

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

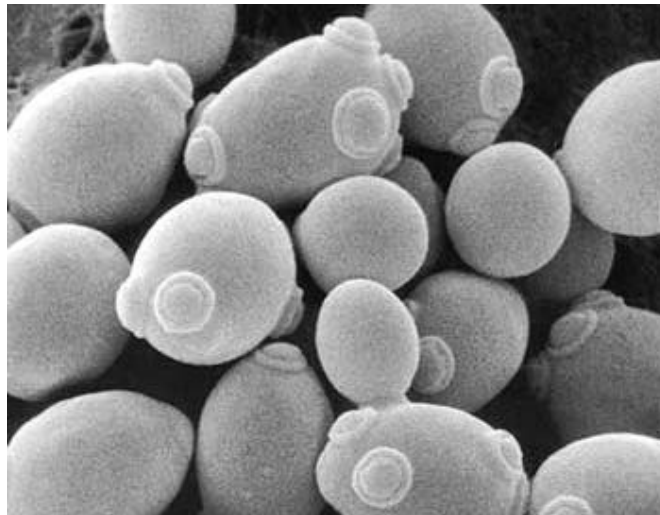
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



<<ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser-633-Ala
ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ msn2 ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
STRESS ΤΟΥ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*>>

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΒΑΡΔΑΚΟΥ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2015

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

<<ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Ser-633-Ala
ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ msn2 ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
STRESS ΤΟΥ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*>>

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΒΑΡΔΑΚΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

Σωτήρης Σπυρίδων Βαμβακάς

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Κατά κύριο λόγο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σωτήρη Βαμβακά για την καθοδήγηση και πολύτιμη βοήθειά του στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην εκτέλεση του πειραματικού της μέρους όσο και στη συγγραφή της.

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, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς και όλους τους φίλους μου που με στήριξαν και με βοήθησαν στο μέγιστο σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή τροφίμων και ποτών. Στις μέρες μας, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αλκοολική ζύμωση που εφαρμόζεται για την παραγωγή βιοαιθανόλης, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας εξαιρετικός παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ άλλων ζυμωτικών μικροοργανισμών και έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Η δημιουργία ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους ζύμης που θα εμφάνιζε καλύτερα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, θα ήταν ανθεκτικότερο στην αιθανόλη, καθώς και σε άλλες αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα μπορούσε να αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Η πρωτεΐνη *msn2* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ελέγχει την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε καταστάσεις κυτταρικού stress. Η ενεργοποίηση του συμβαίνει μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως ο έλεγχος της εισόδου του στο πυρήνα ελέγχεται και αυτός μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της *msn2* πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα του κυττάρου. Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της *msn2* με κατάλληλο λογισμικό αποκαλύφθηκε ότι μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης της *msn2* από την PKA είναι το αμινοξύ Ser στη θέση 633.

Σκοπός της εργασίας ήταν α) η δημιουργία στελέχους ζύμης τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη Ser633Ala επί του γονιδίου MSN2 & β) η πρωταρχική μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress, όπως η παρουσία αλκοόλης ή γλυκόζης εντός του θρεπτικού μέσου.

ABSTRACT

The yeasts are widely used for food and beverage production. Nowadays, there is a great interest in alcoholic fermentation applied for bioethanol production, using as substrates various sugar sources. *Saccharomyces cerevisiae* is an excellent ethanol producer, among other fermentative microorganisms and has the ability to survive in aerobic and anaerobic conditions. Creation of a genetically modified yeast strain which could yield better results during an alcoholic fermentation, could be more resistant to ethanol as well as in any stress condition, would be more effective during ethanol fermentation,

Msn2 protein is a transcription factor that controls the expression of genes that respond to cellular stress. Activation occurs through phosphorylation by various protein kinases. Simultaneously, however, its translocation to the nucleus is controlled through phosphorylation by the complex of the protein kinase A (PKA). Through analysis of the protein sequence of msn2 with appropriate software it was revealed that a potential phosphorylation site of msn2 by PKA is the amino acid Ser at position 633.

The aim of the study was a) to create a yeast strain carrying the mutation Ser633Ala on MSN2 gene & b) the primary study of the effect of the mutation in yeast response to stress conditions, such as the presence of alcohol or glucose in the medium.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> υπό συνθήκες στρες.....	1
1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR)).....	9
1.2.1 Αρχή λειτουργίας αντίδρασης PCR.....	9
1.2.2 Στάδια Κύκλου PCR	10
1.2.3 Εκκινητές και DNA Πολυμεράση	11
1.3 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR.....	14
1.3.1 Μεθοδολογία Μέγα-Εκκινητή (MEGAPRIMER)	14
1.3.2 Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR	15
1.4. Εισαγωγή της μετάλλαξης στη ζύμη	18
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	19
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1. Υλικά	20
3.2 Πειραματικές Πορείες	26
3.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης	26
3.2.2 Παρασκευή 50xTAE	27
3.2.3 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v	27
3.2.4 Παρασκευή μάρτυρα	27
3.2.5 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεμάτων	28
3.2.6 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.....	28
3.2.7 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	31
3.2.8 Συρραφή τμήματος DNA με πλασμιδιακό φορέα.....	31
3.2.9 Nucleospin gel and PCR clean-up kit.....	31
3.2.10 Nucleospin Plasmid kit	33
3.2.11 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό.....	34
3.2.12 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων	35
3.2.13 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού	35
3.2.14 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (High efficiency transformation of yeast cells).....	36
3.2.15 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων.....	37
3.2.16 Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού και ομόλογου ανασυνδυασμού με Taq polymerase	37

3.2.17 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης.....	40
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
4.1 Κατασκευή μεταλλαγμένου γονιδίου.....	41
4.2 Απαλοιφή MSN2 αγρίου τύπου από κύτταρα ζύμης.....	52
4.3 Δοκιμασία ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους.....	58
4.3.1 Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.....	58
4.3.2 Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων.....	60
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	62
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64
6.1 Ξενόγλωσση:.....	64
6.2 Ελληνική:.....	69

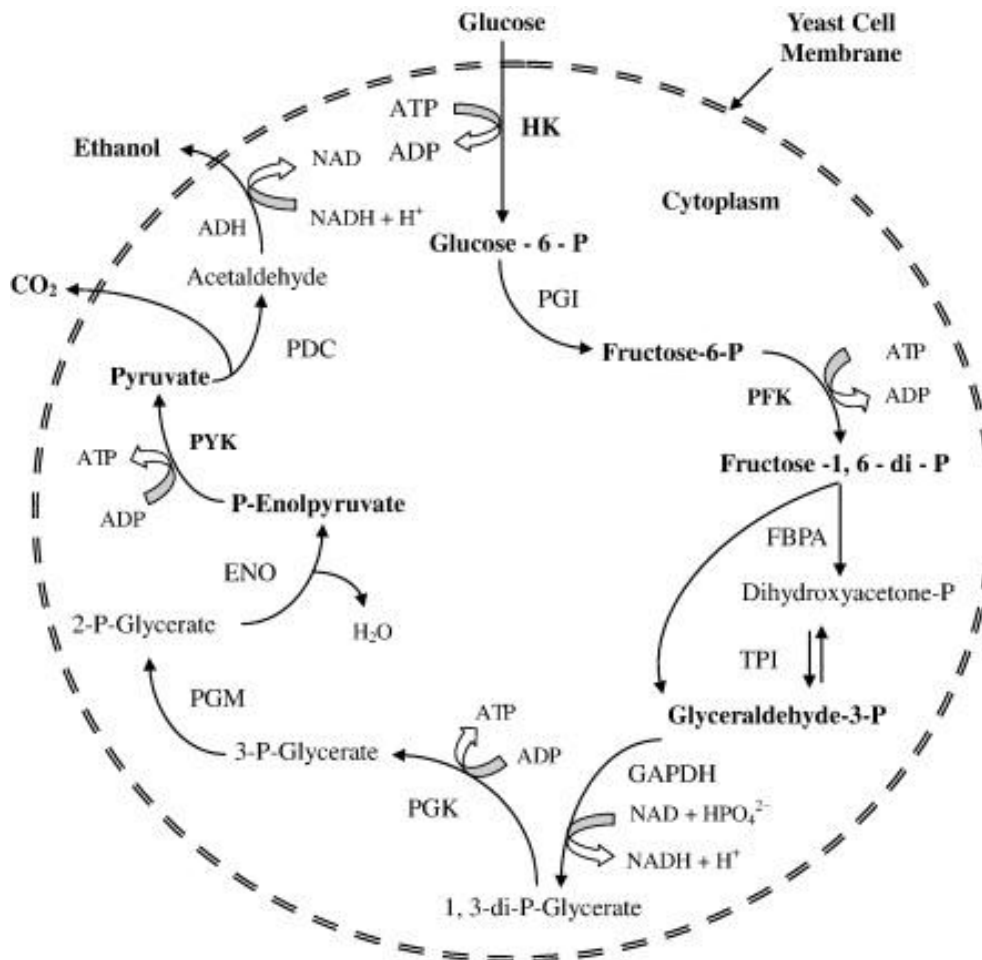
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του *Saccharomyces cerevisiae* υπό συνθήκες στρες

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Σημαντική έρευνα επιτελείται για την βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων είτε με την τροποποίηση των συνθηκών είτε με τη γενετική βελτίωση των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. Η αλκοολική ζύμωση είναι γνωστή και εφαρμόζεται από την αρχαία Ελλάδα μέχρι σήμερα για την παραγωγή οίνου. Η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει σήμερα την χρήση της αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων όπως καλλιεργήσιμα φυτά, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων κ.α. Με ανανεωμένο ενδιαφέρον για την αιθανόλη ως βιώσιμο και καθαρό καύσιμο για τις μεταφορές και για την οικονομική παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη πηγές κυτταρίνης, τον τελευταίο καιρό έχει γίνει ένα κομβικό σημείο σημαντικής έρευνας και προσπάθεια ανάπτυξης σε παγκόσμιο επίπεδο (Outlaw et al., 2005; Sanchez και Cardona, 2008; Wall et al., 2008; Vertes et al., 2010). Η παραγωγή αιθανόλης χαμηλού κόστους και υψηλής ποιότητας είναι σημαντικές προκλήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη μιας βιοοικονομίας. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας θαυμάσιος παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ των πολυάριθμων ζυμωτικών μικροοργανισμών (Lin και Tanaka, 2006; Liu et al., 2008), ο οποίος συχνά καλείται ως ζύμη αρτοποιίας ή ως εκβλαστανούσα ζύμη, λόγω του τρόπου με το οποίο αναπαράγεται όπου είναι η εκβλάστηση και ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει σάκχαρα όπως η γλυκόζη, είτε εξ' ολοκλήρου σε CO₂ και νερό παρουσία οξυγόνου (αεροβίωση), είτε σε αιθανόλη και CO₂ απουσία οξυγόνου (αναεροβίωση). Η πορεία η οποία χρησιμοποιείται από το κύτταρο είναι αυτή της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhoff) κατά την οποία τα σάκχαρα όπως η γλυκόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ. Στη συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ υπό αναερόβιες συνθήκες

αποκαρβοξυλιώνεται ενζυμικά από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού και μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη και ακολούθως ανάγεται σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1: Μια επισκόπηση της γλυκόλυσης. Ένα μόριο γλυκόζης οξειδώνεται προς δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί στη συνέχεια να αποκαρβοξυλιωθεί και να σχηματίσει ακεταλδεΐδη, η οποία μπορεί να δράσει ως τερματικός δέκτης ηλεκτρονίων υπό αναερόβιες συνθήκες στον *S. cerevisiae* για την παραγωγή αιθανόλης (Bai et al., 2008).

Όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταποκριθούν σε ακραίες αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών, ικανών να απειλήσουν τη βιωσιμότητά τους. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των κυττάρων περιλαμβάνουν αισθητήρες και μονοπάτια μεταγωγής σημάτων από το περιβάλλον, που οδηγούν σε σημαντικές

