



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Υποβοηθούμενες από το σύστημα CRISPR/Cas9
προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής στον
ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* για την
παραγωγή του διτερπενίου σκλαρεόλη**

CRISPR/Cas9-mediated approaches of metabolic engineering in yeast
Saccharomyces cerevisiae for the production of the diterpene sclareol

ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

ΛΑΡΙΣΑ

2017

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΙΝ.Ε.Β./Ε.Κ.Ε.Τ.Α.)

Χρονική διάρκεια εκπόνησης διπλωματικής εργασίας:
Οκτώβριος 2015 – Μάιος 2016

Τριμελής επιτροπή:

Μακρής Αντώνιος, Ερευνητής Α΄ ΙΝ.Ε.Β./Ε.Κ.Ε.Τ.Α. – Επιβλέπων

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Τ.Β.Β./Π.Θ. – Συνεπιβλέπουσα

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τ.Β.Β./Π.Θ.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αντώνη Μακρή για την ευκαιρία να εργασθώ εργαστήριό του και για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες πρέπει να απονείμω και στην Αγγελική Ανδρεαδέλλη, βοηθό έρευνας στο εργαστήριο του Δρ. Μακρή, για την στήριξη και την καθοδήγησή της, αλλά κυρίως για τεράστια υπομονή και ηρεμία της, στοιχεία που μου ενέπνεαν σιγουριά και έκαναν την καθημερινότητά μου στο εργαστήριο ακόμα πιο ευχάριστη. Τέλος, δε θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω την Δρ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την εξίσου σημαντική συμβολή της, αφού με στήριξε από την πρώτη στιγμή και με καθησύχασε πολλές φορές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	6
Summary.....	8
Σύνοψη βασικών συντομογραφιών	9
Α΄ ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
A. Τερπένια.....	10
A.1. Τερπένια, τερπενοειδή, ισοπρενοειδή: επεξήγηση όρων.....	10
A.2. Κατάταξη τερπενίων και ονοματολογία	11
A.3. Βιοσύνθεση τερπενοειδών	11
A.3.1. Παραγωγή των δομικών μονομερών των ισοπρενοειδών	11
A.3.2. Πολυμερισμός των μονομερών με τη βοήθεια πρενυλικών τρανσφερασών	14
A.3.3. Αναδιάταξη πρόδρομων πρενυλικών μορίων από τερπενικές συνθέσεις	14
A.4. Σημασία ισοπρενοειδών	15
A.5. Ανάγκη για εναλλακτικές μεθόδους παραγωγής τερπενίων	16
B. Μεταβολική μηχανική.....	17
B.1. Βασικές προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής για παραγωγή τερπενοειδών	17
B.2. Επιλογή του κατάλληλου ετερόλογου ξενιστή	18
B.2.1. Μικροβιακές πλατφόρμες παραγωγής τερπενοειδών	19
Γ. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Γ.1. Βασικά χαρακτηριστικά	19
Γ.1.1. Αναλυτικά για τον ομόλογο ανασυνδυασμό.....	20
Γ.2. Ο <i>S.cerevisiae</i> ως ξενιστής για την παραγωγή τερπενοειδών	20
Γ.3. Βιοσύνθεση ισοπρενοειδών στον <i>S.cerevisiae</i> : το μονοπάτι της εργοστερόλης	21
Γ.4. Προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής για παραγωγή σκλαρεόλης στον <i>S.cerevisiae</i>	23
Γ.4.1. Περί σκλαρεόλης	23
Γ.4.2. Παράκαμψη ενδογενών περιορισμών για την σύνθεση διτερπενοειδών.....	24
Γ.4.2.1. Βιοσύνθεση σκλαρεόλης στον <i>S.cerevisiae</i>	24
Δ. Genome editing χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/Cas9.....	26
E. Σκοπός	28
Β΄ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	29
1. Στελέχη ζύμης.....	29
2. Θρεπτικά μέσα	29
3. Πλασμιδιακοί φορείς & κασέτες.....	30
3.1. Φορέας της Cre ρεκομπινάσης	30
3.2. Φορέας του gRNA.....	30

3.3. Φορείς της Cas9.....	30
3.4. Φορείς κασετών και κασέτες	31
4. Πέψη με ένζυμα περιορισμού	32
4.1. Ένζυμα περιορισμού	32
4.2. Κατασκευή κασέτας με γονίδιο-δείκτη με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων.....	33
5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	34
5.1. Περιγραφή μεθόδου	34
5.2. Κατασκευή κασέτας χωρίς δείκτη με τη βοήθεια PCR.....	35
6. Καθαρισμός προϊόντων PCR με φαινόλη/χλωροφόρμιο & κατακρήμνιση με αιθανόλη	36
6.1. Διαδικασία.....	36
6.2. Επεξήγηση μεθόδου	37
7. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
7.1. Βασικές αρχές μεθόδου	37
7.2. Διαδικασία.....	38
8. Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας υγρής καλλιέργειας κυττάρων.....	38
9. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης.....	39
9.1. Διαλύματα	39
9.2. Διαδικασία.....	39
10. Εκτομή γονιδίου-δείκτη από κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP	40
10.1. Σύστημα Cre/loxP	40
10.2. Διαδικασία στον <i>S.cerevisiae</i>	41
11. Εκχύλιση τερπενοειδών με δεκάνιο.....	42
11.1. Διαδικασία.....	42
11.2. Επεξήγηση μεθόδου	43
12. Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρίας μάζας (GC-MS)	43
12.1. Επεξήγηση μεθόδου	43
12.2. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση παραγόμενης σκλαρεόλης με GC-MS.....	44
Γ' ΜΕΡΟΣ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
Στόχευση ρετροτρανσποζονίων του <i>S.cerevisiae</i> για πολλαπλή ενσωμάτωση δομικών στοιχείων έκφρασης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού	45
Ρετροτρανσποζόνια στους ευκαρυώτες και στον <i>S.cerevisiae</i>	45
Στόχευση Ty1-LTRs στον <i>S.cerevisiae</i>	46
I. Πολλαπλή ενσωμάτωση κασέτας Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 στο γένωμα του <i>S.cerevisiae</i> μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού.....	47
Εκτομή γονιδίου-δείκτη από την κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP.....	47

II. Υποβοηθούμενη -από το σύστημα CRISPR/ Cas9- πολλαπλή ενσωμάτωση κασετών στο γένωμα του <i>S.cerevisiae</i>	47
II.a. Χρήση κασέτας Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (κασέτα με δείκτη)	48
Εκτομή γονιδίου-δείκτη από την κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP..	49
II.b. Χρήση κασέτας COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his ⁻) (κασέτα χωρίς δείκτη)	49
II.b.i. Χρήση high copy πλασμιδιακού φορέα για την Cas9	50
Εκδίωξη πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του sgRNA	50
II.b.ii. Χρήση low copy πλασμιδιακού φορέα για την Cas9.....	52
Εκδίωξη πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του sgRNA	53
Παράρτημα: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	54
Δ' ΜΕΡΟΣ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

Περίληψη

Τα τερπένια είναι ισοπρενοειδείς ενώσεις κυρίως φυτικής προέλευσης που βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς, όπως οι βιομηχανίες καλλυντικών, τροφίμων και φαρμάκων. Ωστόσο, η ευρεία χρήση τους συχνά παρεμποδίζεται από την μειωμένη απόδοση, το υψηλό κόστος και τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο που σχετίζεται με την απομόνωσή τους από τα φυτά ή την χημική τους σύνθεση. Αυτοί οι περιορισμοί, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό συνεχώς αυξανόμενου αριθμού ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους, οδήγησαν τους επιστήμονες στην ανάπτυξη προσεγγίσεων μεταβολικής μηχανικής για την αποτελεσματική παραγωγή διαφόρων τερπενίων με τρόπο οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον.

Εφόσον όλοι οι οργανισμοί παράγουν ισοπρενοειδή, οι ενδογενείς τους μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή των επιθυμητών τερπενικών προϊόντων σε ετερόλογους ξενιστές, με την προϋπόθεση ότι τα κατάλληλα εξωγενή γονίδια θα εισαχθούν και θα εκφραστούν επιτυχώς στα κύτταρα του ξενιστή. Χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς ως ετερόλογους ξενιστές έχει επιτευχθεί σταθερή, μαζική παραγωγή διαφόρων τερπενίων σε βιοαντιδραστήρες από χαμηλού κόστους υποστρώματα μέσω ζύμωσης.

Ένας από τους δημοφιλέστερους μικροοργανισμούς για τη βιομηχανική παραγωγή τερπενίων είναι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* λόγω της μεγαλύτερης αντοχής του έναντι αντίξων (υψηλή ωσμωτική πίεση και χαμηλό pH) βιομηχανικών συνθηκών σε σχέση με τα βακτήρια. Σε τροποποιημένα κύτταρα ζύμης, τα πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση των τερπενίων προέρχονται από το μονοπάτι της εργοστερόλης. Η παρουσία οξυγόνου παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ροής των διαφόρων μορίων διαμέσου του συγκεκριμένου μονοπατιού· οι επιθυμητοί μεταβολίτες συσσωρεύονται όταν η διαθεσιμότητα οξυγόνου είναι μειωμένη, συνεπώς απαιτούνται μερικώς ή πλήρως αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης.

Σε αυτή την εργασία γίνεται περαιτέρω διερεύνηση προσεγγίσεων μεταβολικής μηχανικής που έχουν ήδη εφαρμοστεί στον *S.cerevisiae* για την παραγωγή σκλαρεόλης, ενός διτερπενίου που χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία. Προηγούμενες δοκιμές έχουν δείξει ότι η έκφραση της κατασκευής CcCLS-ERG20(F96C) από πλασμιδιακούς φορείς σε κύτταρα ζυμομύκητα αποδίδει χαμηλές αλλά ικανοποιητικές ποσότητες σκλαρεόλης (28mg/L). Στα πειράματα της παρούσας εργασίας, η προαναφερθείσα κατασκευή ενσωματώθηκε -ως τμήμα μιας κασέτας- στο χρωμοσωμικό DNA του *S.cerevisiae* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, προκειμένου να διασφαλιστεί η σταθερή έκφρασή της. Δεδομένου ότι ο *S.cerevisiae* ενσωματώνει εξωγενή γενετικά στοιχεία στο DNA του σχεδόν αποκλειστικά μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού παρέχοντας τη δυνατότητα πραγματοποίησης στοχευμένων γενετικών χειρισμών, επιδιώχθηκε η υπερέκφραση της κατασκευής CcCLS-ERG20(F96C) μέσω πολλαπλής ένθεσης αντιγράφων της κασέτας στα επαναλαμβανόμενα στοιχεία Ty1-LTR του γονιδιώματος της ζύμης. Παρ' όλα αυτά, προέκυψαν στελέχη με χαμηλότερη απόδοση σκλαρεόλης (20,4 mg/L).

Σε μια προσπάθεια να αυξηθεί το ποσοστό ενσωμάτωσης των κασετών στις περιοχές Ty1-LTR και βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η πρόκληση δίκλωνων τομών στο DNA προκαλεί αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού και της ενσωμάτωσης εξωγενών γραμμικών τμημάτων DNA, χρησιμοποιήσαμε την RNA-κατευθυνόμενη νουκλεάση Cas9 και ένα ειδικό μόριο RNA-οδηγό για πρόκληση ρηγμάτων στοχευμένα σε αυτές τις περιοχές. Παρά το ότι στις αρχικές δοκιμές η μέγιστη απόδοση σκλαρεόλης που καταγράφηκε ήταν μόνο 23,3 mg/L, με περαιτέρω τροποποιήσεις της διαδικασίας παρήχθη στέλεχος με απόδοση 986mg/L.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ήταν ενθαρρυντικά, όμως απαιτείται βελτιστοποίηση της διαδικασίας για την λήψη περισσότερων αποικιών αυξημένης απόδοσης από κάθε δοκιμή. Επίσης, με το σύστημα CRISPR/Cas9 θα μπορούσε να στοχευθεί ταυτόχρονα και μια άλλη ομάδα επαναλαμβανόμενων στοιχείων ώστε να υποβοηθηθεί η πολλαπλή ενσωμάτωση μιας διαφορετικής κατασκευής, που ενδέχεται να αυξήσει περαιτέρω την απόδοση σκλαρεόλης. Τέλος, καταδεικνύεται η ανάγκη διερεύνησης μεθόδων για γρήγορη και αποτελεσματική εκδίωξη των πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του RNA-οδηγού, προκειμένου να καταστεί δυνατή η χρήση των τροποποιημένων στελεχών υψηλής απόδοσης σε βιομηχανική κλίμακα.

Summary

Terpenes are plant-derived isoprenoid compounds that have important applications in many fields, such as in the cosmetic, food and drug industries. However, their widespread use is frequently hindered by the low yield, high cost and environmental impact associated with their extraction from plants or their chemical synthesis. These limitations, combined with the discovery and characterization of continuously increasing number of terpene biosynthetic enzymes, has led scientists to develop approaches of metabolic engineering for efficient production of numerous terpenes in an economical and environmentally friendly way.

Since all organisms produce isoprenoids, their endogenous metabolites can be used for the production of the desired terpene products in heterologous hosts, provided that the exogenous terpene biosynthetic genes are successfully inserted and expressed in host cells. The utilization of microorganisms as heterologous hosts has allowed steady, large-scale production of numerous terpenes in bioreactors via fermentation of low-cost substrates.

One of the most popular microorganisms for industrial production of terpenes is the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to its greater tolerance towards harsh industrial conditions (i.e. high osmotic pressure and low pH values) compared to bacteria. In engineered yeast, precursors for the synthesis of terpenes are provided by the ergosterol biosynthetic pathway. The presence of oxygen plays a critical role in determining the flow of molecules through that pathway: the desired metabolites are accumulated when oxygen availability is low, thus partially of fully anaerobic conditions are required.

This dissertation further investigates approaches of metabolic engineering already applied in *S.cerevisiae* for producing sclareol, a diterpene used in perfumery. Previous studies have shown that the expression of the construct CcCLS-ERG20(F96C) from plasmid vectors in yeast cells resulted in low but efficient yields of sclareol (28mg/L). In this study, the construct CcCLS-ERG20(F96C) was integrated -as part of an integration cassette- into yeast's chromosomal DNA via homologous recombination in order to achieve its stable expression. Since the integration of exogenous DNA into *S.cerevisiae*'s chromosomes proceeds exclusively via homologous recombination allowing targeted genetic manipulations, overexpression of the construct was pursued through multiple integration of the cassette into Ty1-LTR repetitive elements of yeast genome. However, the resulting strains displayed lower yields of sclareol (20,4 mg/L).

In an effort to increase integration of the desired cassettes into Ty1-LTR elements and based on the fact that the induction of chromosomal double strand breaks increases homologous recombination rates and integration of exogenous linear fragments of DNA into the genome, we used the RNA-dependent nuclease Cas9 and a tailor-made guide RNA in order to induce targeted breaks inside Ty1-LTR regions. While the maximum sclareol production was only 23,3 mg/L during the early tests, further modifications of the process resulted in the production of an improved strain with yield 986mg/L.

To sum up, the results of this study were promising, but the process has to be optimized in order to obtain more high-yield cell colonies after each test. Also, another group of repetitive elements could be targeted at the same time by the CRISPR/Cas9 system so as to assist multiple integration of a different construct, which may increase sclareol production even more. Last but not least, aiming to the industrial utilization of engineered high-yield strains, methods that allow fast and efficient elimination of both Cas9-expressing plasmids and guide-RNA-expressing plasmids from yeast cells need to be investigated.

Σύνοψη βασικών συντομογραφιών

5-FOA: 5-fluoroorotic acid, 5-φθοροοροτικό οξύ

8OH-CPP: 8-hydroxy copalyl diphosphate

Cas: CRISPR-associated

CcCLS: *Cistus creticus* 8-hydroxy copalyl diphosphate synthase

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA: CRISPR RNA

DMAPP: πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο

DSBs: Double Strand Breaks, δίκλωνες τομές

FPP: διφωσφορικό φαρνεσύλιο

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

GGPP: διφωσφορικό γερανυλ-γερανύλιο

GPP: διφωσφορικό γερανύλιο

gRNA: guide RNA, RNA- οδηγός

HMG-CoA: 3-υδρόξυ-3-μέθυλο-γλουτάρυλο-συνένζυμο A

HR: Homologous Recombination, ομόλογος ανασυνδυασμός

IPP: πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο

LTRs: long terminal repeats, επιμήκεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

MEP: 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, 4-φωσφορική-2-μεθυλοερυθριτόλη

MVA: mevalonate, mevalonic acid, μεβαλονικό

NHEJ: Non-Homologous End Joining, ένωση μη-ομόλογων άκρων

PAM: Protospacer Adjacent Motif

sgRNA: single-guide RNA

SsSCLS: *Salvia sclarea* sclareol synthase

tracrRNA: trans-activating RNA

Α΄ ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Τερπένια

A.1. Τερπένια, τερπενοειδή, ισοπρενοειδή: επεξήγηση όρων

Ο όρος “τερπένιο” προέρχεται από τον όρο “τουρπεντίνη (turpentine)”. Η τουρπεντίνη είναι η λεγόμενη “ρητίνη των πεύκων”, ένα πυκνόρρευστο, κολλώδες, άχρωμο υγρό με ευχάριστο άρωμα που εκκρίνεται από ορισμένα κωνοφόρα δέντρα, όταν τραυματιστούν από διάφορες αιτίες (άνεμο, φωτιά, κεραυνό ή κ.ά.) προκειμένου να καλυφθεί η πληγή και προστατευτεί το δένδρο από υγρασία, σήψη και προσβολή από έντομα. Από χημική άποψη, οι ρητίνες αποτελούν μείγμα ρητινικών οξέων και υδρογονανθράκων που αναφέρονται ως “τερπένια”. Γενικότερα, όμως, τα τερπένια είναι γνωστά ως τα κύρια συστατικά των φυτικών αιθέριων ελαίων και παραδοσιακά θεωρούνταν ως οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το άρωμα, τη γεύση και τις ιδιαίτερες φαρμακολογικές ιδιότητες των φυτών (ή τμημάτων αυτών).

Τα τερπένια καλούνται συχνά και “τερπενοειδή” (ή και αντίστροφα). Οι δύο όροι, αν και χρησιμοποιούνται στην πλειοψηφία της βιβλιογραφίας ως συνώνυμοι, διαφέρουν: ο όρος “τερπένια” αφορά ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα και υδρογόνου, ενώ ο όρος “τερπενοειδή” αναφέρεται σε τροποποιημένα παράγωγα τερπενίων που περιέχουν και άτομα οξυγόνου (*Encyclopaedia Britannica*).

Έτσι, τελικά, ο όρος “τερπένια” περιλαμβάνει περισσότερες από 70.000 οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους [*The Dictionary of Natural Products Online (2015)*: <http://dnp.chemnetbase.com/intro>] που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους (υδρογονάνθρακες, αλκοόλες και γλυκοσίδιά τους, αιθέρες, αλδεΐδες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα και εστέρες. Παρά τις δομικές τους διαφορές, όλες αυτές οι ενώσεις σχετίζονται μεταξύ τους επειδή οι υδρογονανθρακικοί τους σκελετοί αποτελούνται από κατάλοιπα 2-μεθυλοβουτανίου –τα οποία αναφέρονται και με τον λιγότερο ακριβή όρο “ισοπρενικές μονάδες”, (C₅)_n, (εικόνα 4) [ισοπρένιο= 2-μεθυλο-1,3-βουταδιενιο]- με βάση τον κανόνα του ισοπρενίου που προτάθηκε από τους Wallach (1914) και Ruzicka (1953). Γι’ αυτόν το λόγο, τα “τερπένια” ή “τερπενοειδή” μπορεί να αναφέρονται και ως “ισοπρενοειδή”. Ωστόσο, ισοπρενοειδείς ενώσεις δεν παράγονται σχεδόν αποκλειστικά σε φυτικούς οργανισμούς αλλά σε όλους τους ευκαρυώτες, τα αρχαία και τους προκαρυώτες συγκροτώντας μια οικογένεια πληθώρας δευτερογενών αλλά και πρωτογενών μεταβολιτών¹.

¹ Πρωτογενείς μεταβολίτες: ενώσεις που εμπλέκονται άμεσα σε βασικές κυτταρικές διεργασίες και είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την επιβίωση ενός οργανισμού, π.χ. σάκχαρα, αμινοξέα, συνήθη λιπαρά οξέα, νουκλεοτίδια (βασικές δομικές μονάδες) και πολυμερή όλων των προαναφερθέντων (*Mann, 1987*). Στην πλειοψηφία τους είναι όμοιοι μεταξύ των διάφορων οργανισμών.

Δευτερογενείς μεταβολίτες: ενώσεις που, σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, δεν εμπλέκονται άμεσα στην αύξηση, ανάπτυξη και αναπαραγωγή ενός οργανισμού (*Jenke-Kodama et al., 2008*). Προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και δεν παράγονται συνεχώς αλλά σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ή φάσεις αύξησης ή σε περιόδους stress (π.χ. λόγω έλλειψης θρεπτικών ή μικροβιακής προσβολής). Καλούνται και “φυσικά προϊόντα” (natural products) και συνήθως αποτελούν ενώσεις χαρακτηριστικές για έναν μοναδικό οργανισμό ή μια ομάδα στενά συγγενικών οργανισμών.

Ορισμένες ισοπρενοειδείς ενώσεις είναι δύσκολο να καταταχθούν σε κάποια από τις δύο ομάδες.

A.2. Κατάταξη τερπενίων και ονοματολογία

Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου από τις οποίες αποτελούνται, τα τερπένια κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

Μονάδες ισοπρενίου	Αριθμός ατόμων άνθρακα	Ονομασία
1	5	ημιτερπένια
2	10	μονοτερπένια
3	15	σεσκιτερπένια
4	20	διτερπένια
5	25	σεστερτερπένια
6	30	τριτερπένια
8	40	τετρατερπένια
>8	>40	πολυτερπένια

Τα ημι-, μονο-, σεσκι- και διτερπένια είναι κατά κύριο λόγο δευτερογενείς μεταβολίτες, ενώ τα τρι- και τετρατερπένια αποτελούν πρωτογενείς μεταβολίτες (*Broun & Somerville, 2001*).

A.3. Βιοσύνθεση τερπενοειδών

Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών μπορεί να διακριθεί στα ακόλουθα βασικά στάδια (*MacCaskill & Croteau, 1997*):

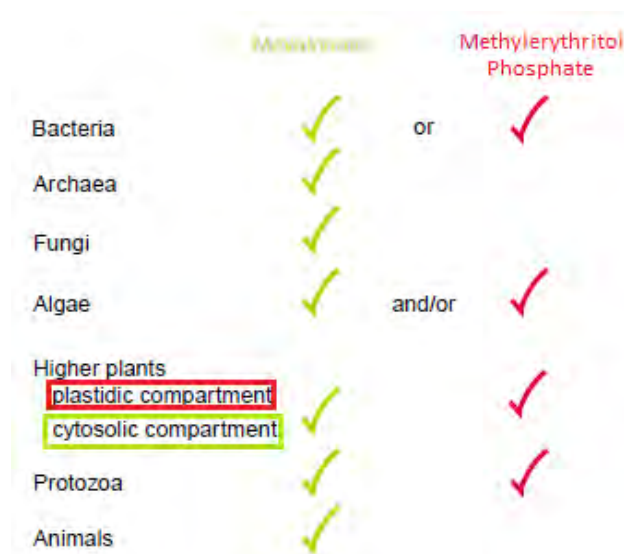
1. Παραγωγή των C5 δομικών μονομερών των ισοπρενοειδών, δηλαδή του πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP) και του πυροφωσφορικού διμεθυλαλλυλίου (DMAPP).
2. Πολυμερισμός των μονομερών με τη βοήθεια πρενυλικών τρανσφερασών προς σχηματισμό γραμμικών διφωσφορικών πρενυλικών πρόδρομων μορίων.
3. Κυκλοποίηση ή/ και αναδιάταξη των πρόδρομων πρενυλικών μορίων από τερπενικές συνθάσες προς σχηματισμό των ανθρακικών σκελετών των τερπενίων.
4. Περαιτέρω τροποποιήσεις του τερπενικού ανθρακικού σκελετού [από τροποποιητικά ένζυμα όπως μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 (P450s), ακετυλομεταφοράσες, μεθυλομεταφοράσες, γλυκοζυλομεταφοράσες, αναγωγάσες, κ.α.] προς απόδοση του τελικού προϊόντος – Το βήμα αυτό δεν είναι πάντα απαραίτητο.

A.3.1. Παραγωγή των δομικών μονομερών των ισοπρενοειδών

Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) είναι ισομερή που συγκροτούνται από πέντε άτομα άνθρακα και δύο φωσφορικές ομάδες και αποτελούν τις βασικές C5 δομικές μονάδες όλων των ισοπρενοειδών (*McGarvey & Croteau, 1995*).

Αρχικά, θεωρείτο ότι υπήρχε ένα μοναδικό μονοπάτι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των IPP και DMAPP σε όλους τους οργανισμούς. Πρόκειται για το λεγόμενο “**μονοπάτι του μεβαλονικού (MVA)**” στο οποίο τρία μόρια ακετυλοσυνενζύμου Α συμπυκνώνονται σχηματίζοντας αρχικά ένα ενδιάμεσο μόριο μεβαλονικού και έπειτα το IPP και το DMAPP (*Katsuki & Bloch,*

1967; Lynen, 1967). Ωστόσο, αργότερα αποδείχθηκε η ύπαρξη ενός εναλλακτικού μονοπατιού, που οδηγούσε στη σύνθεση των δομικών μονομερών χωρίς να συντεθεί μεβαλονικό, σε βακτήρια (Rohmer et al., 1993), φύκη και ανώτερα φυτά (Rohmer, 1999). Σε αυτό το μονοπάτι, ονομάστηκε μονοπάτι της **4-φωσφορικής-2-μεθυλο-ερυθριτόλης (MEP)**², δυο μόρια διαφορετικά του ακέτυλο-CoA χρησιμοποιούνται ως βιογενετικοί πρόδρομοι των IPP και DMAPP: η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη³ και το πυροσταφυλικό³, που συμπυκνώνονται αποδίδοντας –μετά από κάποιες τροποποιήσεις- ένα ενδιάμεσο μόριο 4-φωσφορικής-2-μεθυλο-ερυθριτόλης. Τελικά, είναι πλέον αποδεκτό ότι το IPP και το DMAPP μπορούν να συντεθούν από δύο ανεξάρτητα μονοπάτια τα οποία χρησιμοποιούν μη ομόλογα ένζυμα (εικόνα 2). Είναι αξιοσημείωτο ότι το μονοπάτι της MEP παράγει απευθείας και τα δύο ισομερή (με αναλογία DMAPP προς IPP ίση με 1:5), ενώ το μονοπάτι του MVA έχει ως μοναδικό τελικό προϊόν το IPP από το οποίο προκύπτει στη συνέχεια το DMAPP με τη δράση μιας ισομεράσης (Rohdich et al., 2002).



Εικόνα 1: κατανομή των μονοπατιών σύνθεσης του IPP στους οργανισμούς (Eisenreich et al., 2001)

στούν, να καλείται και “πλαστιδιακό” μονοπάτι. Ισοπρενοειδή που είναι χρήσιμα για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, όπως η χλωροφύλλη, τα καροτενοειδή και η πλαστοκινίνη, συντίθενται εντός του χλωροπλάστη, ενώ άλλα ισοπρενοειδή, όπως οι στερόλες, η δολιχόλη και τα σεσκιτερπένια, συντίθενται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Μάλιστα, μεταξύ των δύο μονοπατιών παρατηρείται αλληλεπίδραση (cross-talk) μέσω ανταλλαγής κοινών τους πρόδρομων μορίων (κυρίως IPP) και ορισμένα ισοπρενοειδή αποτελούν “μωσαϊκά”, δηλαδή βιοσυντίθενται με τη χρήση πρόδρομων μορίων που παράγονται και από τα δύο μονοπάτια (Eisenreich et al., 2001; Rodriguez-Concepcion, 2006).

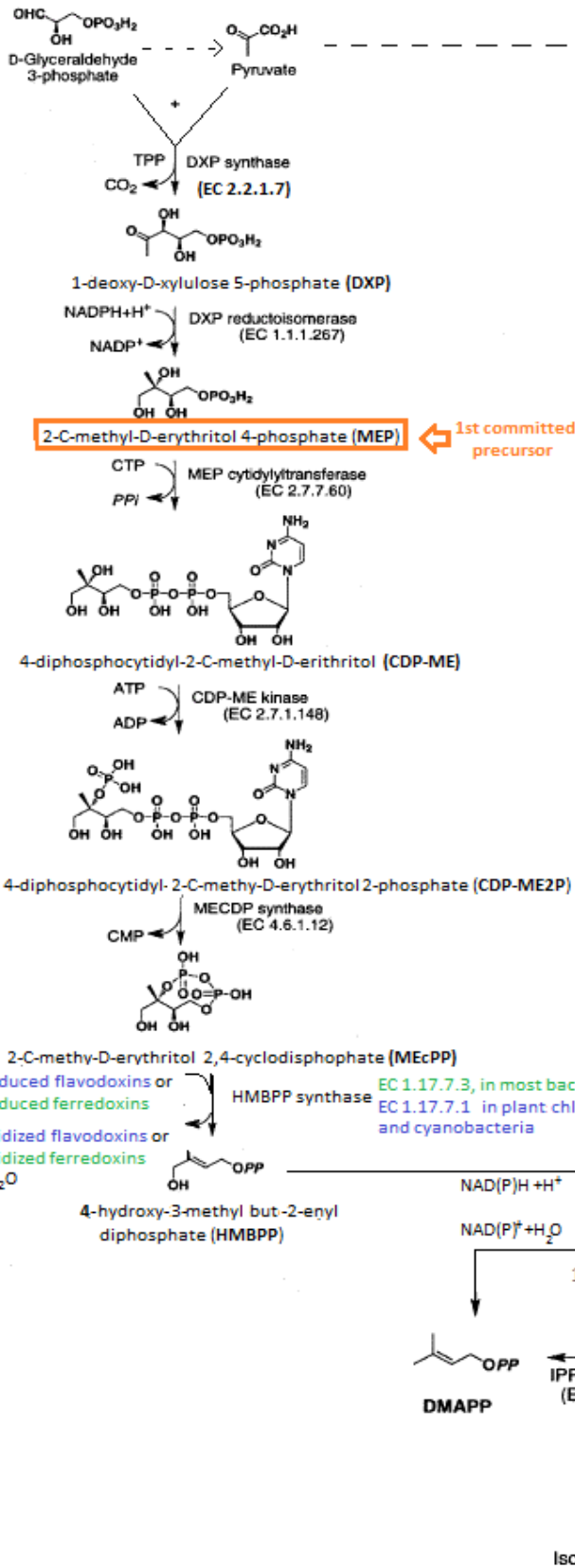
Το μονοπάτι του MVA συναντάται σε όλους τους ευκαρυώτες, τα αρχαία και σε μερικά βακτήρια (ορισμένα προκαρυωτικά φύλα φέρουν μερικά ή όλα τα γονίδια του μονοπατιού του MVA), ενώ το μονοπάτι της MEP είναι ενεργό στην πλειοψηφία των προκαρυωτών και στα πλαστίδια των ευκαρυωτών (εικόνα 1) (Lombard & Moreira, 2011).

