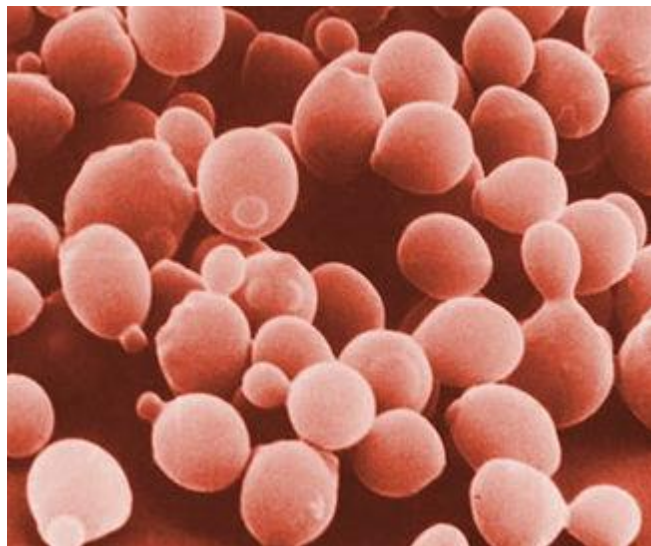


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

<<ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser620Ala ΕΠΙ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ *msn2* ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ>>

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΓΕΝΙΑ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2016

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

<<ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser620Ala ΕΠΙ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ *msn2* ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ>>

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΓΕΝΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής:
Σωτήριος Σπυρίδων Βαμβακάς

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με αυτή τη διπλωματική εργασία ολοκληρώνονται οι σπουδές μου στο τμήμα των τεχνολόγων τροφίμων του ΑΤΕΙ Καλαμάτας και θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με στήριξαν σε αυτή την πορεία.

Αντικείμενο μελέτης είναι η μετάλλαξη Ser620Ala σε λειτουργία με τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* όπου η συγκεκριμένη αλλαγή θέλουμε να διαπιστώσουμε εάν επιφέρει ανθεκτικότητα του ζυμομύκητα έναντι διαφόρων αντίξων συνθηκών, και κατά επέκταση εάν ζυμομύκητας είναι ικανός να επιβιώσει και να λειτουργήσει πιο αποτελεσματικά σε αυτές τις συνθήκες.

Η διπλωματική εργασία μου ανατέθηκε από τον κ. Βαμβακά όπου είναι και ο επιβλέπων καθηγητής μου και πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο χημείας & βιοχημείας του ΑΤΕΙ Καλαμάτας.

Προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Βαμβακά που με βοήθησε στην υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας εκφράζω τις πιο θερμές ευχαριστίες για την πολύτιμη βοήθεια του και για την αμέριστη καθοδήγηση του.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την στήριξη τους σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου και για την εμπιστοσύνη και την θέληση να με βοηθήσουν να πραγματοποιήσω όλους στόχους έθετα.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ζυμομύκητες	9
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.2.1 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.	11
1.2.2 Επίδραση της αιθανόλης.	12
1.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας.	12
1.3 Πρωτεΐνη MSN2	13
1.4 PCR	15
1.4.1 Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.	15
1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου(Real-time PCR)	16
2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
2.1 Υλικά.....	22
2.2 Θρεπτικά υλικά.	23
2.2.1 Υερ	23
2.2.2 Παρασκευή 50xTAE buffer	23

2.2.3 Παρασκευή 1xTAE buffer	23
2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.3.1 Παρασκευή καλλιιεργειών από stock καλλιέργειες.	23
2.4 έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιιεργειών	24
2.6 Καμπύλες ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.	24
2.7 Συλλογή δειγμάτων για απομόνωση RNA.	25
2.8 α. Απομόνωση RNA.	25
β. Επεξεργασία RNA δειγμάτων με DNase-I.	26
2.9 Ηλεκτροφόρηση RNA.....	27
2.10 Real-time PCR.....	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1 Καμπύλη ανάπτυξης παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης.....	31
3.1.1 Συγκέντρωση γλυκόζης 2% w/v.	31
3.1.2 Συγκέντρωση γλυκόζης 15% w/v.	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	50
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52
5.1 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	52

5.2 Ξένη Βιβλιογραφία	52
5.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ζύμη ή ο ζυμομύκητας αποτελεί τον πιο σημαντικό και χρήσιμο ευκαρυωτικό οργανισμό και χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή τροφίμων και ποτών. Είναι τόσο σημαντικός, γιατί έχει την δυνατότητα να παράγει διάφορα μεταβολικά προϊόντα και να είναι ανθεκτικός στις απότομες αλλαγές συνθήκων που μπορεί να βρεθεί.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς, ο οποίος είναι παραγωγός αιθανόλης και έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται ανάλογα με το περιβάλλον που βρίσκεται αφού μπορεί να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Η πρωτεΐνη *msn2* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας του οποίου η ενεργοποίηση και η ενδοκυττάρια μετατόπιση του στον πυρήνα ελέγχεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω φωσφορυλιώσεων.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί το αποτέλεσμα της αντικατάστασης του αμινοξέος σερίνη (Ser) που βρίσκεται στη θέση 620 επί της *Msn2* πρωτεΐνης, με το αμινοξύ Αλανίνη (Ala), στη λειτουργία του ζυμομύκητα. Πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκε αν η συγκεκριμένη αλλαγή επιφέρει ανθεκτικότητα του ζυμομύκητα έναντι διαφόρων αντίξων συνθηκών, καθιστώντας αυτόν ικανό να επιβιώσει και κατά επέκταση λειτουργήσει πιο αποτελεσματικά σε αυτές τις συνθήκες. Επίσης, ελέγχθηκε με την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (RealTime PCR), η μεταβολή της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση του ζυμομύκητα σε αντίξοες συνθήκες και που έχει δειχθεί ότι η έκφρασή τους αυξάνεται σε στελέχη που αυξημένη ανθεκτικότητα στην αλκοόλη.

Λέξεις κλειδιά : ζυμομύκητας, γονίδια, *Saccharomyces cerevisiae*, *pcr*, *Real-time pcr*.

ABSTRACT

Baker's yeast represents the most important eukaryote organism and is widely used for food and beverage production. It is so important because it has the ability to produce proteins and is resistant to sudden changes in circumstances that may be found.

Saccharomyces cerevisiae is one of the most important microorganisms, which is an ethanol producer and has the ability to adapt according to the environment is because it can survive in aerobic and anaerobic conditions.

Protein msn2 is a transcription factor whose activation and intracellular translocation to the nucleus is controlled by different signaling pathways through phosphorylation.

The aim of this study was to investigate the effect of a specific genetic modification in yeast. Specifically, it was tested whether the presence of this mutation cause yeast resistance to various adverse conditions, making it able to survive and function more efficiently under these conditions. It was also evaluated, using the Real Time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR), changes in gene expression involved in response of yeast to extracellular signals, and has been shown that their expression is controlled by the transcriptional factor MSN2.

Keywords: yeast, genes, *Saccharomyces cerevisiae*, pcr, Real Time pcr.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ζυμομύκητες

Οι ζυμομύκητες ή ζύμες είναι μονοκύτταροί μύκητες, η πλειονότητα των οποίων κατατάσσεται στους Ασκομύκητες. Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων είναι συνήθως σφαιρικά, ωοειδή ή κυλινδρικά. (Madigan et al., 2005)

Το μήκος του κυττάρου ποικίλει από 5-10 μm ενώ το πλάτος από 1-3 έως 1-7 μm . Είναι ένας οξεόφιλος μικροοργανισμός που αναπτύσσεται κυρίως σε ελαφρώς ή μετρίως όξινο περιβάλλον (pH 4.5-6.5) με άριστη θερμοκρασία αύξησης στους 20-25 °C

Το κύτταρο του ζυμομύκητα περιβάλλεται από ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από γλυκάνες και μαννοπρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά καθιστούν ανθεκτικότερο το κύτταρο στις απότομες μεταβολές τις οσμωτικής πίεσης. Κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα βρίσκεται ο περιπλασματικός χώρος που διαχωρίζει το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη. Στον περιπλασματικό χώρο εναποτίθενται οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το κύτταρο του ζυμομύκητα, κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με άλλα είδη ζυμών, τα οποία εκκρίνουν πρωτεΐνες απ' ευθείας στον περιβάλλοντα χώρο.

Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιβάλλεται από την κυτταρική μεμβράνη, η οποία είναι εύθραυστη, αλλά ανθεκτική σε χαμηλές τιμές pH. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες και λιπίδια. Η περιεκτικότητα της σε μονο- και πολύ- ακόρεστα λιπαρά οξέα καθορίζει τη διαπερατότητα της και αποτελεί ίσως το σημαντικότερο τμήμα του κυττάρου, διότι ελέγχει την είσοδο και την έξοδο διαφόρων ουσιών από το εσωτερικό του. (Boulton et al., 1996)

Η κυτταρική διαίρεση γίνεται με εκβλαστήματα. Κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης σχηματίζεται ένα νέο κύτταρο υπό τη μορφή μιας μικρής προεξοχής ενός ώριμου κυττάρου, το οποίο βαθμιαία μεγαλώνει και

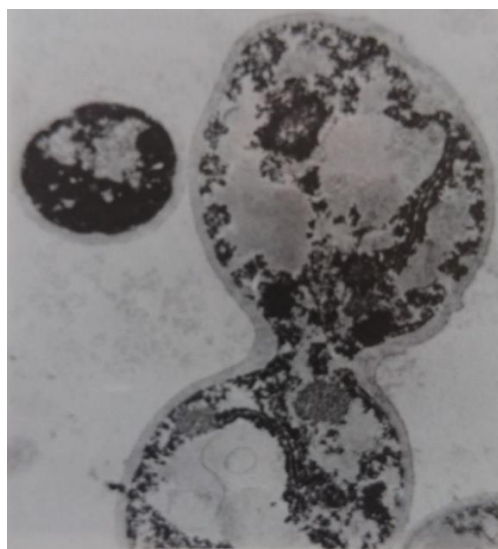
τελικά αποχωρίζεται . Εάν και οι περισσότεροι ζυμομύκητες αναπαράγονται ως μεμονωμένα κύτταρα, υπό ορισμένες συνθήκες κάποιοι από αυτούς σχηματίζουν νήματα. Σε αυτά τα είδη, ορισμένα χαρακτηριστικά εκφράζονται μόνο στις νηματοειδείς μορφές. (Madigan *et al.*, 2005)

Η ζύμη αποτελεί τον πιο χρήσιμο ευκαρυωτικό οργανισμό για παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών και είναι επόμενο να έχει γίνει πολύ μεγάλη πρόοδος στη γενετική και μοριακή βιολογία του μικροοργανισμού αυτού.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έχει εφαρμοστεί στους ζυμομύκητες με στόχο να βελτιωθεί η ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος, να βελτιστοποιηθεί η απόδοση των ζυμώσεων (σε βιομάζα ή προϊόντα) και οι διαδικασίες παραγωγής. (Madigan *et al.*, 2005)

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα *saccharomyces cerevisiae* (εικόνα 1.1), αποτελείται από 12 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων DNA και περιέχει περίπου 6.000 γονίδια.



Εικόνα 1.1: φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης που δείχνει τον *saccharomyces cerevisiae*. (Cooper and Hausman, 2009)

Το κύτταρο του σακχαρομύκητα παρουσιάζει τα τυπικά χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών κυττάρων και περιλαμβάνει ένα διακριτό πυρήνα που περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη, το γονιδιωματικό του DNA είναι κατανεμημένο σε 16 γραμμικά χρωμοσώματα και το κυτταρόπλασμα του περιέχει κυτταροσκελετό και υποκυτταρικά οργάνδια.

Μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα σε εργαστήριο και είναι δυνατόν να μελετηθούν πειραματικά με μεθόδους μοριακής γενετικής. Επίσης, έχει την ικανότητα να αντιδρά και να προσαρμόζει τις λειτουργίες του ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. (Cooper and Hausman, 2009).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ των πολυάριθμων ζυμωτικών μικροοργανισμών (Lin and Tanaka, 2006, Liu et al., 2008), ο οποίος συχνά καλείται ως εκβλαστάνουσα ζύμη, λόγω του τρόπου με το οποίο αναπαράγεται και που έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Ακόμα, έχει την ικανότητα να μεταβολίσει σάκχαρα. (Gasch et al., 2000)

1.2.1 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.

