



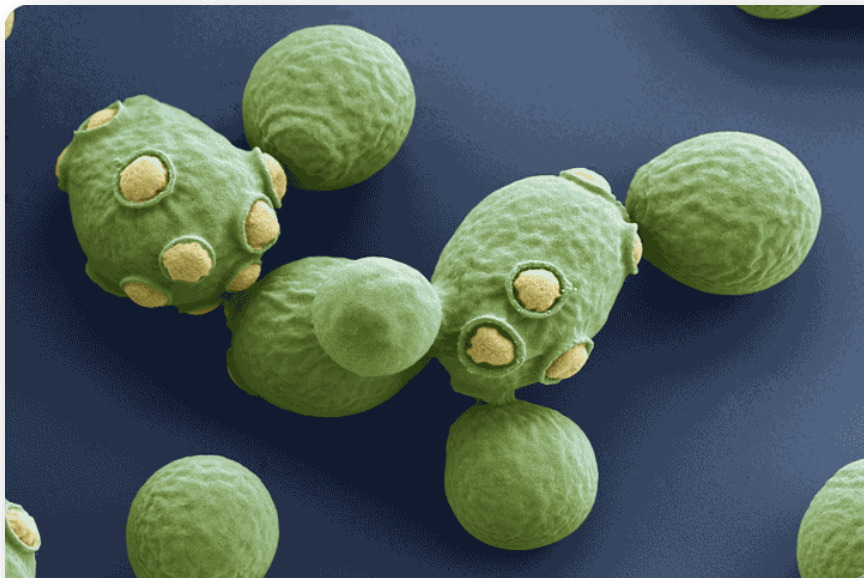
# ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser-533-Ala ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MSN4 ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ STRESS ΣΤΟΝ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

---

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ ΠΑΡΑΒΑΛΟΥ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΩΤΗΡΗΣ-ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΒΑΜΒΑΚΑΣ

## Πίνακας περιεχομένων

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1 Μύκητες .....	6
1.2 Λίγα λόγια για τον <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .....	6
1.3 Η επικράτηση του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> σε εφαρμογές της επιστήμης....	7
1.4 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> υπό συνθήκες στρες.-Οι MSN2/4 και ο ρόλος τους.....	8
1.5 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον. ....	13
1.5.1 Η επίδραση της αιθανόλης. ....	14
1.5.2 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.....	15
1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR)).....	16
1.6.1 Αρχή λειτουργίας αντίδρασης PCR.....	16
1.6.2 Εκκινητές και DNA Πολυμεράση .....	17
1.7 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR.....	20
1.7.1 Μεθοδολογία Μέγα-Εκκινητή (MEGAPRIMER) .....	20
1.7.2 Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR.....	22
1.7.3 Εισαγωγή της μετάλλαξης στη ζύμη- Μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου DpnI. ....	24
2.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	27
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	29
3.1 Υλικά .....	29
3.1.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων .....	35
3.2 Πειραματικές Πορείες.....	40
3.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης.....	40
3.2.2 Παρασκευή μάρτυρα .....	41
3.2.3 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v – Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων. ....	41
3.2.4 Nucleospin gel extraction and PCR clean-up kit.....	42
3.2.5 Nucleospin Plasmid kit .....	44
3.2.6 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό .....	45
3.2.7 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων .....	46
3.2.8 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού .....	46
3.2.9 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (High efficiency transformation of yeast cells). ....	47
3.2.10 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων .....	48

3.3Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης.....	48
3.3.1Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιεργειών .....	48
3.3.2 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	48
3.3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	49
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης .....	50
4.1.1 1 <sup>η</sup> μέθοδος- μέθοδος “Mega-primer” .....	50
4.1.2 2 <sup>η</sup> μέθοδος- μέθοδος των τριών διαδοχικών PCR.....	54
4.1.3 3 <sup>η</sup> μέθοδος- πεψης με το ένζυμο <i>DpnI</i> . .....	58
4.2 Απαλοιφή MSN4 αγρίου τύπου από κύτταρα ζύμης. ....	65
4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress. ....	71
4.3.1 Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.....	71
4.3.2 Παρουσία αιθανόλης .....	73
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	75
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78
5.1 Ξενόγλωσση: .....	78
5.2 Ελληνική.....	81

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα μέσα από αυτήν την εργασία να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους ανθρώπους μου, που μου στάθηκαν με κάθε τρόπο κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, καθώς επίσης και τις συμφοιτήτριές μου για τη συνεργασία και την όποια βοήθεια.

Φυσικά, όλα αυτά δεν θα γίνονταν χωρίς τον κο Βαμβακά, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη στήριξη, την άψογη συνεργασία, την υπομονή και τη δύναμη που μου έδωσε από την αρχή κιόλας των πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ενώ το παγκόσμιο οικονομικό ενδιαφέρον είναι στραμμένο στην εύρεση νέων τεχνικών και στην εξέλιξη των υπαρχουσών, με κύριο στόχο την αύξηση του κέρδους, κάθε τομέας επενδύει σε κάτι νέο. Εκείνος της βιοτεχνολογίας λοιπόν, δεν θα αποτελούσε εξαίρεση, μιας και οι μικροοργανισμοί αποτελούσαν και αποτελούν σύμμαχό μας σε πολλούς κλάδους της ανθρώπινης έρευνας και ανάπτυξης, από την ιατρική μέχρι και τη ίδια την βιοτεχνολογία.

Σε αυτήν την εργασία λοιπόν γίνεται προσπάθεια να βελτιώσουμε τις αμυντικές ιδιότητες του *Saccharomyces cerevisiae*, του πιο δημοφιλή και πιο εργαστηριακά δουλεμένου ζυμομύκητα, σε καταστάσεις stress, με στόχο την αύξηση της αντοχής του και κατά συνέπεια της απόδοσής του. Αυτό γίνεται μεταλλάσσοντας την πρωτεΐνη MSN4 η οποία αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα, και πιο συγκεκριμένα το αμινοξύ σερίνη (Ser) στη θέση 533 σε αλανίνη (Ala). Γίνεται επίσης μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης αυτής στον σακχαρομύκητα, δοκιμάζοντας την ανάπτυξή του σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο και σε μέσο με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και αιθανόλης.

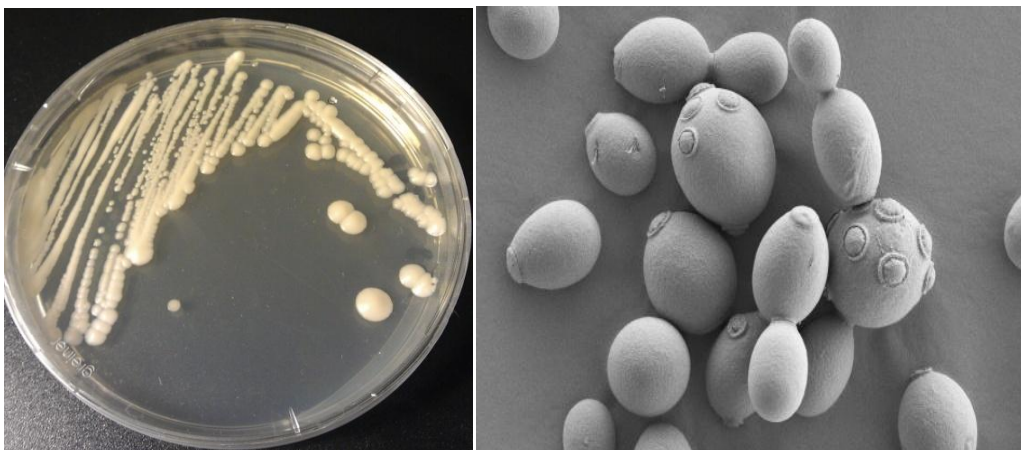
# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Μύκητες

Οι μύκητες είναι ευκαριωτικοί οργανισμοί κι εντάσσονται στην ομάδα των αυστηρά αερόβιων, αν και μπορούν να επιζήσουν και με ελάχιστο ή καθόλου O<sub>2</sub>. Απαντώνται πολύ συχνά στη φύση και γύρω μας, καθώς υπάρχει πληθώρα ειδών. Μορφολογικά χωρίζονται στους ζυμομύκητες (ζύμες), στους νηματοειδείς (μυκηλιακούς) και στους δίμορφους (Βελεγράκη, 2006). Σε αυτήν την εργασία θα ασχοληθούμε με έναν ζυμομύκητα και συγκεκριμένα με τον δημοφιλέστερο και πιο μελετημένο και γενετικά αναγνωρισμένο, τον *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1.2 Λίγα λόγια για τον *Saccharomyces Cerevisiae*

Ο *S. cerevisiae* απομονώθηκε πρώτη φορά από τον Emil Mrazek το 1938 από σαπισμένα σύκα. Έχει ελλειψοειδές, ωοειδές σχήμα και διάμετρο 5-10 μm. Το 1950, ο Robert Mortimer, μέσω γενετικών διασταυρώσεων, δημιούργησε το στέλεχος S288c, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση του γονιδιώματος του *S. cerevisiae* και μόλις το 1996 δημοσιεύτηκε ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδιώματος, το οποίο αποτελείται από 12.068 ζεύγη βάσεων σε δεκαέξι γραμμικά χρωμοσώματα.



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

- Βασίλειο: Μύκητες
- Φύλλο: Μυκόφυτα
- Κλάση: Ασκομύκητες
- Οικογένεια: *Saccharomycetaceae*
- Είδος: *Saccharomyces cerevisiae*

Η απλή δομή, η ταχεία ανάπτυξη, η πληθώρα του στη φύση, η εύκολη γενετική μεταχείριση, το ότι είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε πλέον ολόκληρο το γονιδίωμά του είναι κάποιοι από τους λόγους που έκαναν αυτόν τον ζυμομύκητα ευρέως γνωστό και διαδεδομένο τόσο, ώστε να μπορούμε να πούμε πως είναι ο πρώτος που έρχεται στο μυαλό στο άκουσμα της λέξης «ζυμομύκητας».

### **1.3 Η επικράτηση του *Saccharomyces Cerevisiae* σε εφαρμογές της επιστήμης**

Σήμερα, ο *S. cerevisiae* βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης έρευνας και εξέλιξης, όπως είναι η ιατρική, η επιστήμη και η τεχνολογία τροφίμων και ποτών (οινολογία, αρτοποιία κ), η βιοτεχνολογία, ο τομέας του περιβάλλοντος και των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και άλλοι.

Σημαντικότερη οικονομικά εφαρμογή στις μέρες μας είναι αυτή της παραγωγής βιοαιθανόλης, με τη βοήθεια της αλκοολικής ζύμωσης. Με το ενδιαφέρον όλων στραμμένο στην χρήση της αιθανόλης ως βιώσιμο και καθαρό καύσιμο για τις μεταφορές και στην οικονομική παραγωγή της, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη πηγές κυτταρίνης, τον τελευταίο καιρό έχει γίνει ένα κομβικό σημείο σημαντικής έρευνας και προσπάθειας ανάπτυξης σε παγκόσμιο επίπεδο (Outlawetal., 2005; Sanchez και Cardona, 2008; Walleetal., 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; Liu et al., 2008), ο οποίος συχνά καλείται ως ζύμη αρτοποιίας ή ως εκβλαστανούσα ζύμη-λόγω του τρόπου με το οποίο αναπαράγεται, την εκβλάστηση-και ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Συν τοις άλλοις, η ταχύτητα παραγωγής αιθανόλης και η ανθεκτικότητά του σε αυτήν, η οποία είναι μια ισχυρά τοξική ουσία για αρκετούς μικροοργανισμούς, είναι ίσως το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου ζυμομύκητα.

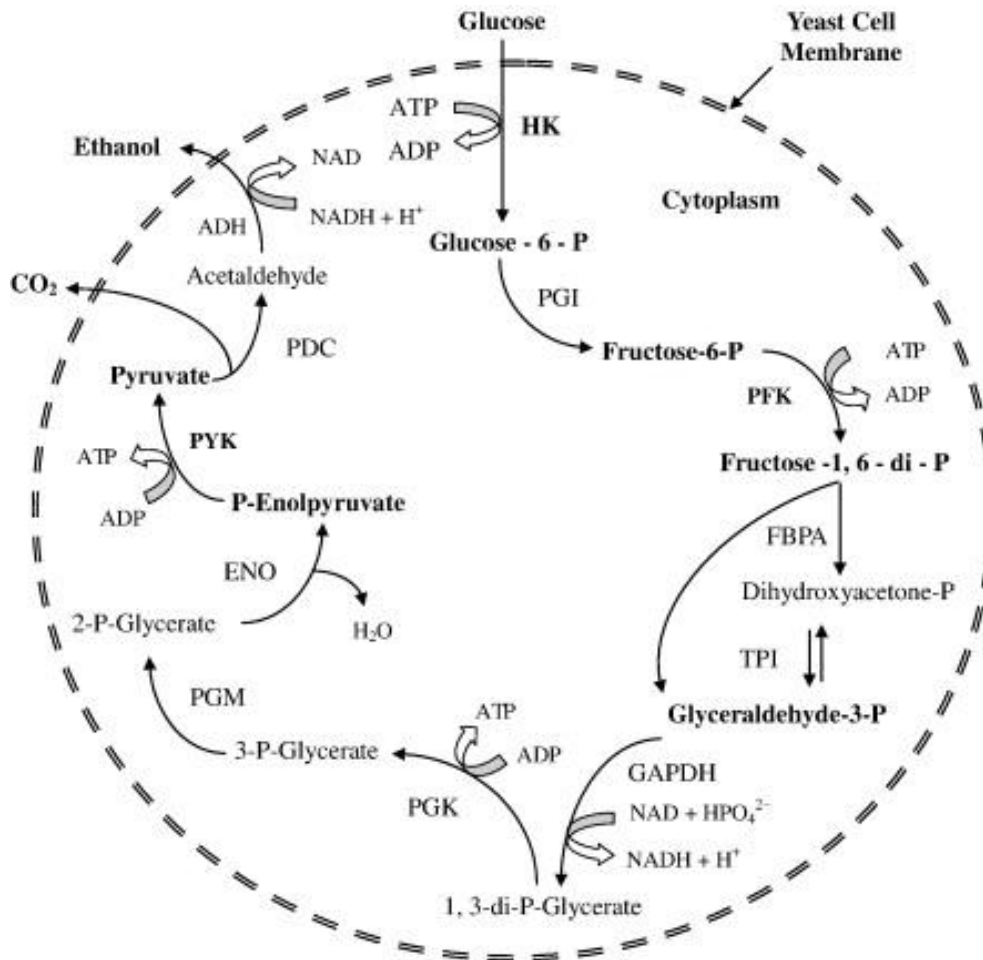
Εκτός από την ικανότητα ταχείας παραγωγής αιθανόλης σε μεγάλες ποσότητες, τα είδη του γένους *Saccharomyces* παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες που είναι δυνατόν να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η άνοδος της θερμοκρασίας είναι αποτέλεσμα της παραγωγή ενέργειας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

#### **1.4 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του *Saccharomyces cerevisiae* υπό συνθήκες στρες.-Οι MSN2/4 και ο ρόλος τους**

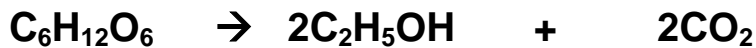
Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει σάκχαρα όπως η γλυκόζη, είτε εξ' ολοκλήρου σε CO<sub>2</sub> και νερό παρουσία οξυγόνου (αεροβίωση), είτε σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub> απουσία οξυγόνου (αναεροβίωση). Η πορεία η οποία χρησιμοποιείται από το κύτταρο είναι αυτή της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhoff) 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. 1.1).



**Σχήμα 1.1:** 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 (Baiaetal., 2008).



Γλυκόζη → αιθυλική αλκοόλη + διοξείδιο του άνθρακα

**Σχήμα1.2:** Αντίδραση γλυκόλυσης: 1 μόριο γλυκόζης αποδίδει 2 μόρια αιθανόλης και 2 μόρια CO<sub>2</sub>

Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι καλές ή ακόμη καλύτερα, οι βέλτιστες, η κυτταρική ανάπτυξη βρίσκεται στον μέγιστο ρυθμό της. Όταν όμως δεν είναι, τότε ενεργοποιούνται μηχανισμοί που οργανώνουν τις λειτουργίες του κυττάρου έτσι ώστε να ανταποκριθεί στις συνθήκες stress. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των κυττάρων περιλαμβάνουν αισθητήρες και μονοπάτια μεταγωγής σημάτων από το περιβάλλον, που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. 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). Ενώ 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).

