

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

*<< Επίδραση της Μετάλλαξης Ser625Ala της
Πρωτεΐνης Msn2 του Σακχαρομύκητα Saccharomyces
cerevisiae στην Απόκριση σε Συνθήκες Stress >>*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΟΣΚΟΡΕΛΛΟΥ ΓΡΗΓΟΡΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής:

Σωτήρης Σπυρίδων Βαμβακάς

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1. Ενδοκυττάρια δραστηριότητα του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> υπό συνθήκες στρες.....	5
1.2. Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου <i>Msn2</i> με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR)) :	10
1.2.1 Γενικά για την PCR	10
1.2.2.Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση με PCR.....	12
1.2.2.1 Μεθοδολογία <<Mega-primer>>.	12
1.2.2.2. Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR	14
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	16
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
3.1. Υλικά	18
3.2. Πειραματικές Πορείες	24
3.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης.....	24
3.2.2 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού	24
3.2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E. Coli</i> με το kit Nucleospin plasmid	25
3.2.4 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών να μετασχηματιστούν	26
3.2.5 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων	27
3.2.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	27
3.2.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR με το kit Gel & PCR clean up.....	30
3.2.8 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με το kit Gel & PCR clean up	30
3.2.9 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης	31
3.2.10 Θρεπτικά υλικά.....	32
3.2.11 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων ζύμης	33
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης	34
4.1.1 Μέθοδος « Megaprimer»	34
4.1.2 Μέθοδος των τριών διαδοχικών PCR.....	40
4.2 Κλωνοποίηση του <i>MSN2-625</i>	45
4.3 Ενίσχυση του <i>MSN2-625</i>	48
4.4 Κατασκευή του <i>W303-1a-ΔMSN2::URA3</i>	50
4.4.1 Εισαγωγή του <i>URA3</i> σε κύτταρα ζύμης	50
4.4.2 Έλεγχος επιτυχούς αντικατάστασης του αγρίου τύπου <i>MSN2</i>	52
4.5 Κατασκευή του <i>W303-1a-MSN2_625</i>	55

4.5.1 Αντικατάσταση του URA3 από το MSN2_625.....	55
4.5.2 Έλεγχος επιτυχούς κατασκευής W303-1a-MSN2_625.....	56
4.6 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress.....	57
4.6.1 Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.....	57
4.6.2 Παρουσία αιθανόλης	58
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *S. Cerevisiae* είναι ένας από τους κύριους μικροοργανισμούς της κατηγορίας των ζυμών που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Η βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας και αφορά ή την τροποποίηση των συνθηκών ζύμωσης ή τη γενετική βελτίωση του μικροοργανισμού.

Όταν το κύτταρο βρεθεί σε κατάσταση stress η πρωτεΐνη Msn2 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες ώστε να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ελέγχει την έκφραση γονιδίων που βοηθούν το κύτταρο να αποκριθεί στο stress. Ταυτόχρονα όμως ο έλεγχος της εισόδου της Msn2 στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της Msn2 πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα του κυττάρου.

Μέσω ανάλυσης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Msn2 βρέθηκε ότι το αμινοξύ Ser στη θέση 625 αποτελεί μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από την PKA.

Στόχος της παρούσης μελέτης είναι αρχικά η εισαγωγή της μετάλλαξης Ser625Ala επί του γονιδίου MSN2 και η μετέπειτα μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress.

ABSTRACT

S. cerevisiae is one of the major organisms of the class of yeasts used extensively in the food and beverage industry. Improving the efficiency of fermentation is an important subject of research and concerns, via either changing the conditions of fermentation or genetic improvement of the microorganism.

When the cell exposed in a stress environment, the protein Msn2 activated through phosphorylation by various protein kinases in order to enter the cell's nucleus. Msn2, which is a transcription factor, controls the expression of genes that help the cell to respond to stress. Simultaneously, however, the translocation of Msn2 to the nucleus is controlled through phosphorylation by the complex of the protein kinase A (PKA). Specifically, Msn2 protein phosphorylation by PKA have the effect of preventing the entry of Msn2 in the cell's nucleus.

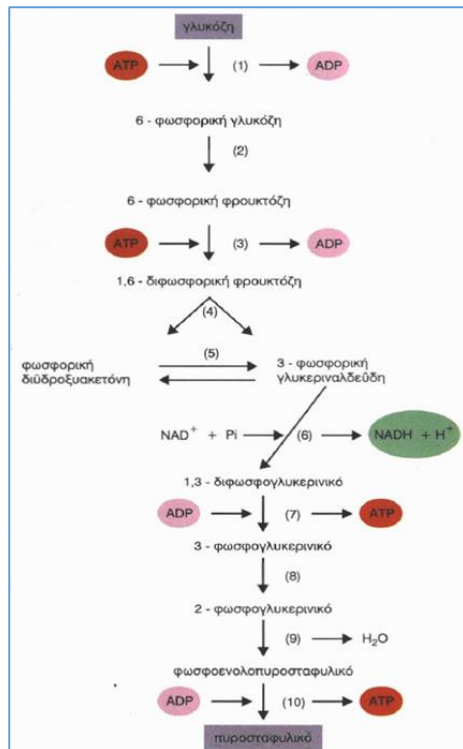
Through analysis of the protein sequence of Msn2 found that the amino acid Ser at position 625 is a potential site of phosphorylation by PKA. The aim of this study was firstly to introduce the mutation Ser625Ala to MSN2 gene and subsequent study of the effect of this mutation in yeast response to stress conditions.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών λαμβάνοντας μέρος σε διάφορες διαδικασίες, με πιο γνωστή αυτή της αλκοολικής ζύμωσης. Η αλκοολική ζύμωση χρησιμοποιείται για την παραγωγή οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών ενώ τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει την χρήση της για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων όπως καλλιεργήσιμα φυτά, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων κ.α.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται ευρέως για την αλκοολική ζύμωση είναι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Παρουσία οξυγόνου σάκχαρα όπως η γλυκόζη μεταβολίζονται σε CO₂ και νερό, ενώ απουσία αυτού σε CO₂ και αιθανόλη. 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. Πιο αναλυτικά, με τον όρο γλυκόλυση εννοούμε την αλληλουχία των αντιδράσεων η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Η πορεία διάσπασης της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό γίνεται σε δέκα επιμέρους βήματα. Οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες, τα ένζυμα καθώς και τα συνένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία αυτή, παρουσιάζονται στην εικόνα 1.1.

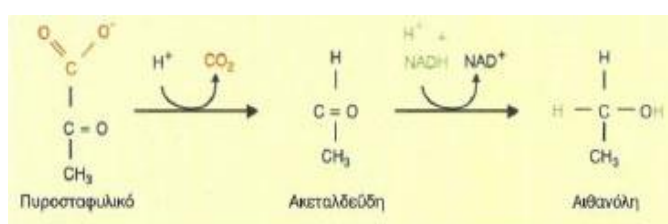


Εικόνα 1.1: σχηματική πορεία γλυκόλυσης.

Η γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα με μεταφορά μέσω μιας ειδικής πρωτεΐνης και έχει προορισμό να φωσφορυλιωθεί από το ATP σχηματίζοντας 6-φωσφορική γλυκόζη. Το επόμενο βήμα στη γλυκόλυση είναι η μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη. Εδώ η αλδεύδομάδα μετατρέπεται σε κετονομάδα. Η αντίδραση που ακολουθεί έχει ως στόχο την προσθήκη μίας δεύτερης φωσφορικής ομάδας, που προέρχεται και πάλι από το ATP, με αποτέλεσμα να δημιουργείται η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη φωσφοφρουκτοκινάση, ένα ένζυμο κλειδί για τη ρύθμιση της γλυκόλυσης. Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται αλλοστερικά από υψηλές συγκεντρώσεις ATP, ενώ αντίθετα ενεργοποιείται από το ADP και το AMP. Χάρη στην αλλοστερική αυτή ρύθμιση η ροή διάσπασης της γλυκόζης προσαρμόζεται στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Όταν υπάρχει περίσσεια ATP (υψηλό ενεργειακό φορτίο), η γλυκόλυση αναστέλλεται, γιατί το ATP δρα ως αναστολέας. Αντίθετα, όταν υπάρχει ανάγκη σε ενέργεια τα επίπεδα του ATP ενδοκυττάρια είναι χαμηλά ενώ αυτά του ADP υψηλά, οπότε ενεργοποιείται η φωσφοφρουκτοκινάση και ο ρυθμός της γλυκόλυσης αυξάνεται ταχύτατα. Η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται στη συνέχεια σε δύο ισομερή μόρια φωσφορικής τριόζης, τη φωσφορική διυδροξυακετόνη και

την 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη, τα οποία μπορούν να αλληλομετατρέπονται με τη δράση της ισομεράσης της φωσφοτριόζης. Η αρχική αντίδραση σε αυτή την πορεία είναι η μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης σε 1,3-διφωσφογλυκερικό. Στην αντίδραση αυτή, που είναι η μοναδική οξειδοαναγωγική αντίδραση της γλυκόλυσης, ενσωματώνεται ανόργανο φωσφορικό, ενώ ταυτόχρονα ανάγεται ένα μόριο του συνενζύμου NAD^+ προς NADH . Στην επόμενη αντίδραση καταλύεται η μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το 1,3-διφωσφογλυκερικό προς το ADP , οπότε σχηματίζεται ένα μόριο ATP . Στη συνέχεια το 3-φωσφογλυκερικό μετατρέπεται σε 2-φωσφογλυκερικό, το οποίο με αφυδάτωση δίνει το φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Τέλος απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος η οποία μεταφέρεται στο ADP και δημιουργείται το πυροσταφυλικό, που αποτελεί το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης.

Κατά την αλκοολική ζύμωση, η οποία λαμβάνει χώρα υπό αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό που παράγεται από τη διάσπαση της γλυκόζης μετατρέπεται σε αιθανόλη. Το πρώτο στάδιο αυτής της διεργασίας είναι η ενζυμική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, οπότε παράγεται ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται ενζυμικά σε αιθανόλη με ταυτόχρονη οξείδωση του NADH σε NAD^+ . Με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το NAD^+ και εξασφαλίζεται η συνεχής πορεία της γλυκόλυσης, εικ. 1.2.



Εικόνα 1.2: πορεία μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη.

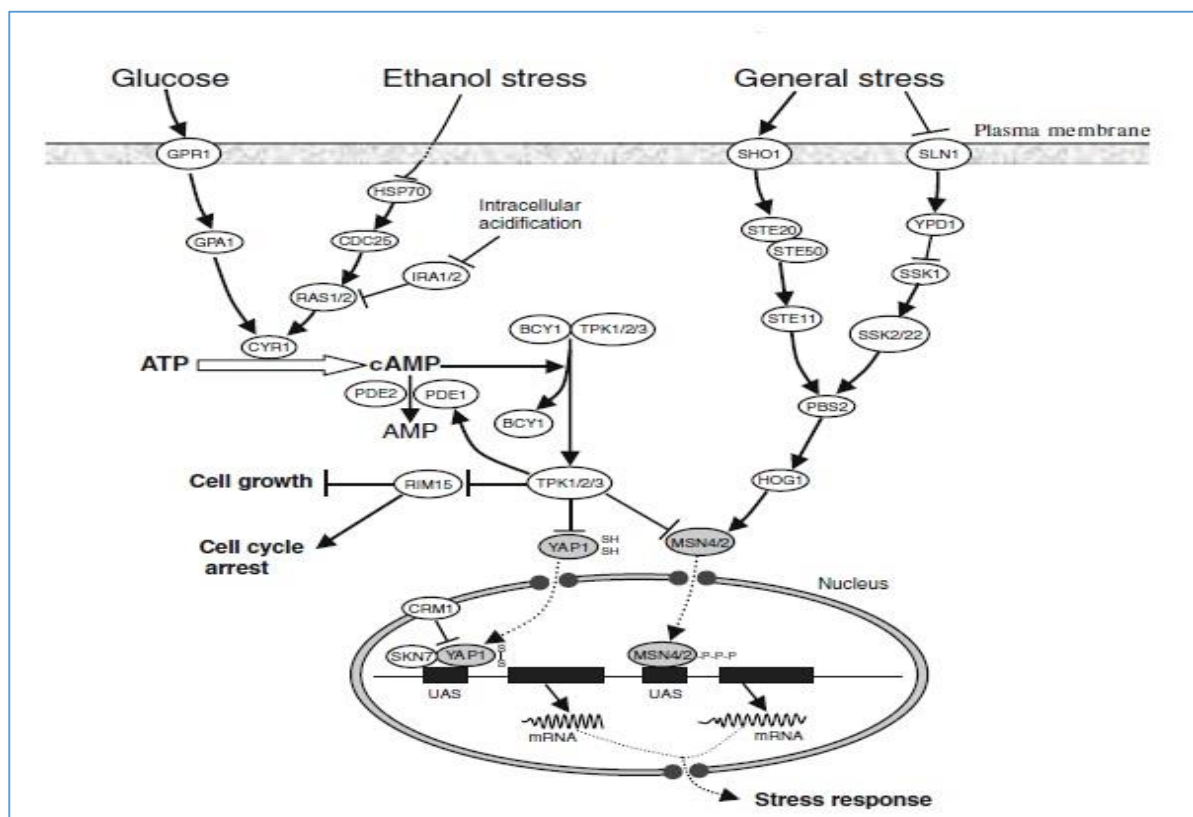
Όσον αφορά τη διαδικασία ανάπτυξης του *S. Cerevisiae*, υπό φυσιολογικές συνθήκες, όταν βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια. Επιπλέον τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Το σύμπλεγμα G πρωτεϊνών που είναι

δεσμευμένες στους υποδοχείς των σακχάρων (Gra1p, Gra2p) ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση Cyr1 με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), (εικ. 1.3). Η cAMP είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της BCY1 η οποία στη μη φωσφορυλιωμένη της μορφή δεσμεύει με την μορφή συμπλόκου το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών Trk1/2/3 που αποτελούν την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA είναι μια φωσφορική κινάση η οποία έχει ως υπόστρωμα έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών τις οποίες και φωσφορυλιώνει κυρίως σε κατάλοιπα σερίνης (Ser). Ένα μόριο στόχος της PKA είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Msn2 τον οποίο υπό κατάλληλες συνθήκες φωσφορυλιώνει. (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Gancedo, 2008; Smets et al., 2010).

Όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταποκριθούν σε ακραίες αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών ικανών να απειλήσουν την βιωσιμότητά τους. Οι κυτταρικοί μηχανισμοί αντίδρασης περιλαμβάνουν αισθητήρες περιβάλλοντος και μονοπάτια μεταγωγής σήματος που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης. Επαγωγή ή καταστολή της έκφρασης του γονιδίου κάτω από συνθήκες στρες επιτρέπει τη γρήγορη προσαρμογή σε διαφορετικές συνθήκες, με αποτέλεσμα την επιβίωση κυττάρου. (Gasch et al., 2000).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Msn2 είναι μια πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου της ζύμης σε γενικό στρες. Έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες στρες (Boy-Marcotte et al., 1998; Görner et al, 2002; Hasan R. et al., 2002; Kandror et al., 2004). Η ενεργοποίηση του συμβαίνει μέσω φωσφορυλίωσης από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες. Ταυτόχρονα όμως και ο έλεγχος της εισόδου του στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της MSN2 πρωτεΐνης από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου της MSN2 στον πυρήνα του κυττάρου. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες στρες τότε αναστέλλεται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Msn2 από την PKA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την είσοδό της στο πυρήνα του κυττάρου και κατ' επέκταση την ρύθμιση της έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες στρες.

Βέβαια πρέπει να αναφέρουμε πως η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης στο κύτταρο δρα αντίθετα από τους άλλους παράγοντες στρες, (Εικ. 1.3). Η ανοχή της αιθανόλης σχετίζεται με την αλληλεπίδραση των πολύπλοκων δικτύων στο επίπεδο του γονιδιώματος. (Menggen Ma & Z. Lewis Liu 2010;) Χαμηλού κόστους και υψηλού τίτλου παραγωγές αιθανόλης είναι σημαντικές προκλήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη μιας βιοοικονομίας. (Lin and Tanaka 2006, Liu et al 2008).



Εικόνα 1.3: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες stress λόγω της αιθανόλης στο *S. Cerevisiae*. Σκιασμένοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι γραμμές που καταλήγουν με ένα βέλος δείχνουν θετική αλληλεπίδραση, και αυτές που καταλήγουν με μία κάθετη προς το βέλος γραμμή, δείχνουν αρνητική αλληλεπίδραση. Αυτό το διάγραμμα προσαρμόζεται με βάση τους Colombo et al. (1998), Estruch (2000), Costa και Moradas-Ferreira (2001), Hohmann (2002), Müller et al. (2003), και Nikolaou et al. (2009).