Η έκθεση των στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις έχει ως επακόλουθο την ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου, λόγω εκροής νερού. Με αυτό το φαινόμενο γίνεται η έναρξη ενός συνόλου από πολύπλοκες αντιδράσεις. Όταν γίνεται διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, η ωσμωτική πίεση αυξάνεται. (Marechal et al., 1994, Meikle et al., 1988). Όταν η ωσμωτική πίεση είναι αυξημένη, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων που δίνουν σήμα για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση. (Brewster et al., 1993, Schuller et al., 1994)

1.2.2 Επίδραση της αιθανόλης.

Η αιθανόλη θεωρείται μια τοξική ουσία για τα κύτταρα. Όταν συγκεντρώνεται στο κύτταρο ή στο περιβάλλοντα χώρο, δρα ως χημικός στρεσογόνος παράγοντας. Έχει αποδειχθεί, ότι οι συγκεντρώσεις που είναι 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 η μετακίνηση των αμμωνιακών ιόντων και μερικών αμινοξέων. Επίσης, σε συγκεντρώσεις περίπου 11%, η ζύμωση καταστέλλεται πλήρως. (Glazer et al., 1995).

Η κυριότερη αρνητική επίδραση της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, αφού η αιθανόλη εισέρχεται σ' αυτή και διασπά τους δεσμούς πρωτεϊνών και λιπιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διαπερατότητα της μεμβράνης.

Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει με αργό ρυθμό και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου (Jackson, 1994).

1.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας.

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την αύξηση 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.

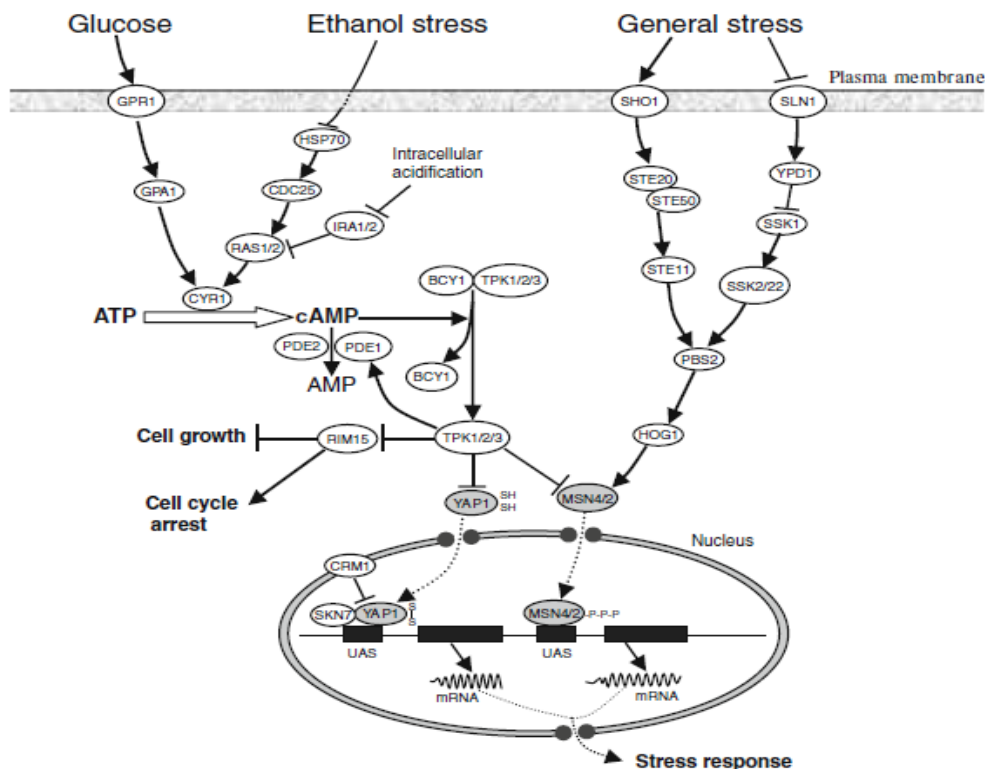
Η βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης για τα περισσότερα στελέχη είναι 20-30 °C, ενώ έχουν αναφερθεί βασικές αποκλίσεις σε στελέχη άγριων ζυμών. Η μέγιστη θερμοκρασία αύξησης, παρουσιάζει διακύμανση σε εύρος από 35-43 °C. Ανάλογα με τις θερμοκρασίες αύξησης γίνεται κατηγοριοποίηση των ζυμών σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες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

1.3 Πρωτεΐνη MSN2

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. Έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες στρες (Boy-Marcotte et al., 1998, Görner et al, 2002, Hasan R. et al., 2002, Kandrór et al., 2004). Η ενεργοποίηση του συμβαίνει μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως και ο έλεγχος της εισόδου του 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 *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 έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες στρες.



Σχήμα 1.2: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες stress λόγω της γλυκόζης, της αιθανόλης και των γενικών περιβαλλοντικών συνθηκών 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).

Αν και η ζύμη είναι ένας παραδοσιακός μικροοργανισμός παραγωγής αιθανόλης είναι επίσης ευαίσθητη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η συσσώρευση της αιθανόλης σε ένα μέσο αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και βιωσιμότητα του κυττάρου, επηρεάζει τα διάφορα συστήματα μεταφοράς και μειώνει τον τίτλο της αιθανόλης στην καλλιέργεια (Casey and Ingledew 1986, D'Amore and Stewart 1987, D'Amore et al. 1990, Bai et al 2004, Pina et al. 2004).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η αιθανόλη έχει επίσης δειχθεί να διαταράσσει την διαμόρφωση των πρωτεϊνών προκαλώντας μετουσίωση και δυσλειτουργία των βασικών γλυκολυτικών ενζύμων όπως της πυροσταφυλικής κινάσης και εξοκινάσης (Millar et al,1982, Pascual et al, 1988). Η υψηλή αιθανόλη επηρεάζει την πρόσληψη γλυκόζης, μαλτόζης, αμμωνίου και αμινοξέων και προκαλεί κυτταρική διαρροή νουκλεοτιδίων, αμινοξέων, και καλίου (Piper 1995).

1.4 PCR

Η μέθοδος αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια από τις πιο πρόσφατες επαναστατικές τεχνικές του DNA η οποία διευκόλυνε τη μελέτη και της εφαρμογές της Μοριακής Γενετικής. Η PCR λειτουργεί σαν μια εναλλακτική μέθοδος κλωνοποίησης διότι μπορεί να αναπαράγει σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη ταχύτητα μία συγκεκριμένη μικρή αλληλουχία DNA που βρίσκεται μέσα σε ένα πολύπλοκο μίγμα.

Η τεχνική είναι πολύ γρήγορη, προσφέρει υψηλή ακρίβεια και αποτελεσματικότητα και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να πολλαπλασιάσει αλληλουχίες DNA που υπάρχουν ακόμη και σε ελάχιστα αντίγραφα μέσα σε ένα μίγμα, καθώς επίσης μπορεί να απομονώσει μια αλληλουχία από ένα πολύ μικρό δείγμα. Με αυτή τη διαδικασία μπορούν να εντοπιστούν συγκεκριμένα γονίδια που υπάρχουν σε ένα δείγμα. (Μπατρινού, 2011)

1.4.1 Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Μερικές φορές κρίνεται απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός του προς μελέτη DNA με πολλαπλή αντιγραφή, χωρίς τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεάσεων, φορέων, ξενιστών με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή :

- Η διπλή αλυσίδα του προς μελέτη DNA διαχωρίζεται με θέρμανση σε δύο μονές αλυσίδες, ουσιαστικά γίνεται διαχωρισμός των κλώνων.
- Προστίθενται δύο ολιγονουκλεοτίδια, ως εκκινητήρια μόρια, καθ' ένα από τα οποία προσδένεται (λόγω των συμπληρωματικών βάσεων) σε κάθε μια από τις δύο αλυσίδες του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά εκκινητές πρέπει να περιέχουν μια αλληλουχία βάσεων που περιέχεται μόνο στο γονίδιο στόχο.
- Η πρόσδεση των εκκινητήριων μορίων γίνεται στις συμπληρωματικές θέσεις (ένα εκκινητήριο μόριο σε κάθε κλώνο) με ψύξη θέρμανση του δείγματος.
- Στη συνέχεια, παρουσία των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων και μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης του DNA, βιοσυντίθενται νέες αλυσίδες του DNA προς τις δύο κατευθύνσεις, ξεκινώντας από τα δύο εκκινητήρια μόρια.
- Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται με το ίδιο μίγμα αντίδρασης για πολλές φορές (20-30 φορές). Η κυκλική θέρμανση και ψύξη ρυθμίζεται ηλεκτρονικά. Από τον τρίτο κύκλο σχηματίζονται διπλές αλυσίδες DNA με μήκος αντίστοιχο της απόστασης μεταξύ των δύο εκκινητήριων μορίων, των οποίων η συγκέντρωση διπλασιάζεται περίπου σε κάθε κύκλο μέχρι που όλα σχεδόν τα τμήματα που βιοσυντίθενται να έχουν το σωστό μήκος.
- Το προϊόν της αντίδρασης είναι το προς μελέτη DNA το οποίο έχει πολλαπλασιαστεί.(Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009)

1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου(Real-time PCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για να μετρήσει με ακρίβεια την συγκέντρωση (ποσότητα) μίας DNA αλληλουχίας στόχου σε ένα δείγμα. Η PCR γίνεται παρουσία μίας

ενώσεως που φθορίζει μόνο όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA και επομένως όσο περισσότερο συντίθεται η συγκεκριμένη DNA αλληλουχία-στόχος (και αυξάνει η συγκέντρωση του δίκλωνου DNA) στο δείγμα, τόσο αυξάνεται ο φθορισμός. Ο φθορισμός που εκπέμπεται αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του νεοσυντιθέμενου DNA και καταγράφεται σε ένα σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή. Σχεδιάζεται μια πρότυπη καμπύλη της ποσότητας φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της PCR με δείγματα γνωστής αρχικής συγκέντρωσης DNA και ορίζεται ένα όριο φθορισμού. Καταμετράται ο αριθμός των κύκλων PCR που χρειάζεται ένα δείγμα προκειμένου να περάσει το όριο φθορισμού και ορίζεται ως Ct. Όσο πιο μικρό είναι το Ct του δείγματος, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση DNA αλληλουχίας στόχου που περιέχεται στο δείγμα.

Από τη σύγκριση με την πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων DNA, προκύπτει η ποσότητα της συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου του υπό εξέταση δείγματος. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε διάστημα που κυμαίνεται από 20 λεπτά ως 2 ώρες.

Η ποσοτική Real-time PCR έχει πολλές εφαρμογές στην ανίχνευση διαγονιδίων σε δείγματα και στην ποσοτικοποίηση, δηλαδή τη μέτρηση του αριθμού ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα. (Demeke & Jenkins 2010, Batrinou et al 2008)

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογισθεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) (Livak et al, 2001).

- Η Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) παρέχει την μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος

αυτή βασίζεται στην χρήση μίας καμπύλης αναφοράς (standard curve), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεγεί μια γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene, 2006).