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

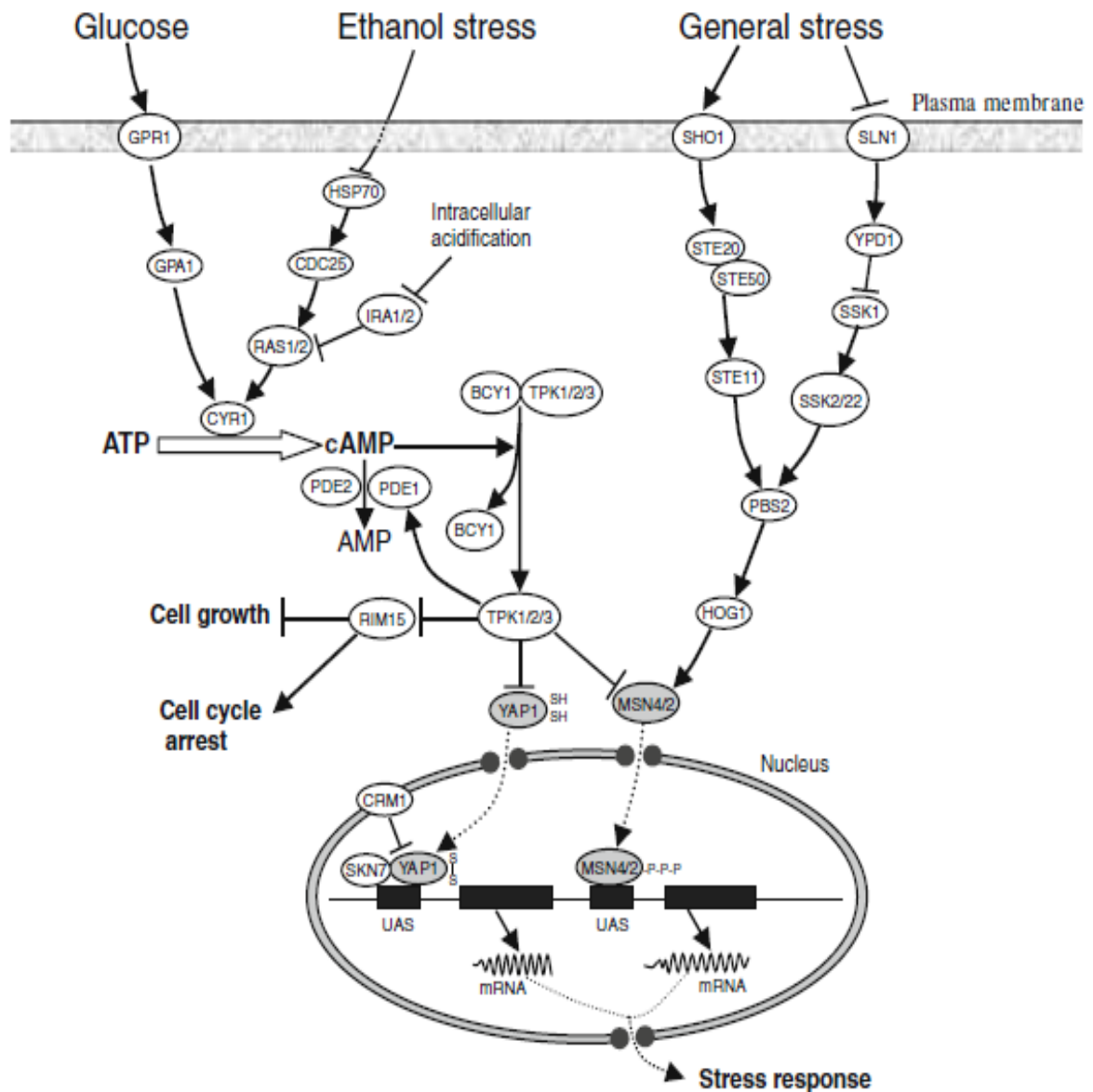
Όταν ο *S. cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφ’ ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ’ ετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών 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. Στον *S. cerevisiae*, σε απάντηση σε μια ραγδαία ζυμώσιμη πηγή άνθρακα όπως είναι η γλυκόζη, το μονοπάτι ενεργοποιεί την *Cyr1* (αδενυλική κυκλάση), η οποία οδηγεί σε μια παροδική αύξηση των επιπέδων της cAMP. Η PKA είναι ετεροτετραμερές που αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Οι καταλυτικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από τρία γονίδια (*TPK1*, *TPK2* και *TPK3*), ενώ οι ρυθμιστικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο (*BCY1*). Η cAMP δρα ως αγγελιοφόρο μόριο απομακρύνοντας τις ρυθμιστικές υπομονάδες έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η αποκατάσταση των επιπέδων της cAMP ελέγχεται από τις φωσφοδιεστεράσες χαμηλής και υψηλής συγγένειας, που κωδικοποιούνται από τις *PDE1* και *PDE2* αντίστοιχα, οι οποίες υδρολύουν την cAMP σε AMP. Διαδοχικά, η PKA επηρεάζει διαφορετικούς στόχους συχνά στο επίπεδο της μεταγραφής γονιδίων, όπως τη διέγερση της κυτταρικής ανάπτυξης και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την

επαγωγή της γλυκόλυσης, την αναστολή της γλυκονεογένεσης, και την κινητοποίηση του γλυκογόνου και της τριαλόζης (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Gancedo, 2008; Smets et al., 2010).

Η PKA μπορεί να ενεργοποιηθεί σε απόκριση στην γλυκόζη από δύο παράλληλα μονοπάτια σηματοδότησης. Το πρώτο εμπλέκει τις Ras1 και Ras2 μικρές GTPases, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσληψη γλυκόζης και την εν συνεχεία φωσφορυλίωση τους. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την Gpr1 (ένας υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες) και την Gα πρωτεΐνη του Gρα2. Και τα δύο αυτά μονοπάτια συγκλίνουν προς την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή της cAMP (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Gancedo, 2008).

Η ενεργοποίηση της PKA έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση. Συνεπώς, αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ενδοκυττάριους στόχους της PKA (Σχ. 1.2). Δύο από αυτούς είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες msn2 και msn4, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των λεγόμενων STRE (στοιχείο απόκρισης στο stress) ελεγχόμενων γονιδίων (Estruch και Carlson, 1993; Martinez-Pastor et al., 1996; Schmitt και McEntee, 1996).

Ως STRE ορίζονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στους προαγωγείς των γονιδίων στόχων και οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από τους MSN2 και MSN4 μεταγραφικούς παράγοντες, δεσμεύονται πάνω σε αυτές και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Οι msn2 και msn4 είναι δύο ομόλογες, κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική απόκριση σε συνθήκες stress, μεταγράφοντας εκατοντάδες γονίδια μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες (Boy-Marcotte et al., 1998; Görner et al., 2002; Hasan et al., 2002; Kandror et al., 2004). Οι msn2/4 βρίσκονται στην καρδιά ενός πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει πολλές φυσικές και γενετικές αλληλεπιδράσεις με διάφορες κινάσες, φωσφατάσες, μεταφορείς και αναδιαμορφωτές χρωματίνης.



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

Οι *msn2/4* ενεργοποιούνται μετά την έκθεση της ζύμης σε μια ευρεία ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως παρουσία αζώτου ή έλλειψη

άνθρακα, ωσμωτική πίεση, παράγοντες που προσβάλλουν το DNA δημιουργώντας κάποια μεταλλαγή σε μια βάση του, αιθανόλη και θερμική καταπόνηση (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001). Διαφορετικοί κυτταρικοί αισθητήρες παρακολουθούν τον εξωκυττάριο χώρο, καθώς και το ενδοκυτταρικό περιβάλλον του ζυμομύκητα, που οδηγεί στην εξαρτώμενη από το stress ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των *msn2/4*. Η δραστηριότητα των *msn2/4* προστατεύει τα κύτταρα ζύμης από τις δυσμενείς επιπτώσεις των ακραίων συνθηκών stress (Martinez-Pastor et al., 1996). Στο παρελθόν έχει αποδειχθεί ότι κατά την διπλή διαγραφή των *msn2* και *msn4*, η επιβίωση της ζύμης μειώνεται σημαντικά μετά από την έκθεση της σε ποικίλες συνθήκες stress (Martinez-Pastor et al., 1996; Hasan et al., 2002; Kandrór et al., 2004).

Τα STRE-ρυθμιζόμενα γονίδια εμπλέκονται σε σημαντικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και της ρύθμισης της ανάπτυξης, καθώς και στην προσαρμογή σε διάφορα είδη stress, όπως η θερμότητα, η βλάβη του DNA, και οι οξειδωτικές και ωσμωτικές πιέσεις (Mai και Breeden, 1997; Moskvina et al., 1998; Smith et al., 1998; Gasch et al., 2000). Υπό συνθήκες που προάγουν την ανάπτυξη (Ανάπτυξη σε γλυκόζη με απουσία stress), οι *msn2* και *msn4* φωσφορυλιώνονται από την PKA σε συγκεκριμένες θέσεις, και διαμένουν στο κυτταρόπλασμα. Στην εξάντληση της γλυκόζης ή άλλων συνθηκών stress (Gorner et al., 1998), αποφωσφορυλιώνονται τα συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων που είχαν φωσφορυλιωθεί από την PKA έχοντας ως αποτέλεσμα μετατόπισή τους στον πυρήνα, όπου επάγουν την έκφραση των STRE-ελεγχόμενων γονιδίων. Όπως γίνεται αντιληπτό, η PKA παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο παρεμποδίζοντας την μετανάστευση των *msn2/msn4* στον πυρήνα, είτε μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης στην περιοχή των σημάτων πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)) (Gorner et al., 1998; Garreau et al., 2000; Gorner et al., 2002) είτε έμμεσα μέσω των πρωτεϊνικών κινασών YAP1 και Rim15. Συνεπώς, η δράση του μονοπατιού cAMP/PKA είναι κατασταλτική έναντι των δραστηριοτήτων των *msn2/4* (Boy-Marcotte et al., 1998; Görner et al., 1998; Smith et al., 1998; Lee et al., 2008).

Μελέτες έδειξαν την σύνδεση μεταξύ της PKA και της δραστηριότητας της *msn2* αποδεικνύοντας ότι η κατάργηση της δραστηριότητας της PKA έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της *msn2* στον πυρήνα και την αυξημένη

δραστηριότητα της (Görner et al., 1998; Smith et al., 1998). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους ρόλους των ειδικών ισόμορφων TRK στη ρύθμιση της δραστηριότητα της *msn2*. Έχει δειχθεί ότι τα στελέχη με ανεπάρκεια και στις τρεις ισομορφές της TRK είναι μη βιώσιμα, ενώ στελέχη που περιέχουν μια οποιαδήποτε ισόμορφή είναι βιώσιμα (Broach και Deschenes, 1990). Οι *Trk1* και *Trk3* είναι οι κυρίαρχες υπομονάδες που οδηγούν σε καταστολή της δραστηριότητας της *msn2*. Σε αντίθεση, η *Trk2* φαίνεται να δρα ως ασθενής ενεργοποιητής της *msn2* (Sadeh et al., 2011). Υπάρχουν παράλληλες πορείες για τον έλεγχο της δραστηριότητας της *msn2* και μια λεπτή ισορροπία στα διαφορετικά πρότυπα φωσφορυλίωσης των *msn2/4* επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητά τους. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, είχε δειχθεί ότι η *msn2* υπερφωσφορυλιώνεται μετά από έκθεση σε διαφορετικές συνθήκες στρες σε διαφορετικές θέσεις από αυτές που ελέγχει η PKA και ότι μια τέτοια υπερφωσφορυλίωση είναι εξαρτώμενη από το stress (Garreau et al., 2000).

Ο *S. cerevisiae* αναπτύσσεται πολύ καλύτερα σε όξινο παρά ουδέτερο ή αλκαλικό pH και κατά συνέπεια, ακόμη και μια μέτρια αύξηση του pH σε αλκαλικές τιμές του θρεπτικού μέσου αντιπροσωπεύει μια κατάσταση stress που είναι σε θέση να προκαλέσει μια αντισταθμιστική πολυπαραγοντική απόκριση (Arino, 2010). Το stress που προκαλείται από το αλκαλικό pH ενεργοποιεί ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των *Rim101/NRG1* (Lamb et al., 2001; Lamb et al., 2003), του δικτύου ασβεστίου/calcineurin (Serrano et al., 2002; Viladevall et al., 2004; Ruiz et al., 2008) και των *Wsc1/Pkc1/Slt2*, MAPK (πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο) (Serrano et al., 2006). Το stress από αλκαλικό pH έχει επίσης βαθιά επίδραση στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία πρόσληψης γλυκόζης από το κύτταρο. Η έκθεση λοιπόν σε υψηλό pH, μιμείται μια κατάσταση έλλειψης γλυκόζης (Viladevall et al., 2004; Ruiz et al., 2008). Λαμβάνοντας υπόψη τον ισχυρό δεσμό μεταξύ του μεταβολισμού των υδατανθράκων και του μονοπατιού της PKA, το αλκαλικό stress μπορεί να επιφέρει αλλαγές στη δραστηριότητα αυτού του μονοπατιού και συγκεκριμένα, η σωστή προσαρμογή του υψηλού pH θα μπορούσε να επιφέρει μια παροδική μείωση στα επίπεδα της cAMP και αυτή η αλλαγή μεταβάλλει την ανοχή της PKA για αλκαλικό pH. Αυτή η προσαρμοστική απόκριση σε υψηλό pH εμπλέκει τους PKA-ρυθμιζόμενους-*msn2/msn4*

μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι με την σειρά τους μεταβάλλουν την γονιδιακή έκφραση (Casado et al., 2011).

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

Επομένως, η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του ζυμομύκητα αποτελεί ένα παράγοντα κυτταρικού στρες. Το αξιοσημείωτο είναι ότι η ενδοκυττάρια σηματοδότηση της αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και τελικά της PKA μέσω των Ras1/2 πρωτεϊνών. Γίνεται 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 θα ήταν ανούσια οποιαδήποτε τροποποίησή της.

1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR))

1.2.1 Αρχή λειτουργίας αντίδρασης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler) (Σχ. 1.3). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να επιτυγχάνεται ταχύτατη εναλλαγή θερμοκρασιών (Βερβερίδης, 2003).



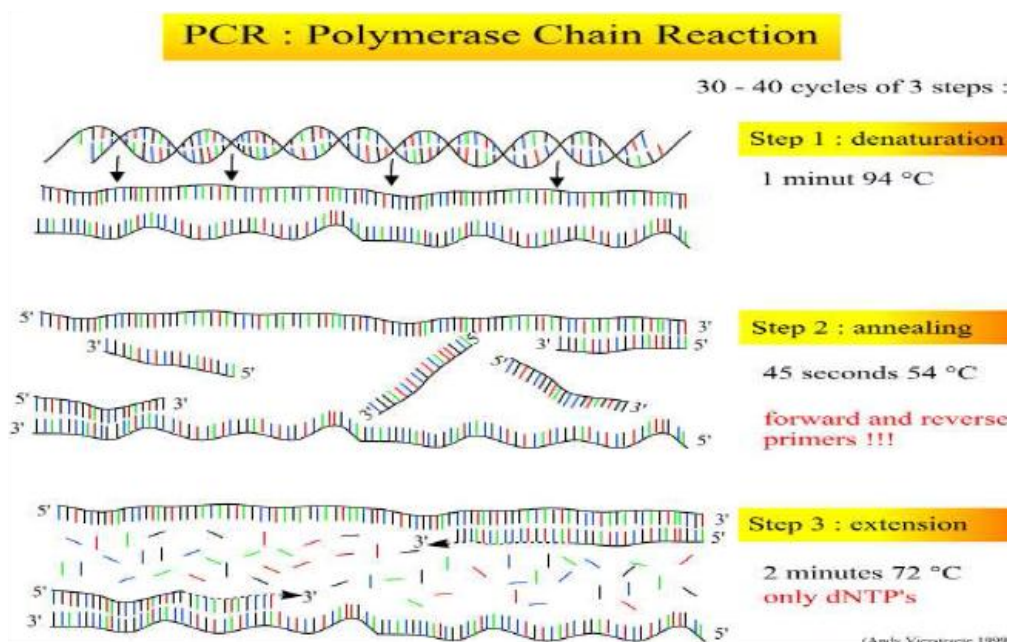
Σχήμα 1.3: Θερμικός κυκλοποιητής (thermal cycler).

1.2.2 Στάδια Κύκλου PCR

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο της αντίδρασης PCR 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 τουλάχιστον 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Σχ. 1.4). 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, Σχήμα 1.4). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια 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' (Σχ. 1.4).



