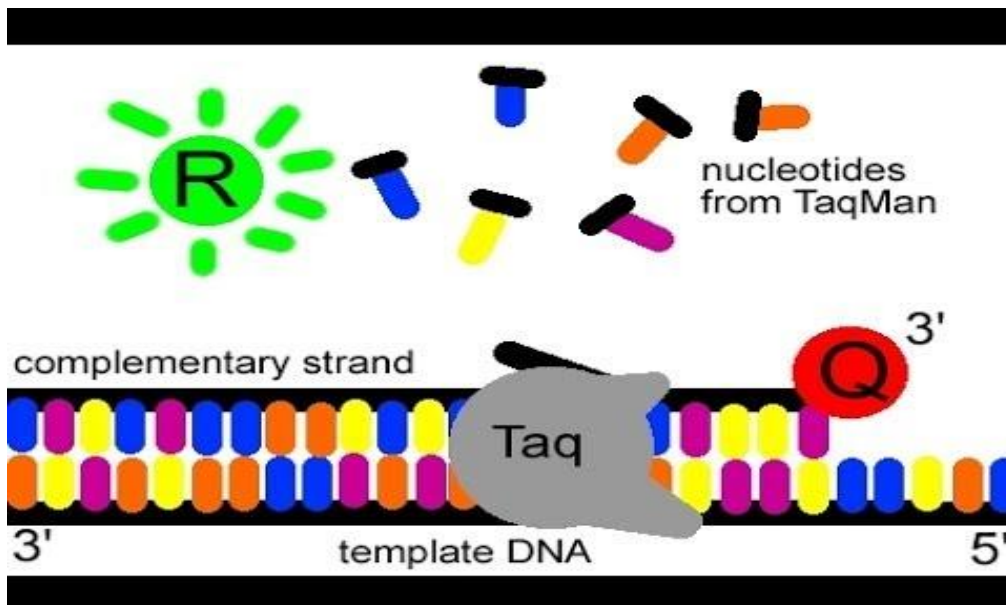


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ΠΟΥ  
ΦΕΡΕΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ SER532ALA ΕΠΙ ΤΗΣ  
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MSN4

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΛΕΙΒΑΔΙΤΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *SACCHAROMYCES CEREVISIUE* ΠΟΥ  
ΦΕΡΕΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ SER532ALA ΕΠΙ ΤΗΣ  
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MSN4

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΛΕΙΒΑΔΙΤΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής :  
Σωτήρης Σπυρίδων Βαμβακάς

Καλαμάτα 2016

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

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

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

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης οφείλω στην συνάδερφο κ. Σοφία Λιώση που δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο και συνέβαλε ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η πτυχιακή μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου που με στήριξαν, με βοήθησαν αλλά και με ανέχτηκαν στο μέγιστο κατά την διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής μελέτης αλλά και σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή τροφίμων και ποτών. Η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. 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. Η παραγωγή αιθανόλης χαμηλού κόστους και υψηλής ποιότητας είναι σημαντική πρόκληση όσον αφορά την ανάπτυξη μιας βιοοικονομίας. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας εξαιρετικός παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ άλλων ζυμωτικών μικροοργανισμών και έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Η μελέτη λοιπόν γενετικά τροποποιημένων στελεχών ζύμης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, της παρουσίας αιθανόλης, 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 Msn4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ελέγχει την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε καταστάσεις κυτταρικού στρες. Η είσοδος της στον πυρήνα είναι ένα σημείο ελέγχου καθοριστικής σημασίας. Ο έλεγχος της εισόδου της Msn4 στον πυρήνα γίνεται μέσω φωσφορυλίσεων συγκεκριμένων αμινοξέων σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης. Η φωσφορυλίωση αυτών των αμινοξέων, η οποία γίνεται από την πρωτεϊνική κινάση A, αναστέλλει την είσοδό της στον πυρήνα. Το αμινοξύ Ser532 είναι ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο της Msn4 στον πυρήνα.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 τόσο σε συνθήκες οξυμωτικού στρες όσο και παρουσία αυξημένων επιπέδων αιθυλικής αλκοόλης καθώς και η διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που έχει

αποδειχθεί ότι έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες.

## **ABSTRACT**

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

Msn4 protein is a transcription factor which controls the expression of genes that respond to cellular stress. It's translocation to the nucleus is a critical control point. This translocation is controlled by phosphorylation of specific serine residues located in Nuclear Localization signal (NLS) domain of Msn4. These residues, are phosphorylated by protein kinase A, (PKA) and has as result the inhibition of Msn4 translocation to the nucleus. Ser532 residue is probably one of these residues which are phosphorylated.

The aim of this thesis is to investigate the growth ability the *Saccharomyces cerevisiae* strain carrying the mutation Ser532Ala on Msn4 under conditions of osmotic stress and presence ethanol. Gene expression of genes that their expression are altered by the presence of ethanol and play an important role in several intracellular processes was also investigated.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 4 -
ABSTRACT.....	- 6 -
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	- 9 -
1.1. Ο ζυμομύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 9 -
1.2. Εφαρμογή του ζυμομύκητα στη βιομηχανία.....	- 10 -
1.3. Ο <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε συνθήκες στρες.....	- 11 -
1.4. Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	- 13 -
1.4.1. Επίδραση της αιθανόλης.....	- 14 -
1.4.2. Επίδραση της γλυκόζης (οσμωτικό στρες).....	- 15 -
1.5. Ο ρόλος της πρωτεΐνης MSN4.....	- 16 -
1.6. Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ζυμομύκητα.....	- 16 -
1.7. PCR και Real time PCR.....	- 18 -
1.7.1. Αρχή μεθόδου της PCR.....	- 18 -
1.8. PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	- 20 -
1.8.1. Αρχή της μεθόδου.....	- 20 -
1.8.2. Στάδια της Real-Time PCR.....	- 21 -
1.8.3. Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I.....	- 24 -
1.8.4. Πλεονεκτήματα της real-time PCR.....	- 24 -
1.8.5. Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων.....	- 25 -
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	- 27 -
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 28 -
3.1. Υλικά.....	- 28 -
3.2. Πειραματικές Πορίες.....	- 30 -
3.2.1. για τις καμπύλες ανάπτυξης.....	- 30 -
3.2.2. Λήψη δειγμάτων για απομόνωση RNA.....	- 30 -
3.2.3. Απομόνωση RNA από κύτταρα ζύμης με όξινη φαινόλη.....	- 31 -
3.2.4. Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	- 33 -
3.2.5. Χρωστική ORANGE G.....	- 33 -

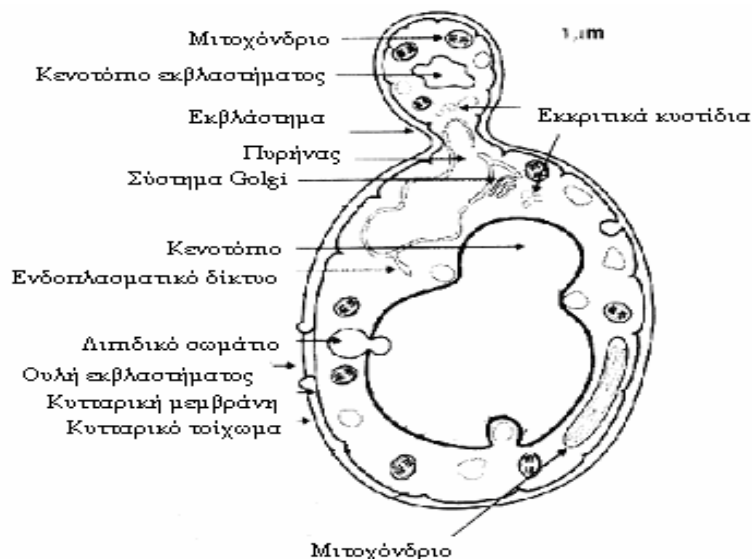
3.2.6.	Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v .....	- 33 -
3.2.7.	Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων.....	- 33 -
3.2.8.	Κατεργασία δειγμάτων με DNase-I.....	- 34 -
3.2.9.	Real Time PCR.....	- 36 -
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	- 38 -
4.1.1	Επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.....	- 38 -
4.1.2	Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων .....	- 40 -
4.2	Απομόνωση RNA.....	- 42 -
4.4	Μελέτη της έκφρασης γονιδίων με Real-Time (RT) PCR.....	- 44 -
4.4.1	Υπολογισμοί ποσοτικοποίησης της Real Time PCR.....	- 44 -
4.4.2	Τα υπό μελέτη γονίδια.....	- 45 -
4.4.3	Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων για χρόνο t=15min.....	- 47 -
4.4.3.2	ALD4.....	- 48 -
4.4.3.3	GND2.....	- 49 -
4.4.3.4	TDH1 .....	- 50 -
4.4.3.5	HXK1 .....	- 51 -
4.5.4	Αποτελέσματα γονιδίων της Real Time PCR για t=16h.....	- 52 -
4.5.4.1	ELO1.....	- 52 -
4.5.4.2	ALD4.....	- 53 -
4.5.4.3	GND2.....	- 54 -
4.5.4.4	TDH1 .....	- 55 -
4.5.4.5	HXK1 .....	- 56 -
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	- 57 -
6.	ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ .....	- 59 -
6.1	Ξενόγλωσση .....	- 59 -
6.2	Ελληνική βιβλιογραφία .....	- 62 -



# 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*

Ο πιο γνωστός και με τις περισσότερες εφαρμογές ζυμομύκητας, είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Πρόκειται για μονοκύτταρο και μονοπύρηνο οργανισμό, με κυτταρικό σχήμα γενικά ελλειψοειδές. Αναλόγως του στελέχους το σχήμα μπορεί να ποικίλει από σφαιρικό, ωσειδές ή κυλινδρικό. Το μήκος του κυττάρου ποικίλει από 5-10  $\mu\text{m}$  και το πλάτος από 1-3 έως 1-7  $\mu\text{m}$ . Τα κύτταρα του αποτελούνται από τον κυτταρικό φάκελο, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα οργανίδια. Ο κυτταρικός φάκελος περιβάλλει και περικλείει τα κυτταρικά στοιχεία και συνίσταται, από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου, από την πλασματική μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο, το κυτταρικό τοίχωμα, την κάψουλα και άλλες εξωκυτταρικές δομές(Εικ.1.1). Ο κυτταρικός φάκελος καταλαμβάνει περίπου το 15% του συνολικού όγκου του κυττάρου και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της όσμωσης και της διαπερατότητας του κυττάρου [Walker, 1998].



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση τυπικού κυττάρου *Saccharomyces cerevisiae* με εκβλάστημα.

Η συστηματική κατάταξη του *Saccharomyces cerevisiae* είναι:

ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Μύκητες  
ΦΥΛΟ: Μυκόφυτα  
ΚΛΑΣΗ: Ασκομύκητες  
ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Πρωτοασκομύκητες  
ΤΑΞΗ: Ενδομύκητες  
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: *Saccharomycetaceae*  
ΓΕΝΟΣ: *Saccharomyces*  
ΕΙΔΟΣ: *Saccharomyces cerevisiae*

## 1.2. Εφαρμογή του ζυμομύκητα στη βιομηχανία

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 προσπάθειας 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.

