

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

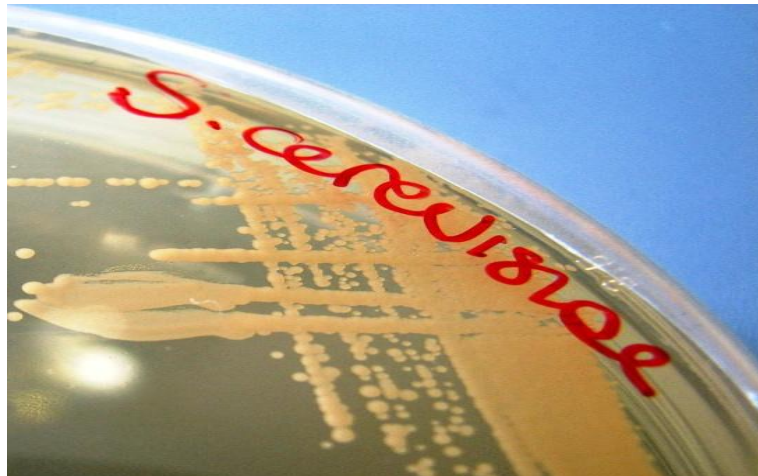
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



<<ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ  
ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Ser633Ala ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Msn2>>

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΛΙΩΣΗ ΣΟΦΙΑ**



ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

<<ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ΠΟΥ  
ΦΕΡΕΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Ser633Ala ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ  
msn2>>

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΛΙΩΣΗ ΣΟΦΙΑ**

**Επιβλέπων καθηγητής:**

**Σωτήριος Σπυρίδων Βαμβακάς**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία έλαβε χώρα στο εργαστήριο Χημείας & Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, του Α.Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέλαβαν στη διεκπεραίωση της με την καθοδήγηση, την στήριξη και την βοήθεια τους.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σωτήρη Βαμβακά για την απεριόριστη καθοδήγηση και βοήθειά του στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην εκτέλεση του πειραματικούμέρους, όσο και στη συγγραφή της. Αλλά και για την στήριξη και κατανόηση που έδειξε σε όλη την διάρκεια της.

Τις ευχαριστίες μου επίσης οφείλω στην συνάδερφο Ελευθερία Λειβαδίτη που δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο και συνέβαλε στην ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς και όλους τους ανθρώπους τον καθένα ξεχωριστά που με στήριξαν, με βοήθησαν αλλά και με ανέχτηκαν στο μέγιστο κατά την διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής μελέτης αλλά και σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1.1 Γενικά για τον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
1.2 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> υπό συνθήκες στρες 9	
1.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) .....	17
1.3.1 Γενικά.....	17
1.3.2 Αρχή της μεθόδου.....	18
1.3.3 RealTimePcr.....	20
1.3.4 Στάδια της Real-Time PCR .....	22
1.3.5 Χρωστική SYBRgreenI.....	24
1.3.6 Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων .....	25
1.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	26
1.4.1 Αρχή Λειτουργίας.....	26
1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό μορίων στην ηλεκτοφόρηση. ....	28
1.4.3 Είδη Ηλεκτοφόρησης.....	29
1.4.4 Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ζυμομύκητα .....	29
2 ΣΚΟΠΟΣ.....	31
3 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
3.1 Υλικά .....	32
3.1.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου Yep .....	34
3.2 Πειραματικές Πορείες .....	34
3.2.1 Καλλιέργειες για τις καμπύλες ανάπτυξης.....	34
3.2.2 Λήψη δειγμάτων για απομόνωση RNA. ....	35
3.2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη. ....	35
3.2.4 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
3.2.5 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v .....	37
3.2.6 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων.....	37
3.2.7 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ DNase-I.....	38
3.2.8 RealTimePCR.....	39
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	41

4.1	Απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη.....	41
4.2	Κατεργασία δειγμάτων με Dnase-I.....	42
4.3	Δοκιμασία ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους.....	43
4.3.1	Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.....	43
4.3.2	Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων.....	44
4.4	Μελέτη του μεταλλαγμένου γονιδίου ως προς την έκφραση των γονιδίων με την μέθοδο της real-time(RT) pcr.....	46
4.4.1	Διαδικασία επεξεργασίας υπολογισμών της RealTimePCR. ....	46
4.4.2	Τα υπό μελέτη γονίδια.....	47
4.4.3	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους για χρόνο $t=15\text{min}$ .....	49
4.4.4	Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους για χρόνο $t=16\text{h}$ .....	55
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64
6.1	Ξενόγλωσση.....	64
6.2	Ελληνική βιβλιογραφία.....	69

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή τροφίμων και ποτών. Η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Στις μέρες μας, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αλκοολική ζύμωση που εφαρμόζεται για την παραγωγή βιοαιθανόλης, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας εξαιρετικός παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ άλλων ζυμωτικών μικροοργανισμών και έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Η μελέτη λοιπόν γενετικά τροποποιημένου στελεχών ζύμης θα εμφάνιζαν καλύτερα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, θα ήταν ανθεκτικότερα στην αιθανόλη, καθώς και σε άλλες αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα μπορούσε να αποφέρουν καλύτερα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Η πρωτεΐνη Msn2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ελέγχει την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε καταστάσεις κυτταρικού stress. Η ενεργοποίηση του συμβαίνει μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως ο έλεγχος της εισόδου του στο πυρήνα ελέγχεται και αυτός μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της Msn2 πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα του κυττάρου. Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Msn2 με κατάλληλο λογισμικό αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της Msn2 από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 633.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διερεύνηση της γονιδιακής έκφρασης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί του γονιδίου MSN2 σε συνθήκες stress, όπως η παρουσία αλκοόλης ή γλυκόζης εντός του θρεπτικού μέσου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη ήταν α) η απομόνωση τουριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) από κύτταρα ζύμης 2) η περεταίρω

κατεργασία των δειγμάτων RNA με DNase-I 3) η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με τη μέθοδο της Real-TimePCR.

## ABSTRACT

The yeasts are widely used for food and beverage production. The best known yeast and with the most applications is *Saccharomyces cerevisiae*. The development of biotechnology allows the use of alcoholic fermentation to produce bioethanol using as substrates various sugar sources such as crop plants, food industry waste etc. The ethanol productions of low cost of and high quality are significant challenges in developing a bioeconomy. *Saccharomyces cerevisiae* is an excellent ethanol producer, among other fermentative microorganisms and has the ability to survive in aerobic and anaerobic conditions. The study of a genetically modified yeast strain showing better characteristics during fermentation, resistance to ethanol, and other adverse conditions during fermentation could yield better results during fermentation.

Msn2 protein is a transcription factor that controls the expression of genes that respond to cellular stress. Activation occurs through phosphorylation by various protein kinases. Simultaneously, however, its translocation to the nucleus is controlled through phosphorylation by the complex of the protein kinase A (PKA). Through analysis of the protein sequence of msn2 with motif analysis software it was revealed that a potential phosphorylation site of Msn2 by PKA is the Serine residue at position 633. The purpose of this study was to investigate the gene expression of *Saccharomyces cerevisiae* strain carrying the mutation Ser633Ala on MSN2 gene in stress conditions, such as the presence of alcohol or glucose in medium.

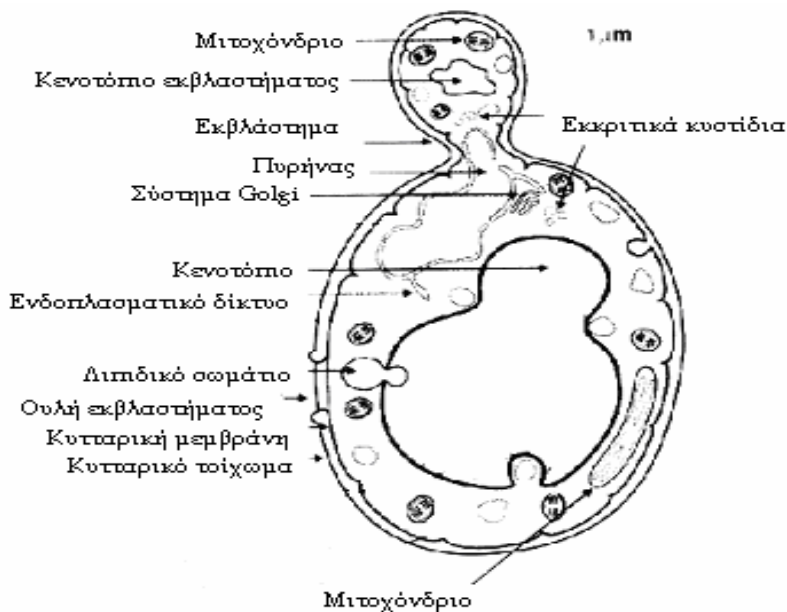
The methods that used in the present study was a) isolation of ribonucleic acid (RNA) from yeast cells 2 ) the further treatment of these samples with DNase-I 3) the study of the expression levels of specific genes using Real-Time PCR.



# 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Γενικά για τον *Saccharomyces cerevisiae*

Η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο και μονοπύρηνο οργανισμό, με κυτταρικό σχήμα γενικά ελλειψοειδές. Ανάλογα με το στέλεχος του, το σχήμα ποικίλει σε σφαιρικό, ωοειδές ή κυλινδρικό. Το μήκος του κυττάρου ποικίλει από 5-10  $\mu\text{m}$  και το πλάτος από 1-3 έως 1-7  $\mu\text{m}$ . Τα κύτταρα της αποτελούνται από τον κυτταρικό φάκελο, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα οργανίδια. (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1- Σχηματική απεικόνιση του *Saccharomyces cerevisiae*.

Ο κυτταρικός φάκελος περιβάλλει και περικλείει τα κυτταρικά στοιχεία και αποτελείται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου από την πλασματική μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο, το κυτταρικό τοίχωμα, την κάψουλα και άλλες εξωκυτταρικές δομές. Ο κυτταρικός φάκελος καταλαμβάνει

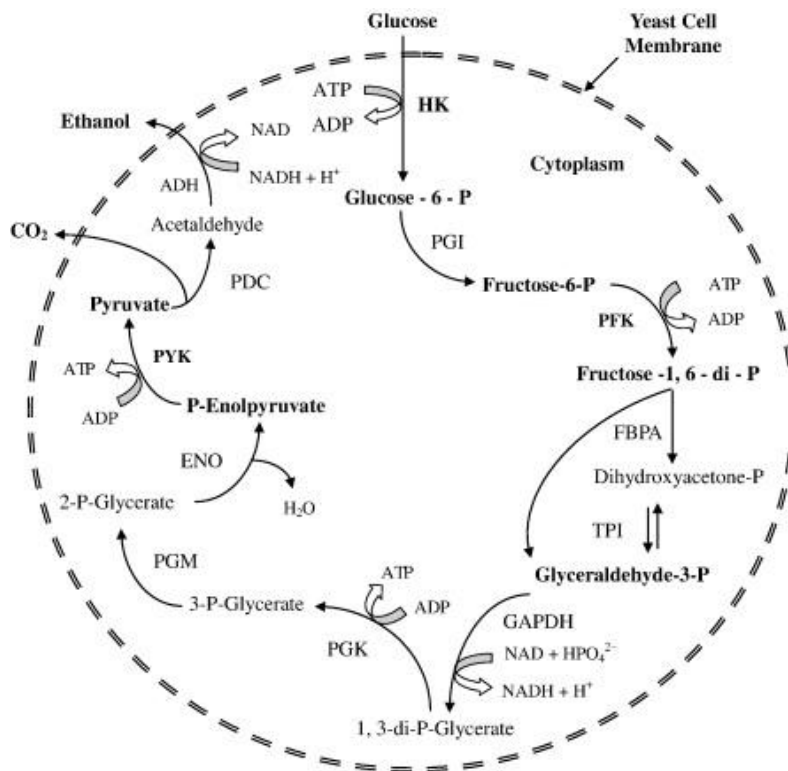
περίπου το 15% του συνολικού όγκου του κυττάρου και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της όσμωσης και της διαπερατότητας του κυττάρου (Walker, 1998).

## **1.2 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του *Saccharomyces cerevisiae* υπό συνθήκες στρες**

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται καθημερινά και σε μεγάλο εύρος στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Η αλκοολική ζύμωση είναι γνωστή και εφαρμόζεται από την αρχαία Ελλάδα ως σήμερα για την παραγωγή οίνου. Για τον λόγο αυτό, επιτελούνται σημαντικές έρευνες για την βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων, είτε με την τροποποίηση των συνθηκών, είτε με τη γενετική βελτίωση των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. 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., κάνοντας εμφανές το ενδιαφέρον για την αιθανόλη, ως βιώσιμο και καθαρό καύσιμο για τις μεταφορές, όπως επίσης και για την οικονομική παραγωγή αιθανόλης, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη πηγές κυτταρίνης, όπου τον τελευταίο καιρό έχει γίνει κομβικό σημείο σημαντικής έρευνας, αλλά και προσπάθεια ανάπτυξης της σε παγκόσμιο επίπεδο (Outlawetal., 2005; Sanchez και Cardona, 2008; Walletal., 2008; Vertesetal.,2010).

Η παραγωγή αιθανόλης χαμηλού κόστους και υψηλής ποιότητας είναι σημαντικές προκλήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη μιας βιοοικονομίας. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας θαυμάσιος παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ των πολυάριθμων ζυμωτικών μικροοργανισμών (Lin και Tanaka, 2006; Liuetal., 2008), ο οποίος συχνά καλείται ως ζύμη αρτοποιίας ή ως εκβλαστανούσα ζύμη, λόγω του τρόπου με το οποίο αναπαράγεται, όπου είναι η εκβλάστηση και ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει σάκχαρα όπως η γλυκόζη, είτε εξ' ολοκλήρου σε CO<sub>2</sub> και νερό, παρουσία οξυγόνου (αεροβίωση), είτε σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub>, απουσία οξυγόνου (αναεροβίωση). 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. Στη συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ υπό αναερόβιες συνθήκες αποκαρβοξυλιώνεται ενζυμικά από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού και μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη και ακολούθως ανάγεται σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Σχ. 1.2).



Εικόνα 1.2-Μια επισκόπηση της γλυκόλυσης. Ένα μόριο γλυκόζης οξειδώνεται προς δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί στη συνέχεια να αποκαρβοξυλιωθεί και να σχηματίσει ακεταλδεΐδη, η οποία μπορεί να δράσει ως τερματικός δέκτης ηλεκτρονίων υπό αναερόβιες συνθήκες στον *S. cerevisiae* για την παραγωγή αιθανόλης (Baletal., 2008).

Όλα τα κύτταρα, έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε ακραίες αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών, ικανών να απειλήσουν τη βιωσιμότητά

τους. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των κυττάρων περιλαμβάνουν αισθητήρες και μονοπάτια μεταγωγής σημάτων από το περιβάλλον, που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στα προγράμματα της γονιδιακής έκφρασης. Η επαγωγή ή η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, κάτω από συνθήκες stress επιτρέπει τη γρήγορη προσαρμογή σε διαφορετικές συνθήκες, με αποτέλεσμα την αύξηση της “φυσικής κατάστασης” των κυττάρων και την επιβίωσή τους (Gasch et al., 2000). Στη ζύμη, έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες (TFs), που προωθούν τη μεταγραφή των εκατοντάδων διαφορετικών γονιδίων σε απόκριση, σε ποικίλες συνθήκες stress (Estruch, 2000). Ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες προωθούν την μεταγραφή συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων, επιτρέποντας έτσι την προσαρμογή σε συγκεκριμένες καταπονήσεις. Άλλοι προωθούν την μεταγραφή πολλών γονιδίων σε απόκριση σε μία ευρεία ποικιλία περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Estruch, 2000).