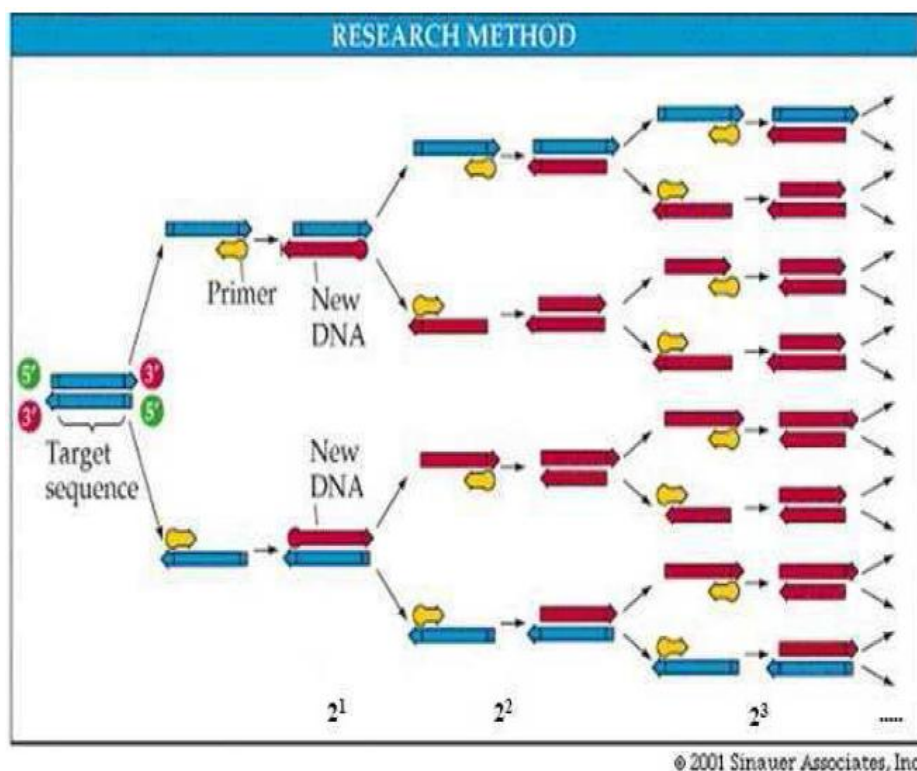
Σχήμα 1.4: Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): Ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension).

1.2.3 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 υβριδοποίησης (melting temperature, T_m). Η DNA πολυμεράση (Taq polymerase) είναι ένζυμο που βοηθάει στην σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή.

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

Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης που αφορά την PCR εκτός από τους εκκινητές, την πολυμεράση και το τμήμα DNA, υπάρχουν επίσης και: τα dNTP's τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates) που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) που απαιτούνται για την εμφάνιση ενζυμικής δραστηριότητας της DNA πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006). 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 (Λαζανάκη 2010) (Σχ. 1.5).



Σχήμα 1.5: Παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας της μεθόδου και εκθετικού πολλαπλασιασμού των προϊόντων.

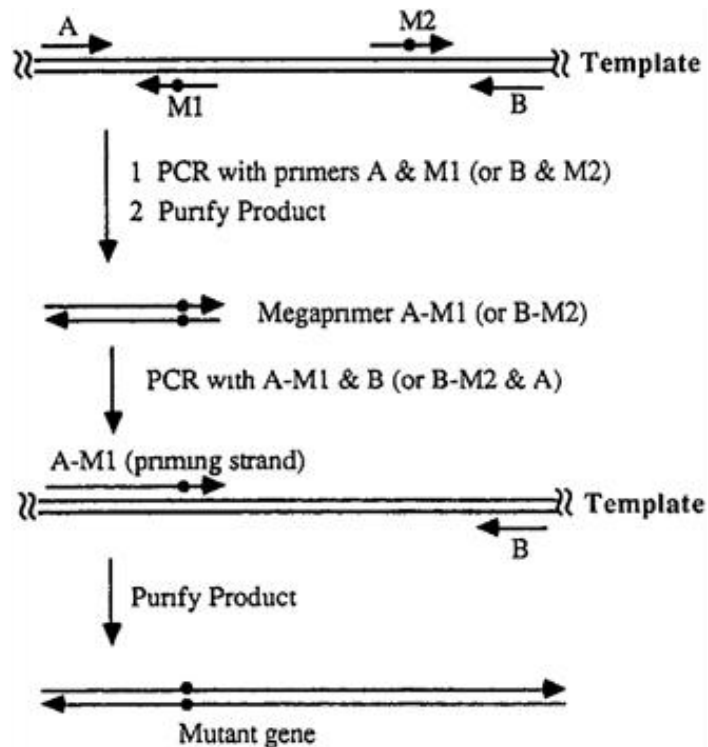
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης μαζί με δείκτες

μοριακών βαρών των οποίων τα μεγέθη είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι μπορεί να διαπιστωθεί αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή τους με Gel Red ή με Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide) τα οποία φθορίζουν έντονα ύστερα από έκθεση τους σε υπεριώδεις ακτίνες UV.(Hunt, 2006).

1.3 Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR

1.3.1 Μεθοδολογία Μέγα-Εκκινητή (MEGAPRIMER)

Η ολιγονουκλεοτιδική κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιείται συνήθως για να εισαχθούν επιθυμητές μεταλλάξεις σε στοχευμένες αλληλουχίες DNA. Μια ποικιλία πρωτοκόλλων έχουν καθιερωθεί για να επιτευχθεί αποτελεσματική μεταλλαξιγένεση, συμπεριλαμβανομένων αρκετών που χρησιμοποιούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Saiki et al., 1985). Μεταξύ των πρωτοκόλλων με βάση την PCR, η μέθοδος <<megaprimer>> που εισήγαγαν οι Kammann et al. (Kammann et al., 1989), και τροποποιήθηκε μεταγενέστερα από τους Sarkar και Sommer (Sarkar και Sommer 1990, 1992) και Landt et al. (Landt et al., 1990), φαίνεται να είναι ιδιαίτερα απλή και αποδοτική. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει δύο γύρους PCR που χρησιμοποιούν δύο “συνοδευτικούς (ή πλευρικούς)” εκκινητές οι οποίοι δεσμεύονται στο 5' και 3' άκρο του προς μετάλλαξη γονιδίου και έναν εσωτερικό μεταλλαξιγόνο εκκινητή που περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη υποκαθιστώντας τις απαραίτητες βάσεις. Η πρώτη PCR πραγματοποιείται με τη χρήση του μεταλλαξιγόνου εσωτερικού εκκινητή και τον πρώτο συνοδευτικό εκκινητή. Το προϊόν αυτής της πρώτης PCR είναι ο λέγόμενος “Μεγα-εκκινητής (megaprimer)”, καθαρίζεται και χρησιμοποιείται ως εκκινητής στη δεύτερη PCR μαζί με τον δεύτερο συνοδευτικό εκκινητή. Το τελικό προϊόν της PCR περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA (Σχ. 1.6).



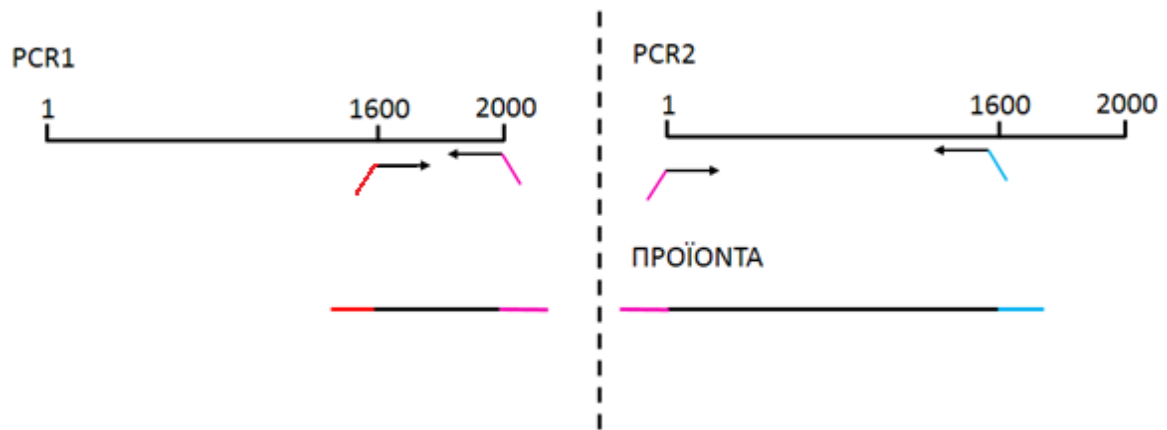
Σχήμα 1.6: Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω της μεθόδου Megaprimer. Οι εκκινητές A, B, M1 και M2 (όπως και η εκκινητήρια γραμμή του megaprimer A-M1) συμβολίζονται από μονές γραμμές που καταλήγουν σε βέλος. Οι διπλές γραμμές αντιπροσωπεύουν το εκμαγείο. Οι τελείες στο M και M2 υποδηλώνουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις (αντικατάσταση, εισαγωγή, διαγραφή) που θα εισαχθούν στο προϊόν μέσω του megaprimer (Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer).

1.3.2 Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR

1.3.2.1 PCR 1

Η πρώτη PCR (Σχ. 1.7) 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).



Σχήμα 1.7: 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.

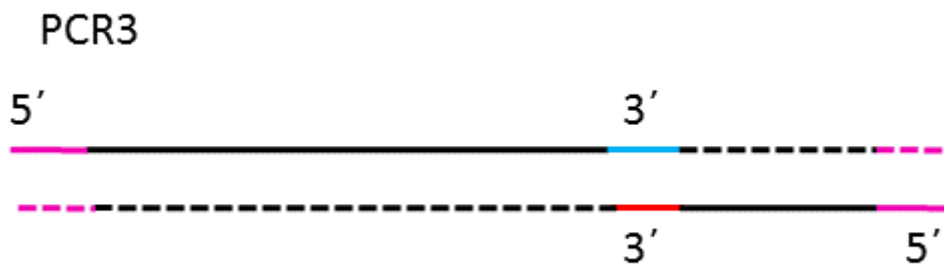
1.3.2.2 PCR 2

Η δεύτερη PCR (Σχ. 1.7) 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 ανοδικάστο 5' άκρο του κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζεται από περιοριστική ενδονουκλεάση για μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου (PCR Primer- A laboratory manual).

1.3.2.3 PCR 3

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

Κατά την διάρκεια του πρώτου κύκλου της τρίτης PCR, αρχικά στους 95°C τα δίκλινα προϊόντα των δυο προηγούμενων PCR αποδιατάσσονται. Στη συνέχεια σε χαμηλότερη θερμοκρασία επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση. Από τους δυο δυνατούς συνδυασμούς μόνο ο ένας είναι δυνατόν να συνεχίσει. Αυτό συμβαίνει διότι η DNA πολυμεράση μπορεί και διαβάζει μόνο με κατεύθυνση 3'→5' και συνθέτει με κατεύθυνση 5'→3'. Έτσι η επιμήκυνση σε θερμοκρασία 72°C συμβαίνει μόνο για την περίπτωση που περιγράφεται στο Σχ. 1.8. 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).



Σχήμα 1.8: Η τρίτη PCR κατά την οποία συντίθεται το προϊόν που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη.

1.4. Εισαγωγή της μετάλλαξης στη ζύμη

Μια μεθοδολογία για την εισαγωγή μιας μεταλλαγμένης μορφής ενός γονιδίου σε κύτταρα ζυμομύκητα είναι αρχικά η καταστροφή κάποιων γονιδίων που συμμετέχουν στις πορείες βιοσύνθεσης απαραίτητων ουσιών όπως νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων. Οι πιο συνηθισμένες βιολογικές πορείες που τροποποιούνται είναι αυτές της βιοσύνθεσης των αμινοξέων λευκίνη (LEU2), τρυπτοφάνη (TRP1), ιστιδίνη (HIS3) και αζωτούχων βάσεων αδενίνης (ADE2), ουρακίλης (URA3). Έχοντας απενεργοποιημένες τις συγκεκριμένες πορείες είναι δυνατόν να απαληφθεί οποιοδήποτε γονίδιο από το γονιδίωμα της ζύμης και να αντικατασταθεί από κάποιο από τα παραπάνω που έχουν απενεργοποιηθεί π.χ. URA3, αρκεί στο 5' και 3' άκρο του URA3 να έχουν εισαχθεί νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ~40 νουκλεοτιδίων όμοιες με αυτές που εντοπίζονται ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου στόχου. Αυτή η αντικατάσταση επαναπροσδίδει στο ζυμομύκητα την χαμένη ικανότητα να βιοσυνθέτει ουρακίλη, οπότε να μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζει η ουρακίλη. Με την αντικατάσταση αυτή έχει επιτευχθεί η απαλοιφή του γονιδίου στόχου.

Στη συνέχεια, το γονίδιο που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη εφόσον ενισχυθεί με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα άκρα του γονιδίου και που φέρουν τις ίδιες αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά με αυτές της περιοχής που έχει εισαχθεί το URA3 στο προηγούμενο βήμα. Υπόστρωμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο URA3 είναι το αντιδραστήριο 5-φθορο-οροτικό οξύ (5-Fluoro-Orotic Acid (5-FOA)). Η δράση αυτής της πρωτεΐνης επί του 5-FOA έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της 5-φθορο-ουρακίλης (5-Fluoro-Uracil (5-FU)) η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα της ζύμης και έχει ως αποτέλεσμα την θανάτωσή τους. Η παρουσία λοιπόν του 5-FOA στο θρεπτικό μέσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης επιλογής των κυττάρων στα οποία έχει γίνει με επιτυχία ο ομόλογος ανασυνδυασμός και η αντικατάσταση του URA3 από τη μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου-στόχου, αφού μόνο αυτά τα κύτταρα που δεν φέρουν το URA3 θα καταφέρουν να επιβιώσουν.

2.ΣΚΟΠΟΣ

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

Η πρωτεΐνη msn2 όπου είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, κατέχει εξέχοντα ρόλο στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress. Η είσοδος της στον πυρήνα είναι ένα σημείο ελέγχου καθοριστικής σημασίας. Ο έλεγχος της εισόδου της Msn2 στον πυρήνα γίνεται μέσω φωσφορυλίσεων συγκεκριμένων αμινοξέων σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)). Η φωσφορυλίωση αυτών των αμινοξέων αναστέλλει την είσοδό της στον πυρήνα. Το αμινοξύ Ser633 είναι πιθανώς ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο της msn2 στον πυρήνα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία της μετάλλαξης Ser633Ala επί του γονιδίου MSN2 μέσω της διαδικασίας της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR, η εισαγωγή της συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής του MSN2 γονιδίου στα κύτταρα του ζυμομύκητα και η πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση της απόκρισής τους σε αντίξοες συνθήκες.

