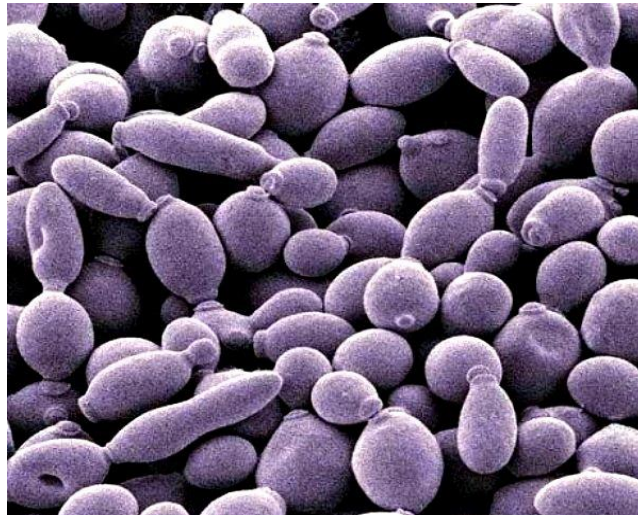


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser 532 Ala ΕΠΙ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Msn4 ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ
ΣΕ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΦΡΑΓΚΗ ΜΑΡΙΑΝΘΗ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser 532 Ala ΕΠΙ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Msn4 ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΣΕ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΦΡΑΓΚΗ ΜΑΡΙΑΝΘΗ

Επιβλέπων καθηγητής :
Σωτήριος Σπυρίδων Βαμβακάς

ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας & Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, του Α.Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου κατά τη χρονική περίοδο Ιανουαρίου έως Σεπτεμβρίου του 2015 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Βαμβακά Σωτήρη.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Βαμβακά, για την υποστήριξη, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας τόσο στην εκτέλεση του πειραματικού της μέρους όσο και στη συγγραφή της αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε για την ενασχόληση μου με ένα τόσο ενδιαφέρον και εξειδικευμένο θέμα. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε όλα τα άτομα που δούλεψαν μαζί μου στο εργαστήριο και συνέβαλαν ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η πτυχιακή μελέτη.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου καθώς και τους φίλους μου για την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, αλλά και την κατανόηση που έδειξαν τόσο κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και στο σύνολο των χρόνων φοίτησης μου στην Καλαμάτα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες είναι σημαντικές στην βιομηχανία τροφίμων με σημαντικότερη οικονομικά εφαρμογή αυτή του *Saccharomyces cerevisiae* επειδή χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως στην ποτοποιία αλλά και αποτελεί εδώ και χρόνια μοντέλο για την έρευνα μοριακής βιολογίας και γενετικής. Ο ζυμομύκητας αυτός χρησιμοποιείται ευρέως στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών και την παραγωγή διαφόρων άλλων προϊόντων όπως ενζύμων, βιταμινών κ.α. Τα βασικότερα χρήσιμα χαρακτηριστικά του *S.cerevisiae* είναι ταχεία ανάπτυξη σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, αποτελεσματική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης και μη παραγωγή ανεπιθύμητων αρωμάτων και γεύσεων.

Έτσι η βελτίωση της απόδοσης των ζυμών αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας μέσω της δημιουργίας ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους ζύμης που θα εμφάνιζε καλύτερα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και θα ήταν ανθεκτικότερο στην αιθανόλη, καθώς και σε άλλες αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Όταν το κύτταρο βρεθεί σε κατάσταση stress ο μεταγραφικός παράγοντας *msn4* ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες ώστε να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ελέγχει την έκφραση γονιδίων που βοηθούν το κύτταρο να αποκριθεί στο δυσμενές περιβάλλον. Ταυτόχρονα όμως ο έλεγχος της εισόδου της *msn4* στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της *msn4* πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα του κυττάρου.

Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της *msn4* με κατάλληλο λογισμικό αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της *msn4* από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 532.

Σποπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία στελέχους ζύμης τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη Ser532Ala επί του γονιδίου MSN4 και η μετέπειτα μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης, σε σύγκριση με του αγρίου τύπου, στην

απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress όπως η παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων αιθανόλης ή γλυκόζης προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποκάλυψη του ρόλου του αμινοξέος στη συγκεκριμένη θέση

Λέξεις κλειδιά : Ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, *msn4*, κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, αλκοολική ζύμωση, PCR, απάντηση στο stress, μεταγραφικός παράγοντας

ABSTRACT

Yeasts are important in the food industry with major economic implementation of *Saccharomyces cerevisiae* because it has long used in distillery and also been a model for the molecular biology and genetic research. Yeast is widely used in fermentation reactions for the production of alcoholic beverages and the production of several other products such as enzymes, vitamins etc. The main useful features *S.cerevisiae* is rapid growth in aerobic and anaerobic conditions, efficient production of carbon dioxide and ethanol and non-production of undesirable aromas and flavors.

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

When the cell exposed to stress conditions, transcription factor *msn4* is activated via phosphorylation by various protein kinases in order to enter the cell nucleus, where it controls the expression of genes that help cell to respond stress. At the same time the translocation of *msn4* to nucleus is also controlled and inhibited by protein kinase A (PKA) phosphorylation.

In silico protein sequence analysis of *msn4* revealed that a potential crucial site of phosphorylation by PKA of *msn4* is the amino acid residue Serine at position 532.

The purpose of this work is to create yeast strain which carry the mutation Ser532Ala on *MSN4* gene and subsequent study of the effect of this mutation, in yeast response to stress conditions such as the presence of various ethanol or glucose concentrations.

Key words: Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *msn4*, site-directed mutagenesis, alcohol fermentation, PCR, stress response, transcription factor

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
1.1 Λίγα λόγια για τις ζύμες.	9
1.2 Το γένος <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και η επικράτηση του.	9
1.3 Προσαρμογή του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> στο εκάστοτε περιβάλλον.	11
1.4 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> υπό συνθήκες στρες.	13
1.5 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον.	15
1.5.1Η επίδραση της αιθανόλης.	16
1.5.2Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.	17
1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση (Polymerase Chain Reaction (PCR)) : .	18
1.6.1 Αρχές Λειτουργίας της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης. ..	18
1.7 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR	22
1.7.1 Μεθοδολογία Μέγα-Εκκινητή (MEGAPRIMER)	22
1.7.2 Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR.	23
1.7.3 Μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου <i>DpnI</i>	26
2.ΣΚΟΠΟΣ	29
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.1 Υλικά	31
3.1.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.....	35
3.2 Πειραματικές Πορείες	38
3.2.1. Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης	38
3.2.2 Καθαρισμός προϊόντων PCR με το kit Gel & PCR clean up	39
3.2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. Coli με το kit Nucleospin plasmid	40
3.2.4 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό.....	41
3.2.5 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων	42
3.2.6 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού.....	43

3.2.7 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (High efficiency transformation of yeast cells).	44
3.2.8 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v – Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων.	45
3.2.9 Μεταφορά αποικίων με την διαδικασία <i>replica</i>	45
3.2.10 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων	46
3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης	46
3.3.1 Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιεργειών.....	46
3.3.2 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	46
3.3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης	48
4.1.1 1 ^η μέθοδος- μέθοδος “Megaprimer”.....	48
4.1.2 2 ^η μέθοδος- μέθοδος των τριών διαδοχικών PCR.....	52
4.1.3 3 ^η μέθοδος- πεψη με το ένζυμο <i>DpnI</i>	56
4.2 Απαλοιφή MSN4 αγρίου τύπου από κύτταρα ζύμης.	62
4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress.	68
4.3.1 Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.....	68
4.3.2 Παρουσία αιθανόλης	70
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	72

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΠΡΟΛΟΓΟΣ

1.1 Λίγα λόγια για τις ζύμες.

Οι ζύμες είναι μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων που ποικίλουν στην φυσιολογία και στην δομή. Πολλαπλασιάζονται ταχύτατα κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ απουσία οξυγόνου μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθυλική αλκοόλη. Αποτελούν την πιο σημαντική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικροοργανισμών στον κλάδο τροφίμων και ποτών λαμβάνοντας μέρος σε διάφορες διεργασίες. Είναι σημαντικοί στην βιομηχανία τροφίμων ως τρόφιμα και λόγω της ικανότητας τους να μετασχηματίζουν κοινά τρόφιμα, μέσω ζυμώσεων, σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας (μαγιά), τη χρήση τους στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως οι βιταμίνες C και D. Μια από τις πιο γνωστές και ευρύτατα διαδεδομένη εφαρμογή από την αρχαία Ελλάδα είναι αυτή της αλκοολικής ζύμωσης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών ενώ τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει την χρήση της για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Ο μικροοργανισμός που διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο κατά την αλκοολική ζύμωση είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, είναι ο πιο καλά μελετημένος και χαρακτηρισμένος ευκαρυωτικός οργανισμός (Μπατρίνου, 2011).

1.2 Το γένος *Saccharomyces cerevisiae* και η επικράτηση του.

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

Πρόκειται για την πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, και αποτελεί τον μικροοργανισμό μελέτης στην παρούσα εργασία. Είναι μονοκύτταρος και μονοπύρηνος οργανισμός, με μήκος κυττάρου από 5-10 μm .

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

Βασίλειο: Μύκητες

Φύλλο: Μυκόφυτα

Κλάση: Ασκομύκητες

Οικογένεια: *Saccharomycetaceae*

Είδος: *Saccharomyces Cerevisiae*

Το γένος *S.cerevisiae*, όπως προαναφέρθηκε, είναι ο κύριος μικροοργανισμός που πέρνει μέρος στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης. Στην επικράτησή του αυτή συνεισφέρουν πολλοί παράγοντες. Η ταχεία παραγωγή αιθανόλης, 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 ζωτικότητα τους και συνεχίζουν τη ζύμωση ακόμα και όταν η θερμοκρασία πλησιάζει στους 38 °C ενώ οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αδυνατούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 25 °C (Μπέλκα, 2007).

1.3 Προσαρμογή του *Saccharomyces Cerevisiae* στο εκάστοτε περιβάλλον.