Αν και η ζύμη είναι ένας παραδοσιακός μικροοργανισμός παραγωγής αιθανόλης είναι επίσης ευαίσθητη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η συσσώρευση της αιθανόλης σε ένα μέσο αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και βιωσιμότητα του κυττάρου, επηρεάζει τα διάφορα συστήματα μεταφοράς και μειώνει τον τίτλο της αιθανόλης στην καλλιέργεια (Casey and Ingledew 1986;, D'Amore and 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, βλάπτουν την διαπερατότητα σε πολυάριθμα ιοντικά είδη, μειώνουν τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης που οδηγεί σε διάχυση του διαμεμβρανικού ηλεκτροχημικού δυναμικού, και στη συνέχεια οξυνίζουν τις ενδοκυτταρικές και κενοτοπικές συνθήκες (Van Uden 1985;, Salgueiro et al 1988;, Rosa and SA-Correia 1996;, Teixeira et al 2009;). Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η αιθανόλη έχει επίσης δειχθεί να διαταράσσει την διαμόρφωση των πρωτεϊνών προκαλώντας μετουσίωση και δυσλειτουργία των βασικών γλυκολυτικών ενζύμων όπως της πυροσταφυλικής κινάσης και εξοκινάσης (Millar et al 1982;, Pascual et al 1988). Η υψηλή αιθανόλη επηρεάζει την πρόσληψη γλυκόζης, μαλτόζης, αμμωνίου και αμινοξέων και προκαλεί κυτταρική διαρροή νουκλεοτιδίων, αμινοξέων, και καλίου (Piper 1995).

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 625.

1.2. Μεταλλαγμένη του γονιδίου *Msn2* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR)) :

1.2.1 Γενικά για την PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή ζύμες. Βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον προσφερόμενο κλώνο εκμαγείο. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει νουκλεοτίδια μόνο επάνω σε μια προϋπάρχουσα ομάδα 3'-OH, χρειάζεται έναν εκκινητή στον οποίο μπορεί να προσθέσει το πρώτο νουκλεοτίδιο. Η απαίτηση αυτή καθιστά δυνατή την οριοθέτηση της συγκεκριμένης περιοχής του προτύπου ακολουθίας το οποίο και θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Τα ολιγονουκλεοτίδια καθορίζουν τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστά τα 5' και 3' άκρα του εν λόγω γονιδίου. Η γνώση της αλληλουχίας των άκρων του προς πολλαπλασιασμό τμήματος του DNA είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των

συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρία στάδια. (σχ. 1.1). 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 επιτυγχάνεται ταχύτατη εναλλαγή θερμοκρασιών (Βερβερίδης, 2003).

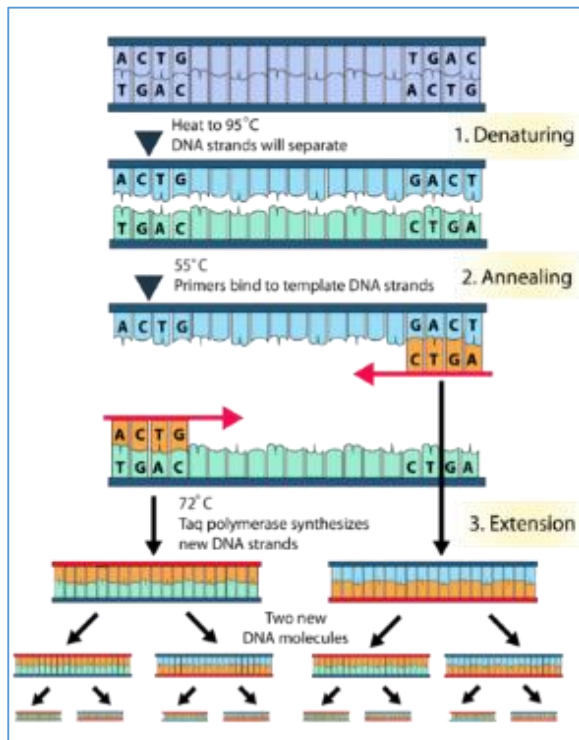


Εικόνα: 1.4: Θερμικός κυκλοποιητής (thermalcycler)

Τα στάδια της PCR είναι:

- a. Αποδιάταξη του DNA (denaturation) η οποία συμβαίνει στους 95°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία το δίκλωνο μόριο DNA αποδιατάσσεται σε δύο μονόκλινα μόρια.
- b. Υβριδοποίηση (hybridization). Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούμε από τους 52 έως τους 65°C περίπου. Κατά την υβριδοποίηση τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούμε ως primers δεσμεύονται στα μονόκλινα μόρια του DNA σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των νουκλεϊνικών οξέων.

- c. Επιμήκυνση της νουκλεοσυντιθέμενης αλυσίδας (extension) η οποία συμβαίνει στους 72-75°C. Στο στάδιο αυτό η DNA πολυμεράση αρχίζει και συνθέτει το υπόλοιπο τμήμα DNA, από τον εκκινητή και μετά, τοποθετώντας νουκλεοτίδια βάση του κανόνα συμπληρωματικότητας, διαβάζοντας την αλυσίδα εκμαγείο με κατεύθυνση 3'→5' και συνθέτοντας την καινούρια με κατεύθυνση 5'→3'.



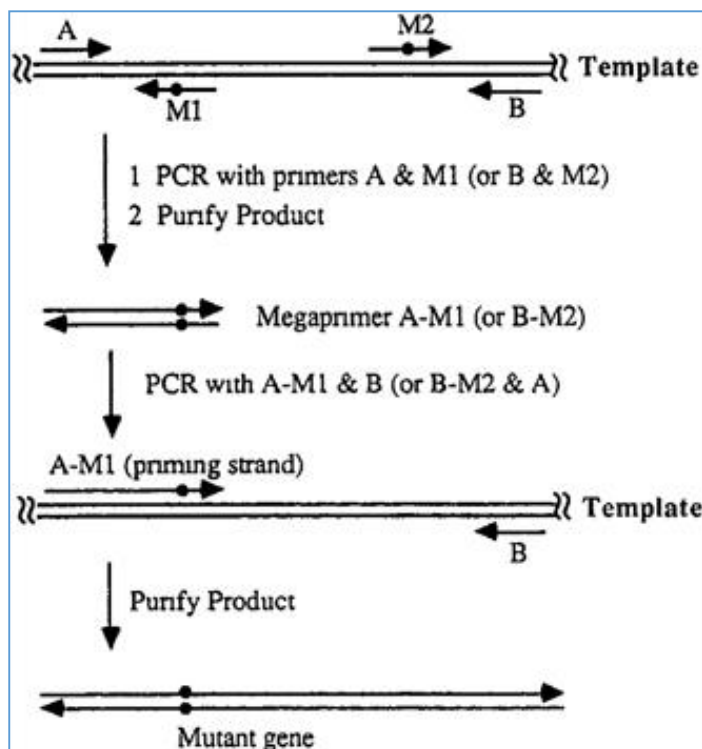
Σχήμα 1.1: Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2): Ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension).

1.2.2. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση με PCR

1.2.2.1 Μεθοδολογία <<Mega-primer>>.

Η Μέθοδος «Mega-primer» είναι μια πραγματικά απλή και ευέλικτη προσέγγιση που μπορεί να υιοθετηθεί για να δημιουργήσει μια μοναδική μετάλλαξη σε μια συγκεκριμένη περιοχή-στόχο, καθώς και να δημιουργήσει σε συγκεκριμένο χώρο ενθέσεις, εξαλείψεις και συντήξεις γονιδίων. (Σχ. 1.2). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί τρεις ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, δύο γύρους PCR, και ένα πρότυπο DNA που περιέχει το γονίδιο που πρόκειται να μεταλλαχθεί. Όπως φαίνεται στο Σχ. 1.2, όπου A και B είναι οι

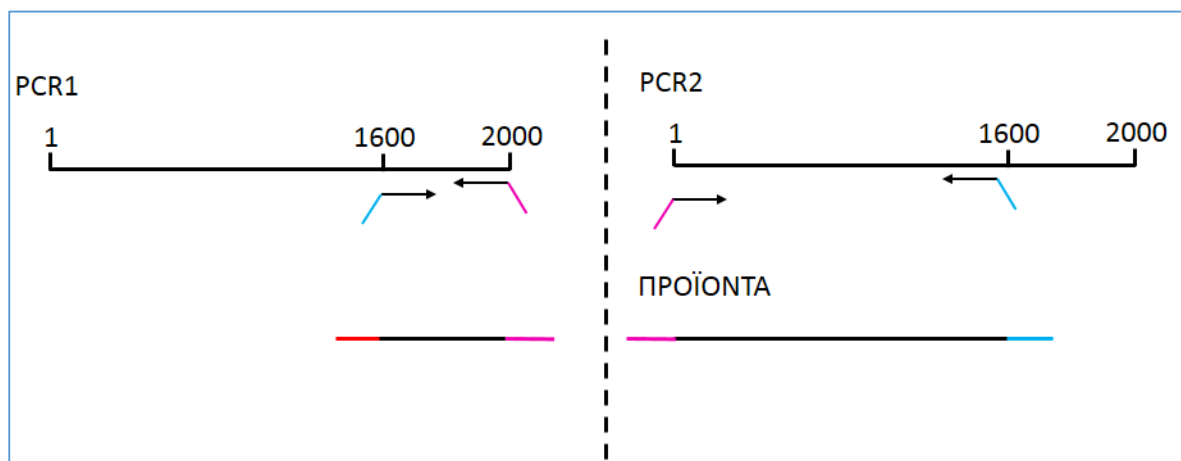
«συνοδευτικοί (ή πλευρικοί)» εκκινητές , και το M εκπροσωπεί το έναυσμα που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη, ο πρώτος γύρος των PCR παράγει ένα θραύσμα με την επιθυμητή μετάλλαξη που εισάγεται, χρησιμοποιώντας έναν από τους «πλευρικούς» εκκινητές (A) και έναν από το μεταλλαγμένο εκκινητή (mutant primer) (M). Το ενισχυμένο αυτό θραύσμα (megaprimer) χρησιμοποιείται στη δεύτερη PCR μαζί με το υπόλοιπο του εξωτερικού εκκινητή (B) για να ενισχυθεί μια μεγαλύτερη περιοχή του πρότυπου DNA. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται και μπορεί να κλωνοποιηθεί σε έναν κατάλληλο φορέα. Με το σχεδιασμό των «πλευρικών» εκκινητών με καθολικές αλληλουχίες θέσεων περιορισμού, συμβατές με το φορέα της επιλογής, είναι δυνατό να δημιουργηθούν διαφορετικοί μεταλλαγμένοι κλώνοι με την αλλαγή μόνο του μεταλλαγμένου εκκινητή. Πρόσφατα, αυτή η προσέγγιση έχει βελτιωθεί με τη χρήση των εμπρός και όπισθεν «πλευρικών» εκκινητών με σημαντικά διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης. Αυτό επιτρέπει στους ερευνητές να εκτελέσουν και τα δύο βήματα της PCR σε έναν ενιαίο σωλήνα. (Michael R. and Joseph S. 2012;)



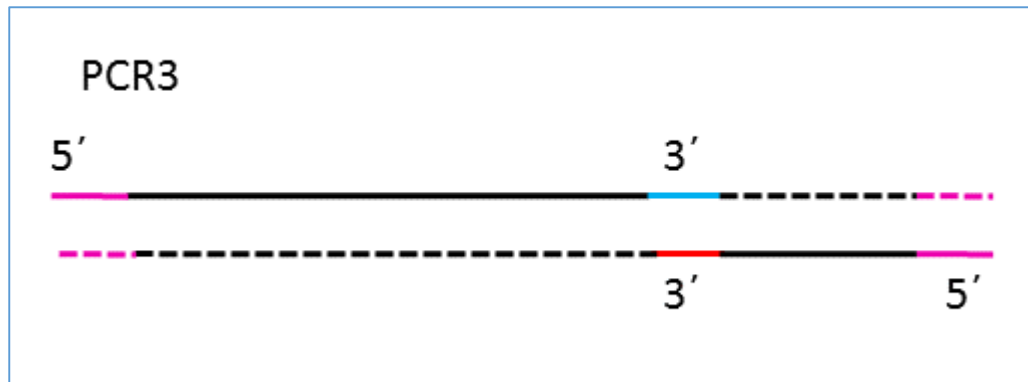
Σχήμα 1.2: Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση μέσω της μεθόδου Megaprimer. Οι εκκινητές A, B, M1 και M2 (όπως και η εκκινητήρια γραμμή του megaprimerA-M1) συμβολίζονται από μονές γραμμές που καταλήγουν σε βέλος. Οι διπλές γραμμές αντιπροσωπεύουν το εκμαγείο. Οι τελείες στο M και M2 υποδηλώνουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις (αντικατάσταση, εισαγωγή, διαγραφή) που θα εισαχθούν στο προϊόν μέσω του megaprimer (Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer PCR - In vitro mutagenesis protocols (1996), Series 57, pp203-215 - Methods in Molecular Biology).

1.2.2.2. Μέθοδος τριών διαδοχικών PCR

Η δεύτερη μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί είναι ίδια με την πρώτη μέχρι το πρώτο βήμα. Δηλαδή, στη δημιουργία ενός μικρού κομματιού DNA το οποίο φέρει τη μετάλλαξη. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται ένα δεύτερο κομμάτι DNA, το οποίο μπορεί να το χαρακτηριστεί και ως τη συνέχεια του πρώτου και έχει και αυτό την ίδια μετάλλαξη με το πρώτο. Για τη κατασκευή του δεύτερου κομματιού ο reverse primer φέρει τη μετάλλαξη στην τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη (Ser) (σχ. 1.3). Κατόπιν, χρησιμοποιώντας αυτά τα δύο κομμάτια ως εκμαγεία και με τους κατάλληλους primers γίνεται η κατασκευή του τελικού μας κομματιού (σχ. 5). Βάση της αρχής της μεθόδου της PCR, στο πρώτο στάδιο (95°C) πραγματοποιείται η αποδιάταξη των δίκλωνων προϊόντων των δύο προηγούμενων PCR. Η υβριδοποίηση είναι το επόμενο στάδιο και λαμβάνει χώρα περίπου στους 60°C. 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 (A) (σχ.1.4). Το αποτέλεσμα της επιμήκυνσης είναι η δημιουργία εκμαγείου που θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι επόμενοι κύκλοι της PCR θα πολλαπλασιάσουν το εκμαγείο αυτό. (PCR Primer- A laboratory manual. (1995)).



Σχήμα 1.3: Περιγραφή της PCR1 και PCR2. Στην PCR1 ο εμπρόσθιος εκκινητής που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη έχει γαλάζιο 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.



Σχήμα 1.5: Η τρίτη PCR κατά την οποία συντίθεται το προϊόν που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο *Saccharomyces cerevisiae* ως ζωντανός μικροοργανισμός 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 οσμωτικής πίεση καθώς και 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.

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).

Σημαντική έρευνα επιτελείται για την βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων είτε με την τροποποίηση των συνθηκών είτε με τη γενετική βελτίωση των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. 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. Κυρίαρχο ρόλο στη ενδοκυττάρια σηματοδότηση διαδραματίζει το μονοπάτι της PKA και ειδικότερα ο έλεγχος της MSN2 από αυτή. Η αποτροπή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Msn2 από την PKA είναι μία πιθανή προσέγγιση με σκοπό την γενετική βελτίωση του *S.cerevisiae*. 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 625. Στόχος λοιπόν είναι η γενετική τροποποίηση του γονιδίου MSN2 στη θέση αυτή. Η τροποποίηση αυτή θα έχει ως στόχο την αντικατάσταση της εν λόγω σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)) προκειμένου να κατασταλεί ο έλεγχος της

μετανάστευσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης από την PKA και να επιτευχθεί διαρκής εντοπισμός της στον πυρήνα. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία στελέχους ζύμης ανθεκτικό στην αιθανόλη καθώς και έναντι συνθηκών γενικού στρες.

Σκοπός της εργασίας λοιπόν είναι η δημιουργία στελέχους ζύμης το οποίο φέρει τη μετάλλαξη Ser625Ala επί του γονιδίου MSN2 και η πρωταρχική μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης στην απόκριση του ζυμομύκητα σε συνθήκες stress.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον Πίνακα 3.1, ενώ όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των PCR βρίσκονται στον Πίνακα 3.2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Synthetic Complete (-U) φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις Πειραματικές Πορείες.