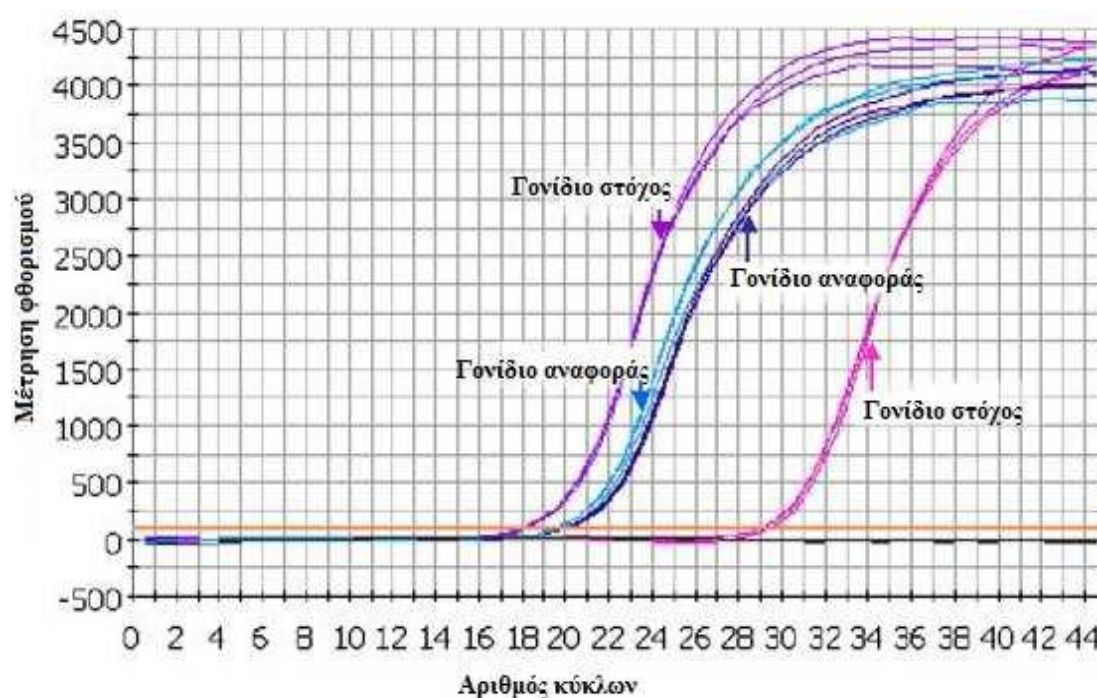
Αυτή τη συγκέντρωση-μάρτυρα θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real-Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα.

Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις Ct values της κάθε αραιώσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη.

Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα (Stratagene, 2006).

- Η Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση και με την μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση της καμπύλης αναφοράς.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Pfaffl, 2002) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Σύγκριση καμπύλης του υπό μελέτη γονιδίου (γονίδιο στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (reference gene) (Hunt, 2006).

Μια ακόμα δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της Real Time PCR είναι η κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve ή Dissociation curve) με την οποία μπορούν να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα προϊόντα που παρήχθησαν είναι αυτά που θέλουμε ή όχι. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή T_m) των προϊόντων της αντίδρασης (Houghton et al, 2006).

Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών ή τμήματα που προέρχονται από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (mispriming) (Hunt, 2006).

Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης τότε θα εμφανιστεί μια κορυφή στην καμπύλη, ενώ στην περίπτωση που ανάμεσα στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (T_m) επειδή για κάθε προϊόν η αποδιάταξη γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία.

Η μεθοδολογία της εφαρμογής της αντίδραση της Real Time PCR θα πρέπει να περιλαμβάνει πάντα και αρνητικούς μάρτυρες (κενά DNA) μαζί με άγνωστα δείγματα προς ανάλυση. Τα αρνητικά αυτά δείγματα αφορούν την εφαρμογή κανονικής αντίδρασης με χρήση όλων των υλικών της PCR πλην της προσθήκης του DNA (όπως στην περίπτωση της αντίδρασης των αγνώστων δειγμάτων). Συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA, για να εξεταστεί η περίπτωση επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης PCR του αγνώστου δείγματος υπό εξέταση με DNA άλλου οργανισμού. (Houghton et al, 2006).

Ο μετρούμενος φθορισμός συνήθως βασίζεται στην χρήση χρωστικών που δεσμεύονται και αλληλεπιδρούν με δίκλωνο DNA. Η χρωστική SYBR Green I όταν δεσμευτεί σε δίκλωνο DNA τότε φθορίζει έντονα πράσινο χρώμα, ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ως αναλογικά με τη συγκέντρωση του δίκλωνου DNA στο διάλυμα (Stratagene, 2006).

Η μέθοδος είναι εύκολη στη χρήση της και έχει μικρό κόστος, γι' αυτό και προτιμάται από τους ερευνητές. Ένα μειονέκτημα της SYBR Green I είναι ότι δεν παρουσιάζει εξειδίκευση και μπορεί να δεθεί με ένα οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA, ακόμα και σε τμήμα που δημιουργήθηκε από ένωση των εκκινητών μεταξύ τους (εσφαλμένος διμερισμός εκκινητών, primer-dimer artifacts). Έτσι δεν είναι δυνατόν η χρήση της SYBR Green I να πιστοποιήσει ότι το σήμα που εκπέμπεται

αντιστοιχεί στην συγκέντρωση των αντιγράφων της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει (Houghton et al, 2006)

2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω πειραματικές πορείες καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 : Αντιδραστήρια πειραματικών διαδικασιών.

	Αντιδραστήρια	Εταιρία	κωδικός
1	Gel red	Biotium	41003
2	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3	C ₂ H ₅ OH 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
4	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	Lab M	MC001
5	Bacto Peptone	AppliChem Panreac	2V004676
6	Γλυκόζη (Glucose)	Sigma-Aldrich	G7021
7	Agar Agar	Serva	11392
8	Απιονισμένο H ₂ O		
9	TES		
10	Όξινη φαινόλη	Riedel-deHaen	A1578
11	C ₂ H ₅ OH 80%	Sigma-Aldich	24194-2.5L-R
12	DNase-I		
13	Trisma Base		
14	Glacial acetic acid		
15	EDTA		
16	Οξικό νάτριο		
17	RNase free H ₂ O		
18	Buffer	TaKaRa	A6301A
19	BSA		
20	χλωροφόρμιο	Merck	K38408045806
21	KAPA SYBR FAST qPCR mix	Kapa biosystems	KK4651
22	primer		
23	ROX LOW	Kapa biosystems	KK2501
24	dUTP	Kapa biosystems	KK2501
25	KAPA RT MIX	Kapa biosystems	KK2501
26	Nuclease-free water	DEMO	1400396

2.2 Θρεπτικά υλικά.

2.2.1 Yep

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

Τοποθετείται στο αυτόκαστο όπου εκεί πραγματοποιείται η υγρή αποστείρωση.

2.2.2 Παρασκευή 50xTAE buffer

Σε προστίθενται :

Trisma base	242 g
Glacial acetic acid	57,1 g
EDTA	18,6 g
Απιονισμένο H ₂ O	900 ml

Προσαρμογή τελικού όγκου του διαλύματος στο 1L με επιπλέον προσθήκη απιονισμένου νερού.

2.2.3 Παρασκευή 1xTAE buffer

Σε μια γυάλινη φιάλη των 1000 ml προστίθενται:

50xTAE buffer	20 ml
Απιονισμένο H ₂ O	980 ml

2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Παρασκευή καλλιιεργειών από stock καλλιέργειες.

Από κύτταρα τα οποία φυλάσσονται στους -70°C σε 20% γλυκερόλη λαμβάνεται με αποστειρωμένη ράβδο ξύσμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό στερεού θρεπτικού υλικού (τρυβλίο petri). Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 30°C για περίπου 16h. Μια από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί επί του στερεού μέσου,

συλλέγεται με βακτηριολογικό κρίκο και χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού όγκου περί τα 10ml.

2.4 έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιεργειών

Με την χρήση μικροσκόπιού διαπιστώνεται η καθαρότητα των ανεπτυγμένων καλλιεργειών τοποθετώντας μικρή ποσότητα καλλιέργειας (~10ml) σε αντικειμενοφόρο και τοποθετώντας από πάνω καλυπτρίδα.

2.5 Καμπύλες ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Η λήψη των καμπυλών ανάπτυξης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης έγινε με τη χρήση του οργάνου ELIZA READER.

Το συγκεκριμένο όργανο έχει την ικανότητα να παρέχει συνεχή ανάδευση υπό σταθερή θερμοκρασία και να λαμβάνει μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης στο επιθυμητό μήκος κύματος (600nm) σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Υγρά θρεπτικά υλικά διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης παρασκευάστηκαν (2%w/v, 5%w/v, 10%w/v, 12%w/v, 15%w/v), εμβολιάστηκαν με ίδιο αριθμό κυττάρων και 100μl αυτών, τοποθετήθηκαν εις διπλούν στην πλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων.

2.6 Καμπύλες ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Για την κάθε συγκέντρωση αιθανόλης που εξετάστηκε, χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό, γερ και απόλυτη αιθανόλη. Οι συγκεντρώσεις όπου υπεβλήθησαν τα κύτταρα να αναπτυχθούν, είναι οι εξής : 3%v/v, 6%v/v, 9%v/v, 12%v/v .

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.

2.7 Συλλογή δειγμάτων για απομόνωση RNA.

Οι συγκεντρώσεις τις γλυκόζης που εξετάστηκαν είναι 2%w/v και 15%w/v και της αιθανόλης σε 3%v/v και 9%v/v. Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιείται η διαδικασία σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, δηλαδή σε t=15min και σε t=16hours.

2.8 α. Απομόνωση RNA.

1. Από καλλιέργεια, μεταφέρονται 1,5 ml σε Eppendorf και φυγοκέντριση στις 10000 rpm για 3min στους 4°C. Πλήρη απομάκρυνση υπερκείμενου. Φύλαξη στους -80°C 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 65°C 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 εκχυλίσσεις με όξινη φαινόλη.
6. Προσθήκη 400μl χλωροφόρμιο, 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.

β. Επεξεργασία RNA δειγμάτων με DNase-I.

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

1. Τα δείγματα αποψύχονται και ακολουθεί η προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων:
 - 2 μl 10 X DNase buffer.
 - 16 μl RNA (~2μg).
 - 1 μl BSA.
 - 1 μl DNase.
2. Τα erppendorf τοποθετούνται για 1h στους 37°C.
3. Ακολουθεί προσθήκη 200μl όξινης φαινόλης και 180μl RNaseFree 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 Erppendorf και προστίθεται 400μl χλωροφόρμιο 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 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.
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 H₂O RNase free, και αποθήκευση στους -70°C.

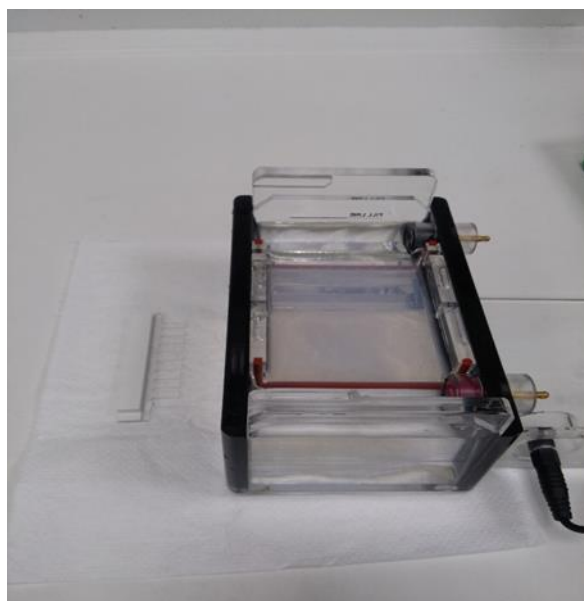
2.9 Ηλεκτροφόρηση RNA

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)(Εικόνα 1.4)



Εικόνα 1.4 : 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 gel red.
2. Αμέσως το διάλυμα απόχύνεται στην ειδική βάση ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για το σχηματισμό των πηγαδιών στο gel αγαρόζης. Όταν στερεοποιηθεί το gel αγαρόζης είναι έτοιμο προς χρήση. (Εικόνα 1.5)



Εικόνα 1.5 : η βάση της ηλεκτροφόρησης όπου βρίσκεται το πηκτωμα 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 πηκτωμα.

3. 2μl του προς εξέταση δείγματος αναμειγνύονται με 1μl 10 X διαλύματος χρωστικής Orange G και 7μl H_2O .
4. Κάθε ένα από τα παραπάνω παρασκευάσματα (10μl) τοποθετείται εντός των πηγαδιών, 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 $\sim 30\text{min}$.