### 1.3. Ο *Saccharomyces cerevisiae* σε συνθήκες στρες

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) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού κυττάρων ζύμης, που συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα. Στον *S. cerevisiae*, σε απάντηση σε μια ραγδαία ζυμώσιμη πηγή άνθρακα όπως είναι η γλυκόζη, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Cyp1 (αδενυλική κυκλάση). Η δράση της αδενυλικής κυκλάσης έχει ως αποτέλεσμα την παροδική αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης, cAMP. Η Πρωτεϊνική κινάση A (PKA) είναι ένα ετεροτετραμερές που

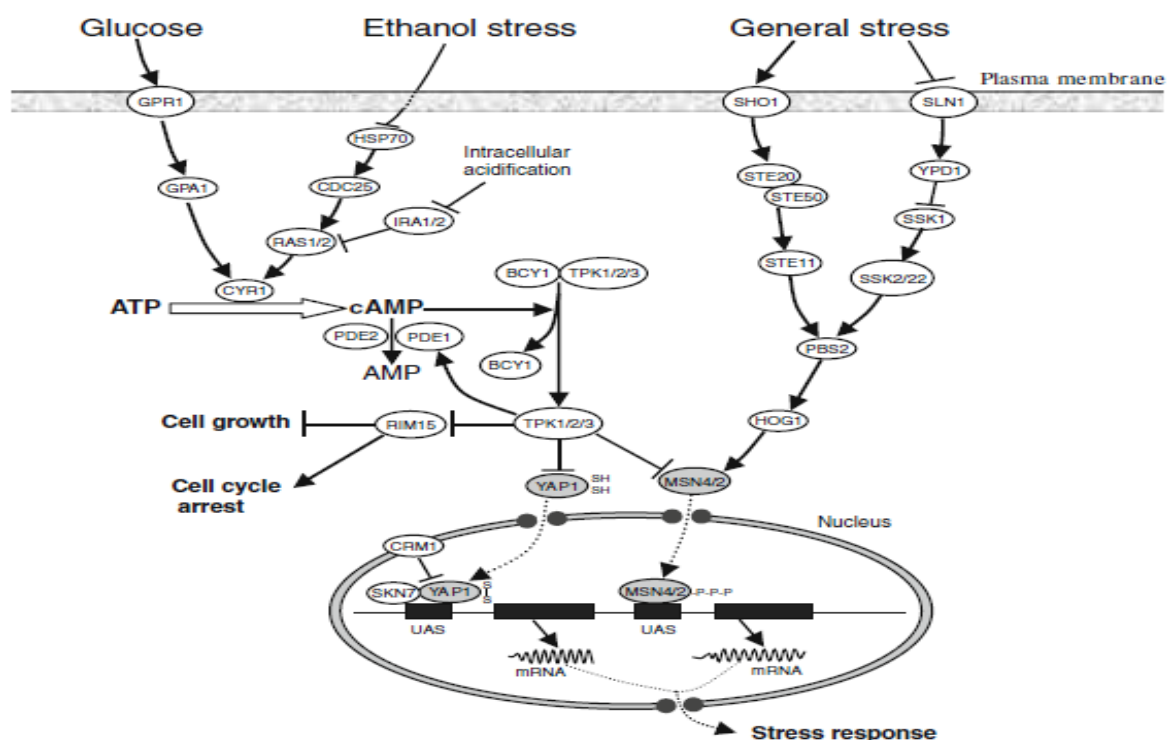
αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Οι καταλυτικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από τρία γονίδια (TRK1, TRK2 και TRK3), ενώ οι ρυθμιστικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο (BCY1). Η cAMP δρα ως αγγελιοφόρο μόριο δεσμεύοντας και απομακρύνοντας τις ρυθμιστικές 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. Ακολούθως, η ενεργοποιημένη PKA επηρεάζει διάφορους 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. Δύο από αυτούς είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2 και Msn4, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχονται από τις αλληλουχίες απόκρισης στο stress (Stress Responsive Elements (STRE)) (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(Εικ.1.2). 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.



Εικόνα 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.

#### 1.4. Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στρεσογόνοι ονομάζονται οι παράγοντες εκείνοι που με την παρουσία τους επιδρούν αρνητικά στην λειτουργικότητα των κυττάρων των ζυμών και συνεπώς στις αποδόσεις των ζυμών. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε: Φυσικούς παράγοντες: Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, η υψηλή οσμωτική πίεση, η έλλειψη νερού, οι υψηλές υδροστατικές και ατμοσφαιρικές πιέσεις και οι διάφορες ακτινοβολίες. Χημικούς παράγοντες: Τέτοιοι είναι η αιθανόλη και άλλοι τοξικοί μεταβολίτες, τα περιορισμένα θρεπτικά συστατικά, το οξειδωτικό στρες, το pH και τα χημικά μεταλλαξιγόνα. Βιολογικούς παράγοντες: Φαινόμενα όπως η γήρανση των κυττάρων, οι γενοτυπικές αλλαγές, ο ανταγωνισμός από άλλους οργανισμούς κ.α. επηρεάζουν επίσης αρνητικά τον μεταβολισμό των κυττάρων. Από τους παραπάνω στρεσογόνους παράγοντες αυτοί που ενδιαφέρουν και μελετώνται είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης και η οσμωτική πίεση (μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης).

#### **1.4.1. Επίδραση της αιθανόλης**

Η αιθανόλη όπως και άλλες αλκοόλες όταν συγκεντρώνονται στο θρεπτικό υλικό δρουν ως χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες για τους μικροοργανισμούς. Η αιθανόλη μπορεί να είναι τοξική για τα κύτταρα των ζυμών σε συγκεντρώσεις 8-18 % κ.ο. γεγονός που εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, τόσο πιο έντονες γίνονται οι αρνητικές επιδράσεις της. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση καταστέλλεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων και μερικών αμινοξέων. Η ζύμωση αναστέλλεται συνήθως πλήρως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης περίπου 11% κ.ο. [Glazer et al., 1995]. Οι ανασταλτικές επιδράσεις της αιθανόλης ενισχύονται από υψηλές θερμοκρασίες και από την έλλειψη θρεπτικών ουσιών (ιδιαίτερα ιόντων  $Mg^{+}$ ) και άλλων μεταβολικών παραπροϊόντων όπως άλλες αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα, αλδεΐδες, οργανικά οξέα, καρβονυλικές και φαινολικές ενώσεις [Jackson 1994, Walker 1998]. Οι ανώτερες αλκοόλες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από την

αιθανόλη όμως η τοξικότητά τους περιορίζεται λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων στις οποίες παράγονται. Μια από τις κύριες τοξικές επιδράσεις της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισχωρεί στην μεμβράνη και διασπά τους δεσμούς λιπιδίου–πρωτεΐνης και λιπιδίου–λιπιδίου. Το αποτέλεσμα είναι η κυτταρική μεμβράνη να γίνεται ολοένα και πιο διαπερατή. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει σιγά σιγά και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με κατάληξη τον θάνατο του κυττάρου [Jackson, 1994]. Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διαφόρων στελεχών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη [You et al., 2003]. Η κυτταρική μεμβράνη είναι από τους πρώτους και σημαντικότερους στόχους της αιθανόλης στον *S. cerevisiae* όμως δεν είναι ο μοναδικός.

#### **1.4.2. Επίδραση της γλυκόζης (οσμωτικό στρες)**

Υπεροσμωτικές συνθήκες μπορεί να δημιουργηθούν μετά από απώλεια ενδοκυτταρικού υγρού π.χ. κατά την παρασκευή ξηρής ζύμης ή ως αποτέλεσμα έκθεσης σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης [Walker, 1998]. Έχει βρεθεί ότι η ικανότητα του *S. cerevisiae* να ζυμώνει σε μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι ανάλογη της ενεργότητας της ιμπερτάσης, η οποία υδρολύει την σακχαρόζη. Η υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη αυξάνει την οσμωτική πίεση και σύντομα η ζύμωση αναστέλλεται. Όταν ο *S. cerevisiae* εκτίθεται σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις, επάγεται μια πολύπλοκη αντίδραση που περιλαμβάνει γρήγορη ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου λόγω εκροής νερού [Marechal et al. 1994, Meikle et al. 1988]. Η γλυκερόλη είναι η πιο αποτελεσματική οσμωρυθμιστική διαλυτή ουσία στις ζύμες. Γι' αυτό και κάτω από υπεροσμωτικές συνθήκες, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων, που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της γλυκερόλης (Brewster et al., 1993, Schuller et al., 1994, Hirayama et al., 1995).

## 1.5. Ο ρόλος της πρωτεΐνης MSN4

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. Όπως αναφέρεται και στα προηγούμενα κεφάλαια η μεταβολή του pH, της θερμοκρασίας, της ωσμωτικής πίεσης, η παρουσία αιθανόλης είναι οι πιο συνήθεις αντίξοες συνθήκες στις οποίες ο ζυμομύκητας καλείται να όχι μόνο να επιβιώσει αλλά και να λειτουργήσει.

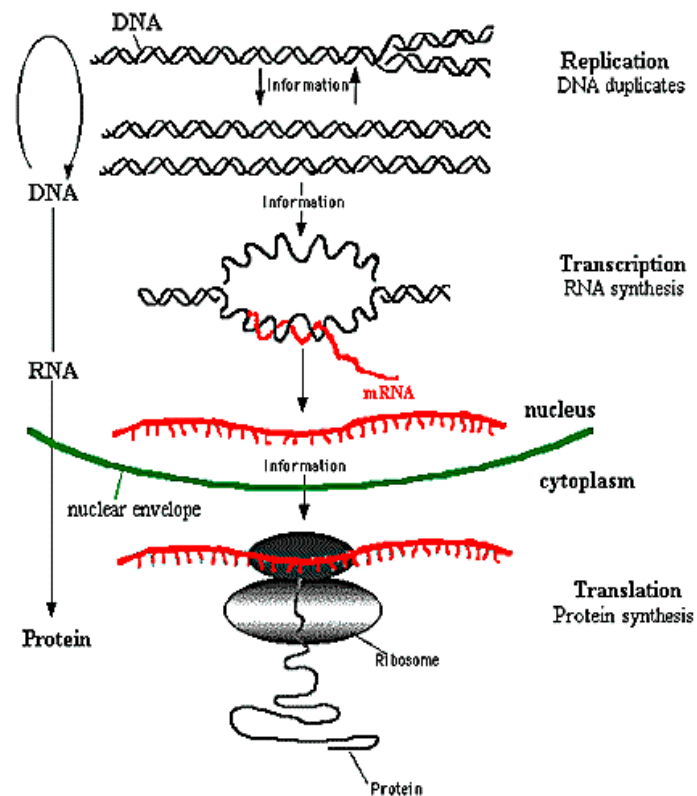
Η πρωτεΐνη MSN4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ελέγχει την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε καταστάσεις κυτταρικού στρες. Η είσοδος της στον πυρήνα είναι ένα σημείο ελέγχου καθοριστικής σημασίας. Ο έλεγχος της εισόδου της Msn4 στον πυρήνα γίνεται μέσω φωσφορυλιώσεων συγκεκριμένων αμινοξέων σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)). Η φωσφορυλίωση αυτών των αμινοξέων, η οποία γίνεται από την πρωτεϊνική κινάση A, αναστέλλει την είσοδο της στον πυρήνα. Το αμινοξύ Ser532 είναι ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο της msn4 στον πυρήνα.

## 1.6. Η ροή της γενετικής πληροφορίας στο ζυμομύκητα

Όπως είναι γνωστό η γενετική πληροφορία βρίσκεται αποθηκευμένη στο δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) του κυττάρου. Προκειμένου η πληροφορία αυτή να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο και να παραχθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες, το τμήμα του DNA του κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που πρόκειται να παραχθεί, αρχικά μεταγράφεται και προκύπτει ένα νέο μόριο που καλείται ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA) (Εικ.1.3). Το RNA είναι μια απλή ασταθής έλικα με ισχυρές δευτεροταγείς δομές. Εντός του κυττάρου απαντώνται διαφορετικά είδη RNA τα οποία κατηγοριοποιούνται αναλόγως των λειτουργιών που επιτελούν ή συμμετέχουν (rRNA, tRNA, mRNA, snRNA). Το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA (rRNA) είναι στην πραγματικότητα αποτελείται από 3-4 διαφορετικά μόρια RNA τα οποία είναι απαραίτητα για



την δημιουργία και λειτουργία των ριβοσωμάτων. Το μεταφορικό RNA (transfer RNA (tRNA), συμμετέχει στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης μεταφέροντας τα αμινοξέα που πρόκειται να ενσωματωθούν στην νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα από τα ριβοσώματα ακολουθώντας πάντα το γενετικό κώδικα και λειτουργώντας χάρη στην αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Το μηνυματοφόρο ή αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA (mRNA) είναι το μόριο εκείνο που φέρει το γενετικό μήνυμα, η μετάφραση του οποίου από τα ριβοσώματα, θα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της νέας πρωτεΐνης).



Εικόνα 1.3: Μεταγραφή DNA σε RNA

## 1.7. PCR και Real time PCR

### 1.7.1. Αρχή μεθόδου της 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)(Εικ.1.4). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να επιτυγχάνει ταχύτατη εναλλαγή θερμοκρασιών (Βερβερίδης, 2003).

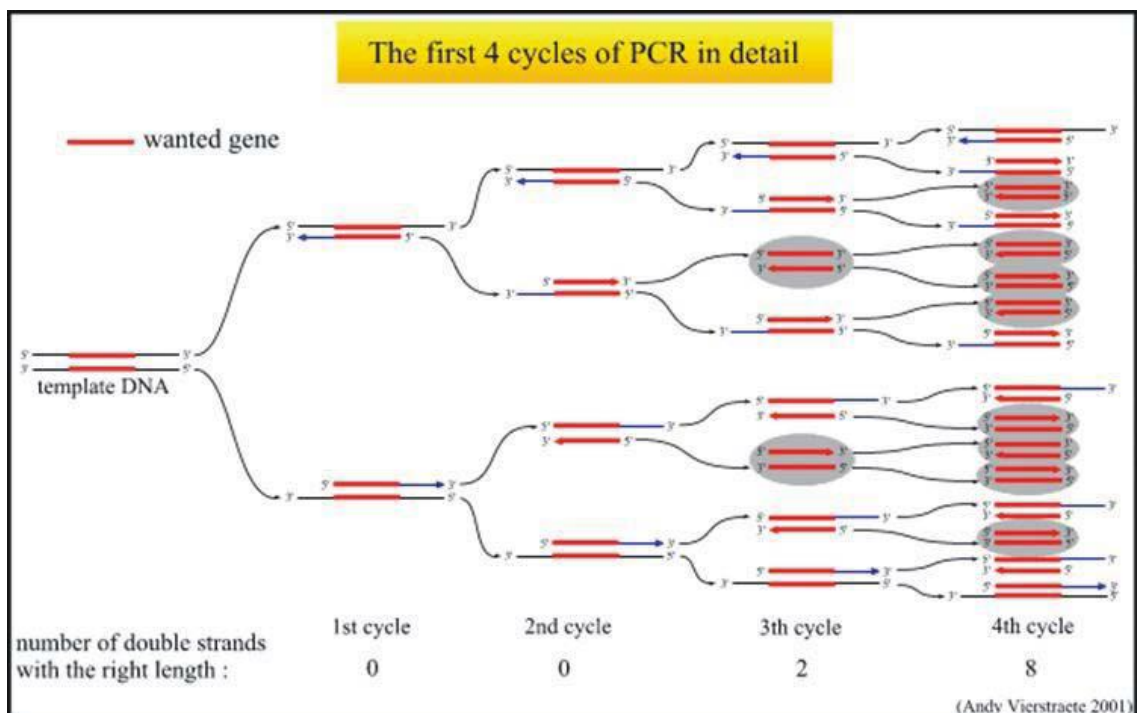


Εικόνα 1.4: Θερμικός κυκλοποιητής (thermal cycler).