Στα φυτά, είναι δυνατόν να είναι ενεργά και τα δύο μονοπάτια ταυτόχρονα, ωστόσο διαχωρίζονται χωρικά με αποτέλεσμα το μονοπάτι του MVA να χαρακτηρίζεται και ως “κυτταροπλασματικό”, ενώ το μονοπάτι της MEP, που λαμβάνει χώρα εντός των χλωροπλά-

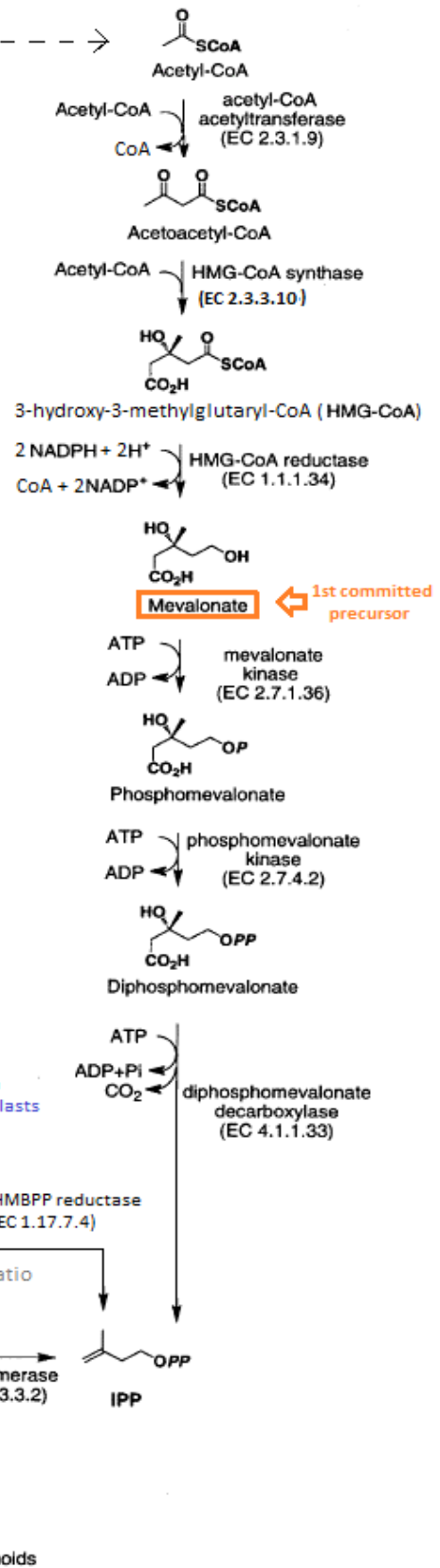
²Μπορεί να συναντάται και ως «μονοπάτι της 5-φωσφορικής-1-δεοξυ-ξυλουλόζης (DXP)»

³Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (3C) και το πυροσταφυλικό (3C) αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες της γλυκόλυσης ή του φωτοσυνθετικού κύκλου αναγωγής του άνθρακα σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς.

MEP PATHWAY



MVA PATHWAY



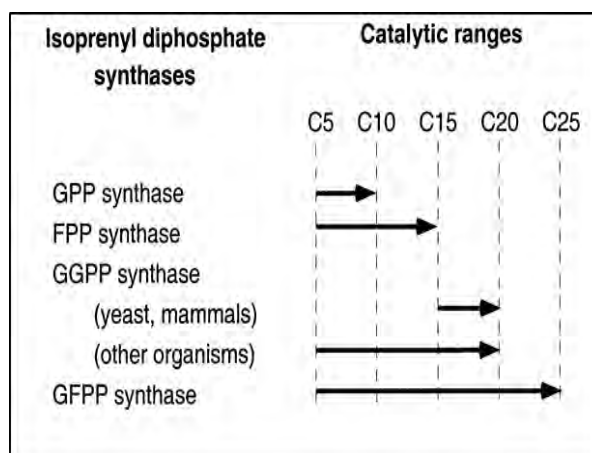
Εικόνα 2: το μονοπάτι της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (MEP) και το μονοπάτι του μεβαλονικού (MVA) (προσαρμογή από Kuzuyama, 2002 και IUBMB Enzyme Nomenclature List).

A.3.2. Πολυμερισμός των μονομερών με τη βοήθεια πρενυλικών τρανσφερασών

Το ισοπροπυλικό μέρος του 2-μεθυλοβουτανίου θεωρείται η “κεφαλή” της μονάδας ισοπρενίου, ενώ το αιθυλικό κατάλοιπο αποτελεί την “ουρά” (εικόνα 4).

Οι ισοπρενικοί σκελετοί των μονο-, σεσκι-, δι- και σεστερτερπενίων δημιουργούνται από τη συνένωση κεφαλής-ουράς μεταξύ επιμέρους μονάδων ισοπρενίου. Αρχικά, ένα μόριο IPP συνενώνεται με ένα μόριο DMAPP (αρχικό αλλυλικό υπόστρωμα) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό διφωσφορικού γερανυλίου (GPP, 10C) που αποτελεί πρόδρομο μόριο των μονοτερπενίων. Με διαδοχική προσθήκη επιπλέον μορίων IPP κατά το ίδιο πρότυπο μπορούν να προκύψουν το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP, 15C), το διφωσφορικό γερανυλ-γερανύλιο (GGPP, 20C), και το διφωσφορικό γερανυλ-φαρνεσύλιο (GFPP, 25C), δηλαδή τα πρόδρομο μόρια για τη σύνθεση των σεσκι-, δι- και σεστερτερπενίων, αντίστοιχα.

Η επιμήκυνση των αλλυλικών υποστρωμάτων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια συγκεκριμένων ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια των πρενυλικών τρανσφερασών και καλούνται “συνθάσες των διφωσφορικών πολυπρενυλίων”. Πολλά από αυτά τα ένζυμα δεν έχουν αυξημένη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμά τους και καταλύουν την συμπύκνωσή του με περισσότερα από ένα μόρια IPP με αποτέλεσμα τη δυνατότητα σχηματισμού διφωσφορικών πολυπρενυλικών αλυσίδων με διαφορετικό μήκος από το ίδιο ένζυμο (εικόνα 3). Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι οι συνθάσες του FPP που καταλύουν όχι μόνο τον σχηματισμό FPP από GPP και IPP αλλά και την αρχική συμπύκνωση του DMAPP με ένα μόριο IPP προς σχηματισμό GPP. Ιδιαίτερη ως προς την εξειδίκευση τους παρουσιάζουν οι συνθάσες GGPP που καταλύουν τη συμπύκνωση του FPP με ένα μόριο IPP προς σχηματισμό GGPP: στους μύκητες και στα θηλαστικά τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα μόνο το FPP, ενώ στα φυτά και στα βακτήρια μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν ως υποστρώματα μόρια DMAPP και GPP (Wang & Ohnuma, 2000; Dewick, 2002).

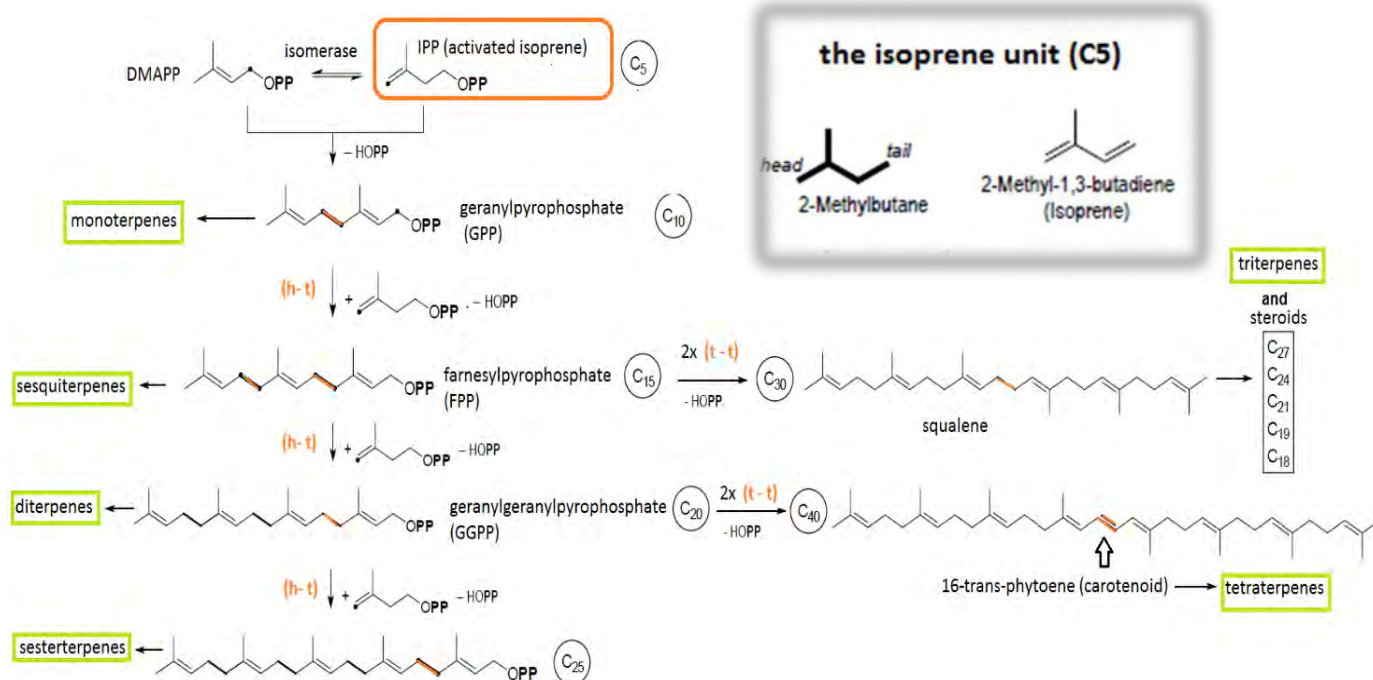


Εικόνα 3: καταλυτικό φάσμα ορισμένων συνθασών διφωσφορικών πολυπρενυλίων (Wang K.C., Ohnuma S., 2000).

Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα, στα τρι- και τετρατερπένια απαντώνται και συνδέσεις ουράς με ουρά. Συγκεκριμένα, ο ισοπρενικός σκελετός των τριτερπενίων, δηλαδή το σκουαλένιο (30C), προκύπτει από την ουρά με ουρά συνένωση δύο μορίων FPP που καταλύεται από την πρενυλική τρανσφεράση “συνθάση του σκουαλενίου”. Με αντίστοιχο τρόπο γίνεται και η ένωση δύο μορίων GGPP προς σχηματισμό του ισοπρενικού σκελετού των τετρατερπενίων, δηλαδή του φυτοενίου (40C), με τη βοήθεια της συνθάσης του φυτοενίου (Croteau et al., 2000).

A.3.3. Αναδιάταξη πρόδρομων πρενυλικών μορίων από τερπενικές συνθάσες

Τα τελικά τερπενοειδή προϊόντα προκύπτουν από τροποποιήσεις των διάφορων τερπενικών υδρογονανθρακικών σκελετών. Οι τερπενικοί υδρογονανθρακικοί σκελετοί σχηματίζονται έπειτα από κυκλοποίηση ή/και αναδιάταξη ακυκλικών πρενυλικών υποστρωμάτων με τη βοήθεια ενζύμων που καλούνται τερπενικές συνθάσες.



Εικόνα 4: Βιοσύνθεση των πρόδρομων πρενυλικών μορίων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των τερπενικών υδρογονανθρακικών σκελετών (προσαρμογή από Arroo, 2007).

Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν αυξημένη εξειδίκευση και διαχωρίζονται σε επιμέρους οικογένειες ανάλογα με τα πρενυλικά μόρια που χρησιμοποιούν ως υποστρώματα. Για παράδειγμα, για τον σχηματισμό τερπενικών σκελετών από GPP, FPP και GGPP είναι υπεύθυνες οι λεγόμενες συνθάσες των μονο-, σεσκι- και διτερπενίων αντίστοιχα. Τερπενικές συνθάσες που παράγουν κυκλικά προϊόντα καλούνται και κυκλάσες. Αξιοσημείωτο είναι ότι ορισμένες συνθάσες μονοτερπενίων έχουν την ικανότητα να παράγουν μίγμα προϊόντων από το ίδιο ενεργό κέντρο. Για παράδειγμα η συνθάση του λιμονένιου, εκτός από το λιμονένιο παράγει και μυρσένιο και α- και ρ- πινένιο σε μικρότερες ποσότητες (Wagschal et al., 1991; Colby et al., 1993).

A.4. Σημασία ισοπρενοειδών

Όλοι οι οργανισμοί χρησιμοποιούν ισοπρενοειδή για βασικές κυτταρικές τους λειτουργίες. Ενδεικτικά παραδείγματα είναι τα στεροειδή, όπως η χοληστερόλη και το σκουαλένιο, που συμμετέχουν στη διατήρηση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών, οι κινόνες που συγκροτούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για την κυτταρική αναπνοή, τα καροτενοειδή που λειτουργούν ως βοηθητικές χρωστικές στη φωτοσύνθεση και προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από φωτοοξείδωση και οι ισοπρενοειδείς ενώσεις που χρησιμοποιούνται για ρύθμιση πρωτεϊνών μέσω πρενυλίωσης⁴ ή γλυκοζυλίωσης⁵. Επίσης, αρκετά ισοπρενοειδή, όπως οι στεροειδείς ορμόνες στους ζωικούς οργανισμούς και το αποκοπτικό

⁴Πρενυλίωση: ομοιοπολική σύνδεση φαρνεσυλίου (C15) ή γερανυλ-γερανυλίου (C20) σε συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών (Zhang & Casey, 1996)

⁵Η βιοσύνθεση του πρόδρομου πολυσακχαρίτη για τη N-γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται πάνω σε ένα ισοπρενοειδές, π.χ. φωσφορική δολιχόλη στους ευκαρυώτες (Jones et al., 2009).

οξύ, οι γιββερελλίνες και τα βρασσινοστεροειδή στους φυτικούς οργανισμούς, εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση ή/και στην ανάπτυξη του οργανισμού.

Παρά τη χρησιμότητά τους σε όλους τους οργανισμούς, η δομή των ισοπρενοειδών έχει εξελιχθεί περισσότερο στο φυτικό βασίλειο, με αποτέλεσμα στους συγκεκριμένους οργανισμούς να εμπλέκονται σε πιο εξειδικευμένες διεργασίες, πέραν της πρωτογενούς αύξησης και ανάπτυξης. Αναλυτικότερα, ως δευτερογενείς μεταβολίτες στους φυτικούς οργανισμούς διαδραματίζουν τους ακόλουθους ρόλους:

- Προστατεύουν τα φυτά έναντι φυτοφάγων οργανισμών.
- Προσελκύουν επικονιαστές και ζώα που συμβάλλουν στη διασπορά των σπερμάτων.
- Πτητικά τερπένια συμμετέχουν στην επικοινωνία μεταξύ γειτονικών φυτών.

Είναι, λοιπόν, αναμενόμενο τα φυτικής προέλευσης ισοπρενοειδή, στην πλειοψηφία τους γνωστά και ως τερπένια, να βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς. Τα αιθέρια έλαια των φυτών χρησιμοποιούνται στην κοσμετολογία για την παραγωγή αρωμάτων, στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικά αρώματος και γεύσης, στη φαρμακοβιομηχανία για την εύρεση και απομόνωση ενώσεων με φαρμακολογικές ιδιότητες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χρήση τους για παραγωγή φυτοφαρμάκων με μικρό χρόνο παραμονής στο περιβάλλον και αμελητέα τοξικότητα έναντι των θηλαστικών (*Isman, 2000*), ενώ γίνονται προσπάθειες για την παραγωγή βιοκαυσίμων με βάση διάφορα τερπένια (*Harvey et al., 2010*) από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς (*Rude & Schirmer, 2009; Peralta-Yahya, 2011*).

A.5. Ανάγκη για εναλλακτικές μεθόδους παραγωγής τερπενίων

Η διαθεσιμότητα των τερπενοειδών που παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον είναι περιορισμένη στη φύση. Για παράδειγμα, το φυτό *Taxus brevifolia* αποδίδει λιγότερα από 0.5 g ταξόλης⁶ ανά δένδρο (*Wall & Wani, 1996*). Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις τα τερπενοειδή τείνουν να συσσωρεύονται σε σημαντικές ποσότητες στα φυτά μόνο μετά την πάροδο μεγάλων χρονικών περιόδων και συχνά ως μίγματα δεκάδων ή εκατοντάδων διαφορετικών ενώσεων. Ενδεικτικά, το ινδικό σανδαλόξυλο, *Santalum album*, πρέπει να αναπτυχθεί για περισσότερο από οκτώ με δέκα έτη προκειμένου αποδώσει αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αρωμάτων (*Jones et al., 2006*).

Συνεπώς, για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων τερπενοειδών με τις συμβατικές μεθόδους (απόσταξη ή εκχύλιση από τα φυτά) απαιτείται τεράστια ποσότητα φυτικής μάζας, μεγάλη έκταση διαθέσιμης γης για την καλλιέργεια των φυτών, σημαντικό εργατικό δυναμικό και μια σειρά διεργασιών καθαρισμού για την λήψη υψηλής καθαρότητας τελικού προϊόντος. Αυτοί οι παράγοντες, όμως, περιορίζουν τη εκτεταμένη εμπορική χρήση των τερπενοειδών λόγω αυξημένου κόστους. Επίσης, στην περίπτωση χρήσης δασικών φυτών πρέπει να ληφθεί υπόψη ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος από την καταστροφή δασικών εκτάσεων.

Άλλο ένα μειονέκτημα της χρήσης φυτικών οργανισμών για την εμπορική παραγωγή τερπενοειδών είναι το γεγονός ότι –εφόσον τα φυτικά τερπενοειδή στην πλειοψηφία τους ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες– η σύνθεσή τους από τα φυτά δεν είναι σταθερή αλλά παρουσιάζει διακυμάνσεις επηρεαζόμενη από διάφορους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι τόσο φυσιολογικοί (π.χ. στάδιο ανάπτυξης των οργάνων του φυτού στα

⁶ Ταξόλη: τερπενοειδές με φαρμακολογικό ενδιαφέρον, καθώς παρουσιάζει αντικαρκινική δράση.

οποία παράγεται το εκάστοτε τερπενοειδές, εποχική διακύμανση⁷⁾ όσο και περιβαλλοντικοί (κλίμα, σύσταση εδάφους, ασθένειες και παράσιτα των φυτών) και γεωγραφικοί-γενετικοί (ύπαρξη χημειότυπων⁸⁾ (Figueiredo, 2008).

Εναλλακτικά, τερπενοειδή μπορούν να παραχθούν και με συνθετικές ή ημι-συνθετικές μεθόδους. Ωστόσο, απαιτούνται πολλά βήματα για την πλήρη σύνθεση τους, σε καθένα από τα οποία παράγεται ρακεμικό μείγμα προϊόντων. Κατά συνέπεια, η τελική απόδοση του επιθυμητού προϊόντος είναι σχετικά χαμηλή (π.χ. τελική απόδοση πλήρους χημικής σύνθεσης ταξόλης: 0.002%), γεγονός που καθιστά και αυτές τις προσεγγίσεις οικονομικά ασύμφωρες. Επιπλέον, πρόκειται για προσεγγίσεις μη-φιλικές προς το περιβάλλον, αφού συνήθως απαιτούν σε διάφορα στάδιά τους τη χρήση αντιδραστηρίων με βάση το πετρέλαιο (Wu et al., 2008).

Οι περιορισμοί των παραπάνω μεθόδων οδήγησαν σε αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών μεθόδων υψηλής απόδοσης που θα είναι παράλληλα οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες φυτικών κυττάρων για την παραγωγή τερπενοειδών [π.χ. παραγωγή φαρμακευτικής ταξόλης από καλλιέργειες φυτικών κυττάρων του είδους *Taxus* (Bringi et al., 1993)], ενώ εξετάζονται και προσεγγίσεις που εμπίπτουν στον κλάδο της μεταβολικής μηχανικής και αναλύονται στην επόμενη ενότητα.

B. Μεταβολική μηχανική⁹

B.1. Βασικές προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής για παραγωγή τερπενοειδών

Ο κλάδος της μεταβολικής μηχανικής χρησιμοποιεί την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA με σκοπό:

- τη βελτίωση των κυτταρικών λειτουργιών ενός οργανισμού,
- την κατευθυνόμενη τροποποίηση μεταβολικών μονοπατιών με την εισαγωγή ετερόλογων γονιδίων ή/ και ρυθμιστικών στοιχείων,
- την ανασύσταση ολόκληρων βιοσυνθετικών μονοπατιών ενός οργανισμού (π.χ. ενός φυτικού οργανισμού) σε έναν ετερόλογο ξενιστή (π.χ. σε ένα βακτήριο).

Συνεπώς, οι προσεγγίσεις της μεταβολικής μηχανικής μπορούν να βρουν εφαρμογή στη δημιουργία στελεχών αυξημένης απόδοσης ως προς την παραγωγή επιθυμητών φυσικών προϊόντων έπειτα από γενετική τροποποίηση οργανισμών που ήδη παράγουν (native hosts) τις συγκεκριμένες ενώσεις. Στην περίπτωση που αυτοί οι οργανισμοί είναι φυτικοί, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες γενετικά τροποποιημένων φυτικών κυττάρων για μαζική παραγωγή φυσικών προϊόντων, άρα και τερπενοειδών, σε βιοαντιδραστήρες, προκει-

⁷Εποχική διακύμανση: Μεταβολές στη σύσταση και στην απόδοση τερπενοειδών που συνδέονται με τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν στους διάφορους μήνες του έτους (θερμοκρασία, υγρασία διάρκεια ηλιοφάνειας,) ή ακόμη και με επιμολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς (ιδιαίτερα κατά τους μήνες με υψηλή βροχόπτωση). Με βάση τα προαναφερθέντα καθορίζεται η καταλληλότερη περίοδος για τη συλλογή του φυτού.

⁸Χημειότυποι: Άτομα του ίδιου είδους που παρουσιάζουν διαφορετική χημική σύσταση δευτερογενών μεταβολιτών (χημειοφαινότυπος) λόγω μικρών γενετικών ή/ και επιγενετικών διαφορών οι οποίες όμως δεν επηρεάζουν την μορφολογία του φυτού.

⁹ Προσαρμογή από Bailey, 1991; Withers & Keasling, 2007; Muntendam et al., 2009; Keasling, 2010

μένου να εξασφαλιστεί η σταθερή παραγωγή του προϊόντος και να μειωθούν οι ανάγκες για διαθέσιμη γη και εργατικό δυναμικό που θα απαιτούσε η καλλιέργεια των φυτών.

Εναλλακτικά, τερπενοειδή μπορούν να παραχθούν και από ετερόλογους ξενιστές (heterologous hosts) τροποποιώντας τα ενδογενή μεταβολικά τους μονοπάτια. Συγκεκριμένα, εφόσον όλοι οι οργανισμοί παράγουν ισοπρενοειδή είτε μέσω πρωτογενούς ή μέσω δευτερογενούς μεταβολισμού, με την εισαγωγή κατάλληλων ετερόλογων γονιδίων ένας ενδογενής μεταβολίτης είναι δυνατόν να μετατραπεί στο επιθυμητό τελικό προϊόν. Επίσης, σε ετερόλογους ξενιστές μπορούν να εισαχθούν και ολόκληρα βιοσυνθετικά μονοπάτια από άλλους οργανισμούς, για να παρακαμφθούν οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί των ενδογενών μονοπατιών.

Προϋπόθεση για την εφαρμογή των προσεγγίσεων της μεταβολικής μηχανικής είναι η πλήρης γνώση των εκάστοτε βιοσυνθετικών μονοπατιών, ενώ η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τα διάφορα επίπεδα ρύθμισης των μονοπατιών μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της απόδοσής τους. Στην περίπτωση των τερπενοειδών, τα μονοπάτια που οδηγούν στη σύνθεση των πρόδρομων μορίων για τον σχηματισμό των τερπενικών σκελετών είναι καλά χαρακτηρισμένα, επομένως το εύρος των τερπενοειδών που μπορούν να παραχθούν σε ετερόλογους ξενιστές περιορίζεται μόνο από τη μη ταυτοποίηση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τερπενικές συνθάσες και τελικά τροποποιητικά ένζυμα. Μάλιστα, ένζυμα διαφορετικών βιοσυνθετικών μονοπατιών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και συνδυαστικά, ώστε να δημιουργηθούν χιμαιρικά μονοπάτια με αποτέλεσμα την παραγωγή νέων ενώσεων (Kirby & Keasling, 2008).

Οι δυνατότητες της μεταβολικής μηχανικής επεκτείνονται ακόμα περισσότερο χρησιμοποιώντας μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής για τον σχεδιασμό ενζύμων με τροποποιημένη εξειδίκευση. Βέβαια, η έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών δε μπορεί να εγγραφεί την εμφάνιση των επιθυμητών ενζυμικών δραστηριοτήτων. Οι ετερόλογες πρωτεΐνες θα πρέπει να αποφυγουν την πρωτεόλυση, να αναδιπλωθούν σωστά, να σχηματίσουν επιτυχώς σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή προσθετικές ομάδες και να αποκτήσουν τον κατάλληλο κυτταρικό εντοπισμό ώστε να έχουν πρόσβαση στα απαιτούμενα υποστρώματα (Bailey, 1991).

B.2. Επιλογή του κατάλληλου ετερόλογου ξενιστή

Κρίσιμο στοιχείο για την έκφραση των ετερόλογων γονιδίων και την εμφάνιση των επιθυμητών ενζυμικών δραστηριοτήτων είναι η επιλογή του κατάλληλου ξενιστή. Οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη για αυτή την επιλογή οι εξής:

- το τελικό προϊόν ή κάποιο μεταβολικό ενδιάμεσο του μονοπατιού είναι τοξικό για τον ξενιστή;
- ο ξενιστής είναι ανθεκτικός στις συνθήκες που απαιτούνται για την παραγωγή του προϊόντος (pH, θερμοκρασία, ωσμωτική πίεση);
- υπάρχουν διαθέσιμα γενετικά εργαλεία για την τροποποίηση του;

Τυπικά, ως ετερόλογοι ξενιστές για την παραγωγή τερπενοειδών χρησιμοποιούνται το φυτό *Arabidopsis thaliana*, το βακτήριο *Escherichia coli* και ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Οι οργανισμοί αυτοί είναι καλά χαρακτηρισμένοι και έχουν το πλεονέκτημα ότι παράγουν περιορισμένο εύρος ισοπρενοειδών μέσω δευτερογενούς μεταβολισμού. Αυτό συνεπάγεται ελαχιστοποίηση των μεταβολικών ροών προς ανταγωνιστικά μονοπάτια και παραγωγή ενός λιγότερο σύνθετου μίγματος τελικών προϊόντων που απλοποιεί τη διαδικασία καθαρισμού για την παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος (Withers & Keasling, 2007).

B.2.1. Μικροβιακές πλατφόρμες παραγωγής τερπενοειδών

Όπως όλα τα φυτά έτσι και το *A.thaliana* κωδικοποιεί μεγάλο αριθμό P450s που συμβάλουν στην τροποποίηση τερπενικών ανθρακικών σκελετών προς παραγωγή του τελικού προϊόντος. Όμως, η χρήση του ως ξενιστή παρουσιάζει όσα μειονεκτήματα προαναφέρθηκαν (βλ. εισαγωγή: ενότητα A.5.) σχετικά με την μαζική παραγωγή φυσικών προϊόντων από φυτικούς οργανισμούς. Αντιθέτως, χρησιμοποιώντας το *E.coli* ή τον *S.cerevisiae* ως ετερόλογους ξενιστές υπάρχει η δυνατότητα να σχεδιαστούν μικροβιακές πλατφόρμες για την σταθερή, μαζική παραγωγή τερπενοειδών σε βιοαντιδραστήρες από απλά, εύκολα διαθέσιμα και χαμηλού κόστους υποστρώματα μέσω ζύμωσης (fermentation) (Muntendam et al., 2009).

Ο μόνος περιορισμός ενός τέτοιου συστήματος είναι η επιτυχής έκφραση ετερόλογων P450s και η εξασφάλιση της λειτουργικότητας τους στο *E.coli*, καθώς το ίδιο δεν κωδικοποιεί ενδογενώς P450s. Για την έκφραση ετερόλογων P450s προτιμάται ο *S.cerevisiae*, καθώς κωδικοποιεί ενδογενώς ορισμένα P450s, ενώ παράλληλα διάφορες προσεγγίσεις διερευνώνται για να επιτευχθεί η λειτουργική έκφραση τους και στο *E.coli* (Kirby & Keasling, 2009).

Γ. *Saccharomyces cerevisiae*

Γ.1. Βασικά χαρακτηριστικά¹⁰

Ο *S.cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός που ανήκει στις “ζύμες” ή “ζυμομύκητες”, δηλαδή στους μύκητες που μπορούν να αναπτυχθούν και υπό αναερόβιες συνθήκες (σε αντίθεση με την πλειοψηφία των μυκήτων που αναπτύσσονται μόνο αερόβια) εκτελώντας ζύμωση σακχάρων προς παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Διάφορα στελέχη του *S.cerevisiae* (ή σακχαρομύκητα) παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον, καθώς χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες στην αρτοποιία (αποτελούν τη γνωστή «μαγιά» αρτοποιίας) και για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, όπως το κρασί και η μπύρα.