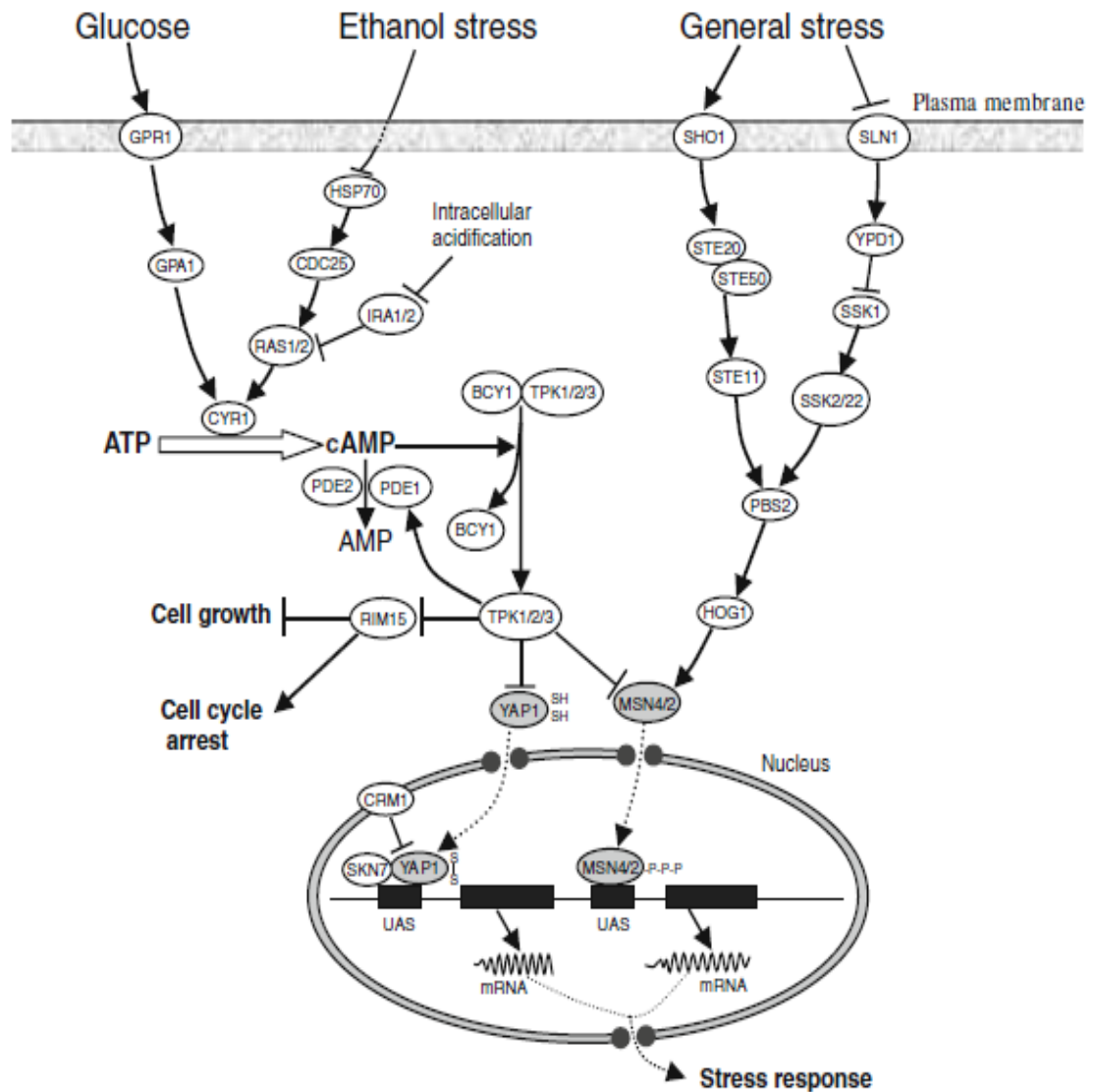
Όταν ο *S.cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η ρύθμιση της δραστηριότητας του μονοπατιού της cAMP (κυκλική

μονοφωσφορική αδενοσίνη) /PKA (πρωτεϊνική κινάση A) παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού κυττάρων ζύμης, που συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα.

Η PKA μπορεί να ενεργοποιηθεί σε απόκριση στην γλυκόζη από δύο παράλληλα μονοπάτια σηματοδότησης. Το πρώτο εμπλέκει τις Ras1 και Ras2 μικρές GTPάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσληψη γλυκόζης και την εν συνεχεία φωσφορυλίωση τους. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την Gpr1 (ένας υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες) και την Ga πρωτεΐνη του Gpa2. Και τα δύο αυτά μονοπάτια συγκλίνουν προς την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή του κυκλικού AMP(cAMP) (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Gancedo, 2008).

Η ενεργοποίηση της PKA έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση. Συνεπώς, αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ενδοκυττάριους 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-Pastoretal., 1996; Schmitt και McEntee, 1996).

Ως STRE ορίζονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στους προαγωγείς των γονιδίων στόχων και οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από τους MSN2 και MSN4 μεταγραφικούς παράγοντες, δεσμεύονται πάνω σε αυτές και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Οι MSN2 και MSN4 είναι δύο ομόλογες, κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική απόκριση σε συνθήκες stress, μεταγράφοντας εκατοντάδες γονίδια μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες (Boy-Marcotte et al., 1998; Görner et al., 2002; Hasan et al., 2002; Kandror et al., 2004). Οι MSN2/4 βρίσκονται στην καρδιά ενός πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει πολλές φυσικές και γενετικές αλληλεπιδράσεις με διάφορες κινάσες, φωσφατάσες, μεταφορείς και αναδιαμορφωτές χρωματίνης.



**Σχήμα 1.2.** Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες stress λόγω της γλυκόζης, της αιθανόλης και των γενικών περιβαλλοντικών συνθηκών στο *S. cerevisiae*. Σκιασμένοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι γραμμές που καταλήγουν με ένα βέλος δείχνουν θετική αλληλεπίδραση, και αυτές που καταλήγουν με μία κάθετη προς το βέλος γραμμή, δείχνουν αρνητική αλληλεπίδραση. Αυτό το διάγραμμα προσαρμόζεται με βάση τους Colombo et al. (1998), Estruch (2000), Costa και Moradas-Ferreira (2001), Hohmann (2002), Müller et al. (2003), και Nikolaou et al. (2009).

Οι MSN2/4 ενεργοποιούνται μετά την έκθεση της ζύμης σε μια ευρεία ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως παρουσία αζώτου ή έλλειψη άνθρακα, ωσμωτική πίεση, παράγοντες που προσβάλλουν το DNA δημιουργώντας κάποια μεταλλαγή σε μια βάση του, αιθανόλη και θερμική

καταπόνηση (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001). Διαφορετικοί κυτταρικοί αισθητήρες παρακολουθούν τον εξωκυττάριο χώρο, καθώς και το ενδοκυτταρικό περιβάλλον του ζυμομύκητα, που οδηγεί στην εξαρτώμενη από το stress ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των MSN2/4. 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 σημαντικά μετά από την έκθεση της σε ποικίλες συνθήκες stress (Martinez-Pastor et al., 1996; Hasan et al., 2002; Kandror et al., 2004).

### **1.5 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον.**

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

#### **1. Φυσικοίπαράγοντες**

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

#### **2. Χημικοίπαράγοντες**

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

#### **3. Βιολογικοίπαράγοντες**

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

Από τους παραπάνω παράγοντες, αυτοί που έχουν μελετηθεί

εκτενέστερα και θεωρούνται οι πιο σημαντικοί είναι η παρουσία της αιθανόλης στο μέσο και η οσμωτική πίεση .

### 1.5.1 Η επίδραση της αιθανόλης.

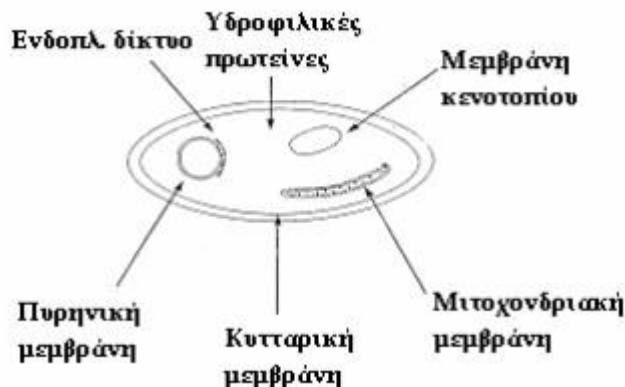
Η αιθανόλη θεωρείται ως μια άκρως τοξική ουσία για τα κύτταρα. Έτσι, όταν συγκεντρώνεται στο θρεπτικό υλικό, δρα ως χημικός στρεσογόνος παράγοντας. Οι συγκεντρώσεις που έχουν αποδειχθεί τοξικές για τα κύτταρα των ζυμών είναι 8-18% αναλόγως το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας. Σε συγκέντρωση 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μειώνεται και η μετακίνηση αμινοξέων και ιόντων, καθώς και μερικών αμινοξέων. Σε συγκεντρώσεις 11% περίπου, η ζύμωση καταστέλλεται πλήρως (Glazer and Nikaido, 1995).

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

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

Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διάφορων στελεχών ζυμών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη (You *et al.*, 2003). Η κυτταρική μεμβράνη είναι ίσως ο σημαντικότερος στόχος της αιθανόλης στα διάφορα στελέχη του

*S.Cerevisiae*, χωρίς ωστόσο να είναι ο μοναδικός. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται μερικοί πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στο ζυμομύκητα.



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

### 1.5.2 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.

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

Η έκθεση των στελεχών του *S. cerevisiae* σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου, λόγω εκροής νερού. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί μέρος ενός συνόλου πολύπλοκων αντιδράσεων (Marechal and Gervais, 1994; Meikle *et al.*, 1988). Ωστόσο, η παρουσία της γλυκερόλης στο μέσο, μιας ουσίας που παράγεται φυσικά ως δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζυμώσεως, εξισορροπεί την ωσμωτική πίεση σε ένα βαθμό. Σε περιπτώσεις αυξημένης ωσμωτικής πίεσης, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων που δίνουν σήμα για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση (Brewster *et al.*, 1993; Schuller *et al.*, 1994; Hirayama *et al.*, 1995).

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

### 1.6.1 Αρχή λειτουργίας αντίδρασης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) είναι μία απλή, ανέξοδη και γρήγορη *invitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφευρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι'αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993 (Βερβερίδης, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο (Βερβερίδης, 2003).

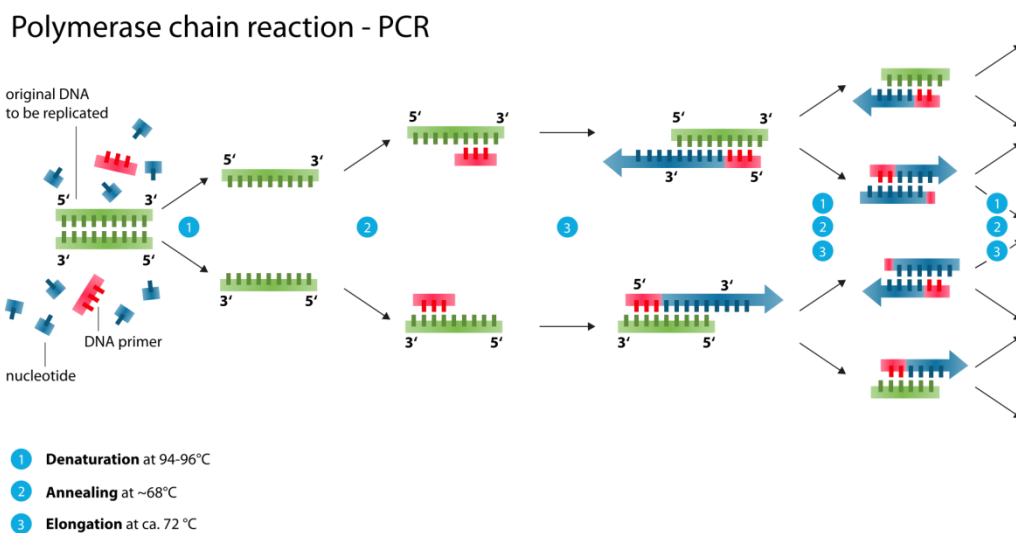


**Εικόνα 1.1:**Θερμικός κυκλοποιητής (thermalcycler)



Τα στάδια ενός πλήρους κύκλου PCR είναι

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation):  
Το εκμαγείο υποβάλλεται σε θερμοκρασία τουλάχιστον 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA.
2. Προσαρμογή των εκκινήτων στο DNA εκμαγείο (annealing):  
η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση των εκκινήτων με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα.
3. Επιμήκυνση (extension):  
η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινήτων, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.



**Σχήμα 1.4:** Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Όλα τα στάδια επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο, δίνοντας τον αριθμό των αντιγράφων που επιθυμούμε.

### 1.6.2 Εκκινήτες και DNA Πολυμεράση

Φυσικά, πέραν των θερμοκρασιών και του αρχικού μορίου DNA, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν και οι εκκινητές και η πολυμεράση. Οι εκκινητές (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA, αφορούν τις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράσης την σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος και έχουν την ίδια θερμοκρασία υβριδοποίησης. Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που βοηθάει στην σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους.

Η πρώτη DNA πολυμεράση απομονώθηκε από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72- 80°C, διατηρώντας επαρκή ενζυμική δραστηριότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Ορισμένα από τα παράγωγα της Taq πολυμεράσης που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι η fast start polymerase, η pfu DNA polymerase, η Vent Polymerase η HiFi polymerase. Αυτές οι πολυμεράσες εμφανίζουν μικρότερη συχνότητα ενσωμάτωσης εσφαλμένης βάσης (εμφανίζουν μεγαλύτερη πιστότητα) κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι'αυτό υπάρχει αυξημένη πιθανότητα παραγωγής προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (Berg et al., 2002).

Μέσα στο διάλυμα που λαμβάνει χώρα η PCR, εκτός του εκμαγείου, των εκκινητών και της πολυμεράσης, χρειάζονται ακόμη κάποια απαραίτητα συστατικά για την πραγματοποίηση της αντίδρασης: τα dNTP's τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxy nucleotide triphosphates) που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) που απαιτούνται για την εμφάνιση ενζυμικής δραστηριότητας της DNA

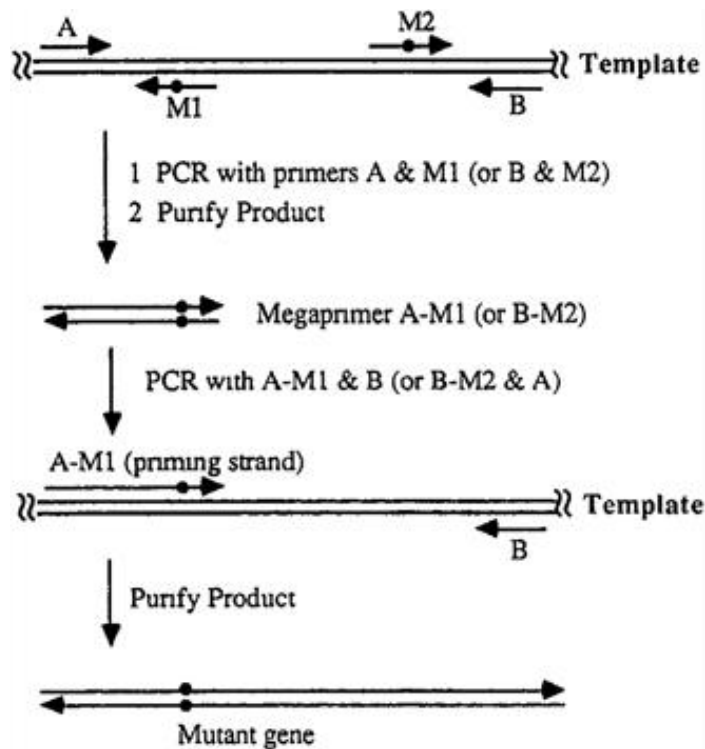
πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA και τα αντίγραφα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο (Λαζανάκη 2010).