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.

2.10 Real-time PCR

- Τα γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχθηκε είναι: HXK1, ALG9, GND2, TDH1, ALD4, ELO1. 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 δείγμα RNA.
- Οι ποσότητες που τοποθετούνται αναγράφονται παρακάτω (πίν.2.1) Τοποθετούμε τις παρακάτω ποσότητες:

Πίνακας1.1: ποσότητες αντιδραστηρίων για την 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 } 45 κύκλοι
 - 1 min στους 95° C
 - 30 sec στους 55° C
 - 30 sec στους 95° C
-

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

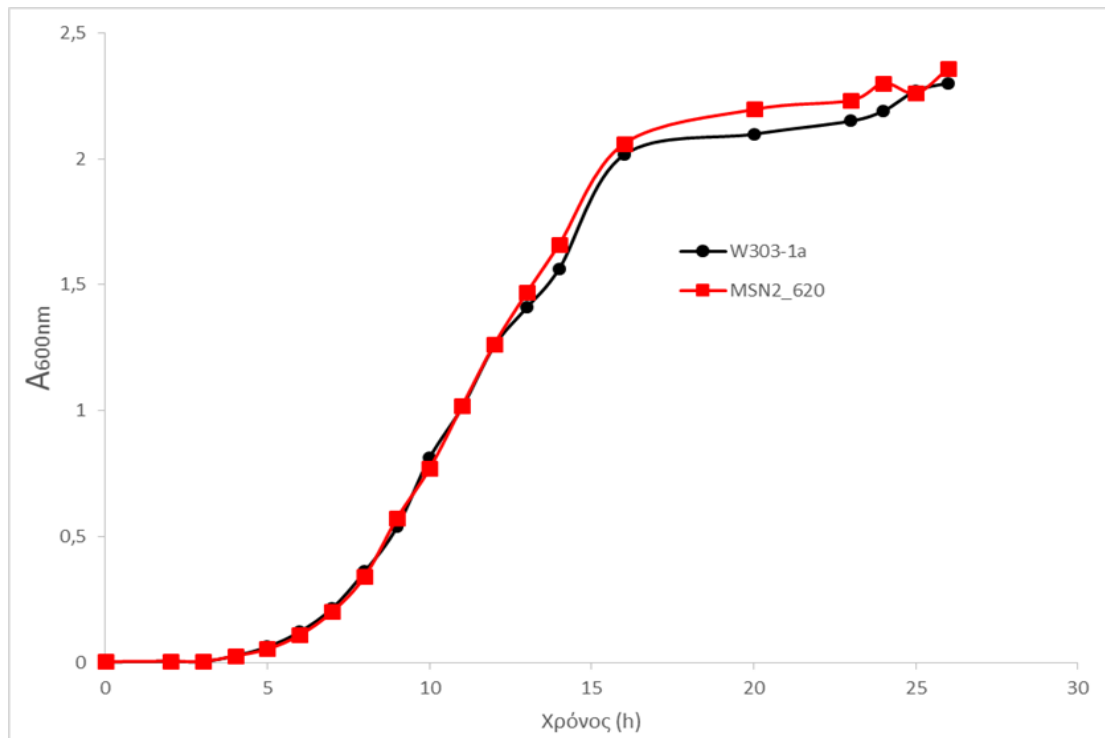
Το περιβάλλον στο οποίο καλείται ο ζυμομύκητας να επιτελέσει τη ζύμωση μεταβάλλεται συνεχώς με την πρόοδο αυτής. Στα πρώτα στάδια της ζύμωσης καλείται να λειτουργήσει και να αναπτυχθεί στο μέτρο του δυνατού, σε περιβάλλον που είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες, ενώ στα επόμενα στάδια καλείται να λειτουργήσει σε περιβάλλον με αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης. Εξ' αιτίας των παραπάνω μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξής του σε θρεπτικά υλικά που προσομοιάζουν των συνθηκών αυτών.

3.1 Καμπύλη ανάπτυξης παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης.

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του γενετικά τροποποιημένου στελέχους παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλυκόζης συγκρινόμενη πάντα με αυτή του αγρίου τύπου στελέχους.

3.1.1 Συγκέντρωση γλυκόζης 2% w/v.

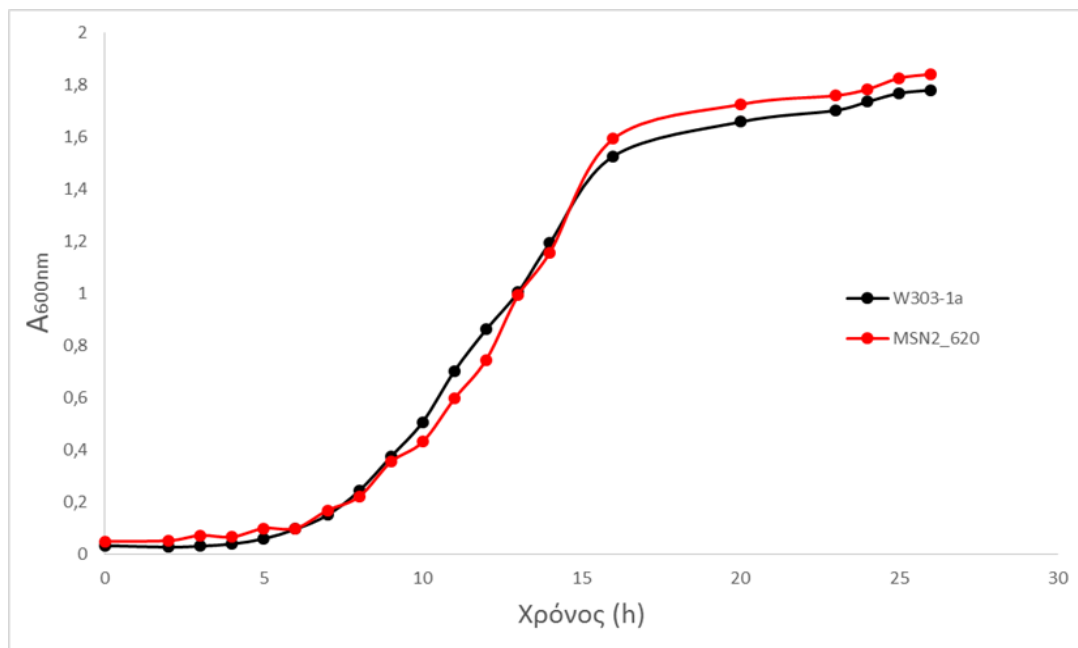
Μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους έναντι του αγρίου τύπου και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης. Αυτό που παρατηρείται από τα αποτελέσματα που καταγράφονται στο παρακάτω σχήμα 1.1 , φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser620Ala επί της πρωτεΐνης MSN2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλει την ικανότητα ανάπτυξής του κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης, ενώ στη στατική φάση παρατηρείται μία αμελητέα διαφοροποίηση ως προς τον αριθμό των κυττάρων του μεταλλαγμένο στέλεχος να αναπτύσσεται στο φυσιολογικό θρεπτικό μέσο.



Σχήμα 1.1: Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae*, σε σύγκριση το μεταλλαγμένο στελέχος με του αγρίου τύπου σε θρεπτικό μέσο 2% w/v γλυκόζης.

3.1.2 Συγκέντρωση γλυκόζης 15% w/v.

Η ανάπτυξη του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη Ser620Ala επί της πρωτεΐνης *msn2* του ζυμομύκητα σε θρεπτικό υλικό με αρκετά υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης 15%w/v, δεν εμφανίζει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά συγκρινόμενη με αυτή του αγρίου τύπου στελέχους. (Σχήμα 1.2).



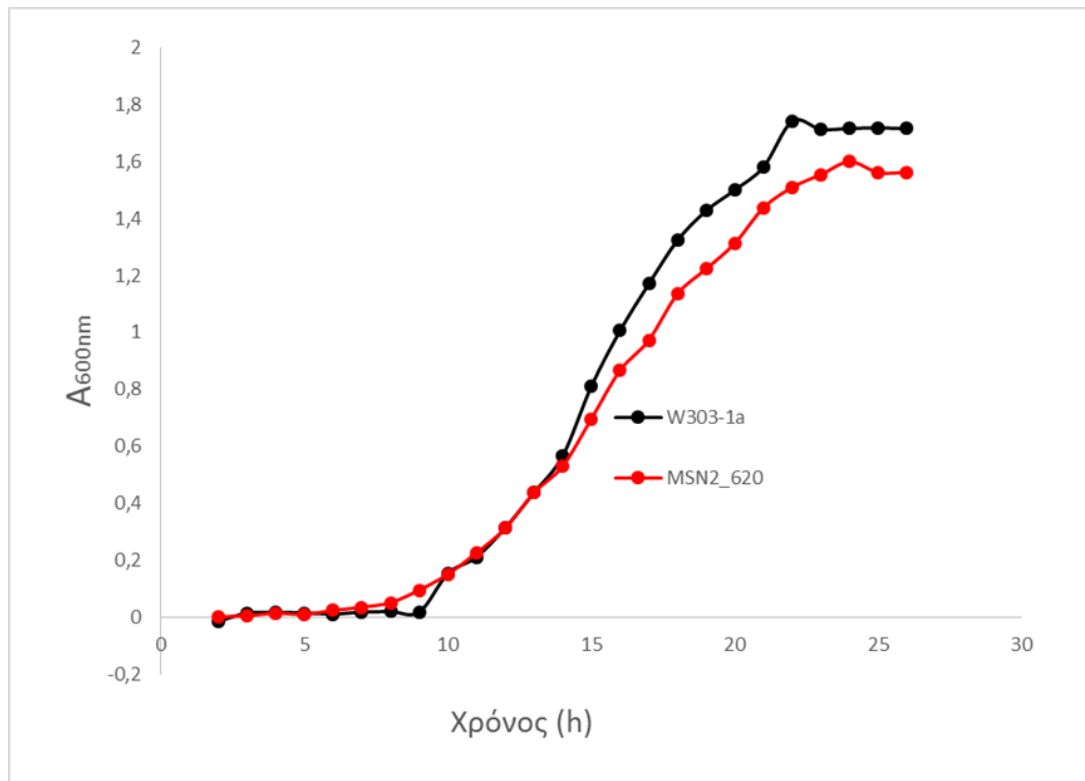
Σχήμα 1.2: Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae*, σε σύγκριση το μεταλλαγμένο στέλεχος με του αγρίου τύπου σε θρεπτικό μέσο 15% w/v γλυκόζης.

3.2 Καμπύλες ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης.

Η αιθανόλη είναι ένας από τους κύριους μεταβολίτες του ζυμομύκητα και επιπροσθέτως είναι το συνηθέστερο προϊόν το οποίο είναι επιθυμητό να παραχθεί στη βιομηχανία τροφίμων. Παρόλο που ο ίδιος ο ζυμομύκητας το παράγει, αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες αναστολής της λειτουργίας του ζυμομύκητα και σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση επιφέρει την θανάτωση του. Καθίσταται λοιπόν απαραίτητη και κρίσιμη η μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη Ser620Ala επί της πρωτεΐνης *msn2*.

3.2.1 Συγκέντρωση αιθανόλης 3% v/v.