Ο *S.cerevisiae* αποτελεί εδώ και δεκαετίες οργανισμό-μοντέλο των ευκαρυωτών, αφού βασικοί κυτταρικοί μηχανισμοί είναι υψηλά συντηρημένοι μεταξύ αυτού και των ανώτερων ευκαρυωτών, ενώ παράλληλα μοιράζεται τη σύνθετη εσωτερική κυτταρική δομή των φυτών και των ζώων, χωρίς το υψηλό ποσοστό μη-κωδικοποιητικού DNA που δυσκολεύει την έρευνα σε αυτούς τους οργανισμούς. Πέραν των προαναφερθέντων, όμως, διαθέτει και τα ακόλουθα χαρακτηριστικά που τον καθιστούν ιδανικό οργανισμό για βιολογικές μελέτες :

- I. πλήρως χαρακτηρισμένο γονιδίωμα,
- II. θεωρείται μη-παθογόνος, άρα δε χρήζει ιδιαίτερης προσοχής στον χειρισμό του,
- III. είναι εύκολα και οικονομικά διαθέσιμος σε μεγάλες ποσότητες (ως μαγιά αρτοποιίας ή μπύρας),
- IV. δυνατότητα ανάπτυξης είτε σε εμπειρικά (YPD) είτε σε συνθετικά θρεπτικά μέσα,
- V. γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης (χρόνος διπλασιασμού εργαστηριακών απλοειδών στελεχών: ~90 min σε YPD/ ~140 min σε συνθετικό θρεπτικό μέσο, κατά την εκθετική φάση με άριστη Θ^ο ανάπτυξης= 30° C),
- VI. ευκολία διαλογής μεγάλου αριθμού αποικιών (π.χ. για απομόνωση μεταλλαγμάτων) μέσω αντιγραφικής επίστρωσης,

¹⁰ Προσαρμογή από *Schneider, 2004; Nevoigt, 2008; Hong & Nielsen, 2012*

- VII. δυνατότητα να αναπτύσσεται¹¹ είτε σε απλοειδή είτε σε διπλοειδή φάση,
- VIII. ευελιξία ως προς την γενετική του τροποποίηση:
- σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς, είναι βιώσιμος παρουσία πληθώρας δεικτών που χρησιμεύουν για τη διαλογή μετασχηματισμένων αποικιών.
 - τα πλασμίδια που εισάγονται σε κύτταρα ζύμης μπορούν είτε να διατηρηθούν ως γενετικά στοιχεία που αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα χρωμοσώματα του ξενιστή ή να ενσωματωθούν σε κάποιο από αυτά και να αντιγράφονται μαζί με το γενετικό υλικό του κυττάρου (επισωματικά πλασμίδια).
 - η ενσωμάτωση εξωγενούς DNA στο γένωμα της ζύμης γίνεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης στοχευμένων γενετικών τροποποιήσεων.

Γ.1.1. Αναλυτικά για τον ομόλογο ανασυνδυασμό

Ομόλογος ανασυνδυασμός είναι η φυσική ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ ομόλογων γενετικών τόπων του ίδιου ή διαφορετικών γονιδιωμάτων μέσω εκτεταμένης σύζευξης των νουκλεοτιδικών τους βάσεων. Χρησιμοποιείται, κυρίως, ως υψηλής πιστότητας, εξαρτώμενος από εκμαγείο μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών του DNA που είναι συντηρημένος σε όλους τους οργανισμούς, όμως εμπλέκεται και σε άλλες διεργασίες, όπως η αλλαγή συζευκτικού τύπου¹¹ στα απλοειδή στελέχη ζύμης (*Herskowitz, 1988*).

Η συχνότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι υψηλότερη στις ζύμες συγκριτικά με τους ανώτερους ευκαρυώτες, γι' αυτό χρησιμοποιείται ως «εργαλείο» για τη γενετική τροποποίησή τους. Μάλιστα, είναι αποτελεσματικότερος όταν χρησιμοποιούνται γραμμικά τμήματα DNA, ωστόσο και κυκλικά πλασμίδια είναι δυνατόν να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Σε κάθε περίπτωση, τα άκρα του ενθέματος θα πρέπει να παρουσιάζουν ομολογία με την αλληλουχία-στόχο του χρωμοσωμικού DNA (*Schneiter, 2004*).

Γ.2. Ο *S.cerevisiae* ως ξενιστής για την παραγωγή τερπενοειδών

Χάρη στην ευελιξία ως προς την γενετική του τροποποίηση, ο *S.cerevisiae* -πέραν των κλασικών βιολογικών ερευνών- είναι ιδιαίτερα δημοφιλής και στον τομέα της μεταβολικής μηχανικής ως κυτταρικό εργοστάσιο παραγωγής προϊόντων εμπορικού ενδιαφέροντος (π.χ. φαρμακευτικές ενώσεις, χημικά, προσθετικά τροφίμων, βιοκαύσιμα και βιοπλαστικά).

Ο βασικότερος περιορισμός του σακχαρομύκητα είναι η ικανότητα του να καταβολίζει μόνο εξόζες (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) και ορισμένους δισακχαρίτες (σουκρόζη, μαλτόζη) αλλά όχι πεντόζες (αραβινόζη, ξυλόζη), που προκύπτουν έπειτα από υδρόλυση βιομάζας. Βέβαια, με προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής είναι δυνατόν να διευρυνθεί το φάσμα ενώσεων που χρησιμοποιεί ως υποστρώματα για την ανάπτυξή του. Σε κάθε περίπτωση, όμως,

¹¹ Ο *S.cerevisiae* έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται είτε σε απλοειδή είτε σε διπλοειδή φάση. Στην απλοειδή του φάση μπορεί να ανήκει στον συζευκτικό τύπο MATa ή MATα, ενώ η διπλοειδής φάση συμβολίζεται ως MATa/MATα. Και οι τρεις κυτταρικοί τύποι έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται αγενώς μέσω εκβλάστησης (δηλαδή με μιτωτική διαίρεση), όμως μόνο τα απλοειδή στελέχη είναι δυνατόν να αναπαράγονται και εγγενώς, με αποτέλεσμα τη μετάβαση στη διπλοειδή φάση (*Herskowitz, 1988*). Η χρήση απλοειδών στελεχών διευκολύνει τη δημιουργία knock-out μεταλλάξεων και την ανίχνευση υποτελών μεταλλάξεων, ενώ τα διπλοειδή στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμασίες συμπληρωματικότητας.

πλεονεκτεί έναντι των βακτηριακών ξενιστών για βιομηχανική χρήση, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην ανακύκλωση, αλλά και σε υψηλές τιμές ωσμωτικής πίεσης και χαμηλό pH και δεν είναι επιρρεπής σε προσβολή από φάγους (Hong & Nielsen, 2012).

Όσον αφορά τον σχεδιασμό μικροβιακής πλατφόρμας για την παραγωγή τερπενοειδών, ο *S. cerevisiae* προτιμάται, επίσης, όποτε απαιτείται η έκφραση ετερόλογων ενζύμων του κυτοχρώματος P450 για τροποποίηση των παραγόμενων τερπενικών σκελετών προς το επιθυμητό προϊόν, καθώς και ο ίδιος κωδικοποιεί ενδογενώς ορισμένα P450s, σε αντίθεση με το *E. coli* και άλλα βακτήρια (βλ. εισαγωγή: ενότητα B.2.1.).

Φυσιολογικά, η βιοσύνθεση των δομικών μονάδων των ισοπρενοειδών στον *S. cerevisiae* γίνεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού. Εισαγωγή εξωγενών γονιδίων (π.χ. γονίδια που κωδικοποιούν για φυτικές τερπενικές συνθάσες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του επιθυμητού τερπενοειδούς από έναν ενδιάμεσο μεταβολίτη του ενδογενούς μονοπατιού (βλ. εισαγωγή: ενότητα B.1.). Ωστόσο, το ενδογενές μονοπάτι MVA υπόκειται σε ρύθμιση, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη σύνθεση ενδιάμεσων μεταβολιτών, άρα και σε μερική ή πλήρη παρεμπόδιση της σύνθεσης των επιθυμητών προϊόντων. Προκειμένου να παρακαμφθεί η ενδογενής ρύθμιση και χρησιμοποιηθεί μια πιο “οικονομική¹²” προσέγγιση, έχουν γίνει και προσπάθειες ανασύστασης του μονοπατιού της MEP από το *E. coli* στον *S. cerevisiae* (Maury et al., 2008; Partow et al., 2012).

Γ.3. Βιοσύνθεση ισοπρενοειδών στον *S. cerevisiae*: το μονοπάτι της εργοστερόλης

Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. εισαγωγή: ενότητα B.2.), ο *S. cerevisiae* παράγει περιορισμένο αριθμό ισοπρενοειδών ενδογενώς για κάποιες βασικές κυτταρικές του λειτουργίες. Μία από αυτές, η ρύθμιση της ρευστότητας και της διαπερατότητας της πλασματικής του μεμβράνης, επιτελείται από την εργοστερόλη (στερόλη στους μύκητες αντίστοιχη της χοληστερόλης στα κύτταρα των θηλαστικών). Η εργοστερόλη -εκτός από τη ζωτική της σημασία για τα ίδια τα κύτταρα- έχει μεγάλη εμπορική αξία, καθώς αποτελεί πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση της βιταμίνη D2.

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης είναι μια σύνθετη διεργασία που μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια (Veen & Lang, 2004):

- Το πρώτο στάδιο είναι κοινό για όλα τα ισοπρενοειδή που παράγει ενδογενώς ο *S. cerevisiae* και ξεκινά με τη βιοσύνθεση των δομικών ισοπρενικών μονάδων (IPP) μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού. Μετά από συμπύκνωση τριών ισοπρενικών μονάδων προκύπτει ένα μόριο FPP.

Το FPP αποτελεί πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση της εργοστερόλης μα και άλλων ισοπρενοειδών που εμπλέκονται σε σημαντικές διεργασίες όπως η κυτταρική ανα-

¹²Για την παραγωγή 1 μορίου FPP χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γλυκόζη απαιτείται η κατανάλωση:

- Στην περίπτωση του μονοπατιού MVA: 6 μορίων NADPH, 9 μορίων ATP και 4,5 μορίων γλυκόζης*
- Στην περίπτωση του μονοπατιού MEP: 9 μορίων NAD(P)H, 6 μορίων ATP και 3 μορίων γλυκόζης*

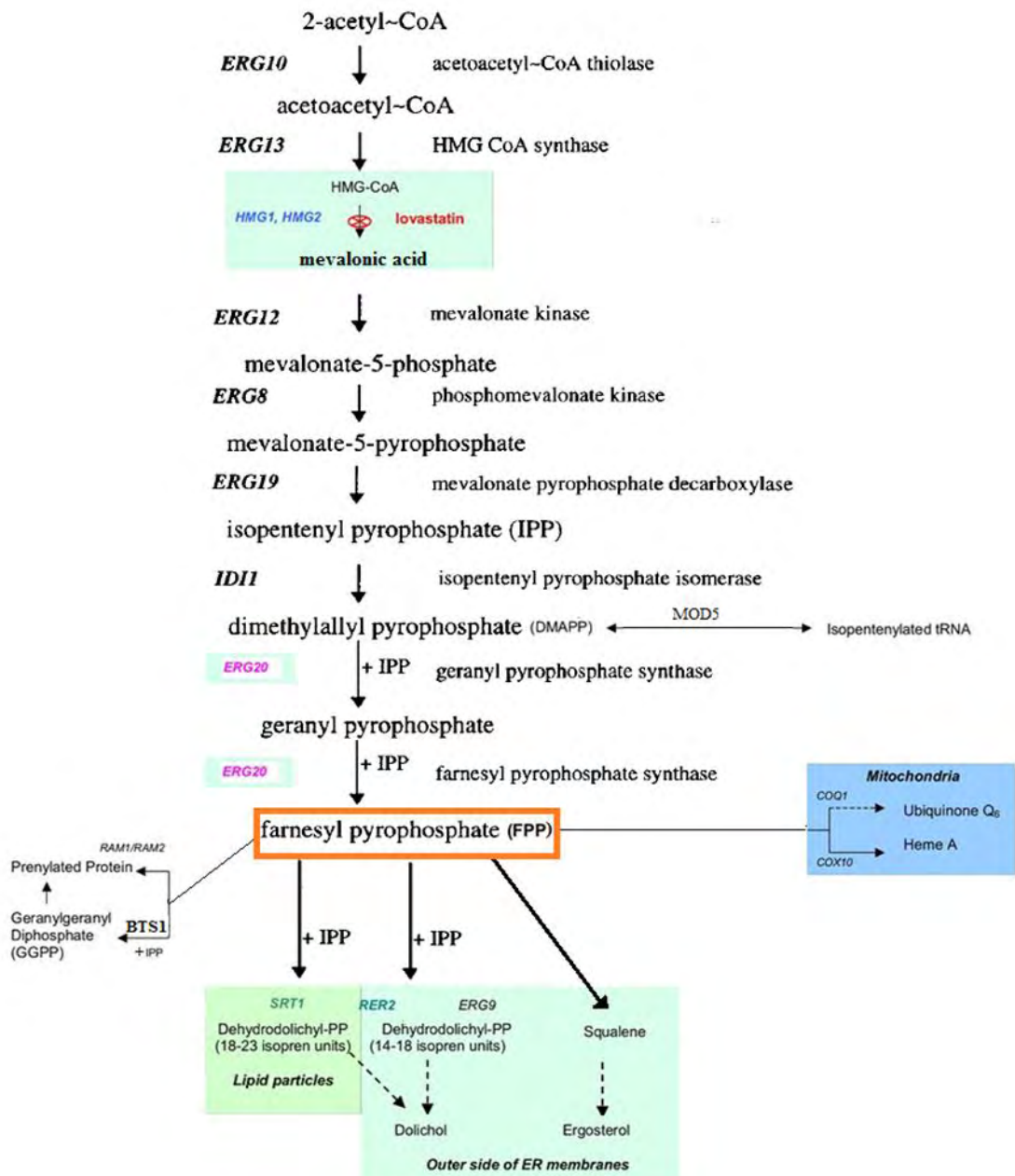
*στις τιμές αυτές δεν περιλαμβάνεται η ποσότητα γλυκόζης που απαιτείται για την παραγωγή ATP και οξειδοαναγωγικών παραγόντων!

Συνεπώς, το μονοπάτι MEP είναι πιο αποδοτικό συγκριτικά με το ενδογενές μονοπάτι του *S. cerevisiae* (δηλαδή το μονοπάτι MVA) για την παραγωγή ισοπρενοειδών όσον αφορά τη σχέση κατανάλωσης υποστρώματος- παραγωγής προϊόντος (Partow et al., 2012).

πνοή (ουβικινόνη, αίμη) και η ομοιοπολική τροποποίηση ορισμένων πρωτεϊνών μέσω πρενυλίωσης και γλυκοζυλίωσης (δολιχόλη, GGPP) (εικόνα 5)

- Το δεύτερο στάδιο ξεκινά με τον σχηματισμό σκουαλενίου, έπειτα από συμπύκνωση δύο μορίων FPP. Το σκουαλένιο αποτελεί το πρώτο μεταβολικό ενδιάμεσο της συγκεκριμένης πορείας το οποίο εμπλέκεται αποκλειστικά στη σύνθεση της εργοστερόλης (committed precursor).

Τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι της εργοστερόλης είναι καλά χαρακτηρισμένα (Daum et al., 1998). Η βιοσύνθεση αυτής και των υπόλοιπων, μη-στεροειδών ισοπρενοειδών υπόκειται σε λεπτομερή ρύθμιση, κατανόηση της οποίας μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία στελεχών αυξημένης απόδοσης ως προς την παραγωγή επιθυμητών -ετερόλογων και μη-προϊόντων.



Εικόνα 5: Βιοσύνθεση ισοπρενοειδών στον *S.cerevisiae* (Grabinska & Palamarczyk, 2002).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι στερόλες συντίθενται υπό αερόβιες συνθήκες. Το μοριακό οξυγόνο είναι απαραίτητο για την μετατροπή του σκουαλενίου σε εποξείδιο του σκουαλενίου, το οποίο μετά από μία σειρά αντιδράσεων αποδίδει εργοστερόλη στους μύκητες ή η χοληστερόλη στα ζωικά κύτταρα. Αντιθέτως, δεν απαιτείται η παρουσία οξυγόνου για το πρώιμο στάδιο του μονοπατιού βιοσύνθεσης των ισοπρενοειδών. Επομένως, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου καθορίζει τη ροή των μεταβολικών ενδιάμεσων στο μονοπάτι (Hampton et al., 1996).

Γ.4. Προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής για παραγωγή σκλαρεόλης στον *S.cerevisiae*

Γ.4.1. Περί σκλαρεόλης

Μια από τις μυρωδιές που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στην αρωματοποιία χαρακτηρίζεται ως “νότες κεχριμπαριού (amber)”. Η πρώτη ύλη που εδώ και αιώνες για να προσέδιδε στα αρώματα αυτήν τη μυρωδιά και παράλληλα χρησίμευε ως σταθεροποιητικό των αρωμάτων είναι το άμβαρ ή αμπέρι (ambergris), γνωστό και ως “γκρίζο κεχριμπάρι”. Πρόκειται για μια κηρώδη ουσία, πλούσια σε χοληστερόλη, που εκκρίνεται στο έντερο της φάλαινας φυσητήρα (sperm whale), ώστε να βοηθήσει τυχόν σκληρά υλικά (π.χ. ράμφη από καλαμάρια με τα οποία τρέφεται το κήτος) να συσσωματωθούν και να αποβληθούν από αυτό χωρίς να το τραυματίσουν. Τελικά απεκκρίνεται ως ένα είδος περιττώματος που επιπλέει στον ωκεανό, όπου με την πάροδο του χρόνου ωριμάζει και μετατρέπεται σε λευκό-γκριζωπό κηρώδη όγκο με γλυκιά και γήινη μυρωδιά (Ohloff, 1982). Εξαιτίας της σπανιότητάς του είναι το πιο ακριβό αρωματικό υλικό (έως και 20.000\$/ κιλό), όμως η χρήση του έχει απαγορευθεί σε πολλές χώρες, επειδή προέρχεται από ένα απειλούμενο και προστατευόμενο ζωικό είδος. Για τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιείται πλέον ευρέως ένα υποκατάστατο του άμβαρ, ένας τρικυκλικός αιθέρας με την εμπορική ονομασία “Ambrox (Firmenich)” ή “Ambroxan (Henkel)” που συντίθεται από την σκλαρεόλη (Barton et al., 1994).

Η σκλαρεόλη είναι μια λαβδανική διτερπενική διόλη που απομονώνεται κυρίως από τα άνθη και τα φύλλα του φυτού *Salvia sclarea* (ερυθρανθές ή κόκκινο φασκόμηλο, clary sage), βοτάνου που συναντάται στη νότια Ευρώπη, όμως έχει ανιχνευθεί και στα φυτά *Cistus creticus*, *Nicotiana glutinosa* και *Cleome spinose* (Caniard et al., 2012). Εκτός από τη χρήση της στην αρωματοποιία ως πρόδρομη ουσία για τη σύνθεση του ambroxan, φαίνεται να έχει και αντικαρκινικές ιδιότητες, αφού επάγει την απόπτωση κυττάρων από ορισμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Mahaira et al., 2011).

Όσον αφορά τη βιοσύνθεσή της (εικόνα 6), τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτήν στο φυτό *Salvia sclarea* είναι πλέον γνωστά. Αρχικά μία διτερπενική συνθάση τύπου II, η SsLPPS, κυκλοποιεί το GGPP προς 8OH-CPP¹³, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε σκλαρεόλη (labda-14-en-8,13-diol) με την βοήθεια μιας διτερπενικής συνθάσης τύπου I, της συνθάσης της σκλαρεόλης (SsSCLS), χωρίς να απαιτείται κάποια περαιτέρω κατεργασία από τροποποιητικά ένζυμα (Caniard et al., 2012; Schalk et al., 2012).

¹³ 8OH-CPP: 8-hydroxycopalyl diphosphate ή αλλιώς LPP: labda-13-en-8-ol diphosphate

Γ.4.2. Παράκαμψη ενδογενών περιορισμών για την σύνθεση διτερπενοειδών¹⁴

Στον *S.cerevisiae*, η σύνθεση του FPP καταλύεται από ένα μόνο ένζυμο, τη συνθάση του διφωσφορικού φαρνεσουλίου (FPPS ή Erg20p), που κωδικοποιείται από το γονίδιο ERG20 και έχει την ιδιαιτερότητα ότι καταλύει και τη σύνθεση του GPP (βλ. εισαγωγή: ενότητα Α.3.2.). Κατά συνέπεια, η παραγωγή ετερόλογων σεσκιτερπενίων σε ικανοποιητικές ποσότητες είναι σχετικά εύκολη στον σακχαρομύκητα. Αντιθέτως, η παραγωγή ετερόλογων διτερπενίων δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική, καθώς για τη σύνθεση του GGPP απαιτείται και δεύτερο ένζυμο, το Bts1p, που κωδικοποιείται από το γονίδιο BTS1 και καταλύει τη συμπύκνωση ενός μορίου του FPP με ένα μόριο IPP. Εφόσον η σύνθεση του FPP αποτελεί σημείο διακλάδωσης πολλών βιοσυνθετικών πορειών, μεγάλο ποσοστό του FPP που παράγεται από το Erg20p καταναλώνεται από ανταγωνιστικά μονοπάτια, και κυρίως από το μονοπάτι σύνθεσης στερολών, ενώ μόνο μικρές ποσότητες φτάνουν στο ενεργό κέντρο του Bts1p.

Δεδομένου ότι η σύνθεση των στερολών απαιτεί την παρουσία οξυγόνου (βλ. εισαγωγή: ενότητα Γ.3.), με ανάπτυξη των κυττάρων υπό μερικής ή πλήρους αναερόβιες συνθήκες είναι δυνατόν να περιοριστεί η κατανάλωση πρώιμων μεταβολιτών, όπως το IPP και το FPP, από το μονοπάτι της εργοστερόλης και, κατ' επέκταση, να αυξηθεί η διαθεσιμότητά τους για άλλα μονοπάτια (Hampton et al., 1996). Ωστόσο, προσέγγιση καθοριστικής σημασίας για την αύξηση της σύνθεσης GGPP είναι η παράκαμψη του σημείου διακλάδωσης των επιμέρους βιοσυνθετικών πορειών. Ένας από τους τρόπους με τους οποίους επιτεύχθηκε αυτή η παράκαμψη είναι μέσω της επέκτασης της ενζυμικής δραστηριότητας της Erg20p ως προς τη σύνθεση GGPP. Συγκεκριμένα, με αντικατάσταση ενός καταλοίπου στο ενεργό της κέντρο του αγρίου τύπου ενζύμου δημιουργήθηκε μετάλλαγμα Erg20p(F96C) με πιο “ευρύχωρο” ενεργό κέντρο ικανό να χρησιμοποιεί και το FPP ως υπόστρωμα για συμπύκνωση με IPP (Igneva et al., 2015).

Γ.4.2.1. Βιοσύνθεση σκλαρεόλης στον *S.cerevisiae*¹⁴

Η βιοσύνθεση των λαβδανικών διτερπενίων, άρα και της σκλαρεόλης, ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο: αρχικά το GGPP κυκλοποιείται από μία διτερπενική συνθάση τύπου II προς σχηματισμό ενός κυκλικού διφωσφορικού ενδιάμεσου και στη συνέχεια αυτό το ενδιάμεσο μόριο αποδίδει τον τελικό διτερπενικό σκελετό με τη βοήθεια μιας διτερπενικής συνθάσης τύπου I (Peters, 2010). Όντως, για την ανασύσταση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της σκλαρεόλης σε κύτταρα *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες δύο διτερπενικές συνθάσες που απομονώθηκαν από το φυτό *Salvia sclarea* με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (απόδοση σκλαρεόλης έως και ~1.5 g/L¹⁵) (Schalk et al., 2012). Παρ' όλα αυτά, για τη σύνθεση του συγκεκριμένου διτερπενίου στον *S.cerevisiae* αρκεί η έκφραση μιας διτερπενικής συνθάσης τύπου II που καταλύει τη σύνθεση του 8OH-CPP και η ανάπτυξη των κυττάρων σε όξινες συνθήκες¹⁶, ώστε η σκλαρεόλη να παραχθεί μέσω όξινης υδρόλυσης του 8OH-CPP (εικόνα 6) (Igneva et al., 2015).

Το 8OH-CPP αποτελεί ενδιάμεσο για τη σύνθεση αρκετών άλλων διτερπενίων πέραν της σκλαρεόλης, γι' αυτό και έχουν απομονωθεί αρκετά ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεσή του. Οι Igneva et al. (2015) χρησιμοποίησαν στις δοκιμές τους τη συνθάση 8OH-CPP του φυτού

¹⁴ Προσαρμογή από Igneva et al., 2015.

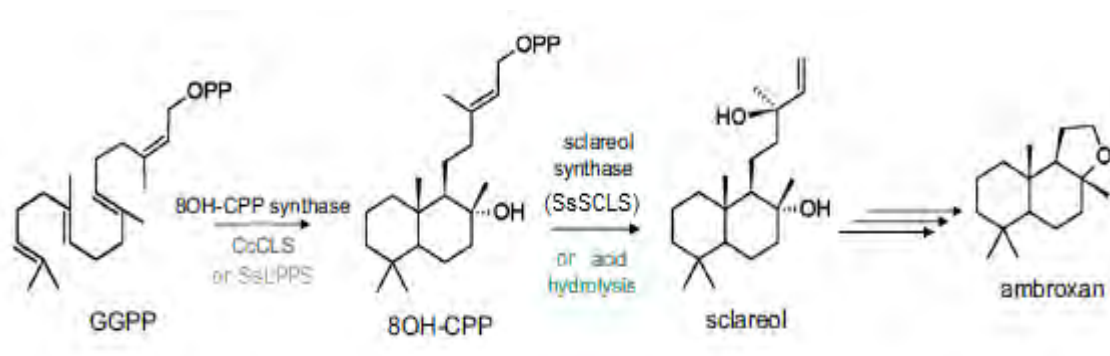
¹⁵ Πρόκειται για την μεγαλύτερη, προς το παρόν, καταγεγραμμένη απόδοση παραγωγής διτερπενίου από μικροβιακό ξενιστή (Schalk et al., 2012).

¹⁶ Χρήση θρεπτικού μέσου με αρχικές τιμές pH 3,5-4,5 ή θρεπτικού μέσου χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να είναι δυνατή η οξύνιση του κατά την διάρκεια της καλλιέργειας.

Cistus creticus (CcCLS) (Falara et al., 2010). Υπερέκφραση αυτής οδήγησε στην παραγωγή σκλαρεόλης με χαμηλή, όμως, απόδοση (0,2mg/L), αλλά με παράλληλη υπερέκφραση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου ERG20(F96C) καταγράφηκε τεράστια αύξηση (77x) της απόδοσης (15,4 mg/L).

Επίσης, δοκίμασαν τη συγχώνευση της ετερόλογης διτερπενικής συνθάσης CcCLS με την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Erg20p(F96C) [fusion CcCLS-Erg20p(F96C)]. Πρέπει να τονιστεί ότι η συγχώνευση ορισμένων ενζύμων μπορεί είναι μην είναι επιτυχής και τελικά να μην οδηγήσει σε αύξηση της απόδοσης του επιθυμητού προϊόντος. Ωστόσο, η τελευταία προσέγγιση αποδείχθηκε η αποτελεσματικότερη όλων αυξάνοντας την απόδοση σκλαρεόλης στα 28mg/L..

Επιπροσθέτως, η χρήση της κατασκευής CcCLS-Erg20p(F96C) φαίνεται να προσφέρει ένα ακόμη πλεονέκτημα: με τη διοχέτευση του GGPP απευθείας σε μια συνθάση διτερπενίων αποφεύγεται η συσσώρευσή του ενδοκυτταρικά, η οποία επάγει την αποικοδόμηση του ισοενζύμου Hmg2p (Garza et al., 2009). Το συγκεκριμένο ισοένζυμο εκφράζεται σε μερικής ή πλήρως αναερόβιες συνθήκες και είναι ένα από τα δύο ισοένζυμα με δραστηριότητα αναγωγάσης του HMG-CoA στον *S.cerevisiae*. Δεδομένου, λοιπόν, ότι τα ένζυμα αυτά καταλύουν το καθοριστικό βήμα του μονοπατιού MVA για τη σύνθεση όλων των ισοπρενοειδών, δηλαδή τη σύνθεση του μεβαλονικού (Hampton et al., 1996; Burg & Espenshade, 2011), η αποικοδόμηση του ισοενζύμου Hmg2p θα προκαλούσε τελικά μείωση της διαθεσιμότητας των διφωσφορικών πρενυλικών μορίων, που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τη σύνθεση τερπενοειδών (Triikka et al., 2015).



Εικόνα 6: Οι διτερπενικές συνθάσες τύπου II CcCLS και SsLPPS κυκλοποιούν το GGPP προς απόδοση 8OH-CPP, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε σκλαρεόλη είτε ενζυμικά, μέσω της δράσης της συνθάσης της σκλαρεόλης SsSCLS, δηλαδή μιας διτερπενικής συνθάσης τύπου I, είτε μέσω όξινης υδρόλυσης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του *S.cerevisiae*. Τελικά η παραχθείσα σκλαρεόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του τρικυκλικού αιθέρα ambroxan (προσαρμογή από Ignea et al., 2015)

Δ. Genome editing χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR/Cas αποτελεί έναν προκαρυωτικό μηχανισμό προσαρμοστικής ανοσίας έναντι γενετικών στοιχείων όπως οι ιοί και τα πλασμίδια και συγκροτείται από τον γενετικό τόπο CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) και τις πρωτεΐνες Cas (CRISPR-associated), οι γονιδιακοί τόποι των οποίων εδράζονται συνήθως κοντά στην περιοχή CRISPR. Βασίζεται στην ενσωμάτωση τμημάτων των εξωγενών γενετικών στοιχείων στον γενετικό τόπο CRISPR του ξενιστή και στην μετέπειτα μεταγραφή τους προς παραγωγή μικρών μορίων μη-κωδικοποιητικού RNA, γνωστών ως CRISPR RNAs (crRNAs). Αυτά περιέχουν μια αλληλουχία-οδηγό (καλούνται και guide RNAs, gRNAs) και βοηθούν τις RNA-εξαρτώμενες νουκλεάσες της οικογένειας Cas να αναγνωρίζουν και να κόβουν στοχευμένα όσα νεο-εισερχόμενα νουκλεϊκά οξέα φέρουν συμπληρωματικές περιοχές (*Wiedenheft et al., 2012*).

Με βάση κυρίως τον εκάστοτε συνδυασμό γονιδίων cas, τα συστήματα CRISPR/Cas έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρεις τύπους¹⁷ (I, II, III) με διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς δράσης (*Makarova et al., 2011*). Τα συστήματα τύπου II είναι τα απλούστερα επιτυγχάνοντας την εισαγωγή δίκλωνων τομών στο DNA με τη βοήθεια μιας μόνο πρωτεΐνης, της Cas9¹⁸, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα συστήματα που χρησιμοποιούν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα (*Bhaya et al., 2011*).

Η φύση των ενδονουκλεασών της οικογένειας Cas, που τέμνουν νουκλεϊκά οξέα κατευθυνόμενες από μόρια RNA, επιτρέπει τον “επαναπρογραμματισμό” τους με τη βοήθεια μικρών συνθετικών μορίων RNA που φέρουν τις επιθυμητές αλληλουχίες-οδηγούς (guide RNAs, gRNAs) με σκοπό τη στόχευση οποιασδήποτε αλληλουχίας. Δεδομένης της απλότητας των συστημάτων τύπου II, η πρωτεΐνη Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε τέτοιου είδους προσεγγίσεις, έπειτα από μικρές τροποποιήσεις [codon optimization για το εκάστοτε ετερόλογο κυτταρικό σύστημα με σκοπό για μεγιστοποίηση της έκφρασής της και προσθήκη σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS) για την παραμονή της στον πυρήνα των ευκαρυωτικών συστημάτων] (*Terns & Terns, 2014*). Ωστόσο, η Cas9 παρουσιάζει δύο ιδιαιτερότητες:

- 1) Για τη δράση της απαιτεί την παρουσία ενός βοηθητικού μορίου RNA, του tracrRNA¹⁹ (trans-activating RNA), που ζευγαρώνει με τμήμα του crRNA. Αντί για αυτά τα δύο μόρια RNA είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ένα -εξίσου αποτελεσματικό- χιμαιρικό μόριο, γνωστό ως sgRNA (single-guide RNA, **εικόνα 7**), που διατηρεί την αλληλουχία-οδηγό (20nt) του crRNA και τη δευτεροταγή δομή του υβριδίου tracrRNA:crRNA.
- 2) Μπορεί να αναγνωρίζει και να κόβει μια αλληλουχία-στόχο (protospacer) στο γενωμικό DNA μόνο αν καθοδικά αυτής υπάρχει μια καθορισμένη²⁰ ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία, η PAM (Protospacer Adjacent Motif), που λειτουργεί ως βοηθητικό σήμα²¹. Περιορίζονται, έτσι, οι περιοχές του DNA που είναι δυνατόν να στοχευθούν (*Jinek et al., 2012; Terns & Terns, 2014*).