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο της αντίδρασης PCR είναι τα εξής:

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

Αυτά τα 3 στάδια λαμβάνουν χώρα σε ένα θερμικό κύκλο. Συνήθως τα πρωτόκολλα της PCR περιλαμβάνουν 30-50 θερμικούς κύκλους (Εικ.1.5). Η διαδικασία πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας-στόχου διαρκεί 2-4 ώρες και ο πλήρης έλεγχος με την ανίχνευση του ηλεκτροφορητικά ή χρωματομετρικά με υβριδισμό νουκλεϊνικών οξέων (probes), ολοκληρώνεται σε 48 ώρες.



Εικόνα 1.5: Οι 4 πρώτοι κύκλοι μιας PCR

## 1.8. PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

### 1.8.1. Αρχή της μεθόδου

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR (Higuchi et al 1993). Η real-time PCR, απλά αναφέρεται στη ενίσχυση του DNA με PCR που όμως η ποσότητα του DNA που παράγεται προσδιορίζεται σε κάθε κύκλο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να μπορεί να ποσοτικοποιήσει με ακρίβεια την ποσότητα του αρχικού DNA στο δείγμα πριν την ενίσχυση με PCR. Η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο. Το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR (Εικ.1.6). Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της ενίσχυσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά την ποσότητα του νεοσυντιθέμενου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA (Science.gr: Real Time PCR 2012).



## Εικόνα 1.6: Μηχάνημα Real Time PCR

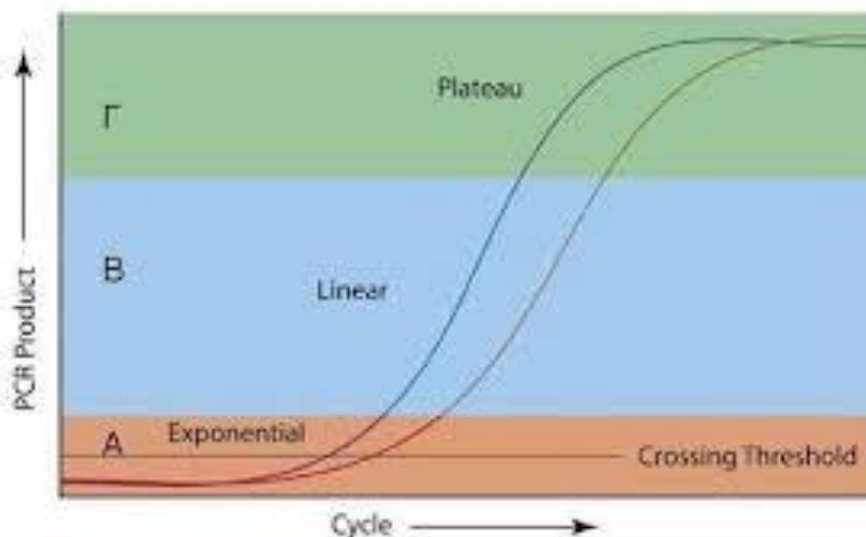
### 1.8.2. Στάδια της Real-Time PCR

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

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού(Εικ.1.7). Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

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

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



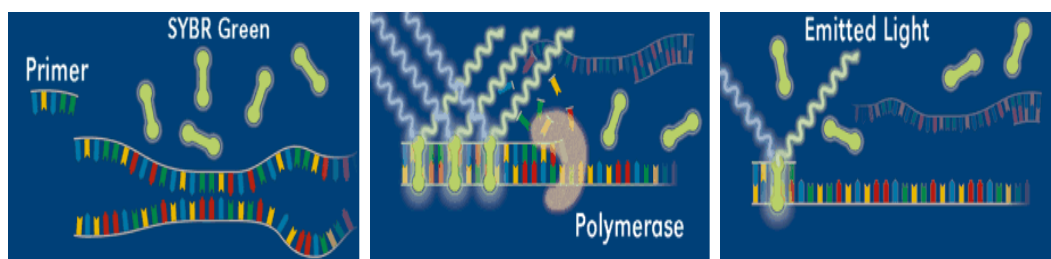
Εικόνα 1.7: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης Real Time PCR

### 1.2.1.1 Η χρωστική SYBR green

Η απλούστερη μέθοδος ανίχνευσης του προϊόντος της PCR επιτυγχάνεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που εμφανίζουν της ικανότητα δέσμευσης επί του δίκλωνου μορίου DNA. Η SYBR green είναι μία τέτοια χρωστική. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης χρωστικής είναι ότι όταν βρίσκεται ελεύθερη δεν εμφανίζει καθόλου φθορισμό ενώ όταν είναι δεσμευμένη με δίκλωνο μόριο DNA εμφανίζει. Η ένταση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA(Εικ.1.8). Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό παρέχει μία απλή και αξιόπιστη μέθοδο μέτρησης της προόδου της real-time PCR. Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση μη τροποποιημένων εκκινητών, η οποία διευκολύνει τον σχεδιασμό και την σύνθεση τους με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους real-time PCR.

Επιπλέον η SYBR green επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ). Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επομένως ως διαγνωστικό εργαλείο για την εξακρίβωση της μοναδικότητας του προϊόντος της PCR, εφόσον η αναπαραγωγή του πειράματος γίνεται κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες, αφού οι τιμές της θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) επηρεάζονται από:

- τη συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου,
- τη συγκέντρωση του DMSO,
- τη συγκέντρωση DNA του δείγματος,
- τη συγκέντρωση της SYBR green και
- το ρυθμό διακύμανσης της θερμοκρασίας κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης (Science.gr: Real Time PCR 2012).



**Εικόνα 1.8 :** Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η δέσμευσή της με το DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

### **1.8.3. Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I.**

Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η δέσμευσή της με το DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης. Μεγαλύτερη εξειδίκευση στη real-time PCR επιτυγχάνεται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher), και υβριδίζονται στο πρότυπο DNA (Συμεωνίδου 2008).

Μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών είναι:

- οι Taqman probes
- molecular beacons
- Scorpion primers

### **1.8.4. Πλεονεκτήματα της real-time PCR**

Η εφαρμογή της real-time PCR απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή

- στην ποιότητα του δείγματος,
- στο χειρισμό του οργάνου,
- στην επιλογή της μεθόδου (χημείας),
- στα αντιδραστήρια

Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η μέθοδος, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που



απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης.

Η real-time PCR μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές, με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA, ανοίγει νέες προοπτικές για νέες εφαρμογές :

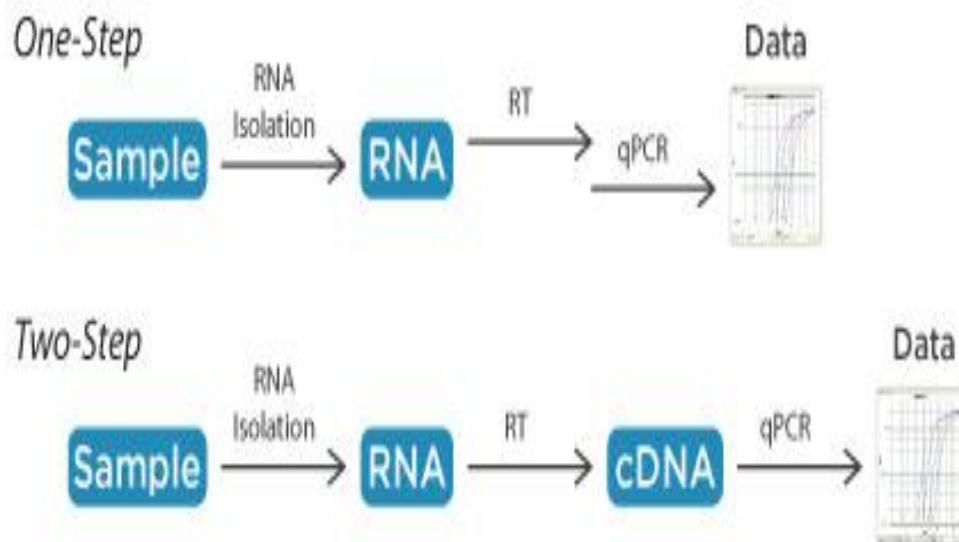
- Ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών (π.χ. ιοί).
- Μέτρηση της έκφρασης κάποιων γονιδίων.
- Επαλήθευση πολλαπλασιασμού κάποιων γονιδίων (gene amplification).
- Αποτελεσματικότητα θεραπευτικής αγωγής (π.χ. νέα φάρμακα για τον καρκίνο).
- Ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA.
- Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.
- Προσδιορισμό γονότυπου (genotyping)( Συμεωνίδου 2008).

#### **1.8.5. Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων**

Η πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-Time RT(Reverse Transcription) PCR) μπορεί να γίνει σε δύο στάδια ή σε ένα στάδιο(Εικ.1.9). Στη δύο σταδίων το RNA πρώτα υποβάλλεται σε αντίστροφη μεταγραφή και παράγεται cDNA, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης ολιγό-dT

εκκινητές, τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (random primers). Το προϊόν της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται ως εκμαγείο στη Real Time PCR. Η χρήση των ολιγό-dT εκκινητών ή τυχαίων ολιγομερών για αντίστροφη μεταγραφή σημαίνει ότι πολλές διαφορετικές μεταγραφές μπορούν να αναλυθούν με PCR από μία μόνο αντίδραση RT. Επιπλέον τα πολύτιμα δείγματα RNA μπορούν να μεταγραφούν αμέσως σε πιο σταθερά cDNA για μετέπειτα χρήση και μακροχρόνια αποθήκευση.

Στην ενός σταδίου μέθοδο ή ενός σωλήνα όπως συχνά ονομάζεται, η αντίστροφη μεταγραφή και η Real Time PCR γίνονται σε ένα σωλήνα, με την αντίστροφη μεταγραφή να προηγείται της Real Time PCR. Η γρήγορη διαδικασία επιτρέπει την ταχεία επεξεργασία των πολλαπλών δειγμάτων και είναι εύκολο να αυτοματοποιηθεί. Ο μειωμένος αριθμός των βημάτων χειρισμού έχει ως αποτέλεσμα υψηλή αναπαραγωγικότητα από δείγμα σε δείγμα και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης επειδή απαιτείται λιγότερη παρέμβαση από τον ερευνητή (Sample and assay technologies Real Time PCR brochure 2009).



**Εικόνα 1.9:** Σύγκριση της Real Time PCR σε ένα βήμα και σε δύο βήματα.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η σημαντικότητα του μεταγραφικού παράγοντα Msn4 στην ρύθμιση της ανάπτυξης και λειτουργίας του ζυμομύκητα είναι δεδομένη. Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης ο ζυμομύκητας βρίσκεται σε ένα περιβάλλον το οποίο εμφανίζει διάφορους παράγοντες stress στους οποίους πρέπει να ανταποκριθεί και να υπερκεράσει προκειμένου να επιτελέσει την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της ζύμωσης σημαντικές έρευνες έχουν γίνει τόσο σε επίπεδο βελτίωσης και ελέγχου των συνθηκών της ζύμωσης, όσο και στο επίπεδο της γενετικής τροποποίησης του ζυμομύκητα.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε προσπάθεια διερεύνησης της ικανότητας ανάπτυξης ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 τόσο σε συνθήκες ωσμωτικού στρες όσο και παρουσία αυξημένων επιπέδων αιθυλικής αλκοόλης. Επίσης, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες. Τα γονίδια τα οποία μελετώνται είναι τα ακόλουθα: ELO 1, ALG 9, ALD 4, GND 2, TDX 1.