Όταν ο *S. cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφ’ ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ’ ετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης, δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η ρύθμιση της δραστηριότητας του μονοπατιού της cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) /PKA (πρωτεϊνική κινάση A) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού κυττάρων ζύμης, που συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα. Στον *S. cerevisiae*, σε απάντηση σε μια ραγδαία ζυμώσιμη πηγή άνθρακα όπως είναι η γλυκόζη, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Cyp1 (αδενυλική κυκλάση), η οποία οδηγεί σε μια παροδική αύξηση των επιπέδων της cAMP. Η PKA είναι ετεροτετραμερές, που αποτελείται από δύο καταλυτικές και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Οι καταλυτικές, κωδικοποιούνται από τρία γονίδια (TPK1, TPK2 και TPK3), ενώ οι ρυθμιστικές κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο (BCY1). Η cAMP δεσμεύει τις ρυθμιστικές υπομονάδες, απελευθερώνοντας τις καταλυτικές έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η αποκατάσταση των επιπέδων της cAMP, ελέγχεται από τις φωσφοδιεστεράσες χαμηλής και υψηλής συγγένειας,

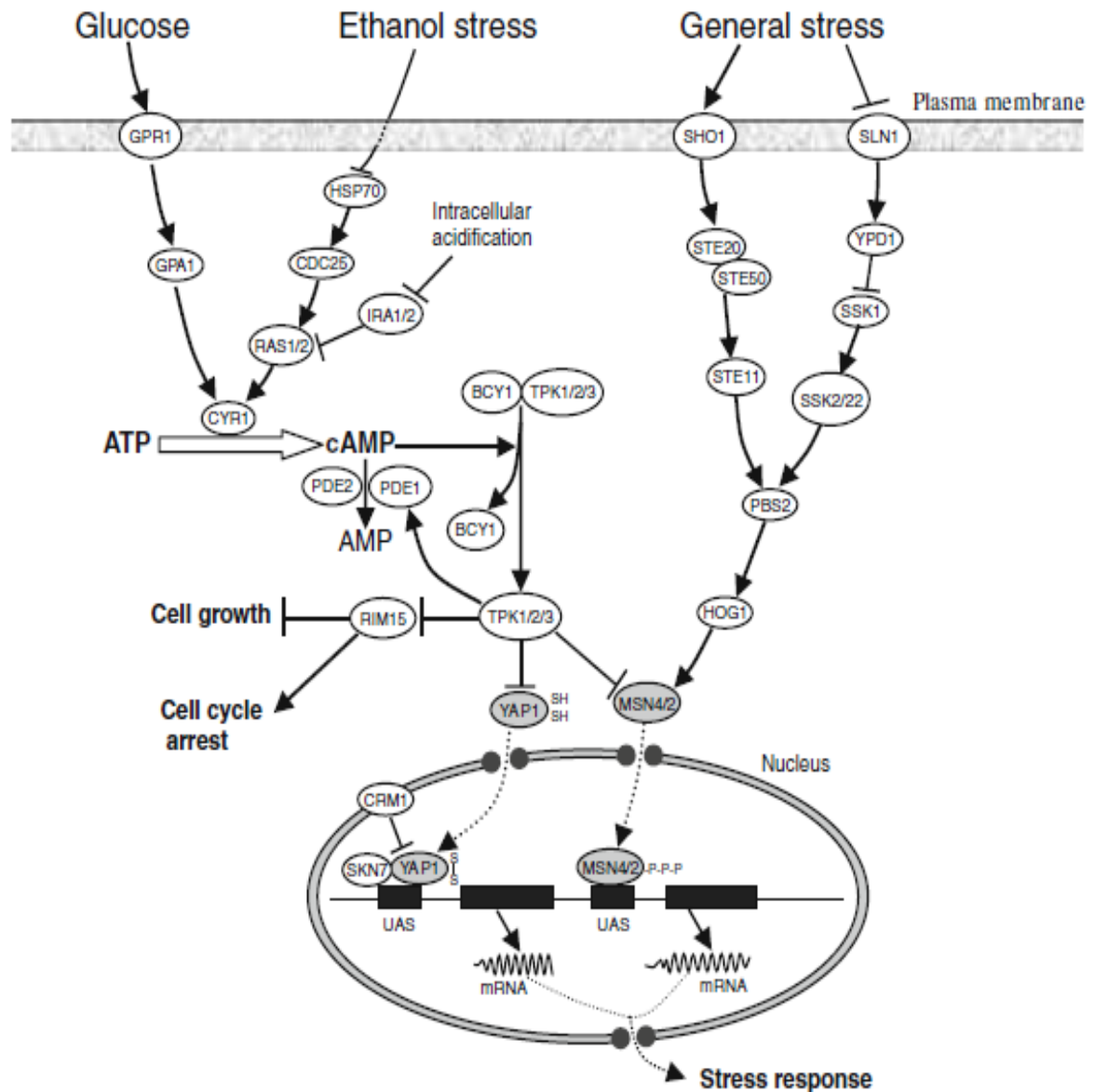
που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PDE1 και PDE2 αντίστοιχα, οι οποίες υδρολύουν την cAMP σε AMP. Διαδοχικά, η PKA, επηρεάζει μέσω φωσφορυλιώσεων διαφορετικούς στόχους συχνά στο επίπεδο της μεταγραφής γονιδίων, όπως τη διέγερση της κυτταρικής ανάπτυξης και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή 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 περιλαμβάνει, την Gpr1 (ένας υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες) και την Gα πρωτεΐνη του Gpa2. 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 ενδοκυττάρους στόχους της PKA (Σχ. 1.2). Δύο από αυτούς είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2 και Msn4, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των λεγόμενων STRE (στοιχείο απόκρισης στο stress) ελεγχόμενων γονιδίων (Estruch και Carlson, 1993; Martinez-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 αυτών. 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 και Msn4, βρίσκονται στην καρδιά ενός πρωτεϊνικού δικτύου που

περιλαμβάνει πολλές φυσικές και γενετικές αλληλεπιδράσεις με διάφορες κινάσες, φωσφατάσες, μεταφορείς και αναδιαμορφωτές χρωματίνης.



Εικόνα 1.3: 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).

Οι Msn2/Msn4 ενεργοποιούνται μετά την έκθεση της ζύμης σε μια ευρεία ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η παρουσία αζώτου ή έλλειψη άνθρακα, η ωσμωτική πίεση, παράγοντες που προσβάλουν το DNA δημιουργώντας κάποια μεταλλαγή σε μια βάση του, η αιθανόλη και η θερμική καταπόνηση (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001). Διαφορετικοί κυτταρικοί αισθητήρες παρακολουθούν τον εξωκυττάριο χώρο, όπως επίσης και το ενδοκυτταρικό περιβάλλον του ζυμομύκητα, που οδηγεί στην εξαρτώμενη από το stress ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των Msn2 και Msn4. Η δραστηριότητα των Msn2/4 προστατεύει τα κύτταρα ζύμης από τις δυσμενείς επιπτώσεις των ακραίων συνθηκών stress (Martinez-Pastor et al., 1996). Στο παρελθόν, έχει αποδειχθεί ότι κατά την διπλή διαγραφή των Msn2 και Msn4, η επιβίωση της ζύμης μειώνεται αρκετά, μετά από την έκθεση της σε διάφορες συνθήκες stress (Martinez-Pastor et al., 1996; Hasan et al., 2002; Kandrор et al., 2004).

Τα STRE-ρυθμιζόμενα γονίδια εμπλέκονται σε σημαντικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και της ρύθμισης της ανάπτυξης, καθώς και στην προσαρμογή σε διάφορα είδη stress, όπως η θερμότητα, η βλάβη του DNA, και οι οξειδωτικές και ωσμωτικές πιέσεις (Mai και Breeden, 1997; Moskvina et al., 1998; Smith et al., 1998; Gasch et al., 2000). Κάτω από συνθήκες που προάγουν την ανάπτυξη (Ανάπτυξη σε γλυκόζη με απουσία stress), οι Msn2 και Msn4 φωσφορυλιώνονται από την PKA σε συγκεκριμένες θέσεις, και διαμένουν στο κυτταρόπλασμα. Στην εξάντληση της γλυκόζης ή άλλων συνθηκών stress (Gorner et al., 1998), αποφωσφορυλιώνονται τα συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων που είχαν φωσφορυλιωθεί από την PKA και ταυτόχρονα φωσφορυλιώνονται σε διαφορετικές θέσεις από άλλες φωσφοκινάσες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπισή τους στον πυρήνα, όπου επάγουν την έκφραση των STRE-ελεγχόμενων γονιδίων. Όπως γίνεται αντιληπτό, η PKA παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο παρεμποδίζοντας την μετανάστευση των Msn2/Msn4 στον πυρήνα, είτε μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης στην περιοχή των σημάτων πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)) (Gorner et al., 1998; Garreau et al., 2000; Gorner et al., 2002), είτε έμμεσα μέσω των πρωτεϊνικών κινασών YAP1 και Rim15. Συνεπώς, η δράση του μονοπατιού cAMP/PKA είναι κατασταλτική

έναντι των δραστηριοτήτων των Msn2/Msn4 (Boy-Marcotte et al., 1998; Görner et al., 1998; Smith et al., 1998; Lee et al., 2008).

Μελέτες έδειξαν την σύνδεση μεταξύ της PKA και της δραστικότητας της Msn2 καταλήγοντας στο συμπέρασμα, ότι η κατάργηση της δραστικότητας της PKA έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της Msn2 στον πυρήνα και την αυξημένη δραστικότητα της (Görner et al., 1998; Smith et al., 1998). Παρ' όλα αυτά, λίγα είναι γνωστά για τους ρόλους των ειδικών ισόμορφων TRK στη ρύθμιση της δραστικότητας της Msn2. Έχει δειχθεί ότι τα στελέχη με ανεπάρκεια και στις τρεις ισομορφές της TRK είναι μη βιώσιμα, ενώ στελέχη που περιέχουν μια οποιαδήποτε ισομορφή είναι βιώσιμα (Broach και Deschenes, 1990). Οι Trk1 και Trk3 είναι οι κυρίαρχες υπομονάδες που οδηγούν σε καταστολή της δραστικότητας της Msn2. Σε αντίθεση, η Trk2 φαίνεται να δρα ως ασθενής ενεργοποιητής της Msn2 (Sadehetal., 2011). Υπάρχουν παράλληλες πορείες για τον έλεγχο της δραστικότητας της Msn2 και μια λεπτή ισορροπία στα διαφορετικά πρότυπα φωσφορυλίωσης των Msn2/Msn4 επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητά τους. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, είχε δειχθεί ότι η Msn2 υπερφωσφορυλιώνεται μετά από έκθεση σε διαφορετικές συνθήκες στρες σε διαφορετικές θέσεις από αυτές που ελέγχει η PKA και ότι μια τέτοια υπερφωσφορυλίωση είναι εξαρτώμενη από το stress (Garreau et al., 2000).

Ο *S. cerevisiae* αναπτύσσεται πολύ καλύτερα σε όξινο παρά ουδέτερο ή αλκαλικό pH κατά συνέπεια, ακόμη και μια μέτρια αύξηση του pH σε αλκαλικές τιμές του θρεπτικού μέσου αντιπροσωπεύει μια κατάσταση stress που είναι σε θέση να προκαλέσει μια αντισταθμιστική πολυπαραγοντική απόκριση (Arino, 2010). Το stress που προκαλείται από το αλκαλικό pH ενεργοποιεί ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των Rim101/NRG1 (Lambetal., 2001; Lambetal., 2003), του δικτύου ασβεστίου/calcineurin (Serranoetal., 2002; Viladevalletal., 2004; Ruizetal., 2008) και των Wsc1/Pkc1/Slt2, MAPK (πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο) (Serranoetal., 2006). Το stress από αλκαλικό pH έχει επίσης βαθιά επίδραση στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία πρόσληψης γλυκόζης από το κύτταρο. Η έκθεση λοιπόν σε υψηλό pH, μιμείται μια κατάσταση έλλειψης γλυκόζης



(Viladevalletal.,2004; Ruizetal.,2008). Λαμβάνοντας υπόψη τον ισχυρό δεσμό μεταξύ του μεταβολισμού των υδατανθράκων και του μονοπατιού της PKA, το αλκαλικό stress μπορεί να επιφέρει αλλαγές στη δραστηριότητα αυτού του μονοπατιού και συγκεκριμένα, η σωστή προσαρμογή του υψηλού pH θα μπορούσε να επιφέρει μια παροδική μείωση στα επίπεδα της cAMP και αυτή η αλλαγή μεταβάλλει την ανοχή της PKA για αλκαλικό pH. Αυτή η προσαρμοστική απόκριση σε υψηλό pH εμπλέκει τους PKA-ρυθμιζόμενους-Msn2/Msn4 μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι στη συνέχεια μεταβάλλουν την γονιδιακή έκφραση (Casadoetal., 2011).

Αν και η ζύμη είναι ένα παραδοσιακό μικρόβιο παραγωγής αιθανόλης, εμφανίζει επίσης ευαισθησία σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, ειδικά για υψηλής ή πολύ υψηλής βαρύτητας συνθήκες ζύμωσης. Συσσώρευση αιθανόλης σε ένα θρεπτικό μέσο αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα, επηρεάζει διαφορετικά μεταφορικά συστήματα, και μειώνει την παραγωγή αιθανόλης (Casey και Ingledew, 1986; D'Amore και Stewart, 1987; D'Amoreetal., 1990; Baietal., 2004; Pinaetal., 2004). Τα υψηλά επίπεδα αιθανόλης επηρεάζουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλούν βλάβη διαπερατότητας σε πολλά ιοντικά είδη, μειώνουν την ρευστότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που οδηγεί στην απαγωγή του διαμεμβρανικού ηλεκτροχημικού δυναμικού. (Van Uden, 1985; Salgueiro et al., 1988; Rosa και Sá-Correia 1996; Teixeira et al., 2009). Σε υψηλές συγκεντρώσεις, έχει επίσηςδειχθεί ότι η αιθανόλη διαταράσσει την μεταφραστική μηχανή των κυττάρων, τα ριβοσώματα, προκαλώντας την μετουσίωσή τους και κατά συνέπεια την δυσλειτουργία τους (Millar et al., 1982; Pascual et al., 1988).