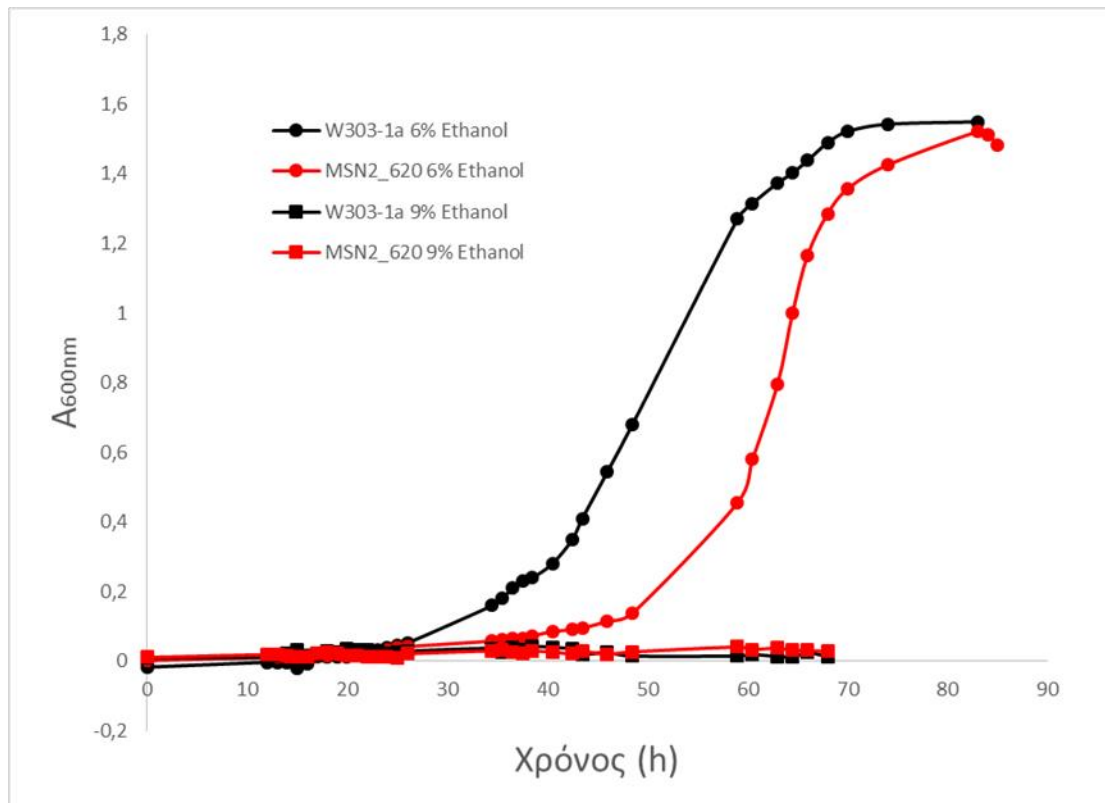
Το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος φαίνεται ότι εμφανίζει μια υστέρηση στην λογαριθμική αλλά και στη στατική φάση έναντι του αγρίου τύπου στελέχους. (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3 : Καμπύλη ανάπτυξης του *Saccharomyces Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 3% v/v αιθανόλης.

3.2.2 Συγκέντρωση αιθανόλης 6% v/v και 9% v/v.

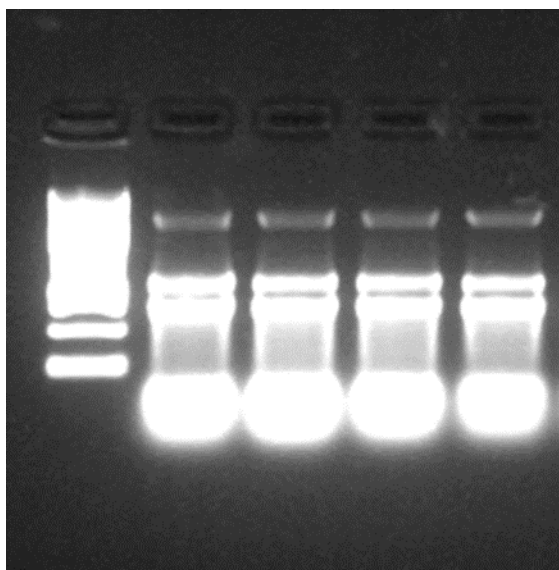
Η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους εμφανίζει σημαντική υστέρηση παρουσία 6% v/v αιθανόλης. Η υστέρηση αυτή εμφανίζεται στη λανθάνουσα φάση. Όμως, από την κλίση της καμπύλης κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης του ζυμομύκητα φαίνεται ότι η παρουσία της υπό μελέτη γενετικής τροποποίησης πιθανόν να δρα θετικά στην ικανότητα ανάπτυξής του. Όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο ανέλθει σε 9% v/v, παρατηρείται ότι ούτε το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος αλλά ούτε και το αγρίου τύπου εμφανίζουν ικανότητα ανάπτυξης.



Σχήμα 1.4 : καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae* , αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, σε θρεπτικό μέσο παρουσία 6% v/v και 9% v/v αιθανόλης.

3.3 Απομόνωση RNA- ηλεκτροφόρηση

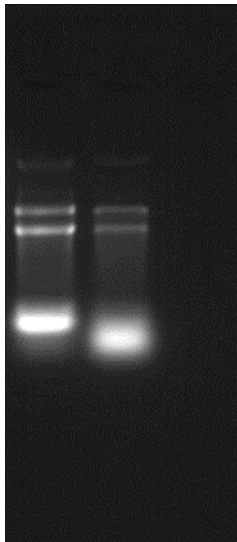
Αφού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της απομόνωσης του RNA στα εξεταζόμενα δείγματα της γλυκόζης και της αιθανόλης, πραγματοποιήσαμε την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης για να διαπιστώσουμε την ποσότητα του RNA. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην παρακάτω μορφή. (Εικόνα 1.1)



Εικόνα 1.1 : Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από την Απομόνωση RNA, στη 1η θέση βρίσκεται ο μάρτυρας και στις επόμενες θέσεις βρίσκονται τα δείγματα. Η εικόνα που παρουσιάζεται είναι ενδεικτική και υπάρχει το αντίστοιχο αποτέλεσμα και για τις υπόλοιπες ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3.4 Επεξεργασία των απομονωθέντων RNA με DNases-I και Ηλεκτροφόρηση

Κατόπιν της απομόνωσης του RNA ακολούθησε η επεξεργασία των δειγμάτων με DNase-I προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση τυχόν ιχνών DNA που μπορεί να υπάρχουν στα δείγματα. Η διαδικασία της επεξεργασίας με DNase-I περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος. Ακολούθως του καθαρισμού των δειγμάτων από την DNase-I τα δείγματα υπεβλήθησαν σε ηλεκτροφόρηση προκειμένου να διαπιστωθεί η ακεραιότητα του RNA. (Εικόνα 1.2)



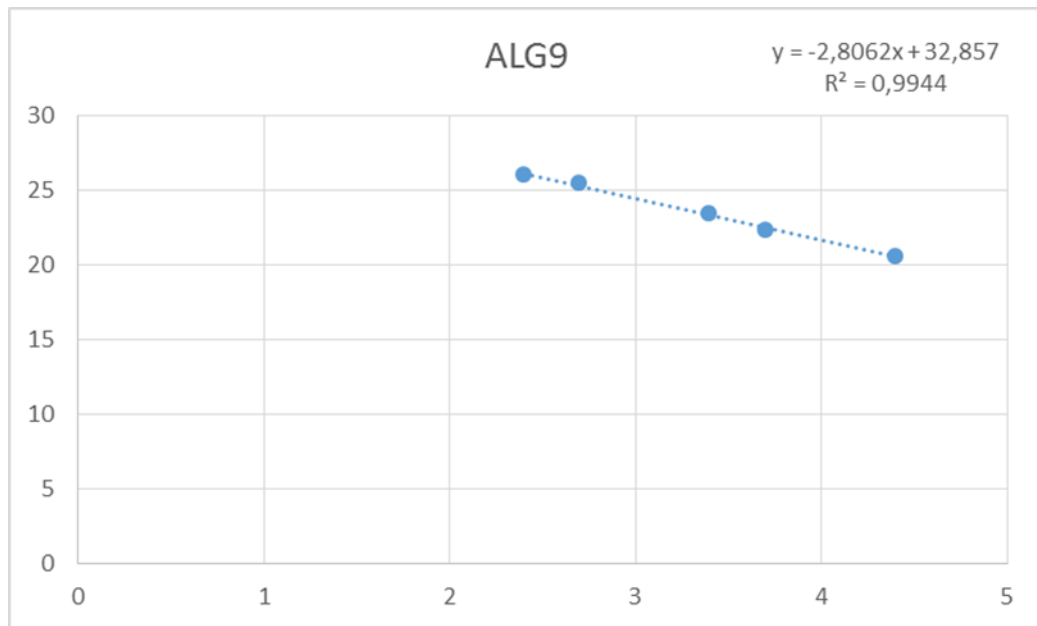
Εικόνα 1.2 : Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από την απομόνωση DNases, όπου παρουσιάζονται ενδεικτικά τα δείγματα που ήταν υπό εξέταση.

3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που από προγενέστερες μελέτες έχει δείχθει ότι μεταβάλλεται η έκφραση τους παρουσία αιθανόλης και ότι είναι κρίσιμα για την ορθή λειτουργία των κυττάρων, έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-Time (RT)PCR)).

3.5.1 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ

Επειδή για κάθε προς μελέτη γονίδιο ενδέχεται τα χαρακτηριστικά της αντίδρασης να διαφέρουν (π.χ. αποτελεσματικότητα), για αυτό το λόγο δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες για κάθε ένα γονίδιο. Στο παρακάτω σχήμα ενδεικτικά εμφανίζεται η πρότυπη καμπύλη του γονιδίου αναφοράς ALG9. (Σχήμα 1.5)



Σχήμα 1.5 : Πρότυπη καμπύλη του γονιδίου ALG9.

3.5.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ REAL-TIME PCR.

Εφόσον από τις πρότυπες καμπύλες για το κάθε ένα γονίδιο, υπολογιστεί η συγκέντρωση του RNA που αντιστοιχεί στις τιμές CT που προσδιορίζει ο θερμικός κυκλοποιητής της RealTime PCR, προκειμένου τα αποτελέσματα που αφορούν το ίδιο γονίδιο να είναι συγκρίσιμα μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών ζύμης, απαιτείται η εξομάλυνση τους με ένα γονίδιο αναφοράς του οποίου η έκφραση θεωρείται ότι είναι σταθερή σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη. Έτσι λοιπόν οι προσδιορισθείσες για κάθε ένα γονίδιο συγκεντρώσεις RNA διαιρούνται με αυτές του γονιδίου αναφοράς ALG9. Στη συνέχεια, οι λόγοι που προκύπτουν για κάθε ένα γονίδιο επεξεργάζονται στατιστικά προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών.

3.5.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.

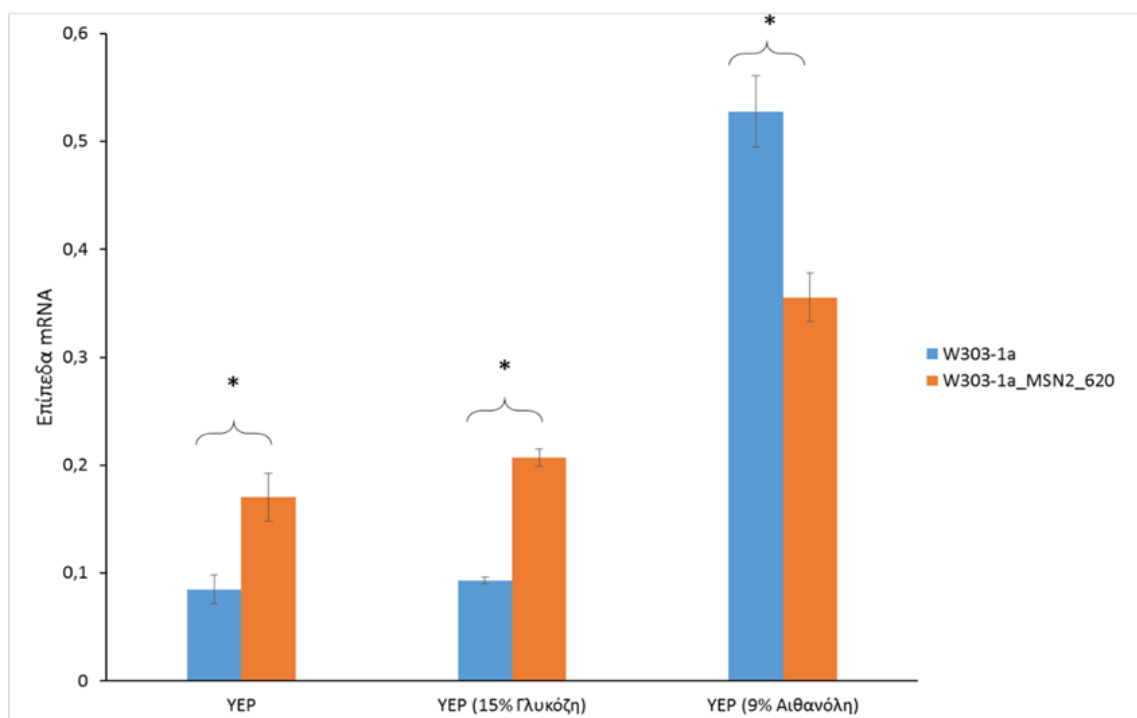
Οι συνθήκες οι οποίες εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η έκθεση των κυττάρων (γενετικά τροποποιημένου W303-1a_MSN2_620 και

αγρίου τύπου W303-1a) σε 15%w/v γλυκόζη και 9%v/v αιθανόλη για χρόνους έκθεσης 15min και 16h. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται για κάθε χρόνο έκθεσης χωριστά, υπό μορφή ραβδογράμματος με σημειωμένες και τις τυπικές αποκλίσεις. Όσα ζεύγη η στατιστική επεξεργασία (t-test) υπέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$), σημειώνονται με αστερίσκο (*).