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

20	Αδερίνη	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	NaCl		
36	NaOH		
37	Αιθυλεν-δι-αμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA)		
38	Triton X-100		
39	RNAse		
40	Ισοπροπανόλη	Penta	603117000
41	Kapa HiFi ReadyMix	Kapa Biosystems	KK2601
42	Taq polymerase ReadyMix	Kapa Biosystems	KK1006
43	MgCl ₂		
44	dNTPs		
45	Αμπικιλίνη (Ampicillin sodium salt)	Biochemica	A0839
46	Nucleospin PCRClean-up & Gel Extraction kit	Macherey-Nagel	740609.50
47	Nucleospin Plasmid kit	Macherey-Nagel	740588.50
48	Περιοριστική Ενδονουκλεάση PstI	Takara	1073A
49	Περιοριστική Ενδονουκλεάση EcoRI	Takara	1040A

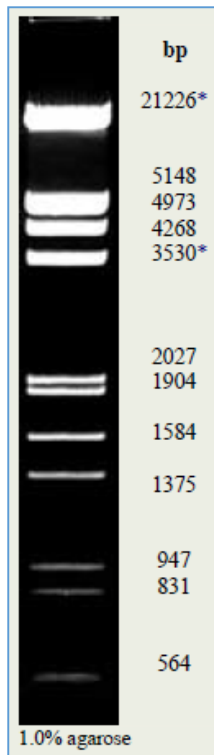
50	Περιοριστική Ενδονουκλεάση BamHI	Takara	1010A
51	5-FOA (5-Fluoroorotic Acid) (5-φθόρο-οροτικόξύ)	Thermo Scientific	R0811
52	SDS (Μετά νατρίου άλας του Θειϊκού Δωδεκακυλίου)	Sigma-Aldrich	L3771
53	Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 4000)	AppliChem	A1249
54	Carrier dna (Salmon Sperm)	AppliChem	A2160,0001
55	T4 DNA λιγάση	Takara	2011A
56	λ DNA		
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	ρUC19 plasmid		
62	W303-1a Yeast Strain		
63	MOPS	Sigma-Aldrich	M1254
64	RbCl ₂	Sigma-Aldrich	R2252
65	CaCl ₂		
66	MnCl ₂		
67	CH ₃ COOK		
68	Λυσοζύμη		
69	BSA		
70	Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> / <i>Hind</i> III Digest	Sigma-Aldrich	D9281
71	1 kb DNA Ladder RTU	Nippon Genetics	MWD-1

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

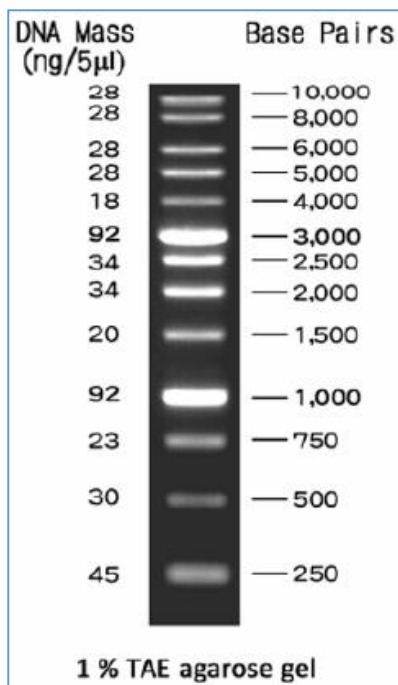
	Εκκινητές (Primers)	Αλληλουχίες εκκινητών	Θερμοκρασίες Υβριδοποίησης
1	MSN2_BamHI_Reverse	5'CGGGATCCAATGTCTCCATGTTTTTTA TGAG3'	T _m =60
2	MSN2_Ser625Ala_Forward	5' GGAGAAAAGCAATGACACC 3'	T _m = 56
3	MSN2_PstI_Forward	5'AAAAGTGCAGATGACGGTTCGACCATG ATTTC 3'	T _m =62
4	MSN2_Ser625Ala_Reverse	5' GGTGTCATTGCTTTTCTCC 3'	T _m = 56
5	MSN2-rec_F	5'CTTTTTTCAACTTTTATTGCTCATAGAA GAACTAGATCTAAAATGACGGTCGACCA TGATTTC 3'	T _m = 62
6	MSN2-rec_R	5'TTATCTTATGAAGAAAGATCTATCGAA TTAAAAAATGGGGTCTATTAAATGTCT CCATGTTTTTTATGAG 3'	T _m = 60
7	MSN2_URA3_Forward	5'CTTTTTTCAACTTTTATTGCTCATAGAA GAACTAGATCTAAAATGTGCGAAAGCTAC ATATAAGG 3'	T _m =58
8	MSN2_URA3_Reverse	5'TTATCTTATGAAGAAAGATCTATCGAA TTAAAAAATGGGGTCTATTAGTTTTGCT GGCCGCATC 3'	T _m =54

Πίνακας 3.3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του Synthetic Complete (-U).

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



Σχήμα 3.1: Lambda DNA/EcoRI/Hind III Digest



Σχήμα 3.2: 1 kb DNA Ladder RTU

3.2. Πειραματικές Πορείες

3.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης

1. Λήψη μιας μονήρους αποικίας από πιάτο ή φυγοκέντριση 200μl υγρής καλλιέργειας (O.D.600≈0.4).
2. Επαναδιάλυση κυττάρων σε 100μl διαλύματος (200mM LiOAc, 1% SDS).
3. Επώαση για 5 min στους 70°C.
4. Προσθήκη 300μl απόλυτης Αιθανόλης και ισχυρή ανάδευση (vortex)
5. Φυγοκέντριση του DNA και των κυτταρικών υπολειμμάτων 15000xg για 3 min.
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 200μl 70% αιθανόλης για έκπλυση ιζήματος.
7. Φυγοκέντριση για 2 min σε 15000xg. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
8. Αφήνουμε να στεγνώσει το ίζημα για 2 min και στη συνέχεια προσθέτουμε 100μl H₂O και επαναδιαλύουμε το ίζημα.
9. Φυγοκεντρούμε στις 15000xg για 15 sec ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
10. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και το φυλάσσουμε στους -20°C.
11. 1-4μl χρησιμοποιείται σε αντίδραση PCR.

3.2.2 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο του βρασμού

1. Εμβολιασμός 5ml θρεπτικού μέσου με μονήρη αποικία και ολονύκτια επώαση.
2. Φυγοκέντριση 1,5ml καλλιέργειας 10000rpm, 1 min, RT
3. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού
4. Επαναδιάλυση σε 0,7ml διαλύματος STET
5. Έντονη ανάδευση
6. Προσθήκη 10μl λυσοζύμης 1mg/ml
7. Τοποθέτηση erpendorfs στους 100°C για 60''
8. Φυγοκέντριση στις 10000rpm για 10 min ή λιγότερο σε RT
9. Μεταφορά 430μl του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs

10. Προσθήκη 400μl ισοπροπανόλης
11. Τοποθέτηση των eppendorfs στους -80°C για 10 min
12. Φυγοκέντριση σε 10000rpm για 30 min στους 4°C
13. Πλήρης απομάκρυνση υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 70% αιθανόλη
14. Φυγοκέντριση για 5min
15. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη 20 μl (H_2O + RNAse (100ng/μl))
16. Επώαση σε RT για 5-10 min

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

1. Φυγοκέντριση 1-5 ml καλλιέργειας *E. coli* σε θρεπτικό LB για 30s στις 11000x g. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
2. Προσθήκη 250μl buffer A1 και vortex.
3. Προσθήκη 250μl buffer A2 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
4. Προσθήκη 300μl buffer A3 και ήπια ανάδευση 6-8 φορές.
5. Φυγοκέντριση για 5min στις 11000x g σε θερμοκρασία δωματίου. (επαναλαμβάνουμε εάν το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό).
6. Τοποθετούμε μια στήλη NucleoSpin® Plasmid σε ένα Collection Tube (2 mL) και μεταφέρουμε το υπερκείμενο από το βήμα 3. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g. (εάν ο όγκος του υπερκείμενου ξεπερνάει τα 750μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα).
7. Προσθήκη 500μl buffer AW (προθέρμανση στους 50°C) και φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g.
8. Προσθήκη 600μl buffer A4 και φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g.
9. Φυγοκέντριση για 2min στις 11000x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων.
10. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Plasmid σε νέο Eppendorf και προσθήκη 50μl buffer AE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
11. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g.

3.2.4 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων ικανών να μετασχηματιστούν

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας 100ml σε LB μέχρι $OD_{550nm} \sim 0,55$. Χρήση κωνικής φιάλης 2L για καλή ανάδευση
2. Φυγοκέντριση για συλλογή κυττάρων 3000x g, 10 min στους 4°C
3. Επαναδιάλυση σε 28ml διαλύματος Tfb1 (πίνακας 3.4) και αφήνουμε για 25 min στους 4°C
4. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντριση 2500xg 10 min και επαναδιάλυση σε 6ml διαλύματος Tfb2 (πίνακας 3.5)
5. Μοιράζω σε κλάσματα των 400μl (για δυο μετασχηματισμούς) και τα φυλάσσω στους -70°C

Πίνακας 3.4: :Παρασκευή διαλύματος Tfb1*

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

Πίνακας 3.5: :Παρασκευή διαλύματος Tfb2*

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

*Δεν αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο αλλά με χρήση φίλτρου με διάμετρο πόρου 0,22μm.

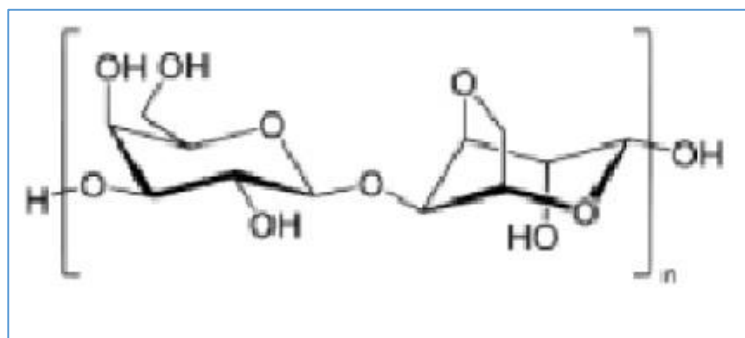
3.2.5 Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυτταρών

1. Ξεπάγωμα τα κύτταρα από παραπάνω στον πάγο και τα μοίρασμα σε δυο eppendorfs.
2. Προσθήκη <math><100\text{ng}</math> DNA και επώαση στον πάγο για 20-40 min
3. Υποβολή κυττάρων σε θερμικό σοκ (Heat shock) για 90 sec στους 42°C
4. Τοποθέτηση κυττάρων για 1 min στον πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 1 ώρα
5. Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντριση για 30 sec στις 10000xg και αφαίρεση 1ml του υπερκείμενου υγρού.
6. Επαναδιάλυση κυττάρων στα υπολειπόμενα 200μl, και επίστρωσή τους επί θρεπτικού μέσου LB + κατάλληλο αντιβιοτικό.

3.2.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

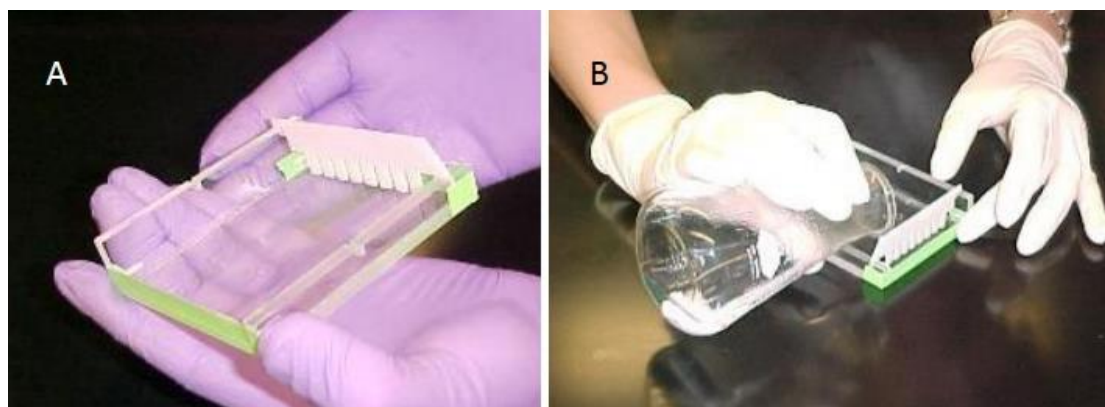
Ο όρος ηλεκτροφόρηση περιγράφει τη μετακίνηση ενός φοτισμένου σωματιδίου κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το φαινόμενο αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης αναλυτικής μεθοδολογίας για το διαχωρισμό, καθαρισμό και την ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA,RNA) καθώς και νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Αυτά τα μόρια φέρουν ομάδες που έχουν τη δυνατότητα ιονισμού και κατ' επέκταση σε συγκεκριμένες συνθήκες pH καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο μπορεί να τα κάνει να κινηθούν μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αντίθετο πόλο. Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό το οποίο όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος του και το σχήμα του. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό ή ιστό, κόβεται σε κομμάτια με μία ή συνδυασμό περισσότερων περιοριστικών ενδονουκλεασών, και το μείγμα των κομματιών αυτών τοποθετείται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA μετακινείται προς την άνοδο, με τα μικρότερα κομμάτια να κινούνται γρηγορότερα και τα μεγαλύτερα αργότερα. Στην περίπτωση του DNA χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που, σε κατάλληλες συνθήκες,

δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Το άγαρ απομονώνεται από φύκη (red algae) και αποτελείται από αγαρόζη και αγαροπηκτίνη. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose και L-galactopyranose) (Εικ.3.1).



Εικόνα 3.1: συντακτικός τύπος αγαρόζης.

Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων, άρα και το μέγεθος των κομματιών DNA που μπορούν να διαχωριστούν. Η πηκτή αγαρόζης είναι συνήθως από 0.7% (καλός διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA 5–10kb) μέχρι 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA 0.2–1kb) περιεκτικότητα σε αγαρόζη. Στην εικ.3.2 φαίνεται η παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης.



Εικόνα 3.2: Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ειδικό εξοπλισμό που συνίσταται από δύο μέρη: τη **μονάδα τάσης** ή **τροφοδοτικό** και τη **μονάδα ηλεκτροφόρησης** η οποία στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης DNA είναι συνήθως οριζόντια διάταξης.

Οι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό μετακίνησης του DNA στην πηκτή είναι:

1. Το μέγεθος του DNA
2. Η συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη
3. Η διαμόρφωση του DNA (κυκλικό υπερ-ελικωμένο, κυκλικό ανοιχτό/κομμένο, γραμμικό)
4. Η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος
5. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (σύνθεση και ιοντική ισχύς)
6. Ο τύπος της αγαρόζης (standard, low-melting temperature)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για να παρέχουν τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται μεταφορά ρεύματος και να διατηρούν το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή. Τα πιο κοινά διαλύματα είναι:

- **TAE** (Tris/Acetate/EDTA) (μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, θέλει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο αλλά έχει καλύτερα αποτελέσματα, καλό διαχωρισμό σε DNA >4kb και σε υπερελικωμένο DNA).
- **TBE** (Tris/Borate/EDTA) (προβληματικό με το RNA λόγω αλληλεπίδρασης, καλό διαχωρισμό σε DNA 0.1-3 kb και όταν εφαρμόζουμε τάση >150V).

50x TAE: Σε 900ml απεσταγμένου H₂O προσθέτουμε:

Tris base	242g
Glacial Acetic Acid	57.1ml
EDTA	18.6 g
Απιονισμένο H ₂ O	μέχρι το 1L

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

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

3.2.8 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με το kit Gel & PCR clean up

1. Προσθήκη 200μl buffer NT1 για κάθε 100mg πηκτής αγαρόζης <2% και θέρμανση του δείγματος για 5-10min στους 50°C. Vortex έως ότου η πηκτή αγαρόζης διαλυθεί πλήρως.
2. Τοποθέτηση μιας στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε ένα Collection Tube (2 mL)) και μεταφορά 700μl αντίδρασης pcr. Φυγοκέντριση δείγματος για 30sec στις 11000x g. (εάν ο όγκος του δείγματος ξεπερνάει τα 700μl επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με το υπόλοιπο δείγμα αντίδρασης).
3. Προσθήκη 700μl buffer NT3 και φυγοκέντριση για 30sec στις 11000x g.
4. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000x g για απομάκρυνση υπολειμμάτων buffer NT3.
5. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε νέο Eppendorf (1,5ml). Προσθήκη 15-30μl buffer NE. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Φυγοκέντριση για 1min στις 11000xg.