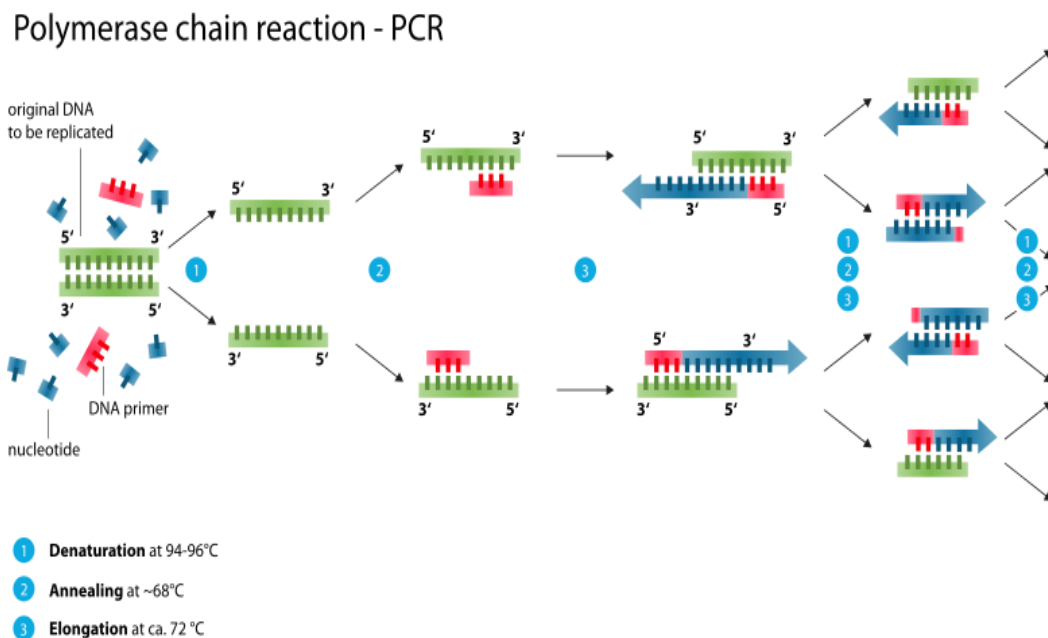
Επομένως, η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του ζυμομύκητα αποτελεί ένα παράγοντα κυτταρικού στρες. Το αξιοσημείωτο είναι ότι η ενδοκυττάρια σηματοδότηση της αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και τελικά της PKA μέσω των Ras1/2 πρωτεϊνών. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό,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

Msn2 και Msn4 από την PKA. Λόγω του σημαντικού ρόλου της PKA στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση θα ήταν ανούσια η οποιαδήποτε τροποποίησή της.

### 1.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

#### 1.3.1 Γενικά

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

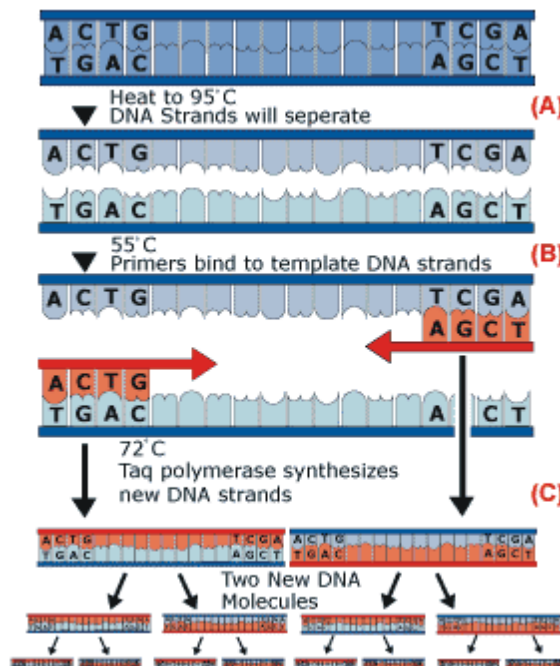


Εικόνα 1.4: Απεικόνιση σταδίων PCR

### 1.3.2 Αρχή της μεθόδου

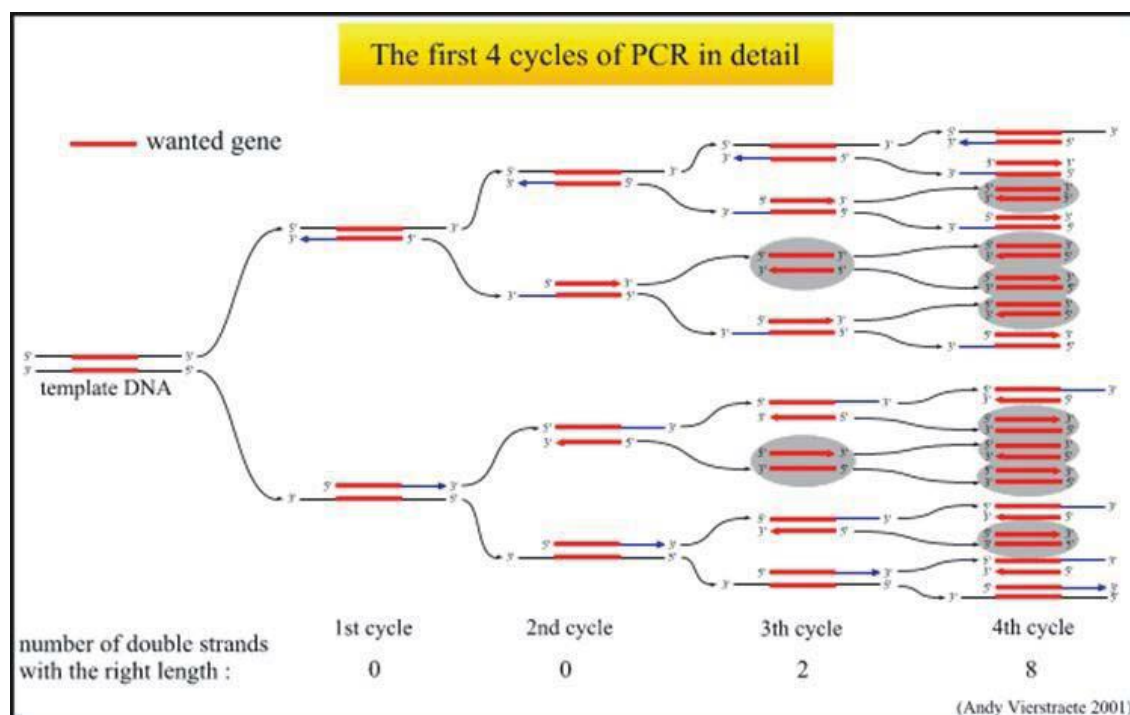
Στην PCR χρησιμοποιούνται θερμικά ανθεκτικές DNA πολυμεράσες, νουκλεοτίδια και ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) σε συνδυασμό και με άλλα αντιδραστήρια τα οποία είναι απαραίτητα για την αντίδραση, για να κατευθύνει το θερμικό πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου, μέσω επανειλημμένων γύρων αποδιάταξης,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

1. Το στάδιο της αποδιάταξης όπου το υπόστρωμα του DNA-στόχου επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 95°C), με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA (σχήμα 1.5. A).
2. Το στάδιο κατά το οποίο, με τη μείωση της θερμοκρασίας, οι εκκινητές της αντίδρασης υβριδοποιούνται με τη συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος (μονή έλικα του DNA-στόχου) (σχήμα 1.5. B).
3. Το στάδιο της επιμήκυνσης του DNA όπου σε θερμοκρασία (72-74°C), το τμήμα του DNA μεταξύ εκκινητών συντίθεται με βάση τη συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος, από την Taq πολυμεράση (σχήμα 1.5.Γ).



Εικόνα 1.5: Βασική αρχή PCR

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



Εικόνα 1.6: Οι 4 πρώτοι κύκλοι μιας PCR

Έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στην ιδέα της συμβατικής PCR και αποτελούν παραλλαγές της αρχικής μεθόδου, όπως είναι η HotStart PCR, η MultiplexPCR, η ReversetranscriptasePCR (RT-PCR) και η μέθοδος της RealTimePCR.



Εικόνα 1.7: Thermal Cycler (Θερμοκυκλοποιητής) συμβατικής PCR

### 1.3.3 RealTimePcr

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



Εικόνα 1.8: Μηχάνημα Real Time PCR

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

Η μέθοδος της RealTimePCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία - στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης

της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο της. Η λειτουργία της τεχνολογίας RealTimePCR βασίζεται στη χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως ( $\lambda$ ), όπως η SybrGreen καθώς και ιχνηθέτων (probes) αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές RealTimePCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές της Real Time PCR βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης. (Κουσίδης, 2013)

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

Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), η οποία επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. (Science.gr: RealTimePCR 2012).

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

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

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

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

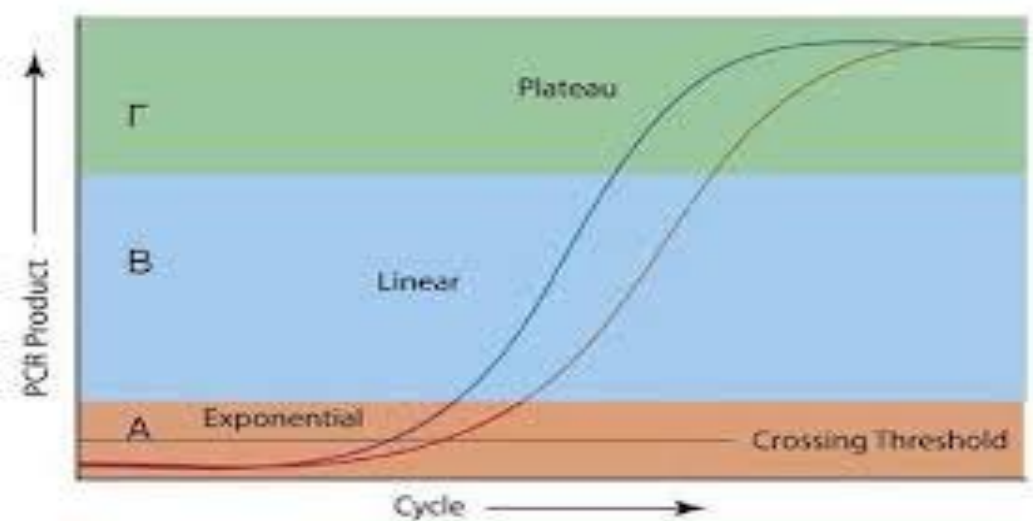
### **1.3.4 Στάδια της Real-Time PCR**

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. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η

καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).



Εικόνα 1.9: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης RealTimePCR



### 1.3.5 Χρωστική SYBRgreen I

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

Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση μη τροποποιημένων εκκινητών, η οποία διευκολύνει τον σχεδιασμό και την σύνθεση τους με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους real-time PCR .

Επιπλέον η SYBR green 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:

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

Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση

μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης. Μεγαλύτερη εξειδίκευση στη Real-Time PCR επιτυγχάνεται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher), οι οποίοι υβριδοποιούνται στο εκμαγείο DNA. Σε συνδυασμό με την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα. Η SYBR green διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm και δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. (Science.gr: RealTimePCR 2012).

### **1.3.6 Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων**

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

Στην άλλη μέθοδο του ενός βήματος ή ενός σωλήνα όπως συχνά ονομάζεται, η αντίστροφη μεταγραφή και η RealTimePCR γίνονται σε ένα σωλήνα, με την αντίστροφη μεταγραφή να προηγείται της RT. Αυτό είναι

εφικτό λόγω ειδικευμένων χημικών αντιδράσεων και πρωτόκολλα κυκλοποίησης. Η γρήγορη διαδικασία επιτρέπει την ταχεία επεξεργασία των πολλαπλών δειγμάτων και είναι εύκολο για την αυτοματοποίηση. Ο μειωμένος αριθμός των βημάτων χειρισμού έχει ως αποτέλεσμα υψηλή αναπαραγωγιμότητα από δείγμα σε δείγμα και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης επειδή απαιτείται λιγότερη χειραγώγηση (Sample and assay technologies Real Time PCR brochure 2009).

## **1.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ**

### **1.4.1 Αρχή Λειτουργίας**

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ιδιαίτερως χρήσιμη αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και το RNA, περιγράφοντας τη μετακίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα παραπάνω μόρια λόγω δυνατότητας ιοντισμού μπορούν σε συγκεκριμένες τιμές pH να κινηθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αντίθετο πόλο. Η ηλεκτροφόρηση έχει πολλές εφαρμογές στη μοριακή βιολογία, βιοχημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κτλ.

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

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

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



1.10: Συσκευή Ηλεκτροφόρησης

#### 1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό μορίων στην ηλεκτροφόρηση.

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

- **pH:** Πολλά μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA είναι αμφολύτες, όπου μια μικρή μεταβολή του pH μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στο συνολικό ηλεκτρικό φορτίο και να επιδράσει στο διαχωρισμό.
- **Θερμοκρασία:** Κατά την ηλεκτροφόρηση, η ροή ρεύματος προκαλεί απελευθέρωση θερμότητας, η οποία προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας. Η αύξηση της θερμοκρασίας αποτελεί μεγάλο κίνδυνο λόγω της μετουσίωσης και της καταστροφής των μορίων που μπορεί να προκαλέσει.
- **Ένταση του ηλεκτρικού πεδίου:** Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος επηρεάζει άμεσα την κινητικότητα των μορίων σε ένα συγκεκριμένο χρόνο. Υπό την επίδραση ισχυρού πεδίου επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός. Τέλος, σε κάθε συσκευή ηλεκτροφόρησης, το μέγιστο δυναμικό που μπορεί να εφαρμοστεί καθορίζεται μέσα σε συγκεκριμένα όρια και η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει με σταθερή τάση ή ένταση ρεύματος.
- **Είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού:** Μερικά ηλεκτροφορητικά υλικά όταν έρθουν σε επαφή με το νερό φορτίζονται αρνητικά, με αποτέλεσμα να έλκουν θετικά φορτισμένα σωματίδια από το διάλυμα και σχηματίζουν μια διπλοστιβάδα όπου τα θετικά σωματίδια είναι ακινητοποιημένα πάνω στο ηλεκτροφορητικό υλικό. Όταν αρχίσει η ηλεκτροφόρηση τα θετικά αυτά σωματίδια κινούνται προς την άνοδο με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η κίνηση των αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων, τα οποία κινούνται και αυτά προς την άνοδο, κάνοντας τα να παραμένουν ακίνητα ή να κινούνται προς την κάθοδο.
- **Μέγεθος και σχήμα του μορίου:** Μόρια μικρότερου μεγέθους μπορούν να μετακινηθούν και να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση από το αρχικό

σημείο, ενώ τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους και σχήματος διανύουν μικρότερες αποστάσεις.

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

#### 1.4.3 Είδη Ηλεκτροφόρησης

Τα κυριότερα είδη ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα:

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

#### 1.4.4 Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ζυμομύκητα

Όπως είναι γνωστό η γενετική πληροφορία βρίσκεται αποθηκευμένη στο δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) του κυττάρου. Προκειμένου η πληροφορία αυτή να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο και να παραχθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες, το τμήμα του DNA του κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που πρόκειται να παραχθεί, αρχικά μεταγράφεται και προκύπτει ένα νέο μόριο που καλείται

ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA). Το RNA είναι μια απλή ασταθής έλικα με ισχυρές δευτεροταγείς δομές. Εντός του κυττάρου απαντώνται διαφορετικά είδη RNA τα οποία κατηγοριοποιούνται αναλόγως των λειτουργιών που επιτελούν ή συμμετέχουν (rRNA, tRNA, mRNA, snRNA). Το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA (rRNA)) είναι στην πραγματικότητα αποτελείται από 3-4 διαφορετικά μόρια RNA τα οποία είναι απαραίτητα για την δημιουργία και λειτουργία των ριβοσωμάτων. Το μεταφορικό RNA (transfer RNA (tRNA)), συμμετέχει στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης μεταφέροντας τα αμινοξέα που πρόκειται να ενσωματωθούν στην νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα από τα ριβοσώματα ακολουθώντας πάντα το γενετικό κώδικα και λειτουργώντας χάρη στην αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Το μηνυματοφόρο ή αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA (mRNA)) είναι το μόριο εκείνο που φέρει το γενετικό μήνυμα, η μετάφραση του οποίου από τα ριβοσώματα, θα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της νέας πρωτεΐνης)

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

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

Η πρωτεΐνη Msn2 όπου είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, κατέχει εξέχοντα ρόλο στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress. Η είσοδος της στον πυρήνα είναι ένα σημείο ελέγχου καθοριστικής σημασίας. Ο έλεγχος της εισόδου της Msn2 στον πυρήνα γίνεται μέσω φωσφορυλιώσεων συγκεκριμένων αμινοξέων σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (NuclearLocalizationSignal (NLS)). Η φωσφορυλίωση αυτών των αμινοξέων αναστέλλει την είσοδο της στον πυρήνα. Το αμινοξύ Ser633 είναι πιθανώς ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο της Msn2 στον πυρήνα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της μετάλλαξης Ser633Ala επί του γονιδίου MSN2 ως προς την ικανότητας ανάπτυξης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση της απόκρισής τους σε αντίξοες συνθήκες. Επίσης, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες.