3.5.3.1 Γονίδιο ELO1

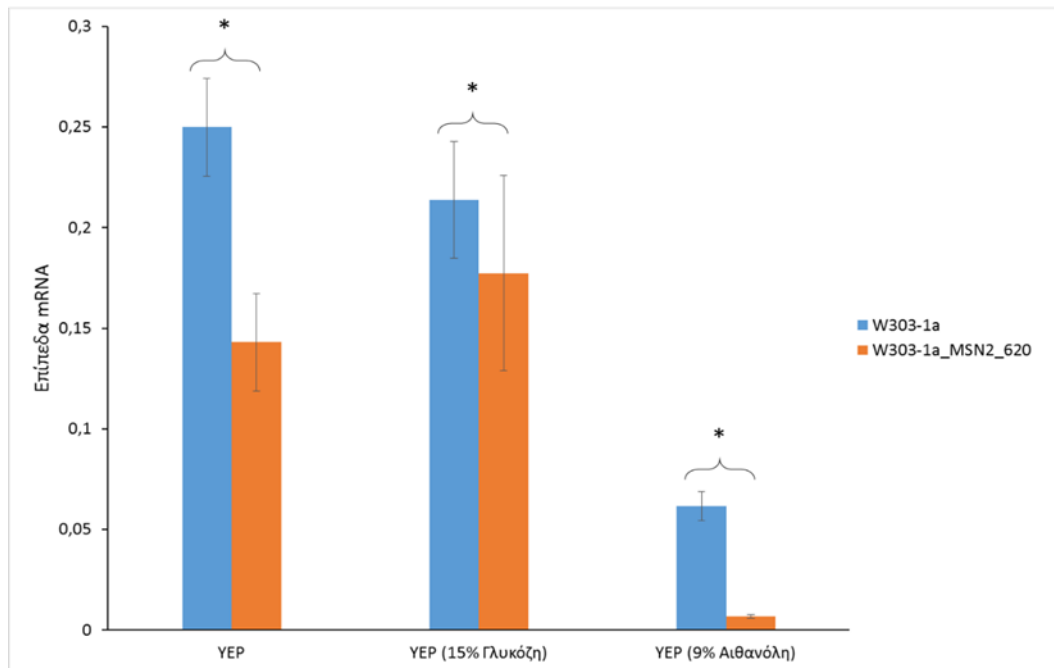
Η πρωτεΐνη *elo1* είναι η κύρια πρωτεΐνη του μηχανισμού επιμήκυνσης μέσου μήκους αλυσίδας λιπαρών οξέων. Δεσμεύει λιπαρά οξέα με μέγεθος αλειφατικής αλυσίδας μέσου μήκους (12-16 άτομα άνθρακα) με τη μορφή των άκυλο-CoA, κατά την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, και με την προσθήκη μηλόνυλο-CoA τα μετατρέπει σε λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (14-18 άτομα άνθρακα).

Παρατηρείται ότι η έκθεση των κυττάρων ζύμης που φέρουν τη μετάλλαξη Ser620Ala επί της πρωτεΐνης *msn2* στην αιθανόλη για χρονικό διάστημα 15min έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου ELO1 άρα και πιθανόν και της πρωτεΐνης *elo1*. Αυτή η αύξηση πιθανόν να συμβάλει στην ανθεκτικότητα των κυττάρων έναντι της αιθανόλης μέσω της διατήρησης της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. (Ma and Liu, 2010) (Σχήμα 1.6)



Σχήμα 1.6 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 15min. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

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.



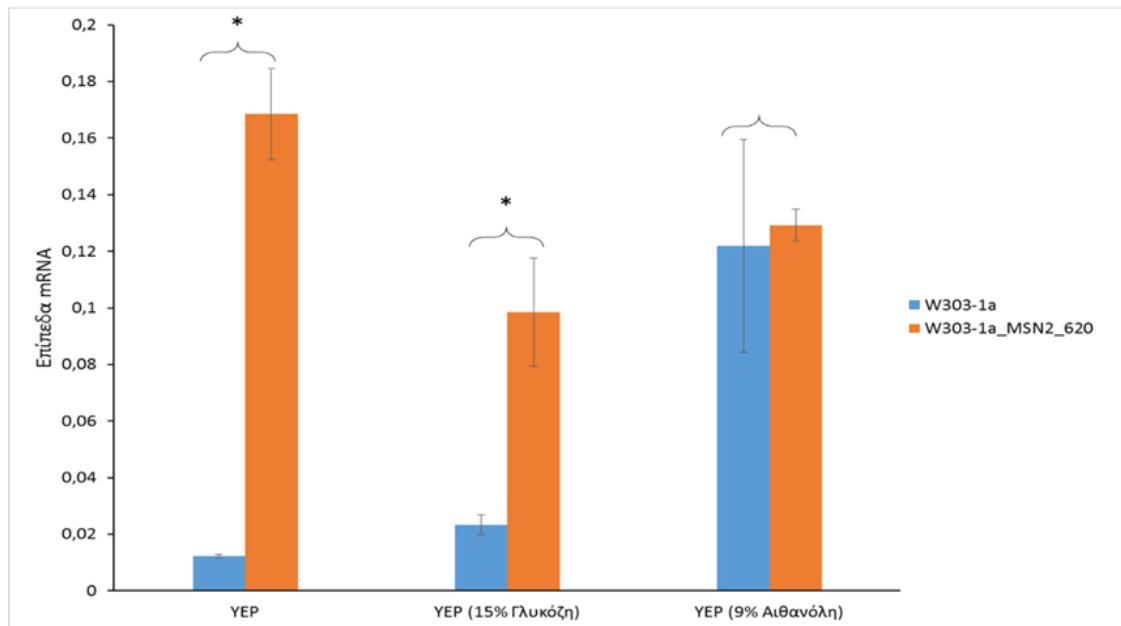
Σχήμα 1.7 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 16h. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

3.5.3.2. Γονίδιο ALD4

Η γλυκόζη μέσω της γλυκόλυσης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και παράγεται ακεταλδεΰδη. Η ακεταλδεΰδη είναι τοξική και από αυτή παράγεται αιθανόλη. Προκειμένου όμως το κύτταρο να απαλλαγεί από την παρουσία της, ακεταλδεΰδη έχει αναπτύξει και άλλους μηχανισμούς απομάκρυνσης της. Ένας από αυτούς, είναι η δράση της αφυδρογονάση αλδεΰδης (ald4), η οποία εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και οξειδώνει την ακεταλδεΰδη 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) (Σχήμα 1.8, 1.9)

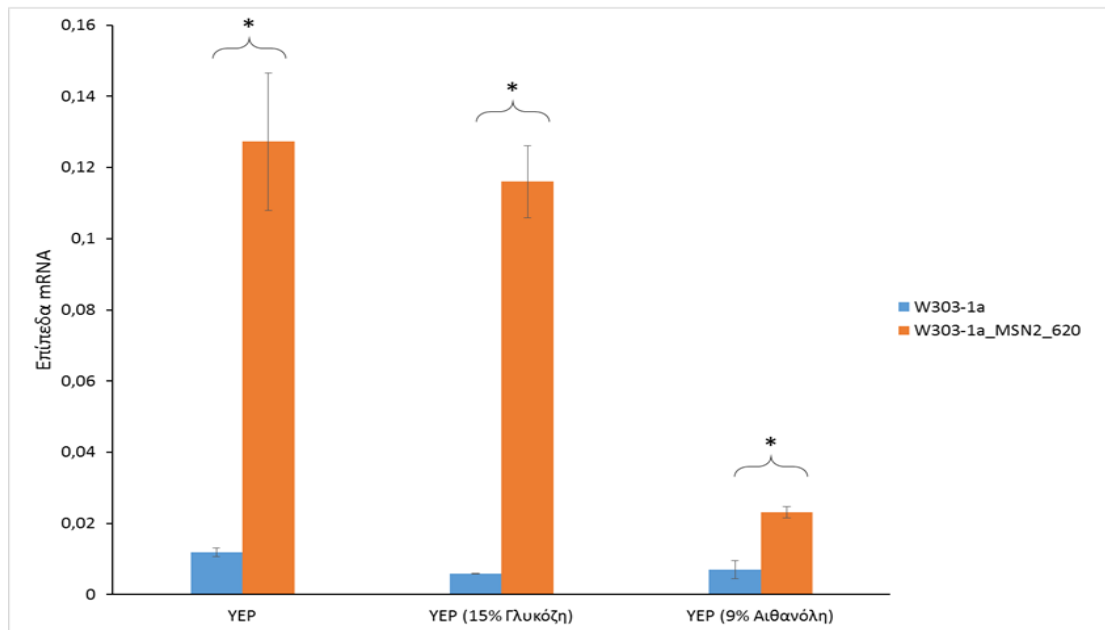
Για μικρό χρόνο έκθεσης (15 min) παρατηρείται ότι το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος εμφανίζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 σε κοινό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης

όπως και σε θρεπτικό μέσο 15% w/v γλυκόζης. Αντιθέτως, η επίδραση της αιθανόλης δεν εμφανίζει κάποια διαφορά. (Σχήμα 1.8)



Σχήμα 1.8 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 15min. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

Η μακροχρόνια έκθεση στους προαναφερθέντες παράγοντες του υπό μελέτη στελέχους παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ALD4 γονιδίου σε όλα τα θρεπτικά υλικά που μελετήθηκαν. (Σχήμα 1.9)



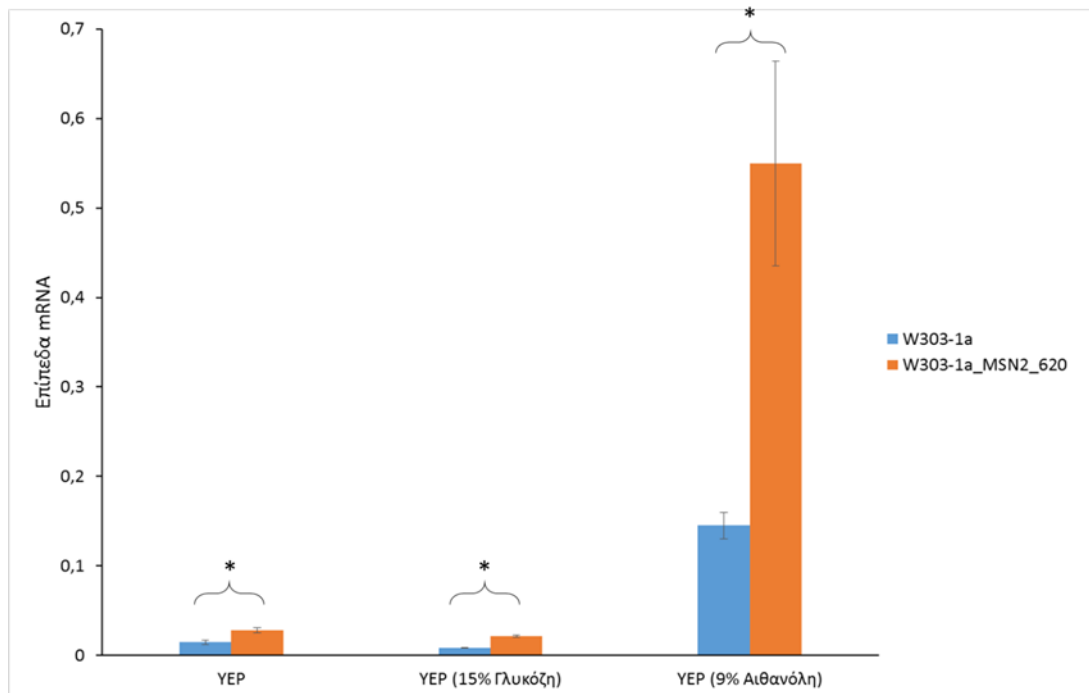
Σχήμα 1.9: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 16h. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

3.5.3.3 Γονίδιο GND2

Η αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού, καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 6-φωσφογλυκονικού προς τη 5- φωσφορική ριβουλόζη με ταυτόχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και ταυτόχρονη αναγωγή του NADP σε NADPH. (Σχήμα 1.10,1.11) (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

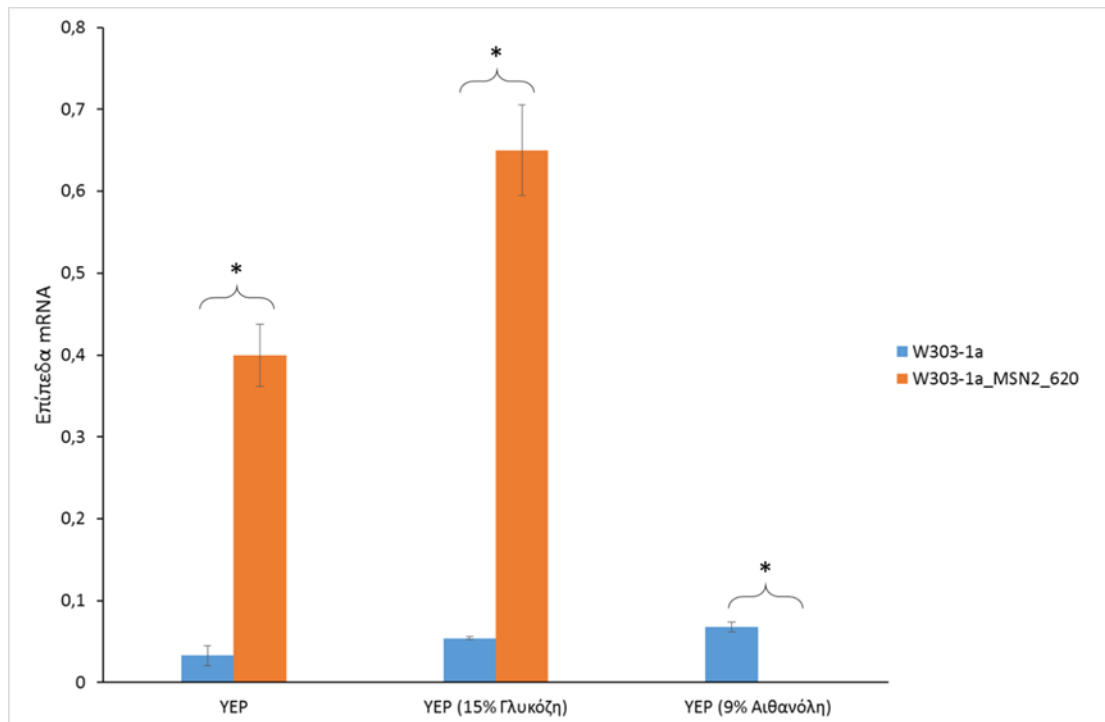
Η παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου προκαλεί στο κύτταρο οξειδωτικό στρες. Το NADPH συμβάλει στην αδρανοποίηση των τοξικών αυτών μορίων εμποδίζοντας την δημιουργία βλαβών επί λειτουργικών μορίων του κυττάρου.

Παρατηρείται ότι το στέλεχος που φέρει τη γενετική τροποποίηση Ser620Ala εμφανίζει στατιστικώς αυξημένα επίπεδα του GND2 γονιδίου εκτιθέμενο για μικρό χρονικό διάστημα σε όλα τα θρεπτικά υλικά που μελετήθηκαν.(Σχήμα 1.10)



Σχήμα 1.10 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GND2 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 15min. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

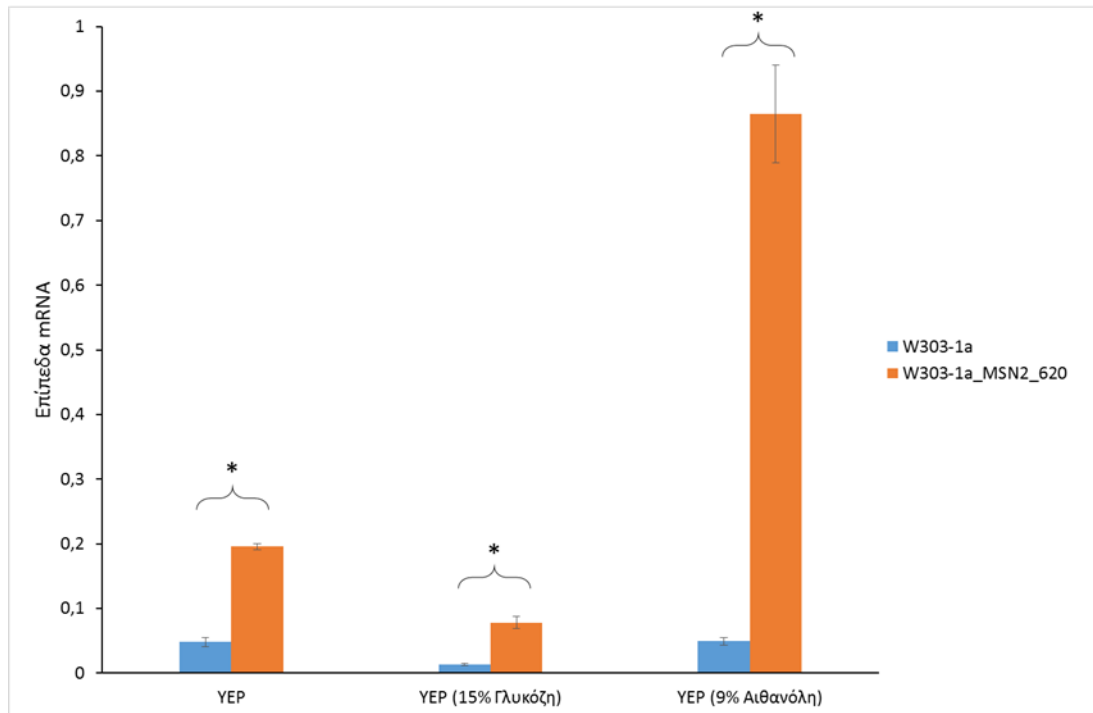
Η έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με πριν, η διαφοροποίηση εμφανίζεται στην παρουσία της αιθανόλης στο θρεπτικό υλικό όπου εμφανίζει στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης. (Σχ. 1.11)



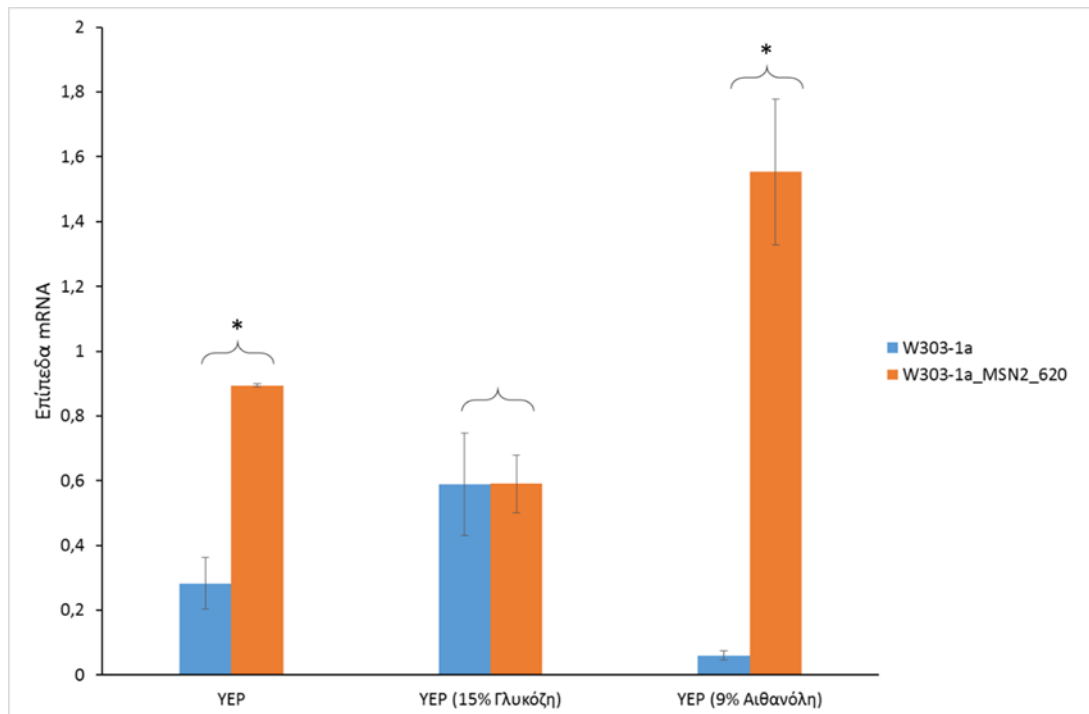
Σχήμα 1.11: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GND2 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 16h. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

3.5.3.4 Γονίδιο 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 σημαντικά στατιστική αύξηση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 τόσο σε στιγμιαία έκθεση όσο και σε μακροχρόνια, για όλα τα θρεπτικά υλικά που μελετήθηκαν εκτός της μακροχρόνιας έκθεσης σε 15% w/v γλυκόζη.(Σχήμα 1.12,1.13)



Σχήμα 1.12 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 15min. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).



Σχήμα 1.13: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 16h. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

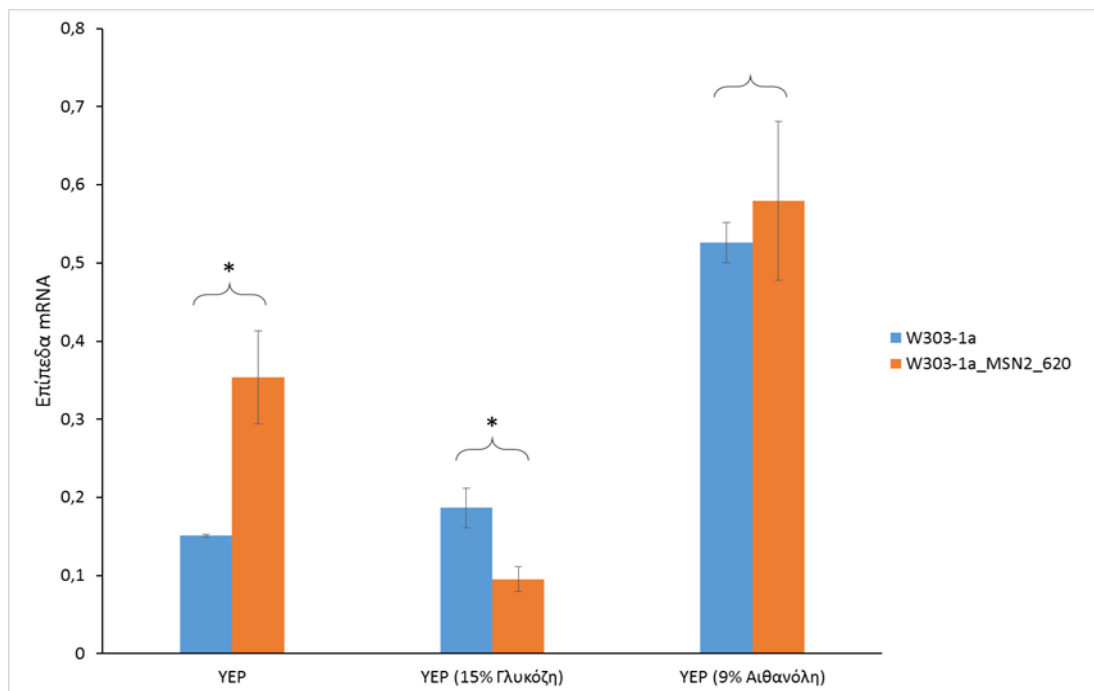
3.5.3.5 Γονίδιο HXK1

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).

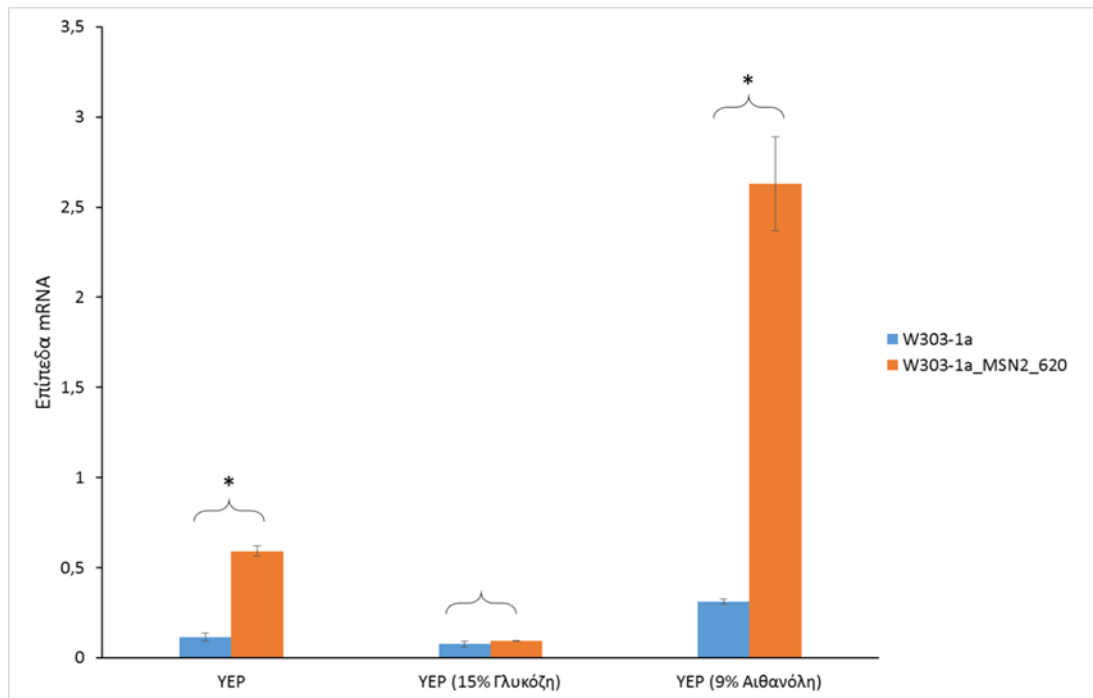
Η δομή της εξοκινάσης αλλάζει σημαντικά όταν δεσμευθεί το υπόστρωμα που είναι η γλυκόζη. Τέλος, η εξοκινάση έχει αλλοστερικό αναστολέα την 6-φωσφο-γλυκόζη που είναι το προϊόν της αντίδρασης. (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009)

Το γονίδιο TDH1 και η εξοκινάση συμμετέχουν στην ίδια πορεία, η οποία είναι η γλυκόλυση και συμβάλλουν στην παραγωγή της αιθανόλης. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι η έκθεση του μεταλλαγμένου μακροχρόνια σε θρεπτικό υλικό με αυξημένο ποσοστό αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα τα

αυξημένα επίπεδα των γονιδίων αυτών γεγονός που υποδηλώνει την καλύτερη λειτουργία της γλυκόλυσης. (Σχήμα 1.14,1.15)



Σχήμα 1.14: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HXK1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 15min. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).



Σχήμα 1.15: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HXK1 σε διάφορα θρεπτικά υλικά με χρόνο έκθεσης σε αυτά 16h. Όποια σημειώνονται με * σημαίνει ότι η παρατηρούμενη διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΕΡΑΣΜΑΤΑ

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 Ser620Ala επί της πρωτεΐνης *msn2* 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 ενδοκυττάριες διεργασίες. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μελετάται είναι τα ακόλουθα: *ELO1*, *HXK1*, *ALD4*, *GND2*, *TDX1*.

Από την καταγραφή των καμπύλων ανάπτυξης φαίνεται ότι η ανάπτυξη των στελεχών σε θρεπτικό υλικό στο οποίο η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι 2%w/v αλλά και 15%w/v δεν εμφανίζεται διαφορά στην ανάπτυξη. Η παρουσία της αιθανόλης στο θρεπτικό υλικό σε περιεκτικότητα 3%v/v και 6%v/v το αγρίου τύπου στέλεχος W303-1a

αναπτύσσεται ταχύτερα εμφανίζοντας μικρότερη περίοδο προσαρμογής από το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος W303-1a_MSN2_620. Η παρουσία αιθανόλης σε περιεκτικότητα 9%v/v παρατηρείται ότι η ανάπτυξη και των δύο στελεχών καθίσταται αδύνατη. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι για τις διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης που έγινε η μελέτη, το μεταλλαγμένο στέλεχος W303-1a_MSN4_532 αναπτύσσεται λιγότερο έναντι του αγρίου τύπου W303-1a.

Προκειμένου να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων στο γενετικά τροποποιημένο στέλεχος, κύτταρα από τα στελέχη w303-1a (αγρίου τύπου) και w303-1a_MSN2_620 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 Time PCR.

Από την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων προκύπτει ότι για τις συγκεντρώσεις YEP 2%w/v, 15%w/v γλυκόζη και YEP 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9%w/v αιθανόλη, για χρόνους επώασης $t=15$ λεπτών και $t=16$ ωρών, τα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων γονιδίων του γενετικά τροποποιημένου στελέχους W303-1a_MSN2_620 εμφανίζουν αύξηση σε σχέση με του αγρίου τύπου W303-1a. Τα αποτελέσματα αυτά και ειδικά αυτά των γονιδίων TDH1 και HXK1 τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στη γλυκολυτική πορεία υποδηλώνουν ότι η συγκεκριμένη γενετική τροποποίηση πιθανόν να επιφέρει καλύτερη λειτουργία της γλυκόλυσης.

Περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας επιβίωσης αλλά και της ικανότητας ζύμωσης θα αποκαλύψουν τελικά την κρισιμότητα του αμινοξέος σερίνης στη θέση 620 της πρωτεΐνης *msn2*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γεωργίου Ν. Θωμοπούλου.(1990). *“Βιολογία κυττάρου”*. Θεσσαλονίκη: University studio press.
- Δημόπουλος Κ. Α. και Αντωνοπούλου Σ. (2009). *“Βασική Βιοχημεία”*. 2^η έκδοσή. Αθήνα.
- Μπατρινού Α. Μ. (2011). *“Σύγχρονη βιοτεχνολογία Τροφίμων/Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα”*. Αθήνα: εκδόσεις Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
- Φραγκούλης Εμμ. Γ. (2012). *“Μαθήματα Βιοχημείας”*. Αθήνα: ιατρικές εκδόσεις Λίτσα.

5.2 Ξένη Βιβλιογραφία

- Bai F.W., Chen L.J., Zhang Z., Anderson W.A., Moo-Young M. (2004). Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J Biotechnol*, 110, pp. 287–293.
- Batrinou A., Spiliotis V. Sakellaris G. (2008). *“Acceptability of genetically modified maize by young people, British Food Journal*.
- 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.
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F. Kunkee R.E.(1996).*“Principles and practices of winemaking”*.

- Demeke T, Jenkins GR. (2010). *“Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Anal Bioanal Chem”*.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., 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.
- Casey G.P., Ingledew W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Crit Rev Microbial*, 13, pp. 219–280.
- D’Amore T., Stewart G.G. (1987). Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb Technol*, 9, pp. 322–330.
- D’Amore T., Panchal C.J., Stewart G.G. (1990). A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit Rev Biotechnol*, 9, pp. 287–304.
- Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman (2011). *“Το κύτταρο: Μια μοριακή προσέγγιση”*. Αλεξανδρούπολη : Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Glazer A.N., Nikaido H. (1995). *“Microbial Biotechnology. Fundamentals Of Applied Microbiology”*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*, 21, pp. 135–144.
- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
- Houghton S. and Cockerill F., (2006). *“RealTime PCR: Overview and applications”*. *Surgery*, Vol 139, No 1, Σελ. 1-5.
- Hunt M., (2006). *“Real Time PCR Tutorial”*. University of South Carolina.

- Jackson R.S. (1994). *“Wine Science. Principles and applications”*. Academic Press.
- 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
- Livak K. J. and Schmittgen T. D., (2001). *“Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDC T Method”*. Elsevier, Methods, USA.
- 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.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2005). *“Brock: Βιολογία των Μικροοργανισμών”*, 10η έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης , Ηράκλειο: 2011.
- 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.
- Marie-Ange Teste, Manon Duquenne, Jean M François and Jean-Luc Parrou. (2009). *“Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in Saccharomyces cerevisiae”*. *BMC Molecular Biology*.
- 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.

- Menggen Ma and Lewis Z Lui., (2010). “*Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae*”. BMC Microbiology.
- Millar D.G., Griffiths-Smith K., Algar E., Scopes R.K. (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechnol Lett, 9, pp.601–606.
- Pascual C., Alonso A., García I., Romay C. (1988). Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng, 32, pp. 374–378.
- Pina C., António J., Hogg T. (2004). Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. Biotechnol Lett, 26, pp. 1521–1527.
- Piper PW (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. FEMS Microbiol Lett 134:121–127.
- Pfaffl M.W., 2002. “*Chapter 3: A-Z of quantitative PCR*”. Εκδόσεις S.A. Bustin.
- International University Line, La jolla, CA. Σελ 1-23.
- 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.
- 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.

- Stratagene, (2006). *“Introduction to Quantitative PCR”*. Stratagene, La Jolla, CA. Σελ.3-8, 9-11,23-26.
- Walker, G. M.(1998). *“Yeast Physiology and Biotechnology”*. New York: John Wiley and Sons.

5.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. (2003). Διαθέσιμο στη: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690200>. Τελευταία επίσκεψη: 17/05/2016
- Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. (1997). Διαθέσιμο στη: <http://europepmc.org/abstract/MED/9014361>. Τελευταία επίσκεψη: 17/05/2016
- Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. (2006). Διαθέσιμο στη: <http://europepmc.org/abstract/MED/16920781> . Τελευταία επίσκεψη : 17/05/2016.
- ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. (2005). Διαθέσιμο στη: <http://europepmc.org/abstract/MED/15987956>. Τελευταία επίσκεψη : 28/05/2016.
- Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. (1998). Διαθέσιμο στη: <http://europepmc.org/abstract/MED/9851916> . Τελευταία επίσκεψη: 17/05/2016.
- 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. (2004). Διαθέσιμο στη:

<http://europepmc.org/abstract/MED/15256563> . Τελευταία

επίσκεψη: 17/05/2016.

- Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. (1996). Διαθέσιμο στη: <http://europepmc.org/abstract/MED/8702485> . Τελευταία επίσκεψη: 03/06/2016.
- Fatty acid elongation in yeast--biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. (1998). Διαθέσιμο στη: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546663>
Τελευταία επίσκεψη: 19/05/2016.
- Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1Delta(9) to C16:1Delta(11) fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. (2000). Διαθέσιμο στη : <http://europepmc.org/abstract/MED/10850979>
Τελευταία επίσκεψη : 17/05/2016.
- Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-long-chain fatty acid synthesis. (2006). Διαθέσιμο στη : <http://europepmc.org/abstract/MED/12684876> . Τελευταία επίσκεψη : 04/06/2016.
- <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=&sort=score> . Τελευταία επίσκεψη : 06/06/2016.