3.2.9 Υψηλής απόδοσης μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

1. Εμβολιασμός 50ml 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 2000 rpm για 5min στους $4^{\circ}C$.
3. Επαναδιάλυση σε 25 ml αποστειρωμένο H_2O και φυγοκέντριση στους $4^{\circ}C$ 8000 rpm.
4. Επαναδιάλυση σε 1ml 10mM LiOAc (Οξικό Λίθιο), στον πάγο.
5. Μεταφορά σε erpendorfs.
6. Φυγοκέντριση στις 4000 rpm για 30-60sec στους $4^{\circ}C$.
7. Επαναδιάλυση σε 100mM LiOAc. Τελικός όγκος=500μl (κύτταρα+διάλυμα).
8. Μοίρασμα σε 5 erpendorfs (100μl).
9. Σύντομη φυγοκέντριση 4-5sec.
10. Επαναδιάλυση ιζήματος σε
 - a. 240 μl PEG(4000) 50%,
 - b. 36μl 1M LiOAc
 - c. 25μl carrier DNA (2μg/μl),
 - d. 50μl H_2O +DNA (0.1-1μg)
11. Vortex για 1min.
12. Τοποθέτηση στους $30^{\circ}C$ για 30min.
13. Τοποθέτηση στους $42^{\circ}C$ για 20-25min.
14. Φυγοκέντριση στις 2000rpm για 1min.
15. Προσθήκη 200μl αποστειρωμένου H_2O και ήπια επαναδιάλυση.
16. Επίστρωση κυτάρων επί στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία petri.

3.2.10 Θρεπτικά υλικά

- **YEP**

Yeast extract	10g
Bacto Peptone	20g
Glucose	20g
Agar	20g
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι όγκου 1L

Υγρή αποστείρωση

- **SC**

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

Υγρή αποστείρωση

- **LB**

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

Υγρή αποστείρωση

- **5-FOA**

1. 10 g αγαρ σε 300 ml H₂O σε κωνική φιάλη του 1L με μαγνήτη και αποστείρωση.
2. Σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 195ml H₂O ακριβώς προσθέτονται τα ακόλουθα:

Yeast Nitrogen base without amino acids	3.35g
Glucose	10g
Amino Acids mix (w/o uracil)	1.15g
5-FOA	0.5g

3. Θέρμανση του μείγματος με το 5-FOA πάνω σε θερμαντική πλάκα στους 55-65°C, μέχρι πλήρους διαλύσεως όλων των συστατικών (περίπου 1 ώρα).
4. Αποστείρωση του μείγματος με φιλτράρισμα με φίλτρο διαμέτρου πόρου 0,22μm και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60°C.
5. Η κωνική φιάλη με το αποστειρωμένο άγαρ τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα και αφήνεται να κρυώσει υπό ανάδευση μέχρι τους ~65°C.
6. Γίνεται προσθήκη του αποστειρωμένου μείγματος 5-FOA καθώς και 5ml αποστειρωμένου 100X uracil διαλύματος (2mg/ml).
7. Μοιράζεται το υλικό σε τρυβλία petri και αφήνεται να στερεοποιηθεί.

* Για την Παρασκευή υγρών θρεπτικών υλικών δεν προσθέτουμε άγαρ.

3.2.11 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

Προκειμένου να επιτευχθεί η εισαγωγή της μετάλλαξης Ser625Ala στην Msn2 πρωτεΐνη, απαιτείται η τροποποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου MSN2 τροποιώντας την τριπλέτα που αντιστοιχεί στο αμινοξύ Ser625.

4.1 Εισαγωγή μετάλλαξης

4.1.1 Μέθοδος « Megaprimer».

Αρχικά έγινε προσπάθεια εισαγωγής της εν λόγω μετάλλαξης με την μέθοδο του Mega-Primer. Χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμίδιο pUC19-MSN2 στο οποίο βρίσκεται κλωνοποιημένο το αγρίου τύπου γονίδιο MSN2 και εφαρμόστηκε PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές, (πιν. 4.1).

Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια για την PCR1.

pUC19- MSN2 for pcr	4μl
5x KAPA HIFI FID	10μl
MSN2-Ser-625-Ala F	1.5μl
BamHI- MSN2- R	1.5μl
dNTP's	1.5μl
HIFI	1μl
H ₂ O	30.5μl
Σύνολο	50μl

Πρόγραμμα PCR1:

1. 95 °C	3min	
2. 98 °C	20sec	
3. 58 °C	15sec	
4. 72 °C	1min 30sec	Βήμα 2, #30
5. 72 °C	5min	
6. 4 °C	∞	

Το αποτέλεσμα από την παραπάνω αντίδραση PCR είναι η λήψη ενός μικρού τμήματος DNA της MSN2 το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Η τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη 625 είναι η TCA. Στο γονίδιο της MSN2, (εικ. 4.1, 4.2), ο forward primer (MSN2_Ser-625-Ala) υβριδοποιείται στη βάση 1864 και συνθέτει έως το τέλος του γονιδίου όπου υβριδοποιείται ο reverse primer (BamHI-MSN2-R). Η ακριβής αλληλουχία των εκκινητών

περιγράφονται στην παράγραφο υλικά και μέθοδοι. Ο εκκινητής MSN2_Ser-625-Ala έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η αντικατάσταση της τριπλέτας TCA που κωδικοποιεί το αμινοξύ σερίνη, σε GCA που κωδικοποιεί το αμινοξύ αλανίνη. Ο reverse primer, υβριδοποιείται στο τέλος του γονιδίου στη θέση 2112 και κατευθύνεται ανάποδα στο γονίδιο της MSN2.

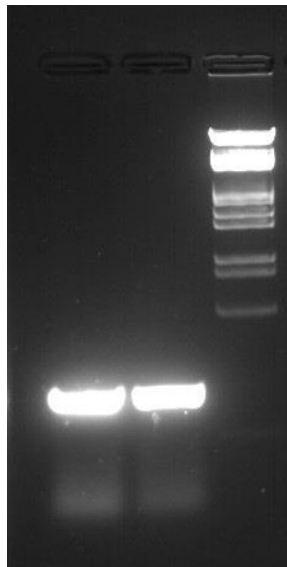
1	MetThr Val Asp His AspPhe AsnSer Glu AsnLeu Phe Pro Ile Glu SerMet Ser Ser Ile Gln Tjr ValGlu Asn AsnAsnPro AsnAsnIle Asn AsnAsp Val Ile Pro Tjr SerLeuAsp Ile LysAsnThr ValLeu Asp SerAlaAspLeu AsnAsp Ile GlnAsnGln GluThrSer Leu AsnLeuGly
	ATGACGGTGC ACCATGATTT CAATAGCGAA GATATTTTAT TCCCATAGA AGCATGAGT AGTATACAAAT ACGTGGAGAA TAATAACCCA AATAATATTA ACAACGATGT TATCCGGTAT TCTCTAGATA TCAAAAACAC TGCTTTAGAT AGTGGGGATC TCAATGACAT TCAAAATCAA GAAACTTACG TGAATTTGGG TACTGCCAGC TGGTACTAAA GTTATCGCTT CTATAAAAATA AGGGGTATCT TCGTACTCA TCAATATGTA TGCACCTCTT ATTATGGGT TATATATAAT TGTTGCTACA ATAGGGCATA AGAGATCTAT AGITTTTTGTG ACBAAATCTA TCAAGCCTAG AGTACTGTA AGTTTTAGTT CTTTGAAGTG ACTTAAACCC
201	GlyLeuPro Pro LeuSerPheAsp SerProLeu ProVal Thr GluThr Ile Pro SerThr Thr AspAsnSer LeuHisLeu Lys AlaAspSer AsnLys Asn ArgAspAla Arg Thr Ile Glu AsnAspSer Glu Ile Lys Ser ThrAsnAsn AlaSer Gly Ser GlyAla Asn Gln Thr Thr Leu Thr SerProTjrPro
	GCTTCCTCCA CTATCTTTCG ACTCTCCACT GCGCGTAAGC GAACAGATAC CATCCACTAC CGATAACAGC TTGCATTGTA AAGCTGATAG CAACAAAAAT CGCGATGCAA GAACATTTGA AATGATAGT GAAATTAAGA GACTAATAA TGCTAGTGGC TGTGGGGCAA ATCAATACAC AACTCTTACT TCACCTTATC CGAAGGAGST GATAGAAAGC TGAGAGGTGA CCGGCATTGC CTTTCTATG GTAGGTGATG GCTATATGTC AACGTAAACT TTCGACTATC GTTGTTTTTA GCGCTACGTT CTTGATAACT TTTACTATCA CTTTAAITCT CATGATTAT ACAGTACCOC AGACCCCGST TAGTTATGTG TTGAGATGA AGTGGAAAG
401	ProMetAsnAsp Ile Leu Tjr AsnMetAsnAsn ProLeu Gln SerPro Ser ProSerSer Val ProGln Asn ProThr Ile AsnProPro Ile AsnThr Ala SerAsnGlu ThrAsnLeu Ser ProGln Thr SerAsn Gly AsnGluThr Leu Ile Ser Pro ArgAla Gln GlnHisThr Ser Ile Lys AspAsnArgLeu
	CTATGAAOGA CATTTGTGAC AACATGAACA ATCCGTTACA ATCACCGTCA CCTTCATCGG TACCTCAAAA TCCGACTATA AATCCTCCCA TAATACAGC AAGTAAOGBA ACTAATTTAT CCGCTCAAACT TCCAAATGGT AATGAAACTC TTATATCTCC TCGAGCCCAA CAACATAGCT CCAATTAAGA TATCGTCTG GATACTTGTCT GTAAAACATG TTGACTTTGT TAGGCAATGT TAGTGGCAGT GGAAGTAGCC ATGGAGTTTT AAGCTGATAT TTAGGAGGGT ATTTATGTG TCCATTGCTT TGATTAATA GCGGAGTTTG AAGTTTACCA TTACTTTGAG AATATAGAGG AGCTCGGGTT GTTGTATGCA GGTAAITTTCT ATTAGCAGAC
601	SerLeuPro Asn GlyAla Asn SerAsnLeu PheIle Asp Thr AsnPro Asn AsnLeu Asn GluLysLeu Arg AsnGln Leu AsnSer Asp ThrAsnSer Tjr SerAsnSer Ile Ser Asn SerAsnSer Asn SerThr Gly AsnLeu Asn SerSer Tjr Phe AsnSer Leu AsnIle Asp SerMeLeu Asp AspTjrVal
	TCCITACCTA ATGGTGTAA TTGCAATCTT TCAATGACA CTAACCCAAA CAATTTGAAC GAABAACTAA GAATCAATT GAACCTAGAT ACAAAATCAT ATTCTAACT CAITTTCAAT TCAAACTCCA ATTCTACGGG TAATTTAAAT TCCAGTTAT TTAATCTACT GAACATAGAC TCCATGCTAG ATGATACGT AGGAATGGAT TACCAGGAT AAGCTTAGAA AAGTAACTGT GATTTGGTTT GTTAAACTTG CTTTITGAT CTTTATGTA CTTGAGTCA TGTTTAAGTA TAGAATGAG GTAAAGATTA AGTTTGAAGT TAAGTGCOC ATTAATTTA AGGTCAATAA AATTAAGTGA CTTGTATCTG AGGTACGATC TACTAATGCA
801	ValSerSer Asp LeuLeuLeu Asn AspAspAsp AspAsp Thr AsnLeuSer Arg ArgArg Phe SerAsp Val Ile ThrAsnGln PheProSer MetThr Asn SerArgAsnSer Ile Ser His SerLeu Asp LeuTrpAsnHis ProLys Ile AsnPro Ser AsnArgAsnThr AsnLeu Asn Ile Thr Thr AsnSerThrSer
	TTCTAGTGT CTCTTATGGA ATGATGATGA TGATGACACT AATTTATCAC GCGAAGAT TTGCGAGT ATACAAAAC AATTTCCGTC AATGACAAAT TCGAAGAT CTATTTCTCA CTCTTTGGAC CTTTGGAAC ATCCGAAAAT TAATCCAGC AATAGAAATA CAATTTCAA TATCACTACT AATTTACT AAGTACTCA GAGAATAACT TACTACTACT ACTACTGTGA TTAATATGTG CCGCTTCTAA ATCGCTGCAA TATGTTTGG TTAAGAGCAG TTACTGTITA AGCTCCTTAA GATAAAGAT GAGAAAAGCT GAAACCTTGG TAGGCTTTTA ATTAGGTTG ATTAGGTTG TTAICTTTAT GTTTAGAGTT ATAGTATGA TTAGATGGA
1001	SerSerSer Asn AlaSer Pro AsnThrThr Thr MetAsn Ala AsnAla Asp SerAsnIle Ala GlyAsnPro LysAsnAsn AspAlaThr Ile AspAsnGlu LeuThr Gln Ile LeuAsnGlu TjrAsnMet AsnPheAsn AspAsnLeu Gly ThrSer Thr Ser Gly Lys AsnLysSer Ala CysProSer SerPheAsp
	CAAGTTCCAA TGCAAGTCCG AATACCACTA CTATGAAOGC AATGCGAGC TCAATATTTG CTGGCAACCC GAABAACTAA GAGCTACCA TAGACAATGA GTTGACACAG ATTCTTAAO AATATAATAT GAACITCAAC GATAATTTGG GCACATCCAC TTCTGGCAG AACAAMTCTG CTTGCCAAG TCTTTTGTAT GTTCAAGGTT ACGTTCAGCG TTAGTGGTAT GATACTTGCG TTTACGTCG AGTTTATAAC GACCGTTGGG CTTTITGTTA CTGCGATGGT ATCTGTACT CAACGTGTGC TAGAAATGTC TTAATATATA CTTGAAGTTG CTAITAAACC CGTGTAGGTG AAGACCGTTC TTGTTTAGAC GAACGGGTTG ABAABAACTA
1201	AlaAsnAla Met ThrLys Ile AsnPro Ser GlnGlnLeu Gln GlnGln Leu AsnArg Val GlnHisLys Gln LeuThr Ser SerHis Asn AsnSerSer Thr AsnMetLys SerPheAsn SerAspLeu Tjr SerArg Arg GlnArg Ala SerLeuPro Ile Ile AspAsp SerLeuSer TjrAspLeu Val AsnLysGln
	GCCAAATGTA TGCAAAAGAT AATCCAAAT CAGCAATTA AGCAACAGCT AACCAGAT CAACCAAGC AGCTCACCTC CTCACATAAT AACAGTAGA CTAACTGAA ATCCITCAAC AGCGATCTT ATTCAAGAG CCAAAAGACT TCTTTACCA TAATCGATGA TTCACTAAGC TAGACCTGG TTAATAGCA CGTTACGAT ACTGTTTCTA TTAGGTTTCA GTCGTAAATG TCGTTGCGA TTTGGCTCAA GTTGTGTGCG TCGAGTGGAG CAGTGTATTA TTGTCATCGT GATTTACTT TAGAAGTTG TCGCTAGAAA TAGTTCTTC CTTTCTCGA AGAAATGGT ATTAGCTACT AAGTGTTCG ATGCTGGACC AATTAITCGT
1401	GlnAspGlu Asp ProLysAsnAsp MeLeu Pro AsnSer AsnLeuSerSer Ser GlnGln Phe Ile Lys Pro SerMetIle Leu SerAspAsn AlaSer Val Ile AlaLys Val AlaThr Thr GlyLeu Ser AsnAspMetPro PheLeu Thr GluGlu Gly GluGlnAsnAla AsnSer Thr ProAsnPhe AspLeuSerIle
	GGATGAAGC CCCAAGAAGC ATATGCTGCC GAATTCAAAT TTGATTTAT CTCAACAAT TATCAACC GCTATGATC TTTCAAGAA TGCGTCCGTT ATTCCGAAG TGGCGACTAC AAGCTTGAAT AATGATATG CATTITTTGAC AGAGGAAGT GAACAAAATG CTAATCTAC TCCAAATTC GATCTTTCCA CCTACTCTG GGGTCTTGC TATACGACGG CTTAAGTTTA AACTCAAGTA GAGTGTATA ATAGTTTGG AGATACTAAG AAGTCTGTT ACGCAAGCAA TAACGCTTC ACGCTGATG TCCGAATCA TTAATAATG GTAAAAACTC TCTCCTTCCA CTTGTTTTAC GATTAAGATG AAGTTTAAAG CTAGAAAGGT
1601	IleThrGln Met AsnMetAla ProLeuSer Pro AlaSer Ser SerSer Thr SerLeuAla Thr AsnHis Phe TyrHis His PheProGln Gln GlyHis His ThrMetAsn SerLys Ile Gly SerSer Leu ArgArg Arg LysSerAla Val ProLeuMet GlyThr Val ProLeuThr AsnGlnGln Asn AsnIle Ser
	TCACTCAAAI GAATATGGCT CCAATTATCG CTGCATCAC ATCCTCACG TCTCTTGCAA CAATCATTT CTATCCACT TTCCCAAGC AAGGTCACCA TACCATGAAC TCTAAATOG GTTCTTCCCT TCGAGGCGG AAGTCTGCTG TGCTTTGAT GGTACGGTG CCGCTTACA ATCAACAAA TAATATAAGC AGTGAATTA CTATACCGA GGTAAATAGC GACGTAGAG TAGGAGTGC AGAAGACSTT GTTATGAAA GATATGGTA AAGGTTGTC TCCAGTGGT ATGGTACTG AGATTTAGC CAAAGAGGA AGCTCCGCG TTCAGACAC ACBAAACTA CCAATGCCAC GGCBAATGT TAGTTTITTT ATTAATATCG
1801	SerSerSer Val AsnSer Thr GlyAsn Gly Ala Gly Val Thr LysGlu Arg ArgPro Ser TjrArgArg Lys SerMetThr ProSer Arg ArgSerSer Val Val Ile Glu SerThr Lys GluLeuGlu Glu LysPro Phe HisCys His Ile CysPro Lys SerPheLys ArgSer Glu HisLeuLys Arg His ValArg
	AGTATAGTG TCAACTCAAC TGGCAATGGT GCTGGGGTTA CGAAGGAAG AAGGCCAAT TACAGGAGAA AATCAATGAC ACCTCCAGA AGATCAAGT TCGTAATAGA ATCAACAAAG GAATCGAGG AAAAAACGTT CCACTGTAC ATTTGTCCCA AGAGCTTTAA CGCAGCGAA CATTTGAATA GGCATGTAG TCATCATCA AGTTGAGTTG ACCSTTACCA CGACCCAAAT GCTTCCITTC TTCCGTTCA ATGTCTCTT TTAGTTACTG TGGCAGGCT TCTAGTTCA AGCATTAICT TAGTTTITTC CTTGAGCTC TCTTTGCAA GGTGACAGT TAACAGAGGT TCTCGAAAT CCGCTCGCTT GAAACTTTT CCGTACACT
2001	ArgSer Val His SerAsnGlu Arg ProPhe Ala CysHis Ile CysAspLys Lys PheSer Arg SerAspAsn LeuSerGln His Ile Lys Thr HisLys Lys His GlyAsp Ile
	ATCTGTTCAC TCTAACGAAC GACCATTTGC TTGTCAATA TGCGATAAGA AATTTAGTAG AAGCGATAAT TTGTGCGAAC ACATCAAGAC TCATAAAAAA CATGGAGACA TT TAGACAAGT AGATTCCTTG CTGGTAAACG AACAGTGTAT ACGTAITCT TTAATCAIC TTCGTAATA AACAGCGTGG TGTAGTTCTG AGTATTTTTT GTACTCTGT AA

Εικόνα 4.1: Αλληλουχία του αγρίου τύπου γονιδίου MSN2. Εμφανίζεται και η αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

1	MetThr Val Asp His AspPhe AsnSer Glu Aspile Leu Phe Pro Ile Glu SerMet Ser Ser Ile Gln Tyr ValGlu Asn AsnAsnPro AsnAsnIle Asn AsnAsp Val Ile Pro Tyr SerLeuAsp Ile LysAsn Thr ValLeu Asp SerAlaAspLeu AsnAsp Ile GlnAsn Gln GluThrSer Leu AsrLeuGly
	ATGACGGTCG ACCATGATTT CAATACGGAA GATATTTTAT TCCCATAGA AAGCATGAGT AGTATACAAAT ACSTGGAGAA TAATAACCCA AATAATATTA ACAACGATGT TATCCCGTAT TCTCTAGATA TCAAAAACAC TGCTCTAGAT AGTCCGGATC TCAATGACAT TCAAAATCAA GAACCTTCAC TGAATTTGGG TACTGCCAGC TGGTACTAAA GTTATCGCTT CTATAAAATA AGGGGTATCT TTOSTACTCA TCATATGTTA TGCACCTCTT ATTATTGGGT TTATTATAAT TGTGTCTACA ATAGGGCATA AGAGATCTAT AGTTTTTGTG ACAGAAATCA TCACGCCATG AGTACTGTA AGTTTTAGTT CTTTGAAGTG ACTTAAACCC
201	GlyLeuPro Pro LeuSerPhe Asp SerPro Leu ProVal Thr GluThr Ile Pro SerThr Thr AspAsn Ser LeuHisLeu Lys AlaAsp Ser AsrLys Asn ArgAspAla Arg Thr Ile Glu AsnAsp Ser Glu Ile Lys Ser ThrAsnAsn AlaSer Gly Ser GlyAla Asn Gln Tyr Thr ThrLeu Thr SerProTyrPro
	GCTTCCTCCA CTATCTTTCG ACTCTCCACT GCCCGTAAGC GAACCGATAC CATCCACTAC CGATAACAGC TTGCATTGGA AAGCTGATAG CAACAAAAAT CCGATGCAA GAACCTATGA AAATGATAGT GAATTAAGA TACTAATAAA TGCTATGACC TCTGGGGCAA ATCAATACAC AACTCTTACT TCACCTTATC CGAAGGAGGT GATAGAAAGC TGAGAGGTGA CCGGCAATTGC CTTTGCATAG GTAGGTGATG GCTATTGTGC AACGTAAACT TTGCAGTATC GTTGTITTTA CCGCTACGTT CTTGATRACT TTTACTATCA CTTTAAITCT CATGATTAT ACATACACCC AGACCCCGTT TAGTTATGTG TTGAGAATGA AGTGGAAATG
401	ProMetAsn Asp Ile Leu Tyr AsrMetAsnAsn ProLeu Gln SerPro Ser ProSerSer Val ProGln Asn ProThr Ile AsrProPro Ile AsrThr Ala SerAsnGlu ThrAsrLeu Ser ProGln Thr SerAsn Gly AsrGluThr Leu Ile Ser Pro ArgAla Gln GlnHis Thr Ser Ile Lys Asp AsrArgLeu
	CTATGAACGA CATTTTGTAC AACATGAACA ATCCGTTACA ATCACCGTCA CCTTCATCGG TACCTCAAAA TCCGACTATA AATCCOCCA TAAATACAGC AAGTAACGAA ACTAATTTAT CCGCTCAAC TTCAATGGT AATGAAACTC TTATATCTCC TCGAGCCCAA CAACATACT CCATTAAAGA TAATCGCTG GATACTTGTCT GTAACACATG TTGACTTTGT TAGGCAATGT TAGTGGCAGT GGAATGAGCC ATGGAGTTTT AGGCTGATAT TTAGGAGGGT ATTTATGTGC TTCAITGCTT TGATTAATA GCGGAGTTTG AAGTTTACCA TTACTTTGAG AATATAGAG AGCTCGGGTT GTTGTATGCA GGTAAATTTCT ATTAGCACAC
601	SerLeuPro Asn GlyAla Asn SerAsnLeu Phelle Asp Thr AsrPro Asn AsrLeu Asn GluLysLeu Arg AsrGln Leu AsrBer Asp ThrAsrBer Tyr SerAsn Ser Ile Ser Asn SerAsrBer Asn SerThr Gly AsrLeu Asn SerSer Tyr Phe AsrBer Leu AsnIle Asp SerMetLeu Asp AspTyrVal
	TCCITTACTTA ATGGTGTCAA TTCGAATCTT TTCAITGACA CTAAACCCAA CAATTTGAAC GAAAACTAA GAATCAATIT GAATCAGAT ACAAAITCAT ATTCATCTC CAITTTCTAA TCAACTCCA ATTCATCGGG TAATTTAAAT TCCAGTTATT TTAATCTACT GAACATAGAC TCCATGCTAG ATGATTACTG AAGATGAGAT TACCACGATT AAGCTTAGAA AAGTAACTGT GATTGGGTTT GTTAAACTTG CTTTITGATIT CTTTAGTAA CTTGAGTCTA TGTTTAAGTA TAAGATTGAG GTAAAGATTA AGTTTGAAGT TAGATGCCC ATTAATTTTA AGGTCAATAA AATTAAGTGA CTTGTATCTG AAGTACGATC TACTAATGCA
801	ValSerSer Asp LeuLeuLeu Asn AspAsp Asp Asp Thr AsrLeuSer Arg ArgArg Phe Ser Asp Val Ile ThrAsnGln PhePro Ser MetThr Asn SerArgAsn Ser Ile Ser His SerLeu Asp LeuTyrAsnHis ProLys Ile AsrPro Ser AsnArgAsn Thr AsrLeu Asn Ile Thr Thr AsrBerThrSer
	TTCAGTGTAT CTCTTATTGA ATGATGATGA TGATGACACT AATTTATCAC CCGGAAGATT TAGCGACGTT AATCAAAACC AATTTCCGCT AATGACAAAT TCGAGGAAT CTATTCTCA CTCTTTGGAC CTTTGAACC ATCCGAAAT TAATCCAAAG AATAGAAATA CAATCTCAA TATCACTACT AATTTACTCT AAGATCACTA GAGAAATACCT TACTACTACT ACTACTGTGA TTAATATGTE TAAACTCTAA ATCGCTGCAA TATGTTTGG TTAAGGCGAG TTAGCTTITA AGCTCCTTAA GATAAAGAT GAGAAACCTG GAACCTTGG TAGGCTTTTA ATTAGGTTCC TTATCTTTAT ATAGTATGA TTAAGATGGA
1001	SerSerSer Asn AlaSer Pro AsnThr Thr Thr MetAsn Ala AsnAla Asp SerAsnIle Ala GlyAsnPro LysAsnAsn AspAlaThr Ile AspAsnGlu LeuThr Gln Ile LeuAsnGlu TyrAsnMet AsrPheAsn AspAsrLeu Gly ThrSer Thr Ser Gly Lys AsrLysSer Ala CysPro Ser SerPheAsp
	CAAGTTCOAA TGCAAGTCCG AATACCACTA CTATGAACGC AAATGCAGAC TCAAAATATT CTGGCAACCC GAAAAACAAT GAGCTACCA TAGACAATGA GTTGACACAG ATTTCTAACG AATATAATAT GAATCTCAAC GATTAATTTGG GCACATGCCA TTCTGGCAAG ATCAATCTG CTTGCCCAAG TTCTTTTGA GTTCAAGGTT ACGTTCAGCC TTATGSGAT GATACTGCG TTTACGCTG AGTTTATAAC GACCGTGGGG CTTTITGTTA CTGCGATGGT ATCTGTACT CAATGTGTC TAGAAATTC TTATATTATA CTTGAGGTTG CTATTAAAC CBTGTAGTG AAGACCGTTC TTGTTTAGAC GAACGGGTTC AAAAACTA
1201	AlaAsnAla Met ThrLys Ile AsrPro Ser GlnGlnLeu Gln GlnGln Leu AsnArg Val GlnHisLys Gln LeuThr Ser SerHis Asn AsrBerSer Thr AsrMetLys SerPheAsn SerAspLeu Tyr SerArg Arg GlnArg Ala SerLeuPro Ile Ile AspAsp SerLeu Ser TyrAspLeu Val AsrLysGln
	GCCAAATGCTA TGACAAAGAT AAATCCAAAT CAGCAATTAC AGCAACAGCT AAACCGAGTT CAACACAAGC AGCTCACCTC GTCACATAAT AACAGTAGCA CTAACATGAA ATCCTTCAAC AGCGATCTTT ATTCAAAGAG CCAAAAGACT TCTTTACCCA TAATCGATGA TTCCTAAGC TAGCACCTGG TTAATAAGCA CGGTTACGAT ACTGTTTCTA TTTAGTTTCA GTCGTTAATG TCGTGTGCGA TTGCGCTCAA GTTGTGTTGC TCGAGTGGAG CAGTGTATTA TTGTCACTGT GATTTACTT TAGGAATTTG TCGTAGAAA TAGTCTTTC CGTTTCTCGA AGAAATGGGT ATTAGTACT AAGTGAITCG ATGCTGGACC AATTTACTGT
1401	GlnAspGlu Asp ProLysAsnAsp MeLeu Pro AsrBer Asn LeuSerSer Ser GlnGln Phe Ile Lys Pro SerMetIle Leu SerAspAsn AlaSer Val Ile AlaLys Val AlaThr Ile GlySer Ser AsrAspMetPro PheLeu Thr GluGlu Gly GluGlnAsn Ala AsrBer Thr ProAsnPhe AspLeuSerIle
	GAGTGAAGAC CCCAAGACG ATATGCTGCC GAATTCAAAT TTGAGTTCAI CTCACAAIT TATCAAAACC TCTATGATTC TTTCAGACAA TGCGTCCGTT ATTGCGAAG TGCGGACTAC AGGCTGTAGT AATGATATGC CATTTTGGAC AGGGAAGGT GAACAAAATG CTAATTTCTAC TCCAAAATTC GATCTTCCA CCTACTCTG GGGTCTTGC TATACGACGG CTTAAGTTTA AACTCAAGTA GAGTGTAA ATAGTTTGGC AGTACTAAG AAGTCTGTT ACGCAGGCAA TACGCTTTC ACCGCTGATG TCGGAATCA TTACTATAG GTAAAACTG TCTCCTCCA CTTGTTTTAC GATTAAGATG AAGTTTAAAG CTAGAAAGGT
1601	IleThrGln Met AsrMetAla ProLeuSer Pro AlaSer Ser SerSer Thr SerLeuAla Thr AsrHis Phe TyrHis His PheProGln Gln GlyHis His ThrMetAsn SerLys Ile Gly SerSer Leu ArgArg Arg LysSerAla Val ProLeu Met GlyThr Val ProLeuThr Asn GlnGln Asn AsnIle Ser
	TCATCTCAAAT GAATATGGCT CCAITATCGC CTGCAATCAT ATCTCCAGC TCTCTGCAA CAATCAITTI CTATCACCAT TTCCAGACG AGGGTACCA TACCATGAAC TCTAAAATCC GTTCTCCCT TCGAGGCGG AACTCTGCTG TCCCTTGAAT GGGTACGGT CCGCTTCAA AATCAAAAA TAATAAAGC AGTGAATTTA CTTATACCGA GGTAAATAGCG GACGTAGTAG TAGGAGGTGC AAGAACSTT GTTATGATAA GATATGGSTA AAGGTTGTGC TCCAGTGGT ATGGTACTTG AGAATTTAGC CAAGAAAGGA AGCTCCGCC TTCAGAGAC ACGGAAACTA CCCATGCCAC GCGGAATGT TAGTTGTITT ATTATATTGC
1801	SerSerSer Val AsrBer Thr GlyAsn Gly AlaGlyVal Thr LysGlu Arg ArgPro Ser TyrArgArg Lys AlaMet Thr ProSer Arg ArgSerSer Val Val Ile Glu SerThr Lys GluLeuGlu Glu LysProPhe HisCys His Ile CysPro Lys SerPheLys ArgSer Glu HisLeuLys Arg His ValArg
	AGTAGTAGT TCACTCAAC TGGCAATGGT GCTGGGGTTA CGAAGGAAAG AAGGCCAAT TACAGGAGAA AACTATGAC ACCGTCAGG AATCAAGTG TCGTAAATGA ATCAACAAG GAATCTGAGG AAAAAAGGT CCACTGTAC ATTGTCCA AGAGCTTAA CCGCAGCGAA CATTGAAAA GGCATGTAG TCAATCACAC AGTTGAGTGG ACCGTTAQCA CGACCCCAAT GCTTCCCTTC TTCCGTTTCA ATGCTCCTCT TTCCGTACTG TGCCAGGCTT TCTAGTTTAC AGCAITATCT TAGTTGTTTC CTTGAGCTCC TCTTTGGCAA GGTGACAGTG TAAACAGGTT TCTCGAATTT CCGCTGCTT GTAACCTTIT CCGTACACTC
2001	ArgSer Val His SerAsrGlu Arg ProPhe Ala CysHis Ile CysAspLys Lys PheSer Arg SerAspAsn LeuSerGln His Ile Lys Thr HisLys Lys His GlyAsp Ile
	ATCTGTTTCA TCAACGAAC GACCAITTTG TTGTCAATA TCGATAAGA AATTTAGTAG AAGCGATAAT TTGTCCGAC ACATCAAGC TCAAAAAAA CATGGAGACA TT TAGCAAGTG AATTTGCTTG CTGGTAAAG AACAGTGTAT AGGCTATCT TTAATCATC TTCCGTATTA AACCGGTTG TGTAGTCTG AATATTTTTT GTACCTCTGT AA

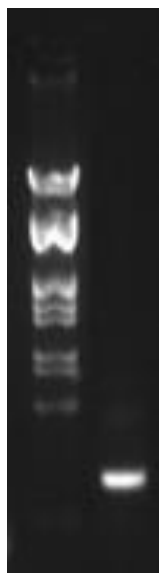
Εικόνα 4.2: Αλληλουχία του γονιδίου MSN2 που φέρει τη μετάλλαξη Ser625Ala. Εμφανίζεται και η αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Με κίτρινο φαίνεται η εισαγωγή της μετάλλαξης.

Το προϊόν της PCR1 είναι ένα μικρό τμήμα DNA μεγέθους 248 ζεύγη βάσεων το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη (εικ. 4.3) Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR1. (εικ. 4.3).



Εικόνα 4.3: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR1 σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 και 2 βρίσκεται το προϊόν της PCR1 ενώ στη θέση 3 βρίσκεται ο μάρτυρας.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR1 με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ελέγχθηκε η καθαρότητά του με νέα ηλεκτροφόρηση (εικ. 4.4).



Εικόνα 4.4: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR1 σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ το καθαρό προϊόν της PCR1 βρίσκεται στη θέση 2..

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το τμήμα DNA που προέκυψε, από την πρώτη pcr, ως τον έναν εκκινητή (<<megaprimer>>) έγινε προσπάθεια λήψης ολόκληρου του γονιδίου MSN2.

Η μέθοδος <<megaprimer>> που εισήχθη από τους Kammannetal και συνεργάτες (Kammannetal., 1989), και τροποποιήθηκε μεταγενέστερα από τους Sarker και Sommer (Sarkarand Sommer 1990, 1992) και Landt και συνεργάτες (Landt et al., 1990), φαίνεται να είναι ιδιαίτερα απλή και αποδοτική. Αποτελείτε από δύο διαδοχικές PCR όπου το προϊόν της πρώτης PCR χρησιμοποιείτε ως εκκινητής <<megaprimer>> για τη δεύτερη PCR. Έτσι λοιπόν, για τη δεύτερη PCR χρησιμοποιούμε πάλι ως εκμαγείο το πλασμίδιο pUC19- MSN2 όπου βρίσκεται κλωνοποιημένο το αγρίου τύπου γονίδιο MSN2 και εφαρμόζουμε PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές (πίν. 4.2).

Πίνακας 4.2: Αντιδραστήρια για την PCR2.

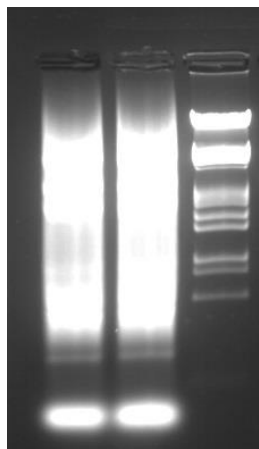
pUC19- MSN2 for pcr	10μl
MSN2-pcr1- R	8μl
pstI- MSN2- F	1.5μl
dNTP'S	1.5μl
HIFI	1μl
5x KAPA HIFI FID	10μl
H ₂ O	18μl
Σύνολο	50μl

Πρόγραμμα PCR2:

1. 95 °C	3min	
2. 98 °C	20sec	
3. 58 °C	15sec	
4. 72 °C	1min 30sec	Βήμα 2, #25
5. 72 °C	5min	
6. 4 °C	∞	

Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι να ληφθεί ολόκληρο το γονίδιο της MSN2 φέροντας την επιθυμητή μετάλλαξη. Παρόλο που έγιναν πολλές προσπάθειες δοκιμάζοντας διαφορετικές κάθε φορά συγκεντρώσεις εκμαγείου, εκκινητών, καθώς και διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίες υβριδοποίησης, χρόνοι υβριδοποίησης, χρόνοι

επιμήκυνσης), δεν κατέσται δυνατή η λήψη του επιθυμητού προϊόντος. Στην Εικ. 4.5 παρουσιάζεται ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της PCR.



Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στις θέσεις 1 και 2 βρίσκεται το προϊόν της PCR2 ενώ ο μάρτυρας βρίσκεται στη θέση 3.

4.1.2 Μέθοδος των τριών διαδοχικών PCR

Λόγω αποτυχίας της δημιουργίας του μεταλλαγμένου MSN2 με τη μέθοδο του Mega primer έγινε προσπάθεια δημιουργίας του με τη μέθοδο των τριών διαδοχικών PCR. Σε αυτή τη περίπτωση η μεθοδολογία λήψης της πρώτης PCR καθώς και το προϊόν της παραμένει ως έχει. Η δεύτερη PCR επιτελείται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γονίδιο στο οποίο είναι επιθυμητή η εισαγωγή της μετάλλαξης (MSN2). Στην προκειμένη περίπτωση ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το pUC19-MSN2. Ως ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) χρησιμοποιείται ολιγονουκλεοτίδιο MSN2-Ser-625-Ala-R το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Ως εμπρόσθιος εκκινητής (forward primer) χρησιμοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο pstI-MSN2-F το οποίο υβριδοποιείται στην αρχή του γονιδίου στόχου και φέρει ανοδικά στο 5' άκρο του κατάλληλη αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση για μετέπειτα κλωνοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου (PCR Primer- A laboratory manual (1995)) (Πιν. 4.3).

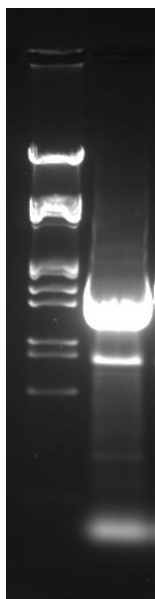
Πίνακας 4.3: αντιδραστήρια για την PCR2.

pUC19- MSN2 for pcr	4μl
5x KAPA HIFI FID	10μl
MSN2-Ser-625-Ala R	1.5μl
pstI- MSN2- F	1.5μl
dNTP's	1.5μl
HIFI	1μl
H ₂ O	30.5μl
Σύνολο	50μl

Πρόγραμμα PCR2:

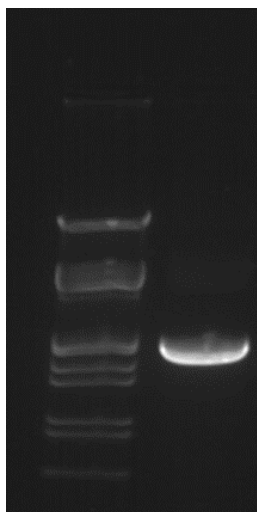
1. 95°C	3min	
2. 98°C	10sec	
3. 56°C	10sec	
4. 72°C	1min 20sec	Βήμα 2, #25
5. 72°C	5min	
6. 4°C	∞	

Το αποτέλεσμα από την παραπάνω διαδικασία είναι η δημιουργία ενός δεύτερου τμήματος, του υπολοίπου, της MSN2 το οποίο επίσης φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Στο γονίδιο της MSN2, (εικ. 4.1, 4.2) ο reverse primer (MSN2_Ser-625-Ala R) υβριδοποιείται στην βάση 1883 ενώ ο forward primer, ο οποίος είναι ο pstI-MSN2, στην βάση 1. Το τμήμα DNA που προκύπτει έχει μέγεθος 1883 ζευγών βάσεων. Η επιτυχία της λήψης του συγκεκριμένου τμήματος ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, (εικ. 4.6).



Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR2A σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 το προϊόν της PCR2A.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR2 με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ελέγχθηκε η καθαρότητά του με νέα ηλεκτροφόρηση, (εικ. 4.7).



Εικόνα 4.7: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR2A σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 το καθαρισμένο προϊόν της PCR2A.

Προκειμένου να ληφθεί ολόκληρο το γονίδιο της MSN2 το οποίο να φέρει τη μετάλλαξη Ser625Ala, (MSN2-Ser625Ala) εφαρμόστηκε τρίτη PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα προϊόντα της πρώτης και της δεύτερης PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι pstI-MSN2-F και BamHI-MSN2-R οι οποίοι υβριδοποιούνται στα άκρα του γονιδίου της MSN2 και φέρουν θέσεις αναγνώρισης των αντίστοιχων περιοριστικών ενδονουκλεασών. (πίνακας 4.4)

Πίνακας 4.4: αντιδραστήρια για την PCR3.

DNA*	1μl
5x KAPA HIFI FID	10μl
BamHI- MSN2- R**	1.5μl
pstI- MSN2- F**	1.5μl
dNTP's	1.5μl
HIFI	1μl
H₂O	33.5μl
Σύνολο	50μl

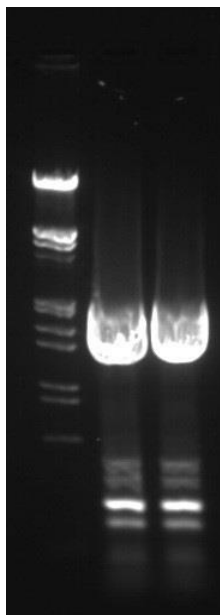
Πρόγραμμα PCR3:

1. 95 °C	3min	
2. 98 °C	10sec	
3. 60 °C	10sec	
4. 72 °C	1min 10sec	
5. 98 °C	10sec	
6. 58 °C	10sec	
7. 72 °C	1min10sec	Βήμα 5, #4
8. 98 °C	10sec	
9. 58 °C	10sec	
10. 72 °C	1min10sec	Βήμα 8, #25
11. 72 °C	5min	
12. 4 °C	∞	

* DNA: 1μl PCR1 + 1μl PCR2A + 18μl H₂O

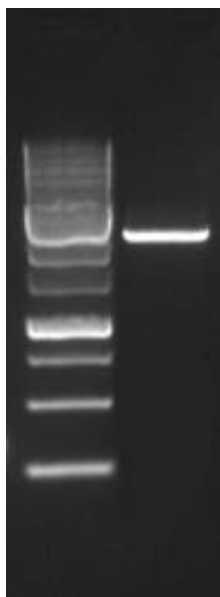
** Οι primers μπαίνουν μετά το τέλος του 5 κύκλου του βήματος 7 στο πρόγραμμα της PCR3.

Κατά την διάρκεια των 5 πρώτων 5 κύκλων δημιουργείται το πλήρες MSN2 γονίδιο το οποίο φέρει τη μετάλλαξη Ser625Ala. Στη συνέχεια η προσθήκη των εκκινητών συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό του νέοσυντιθέμενου γονιδίου MSN2-Ser625Ala, το μέγεθος του οποίου είναι 2112 ζεύγη βάσεων. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του μείγματος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία του και να κοπεί το τμήμα της αγαρόζης όπου εντοπίζεται το προϊόν της PCR. (εικ. 4.8).



Εικόνα 4.8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος της PCR3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στη θέση 2 και 3 το προϊόν της PCR3

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR3 με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου πλέον γονιδίου MSN2-Ser625Ala προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα του (Εικ. 4.9), όπου όπως φαίνεται, εμφανίζεται απολύτως καθαρό.



Εικόνα 4.9: Ηλεκτροφόρηση καθαρού προϊόντος της PCR3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ το καθαρισμένο προϊόν της PCR3 βρίσκεται στη θέση 3.

4.2 Κλωνοποίηση του MSN2-625.

Μετά τη δημιουργία του MSN2-Ser625Ala 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. 4.5. Ακολουθεί καθαρισμός με τη χρήση του *Nucleospin PCR clean up gel extraction kit*. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον πλασμιδιακό φορέα pUC19.

Πίνακας 4.5: 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

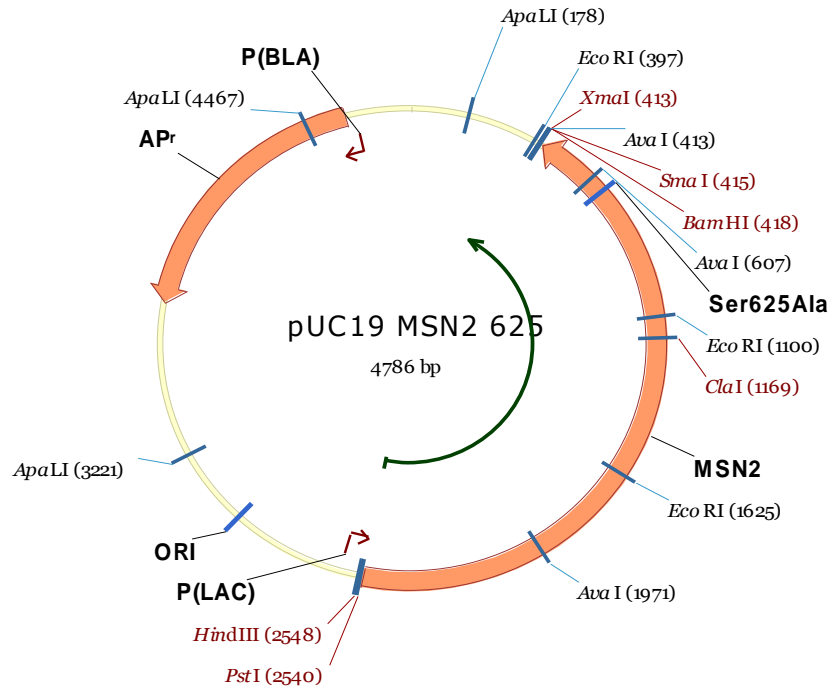
Η ακεραιότητα των προϊόντων της πέψης ελέγχθηκε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ακολούθησε η αντίδραση συρραφής των δυο αυτών τμημάτων (ligation) (Πίν. 4.6). 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_Ser625Ala (λευκές αποικίες) από εκείνα που μετασχηματίστηκαν με το pUC19 (μπλε αποικίες).

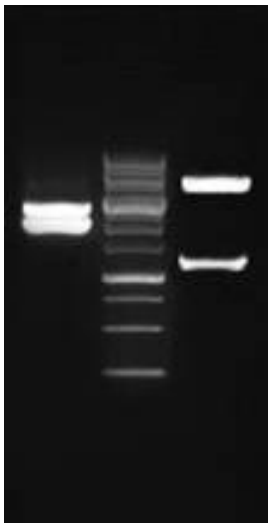
Πίνακας 4.6: Αντίδραση συρραφής πλασμιδιακού φορέα ρUC19 (PstI/BamHI). Επώαση στους 25°C για 2 h.

MSN2_625 (PstI/BamHI) (150 ng)	3 μ l
ρUC19 (PstI/BamHI) (50 ng)	2 μ l
10x Ligation Buffer	2 μ l
Ligase	1 μ l
H ₂ O	12 μ l
Σύνολο	20 μ l

Μικρός αριθμός άσπρων αποικιών χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου LB+Αμπικιλίνη (100 μ g/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 (Εικ.. 4.10) αναμένουμε τα DNA που εμφανίζουν δύο μπάντες μεγέθους 2122bp ζεύγων βάσεων που αντιστοιχεί στο MSN2_Ser625Ala και 2664 ζεύγων βάσεων που αντιστοιχεί στο ρUC19 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_625, και 3558bp που αντιστοιχεί στο ρUC19 μαζί με το υπόλοιπο τμήμα του MSN2_625 (Εικ. 4.10-4.11). Τα βακτηριακά κύτταρα από τα οποία προήλθε το εν λόγω DNA φυλάσσονται σε 20% γλυκερόλη σε θερμοκρασία -80°C.



Εικόνα 4.10.: Πλασμιδιακός χάρτης του pUC-19_MSN2(633).



Εικόνα 4.11: 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 pUC19-MSN2_625 και απομόνωση του από τα κύτταρα με τη χρήση του *Nucleospin Plasmid kit*.

4.3 Ενίσχυση του MSN2-625

Προκειμένου το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN2 να αποκτήσει τις κατάλληλες αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η εισαγωγή του στο γενομικό DNA της ζύμης μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, έλαβε χώρα μια ακόμα αντίδραση PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pUC19_MSN2_625 και ως εκκινητές οι MSN2-rec-F και MSN2-R (πίν. 4.7). Ως αποτέλεσμα (PCR4) λαμβάνεται το μεταλλαγμένο γονίδιο της MSN2 το οποίο έχει ίδια άκρα με την περιοχή που εντοπίζεται στο γενομικό DNA της ζύμης (αγρίου τύπου).

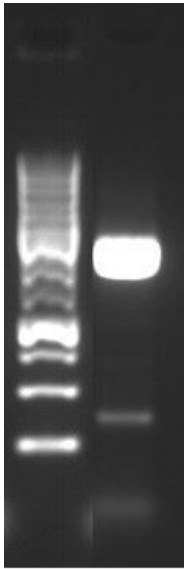
Πίνακας 4.7: Αντιδραστήρια για την PCR4.