### 3 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια αλλά και τα γονίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον Πίν. 3.1.

**Πίνακας 3.1:** Αντιδραστήρια και γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις Πειραματικές Πορείες.

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

16.	Αιθανόλη 100%	Sigma- Aldrich	24194-2.5L- R
17.	Οξικό Νάτριο		
18.	MgCl <sub>2</sub>		
19.	Ca Cl <sub>2</sub>		
20.	BSA		
21.	KAPA SYBR FAST one-step qRT-PCR Kit Universal	Kapa Biosystem	KK4651

**Πίνακας 3.2:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της real-time qRT-PCR, συνοδευόμενοι από τις αλληλουχίες τους και τα γονίδια τους, με την χρήση της χρωστικής SYBRGreen.

	Εκκινητές (Primers)	Αλληλουχίες εκκινητών	Γονίδιο
1.	Msn2_Elo1_ Reverse	5'GACAGTGTCTGCGAACTCCA3'	<i>ELO1/YJL196C</i>
2.	Msn2_Elo1_F orward	5'GTATCGCCATGGGCTGTATT3'	
3.	Msn2_ALG9_ Reverse	5'CAGCAGGAAAGAACTTGGG3'	<i>ALG9</i>
4.	Msn2_ALG9_ Forward	5'AGTGGCTTTGGTGAACAATTAC 3'	
5.	Msn2_TDH1_ Reverse	5'AAGCCTTGGCAACATATTCG3'	<i>TDH1/YJL05W</i>
6.	Msn2_TDH1_ Forward	5'CTCACGCTTCCATCTTCGAT3'	
7.	Msn2_ALD4_ Reverse	5'GATTTACCACCCAGCTCCAA3'	<i>ALD4/YOR374 W</i>
8.	Msn2_ALD4_ Forward	5'AGGCCATTTACAAACCATCCA3'	

9.	Msn2_HXK1_ Reverse	5'CAACATCAAGCCCTTCTCGT3'	HXK1/YFR053 C
10.	Msn2_HXK1_ Forward	5'TGCTGTGCGACGAACAATCTC3'	
11.	Msn2_GND2 _Reverse	5'CTGACAAACAACGAGCGAAA 3'	GND2/YGR256 W
12.	Msn2_GND2 _Forward	5'GGTAAGCCATTGGTGGAAAA 3'	

### 3.1.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου Yep

**Πίνακας 3.:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Yep.

Yeast extract:	10g
Bacto Peptone:	20g
Glucose:	20 g

Προσθέτω νερό μέχρι το 1 L

Υγρή αποστείρωση

## 3.2 Πειραματικές Πορείες

### 3.2.1 Καλλιέργειες για τις καμπύλες ανάπτυξης

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα ανάπτυξης του υπό εξέταση στελέχους έγιναν καλλιέργειες σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης παρουσία συγκεντρώσεων γλυκόζης 2%w/v (φυσιολογικό θρεπτικό μέσο), 5%w/v, 10%w/v, 12%w/v, και 15%w/v και παρουσία αιθανόλης, 3%v/v, 6%v/v, 9%v/v, και 12%v/v.

Η ικανότητα ανάπτυξης του στελέχους W303-1a\_MSN2\_633, συγκρίνεται με αυτή του αγρίου τύπου στελέχους W303-1a. Η ανάπτυξη των στελεχών μετρείται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η ανάπτυξη των στελεχών για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης έγινε σε πλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων και μέτρηση της ανάπτυξης σε ειδικό μηχάνημα ανάγνωσης των συγκεκριμένων πλακών (ELISAReader), λαμβάνοντας τιμές οπτικής απορρόφησης κάθε 30λέπτα για χρονικό διάστημα περίπου 20 ωρών. Η ανάπτυξη των στελεχών για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης έγινε σε κωνικές φιάλες των 250ml έχοντας τοποθετήσει 50ml από το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο σε τακτά χρονικά διαστήματα.

### **3.2.2 Λήψη δειγμάτων για απομόνωση RNA.**

Ελήφθησαν δείγματα για την απομόνωση RNA από καλλιέργειες των υπό εξέταση στελεχών (W303-1a, W303-1a\_MSN2\_633) που υπεβλήθησαν σε ανάπτυξη εντός θρεπτικού μέσου με συγκεντρώσεις γλυκόζης 2%w/v (φυσιολογικό θρεπτικό μέσο YEP) και 15%w/v για χρονικό διάστημα 0 ωρών και 16 ωρών. Αντίστοιχα δείγματα ελήφθησαν και από καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 6%v/v αιθανόλη. Στις καλλιέργειες παρουσία 6% αιθανόλης, προκειμένου να ληφθεί ικανοποιητική ποσότητα κυττάρων για την περαιτέρω απομόνωση του RNA, τα θρεπτικά μέσα εμβολιάστηκαν με κύτταρα που προέρχονταν από 2ml καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο για τους απαιτούμενους χρόνους ώρες.

### **3.2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη.**

1. Από την καλλιέργεια μεταφέρεται 1.5ml σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10000 rpm για 3min στους 4°C

2. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
3. Αναδιαλύεται το ίζημα των κύτταρων σε 400 μιλιαλύματος. TESH σύνθεση του TES εμφανίζεται παρακάτω :
  - 10mMTris-HClpH: 7.5
  - 10mMEDTA
  - 0.5% w/v
  - RNase-freeH<sub>2</sub>O.
4. Εν συνεχεία προστίθεται 400μl όξινη φαινόλη, και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10sec και επωάζουμε για 60min σε θερμοκρασία 65°C μεπεριστασιακή έντονη ανάδευση.
5. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C
6. Η υδατική φάση (επάνω)μεταφέρεται σε νέο erpendorf.
7. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl όξινη φαινόλη και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10 sec και επώαση στον πάγο για 5min.
8. Ακολουθως γίνεται φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C.
9. Λαμβάνεταιη υδατική φάση και σε νέο erpendorf
10. Έπειτα προστίθενται 200μlχλωροφορμίου (CHCl<sub>3</sub>).
11. Ακολουθείέντονη ανάδευση για 10sec και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4 °Cκαι μεταφορά της υδατικής φάσης (Πάνω φάση) σε νέο Erpendorf. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά 2φορές.
12. Ακολουθεί προσθήκη, στη τελευταία υδατική φάση που συλλέχθηκε, 3M οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) με pH 5.2 και όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης και 2.5 φορές του όγκου 100% αιθανόλη (EtOH) και επωάζεται για τουλάχιστον 1h στο πάγο ή για 15minσε θερμοκρασία -20 °C.
13. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 500μl 80%v/v Αιθανόλης.
14. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C και απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
15. Το ίζημα αφήνεται για 5 min να στεγνώσει.

16. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση τουιζήματος σε 30  $\mu\text{H}_2\text{ORNAse-free}$  και φυλάσσεται σε θερμοκρασία  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση του RNA σε πήκτωμα αγαρόζης φτιάχνουμε τα δείγματα με την εξής αναλογία:

Απομονωμένο RNA	2 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{ORNAsefree}$	7 $\mu\text{l}$
Χρωστική ORANGE G.	1 $\mu\text{l}$
ΣΥΝΟΛΟ	10 $\mu\text{l}$

Παρακάτω φαίνονται τα συστατικά της χρωστικής OrangeG.

#### Χρωστική ORANGE G

- 30% glycerol
- 0.2% orange g

### 3.2.5 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v

Διάλυση 0,5 g αγαρόζης σε 50 ml 1xTAE με βρασμό. Προσθήκη 2,5  $\mu\text{l}$  GelRed στο διάλυμα. Ανάδευση, ψύξη έως θερμοκρασία περίπου στους  $55^\circ\text{C}$  και απόχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθέτηση χτενιού για την δημιουργία πηγαδίων. Αφού το διάλυμα στερεοποιηθεί είναι έτοιμο για χρήση.

### 3.2.6 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων

Όταν το πήκτωμα αγαρόζης είναι πλέον έτοιμο, ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος 1 X TAE εντός της συσκευής. Ακολουθεί εναπόθεση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA καθώς και του μάρτυρα εντός των σχηματισθέντων πηγαδίων. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό

ακολουθεί η ανάπτυξη της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή ένταση ρεύματος περίπου 60 mA. Ακολούθως της ανάπτυξης, το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται εντός της συσκευής απεικόνισης η οποία αποτελείται από πηγή UV ακτινοβολίας, φωτογραφική μηχανή και υπολογιστή, και λαμβάνονται φωτογραφίες του πηκτώματος. Το μέγεθος των προς προσδιορισμό δειγμάτων υπολογίζεται με σύγκριση του συντελεστή επιβράδυνσης αυτού σε σχέση με των τμημάτων DNA του μάρτυρα.

### 3.2.7 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ DNase-I

#### 3.2.7.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ DNase-I

10Xδιάλυμα αντίδρασης:

- 500 mM Tris HCL pH=7.5
- 100 mM MgCl<sub>2</sub> (1M)
- 50 mM CaCl<sub>2</sub> (0,5M)

Μείγμα για αντίδραση με DNase-I

RNA	15 μl
10 X Buffer	2 μl
BSA (500μg/ml)	1 μl
DNase	2μl
ΣΥΝΟΛΟ	20 μl

Επώαση της αντίδρασης για 1h σε θερμοκρασία 37°C.

#### 3.2.7.2 Διαδικασία απομάκρυνσης της DNase-I και καθαρισμός του δείγματος.

1. Προσθήκη 200μl H<sub>2</sub>O RNase-Free και 200μl όξινης φαινόλης και έντονη ανάδευση (vortex) για 2min.
2. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min και φυγοκέντριση στις 6000 rpm. για 5min σε θερμοκρασία 4°C
3. Μεταφορά της υδατικής φάσης (επάνω) και προσθήκη 200μl χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10sec και

φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές.

4. Ακολουθεί προσθήκη, στη τελευταία υδατική φάση που συλλέχθηκε, 3M οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) με pH 5.2 και όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης και 2.5 φορές του όγκου 100% αιθανόλη (EtOH) και επωάζεται για τουλάχιστον 1h στο πάγο ή για 15min σε θερμοκρασία -20 °C.
5. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500μl 80%v/v Αιθανόλης.
6. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C και απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
7. Το ίζημα αφήνεται για 5 min να στεγνώσει.
8. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl H<sub>2</sub>O RNase-free και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -70 °C.

### 3.2.8 RealTimePCR

Οι μελέτη της έκφρασης γονιδίων της ζύμης έγινε με τη χρήση του KAPASYBRFASTone-stepqRT-PCRKitUniversal. Σε κάθε αντίδραση προστίθενται τα παρακάτω ακολουθώντας τις οδηγίες της Εταιρείας κατασκευής του kit.

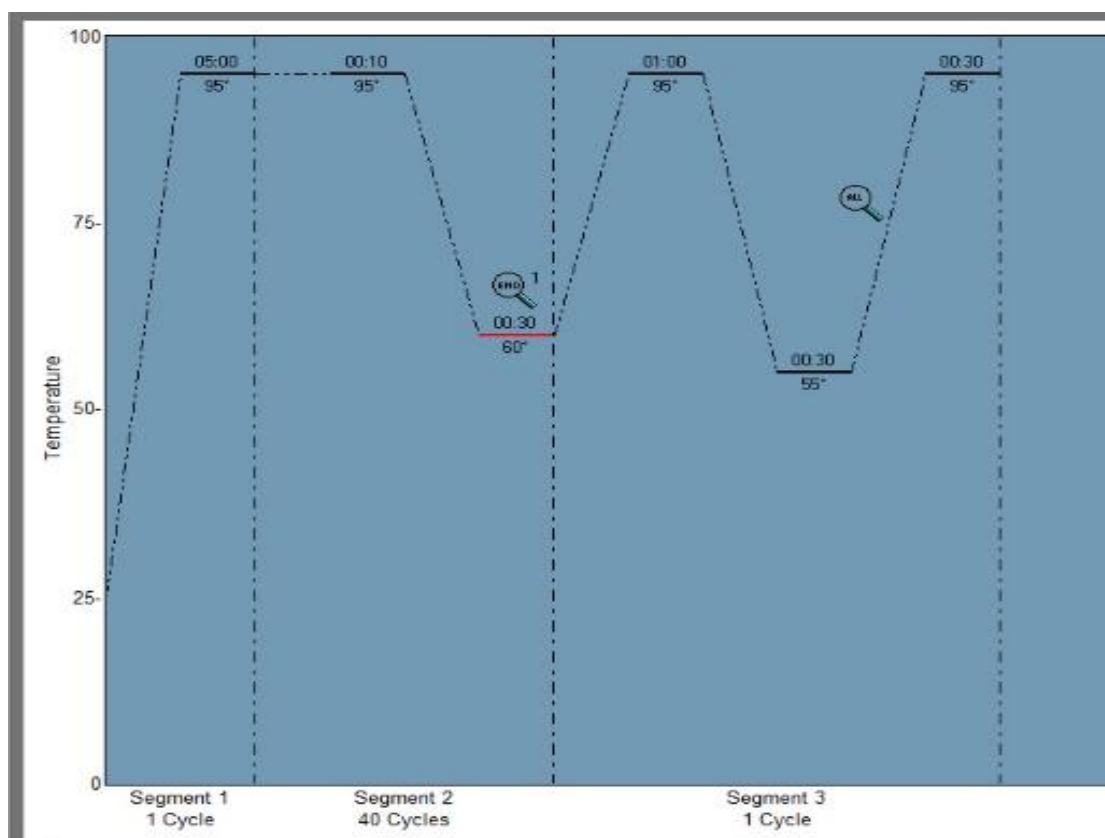
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	10 μl
Μείγμα εκκινητών	0,4 μl
ROXLow	0,4 μl
dUTP	0,4 μl
KAPA RTmix	0,4 μl
H <sub>2</sub> O (DNase / RNase-Free)	4,4 μl
RNA (κατεργασμένο με DNase)	4μl
ΣΥΝΟΛΟ	20μl



Κάθε ένα δείγμα αναλύεται τουλάχιστον δυο φορές (δύο αντιδράσεις) ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία.

Ως μείγμα εκκινήτων ορίζεται το μείγμα που έχει προκύψει από την ανάμειξη του Forward και του Reverseεκκινήτη για κάθε υπό μελέτη γονίδιο.