Τέλος, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, παρουσία δείκτη (μάρτυρας) με γνωστά μοριακά βάρη. Με αυτόν τον τρόπο διαπιστώνουμε αν τα αποτελέσματα της PCR είναι τα αναμενόμενα. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή τους με GelRed ή με Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide) τα οποία φθορίζουν έντονα ύστερα από έκθεση τους σε υπεριώδεις ακτίνες UV.(Hunt, 2006).

## 1.7 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR

### 1.7.1 Μεθοδολογία Μέγα-Εκκινητή (MEGAPRIMER)

Η ολιγονουκλεοτιδική κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιείται συνήθως για να εισαχθούν επιθυμητές μεταλλάξεις σε στοχευμένες αλληλουχίες DNA. Μια ποικιλία πρωτοκόλλων έχουν καθιερωθεί για να επιτευχθεί αποτελεσματική μεταλλαξιγένεση, συμπεριλαμβανομένων αρκετών που χρησιμοποιούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Saiki et al., 1985). Μεταξύ των πρωτοκόλλων με βάση την PCR, η μέθοδος «megaprimer» που εισήγαγαν οι Kammann et al. (Kammann et al., 1989), και τροποποιήθηκε μεταγενέστερα από τους Sarkar και Sommer (Sarkar και Sommer 1990, 1992) και Landt et al. (Landt et al., 1990), φαίνεται να είναι ιδιαίτερα απλή και αποδοτική. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει δύο γύρους PCR που χρησιμοποιούν δύο “συνοδευτικούς (ή πλευρικούς)” εκκινητές οι οποίοι δεσμεύονται στο 5' και 3' άκρο του προς μετάλλαξη γονιδίου και έναν εσωτερικό μεταλλαξιγόνο εκκινητή που περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη υποκαθιστώντας τις απαραίτητες βάσεις. Η πρώτη PCR πραγματοποιείται με τη χρήση του μεταλλαξιγόνου εσωτερικού εκκινητή και τον πρώτο συνοδευτικό εκκινητή. Το προϊόν αυτής της πρώτης PCR είναι ο λέγόμενος “Μεγα-εκκινητής (megaprimer)”, καθαρίζεται και χρησιμοποιείται ως εκκινητής στη δεύτερη PCR μαζί με τον δεύτερο συνοδευτικό εκκινητή. Το τελικό προϊόν της PCR περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA.

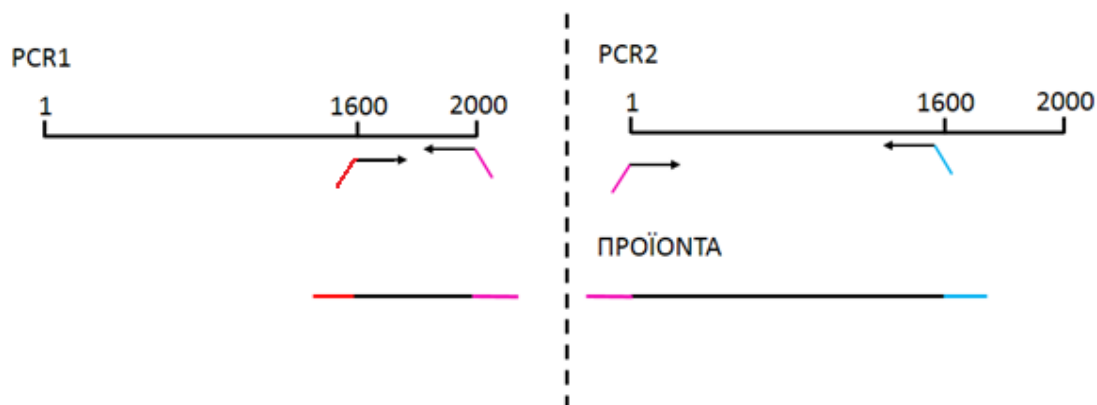


**Σχήμα 1.5:** Κατευθυνόμενη μεταλλαγμένηση μέσω της μεθόδου Megaprimer. Οι εκκινητές A, B, M1 και M2 (όπως και η εκκινητήρια γραμμή του megaprimer A-M1) συμβολίζονται από μονές γραμμές που καταλήγουν σε βέλος. Οι διπλές γραμμές αντιπροσωπεύουν το εκμαγείο. Οι τελείες στο M και M2 υποδηλώνουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις (αντικατάσταση, εισαγωγή, διαγραφή) που θα εισαχθούν στο προϊόν μέσω του megaprimer (Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer).

## 1.7.2 Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR

### 1.7.2.1 PCR 1

Η πρώτη PCR γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο που υβριδοποιείται στο τέλος του γονιδίου στόχου και φέρει καθοδικά στο 3' άκρο του την κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζεται από περιοριστική ενδονουκλεάση για την μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου (PCR Primer- Laboratory manual).



**Σχήμα 1.6:** Περιγραφή της PCR1 και PCR2. Στην PCR1 ο εμπρόσθιος εκκινητής που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη έχει κόκκινο άκρο, ενώ ο ανάστροφος εκκινητής έχει μωβ άκρο. Στην PCR2 ο εμπρόσθιος εκκινητής έχει μωβ άκρο, ενώ ο ανάστροφος εκκινητής που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη έχει γαλάζιο άκρο.

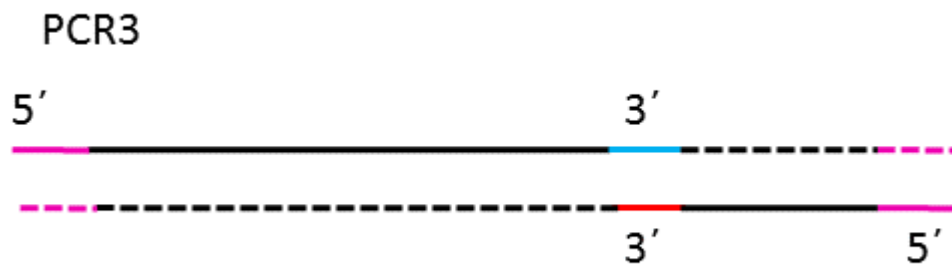
### 1.7.2.2 PCR 2

Η δεύτερη PCR (Σχ. 1.6) γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverseprimer) χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forwardprimer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο που υβριδοποιείται στην αρχή του γονιδίου στόχου και φέρει ανοδικά στο 5' άκρο του κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζεται από περιοριστική ενδονουκλεάση για μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου (PCRPrimer- Alaboratorymanual).

### 1.7.2.3 PCR 3

Η τρίτη PCR γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα προϊόντα της πρώτης και της δεύτερης PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται οι προαναφερθέντες που φέρουν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Κατά την διάρκεια του πρώτου κύκλου της τρίτης PCR, αρχικά στους 95°C τα δίκλινα προϊόντα των δυο προηγούμενων PCR αποδιατάσσονται. Στη συνέχεια σε χαμηλότερη θερμοκρασία επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση. Από τους δυο δυνατούς συνδυασμούς μόνο ο ένας είναι δυνατόν να συνεχίσει. Αυτό συμβαίνει διότι η DNA πολυμεράση μπορεί και διαβάζει μόνο με κατεύθυνση 3'→5' και συνθέτει με κατεύθυνση 5'→3'. Έτσι η επιμήκυνση σε θερμοκρασία 72°C συμβαίνει μόνο για την περίπτωση που περιγράφεται στο Σχ. 1.7. Το αποτέλεσμα της επιμήκυνσης είναι η δημιουργία εκμαγείου που θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι επόμενοι κύκλοι της PCR θα πολλαπλασιάσουν το εκμαγείο αυτό (PCRPrimer- Alaboratorymanual).



**Σχήμα 1.7:** Η τρίτη PCR κατά την οποία συντίθεται το προϊόν που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη.

### 1.7.3 Εισαγωγή της μετάλλαξης στη ζύμη- Μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου *DpnI*.

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

Μέσω της μεθόδου με την χρήση του ενζύμου *DpnI* αναλόγως με το επιθυμητό αποτέλεσμα τα στάδια που ακολουθούνται με αυτή την μέθοδο είναι τα εξής (Σχ. 1.8, 1.9):

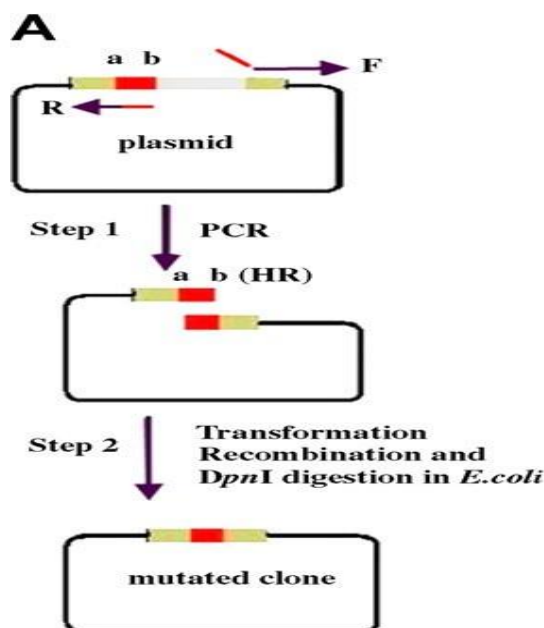
- A. Διαγραφή αλληλουχίας. Η αλληλουχία στόχος για διαγραφή συμβολίζεται με γκρί καθώς οι πλευρικές περιοχές συμβολίζονται με ανοιχτό καφέ και κόκκινο. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που υβριδοποιούν την κάθε αλυσίδα του κλώνου ώστε να διαγράψουν την αλληλουχία στόχο συμβολίζονται με βέλη στο σχήμα 1.7. Δεκαπέντε νουκλεοτίδια με 5' άκρο ως προς την αλληλουχία στόχου προς



διαγραφή συμβολίζονται με «a-b» και θα πρέπει να περιέχονται στον primerF, αντίστοιχα.

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

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

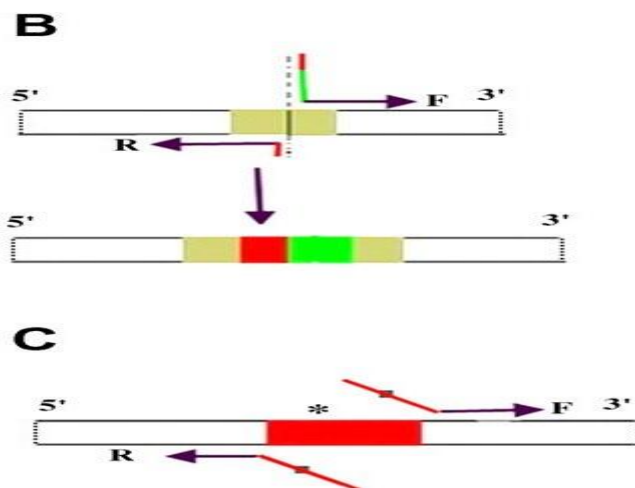


**Σχήμα 1.8 :** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μεταλλαξεγένεσης για διαγραφή τμήματος του κλωνοποιημένου γονιδίου με πέψη του προϊόντος τηςPCRμε το ένζυμο *DpnI*και εισαγωγή τουσε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

B. Εισαγωγή αλληλουχίας στόχου. Για απλοποίηση μόνο οι αρχικές ακολουθίες και τα τελικά προϊόντα εισαγωγής απεικονίζονται. Η

αλληλουχία εισαγωγής συμβολίζεται από ένα κόκκινο και πράσινο ορθογώνιο (Σχήμα 1.8). Οι αλληλουχίες των primers που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη και θα υβριδοποιήσουν την κάθε αλυσίδα βρίσκονται στην θέση πρόσδεσης τους αντίστοιχα. Η αλληλουχία που επρόκειτο να εισαχθεί είναι ενσωματωμένη στο 5' άκρο του εκκινητή F. Ο primer R περιέχει στο 5' άκρο συμπληρωματικό ως προς 15 νουκλεοτίδια του primer F. Στο σχήμα 1.8 υποδεικνύεται από την κόκκινη γραμμή. Το τελικό προϊόν με την εισαγόμενη μετάλλαξη συμβολίζεται με πράσινα και κόκκινα ορθογώνια η οποία δημιουργήθηκε ύστερα του μετασχηματισμού.

- C. Σημειακή μετάλλαξη. Μόνο οι αρχικές θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών παρουσιάζονται. Η περιοχή που επρόκειτο να μεταλλαχτεί συμβολίζεται με ένα κόκκινο ορθογώνιο καθώς και η θέση-στόχος συμβολίζεται με αστερίσκο. Τέλος τα επιθυμητά νουκλεοτίδια που πρόκειται να εισαχθούν, συμβολίζονται με μαύρες κουκίδες, ενσωματώνονται στην επικαλυπτόμενη περιοχή των εκκινητών. Τα προϊόντα που φέρουν την μετάλλαξη έχουν δημιουργηθεί μέσω ενισχυμένης PCR με την διαγραφή της αλληλουχίας-στόχου.



**Σχήμα 1.9 :** Σχηματική απεικόνιση με τον τρόπο που γίνεται η εισαγωγή της μετάλλαξης με την διαγραφή της αλληλουχίας στόχου (Jing *et al.*, 2007).

## 2.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

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 MSN4 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 MSN4 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 Ser533 είναι πιθανώς ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο της MSN4 στον πυρήνα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία της μετάλλαξης Ser533Ala επί του γονιδίου MSN4 μέσω της διαδικασίας της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR, η εισαγωγή της συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής του MSN4 γονιδίου στα κύτταρα του ζυμομύκητα και η πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση της απόκρισής τους σε αντίξοες συνθήκες.

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

παραγωγή αιθανόλης. Η ταυτόχρονη αύξηση της απόδοσης των στελεχών αυτών θα μπορούσε να είναι ένα μετέπειτα πιθανό θέμα μελέτης.

### 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

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

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

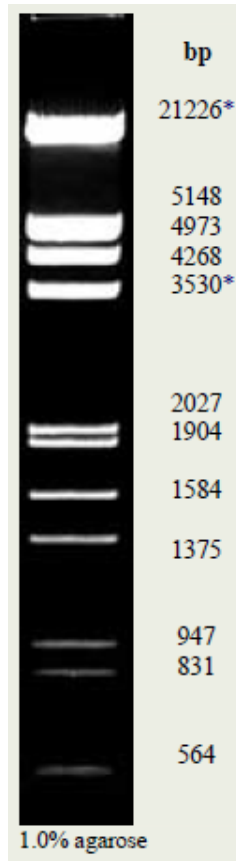
	Αντιδραστήρια	Εταιρία	Κωδικός
1	Gel red	Biotium	41003
2	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
4	Οξικόλιθιο (Lithium Acetate dihydrate)	AppliChem	A3478
5	Tris ultrapure	Duchefa Biochemie	T1501.1000
6	Οξικόοξύ (Glacial Acetic Acid)	Penta	607002006
7	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	Lab M	MC001
8	Bacto Peptone		
9	Γλυκόζη (Glucose)	Sigma-Aldrich	G7021
10	Agar Agar	Serva	11392
11	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Sigma-Aldrich	Y0626-250G
12	Ασπαραγίνη	AppliChem	A3721
13	Γλουταμινικό οξύ	AppliChem	A3712
14	Λευκίνη	AppliChem	A3496
15	Τυροσίνη	Sigma-	T3379

		Aldrich	
16	Βαλίνη	Merk	1084950100
17	Φαινυλαλανίνη	Serva	32191
18	Ασπαραγινικό οξύ	AppliChem	A3715
19	Αργινίνη	AppliChem	A3709
20	Αδενίνη	AppliChem	A0939
21	Ισολευκίνη	AppliChem	A3677
22	Θρεονίνη	AppliChem	A3946
23	Κυστεΐνη	AppliChem	A3694
24	Προλίνη	Sigma- Aldrich	81710
25	Τρυπτοφάνη	Sigma- Aldrich	T8941
26	Λυσίνη	Sigma- Aldrich	L9037
27	Μεθειονίνη	Sigma- Aldrich	M5308
28	Γλουταμίνη	AppliChem	A3734
29	Αλανίνη	Serva	11482
30	Σερίνη	Sigma- Aldrich	84960
31	Ιστιδίνη	AppliChem	A3719
32	Γλυκίνη	Serva	56406
33	Τρυπτόνη	Lab M	MC005
34	Ουρακίλη	AppliChem	A0667
35	Χλωριούχο Νάτριο		
36	Υδροξείδιο του Νατρίου		
37	Αιθυλεν-δι-αμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA)		
38	Triton X-100		
39	RNAάση		
40	Ισοπροπανόλη	Penta	603117000
41	Καπα HiFi HotStart ReadyMix	Καπα	KK2601