¹⁷ Κάθε τύπος συστήματος CRISPR/Cas απαρτίζεται από επιμέρους υπότυπους. Όλα τα γνωστά συστήματα τέμνουν δίκλωνο DNA εκτός από τα συστήματα τύπου III-B που τέμνουν μονόκλωνο RNA.

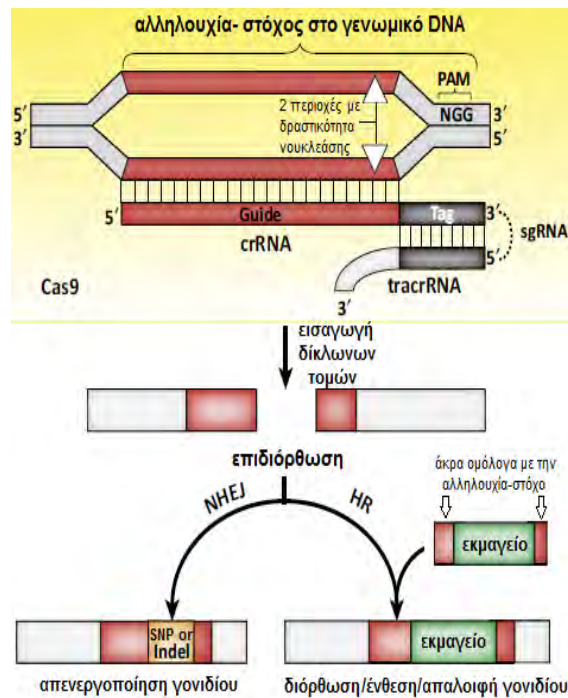
¹⁸ Κάθε μόριο Cas9 φέρει δύο ανεξάρτητες περιοχές με δραστηριότητα νουκλεάσης, καθεμιά από τις οποίες τέμνει μια αλυσίδα του δίκλωνου DNA (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.).

¹⁹ Το tracrRNA διαδραματίζει σημαντικό αλλά απροσδιόριστο ακόμη ρόλο στην στόχευση και στην τομή του DNA από την Cas9.

²⁰ Πρωτεΐνες Cas9 προερχόμενες από διαφορετικούς μικροοργανισμούς απαιτούν για τη δράση τους διαφορετικές αλληλουχίες PAM στο γενωμικό DNA.

²¹ Η PAM δεν παρουσιάζει συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία-οδηγό του sgRNA.

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη Cas9 προέρχεται από τον *Streptococcus pyogenes* και απαιτεί την απλή PAM «5'-NGG-3'» 1bp καθοδικά της αλληλουχίας-στόχου. Η συγκεκριμένη νουκλεάση εισάγει δίκλωνες τομές (DSBs) μεταξύ του 17^{ου} και του 18^{ου} νουκλεοτιδίου εντός μια αλληλουχίας-στόχου 20nt, δηλαδή 3bp ανοδικά της PAM (Jinek et al., 2012).



Εικόνα 7 επάνω: η Cas9 αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία-στόχο με τη βοήθεια του crRNA, που φέρει μια αλληλουχία-οδηγό 20nt στο 5'-άκρο του, και του tracrRNA, που ζευγαρώνει με το 3'-άκρο του crRNA. Κάτω: Οι δίκλωνες τομές επιδιορθώνονται A) είτε μέσω NHEJ, με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση σημειακών μεταλλάξεων (SNPs) ή μικρής έκτασης ενθέσεων/ελλειμάτων (INDELS) ικανών να απενεργοποιήσουν ή να διαταράξουν τη λειτουργία όποιου γονιδίου εντοπίζεται στη συγκεκριμένη περιοχή μετατοπίζοντας το αναγνωστικό του πλαίσιο ή/και εισάγοντας παρανοηματικές ή μη-νοηματικές μεταλλάξεις, B) είτε μέσω HR, αν παρέχεται εκμαγείο που φέρει τουλάχιστον άκρα ομόλογα με την αλληλουχία-στόχο, δίνοντας τη δυνατότητα στοχευμένης διόρθωσης ή απαλοιφής της συγκεκριμένης γενωμικής αλληλουχίας ή στοχευμένης ένθεσης ενός ή περισσοτέρων γονιδίων (Terns & Terns, 2014).

Η πρόκληση DSBs ακολουθείται από επιδιόρθωση των ρηγμάτων είτε μέσω ένωσης μη-ομόλογων άκρων (non-homologous end joining, NHEJ) είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR)²² (εικόνα 7). Η NHEJ είναι ένας επιρρεπής σε λάθη επιδιορθωτικός μηχανισμός που έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση τυχαίων σημειακών μεταλλάξεων ή μικρής έκτασης ενθέσεων/ ελλειμάτων στο σημείο της τομής, ενώ ο HR αποτελεί υψηλής πιστότητας μηχανισμό που εξαρτάται από εκμαγείο, το οποίο πρέπει να παρουσιάζει ομολογία με την αλληλουχία-στόχο τουλάχιστον στα άκρα του.

Μετασηματίζοντας, λοιπόν, ένα κύτταρο με ένα τμήμα DNA (πλασμίδιο ή γραμμική κασέτα), που λειτουργεί ως εκμαγείο, μαζί με τους φορείς έκφρασης της Cas9 και του sgRNA επιτυγχάνεται η ανασύσταση ενός λειτουργικού συστήματος CRISPR/Cas9 που τέμνει το γενωμικό DNA, ενώ παράλληλα προάγεται η επιδιόρθωσή του ρήγματος μέσω HR. Παρέχεται, έτσι, η δυνατότητα στοχευμένης τροποποίησης της αλληλουχίας-στόχου (απαλοιφή ή διόρθωση αυτής ή εισαγωγή επιθυμητών σημειακών μεταλλάξεων) ή στοχευμένης ενσωμάτωσης νέων στοιχείων έκφρασης σε αυτή (Terns & Terns, 2014; Barrangou, 2015).

²² Σε αντίθεση με τον μηχανισμό NHEJ, ο HR μπορεί να λάβει χώρα μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα.

Ε. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή προσεγγίσεων μεταβολικής μηχανικής στον ζυμομύκητα *S.cerevisiae* προκειμένου να επιτευχθεί παραγωγή του διτερπενίου σκλαρεόλη με αποδόσεις υψηλότερες από εκείνες παλαιότερων προσπαθειών. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε η -ήδη δοκιμασμένη και αποτελεσματική- γονιδιακή κατασκευή CcCLS-ERG20-(F96C) υπό τον έλεγχο ισχυρού ιδιοσυστατικού υποκινητή, όμως αυτή τη φορά δεν εισήχθη στα κύτταρα ως τμήμα πλασμιδιακού φορέα έκφρασης αλλά ως τμήμα γραμμικής κασέτας που ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των κυττάρων. Εξασφαλίστηκε, έτσι, η σταθερή έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης χωρίς να απαιτείται πλέον συνεχής άσκηση πίεσης μέσω θρεπτικού μέσου επιλογής για διατήρηση πλασμιδιακών φορέων στα κύτταρα. Μάλιστα, επιθυμώντας την υπερέκφραση της προαναφερθείσας κατασκευής και χάρη στην ικανότητα του *S. cerevisiae* να ενσωματώνει εξωγενή γενετικά στοιχεία στο γονιδίωμά του μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, χρησιμοποιήθηκαν κασέτες με άκρα ομόλογα ως προς τις αλληλουχίες LTRs των ρετροτρανσποζονίων Ty1 του σακχαρομύκητα, ώστε να στοχευθεί η πολυπληθέστερη οικογένεια επαναλαμβανόμενων στοιχείων του και να πραγματοποιηθεί πολλαπλή ένθεση της εκάστοτε κασέτας. Η αποτελεσματικότερη ενσωμάτωση των επιθυμητών κασετών στις αλληλουχίες-στόχους υποβοηθήθηκε από το σύστημα CRISPR/Cas9 μέσω στοχευμένης πρόκλησης δίκλωνων τομών στις περιοχές Ty1-LTRs, πράξη που αποσκοπούσε στην αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις αρχικές δοκιμές (που πραγματοποιήθηκαν και με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR/Cas9 αλλά και χωρίς αυτή) πολλαπλής ένθεσης της κατασκευής CcCLS-ERG20(F96C) στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε κασέτα με γονίδιο-δείκτη, εκατέρωθεν του οποίου υπήρχαν αλληλουχίες loxP, για να διευκολυνθεί η διαλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων και να είναι δυνατή η μετέπειτα εκτομή των γονιδίων-δεικτών με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP. Ωστόσο, η εμφανής μείωση στην απόδοση παραγωγής σκλαρεόλης μετά τη διαδικασία εκτομής έδωσε ώθηση στη διερεύνηση προσεγγίσεων υποβοηθούμενης από το σύστημα CRISPR/Cas9 πολλαπλής ένθεσης κασέτας που περιείχε μόνο την επιθυμητή γονιδιακή κατασκευή χωρίς γονίδιο-δείκτη.

Παράλληλα, διερευνήθηκαν μέθοδοι εκδίωξης πλασμιδίων με στόχο την γρήγορη απομάκρυνση των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των συστατικών του συστήματος CRISPR/Cas9 από τα τροποποιημένα κύτταρα ζύμης χωρίς να διαταραχθεί η ικανότητά τους να παράγουν σκλαρεόλη.

Β' ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Στελέχη ζύμης

Χρησιμοποιήθηκε το απλοειδές στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* AM238 το οποίο είναι αυξοτρόφο για τα αμινοξέα ιστιδίνη (His), θρυπτοφάνη (Trp) και λευκίνη (Leu) και την αζωτούχο βάση ουρακίλη (Ura) και περιέχει και άλλες διαγραφές γονιδίων που παρουσιάζονται αναλυτικά εδώ:

AM238	Mat alpha <i>his3, ura3, trp1, lexAops-LEU2, rox1, dos2, yer134c, vba5, ygr259c, ynr063w, derived from AM233 (Trikka et al., 2015)</i>
--------------	--

Η αυξοτροφία του συγκεκριμένου στελέχους αναιρείται έπειτα από μετασχηματισμό του με πλασμιαδικούς φορείς ή γραμμικές κασέτες DNA που προσφέρουν πρωτοτροφία για την ιστιδίνη, θρυπτοφάνη, λευκίνη ή ουρακίλη. Έτσι, είναι δυνατόν να επαχθεί η ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων κυττάρων σε αντίστοιχα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα.

2. Θρεπτικά μέσα

YPD medium*

Αποτελεί θρεπτικό μέσο ιδανικό για τη διατήρηση και τον γρήγορο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ζύμης (χρόνος διπλασιασμού εργαστηριακών απλοειδών στελεχών σε YPD: ~90 min στην εκθετική φάση σε άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30° C).

Για 1 λίτρο θρεπτικού μέσου:

10 gr εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)

20 gr πεπτόνη

20 gr γλυκόζη

Complete minimal (CM) & drop-out medium*

Για 1 λίτρο θρεπτικού μέσου:

1,3 gr complete minimal/ drop-out nutrient mix powder

6,7 gr Yeast Nitrogen Base (YNB)

20 gr γλυκόζη

Η γλυκόζη μπορεί να αντικατασταθεί από μίγμα 20 gr γαλακτόζης & 10 gr ραφινόζης στην περίπτωση που το γονίδιο που μας ενδιαφέρει βρίσκεται υπό τον έλεγχο επαγόμενου από τη γαλακτόζη υποκινητή.

Το complete minimal (CM) nutrient mix περιέχει μίγμα θρεπτικών συστατικών (αμινοξέα και αζωτούχες βάσεις) που υποστηρίζει την ανάπτυξη αυξοτρόφων στελεχών. Αντιθέτως, το drop-out nutrient mix, που προκύπτει από CM nutrient mix με την παράλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών συστατικών, χρησιμοποιείται για την παρασκευή θρεπτικών μέσων επιλογής που επιτρέπουν την ανάπτυξη μόνο στελεχών που είναι πρωτότροφα για τον παράγοντα που απουσιάζει από το μέσο (π.χ. λόγω μετασχηματισμού με πλασμίδιο το οποίο φέρει γονίδιο- δείκτη που αναιρεί την αυξοτροφία για τον εν λόγω παράγοντα).

*Στα παραπάνω μίγματα συμπληρώνεται μόνο απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1L αν πρόκειται για υγρά θρεπτικά μέσα, ενώ για την παρασκευή στερεών θρεπτικών μέσων προστίθενται επίσης 20 gr άγαρ & 1 ml διάλυμα NaOH (1 pellet/ ml). Σε κάθε περίπτωση ακολουθεί αποστείρωση των θρεπτικών μέσων στο αυτόκαυστο (20min στους 121° C). Το διάλυμα NaOH ρυθμίζει το pH στην τιμή 5,8- 6,2 για να αποφευχθεί η διάσπαση του άγαρ κατά την αποστείρωση.

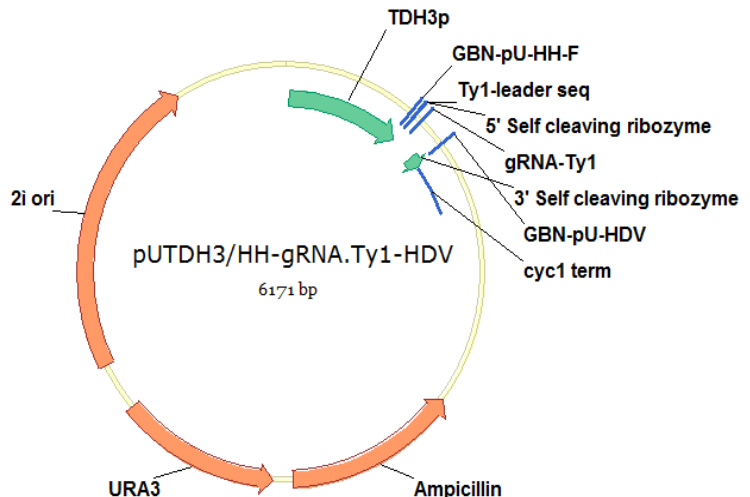
3. Πλασμιδιακοί φορείς & κασέτες

3.1. Φορέας της Cre ρεκομπινάσης

Πρόκειται για το πλασμίδιο ρB227/Gal-Cre που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο του Δρ. F. Heffron. Φέρει το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης του φάγου P1, υπό τον έλεγχο επαγόμενου από τη γαλακτόζη υποκινητή Gal1/10p, και το γονίδιο LEU2, που εμπλέκεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του αμινοξέος λευκίνη, ως δείκτη για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης (Ross-MacDonald et al., 1997). Συνεπώς, απαιτείται χρήση θρεπτικού μέσου Glu/CM-Leu για διατήρηση του πλασμιδίου στα κύτταρα ζύμης ή Gal-Raff/CM-Leu για επαγωγή της έκφρασης της Cre ρεκομπινάσης.

3.2. Φορέας του gRNA

Πρόκειται για το πλασμίδιο ρUTDH3/HH-gRNA.Ty1-HDV (εικόνα 8) που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο του Δρ. Α. Μακρή. Το πλασμίδιο φέρει ως δείκτη το γονίδιο URA3 του *Kluyveromyces lactis*, το οποίο συμπληρώνει τα *ura3* μεταλλάγματα του *S.cerevisiae* επιτρέποντας την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων στελεχών απουσία ουρακίλης. Η έκφραση του επιθυμητού gRNA βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή TDH3p, που είναι ιδιοστατικός και αναγνωρίζεται από την πολυμεράση II του RNA²³. Από τη μεταγραφή προκύπτει ένα πρόδρομο μόριο RNA που φέρει ένα ριζοένζυμο τύπου Hammerhead (HH) στο 5'-άκρο του, την επιθυμητή αλληλουχία gRNA στο μέσο και το ριζοένζυμο του ιού της ηπατίτιδας δ (Hepatitis Delta Virus, HDV) στο 3'-άκρο του. Χάρη στην παρουσία των ριβοενζύμων, το πρόδρομο μόριο RNA αυτοτέμνεται προς απόδοση του ώριμου gRNA (Gao & Zhao, 2014).



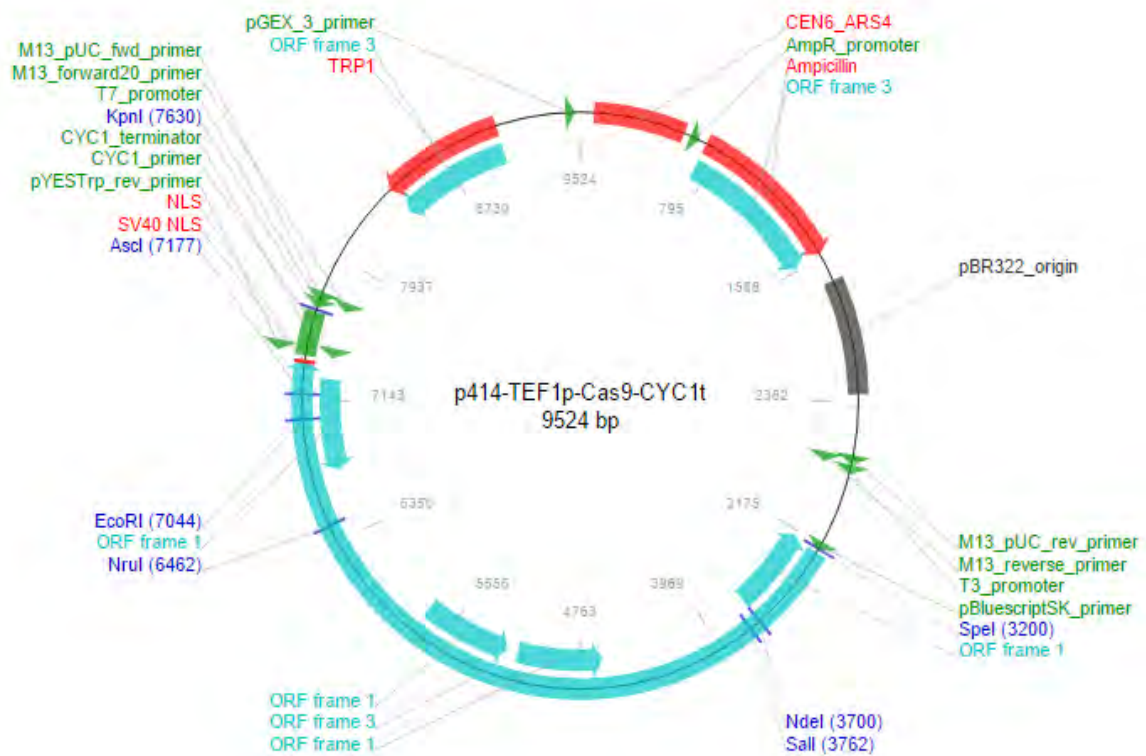
Εικόνα 8: Χάρτης του πλασμιδίου ρUTDH3/HH-gRNA.Ty1-HDV, που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την έκφραση του gRNA στα κύτταρα ζύμης.

3.3. Φορείς της Cas9

Το γονίδιο της Cas9 που χρησιμοποιήθηκε για την ανασύσταση του συστήματος CRISPR/Cas9 στον *S.cerevisiae* προήλθε από το βακτήριο *Streptococcus pyogenes*. Για την έκφρασή του χρησιμοποιήθηκαν ακόλουθοι δύο πλασμιδιακοί φορείς που κατασκευάστηκαν και καταχωρήθηκαν στην βάση πλασμιδιακών φορέων «Addgene» (<https://www.addgene.org/>) από το εργαστήριο του George Church (DiCarlo et al., 2013):

²³ Οι Gao & Zhao (2014) προτείνουν για την έκφραση των gRNAs την χρήση υποκινητών που αναγνωρίζονται από την RNA Pol II, ώστε να παρακαμφθούν οι περιορισμοί που απορρέουν από τη χρήση υποκινητών της RNA Pol III. Επίσης, δεδομένου ότι τα μεταγράφα της RNA Pol II υφίστανται επεξεργασία στα άκρα τους μετά τη σύνθεσή τους, δείχνουν ότι τοποθετώντας την αλληλουχία του επιθυμητού gRNA μεταξύ δύο ριβοενζύμων δεν αλλοιώνονται τα άκρα του και τελικά προκύπτει ένα πλήρως λειτουργικό μόριο gRNA.

1. ο -πολλαπλών αντιγράφων (**high copy**)- φορέας **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t** (*Addgene plasmid #43802*, **εικόνα 9**), στον οποίο η έκφραση της Cas9 βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ιδιοσυστατικού υποκινητή TEF1p. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης βασίζεται στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζει το αμινοξύ θρυπτοφάνη, καθώς το πλασμίδιο φέρει το γονίδιο TRP1 ως δείκτη.



Εικόνα 9: Χάρτης του high-copy πλασμιδίου p414-TEF1-Cas9-CYC1t.

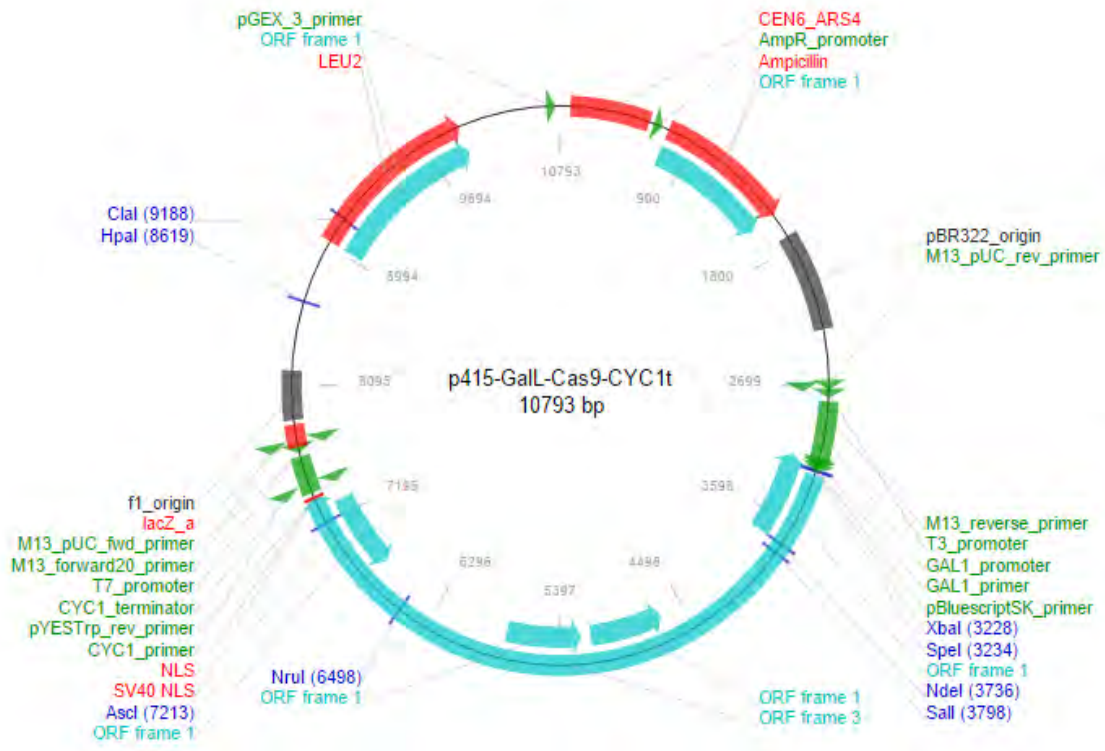
2. ο -μικρού αριθμού αντιγράφων (**low copy**)- φορέας **p415-Gallp-Cas9-CYC1t** (*Addgene plasmid #43804*, **εικόνα 10**) που φέρει το γονίδιο της Cas9 υπό τον έλεγχο του επαγόμενου από τη γαλακτόζη υποκινητή Gallp και το γονίδιο LEU2 ως δείκτη για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης. Επομένως, απαιτείται η χρήση θρεπτικού μέσου Gal-Raff/CM -Leu για επαγωγή της έκφρασης της Cas9.

3.4. Φορείς κασετών και κασέτες

Ως φορέας της κασέτας με δείκτη χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **pblue/Ty1-LTR-CLS-ERG20 (F96C)-HIS5**, που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο του Δρ.Α.Μακρή αποκλειστικά για τον συγκεκριμένο σκοπό. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή του και για την απομόνωση της επιθυμητής κασέτας **Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5** από αυτό με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων περιγράφεται στην ενότητα 4.2., ενώ η δομή της κασέτας παρουσιάζεται στην **εικόνα 12**.

Ως φορέας της κασέτας χωρίς δείκτη χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **COD7/CLS-ERG20 (F96C)-HIS5 (εικόνα 13)** (*Trikka et al., 2015*). Η κασέτα **COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his^r)** απομονώθηκε μέσω ενίσχυσης ενός τμήματος του φορέα με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, η διαδικασία για την ενίσχυση της κασέτας και η δομή της περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 5.2.

Το γονίδιο HIS5 που χρησιμοποιείται ως δείκτης στους παραπάνω φορείς και στην κασέτα Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 προέρχεται από τον μύκητα *Schizosaccharomyces pombe* και συμπληρώνει τα *his3* μεταλλάγματα του *S.cerevisiae* επιτρέποντας την ανάπτυξή τους απουσία ιστιδίνης.



Εικόνα 10: Χάρτης του low-copy πλασμιδίου p415-GalL-Cas9-CYC1t.

4. Πέψη με ένζυμα περιορισμού

4.1. Ένζυμα περιορισμού

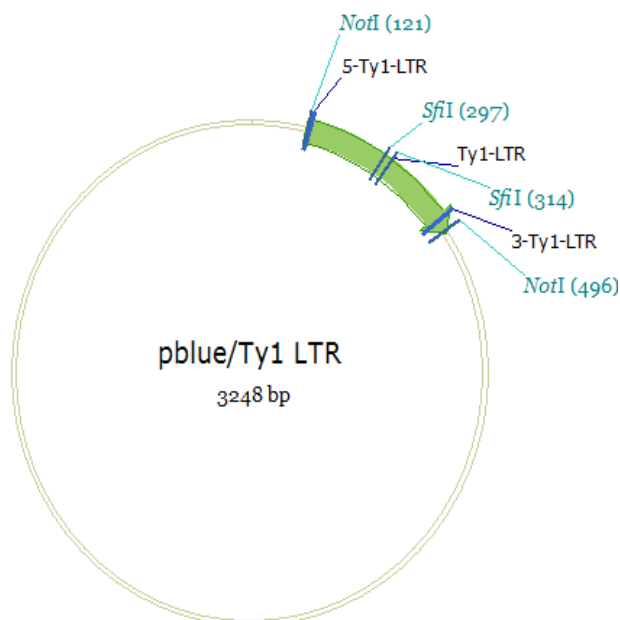
Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν καθορισμένες βραχείες αλληλουχίες (μήκους 4-8 βάσεων) στις οποίες προσδένονται και έπειτα, ανάλογα με τον τύπο τους, τέμνουν το δίκλωνο DNA στη συγκεκριμένη περιοχή ή σε κάποια γειτονική θέση δημιουργώντας θραύσματα με λεία, δίκλινα («αμβλέα», blunt) ή προεξέχοντα, μονόκλινα («κολλώδη», sticky) άκρα. Τα ένζυμα αυτά απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπου φυσιολογικά πέπτουν τυχόν ξένο DNA που εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων παρέχοντας προστασία έναντι προσβολής από φάγους, και βρίσκουν εφαρμογές σε τεχνικές Μοριακής Βιολογίας που απαιτούν την πέψη μιας αλληλουχίας DNA. Η δράση τους εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία επώασης, το pH και την ιονική ισχύ του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Οι τελευταίες δύο παράμετροι προσαρμόζονται για το εκάστοτε ένζυμο με τη βοήθεια ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffer), τα οποία μπορεί επίσης να περιέχουν σταθεροποιητές ενζύμων (π.χ. ζελατίνη) ή και ισχυρούς αναγωγικούς παράγοντες (π.χ. β-μερκαπταιθανόλη) για την αναστολή της δράσης άλλων νουκλεασών που ενδεχομένως υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης. Η ποσότητα ενζύμου που χρησιμοποιείται σε κά-

θε αντίδραση εξαρτάται από την ενεργότητα του ενζύμου στις εκάστοτε συνθήκες αλλά και από την ποσότητα και το μέγεθος του προς κατάτμηση DNA.

4.2. Κατασκευή κασέτας με γονίδιο-δείκτη με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων

Για την απομόνωση της κασέτας **Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5** χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένος πλασμιδιακός φορέας **pBlue/Ty1-LTR (εικόνα 11)**, που είχε ήδη κατασκευαστεί στο εργαστήριο του Δρ. Α. Μακρή. Συγκεκριμένα, στον πλασμιδιακό φορέα **pBlue** ενσωματώθηκε αλληλουχία **Ty1-LTR** στην θέση περιορισμού **NotI**. Η αλληλουχία **Ty1-LTR** φέρει δύο κοντινές θέσεις περιορισμού για το ένζυμο **SfiI**, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του **pBlue/Ty1-LTR** με σκοπό ο φορέας να γίνει γραμμικός και να συνδεθεί στη συνέχεια με το ένθεμα **TDH3p-CLS-ERG20(F96C)-LoxP-HIS5-LoxP**.

Η απομόνωση της κασέτας από τον συγκεκριμένο φορέα έγινε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου **NotI**, ώστε οι περιοχές **5'-Ty1-LTR** και **3'-Ty1-LTR** να αποτελέσουν τελικά τα άκρα αυτής. Οι αλληλουχίες που περιέχονται στην κασέτα φαίνονται στην **εικόνα 12**.

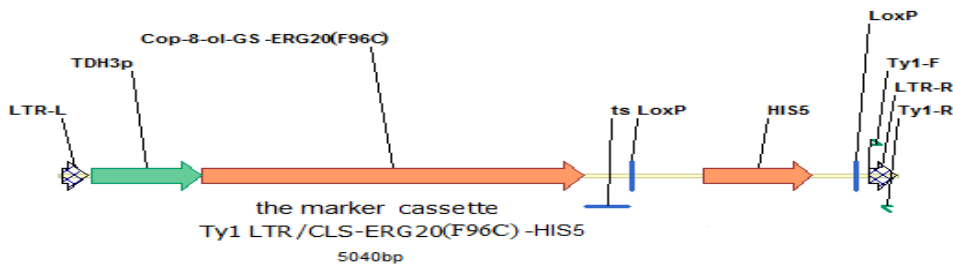


Εικόνα 11: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα **pBlue/Ty1-LTR** που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της κασέτας με γονίδιο- δείκτη.