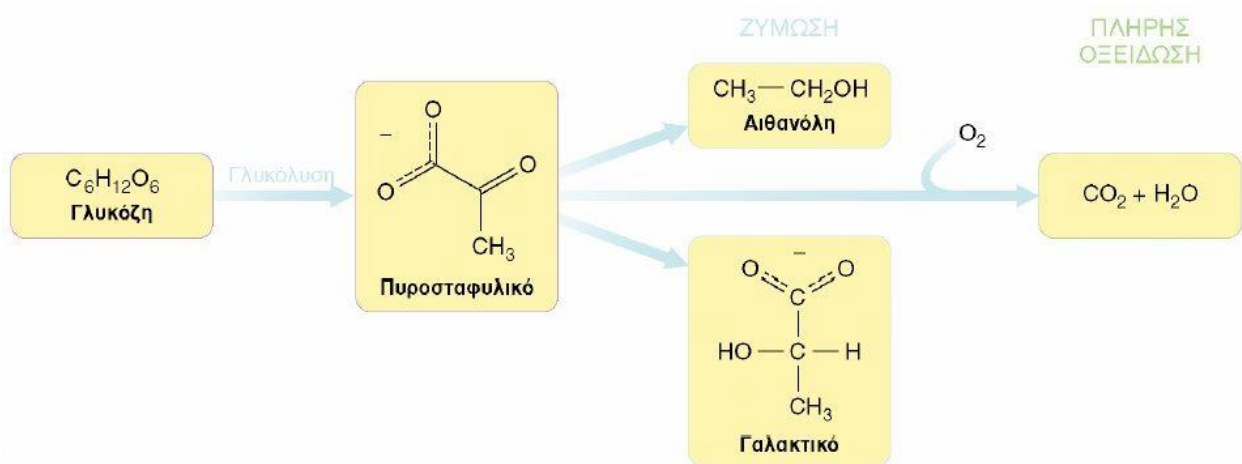
Η αύξηση των ζυμών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις συνθήκες που επικρατούν στον περιβάλλοντα χώρο. Έτσι, ανάλογα με τις εξωκυτταρικές συνθήκες, οι ζύμες, σαν προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μπορούν να αποκτήσουν την απαραίτητη για την αύξησή τους ενέργεια μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών. Μπορούν να ακολουθήσουν το μονοπάτι της αναπνοής, το οποίο ξεκινάει με τη γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, είτε το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο ξεκινάει με τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση. Ο παράγων που θα κρίνει το πιο από τα δύο μονοπάτια θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο (Carlile *et al.*, 2001).

Με τον όρο γλυκόλυση εννοούμε την αλληλουχία των αντιδράσεων η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Η πορεία αυτή είναι όμοια σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και γίνεται στο κυτταρόπλασμα. Στην πραγματικότητα, η μοναδική διαφορά μεταξύ αερόβιας και αναερόβιας διάσπασης της γλυκόζης βρίσκεται στην παραπέρα τύχη του πυροσταφυλικού.

Κατ' αρχάς η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφορική γλυκόζη και, μέσω των ενδιάμεσων 1,6-διφωσφορική γλυκόζη, 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη και φωσφοενολοπυροσταφυλικό, αποικοδομείται σε πυροσταφυλικό. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος αυτής της πορείας είναι δύο μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που διασπάται. Περιλαμβάνει μία μόνο οξειδοαναγωγική αντίδραση, κατά την οποία δημιουργούνται κυτταροπλασματικά μόρια NADH. Η αντίδραση αυτή είναι η μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης σε 1,3-διφωσφο-γλυκερικό. Επομένως από ένα μόριο γλυκόζης παράγονται δυο μόρια NADH ή διαφορετικά καταναλώνονται δυο μόρια NAD⁺.

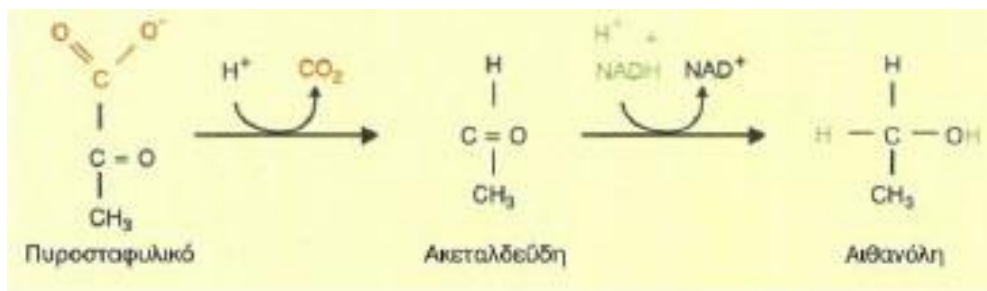
Στους αερόβιους οργανισμούς το NADH που σχηματίζεται κατά την γλυκόλυση μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στο O₂ μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το NAD⁺. Κάτω από αναερόβιες

συνθήκες το NAD^+ αναγεννάται κατά τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος ή της αιθανόλης από το πυροσταφυλικό (Σχήμα 1.1). Αυτές οι δύο διεργασίες ονομάζονται ζυμώσεις και συντελούνται σε μερικούς μικροοργανισμούς (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001).



Σχήμα 1.1: Γενική απεικόνιση της γλυκόλυσης.

Κατά την αλκοολική ζύμωση το πυροσταφυλικό που παράγεται κατά την αναερόβια διάσπαση της γλυκόζης μετατρέπεται, στους ζυμομύκητες και μερικούς άλλους μικροοργανισμούς, σε αιθανόλη. Το πρώτο στάδιο αυτής της διεργασίας είναι η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, οπότε παράγεται ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη με ταυτόχρονη επανοξείδωση του NADH σε NAD^+ . Με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το NAD^+ και εξασφαλίζεται η συνεχής λειτουργία της γλυκολυτικής πορείας (Σχήμα 1.2).



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

1.4 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του *Saccharomyces Cerevisiae* υπό συνθήκες στρες.

Όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε ακραίες αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών όταν πρόκειται να απειληθεί η βιωσιμότητά τους. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των αλλαγών αυτών από τα κύτταρα, περιλαμβάνουν αισθητήρες και μονοπάτια μεταγωγής σημάτων, που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Κάτω από ακραίες τέτοιες αλλαγές, συνθήκες στρες, τα κύτταρα προσπαθούν να προσαρμοστούν γρήγορα κάθε φορά στο εκάστοτε περιβάλλον τους (Gasch *et al.*, 2000). Στη ζύμη, έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που προωθούν τη μεταγραφή εκατοντάδων διαφορετικών γονιδίων σε απόκριση τους σε ποικίλες συνθήκες stress (Estruch, 2000).

Όταν ο *S.cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφ' ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ'ετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η ρύθμιση της δραστηριότητας του μονοπατιού της cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) /PKA (πρωτεϊνική κινάση A) 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 GTPases, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσληψη γλυκόζης και την εν συνεχεία φωσφορυλίωση τους. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την Gpr1 (ένας υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες) και την Ga πρωτεΐνη του Gra2. Και τα δύο αυτά μονοπάτια συγκλίνουν προς την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή του κυκλικού AMP (cAMP) (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Gancedo, 2008).

Η παραγωγή cAMP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η ενεργοποίηση της PKA έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση φωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνες στόχους της. Συνεπώς, αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ενδοκυττάριους στόχους της PKA. Δύο από αυτούς είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες *msn2* και *msn4*, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των λεγόμενων STRE (στοιχείο απόκρισης στο stress) ελεγχόμενων γονιδίων (Estruch and Carlson, 1993; Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt and 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; Kandrор *et al.*, 2004).

Η ενεργοποίηση τους συμβαίνει μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως και ο έλεγχος της εισόδου τους στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της *msn4* πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της *msn4* στον πυρήνα του κυττάρου. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες στρες τότε αναστέλλεται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *msn4* από την PKA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την είσοδό της στο πυρήνα του κυττάρου και κατ' επέκταση την ρύθμιση της έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες στρες.

Διαφαίνεται λοιπόν ότι η δράση του μονοπατιού cAMP/PKA είναι κατασταλτική έναντι των δραστηριοτήτων των *msn2/4* (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Görner *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2008).

Προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά κατάλοιπα αμινοξέων επί της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της MSN4 τα οποία φωσφορυλιώνονται από την PKA, διεξήχθη ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με κατάλληλο λογισμικό και αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της *msn4* από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 532.

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. Φυσιικοί παράγοντες

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

2. Χημικοί παράγοντες

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

3. Βιολογικοί παράγοντες

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

Από τους παραπάνω παράγοντες, αυτοί που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα και θεωρούνται οι πιο σημαντικοί είναι η παρουσία της αιθανόλης στο μέσο 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 μέσο, 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 αμμωνιακών 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 ιμπερτάσης, ενός ενζύμου που εκκρίνει ο σακχαρομύκητας για να υδρολύσει την σακχαρόζη. Με τη διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, η ωσμωτική πίεση αυξάνεται και ως εκ τούτου παρουσιάζονται δυσκολίες στην έκβαση της αλκοολικής ζύμωσης.

Η έκθεση των στελεχών του *S. cerevisiae* σε υψηλές 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 πολυμεράση (Polymerase Chain Reaction (PCR)) :

1.6.1 Αρχές Λειτουργίας της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης.

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. 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).

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

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

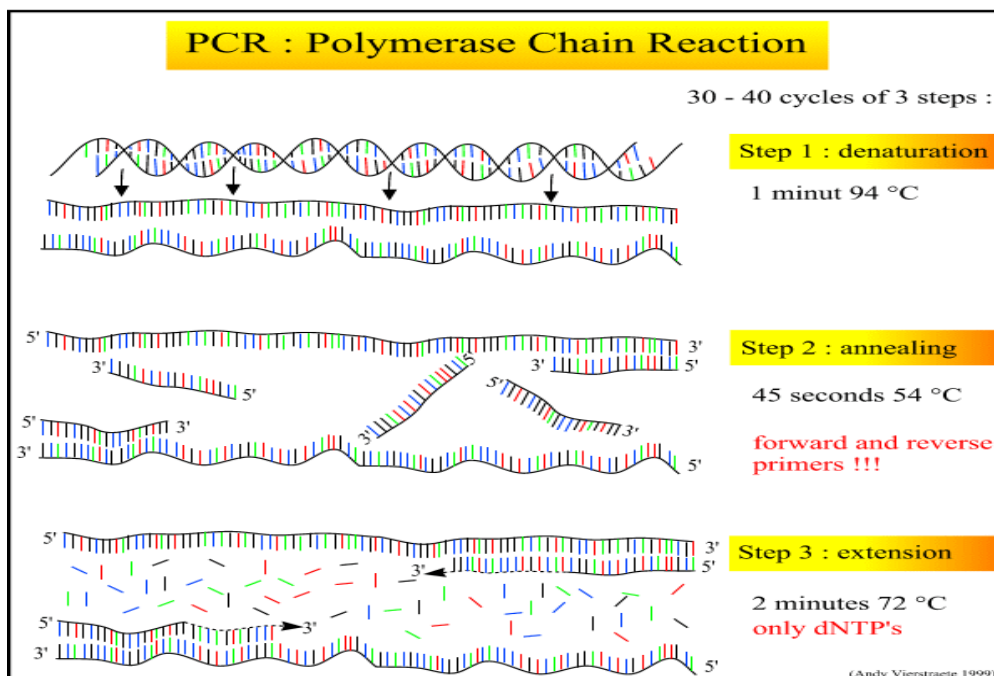
Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικ.1.1).

Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές

αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Εικ. 1.1).

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA.

Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1: Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): Ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension) (Λαζανάκη, 2010).