DNA (pUC19_MSN2_625) (1ng)	2μl
5x KAPA HIFI FID	10μl
MSN2-rec-F	1.5μl
MSN2-R	1.5μl
dNTP's	1.5μl
HIFI	1μl
H ₂ O	32.5μl
Σύνολο	50μl

Πρόγραμμα PCR4:

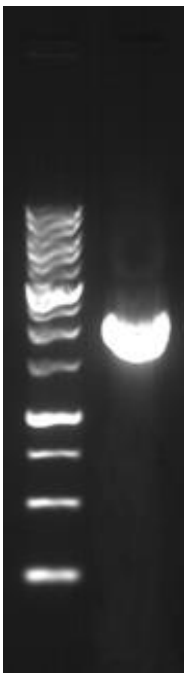
1.	95 °C	3min	
2.	98 °C	10sec	
3.	56 °C	10sec	
4.	72 °C	1min 20sec	Βήμα 2, #25
5.	72 °C	5min	
6.	4 °C	∞	

Το προϊόν της PCR που ελήφθη (εικ. 4.12) είναι ~ 2100 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 4.12: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος της PCR4 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ το προϊόν της PCR4 βρίσκεται στη θέση 4.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης PCR4 με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και ελέγχθηκε η καθαρότητά του με νέα ηλεκτροφόρηση, (εικ. 4.13).



Εικόνα 4.13: Ηλεκτροφόρηση του καθαρού προϊόντος της PCR4 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ το καθαρό προϊόν της PCR4 βρίσκεται στη θέση 2.

4.4 Κατασκευή του W303-1a-ΔMSN2::URA3

4.4.1 Εισαγωγή του URA3 σε κύτταρα ζύμης

Το αγρίου τύπου MSN2 γονίδιο πρέπει να αντικατασταθεί από το μεταλλαγμένο MSN2_625. Επειδή η διαγραφή του αγρίου τύπου και η ταυτόχρονη εισαγωγή του μεταλλαγμένου δεν μπορεί να γίνει σε ένα στάδιο λόγω της μη ικανότητας ανίχνευσης της επιτυχούς αντικατάστασης, επιλέχθηκε η αντικατάσταση να γίνει σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται η διαγραφή του αγρίου τύπου και αντικατάσταση του από ένα γονίδιο αναφοράς και στο δεύτερο στάδιο η αντικατάσταση του γονιδίου αναφοράς από το μεταλλαγμένο MSN2. Η αντικατάσταση γονιδίων στη ζύμη γίνεται με την εισαγωγή του τμήματος DNA που επιθυμείται να αντικαταστήσει το γονίδιο στόχο μέσω του μετασχηματισμού των κυττάρων ζύμης και εν συνεχεία μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού που επιτελείται αυθόρμητα στη ζύμη υπό την προϋπόθεση ότι το εισαχθέν στην ζύμη τμήμα DNA φέρει ανοδικά και καθοδικά, άκρα, μήκους ~40 ζευγών βάσεων όμοια με αυτά που βρίσκονται ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου στόχου στο γενομικό DNA. Προκειμένου να επιτευχθεί λοιπόν η αντικατάσταση του αγρίου τύπου MSN2 από το μεταλλαγμένο, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος W303-1a. Στο στέλεχος αυτό έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο URA3. Αυτό καθιστά αδύνατη την ανάπτυξή του σε περιβάλλον όπου απουσιάζει η ουρακίλη, καθώς δεν μπορεί να τη συνθέσει από μόνο του. Σε πρώτη φάση θα εισαχθεί στα κύτταρα ζύμης το γονίδιο URA3 με σκοπό την απαλοιφή του αγρίου τύπου MSN2. Με τη μέθοδο της PCR (Πιν.4.8) χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές, γίνεται ενίσχυση του γονιδίου URA3 και το προϊόν της PCR είναι το γονίδιο URA3 του οποίου τα άκρα είναι ίδια με αυτά του MSN2 αγρίου τύπου. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε γενομικό DNA το οποίο έχει απομονωθεί από στέλεχος ζύμης το οποίο έχει λειτουργικό URA3 γονίδιο.

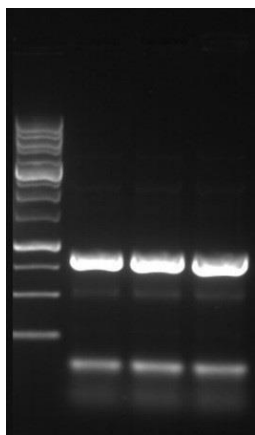
Πίνακας 4.8: αντιδραστήρια για την PCR-URA3.

Genomic DNA από στέλεχος με λειτουργικό το URA3 γονίδιο	3μl
MSN2_URA3_Forward	1.5μl
MSN2_URA3_Reverse	1.5μl
2x Kapa HiFi HotStart ReadyMix	25μl
H ₂ O	19μl
Σύνολο	50μl

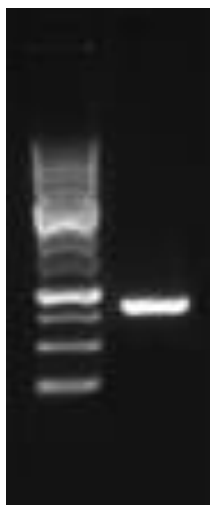
Πρόγραμμα PCR-URA3:

1. 95 °C	3min	
2. 95 °C	20sec	
3. 58 °C	15sec	
4. 72 °C	1min	Βήμα 2, #30
5. 72 °C	5min	
6. 4 °C	∞	

Το μέγεθος του ενισχυμένου URA3 είναι 900 ζεύγη βάσεων (εικ. 4.14). Ακολούθησε καθαρισμός τομή του πηκτώματος αγαρόζης στο σημείο που εντοπίζεται το προϊόν της PCR, καθαρισμός με τη χρήση του *Nucleospin PCR cleanup gel extraction kit* και εκ νέου ηλεκτροφόρηση ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητά του (εικ. 4.15).



Εικόνα 4.14: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR-URA3 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ενώ στις θέσεις 2 έως 4 βρίσκεται το προϊόν της PCR-URA3 χωρισμένο σε τρία ίσα μέρη.



Εικόνα 4.15: 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 η ουρακίλη (Synthetic Complete – Uracil (SC-U)) σε θερμοκρασία 30°C. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν πιθανόν να είναι αυτά που έχει γίνει η αντικατάσταση του αγρίου τύπου MSN2 από το URA3, καθώς αυτά είναι που έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν απουσία ουρακίλης.

4.4.2 Έλεγχος επιτυχούς αντικατάστασης του αγρίου τύπου MSN2.

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 πολυμεράση. Ως εκκινήτες χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη PCR (check PCR (1)) οι pstI-MSN2-Forward και BamHI-MSN2-Reverse και στη δεύτερη (check PCR (2)) οι pst-MSN4-Forward και BamHI-MSN4-Reverse. Τα αντιδραστήρια της check PCR (1) και check PCR (2) για τον έλεγχο του πρώτου μετασχηματισμού φαίνονται στους πίνακες 4.9 και 4.10 αντίστοιχα.

Πίνακας 4.9: Αντιδραστήρια για την check PCR (1) για τον έλεγχο του πρώτου μετασχηματισμού.

DNA	4μl
MgCl ₂	2μl
pstI-MSN2-F	1μl
BamHI-MSN2-R	1μl
Taq polymerase	0.5μl
5x Buffer C	5μl
dNTP's	1μl
H ₂ O	10.5μl
Σύνολο	25μl

Πίνακας 4.10: Αντιδραστήρια για την check PCR (2) για τον έλεγχο του πρώτου μετασχηματισμού

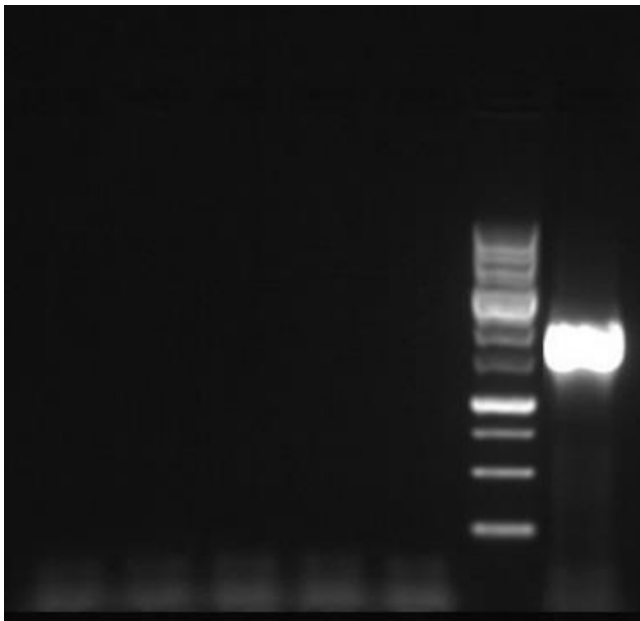
DNA	4μl
MgCl ₂	2μl
pstI-MSN4-F	1μl
BamHI-MSN4-R	1μl
Taq polymerase	0.5μl
5x Buffer C	5μl
dNTP's	1μl
H ₂ O	10.5μl
Σύνολο	25μl

Πρόγραμμα check PCR (1) και check PCR (2):

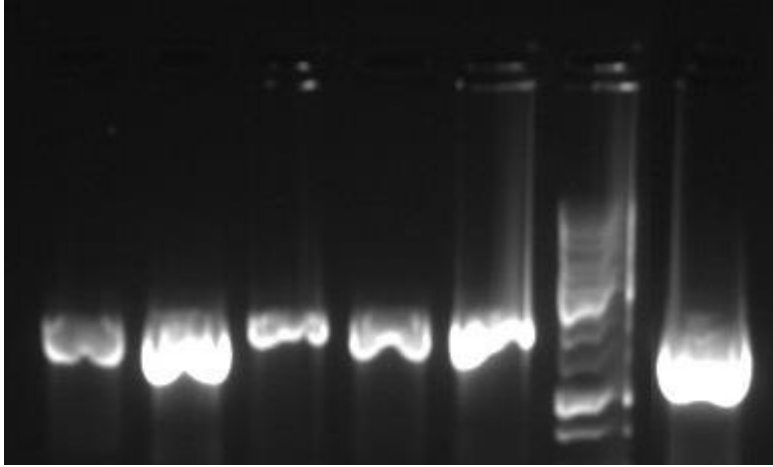
1.	95 °C	5min	
2.	98 °C	10sec	
3.	58 °C	15sec	
4.	72 °C	2min	Βήμα 2, #30
5.	72 °C	1min	
6.	4 °C	∞	

Στην πρώτη PCR (check PCR (1) αναμένεται να εμφανίσει προϊόν μόνο το δείγμα W303-1a το οποίο δεν έχει υποστεί μετασχηματισμό και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ότι

επιτελέστηκε σωστά η PCR. Κατά την δεύτερη PCR (check PCR (2)) αναμένεται να εμφανίσουν προϊόν όλα τα δείγματα σε μέγεθος ~2100bp, και με αυτό τον τρόπο πιστοποιείται η επιτυχής απομόνωση του γενομικού DNA από τα κύτταρα ζύμης. 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. Τα αποτελέσματα γίνονται εμφανή στην ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, εικόνα 4.16 και 4.17. Τα κύτταρα από τα οποία έχει απαληφθεί το MSN2 γονίδιο αγρίου τύπου φυλάσσονται ως stock στους -80°C.



Εικόνα 4.16: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της check PCR (1) με Taq polymerase, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 1^{ου} μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Από τα αριστερά προς τα δεξιά έχουν ηλεκτροφορηθεί: 1^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 2^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 3^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 4^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, 5^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, μάρτυρας, δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης W303-1a).



Εικόνα 4.17: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της *check PCR* (2) με *Taq polymerase*, 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*).

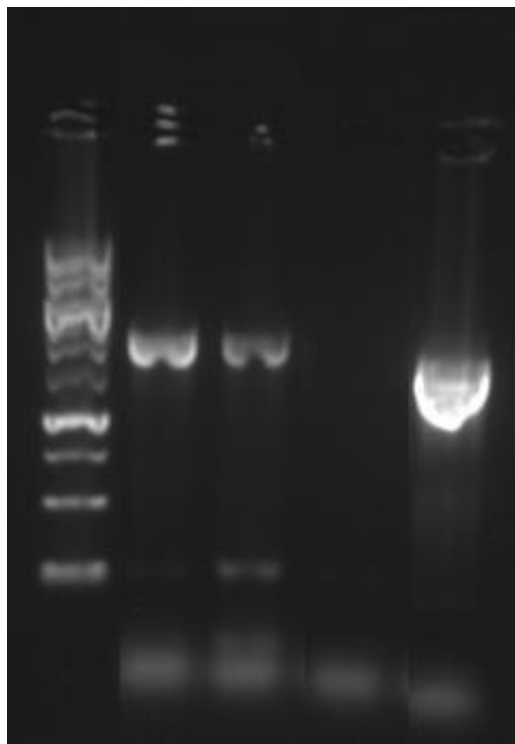
4.5 Κατασκευή του *W303-1a-MSN2_625*

4.5.1 Αντικατάσταση του *URA3* από το *MSN2_625*

Αφού έχει αντικατασταθεί το *MSN2* αγρίου τύπου με το *URA3*, το επόμενο βήμα είναι η εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου *MSN2-625* στη ζύμη (δεύτερος μετασχηματισμός). Η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με τον πρώτο μετασχηματισμό, μόνο που σαν DNA αυτή τη φορά χρησιμοποιείται το *MSN2-625* και το στερεό θρεπτικό μέσο όπου γίνεται η επίστρωση είναι το *SC+URA+5-FOA*. Η επώαση γίνεται στους 30°C. Το 5-φθορο-οροτικό οξύ ((5-Fluoro-orotic acid (5-FOA)) προστίθεται στο θρεπτικό μέσο καθώς είναι απαραίτητος ένας δείκτης για τη σωστή διάγνωση του μετασχηματισμού. Το 5-FOA αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα, δηλαδή αυτά που έχουν το *URA3* τα οποία και το αποικοδομούν. Από αυτή τη διαδικασία παράγεται η τοξική ουσία 5-φθορο-ουρακίλη (5-Fluoro Uracil (5-FU)) με αποτέλεσμα τα κύτταρα να θανατώνονται. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχει πετύχει ο μετασχηματισμός και φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο *MSN2* και δεν παράγουν την πρωτεΐνη *Ura3*, μπορούν να αναπτυχθούν. 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.

4.5.2 Έλεγχος επιτυχούς κατασκευής W303-1a-MSN2_625

Από τις καλλιέργειες αυτές καθώς και από καλλιέργειες των στελεχών W303-1a, και W303-1a-ΔMSN2::URA3, γίνεται απομόνωση του γενομικού DNA τους με τη μέθοδο απομόνωσης γενομικού DNA από κύτταρα ζύμης. Όπως και στον πρώτο μετασχηματισμό έτσι και εδώ θα ελεγχθεί η επιτυχία του με την ίδια μέθοδο PCR. Για την check PCR (F) χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια αντιδραστήρια με την check PCR (1), πίνακας 4.9, με τη μόνη διαφορά ότι για DNA χρησιμοποιήθηκε αυτό που απομονώθηκε από τις καλλιέργειες SC+URA+5-FOA. Οι συνθήκες του προγράμματος της check PCR (F) είναι ίδιες με της check PCR (1). Προϊόν αναμένεται να εμφανιστεί στο δείγμα W303-1a, που φέρει το αγρίου τύπου MSN2 καθώς και στα δείγματα DNA που έχει πετύχει ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Στο δείγμα ελέγχου W303-1a-ΔMSN2::URA3 δεν αναμένεται να εμφανιστεί προϊόν αφού φέρει το URA3 εντός του γονιδιώματος της ζύμης και όχι το MSN2 (Εικ. 4.18). Τα κύτταρα ζύμης των θετικών δειγμάτων όπου ουσιαστικά έχουν δεχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο MSN2-625 φυλάσσονται στους -80°C ως stock.



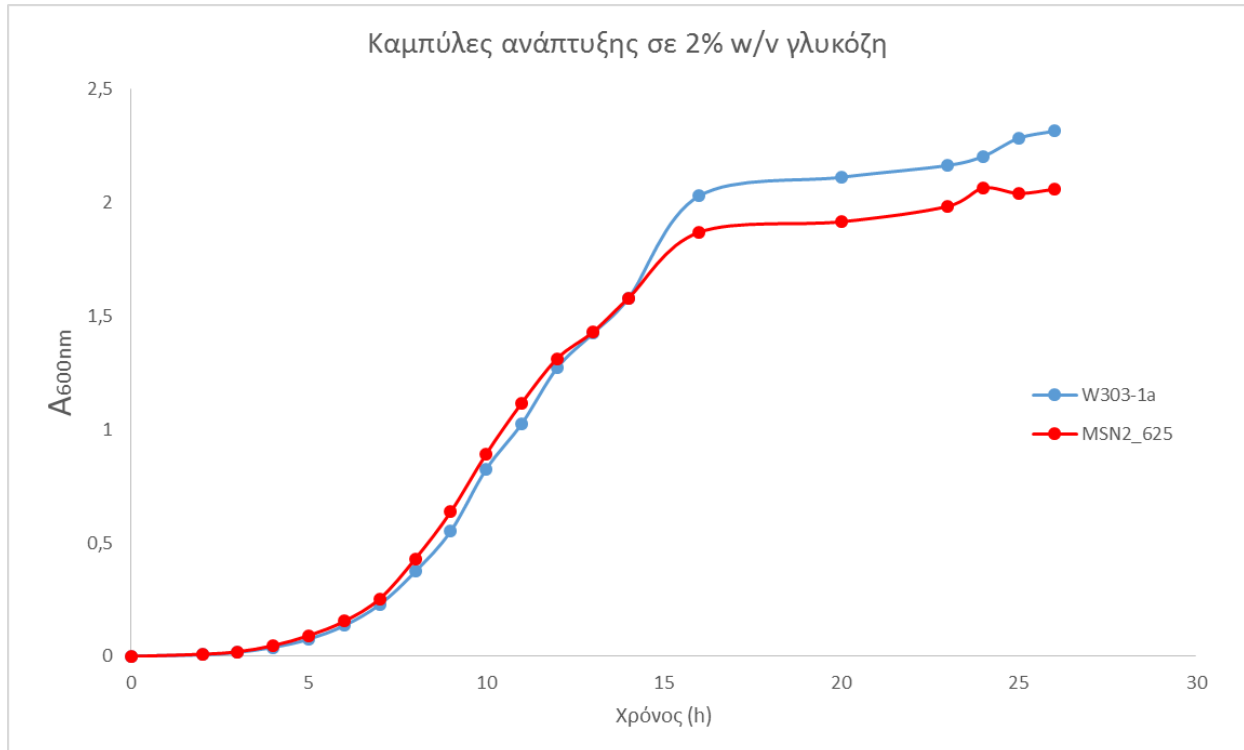
Εικόνα 4.18 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της check pcr (F) με Taq polymerase, για τον έλεγχο της επιτυχίας του 2^{ου} μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης. Στη θέση 1 βρίσκεται ο μάρτυρας. Στις θέσεις 2 και 3 βρίσκονται το 3^ο και το 4^ο δείγμα γενομικού DNA μετασχηματισμένης ζύμης, αντίστοιχα. Στη θέση 4 βρίσκεται το δείγμα ελέγχου που περιέχει το γονίδιο URA3 στη θέση του MSN2 εντός του γονιδιώματος της ζύμης ενώ στη θέση 5 βρίσκεται το δείγμα ελέγχου (γενομικό DNA ζύμης w303-1a).

4.6 Μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης σε συνθήκες stress

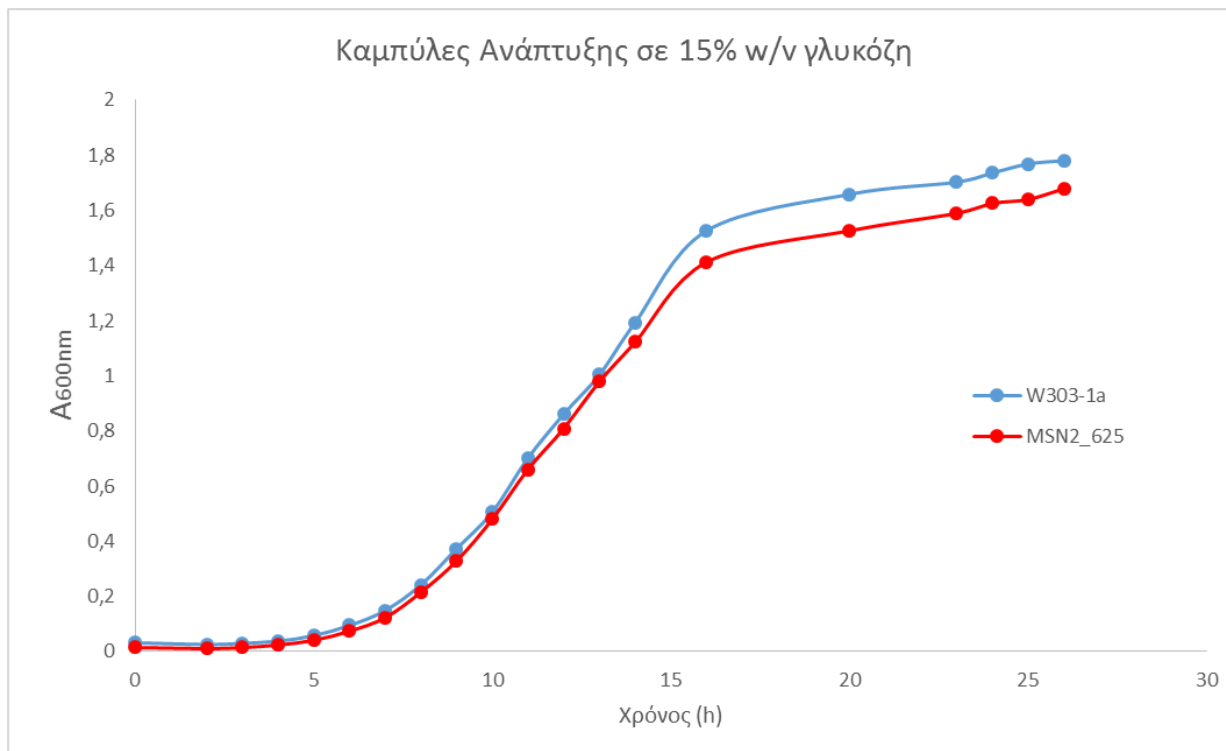
Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης που κατασκευάστηκε (W303-1a-MSN2_625) σε συνθήκες stress, επιλέχθηκαν ως παράγοντες μελέτης η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης καθώς και η παρουσία της αιθανόλης στο περιβάλλον του σακχαρομύκητα.

4.6.1 Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης

Μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους έναντι του αγρίου τύπου και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (Σχ. 4.1, 4.2). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser625Ala επί της πρωτεΐνης MSN2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης, ενώ στη στατική φάση παρατηρείται μία μικρή διαφοροποίηση ως προς τον αριθμό των κυττάρων με το μεταλλαγμένο στέλεχος να υστερεί τόσο στο φυσιολογικό θρεπτικό μέσο όσο και σε αυτό με αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης.



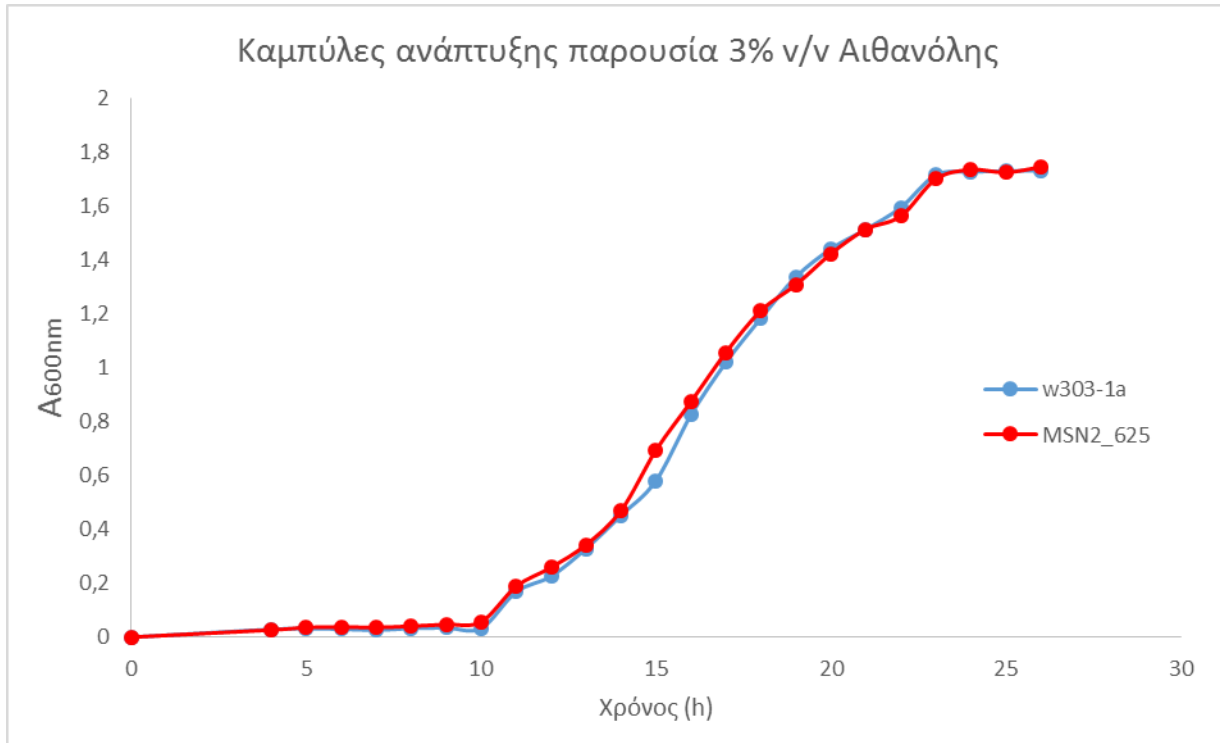
Σχήμα 4.1: καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae*, αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, παρουσία 2% w/v γλυκόζης



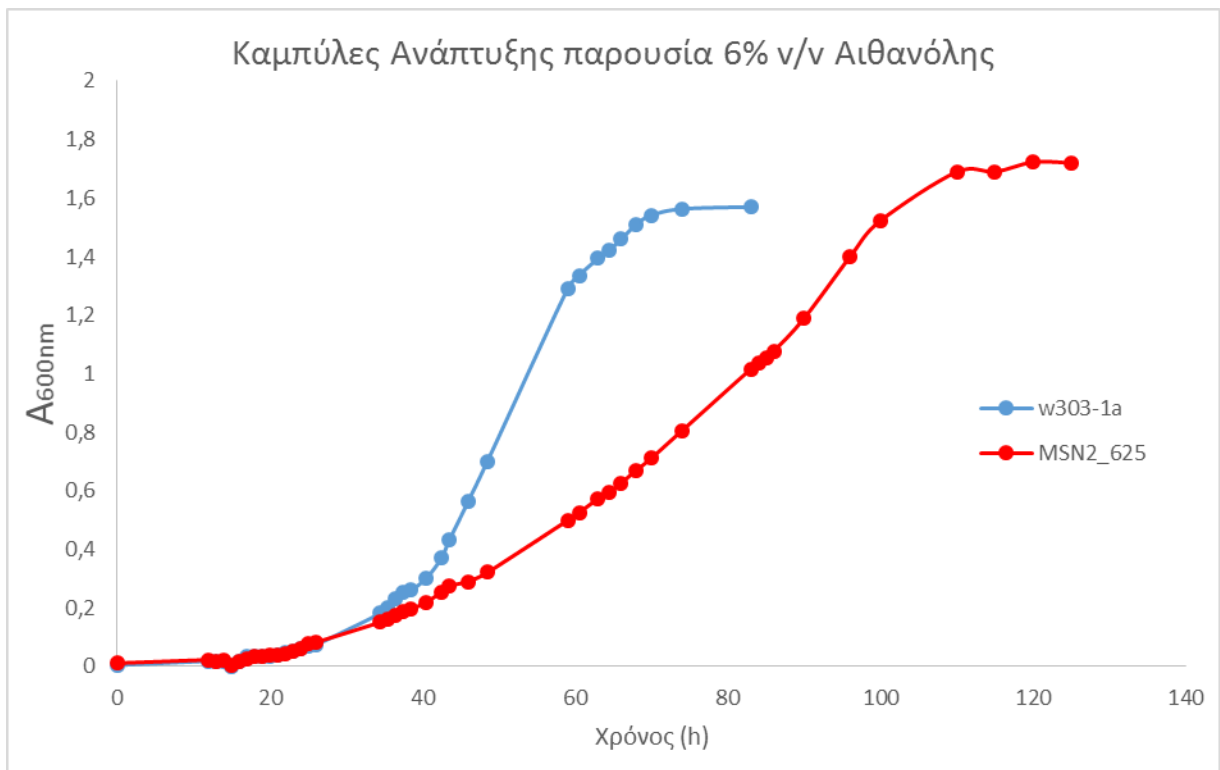
Σχήμα 4.2: καμπύλη ανάπτυξης του *S.cerevisiae* , αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου, παρουσία 15% w/v γλυκόζης

4.6.2 Παρουσία αιθανόλης

Μετά από μελέτη που έγινε για την ικανότητα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης (Σχ. 4.3, 4.4). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετάλλαξη Ser625Ala επί της πρωτεΐνης Msn2 του ζυμομύκητα, δεν μεταβάλλει την ικανότητα ανάπτυξής του σε χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (3%) (σχ.4.3). Σε υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης (6%) φαίνεται ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη επιδρά αρνητικά στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, αλλά πλεονεκτεί στο τελικό αριθμό των ανεπτυγμένων κυττάρων (σχ. 4.4).



Σχήμα 4.3: καμπύλη ανάπτυξης του *S. Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 3% v/v αιθανόλης.



Σχήμα 4.4: καμπύλη ανάπτυξης του *S. Cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο παρουσία 6% v/v αιθανόλης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικά δημιουργήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου MSN2 που φέρει τη μετάλλαξη Ser625Ala, με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR. Κατόπιν, το μεταλλαγμένο γονίδιο της MSN2 κλωνοποιήθηκε και στη συνέχεια εισήχθη σε κύτταρα ζύμης W303-1a_ΔMSN2::URA3, και το στέλεχος που προέκυψε είναι το W303-1a_MSN2_Ser625Ala, μέσω της διαδικασίας του μετασχηματισμού και του ακόλουθου ομόλογου ανασυνδυασμού. Ακολούθησε μια πρωταρχική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξής του σε σχετικά υψηλές τιμές συγκέντρωσης σακχάρου καθώς και σε διάφορες τιμές συγκέντρωσης αιθανόλης.

Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης στο περιβάλλον ανάπτυξης του σακχαρομύκητα δημιουργεί ένα περιβάλλον ωσμωτικού stress στο οποίο ο ζυμομύκητας καλείται να ξεκινήσει την ζύμωση. Όπως αποδείχθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους του σακχαρομύκητα κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και εκθετικής φάσης δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή του φυσιολογικού στελέχους, τόσο σε βέλτιστο θρεπτικό μέσο (2% w/v) όσο και σε θρεπτικό με αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης (15% w/v). Αντίθετα, η κυτταρική ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους φαίνεται μειωμένη κατά τη στατική φάση έναντι αυτής του φυσιολογικού ασχέτως της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο.

Ο έλεγχος σε διάφορες συγκεντρώσεις αιθανόλης προσομοιάζει με το περιβάλλον που βρίσκεται ο ζυμομύκητας κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Σε θρεπτικό μέσο με χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης (3% v/v) παρατηρείται ότι η κυτταρική ανάπτυξη του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα δεν διαφέρει με αυτή του αγρίου τύπου. Όσον αφορά την μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης του μεταλλαγμένου σακχαρομύκητα σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (6% v/v) κατά κύριο λόγο παρατηρείται μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης έναντι του φυσιολογικού. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει διότι στη ζύμη υπάρχει το μεταλλαγμένο γονίδιο της MSN2, το οποίο συμβάλει στον πιθανό εντοπισμό της πρωτεΐνης Msn2 στο πυρήνα του κυττάρου καθώς δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την PKA στο συγκεκριμένο κατάλοιπο Ser. Μία εκ των δράσεων του εντοπισμού της Msn2 πρωτεΐνης στο πυρήνα είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Παρ' όλ' αυτά ο τελικός αριθμός κυττάρων του μεταλλαγμένου στελέχους είναι φανερά πιο αυξημένος από

τον τελικό αριθμό κυττάρων του φυσιολογικού. Προκειμένου να φανεί η πλήρης επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης επί της λειτουργίας του ζυμομύκητα απαιτείται η περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής αιθανόλης η οποία γίνεται αναερόβια.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία:

- 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.
- 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.
- Casey G.P., Ingledew W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Crit Rev Microbiol*, 13, pp. 219–280.
- 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.
- Gancedo, J. M. (2008) The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 11, pp. 4241–4257.
- 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.
- 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

- 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.
- Menggen Ma and Z. Lewis Liu (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:829–845.
- Michael R. Green and Joseph Sambrook (2012). Megaprimer PCR-Based Mutagenesis. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 14, protocol 9.
- 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.
- 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.
- Piper PW (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 134:121–127
- 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.
- 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.
- Santangelo, G. M. (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282

- 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, 1–32
- Tamaki, H. (2007) Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 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, 904–918
- Van Uden N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann Rep Ferment Process*, 8, pp. 11–58.

Ελληνική βιβλιογραφία:

- Βερβερίδης, Φ. (2003). “Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών”, Ηράκλειο Κρήτης