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. (Εικ.3.1)

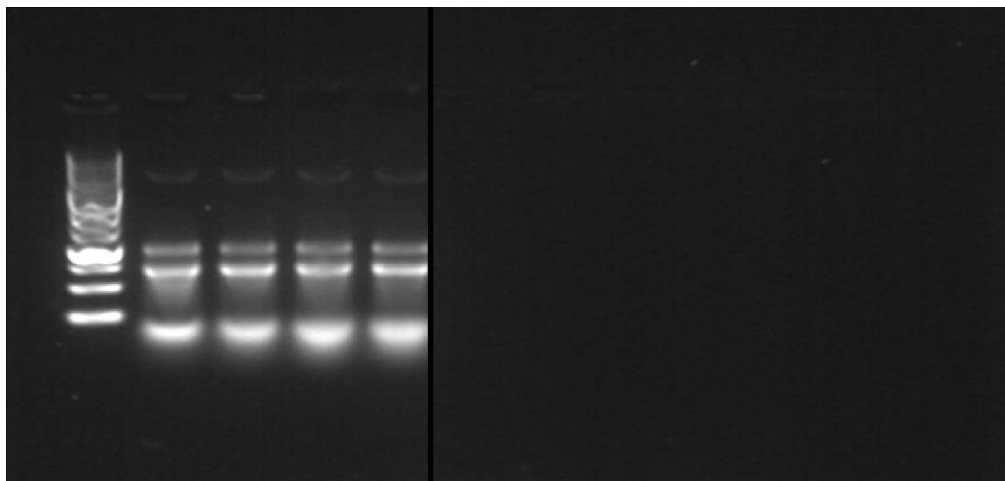


Εικόνα 3.1: Πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην μέθοδο της real-timepcr για τα κύτταρα ζύμης w303-1a και του μεταλλαγμένου κυττάρου MSN2\_633 για τις συγκεντρώσεις 2% και 15% γλυκόζη και για τις συγκεντρώσεις 3% και 6% αιθανόλης για χρονικές περιόδους T=0h και T=16h.

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη.

Μετά την διαδικασία της απομόνωσης του RNA στα κύτταρα ζύμης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις για γλυκόζη και αιθανόλη, στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα T=0h και T=16h για τα γονίδια w303-1a και για το μεταλλαγμένο γονίδιο 633 περιμένουμε να δούμε την ακεραιότητα των προϊόντων της απομόνωσης. Η διαδικασία αυτή ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Περιμένοντας την εμφάνιση του ριβονουκλεϊκού οξέος με την μορφή δύο παράλληλων μπαντών προϊόντων που εμφανίζονται στο πήκτωμα αγαρόζης σε ύψος μπαντών 3.000 έως 2.000 bp. Η εικόνα 4.1. είναι μια ενδεικτική εικόνα που εμφανίζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης RNA με όξινη φαινόλη στον απαιτούμενο χρόνο και με την αναμενόμενη εικόνα.



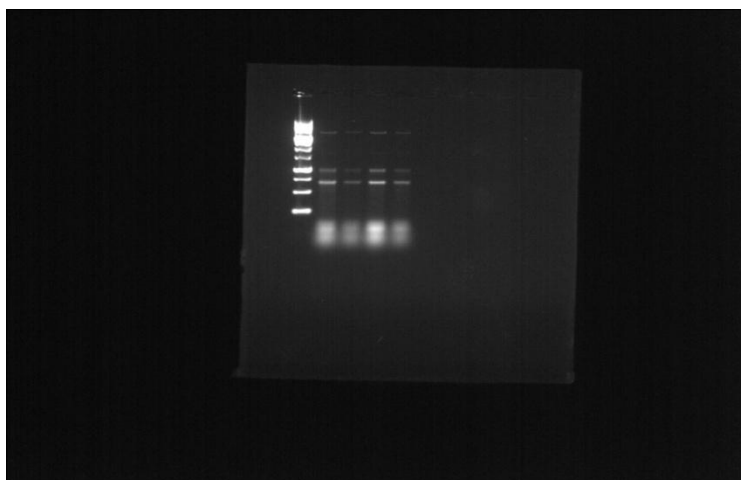
Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της απομόνωσης του ριβονουκλεϊκού οξέος με όξινη φαινόλη σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2,3 βρίσκεται το προϊόν w303-1a για T=0h και T=16h σε συγκέντρωση 2% γλυκόζης αντίστοιχα. Στην θέση 4,5 βρίσκεται το προϊόν w303-1a για T=0h και T=16h σε συγκέντρωση 15% γλυκόζης αντίστοιχα.

Ακριβώς η ίδια διαδικασία εμφάνισης των αποτελεσμάτων της απομόνωσης του RNA με όξινη φαινόλη έχει γίνει για όλα τα προϊόντα (w303-1a και 633 των απαιτούμενων συγκεντρώσεων και χρόνων) και έχει γίνει η

παραλαβή των αποτελεσμάτων (αντιπροσωπευτικές εικόνες με εμφανή τα προϊόντα) ώστε να συνεχιστεί η μελέτη των γονιδίων.

## 4.2 Κατεργασία δειγμάτων με Dnase-I

Η συνέχεια της μελέτης γίνεται με την κατεργασία των δειγμάτων με Dnases-I. Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζονται με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης με την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1,5%. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων γίνεται με εμφάνιση 2 παράλληλων μπάντων που αντιπροσωπεύει την ποσότητα των προϊόντων και η αναμενόμενη παρουσίαση τους γίνεται σε ποσότητα 3.000 έως 2.000 bp. Η εικόνα 4.2. είναι ενδεικτική εικόνα που εμφανίζει τα αποτελέσματα της κατεργασίας με Dnases-I στον απαιτούμενο χρόνο και με την αναμενόμενη ποσότητα καθαρού ριβονουκλεικού οξέος.



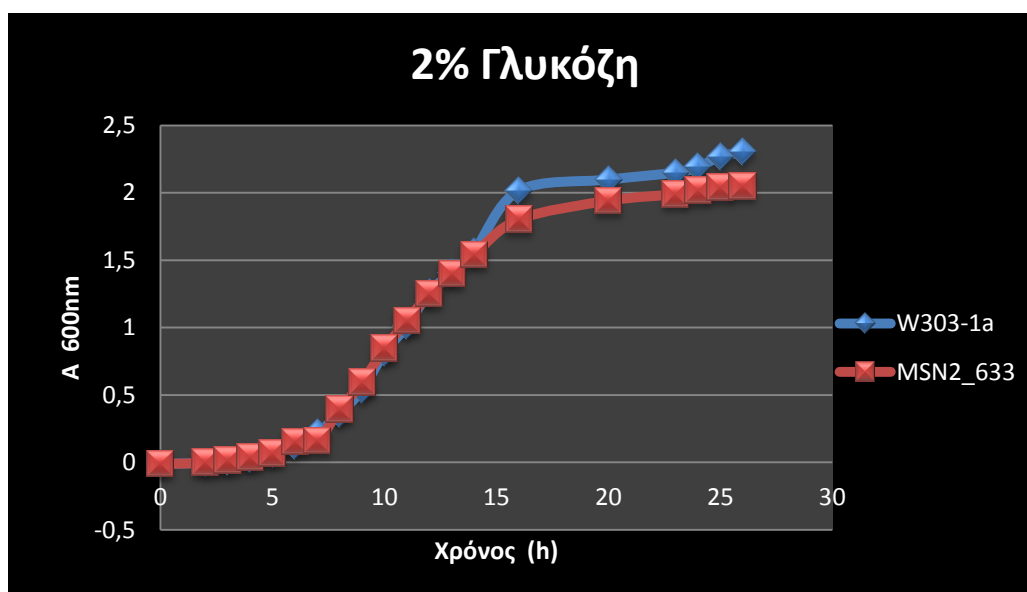
Εικόνα 4.2: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της κατεργασίας δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2,3 βρίσκεται το προϊόν w303-1a για T=0h και T=16h σε συγκέντρωση 2% γλυκόζης αντίστοιχα. Στην θέση 4,5 βρίσκεται το προϊόν w303-1a για T=0h και T=16h σε συγκέντρωση 15% γλυκόζης αντίστοιχα.

### 4.3 Δοκιμασία ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους

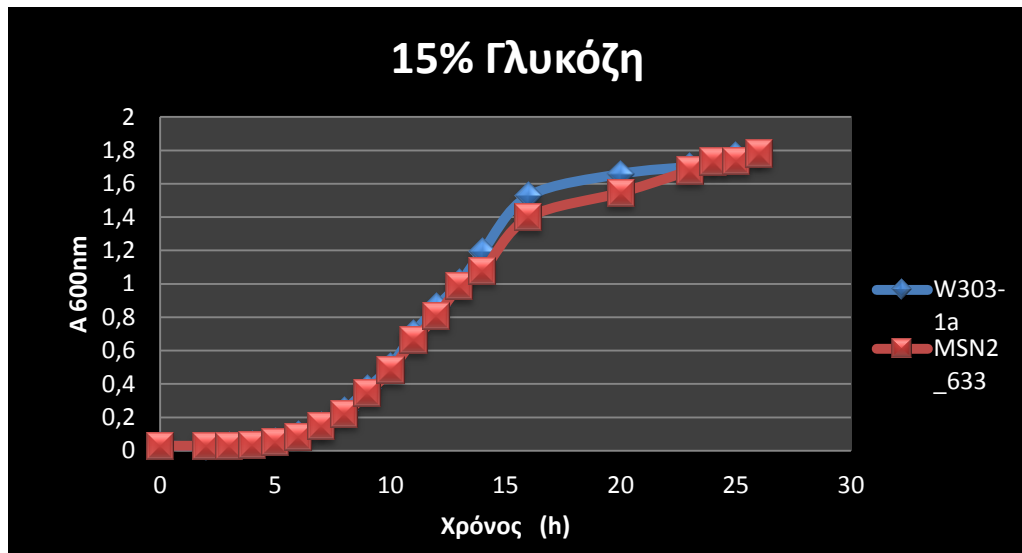
Προκειμένου να γίνει μια εμπειριστατωμένη μελέτη του στελέχους ζύμης W303-1a\_MSN2\_633, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξής τους σε διάφορες συνθήκες συγκρίνοντας τη με αυτή των αγρίου τύπου κυττάρων.

#### 4.3.1 Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.

Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας καλείται να ξεκινήσει την ζύμωση, βρισκόμενος ουσιαστικά σε κατάσταση ωσμωτικού στρες. Με αυτό τον τρόπο μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης msn2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε συγκεντρώσεις γλυκόζης 2% και 15%.



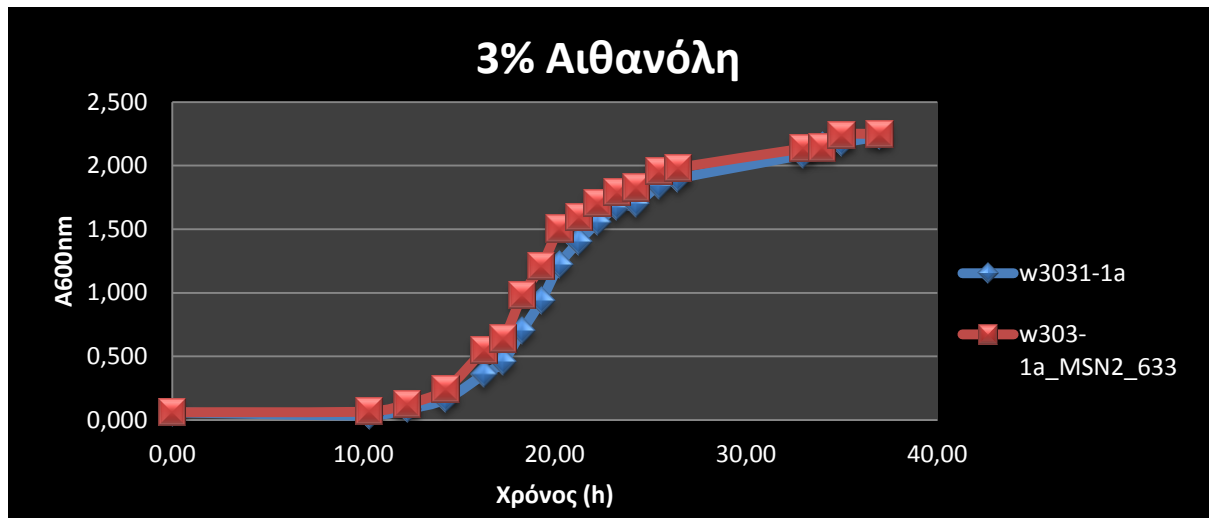
Σχήμα 4.1: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2\_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 2%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



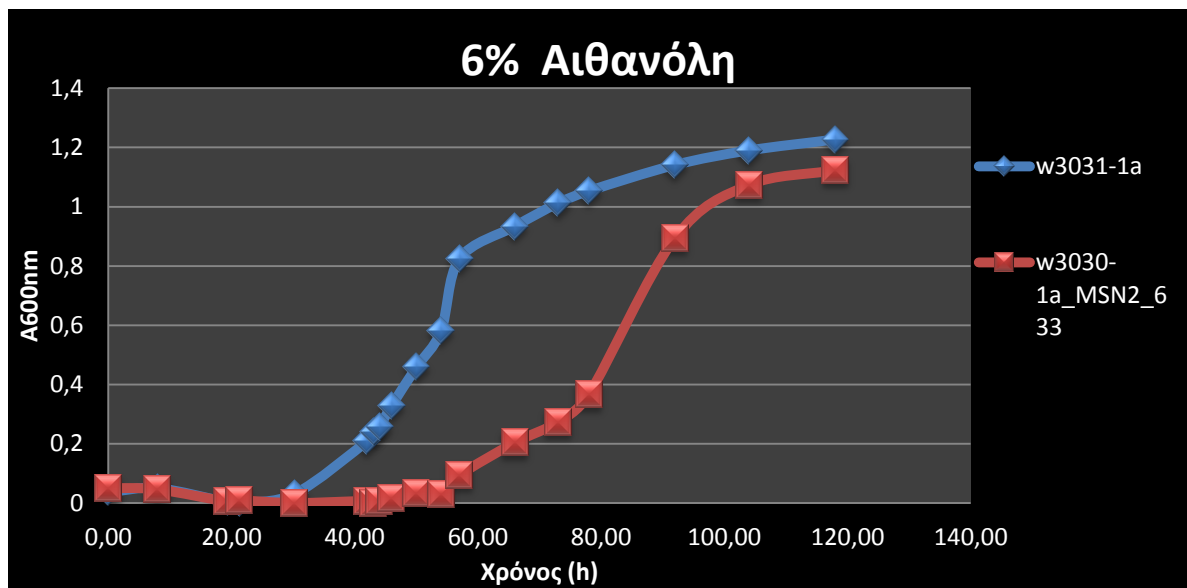
Σχήμα 4.2: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2\_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 5%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

#### 4.3.2 Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων

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 Ser633Ala επί της πρωτεΐνης msn2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (3%) (Σχ.4.3). Σε υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης (6%) φαίνεται ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη όχι μόνο δεν ευνοεί την ανάπτυξη του ζυμομύκητα αλλά απεναντίας εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία σε αυτή τουλάχιστον σε επίπεδο ανάπτυξης (Σχ. 4.4).