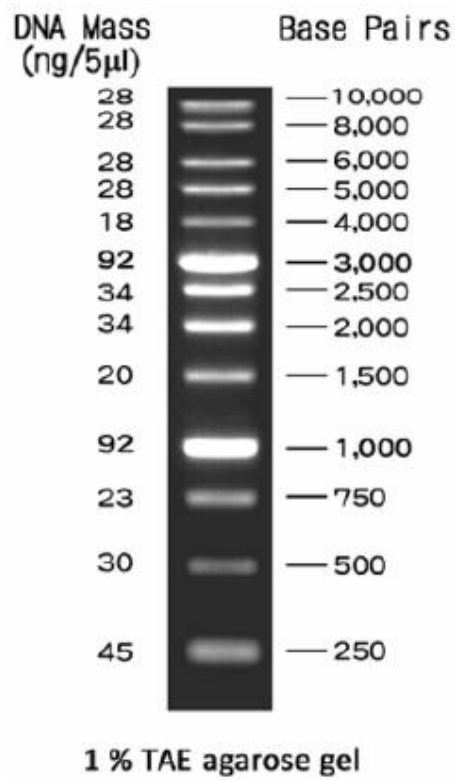
		Biosystems	
42	Taq polymerase ReadyMix	Kapa	KK1006
		Biosystems	
43	MgCl <sub>2</sub>		
44	Dntps		
45	Αμπικιλίνη (Ampicillin sodium salt)	Biochemica	A0839
46	Nucleospin PCRClean-up & Gel Extraction kit	Macherey-Nagel	740609.50
47	Nucleospin Plasmid kit	Macherey-Nagel	740588.50
48	Περιοριστική Ενδονουκλεάση PstI	Takara	1073A
49	Περιοριστική Ενδονουκλεάση EcoRI	Takara	1040A
50	Περιοριστική Ενδονουκλεάση BamHI	Takara	1010A
51	Περιοριστική Ενδονουκλεάση HindIII	Takara	1060AH
52	DpnI	BioLabs	R0176S
53	5-FOA (5-FluorooroticAcid) (5-φθόρο-οροτικόξύ)	Thermo Scientific	R0811
54	SDS (Μετά νατρίου άλας του Θειϊκού Δωδεκακυκλίου)	Sigma-Aldrich	L3771
55	Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 4000)	AppliChem	A1249
56	Carrier DNA (Salmon Sperm)		A2160,0001
57	T4 DNA λιγάση	Takara	2011A
58	10X Loading buffer	Takara	
59	Γλυκερόλη	Fisher Scientific	BP229
60	IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)		

<b>61</b>	X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)		
<b>62</b>	pUC19 plasmid		
<b>63</b>	W303-1a Yeast Strain		
<b>64</b>	MOPS	Sigma-Aldrich	M1254
<b>65</b>	RbCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	R2252
<b>66</b>	CaCl <sub>2</sub>		
<b>67</b>	MnCl		
<b>68</b>	CH <sub>3</sub> COOK		
<b>69</b>	Λυσοζύμη		
<b>70</b>	BSA		
<b>71</b>	Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest	Sigma-Aldrich	D9281
<b>72</b>	1 kb DNA Ladder RTU	Nippon Genetics	MWD-1
<b>73</b>	CutSmart	BioLabs	B7204S





**Σχήμα 3.1:** Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest



**Σχήμα 3.2:** 1 kbDNA Ladder RTU

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

Εκκινητές (Primers)	Αλληλουχίες εκκινητών	Θερμοκρασίες Υβριδοποίησης
1 MSN4 Forward(pstI)	5'AAAAC TGCAGATGCTAGTCTTCGGA CCTAA 3'	Tm=58
2 MSN4 Reverse(BamHI)	5'CGGGATCCAAAATCACCGTGCTTTT TGTG 3'	Tm=58
3 MSN4 (Ser533Ala) Forward	5' AGAAAGTCGTCA <b>GCT</b> GTTAC 3'	Tm=50
4 MSN4 (Ser533Ala) Reverse	5' GTAAC <b>AGC</b> TGACGACTTTCT	Tm=50
5 Forward MSN4	5'CAGTTCGGCTTTTTTTTCTTTTCTTC TTATTA AAAACAATATA3'	Tm=58
6 Reverse MSN4	5'CCGTAGCTTGTCTTGCTTTTATTTGC TTTTGACCTTATTTTTT 3'	Tm=54
7 MSN4 (Ser533Ala) –New Forward	5'GAAGAAGAAAGTCGTCAGCTGTTAC TTTAAGTCCAAC3'	Tm=58
8 MSN4 (Ser533Ala) –NewReverse	5'GTTGGACTTAAAGTAACAGCTGACG ACTTTCTTCTTC3'	Tm=58

### 3.1.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Ακολουθεί αναφορά στα υλικά και τις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων. Η προσθήκη άγαρ γίνεται μόνο κατά την δημιουργία στερεών υποστρωμάτων σε τρυβλία Petri με τα αντίστοιχα θρεπτικά.

#### 3.1.1.1. YEP

**Πίνακας 3.3 :** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του YEP.

Yeastextract	10g
BactoPeptone	20g
Glucose	20g
Agar	20g
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	Μέχρι όγκου 1L

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

#### 3.1.1.2 SC

**Πίνακας 3.4:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του SC.

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

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στον αυτόκαυστο.

### 3.1.1.3 LB

**Πίνακας 3.5 :** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του LB.

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

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

### 3.1.1.4 Synthetic Complete (-U):

**Πίνακας 3.6** :Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του SyntheticComplete (-U).

Ασπαραγίνη (Asparagine):	2g
Γλουταμινικόξύ (Glutamate):	2g
Λευκίνη (Leucine):	4g
Τυροσίνη (Tyrosine):	2g
Βαλίνη (Valine):	2g
Φαινιλαλανίνη (Phenylalanine):	2g
Ασπαραγινικό οξύ(Aspartate):	2g
Αργινίνη (Arginine):	2g
Αδενίνη (Adenine):	1g
Ισολευκίνη (Isoleucine):	2g
Θρεονίνη (Threonine):	2g
Κυστεΐνη (Cysteine):	2g
Προλίνη (Proline):	2g
Τρυπτοφάνη (Tryptophan):	2g
Λυσίνη (Lysine):	2g
Μεθειονίνη (Methionine):	2g
Γλουταμίνη (Glutamine):	2g
Αλανίνη (Alanine):	2g
Σερίνη (Serine):	2g
Ιστιδίνη (Histidine):	2g
Γλυκίνη (Glycine):	2g

### 3.1.1.5 SC+URA+5-FOA

1. Προστίθενται 10 g agar σε 300 ml H<sub>2</sub>O σε κωνική φιάλη του 1 L με μαγνήτη και αποστείρωση.
2. Σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 195 ml H<sub>2</sub>O ακριβώς Προστίθενται τα ακόλουθα:
  - 3.35 g Yeast Nitrogen base without amino acids
  - 10 g Glucose
  - 1.15 g Amino Acids mix (w/o uracil)
  - 0.5 g 5-FOA
3. Θέρμανση του μείγματος με το 5-FOA πάνω σε θερμοαντική πλάκα στους 55-65°C, μέχρι να διαλυθούν όλα τα συστατικά πλήρως (περίπου 1 h).
4. Στη συνέχεια αποστειρώνεται με φιλτράρισμα μέσω φίλτρου πόρου 0,22 μm και το φιλτραρισμένο υλικό συλλέγεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60°C.
5. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης με το αποστειρωμένο agar πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και ανάδευση έως ότου η θερμοκρασία του μειωθεί έως τους 65°C.
6. Προσθήκη του αποστειρωμένου μείγματος 5-FOA καθώς και 5 ml από το αποστειρωμένο διάλυμα 100 X ουρακίλης (2 mg/ml). Όλες αυτές οι μεταγγίσεις υγρών στην κωνική γίνονται υπό στείρες συνθήκες.
7. Ακολουθεί μοίρασμα του υλικού σε τρυβλία petri.

Για την παρασκευή υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων δεν προστίθεται agar.

### 3.1.1.6 Παρασκευή 50xTAE

**Πίνακας 3.7 :** Αντιδραστήρια για την Παρασκευή του 50xTAE

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

### 3.1.1.7 Παρασκευή 1xTAE

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

## 3.2 Πειραματικές Πορείες

### 3.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης

1. Λήψη μιας μονήρους αποικίας από τρυβλίο petri ή φυγοκέντριση 200μl υγρής καλλιέργειας στα 15.000 xg για 3 min, απομακρύνοντας στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό (O.D.600≈0.4).
2. Επαναδιάλυση κυττάρων σε 100μl διαλύματος (200mM LiOAc, 1% SDS).
3. Επώαση για 5 min στους 70°C.
4. Προσθήκη 300μl απόλυτης Αιθανόλης και ισχυρή ανάδευση (vortex).
5. Φυγοκέντριση του DNA και των κυτταρικών υπολειμμάτων στα 15000xg για 3min.
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 200μl 70% αιθανόλης για έκπλυση ιζήματος.
7. Φυγοκέντριση για 2 min στα 15.000xg. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
8. Στέγνωμα ιζήματος για 2 min και στη συνέχεια προσθήκη 100μl H<sub>2</sub>O και επαναδιάλυση ιζήματος.
9. Φυγοκέντρωση στα 15.000xg για 15 sec ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
10. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και φύλαξη αυτού στους -20°C.
11. 1-4 μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.



### 3.2.2 Παρασκευή μάρτυρα

Πέψη του λ DNA με περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII, 37°C για 3h.

**Πίνακας 3.3:** Αντιδραστήρια για την παρασκευή του μάρτυρα.

λ DNA (60 μg)	200 μl
10x buffer (M)	40μl
EcoRI	12μl
HindIII	16μl
H <sub>2</sub> O	132μl
Σύνολο	400μl

Ακολουθεί προσθήκη 140 μl H<sub>2</sub>O και 60 μl 10 xloadingbuffer. Φυλάσσεται στους -20°C.

### 3.2.3 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v – Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων.

1. Αρχικά γίνεται διάλυση σε κωνική φιάλη 0,5 g αγαρόζης με 50 ml 1xTAE και θερμαίνεται μέχρι βρασμό του πηκτώματος. Αφού βράσει το διάλυμα μας προσθέτουμε 2,5 ml gel red και ανακινούμε .
2. Ύστερα τοποθετείται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται ο κατάλληλος applicator για την διάνοιξη μικρών οπών-πηγαδιών επάνω στο gel αγαρόζης. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμά μας τότε είναι έτοιμο για χρήση.
3. Τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος ορού (10 μl), στα οποία έχει προστεθεί η χρωστική ουσία, σε κάθε οπή του πηκτώματος αφού πρώτα γίνει απόχυση 1xTAE μέχρι να καλυφθεί το gel . Αντίστοιχα τοποθετείται και ο μάρτυρας.
4. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό και ακολουθεί η ανάπτυξη της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή ένταση ρεύματος περίπου 60 mA.
5. Έπειτα απο 30 λεπτά κατα την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται το πήκτωμα και τοποθετείται στη συσκευή απεικόνισης, η

οποία αποτελείται από μία πηγή UV ακτινοβολίας και φωτογραφική μηχανή και συνδέεται με υπολογιστή, έτσι ώστε να μας δώσει τα τελικά αποτελέσματα δηλαδή τον προσδιορισμό του μεγέθους των δειγμάτων που υπολογίζεται με σύγκριση του συντελεστή επιβράδυνσης αυτών σε σχέση με τα τμημάτων DNA του μάρτυρα.

### **3.2.4 Nucleospin gel extraction and PCR clean-up kit**

#### **3.2.4.1 PCR Clean-up**

1. Ρύθμιση όγκου με H<sub>2</sub>O έως 100μl. Προσθήκη στο δείγμα διπλάσιου όγκου διαλύματος NTI. (100μl δείγμα → 200μl NTI)
2. Τοποθέτηση του δείγματος εντός των στηλών και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος.
3. Προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200μl διαλύματος NT3.
4. Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρηση για 5min στα 11.000 xg για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
5. Έκλυση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (eppendorf) των 1,5ml. Προσθήκη 15-30μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1min. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 x g.

#### **3.2.4.2 Απομόνωση DNA από πηκτώματα αγαρόζης**

1. Αποκοπή τμήματος πηκτώματος που περιέχει το DNA καθορισμός του βάρους του τμήματος της πηκτής και μεταφορά σε καθαρό eppendorf. Για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης <2% w/v προστίθενται 200μl ρυθμιστικού διαλύματος NTI. Ακολουθεί επώαση δείγματος για 5-10min στους 50°C. Ανακίνηση δείγματος με vortex κάθε 2-3min μέχρις ότου το τμήμα του πηκτώματος διαλυθεί πλήρως.

2. Τοποθέτηση του δείγματος εντός των στηλών και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να διηθηθεί όλος ο όγκος του δείγματος.
3. Προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200μl διαλύματος NT3.
4. Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρηση για 5min στα 11.000 xg για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
5. Έκλυση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (eppendorf) των 1,5ml. Προσθήκη 15-30μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1min. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 x g.

### 3.2.5 Nucleospin Plasmid kit

1. Συλλέγονται 1-5ml μίας πλήρους καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* σε θρεπτικό μέσο LB με φυγοκέντρηση στα 11.000 xg για 30s και πλήρους απομάκρυνση του υπερκείμενου
2. Προσθήκη 250ml ρυθμιστικού διαλύματος A1 και πλήρους επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με ανάδευση (vortex) ή με χρήση της πιπέτας.
3. Προσθήκη 250ml ρυθμιστικού διαλύματος A2. Ήπια ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου έως 5min ή μέχρι το λύμα να γίνει διαυγές
4. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος A3. Πολύ καλή ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές.
5. Φυγοκέντρηση για 5min στα 11.000 xg σε θερμοκρασία δωματίου και μετάγγιση υπερκείμενου στη στήλη Nucleospin Plasmid.
6. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 xg. Απόρριψη διηθήματος και επανάληψη αυτού του βήματος, εάν απαιτείται, για το υπόλοιπο του προϊόντος λύσης.
7. Προσθήκη 600ml ρυθμιστικού διαλύματος A4 και φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 xg. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200ml διαλύματος NT3.
8. Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρηση για 5min στα 11.000 xg για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
9. Έκλουση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (ependorf) των 1,5ml. Προσθήκη 50ml ρυθμιστικού διαλύματος AE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1min. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 x g.

### 3.2.6 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας 100ml σε LB μέχρι  $OD_{550nm} \cong 0,55$ . Χρήση κωνικής φιάλης 2L για καλή ανάδευση.
2. Φυγοκέντριση για συλλογή κυττάρων 3000xg, 10min στους 4°C.
3. Επαναδιάλυση σε 28ml διαλύματος Tfb1 (Πίν. 3.8) και αφήνουμε για 25min στους 4°C.
4. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντριση 2500xg για 10min και επαναδιάλυση σε 6ml διαλύματος Tfb2(Πίν. 3.9).
5. Μοίρασμα σε κλάσματα των 400μl (για δυο μετασχηματισμούς) και τα φύλαξη στους -70°C.

**Πίνακας 3.8:**Παρασκευή διαλύματος Tfb1.

100mM	RbCl <sub>2</sub>	pH: 5,8 Προσαρμόστε το διάλυμα με 0,2MCH <sub>3</sub> COOH
50mM	MnCl <sub>2</sub>	
30mM	CH <sub>3</sub> COOK	
10mM	CaCl <sub>2</sub>	
15%	Glycerol	

**Πίνακας 3.9:**Παρασκευή διαλύματος Tfb2.

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

Δεν αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

Αποστειρώνεται με χρήση φίλτρου 0,22μm.