3. ΥΛΙΚΑ & 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.

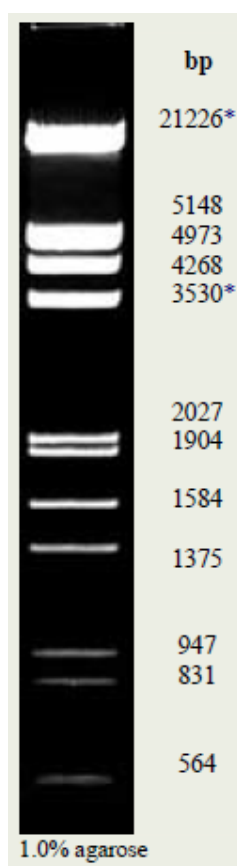
Πίνακας 3.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις Πειραματικές Πορείες.

	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-	T3379

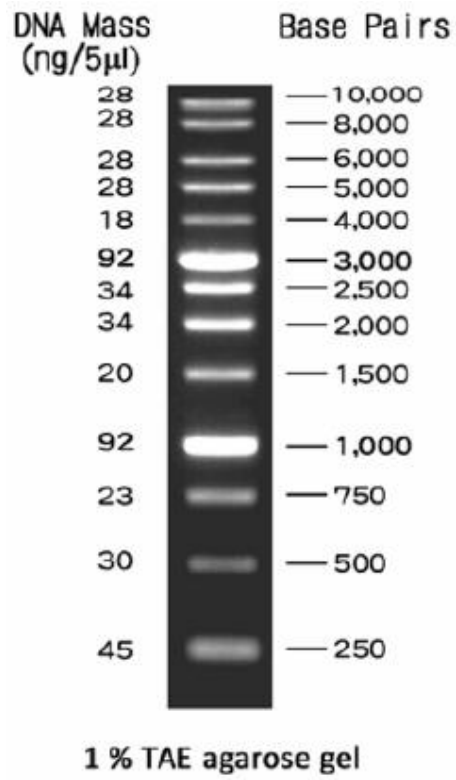
		Aldrich	
16	Βαλίνη	Merk	1084950100
17	Φαινιλαλανίνη	Serva	32191
18	Ασπαραγινικό οξύ	AppliChem	A3715
19	Αργινίνη	AppliChem	A3709
20	Αδενίνη	AppliChem	A0939
21	Ισολευκίνη	AppliChem	A3677
22	Θρεονίνη	AppliChem	A3946
23	Κυστεΐνη	AppliChem	A3694
24	Προλίνη	Sigma- Aldrich	81710
25	Τρυπτοφάνη	Sigma- Aldrich	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	KK2601

		Biosystems	
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	5-FOA (5-Fluoroorotic Acid) (5- φθόρο-οροτικό οξύ)	Thermo Scientific	R0811
53	SDS (Μετά νατρίου άλας του Θειϊκού Δωδεκακυκλίου)	Sigma- Aldrich	L3771
54	Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 4000)	AppliChem	A1249
55	Carrier dna (Salmon Sperm)		A2160,0001
56	T4 DNA λιγάση	Takara	2011A
57	10X Loading buffer	Takara	
58	Γλυκερόλη	Fisher Scientific	BP229
59	IPTG (isopropyl-beta-D- thiogalactopyranoside)		
60	X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galacto-pyranoside)		
61	pUC19 plasmid		
62	W303-1a Yeast Strain		

63	MOPS	Sigma- Aldrich	M1254
64	RbCl ₂	Sigma- Aldrich	R2252
65	CaCl ₂		
66	MnCl		
67	CH ₃ COOK		
68	Λυσοζύμη		
69	BSA		
70	Lambda DNA/EcoRI/HindIII Digest	Sigma- Aldrich	D9281
71	1 kb DNA Ladder RTU	Nippon Genetics	MWD-1



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)	Αλληλουχίες εκκινητών	Θερμοκρασίες Υβριδοποίησης
1	MSN2_BamHI_Reverse	5' CGGGATCC AATGTCTCCATGTT TTTTATGAG3'	T _m =60
2	MSN2_Ser633Ala_Foward	5'CCAGAAGATCA GCT GTCG3'	T _m = 56
3	MSN2_PstI_Forward	5' AAACTGCAG ATGACGGTCGAC CATGATTTTC3'	T _m =62
4	MSN2_Ser633Ala_Reverse	5'CGAC AGC TGATCTTCTGG3'	T _m = 56
5	MSN2-rec_Foward	5' CTTTTTCAACTTTTATTGCTCA TAGAAGA ACTAGATCTAAAATGA CGGTCGACCATGATTTTC3'	T _m = 62
6	MSN2-rec_Reverse	5' TTATCTTATGAAGAA AGATCTAT CGAATTA AAAAAATGGGGTCTAT TAAATGTCTCCATGTTTTTTATGA G3'	T _m = 60
7	MSN2_URA3_Forward	5' CTTTTTCAACTTTTATTGCTCA TAGAAGA ACTAGATCTAAAATGT CGAAAGCTACATATAAGG3'	T _m =58
8	MSN2_URA3_Reverse	5' TTATCTTATGAAGAA AGATCTAT CGAATTA AAAAAATGGGGTCTAT TAGTTTTGCTGGCCGCATC3'	T _m =54

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. Φυγοκέντρωση στα 15.000 x g για 15 sec ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
10. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και φύλαξη αυτού στους -20°C.
11. 1-4 μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.

3.2.2 Παρασκευή 50xTAE

Σε 900 ml απιονισμένο νερό προστίθενται :

- 242 g Trisma base
- 57,1 ml Glacial acetic acid
- 18,6 g EDTA

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

3.2.3 Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v

Διάλυση 0,5 g αγαρόζης σε 50 ml 1xTAE με βρασμό. Προσθήκη 2,5 ml Gel Red στο διάλυμα. Ανάδευση, ψύξη έως θερμοκρασία περίπου στους 55°C και απόχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθέτηση χτενιού για την δημιουργία πηγαδίων. Αφού το διάλυμα στερεοποιηθεί είναι έτοιμο για χρήση.

3.2.4 Παρασκευή μάρτυρα

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

Πίνακας 3.3: Αντιδραστήρια για την παρασκευή του μάρτυρα.

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

Ακολουθεί προσθήκη 140 μl H₂O και 60 μl 10 x loading buffer. Φυλάσσεται στους -20°C.

3.2.5 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεμάτων

Όταν το πήκτωμα αγαρόζης είναι πλέον έτοιμο, ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος 1 X TAE εντός της συσκευής. Ακολουθεί εναπόθεση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA καθώς και του μάρτυρα εντός των σχηματισθέντων πηγαδίων. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό ακολουθεί η ανάπτυξη της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή ένταση ρεύματος περίπου 60 mA. Ακολούθως της ανάπτυξης, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται εντός της συσκευής απεικόνισης η οποία αποτελείται από πηγή UV ακτινοβολίας, φωτογραφική μηχανή και υπολογιστή, και λαμβάνονται φωτογραφίες του πηκτώματος. Το μέγεθος των προς προσδιορισμό δειγμάτων υπολογίζεται με σύγκριση του συντελεστή επιβράδυνσης αυτού σε σχέση με των τμημάτων DNA του μάρτυρα.

3.2.6 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων γίνονται εμφανή στους παρακάτω πίνακες (Πίν. 3.4-3.7).

3.2.6.1 Υερ

Πίνακας 3.4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Υερ.

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

Προσθέτω νερό μέχρι το 1 L

Υγρή αποστείρωση

3.2.6.2 SC-U

Πίνακας 3.5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του SC-U.

Yeast Nitrogen Base:	6,7 g
Glucose:	20 g
Synthetic Complete (-U):	2,3 g
Agar	20 g

Προσθέτω νερό μέχρι το 1L

Υγρή αποστείρωση

3.2.6.3 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

3.2.6.4 LB

Πίνακας 3.7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του LB.

Tryptone:	10 g
Yeast extract:	5 g
NaCl:	5 g
1 N NaOH:	1 ml
Agar:	20 g

Προσθέτω νερό μέχρι το 1 L

Υγρή αποστείρωση

3.2.6.5 SC+URA+5-FOA

1. Προστίθενται 10 g αγαρ 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 θερμαντική 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.

3.2.7 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες γίνονται ακολουθώντας τις οδηγίες που τις συνοδεύουν.

3.2.8 Συρραφή τμήματος DNA με πλασμιδιακό φορέα

Ακολουθώντας της πέψης του πλασμιδιακού φορέα (pUC19) και του τμήματος DNA που επιθυμείται να εισαχθεί σε αυτόν (ένθεμα), με την κατάλληλη κάθε φορά περιοριστική ενδονουκλεάση και καθαρισμού αυτών, επιτελείται αντίδραση συρραφής με την χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (ligase) σύμφωνα με το συνοδευτικό φυλλάδιο του ενζύμου. Κατά την αντίδραση συρραφής τμημάτων DNA που έχουν συμπληρωματικά άκρα απαιτείται η αναλογία μορίων πλασμιδίου : ενθέματος να είναι 1:3, ενώ όταν τα άκρα των τμημάτων DNA είναι “τυφλά” τότε η εν λόγο αναλογία απαιτείται να είναι 1:6.

3.2.9 Nucleospin gel and PCR clean-up kit

3.2.9.1 PCR Clean-up

1. Ρύθμιση όγκου με H₂O έως 100 μl. Προσθήκη στο δείγμα διπλάσιου όγκου διαλύματος NT1. (100 μl δείγμα → 200 μl NT1)
2. Τοποθέτηση του δείγματος εντός των στηλών και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος.
3. Προσθήκη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200 μl διαλύματος NT3.
4. Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρηση για 5 min στα 11.000 x g για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
5. Έκλυση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (ependorf) των 1,5 ml. Προσθήκη 15-30 μl ρυθμιστικού

διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1 min.
Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g.

3.2.9.2 Απομόνωση DNA από πηκτώματα αγαρόζης

1. Αποκοπή τμήματος πηκτώματος που περιέχει το DNA καθορισμός του βάρους του τμήματος της πηκτής και μεταφορά σε καθαρό erpendorf. Για κάθε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης <2% w/v προστίθενται 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT1. Ακολουθεί επώαση δείγματος για 5-10 min στους 50°C. Ανακίνηση δείγματος με vortex κάθε 2-3 min μέχρις ότου το τμήμα του πηκτώματος διαλυθεί πλήρως.
2. Τοποθέτηση του δείγματος εντός των στηλών και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να διηθηθεί όλος ο όγκος του δείγματος.
3. Προσθήκη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 x g. Απόρριψη διηθήματος. Επανάληψη διαδικασίας με 200 μl διαλύματος NT3.
4. Στέγνωμα μεμβράνης πυριτίου. Φυγοκέντρηση για 5 min στα 11.000 x g για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
5. Έκλυση DNA. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (erpendorf) των 1,5 ml. Προσθήκη 15-30 μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1 min. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g.

3.2.10 Nucleospin Plasmid kit

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

3.2.11 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων 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 Προσαρμόστε το διάλυμα με 0,2 M 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.

3.2.12 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων

1. Ξεπάγωμα των competent cells στον πάγο και ακολουθεί μοίρασμα τους σε δυο erpendorf.
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).

3.2.13 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του 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 (Πίν. 3.10).
5. Έντονη ανάδευση.
6. Προσθήκη 10 μl λυσοζύμης 1 mg/ml.
7. Τοποθέτηση erpendorfs στους 100°C για 1 min.
8. Φυγοκέντριση στα 10.000 rpm για 10min ή λιγότερο σε RT.
9. Μεταφορά 430 μl του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs.
10. Προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης.
11. Τοποθέτηση των erpendorfs στους -80°C για 10 min.
12. Φυγοκέντριση σε 10.000 rpm για 30 min στους 4°C.
13. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου 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.

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

3.2.14 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 $OD_{600}=0.4-0.6 \sim 10^7$ cells/ml- $5 \cdot 10^8$ 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

3.2.15 Δημιουργία stock σε καλλιέργειες ζύμης και βακτηρίων

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

3.2.16 Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού και ομόλογου ανασυνδυασμού με Taq polymerase

Για να αποδειχθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού και ομόλογου ανασυνδυασμού σε κύτταρα ζύμης, γίνεται έλεγχος μέσω μιας PCR, χρησιμοποιώντας την Taq polymerase. Ο σκοπός του πρώτου μετασχηματισμού ήταν να αντικατασταθεί το γονίδιο MSN2 αγρίου τύπου από το γονίδιο URA3. Εφαρμόζεται λοιπόν ένα πρόγραμμα PCR στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες ζύμης των υποψηφίων αποικιών με primers τον PstI_MSN2_Forward και τον BamHI_MSN2_Reverse όπως φαίνεται στον Πίν. 3.11. Εάν ο μετασχηματισμός και ομόλογος ανασυνδυασμός έχει πετύχει, στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθεί σε πήκτωμα αгарόζης μετά την PCR με την Taq polymerase, αναμένεται να εμφανιστεί μπάντα μόνο στο δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου) που περιέχει το γονίδιο MSN2 και όχι στα δείγματα DNA από τα υποψήφια στελέχη που δεν περιέχουν το γονίδιο MSN2, αλλά το γονίδιο URA3. Ακολουθεί και μια PCR με εκκινητές τους PstI_MSN4_Forward και BamHI_MSN4_Reverse (Πίν. 3.11) για να διασταυρωθεί ότι η μη εμφάνιση μπάντας στα δείγματα είναι απόρροια του επιτυχημένου ομόλογου ανασυνδυασμού και κατά συνέπεια της διαγραφής της αγρίου τύπου MSN2 και όχι λόγω πιθανής αποτυχημένης απομόνωσης του γενομικού DNA.

Συνθήκες PCR με Taq polymerase:

- 1)95°C →5 min
- 2)98°C →10 sec
- 3)58°C →15 sec
- 4)72°C →2 min →βήμα 2, #30 φορές
- 5)72°C →1 min
- 6)4°C →∞

Πίνακας 3.11: Αντιδραστήρια PCR με Taq polymerase.

DNA	2 μl
PstI_MSN2_Forward ή PstI_MSN4_Forward	0,8 μl
BamHI_MSN2_Reverse ή BamHI_MSN4_Reverse	0.8 μl
Taq polymerase ReadyMix	10 μl
H ₂ O	6,4 μl
Σύνολο	20 μl

Για τον έλεγχο της επιτυχίας του μετασχηματισμού των κυττάρων ζύμης, όπου τη θέση του γονιδίου URA3 έχει πάρει το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN2_Ser633Ala, απαιτείται η εφαρμογή ενός προγράμματος PCR χρησιμοποιώντας την Taq polymerase. Ο έλεγχος γίνεται στα υποψήφια δείγματα DNA που απομονώθηκαν από καλλιέργειες ζύμης που μετασχηματίστηκαν, χρησιμοποιώντας ως ελεγκτές της διαδικασίας γενομικό DNA από αγρίου τύπου ζύμη καθώς και ζύμης στην οποία το γονίδιο URA3 έχει αντικαταστήσει το αγρίου τύπου MSN2 (από τον πρώτο μετασχηματισμό). Ως εκκινήτες χρησιμοποιούνται οι PstI_MSN2_Forward και BamHI_MSN2_Reverse όπως φαίνεται στον Πίν. 3.12.

Εάν ο μετασχηματισμός και ομόλογος ανασυνδυασμός έχει πετύχει, στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθεί σε πήκτωμα αγαρόζης μετά την PCR με την Taq polymerase, αναμένεται να εμφανιστεί μπάντα μόνο μόνο στο δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου) που περιέχει το γονίδιο MSN2 και στα δείγματα DNA από τα στελέχη στα οποία έχει πετύχει ο ομόλογος ανασυνδυασμός και δεν περιέχουν το γονίδιο URA3 πλέον, αλλά το γονίδιο MSN2_Ser633Ala. Το μόνο δείγμα που δεν θα εμφανίσει μπάντα στην ηλεκτροφόρηση είναι αυτό που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN2 εντός του γονιδιώματος της ζύμης.

Συνθήκες PCR με Taq polymerase:

- 1) 95°C → 2 min
- 2) 95°C → 30 sec
- 3) 58°C → 30 sec
- 4) 72°C → 2 min 10 sec → βήμα 2, #30 φορές
- 5) 72°C → 2 min
- 6) 4°C → ∞

Πίνακας 3.12: Αντιδραστήρια PCR με Taq polymerase.

DNA	2 μl
PstI_MSN2_Forward	0,8 μl
BamHI_MSN2_Reverse	0.8 μl
Taq polymerase ReadyMix	10 μl
H ₂ O	6,4 μl
Σύνολο	20 μl

3.2.17 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης.

Θρεπτικό μέσο που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης ή αιθανόλης εμβολιάζεται με υπό ανάπτυξη κύτταρα ζύμης έτσι ώστε η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm των δειγμάτων να έχει τιμή περίπου 0,005. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται κύτταρα αγρίου τύπου (W303-1a) και κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη Ser633Ala της πρωτεΐνης *msn2* (W303-1a_MSN2_Ser633Ala). Η ανάπτυξη των καλλιεργειών εκτιμάται με τη λήψη δείγματος που λαμβάνεται σε καθορισμένη χρονική στιγμή από το χρόνο εμβολιασμού και φωτομετρείται σε μήκος κύματος 600 nm.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κατασκευή μεταλλαγμένου γονιδίου

Αρχικά έγινε μία προσπάθεια κατασκευής του μεταλλαγμένου γονιδίου με την μέθοδο του Μέγα- εκκινητή, αλλά χωρίς να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Για αυτό το λόγο για την κατασκευή του μεταλλαγμένου γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των τριών διαδοχικών PCR.

Προκειμένου να επιτευχθεί η μετάλλαξη της πρωτεΐνης *msn2*, Ser633Ala, απαιτείται η μεταλλαγή δυο βάσεων του γονιδίου MSN2 στις θέσεις 2188-2189 από AG σε GC (AG2188-2189GC). Για να επιτευχθεί χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές οι οποίοι αναφέρονται στους Πίν. 4.1, 4.2, 4.3.

Η PCR1 που έγινε είχε ως στόχο την δημιουργία του προϊόντος PCR1. Το DNA αυτό έχει μέγεθος ~230 ζεύγη βάσεων (230bp). Ο εκκινητής MSN2_Ser633_Ala φέρει τις απαραίτητες βάσεις προκειμένου το προϊόν της PCR (PCR1) να φέρει την απαιτούμενη μετάλλαξη. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *puC19-MSN2*, όπου βρίσκεται κλωνοποιημένο το αγρίου τύπου γονίδιο MSN2. Ομοίως, δημιουργήθηκε και το τμήμα PCR2 το μέγεθος του οποίου είναι ~1910bp. Οι συνθήκες των PCR1 και PCR2 εμφανίζονται παρακάτω.

Συνθήκες PCR1:

- | | | |
|---------|---------------|--------------------|
| 1. 95°C | →3 min | |
| 2. 98°C | →20 sec | |
| 3. 58°C | →15 sec | |
| 4. 72°C | →1 min 30 sec | →βήμα 2, #30 φορές |
| 5. 72°C | →5 min | |
| 6. 4°C | →∞ | |

Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR1:

ρUC19-MSN2 (~50 pg/μl)	1 μl
Primer MSN2_BamHI_Reverse (10 pg/μl)	1,5 μl
Primer MSN2_Ser633Ala_Forward (10 pg/μl)	1,5 μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	25 μl
H ₂ O	21 μl
Σύνολο:	50 μl

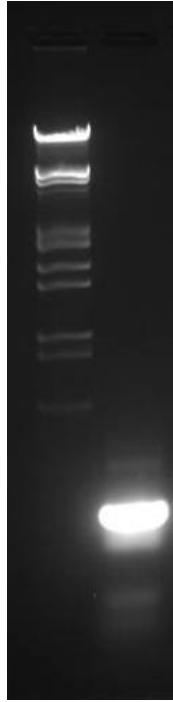
Συνθήκες PCR2:

1. 95°C → 3 min
2. 98°C → 10 sec
3. 56°C → 10 sec
4. 72°C → 1 min 20 sec → βήμα 2, #30 φορές
5. 72°C → 5 min
6. 4°C → ∞

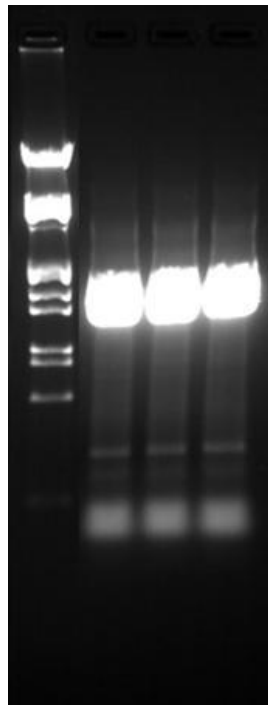
Πίνακας 4.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR2.

ρUC19-MSN2 (~50 pg/μl)	4 μl
Primer MSN2_PstI_Forward (10 pg/μl)	1,5 μl
Primer MSN2_Ser633Ala_Reverse (10 pg/μl)	1,5 μl
2xKapa HiFi HotStart ReadyMix	25 μl
H ₂ O	18 μl
Σύνολο:	50 μl

Η επιτυχία των παραπάνω PCR ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και 1% αντίστοιχα (Σχ. 4.1, Σχ. 4.2).

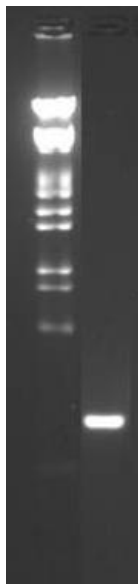


Σχήμα 4.1: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR1 σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το προϊόν της PCR1.

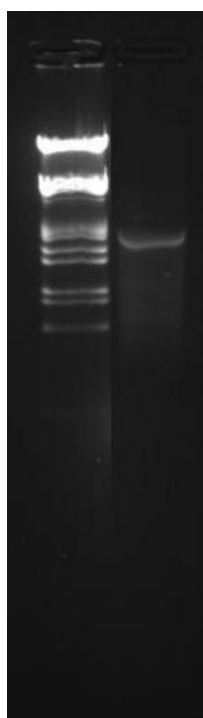


Σχήμα 4.2: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στις θέσεις 2 έως 4 βρίσκεται το προϊόν της PCR2 χωρισμένο σε 3 ίσα μέρη.

Ακολούθησε ο καθαρισμός τους από το μείγμα της PCR αντίδρασης με τη χρήση του Nucleospin PCR clean up gel extraction kit και ελέγχθηκε η καθαρότητά τους με νέα ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Σχ. 4.3, Σχ. 4.4)



Σχήμα 4.3: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR1 σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το καθαρό προϊόν της PCR1.



Σχήμα 4.4: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR2 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το καθαρό προϊόν της PCR2.

Το επόμενο βήμα ήταν η δημιουργία του MSN2 γονιδίου που φέρει την μετάλλαξη MSN2-Ser633Ala χρησιμοποιώντας τα προαναφερθέντα προϊόντα PCR1 και PCR2 (Πίν. 4.3), εφαρμόζοντας το πρόγραμμα PCR3 όπως αυτό περιγράφεται παρακάτω. Το προϊόν της PCR3 ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να φανεί η ορθότητά του αφού αναμένεται το μεγεθός του να είναι ~2140bp (Σχ. 4.5). Καθαρίζεται με τη χρήση του Nucleospin PCR clean up gel extraction kit και ηλεκτροφορείται ξανά προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του (Σχ. 4.6).

Συνθήκες PCR3:

- | | | |
|----------|---------|--------------------|
| 1. 95°C | →3 min | |
| 2. 98°C | →10 sec | |
| 3. 60°C | →10 sec | |
| 4. 72°C | →2 min | |
| 5. 98°C | →10 sec | |
| 6. 60°C | →10 sec | |
| 7. 72°C | →2 min | →βήμα 5, #4 φορές |
| 8. 98°C | →10 sec | |
| 9. 64°C | →10 sec | |
| 10. 72°C | →2 min | →βήμα 8, #25 φορές |
| 11. 72°C | →5 min | |
| 12. 4°C | →∞ | |

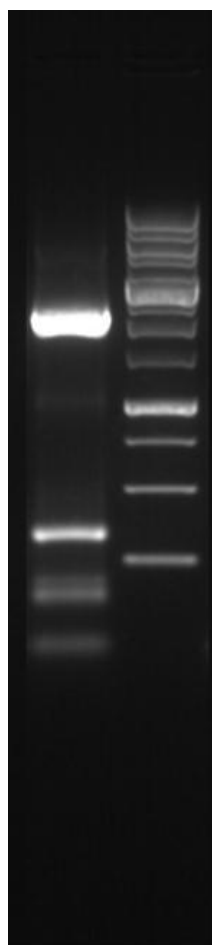
Οι primers δεν προστίθενται από την αρχή, αλλά μετά το πέρας του βήματος 7 στο τέλος του πέμπτου κύκλου ως primersmix.

Πίνακας 4.3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR3.

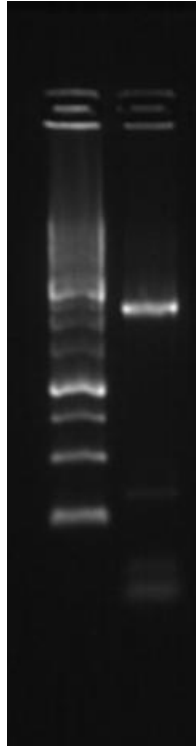
DNA 1 (~500 pg/μl)	1 μl
DNA 2 (~500 pg/μl)	1 μl
MSN2_BamHI_Reverse (10 pg/μl)	1,5 μl
MSN2_PstI_Forward (10 pg/μl)	1,5 μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	25 μl
H ₂ O	20 μl
Σύνολο:	50 μl

Ως DNA 1 χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της PCR 1.

Ως DNA 2 χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της PCR 2.



Σχήμα 4.5: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται το προϊόν της PCR3 ενώ στη θέση 2 ο μάρτυρας.



Σχήμα 4.6: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 το καθαρό από PCR clean up προϊόν της PCR3.

Μετά τη δημιουργία του MSN2-Ser633Ala από την PCR3 στου οποίου τα άκρα υπάρχουν οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και PstI, ακολουθεί πέψη του με τα ένζυμα αυτά σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται στον Πίν. 4.4. Ακολουθεί καθαρισμός με τη χρήση του Nucleospin PCR clean up gel extraction kit. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον πλασμιδιακό φορέα pUC19.

Πίνακας 4.4: Το προϊόν της PCR3 υποβάλλεται σε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PstI & BamHI. Επώαση στους 37°C για 1 h.

PCR3 (καθαρισμένο) (1 μg)	3 μl
10 xBuffer K	2 μl
10x BSA	2 μl
BamHI (10 units / μl)	1 μl
PstI (10 units / μl)	1 μl
H ₂ O	11 μl
Σύνολο	20 μl

Η ακεραιότητα των προϊόντων της πέψης ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.

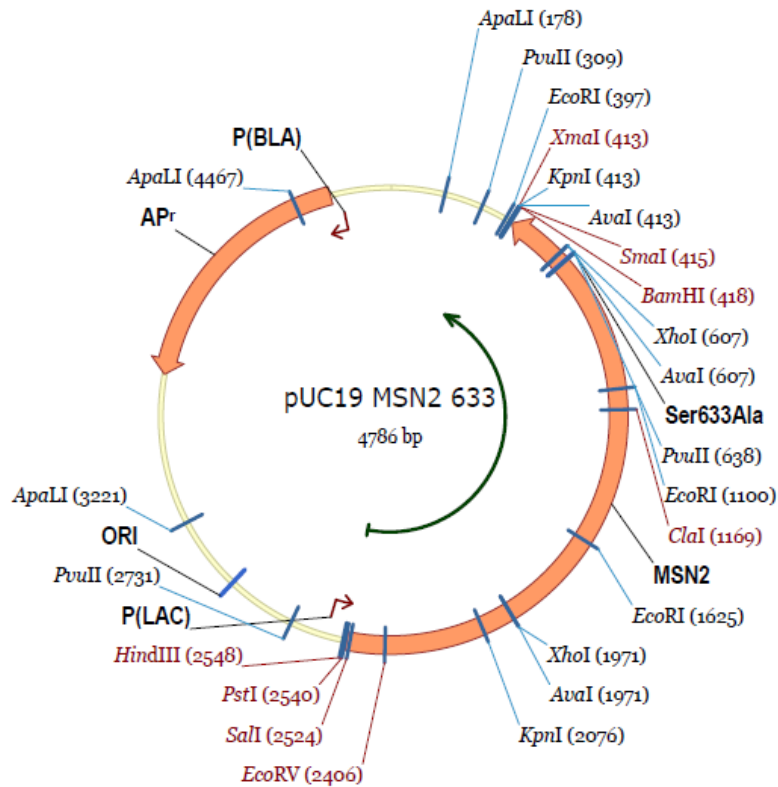
Ακολούθησε η αντίδραση συρραφής των δυο αυτών τμημάτων (ligation) (Πίν. 4.5). 10 μl του προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό competent βακτηριακών κυττάρων, και ακολούθησε τοποθέτηση αυτών σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (100 μg/ml) καθώς και IPTG (0.1 M) και x-gal (20 mg/ml) για να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με το pUC19-MSN2_Ser633Ala (λευκές αποικίες) από εκείνα που μετασχηματίστηκαν με το pUC19 (μπλε αποικίες).