Σχήμα 4.3: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2\_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αιθανόλη σε συγκέντρωση 3%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



Σχήμα 4.4: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2\_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αιθανόλη σε συγκέντρωση 6%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

#### **4.4 Μελέτη του μεταλλαγμένου γονιδίου ως προς την έκφραση των γονιδίων με την μέθοδο της real-time(RT) pcr**

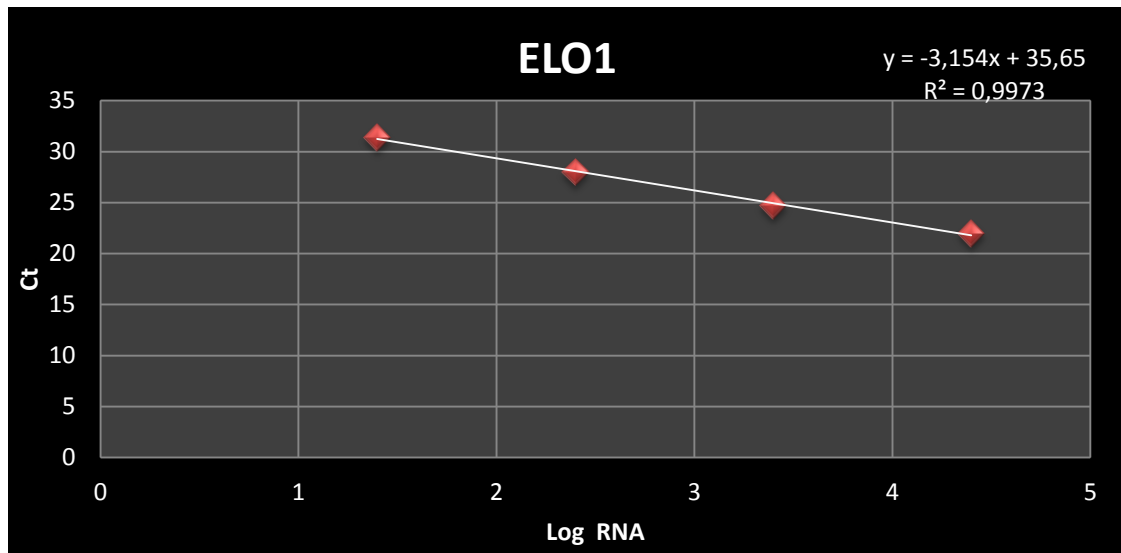
Προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση γονιδίων στο μεταλλαγμένο στέλεχος ser633a1a, έχουν χρησιμοποιηθεί δείγματα για την διεξαγωγή Real-Time (RT) PCR. Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα: ELO1, HXK1, ALD4, GND2, TDH1. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ALG9.

##### **4.4.1 Διαδικασία επεξεργασίας υπολογισμών της RealTimePCR.**

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της RealTimePCR χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο ALG9 ως γονίδιο αναφοράς για να διορθώσει διαφορές που οφείλονται σε διακυμάνσεις στις αρχικές ποσότητες των δειγμάτων, στα ποσοστά ανάκτησης των νουκλεϊκών οξέων, στη φόρτωση των δειγμάτων ή σφάλματα κατά την διαδικασία διεξαγωγής του πειράματος.

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

Προκειμένου να είναι εφικτή η ποσοτικοποίησης γονιδιακής έκφρασης μέσω της RealTimePCR θα πρέπει πρώτα να δημιουργήσουμε πρότυπες καμπύλες για το γονίδιο αναφοράς (ALG9) αλλά και για όλα υπό εξέταση. Όλες οι πρότυπες καμπύλες έχουν τη μορφή που εμφανίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχ.4.5).



Σχήμα 4.5: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γονιδίου. Στο κατακόρυφο άξονα καταγράφονται οι τιμές του Ct (threshold cycle) και στον οριζόντιο άξονα βρίσκονται οι τιμές των συγκεντρώσεων του γονιδίου σε λογαριθμική μορφή. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο γραμμικός συσχετισμός των δυο τιμών με την βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων.

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

#### 4.4.2 Τα υπό μελέτη γονίδια

Τα γονίδια τα οποία μελετώνται είναι τα εξής:

- ALG 9

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

- ELO 1

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



Φαίνεται ότι αυξάνεται η έκφραση του παρούσα αιθανόλης. Αυτή αύξηση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των μακριάς αλύσου λιπαρών οξέων που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης παρουσία της αιθανόλης.

- ALD4

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

- HXK 1

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

- TDH 1

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

- GND 2

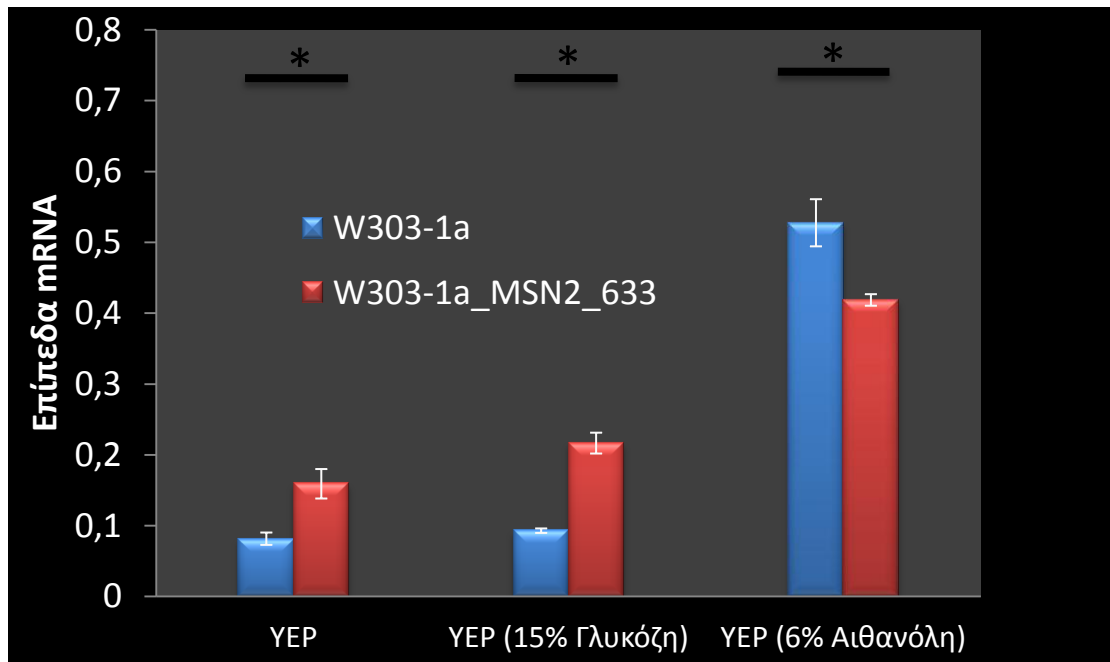
Στον *Saccharomyces cerevisiae*, το GND1 κωδικοποιεί την κύρια ισομορφή της φωσφογλυκονικής αφυδρογονάσης, που αντιπροσωπεύει περίπου το 80 % της δραστηριότητας, και το GND2 κωδικοποιεί τη λιγότερη ισόμορφη. Η φωσφογλυκονική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο κλειδί της πορείας των φωσφορικών πεντοζών που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

#### **4.4.3 Μελέτητης γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του αγρίου τύπουκαι του μεταλλαγμένουστελέχουςγια χρόνο t=15min.**

Από τηνμελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετώνται στην παρούσα εργασία μεταξύ του αγρίου τύπου στελέχους ζύμης (w303-1a) και του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2 πρωτεΐνης (w303-1a\_MSN2\_633) για χρόνο έκθεσης t=15min σε θρεπτικό υλικό YEP περιεκτικότητας σε γλυκόζη 2%w/v, 15%w/vκαι σε θρεπτικό υλικό YEP περιεκτικότητας 2%w/v σε γλυκόζη και 6%v/v σε αιθανόλη ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

##### **4.4.3.1 ELO1**

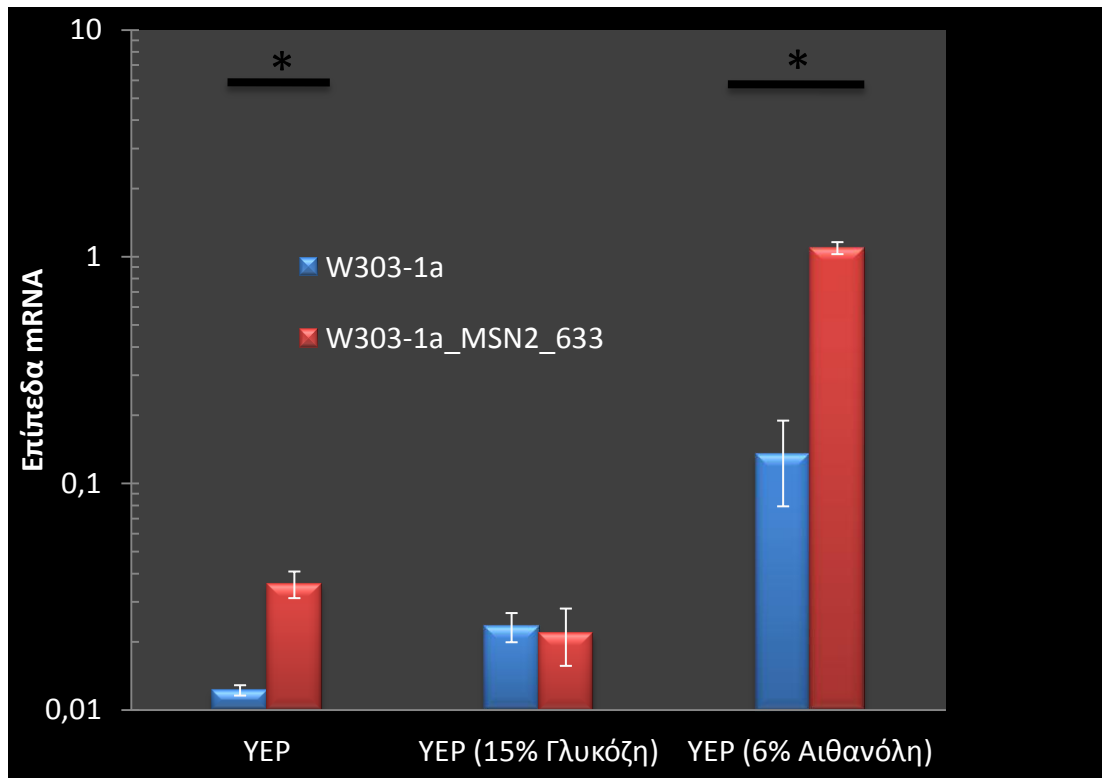
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης), YEP με 15%w/v γλυκόζη αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 6%v/v αιθανόλης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.6). Η παρατηρούμενη μείωση παρουσία της αιθανόλης πιθανόν να αντανακλά την μειούμενη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακριάς αλύσου που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερη ευαισθησία σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης τουλάχιστον για σύντομο χρονικό διάστημα έκθεσης σε αυτή.



Σχήμα 4.6: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3.2 ALD4

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη, αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αντίθετα σε θρεπτικό υλικό YEP με 15%w/v γλυκόζη φαίνεται ότι δεν είναι σημαντική αυξημένη η έκφραση του γονιδίου ALD4. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του ALD4 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (YEP με 2%w/v γλυκόζη και YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης.) (Σχ.4.7). Αντίστοιχα Η παρατηρούμενη αύξηση πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οξικού οξέος κατά τη διάρκεια αναερόβιας ανάπτυξης από το παραγόμενο από τη γλυκόλυση πυροσταφυλικού πιθανότατα εις βάρος της παραγωγής αιθανόλης.

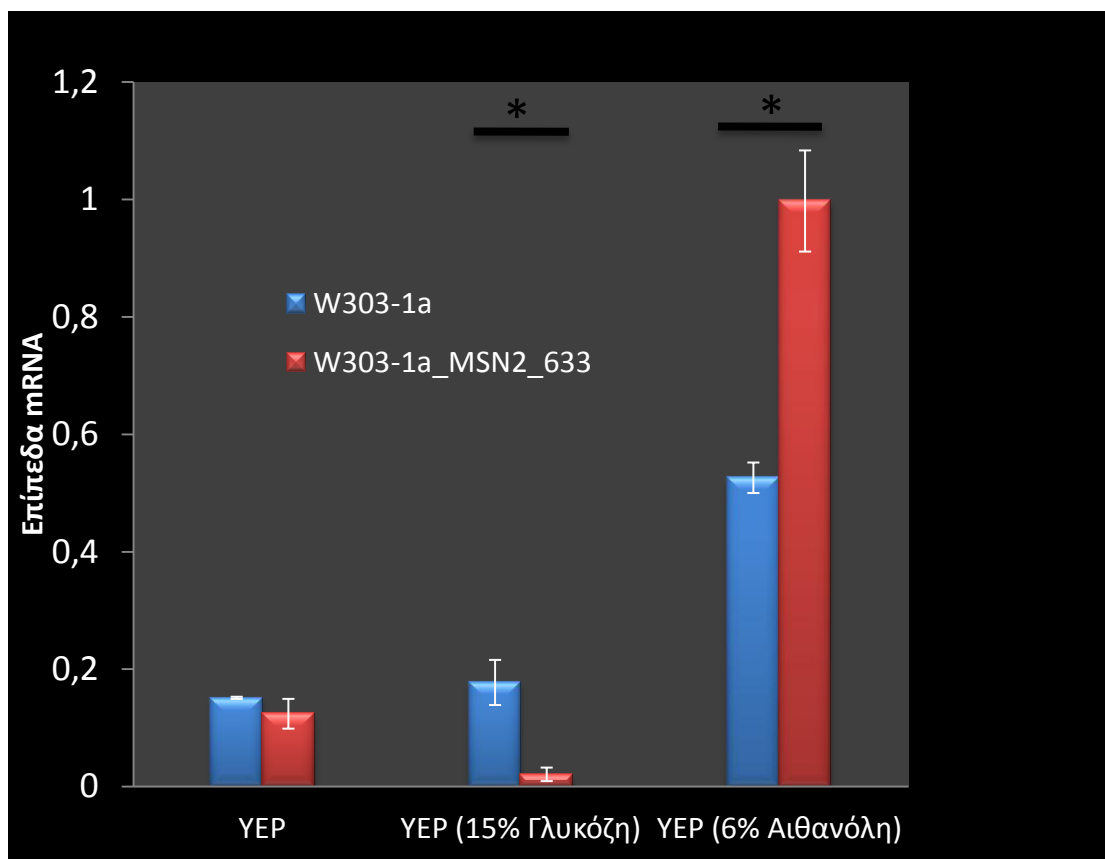


Σχήμα 4.7: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3.3 HKX1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HKX1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 15%w/v γλυκόζη αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αντίθετα σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη(βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης) φαίνεται ότι δεν είναι σημαντική αυξημένη η έκφραση του γονιδίου HKX1. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του HKX1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (YEP με 15%w/v γλυκόζη και YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 6% αιθανόλης.)(Σχ.4.8). Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της HKX1παρουσία της αιθανόλης πιθανόν να αντανακλά αυξημένη ενεργοποίηση της πορείας της γλυκόλυσης γεγονός

το οποίο είναι αναμενόμενο για ένα στέλεχος που μπορεί και αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία αιθανόλης. Η εμφανιζόμενη μείωση παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης είναι μερικώς αναμενόμενο αφού η παρουσία της γλυκόζης δρα ανασταλικά στην ενεργοποίησή της και πιθανόν να αντανάκλαστοςτήρηση στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης.