### 3.2.7 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων

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

### 3.2.8 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού

1. Εμβολιασμός 5ml θρεπτικού μέσου με μονήρη αποικία και ολονύκτια επώαση.
2. Φυγοκέντριση 1,5ml καλλιέργειας 10.000rpm, 1min, RT.
3. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού.
4. Επαναδιάλυση σε 0,7ml διαλύματος STET (Πίν. 3.10).
5. Έντονη ανάδευση.
6. Προσθήκη 10μl υδροξυζύμης 1mg/ml.
7. Τοποθέτηση eppendorfs στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 1min.
8. Φυγοκέντριση στα 10.000rpm για 10min ή λιγότερο σε RT.
9. Μεταφορά 430μl του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs.
10. Προσθήκη 400μl ισοπροπανόλης.
11. Τοποθέτηση των eppendorfs στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 10min.
12. Φυγοκέντριση σε 10.000rpm για 30min στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
13. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 70% Ethanol.
14. Φυγοκέντριση για 5min.

15. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη 20μl (H<sub>2</sub>O + RNase (100ng/μl)).

16. Επώαση σε RT για 5-10min.

Lysozyme Stock

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

**Πίνακας 3.10:** Παρασκευή STET buffer.

**100mM NaCl**

**10mM Tris-HCl pH:8**

**1mM EDTA pH :8**

**5% Triton X-100**

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

1. Εμβολιασμός 50ml καλλιέργειας ζύμης αργά το απόγευμα (για 5 μετασχηματισμούς).
2. Επόμενο πρωί όταν OD<sub>600</sub>=0.4-0.6 ~10<sup>7</sup> cells/ml-5\*10<sup>8</sup> cells/ml φυγοκέντριση σε 2.000 rpm για 5min στους 4°C.
3. Επαναδιάλυση σε 25ml αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O και φυγοκέντριση στους 4°C.
4. Επαναδιάλυση σε 1ml 10mM LiOAc (Οξικό Λίθιο), στον πάγο.
5. Μεταφορά σε erpendorf.
6. Φυγοκέντριση στις 4.000rpm για 30sec-1min στους 4°C.
7. Επαναδιάλυση σε 100mM LiOAc Τελικός όγκος=500 μl (κύτταρα+διάλυμα).
8. Μοίρασμα σε 5 erpendorfs (100μl).
9. Σύντομη φυγοκέντριση (4-5sec).
10. Επαναδιάλυση ιζήματος σε:
  - a. 240μl PEG(4000) 50%,
  - b. 36μl 1M LiOAc,
  - c. 10μl carrier DNA (10 μg/μl),
  - d. 74μl H<sub>2</sub>O+DNA (0.1-1μg).
11. Vortex 1min.
12. Επώαση στους 30°C για 30 min.

13. Επώαση στους 42°C για 15min.
14. Φυγκέντριση στις 2.000rpm για 1min.
15. Προσθήκη 200μl αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O και ήπια επαναδιάλυση.
16. Τοποθέτηση επί κατάλληλου στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία petri

### **3.2.10 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων**

Σε ένα errendorf γίνεται προσθήκη 800μl από την καλλιέργεια ζύμης ή βακτηρίων και 200μl γλυκερόλης. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και φύλαξη στους -80°C.

## **3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης**

### **3.3.1 Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιιεργειών**

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

### **3.3.2 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης**

Το μηχάνημα στο οποίο θα τοποθετηθούν τα δείγματα και θα αποδοθούν τα αποτελέσματα των καμπυλών που επιθυμούμε, ονομάζεται ELIZAREADER.

Οι συγκεντρώσεις όπου δοκιμάζονται για την ανάπτυξη τους τα διάφορα στελέχη ζύμης, είναι οι εξής: 2%, 15%.

Σε Errendorf των 2 ml τοποθετούνται 2ml θρεπτικού μέσου διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα



φρεσκοανεπτυγμένης καλλιέργειας από τα προς εξέταση στελέχη έτσι ώστε η απορρόφηση των δειγμάτων να έχει τιμή μικρότερη από 0,001.

Μεταφέρονται 100 μl από το κάθε δείγμα σε τουλάχιστον 2 θέσεις του πιάτου.

### **3.3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης**

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

Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής :

Σε κωνικές φιάλες των 100ml τοποθετείται θρεπτικό μέσο διαφόρων συγκεντρώσεων αιθανόλης. Οι κωνικές εμβολιάζονται με κατάλληλη ποσότητα των στελεχών και επωάζονται στους 30<sup>0</sup>C υπό ανάδευση. Προκειμένου να καταγραφεί η ανάπτυξη των κυττάρων με την πάροδο του χρόνου λαμβάνεται και καταγράφεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 600nm.

Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται κύτταρα αγρίου τύπου (W303-1a) και κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη Ser533Ala της πρωτεΐνης msn4 (W303-1a\_MSN4\_Ser533Ala).

## 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να επιτευχθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης Ser533Ala στην πρωτεΐνηMSN4, απαιτείται η τροποποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου MSN4 τροποποιώντας την τριπλέτα που αντιστοιχεί στο αμινοξύ Ser533.

### 4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης

#### 4.1.1 1<sup>η</sup>μέθοδος- μέθοδος “Mega-primer”

Αρχικά έγινε προσπάθεια εισαγωγής της εν λόγω μετάλλαξης με την μέθοδο του Mega-Primer. Χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pUC19-MSN4 στο οποίο βρίσκεται κλωνοποιημένο το αγρίου τύπου γονίδιο MSN4 και εφαρμόστηκε PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές με σκοπό την δημιουργία ενός μικρός τμήματος το οποίο θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Μια ενδεικτική PCR1 και το αντίστοιχο πρόγραμμα που τέθηκε βρίσκεται στους παρακάτω πίνακες.

**Πίνακας 4.1 :** Αντιδραστήρια για την PCR1

<b>pUC19- MSN4 for pcr</b>	2μl
<b>2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	10μl
<b>Primer MSN4-Ser-533-Ala F</b>	1μl
<b>Primer BamHI- MSN4- R</b>	1μl
<b>H2O</b>	6μl
<b>Σύνολο</b>	20μl

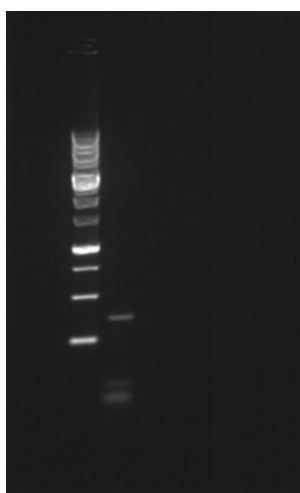
Πρόγραμμα για PCR1 :

1. 95 → 3min
2. 98 → 20sec
3. 50 → 15sec
4. 72 → 1min30sec      Βήμα 2, #30
5. 72 → 5min
6. 4 → ∞

Στόχος της 1ης PCR είναι να παραχθεί ένα θραύσμα με την επιθυμητή μετάλλαξη που εισάγεται, χρησιμοποιώντας έναν από τους πλευρικούς εκκινητές reverse primer (BamHI-MSN4-R) και έναν από τον μεταλλαγμένο εκκινητή forward primer (MSN4\_Ser-533-Ala-F).

Η τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη στη θέση 533 είναι η AGT. Ο εκκινητής MSN4\_Ser-533-Ala έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η αντικατάσταση της τριπλέτας που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη, στην τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ αλανίνη GCT.

Το προϊόν της PCR1 είναι ένα μικρό τμήμα DNA μεγέθους ~300 ζευγών βάσεων το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη (εικ. 4.1). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR1(εικ. 4.1).



**Εικόνα 4.1:** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR1 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στην θέση 2 βρίσκεται το προϊόν της PCR1.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR1 με τη χρήση του *Nucleospin PCR clean up kit* και ελέγχθηκε η καθαρότητά του με νέα ηλεκτροφόρηση.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το τμήμα DNA που προέκυψε από την πρώτη PCR, ως τον έναν εκκινητή “megaprimer”, έγινε προσπάθεια λήψης ολόκληρου του γονιδίου MSN4.

Έτσι λοιπόν, για τη δεύτερη PCR χρησιμοποιούμε πάλι ως εκμαγείο το πλασμίδιο pUC19- MSN4 όπου βρίσκεται κλωνοποιημένο το αγρίου τύπου γονίδιο MSN4 και εφαρμόζουμε PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται μια ενδεικτική PCR2 (πίν. 4.2).

**Πίνακας 4.2 :** Αντιδραστήρια για την PCR2

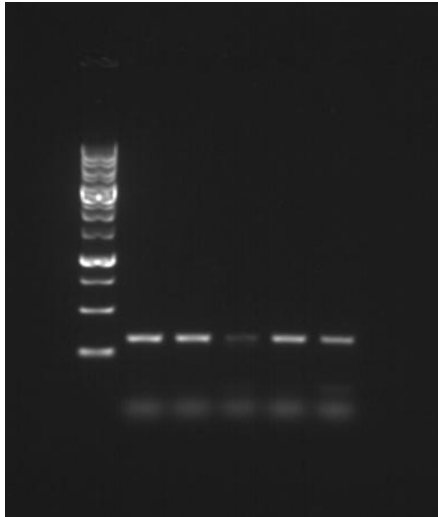
<b>pUC19- MSN4 for PCR1</b>	2μl
<b>MSN4-PCR1- R</b>	2μl
<b>pstI- MSN4- F</b>	1μl
<b>2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	10μl
<b>H2O</b>	5μl
<b>Σύνολο</b>	20μl

Πρόγραμμα PCR2 :

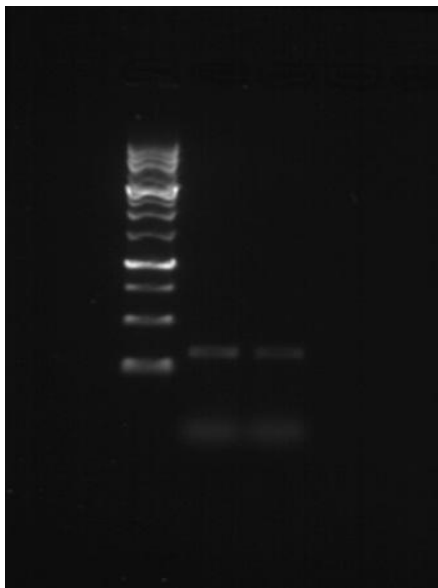
1. 98 → 3min
2. 98 → 20sec
3. 58 → 15sec
4. 72 → 1min30sec Βήμα 2, #25
5. 72 → 5min
6. 4 → ∞

Το προϊόν της PCR2 είναι ένα τμήμα DNA μεγέθους ~1900 ζευγών βάσεων το οποίο θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη και αντιστοιχεί σε όλο το γονίδιο MSN4.

Παρόλο που έγιναν πολλές προσπάθειες δοκιμάζοντας διαφορετικές κάθε φορά συγκεντρώσεις εκμαγείου, εκκινητών, καθώς και διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίες υβριδοποίησης, χρόνοι υβριδοποίησης, χρόνοι επιμήκυνσης), δεν κατέσται δυνατή η λήψη του επιθυμητού προϊόντος της PCR2. Στην Εικ.4.2, 4.3 παρουσιάζεται ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της PCR2.



**Εικόνα 4.2 :** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2 (σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης) σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2-6 βρίσκεται το προϊόν της PCR2 με τις ακόλουθες θερμοκρασίες υβριδοποίησης ( 53, 54, 55, 56, 57) .



**Εικόνα 4.3 :** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2 (σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης) σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2,3 βρίσκεται το προϊόν της PCR2 με τις ακόλουθες θερμοκρασίες υβριδοποίησης ( 58, 59) .

#### 4.1.2 2<sup>η</sup> μέθοδος- μέθοδος των τριών διαδοχικών PCR

Λόγω αποτυχίας της δημιουργίας του μεταλλαγμένου MSN4 με τη μέθοδο του Mega-primer έγινε προσπάθεια δημιουργίας του με τη μέθοδο των τριών διαδοχικών PCR. Σε αυτή τη περίπτωση η μεθοδολογία λήψης της πρώτης PCR καθώς και το προϊόν της παραμένει ως έχει (πίνακας 4.1). Η δεύτερη PCR γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης (MSN4). Στην προκειμένη περίπτωση, ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το pUC19-MSN4. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδιο MSN4-Ser-533-Ala-R το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο MSN4\_EGFP\_F το οποίο υβριδοποιείται στην αρχή του γονιδίου στόχου και φέρει ανοδικά στο 5' άκρο του κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση για μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου (Πιν. 4.3).

**Πίνακας 4.3:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR2

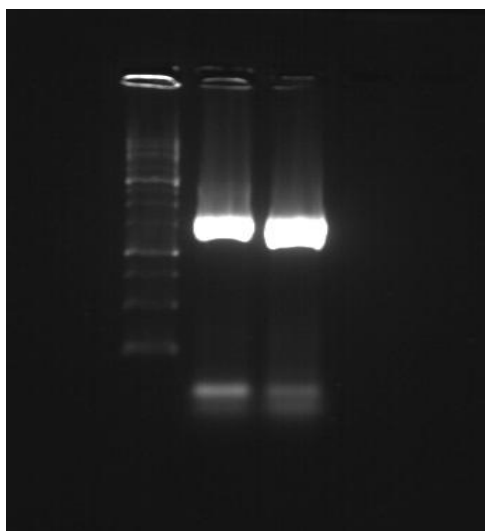
<b>pUC19-MSN4</b>	2μl
<b>Primer MSN4_EGFP_Forward</b>	1μl
<b>Primer MSN4_Ser532Ala_Reverse</b>	1μl
<b>2xKapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	10μl
<b>H2O</b>	6μl
<b>Σύνολο:</b>	20μl

Πρόγραμμα PCR2:

1. 95 → 3min
2. 98 → 10sec
3. 56 → 10sec
4. 72 → 1min20sec Βήμα 2, #30
5. 72 → 5min
6. 4 → ∞

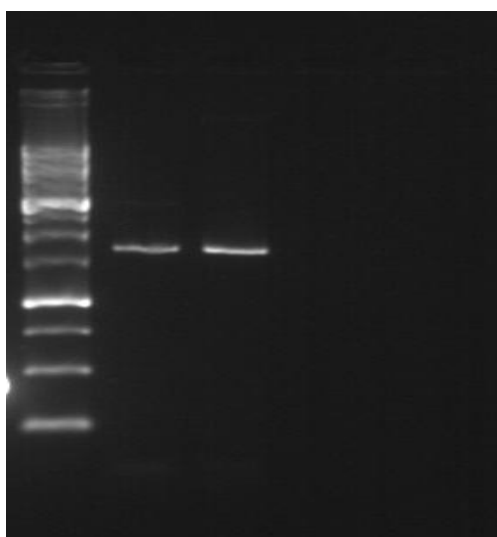
Το αποτέλεσμα από την παραπάνω διαδικασία είναι η δημιουργία ενός δεύτερου τμήματος μεγέθους ~1600 ζευγών βάσεων, του υπολοίπου, της MSN4 το οποίο επίσης φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη.

Η επιτυχία της λήψης του συγκεκριμένου τμήματος ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, (εικ. 4.4).



**Εικόνα 4.4** : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στην θέση 2,3 βρίσκεται το προϊόν της PCR2.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR2 με τη χρήση του *Nucleospin PCR clean up kit* και ελέγχθηκε η καθαρότητά του με νέα ηλεκτροφόρηση, (εικ. 4.5).



**Εικόνα 4.5 :** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στην θέση 2,3 βρίσκεται το προϊόν της PCR2 ύστερα του καθαρισμού.

Προκειμένου να ληφθεί ολόκληρο το γονίδιο της MSN4 το οποίο να φέρει τη μετάλλαξη Ser533Ala, (MSN4-Ser533Ala) εφαρμόστηκε τρίτη PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα προϊόντα της πρώτης και της δεύτερης PCR. Η τρίτη PCR γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα προϊόντα της πρώτης και της δεύτερης PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται οι προαναφερθέντες που φέρουν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι MSN4\_EGFP\_F και MSN4-R οι οποίοι υβριδοποιούνται στα άκρα του γονιδίου της MSN4 και φέρουν θέσεις αναγνώρισης των αντίστοιχων περιοριστικών ενδονουκλεασών (πίνακας 4.4).