Για την αντίδραση πέψης (με τελικό όγκο 100μl) προστέθηκαν σε ένα σωληνάριο Eppendorf τα ακόλουθα:

- 20μl (10μg) πλασμιδιακού φορέα **pBlue/Ty1-LTR-CLS-ERG20(F96C)-HIS5**
- 10μl **CutSmart™** buffer (New England Biolabs Inc.)
- 4μl **NotI** (New England Biolabs Inc.)
- 66μl **ddH₂O**

Το μίγμα της αντίδρασης επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3h με βάση τις υποδείξεις του κατασκευαστή του ενζύμου και έπειτα 2μl του μίγματος ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1% προς επιβεβαίωση λήψης θραύσματος του επιθυμητού μεγέθους (ανιχνεύθηκε ζώνη που αντιστοιχεί σε τμήμα DNA μεγέθους ~5Kb). Τέλος, το μίγμα υπέστη καθαρισμό προς παραλαβή της επιθυμητής κασέτας σε καθαρή μορφή χρησιμοποιώντας το **QIAquick gel extraction kit** (Qiagen) με βάση προτεινόμενο -για το συγκεκριμένο kit- πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων ενζυμικής πέψης.



Εικόνα 12: Χάρτης κασέτας με γονίδιο- δείκτη. Η κασέτα φέρει το γονίδιο CLS-ERG20 (F96C) και το γονίδιο HIS5 που λειτουργεί ως δείκτης (προσφέρει πρωτοτροφία για την ιστιδίνη σε αυξότροφα στελέχη) υπό τον έλεγχο του ιδιοσυστατικού υποκινητή TDH3p. Εκατέρωθεν του γονιδίου HIS5 βρίσκονται αλληλουχίες LoxP που χρησιμοποιούνται για την εκτομή του από την κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP, προκειμένου η ίδια κασέτα να επαναχρησιμοποιηθεί. Τα άκρα της κασέτας αποτελούνται από αλληλουχίες Ty1-LTR που επιτρέπουν την ενσωμάτωσή της μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στο γένωμα του *S.cerevisiae*.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

5.1. Περιγραφή μεθόδου

Η PCR αποτελεί σημαντικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας, καθώς επιτρέπει τον *in vitro* πολλαπλασιασμό επιλεγμένων τμημάτων DNA. Μάλιστα, δεν είναι απαραίτητη η γνώση της πλήρους αλληλουχίας των προς ενίσχυση τμημάτων DNA, παρά μόνο των άκρων τους για τον σχεδιασμό συμπληρωματικών προς αυτά ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών πάνω στους οποίους θα συνθέσει τους συμπληρωματικούς κλώνους η πολυμεράση του DNA.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η αποδιάταξη (denaturation) του DNA-στόχου, που επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-95°C για περίπου 30sec. Έτσι, το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο επιτρέποντας τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (annealing) πάνω σε αυτό, διαδικασία που απαιτεί θερμοκρασίες μεταξύ των 50-65°C για περίπου 1 min. Ακολουθεί η επέκταση (extension) των νέων κλώνων με την προσθήκη νουκλεοτιδίων συμπληρωματικών ως προς το DNA-στόχο στο 3'-άκρο κάθε εκκινητή με τη βοήθεια μιας πολυμεράσης του DNA. Αυτό το στάδιο απαιτεί θερμοκρασίες μεταξύ 72-74° C για περίπου 30sec-2min ανάλογα με το μέγεθος του προς ενίσχυση τμήματος και την ποιότητα της πολυμεράσης του DNA που χρησιμοποιείται. Τα τρία παραπάνω στάδια συγκροτούν έναν κύκλο της PCR που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο θυγατρικών μορίων DNA. Δηλαδή, η ενίσχυση του DNA-στόχου ακολουθεί το εκθετικό πρότυπο 2^n , όπου n: ο αριθμός των κύκλων, με βέλτιστο αριθμό κύκλων²⁴ να κυμαίνεται μεταξύ 25-40 ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση του DNA- στόχου στο δείγμα. Οι γρήγορες εναλλαγές της θερμοκρασίας μεταξύ των επιμέρους σταδίων επιτυγχάνονται με τη βοήθεια αυτοματοποιημένων συσκευών που καλούνται θερμοκυκλοποιητές.

Τα βασικά συστατικά για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR είναι τα ακόλουθα:

1. Μια ειδική θερμοανθεκτική πολυμεράση του DNA,
2. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, που καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί και επιτρέπουν την εκκίνηση του πολυμερισμού των νέων κλώνων από την πολυμεράση του DNA. Οι εκκινητές πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και συμπληρωματικοί ο καθένας ως προς μία από τις αλυσίδες του DNA-στόχου. Για το σχεδιασμό τους λαμβάνονται υπόψη οι εξής παράμετροι:

²⁴Υπερβολικός αριθμός κύκλων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης, ενώ μικρός αριθμός κύκλων οδηγεί στη μη ανίχνευση του DNA- στόχου.

- Το μήκος τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18- 24 νουκλεοτιδίων.
- Αποφεύγονται εκκινητές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και με σημαντική δευτεροταγή δομή.
- Δεν πρέπει να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους στα άκρα τους, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός “διμερών εκκινητών” (primer dimer).
- Προτιμώνται εκκινητές με παρόμοια σύσταση βάσεων, ώστε να εμφανίζουν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας τήξης [$T_m = (A+T) \cdot 2^\circ C + (G+C) \cdot 4^\circ C$] και κατ’ επέκταση να απαιτούν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας για το στάδιο υβριδοποίησης, δεδομένου ότι η θερμοκρασία υβριδοποίησης ορίζεται περίπου ως 5° χαμηλότερη από την T_m .

Για συγκεκριμένες εφαρμογές, π.χ. εισαγωγή ρυθμιστικών στοιχείων ή θέσεων που αναγνωρίζονται από περιοριστικά ένζυμα, αλληλουχίες μη- συμπληρωματικές προς το εκμαγείο μπορεί να προστεθούν στο 5’-άκρο των εκκινητών με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση αυτών των αλληλουχιών στα άκρα των προϊόντων της PCR.

- Διάλυμα ελεύθερων 5’ τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) με ίσες συγκεντρώσεις για κάθε νουκλεοτίδιο, προκειμένου να περιοριστεί η πιθανότητα ενσωμάτωσης λανθασμένου νουκλεοτιδίου στα προϊόντα της αντίδρασης.
- Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$ για παροχή των –απαραίτητων για τη δράση της πολυμεράσης του DNA- ιόντων Mg^{+2} .
- Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της πολυμεράσης του DNA που διατηρεί σταθερό το pH και την ιονική ισχύ του περιβάλλοντος της αντίδρασης και περιέχει επίσης σταθεροποιητές του ενζύμου.
- Το DNA- στόχος. Συνήθως, για την αντίδραση χρειάζονται 0,1 pg έως 1 ng DNA, όταν πρόκειται για πλασμιδιακό DNA. Σε κάθε περίπτωση, το DNA πρέπει να μην είναι κατεστραμμένο στην περιοχή του στόχου και να είναι υψηλής καθαρότητας, χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά που μπορεί να αναστέλλουν τη δράση της πολυμεράσης του DNA.

5.2. Κατασκευή κασέτας χωρίς δείκτη με τη βοήθεια PCR

Η κασέτα **COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his)** δημιουργήθηκε έπειτα από ενίσχυση με PCR ενός τμήματος του πλασμιδίου COD7/CLS-ERG20(F96C)-HIS5. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 13**, στον πλασμιδιακό φορέα η αλληλουχία του γονιδίου CLS-ERG20(F96C) ακολουθείται από την αλληλουχία του γονιδίου-δείκτη HIS5, η οποία πρέπει να απουσιάζει από την κασέτα. Αυτό επιτεύχθηκε με τον σχεδιασμό κατάλληλου reverse εκκινητή που υβριδίζεται στο DNA-στόχο ανοδικά της αλληλουχίας του γονιδίου-δείκτη. Επίσης, η εικονιζόμενη περιοχή στον συγκεκριμένο φορέα δεν περιβάλλεται από αλληλουχίες Ty1-LTR, που χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση της κασέτας στο γένωμα του *S.cerevisiae* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Προκειμένου οι αλληλουχίες αυτές να ενσωματωθούν στα άκρα των προϊόντων της PCR, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές με αλληλουχίες Ty1-LTR στα 5’-άκρα τους:

Ty1-COD7-F	aggaataatcgaatattagtagtagaaaatagattccattttgaggattcctatatccagttcaggtttatcattatc
Ty1-cyc1-R	ttccattgttgataaggctataatattaggtatatacagaatatactagaagttctcgccgcaaataaagccttcgag

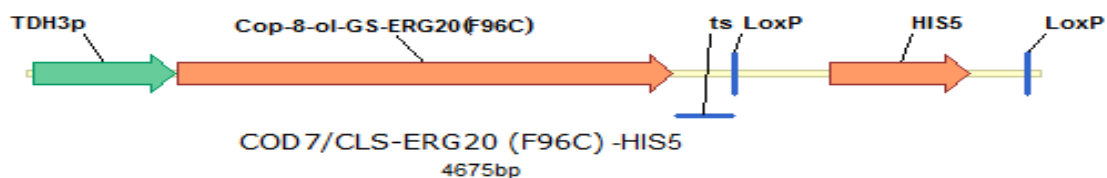
Με σκοπό να ληφθεί μεγάλη ποσότητα προϊόντος δημιουργήθηκε το παρακάτω μίγμα αντίδρασης τελικού όγκου 300μl, που μοιράστηκε σε έξι σωληνάρια PCR (50μl/ σωληνάριο):

- 6μl πλασμιδιακού φορέα COD7/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (από αραιώση 1:10)
- 60μl MyTaq™ Buffer²⁵, 5x (BIOLINE)
- 3μl MyTaq™ DNA polymerase (BIOLINE)
- 6μl εκκινητή Ty1-COD7-F, 20 μM (Invitrogen)
- 6μl εκκινητή Ty1-cyc1-R, 20 μM (Invitrogen)
- 219μl ddH₂O

Στη συνέχεια, τα σωληνάρια PCR τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή ρυθμισμένο να εκτελέσει το παρακάτω πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	1min	Πριν τον 1 ^ο κύκλο
Αποδιάταξη DNA-στόχου	95°C	30sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	58°C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	2min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	Μετά τον τελευταίο κύκλο
Συντήρηση	4°C	∞	

Μετά το πέρας της αντίδρασης, 2μl του μίγματος ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% προς επιβεβαίωση της παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων (ανιχνεύθηκε ζώνη που αντιστοιχεί σε τμήμα DNA μεγέθους ~4Kb).



Εικόνα 13: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα COD7/CLS-ERG20(F96C)-HIS5. Απεικονίζεται μόνο το τμήμα που περιέχει το γονίδιο CLS-ERG20 (F96C) υπό τον έλεγχο του ιδιοσυστατικού υποκινητή TDH3p και το γονίδιο-δείκτη HIS5.

6. Καθαρισμός προϊόντων PCR με φαινόλη/χλωροφόρμιο & κατακρήμνιση με αιθανόλη

6.1. Διαδικασία

Τα προϊόντα της PCR από τα επιμέρους σωληνάρια PCR συγκεντρώνονται σε ένα σωληνάριο erpendorf στο οποίο προστίθεται ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 500μl. 150μl φαινόλη και 150μl χλωροφόρμιο αναμειγνύονται σε διαφορετικό σωληνάριο erpendorf με τη βοήθεια vortex, το μίγμα μεταφέρεται στο σωληνάριο που περιέχει τα προϊόντα της PCR και αναδεύεται ξανά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2min σε 12000rpm, μετά το πέρας της οποίας προκύπτουν δύο διακριτές φάσεις: η οργανική (κάτω) και η υδατική (πάνω). Η υδατική φάση

²⁵ Το MyTaq™ Buffer περιέχει επίσης τα απαραίτητα ελεύθερα 5'-dNTPs και ιόντα Mg²⁺.

μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο erpendorf. Σε αυτό προστίθενται 300μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 2min σε 12000rpm. Στη συνέχεια, η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.

Στην υδατική φάση που προκύπτει προστίθενται 50μl οξικού νατρίου 2M και, έπειτα από ανάδευση, 1ml παγωμένης, απόλυτης (100%) αιθανόλης. Το σωληνάριο αφήνεται στους -20°C για 1h και μετά φυγοκεντρείται στους 4°C για 15min σε 12000rpm. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το DNA που παραμένει ως ίζημα στον πάτο του σωληναρίου ξεπλένεται με 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στους 4°C για 3-4min σε 12000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το ίζημα αφήνεται μέσα στο σωληνάριο με ανοιχτό το καπάκι μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη και τελικά επαναδιαλυτοποιείται σε 2μl DNA σπέρματος σολομού, για να ακολουθήσει μετασχηματισμός των κυττάρων ζύμης με την κασέτα.

6.2. Επεξήγηση μεθόδου

Η απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων είναι πιο αποδοτική όταν χρησιμοποιούνται δύο οργανικοί διαλύτες αντί για έναν, γι' αυτό συνήθως προτιμάται για τον συγκεκριμένο σκοπό η εκχύλιση με φαινόλη/ χλωροφόρμιο. Η φαινόλη αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες (μαζί με τα λιπίδια αν υπάρχουν) από τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ το χλωροφόρμιο διευκολύνει τον διαχωρισμό των δύο φάσεων λόγω της πυκνότητας που προσδίδει στη οργανική φάση και απομακρύνει τυχόν υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα. Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση.

Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη (ή ισοπροπανόλη) για τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή/ και για την απομάκρυνση αλάτων, ενζύμων ή άλλων προσμίξεων από το υδατικό διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων. Η αιθανόλη δρα ως αφυδατικό, καθώς αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊκά οξέα εκθέτοντας τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές τους ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα του διαλύματος -συγκεκριμένα, στα Na⁺ που προκύπτουν από τη διάσταση του οξικού νατρίου- που τελικά συνδέονται με αυτές. Έτσι, μειώνονται οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιζήματος, διαδικασία που υποβοηθείται από την εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών (χρήση παγωμένης αιθανόλης και φυγοκέντρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες), που μειώνουν τη διαλυτότητα των νουκλεϊκών οξέων.

7. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

7.1. Βασικές αρχές μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων μορίων (πρωτεΐνες, DNA, RNA) που βασίζεται στην ικανότητά τους να κινούνται κατά μήκος στερεού πορώδους υποστρώματος (πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης) στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα υπό εξέταση μόρια κινούνται προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο με διαφορετικές ταχύτητες εξαιτίας διαφορών που σχετίζονται με το φορτίο, τη μάζα ή και τη δομή τους. Η οπτικοποίηση τους καθίσταται δυνατή με ειδικές χρώσεις και παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

Για τον διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε περιπτώσεις που δεν απαιτείται εξαιρετικά μεγάλη διακριτική ικανότητα (π.χ. για διαχωρισμό τμημάτων DNA έπειτα από κατάτμηση με περιοριστικά ένζυμα ή ανάλυση προϊόντων PCR) χρησιμοποιούνται πηκτώματα αγαρόζης. Σε συνθήκες ουδέτερου pH, το DNA φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων, άρα το προς ανάλυση δείγμα τοποθετείται στην κάθοδο (-) και μετακινείται προς την άνοδο (+).

7.2. Διαδικασία

Για την παρασκευή 40ml πηκτώματος αγαρόζης 1% (w/v), 0,4gr αγαρόζης (Ultra Pure™ Agarose, Invitrogen) και 40ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (running gel buffer) 1x TAE (Tris-οξικό/EDTA)²⁶ προστίθενται σε κωνική φιάλη. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για ~2min και αναδεύεται για να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία του μίγματος φτάσει στους 50° C, προστίθενται σε αυτό 2ml βρωμιούχου αιθιδίου²⁷ 10mg/ml. Μετά από ανάδευση, η ρευστή αγαρόζη αποχύνεται σε εκμαγείο, όπου τοποθετούνται ειδικά “χτενάκια” για να προκύψουν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων. Όταν στερεοποιηθεί το πήκτωμα, τα χτενάκια απομακρύνονται και το εκμαγείο με το πήκτωμα μεταφέρονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα, ώστε να διατηρείται σταθερή η κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα (2μl) αναμειγνύονται με 2μl gel loading buffer²⁸ 6x, φορτώνονται στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος με πιπέτα και εκτίθενται σε συνεχή τάση 100V για ~30min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους του DNA στις ζώνες που προκύπτουν, ταυτόχρονα στο ίδιο πήκτωμα ηλεκτροφορείται και κατάλληλος μάρτυρας που σχηματίζει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους (1kb/1000bp BLUE DNA Ladder, GeneON). Για την εμφάνιση των ζωνών του πηκτώματος χρησιμοποιείται τράπεζα UV ακτινοβολίας. Τότε οι ζώνες φαίνονται ερυθρές- πορτοκαλί.

8. Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας υγρής καλλιέργειας κυττάρων

Η συγκέντρωση κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια υποδεικνύεται, με τη βοήθεια της φασματοφωτομετρίας, από την τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD) δείγματος 1ml αυτής. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται μήκος κύματος 600 nm (περιοχή ορατού) και το προς μέτρηση δείγμα τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα. Πριν τη μέτρηση, τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο κυψελίδα η οποία περιέχει μόνο το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που έχει χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια (blank, “κενό” δείγμα) για μηδενισμό της απορρόφησης. Καθώς

²⁶ Για παρασκευή διαλύματος 1x TAE buffer, σε 20ml 50x TAE buffer stock προστίθεται ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1L. Το stock 50x TAE Buffer περιέχει: 242gr Tris base, 18,6gr EDTA, 57,1ml οξικό οξύ και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1L.

²⁷ Βρωμιούχο αιθίδιο: χρωστική που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων και χρησιμοποιείται για την εμφάνιση των ζωνών σε πηκτώματα, με έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία.

²⁸ Το gel loading buffer περιέχει γλυκερόλη (προσδίδει στα δείγματα πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, ώστε να καταβυθιστούν στις θέσεις φόρτωσης) και μπλε της βρωμοφαινόλης (Χρωστική που διευκολύνει τη διαδικασία φόρτωσης των δειγμάτων και επιτρέπει τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης, καθώς διαθέτει αρνητικό φορτίο άρα κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA. Λόγω του χαμηλού της μοριακού βάρους μετακινείται περίπου όπως ένα τμήμα γραμμικού δίκλωνου DNA μεγέθους 300bp σε πήκτωμα αγαρόζης 1%).

η ακτίνα φωτός διέρχεται διαμέσου του εναιωρήματος που περιέχεται στην κυψελίδα, σκεδάζεται λόγω της παρουσίας κυττάρων ή και άλλων μικροσκοπικών σωματιδίων και το ποσοστό της σκέδασης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των σωματιδίων στο εναιώρημα.

Η OD₆₀₀ μιας υγρής καλλιέργειας αποτελεί δείκτη της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, πληροφορία κρίσιμη για διαδικασίες όπως ο μετασχηματισμός.

9. Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

9.1. Διαλύματα

Διάλυμα 1: Μείγμα 1M Lithium acetate²⁹, 10x TE buffer³⁰ και αποστειρωμένου ddH₂O σε αναλογία 1:1:8. Απαιτούνται 750μl διαλύματος 1 για κάθε 50ml καλλιέργειας.

Διάλυμα 2: Μείγμα 1M Lithium acetate, 10x TE buffer και 50% PEG³¹ (polyethylene glycol) σε αναλογία 1:1:8. Για έναν μετασχηματισμό απαιτούνται 300μl διαλύματος 2.

Διάλυμα salmon sperm DNA 100 μg/ml (AppliChem): προαιρετικό! Λειτουργεί ως μονόκλωνο carrier DNA αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού (*Schiestl & Gietz, 1989*).

9.2. Διαδικασία

Η παρασκευή των διαλυμάτων και οι ακόλουθοι χειρισμοί πραγματοποιούνται κοντά σε φλόγα λύχνου Bunsen για διασφάλιση ασηπτικών συνθηκών. Τα διαλύματα 1 και 2 αναδεύονται σχολαστικά στο vortex προς ομογενοποίησή τους πριν χρησιμοποιηθούν.

Αρχικά, φρέσκιες αποικίες ζύμης ενοφθαλμίζονται σε 5ml κατάλληλου υγρού θρεπτικού μέσου (YPD ή drop-out medium) και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας για 16h (overnight) στους 30° C υπό ανάδευση. Έπειτα, μέρος αυτής της καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε 50ml φρέσκου όμοιου υγρού θρεπτικού μέσου έτσι ώστε να προκύψει νέα καλλιέργεια με OD₆₀₀ ίση με ~0,1. Η νέα καλλιέργεια επωάζεται στις ίδιες συνθήκες μέχρι η OD₆₀₀ να αποκτήσει τιμή 0,5- 0,6 (τότε τα κύτταρα βρίσκονται στα μέσα της εκθετικής τους φάσης, γεγονός που ευνοεί την έκφραση πρωτεϊνών). Τότε, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε φιαλίδιο falcon που τοποθετείται για φυγοκέντρηση σε 4000rpm για 6.30min με σκοπό τη συλλογή των κυττάρων σε ίζημα και την απομάκρυνση του υπερκείμενου, δηλαδή του θρεπτικού μέσου.

Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με επαναδιαλυτοποίηση του σε 30 ml αποστειρωμένου ddH₂O, φυγοκέντρηση του εναιωρήματος σε 4000rpm για 6.30min και απόρριψη του υπερκείμενου. Αυτή η διαδικασία γίνεται συνολικά τρεις φορές. Αφού ολοκληρωθεί και η 3^η πλύση, προστίθενται 500μl διαλύματος 1 στο falcon προς επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος. Το εναιώρημα μεταφέρεται με τη βοήθεια πιπέτας σε σωληνάριο Eppendorf και ακολουθεί

²⁹ Το αλκαλικό κατιόν Li⁺ που προκύπτει από τη διάσταση του LiAc καθιστά το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων ζύμης διαπερατό χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των προς μετασχηματισμό κυττάρων (*Ito et al., 1983*).

³⁰ TE buffer: Tris- hydrochloride buffer, pH 8.0, με 1.0 mM EDTA (*Ito et al., 1983*).

³¹ Το PEG εμπλέκεται στην συγκατακρήμνιση των κυττάρων ζύμης και του -υπό μορφή πλασμιδίου ή κασέτας- DNA (*Gietz et al., 1995*).

φυγοκέντρηση για 2min σε 14500rpm. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 250 μl διαλύματος 1.

Μέρος του εναιωρήματος των -δεκτικών πλέον- κυττάρων μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια Eppendorf (50μl εναιωρήματος/ σωληνάριο) καθένα από τα οποία περιέχει 3 μl διαλύματος ενός επιθυμητού πλασμιδίου/ κασέτας ή 1,5 μl καθενός από δύο διαφορετικά διαλύματα πλασμιδίων/ κασετών. Προαιρετικά, στα σωληνάρια προστίθεται και 1,5 μl διαλύματος DNA σπέρματος σολομού, για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 300μl διαλύματος 2 και ακολουθεί σχολαστική ανάδευση σε Vortex, επώαση στους 30° C για 45min και heat-shock για 12min στους 42° C.

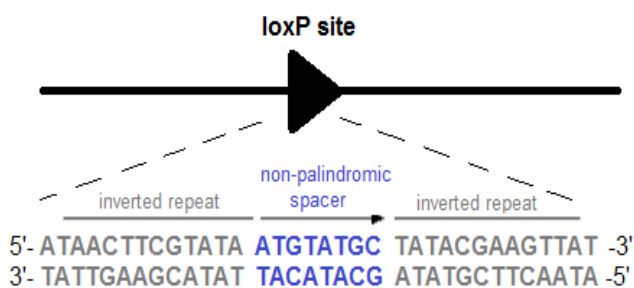
Τέλος, 100μl καλλιέργηματος (από το κάτω μέρος του σωληναρίου) επιστρώνονται σε κατάλληλα drop-out plates, που τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστήρα στους 30°C για ~48h με σκοπό τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό μόνο των μετασχηματισμένων κυττάρων.

10. Εκτομή γονιδίου-δείκτη από κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP

10.1. Σύστημα Cre/loxP³²

Το σύστημα Cre/loxP ανακαλύφθηκε μελετώντας την αντιγραφή του βακτηριοφάγου P1 στο βακτήριο *E. coli*. Πρόκειται για ένα σύστημα με τοποειδική δράση το οποίο καταλύει συμβάντα ανασυνδυασμού μεταξύ ειδικών αλληλουχιών DNA που συναντώνται φυσιολογικά μόνο στο γένωμα του συγκεκριμένου φάγου και καλούνται αλληλουχίες "loxP" [Locus of X(cross)-over in P1]. Κάθε αλληλουχία loxP έχει μήκος 34bp και απο-τελείται από δυο παλινδρομικές επαναλήψεις 13bp, που διαχωρίζονται από μια αλληλουχία-spacer 8bp (εικόνα 14). Ο ανασυνδυασμός μεταξύ δύο αλληλουχιών loxP πραγματοποιείται με τη βοήθεια της τοποειδικής ρεκομπινάσης Cre (causes recombination) που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο του φάγου P1 (Hamilton & Abremski, 1984). Η Cre ρεκομπινάση προσδένεται στις δύο παλινδρομικές επαναλήψεις κάθε αλληλουχίας loxP σχηματίζοντας ένα διμερές σύμπλοκο. Έπειτα, οι δύο θέσεις loxP ευθυγραμμίζονται σε παράλληλο προσανατολισμό με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός τετραμερούς συμπλόκου ρεκομπινασών και την εισαγωγή δίκλωνων τομών εντός της αλληλουχίας-spacer κάθε σημείου loxP. Τελικά, οι τομές κλείνουν με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε μισό της μιας αλληλουχίας loxP να συνδεθεί με ένα μισό της άλλης αλληλουχίας loxP.

Η ανασύσταση του συστήματος Cre/loxP είναι εφικτή σε οποιοδήποτε κυτταρικό περιβάλλον επιτρέποντας τη διενέργεια εξειδικευμένων χειρισμών του DNA, αν οι αλληλουχίες loxP εισαχθούν στις επιθυμητές θέσεις στο γένωμά του κυττάρου και αν το διαγονίδιο της Cre εκφραστεί παροδικά με τη χρήση επαγωγίμου υποκινητή. Ανάλογα με τη θέση και τον



Εικόνα 14: Το σημείο loxP. Φαίνονται οι παλινδρομικές αλληλουχίες και η αλληλουχία-spacer που το απαρτίζουν. Ο προσανατολισμός της μη-παλινδρομικής αλληλουχίας-spacer καθορίζει τον προσανατολισμό του εκάστοτε σημείου loxP (προσαρμογή από Kuhn & Torres, 2002).

³² Προσαρμογή από Nagy, 2000; Kuhn & Torres, 2002.

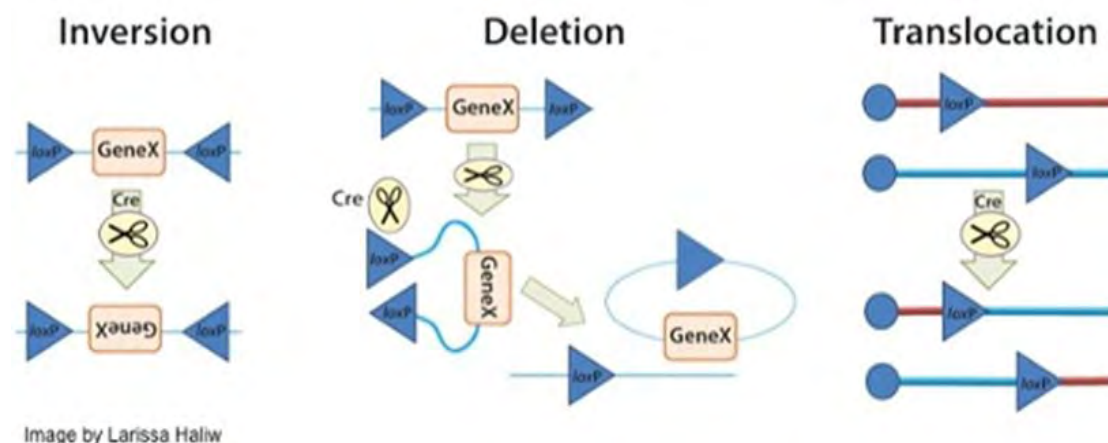
προσανατολισμό των δύο αλληλουχιών loxP, ο ανασυνδυασμός μεταξύ τους μπορεί να έχει τα ακόλουθα αποτελέσματα (εικόνα 15):

1^ο) Αν οι δυο αλληλουχίες loxP βρίσκονται σε διαφορετικά μέρια DNA, τότε παρατηρείται ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ τους (μετατόπιση).

2^ο) Αν οι δύο αλληλουχίες loxP βρίσκονται στο ίδιο μέρος DNA και είναι:

- a. ομόρροπες, τότε το τμήμα DNA μεταξύ αυτών εκτέμνεται σχηματίζοντας ένα κυκλικό μέρος DNA, το οποίο δε διατηρείται (διαγραφή).
- b. αντίρροπες, τότε το τμήμα DNA μεταξύ αυτών υφίσταται αναστροφή.

Μια από τις συνήθεις εφαρμογές του συστήματος Cre/loxP είναι η χρήση του για εκτομή γονιδίων-δεικτών από κασέτες που έχουν ενσωματωθεί στο γένωμα των κυττάρων στόχων. Σε αυτές τις κασέτες, το εκάστοτε γονίδιο-δείκτης περιβάλλεται από ομόρροπες αλληλουχίες loxP, ώστε -αφότου γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα χάρη στις ιδιότητες που ο δείκτης παρέχει στα κύτταρα (π.χ. πρωτοτροφία για έναν αυξητικό παράγοντα ή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά)- να υπάρχει η δυνατότητα εκτομής του, όταν επαχθεί η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης.



Εικόνα 15: Τα τρία πιθανά αποτελέσματα του -επαγόμενου από την Cre ρεκομπινάση- ανασυνδυασμού μεταξύ δύο αλληλουχιών loxP. Ανάλογα με τη θέση και τον προσανατολισμό των θέσεων loxP είναι δυνατόν να συμβούν αναστροφή (inversion), διαγραφή (deletion) ή μετατόπιση(translocation) τμημάτων DNA (Plasmids 101: Cre-lox, Addgene).

10.2. Διαδικασία στον *S.cerevisiae*

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το χρησιμοποιηθέν πρωτόκολλο για την εκτομή του δείκτη HIS5 από τις κασέτες Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5, μετά την ενσωμάτωσή τους στο γένωμα του *S.cerevisiae*, με της βοήθεια Cre ρεκομπινάσης από το πλασμίδιο pB227/Gal-Cre.