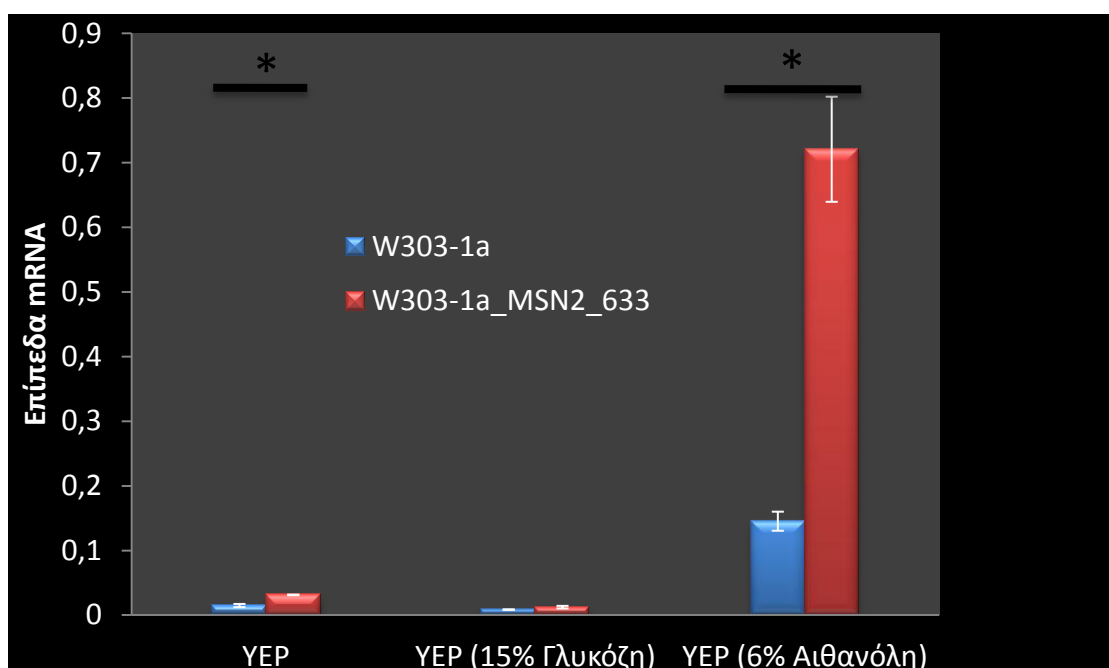


Σχήμα 4.8: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ )

#### 4.4.3.4 GND2

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της φωσφογλυκονικής αφυδρογονάσης, GND2 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό

ανάπτυξης), αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αντίθετα σε θρεπτικό υλικό YEP με 15%w/v γλυκόζη φαίνεται ότι δεν είναι σημαντική αυξημένη η έκφραση του γονιδίου GND2. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του GND2 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (YEP με 2%w/v γλυκόζη και YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης)(Σχ.4.9). Η παρατηρούμενη αύξηση βρίσκεται σε συμφωνία προηγούμενα ευρήματα (Ma&Liu,2010)όπου στελέχη που εμφανίζουν καλύτερη ανάπτυξη παρουσία αιθανόλης έχουν αυξημένα επίπεδα GND2.

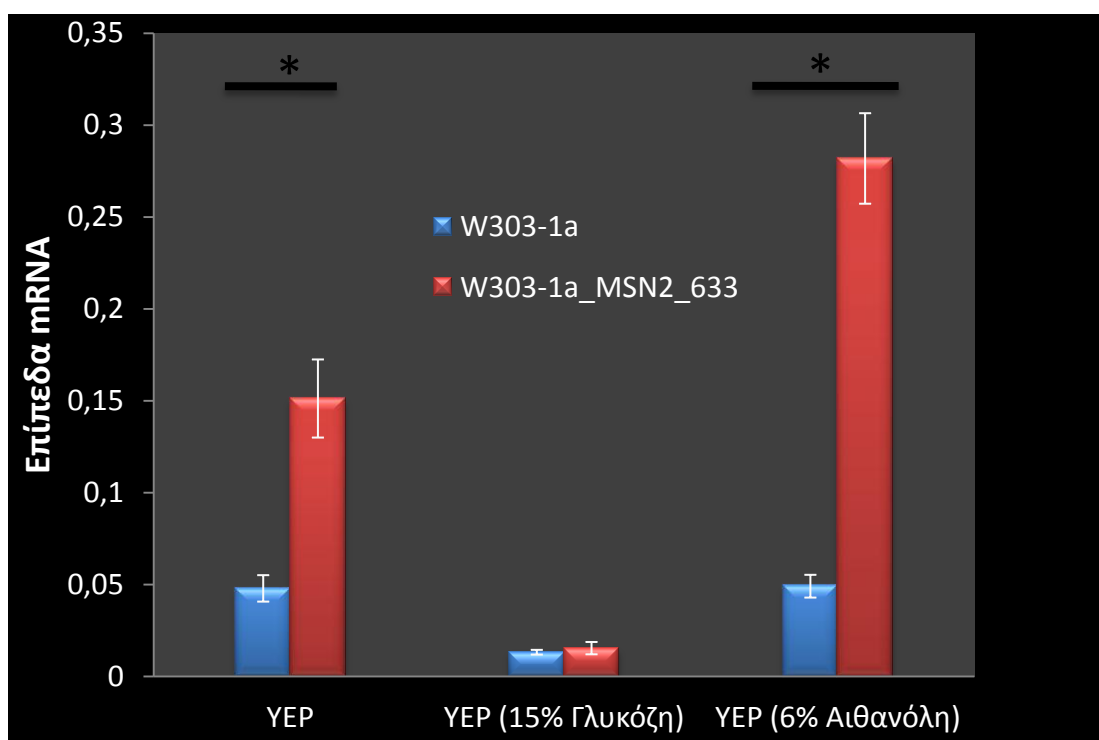


Σχήμα 4.9: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου GND2 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3.5 TDH1

Όπως και για την εξοκινάση HXK1 έτσι και για το έτερο ενζυμο που συμμετέχει στη γλυκόλυση, την αλδολάση TDH1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2,

όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης), αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αντίθετα σε θρεπτικό υλικό YEP με 15%w/v γλυκόζη φαίνεται ότι δεν είναι σημαντική αυξημένη η έκφραση του γονιδίου TDH1. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του TDH1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (YEP με 2%w/v γλυκόζη και YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης.)(Σχ.4.10).Ηπαρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης πιθανότατα προάγει την λειτουργία της γλυκόλυσης.



Σχήμα 4.10: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

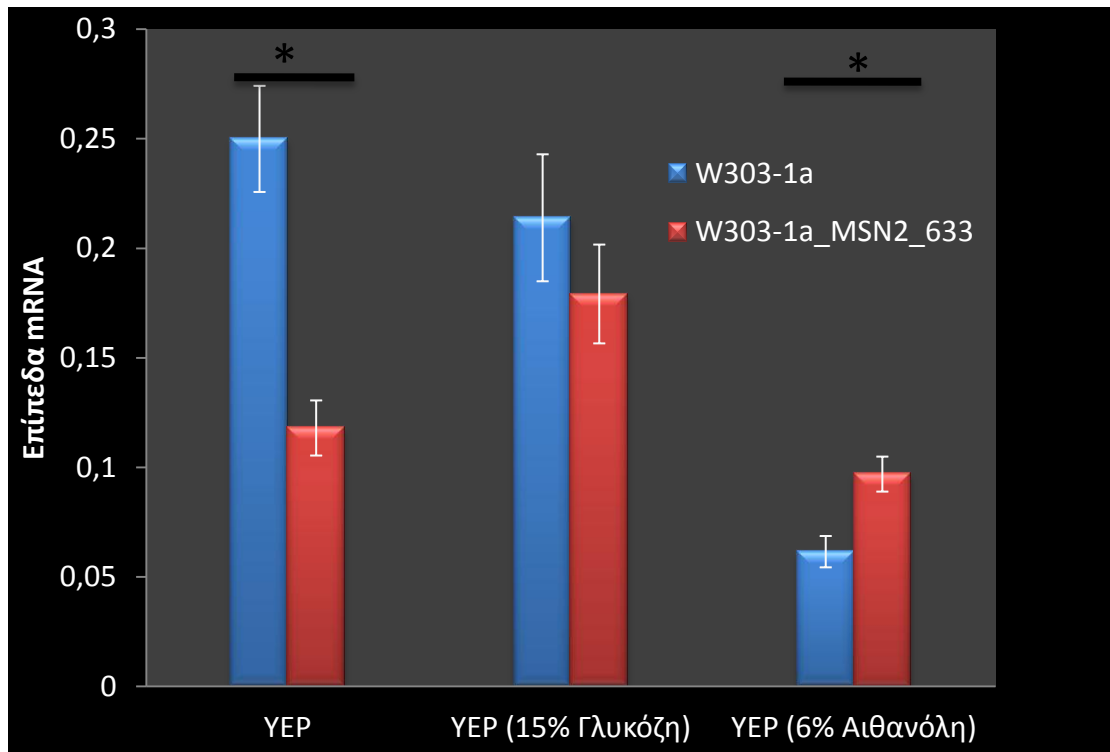
#### **4.4.4 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους για χρόνο $t=16h$ .**

Στην συνέχεια, εμφανίζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στο αγρίου τύπου στέλεχος w303-1a και το στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης Msn2 με την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου για χρονικό διάστημα έκθεσης  $t=16h$  σε καθορισμένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης (2%, 15% γλυκόζη, 6% αιθανόλη).

##### **4.4.4.1 ELO1**

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 ωρών σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 6% αιθανόλης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (Σχ.4.11). Αντίθετα σε θρεπτικό υλικό YEP με 15%w/v γλυκόζη διακρίνουμε ότι η διαφορά της έκφρασης του ELO1 γονιδίου δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η παρατηρούμενη αύξηση (σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 6%w/v αιθανόλης) πιθανόν να αντανακλά την αυξημένη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακρίας αλυσού που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης όταν εκτεθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αυτή.

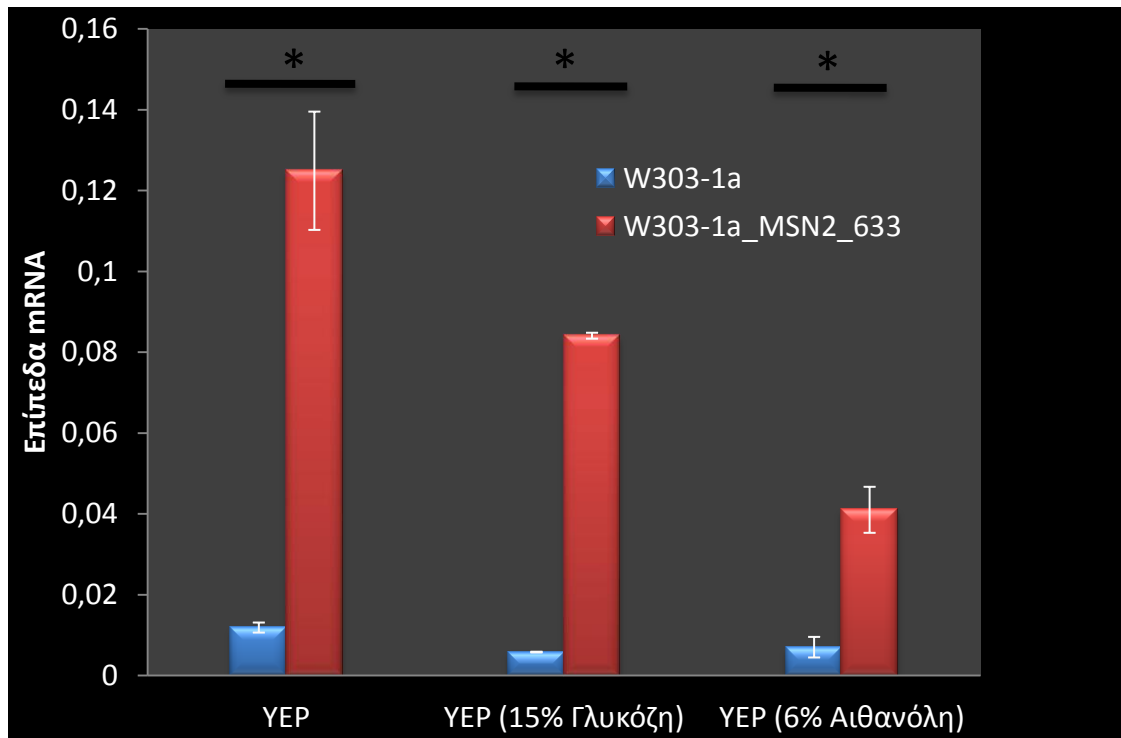




Σχήμα 4.11: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=16$  ωρών. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.4.2 ALD4

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά στατιστικώς αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 ωρών και στα τρία υπό εξέταση θρεπτικά υλικά. (Σχ.4.12). Η παρατηρούμενη αύξηση πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οξικού οξέος κατά τη διάρκεια αναερόβιας ανάπτυξης από το παραγόμενο από τη γλυκόλυση πυροσταφυλικό πιθανότατα εις βάρος της παραγωγής αιθανόλης.

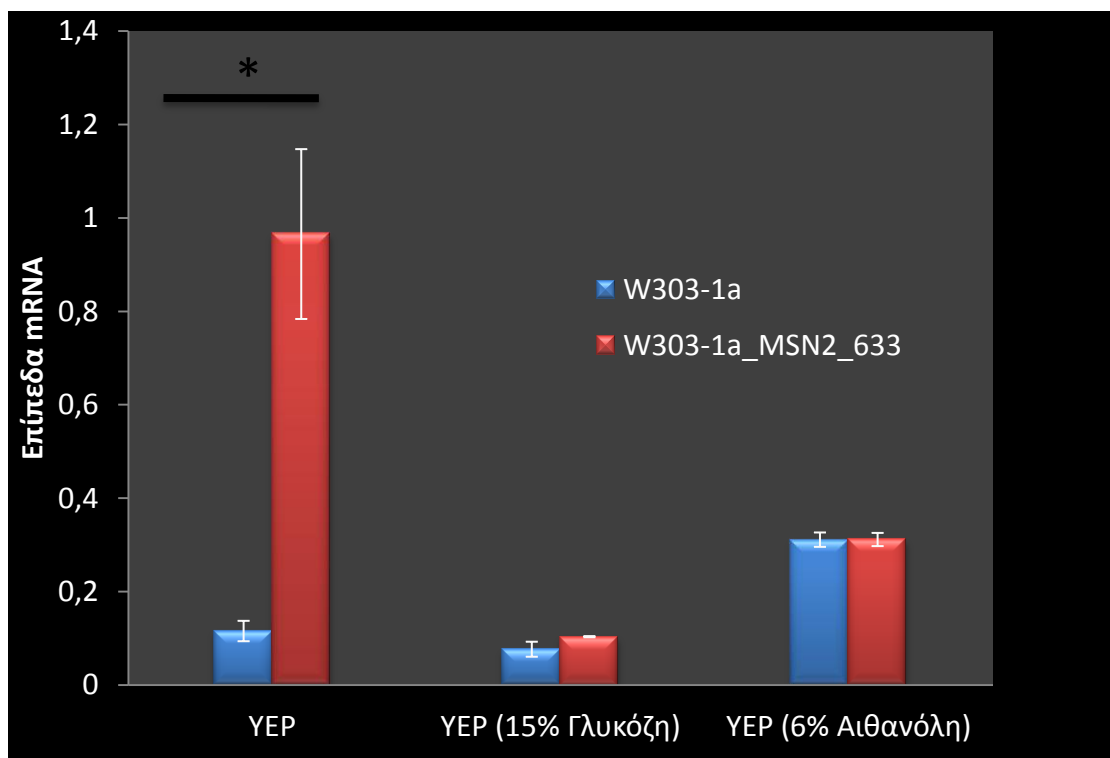


Σχήμα 4.12 Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=16$  ωρών. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.4.3 HKX1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου HKX1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16ωρών σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη. Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του HKX1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική. (Σχ.4.13). Η εμφανιζόμενη αύξηση των επιπέδων της εξοκινάσης-1 είναι αναμενόμενη αφού μετά την ανάπτυξη επί 16 ώρες ποσότητα της γλυκόζης που περιέχονταν στο θρεπτικό υλικό έχει σχεδόν καταναλωθεί. Το ίδιο μάλλον δεν συμβαίνει στο θρεπτικό υλικό με 15w/v περιεκτικότητα σε γλυκόζη αφού πιθανόν υπάρχει γλυκόζη στο θρεπτικό υλικό και για αυτό δεν φαίνεται αξιοσημείωτη διαφορά. Η έλλειψη διαφοράς της έκφρασης της εξοκινάσης-1 σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 2%w/v γλυκόζη και 6%w/v αιθανόλη πιθανόν να είναι φυσιολογική διότι η παρουσία