### 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Υλικά

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

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

	<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Εταιρία</b>	<b>Κωδικός</b>
1.	W303-1a Yeast Strain		
2.	Αγαρόζη	Nippon genetics	AG02
3.	Αιθανόλη 100%	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
4.	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	Lab M	MC001
5.	Bacto Peptone		
6.	Γλυκόζη (Glucose)	Sigma-Aldrich	G7021
7.	Agar Agar	Serva	11392
8.	Tris Base		
9.	Glacial Acetic Acid		
10.	Αιθυλεν-δι-αμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA)		
11.	Γλυκερόλη	Fisher Scientific	BP229
12.	Χρωστική orange G		
13.	Gel red	Biotium	41003
14.	Tris- Hcl		
15.	Μετά νατρίου άλας του Θεϊικού Δωδεκακυκλίου (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
16.	Όξινη Φαινόλη		
17.	Χλωροφόρμιο		

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

**Πίνακας 3.2: Γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην Real Time PCR με τις αλληλουχίες τους.**

	<b>Κατεύθυνση</b>	<b>Αλληλουχία 5`-3`</b>	<b>Γονίδιο</b>
1.	Msn4_Elo1_Forward	Gtatcgccatgggctgtatt	<i>ELO1/YJL196C</i>
2.	Msn4_Elo1_Reverse	Gacagtgtctgcgaactcca	
3.	Msn4_ALG9_Forward	Agtggctttggtgaacaattac	<i>ALG9</i>
4.	Msn4_ALG9_Reverse	Cagcaggaaagaactggg	
5.	Msn4_TDH1_Forward	Ctcacgcttccatcttcgat	<i>TDH1/YJL052W</i>
6.	Msn4_TDH1_Reverse	Aagccttggaacatattcg	
7.	Msn4_ALD4_Forward	Aggccattacaaccatcca	<i>ALD4/YOR374W</i>
8.	Msn4_ALD4_Reverse	Gattaccacccagctccaa	

9.	Msn4_HXK1_Forward	Tgctgtcgacgaacaatctc	HXK1/YFR053C
10.	Msn4_HXK1_Reverse	Caacatcaagcccttctcgt	
11.	Msn4_GND2_Forward	Ggtaagccattggtggaaaa	GND2/YGR256 W
12.	Msn4_GND2_Reverse	Ctgacaaacaacgagcgaaa	

### 3.2. Πειραματικές Πορίες

#### 3.2.1. για τις καμπύλες ανάπτυξης

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

Η ικανότητα ανάπτυξης του στελέχους W303-1a\_MSN4\_532, συγκρίνεται με αυτή του αγρίου τύπου στελέχους W303-1a. Η ανάπτυξη των στελεχών μετρείται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η ανάπτυξη των στελεχών για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης έγινε σε πλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων και μέτρηση της ανάπτυξης σε ειδικό μηχάνημα ανάγνωσης των συγκεκριμένων πλακών (ELISA Reader), λαμβάνοντας τιμές οπτικής απορρόφησης κάθε 30λέπτα για χρονικό διάστημα περίπου 20 ωρών. Η ανάπτυξη των στελεχών για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης έγινε σε κωνικές φιάλες των 250ml έχοντας τοποθετήσει 50ml από το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο σε τακτά χρονικά διαστήματα.

#### 3.2.2. Λήψη δειγμάτων για απομόνωση RNA

Ελήφθησαν δείγματα για την απομόνωση RNA από καλλιέργειες των υπό εξέταση στελεχών (W303-1a, W303-1a\_MSN4\_532) που υπεβλήθησαν σε ανάπτυξη εντός θρεπτικού μέσου με συγκεντρώσεις γλυκόζης 2%w/v

(φυσιολογικό θρεπτικό μέσο YEP) και 15%w/v για χρονικό διάστημα 0 ωρών και 16 ωρών. Αντίστοιχα δείγματα ελήφθησαν και από καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 9%v/v αιθανόλη. Στις καλλιέργειες παρουσία 9% αιθανόλης, προκειμένου να ληφθεί ικανοποιητική ποσότητα κυττάρων για την περαιτέρω απομόνωση του RNA, τα θρεπτικά μέσα εμβολιάστηκαν με κύτταρα που προέρχονταν από 2ml καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο για τους απαιτούμενους χρόνους ώρες.

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

1. Από την καλλιέργεια μεταφέρεται 1.5ml σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 10000 rpm για 3min στους 4 °C
2. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
3. Αναδιαλύεται το ίζημα των κυττάρων σε 400 μl διαλύματος. TES Η σύνθεση του TES εμφανίζεται παρακάτω :
  - 10mM Tris-HCl pH: 7.5
  - 10 mM EDTA
  - 0.5% w/v
  - RNase-free H<sub>2</sub>O.
4. Εν συνεχεία προστίθεται 400μl όξινη φαινόλη, και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10sec και επωάζουμε για 60min σε θερμοκρασία 65 °C με περιστασιακή έντονη ανάδευση.
5. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min και φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 5min στους 4 °C
6. Η υδατική φάση (επάνω) μεταφέρεται σε νέο erpendorf.
7. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl όξινη φαινόλη και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10 sec και επώαση στον πάγο για 5min.
8. Ακολούθως γίνεται φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C.
9. Λαμβάνεται η υδατική φάση και σε νέο erpendorf
10. Έπειτα προστίθενται 200μl χλωροφορμίου (CHCl<sub>3</sub>).

11. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10sec και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4 °C και μεταφορά της υδατικής φάσης (Πάνω φάση) σε νέο Eppendorf. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά 2φορές.
12. Ακολουθεί προσθήκη, στη τελευταία υδατική φάση που συλλέχθηκε, 3M οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) με pH 5.2 και όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης και 2.5 φορές του όγκου 100% αιθανόλη (EtOH) και επωάζεται για τουλάχιστον 1h στο πάγο ή για 15min σε θερμοκρασία -20 °C.
13. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500μl 80%v/v Αιθανόλης.
14. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C και απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.  
Το ίζημα αφήνεται για 5 min να στεγνώσει.
15. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl H<sub>2</sub>O RNase-free και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -70 °C.



### 3.2.4. Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

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

Απομονωμένο rna	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O RNase free	7 $\mu$ l
Χρωστική ORANGE G.	1 $\mu$ l
ΣΥΝΟΛΟ	10 $\mu$ l

Παρακάτω φαίνονται τα συστατικά της χρωστικής Orange G.

### 3.2.5. Χρωστική ORANGE G

- 30% glycerol
- 0.2% orange g

### 3.2.6. Παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v

Διάλυση 0,5 g αγαρόζης σε 50 ml 1xTAE με βρασμό. Προσθήκη 2,5  $\mu$ l 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.

### 3.2.7. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση αποτελεσμάτων

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

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

### 3.2.8. Κατεργασία δειγμάτων με DNase-I

#### 3.2.8.1 Αντιδραστήρια για κατεργασία δειγμάτων με DNase-I

10X διάλυμα αντίδρασης:

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

#### Μείγμα για αντίδραση με DNase-I

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

Επώαση της αντίδρασης για 1h σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C.

### 3.2.8.2. Διαδικασία απομάκρυνσης της DNAσε-I και καθαρισμός του δείγματος.

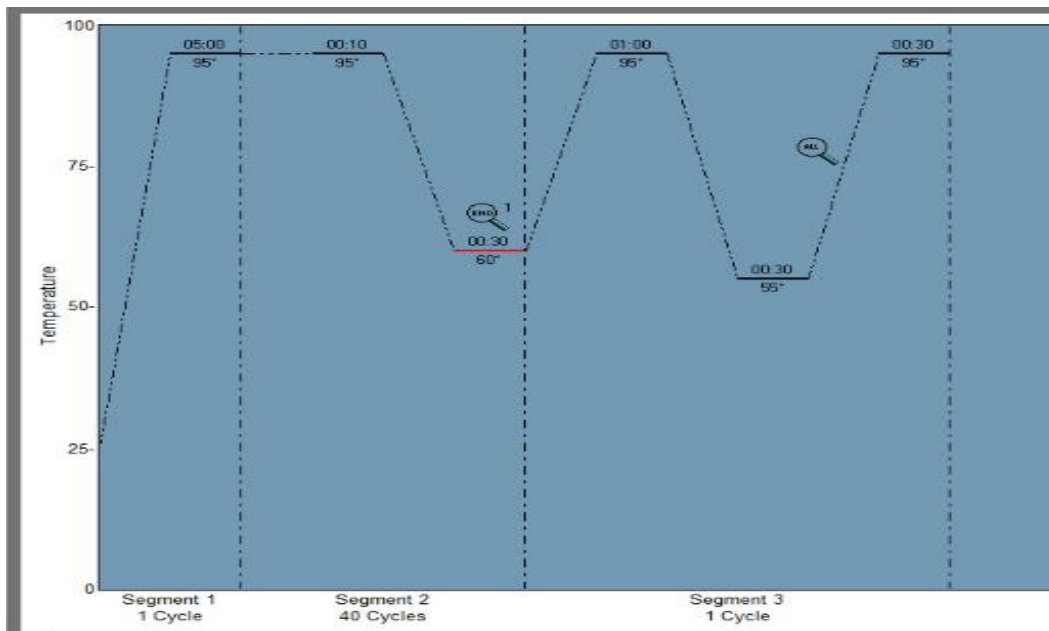
1. Προσθήκη 200μl H<sub>2</sub>O RNase-Free και 200μl όξινης φαινόλης και έντονη ανάδευση (vortex) για 2min.
2. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min και φυγοκέντριση στις 6000 rpm. για 5min σε θερμοκρασία 4°C
3. Μεταφορά της υδατικής φάσης (επάνω) και προσθήκη 200μl χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10sec και φυγοκέντριση στις 6000 rpm για 5min στους 4°C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές.
4. Ακολουθεί προσθήκη, στη τελευταία υδατική φάση που συλλέχθηκε, 3M οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) με pH 5.2 και όγκου ίσου με το 10% του όγκου της υδατικής φάσης και 2.5 φορές του όγκου 100% αιθανόλη (EtOH) και επωάζεται για τουλάχιστον 1h στο πάγο ή για 15min σε θερμοκρασία -20 °C.
5. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 500μl 80%v/v Αιθανόλης.
6. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντριση για 15min στις 10000 rpm σε θερμοκρασία 4°C και απομακρύνεται πλήρως το υπερκείμενο.
7. Το ίζημα αφήνεται για 5 min να στεγνώσει.
8. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl H<sub>2</sub>O RNase-free και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -70 °C.

### 3..2..9. Real Time PCR

Οι μελέτη της έκφρασης γονιδίων της ζύμης έγινε με τη χρήση του KAPA SYBR FAST one-step qRT-PCR Kit Universal. Σε κάθε αντίδραση προστίθενται τα παρακάτω ακολουθώντας τις οδηγίες της Εταιρείας κατασκευής του kit.

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	10 $\mu$ l
Μείγμα εκκινητών	0,4 $\mu$ l
ROX Low	0,4 $\mu$ l
Dutp	0,4 $\mu$ l
KAPA RT mix	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (DNase / RNase-Free)	4,4 $\mu$ l
RNA (κατεργασμένο με DNase)	4 $\mu$ l
ΣΥΝΟΛΟ	20 $\mu$ l

Κάθε ένα δείγμα αναλύεται τουλάχιστον δυο φορές (δύο αντιδράσεις) ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία. Ως μείγμα εκκινητών ορίζεται το μείγμα που έχει προκύψει από την ανάμειξη του Forward και του Reverse εκκινητή για κάθε υπό μελέτη γονίδιο. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε φαίνεται στην παρακάτω εικόνα(Εικ.3.1).



Εικόνα 3.1: Πρόγραμμα της Real Time PCR που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα

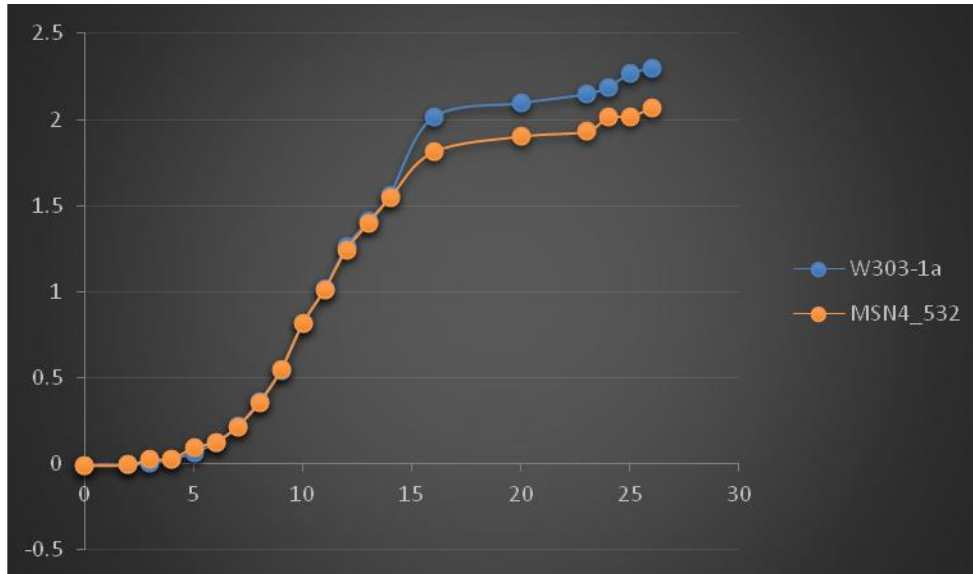
## **4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1 Δοκιμασία ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους**

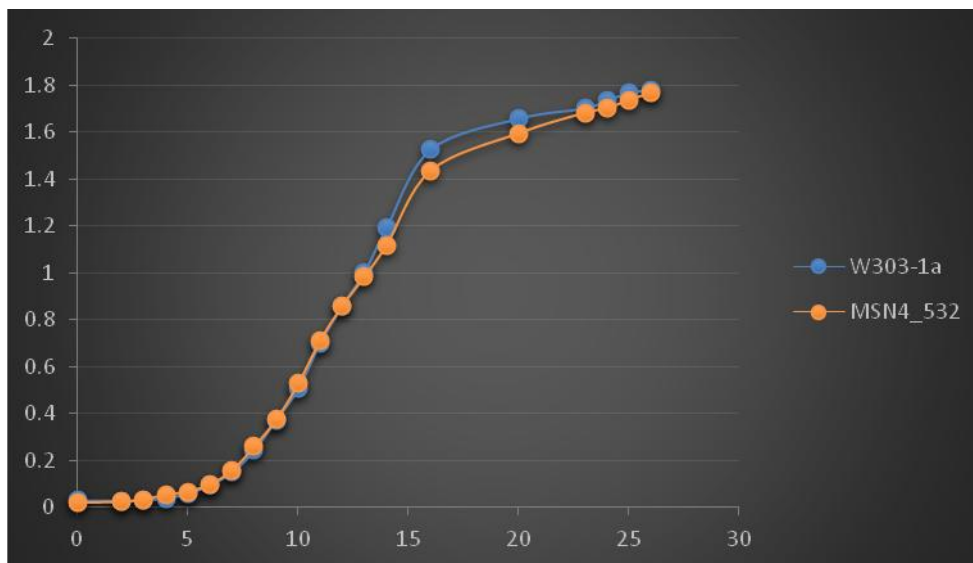
Προκειμένου να γίνει μια πρωταρχική μελέτη του στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a\_MSN4\_532), μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης τους σε διάφορες συνθήκες συγκρίνοντας τη με αυτή των αγρίου τύπου κυττάρων.