Πίνακας 4.5: Αντίδραση συρραφής πλασμιδιακού φορέα pUC19 (PstI/BamHI). Επώαση στους 25°C για 2 h.

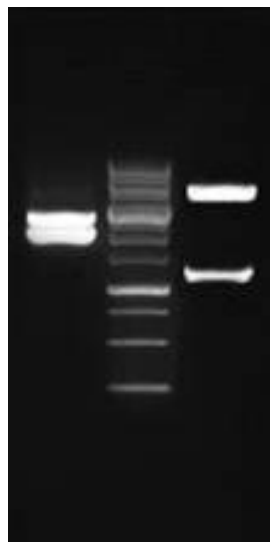
MSN2_633 (PstI/BamHI) (150 ng)	3 μl
pUC19 (PstI/BamHI) (50 ng)	2 μl
10x Ligation Buffer	2 μl
Ligase	1 μl
H ₂ O	12 μl
Σύνολο	20 μl

Μικρός αριθμός άσπρων αποικιών χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου LB+Αμπικιλίνη (100 μg/ml) και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα ακολουθεί η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες με τη μέθοδο του βρασμού. Τα ληφθέντα υποψήφια DNA υποβάλλονται σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα PstI και BamHI και ακολουθεί η ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Σύμφωνα με τον χάρτη του πλασμιδίου (Σχ. 4.7) αναμένουμε τα DNA που εμφανίζουν δύο μπάντες μεγέθους 2122bp ζεύγων βάσεων που αντιστοιχεί στο MSN2_Ser633Ala και 2664bp ζεύγων βάσεων που αντιστοιχεί στο pUC19 να είναι τα ορθά. Ένα από τα επιτυχή DNA υποβλήθηκε ξανά σε πέψη με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Από την τελευταία πέψη αναμένεται η εμφάνιση δυο μπαντών μεγέθους 1228bp που αντιστοιχεί σε τμήμα του MSN2_633, και 3558bp που αντιστοιχεί στο pUC19 μαζί με το υπόλοιπο τμήμα του MSN2_633 (Σχ. 4.7-4.8). Τα βακτηριακά κύτταρα από

τα οποία προήλθε το εν λόγω DNA φυλάσσονται σε 20% γλυκερόλη σε θερμοκρασία -80°C.



Σχήμα 4.7.: Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN2(633).



Σχήμα 4.8: Πέψη του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (PstI/BamHI) (θέση 1), Μάρτυρας (θέση 2), πέψη του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (EcoRI) (θέση 3).

Ακολουθεί ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο ρUC19-MSN2_633 και απομόνωση του από τα κύτταρα με τη χρήση του Nucleospin Plasmid kit.

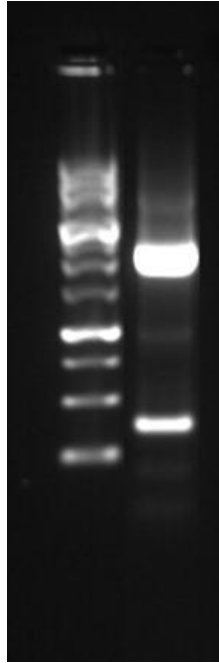
Το απομονωθέν πλασμίδιο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την ενίσχυση του γονιδίου MSN2_633 με PCR. Χρησιμοποιούνται ως εκκινητές οι MSN2-rec_F και MSN2-rec_R (Πίν. 4.6). Οι εκκινητές αυτοί φέρουν στο 5' άκρο τους αλληλουχίες οι οποίες είναι ίδιες με τις αλληλουχίες που υπάρχουν στο γενωμικό DNA της ζύμης ανοδικά και καθοδικά του MSN2. Η ύπαρξη αυτών των αλληλουχιών απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η αντικατάσταση του γονιδίου μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται σε gel αгарόζης 1%, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR, καθαρίζεται με το Nucleospin pcr clean up gel extraction kit και ηλεκτροφορείται το καθαρό προϊόν DNA προκειμένου να διαπιστωθεί η καθαρότητά του (Σχ. 4.9). Το προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μέγεθος 2202bp.

Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του γονιδίου MSN2_633:

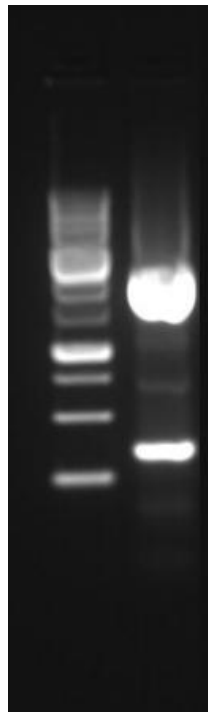
1. 95°C → 3 min
2. 98°C → 15 sec
3. 66°C → 10 sec
4. 72°C → 1 min → βήμα 2, #30 φορές
5. 72°C → 3 min
6. 4°C → ∞

Πίνακας 4.6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου MSN2_633.

ρUC19-MSN2_Ser633Ala	1 μl
MSN2-rec_F (10 pg/μl)	1,5 μl
MSN2-rec_R (10 pg/μl)	1,5 μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	25 μl
H ₂ O	21 μl
Σύνολο:	50 μl



Σχήμα 4.9: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου MSN2_633 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 το προϊόν της PCR.



Σχήμα 4.10: Ηλεκτροφόρηση καθαρού προϊόντος PCR για την ενίσχυση του γονιδίου MSN2_633 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το καθαρό προϊόν της PCR.

4.2 Απαλοιφή MSN2 αγρίου τύπου από κύτταρα ζύμης

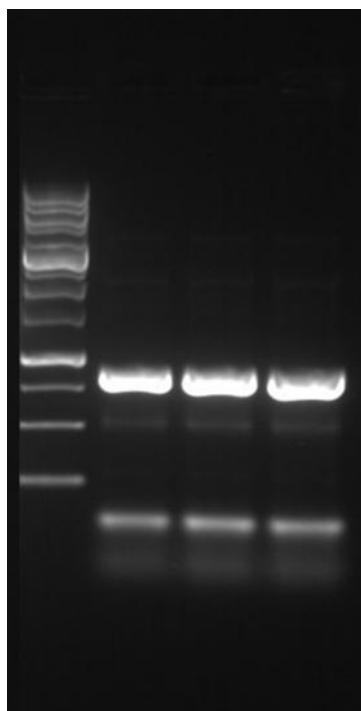
Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την αντικατάσταση ενός γονιδίου στο γενομικό DNA της ζύμης απαιτεί την τέλεση δυο διαδοχικών μετασχηματισμών και ομόλογων ανασυνδυασμών. Κατά τον πρώτο μετασχηματισμό τα κύτταρα ζύμης του στελέχους W303-1a, τα οποία δεν έχουν λειτουργικό γονίδιο URA3, μετασχηματίζονται 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_MSN2). Απαιτείται λοιπόν η ενίσχυση του αγρίου τύπου γονιδίου URA3 με την χρήση των κατάλληλων εκκινητών (Πίν. 4.7). Ως εκμαγείο χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pUC19-URA3. Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε για την ορθότητα του με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, απομονώθηκε η περιοχή του πηκτώματος όπου εντοπίζεται το προϊόν της PCR και καθαρίστηκε με το Nucleospin pcr clean up gel extraction kit και ηλεκτροφορήθηκε ξανά για τον έλεγχο της καθαρότητάς του (Σχ. 4.11, 4.12).

Συνθήκες PCR URA3:

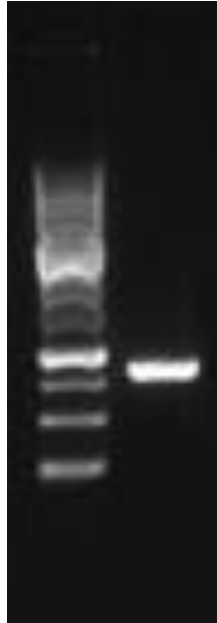
- | | | |
|---------|---------|--------------------|
| 1. 95°C | →3 min | |
| 2. 95°C | →20 sec | |
| 3. 58°C | →15 sec | |
| 4. 72°C | →1 min | →βήμα 2, #30 φορές |
| 5. 72°C | →5 min | |
| 6. 4°C | →∞ | |

Πίνακας 4.7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR URA3:

Genomic DNA από στέλεχος με λειτουργικό το URA3 γονίδιο	3 μ l
Primer MSN2_URA3_Forward (10 μ g/ μ l)	1,5 μ l
Primer MSN2_URA3_Reverse (10 μ g/ μ l)	1,5 μ l
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	25 μ l
H ₂ O	19 μ l
Σύνολο:	50 μ l



Σχήμα 4.11: 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.

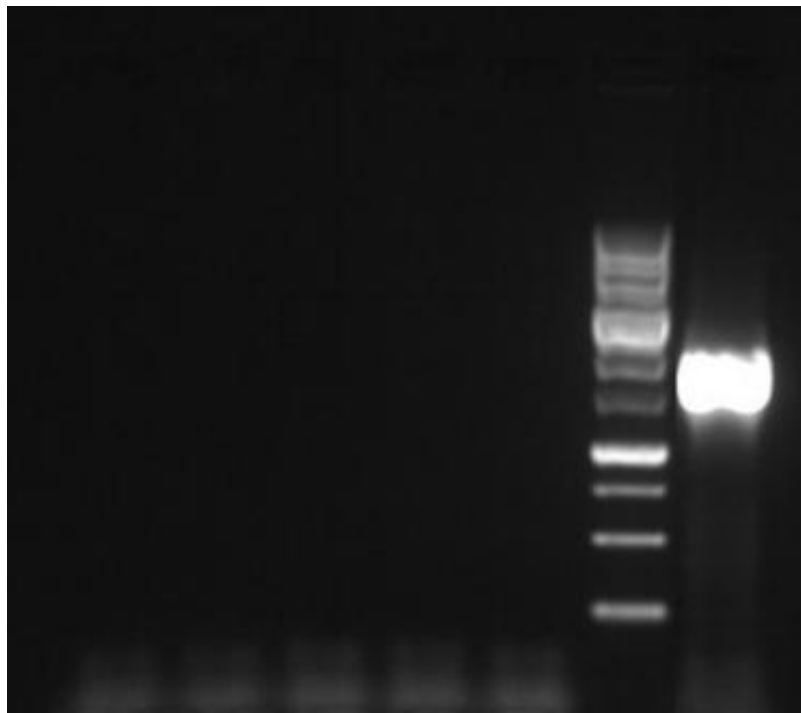


Σχήμα 4.12: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR URA3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 βρίσκεται το καθαρό προϊόν της PCR URA3.

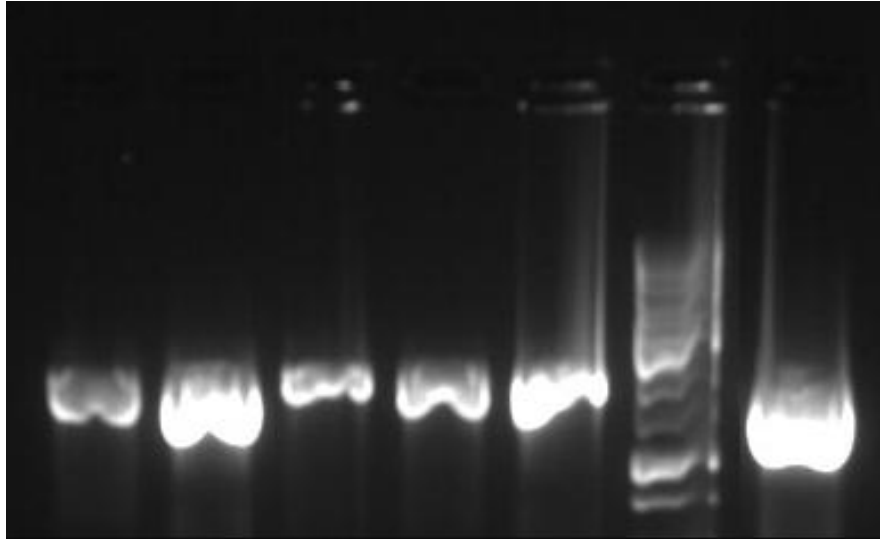
Το καθαρισμένο πλέον γονίδιο URA3_MSN2 χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης W303-1a. Τα κύτταρα που υπεβλήθησαν στην διαδικασία του μετασχηματισμού, αρχικά αναπτύχθηκαν επί περιοριστικού θρεπτικού μέσου από το οποίο απουσίαζε το αμινοξύ ουρακίλη (Synthetic Complete – Uracil (SC-U)) σε θερμοκρασία 30°C. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν επί του περιοριστικού θρεπτικού μέσου πιθανόν να είναι αυτά που έχει γίνει η αντικατάσταση του αγρίου τύπου MSN2 από το URA3.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού και του ομόλογου ανασυνδυασμού αποικίες από το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου SC-U και επωάστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση. Από τις καλλιέργειες αυτές έγινε απομόνωση του γενομικού DNA με τη μέθοδο απομόνωσης γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης. Ο έλεγχος της επιτυχίας του μετασχηματισμού έγινε στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, μέσω δυο αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιώντας την Taq polymerase, όπως έχει περιγραφεί στις πειραματικές μεθόδους. Ως 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 MSN2 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 (Σχ. 4.13, 4.14). Τα αποτελέσματα γίνονται εμφανή στην ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Τα κύτταρα από τα οποία έχει απαληφθεί το MSN2 γονίδιο αγρίου τύπου φυλάσσονται ως stock στους -80°C.