αυξημένων επιπέδων αιθανόλης που όπως φάνηκε (Σχ.4.8) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της εξοκινάσης-1 μάλλον αντισταθμίζεται από την έλλειψη της γλυκόζης η οποία μάλλον έχει καταναλωθεί

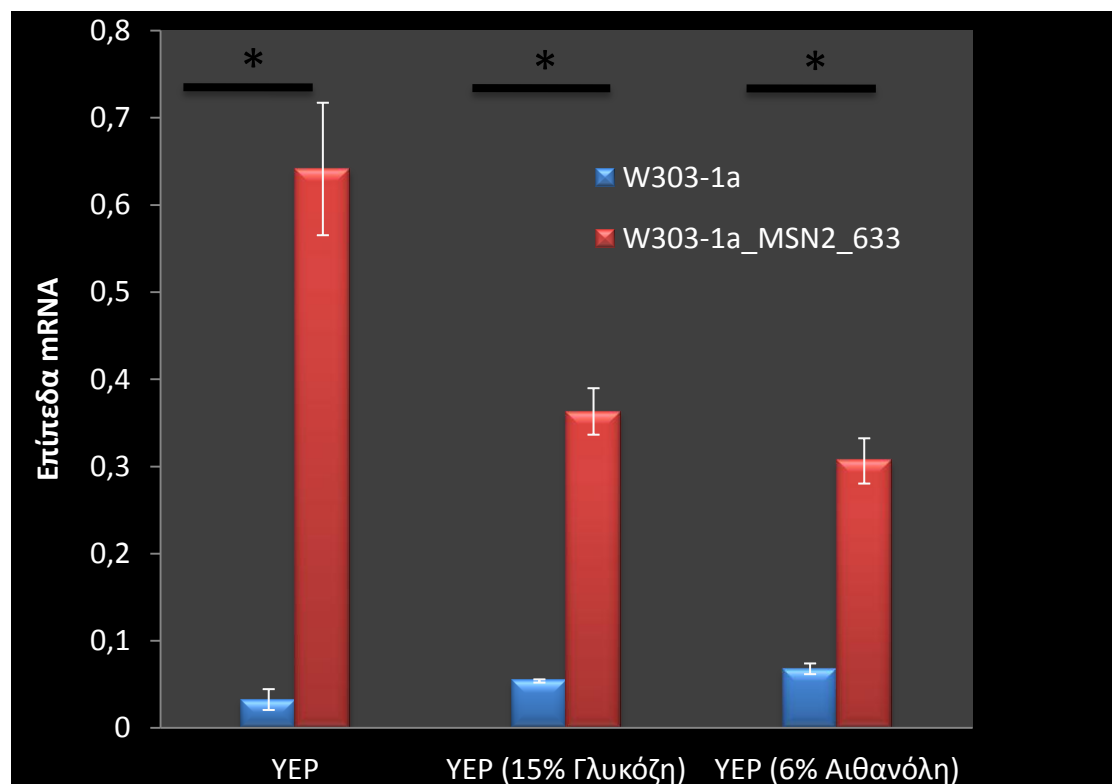


Σχήμα 4.13: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου HXK1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=16$  ωρών. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p<0.05$ ).

#### 4.4.4.4 GND2

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GND2 φαίνεται ότι είναι στατιστικώς εξαιρετικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 ωρών και στα τρία υπό εξέταση θρεπτικά υλικά (Σχ.4.14). Μετά την πάροδο 16 ωρών μικρή αλλά υπολογίσιμη ποσότητα αλκοόλης παράγεται ακόμα και υπό αερόβιες συνθήκες. Η παρατηρούμενη αύξηση βρίσκεται σε συμφωνία προηγούμενα

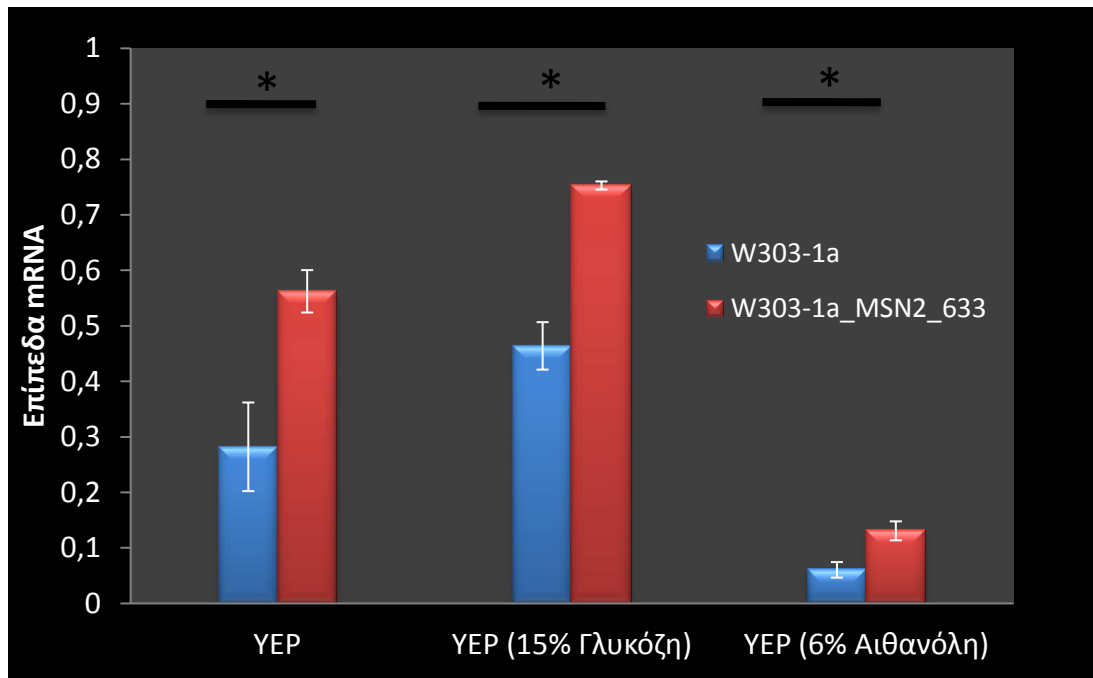
ευρήματα(Ma&Liu,2010) όπου στελέχη που εμφανίζουν καλύτερη ανάπτυξη παρουσία αιθανόλης έχουν αυξημένα επίπεδα GND2.



Σχήμα 4.14: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίουGND2 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16 ωρών. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.4.5 TDH1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 φαίνεται ότι είναι αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser633Ala επί της Msn2, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16 ωρών και στα τρία υπό εξέταση θρεπτικά υλικά (Σχ.4.14). Αυτή η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του TDH1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.15). Η παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης πιθανότατα προάγει την λειτουργία της γλυκόλυσης.



Σχήμα 4.15: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN2\_633) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=16$  ωρών. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ )

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι Msn2/4 ενεργοποιούνται μετά την έκθεση της ζύμης σε μια ευρεία ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως άζωτο ή έλλειψη άνθρακα, ωσμωτική πίεση, παράγοντες που βλάπτουν το DNA, αιθανόλη και θερμική καταπόνηση.

Η ζύμη είναι ευαίσθητη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, ειδικά για υψηλής βαρύτητας ή πολύ υψηλής βαρύτητας συνθήκες ζύμωσης. Συσσώρευση αιθανόλης σε ένα θρεπτικό μέσο αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα, επηρεάζει διαφορετικά μεταφορικά συστήματα, και μειώνει την παραγωγή αιθανόλης.

Η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του ζυμομύκητα, όπως και η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης αποτελούν παράγοντες κυτταρικού στρες.

Στην παρούσα εργασία αρχικά μελετήθηκε το στέλεχος ζύμης W303-1a\_MSN2\_Ser633Ala ως προς την ικανότητα ανάπτυξής του σε θρεπτικό υλικό χαμηλής και υψηλής περιεκτικότητας σακχάρου, καθώς και σε θρεπτικό υλικό παρουσία υψηλής και χαμηλής τιμή περιεκτικότητας σε αιθανόλη. Από τη μελέτη προέκυψαν τα εξής:

- Η μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης Msn2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του στις υπό εξέταση περιεκτικότητες γλυκόζης.
- Η ικανότητα του ζυμομύκητα να αναπτύσσεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (3%v/v) δεν μεταβάλλεται με την παρουσία της υπό εξέταση μετάλλαξης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης (6%) όμως φαίνεται ότι η υπό μελέτη μετάλλαξη ευνοεί την ανάπτυξη του ζυμομύκητα.

Ακολούθησε μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων του στελέχους ζύμης W303-1a\_MSN2\_Ser633Ala με την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου και τα συμπεράσματα είναι τα εξής:

Η μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης Msn2 του ζυμομύκητα στα περισσότερα γονίδια που μελετήθηκαν μεταβάλλει την γονιδιακή έκφραση. Για

ορισμένα γονίδια παρατηρείται αύξηση της έκφρασης ενώ για κάποια άλλα μείωση σε σχέση με του άγριου τύπου γονίδιο W303-1a αναλόγως των συνθηκών που επικρατούν.

Πιο συγκεκριμένα για το ELO1 για χρονικό διάστημα  $t=15\text{min}$  το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζεται να έχει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιός που μπορεί να υποδηλώνει πιθανή ευαισθησία στην αιθανόλη στο αρχικό στάδιο έκθεσης σε αυτή. Αντίθετα διακρίνουμε ότι σε χρονικό διάστημα έκθεσης 16 ωρών το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1. Η παρατήρηση αυτή είναι πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης, όταν εκτεθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς και αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης.

Για το ALD4 παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης του τόσο για χρόνο  $t=15\text{min}$  όσο και για  $t=16\text{ώρες}$ , σε όλα τα θρεπτικά υλικά που ελέγχθηκαν. 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 γλυκόλυση. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης εμφανίζεται μειωμένη παρουσία καθώς υστερεί στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. 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  $t=15\text{min}$  αλλά και  $t=16\text{ώρες}$  παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο μεταλλαγμένο στέλεχος το οποίο πιθανόν υποδηλώνει καλύτερη ανάπτυξη παρουσία αιθανόλης.

Τέλος το γονίδιο TDH1 και για τις δύο χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν ( $t=15\text{min}$  και  $t=16\text{ώρες}$ ) παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης που πιθανόν προάγει την λειτουργία της γλυκόλυσης.

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 633 της μεταγραφικού παράγοντα Msn2.



## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 6.1 Ξενόγλωσση

- Arino J. (2010). Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *OMICS*, 14, pp. 517–523.
- Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, pp. 89-105.
- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L.(2002). “Biochemistry, 5th edition”. W.H. Freeman and Company, New York.
- 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.
- Broach J.R., Deschenes R.J. (1990). The function of ras genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Cancer Res* 54, pp. 79–139.
- 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.
- Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 12, pp. 323–337.
- Casado C., Gonzalez A., Platara M., Ruiz A. and Arino J. (2011). The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *Biochem. J.*, 438, pp. 523-533.
- Casey G.P., Ingledew W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Crit Rev Microbial*, 13, pp. 219–280.
- 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'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.
- 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.
- Garreau H., Hasan R.N., Renault G., Estruch F., Boy-Marcotte E. and Jacquet M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 146, pp. 2113–2120.
- 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.
- Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol., Rev.* 32, pp. 673–704.
- Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor M. T., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H. and Schuller C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.*, 12, pp. 586–597.
- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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
- Lamb T. M., Xu W., Diamond A. and Mitchell A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 1850–1856.
- Lamb T.M. and Mitchell A.P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 23, pp. 677–686.
- Lee P., Cho B.R., Joo H.S., Hahn J.S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol*, 70, pp. 882–895.
- 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.
- Mai B. and Breeden L. (1997). Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol. Cell. Biol.*, 17, pp. 6491–6501.
- 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.

- Ma M., and Liu L.Z.,(2010)Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Ma and Liu *BMC Microbiology* 2010, 10:169, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/169>
- Moskvina E., Schuller C., Maurer C.T., Mager W.H. and Ruis H. (1998). A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* , 14, pp. 1041–1050.
- 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.
- 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.
- Rosa M.F., Sá-Correia I. (1996). Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett*, 135, pp. 271–274.
- Outlaw J., Collins K.J., Duffield J.A. (2005). *Agriculture as a producer and consumer of energy*. CABI, Oxfordshire.
- Ruiz, A, Serrano R. and Arino J. (2008). Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway. *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 13923–13933.
- Sample and assay technologies - Real Time PCR brochure (05/2009): Critical factors for successful Real Time PCR, 64:9.

- Salgueiro S.P., Sá-Correia I., Novais J.M. (1988). Ethanol induced-leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl Environ Microbiol*, 54, pp. 903–909.
- 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.
- Science.gr : Real Time PCR (2012). Ημερομηνία ανάκτησης 10 Μαΐου 2016, από <http://www.science.gr/main/>.
- Serrano R., Ruiz A., Bernal D., Chambers J.R. and Arino J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.*, 46, pp. 1319–1333.
- 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.
- Smith A., Ward M.P. and Garrett S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17, pp. 3556–3564.
- Tamaki H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng*, 104, pp. 245–250.
- Teixeira M.C., Raposo L.R., Mira N.P., Lourenço A.B., Sá-Correia I. (2009). Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 75, pp. 5761–5772.

- 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.
- Van Uden N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann Rep Ferment Process*, 8, pp. 11–58.
- Vertes A., Qureshi N., Yukawa H., Blaschek H. (2010). Biomass to biofuels. Wiley, West Sussex.
- Viladevall L., Serrano R., Ruiz A., Domenech G., Giraldo J., Barcelo A. and Arino J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279, pp. 43614–43624.
- 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.

## 6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- Βαρθολομαίος, Γ, Δραΐνας, Κ, Κόλιος, Γ, (2002). « Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοχημείας Ι»
- Βερβερίδης, Φ. (2003). « Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών», Ηράκλειο Κρήτης
- Κουσίσης, Σ, Κίζης Δ, Χούχουλα, Δ, (2013) . «Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοχημείας ΙΙ » Εργαστηριακή Άσκηση Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων.
- 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.