**Πίνακας 4.4 :** Αντιδραστήρια για την PCR3

<b>DNA 1 (προϊόν PCR1)</b>	1μl
<b>DNA 2 (προϊόν PCR2)</b>	1μl
<b>PrimerMSN4_Reverse</b>	1μl
<b>PrimerMSN4_EGFP_Forward</b>	1μl
<b>2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	10μl
<b>H2O</b>	6μl
<b>Σύνολο:</b>	20μl

ΠρόγραμμαPCR3:

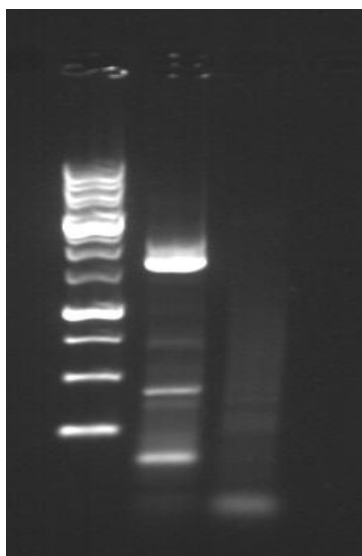
1. 95 → 3min
2. 98 → 10sec
3. 60 → 10sec
4. 72 → 2min
5. 98 → 10sec
6. 60 → 10sec
7. 72 → 2min Βήμα 5, #4
8. 98 → 10sec



9. 64 →10sec  
10. 72 →2min Βήμα 8, #25  
11. 72 →5min  
12. 4 →∞

\*Οι primers δεν προστίθενται από την αρχή, αλλά μετά το πέρας του βήματος 7 στο τέλος του πέμπτου κύκλου ως primersmix.

Στην 3<sup>η</sup> PCR συντίθεται το MSN4 φέροντας την μετάλλαξη Ser\_533\_Ala. Το προϊόν της PCR3 ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να φανεί η ορθότητά του αφού αναμένεται το μεγεθός του να είναι ~1900bp (Εικ. 4.6).



**Εικόνα 4.6** : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στην θέση 2 βρίσκεται το προϊόν της PCR3.

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR3 με τη χρήση του *NucleospinPCRcleanupkit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέονγονιδίου MSN4-Ser533Ala προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του.

Η ακεραιότητα των προϊόντων ελέγχθηκε χωρίς όμως να πάρουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Παρόλο που έγιναν πολλές προσπάθειες δοκιμάζοντας διαφορετικές κάθε φορά συγκεντρώσεις εκμαγείου, εκκινητών, καθώς και διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίες υβριδοποίησης, χρόνοι υβριδοποίησης, χρόνοι

επιμήκυνσης), δεν κατέσπει δυνατή η λήψη του επιθυμητού προϊόντος της PCR3.

#### 4.1.3 3<sup>η</sup> μέθοδος- πεψης με το ένζυμο *DpnI*.

Αφού έγιναν προσπάθειες κατασκευής του μεταλλαγμένου γονιδίου με την μέθοδο του Μέγα-εκκινητή και των τριών διαδοχικών PCR αλλά χωρίς να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα ακολουθήσαμε μια τρίτη μέθοδο μέσω της πέψης με το ένζυμο *DpnI* για την κατασκευή του μεταλλαγμένου γονιδίου.

Αρχικά το απομονωθέν πλασμίδιο pUC19\_MSN4 χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την δημιουργία του πλασμιδίου pUC19\_MSN4\_533 με PCR. Χρησιμοποιούνται ως εκκινητές οι MSN4\_533\_F και MSN4\_533\_R (πίνακας 3.2). Το προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μέγεθος ~4200bp.

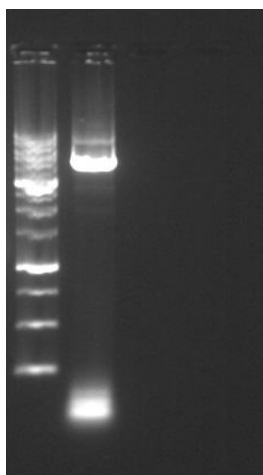
**Πίνακας 4.5** :Αντιδραστήρια για την PCR

<b>pUC19_MSN4</b>	4μl
<b>Primer MSN4_533_F</b>	1μl
<b>Primer MSN4_533_R</b>	1μl
<b>2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	10μl
<b>H2O</b>	4μl
<b>Σύνολο :</b>	20μl

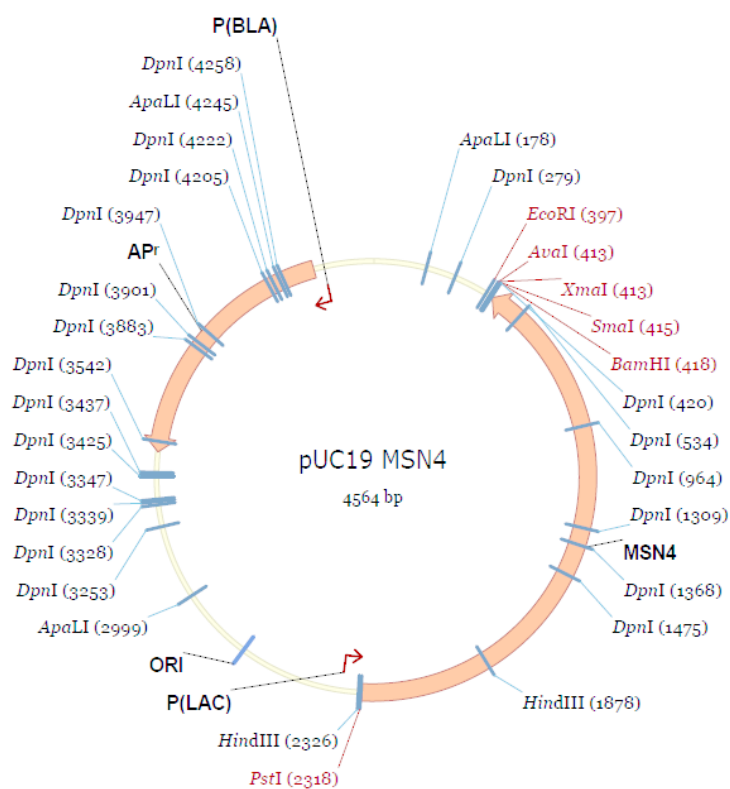
Πρόγραμμα PCR :

- 1.95 → 3min
- 2.98 → 15sec
- 3.64 → 10sec
- 4.72 → 2min15sec, Βήμα 2,#25
- 5.72 → 4min
- 6.4 → ∞

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



**Εικόνα 4.7 :** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το προϊόν της PCR.



**Σχήμα 4.1 :**Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19\_MSN4και οι θέσεις πέψης του ενζύμου *DpnI*.

Από το προϊόν αυτό της PCR 15μl θα υποβληθούν σε πέψη με το ένζυμο *DpnI*(πίνακας 4.6).

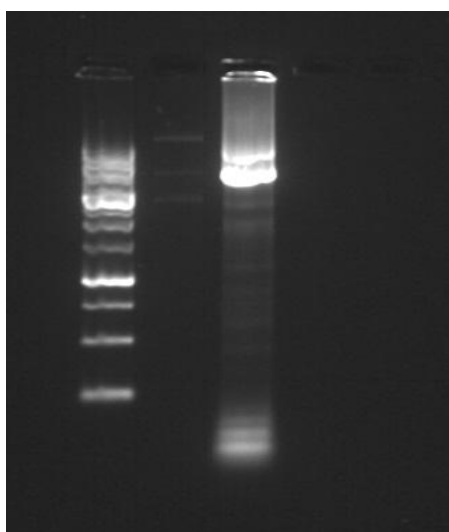
**Πίνακας 4.6 :** Το προϊόν της PCR υποβάλλεται σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *DpnI*. Επώαση στους 37οC για 1 h.

<b>Προϊόν PCR</b>	15μl
<b><i>DpnI</i></b>	1μl

Στο εκμαγείο που χρησιμοποιούμε (PUC19\_MSN4) υπάρχουν κάποιες *DpnI* θέσεις στις οποίες υπάρχουν μεθυλιώσεις διότι το πλασμίδιο αυτό έχει απομονωθεί από βακτήρια. Το προϊόν της παραπάνω PCR, παρόλο που φέρει ακριβώς τις ίδιες θέσεις δράσης του ενζύμου *DpnI* δεν υπάρχουν μεθυλιώσεις διότι κατά την PCR αυτές δεν λαμβάνουν χώρα.

Η *DpnI* δρα μόνο σε μεθυλιωμένο DNA ενώ το αμεθυλιώτο μένει ανέπαφο. Το αποτέλεσμα είναι το εκμαγείο DNA που δεν φέρει την μετάλλαξη να καταστραφεί ενώ το προϊόν που φέρει την μετάλλαξη να αφήνεται ανέπαφο διότι δεν είναι μεθυλιωμένο.

Η ακεραιότητα των προϊόντων της πέψης ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 4.9).



**Εικόνα 4.8 :** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2 το πλασμίδιο pUC19-MSN4 και στην θέση 2 το προϊόν της PCR ύστερα από πέψη.

Ακολούθησε μετασχηματισμός competent βακτηριακών κυττάρων 2 μl του προϊόντος της αντίδρασης και ακολούθησε τοποθέτηση αυτών σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού αμπικικιλίνη (100 μg/ml) για να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με το pUC19\_MSN4\_Ser533Ala από εκείνα που δεν μετασχηματίστηκαν. Ο μετασχηματισμός έγινε χρησιμοποιώντας ένα δείγμα control εκμαγείου και την χρήση του *DpnI* (πίν. 4.7) το οποίο δεν μας έδωσε αποικίες κατά τον μετασχηματισμό.

**Πίνακας 4.7 :** Αντιδραστήρια για την δημιουργία δείγματος control (εκμαγείου + *DpnI*) και επώαση για 2ώρες στους 37.

<b>pUC19_MSN4</b>	1μl
<b><i>DpnI</i></b>	1μl
<b>CutSmart Buffer</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	16μl
<b>Σύνολο :</b>	20μl

Μικρός αριθμός άσπρων αποικιών χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου LB και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα ακολουθεί η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες με τη μέθοδο βρασμού.

Ύστερα χρειάστηκε να γίνει πολλαπλασιασμός του μεταλλαγμένου γονιδίου της MSN4 που φέρει την μετάλλαξη μέσω της παρακάτω PCR(πίνακας 4.8). Προκειμένου το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN4 να αποκτήσει τις κατάλληλες αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η εισαγωγή του στο γενομικό DNA της ζύμης μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, έλαβε χώρα μια ακόμα αντίδραση PCR. Ως εκμαγείο

χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pUC19\_MSN4\_Ser533Ala και ως εκκινητές οι MSN4-EGFP-F και MSN4-R (πίν. 4.8). Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται το μεταλλαγμένο γονίδιο της MSN4 το οποίο έχει ίδια άκρα με την περιοχή που εντοπίζεται στο γενομικό DNA της ζύμης (αγρίου τύπου).

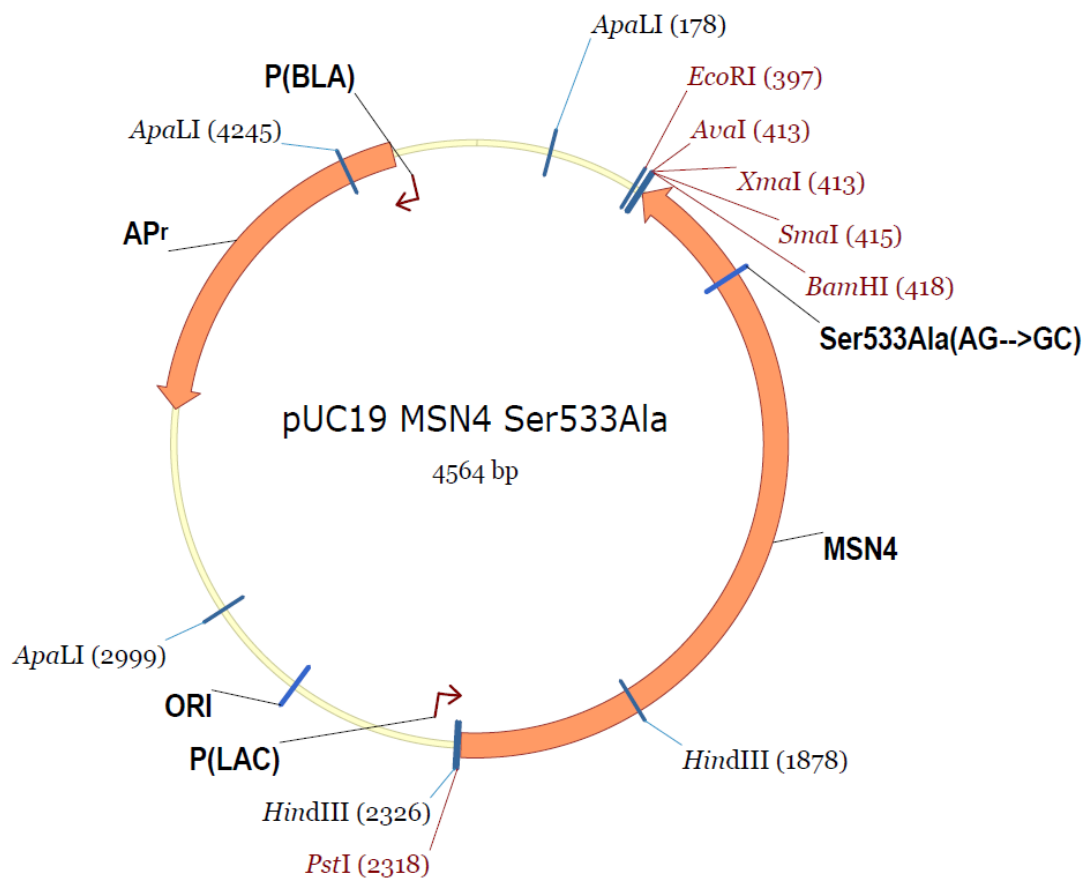
**Πίνακας 4.8 :** Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονίου *MSN4* που φέρει την μετάλλαξη.

<b>DNA (pUC19_MSN4_Ser533Ala)</b>	2μl
<b>Primer MSN4_EGFP_F</b>	1μl
<b>Primer MSN4_R</b>	1μl
<b>2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	10μl
<b>H2O</b>	6μl
<b>Σύνολο :</b>	20μl

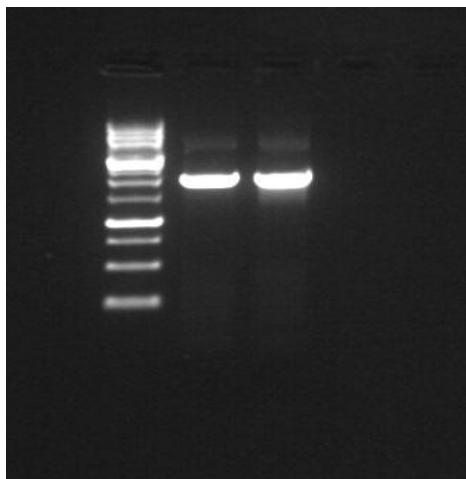
Πρόγραμμα PCR :

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

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR με τη χρήση του *NucleospinPCRcleanupkit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέονγονιδίου MSN4-Ser533Ala προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του.



Σχήμα 4.2 : Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19\_MSN4 με την μετάλλαξη Ser533Ala.



Εικόνα 4.9 : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας στην θέση 2, 3 το καθαρό προϊόν της PCR.

Το προϊόν αυτό θα χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό στα κύτταρα ζύμης ώστε να προκύψει το στέλεχος W303-1a με την μετάλλαξη Ser\_533\_Ala της πρωτεΐνης *MSN4*.