1.6.1.1 Εκκινητές και DNA πολυμεράση

Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA 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 αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

Η **DNA πολυμεράση (Taq polymerase)** είναι το ένζυμο που συνθέτει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα 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 προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή (Berg *et al*, 2002). Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-80 °C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική 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 πιστότητα. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων 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 πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg *et al*, 2002)

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

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

1.6.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

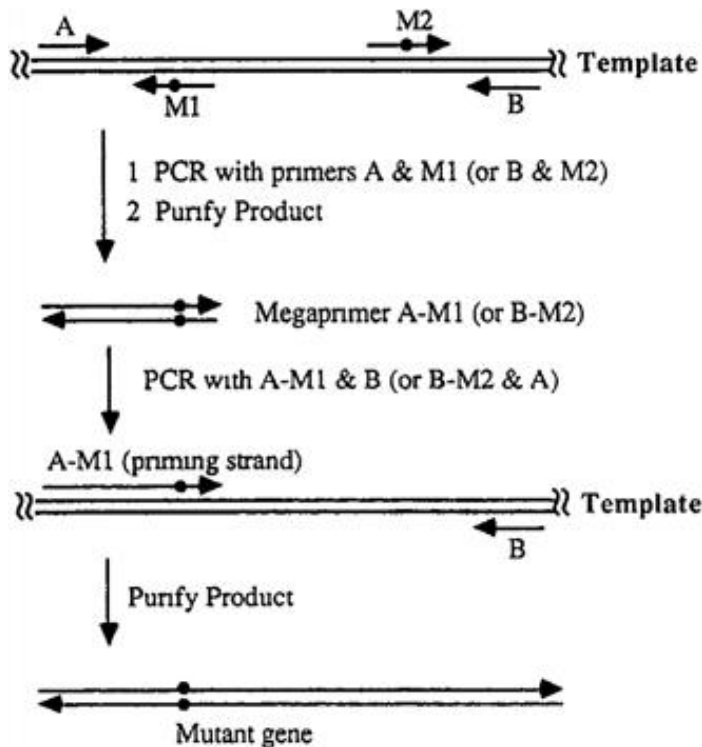
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα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

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

1.7 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR

1.7.1 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 and 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 λεγόμενος “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 (Σχ. 1.4).



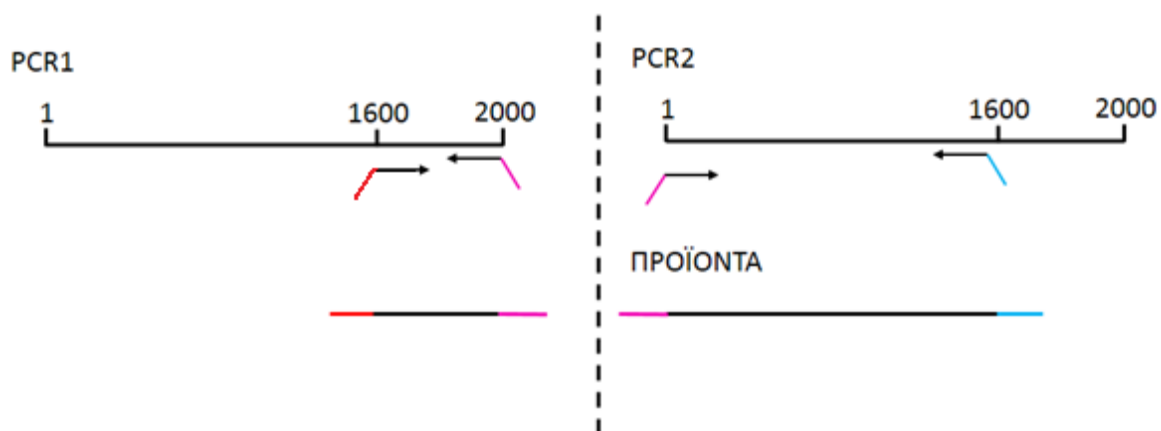
Σχήμα 1.4: Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω της μεθόδου Megaprimer. Οι εκκινητές A, B, M1 και M2 (όπως και η εκκινητήρια γραμμή του megaprimerA-M1) συμβολίζονται από μονές γραμμές που καταλήγουν σε βέλος. Οι διπλές γραμμές αντιπροσωπεύουν το εκμαγείο. Οι τελείες στο M και M2 υποδηλώνουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις (αντικατάσταση, εισαγωγή, διαγραφή) που θα εισαχθούν στο προϊόν μέσω του megaprimer (Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer PCR – In vitro mutagenesis protocols (1996), Series 57, pp203-215 – Methods in Molecular Biology).

1.7.2 Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR.

1.7.2.1 PCR 1

Η πρώτη PCR (Σχ.1.5) 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- A laboratory manual. (1995)).



Σχήμα 1.5 : 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.

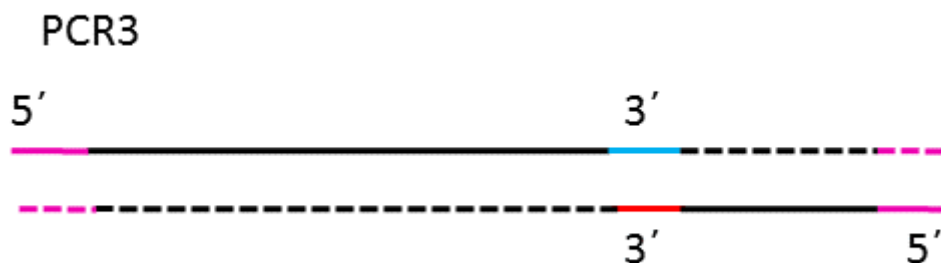
1.7.2.2 PCR 2

Η δεύτερη PCR (Σχ. 1.6) γίνεται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο 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 (PCR Primer- A laboratory manual. (1995)).

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 δίκλιωνα 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. 1.6. Το αποτέλεσμα της επιμήκυνσης είναι η δημιουργία εκμαγείου που θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι επόμενοι κύκλοι της PCR θα πολλαπλασιάσουν το εκμαγείο αυτό (PCR Primer- A laboratory manual. (1995)).



Σχήμα 1.6 : Η τρίτη PCR κατά την οποία συντίθεται το προϊόν που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη.

1.7.3 Μέθοδος με τη χρήση του ενζύμου *DpnI*.

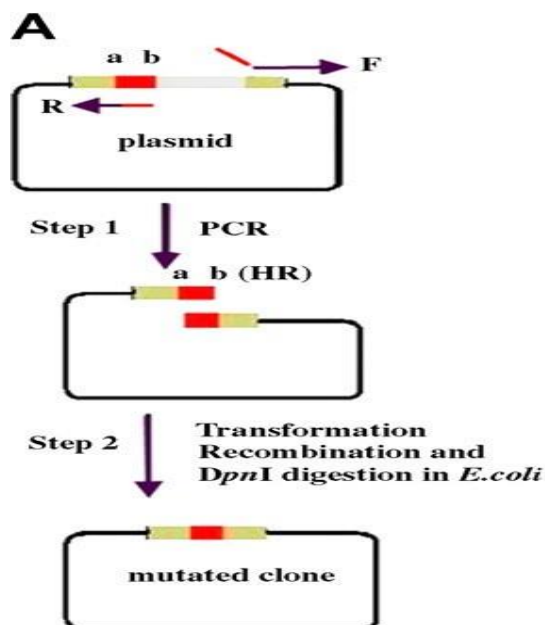
Το ένζυμο *DpnI* αναγνωρίζει και πέπτει πλήρως μεθυλιωμένο τμήμα DNA αφήνοντας παράλληλα ανέπαφο το μη-μεθυλιωμένο DNA. Με βάση αυτή την προσέγγιση, αναπτύχθηκε μία μέθοδος ταχείας μεταλαξεγένεσης χρησιμοποιώντας μια διπλή έλικα DNA ως εκμαγείο που απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα και πέψη με το ένζυμο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

Μέσω της μεθόδου με την χρήση του ενζύμου *DpnI* αναλόγως με το επιθυμητό αποτέλεσμα τα στάδια που ακολουθούνται με αυτή την μέθοδο είναι τα εξής (Σχ. 1.7, 1.8):

A. Διαγραφή αλληλουχίας. Η αλληλουχία στόχος για διαγραφή συμβολίζεται με γκρι καθώς οι πλευρικές περιοχές συμβολίζονται με ανοιχτό καφέ και κόκκινο. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που υβριδοποιούν την κάθε αλυσίδα του κλώνου ώστε να διαγράψουν την αλληλουχία στόχο συμβολίζονται με βέλη στο Σχήμα 1.7. Δεκαπέντε νουκλεοτίδια με 5' άκρο ως προς την αλληλουχία στόχου προς διαγραφή συμβολίζονται με ab και θα πρέπει να περιέχονται στον primer F, αντίστοιχα.

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

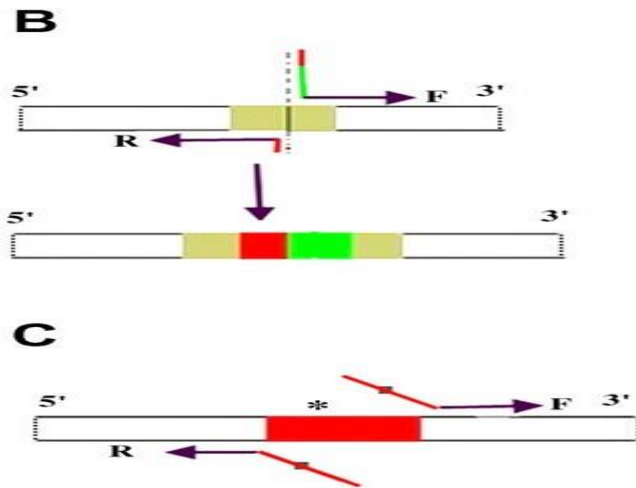
Βήμα 2- Μετασχηματισμός: Το ανοικτό πλασμίδιο που δημιουργήθηκε ως προϊόν της PCR χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli*. (Σχήμα 1.7)



Σχήμα 1.7 : Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μεταλλαξεγένεσης για διαγραφή τμήματος του κλωνοποιημένου γονιδίου με πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο *DpnI* και εισαγωγή του σε 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 εκκινήτη 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 1.8 : Σχηματική απεικόνιση με τον τρόπο που γίνεται η εισαγωγή της μετάλλαξης με την διαγραφή της αλληλουχίας στόχου (Jing *et al.*, 2007).

2.ΣΚΟΠΟΣ

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

Η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του ζυμομύκητα αποτελεί ένα παράγοντα κυτταρικού στρες, όμως η ενδοκυττάρια σηματοδότηση της αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και τελικά της PKA μέσω των Ras1/2 πρωτεϊνών. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης από τον *S.cerevisiae* χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα θα ήταν χρήσιμο να επιτευχθούν κατάλληλες γενετικές τροποποιήσεις με σκοπό την αποτροπή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών *msn2/4* από την PKA. Λόγω του εξέχοντος ρόλου της PKA στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση είναι θα ήταν ανούσια οποιαδήποτε τροποποίησή του.

Είναι λοιπόν κύριος στόχος η γενετική τροποποίηση του γονιδίου MSN4. Η τροποποίηση αυτή έχει ως στόχο την αντικατάσταση ενός καταλοίπου σερίνης με το αμινοξύ Αλανίνη (Ser532Ala) στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)) προκειμένου να κατασταλεί ο έλεγχος της μετανάστευσης του μεταγραφικού παράγοντα *msn4*, από την PKA και να επιτευχθεί διαρκής εντοπισμός της στον πυρήνα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία της μετάλλαξης Ser532Ala επί του γονιδίου MSN4 μέσω της πέψης με το ένζυμο *DpnI*, η εισαγωγή της συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής του MSN4 γονιδίου στα κύτταρα του ζυμομύκητα και η πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης και επιβίωσης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις

γλυκόζης και αιθανόλης σε σύγκριση πάντα με αυτά που δεν έχουν δεκτεί κάποια γενετική τροποποίηση 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 ήταν ένα μετέπειτα πιθανό θέμα μελέτης

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

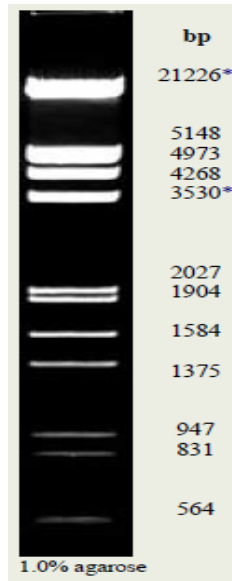
Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον Πίν. 3.1, ενώ όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των PCR βρίσκονται στον Πίν. 3.2.

Πίνακας 3.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις Πειραματικές Πορείες.

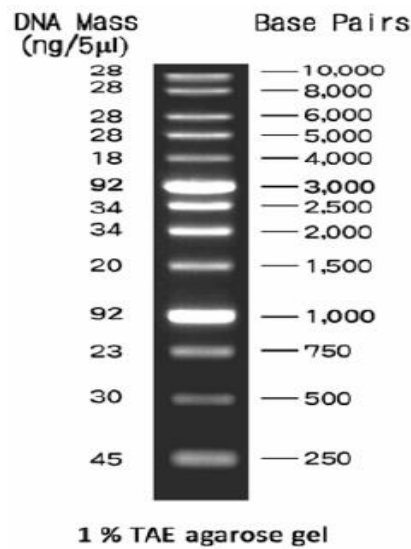
	Αντιδραστήρια	Εταιρία	Κωδικός
1	Gel red	Biotium	41003
2	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
4	Οξικό λίθιο (Lithium Acetate dihydrate)	AppliChem	A3478
5	Tris ultrapure	Duchefa Biochemie	T1501.1000
6	Οξικό οξύ (Glacial Acetic Acid)	Penta	607002006
7	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	Lab M	MC001
8	Bacto Peptone		
9	Γλυκόζη (Glucose)	Sigma-Aldrich	G7021
10	Agar Agar	Serva	11392
11	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Sigma-Aldrich	Y0626-250G
12	Ασπαραγίνη	AppliChem	A3721
13	Γλουταμινικό οξύ	AppliChem	A3712
14	Λευκίνη	AppliChem	A3496
15	Τυροσίνη	Sigma-Aldrich	T3379
16	Βαλίνη	Merk	1084950100
17	Φαινιλαλανίνη	Serva	32191
18	Ασπαραγινικό οξύ	AppliChem	A3715
19	Αργινίνη	AppliChem	A3709
20	Αδενίνη	AppliChem	A0939
21	Ισολευκίνη	AppliChem	A3677

22	Θρεονίνη	AppliChem	A3946
23	Κυστεΐνη	AppliChem	A3694
24	Προλίνη	Sigma-Aldrich	81710
25	Τρυπτοφάνη	Sigma-Aldrich	T8941
26	Λυσίνη	Sigma-Aldrich	L9037
27	Μεθιονίνη	Sigma-Aldrich	M5308
28	Γλουταμίνη	AppliChem	A3734
29	Αλανίνη	Serva	11482
30	Σερίνη	Sigma-Aldrich	84960
31	Ιστιδίνη	AppliChem	A3719
32	Γλυκίνη	Serva	56406
33	Τρυπτόνη	Lab M	MC005
34	Ουρακίλη	AppliChem	A0667
35	Χλωριούχο Νάτριο		
36	Υδροξείδιο του Νατρίου		
37	Αιθυλεν-δι-αμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA)		
38	Triton X-100		
39	RNAse		
40	Ισοπροπανόλη	Penta	603117000
41	Kapa HiFi HotStart ReadyMix	Kapa Biosystems	KK2601
42	Taq polymerase ReadyMix	Kapa Biosystems	KK1006
43	MgCl ₂		
44	Dntps		
45	Αμπικιλίνη (Ampicillin sodium salt)	Biochemica	A0839
46	Nucleospin PCR Clean-up & Gel Extraction kit	Macherey-Nagel	740609.50
47	Nucleospin Plasmid kit	Macherey-Nagel	740588.50
48	Περιοριστική Ενδονουκλεάση PstI	Takara	1073A
49	Περιοριστική Ενδονουκλεάση EcoRI	Takara	1040A
50	Περιοριστική Ενδονουκλεάση BamHI	Takara	1010A
51	Περιοριστική Ενδονουκλεάση HindIII	Takara	1060AH

52	DpnI	BioLabs	R0176S
53	5-FOA (5-Fluoroorotic Acid) (5-φθόρο-οροτικό οξύ)	Thermo Scientific	R0811
54	SDS (Μετά νατρίου άλας του Θεϊκού Δωδεκακυκλίου)	Sigma-Aldrich	L3771
55	Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 4000)	AppliChem	A1249
56	Carrier dna (Salmon Sperm)		A2160,0001
57	T4 DNA λιγάση	Takara	2011A
58	10X Loading buffer	Takara	
59	Γλυκερόλη	Fisher Scientific	BP229
60	IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)		
61	X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside)		
62	pUC19 plasmid		
63	W303-1a Yeast Strain		
64	MOPS	Sigma-Aldrich	M1254
65	RbCl ₂	Sigma-Aldrich	R2252
66	CaCl ₂		
67	MnCl		
68	CH ₃ COOK		
69	Λυσοζύμη		
70	BSA		
71	Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest	Sigma-Aldrich	D9281
72	1 kb DNA Ladder RTU	Nippon Genetics	MWD-1
73	CutSmart	BioLabs	B7204S



Σχήμα 3.1: Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest



Σχήμα 3.2: 1 kb DNA 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)	Αλληλουχία εκκινητών	Θερμοκρασίες Υβριδοποίησης
1	MSN4 Forward(pstI)	5' AAAACTGCAG ATGCTAGTCTTCGGACCTAA 3'	Tm=58
2	MSN4 Reverse(BamHI)	5' CGGGATCC AAAATCACCGTGCTTTTGTG 3'	Tm=58
3	MSN4 (Ser532Ala)For	5' AGAAAGTCGGCAAGTGTTAC 3'	Tm=58
4	MSN4 (Ser532Ala) Rev.	5' GTAACACTTGCCGACTTCT 3'	
5	Forward_MSN4	5' CAGTTCGGCTTTTTTCTTTTCTTCTTATTA AAAACAATATA 3'	Tm=58
6	Reverse_MSN4	5' CCGTAGCTTGTCTTGCTTTTATTTGCTTTTGACCTTATTTTTT 3'	Tm=54

3.1.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Παρακάτω αναφέρονται τα υλικά και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία των θρεπτικών υλικών. Η προσθήκη άγαρ γίνεται μόνο κατά την δημιουργία τρυβλίων με τα αντίστοιχα θρεπτικά.

3.1.1.1. YEP

Πίνακας 3.3 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του YEP.

Yeast extract	10g
Bacto Peptone	20g
Glucose	20g
Agar	20g
Απιονισμένο H ₂ 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.

Yeast Nitrogen Base	6,7g
Glucose	20g
Synthetic Complete (-U)	2g
Agar	20g
Απιονισμένο H ₂ 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 ₂ O	Μέχρι όγκου 1L

Πραγματοποιείται υγρή αποστείρωση στον αυτόκαυστο.

3.1.1.4 Synthetic Complete (-U):

Πίνακας 3.6 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Synthetic Complete (-U).

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

3.1.1.5 SC+URA+5-FOA

1. Προστίθενται 10 g agar σε 300 ml H₂O σε κωνική φιάλη του 1 L με μαγνήτη και αποστείρωση.
2. Σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 195 ml H₂O ακριβώς Προστίθενται τα ακόλουθα:
 - 3.35 g Yeast Nitrogen base without amino acids
 - 10 g Glucose
 - 1.15 g Amino Acids mix (w/o uracil)
 - 0.5 g 5-FOA
3. Θέρμανση του μείγματος με το 5-FOA πάνω σε 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 άγαρ πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και ανάδευση έως ότου η θερμοκρασία του μειωθεί έως τους 65°C.
6. Προσθήκη του αποστειρωμένου μείγματος 5-FOA καθώς και 5 ml από το αποστειρωμένο διάλυμα 100 X ουρακίλης (2 mg/ml). Όλες αυτές οι μεταγγίσεις υγρών στην κωνική γίνονται υπό στείρες συνθήκες.
7. Ακολουθεί 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 ₂ 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 200 μl υγρής καλλιέργειας στα 15.000 x g για 3 min, απομακρύνοντας στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό (O.D.600≈0.4).
2. Επαναδιάλυση κυττάρων σε 100 μl διαλύματος (200 mM LiOAc, 1% SDS).
3. Επώαση για 5 min στους 70°C.
4. Προσθήκη 300 μl απόλυτης αιθανόλης και ισχυρή ανάδευση (vortex).
5. Φυγοκέντριση του DNA και των κυτταρικών υπολειμμάτων στα 15000 x g για 3 min.
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 200 μl 70% αιθανόλης για έκπλυση ιζήματος.
7. Φυγοκέντριση για 2 min στα 15.000 x g. Απομάκρυνση υπερκείμενου.

8. Στέγνωμα ιζήματος για 2 min και στη συνέχεια προσθήκη 100 μl H₂O και επαναδιάλυση ιζήματος.
9. Φυγοκέντρηση στα 15.000 x g για 15 sec ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
10. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erppendorf και φύλαξη αυτού στους -20oC.
11. 1-4 μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.

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

3.2.2.1 PCR Clean-up

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου του δείγματος από το buffer NT1. (π.χ. για 100μl δείγματος PCR προσθέτουμε 200μl buffer NT1).
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε ένα Collection Tube (2 mL) και μεταφορά 700μl αντίδρασης PCR. Φυγοκέντρηση δείγματος για 30sec στις 11000x g. (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).
3. Προσθήκη 700μl buffer NT3 και φυγοκέντρηση για 30sec στις 11000x g.
4. Φυγοκέντρηση για 1min στις 11000x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων buffer NT3.
5. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5ml). Προσθήκη 15-30μl buffer NE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Φυγοκέντρηση για 1min στις 11000xg.

3.2.2.2 Απομόνωση DNA από πηκτώματα αγαρόζης

1. Προσθήκη 200μl buffer NTI για κάθε 100mg πηκτής αγαρόζης <2% και θέρμανση του δείγματος για 5-10min στους 50°C. Vortex έως ότου η πηκτική αγαρόζης διαλυθεί πλήρως.
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε ένα Collection Tube (2 mL)) και μεταφορά 700μl αντίδρασης pcr. Φυγοκέντριση δείγματος για 30sec στις 11000x g. (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).
3. Προσθήκη 700μl buffer NT3 και φυγοκέντριση για 30sec στις 11000x g.
4. Φυγοκέντριση 1min, 11000x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων buffer NT3.
5. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5ml). Προσθήκη 15-30μl buffer NE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.

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

1. Φυγοκέντριση 1-5 ml καλλιέργειας *E.coli* σε θρεπτικό LB για 30s στις 11000x g. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
2. Προσθήκη 250μl buffer A1 και vortex.
3. Προσθήκη 250μl buffer A2 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
4. Προσθήκη 300μl buffer A3 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές.
5. Φυγοκέντριση για 5min στις 11000x g σε θερμοκρασία

δωματίου.(επαναλαμβάνουμε εάν το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό).

6. Τοποθετούμε μια στήλη NucleoSpin® Plasmid σε ένα Collection Tube (2 mL) και μεταφέρουμε το υπερκείμενο από το βήμα 3. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g. (εάν ο όγκος του υπερκείμενου ξεπερνάει τα 750μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα).
7. Προσθήκη 500μl buffer AW (προθέρμανση στους 50°C) και φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g.
8. Προσθήκη 600μl buffer A4 και φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g.
9. Φυγοκέντριση για 2min στις 11000x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων.
10. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Plasmid σε νέο Eppendorf και προσθήκη 50μl buffer AE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
11. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g.

3.2.4 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών για μετασχηματισμό

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

Πίνακας 3.8 : Παρασκευή διαλύματος Tfb1*.

100 mM	RbCl ₂	pH: 5,8 Ρυθμιση pH με 0,2M CH ₃ COOH
50 mM	MnCl ₂	
30 mM	CH ₃ COOK	
10 mM	CaCl ₂	
15%	Glycerol	

Πίνακας 3.9 : Παρασκευή διαλύματος Tfb2*.

10 mM	MOPS pH:7	pH: 7 αν όχι προσαρμόστε το διάλυμα με KOH
10 mM	RbCl ₂	
80 mM	CaCl ₂	
15%	Glycerol	

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

3.2.5 Μετασηματισμός Βακτηριακών κυττάρων

1. Ξεπάγωμα των competent cells στον πάγο και ακολουθεί μοίρασμα τους σε δυο eppendorf.
2. Προσθήκη <100 ng DNA και επώαση στον πάγο για 20-40 min.
3. Τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (Heat shock) για 90 sec στους 42°C.
4. Τοποθέτηση των κυττάρων για 1 min στον πάγο, προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 1h.
5. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση για 30 sec στις 10.000 x g και αφαίρεση 1 ml του υπερκείμενου υγρού.

6. Επαναδιάλυση κυττάρων στα υπολειπόμενα 200 μl, και τοποθέτησή τους επί θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη).

3.1.6 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού

1. Εμβολιασμός 5 ml θρεπτικού μέσου με μονήρη αποικία και ολονύκτια επώαση.
2. Φυγοκέντριση 1,5 ml καλλιέργειας 10.000 rpm, 1 min, RT.
3. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού.
4. Επαναδιάλυση σε 0,7 ml διαλύματος STET
5. Έντονη ανάδευση.
6. Προσθήκη 10 μl λυσοζύμης 1 mg/ml.
7. Τοποθέτηση eppendorfs στους 100°C για 1 min.
8. Φυγοκέντριση στα 10.000 rpm για 10min ή λιγότερο σε RT.
9. Μεταφορά 430 μl του υπερκειμένου σε νέα eppendorfs.
10. Προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης.
11. Τοποθέτηση των eppendorfs στους -80°C για 10 min.
12. Φυγοκέντριση σε 10.000 rpm για 30 min στους 4°C.
13. Πλήρης απομάκρυνση υπερκειμένου και πλύσιμο ιζήματος με 70% Ethanol.
14. Φυγοκέντριση για 5 min.
15. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη 20 μl (H₂O + RNase (100 ng/μl)).
16. Επώαση σε RT για 5-10 min.

Lysozyme Stock

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

Πίνακας 3.10: Παρασκευή STET buffer.

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

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

1. Εμβολιασμός 50 ml καλλιέργειας ζύμης αργά το απόγευμα (για 5 μετασχηματισμούς).
2. Επόμενο πρωί όταν $OD_{600}=0.4-0.6 \sim 10^7 \text{ cells/ml} - 5 \cdot 10^8 \text{ cells/ml}$ φυγοκέντριση σε 2.000 rpm για 5 min στους 4°C.
3. Επαναδιάλυση σε 25 ml αποστειρωμένο H₂O και φυγοκέντριση στους 4°C.
4. Επαναδιάλυση σε 1 ml 10 mM LiOAc (Οξικό Λίθιο), στον πάγο.
5. Μεταφορά σε erpendorf.
6. Φυγοκέντριση στις 4.000 rpm για 30 sec-1 min στους 4°C.
7. Επαναδιάλυση σε 100 mM LiOAc Τελικός όγκος=500 μl (κύτταρα+διάλυμα).
8. Μοίρασμα σε 5 erpendorfs (100 μl).
9. Σύντομη φυγοκέντριση (4-5 sec).
10. Επαναδιάλυση ιζήματος σε:
 - a. 240 μl PEG(4000) 50%,
 - b. 36 μl 1M LiOAc,
 - c. 10 μl carrier DNA (10 μg/μl),
 - d. 74 μl H₂O+DNA (0.1-1 μg).
11. Vortex 1 min.
12. Επώαση στους 30°C για 30 min.
13. Επώαση στους 42°C για 15 min.
14. Φυγοκέντριση στις 2.000 rpm για 1 min.
15. Προσθήκη 200 μl αποστειρωμένου H₂O και ήπια επαναδιάλυση.

16. Τοποθέτηση επί κατάλληλου στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία petri

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

1. Αρχικά γίνεται διάλυση σε κωνική φιάλη 0,5 g αγαρόζης με 50 ml 1xTAE και θερμαίνεται μέχρι βρασμό του πηκτώματος. Αφού βράσει το διάλυμα μας προσθέτουμε 2,5 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 από 30 λεπτά κατά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται το πήκτωμα και τοποθετείται στο αντίστοιχο μηχάνημα το οποίο εκπέμπει UV ακτινοβολία και μας δίνει τα τελικά αποτελέσματα δηλαδή τον προσδιορισμό του μεγέθους των δειγμάτων που υπολογίζεται με σύγκριση του συντελεστή επιβράδυνσης αυτού σε σχέση με των τμημάτων DNA του μάρτυρα.

3.2.9 Μεταφορά αποικιών με την διαδικασία *replica*.

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

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

3.2.10 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων

Σε ένα erpendorf γίνεται προσθήκη 800 μl από την καλλιέργεια ζύμης ή βακτηρίων και 200 μl γλυκερόλης. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και φύλαξη στους -80oC. Η παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπο ασηπτικές συνθήκες.

3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης

3.3.1 Έλεγχος καθαρότητας ανεπτυγμένων καλλιεργειών

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

3.3.2 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης

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

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

Υγρά θρεπτικά υλικά διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης παρασκευάστηκαν (2%w/v, 5% w/v, 10% w/v, 12%w/v, 15% w/v), εμβολιάστηκαν

με ίδιο αριθμό κυττάρων και 100μl αυτών, τοποθετήθηκαν εις διπλούν στην πλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων.

3.3.3 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης

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

Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής :

Σε κωνικές φιάλες των 100ml τοποθετείται θρεπτικό μέσο διαφόρων συγκεντρώσεων αιθανόλης. Οι κωνικές εμβολιάζονται με κατάλληλη ποσότητα των στελεχών και επωάζονται στους 30⁰C 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 Ser532Ala της πρωτεΐνης *msn4* (W303-1a_MSN4_Ser532Ala).

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να επιτευχθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης Ser532Ala στην *msn4* πρωτεΐνη, απαιτείται η τροποποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου MSN4 τροποιώντας την τριπλέτα που αντιστοιχεί στο αμινοξύ Ser532Ala.

4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης

4.1.1 1^η μέθοδος- μέθοδος “Megaprimer”

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

pUC19- MSN4 for PCR	2μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
Primer MSN4-Ser-532-Ala-F	1μl
Primer BamHI- MSN4- R	1μl
H ₂ O	6μl
Σύνολο	20μl

Πρόγραμμα για PCR1 :

1. 95 → 3min
2. 98 → 20sec
3. 58 → 15sec
4. 72 → 1min30sec Βήμα 2, #30

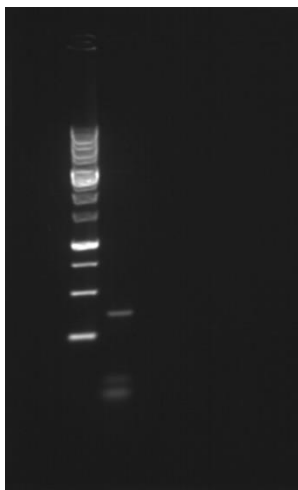
5. 72 →5min

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-532-Ala-F).

Η τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη 532 είναι η TCA. Ο εκκινητής MSN4-Ser-532-Ala έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η αντικατάσταση της τριπλέτας που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη, στην τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ αλανίνη GCA.

Το προϊόν της PCR1 είναι ένα μικρό τμήμα DNA μεγέθους ~300 ζεύγη 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 cleanup gel extraction 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

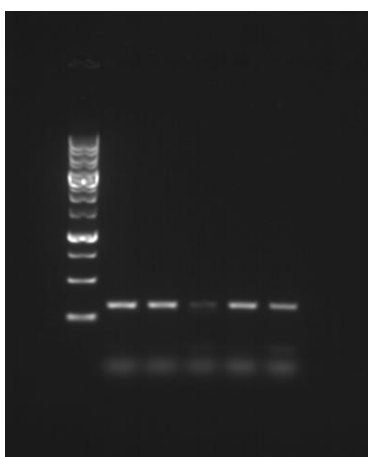
pUC19- MSN4 for PCR1	2μl
MSN4-PCR1- R	2μl
pstI- MSN4- F	1μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H ₂ O	5μl
Σύνολο	20μl

Πρόγραμμα PCR2 :

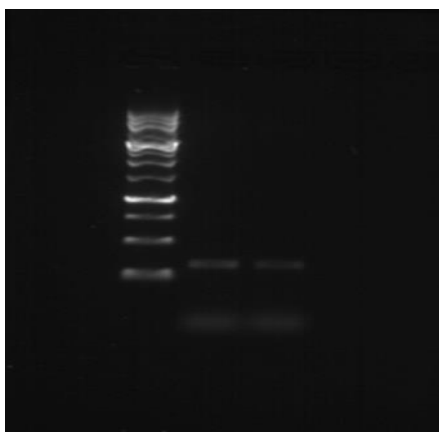
1. 98 → 3min
2. 98 → 20sec
3. 58 → 15sec
4. 72 → 1min30sec Βήμα 2, #25
5. 72 → 5min
6. 4 → ∞

Το προϊόν της PCR2 είναι ένα τμήμα DNA μεγέθους ~1900 ζεύγη 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 κατέστη 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^η 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-532-Ala-R το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο MSN4_Egfd_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

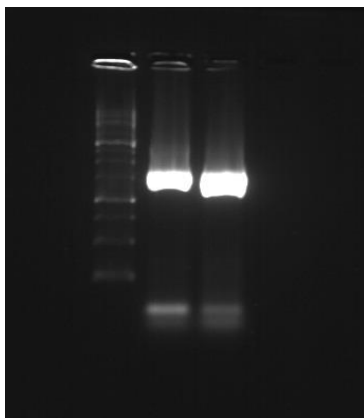
pUC19-MSN4	2μl
Primer MSN4_Egfd_Forward	1μl
Primer MSN4_Ser532Ala_Reverse	1μl
2xKapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H ₂ O	6μl
Σύνολο:	20μl

Πρόγραμμα PCR2:

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

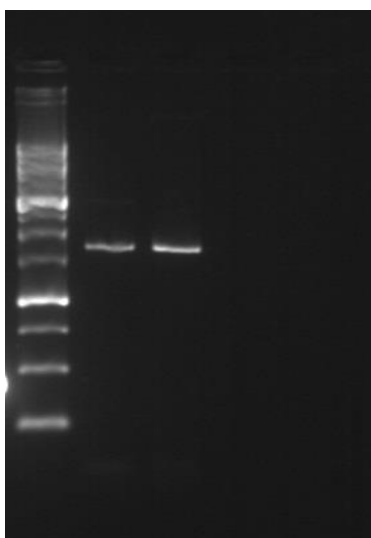
Το αποτέλεσμα από την παραπάνω διαδικασία είναι η δημιουργία ενός δεύτερου τμήματος μεγέθους ~1600 ζευγών βάσεων, του υπολοίπου, της MSN4 το οποίο επίσης φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη.

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 cleanup gel extraction 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 Ser532Ala, (MSN4-Ser532Ala) 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_Egfd_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

DNA 1 (προϊόν PCR1)	1μl
DNA 2 (προϊόν PCR2)	1μl
Primer MSN4_Reverse	1μl
Primer MSN4_Egfd_Forward	1μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H ₂ O	6μl
Σύνολο:	20μl

Πρόγραμμα PCR3:

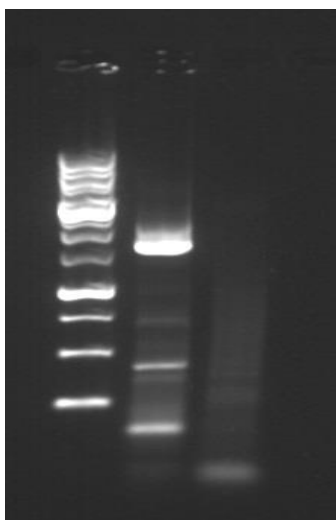
1. 95 → 3min
2. 98 → 10sec
3. 60 → 10sec
4. 72 → 2min
5. 98 → 10sec
6. 60 → 10sec
7. 72 → 2min Βήμα 5, #4
8. 98 → 10sec
9. 64 → 10sec

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^η PCR συντίθεται το MSN4 φέροντας την μετάλλαξη Ser_532_Ala.

Το προϊόν της PCR3 ηλεκτροφορεύεται 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 *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέον γονιδίου MSN4-Ser532Ala 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 κατέστη δυνατή η λήψη του επιθυμητού προϊόντος της PCR3. Στην Εικ.4.6 παρουσιάζεται η ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της PCR3.

4.1.3 3^η μέθοδος- πεψη 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_532 με PCR. Χρησιμοποιούνται ως εκκινητές οι MSN4_532_F και MSN4_532_R (πίνακας 4.5). Το προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μέγεθος ~4200bp.

Πίνακας 4.5 : Αντιδραστήρια για την PCR

pUC19_MSN4	4μl
Primer MSN4_532_F	1μl
Primer MSN4_532_R	1μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H ₂ O	4μl
Σύνολο :	20μl

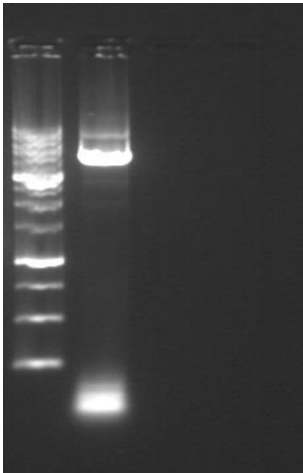
Πρόγραμμα PCR :

1. 95 → 3min
2. 98 → 15sec
3. 64 → 10sec
4. 72 → 2min15sec, Βήμα 2, #25

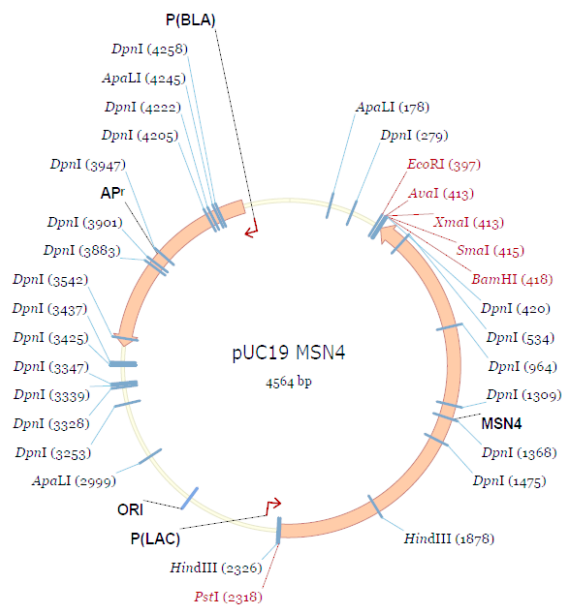
5. 72 →4min

6. 4 →∞

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται 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_MSN4 και οι θέσεις πέψης του ενζύμου *DpnI*.

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

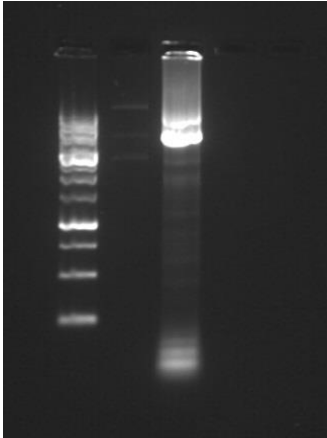
Πίνακας 4.6 : Το προϊόν της PCR υποβάλλεται σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *DpnI*. Επώαση στους 37 °C για 1 h.

Προϊόν PCR	15μl
<i>DpnI</i>	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 δεν συμβαίνουν μεθυλιώσεις.

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

Η ακεραιότητα των προϊόντων της πέψης ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 4.8).



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 μ l του προϊόντος της αντίδρασης και ακολούθησε τοποθέτηση αυτών σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνη (100 μ g/ml) για να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με το pUC19_MSN4_Ser_532_Ala 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.

pUC19_MSN4	1 μ l
<i>DpnI</i>	1 μ l
CutSmart Buffer	2 μ l
H ₂ O	16 μ l
Σύνολο :	20 μ l

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.

Υστερα 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_532 και ως εκκινήτες οι MSN4-Egfd-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).

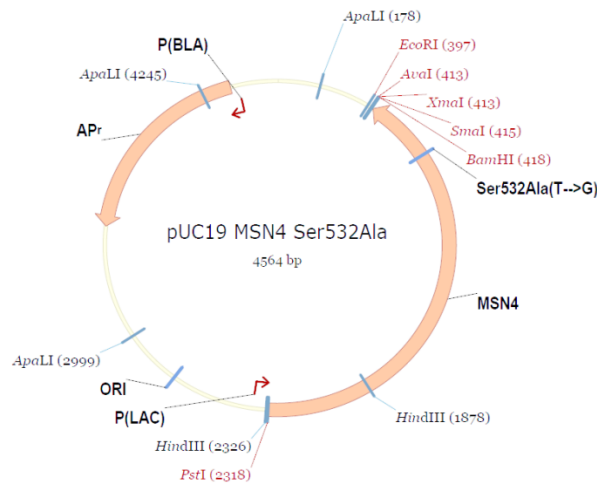
Πίνακας 4.8 : Αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της PCR για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου MSN4 που φέρει την μετάλλαξη.

DNA (pUC19_MSN4_532)	2μl
Primer MSN4_Egfd_F	1μl
Primer MSN4_R	1μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	10μl
H ₂ O	6μl
Σύνολο :	20μl

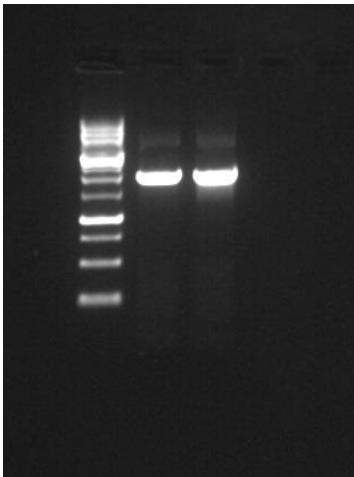
Πρόγραμμα PCR :

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

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέον γονιδίου MSN4-Ser532Ala προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του.



Σχήμα 4.2 : Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN4 με την μετάλλαξη Ser532Ala.



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_532_Ala της πρωτεΐνης *msn4*.

4.2 Απαλοιφή MSN4 αγρίου τύπου από κύτταρα ζύμης.

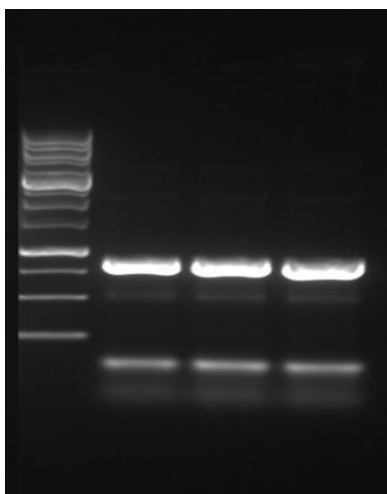
Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την αντικατάσταση ενός γονιδίου στο γενομικό DNA της ζύμης απαιτεί την τέλεση δυο διαδοχικών μετασχηματισμών και ομόλογων ανασυνδυασμών. Κατά τον πρώτο μετασχηματισμό τα κύτταρα ζύμης του στελέχους W303-1a, τα οποία δεν έχουν λειτουργικό γονίδιο URA3, μετασχηματίζονται 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 εκκινητών (Πίν. 4.9). 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 (Εικ. 4.10).

Συνθήκες PCR URA3:

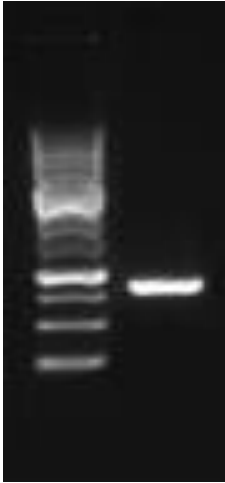
- | | | |
|---------|---------|--------------------|
| 1. 95°C | →3 min | |
| 2. 95°C | →20 sec | |
| 3. 58°C | →15 sec | |
| 4. 72°C | →1 min | →βήμα 2, #30 φορές |
| 5. 72°C | →5 min | |
| 6. 4°C | →∞ | |

Πίνακας 4.9 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR URA3:

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



Εικόνα 4.10 : Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR URA3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στις θέσεις 2 έως 4 βρίσκεται το προϊόν της PCR URA3 χωρισμένο σε τρία ίσα μέρη.

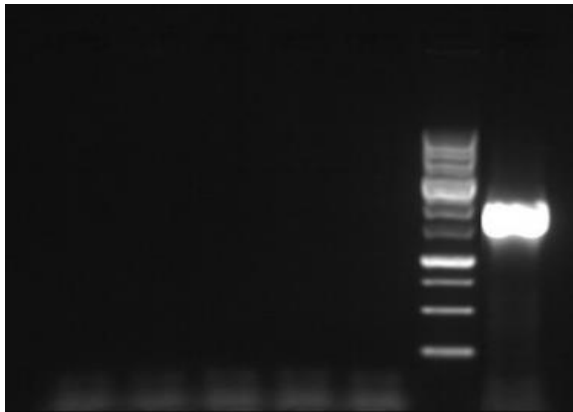


Εικόνα 4.11 : Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR URA3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το καθαρό προϊόν της PCR URA3.

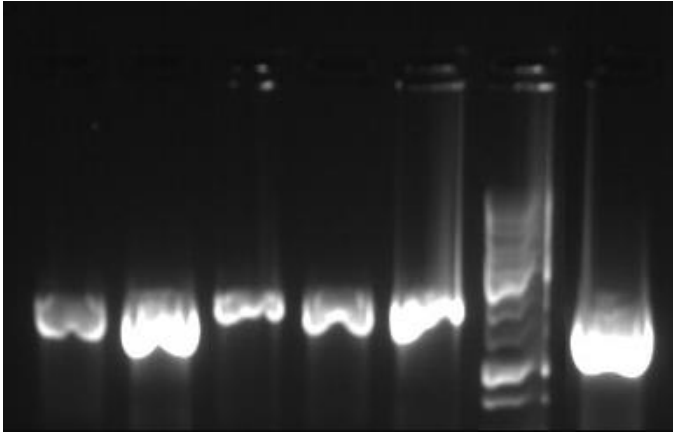
Το καθαρισμένο πλέον γονίδιο URA3_MSN4 χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης W303-1a. Τα κύτταρα που υπεβλήθησαν στην διαδικασία του μετασχηματισμού, αρχικά αναπτύχθηκαν επί περιοριστικού θρεπτικού μέσου από το οποίο απουσίαζε το αμινοξύ ουρακίλη (Synthetic Complete – Uracil (SC-U)) σε 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 επώαστηκαν 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 εκκινήτες 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.



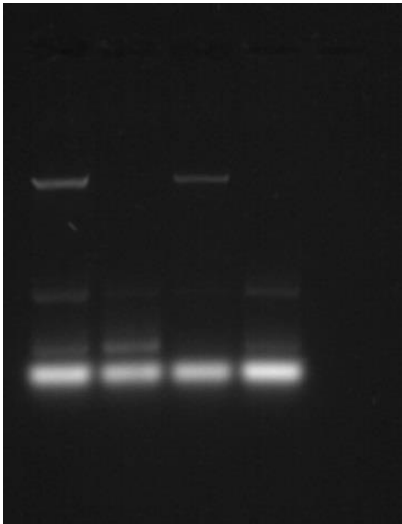
Εικόνα 4.12 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taq polymerase, με MSN2 εκκινήτες, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 1^{ου} μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: 1^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 3^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 4^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 5^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, μάρτυρας, δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης W303-1a).



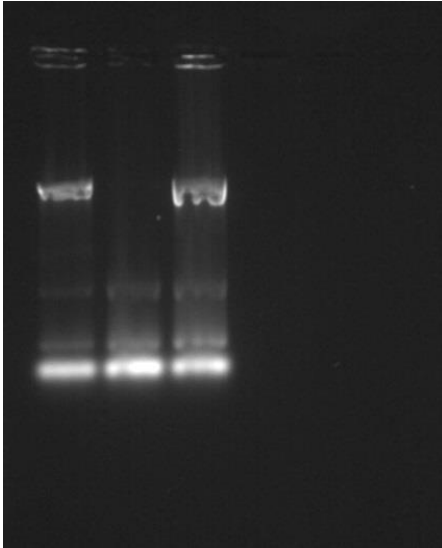
Εικόνα 4.13 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taq polymerase, με MSN4 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 1^{ου} μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: 1^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 3^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 4^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 5^ο 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-532-Ala στη ζύμη, η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με τον πρώτο μετασχηματισμό, μόνο που σαν DNA αυτή τη φορά χρησιμοποιείται το MSN4_Ser532Ala 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. 4.14). 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_Ser532Ala. 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. 4.15). Τα δείγματα τα οποία έχουν δεχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN4_Ser532Ala 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 μετασηματισμού 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 μετασηματισμένης ζύμης.

4.3 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress.

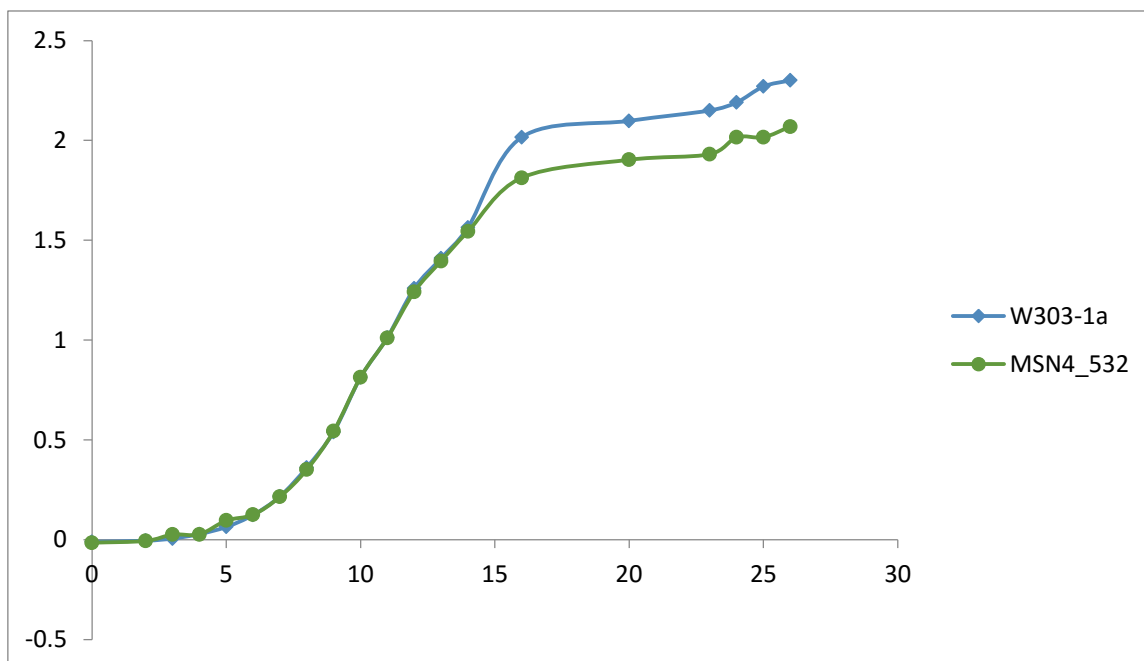
Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a-MSN4_532) σε συνθήκες stress, επιλέχθηκαν ως παράγοντες μελέτης η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης καθώς και η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του σακχαρομύκητα.

4.3.1 Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης

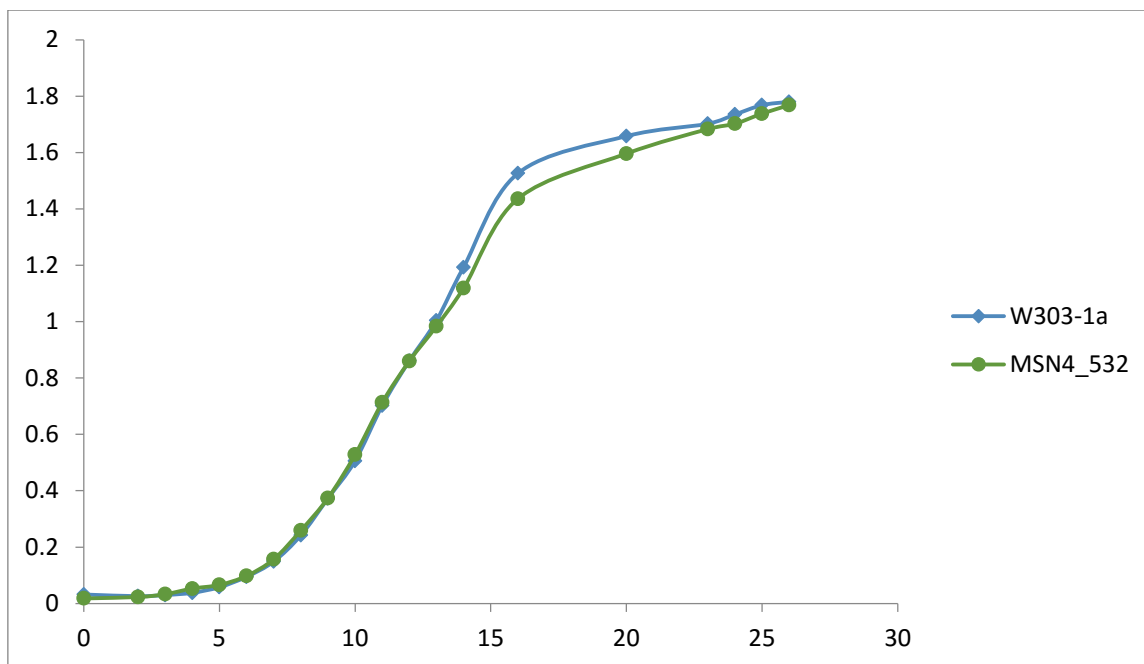
Μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους έναντι του αγρίου τύπου και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (Σχ. 4.3, 4.4). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser532Ala επί της πρωτεΐνης *msn4* του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης αλλά παρατηρείται διαφοροποίηση κατά το τέλος της εκθετικής φάσης καθώς και στην στατική φάση ως προς τον αριθμό των

κυττάρων με το μεταλλαγμένο στέλεχος να υστερεί στο φυσιολογικό θρεπτικό μέσο (Σχήμα 4.3).

Αντίστοιχα στο θρεπτικό υλικό με υψηλό ποσοστό συγκέντρωσης γλυκόζης δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική διαφοροποίηση πέρα από το τέλος της εκθετικής φάσης που διακρίνεται μια ελάχιστη διαφοροποίηση των δύο καμπυλών (Σχήμα 4.4).



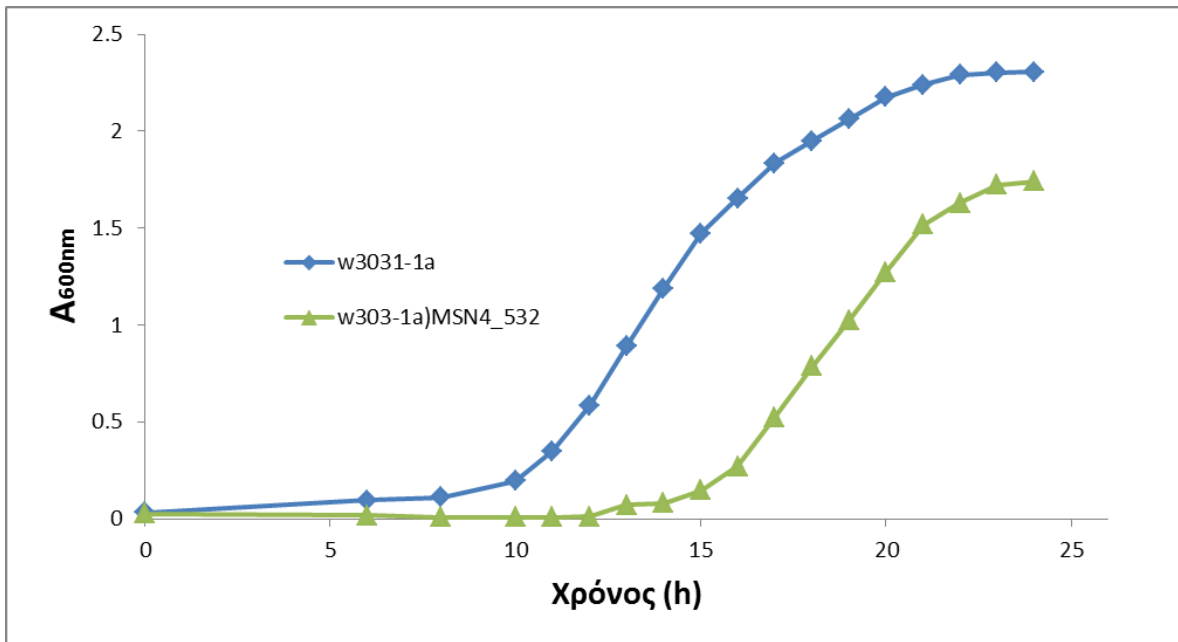
Σχήμα 4.3 : καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae* , αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, παρουσία 2% w/v γλυκόζης.



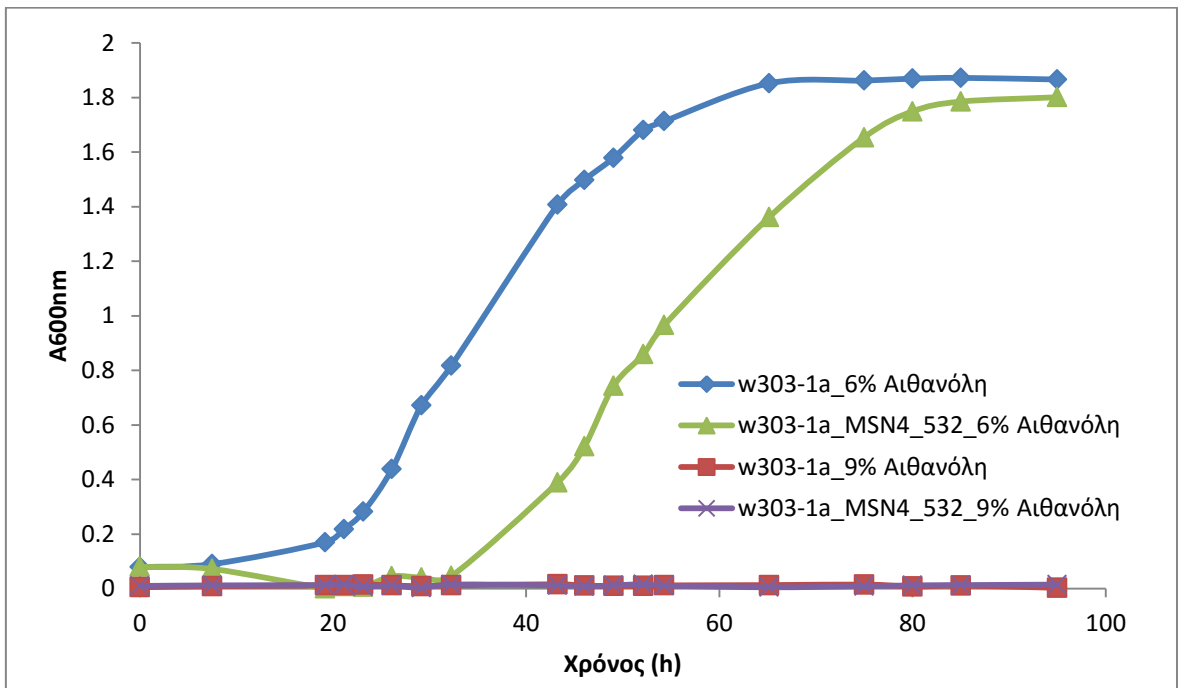
Σχήμα 4.4 : καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae* , αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, παρουσία 15% w/v γλυκόζης.

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 Ser532Ala 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 μικρότερη ανάπτυξη καθώς επίσης παρατηρείται και καθυστέρηση ως προς αυτήν (Σχ. 4.5). Σε υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης (6%) επίσης διακρίνεται καθυστέρηση ανάπτυξης αλλά ο τελικός αριθμός των ανεπτυγμένων κυττάρων είναι ίδιος με αυτού του αγρίου τύπου. (Σχ. 4.6). Τέλος σε ακόμα πιο υψηλά επίπεδα αιθανόλης (9%) δεν έχουμε ανάπτυξη (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% και 9% 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 το τομέα της περιβαντολογικής διαχείρισης αποβλήτων. Το συγκεκριμένο γεγονός λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ως έναυσμα για την δημιουργία και μελέτη γενετικά τροποποιημένων στελεχών του ζυμομήκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Πρωταρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η δημιουργία της μετάλλαξης Ser532Ala 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 T1607G επί του γονιδίου MSN4 που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος σερίνη σε αλανίνη στη θέση 532 (Ser532Ala), ακολουθώντας την μέθοδο πέψης με το ένζυμο *DpnI*. Κατόπιν, η μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου της MSN4 ενισχύθηκε με PCR και εισήχθη σε κύτταρα ζύμης W303-1a_ΔMSN4::URA3 από τα οποία έχει απαληφθεί το αγρίου τύπου γονίδιο της MSN4. Ακολουθως του μετασχηματισμού και του ακολουθούμενου ομόλογου ανασυνδυασμού, το στέλεχος που προέκυψε είναι το W303-1a_MSN4_532.

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 δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή του φυσιολογικού στελέχους, τόσο σε βέλτιστο θρεπτικό μέσο (2% w/v) όσο και σε θρεπτικό με αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης (15% w/v). Αντίθετα, η κυτταρική ανάπτυξη του

μεταλλαγμένου στελέχους φαίνεται μειωμένη κατά τη στατική φάση έναντι αυτής του φυσιολογικού κυρίως στα χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης. 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.

Αντίθετα, η παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης επιδρά αρνητικά στο ρυθμό ανάπτυξη και όταν συγκεντρώνεται στο μέσο, δρα ως χημικός στρεσογόνος παράγοντας. Συγκεκριμένα, σε θρεπτικό μέσο με σχετικά χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης (3% v/v) παρατηρείται ότι η κυτταρική ανάπτυξη του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα διαφέρει αισθητά με αυτή του αγρίου τύπου διότι υπάρχει μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης καθώς και αυξημένη υστέρηση στην είσοδο των κυττάρων στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Όσον αφορά την μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (6% v/v) παρατηρείται επίσης μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης έναντι του αγρίου τύπου στελέχους. Τέλος σε ακόμα πιο υψηλά επίπεδα (9% v/v) δεν υπάρχει ανάπτυξη.

Συνοψίζοντας, παρατηρείται ότι η μετάλλαξη που μελετήθηκε δεν επηρεάζει την ικανότητα ανάπτυξης του ζυμομύκητα σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης σακχάρου, ενώ η ικανότητα ανάπτυξης παρουσία αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο βλέπουμε να έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ανάπτυξης. Αυτό κατά ανάγκη δεν σημαίνει ότι η μετάλλαξη Ser532Ala επί της *msn4* πρωτεΐνης καθιστά τα κύτταρα πιο ευάλωτα διότι ο 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 532 της *msn4* απαιτείται περαιτέρω μελέτη τόσο της ικανότητας ζύμωσης του μεταλλαγμένου στελέχους όσο και της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Barik S. (1996). Site- Directed Mutagenesis in Vitro by Megaprimer PCR, Methods in Molecular Biology vol.57- In vitro Mutagenesis protocols. pp. 203-215
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Barik, 1996)
- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002). Biochemistry, 5th edition. New York: W.H. Freeman and Company.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Berg et al., 2002)
- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). msn2p and msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 180, pp. 1044–1052.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Boy- Marcotte *et al.*, 1998)
- Brewster J.L., De Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. Science. vol. 259 pp. 1760-1763.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Brewster *et al.*, 1993)
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Goodday G.W. (2001). The Fungi. 2nd rd. London : Academic Press.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Carlile *et al.*, 2001)
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 24, pp. 469–486.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Estruch, 2000)

- Estruch F. and Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 3872–3881.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Estruch and Carlson, 1993)
- Gancedo J.M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Gancedo, 2008)
- 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.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Gasch *et al.*, 2000)
- Glazer A.N. and Nikaido H. (1995). *Microbial Biotechnology- Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W.H. Freeman and Company.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Glazer and Nikaido, 1995)
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*, 21, pp. 135–144.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Gorner *et al.*, 2002)
- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the *msn2/4* transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Hasan *et al.*, 2002)
- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*. vol. 249 pp.127-138.

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

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Hunt, 2006)

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Jackson, 1994)

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

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

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

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

- 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.

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

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

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

- Lee P., Cho B.R., Joo H.S., Hahn J.S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and msn2/msn4. Mol Microbiol, 70, pp. 882–895.

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

- Marechal P.A., Gervais P. (1994). Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 42 pp. 617-622.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Marechal and Gervais, 1994)
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and Estruch F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger protein *msn2p* and *msn4p* are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15, pp. 2227–2235.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Martinez- Pastor *et al.*, 1996)
- Meikle A.J., Reed R.H., Gadd G.M. (1988). Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. vol. 134 pp. 3049-3060.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Meikle *et al.*, 1988)
- PCR Primer- A laboratory manual Cold Spring Harbor Press (1995). pp 603-611.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (PCR- A laboratory manual. (1995)
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985). *Science*, 230. pp. 1350–1354.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Saiki *et al.*, 1985)
- Santangelo G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Santangelo, 2006)
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1990). *BioTechniques*, 8. pp. 404–407.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Sarkar and Sommer 1990, 1992)

- Sarkar G. and Sommer S.S. (1992). *Nucleic Acids Res.*, 20. pp. 4937–4938
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Sarkar and Sommer 1990, 1992)
- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). *msn2p*, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, pp. 5777–5782.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Schmitt and McEntee, 1996)
- Schuller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruis H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO Journal*. vol. 13 pp. 4382-4389.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Schuller *et al.*, 1994)
- Smith A., Ward M.P. and Garrett S. (1998). Yeast PKA represses *msn2p/msn4p* dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17, pp. 3556–3564.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Smith *et al.*, 1998)
- Thevelein J.M. and Winde J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904–918.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Thevelein and Winde, 1999)
- VandenLangernberg B. (2012). Baker's and Brewer's Yeast. Available at: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/vandenla_beth/contact.htm.
Τελευταία επίσκεψη 21/5/2016.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (VandenLangernberg, 2012)
- Walker G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons.
Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Walker, 1998)

- You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and environmental microbiology*.

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

Ελληνική βιβλιογραφία

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

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

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Βερβερίδης, 2003)

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

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Λαζανάκη, 2010)

- Μπαμπίλης Ν. και Οικονόμου Κ. (2001). Βιοχημεία Γ' Γενικού Λυκείου – Τεχνολογικής κατεύθυνσης: Κύκλος Τεχνολογίας και Παραγωγής. Αθήνα: Πατάκης.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Μπαμπίλης και Οικονόμου, 2001)

- Μπατρίνου Α.Μ. (2011). Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων-γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Αθήνα : Π.Χ. Πασχαλίδης.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Μπατρινού, 2011)

- Μπέλκα Α. (2007). Επίδραση υπολειμάτων φυτοφαρμάκων στη βιοχημική συμπεριφορά στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Μπέλκα, 2007)

- Παπανικολάου Β. (2006). Μέθοδοι και Υλικά Ακινητοποίησης Βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου. Πάτρα: s.n.

Αναφορά μέσα στο κείμενο : (Παπανικολάου, 2006)