#### **4.1.1 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. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser532Ala επί της πρωτεΐνης msn4 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει σημαντικά την ικανότητα ανάπτυξής του σε συγκεντρώσεις γλυκόζης 2% (Σχ.4.1) και 15%(Σχ.4.2).



**Σχήμα 4.1:** Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN4\_532) και κυττάρων αγρίου τύπου (w303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 2%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

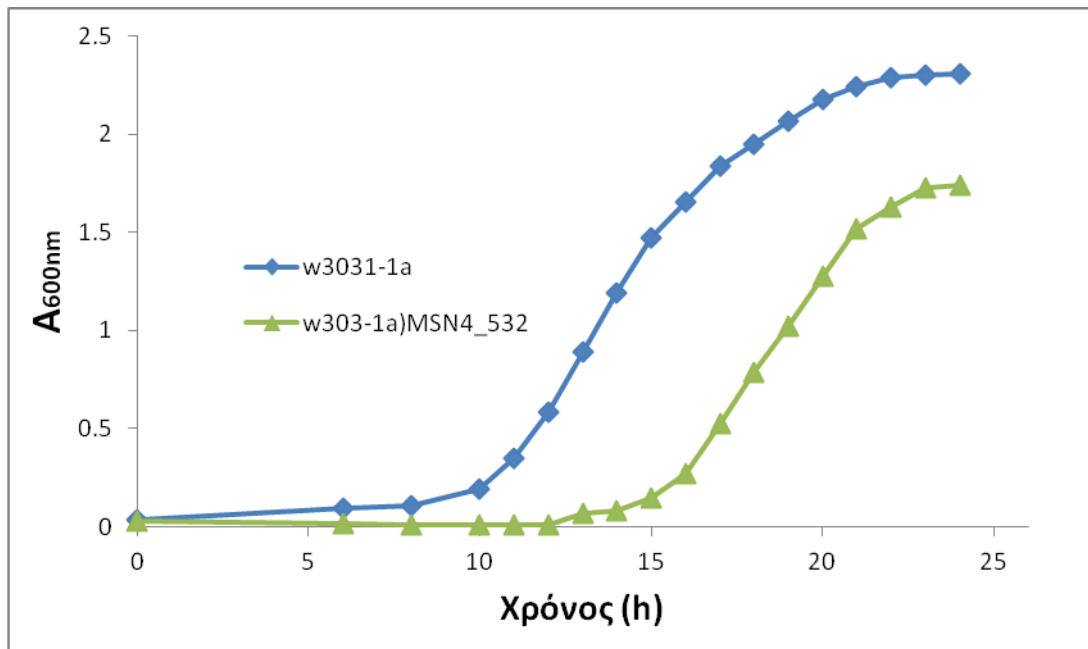


**Σχήμα 4.2:** Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN4\_532) και κυττάρων αγρίου τύπου (w303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη σε συγκέντρωση 15%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

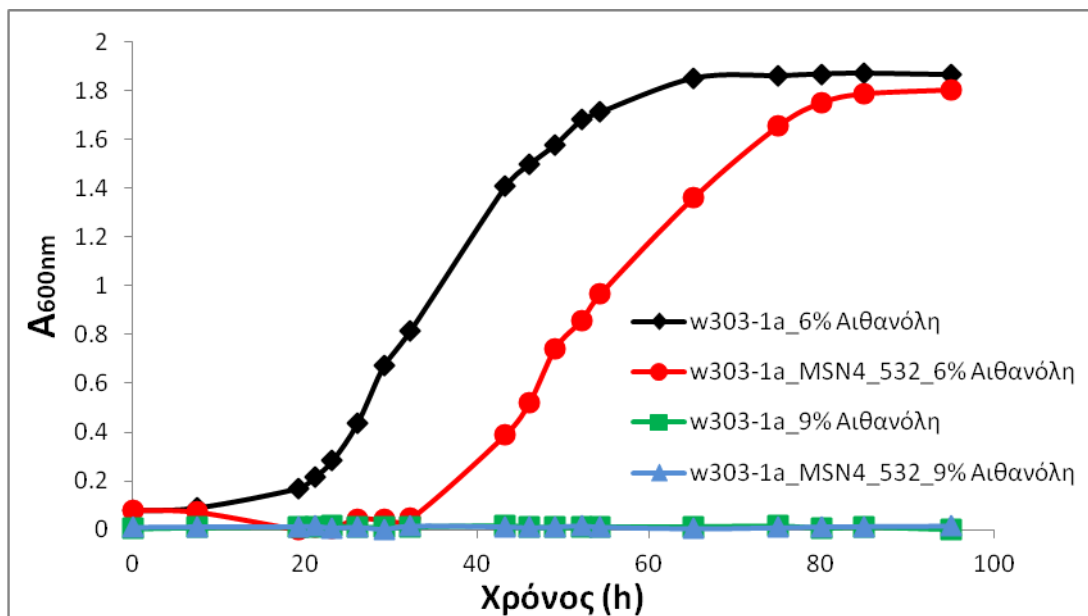
#### 4.1.2 Επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων

Η παρουσία της αιθανόλης στο θρεπτικό υλικό προσομοιάζει το περιβάλλον στο οποίο ο ζυμομύκητας λειτουργεί εφόσον έχει ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser532Ala επί της πρωτεΐνης MSN4 του ζυμομύκητα, σε περιεκτικότητα αιθανόλης 3%v/v εμφανίζει λανθάνουσα φάση μεγαλύτερης διάρκειας σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος (Σχ.4.3). Στην εκθετική φάση δεν φαίνεται να υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά, ενώ στην στατική φάση φαίνεται ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος αναπτύσσεται σε μικρότερο βαθμό από ότι το αγρίου τύπου στέλεχος (Σχ.4.3). Παρόμοια εικόνα εμφανίζεται και στην ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 6%v/v αιθανόλη. Σε αυτή τη συγκέντρωση αιθανόλης η μετάλλαξη Ser532Ala φαίνεται να επηρεάζει ελάχιστα και την εκθετική φάση ανάπτυξης εμφανίζοντας μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης (κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της σιγμοειδούς καμπύλης μικρότερη σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος) (Σχ.4.4). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης (9%v/v) δεν εμφανίζει ικανότητα ανάπτυξης ούτε το μεταλλαγμένο ούτε το αγρίου τύπου στέλεχος (Σχ.4.4). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν ευνοεί την ανάπτυξη του ζυμομύκητα και εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία σε αυτή τουλάχιστον σε επίπεδο ανάπτυξης. 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 4.3: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN4\_532) και κυττάρων αγριού τύπου (w303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αιθανόλη σε συγκέντρωση 3%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.



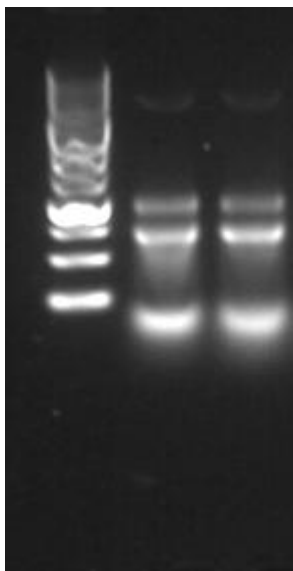
Σχήμα 4.4: Καμπύλες ανάπτυξης μεταλλαγμένων κυττάρων (MSN4\_532) και κυττάρων αγριού τύπου (w303-1a) σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αιθανόλη σε συγκέντρωση 6% και 9%. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος σε h.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η ικανότητα ανάπτυξης σε ορισμένες συνθήκες, δηλαδή πολλαπλασιασμού των κυττάρων, δεν αντανακλά και την ικανότητα επιβίωσης στις συνθήκες αυτές.

## 4.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA από δείγματα που συλλέχθηκαν τόσο του αγρίου τύπου όσο και του μεταλλαγμένου στελέχους έγινε με την μέθοδο της απομόνωσης RNA με όξινη φαινόλη. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποβληθεί σε επώαση σε θρεπτικό υλικό του οποίου η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 2%w/v και 15%w/v και της αιθινόλης 9%v/v. Η λήψη των δειγμάτων έγινε σε χρόνους  $t=15\text{min}$  και  $t=16\text{h}$ .

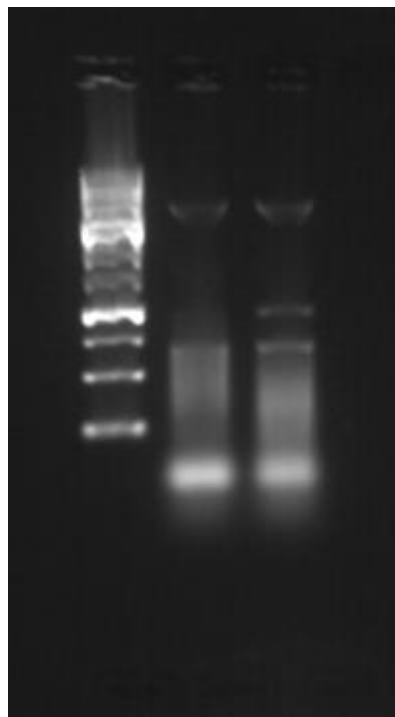
Μετά την απομόνωση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης για να εξεταστεί η ποιότητα του RNA που ελήφθη. Αναμένεται να εμφανιστούν δυο έντονα ίχνη που αντιστοιχούν στα μόρια του ριβοσωμικού RNA (rRNA) 18S και 26S. Παρακάτω εμφανίζεται ενδεικτική εικόνα της ηλεκτροφόρησης του απομονωθέντος ολικού RNA. (Εικ.4.5).



Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA. Θέση 1 μάρτυρας. Θέσεις 2,3 δείγματα απομόνωσης RNA.

### 4.3 Κατεργασία δειγμάτων RNA με DNase-I.

Τα δείγματα RNA που ελήφθησαν τις περισσότερες φορές περιέχουν και ίχνη DNA. Για την λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων κατά την Real-Time (RT) PCR που θα ακολουθήσει απαιτείται η πλήρης απουσία του DNA από τα δείγματα RNA. Για το λόγο αυτό ακολούθησε η κατεργασία των δειγμάτων RNA με DNase-I όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.7.1. Εφόσον τα δείγματα καθαρίστηκαν εκ νέου για την απομάκρυνση της DNase-I ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για να βεβαιωθούμε για την ποιότητα του απομονωθέντος RNA (Εικ 4.6).



Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση W303-1a. Θέση 1 μάρτυρας. Θέση 2 και 3 επιτυχημένα δείγματα από την κατεργασία με DNase-I.