## 4.2 Απαλοιφή MSN4 αγρίου τύπου από κύτταρα ζύμης.

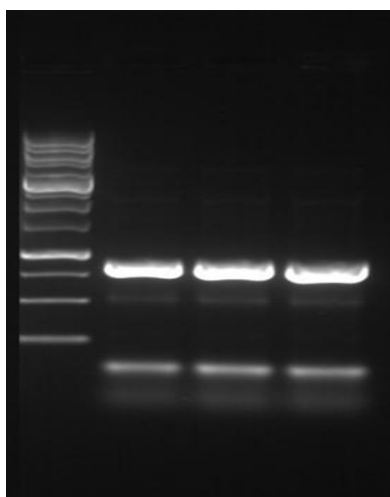
Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την αντικατάσταση ενός γονιδίου στο γενομικό DNA της ζύμης απαιτεί την τέλεση δυο διαδοχικών μετασχηματισμών και ομόλογων ανασυνδυασμών. Κατά τον πρώτο μετασχηματισμό τα κύτταρα ζύμης του στελέχους W303-1a, τα οποία δεν έχουν λειτουργικό γονίδιο URA3, μετασχηματίζονται με αγρίου τύπου γονίδιο URA3 το οποίο φέρει ανοδικά και καθοδικά αλληλουχίες όμοιες με αυτές που υπάρχουν στα ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου που επιθυμείται η απομάκρυνσή του (URA3\_MSN4). Απαιτείται λοιπόν η ενίσχυση του αγρίου τύπου γονιδίου URA3 με την χρήση των κατάλληλων εκκινήτων (Πίν. 4.7). Ως εκμαγείο χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pUC19-URA3. Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε για την ορθότητα του με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, απομονώθηκε η περιοχή του πηκτώματος όπου εντοπίζεται το προϊόν της PCR και καθαρίστηκε με το Nucleospin pcr clean up gel extraction kit και ηλεκτροφορήθηκε ξανά για τον έλεγχο της καθαρότητάς του (Σχ. 4.12).

Συνθήκες PCR URA3:

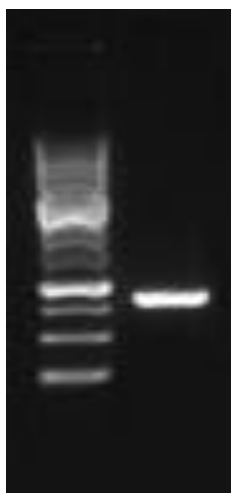
- |         |         |                    |
|---------|---------|--------------------|
| 1. 95°C | →3 min  |                    |
| 2. 95°C | →20 sec |                    |
| 3. 58°C | →15 sec |                    |
| 4. 72°C | →1 min  | →βήμα 2, #30 φορές |
| 5. 72°C | →5 min  |                    |
| 6. 4°C  | →∞      |                    |

**Πίνακας 4.7:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCRURA3:

<b>Genomic DNA από στέλεχος με 3 μl λειτουργικό το URA3 γονίδιο</b>	
<b>Primer MSN4_URA3_Forward</b>	<b>(10 1,5 μl pg/μl)</b>
<b>Primer MSN4_URA3_Reverse</b>	<b>(10 1,5 μl pg/μl)</b>
<b>2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix</b>	<b>25 μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>19 μl</b>
<b>Σύνολο:</b>	<b>50 μl</b>



**Εικόνα 4.10:** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCRURA3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στις θέσεις 2 έως 4 βρίσκεται το προϊόν της PCRURA3 χωρισμένο σε τρία ίσα μέρη.

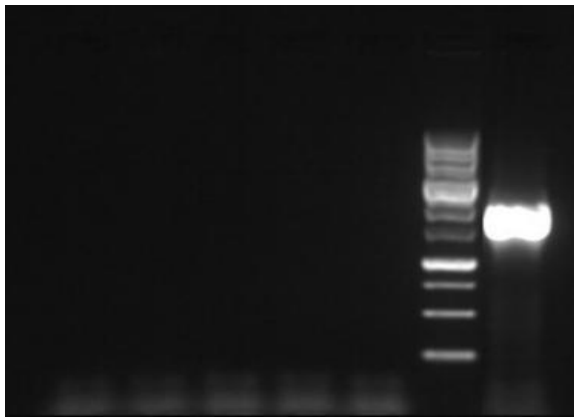


**Εικόνα4.11:** Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCRURA3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το καθαρό προϊόν της PCRURA3.

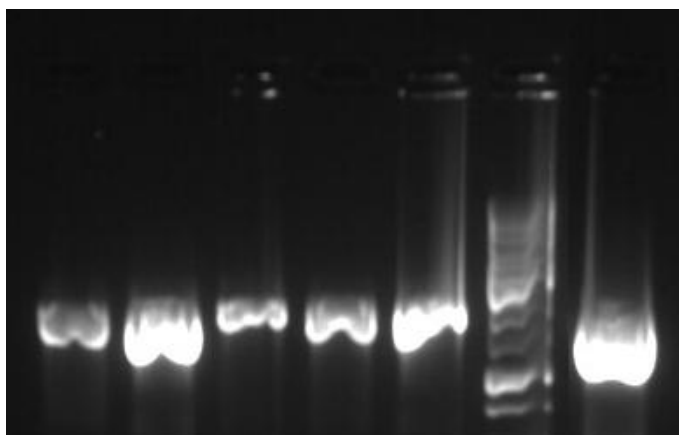
Το καθαρισμένο πλέον γονίδιο URA3\_MSN4 χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης W303-1a. Τα κύτταρα που υπεβλήθησαν στην διαδικασία του μετασχηματισμού, αρχικά αναπτύχθηκαν επί περιοριστικού θρεπτικού μέσου από το οποίο απουσίαζε το αμινοξύ ουρακίλη (Synthetic Complete – Uracil (SC-U)) σε θερμοκρασία 30°C. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν επί του περιοριστικού θρεπτικού μέσου πιθανόν να είναι αυτά που έχει γίνει η αντικατάσταση του αγρίου τύπου MSN4 από το URA3.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού και του ομόλογου ανασυνδυασμού αποικίες από το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου SC-U και επωάστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση. Από τις καλλιέργειες αυτές έγινε απομόνωση του γενομικού DNA με τη μέθοδο απομόνωσης γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης. Ο έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού έγινε στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, μέσω δυο αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιώντας την Taq polymerase, όπως έχει περιγραφεί στις πειραματικές μεθόδους. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη PCR οι PstI\_MSN2\_Forward και BamHI\_MSN2\_Reverse και στη δεύτερη οι PstI\_MSN4\_Forward και BamHI\_MSN4\_Reverse. Κατά την δεύτερη PCR αναμένεται να εμφανίσουν προϊόν όλα τα δείγματα σε μέγεθος ~1900bp, και

με αυτό τον τρόπο πιστοποιείται η επιτυχής απομόνωση του γενομικού DNA από τα κύτταρα ζύμης, ενώ κατά την πρώτη PCR αναμένεται να εμφανίσει προϊόν μόνο το δείγμα W303-1a το οποίο δεν έχει υποστεί μετασχηματισμό και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ότι επιτελέστηκε σωστά η PCR. Η απουσία προϊόντος από τα προς εξέταση δείγματα υποδηλώνει την απουσία του MSN4 γονιδίου άρα την επιτυχία της διαγραφής του. Ο ρόλος της δεύτερης PCR είναι να εξασφαλίσει ότι από τα προς εξέταση δείγματα έγινε σωστά η απομόνωση του γενομικού DNA. Τα αποτελέσματα γίνονται εμφανή στην ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Τα κύτταρα από τα οποία έχει απαληφθεί το MSN4 γονίδιο αγρίου τύπου φυλάσσονται ως stock στους -80oC.



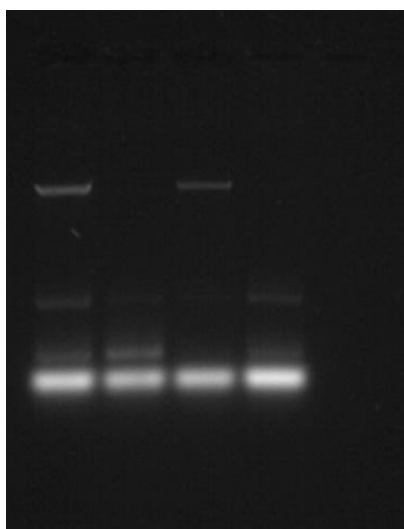
**Εικόνα 4.12:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taqpolymerase, με MSN2 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 1<sup>ου</sup> μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: 1<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 3<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 4<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 5<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, μάρτυρας, δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης W303-1a).



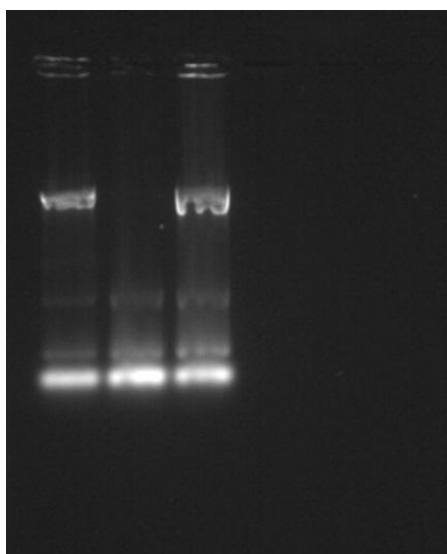
**Εικόνα 4.13:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taqpolymerase, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 1<sup>ου</sup> μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: 1<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 3<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 4<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 5<sup>ο</sup> δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, μάρτυρας, δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου).

Κατά το δεύτερο μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης που ακολουθεί, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου MSN4-Ser-533-Ala στη ζύμη, η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με τον πρώτο μετασχηματισμό, μόνο που σαν DNA αυτή τη φορά χρησιμοποιείται το MSN4\_Ser533Ala και το στερεό θρεπτικό μέσο όπου γίνεται η επίστρωση είναι το SC+URA+5-FOA. Η επώαση γίνεται στους 30°C. Αφού η ανάπτυξη των αποικιών της μετασχηματισμένης ζύμης είναι επαρκής στα τρυβλία, γίνεται μεταφορά των αποικιών και καλλιέργεια αυτών σε υγρό θρεπτικό μέσο SC+URA+5-FOA. Η επώαση γίνεται στους 30°C υπό ανάδευση. Από τις καλλιέργειες αυτές γίνεται απομόνωση του γενομικού DNA τους με τη μέθοδο απομόνωσης γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης. Ο έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού αυτού γίνεται στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που ελέγχθηκε και η επιτυχία του πρώτου μετασχηματισμού. Τα αποτελέσματα γίνονται εμφανή στην ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης (Εκ. 4.11). Σε αυτή την PCR αναμένεται να εμφανίσουν προϊόν μόνο το δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου) που περιέχει το γονίδιο MSN4 και τα δείγματα ελέγχου, στα οποία έχει πετύχει ο ομόλογος

ανασυνδυασμός και δεν περιέχουν το γονίδιο URA3 πλέον, αλλά το γονίδιο MSN4\_Ser533Ala. Το μόνο δείγμα που δεν εμφανίζει προϊόν στην ηλεκτροφόρηση είναι αυτό που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN4 εντός του γονιδιώματος της ζύμης (Εικ. 4.12). Τα δείγματα τα οποία έχουν δεχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN4\_Ser533Ala γίνονται stock και φυλάσσονται στους -80°C.



**Εικόνα 4.14** : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 2ου μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται γονομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου (δείγμα ελέγχου), στην θέση 2 βρίσκεται 1ο δείγμα γονομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην θέση 3 βρίσκεται 2ο δείγμα γονομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, στην θέση 4 βρίσκεται 3ο δείγμα γονομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης.



**Εικόνα 4.15** : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 2ου μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται γονομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου (δείγμα ελέγχου), στην θέση 2 βρίσκεται το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN4 εντός του γονιδιώματος της ζύμης και στην θέση 3 βρίσκεται το επιτυχές γονομικό DNA μετασχηματισμένης ζύμης.

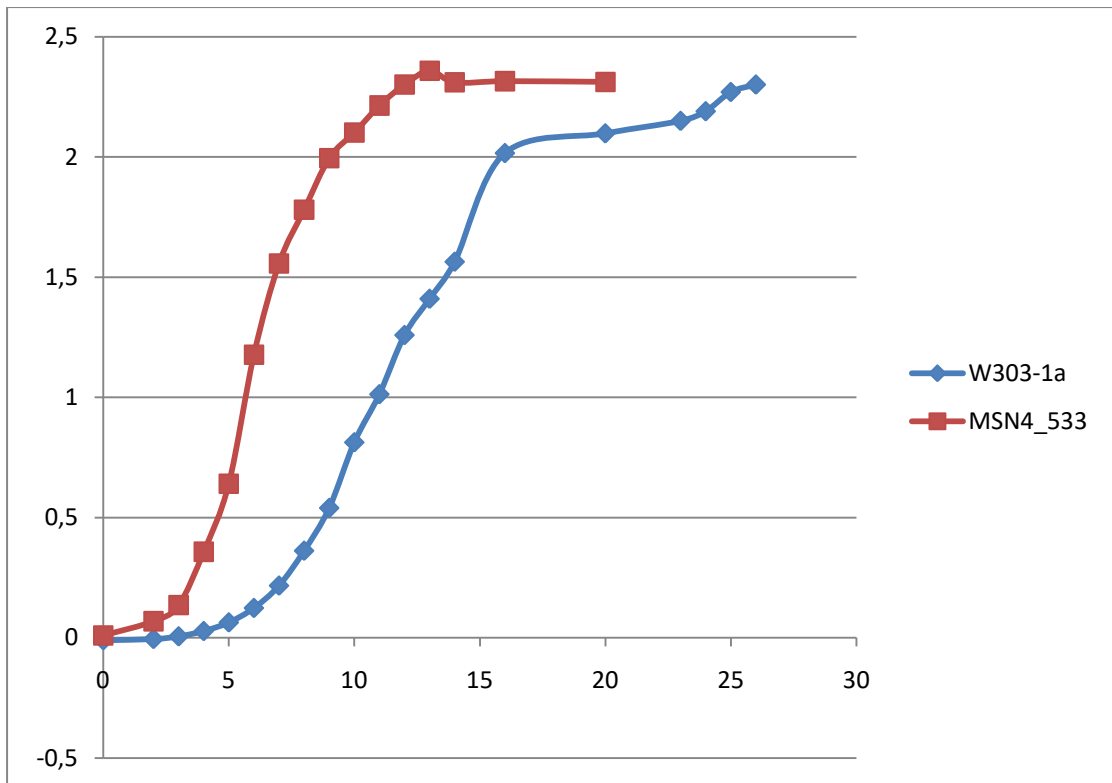
### **4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress.**

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a-MSN4\_533) σε συνθήκες stress, επιλέχθηκαν ως παράγοντες μελέτης η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης καθώς και η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του σακχαρομύκητα.

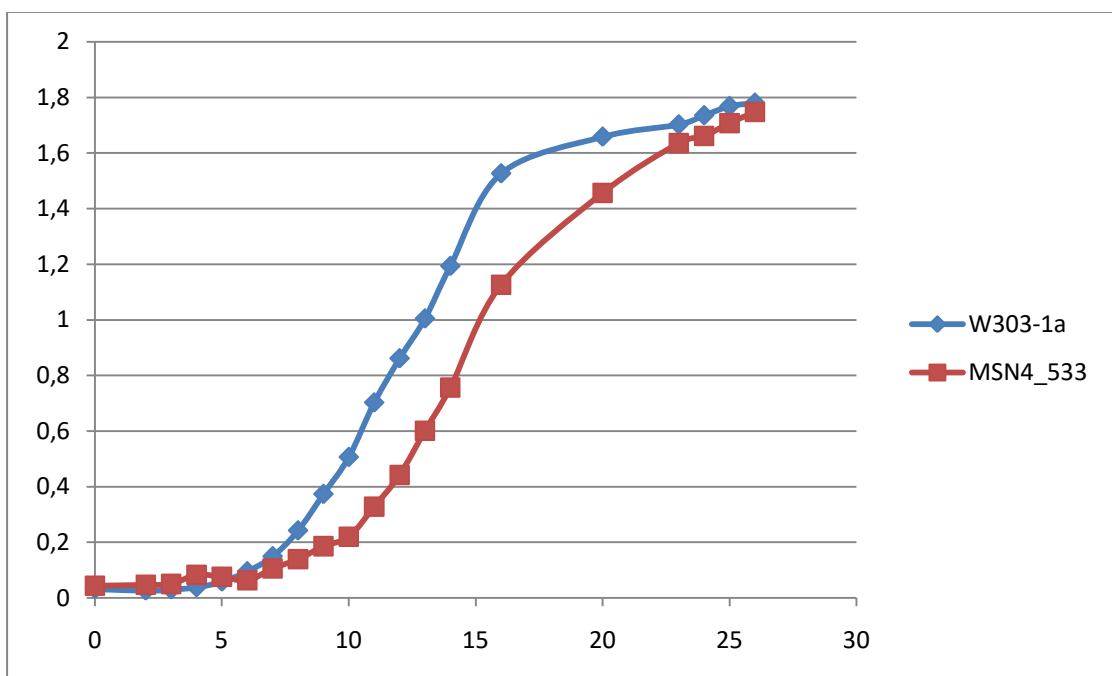
#### **4.3.1 Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης**

Μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους έναντι του αγρίου τύπου και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (Σχ. 4.2, 4.3). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser533Ala επί της πρωτεΐνης MSN4 του ζυμομύκητα, μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξης του κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης, καθώς παρατηρείται ταχύτερη απόκριση και ανάπτυξη αλλά και μεγαλύτερη διάρκεια της εκθετικής φάσης διαφοροποίηση κατά το τέλος της εκθετικής φάσης καθώς και στην στατική φάση ως προς τον αριθμό των κυττάρων με το αγρίου τύπου στέλεχος να υστερεί στο φυσιολογικό θρεπτικό μέσο. (Σχήμα 4.2)

Αντίθετα, στο θρεπτικό υλικό με υψηλό ποσοστό συγκέντρωσης γλυκόζης, παρατηρούμε κάποια καθυστέρηση του μεταλλαγμένου στελέχους στην εισαγωγή στην εκθετική φάση αλλά καμία άλλη διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης και στον αριθμό των κυττάρων σε κάθε φάση ανάπτυξης. (Σχήμα 4.3)



**Σχήμα 4.3:** καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae* , αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, παρουσία 2% w/v γλυκόζης.

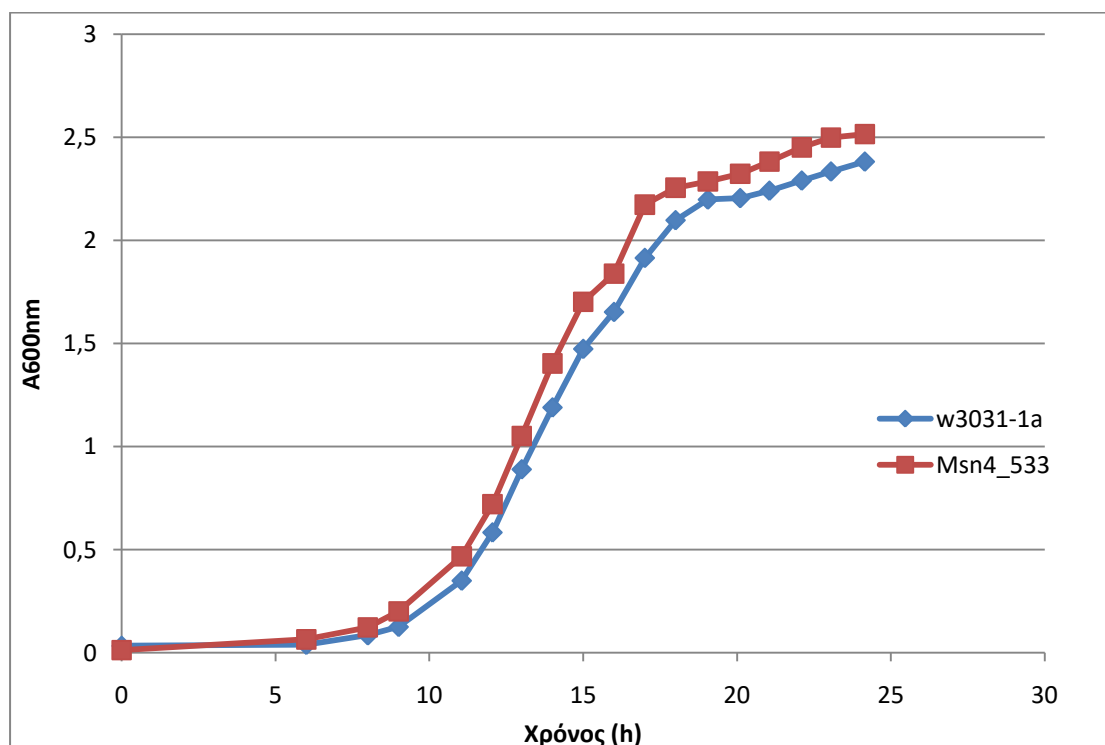


**Σχήμα 4.4:** καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae* , αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, παρουσία 15% w/v γλυκόζης.

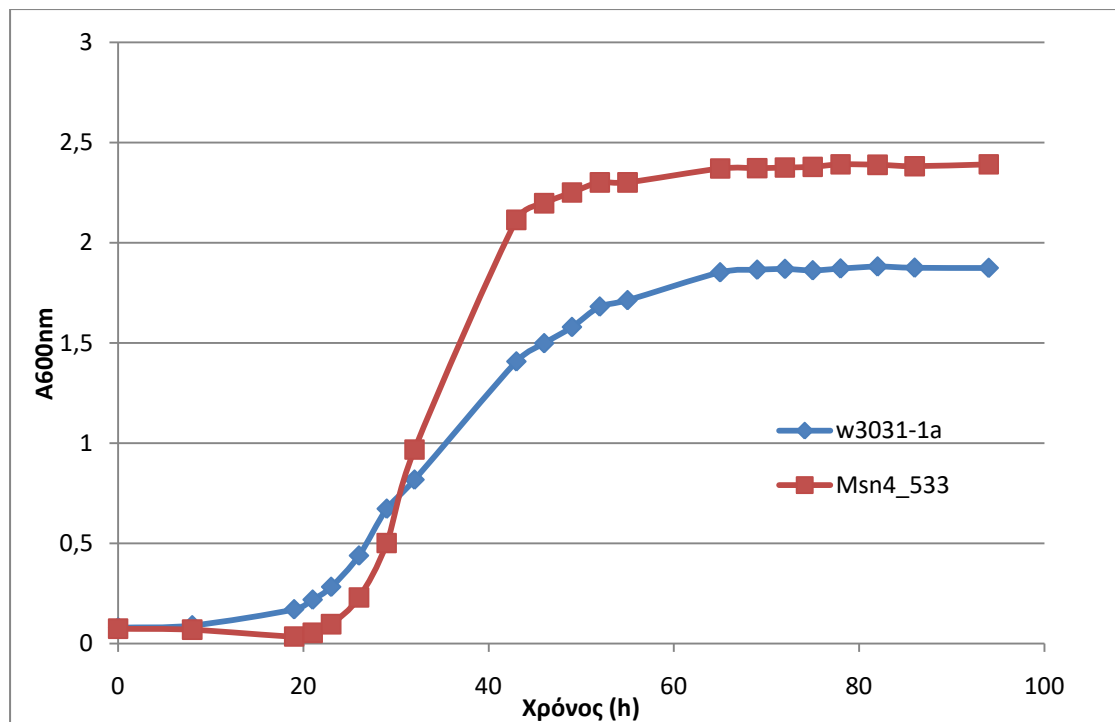


### 4.3.2 Παρουσία αιθανόλης

Μετά από μελέτη που έγινε για την ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser533Ala επί της πρωτεΐνης MSN4 του ζυμομύκητα μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του στα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης. Σε χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (3%), η συγκεκριμένη μετάλλαξη παρουσιάζει ελαφρά καλύτερη ανάπτυξη καθώς σε όλα τα στάδιά της, παρατηρείται ένα μικρό προβάδισμα ως προς τον αριθμό κυττάρων στον ίδιο χρόνο (Σχ. 4.5). Σε υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης (6%), ενώ στην αρχή διακρίνεται μικρή καθυστέρηση του μεταλλαγμένου στελέχους στην είσοδο στην εκθετική φάση, αυτή καταλήγει να γίνεται σε πιο γρήγορο ρυθμό και πιο αποδοτικά από το αγρίου τύπου στέλεχος, καθώς από την εκθετική φάση και μετά παρατηρείται σταθερά μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων (Σχ. 4.6).



**Σχήμα 4.5:** Καμπύλη ανάπτυξης του *S. Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 3% v/v αιθανόλης.



**Σχήμα 4.6 :** Καμπύλη ανάπτυξης του *S. Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 6% v/v αιθανόλης.

## 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βελτίωση της απόδοσης της αλκοολικής ζύμωσης είναι ένα από τα κρίσιμα ζητήματα που αφορά τόσο τον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών, όσο και τον τομέα της περιβαλλοντικής διαχείρισης αποβλήτων και πολλών άλλων. Το συγκεκριμένο γεγονός λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ως έναυσμα για την δημιουργία και μελέτη γενετικά τροποποιημένων στελεχών του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Πρωταρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η δημιουργία της μετάλλαξης Ser533Ala επί του γονιδίου MSN4, η αντικατάσταση του αγρίου τύπου γονιδίου των κυττάρων ζύμης, με αυτό που φέρει τη μετάλλαξη, και η πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης. Η σύγκριση των ληφθέντων αποτελεσμάτων έγινε έναντι των μητρικών κυττάρων αγρίου τύπου, προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση της απόκρισής τους σε αντίξοες συνθήκες.

Αρχικά εισήχθη η μετάλλαξη AG1610GCεπι του γονιδίου MSN4 που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος σερίνη σε αλανίνη στη θέση 533(Ser533Ala), ακολουθώντας την μέθοδο πέψης με το ένζυμο *DpnI*. Κατόπιν, η μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου της MSN4ενισχύθηκε με PCR και εισήχθη σε κύτταρα ζύμης W303-1a\_ΔMSN4::URA3 από τα οποίαείχε απαληφθεί το αγρίου τύπου γονίδιο της MSN4. Ακολούθως του μετασχηματισμού και του ακολουθούμενου ομολόγου ανασυνδυασμού, το στέλεχος που προέκυψε είναι το W303-1a\_MSN4\_533.

Το ληφθέν στέλεχος υποβλήθηκε σε δοκιμασίες ανάπτυξης παρουσία υψηλών διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και αιθανόλης. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης στο περιβάλλον ανάπτυξης του σακχαρομύκητα δημιουργεί ένα περιβάλλον ωσμωτικού stress στο οποίο ο ζυμομύκητας καλείται να ξεκινήσει την ζύμωση. Όπως αποδείχθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους του σακχαρομύκητα κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης διαφέρει ελαφρά από αυτή του φυσιολογικού στελέχους, τόσο σε βέλτιστο θρεπτικό μέσο (2% w/v) όσο και σε θρεπτικό με αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης (15% w/v), με τον

μύκητα να αντιδρά διαφορετικά και στις δύο περιπτώσεις: στην πρώτη, η μετάλλαξη επέδρασε θετικά ενώ στη δεύτερη αρνητικά στην ταχύτητα της ανάπτυξης συγκριτικά με το μητρικό στέλεχος. Δεν παρατηρείται λοιπόν διαφορά στην ικανότητα ανάπτυξης παρουσία αυξημένων επιπέδων γλυκόζης γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση των κυττάρων παρουσία υψηλών επιπέδων σακχάρου, αλλά βελτιστοποιεί κατά ένα βαθμό την απόκριση σε θρεπτικό με φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης.

Από την άλλη, η παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αιθανόλης φαίνεται να επιδρά θετικά στο ρυθμό ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, σε θρεπτικό μέσο με σχετικά χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης (3% v/v) παρατηρείται ότι η κυτταρική ανάπτυξη του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα διαφέρει με αυτή του αγρίου τύπου διότι υπάρχει αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης, παρόλο που ως και τη λανθάνουσα φάση η ανάπτυξη είναι κοινή και στα δύο στελέχη. Όσον αφορά την μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (6% v/v) παρατηρείται επίσης αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης, ιδιαίτερα αισθητόζέναντι του αγρίου τύπου στελέχους, μετά από μία καθυστέρηση στην εισαγωγή στην εκθετική φάση.

Συνοψίζοντας, παρατηρείται ότι η μετάλλαξη που μελετήθηκε επηρεάζει μερικώς την ικανότητα ανάπτυξης του ζυμομύκητα σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης σακχάρου, ενώ η παρουσία αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο παρατηρείται ότι έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ανάπτυξης σε μέτρια συγκέντρωση αιθανόλης. Αυτό κατά ανάγκη δεν σημαίνει ότι η μετάλλαξη Ser533Ala επί της MSN4 πρωτεΐνης καθιστά τα κύτταρα πιο ανθεκτικά διότι αφενός ο ζυμομύκητας παράγει αιθανόλη υπό αναερόβιες συνθήκες όπου ουσιαστικά η ανάπτυξη του είναι πολύ μικρή, και αφετέρου από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι μια εκ των δράσεων της εισόδου του μεταγραφικού παράγοντα MSN4 στον πυρήνα του κυττάρου σε καταστάσεις κυτταρικού στρες είναι η μερική αναστολή της ανάπτυξης προκειμένου το κύτταρο να μπορέσει να ανταποκριθεί στο δυσμενές περιβάλλον. Προκειμένου, λοιπόν να αποκαλυφθεί πλήρως κατά το δυνατόν ο ρόλος του αμινοξέος σερίνη στη θέση 533 της MSN4 απαιτείται περαιτέρω μελέτη τόσο

της ικανότητας ζύμωσης του μεταλλαγμένου στελέχους όσο και της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 5.1 Ξενόγλωσση:

- Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, pp. 89-105.
- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 180, pp. 1044–1052.
- Brewster J.L., De Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*. vol. 259 pp. 1760-1763.
- 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.
- 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.
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24, pp. 469–486.
- Estruch F. and Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 3872–3881.
- Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol., Rev.* 32, pp. 673–704.

- 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.
- Glazer A.N. and Nikaido H. (1995). *Microbial Biotechnology- Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*, 21, pp. 135–144.
- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*. vol. 249 pp. 127-138.
- Hohmann S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol, Rev* 66, pp. 300–372.
- Hunt M. (2006). "Real Time PCR Tutorial", University of South Carolina.
- Jackson R.S. (1994). *Wine Science-Principles and applications*. Carolina: Academic Press.
- Jing L., Chunhua L., Wei X., Dongxia Y., Gang W., Linxin M. (2007). Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and DpnI digestion of the plasmid template in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 373. pp. 389-391.
- Kamman M., Laufs J., Schell J. and Gronenborn B. (1989). *Nucleic Acids Res.*, 17, pp. 5404.
- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*, 13, pp. 771–781.

- Landt O., Grunert H.P. and Hahn U. (1990). *Gene*, 96, pp. 125–128.
- 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.
- Marechal P.A., Gervais P. (1994). Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 42 pp. 617-622.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and Estruch F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger protein *msn2p* and *msn4p* are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15, pp. 2227–2235.
- Meikle A.J., Reed R.H., Gadd G.M. (1988). Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. vol. 134 pp. 3049-3060.
- Müller D., Exler S., Aguilera-Vázquez L., Guerrero-Martín E., Reuss M. (2003). Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20, pp. 351–367.
- Nikolaou E., Agrafioti I., Stumpf M., Quinn J., Stansfield I., Brown A.J. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol*, 9, pp. 44.
- Outlaw J., Collins K.J., Duffield J.A. (2005). *Agriculture as a producer and consumer of energy*. CABI, Oxfordshire.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985). *Science*, 230, pp. 1350–1354.
- 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.
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1990). *BioTechniques*, 8, pp. 404–407.
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1992). *Nucleic Acids Res.*, 20, pp. 4937–4938.
- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, pp. 5777–5782.
- Schuller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruis H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO Journal*. vol. 13 pp. 4382-4389.
- Thevelein J.M. and Winde J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904–918.
- Vertes A., Qureshi N., Yukawa H., Blaschek H. (2010). *Biomass to biofuels*. Wiley, West Sussex.
- Walker G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons.
- Wall J., Harwood C., Demain A. (2008). *Bioenergy*. ASM, Washington.
- You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and environmental microbiology*.

## 5.2 Ελληνική

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

- Βελεγράκη Α. (2006) Οι μύκητες στη ζωή μας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- Βερβερίδης, Φ. (2003). “Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών”, Ηράκλειο Κρήτης.
- Λαζανάκη Β. (2010). “Η χρήση της Real Time PCR για την Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Στελεχών Βακτηρίου (*Escherichia Coli*)”, Διπλωματική Εργασία, Ηράκλειο Κρήτης.
- Μπέλκα Α. (2007). Επίδραση υπολειμάτων φυτοφαρμάκων στη βιοχημική συμπεριφορά στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη.
- Παπανικολάου Β. (2006). Μέθοδοι και Υλικά Ακινητοποίησης Βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου. Πάτρα: s.n.