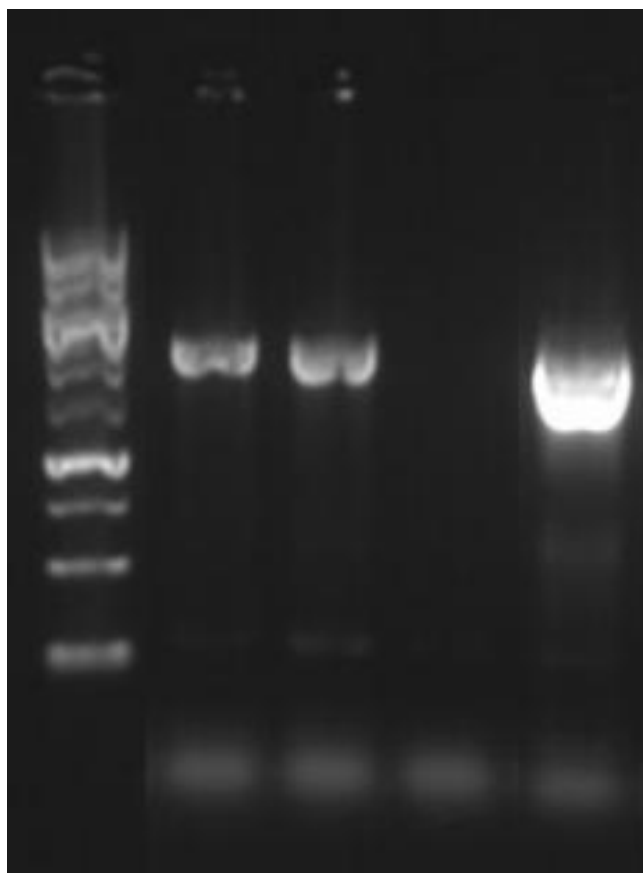
Σχήμα 4.13: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taq polymerase, με MSN2 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 1^{ου} μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: 1^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 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 W303-1a).



Σχήμα 4.14: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taq polymerase, με MSN4 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 αγρίου τύπου).

Κατά το δεύτερο μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης που ακολουθεί, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου MSN2-Ser-633-Ala στη ζύμη, η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με τον πρώτο μετασχηματισμό, μόνο που σαν DNA αυτή τη φορά χρησιμοποιείται το MSN2_Ser633Ala 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 (Σχ. 4.15). Σε αυτή την PCR αναμένεται να εμφανίσουν προϊόν μόνο το δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου)

που περιέχει το γονίδιο MSN2 και τα δείγματα ελέγχου, στα οποία έχει πετύχει ο ομόλογος ανασυνδυασμός και δεν περιέχουν το γονίδιο URA3 πλέον, αλλά το γονίδιο MSN2_Ser633Ala. Το μόνο δείγμα που δεν εμφανίζει προϊόν στην ηλεκτροφόρηση είναι αυτό που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN2 εντός του γονιδιώματος της ζύμης. Τα δείγματα τα οποία έχουν δεχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN2_Ser633Ala γίνονται stock και φυλάσσονται στους -80°C.



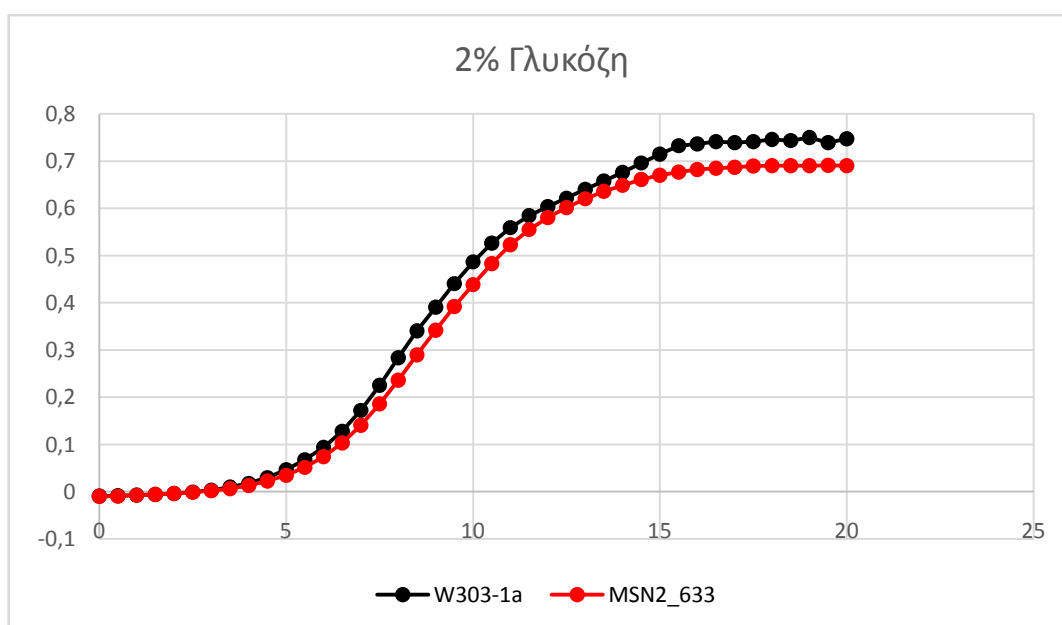
Σχήμα 4.15: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με Taq polymerase, με MSN2 εκκινητές, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 2^{ου} μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: μάρτυρας, 1^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, δείγμα ελέγχου που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN2 εντός του γονιδιώματος της ζύμης, δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης αγρίου τύπου).

4.3 Δοκιμασία ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους

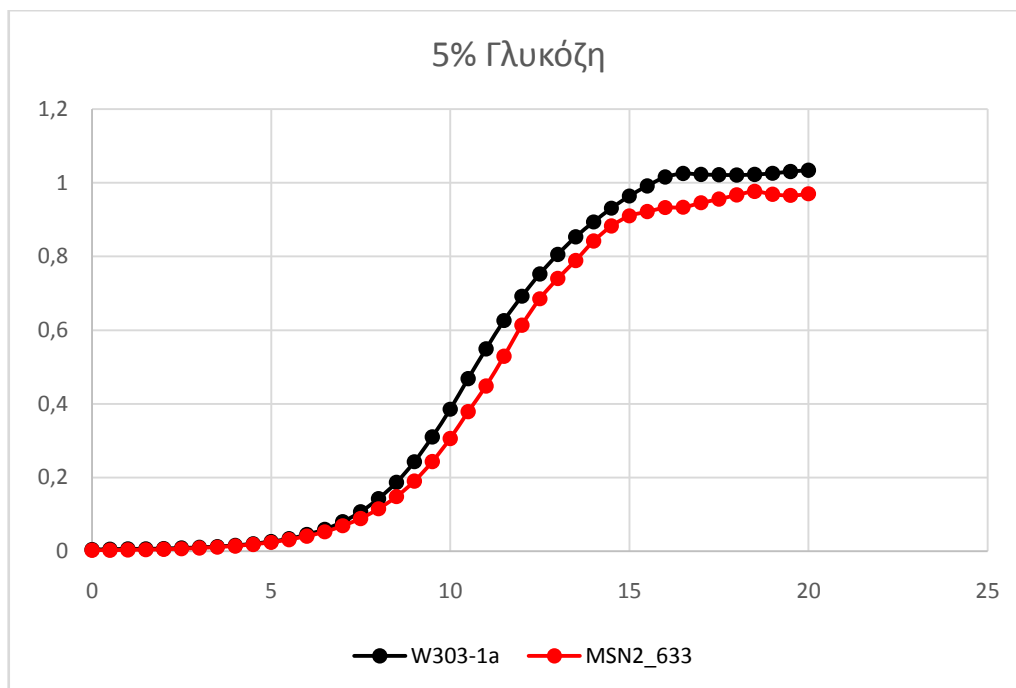
Προκειμένου να γίνει μια πρωταρχική μελέτη του στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a_MSN2_633), μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξής τους σε διάφορες συνθήκες συγκρίνοντας τη με αυτή των αγρίου τύπου κυττάρων.

4.3.1 Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.

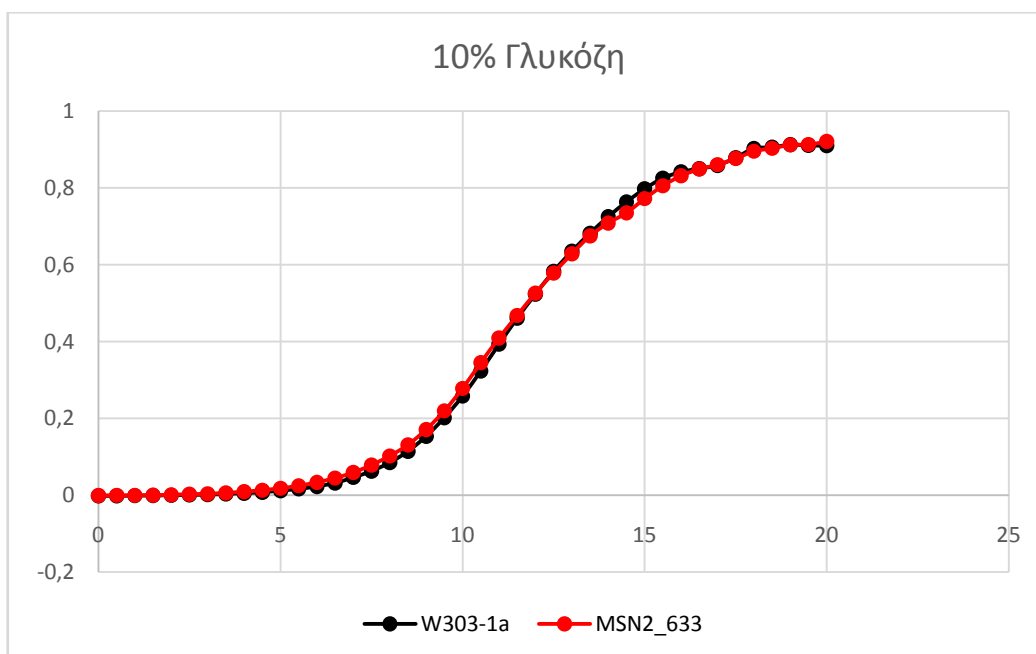
Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας καλείται να ξεκινήσει την ζύμωση, βρισκόμενος ουσιαστικά σε κατάσταση ωσμωτικού στρες. Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (Σχ. 4.16-4.19). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης *msn2* του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης.



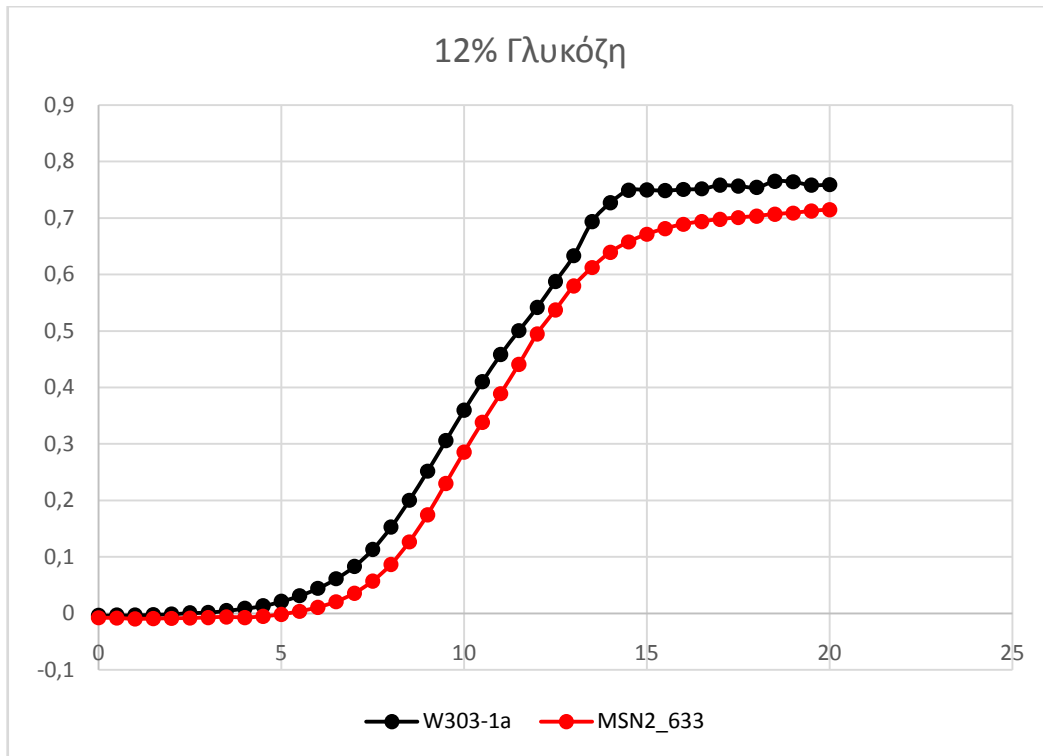
Σχήμα 4.16: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 2%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



Σχήμα 4.17: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 5%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



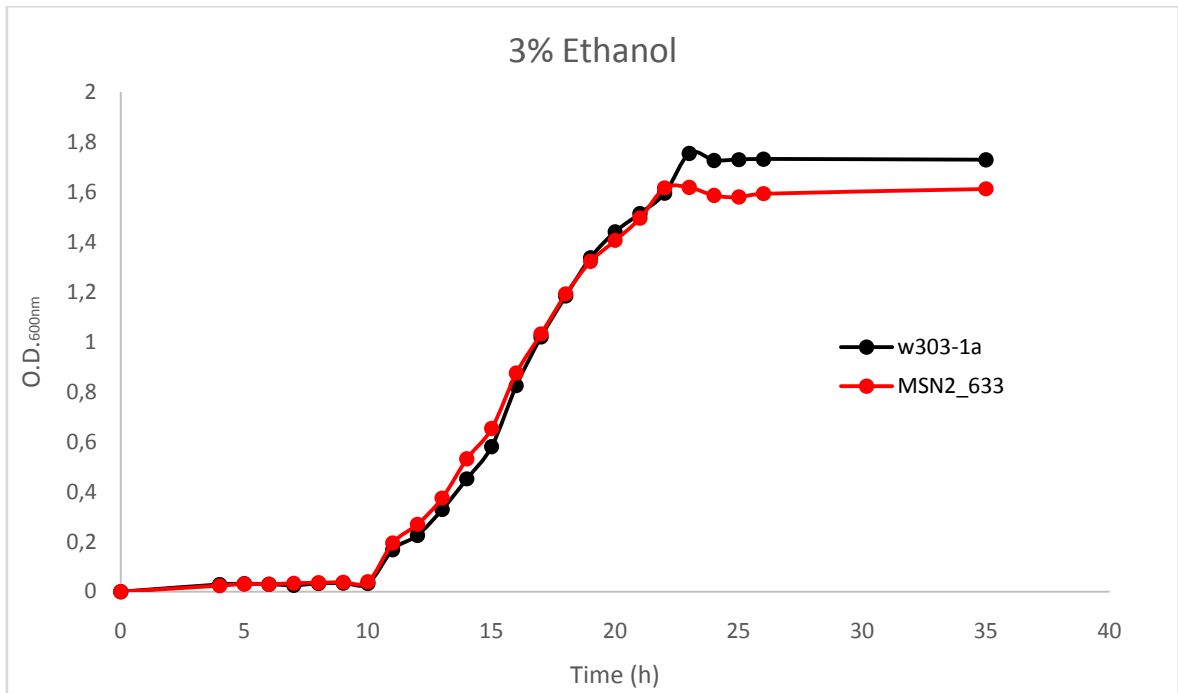
Σχήμα 4.18: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 10%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



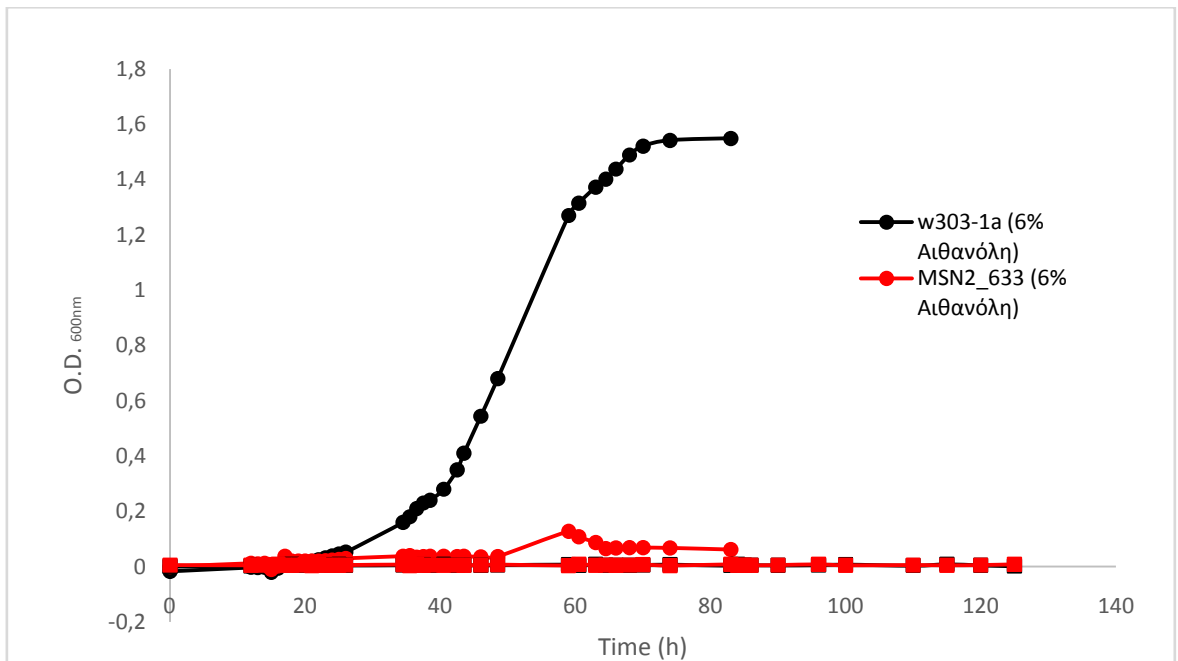
Σχήμα 4.19: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (w303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 12%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

4.3.2 Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων

Η παρουσία της αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας λειτουργεί εφόσον έχει ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (Σχ. 4.20-4.21). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης msn2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (3%) (Σχ. 4.20). Σε υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης (6%) φαίνεται ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη όχι μόνο δεν ευνοεί την ανάπτυξη του ζυμομύκητα αλλά απεναντίας εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία σε αυτή τουλάχιστον σε επίπεδο ανάπτυξης (Σχ. 4.21). Απαιτείται η περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής αιθανόλης η οποία γίνεται αναερόβια προκειμένου να φανεί η πλήρης επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης επί της λειτουργίας του ζυμομύκητα.



Σχήμα 4.20: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αιθανόλη σε συγκέντρωση 3%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



Σχήμα 4.21: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN2_633) και κυττάρων αγρίου τύπου (W303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αιθανόλη σε συγκέντρωση 6% και 9%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι *msn2/4* ενεργοποιούνται μετά την έκθεση της ζύμης σε μια ευρεία ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως άζωτο ή έλλειψη άνθρακα, ωσμωτική πίεση, παράγοντες που βλάπτουν το DNA, αιθανόλη και θερμική καταπόνηση.

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

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

Στην παρούσα εργασία αρχικά δημιουργήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου *MSN2* που φέρει τη μετάλλαξη *Ser633Ala*, με την τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR. Εν συνεχεία έγινε απαλοιφή του γονιδίου *MSN2* και αντικατάστασή του από το γονίδιο *URA3*, από το αγρίου τύπου στέλεχος *W303-1a* μέσω της διαδικασίας του μετασχηματισμού και του ακόλουθου ομόλογου ανασυνδυασμού που μπορεί να γίνει αυθόρμητα στη ζύμη υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις.. Το στέλεχος που προέκυψε *W303-1a_ΔMSN2* μετασχηματίστηκε με τη μεταλλαγμένη μορφή του *MSN2* γονιδίου (*MSN2_633*) και μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, έγινε αντικατάσταση του *URA3* γονιδίου που εισήχθη στο προηγούμενο βήμα. Τελικά ελήφθη το στέλεχος ζύμης *W303-1a_MSN2_Ser633Ala*. Ακολούθησε μια πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξής του σε σχετικά υψηλές τιμές συγκέντρωσης σακχάρου καθώς και σε διάφορες τιμές συγκέντρωσης αιθανόλης. Από τη πρωταρχική αυτή μελέτη προέκυψαν τα εξής:

- Η μετάλλαξη *Ser633Ala* επί της πρωτεΐνης *msn2* του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

- Η μετάλλαξη Ser633Ala επί της πρωτεΐνης msn2 του ζυμομύκητα, καθιστά το ζυμομύκητα μη ικανό να αναπτυχθεί σε σχετικά υψηλές τιμές αιθανόλης.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο κατάλοιπο Ser που υπάρχει στη φυσιολογική μορφή της msn2 πρωτεΐνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα ανάπτυξης του ζυμομύκητα σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης. Προκειμένου να αποκαλυφθεί πλήρως ο ρόλος του συγκεκριμένου αμινοξέος απαιτείται η περαιτέρω διερεύνηση τόσο διαφόρων άλλων συνθηκών που πιθανόν να επηρεάζουν την ανάπτυξη του ζυμομύκητα, όσο και της ικανότητας ζύμωσης των μεταλλαγμένων κυττάρων σε συνθήκες που προσομοιάζουν του φυσικού περιβάλλοντος που γίνεται η ζύμωση, καθώς και η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση:

- Arino J. (2010). Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. OMICS, 14, pp. 517–523.
- Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances, 26, pp. 89-105.
- Bai F.W., Chen L.J., Zhang Z., Anderson W.A., Moo-Young M. (2004). Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. J Biotechnol, 110, pp. 287–293.
- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L.(2002). “Biochemistry, 5th edition”. W.H. Freeman and Company, New York.
- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 180, pp. 1044–1052.
- Broach J.R., Deschenes R.J. (1990). The function of ras genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Adv Cancer Res 54, pp. 79–139.
- Casado C., Gonzalez A., Platara M., Ruiz A. and Arino J. (2011). The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. Biochem. J., 438, pp. 523-533.
- Casey G.P., Ingledew W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. Crit Rev Microbial, 13, pp. 219–280.
- Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol Biol Cell, 12, pp. 323–337.
- Colombo S., Ma P., Cauwenberg L., Winderickx J., Crauwels M., Teunissen A., Nauwelaers D., de Winde J.H., Gorwa M.F., Colavizza D., Thevelein J.M.(1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose-

- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 17, pp. 3326–3341.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. Mol Aspects Med, 22, pp. 217–246.
 - D'Amore T., Stewart G.G. (1987). Ethanol tolerance of yeast. Enzyme Microb Technol, 9, pp. 322–330.
 - D'Amore T., Panchal C.J., Stewart G.G. (1990). A study of ethanol tolerance in yeast. Crit Rev Biotechnol, 9, pp. 287–304.
 - Estruch F. 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.
 - Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 24, pp. 469–486.
 - Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. FEMS Microbiol., Rev. 32, pp. 673–704.
 - Garreau H., Hasan R.N., Renault G., Estruch F., Boy-Marcotte E. and Jacquet M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 146, pp. 2113–2120.
 - Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell, 11, pp. 4241–4257.
 - Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor M. T., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H. and Schuller C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. Genes Dev., 12, pp. 586–597.
 - Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. EMBO J, 21, pp. 135–144.

- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
- Hohmann S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol, Rev* 66, pp. 300–372.
- Hunt M. (2006). "Real Time PCR Tutorial", University of South Carolina.
- Kammann M., Laufs J., Schell J. and Gronenborn B. (1989). *Nucleic Acids Res.*, 17, pp. 5404.
- Kandrór 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.
- Lamb T. M., Xu W., Diamond A. and Mitchell A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 1850–1856.
- Lamb T.M. and Mitchell A.P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 23, pp. 677–686.
- Landt O., Grunert H.P. and Hahn U. (1990). *Gene*, 96, pp. 125–128.
- Lee P., Cho B.R., Joo H.S., Hahn J.S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol*, 70, pp. 882–895.
- Lin Y., Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, pp. 627–642.
- Liu Z.L., Saha B.C., Slininger P.J. (2008). Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. In: Wall J., Harwood C., Demain A. (eds) *Bioenergy*. ASM, Washington, DC, pp. 17–36.
- Mai B. and Breeden L. (1997). Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol. Cell. Biol.*, 17, pp. 6491–6501.
- Martínez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and Estruch F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins

- Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15, pp. 2227–2235.
- Millar D.G., Griffiths-Smith K., Algar E., Scopes R.K. (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol Lett*, 9, pp. 601–606.
 - Moskvina E., Schuller C., Maurer C.T., Mager W.H. and Ruis H. (1998). A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast*, 14, pp. 1041–1050.
 - Müller D., Exler S., Aguilera-Vázquez L., Guerrero-Martín E., Reuss M. (2003). Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20, pp. 351–367.
 - Nikolaou E., Agrafioti I., Stumpf M., Quinn J., Stansfield I., Brown A.J. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol*, 9, pp. 44.
 - Outlaw J., Collins K.J., Duffield J.A. (2005). Agriculture as a producer and consumer of energy. CABI, Oxfordshire.
 - Pascual C., Alonso A., García I., Romay C. (1988). Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 32, pp. 374–378.
 - PCR Primer - A laboratory manual Cold Spring Harbor Press(1995)., pp. 603-611.
 - Pina C., António J., Hogg T. (2004). Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. *Biotechnol Lett*, 26, pp. 1521–1527.
 - Rosa M.F., Sá-Correia I. (1996). Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett*, 135, pp. 271–274.
 - Ruiz, A, Serrano R. and Arino J. (2008). Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway. *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 13923–13933.
 - Sadeh A., Movshovich N., Volokh M., Gheber L., Aharoni A. (2011). Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. *Mol. Biol. Cell.*, 17, pp. 3127-3138.

- 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.
- Salgueiro S.P., Sá-Correia I., Novais J.M. (1988). Ethanol induced-leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl Environ Microbiol*, 54, pp. 903–909.
- Sanchez O.J., Cardona C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, 99, pp. 5270–5295.
- Santangelo G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol., Rev.* 70, pp. 253–282.
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1990). *BioTechniques*, 8, pp. 404–407.
- Sarkar G. and Sommer S.S. (1992). *Nucleic Acids Res.*, 20, pp. 4937–4938.
- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, pp. 5777–5782.
- Serrano R., Martin H., Casamayor A. and Arino J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, 281, pp. 39785–39795.
- Serrano R., Ruiz A., Bernal D., Chambers J.R. and Arino J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.*, 46, pp. 1319–1333.
- Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer PCR - In vitro mutagenesis protocols (1996)., Series 57, pp. 203-215 - *Methods in Molecular Biology*.
- Smets B., Ghillebert R., De Snijder P., Binda M., Swinnen E., De Virgilio C. and Winderickx J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 56, pp. 1–32.

- Smith A., Ward M.P. and Garrett S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17, pp. 3556–3564.
- Tamaki H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, pp. 245–250.
- Teixeira M.C., Raposo L.R., Mira N.P., Lourenço A.B., Sá-Correia I. (2009). Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol.*, 75, pp. 5761–5772.
- Thevelein J. M. and de Winde J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 33, pp. 904–918.
- Van Uden N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann Rep Ferment Process*, 8, pp. 11–58.
- Vertes A., Qureshi N., Yukawa H., Blaschek H. (2010). *Biomass to biofuels*. Wiley, West Sussex.
- Viladevall L., Serrano R., Ruiz A., Domenech G., Giraldo J., Barcelo A. and Arino J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279, pp. 43614–43624.
- Wall J., Harwood C., Demain A. (2008). *Bioenergy*. ASM, Washington.

6.2 Ελληνική:

- Βαρζάκας, Χ. Θ., Αρβανιτογιάννης Ι. (2006). “Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα”, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- Βερβερίδης, Φ. (2003). “Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών”, Ηράκλειο Κρήτης.
- Λαζανάκη Β. (2010). “Η χρήση της Real Time PCR για την Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Στελεχών Βακτηρίου (*Escherichia Coli*)”, Διπλωματική Εργασία, Ηράκλειο Κρήτης.