## **4.4 Μελέτη της έκφρασης γονιδίων με Real-Time (RT) PCR**

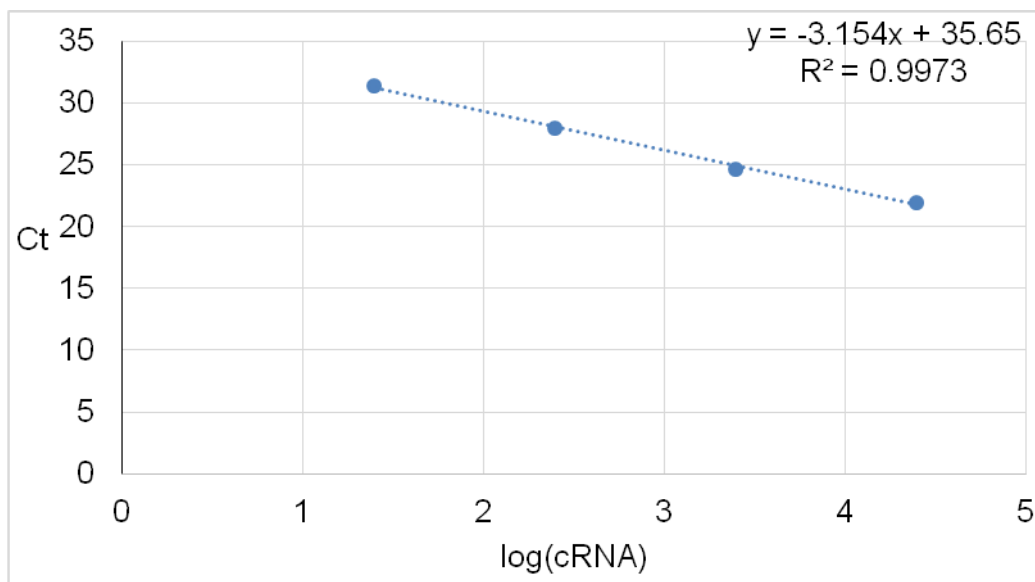
Προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση γονιδίων στο μεταλλαγμένο στέλεχος, που έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες, τα δείγματα που ελήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή Real-Time (RT) PCR. Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα: ELO1, HXK1, ALD4, GND2, TDH1. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ALG9.

### **4.4.1 Υπολογισμοί ποσοτικοποίησης της Real Time PCR**

Για τους υπολογισμούς των αποτελεσμάτων της Real Time PCR χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο ALG9 ως γονίδιο αναφοράς για να διορθώσει διαφορές που οφείλονται σε διακυμάνσεις στις αρχικές ποσότητες των δειγμάτων, στα ποσοστά ανάκτησης των νουκλεϊκών οξέων, στη φόρτωση των δειγμάτων ή σφάλματα πιπεταρίσματος.

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

Για να γίνει εφικτή η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR απαιτείται πρώτα η δημιουργία πρότυπων καμπυλών τόσο για το γονίδιο αναφοράς (ALG9) και για όλα τα υπό μελέτη γονίδια. Η μορφή των πρότυπων καμπυλών εμφανίζεται ενδεικτικά στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 4.7).



**Σχήμα 4.7:** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γονιδίου. Στο κατακόρυφο άξονα καταγράφονται οι τιμές του Ct (threshold cycle) και στον οριζόντιο άξονα βρίσκονται οι τιμές των συγκεντρώσεων του γονιδίου σε λογαριθμική μορφή. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο γραμμικός συσχετισμός των δυο τιμών με την βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων.

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

#### 4.4.2 Τα υπό μελέτη γονίδια

- ALG9

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

- ELO1

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

ως αποτέλεσμα την αύξηση των μακρίας αλύσου λιπαρών οξέων που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης παρουσία της αιθανόλης.

- ALD4

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

- HXK1

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

- TDH1

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

- GND2

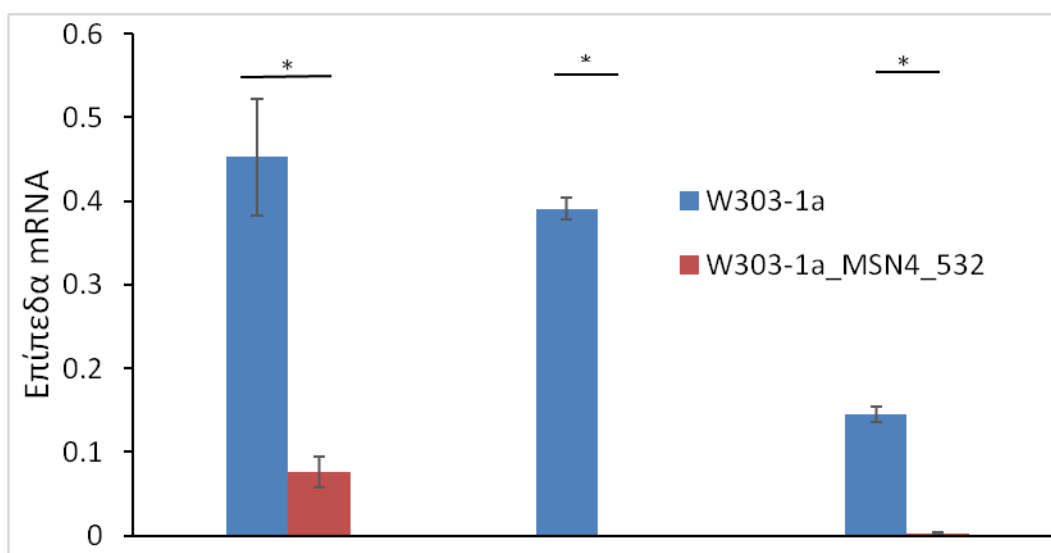
Στον *Saccharomyces cerevisiae* ,το GND1 κωδικοποιεί την κύρια ισομορφή της φωσφογλυκονικής αφυδρογονάσης, που αντιπροσωπεύει περίπου το 80 % της δραστηριότητας, και το GND2 κωδικοποιεί τη λιγότερη ισόμορφη. Η φωσφογλυκονική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο κλειδί της πορείας των φωσφορικών πεντοζών που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των οξειδωτικών παραγόντων εντός του κυτάρου. Καταλύει την δεύτερη οξειδωτική μείωση του NADP<sup>+</sup> σε NADPH. Ο συγκεκριμένος

μηχανισμός αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς προστασίας από το οξειδωτικό στρες.

#### 4.4.3 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων για χρόνο t=15min

##### 4.4.3.1 ELO1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης), YEP με 15%w/v γλυκόζη αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.8). Η παρατηρούμενη μείωση πιθανόν να αντανακλά την μειωμένη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακριάς αλύσου που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μικρότερη ικανότητα ανάπτυξης ή επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης.

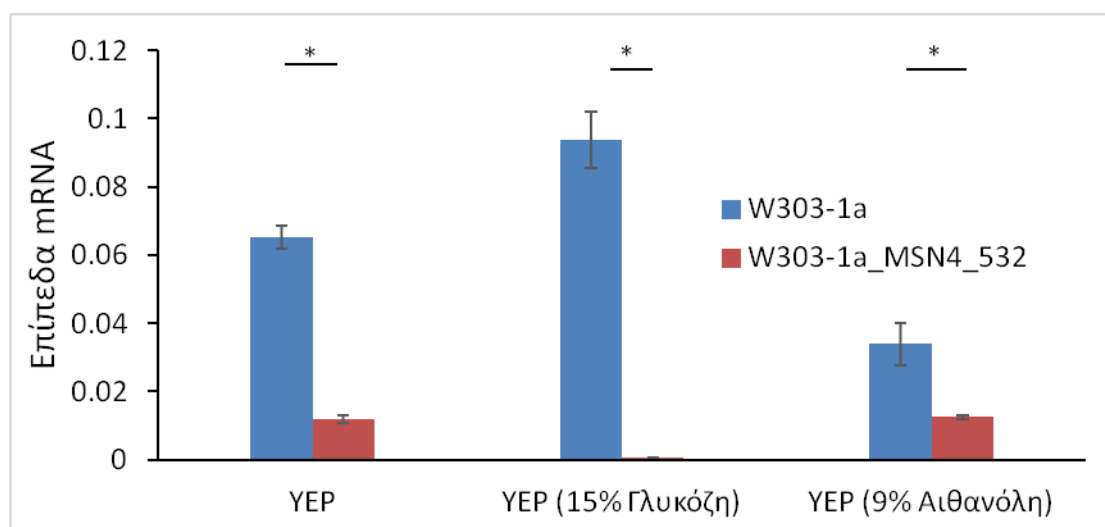


Σχήμα 4.8: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=15min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα

υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3.2 ALD4

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη, YEP με 15%w/v γλυκόζη αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του ALD4 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.9). Όπως γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία, αυτό το γονίδιο εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και αποτελεί μηχανισμό προστασίας του κυττάρου από την τοξική ακεταλδεΐδη που παράγεται από το πυροσταφυλικό μετατρέποντάς τη σε οξικό οξύ. Η μείωση των επιπέδων μπορεί να υποδηλώνει είτε μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης είτε μεγαλύτερη ευαισθησία.

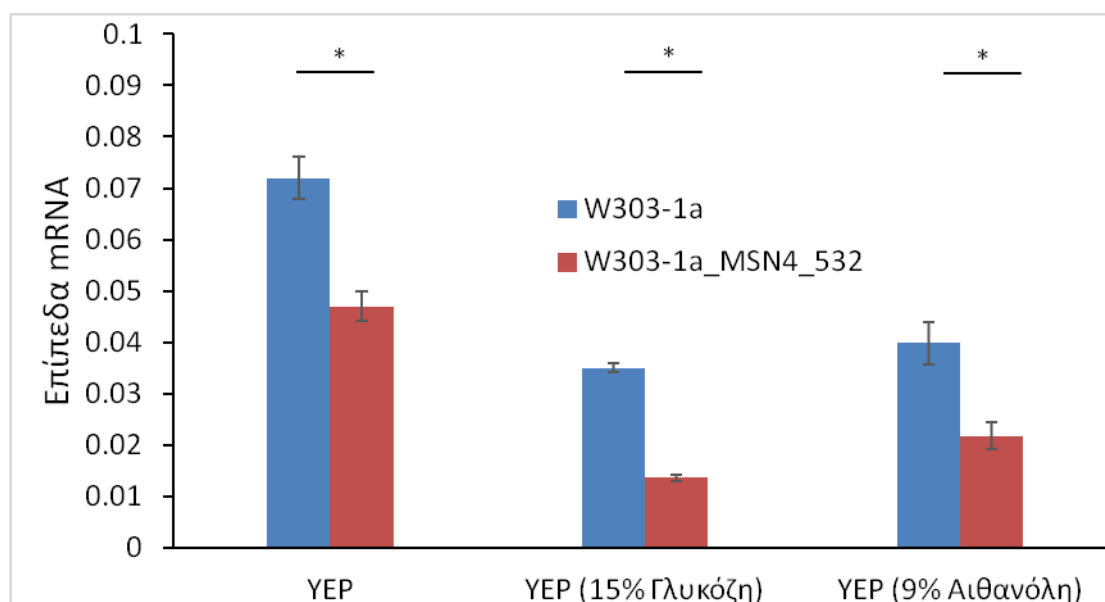


Σχήμα 4.9: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).



#### 4.4.3.3 GND2

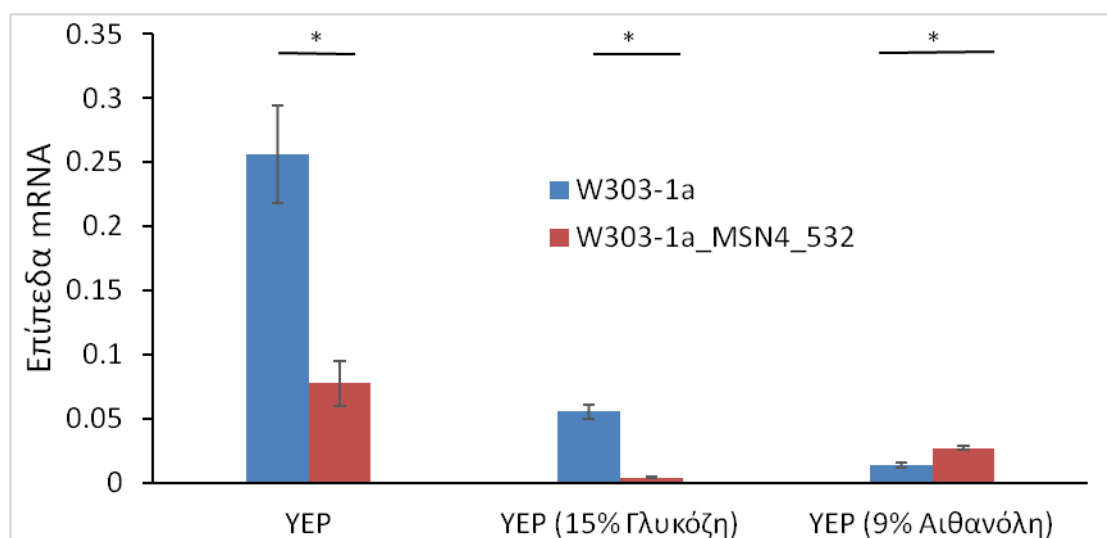
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GND2 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min σε οποιοδήποτε από τα θρεπτικά υλικά που ελέγχθηκαν. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του GND2 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.10). Το γονίδιο GND2 είναι μαζί με το γονίδιο GND1 μέρος ενός από τους κύριους μηχανισμούς προστασίας από το οξειδωτικό στρες.