Η διαδικασία πραγματοποιείται υπό τη φλόγα λύχνου Bunsen για διασφάλιση ασηπτικών συνθηκών.

Τα στελέχη ζύμης που φέρουν κασέτα με γονίδιο-δείκτη μετασχηματίζονται με το πλασμίδιο pB227/Gal-Cre, με βάση το πρωτόκολλο της ενότητας 9. Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών γίνεται με επιστροφή σε πιάτο Glu/CM-Leu, με βάση το γονίδιο-δείκτη LEU2 του πλασμιδίου, που προσδίδει πρωτοτροφία για τη λευκίνη. Μετά από επώαση στους 30°C για 48h, δείγμα αποικιών από το πιάτο Glu/CM-Leu ενοφθαλμίζεται σε 5ml υγρού θρεπτικού μέσου Gal-Raff/CM-Leu, με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της Cre ρεκο-

μπινάσης που βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή Gal1/10p, και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας για 16h (overnight) στους 30° C υπό ανάδευση. Από την υγρή καλλιέργεια γίνονται διαδοχικές αραιώσεις 10^{-2} , 10^{-3} και 10^{-4} σε σωληνάρια erpendorf, ως εξής:

Πίνακας 1: αναλογίες αραιώσεων

αραίωση	καλλιέργεια	αποστειρωμένο H ₂ O
10^{-2}	10 μl από την αρχική καλλιέργεια	990 μl
10^{-3}	100 μl από την αραιώση 10^{-2}	900 μl
10^{-4}	100 μl από την αραιώση 10^{-3}	900 μl

Οι αραιώσεις 10^{-3} και 10^{-4} επιστρώνονται σε πιάτα YPD τα οποία τοποθετούνται ανεστραμμένα για επώαση στους 30°C για 48h. Έπειτα, μονές αποικίες μεταφέρονται σε νέα πιάτα YPD και ακολουθεί επώαση στους 30°C για 24h. Χρησιμοποιείται YPD ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, καθώς είναι πλήρες ως προς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, συνεπώς δεν ασκεί πίεση υπέρ της διατήρησης του πλασμιδιακού φορέα της Cre (που παρέχει πρωτοτροφία για τη λευκίνη) στα κύτταρα της ζύμης. Μετά την ανάπτυξη των μονών αποικιών γίνεται αντιγραφική επίστρωση σε πιάτα Glu/CM-Leu και Glu/CM-His, τα οποία επωάζονται επίσης στους 30°C για 24h. Στα πιάτα Glu/CM-Leu αναπτύσσονται μόνο οι αποικίες που δεν έχουν αποβάλλει το πλασμίδιο pB227/Gal-Cre, ενώ στα πιάτα Glu/CM-His αναπτύσσονται μόνο οι αποικίες στις οποίες το γονίδιο-δείκτης HIS5 της κασέτας δεν έχει υποστεί εκτομή.

Σκοπός είναι η εκδίωξη τόσο του πλασμιδίου όσο και του δείκτη της κασέτας, καθώς έτσι αποφεύγεται μελλοντικά η τυχαία δράση της Cre και παρέχεται η δυνατότητα τα ίδια στελέχη να μετασχηματιστούν με νέα πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο LEU2 ως γονίδιο-δείκτη αλλά και να επαναχρησιμοποιηθεί η ίδια κασέτα για περαιτέρω ενθέσεις ή να χρησιμοποιηθεί νέα κασέτα ή πλασμίδιο που φέρει επίσης ως δείκτη το γονίδιο HIS5.

11. Εκχύλιση τερπενοειδών με δεκάνιο

11.1. Διαδικασία

Φρέσκιες αποικίες ζύμης ενοφθαλμίζονται σε 5ml υγρού θρεπτικού μέσου Glu-CM (εντός γυάλινου δοκιμαστικού σωλήνα) και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας για 16h (overnight) στους 30° C υπό ανάδευση. Έπειτα, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 500μl δεκανίου (οργανική φάση) και οι καλλιέργειες τοποθετούνται ξανά για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 48h. Μέχρι αυτό το σημείο κάθε χειρισμός πραγματοποιείται κοντά σε φλόγα λύχνου Bunsen για διασφάλιση ασηπτικών συνθηκών.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε στατώ σωληναρίων μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία και να διαχωριστούν η οργανική (πάνω) και η υδατική (κάτω) φάση. Η οργανική φάση συλλέγεται προσεκτικά με πιπέτες Pasteur και μεταφέρεται σε σωληνάρια erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2min σε 14.680rpm, μεταφορά 170μl από το υπερκείμενο (οργανική φάση) σε νέα σωληνάρια και ξανά φυγοκέντρηση με τις ίδιες παραμέτρους. Τέλος, 120μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε φιαλίδια ειδικά για τη διενέργεια αέριας χρωματογραφίας.

11.2. Επεξήγηση μεθόδου

Η εκχύλιση τερπενοειδών από υγρή καλλιέργεια με δεκάνιο εμπίπτει στην κατηγορία εκχύλισης υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό από άλλο υγρό (liquid-liquid extraction). Σε αυτήν την περίπτωση επιδιώκεται η απομόνωση της επιθυμητής ουσίας με βάση τη διαφορετική κατανομή της σε σύστημα δύο διαλυτών (οργανικός και υδατικός).

Σκοπός των επαναλαμβανόμενων φυγοκεντρήσεων είναι να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων υδατικής φάσης από το δείγμα που θα αναλυθεί στη συνέχεια μέσω GC-MS, καθώς ίχνη υγρασίας απενεργοποιούν τη στατική φάση.

12. Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρίας μάζας (GC-MS)

12.1. Επεξήγηση μεθόδου

Οι τεχνικές χρωματογραφικής ανάλυσης αποσκοπούν στον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος με βάση διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (π.χ. σημείο ζέσεως, πολικότητα, μέγεθος των μορίων). Οι διαφορές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφορετική κατανομή του κάθε συστατικού μεταξύ μιας στατικής και μιας κινητής φάσης μέσα σε μια χρωματογραφική στήλη. Συγκεκριμένα, η διέλευση της κινητής φάσης από τη χρωματογραφική στήλη προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος επάνω στη στατική φάση, επάγοντας τον διαχωρισμό τους και την έξοδο τους από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού. Έτσι εκτός από το διαχωρισμό έχουμε παράλληλα και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του μείγματος.

Στην περίπτωση της αέριας-υγρής, ή απλά αέριας, χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC), η στατική φάση αποτελείται από ένα μη-πητικό υγρό καθηλωμένο πάνω σε αδρανή στερεό φορέα, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιείται κάποιο απαλλαγμένο από προσμίξεις, αδρανές³³ αέριο, κυρίως άζωτο, ήλιο ή αργό ή υδρογόνο (“φέρον” αέριο). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μόνο στην περίπτωση που οι εξεταζόμενες ουσίες είναι πτητικές ή μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο διαχωρισμού, καθώς πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων ως προς την ευαισθησία, την ταχύτητα, την απλότητα και το γεγονός ότι καθιστά δυνατούς διαχωρισμούς που είναι πάρα πολύ δύσκολοι έως και ακατόρθωτοι με συνηθισμένες μεθόδους.

Όταν οι δυνατότητες διαχωρισμού που παρέχει η αέρια χρωματογραφία συνδυαστούν με την φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) δημιουργείται ένα ισχυρό μέσο ανίχνευσης, ταυτοποίησης και προσδιορισμού ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα, το GC-MS. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα.

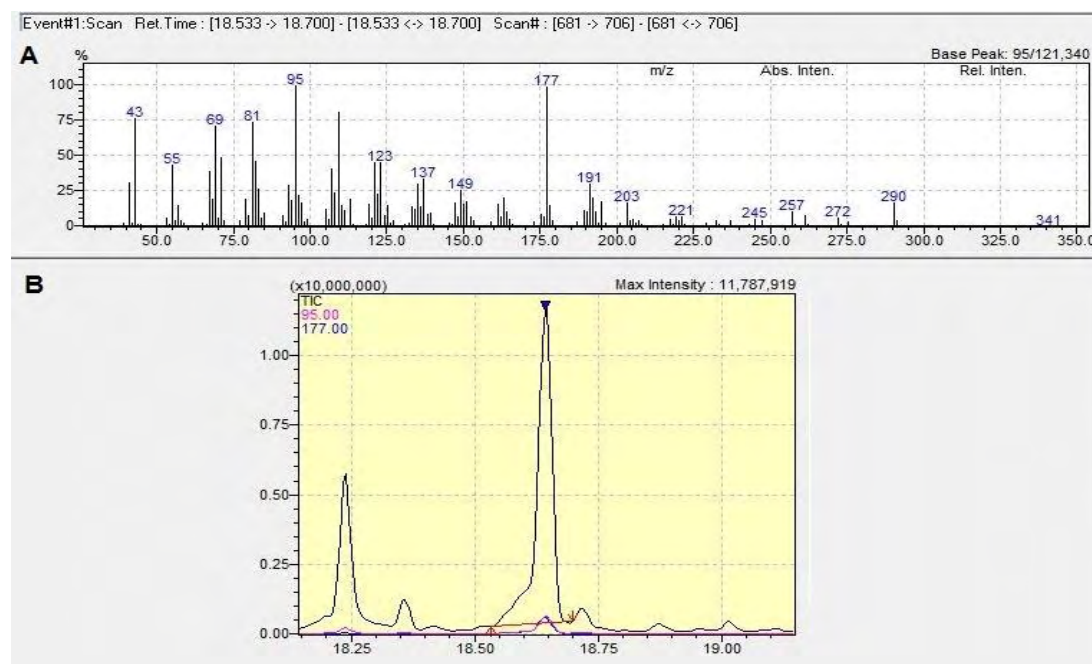
Η φασματομετρία μάζας είναι μια τεχνική ταυτοποίησης ουσιών στην οποία ένα δείγμα- σε αέρια φάση και υψηλής συνθήκης κενού- βομβαρδίζεται από ηλεκτρόνια με σκοπό τον ιονισμό των συστατικών του. Συνήθως, παράγονται ιόντα με θετικό φορτίο που διατηρούνται ή διασπώνται αποδίδοντας ιόντα μικρότερης μάζας (θραύσματα ιόντων) και ουδέτερα μόρια. Τα παραγόμενα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το πηλίκιο μάζας/φορτίου (m/e) υπό την

³³ “Αδρανές”, δηλαδή δεν αντιδρά με τη στατική φάση ή τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν.

επίδραση μαγνητικού πεδίου και το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/e μετριέται με κατάλληλο ανιχνευτή. Το διάγραμμα της έντασης του μετρούμενου ρεύματος σε συνάρτηση με το λόγο m/e αποτελεί το φάσμα μάζας. Δεδομένου ότι κάθε μόριο έχει χαρακτηριστικό πρότυπο θραύσης, το λαμβανόμενο φάσμα μάζας είναι μοναδικό για κάθε ουσία οδηγώντας στην ταυτοποίησή της.

12.2. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση παραγόμενης σκλαρεόλης με GC-MS

Η οργανική φάση που συλλέγεται μετά το πέρας της διαδικασίας εκχύλισης τερπενοειδών από τις υγρές καλλιέργειες κυττάρων ζύμης αναλύεται μέσω GC-MS. Ζητούμενο της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση σκλαρεόλης στα δείγματα, γι' αυτό στο χρωματογράφημα κάθε δείγματος αναζητείται κορυφή (εικόνα 16B) η οποία εμφανίζεται στην τιμή χρόνου κατακράτησης³⁴ που ορίζεται από το πρότυπο χρωματογράφημα σκλαρεόλης. Επίσης, το φάσμα μάζας της ουσίας που εκλούεται από τη στήλη κατά το ορισθέν χρονικό διάστημα θα πρέπει να είναι αντίστοιχο του πρότυπου φάσματος μάζας της σκλαρεόλης (εικόνα 16A). Σε αυτήν την περίπτωση, ακολουθεί ποσοτικοποίηση της παραχθείσας σκλαρεόλης με βάση το γεγονός ότι το εμβαδόν μιας χρωματογραφικής κορυφής, υπό σταθερές πειραματικές συνθήκες, είναι ανάλογο της ποσότητας του συστατικού που αντιπροσωπεύει η κορυφή αυτή.



Εικόνα 16: A) πρότυπο φάσμα μάζας της σκλαρεόλης, B) η κορυφή της σκλαρεόλης σε χρωματογράφημα (χρόνος κατακράτησης [18,533 → 18,700] min)

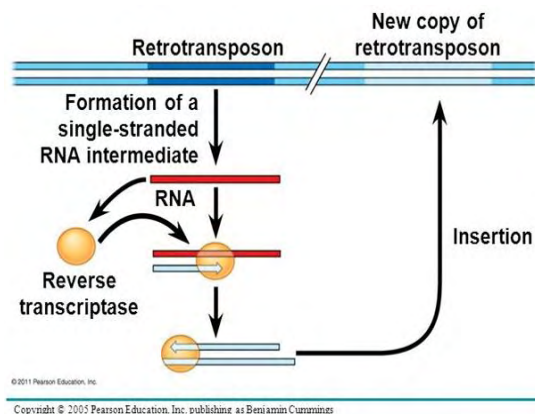
³⁴ Χρόνος κατακράτησης (retention time, t_R): ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος στη στήλη και της εμφάνισης του μέγιστου της κορυφής στο χρωματογράφημα.

Γ' ΜΕΡΟΣ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχευση ρετροτρανσποζονίων του *S.cerevisiae* για πολλαπλή ενσωμάτωση δομικών στοιχείων έκφρασης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού

Ρετροτρανσποζόνια στους ευκαρυώτες και στον *S.cerevisiae*

Το επαναλαμβανόμενο DNA των ευκαρυωτών απαρτίζεται κατά ένα μεγάλο μέρος του από ένα είδος μεταθετών στοιχείων³⁵ με ρετροϊικά χαρακτηριστικά, τα λεγόμενα ρετροτρανσποζόνια. Αυτά μετακινούνται εντός του γονιδιώματος μέσω ενός μηχανισμού «αντιγραφής-επικόλλησης» (εικόνα 17) που απαιτεί τη σύμπραξη δύο ενζύμων τα οποία κωδικοποιούνται, συνήθως³⁶, από το εκάστοτε ρετροτρανσποζόνιο: της αντίστροφης μεταγραφάσης και της ιντεγκράσης. Συγκεκριμένα, το ρετροτρανσποζόνιο αρχικά μεταγράφεται από την κυτταρική RNA πολυμεράση II σε RNA, που μετατρέπεται από την αντίστροφη μεταγραφάση σε cDNA, το οποίο τελικά εισέρχεται σε νέα θέση στο γονιδίωμα με τη βοήθεια της ιντεγκράσης (Goodier & Kazazian, 2008). Τα ρετροτρανσποζόνια κατηγοριοποιούνται σε δύο επιμέρους τάξεις: α) αυτά που φέρουν επιμήκεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (long terminal repeats, LTRs) στα άκρα τους (τάξη I), τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τους ρετροϊούς (εικόνα 18), και β) αυτά που δε φέρουν LTRs, αλλά μια πολύ(A)-ουρά στο 3'-άκρο τους (τάξη II) (Finnegan, 2012).



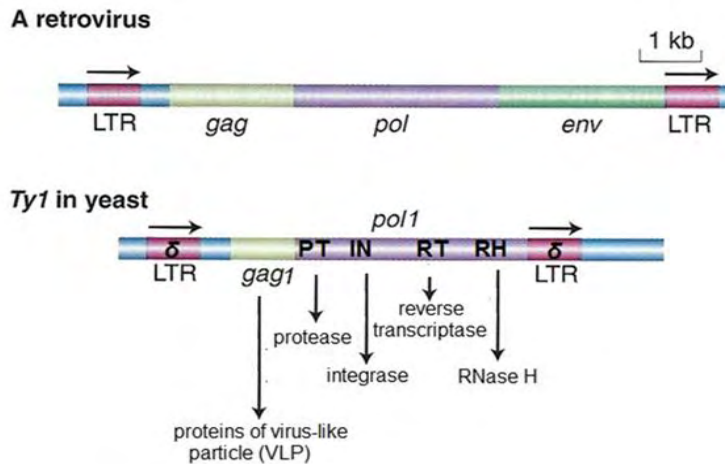
Εικόνα 17: Μηχανισμός μετάθεσης ρετροτρανσποζονίων (Pearson Education Inc., 2005).

Παράδειγμα ρετροτρανσποζονίων την τάξης I αποτελούν τα Ty στοιχεία του *S.cerevisiae*, που κατηγοριοποιούνται σε πέντε οικογένειες (Ty1-Ty5). Όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα, τα στοιχεία της οικογένειας Ty1 (εικόνα 18) παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο αριθμό ενθέσεων στο γένωμα του ζυμομύκητα, ωστόσο στην πλειοψηφία τους οι ενθέσεις δεν αποτελούνται από την πλήρη αλληλουχία των συγκεκριμένων ρετροτρανσποζονίων αλλά από τμήματα αυτών ή των LTRs τους ή από μεμονωμένες αλληλουχίες LTR (solo LTRs) (Kim et al., 1998).

Οικογένειες στοιχείων Ty	Συνολικός* αριθμός ενθέσεων σε όλο το γένωμα *(στοιχεία πλήρους μήκους, μονές αλληλουχίες & θραύσματα LTR)	Αριθμός ενθέσεων στοιχείων πλήρους αλληλουχίας
Ty1	217	32
Ty2	34	13
Ty3	41	2
Ty4	32	2
Ty5	7	1

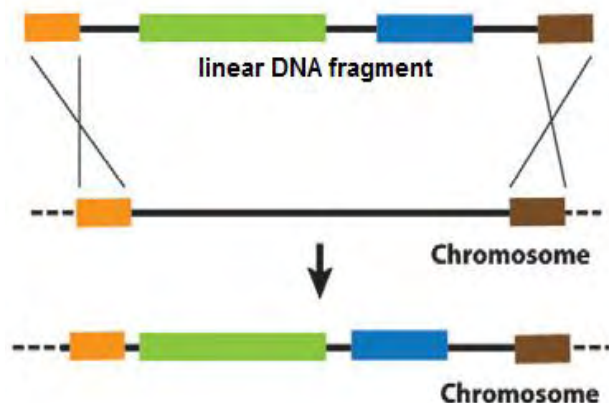
³⁵ **Μεταθετά στοιχεία (transposable elements):** αλληλουχίες DNA που έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν θέση εντός του γονιδιώματος. Ανάλογα με τον μηχανισμό μετακίνησής τους, τα μεταθετά στοιχεία των ευκαρυωτών διακρίνονται σε τρανσποζόνια, που μετακινούνται μέσω ενός μηχανισμού «αποκοπής-επικόλλησης», και σε ρετροτρανσποζόνια, η μετακίνηση των οποίων ακολουθεί το πρότυπο «αντιγραφή-επικόλληση» (Goodier & Kazazian, 2008).

³⁶ Όταν τα απαραίτητα για τη μετάθεση ένζυμα κωδικοποιούνται από το ίδιο το μεταθετό στοιχείο, τότε αυτό είναι ικανό να ξεκινά μόνο του τη διαδικασία μετάθεσής του και γι' αυτό καλείται «αυτόνομο». Υπάρχουν και μη-αυτόνομα μεταθετά στοιχεία που δεν κωδικοποιούν κάποιο από τα απαραίτητα για τη μετάθεση ένζυμα και κινητοποιούνται με τη βοήθεια των ενζύμων που κωδικοποιούνται από τα αυτόνομα στοιχεία (Finnegan, 2012).



Εικόνα 18: Τα LTR-ρετροτρανσποζόνια παρουσιάζουν μεγάλη δομική ομοιότητα με το ρετροϊκό γονιδίωμα, που επίσης φέρει LTRs στα άκρα του. Ως παράδειγμα παρουσιάζεται στοιχείο της οικογένειας ρετροτρανσποζονίων Ty1 του *S.cerevisiae*. Οι LTRs των στοιχείων Ty1 είναι γνωστές ως αλληλουχίες «δ». Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης *gag1*, που μοιάζει με το ρετροϊκό γονίδιο *gag*, κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες που συγκροτούν στο κυτταρόπλασμα ένα μη μολυσματικό κυστίδιο όμοιο με ιόσωμα (Virus-Like Particle, VLP) εντός του οποίου πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή του RNA-αντιγράφου του ρετροτρανσποζονίου. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης *pol1* κωδικοποιεί, μεταξύ άλλων, και για τα απαραίτητα για τη μετάθεση ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση και ιντεγκράση και την RNάση H, η οποία πέπτει το ενδιάμεσο μόριο RNA (προσαρμογή από Kim et al., 1998; Finnegan, 1997).

Στόχευση Ty1-LTRs στον *S.cerevisiae*
 Στη συγκεκριμένη εργασία, προκειμένου να διασφαλιστεί η σταθερή έκφραση των επιθυμητών γονιδίων επιλέχθηκε η εισαγωγή τους όχι σε πλασμίδια αλλά σε γραμμικές κασέτες, που ενσωματώθηκαν στο γένωμα του *S.cerevisiae* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (βλ. εικόνα 19 & εισαγωγή: ενότητα Γ.1.1.). Για να επιτευχθεί, μάλιστα, ένθεση πολλαπλών αντιγράφων της εκάστοτε κασέτας –με σκοπό την υπέρ-έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης-, ως αλληλουχίες-στόχοι για την ενσωμάτωση επιλέχθηκαν περιοχές επαναλαμβανόμενου DNA του *S.cerevisiae* (Lee & Da Silva, 1997). Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι κασέτες Ty1-LTR/ CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (βλ. υλικά & μέθοδοι: ενότητα 4.2., εικόνα 12) και COD7/CLS-ERG20 (F96C): Ty1(his^r) (βλ. υλικά & μέθοδοι: ενότητα 5.2.) που φέρουν στα άκρα τους αλληλουχίες ομόλογες με τις LTRs των στοιχείων Ty1 του *S.cerevisiae*, ώστε να στοχευθεί η πολυπληθέστερη οικογένεια επαναλαμβανόμενων στοιχείων του σακχαρομύκητα στο σύνολό της και όχι μόνο τα λιγοστά στοιχεία Ty1 πλήρους αλληλουχίας.



Εικόνα 19: γραμμικό τμήμα DNA που φέρει άκρα ομόλογα προς περιοχές του χρωμοσωμικού DNA ενσωματώνεται σε αυτό μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Da Silva & Srikrishnan, 2012)

I. Πολλαπλή ενσωμάτωση κασέτας Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 στο γένωμα του *S.cerevisiae* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού

Η κασέτα Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 εισήχθη στο στέλεχος AM238 με μετασχηματισμό σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 9 των υλικών & μεθόδων. Ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο Glu/CM-His με σκοπό την ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης, τα οποία παρουσίαζαν πρωτοτροφία για το αμινοξύ ιστιδίνη χάρη στο γονίδιο-δείκτη HIS5 της κασέτας. Μετά από επώαση για 48h στους 30°C, από το πιάτο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν μονές αποικίες που επιστρώθηκαν σε νέο πιάτο Glu/CM-His και ακολούθησε επώαση για 24h στους 30° C. Τελικά, 10 από αυτές τις μονές αποικίες ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα παραγωγής σκλαρεόλης με τη βοήθεια GC-MS. Η πιο αποδοτική αποικία [AM238-8 Ty1-LTR/CLS-ERG20 (F96C)-HIS5] παρήγαγε **20,39 mg/L** σκλαρεόλης.

Εκτομή γονιδίου-δείκτη από την κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP

Το σύστημα Cre/loxP παρουσιάστηκε αναλυτικά στην ενότητα 10 των υλικών & μεθόδων. Μια από τις συνήθεις εφαρμογές του είναι η εκτομή γονιδίων-δεικτών από κασέτες που έχουν ενσωματωθεί στο γένωμα των κυττάρων-στόχων με σκοπό να υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης (ανακύκλωσης) της ίδιας κασέτας για περαιτέρω ενθέσεις ή χρήσης διαφορετικής κασέτας ή πλασμιδιακού φορέα με τον ίδιο δείκτη. Προϋπόθεση για την εκτομή του γονιδίου-δείκτη είναι να περιβάλλεται από ομόρροπες αλληλουχίες loxP, όπως συμβαίνει για το γονίδιο-δείκτης HIS5 της κασέτας Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (εικόνα 12), η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους AM238.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα κύτταρα της πιο αποδοτικής μετασχηματισμένης αποικίας (c8) καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο YPD και στη συνέχεια υπέστησαν εκτομή του προαναφερθέντα δείκτη με της βοήθεια Cre ρεκομπινάσης από το πλασμίδιο pB227/Gal-Cre, κατά το πρότυπο της ενότητας 10.2. των υλικών & μεθόδων. Τελικά, έξι από τις αποικίες που απέβαλαν τόσο τον δείκτη της κασέτας όσο και τον πλασμιδιακό φορέα της Cre [ονομάστηκαν “AM238-8, Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C) (his⁻, excised)”] ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα παραγωγής σκλαρεόλης μέσω GC-MS. Από τις ελεγχθείσες αποικίες μόνο δύο ήταν παραγωγικές με αποδόσεις σκλαρεόλης **6,87 mg/L** και **6,15 mg/L**.

Δηλαδή, η διαδικασία εκτομής του δείκτη HIS5 από τα αντίγραφα της κασέτας Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5, που ενσωματώθηκαν σε πολλαπλές θέσεις στο γένωμα του *S.cerevisiae*, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποικιών είτε ανίκανων να παράγουν σκλαρεόλη είτε παραγωγικών αλλά με εμφανώς μειωμένη απόδοση σε σχέση με την αρχική (unexcised) αποικία.

II. Υποβοηθούμενη -από το σύστημα CRISPR/ Cas9- πολλαπλή ενσωμάτωση κασετών στο γένωμα του *S.cerevisiae*

Δεδομένου ότι ο *S.cerevisiae* ενσωματώνει εξωγενή στοιχεία στο γένωμά του σχεδόν αποκλειστικά μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (βλ. εισαγωγή: ενότητα Γ.1.), το σύστημα CRISPR/ Cas9 χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία με σκοπό την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης αυτού του φαινομένου και κατ' επέκταση του ποσοστού ενσωμάτωσης των

επιθυμητών κασετών στο γενωμικό DNA. Με βάση τις παρατηρήσεις των *DiCarlo et al.* (2013), η στοχευμένη πρόκληση DSBs μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 όντως αυξάνει σημαντικά³⁷ τη συχνότητα εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού στον *S.cerevisiae* παρουσία δίκλωνου, γραμμικού εκμαγείου DNA, αν αυτό εισαχθεί ταυτόχρονα με τον φορέα έκφρασης του sgRNA (co-transformation) σε κύτταρα που ήδη εκφράζουν την πρωτεΐνη Cas9.

Στην παρούσα εργασία, με την έκφραση του διαγονιδίου της ενδοκυκλεάσης Cas9 του *S.pyogenes* και του κατάλληλου sgRNA στα κύτταρα του σακχαρομύκητα προωθήθηκε η στοχευμένη πρόκληση δίκλωνων τομών στις αλληλουχίες LTRs των στοιχείων Ty1, οι οποίες αποτελούν τις αλληλουχίες-στόχους για την ένθεση των κασετών. Παράλληλα, τα κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τις επιθυμητές γραμμικές κασέτες. Αυτές, έχοντας άκρα ομόλογα ως προς τις αλληλουχίες-στόχους, χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία επάγοντας την επιδιόρθωση των ρηγμάτων στο γενωμικό DNA μέσω του επιδιορθωτικού μηχανισμού υψηλής πιστότητας, που βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, με αποτέλεσμα την ενσωμάτωσή τους στις πολυάριθμες θέσεις LTR του γενώματος.

II.a. Χρήση κασέτας Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (κασέτα με δείκτη)

Αρχικά, κύτταρα του στελέχους AM238 καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο YPD και μετασχηματίστηκαν με τον φορέα έκφρασης της Cas9. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ως φορέας της Cas9 χρησιμοποιήθηκε το high copy πλασμίδιο **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t**, το οποίο φέρει ως δείκτη το γονίδιο TRP1 (βλ. *υλικά & μέθοδοι: ενότητα 3.3.*), συνεπώς η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε με επίστρωση σε πιάτο Glu/CM-Trp. Σε αυτόν το φορέα, το διαγονίδιο της Cas9 βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ιδιοσυστατικού υποκινητή TEF1p, επομένως η έκφρασή της ενδοκυκλεάσης ήταν συνεχής στα μετασχηματισμένα κύτταρα.

Μετά από επώαση στους 30°C για 48h, δείγμα των μετασχηματισμένων κυττάρων ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο Glu/CM-Trp και ακολούθησε δεύτερος γύρος μετασχηματισμού με σκοπό την ταυτόχρονη εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης του sgRNA και της γραμμικής κασέτας-εκμαγείου στα κύτταρα. Ο φορέας του sgRNA που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή το πλασμίδιο **pU-HH-gRNA.Ty1-HDV**, φέρει το γονίδιο-δείκτη URA3 (βλ. *υλικά & μέθοδοι: ενότητα 3.2.*), ενώ η γραμμική κασέτα **Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5** φέρει το γονίδιο-δείκτη HIS5. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων μετά τον δεύτερο γύρο μετασχηματισμού έγινε με επίστρωση σε πιάτο Glu/CM-Ura, His, Trp. Η απουσία της θρυπτοφάνης από το θρεπτικό μέσο καθιστά το γονίδιο TRP1 απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων εξασφαλίζοντας, έτσι, την παραμονή του πλασμιδίου **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t** στα κύτταρα μέσω άσκησης πίεσης επιλογή και τη συνέχιση της έκφρασης της Cas9.

Μετά την ολοκλήρωση του απαιτούμενου χρόνου επώασης, επιλέχθηκαν μονές αποικίες από το πιάτο Glu/CM-Ura, His, Trp και μεταφέρθηκαν σε πιάτο Glu/CM-His. Σε αυτό το στάδιο, τα συστατικά του συστήματος CRISPR/Cas9 αναμένεται να έχουν δράσει έτσι ώστε η κασέτα να έχει ενσωματωθεί στις θέσεις-στόχους στο γενωμικό DNA, άρα δε χρειάζεται πλέον να ασκείται πίεση μέσω του θρεπτικού μέσου για τη διατήρηση των πλασμιδιακών φορέων τους. Έπειτα από επώαση στους 30°C για 24h, δεκατέσσερις μονές αποικίες ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Glu/CM-His και ελέγχθηκαν μέσω GC-MS ως προς την ικανότητα τους για παραγωγή σκλαροόλης. Τελικά δύο από τις ελεγχθείσες αποικίες "AM238 TEF1p-Cas9,

³⁷ Αύξηση συχνότητας εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού έως και 130 φορές στην περίπτωση χρήσης oligo-dsDNA (*DiCarlo et al., 2013*).

pUgRNA, Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5” παρουσίασαν μέγιστη απόδοση σκλαρεόλης ίση με **23, 23 mg/L**.

Φαίνεται ότι οι αποικίες που ενσωμάτωσαν την κασέτα Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR/Cas9 είχαν ελαφρώς αυξημένη τιμή μέγιστης απόδοσης παραγωγής σκλαρεόλης σε σχέση με την αποικία AM238-8 Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (20,39 mg/L). Το γεγονός αυτό πιθανώς συνδέεται με τον σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε εξ’ αρχής το σύστημα CRISPR/Cas9, δηλαδή για να αυξηθεί το ποσοστό ενσωμάτωσης της χρησιμοποιούμενης κασέτας στο γένωμα των κυττάρων οδηγώντας σε υπερέκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτή και, κατ’ επέκταση, αύξηση της παραγωγής σκλαρεόλης. Ωστόσο, αναμενόταν μεγαλύτερη αύξηση της απόδοσης.

Εκτομή γονιδίου-δείκτη από την κασέτα με τη βοήθεια του συστήματος Cre/loxP

Τα κύτταρα μιας από τις δύο πιο αποδοτικές αποικίες AM238 TEF1p-Cas9, pUgRNA, Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 (χρησιμοποιήθηκε η αποικία 10) υποβλήθηκαν σε εκτομή του δείκτη HIS5 από τα -ενσωματωμένα στο γένωμά τους- αντίγραφα της κασέτας, κατά τρόπο όμοιο με την αντίστοιχη διαδικασία της ενότητας I. Τελικά, ελέγχθηκαν μέσω GC-MS ορισμένες αποικίες που είχαν αποβάλλει και τον δείκτη της κασέτας και τον πλασμιδιακό φορέα της Cre [ονομάστηκαν “AM238-10 TEF1p-Cas9, pUgRNA, Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C) (his⁻, excised)”], όμως δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή σκλαρεόλης σε κανένα δείγμα. Μετά από επανάληψη της διαδικασίας εκτομής του δείκτη για κύτταρα της ίδιας αρχικής αποικίας, ελέγχθηκαν τρεις excised αποικίες. Από τις ελεγχθείσες αποικίες μόνο μία ήταν παραγωγική με αποδόση σκλαρεόλης **15,73 mg/L**.

Σε συμφωνία, λοιπόν, με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της ενότητας I, αποδεικνύεται ότι η διαδικασία εκτομής του δείκτη μειώνει την ικανότητα παραγωγής σκλαρεόλης από τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης.

II.b. Χρήση κασέτας COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his⁻) (κασέτα χωρίς δείκτη)

Εφόσον η εκτομή του δείκτη από τις κασέτες που ενσωματώθηκαν στο γένωμα του *S.cerevisiae* φάνηκε να μειώνει την ικανότητα των κυττάρων να παράγουν σκλαρεόλη, κρίθηκε σκόπιμο να παρακαμφθεί η συγκεκριμένη χρονοβόρα διαδικασία. Γι’ αυτό, ως εκμαγείο για την προώθηση της επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρηγμάτων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού χρησιμοποιήθηκε η κασέτα **COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his⁻)**, που φέρει τα ίδια στοιχεία με την κασέτα Ty1-LTR/CLS-ERG20(F96C)-HIS5 χωρίς όμως αλληλουχίες loxP και γονίδιο-δείκτη για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων (βλ. υλικά & μέθοδοι: ενότητα 5.2.).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η γραμμική κασέτα και ο φορέας του sgRNA εισάγονται στα κύτταρα κατά τον ίδιο γύρο μετασχηματισμού. Στη συνέχεια, επειδή στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε κασέτα χωρίς δείκτη, η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε με βάση το γονίδιο-δείκτη του φορέα του sgRNA. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν ότι, σε περίπτωση συν-μετασχηματισμού στις ζύμες παρουσία μονόκλωνου carrier DNA, μόνο το 30-40% των δεκτικών κυττάρων προσλαμβάνουν τελικά περισσότερα του ενός μόρια DNA (Gietz & Schielst, 1991), κατέστη αναγκαίος ο έλεγχος μεγάλου αριθμού φαινομενικά επιτυχώς μετασχηματισμένων αποικιών προς επιλογή αυτών που προσέλαβαν και την κασέτα. Εφόσον ο

στόχος -μετά την πρόσληψη της κασέτας- είναι η ενσωμάτωσή της στο γένωμα των κυττάρων, η οποία θεωρείται επιτυχής αν τελικά επάγει την παραγωγή σκλαρεόλης από τα κύτταρα, η περαιτέρω διαλογή των μετασχηματισμένων αποικιών έγινε μέσω προσδιορισμού της παρουσίας σκλαρεόλης στα εκχυλίσματα τους με GC-MS.

II.b.i. Χρήση high copy πλασμιδιακού φορέα για την Cas9

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στελέχους AM238 που είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t** και εξέφραζαν ιδιοσυστατικά την πρωτεΐνη Cas9. Ο συν-μετασχηματισμός τους με το πλασμίδιο **pU-HH-gRNA.Ty1-HDV** και την κασέτα **COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his^r)** έγινε κατά το πρότυπο της ενότητας *II.a*, όμως η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε με επίστρωση σε πιάτα Glu/CM-Ura, Trp με βάση τα γονίδια-δείκτες των δύο πλασμιδιακών φορέων. Μετά την ολοκλήρωση του απαιτούμενου χρόνου επώασης, επιλέχθηκαν τυχαία μονές αποικίες και μεταφέρθηκαν σε πιάτο Glu-CM. Ακολούθως, τριάντα από αυτές τις μονές αποικίες ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Glu-CM. Μετά από προσθήκη δεκανίου στις υγρές καλλιέργειες και συλλογή του εκχυλίσματος κάθε αποικίας σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 11.1. των υλικών & μεθόδων, η παρουσία σκλαρεόλης στα εκχυλίσματα ελέγχθηκε μέσω GC-MS. Τελικά, μόνο τρεις από τις ελεγχθείσες αποικίες “AM238 TEF1p-Cas9, pUgRNA, COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his^r)” είχαν αποκτήσει την ικανότητα παραγωγής σκλαρεόλης με αποδόσεις **9,17**, **1,71** και **0,40 mg/L**.

Εκδίωξη πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του sgRNA

Η διατήρηση πλασμιδίων σε κύτταρα ζύμης έχει συνδεθεί με μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων. Μάλιστα, όταν πρόκειται για πλασμίδια τα οποία φέρουν ως δείκτες γονίδια που συμπληρώνουν αυξοτρόφα μεταλλάγματα, το παραπάνω φαινόμενο είναι λίγο πιο έντονο (Karim *et al.*, 2013). Επιπροσθέτως, λαμβάνοντας υπόψιν αναφορές για κυτταροτοξικότητα συνδεδεμένη με την έκφραση της Cas9 παρουσία sgRNA (DiCarlo *et al.*, 2013) και εμφάνιση μη-στοχευμένης δράσης από το σύστημα CRISPR/ Cas9 στον *S.cerevisiae* (Stovicek *et al.*, 2015) και επιθυμώντας, επίσης, την απομάκρυνση των γονιδίων-δεικτών, ώστε να είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίησή τους, επιχειρήθηκε η εκδίωξη των πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του sgRNA, αφότου ολοκλήρωσαν τον σκοπό τους.

Στη συνέχεια περιγράφονται οι δύο προσεγγίσεις που δοκιμάστηκαν για την εκδίωξη των πλασμιδίων από κύτταρα της πιο αποδοτικής αποικίας του συγκεκριμένου πειράματος.

A) Κατεργασία με 5-FOA

Το 5-FOA (5-φθοροοροτικό οξύ) είναι ένα μη-τοξικό ανάλογο πυριμιδίνης το οποίο όμως μεταβολίζεται προς μια τοξική μορφή (5-φθοροουρακίλη) από το προϊόν του γονιδίου URA3, που εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ουρακίλης. Συνεπώς, κύτταρα *S.cerevisiae* με λειτουργικό αλληλόμορφο του γονιδίου URA3 δεν μπορούν να επιβιώσουν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 5-FOA. Δεδομένου ότι το γονίδιο URA3 χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο-δείκτης σε πλασμίδια, η προσθήκη 5-FOA στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων που φέρουν τέτοια πλασμίδια είναι συνήθης πρακτική για την εκδίωξή τους από τα κύτταρα· η παρουσία πλασμιδίων με δείκτη URA3 δεν εξυπηρετεί πλέον την επιβίωση των κυττάρων,

άρα μετά από αρνητική επιλογή με 5-FOA απομονώνονται κύτταρα με φαινότυπο *ura⁻*, που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αυτές τις συνθήκες (Boeke *et al.*, 1984; Forsburg, 2001).

Στην παρούσα δοκιμή, με τη χρήση 5-FOA επιδιώχθηκε η εκδίωξη του πλασμιδίου **pU-HH-gRNA.Ty1-HDV** από κύτταρα της αποικίας AM238-5 TEF1p-Cas9, pUgRNA, COD7/CLS-ERG20 (F96C):Ty1(*his⁻*). Το διάλυμα 5-FOA προστέθηκε σε πλήρες θρεπτικό μέσο Glu-CM, έτσι ώστε τα κύτταρα του στελέχους AM238, που αποτελεί *ura3* μετάλλαγμα να επιβιώσουν προσλαμβάνοντας ουρακίλη από το θρεπτικό μέσο μετά την εκδίωξη του προαναφερθέντος πλασμιδίου. Παράλληλα, χάρη στην παρουσία θρυπτοφάνης στο θρεπτικό μέσο, έπαψε να ασκείται πίεση επιλογής για τη διατήρηση των αντιγράφων του πλασμιδίου **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t** στα κύτταρα AM238, που δε φέρουν ούτε λειτουργικό αλληλόμορφο TRP1 στο γένωμά τους.

Αναλυτικότερα, σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν, μέχρι τελικού όγκου 5ml, 5-FOA (USBiologicals) και υγρό θρεπτικό μέσο Glu-CM σε αναλογίες 1:2, 1:10 και 1:20. Σε αυτούς ενοφθαλμίστηκε δείγμα κυττάρων της αποικίας c5 και τα καλλιέργηματα επώαστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση μέχρι να αποκτήσουν εμφανώς θολερή όψη λόγω της αύξησης του αριθμού των κυττάρων (24-48h). Από κάθε υγρή καλλιέργεια έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} σε σωληνάρια erppendorf (βλ.υλικά & μέθοδοι:πίνακας 1) και οι αραιώσεις 10^{-3} και 10^{-4} επιστρώθηκαν σε πιάτα YPD, τα οποία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα για επώαση στους 30°C για 48h. Έπειτα, μονές αποικίες μεταφέρθηκαν σε νέα πιάτα YPD και ακολούθησε επώαση στους 30°C για 24h. Μετά την ανάπτυξη των μονών αποικιών έγινε αντιγραφική επιστροφή σε πιάτα Glu/CM-Trp και Glu/CM-Ura τα οποία επώαστηκαν επίσης στους 30°C για 24h.

Στα πιάτα Glu/CM-Trp αναμενόταν η ανάπτυξη όσων αποικιών δεν απέβαλαν το πλασμίδιο **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t**, ενώ στα πιάτα Glu/CM-Ura αναμενόταν η ανάπτυξη όσων αποικιών δεν απέβαλαν το πλασμίδιο **pU-HH-gRNA.Ty1-HDV**. Τελικά, όλες οι αποικίες απέβαλαν τον φορέα του sgRNA, ωστόσο ελάχιστες απέβαλαν και τον φορέα της Cas9. Έξι μονές αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία και τα εκχυλίσματά τους ελέγχθηκαν μέσω GC-MS για την παρουσία σκλαρεόλης, η οποία δεν εντοπίστηκε σε κανένα δείγμα. Συνεπώς δεν ακολούθησε περαιτέρω καλλιέργεια των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό μέσο για την εκδίωξη των φορέων της Cas9 από αυτά.

B) Ανακαλλιέργειες σε πλήρες θρεπτικό μέσο

Εναλλακτικά, κύτταρα της αποικίας AM238-5 TEF1p-Cas9, pUgRNA, COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(*his⁻*) ενοφθαλμίστηκαν σε 5ml υγρού θρεπτικού μέσου Glu-CM και επώαστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση. Μετά από ~48 h, εφόσον το καλλιέργημα απέκτησε εμφανώς θολερή όψη λόγω της αύξησης του αριθμού των κυττάρων, 5ml αυτού μεταφέρθηκαν σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5ml φρέσκου υγρού θρεπτικού μέσου Glu-CM και το νέο καλλιέργημα επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθησαν περαιτέρω ανακαλλιέργειες σε πλήρες θρεπτικό μέσο και σε τακτά διαστήματα δείγμα των καλλιεργημάτων αραιωνόταν και επιστρωνόταν σε πιάτα YPD για παραλαβή μονών αποικιών, με τον τρόπο που ήδη περιγράφηκε στις προηγούμενες παραγράφους. Και εδώ, ο εντοπισμός των μονών αποικιών που απέβαλαν τα πλασμίδια έγινε με αντιγραφική επιστροφή σε πιάτα Glu/CM-Trp και Glu/CM-Ura.

Το πλήρες θρεπτικό μέσο Glu-CM παρέχει στα αυξότροφα κύτταρα όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. Συνεπώς, πλασμίδια που προσδίδουν την ικανότητα βιοσύνθεσης ορισμένων θρεπτικών συστατικών παύουν είναι απαραίτητα για την επι-

βίωση των κυττάρων και αναμένεται να μην διατηρούνται σε αυτά (Lundblad & Zhou, 2001). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι περισσότερες μονές αποικίες απέβαλαν τους φορείς του sgRNA σχετικά γρήγορα (μετά από ~7- 10 ανακαλλιέργειες), αλλά ο αριθμός των μονών αποικιών που αναπτύσσονταν στα πιάτα Glu/CM-Trp παρέμεινε μεγάλος ακόμη και μετά από είκοσι δύο ανακαλλιέργειες υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα συνέχιζαν να διατηρούν αντίγραφα του high cory πλασμιδίου **p414-TEF1p-Cas9-CYC1t**. Δεν ακολούθησαν περαιτέρω ανακαλλιέργειες, καθώς η παρούσα προσέγγιση θα ήταν χρονοβόρα και οικονομικά ασύμφορη για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα.

II.b.ii. Χρήση low cory πλασμιδιακού φορέα για την Cas9

Λόγω της δυσκολίας που παρουσίασε η εκδίωξη των πολλών αντιγράφων του high cory φορέα της Cas9 από τα κύτταρα της ζύμης, το πείραμα της ενότητας II.b.i. πραγματοποιήθηκε ξανά χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά έναν low cory πλασμιδιακό φορέα για την έκφραση της, το πλασμίδιο **p415-GalIp-Cas9-CYC1t**. Αυτό φέρει ως δείκτη επιλογής το γονίδιο LEU2 (βλ. υλικά & μέθοδοι: ενότητα 3.3.), επομένως η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε με επίστρωση σε πιάτο Glu/CM-Leu.

Μετά την εμφάνιση αποικιών στο πιάτο, δείγμα αυτών ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο Gal-Raff/CM-Leu, προκειμένου να ενεργοποιηθεί παροδικά η έκφραση του διαγονιδίου της Cas9 το οποίο, εδώ, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του –επαγόμενου από τη γαλακτόζη- ασθενούς υποκινητή Gallp (Mumberg et al., 1994). Η χρήση επαγόμενου και ασθενούς υποκινητή αποσκοπεί στην αποφυγή κυτταροτοξικών φαινομένων που έχουν συνδεθεί με την παρατεταμένη έκφραση της Cas9 κυρίως υπό τον έλεγχο ισχυρών υποκινητών, όπως ο TEF1p, παρουσία sgRNA (Di Carlo et al., 2013; Jakociunas et al., 2016).

Έπειτα, τα κύτταρα της υγρής αποικίας συλλέχθηκαν και μετασχηματίστηκαν ταυτόχρονα με το πλασμίδιο **pU-HH-gRNA.Ty1-HDV** και την κασέτα **COD7/CLS-ERG20(F96C): Ty1(his⁻)** κατά το πρότυπο της ενότητας II.a., ενώ η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε με επίστρωση σε πιάτο Glu/CM-Ura, ώστε να μην ασκείται πλέον πίεση για τη διατήρηση του φορέα της Cas9. Ακολούθως, τυχαίες μονές αποικίες μεταφέρθηκαν σε πιάτο Glu-CM και, μετά από 48h επώασης στους 30°C, πέντε από αυτές ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Glu-CM με τελικό σκοπό τη συλλογή των εκχυλισμάτων τους και τον έλεγχο τυχόν παρουσίας σκλαρεόλης σε αυτά μέσω GC-MS. Μόνο μια από τις ελεγχθείσες αποικίες AM238 Gallp-Cas9, pUgRNA,COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1(his⁻) βρέθηκε να είναι παραγωγική με απόδοση σκλαρεόλης **495 mg/L**.

Η διαδικασία μετασχηματισμού με τους φορείς της Cas9 και του sgRNA και με την γραμμική κασέτα επαναλήφθηκε για νέα κύτταρα του στελέχους AM238 με σκοπό την παραλαβή επιπρόσθετων παραγωγικών αποικιών. Τελικά, ελέγχθηκαν τα εκχυλίσματα δώδεκα αποικιών και τρεις από αυτές ήταν παραγωγικές, μια εκ των οποίων παρουσίασε πολύ μεγαλύτερη απόδοση σκλαρεόλης (**986 mg/L**).

Εκδίωξη πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του sgRNA

A) Κατεργασία με 5-FOA

Για δείγμα κυττάρων της πιο αποδοτικής αποικίας [AM238-8 GalP-Cas9, pUgRNA, COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1 (his⁻)] του συγκεκριμένου πειράματος επιδιώχθηκε ξανά η εκδίωξη των αντιγράφων του πλασμιδίου **pU-HH-gRNA.Ty1-HDV** με την παρουσία 5-FOA σε υγρό θρεπτικό μέσο Glu-CM. Ωστόσο, αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις 1:30, 1:40, 1:100, 1:200 και 1:400 αποσκοπώντας στην εύρεση της όσο το δυνατόν μικρότερης συγκέντρωσης 5-FOA που θα διώχνει αποτελεσματικά τους φορείς του sgRNA από τα κύτταρα χωρίς να καταργεί την ικανότητά τους να παράγουν σκλαρεόλη. Ο προσδιορισμός της εκδίωξης των πλασμιδίων από τις μονές αποικίες που προέκυψαν έγινε με αντιγραφική επίστρωση σε πιάτα Glu/CM-Leu και Glu/CM-Ura. Ακολούθως, έξι μονές αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία από κάθε YPD πιάτο μονών αποικιών και τα εκχυλίσματά τους ελέγχθηκαν μέσω GC-MS για την παρουσία σκλαρεόλης.

Τελικά, παρά την έκθεση των κυττάρων σε μικρότερες συγκεντρώσεις 5-FOA, όλες οι αποικίες απέβαλαν τον φορέα του sgRNA, αλλά έχασαν και πάλι την ικανότητα παραγωγής σκλαρεόλης. Επίσης, οι περισσότερες αποικίες αναπτύχθηκαν στα πιάτα Glu/CM-Leu, δηλαδή διατήρησαν αντίγραφα του low copy πλασμιδίου **p415-GalP-Cas9-CYC1**, όμως εξαιτίας της μη εύρεσης παραγωγικών αποικιών δεν ακολούθησε κάποια περαιτέρω διεργασία για την εκδίωξη των φορέων της Cas9 από τα κύτταρα.

B) Ανακαλλιέργειες σε πλήρες θρεπτικό μέσο

Κύτταρα της αποικίας AM238-8 GalP-Cas9, pUgRNA, COD7/CLS-ERG20(F96C):Ty1 (his⁻) ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Glu-CM και το καλλιέργημα υπέστη ανακαλλιέργειες κατά το πρότυπο της ενότητας II.b.i. Μετά από επτά ανακαλλιέργειες, απομονώθηκαν μονές αποικίες που ελέγχθηκαν για την παρουσία πλασμιδίων με αντιγραφική επίστρωση σε πιάτα Glu/CM-Leu και Glu/CM-Ura. Έπειτα από επώαση στους 30°C για 48h, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών σε κανένα πιάτο, υποδεικνύοντας την επιτυχή εκδίωξη όλων των αντιγράφων των δύο πλασμιδίων από όλα τα κύτταρα. Στη συνέχεια, έξι μονές αποικίες επιλέχθηκαν τυχαία από το YPD πιάτο μονών αποικιών και τα εκχυλίσματά τους ελέγχθηκαν μέσω GC-MS για την παρουσία σκλαρεόλης. Τελικά, όλες οι αποικίες παρέμειναν παραγωγικές με αποδόσεις σκλαρεόλης που κυμαίνονταν πολύ κοντά στην τιμή της αρχικής αποικίας

Συνεπώς, χρησιμοποιώντας τον low copy φορέα **p415-GalP-Cas9-CYC1t**, η εκδίωξη των πλασμιδίων επιτεύχθηκε με σχετικά μικρό αριθμό ανακαλλιεργειών και χωρίς να διαταραχθεί η ικανότητα των κυττάρων να παράγουν σκλαρεόλη. Παρ' όλα αυτά πρέπει να ελεγχθεί αν τα πλασμίδια είχαν εκδιωχθεί νωρίτερα, καθώς όσο μικρότερος είναι αριθμός των απαιτούμενων ανακαλλιεργειών, τόσο πιο προσιτή από άποψη χρόνου και κόστους θα θεωρείται η παρούσα προσέγγιση για εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα.

Παράρτημα: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Πίνακας 2: Σύνοψη καταγεγραμμένων αποδόσεων σκλαρεόλης

Δοκιμή	Μέγιστη καταγεγραμμένη απόδοση σκλαρεόλης σε mg/L
Ένθεση κασέτας με γονίδιο-δείκτη μέσω της ενδογενούς ικανότητας ομόλογου ανασυνδυασμού του <i>S.cerevisiae</i> (ενότητα I)	20,39
Υποβοηθούμενη από το σύστημα CRISPR/Cas9 ένθεση κασέτας με γονίδιο δείκτη + high copy φορέας της Cas9 (ενότητα II.α.)	23,23
Υποβοηθούμενη από το σύστημα CRISPR/Cas9 ένθεση κασέτας χωρίς γονίδιο-δείκτη + high copy φορέας της Cas9 (ενότητα II.β.i)	9,17
Υποβοηθούμενη από το σύστημα CRISPR/Cas9 ένθεση κασέτας χωρίς γονίδιο-δείκτη + low copy φορέας της Cas9 (ενότητα II.β.ii)	495 (1 ^η δοκιμή) 986 (2 ^η δοκιμή)

Πίνακας 3: αποτελεσματικότητα συν-μετασηματισμού στην περίπτωση χρήση κασέτας χωρίς γονίδιο-δείκτη

Δοκιμή	Αριθμών αποικιών που ελέγχθηκαν	Παρατηρηθείς αριθμός παραγωγικών αποικιών	Αναμενόμενος αριθμός παραγωγικών αποικιών	Απόκλιση από το πρότυπο των Gietz & Schiestl (1991)
Ενότητα II.β.i	30	3	9-12	Ναι
Ενότητα II.β.ii	5	1	1,5-2	Αμελητέα
	12	3	3,6- 4,8	Αμελητέα

Δ' ΜΕΡΟΣ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σκλαρεόλη είναι ένα διτερπένιο που χρησιμοποιείται στην αρωματοποίηση και απομονώνεται κυρίως από το φυτό *Salvia sclarea* ή κοινώς το κόκκινο φασκόμηλο. Όμως, επειδή αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη, η ετήσια παραγωγή της δεν είναι σταθερή και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, κυρίως περιβαλλοντικούς, γεγονός που επηρεάζει άμεσα την τιμή της. Δεδομένου ότι το βιοσυνθετικό της μονοπάτι έχει αποσαφηνιστεί και ότι όλοι οι οργανισμοί συνθέτουν ισοπρενοειδή, έχουν διερευνηθεί διάφορες προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής προκειμένου να επιτευχθεί σταθερή, μαζική παραγωγή της από μικροβιακούς ξενιστές με πιο οικονομικό τρόπο.

Ένας ιδιαίτερα δημοφιλής μικροβιακός ξενιστής στον τομέα της μεταβολικής μηχανικής είναι ο ζυμομύκητας *S.cerevisiae* λόγω της ευκολίας χειρισμού του, της ευελιξίας ως προς τη γενετική του τροποποίηση και της ανθεκτικότητάς του σε αντίξοες βιομηχανικές συνθήκες. Για τη σύνθεση σκλαρεόλης και άλλων τερπενοειδών στον σακχαρομύκητα χρησιμοποιούνται μεταβολικά ενδιάμεσα του μονοπατιού της εργοστερόλης. Η ροή των διαφόρων μορίων διαμέσου του συγκεκριμένου μονοπατιού επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου στο περιβάλλον ανάπτυξης των κυττάρων· οι επιθυμητοί μεταβολίτες συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά σε αυξημένες συγκεντρώσεις όταν η διαθεσιμότητα οξυγόνου είναι μειωμένη (*Hampton et al., 1996*). Συνεπώς απαιτούνται μερικώς ή πλήρως αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, που σε δοκιμές μικρής κλίμακας μπορούν να εξασφαλιστούν καλλιεργώντας τα κύτταρα σε υγρό θρεπτικό μέσο εντός σφραγισμένων δοκιμαστικών σωλήνων. Πέραν αυτής της βασικής προσέγγισης, έχουν αναπτυχθεί γενετικά τροποποιημένα στελέχη σακχαρομύκητα στα οποία η κατανάλωση των επιθυμητών μεταβολικών ενδιάμεσων από ανταγωνιστικά μονοπάτια έχει περιοριστεί έτσι, ώστε να διευκολυνθεί η σύνθεση των τερπενοειδών που μας ενδιαφέρουν σε ικανοποιητικές ποσότητες. Εφόσον στην παρούσα εργασία διερευνώνται προσεγγίσεις που αποσκοπούν στη παραγωγή σκλαρεόλης σε αυξημένες ποσότητες από κύτταρα σακχαρομύκητα, χρησιμοποιήθηκε ένα απλοειδές στέλεχος τροποποιημένο έτσι ώστε να προάγει τη σύνθεση GGPP έναντι της σύνθεσης εργοστερόλης, το AM238 (*Trikka et al., 2015*).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η γονιδιακή κατασκευή CcCLS-ERG20(F96C) που κωδικοποιεί πρωτεΐνη είναι ικανή να καταλύει όλα τα βήματα από την αρχική συμπύκνωση ενός μορίου IPP με ένα μόριο DMAPP ως την παραγωγή 8OH-CPP, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε σκλαρεόλη είτε ενζυμικά είτε μέσω όξινης υδρόλυσης, περιορίζοντας ακόμα περισσότερο την κατανάλωση ενδιάμεσων μεταβολιτών από ανταγωνιστικά μονοπάτια. Υπερέκφραση αυτής της κατασκευής μέσω πλασμιδιακών φορέων σε διπλοειδή κύτταρα ζύμης είχε ως αποτέλεσμα απόδοση σκλαρεόλης ίση με 28 mg/L (*Ignea et al., 2015*), ενώ σε απλοειδή κύτταρα AM238 απέδωσε 26 mg/L (*Trikka et al., 2015*). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες προσεγγίσεις, στη συγκεκριμένη εργασία η προαναφερθείσα κατασκευή εισήχθη σε κύτταρα AM238 ως τμήμα γραμμικής κασέτας με σκοπό να ενσωματωθεί στο γένωμα του σακχαρομύκητα, ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερή έκφρασή της χωρίς να απαιτείται συνεχής χρήση θρεπτικών μέσων επιλογής για τη διατήρηση πλασμιδιακών φορέων.

Όμως, σε αυτή την περίπτωση δεν αρκεί μόνο η χρήση ενός ισχυρού υποκινητή, όπως ο TDH3p, για την υπερέκφραση ενός γονιδίου· πρέπει να διασφαλιστεί η ένθεση πολλών αντιγράφων της επιθυμητής κασέτας στο χρωμοσωμικό DNA. Βασιζόμενοι, λοιπόν, στην ικανότητα του *S.cerevisiae* να ενσωματώνει εξωγενή γενετικά στοιχεία στο γένωμά του σχεδόν αποκλειστικά μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, άρα στοχευμένα, κατασκευάσαμε κασέτες με άκρα ομόλογα προς τις αλληλουχίες LTR των ρετροτρανσποζονίων της οικογένειας Ty1, ώστε να στοχευθεί η πολυπληθέστερη ομάδα επαναλαμβανόμενων στοιχείων του σακχαρο-

μύκητα (*Kim et al., 1998*). Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα αυτής της προσέγγισης, χρησιμοποιήθηκε αρχικά κασέτα που, εκτός από την επιθυμητή γονιδιακή κατασκευή, έφερε και γονίδιο-δείκτη για την επιλογή των κυττάρων που την ενσωμάτωσαν στο γονιδίωμά τους. Τελικά, η μέγιστη απόδοση σκλαρεόλης που καταγράφηκε ήταν 20,39 mg/L (βλ. *αποτελέσματα: ενότητα I*), δηλαδή χαμηλότερη σε σχέση με τα αποτελέσματα προηγούμενων προσεγγίσεων, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην ενσωμάτωση σχετικά μικρού αριθμού αντιγράφων της κασέτας στο γονιδίωμα των κυττάρων. Άρα, ενώ η ενδογενής συχνότητα εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού είναι υψηλότερη στις ζύμες συγκριτικά με τους ανώτερους ευκαρυώτες, φαίνεται πως δεν είναι επαρκής για την ενσωμάτωση μεγάλου αριθμού εξωγενών γενετικών στοιχείων ταυτόχρονα στο χρωμοσωμικό τους DNA.

Σε μια προσπάθεια να ενσωματωθούν αντίγραφα της επιθυμητής κασέτας σε περισσότερα στοιχεία Ty1-LTR, καταφύγαμε στο γεγονός ότι η στοχευμένη πρόκληση δίκλωνων τομών (DSBs) αυξάνει το ποσοστό εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού και, κατ' επέκταση το ποσοστό ενσωμάτωσης γραμμικών τμημάτων DNA με άκρα ομόλογα προς την περιοχή του γενωμικού DNA που έχει κοπεί (*Storici et al., 2003*). Για την πρόκληση DSBs στα στοιχεία Ty1-LTR επιλέξαμε ένα ιδιαίτερα ευέλικτο και απλό σύστημα, το σύστημα CRISPR/Cas9, που παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης στοχευμένων DSBs στο DNA χρησιμοποιώντας μόνο μια RNA-κατευθυνόμενη νουκλεάση, την Cas9, και ένα ειδικό RNA-οδηγό συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία-στόχο (*Terns & Terns, 2014*). Με βάση τις παρατηρήσεις των *DiCarlo et al. (2013)*, η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 αυξάνει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού στον *S.cerevisiae*, αν το προς ένθεση τμήμα DNA εισαχθεί ταυτόχρονα με τον φορέα έκφρασης του RNA-οδηγού σε κύτταρα που ήδη εκφράζουν την Cas9.

