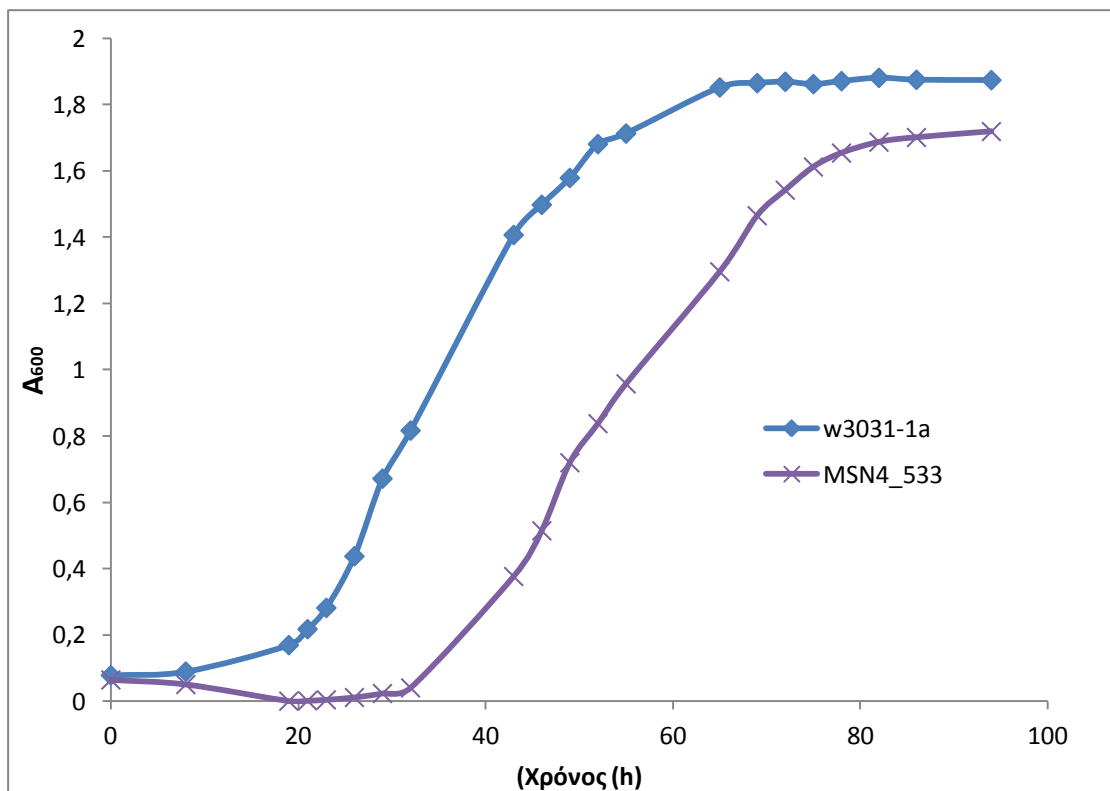
Σχήμα 2: Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο 15% γλυκόζης του μεταλλαγμένου στελέχους σε σύγκριση με το αγρίου τύπου. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600nm και στον οριζόντιο ο χρόνος σε h.

3.2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η παρουσία της αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας λειτουργεί εφόσον έχει ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη *Ser531Ala* επί της πρωτεΐνης MSN4 του ζυμομύκητα δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξης του σε χαμηλά επίπεδα (3% αιθανόλη), ενώ το αγρίου τύπου φαίνεται να λειτουργεί καλύτερα.



Σχήμα 3: Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο 3% αιθανόλης του μεταλλαγμένου στελέχους σε σύγκριση με το αγρίου τύπου. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600nm και στον οριζόντιο ο χρόνος σε h.

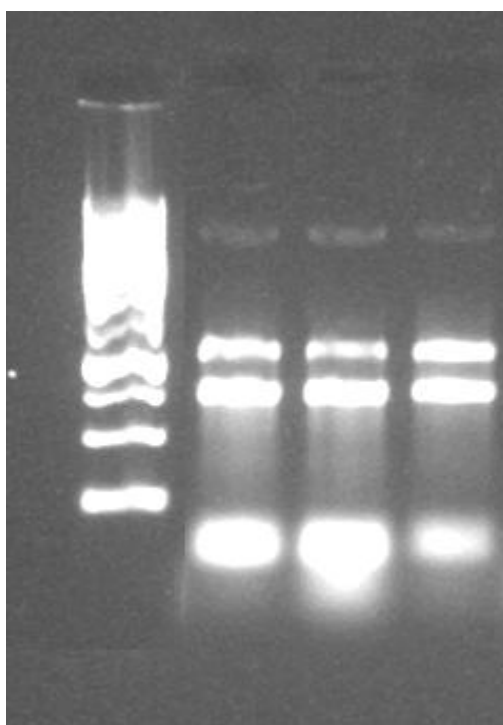


Σχήμα 4: Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο 6% αιθανόλης του μεταλλαγμένου στελέχους σε σύγκριση με το αγρίου τύπου. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600nm και στον οριζόντιο ο χρόνος σε h.

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Η απομόνωση του RNA από τα εξεταζόμενα δείγματα έγινε με την μέθοδο απομόνωσης RNA με όξινη φαινόλη. Τα δείγματα που απομονώθηκαν ήταν εμβολιασμένα με 2% w/v και 15% w/v γλυκόζης και 3% v/v, 6%v/v και 9% v/v αιθανόλης και είχαν επωαστεί στους 37°C για χρόνο t=15min και t=16h.

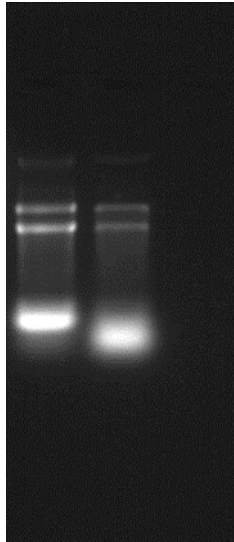
Μετά την απομόνωση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να εξεταστεί η επιτυχία της απομόνωσης και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 5: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από την απομόνωση RNA. Θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας. Η εικόνα που παρουσιάζεται είναι ενδεικτική και υπάρχει το αντίστοιχο αποτέλεσμα και για τις υπόλοιπες ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ DNases-I

Η επεξεργασία των δειγμάτων με DNases-I γίνεται για την πλήρη απομάκρυνση DNA από τα δείγματά μας.



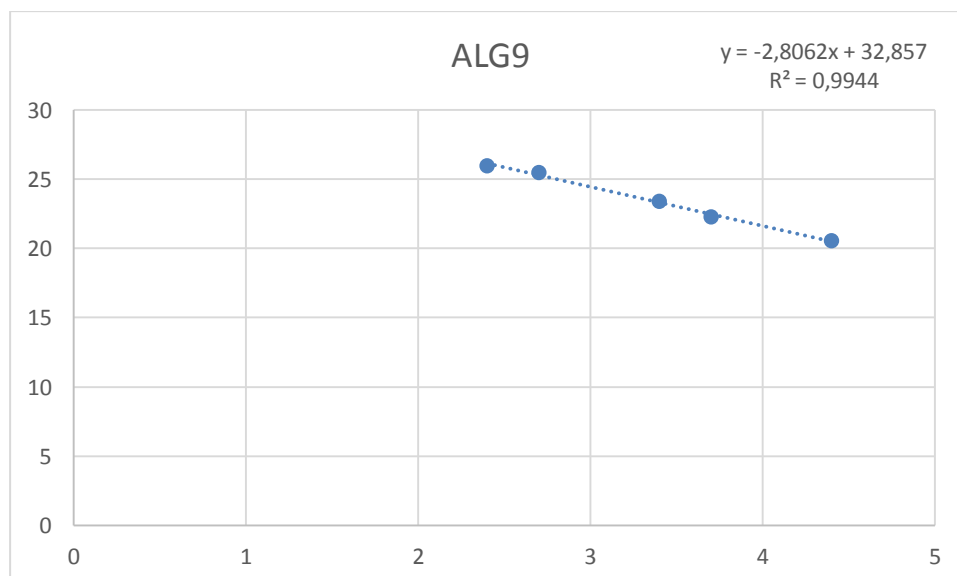
Σχήμα 6: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ύστερα από επεξεργασία με DNases-I. Η εικόνα είναι ενδεικτική

3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Τα δείγματα που έχουμε απομονώσει θα τα επεξεργαστούμε με την μέθοδο της Real-Time PCR για να ελέγξουμε την έκφραση γονιδίων που έχει δείξει ότι μεταβάλλεται με την παρουσία αιθανόλης και παίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες. Τα γονίδια που εξετάσαμε είναι τα ακόλουθα: ELO1, ALG9, ALD4, GND2, TDX1 και ΗΧΚ1.

3.5.1 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ

Επειδή για κάθε γονίδιο που μελετάμε ενδέχεται τα χαρακτηριστικά της αντίδρασης να διαφέρουν, δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες. Παρακάτω παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του γονιδίου αναφοράς ALG9.

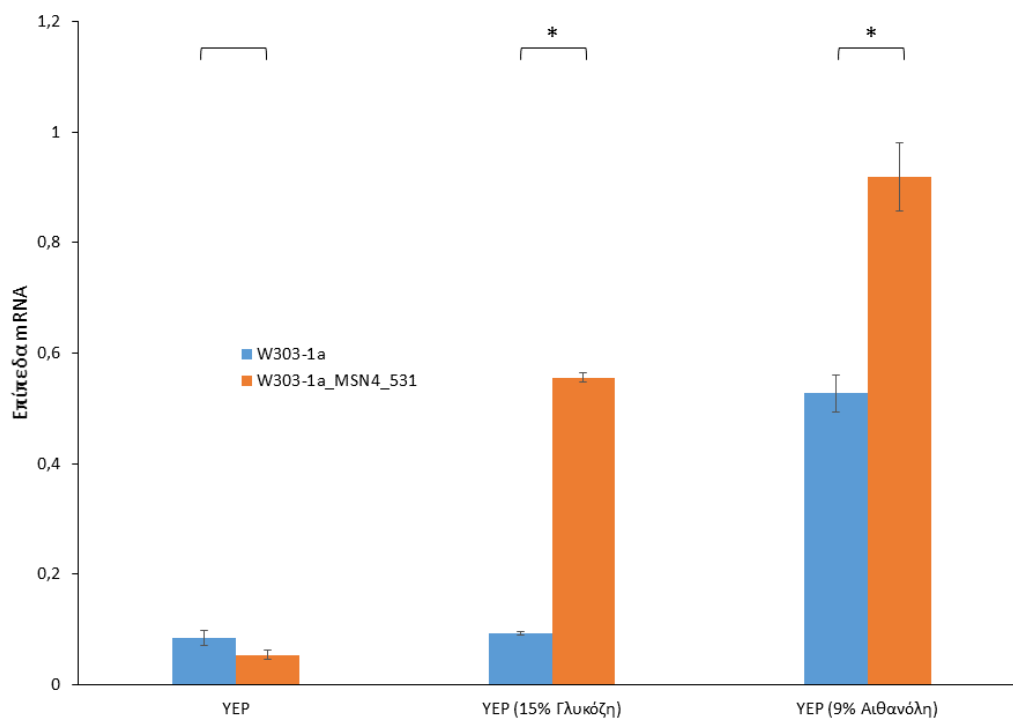


Σχήμα 7: Πρότυπη καμπύλη γονιδίου αναφοράς ALG9.

3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ Real-Time PCR

3.6.1 ELO1

Η πρωτεΐνη *elo1* είναι η 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 μηλόνυλο-CoA τα μετατρέπει σε λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (14-18 άτομα άνθρακα).

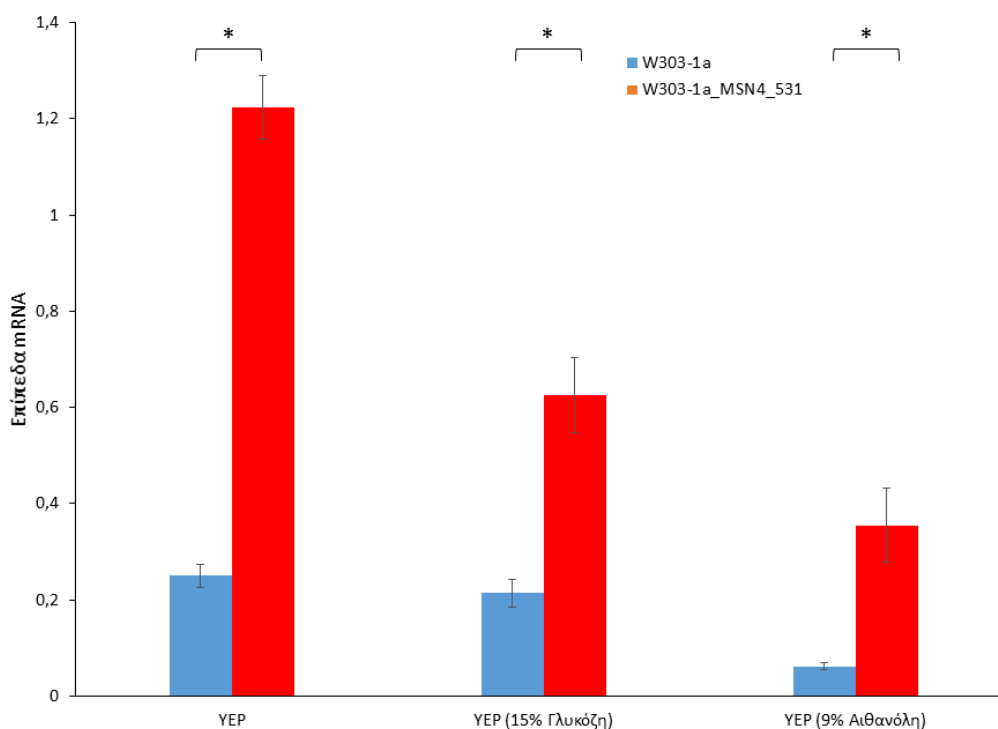


Σχήμα 8: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου ELO1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης 15min. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όταν τα κύτταρα εκτεθούν στις προαναφερθείσες συνθήκες για χρόνο 16h παρατηρείται ότι τόσο σε κοινό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης όσο και παρουσία αιθανόλης, το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου ELO1.

Αυτό πιθανότατα να σημαίνει ότι η παρατεταμένη έκθεση του ζυμομύκητα που φέρει την υπό μελέτη μετάλλαξη ίσως καθιστά τον ζυμομύκητα πιο ευάλωτο.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά και στις τρεις συγκεντρώσεις, οπότε εμφανίζεται μεγαλύτερη παραγωγή elo1 πρωτεΐνης από το μεταλλαγμένο στέλεχος σε σύγκριση με το αγρίου τύπου στέλεχος w303-1a. Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει μεγαλύτερη ικανότητα διατήρησης της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης σε συνθήκες stress.



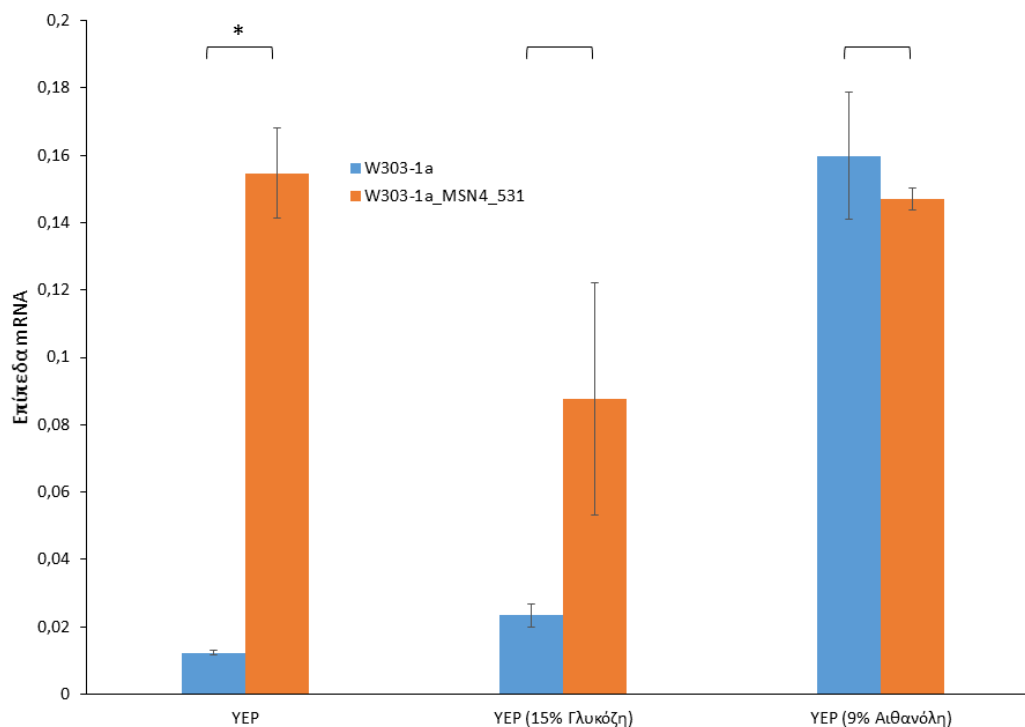
Σχήμα 9: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου ELO1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης 16h. όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.6.2 ALD4

Η γλυκόζη μέσω της γλυκόλυσης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και παράγεται ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη είναι τοξική και από αυτή παράγεται αιθανόλη. Προκειμένου όμως το κύτταρο να απαλλαγεί από την παρουσία της, ακεταλδεΐδη έχει αναπτύξει και άλλους μηχανισμούς απομάκρυνσης της. Ένας από αυτούς, είναι η δράση της αφυδρογονάση αλδεΐδης (ALD4), η οποία εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και οξειδώνει την ακεταλδεΐδη σε οξικό οξύ. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της

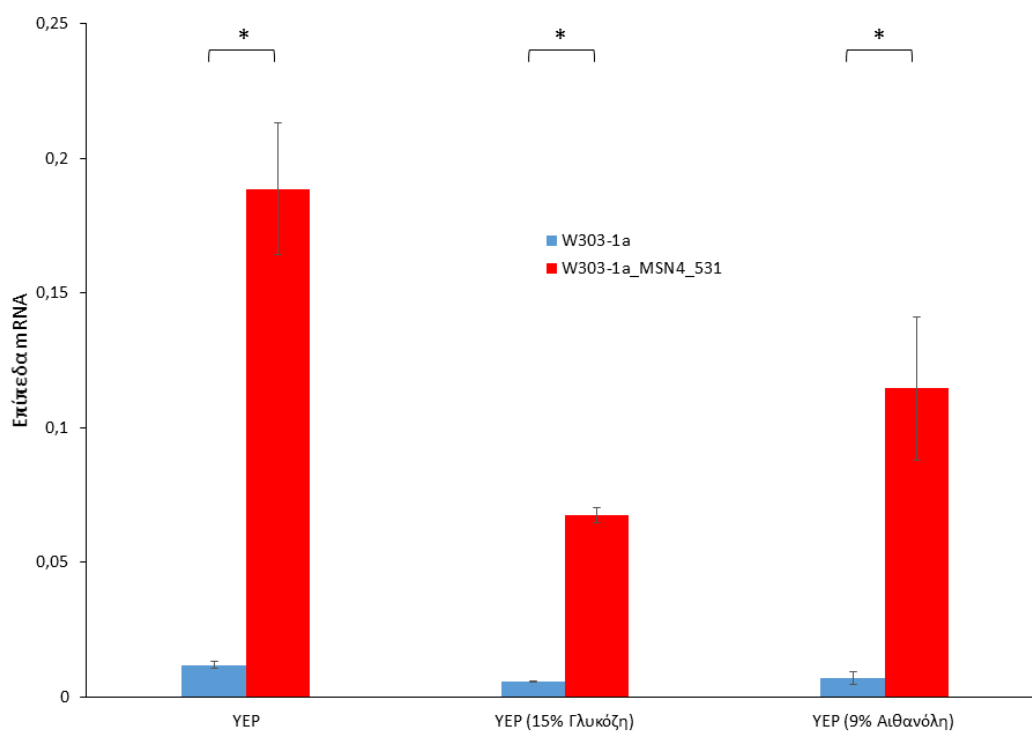
παραγωγής αιθανόλης που είναι το επιθυμητό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και του οξικού οξέος το οποίο είναι ένα παραπροϊόν. (Saint-Prix F et al., 2004)

Στο παρακάτω διάγραμμα παρατηρείται ότι για χρόνο $t=15\text{min}$ υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 στις συγκεντρώσεις που εξετάσαμε.



Σχήμα 10: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου ALD4 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η έκθεση σε χρόνο $t=16\text{h}$ του υπό μελέτη στελέχους παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ALD4 γονιδίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδηλώνει μια καλύτερη απόκριση του μεταλλαγμένου στελέχους σε καταστάσεις stress αφού πιθανόν να απομακρύνει τη τοξική ακεταλδεϋδη πιο αποτελεσματικά.

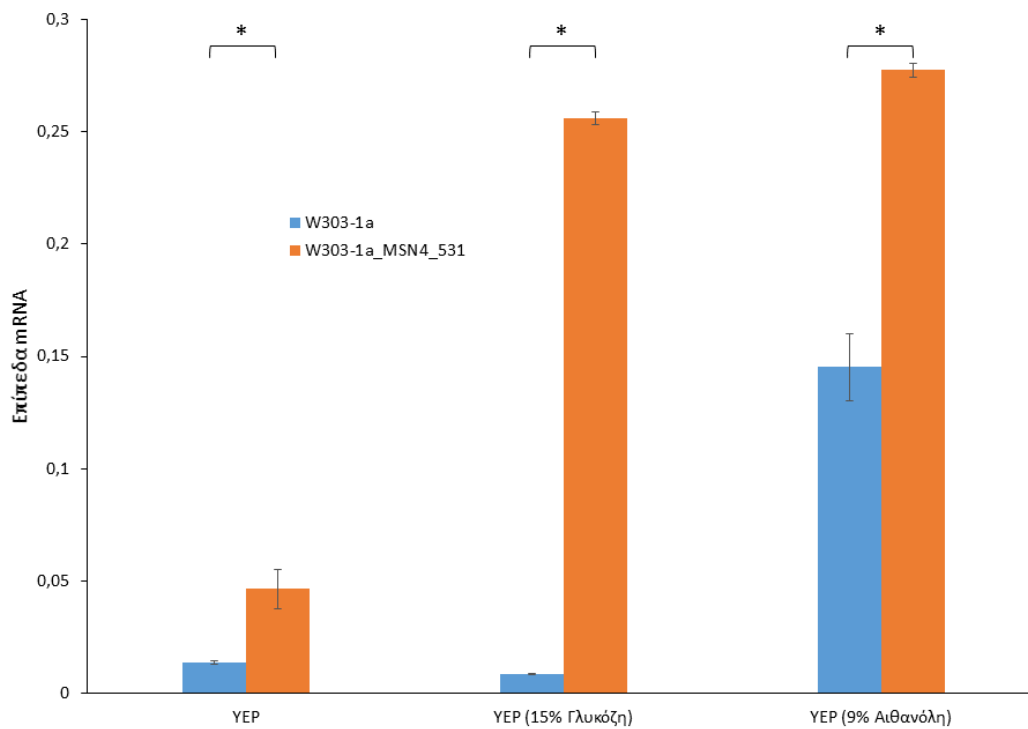


Σχήμα 11: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου ALD4 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=16h$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.6.3 GND2

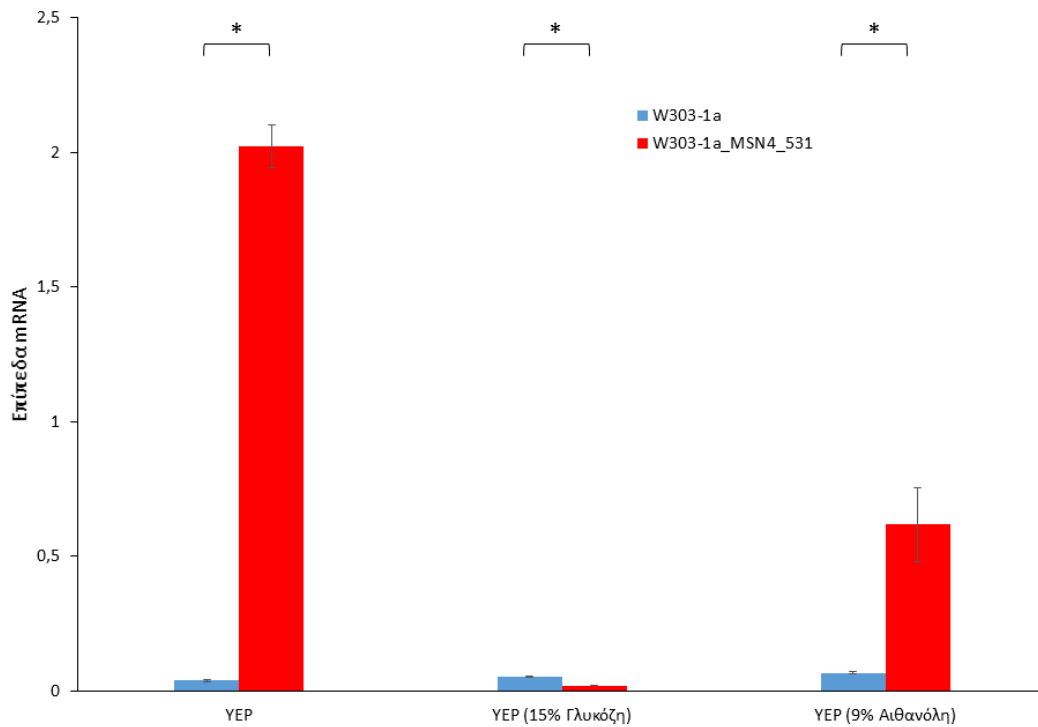
Στον *Saccharomyces cerevisiae*, το GND1 κωδικοποιεί την κύρια ισομορφή της φωσφογλυκονικής αφυδρογονάσης, που αντιπροσωπεύει περίπου το 80 % της δραστηριότητας, και το GND2 κωδικοποιεί τη λιγότερη ισομορφή. Η φωσφογλυκονική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο κλειδί της πορείας των φωσφορικών πεντοζών που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των οξειδωτικών παραγόντων εντός του κυττάρου. Καταλύει την δεύτερη οξειδωτική μείωση του $NADP^+$ σε NADPH. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς προστασίας από το οξειδωτικό στρες.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στις τιμές των 2 γονιδίων. Αυτό σημαίνει ότι πιθανότητα υπάρχει μεγαλύτερη παραγωγή GND2 από το μεταλλαγμένο στέλεχος σε σύγκριση με το αγρίου τύπου γονίδιο w303-1a.



Σχήμα 12: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου GND2 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

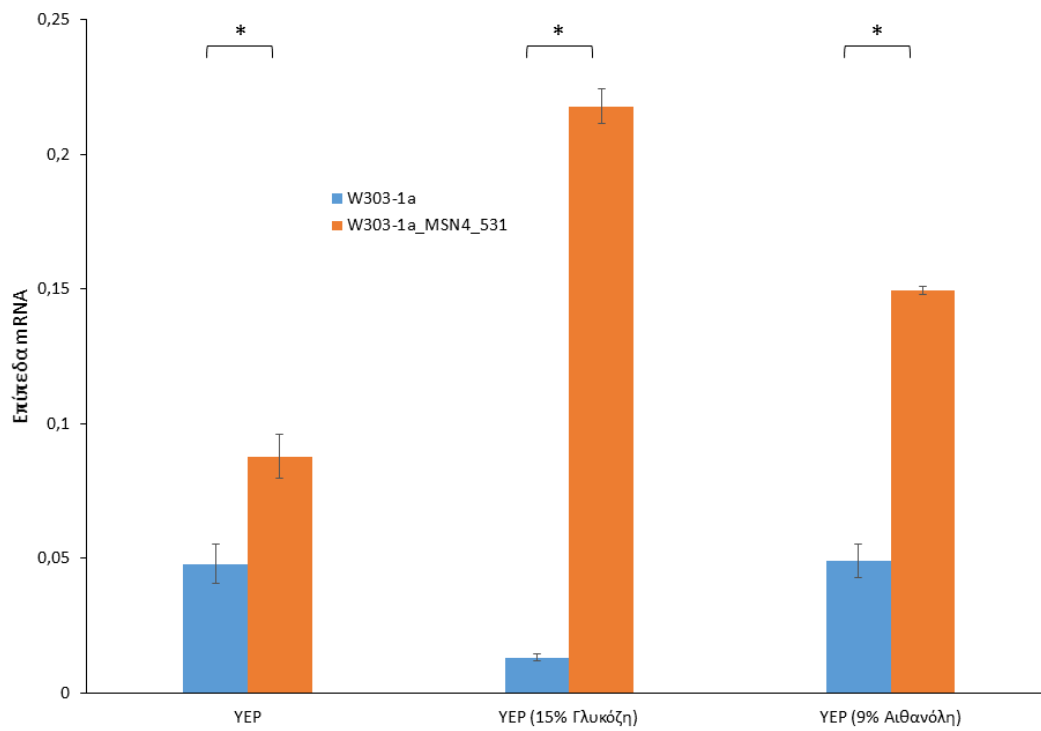
Η έκθεση σε χρόνο $t=16\text{h}$ του υπό μελέτη στελέχους παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του GND2 γονιδίου σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Μικρή διαφορά φαίνεται να υπάρχει στη συγκέντρωση 15% γλυκόζης.



Σχήμα 13: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου GND2 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=16h$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

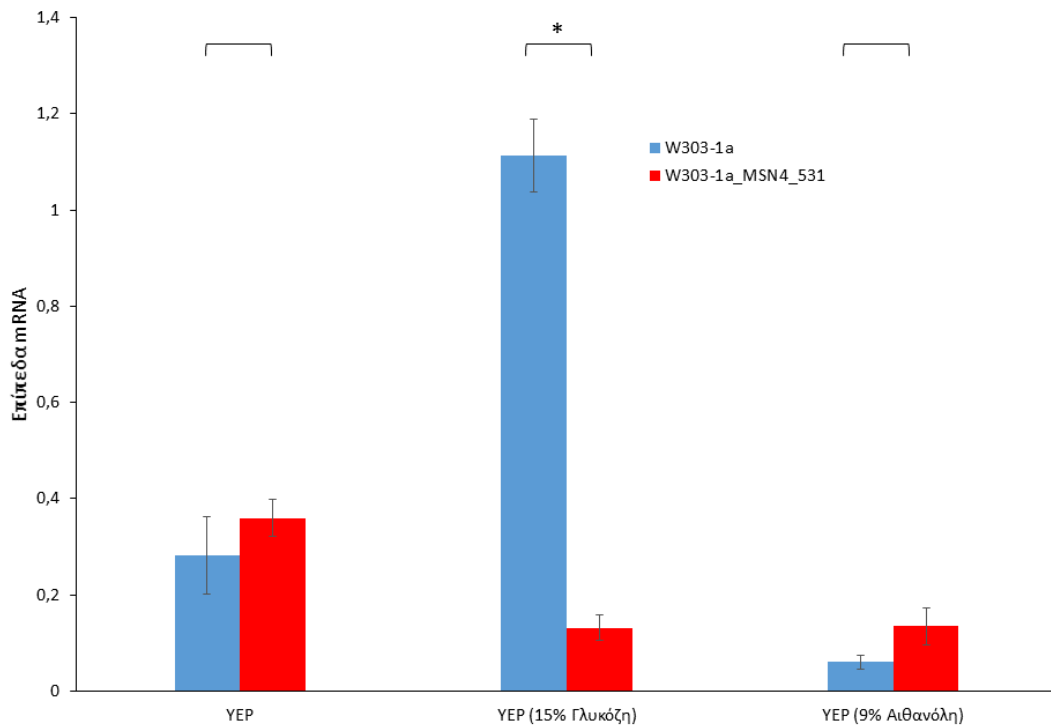
3.6.4 TDH1

Η Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (tdh1) η οποία συμμετέχει στην πορεία της γλυκόλυσης οξειδώνει την 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη σε 3-φώσφο-γλυκερικό. Παρατηρείται σημαντική στατιστική αύξηση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 τόσο σε στιγμιαία έκθεση όσο και σε μακροχρόνια, για όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.



Σχήμα 14: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου TDH1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Σε χρόνο $t=16\text{h}$ παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά στο εξεταζόμενο δείγμα 15% γλυκόζης.



Σχήμα 15: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου TDH1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης t=16h, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

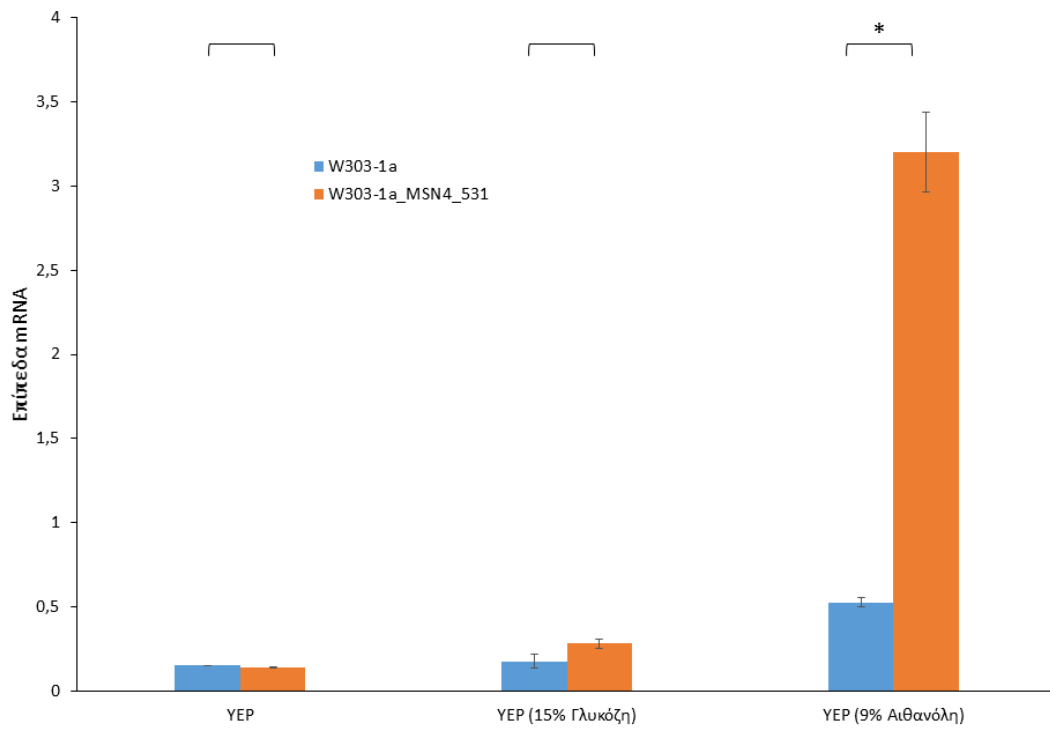
3.6.5 ΗΧΚ1

Η Εξοκινάση-1 εμπλέκεται στη πορεία καταβολισμού των εξοζών, κυρίως της γλυκόζης. Η εξοκινάση καταλύει την πρώτη αντίδραση της γλυκολυτικής πορείας και αποτελεί ένα από τα κύρια σημεία ελέγχου αυτής. Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφο-γλυκόζη παρουσία του ενζύμου κινάση της γλυκόζης (εξοκινάση, γλυκοκινάση).

Η δομή της εξοκινάσης αλλάζει σημαντικά όταν δεσμευθεί το υπόστρωμα που είναι η γλυκόζη. Τέλος, η εξοκινάση έχει αλλοστερικό αναστολέα την 6-φωσφο-γλυκόζη που είναι το προϊόν της αντίδρασης. (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009)

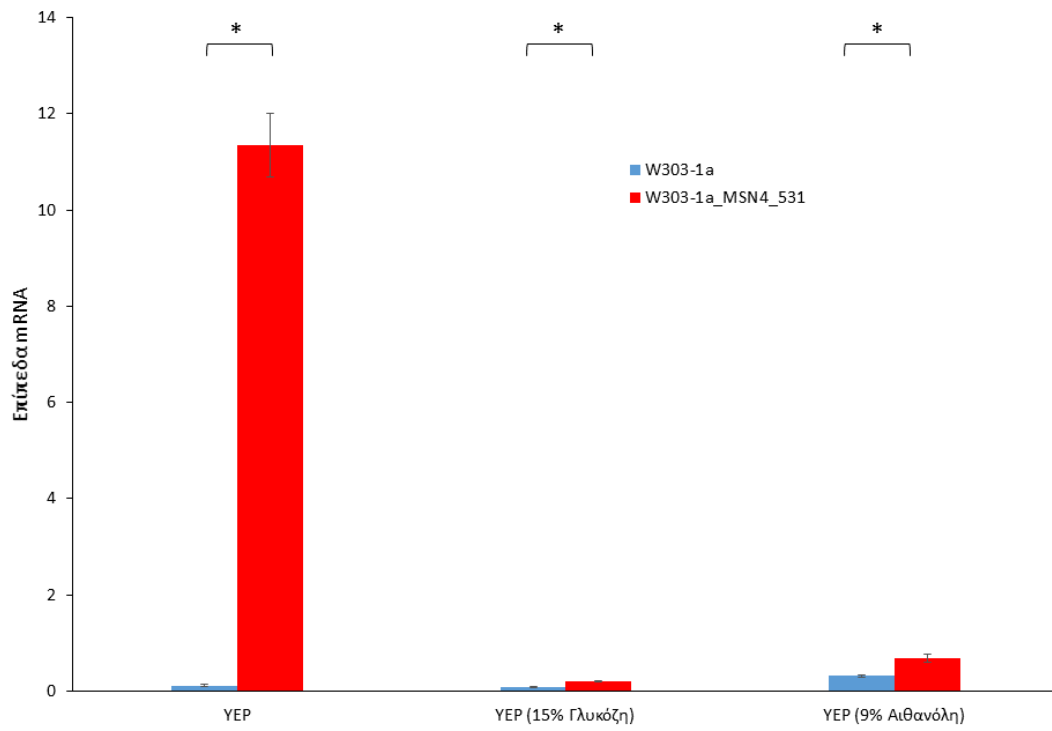
Το γονίδιο TDH1 και η εξοκινάση συμμετέχουν στην ίδια πορεία, η οποία είναι η γλυκόλυση και συμβάλλουν στην παραγωγή της αιθανόλης.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά στο εξεταζόμενο δείγμα συγκέντρωσης 9% αιθανόλης.



Σχήμα 16: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου HXK1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=15\text{min}$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στο παρακάτω διάγραμμα και σε χρόνο $t=16\text{h}$ φαίνεται να υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά στο θρεπτικό μέσο 2%γλυκόζης.



Σχήμα 17: Επίπεδα έκφρασης γονιδίου HXK1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης $t=16h$, όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει σήμερα την χρήση της αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων όπως καλλιεργήσιμα φυτά, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων κ.α.

Εξαιτίας των παραπάνω εμφανίζεται η ανάγκη δημιουργίας και μελέτης γενετικά τροποποιημένων στελεχών ζύμης που πιθανόν να εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα όταν εκτεθούν σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης και συνθήκες ωσμωτικού στρες. Η επιλογή αυτών των δυο συνθηκών έγινε επειδή τις συναντούμε συχνά σε καταστάσεις αλκοολικής ζύμωσης του ζυμομύκητα.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια διερεύνησης της ικανότητας ανάπτυξης ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος φέρει τη μετάλλαξη *Ser531Ala* επί της πρωτεΐνης MSN4 τόσο σε συνθήκες ωσμωτικού στρες όσο και παρουσία αυξημένων επιπέδων αιθυλικής αλκοόλης. Επίσης, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρια διεργασίες. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μελετάται είναι τα ακόλουθα: ELO1, HXK1, ALD4, GND2, TDX1.

Από τις καμπύλες ανάπτυξης βλέπουμε ότι στη συγκέντρωση 2% γλυκόζης το μεταλλαγμένο W303-1a_MSN4_531 προσαρμόζεται και αναπτύσσεται γρηγορότερα από το αγρίου τύπου W303-1a. Όμως, στη συγκέντρωση 15% γλυκόζης δεν παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη. Αντιθέτως, όμως, στις συγκεντρώσεις 3% και 6% αιθανόλης εμφανίζεται διαφορά στην ανάπτυξη. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το αγρίου τύπου W303-1a προσαρμόζεται γρηγορότερα και αναπτύσσεται με μεγαλύτερη ταχύτητα από το μεταλλαγμένο W303-1a_MSN4_531.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απομόνωση RNA έτσι ώστε να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στο μεταλλαγμένο στέλεχος W303-1a_MSN4_531. Τα δείγματα των απομονωμένων RNA μελετήθηκαν με την μέθοδο της Real-Time PCR.

Πιο συγκεκριμένα για το ELO1 για χρονικό διάστημα $t=15\text{min}$ το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζεται να έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις συγκεντρώσεις 15% γλυκόζης και 9% αιθανόλης. Αντίθετα, σε συγκέντρωση 2% γλυκόζης υστερεί σε σύγκριση με το αγρίου τύπου. Επίσης διακρίνουμε ότι σε χρονικό διάστημα έκθεσης 16 ωρών το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζει επίσης αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1. Η παρατήρηση αυτή πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης, καθώς και αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης.

Για το ALD4 παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασής για χρόνο $t=15\text{min}$ στις συγκεντρώσεις 2% και 15% γλυκόζης. Αντιθέτως για χρόνο $t=15\text{min}$ στη συγκέντρωση 9% αιθανόλης παρουσιάζει μειωμένη αύξηση σε σύγκριση με το αγρίου τύπου W303-1a. Για χρόνο $t=16$ ώρες, σε όλα τα θρεπτικά υλικά που ελέγχθηκαν παρουσιάζει αύξηση των επιπέδων έκφρασής του.. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οδηγεί στο σχηματισμό οξικού οξέος κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης από το παραγόμενο από την γλυκόλυση του πυροσταφιλικού σε βάρος της παραγωγής αιθανόλης.

Το γονίδιο HXK1 για την χρονική στιγμή $t=15\text{min}$ σε παρουσία αιθανόλης πιθανότητα αυξάνει την ενεργοποίηση της πορείας της γλυκόλυσης. Αντίθετα σε συγκέντρωση 2% γλυκόζης παρουσιάζει μειωμένη αύξηση, ενώ, στη συγκέντρωση 15% γλυκόζης παρουσιάζει μικρή αύξηση των επιπέδων έκφρασής του. Για $t=16\text{h}$ υπάρχει αύξηση των επιπέδων της εξοκινάσης-1 και αυτό πιθανότατα οφείλεται στην καταναλωμένη γλυκόζη.

Για το γονίδιο GND2 για χρονικό διάστημα $t=15\text{min}$ παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο μεταλλαγμένο στέλεχος το οποίο πιθανόν υποδηλώνει καλύτερη ανάπτυξη παρουσία αιθανόλης. Για χρόνο $t=16\text{h}$ παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο μεταλλαγμένο στέλεχος στις συγκεντρώσεις 2% γλυκόζης και 9% αιθανόλης. Αντιθέτως σε συγκέντρωση 15% γλυκόζης παρατηρείται μειωμένη αύξηση σε σύγκριση με το αγρίου τύπου W303-1a.

Τέλος το γονίδιο TDH1 για χρονικό διάστημα $t=15\text{min}$ παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης που πιθανόν προάγει την λειτουργία της γλυκόλυσης. Αντίθετα σε χρόνο $t=16\text{h}$ παρατηρείται μικρότερη αύξηση στις

συγκεντρώσεις 2% γλυκόζης και 9% αιθανόλης. Ενώ σε συγκέντρωση 15% γλυκόζης υστερεί σε σύγκριση με το αγρίου τύπου W303-1a.

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 531 της μεταγραφικού παράγοντα MSN4.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 180, pp. 1044–1052.
- Brewster J.L., De Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C.,(1993). “An osmosensing signal transduction pathway in yeast”. *Science*, vol. 259 pp. 1760-176.
- 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.
- Colombo S., Ma P., Cauwenberg L., Winderickx J., Crauwels M., Teunissen A., Nauwelaers D., de Winde J.H., Gorwa M.F., Colavizza D., Thevelein J.M.(1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 17, pp. 3326–3341.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med*, 22, pp. 217–246.
- D. Fraga, T. Meulia, S Fenster (2008). “UNIT 10.3 Real-Time PCR Current Protocols Essential Laboratory Techniques”, p:10.3.1-10.3.5.
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24, pp. 469–486.
- Estruch F. and Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 3872–3881.
- Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol., Rev.* 32, pp. 673–704.
- Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol., Rev.* 32, pp. 673–704.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., StorzG., Botstein D., Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*,11, pp. 4241–4257.
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*, 21, pp. 135–144.
- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.

- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*, 13, pp. 771–781.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125
- Lin Y., Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, pp. 627–642.
- Liu Z.L., Saha B.C., Slininger P.J. (2008). Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. In: Wall J., Harwood C., Demain A. (eds) *Bioenergy*. ASM, Washington, DC, pp. 17–36.
- M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker (2010). “Βιολογία των Μικροοργανισμών”. Brock, Τόμος 1. Ε.Κ.Π. Ηράκλειο
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and Estruch F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15, pp. 2227–2235.
- Müller D., Exler S., Aguilera-Vázquez L., Guerrero-Martín E., Reuss M. (2003). Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20, pp. 351–367.
- Nikolaou E., Agrafioti I., Stumpf M., Quinn J., Stansfield I., Brown A.J. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol*, 9, pp. 44
- Outlaw J., Collins K.J., Duffield J.A. (2005). *Agriculture as a producer and consumer of energy*. CABI, Oxfordshire.
- R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). Kinetic PCR Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030.
- R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh and R. Griffith (1992), simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413-417.
- Saint-Prix F, Bönquist L , Dequin S. (2004). "*Functional analysis of the ALD gene family of Saccharomyces cerevisiae during anaerobic growth on glucose: the NADP+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation.*". *Microbiology* 150:2209-2220.

- Sample and assay technologies - Real Time PCR brochure (05/2009): Critical factors for successful Real Time PCR, 64:9.
- Sanchez O.J., Cardona C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, 99, pp. 5270–5295
- Santangelo G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol., Rev.* 70, pp. 253–282.
- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, pp. 5777–5782
- Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., Ruis, H. (1994): The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae CTT1* gene. *EMBO Journal*, 13:4382-4389
- Science.gr : Real Time PCR (2012). Ημερομηνία ανάκτησης 10 Μαΐου 2016, από <http://www.science.gr/main/>.
- Smets B., Ghillebert R., De Snijder P., Binda M., Swinnen E., De Virgilio C. and Winderickx J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 56, pp. 1–32.
- Tamaki H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng*, 104, pp. 245–250.
- Thevelein J. M. and de Winde J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 33, pp. 904–918.
- Walker, G. M. (1998): *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, New York, pp. 350
- Wall J., Harwood C., Demain A. (2008). *Bioenergy*. ASM, Washington

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Α. Μ. Μπατρίνου (2011) “Σύγχρονη Βιοτεχνολογία – Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα”. Αθήνα Π. Χ. Πασχαλίδης Α.Ε.
- Γ. Αγγελής (2007) “Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία”. Αθήνα Αθ. Σταμούλης.
- Ε. Αλεξανδρή – Χαντζηαντωνίου (2004) “Βιολογία – Η Μελέτη της Ζωής”. Β' Έκδοση. Αθήνα Αθ. Σταμούλης
- Κ. Α. Δημόπουλος, Σ. Αντωνοπούλου (2009) “Βασική Βιοχημεία”. 2^η Έκδοση, Αθήνα
- Παναγιώτης Κατινάκης (2004) “Βιοχημεία”. Αθήνα

- 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.