**Σχήμα 4.10:** Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου GND2 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=15min. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

#### 4.4.3.4 TDH1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min και στα τρία υπό εξέταση θρεπτικά υλικά. Ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 φαίνεται ότι είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα στο μεταλλαγμένο στέλεχος με έκθεση για χρόνο  $t=15\text{min}$  σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αυτή η μείωση (YEP 2%w/v ΚΑΙ 15%w/v) και η αύξηση (YEP 9%w/v), των επιπέδων της έκφρασης του TDH1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντικές και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.11).

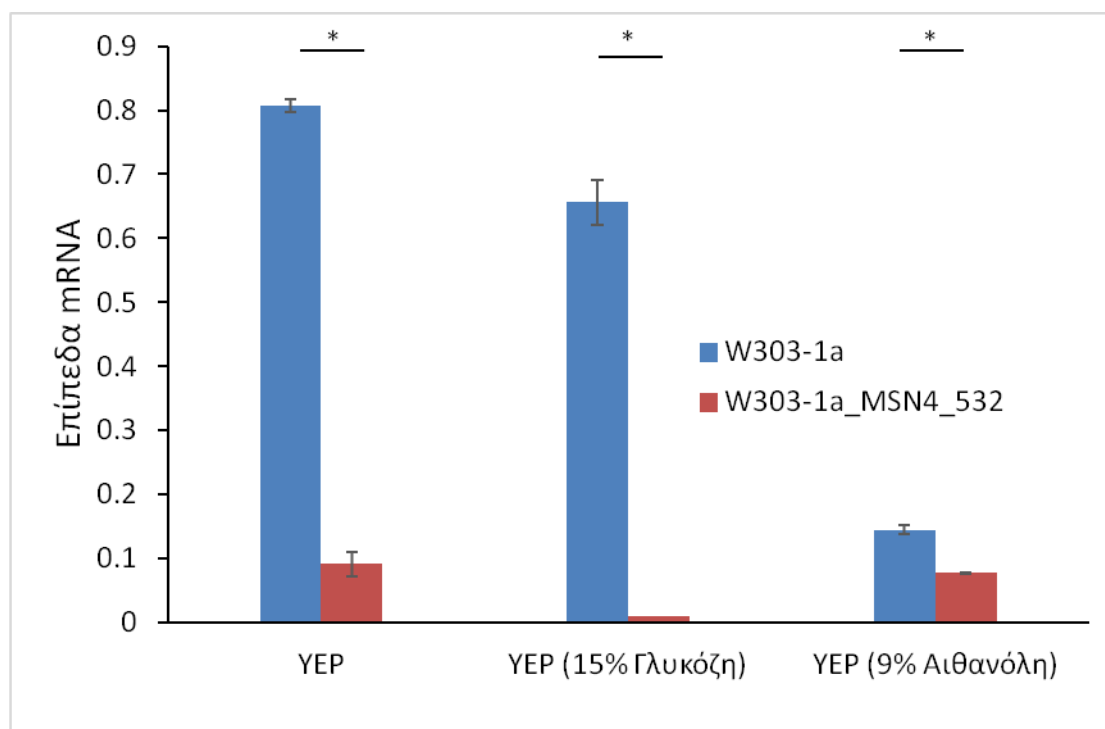


**Σχήμα 4.11:** Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3.5 ΗΧΚ1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ΗΧΚ1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στελέχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 15min και στα τρία θρεπτικά μέσα που ελέγχθηκαν. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του ΗΧΚ1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.12).

Είναι γνωστό ότι η εξοκινάση-I είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στην πορεία της γλυκόλυσης και καταλύει την φωσφορυλίωση της γλυκόζης κατά τον μεταβολισμό της. Η έκφρασή της είναι μεγαλύτερη όταν αναπτύσσεται σε υποστρώματα με άνθρακα και απουσία γλυκόζης.

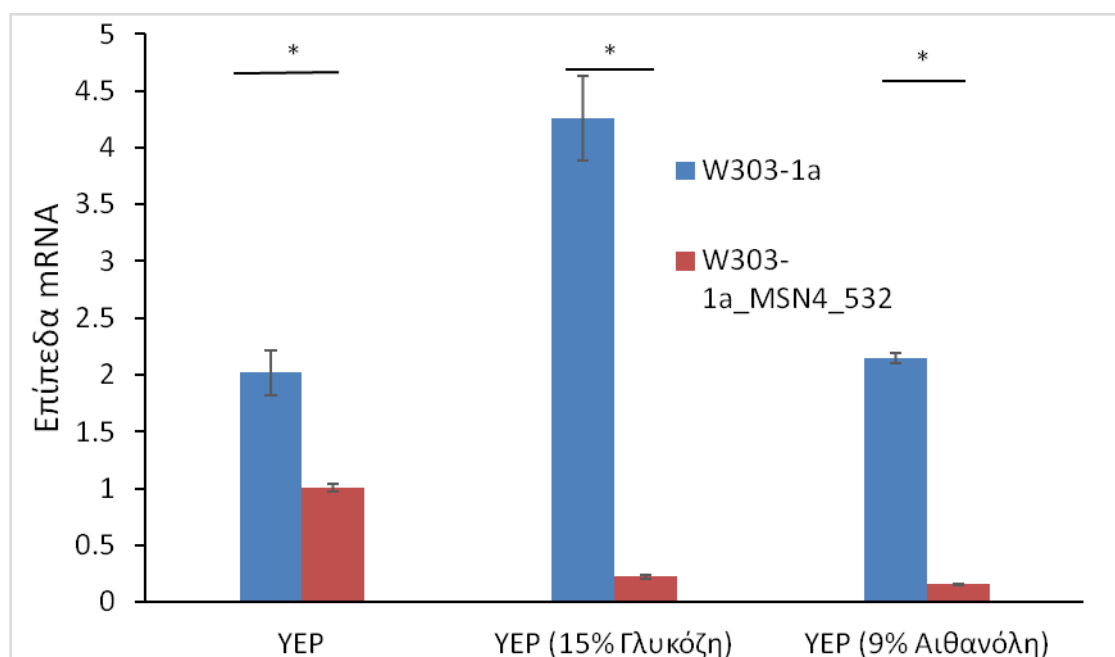


Σχήμα 4.12: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ΗΧΚ1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης  $t=15\text{min}$ . Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p<0.05$ ).

#### 4.5.4 Αποτελέσματα γονιδίων της Real Time PCR για t=16h

##### 4.5.4.1 ELO1

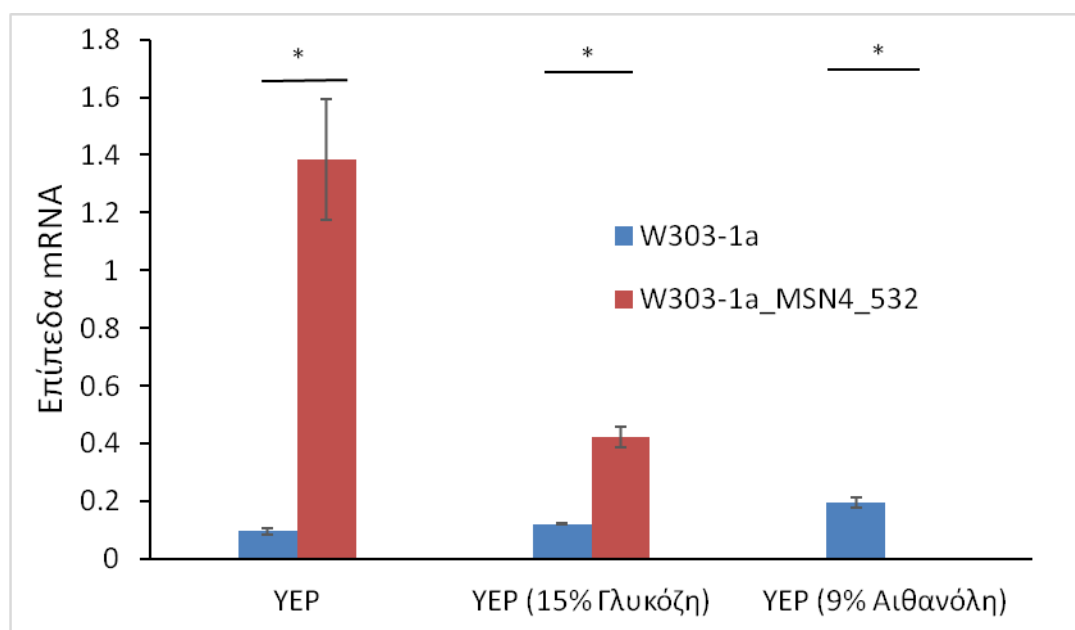
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ELO1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης), YEP με 15%w/v γλυκόζη αλλά και σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του ELO1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.13). Η παρατηρούμενη μείωση πιθανόν να αντανακλά την μειωμένη παραγωγή των λιπαρών οξέων μακριάς αλύσου που πιθανολογείται ότι βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που πιθανόν να προσδίδει στο μεταλλαγμένο στέλεχος μικρότερη ικανότητα επιβίωσης σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης.



Σχήμα 4.13: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ELO1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05)

#### 4.5.4.2 ALD4

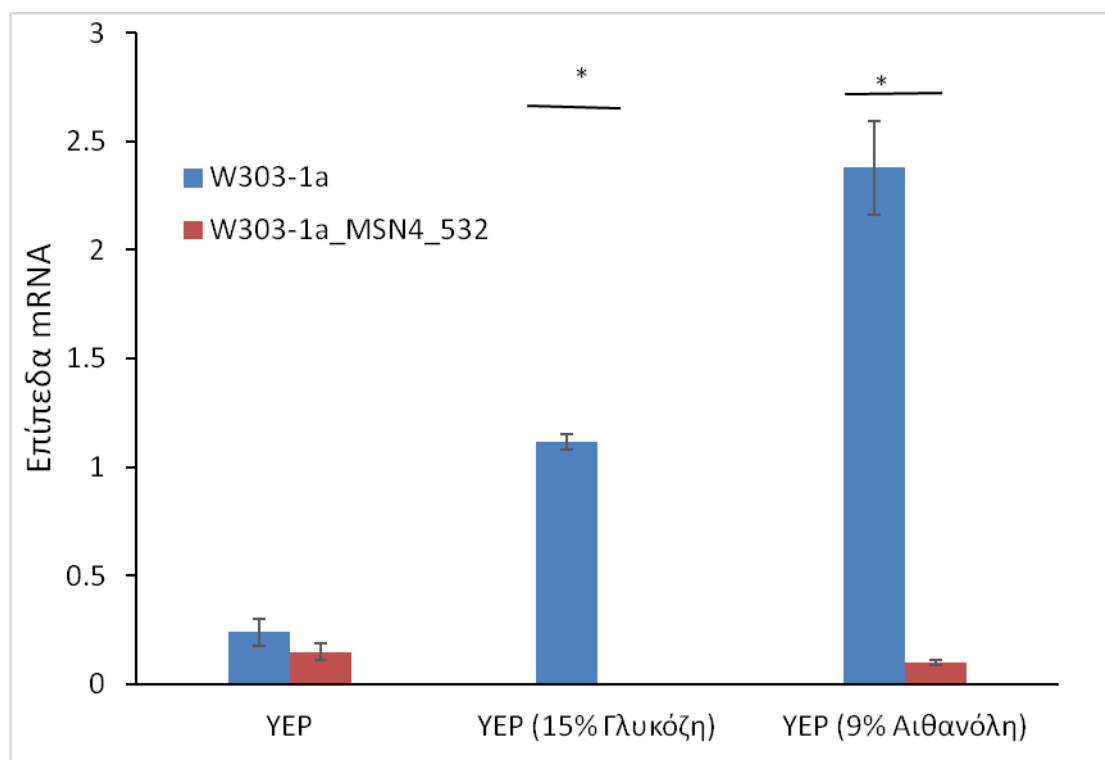
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης) και YEP με 15%w/v γλυκόζη. Σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις γλυκόζης, σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης για χρόνο 16h, το μεταλλαγμένο στέλεχος φαίνεται να έχει σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ALD4. Αυτή η αύξηση (YEP 2%w/v και 15%w/v γλυκόζη) και η μείωση (YEP 9%w/v αιθανόλη) των επιπέδων της έκφρασης του ALD4 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντικές και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.14). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αυτό το γονίδιο εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και αποτελεί μηχανισμό προστασίας του κυττάρου από την τοξική ακεταλδεΐδη που παράγεται από το πυροσταφυλικό.