Ακολουθώντας αυτό το πρότυπο και παρά τα όσα αναμέναμε, η πρώτη δοκιμή της υποβοηθούμενης από το σύστημα CRISPR/Cas9 πρόκλησης ομόλογου ανασυνδυασμού (βλ. *αποτελέσματα: ενότητα II.a*) είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη αποικιών με ελάχιστα αυξημένη απόδοση σκλαρεόλης (23,23 mg/L) σε σχέση με την προαναφερθείσα δοκιμή, όπου η ένθεση της ίδιας κασέτας δεν υποβοηθήθηκε με κάποιο μέσο. Επόμενη δοκιμή απέφερε ακόμα χαμηλότερες τιμές απόδοσης σκλαρεόλης (μέγιστη τιμή: 9,17 mg/L). Κοινό στοιχείο και των δύο δοκιμών είναι η χρήση ισχυρού, ιδιοσυστατικού υποκινητή (TEF1p) και high copy πλασμιδιακού φορέα (p414) για την έκφραση Cas9, γεγονός που σύμφωνα με αναφορές των *Di Carlo et al. (2013)* και *Jakociunas et al. (2016)* συνδέεται με την εμφάνιση κυτταροτοξικών φαινομένων. Δεδομένου ότι σε μετέπειτα δοκιμές, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε επαγωγίσιμος, ασθενής υποκινητής (GalIp) και low copy (p415) πλασμιδιακός φορέας για την έκφραση της Cas9 (βλ. *αποτελέσματα: ενότητα II.b.ii*), καταγράφηκε τεράστια αύξηση στην απόδοση σκλαρεόλης (εως και 986 mg/L), εικάζουμε ότι οι μη αναμενόμενες, μειωμένες αποδόσεις σκλαρεόλης στις δύο πρώτες δοκιμές οφείλονται κυτταροτοξικά φαινόμενα.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι στην πρώτη υποβοηθούμενη από το σύστημα CRISPR/Cas9 δοκιμή χρησιμοποιήθηκε κασέτα με γονίδιο-δείκτη, ενώ στις επόμενες δοκιμές χρησιμοποιήθηκε κασέτα χωρίς γονίδιο-δείκτη, ώστε να αποφευχθεί η διαδικασία εκτομής των γονιδίων-δεικτών, η οποία ήταν όχι μόνο χρονοβόρα αλλά οδηγούσε και σε μείωση ή και εκμηδενισμό της απόδοσης (βλ. *αποτελέσματα: ενότητα I και II.a*). Το παραπάνω μπορεί να εξηγηθεί από την πρόκληση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων εξαιτίας της δράσης του συστήματος Cre/loxP (*Delneri et al., 2000*), που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία εκτομής. Συγκεκριμένα, ύπαρξη μεγάλου αριθμού -ενσωματωμένων στο γένωμα- αντιγράφων της κασέτας με δείκτη σημαίνει και ύπαρξη πολυάριθμων αλληλουχιών loxP. Άρα, παρουσία της ρεκομπιλάσης Cre, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα πραγματοποίησης αυθαίρετων ανασυνδυασμών

μεταξύ τυχαίων αλληλουχιών loxP με αποτέλεσμα τη διαγραφή, αναστροφή ή μετατόπιση χρωμοσωμικών τμημάτων, ανάλογα με τη θέση και τον προσανατολισμό των εμπλεκόμενων αλληλουχιών loxP. Επίσης, μετά την εκτομή ενός γονιδίου-δείκτη (εκατέρωθεν του οποίου υπάρχουν δύο ομόρροπες αλληλουχίες loxP) απομένει στο γένωμα του κυττάρου μια αλληλουχία loxP, άρα, στην περίπτωση εκτομής μεγάλου αριθμού γονιδίων-δεικτών, παρατεταμένη δράση της Cre ενδέχεται να προκαλέσει περαιτέρω συμβάντα τοποειδικού ανασυνδυασμού μεταξύ των εναπομείναντων loxP αλληλουχιών. Τέλος, έχει αναφερθεί η ύπαρξη "κρυφών" σημείων lox στο γένωμα του *S.cerevisiae* (Sauer, 1992), τα οποία μπορούν να ανασυνδυαστούν με αλληλουχίες loxP που εισάγονται στο γένωμα των κυττάρων μέσω κασετών, αλλά η πιθανότητα να συμβεί κάτι τέτοιο είναι πολύ μικρή (Delneri et al., 2000).

Η χρήση κασέτας χωρίς γονίδιο-δείκτη δε συστήνεται σε περιπτώσεις αξιοποίησης αποκλειστικά της ενδογενούς ικανότητας ομόλογου ανασυνδυασμού του *S.cerevisiae* λόγω της χαμηλής αποτελεσματικότητάς του ως προς την ενσωμάτωση εξωγενών γραμμικών γενετικών στοιχείων (10^{-6} με 10^{-4}) (Wach et al., 1994; Jakociunas et al., 2015b), γεγονός που θα καθιστούσε πολύ δύσκολη και χρονοβόρα τη διαδικασία διαλογής των κυττάρων για την εύρεση αποικιών που ενσωμάτωσαν την κασέτα. Αντιθέτως, η αποτελεσματικότητα ενσωμάτωσης μιας κασέτας μέσω υποβοηθούμενης -από το σύστημα CRISPR/Cas9- πρόκλησης ομόλογου ανασυνδυασμού είναι τόσο μεγάλη (έως και 100%) (DiCarlo et al., 2013; Bao et al., 2015; Jakociunas et al., 2015a), που η παρουσία γονιδίου-δείκτη στην κασέτα δεν είναι απαραίτητη για την επιλογή (Cong et al., 2013). Τότε, η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων βασίζεται στις αναφορές των Gietz & Schielst (1991) ότι σε περίπτωση συν-μετασχηματισμού στις ζύμες, μόνο το 30-40% των δεκτικών κυττάρων προσλαμβάνουν τελικά περισσότερα του ενός μόρια DNA. Συνεπώς, αφού η εισαγωγή του φορέα έκφρασης του RNA-οδηγού και της επιθυμητής κασέτας επιχειρείται στον ίδιο κύκλο μετασχηματισμού, αρκεί να γίνει αρχικά διαλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων με βάση το γονίδιο-δείκτη του φορέα έκφρασης του RNA-οδηγού ακολουθούμενη από περαιτέρω έλεγχο σχετικά μεγάλου αριθμού αποικιών για εύρεση εκείνων που ενσωμάτωσαν αντίγραφα της κασέτας χωρίς γονίδιο-δείκτη. Ο έλεγχος των αποικιών θα μπορούσε να γίνει με τη βοήθεια PCR ή αλληλούχησης κατά Sanger χρησιμοποιώντας εκκινητές συμπληρωματικούς προς τις αλληλουχίες-στόχους των ενθέσεων (Jakociunas et al., 2015a, 2015b)· όμως, επειδή μας ενδιαφέρει περισσότερο η εύρεση στελεχών ικανών να παράγουν μεγάλες ποσότητες σκλαρεόλης πάρα ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων που ενσωματώθηκαν τελικά στο γένωμα των κυττάρων, ο έλεγχος των αποικιών έγινε μέσω ανάλυσης των εκχυλισμάτων τους με GC-MS. Τελικά, το πλήθος παραγωγικών αποικιών σε ένα δείγμα ορισμένου αριθμού αποικιών, που προσέλαβαν τον φορέα του RNA-οδηγού, ακολουθούσε με αμελητέα απόκλιση το πρότυπο των Gietz & Schielst (1991) στις δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιήθηκε κασέτα χωρίς γονίδιο-δείκτη και low copy φορέας για την έκφραση της Cas9, ενώ στη δοκιμή που χρησιμοποιήθηκε κασέτα χωρίς γονίδιο-δείκτη και high copy φορέας για την έκφραση της Cas9 ο παρατηρηθείς αριθμός παραγωγικών αποικιών απέκλινε κατά πολύ από τον αναμενόμενο αριθμό (βλ. αποτελέσματα: πίνακας 3). Η αιτία αυτής της απόκλισης φαίνεται να είναι και πάλι η εμφάνιση κυτταροτοξικότητας εξαιτίας της χρήσης high copy πλασμιδιακού φορέα για την έκφραση της Cas9, όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως.

Άλλη μια πρόκληση που συναντήσαμε στην παρούσα εργασία, ήταν η δυσκολία εκδίωξης των πλασμιδιακών φορέων της Cas9 και του RNA-οδηγού από τα κύτταρα των παραγωγικών αποικιών. Για τον σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δύο προσεγγίσεις. Στην πρώτη, τα παραγωγικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο παρουσία του αναλόγου πυριμιδίνης 5-FOA. Η συγκεκριμένη προσέγγιση αποτελεί τον πιο συνήθη τρόπο για την εκδίωξη πλασμιδίων που

φέρουν το γονίδιο-δείκτη URA3 (Boeke et al., 1984; Forsburg, 2001), όπως ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης του RNA-οδηγού. Παρά το ότι ως τώρα δεν έχουν αναφερθεί επιπτώσεις στον μεταβολισμό των κυττάρων που εκτίθενται στο 5-FOA, οι αποικίες που προέκυψαν μετά από κατεργασία των παραγωγικών κυττάρων με αυτό δεν ήταν ικανές να παράγουν σκλαρεόλη. Η ακριβής αιτία του εκμηδενισμού της απόδοσης δεν είναι γνωστή και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, ωστόσο πιστεύουμε ότι μπορεί να σχετίζεται με την εγκαθίδρυση επιγενετικών τροποποιήσεων που άλλαξαν το μοτίβο της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων.

Εναλλακτικά, για την εκδίωξη των αντιγράφων και των δύο πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες των παραγωγικών κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό μέσο, ώστε να μην ασκείται πλέον πίεση επιλογής για τη διατήρησή τους στα κύτταρα (Lundblad & Zhou, 2001). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν παραγωγικά κύτταρα που είχαν μετασηματιστεί με τον high copy φορέα της Cas9, όμως η δυσκολία εκδίωξης των πολυάριθμων αντιγράφων του από αυτά ήταν ένας ακόμη λόγος που οδήγησε στη χρήση low copy φορέα για την έκφραση της Cas9. Τελικά, η εκδίωξη όλων αντιγράφων του low copy φορέα της Cas9 και του RNA-οδηγού κατέστη δυνατή μετά από επτά ανακαλλιέργειες και οι αποικίες που προέκυψαν απέδιδαν ποσότητες σκλαρεόλης παρόμοιες με την αρχική αποικία. Παρ' όλα αυτά, θα ήταν επιθυμητή η επίτευξη της εκδίωξης των πλασμιδίων με ακόμα μικρότερο αριθμό ανακαλλιεργειών, γεγονός που θα καθιστούσε τη διαδικασία ανάπτυξης παραγωγικών στελεχών πιο προσιτή από άποψη χρόνου και κόστους για εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ενθαρρυντικά, καθώς τελικά κατέστη δυνατή η παραλαβή αποικιών *S.cerevisiae* με υψηλές αποδόσεις σκλαρεόλης (έως και 986 mg/L, βλ. αποτελέσματα: πίνακας 2) μέσω υποβοηθούμενης από το σύστημα CRISPR/Cas9 ένθεσης της κατασκευής CcCLS-ERG20(F96C) σε πολλαπλές θέσεις Ty1-LTR στο γένωμα των κυττάρων. Η δυνατότητα που παρέχει το συγκεκριμένο σύστημα για ένθεση των επιθυμητών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας κασέτες χωρίς γονίδια-δείκτες, το καθιστά ιδανικό εργαλείο για ανάπτυξη στελεχών αξιοποιήσιμων σε βιομηχανική κλίμακα, όμως απομένει να μελετηθούν επιπλέον προσεγγίσεις για αποτελεσματικότερη και ταχύτερη εκδίωξη των φορέων έκφρασης της Cas9 και του RNA-οδηγού από τα κύτταρα. Οι Ryan et al. (2014) και Bao et al. (2015) χρησιμοποίησαν έναν πλασμιδιακό φορέα για την έκφραση και των δύο συστατικών του συστήματος CRISPR/Cas9, στρατηγική που, ενώ εκ πρώτης όψης μοιάζει συμφέρουσα γιατί μειώνει το πλήθος των πλασμιδίων προς εκδίωξη, περιορίζεται από θέματα βιοασφάλειας (DiCarlo et al., 2015). Ενδιαφέρουσα εναλλακτική για την πλήρη αποφυγή της χρήσης πλασμιδιακών φορέων αποτελεί η μέθοδος "suicide CRISPR/Cas9" (Wang et al., 2016), στην οποία οι περιοχές που κωδικοποιούν την Cas9 και το RNA-οδηγό εδράζονται στην ίδια πλευρά ενός γραμμικού φορέα DNA που φέρει, επίσης, την -προς ένθεση στο γένωμα- κατασκευή περιστοιχισμένη από τμήματα ομόλογα προς στην αλληλουχία-στόχο· η έκφραση της Cas9 και του RNA-οδηγού εισάγει DBSs στην αλληλουχία-στόχο και, ακολούθως, η επιθυμητή κατασκευή ενσωματώνεται στο γένωμα μέσω διπλού διασκελισμού, ενώ τα εναπομείναντα τμήματα του γραμμικού φορέα DNA -άρα και οι περιοχές που εκφράζουν τα συστατικά του συστήματος CRISPR/Cas9- αποικοδομούνται.

Η χρήση της προαναφερθείσας μεθόδου θα μπορούσε να συμβάλλει και στην αποφυγή εμφάνισης μη-στοχευμένης δράσης, αφού η έκφραση της Cas9 και του RNA-οδηγού είναι παροδική (Wang et al., 2016). Άλλωστε, για την παραλαβή περισσότερων στελεχών αυξημένης απόδοσης σε κάθε δοκιμή, κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση παραμέτρων που αφορούν τη ρύθμιση της έκφρασης της Cas9 και του RNA-οδηγού, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα κυταροτοξικότητας, μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης και δυσκολίας ανάκαμψης των κυττάρων

μετά από μετασηματισμό, που σχετίζονται με την εμφάνιση μη-στοχευμένης δράσης και με την παρατεταμένη έκφραση της Cas9 (*Jakociunas et al., 2016*).

Όσον αφορά την προς ένθεση κατασκευή, οι *Ronda et al. (2015)* έδειξαν ότι το σύστημα CRISPR/Cas9 υποβοηθά με υψηλή αποτελεσματικότητα την ένθεση ακόμα και μεγάλων τμημάτων DNA (5,1-6,8 Kb) στο γένωμα του σακχαρομύκητα χωρίς τη χρήση γονιδίων-δεικτών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κασέτες 4-5 Kb, άρα θεωρούμε ότι το μέγεθός τους δεν ευθύνεται για τη μειωμένη απόδοση ορισμένων δοκιμών, όμως συστήνεται η διερεύνηση της επίδρασης που μπορεί να έχει η ποσότητα της χρησιμοποιούμενης κασέτας στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Επίσης, προτείνεται η χρήση κασετών με μακρύτερα, ομόλογα -προς την αλληλουχία-στόχο- άκρα, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι αυξάνουν την αποτελεσματικότητα ενσωμάτωσης των αντιγράφων μιας κασέτας σε πολλαπλές θέσεις ταυτόχρονα (*Ronda et al., 2015*).

Τέλος, αποσκοπώντας στην δημιουργία ακόμα πιο αποδοτικών στελεχών, αξίζει να ληφθούν υπόψιν τα δεδομένα από τις έρευνες των *Ignea et al. (2015)* και *Trikka et al. (2015)*, που υποδεικνύουν ότι η απόδοση παραγωγής σκλαρεόλης μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω σε στελέχη που υπερέκφραζουν την κατασκευή CcCLS-ERG20(F96C), αν παράλληλα επιχειρηθεί υπερέκφραση και των γονιδίων CcCLS και CD-HMG2³⁸ μέσω πλασμιδιακών φορέων. Συνδυάζοντας τα παραπάνω με την ικανότητα του συστήματος CRISPR/Cas9 να στοχεύει ταυτόχρονα έως και πέντε διαφορετικούς γενετικούς τόπους οδηγώντας σε αποτελεσματική ένθεση διαφορετικών κασετών (*Jakociunas et al., 2015a*), προτείνεται ο σχεδιασμός RNA-οδηγών συμπληρωματικών προς δύο ακόμη οικογένειες επαναλαμβανόμενων στοιχείων του *S.cerevisiae* και η κατασκευή αντίστοιχων κασετών, κάθε μια από τις οποίες θα περιέχει διαφορετικό γονίδιο περιστοιχισμένο από άκρα ομόλογα προς την εκάστοτε αλληλουχία-στόχο. Με αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να επιτευχθεί πολλαπλή ένθεση τριών διαφορετικών γονιδίων χωρίς τη χρήση δεικτών ακόμα και σε ένα βήμα, εξασφαλίζοντας τη σταθερή υπερέκφρασή τους στα κύτταρα και πιθανώς αυξάνοντας κατά πολύ την ικανότητα των κυττάρων να παράγουν σκλαρεόλη.

³⁸ CD-HMG2: κωδικοποιεί την καταλυτική περιοχή του ισοενζύμου hmg2p. Το προκύπτον ένζυμο είναι ιδιοσυστατικά ενεργό και "αποφεύγει" την επαγόμενη από το GGPP αποικοδόμηση, *Trikka et al., 2015*)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arroo, R., Eberhard Breitmaier. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones.** Wiley-VCH, Appl. Organometal. Chem., 21: 377. doi:10.1002/aoc.1209, (2007).

Bailey J.E., **Toward a Science of Metabolic Engineering**, Science, 252: 1668- 1675 (1991).

Bao Z., Xiao H., Liang J., Zhang L., Xiong X., Sun N., Si T., Zhao H., **Homology-Integrated CRISPR–Cas (HI-CRISPR) System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae***, ACS Synthetic Biology, 4: 585–594 (2015).

Barrangou R., **The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond**, Current Opinion in Immunology, 32: 36– 41 (2015).

Barton D.H.R., Parekh S.I., Taylor D.K., Tse C., **An Efficient Synthesis of (-)-Dodecahydro-3a,6,6,9a-tetramethylnaphtho[2,1-b]furan from (-)-Sclareol**, Tetrahedron Letters, 35 (32): 5801- 5804 (1994).

Bhaya D., Davison M., Barrangou R., **CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation**, Annual Review of Genetics, 45: 273–297 (2011).

Boeke J.D., LaCroute F., Fink G.R., **A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance**, Mol. Gen. Genet., 197: 345-346 (1984).

Bringi, V., Kadekde, P.G., Prince, C.L., Schubmehl, Barry F., Kane, Eugene J., Roach, B., **Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of taxus species**, Phyton Catalytic, Inc., WO 1993/017121 A1 (1993).

Broun P., Somerville C., **Progress in plant metabolic engineering**, PNAS USA, 98: 8925- 8927 (2001).

Burg J.S., Espenshade P.J., **Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast**, Progress in Lipid Research, 50: 403–410 (2011).

Caniard A., Zerbe P., Legrand S., Cohade A., Valot N., Magnard J., Bohlmann J., Legendre L., **Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture**, BMC Plant Biology, 12: 119 (2012).

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F., **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems**, Science, 339: 819–823 (2013).

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., **Chapter 24: Natural Products (secondary metabolites)**, Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists (2000).

Daum G., Lees N.D., Bard M., Dickson R., **Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of *Saccharomyces cerevisiae***, Yeast, 14: 1471–1510 (1998).

Dewick P.M., **The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds**, Nat. Prod. Rep., 19: 181-222 (2002).

DiCarlo J.E., Chavez A., Dietz S.L., Esvelt K.M., Church G.M., **Safeguarding CRISPR-Cas9 gene drives in yeast**, Nature Biotechnology, 33: 1250–1255 (2015).

DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M., **Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems**, Nucleic Acids Research, 41 (7): 4336-4343 (2013).

Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A., **Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids**, Trends in Plant Science, 6: 78–84 (2001).

Falara V., Pichersky E., Kanellis A.K., **A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes**, Plant Physiol, 154: 301–310 (2010).

Figueiredo C.A., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C., **Factors affecting volatile and essential oil production in plants: volatile components and essential oils**, *Flavour Fragr. J.*, 23: 213–226 (2008).

Forsburg S.L., **The art and design of genetic screens: Yeast**, *Nature Reviews Genetics*, 2: 659–668 (2001).

Gao Y., Zhao Y., **Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing**, *Journal of Integrative Plant Biology*, 56: 343–349 (2014).

Garza R.M., Tran P.N., Hampton R.Y., **Geranylgeranyl Pyrophosphate Is a Potent Regulator of HRD-dependent 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Degradation in Yeast**, *The Journal Of Biological Chemistry*, 284 (51): 35368–80 (2009).

Gietz R.D., Schiestl R.H., **Applications of High Efficiency Lithium Acetate Transformation of Intact Yeast Cells using Single-Stranded Nucleic Acids as Carrier**, *Yeast*, 7: 253–263 (1991).

Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., Woods R.A., **Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure**, *Yeast*, 11: 355–360 (1995).

Grabinska K., Palamarczyk G., **Dolichol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an insight into the regulatory role of farnesyl diphosphate synthase**, *FEMS Yeast Research*, 2: 259–265 (2002).

Hamilton D.L., Abremski K., **Site-specific Recombination by the Bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated Synapsis of Two lox Sites**, *Journal of Molecular Biology*, 178 (2): 481–486 (1984).

Hampton R., Dimster-Denk R., Rine J., **The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation**, *Trends Biochem Sci.*, 21: 140–145 (1996).

Harvey B.G., Wright M.E., Quintana R.L., **High-Density Renewable Fuels Based on the Selective Dimerization of Pinenes**, *Energy Fuels*, 24: 267–273 (2010).

Herskowitz I., **Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *Microbiological reviews*, 12: 536–553 (1988).

Hong K., Nielsen J., **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries**, *Cell. Mol. Life Sci.*, 69: 2671–2690 (2012).

Ignea C., Trika F.A., Nikolaidis A.K., Georgantea P., Ioannou E., Loupassaki S., Kefalas P., Kanellis A.K., Roussis V., Makris A.M., Kampranis S.C., **Efficient diterpene production in yeast by engineering Erg20p into a geranylgeranyl diphosphate synthase**, *Metabolic Engineering*, 27: 65–75 (2015).

Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A., **Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations**, *Journal Of Bacteriology*, 154 (1): 163–168 (1983).

Isman M.B., **Plant essential oils for pest and disease management**, *Crop Protection*, 19: 603–608 (2000).

Jakočiūnas T., Bonde I., Herrgard M., Harrison S.J., Kristensen M., Pedersen L.E., Jensen M.K., Keasling J.D., **Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae***, *Metabolic Engineering*, 28C: 213–222, (2015a).

Jakočiūnas T., Jensen M.K., Keasling J.D., **CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories**, *Metabolic Engineering*, 34: 44–59 (2016).

Jakočiūnas T., Rajkumar A.S., Zhang J., Arsovska D., Rodriguez A., Jendresen C.B., Skjødtt M.L., Nielsen A.T., Borodina I., Jensen M.K., Keasling J.D., **CasEMBLR: Cas9-Facilitated Multiloci Genomic Integration of in Vivo Assembled DNA Parts in *Saccharomyces cerevisiae***, *ACS Synthetic Biology*, 4 (11): 1226–1234, (2015b).

Jenke-Kodama H., Müller R., Dittmann E., **Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity**, *Progress in Drug Research*, 65: 119–140 (2008).

- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E., **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**, *Science*, 337: 816-821 (2012).
- Jones C.G., Ghisalberti E.L., Plummer J.A., Barbour E.L., **Quantitative co-occurrence of sesquiterpenes; a tool for elucidating their biosynthesis in Indian sandalwood, *Santalum album***, *Phytochemistry*, 67: 2463–2468 (2006).
- Jones M.B., Rosenberg J.N., Betenbaugh M.J., Krag S.S., **Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790: 485–494 (2009).
- Karim A.S., Curran K.A., Alper H.S., **Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications**, *FEMS Yeast Res*, 13: 107–116 (2013).
- Katsuki H., Bloch K., **Studies on the biosynthesis of ergosterol in yeast. Formation of methylated intermediates**, *The Journal of Biological Chemistry*, 242: 222–227 (1967).
- Keasling J.D., **Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering**, *Science*, 330: 1355-1358 (2010).
- Kirby J., Keasling J.D., **Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering**, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60: 335–355 (2009).
- Kirby J., Keasling J.D., **Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid production**, *Nat Prod Rep*, 25 (4): 656–661 (2008).
- Kuhn R., Torres R.M., **Cre/loxP recombination system and gene targeting**, *Methods Mol. Biol.*, 180: 175-204 (2002).
- Kuzuyama T., **Mevalonate and non-mevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (8): 1619-1627 (2002).
- Lombard J., Moreira D., **Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life**, *Molecular Biology and Evolution*, 28: 87–99 (2011).
- Lundblad V., Zhou H., **Manipulation of Plasmids from Yeast Cells**, *Current Protocols in Molecular Biology*, 39:III:13.9.1. (2001).
- Lynen F., **Biosynthetic pathways from acetate to natural products**, *Pure and Applied Chemistry*, 14: 137–167 (1967).
- Mahaira L.G., Tsimplouli C., Sakellaris N., Alevizopoulos K., Demetzos C., Han Z., Pantazis P., Dimas K., **The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action**, *European Journal of Pharmacology*, 666: 173–182 (2011).
- Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Wolf Y.I., Yakunin A.F., Van der Oost J., Koonin E.V., **Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems**, *Nature Reviews Microbiology*, 9 (6): 467-477 (2011).
- Mann J., **Secondary metabolism (book)**, Oxford: Clarendon Press (1987).
- Maury J., Asadollahi M.A., Møller K., Schalk M., Clark A., Formenti L.R., Nielsen J., **Reconstruction of a bacterial isoprenoid biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae***, *FEBS Letters*, 582, doi:10.1016/j.febslet.2008.10.045 (2008).
- McCaskill D., Croteau R., **Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis**, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55, 107–146 (1997).

- McGravey D.J., Croteau R., **Terpenoid metabolism**, *Plant cell*, 7 (7): 1015-1026 (1995).
- Mumberg D., Muller R., Funk M., **Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression**, *Nucleic Acids Research*, 22 (25): 5767-5768 (1994).
- Muntendam R., Melillo E., Ryden A., Kayser O., **Perspectives and limits of engineering the isoprenoid metabolism in heterologous hosts**, *Appl Microbiol Biotechnol*, 84: 1003-1019 (2009).
- Nagy A., **Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring**, *Genesis*, 26: 99-109 (2000).
- Nevoigt E., **Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae***, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72 (3): 379 (2008).
- Ohloff G., **The fragrance of Ambergris**, In: Theimer E.T. (Ed.), *Fragrance chemistry: the science of the sense of smell*, Academic Press, New York (1984).
- Partow S., Siewers V., Daviet L., Schalk M., Nielsen J., **Reconstruction and Evaluation of the Synthetic Bacterial MEP Pathway in *Saccharomyces cerevisiae***, *PLoS ONE*, 7 (12): e5249 (2012).
- Peralta-Yahya P.P., Ouellet M., Chan R., Mukhopadhyay A., Keasling J.D., Lee T.S., **Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel**, *Nat. Commun.*, 2:483 doi: 10.1038 / ncomms1494 (2011).
- Peters R.J., **Two rings in them all: the labdane- related diterpenoids**, *Nat Prod Rep*, 27: 1521-30 (2010).
- Rodriguez-Concepcion M., **Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells**, *Phytochemistry Reviews*, 5: 1-15 (2006).
- Rohdich F., Hecht S., Gartner K., et al., **Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein**, *PNAS USA*, 99: 1158–1163 (2002).
- Rohmer M., **The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants**, *Natural Product Reports*, 16 :565–574 (1999).
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H., **Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate**, *Biochem. J.*, 295 (2): 517–524 (1993).
- Ronda C., Maury J., Jakočiūnas T., Jacobsen S.A.B., Germann S.M., Harrison S.J., Borodina I., Keasling J.D., Jensen M.K., Nielsen A.T., **CREdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae***, *Microb.Cell.Fact.*, 14:97 (2015).
- Ross-MacDonald P., Sheehan A., Shirleen Roeder G., Snyder M., **A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae***, *PNAS USA*, 94: 190-195 (1997).
- Rude M.A., Schirmer A., **New microbial fuels: a biotech perspective**, *Current Opinion in Microbiology*, 12: 274–281 (2009).
- Ryan O.W., Skerker J.M., Maurer M.J., Li X., Tsai J.C., Poddar S., Lee M.E., DeLoache W., Dueber J.E., Arkin A.P., Cate J.H.D., **Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system**, *Elife*, e03703 (2014).
- Sauer B., **Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance**, *J. Mol. Biol.* 223: 911–928 (1992).
- Schalk M., Pastore L., Mirata M.A., Khim S., Schouwey M., Deguerry F., Pineda V., Rocci L., Daviet L., **Toward a Biosynthetic Route to Sclareol and Amber Odorants**, *Journal of the American Chemical Society*, 134: 18900–18903 (2012).

- Schiestl R.H. and Gietz R.D., **High efficiency transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier**, *Current Genetics*, 16: 339-346 (1989).
- Schneiter R., **Genetics, molecular and cell biology of yeast**, *Yeast Genetics* (January): 1-68 (2004).
- Storici F., Durham C.L., Gordenin D.A., Resnick M.A., **Chromosomal site-specific double-strand breaks are efficiently targeted for repair by oligonucleotides in yeast**, *PNAS*, 100: 14994–14999 (2003).
- Stovicek V., Borodina I., Forster J., **CRISPR– Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains**, *Metabolic Engineering Communications*, 2: 13–22 (2015).
- Terns R.M., Terns M.P., **CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed**, *Trends in Genetics*, 30 (3): 111-118 (2014).
- Trikka F.A., Nikolaidis A., Athanasakoglou A., Andreadelli A., Ignea C., Kotta K., Argiriou A., Kampranis S.C., Makris A.M., **Iterative carotenogenic screens identify combinations of yeast gene deletions that enhance sclareol production**, *Microbial Cell Factories*, 14: 60 (2015).
- Veen M., Lang C., **Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *Appl Microbiol Biotechnol*, 63: 635–646 (2004).
- Wach A., Brachat A., Pohlmann R., Philippsen P., **New Heterologous Modules for Classical or PCR-based Gene Disruptions in *Saccharomyces cerevisiae***, *Yeast*, 10: 1793- 1808 (1994).
- Wall M.E., Wani M.C., **Camptothecin and taxol: from discovery to clinic**, *Journal of Ethnopharmacology* 51: 239-254 (1996).
- Wang K.C., Ohnuma S., **Isoprenyl diphosphate synthases**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529: 33-48 (2000).
- Wang Y., Wei D., Zhu X., Pan J., Zhang P., Huo L., Zhu X., **A ‘suicide’ CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans***, *Nature Scientific Reports*, 6:31145, DOI: 10.1038/srep31145 (2016).
- Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna, J.A., **RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea**, *Nature*, 482: 331–338 (2012).
- Withers S.T., Keasling J.D., **Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules**, *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 980–990 (2007).
- Wu S., Chappel J., **Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future**, *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 145–152 (2008).
- Zhang F.L., Casey P.J., **Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences**, *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 241-269 (1996).