**Σχήμα 4.14:** Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ALD4 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

#### 4.5.4.3 GND2

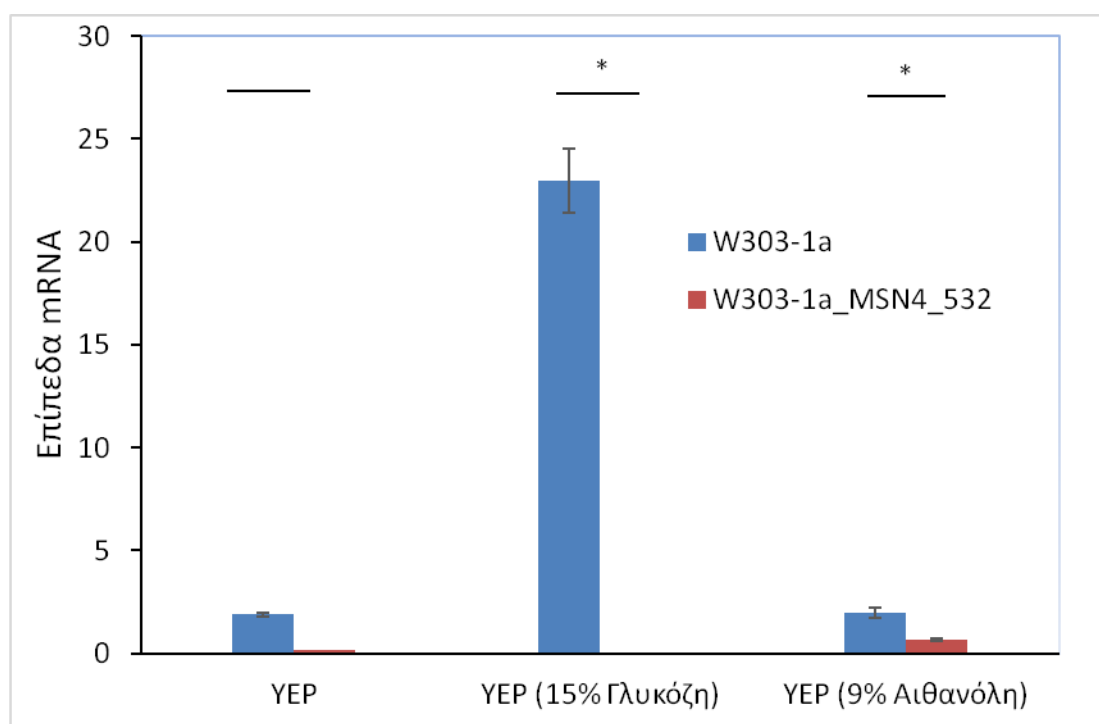
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GND2 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h και στα τρία υπό εξέταση θρεπτικά υλικά. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του GND2 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική στις δύο περιπτώσεις, αλλά σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη (βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης) για χρόνο t=16h δεν είναι στατιστικά σημαντική (Σχ.4.15). Αυτό το μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα δείχνει ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GND2 για το αγρίου τύπου και το μεταλλαγμένο στέλεχος, δεν έχουν διαφορά στα επίπεδα έκφρασης τους. Το γονίδιο GND2 είναι μέρος ενός από τους κύριους μηχανισμούς προστασίας από το οξειδωτικό στρες. Πιθανόν λοιπόν το μεταλλαγμένο στέλεχος να είναι περισσότερο ευαίσθητο.



Σχήμα 4.15: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου GND2 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

#### 4.5.4.4 TDH1

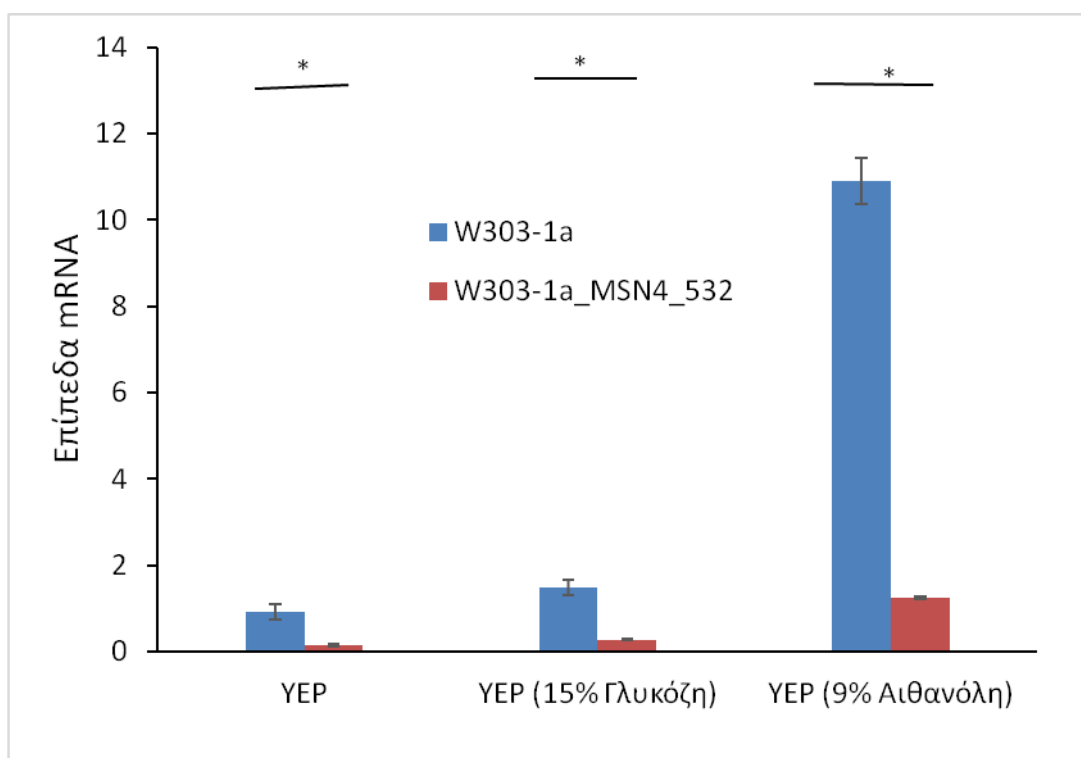
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TDH1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα στο στελέχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της Msn4, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h και στα τρία θρεπτικά υλικά. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του TDH1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.16).



**Σχήμα 4.16:** Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου TDH1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).

#### 4.5.4.5 ΗΧΚ1

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ΗΧΚ1 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα για το μεταλλαγμένο στελέχος, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h και στα τρία υπό εξέταση θρεπτικά υλικά. Αυτή η μείωση των επιπέδων της έκφρασης του ΗΧΚ1 γονιδίου είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιπτώσεις (Σχ.4.17). Όπως προαναφέρθηκε η έκφρασή της εξοκινάση-I είναι μεγαλύτερη όταν αναπτύσσεται σε υποστρώματα με άνθρακα και απουσία γλυκόζης.



Σχήμα 4.17: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του γονιδίου ΗΧΚ1 μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους (w303-1a\_MSN4\_532) και του αγρίου τύπου στελέχους (W303-1a) για χρόνο έκθεσης t=16h. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται τα υπολογιζόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Αυτά που είναι σημειωμένα με \* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05).



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη. 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. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας εξαιρετικός παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ άλλων ζυμωτικών μικροοργανισμών και έχει την ικανότητα να επιβιώνει τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες.

Για αυτό το λόγο παρουσιάστηκε η ανάγκη της δημιουργίας και της μελέτης ενός μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης που πιθανόν να έχει μεγαλύτερη αντοχή σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης και συνθήκες ωσμωτικού στρες. Η επιλογή αυτών των δυο συνθηκών έγινε επειδή τις συναντούμε συχνά σε καταστάσεις αλκοολικής ζύμωσης του ζυμομύκητα.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια διερεύνησης της ικανότητας ανάπτυξης ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος φέρει τη μετάλλαξη Ser532Ala επί της πρωτεΐνης Msn4 τόσο σε συνθήκες ωσμωτικού στρες όσο και παρουσία αυξημένων επιπέδων αιθυλικής αλκοόλης. Επίσης, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της έκφρασης γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση τους μεταβάλλεται παρουσία της αιθανόλης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες ενδοκυττάρειες διεργασίες. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μελετάται είναι τα ακόλουθα: ELO1, HXK1, ALD4, GND2, TDX1.

Κύτταρα από τα στελέχη w303-1a και w303-1a\_MSN4\_532 που εκτέθηκαν στις συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA. Εν συνεχεία στα απομονωθέντα RNA εξετάστηκαν τα επίπεδα της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων με την μέθοδο της Real Time PCR.

Από την καταγραφή των καμπύλων ανάπτυξης συμπεραίνουμε ότι η ανάπτυξη των στελεχών σε θρεπτικό υλικό στο οποίο η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι 2%w/v αλλά και 15% δεν εμφανίζεται διαφορά στην ανάπτυξη. Όταν η περιεκτικότητα της αιθανόλης στο θρεπτικό υλικό είναι 3%v/v και 6%v/v το αγρίου τύπου στέλεχος W303-1a αναπτύσσεται αρκετά καλύτερα από το μεταλλαγμένο στέλεχος W303-1a\_MSN4\_532. Η παρουσία αιθανόλης σε περιεκτικότητα 9%v/v η ανάπτυξη και των δύο στελεχών καθίσταται αδύνατη. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι για τις διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης που έγινε η μελέτη, το μεταλλαγμένο στέλεχος W303-1a\_MSN4\_532 αναπτύσσεται λιγότερο έναντι του αγρίου τύπου W303-1a.

Από την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων προκύπτει ότι για τις συγκεντρώσεις YEP 2%w/v, 15%w/v γλυκόζη και YEP 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9%w/v αιθανόλη, για χρόνους επώασης  $t=15$  λεπτών και  $t=16$  ωρών, τα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων γονιδίων του μεταλλαγμένου στελέχους W303-1a\_MSN4\_532 φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με του αγρίου τύπου W303-1a. Οι μοναδικές εξαιρέσεις είναι για το γονίδιο TDH1 τα επίπεδα έκφρασης του οποίου φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο μεταλλαγμένο στέλεχος με έκθεση για χρόνο  $t=15$ min σε YEP με 2%w/v γλυκόζη παρουσία 9% αιθανόλης και για το γονίδιο ALD4 φαίνεται ότι είναι σημαντικά αυξημένα στο μεταλλαγμένο στέλεχος, όταν αυτό εκτεθεί για χρόνο 16h σε θρεπτικό υλικό YEP με 2%w/v γλυκόζη και YEP με 15%w/v γλυκόζη.

Περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας επιβίωσης αλλά και της ικανότητας ζύμωσης του στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη θα αποκαλύψουν τελικά την κρισιμότητα του αμινοξέος σερίνης στη θέση 532 της πρωτεΐνης Msn4.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ

### 6.1 Ξενόγλωσση

- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 180, pp. 1044–1052.
- Brewster, J.L., De Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., Gustin, M.C. (1993): An osmosensing signal transduction pathway in yeast. Science, 259:1760-1763.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol 34, 597-601.
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 24, pp. 469–486.
- Estruch F. and Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 13, pp. 3872–3881.
- Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. FEMS Microbiol., Rev. 32, pp. 673–704.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., StorzG., Botstein D., Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell,11, pp. 4241–4257.
- Glazer, A. N., Nikaido, H. (1995): Microbial Biotechnology. Fundamentals Of Applied Microbiology. W. H. Freeman and Company, New York, p. 662.
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. EMBO J, 21, pp. 135–144.

- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
- Hirayama, T., Maeda, T., Saito, H., Shinozaki, K. (1995): Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 249:127-138.
- Jackson, R. S. (1994): *Wine Science. Principles And Applications*. Academic Press, a division of Harcourt Brace and Company, New York, p. 474.
- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*, 13, pp. 771–781.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125
- Lin Y., Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, pp. 627–642.
- Liu Z.L., Saha B.C., Slininger P.J. (2008). Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. In: Wall J., Harwood C., Demain A. (eds) *Bioenergy*. ASM, Washington, DC, pp. 17–36.
- Marechal, P.A., Gervais, P. (1994): Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42:617-622.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and Estruch F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, 15, pp. 2227–2235.

- Meikle, A.J., Reed, R.H., Gadd, G. M. (1988): Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 134:3049-3060.
- Outlaw J., Collins K.J., Duffield J.A. (2005). *Agriculture as a producer and consumer of energy*. CABI, Oxfordshire.
- Sample and assay technologies - Real Time PCR brochure (05/2009): Critical factors for successful Real Time PCR, 64:9.
- Sanchez O.J., Cardona C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, 99, pp. 5270–5295.
- Santangelo G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol., Rev.* 70, pp. 253–282.
- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, pp. 5777–5782.
- Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., Ruis, H. (1994): The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO Journal*, 13:4382-4389.
- Science.gr : Real Time PCR (2012). Ημερομηνία ανάκτησης 10 Μαΐου 2016, από <http://www.science.gr/main/>.
- 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.
- Tamaki H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng*, 104, pp. 245–250.
- 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.

- Vertes A., Qureshi N., Yukawa H., Blaschek H. (2010). Biomass to biofuels. Wiley, West Sussex.
- Walker, G. M. (1998): Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, New York, pp. 350
- Walker, G. M. (1998): Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, New York, pp. 350.
- Wall J., Harwood C., Demain A. (2008). Bioenergy. ASM, Washington.
- You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. (2003): Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. Applied and environmental microbiology, 69(3):1499-1503.

## 6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- Βερβερίδης, Φ. (2003). “Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών”, Ηράκλειο Κρήτης
- Παπανικολάου Βασιλική (2006) Ερευνητική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΥΣΙΜΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ» Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Θετικών επιστημών
- Συμεωνίδου Ιωάννα Ελένη (2008) « Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς » Ανέκδοτη διπλωματική εργασία , Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής