



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΚΡΗΤΗΣ

UNIVERSITY  
OF CRETE

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εξερευνώντας τη χημική ποικιλομορφία των  
τερπενικών δομών χρησιμοποιώντας συνθετική  
βιολογία και πρωτεϊνική μηχανική

ΣΕΡΑΦΕΙΜΙΔΗ ΘΕΑΝΩ

Ηράκλειο, Ελλάδα

Σεπτέμβρης, 2016

***ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ***

ΚΑΘ. ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ ΚΡΙΤΩΝ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΚΑΘ. ΚΑΜΠΡΑΝΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΚΑΘ. ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΤΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

Θα ήθελα να αφιερώσω την μεταπτυχιακή εργασία στην αδερφή μου που αν και έφυγε νωρίς παραμένει στην καρδιά μου πάντα.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

**H**παρούσα εργασία ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας Φυτών του τμήματος Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, της Σχολής Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Κρήτης. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Κρίτων Καλαντίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο.

Αναμφίβολα σημαντική ήταν και η βοήθεια του καθηγητή Καμπράνη Σωτήριου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά το **Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης** για τη χορήγηση υποτροφίας κατά τα Ακαδημαϊκά έτη 2014-2016, καθώς η οικονομική ενίσχυση του ιδρύματος μου επέτρεψε να αφοσιωθώ απερίσπαστα στις σπουδές μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιστημονική Μεταδιδακτορική Συνεργάτη του εργαστήριου Βιοχημείας, Δρα Codruta Ignea για την καθημερινή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδακτορική φοιτήτρια Αθανασάκογλου Αναστασία και τον διδακτορικό φοιτητή Δεικτάκη Λευτέρη για την έμπρακτη αλλά και ηθική βοήθεια που μου παρείχαν. Επίσης, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τον λατρευμένο μου ανιψιό Πάμπαλη Μανώλη και την υπέροχη φίλη μου Γκιντάλη Ειρήνη που βρίσκονταν στο πλευρό μου μέχρι τέλους και και υπήρξαν αμέτρητες οι φορές που με ώθησαν στην ολοκλήρωση του μάστερ παρά τις δυσκολίες και αντιξοότητες που εμφανίζονταν. Δεν θα έπρεπε να ξεχάσω την υπέροχη Μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ευαγγελία Μόρου, για τη θετική της ενέργεια, την αγάπη και τη βοήθεια που μου παρείχε σε κάθε ευκαιρία. Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν στον υπέροχο άντρα μου και την πολυαγαπημένη μου μαμά, που με την ουσιαστική βοήθεια και συμπαράσταση τους κατάφερα να ολοκληρώσω τις σπουδές μου, αν όχι να τις ολοκληρώσουμε και οι τρεις μαζί.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>	<b>IV</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....</b>	<b>V</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ .....</b>	<b>VII</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
1.1 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ .....	1
1.2 ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ .....	2
1.2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ .....	2
1.2.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ.....	4
1.2.3 ΔΙΤΕΡΠΕΝΙΑ.....	5
1.3 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ.....	6
1.4 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	6
1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ .....	7
1.6 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> – ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ .....	9
1.7 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΗΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ .....	9
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	10
<b>2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>11</b>
2.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	11
2.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ .....	11
2.1.2 ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ.....	11
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	12
2.2.1 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (LURIA-BERTANI MEDIUM).....	12
2.2.2 ΠΛΗΡΕΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (YPD) .....	12
2.2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ ΓΙΑ ΕΠΛΟΓΗ (CM).....	13
2.3 ΣΤΟΚ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ .....	13
2.4 ANTIBIOTIKA .....	13
2.5 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ .....	14
2.6 ENZYMA.....	14
2.6.1 ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA .....	15
2.6.2 ΆΛΛΑ ENZYMA.....	15
2.7 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ENZYΜΩΝ	

(ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ).....	15
2.7.1    ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ ΜΕ SDS ΑΠΟ ΑΠΟΙΚΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (MINIPREP) ....	15
2.7.2    ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA .....	16
2.7.3    ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 0,8% .....	16
2.7.4    ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	17
2.7.5    ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ (LIGASE REACTION) .....	18
2.7.6    ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ESCHERICHIA COLI .....	18
2.7.7    ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ (HEAT SHOCK) .....	19
2.8    ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ PCR .....	19
2.9    ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ .....	20
2.9.1    ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ .....	20
2.9.2    ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ .....	20
2.9.3    ΕΚΚΙΝΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ.....	21
2.10    ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (GC-MS) 21	
<b>3    ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>22</b>
3.1    ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΗΣ .....	22
3.2    ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΖΥΜΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ .....	24
3.3    ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ .....	27
3.3.1    ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ: pESC-URA/CDS-Y95, pESC-URA/CLS-Y95, pESC-URA/CDS-95L96I MUTANT 3, pESC-URA/CLS-95L96I MUTANT 1 ΚΑΙ pESC-URA/CLS-95A96TGK MUTANT4 .....	27
3.3.2    ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ: pESC-URA/CDS-Y95-SCLS, pESC-URA/CDS-Y95-p1326, pESC-URA/CLS-Y95-SCLS ΚΑ pESC-URA/CLS-Y95-p1326. ....	30
3.4    ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΟΡΕΑ pESC-URA ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟΥΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ pYES ΚΑΙ pHTDH .....	41
<b>4    ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>48</b>
4.1    ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ.....	50
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I –ΧΑΡΤΕΣ ΦΟΡΕΩΝ .....</b>	<b>51</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 1 : ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ PCRII-TOPO .....</b>	<b>51</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II –ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΦΟΡΕΩΝ .....</b>	<b>63</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>XCI</b>

# ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

*Πίνακας 1: Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα*

Σύντ/μηση	Πλήρες όνομα
IPP	isopentenyl pyrophosphate
DMAPP	dimethylallyl pyrophosphate
MVA pathway	mevalonic acid pathway
DXP pathway	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate: (DXP pathway)
GPP	geranyl diphosphate
FPP	farnesyl diphosphate
GGPP	geranylgeranyl diphosphate
LB	Luria- Bertani medium
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose (Πλήρες θρεπτικό μέσο καλ/γειας σακχαρομύκητα)
CM-GAL	Complete Medium with Galactose (Θρεπτικό μέσο καλ/γειας τροποποιημένου σακχαρομύκητα εμπλουτισμένο με γαλακτόζη)
CM-GLU	Complete Medium with Glucose (Θρεπτικό μέσο καλ/γειας τροποποιημένου σακχαρομύκητα εμπλουτισμένο με γλυκόζη)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυσικά προϊόντα των φυτών έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον του ανθρώπου λόγω των απεριόριστων ιδιοτήτων και της φυσικής τους προέλευσης. Ωστόσο, δύσκολα μπορούν να απομονωθούν από τα ίδια τα φυτά όλες αυτές οι πολύτιμες ενώσεις και η εφευρετικότητα του ανθρώπου βρήκε λύση σε αυτό το πρόβλημα με την βοήθεια ετερόλογων συστημάτων παραγωγής των ενώσεων αυτών, με κυρίαρχους οργανισμούς στόχους το βακτήριο *Escherichia coli* και το σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Τα τερπένια αποτελούν μία μεγάλη υποκατηγορία των φυσικών ενώσεων, με ποικίλη και πολύπλοκη δομή που καθιστούν το κάθε μόριο και τις ιδιότητες του μοναδικά. Επίκεντρο της εργασία αποτέλεσαν οι παρακάτω τερπενικές ενώσεις: σκλαρεόλη, μανόλη, οξείδιο της μανόλης και μιλτιραδιένη.

Η σκλαρεόλη αποτελεί ένα διτερπένιο το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον στην σύνθεση αρωμάτων αντικαθιστώντας το αμπάρο που προέρχεται από τις φάλαινες. Η μανόλη φαίνεται να έχει εκλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων αλλά μέχρι στιγμής χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία κατά τον ίδιο τρόπο με τη σκλαρεόλη. Το οξείδιο της μανόλης χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία επίσης, αλλά αποτελεί και πρόδρομο μόριο για την παραγωγή φορσκολίνης, η οποία έχει ευρεία ιατρική χρήση με κυριότερη τη βελτίωση λειτουργίας της καρδιάς. Η μιλτιραδιένη είναι μια ολεφίνη που αποτελεί πρόδρομο μόριο στην παραγωγή φερουγκινόλης, ένα μόριο με αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Με γνώμονα τις χρήσεις των μορίων αυτών πραγματοποιείται ερευνητική προσπάθεια για την αύξηση της ετερόλογης παραγωγής των παραπάνω τερπενίων σε σακχαρομύκητα με τη χρήση μεταλλαξιγένεσης και γενετικής μηχανικής. Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί διαφόρων στελεχών ζύμης που θα μπορούσαν να ελεγχτούν μελλοντικά κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης για την βελτιστοποίηση της παραγωγής τους, πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη δύο γονιδίων (CDS-Y95/CLS-Y95) με σκοπό την ώθηση του μονοπατιού προς την κατεύθυνση που μας ενδιαφέρει (αυξημένη παραγωγή διτερπενίων) και τέλος έγινε μεταφορά των γονιδίων CDS-Y95/CLS-Y95/SCLS/p1326 από τους προηγούμενα χρησιμοποιούμενους φορείς pYES και pHTDH στο φορέα έκφρασης pESC-URA με σκοπό την επίτευξη αυξημένης παραγωγής των ενώσεων : σκλαρεόλη, μανόλη, οξείδιο της μανόλης και μιλτιραδιένη.

## ABSTRACT

Natural products have attracted the interest of man due to their unlimited properties and natural origin. However, all these valuable compounds can hardly be isolated from the plants themselves and human ingenuity found a solution to this problem with the help of heterologous production systems, with dominant target organisms the bacterium *Escherichia coli* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Terpenes are a large subset of natural compounds, with diverse and complex structure which enables each molecule and their properties to be unique. The following compounds were the focus of this project: sclareol, manool, manoyl oxide and miltiradiene.

Sclareol is a diterpene which is predominantly used in the perfume composition replacing ambergris from whales. Manool has shown to have selective cytotoxic activity against tumor cells but so far it is used in perfumery at the same way as sclareol. Manoyl oxide is also used in perfumery, but it is also a precursor for the production of forskolin, which has broad medical use, with the most important so far to be the improvement of heart function. Miltiradiene is an olefin that is also a precursor for the production of ferruginol, a molecule with anti-inflammatory and antioxidant properties.

With reference to the multiple uses of these molecules research is carried out with the effort focused in increasing heterologous production of terpenes in yeast using mutagenesis and genetic engineering. In this work transformations of various yeast strains were carried out, that could be used in the future under different growing conditions to optimize production, a mutation of two genes (CDS-Y95 / CLS-Y95) was carried out in order to boost the metabolic path in the direction of interest (diterpene production) and finally there was a sub cloning of the genes CDS-Y95/CLS-Y95/SCLS/p1326 in expression vector pESC-URA from the previously used pYES and pH TDH in order to increase production of the molecules : sclareol, manool, manoyl oxide and miltiradiene.



# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Φύση δεν δαμάζεται παρά μόνο αν υποταχθείς σ' αυτήν.

Francis Bacon  
1561-1626

## 1.1 Φυσικά προϊόντα

Φυσικά προϊόντα θεωρούνται οι οργανικές ενώσεις που προέρχονται από τον πρωτογενή ή δευτερογενή μεταβολισμό των οργανισμών. Έτσι, τα φυσικά προϊόντα χωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Ο ρόλος των πρωτογενών μεταβολιτών στα φυτά είναι ξεκάθαρος και περιλαμβάνει βασικές ενώσεις για τη φωτοσύνθεση, την αύξηση και την ανάπτυξη, όπως νουκλεοτίδια, αμινοξέα και λιπίδια. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν σχετίζονται άμεσα με τις παραπάνω βασικές λειτουργίες των φυτών αλλά έχουν την ικανότητα να προσδίδουν εξελικτικό πλεονέκτημα όσο αναφορά την επιβίωση του φυτού (Wink, 2003, Williams et al., 1989). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν μία πληθώρα από λειτουργίες στη φύση όπως αυτές που εξυπηρετούν την άμυνα των φυτών έναντι ανταγωνιστικών φυτών, ιών, μικροβίων και φυτοφάγων ζώων καθώς και ενώσεις-σήματα για την προσέλκυση επικονιαστών ή ζώων που βοηθούν στη μεταφορά των σπόρων.

Ως εκ τούτου, οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν προσαρμοστικά

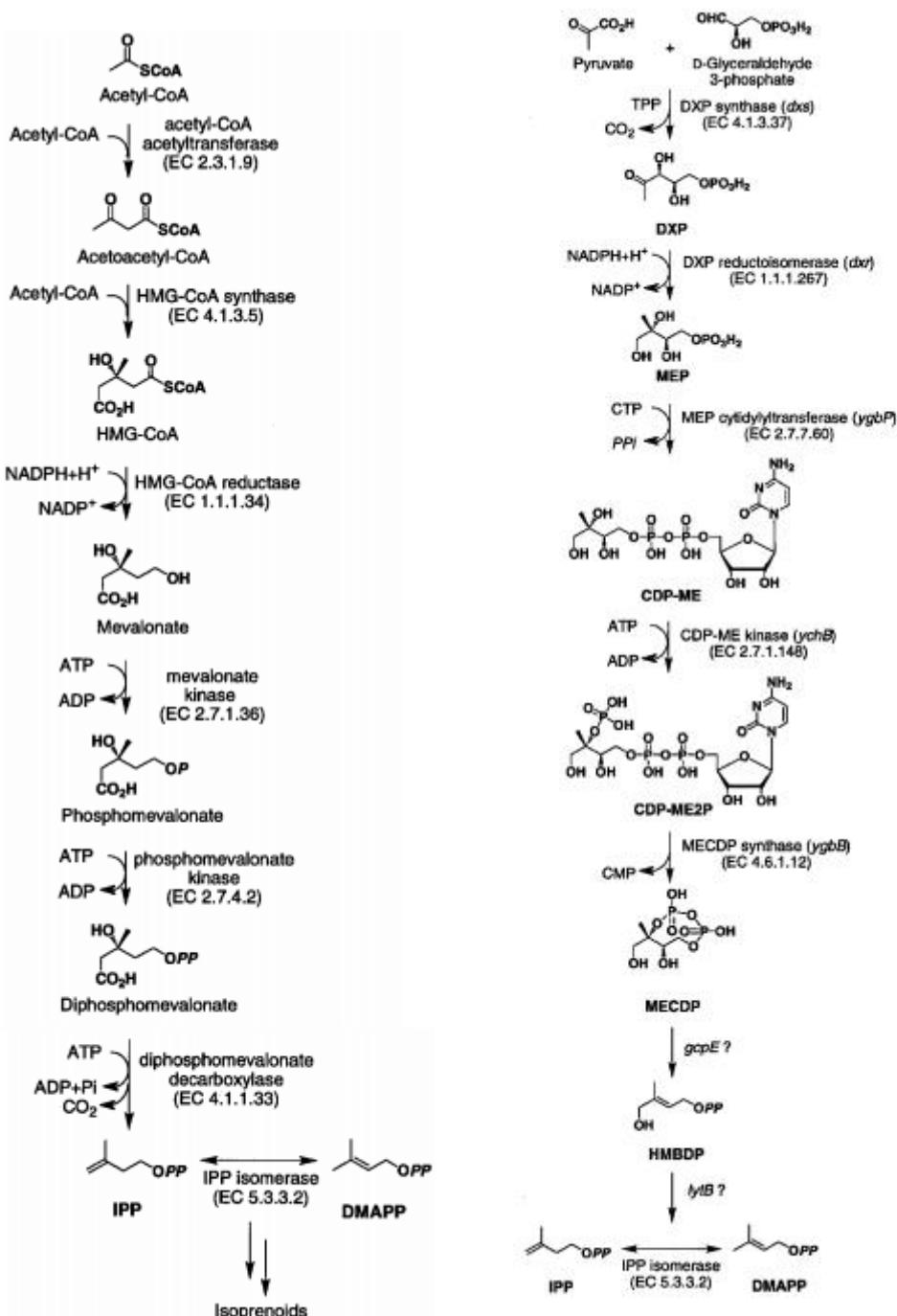
χαρακτηριστικά που έχουν υποστεί φυσική επιλογή κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Wink, 2003). Σύμφωνα με τη βιοσυνθετική τους προέλευση οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) τερπενοειδή, β) φλαβονοειδή, φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις γ) αλκαλοειδή που περιέχουν άζωτο και συστατικά που περιέχουν θείο (Crozier et al., 2006). Στη παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τα τερπενοειδή.

## 1.2 Τερπενοειδή

### 1.2.1 Δομή και βιοσύνθεση τερπενοειδών

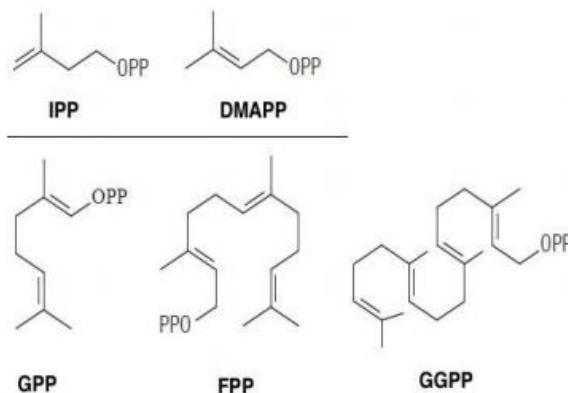
Η εκτενέστερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που συντίθενται από τα φυτά είναι τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή. Ωστόσο, παρόλη την τεράστια χημική και λειτουργική ποικιλότητα που παρουσιάζουν, όλα τα τερπενοειδή προέρχονται από δύο πρόδρομες ενώσεις : ισοπεντενυλ-πυροφωσφορικό (isopentenyl pyrophosphate: IPP) και διμεθυλαλλυλ-πυροφωσφορικό (dimethylallyl pyrophosphate: DMAPP). Αυτά τα ισομερή παράγονται από δύο διαφορετικά μονοπάτια που δε σχετίζονται μεταξύ τους, το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέως (mevalonic acid pathway: MVA) και το μη μεβαλονικό μονοπάτι (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate: (DXP pathway).

Επί μακρό διάστημα, το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέως θεωρούνταν η μοναδική πηγή των δομικών μονάδων των ισοπρενοειδών. Στην πορεία ανακαλύφθηκε το μη μεβαλονικό μονοπάτι (DXP pathway) (Rohmer, 1999, Rohmer et al., 1996). Το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέως βρίσκεται κυρίως στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, τα αρχαία και μερικά βακτήρια ενώ το μη μεβαλονικό μονοπάτι συναντάται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και τα πλαστίδια των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Και τα δύο μονοπάτια αρχίζουν από ένα κεντρικό ενδιάμεσο μόριο άνθρακα: το ακετυλο-CoA στην περίπτωση του μονοπατιού MVA, και το πυροσταφυλικό και η 3-φωσφορική αφυδρογονάση στην περίπτωση του μονοπατιού DXP (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Τα δύο μονοπάτια βιοσύνθεσης των ισοπρενοειδών. Αριστερά : Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού των μεβαλονικού οξέως. Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση του μη μεβαλονικού μονοπατιού. Και τα δύο μονοπάτια καταλήγουν να παράγουν και τα δύο πρόδρομα ισομερή μόρια (IPP/DMAPP). Το IPP και το DMAPP μπορούν στη συνέχεια να μετατραπούν μέσω τρανσφερασών σε πρένυλ-πυροφωσφατάσες όπως geranyl diphosphate (GPP), farnesyl diphosphate (FPP), και geranylgeranyl diphosphate (GGPP) (Kuzuyama, 2002).

Στο σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) το πρόδρομο μόριο IPP προέρχεται από την συμπύκνωση τριών μορίων οξικού άλατος με το ακέτυλο-CoA και το 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλ- CoA μέσω της ενζυμικής αναγωγής σε μεβαλονικό οξύ. Η αλληλόμορφη ισομερής μορφή DMAPP παράγεται από τον ισομερισμό του IPP. Στο επόμενο στάδιο της βιοσυνθετικής διαδρομής, η GPP συνθάση συμπυκνώνει ένα μόριο DMAPP και ένα μόριο IPP, η FPP συνθάση συμπυκνώνει ένα μόριο DMAPP με δύο μόρια IPP διαδοχικά και η GGPP συνθάση συμπυκνώνει ένα μόριο DMAPP με τρία μόρια IPP διαδοχικά για να συνθέσει τις πρόδρομες τερπενικές ενώσεις GPP, FPP και GGPP, αντίστοιχα (Εικόνα 2). Κατά τη διάρκεια αυτών των επαναλαμβανόμενων συμπυκνώσεων, τα ενδιάμεσα πρενυλδιφωσφορικά μόρια συνήθως δεν απελευθερώνονται από τα ένζυμα παρά μόνο όταν έχει προκύψει το τελικό προϊόν.



**Εικόνα 2:** Χημική δομή των κύριων πρόδρομων τερπενικών ενώσεων: IPP (isopentenyl pyrophosphate), GPP (geranyl diphosphate), FPP (farnesyl diphosphate), and GGPP (geranylgeranyl diphosphate).

Οι κυκλοποιήσεις και αναδιατάξεις όλων αυτών των γραμμικών πρόδρομων ενώσεων καταλύονται περαιτέρω από τις συνθάσεις των τερπενίων για την παραγωγή των διαφορετικών σκελετών άνθρακα των τερπενοειδών. Αυτοί οι σκελετοί άνθρακα μπορούν να μετατραπούν μέσω πολλαπλών βημάτων για να σχηματίσουν πιο σύνθετες βιοδραστικές ενώσεις (Chang and Keasling, 2006b).

### 1.2.2 Κατηγορίες τερπενοειδών

Τα τερπένια κατατάσσονται σε διαφορετικές κατηγορίες σύμφωνα με τον αριθμό των ανθράκων που περιέχουν στους σκελετούς τους (Πίνακας 2). Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του κάθε τερπενίου, μπορούν

να χωριστούν σε ημιτερπένια με μία μονάδα ισοπρενίου (C5), μονοτερπένια (C10), σεσκιτερπένια (C15) και διτερπένια (C20). Οι ισοπρενικές μονάδες συνδέονται μεταξύ τους έτσι ώστε η αρχή της μίας μονάδας να ενώνεται με το τέλος της άλλης. Υπάρχουν και άλλες κατηγορίες τερπενίων όπως τρι (C30) και τετρατερπένια (C40) που δεν ακολουθούν αυτόν τον κανόνα και έτσι δύο C15 ή C20 μονάδες αντίστοιχα, είναι συνδεδεμένες έτσι ώστε το τέλος της μίας μονάδας να ενώνεται με το τέλος της άλλης.

**Πίνακας 2:** Κατηγοριοποίηση των τερπενοειδών με βάση τον αριθμό των ισοπρενοειδών ομάδων.

Μονάδες ισοπρενίων	Άτομα άνθρακα	Κατηγοριοποίηση
1	5	Ημιτερπένια
2	10	Μονοτερπένια
3	15	Σεσκιτερπένια
4	20	Διτερπένια
6	30	Τριτερπένια
8	40	Τετρατερπένια
>8	>40	Πολυτερπένια

### 1.2.3 Διτερπένια

Τα διτερπένια απαντώνται σε όλο τον κόσμο σε τεράστια αφθονία που φτάνει μέχρι και τα 5000 φυσικά διτερπένια τα οποία προέρχονται από το γέρανυλ-γέρανυλ διφωσφορικό (Busch and Kirschning, 2008). Τα διτερπένια βρίσκονται συχνά στη ρητίνη των κωνοφόρων, στα ξυλώδη μέρη των ψυχανθών, στα σύνθετα και σε μερικά είδη της οικογένειας Euphorbiaceae. Η φυτόλη, ένα ακυκλικό διτερπένιο με σχετικά απλή δομή βρίσκεται σε όλα τα φύλλα των πράσινων φυτών μιας και αποτελεί το ένα τρίτο του μορίου της χλωροφύλλης. Τα διτερπένια αποτελούνται πάντα από μόρια με 20 άτομα άνθρακα (4 μονάδες ισοπρενίων) και χαρακτηριστικά παραδείγματα τους αποτελούν η σκλαρεόλη και η αμπιενόλη (Ignea et al., 2015b).

Άλλα παραδείγματα διτερπενίων με υψηλή εμπορική αξία είναι η ταξόλη και η φορσκολίνη ως φαρμακευτικά προϊόντα και η αμβροξίνη στην αρωματοποίια (Zerbe et al., 2013, Ignea et al., 2015b).

### **1.3 Χρήσεις τερπενοειδών**

Τα ισοπρενοειδή έχουν μελετηθεί από τον άνθρωπο και έχουν χρησιμοποιηθεί από αυτόν με ποικίλους τρόπους. Παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον ως χρωστικές ουσίες τροφίμων και αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή), ως αρώματα και ενισχυτικά γεύσης (τερπένια), ως φαρμακευτικά προϊόντα (ουβικινόνη) και ενώσεις με αντιπαρασιτική και αντικαρκινική ιδιότητα (ταξόλη) (Lee et al., 2005). Όλα τα ισοπρενοειδή συντίθενται από την ίδια αρχική ένωση που ονομάζεται ισοπεντενύλ- διφωσφορικό (IPP). Στη ζύμη, το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέως χρησιμοποιείται κυρίως για να σχηματιστεί εργοστερόλη (προβιταμίνη D2) η οποία αποτελεί ένα ουσιαστικό μέρος της μεμβράνης των ζυμομυκήτων καθώς τους προσδίδει διαπερατότητα και ρευστότητα (Veen and Lang, 2004).

Η χρήση των τερπενοειδών για φαρμακευτικούς σκοπούς είναι εξαιρετικά ελπιδοφόρα στην εποχή μας. Παράγωγα του σύνθετου διτερπενίου ταξόλη είναι μεταξύ των ευρέως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων στη χημειοθεραπεία του καρκίνου. Η ταξόλη εμφανίζει ισχυρή αντιμιτωτική ιδιότητα. Το μόριο δεσμεύει τα ετεροδιμερή της τουμπουλίνης, προωθεί και σταθεροποιεί τη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων και κατά συνέπεια μειώνει το ποσοστό διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων (Schiff and Horwitz, 1980).

Όσο αναφορά τη φαρμακευτική βιομηχανία υπάρχουν και άλλα σημαντικά μόρια όπως η αρτεμισινίνη, ένα παράγωγο σεσκιτερπενίου (λακτόνη της ενδοπεροξειδάσης) που παρουσιάζει έντονη ανθελονοσιακή δράση. Αυτό το μόριο εξάγεται από το φυτό Artemisia annua ένα κοινό φυτό της Ασίας το οποίο απαντάται και στην βόρεια Αμερική (Ro et al., 2006).

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι τα τερπένια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως πρόδρομα μόρια για χρήση ως βιοκαύσιμα. Παραδείγματος χάριν, η πλήρως ανηγμένη μορφή του γραμμικού τερπενίου φαρνεσένιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό βιοσυνθετικό ντίζελ στην αγορά (Peralta-Yahya and Keasling, 2010).

Παρόλο που τα φυτά παράγουν φυσικά τερπένια, η γενετική μηχανική μικροοργανισμών είναι πιο βολική και οικονομική όταν πρόκειται για μεγάλης κλίμακας παραγωγή και για αυτό προτιμάται.

### **1.4 Περιορισμοί στη χρήση των φυσικών προϊόντων**

Τα τερπένια καθώς και όλα τα φυσικά προϊόντα έχουν μεγάλη βιομηχανική αξία. Ωστόσο η εξαγωγή αυτών των συστατικών από φυσικές πηγές είναι μη αποτελεσματική λόγω

του ότι δε διαθέτουμε τα μέσα εκχύλισης ικανοποιητικής ποσότητας χωρίς το κόστος να γίνεται περιοριστικό. Στην περίπτωση απόπειρας εξαγωγής μεγάλης ποσότητας από τα ίδια τα φυτά καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε και άλλους δυσμενής παράγοντες όπως εποχιακή ανάπτυξη των φυτών ή εύρεση των φυτών σε περιοχές εξαιρετικά δυσπρόσιτες. Ένα επιπλέον πρόβλημα που προκύπτει από την εξαγωγή από φυσικές πηγές είναι πως θα μπορούσε η εκτεταμένη χρήση κάποιων φυτών να οδηγήσει σε διαταραχή του οικοσυστήματος ή ακόμα χειρότερα σε εξαφάνιση των ίδιων των φυτών. Ένα παράδειγμα διαταραχής του οικοσυστήματος έχει ήδη παρατηρηθεί με την εξαγωγή πακλιταξέλης από το φυτό *Taxus brevifolia*. Από την άλλη η εξαγωγή άμεσα από τα φυτά απαιτεί χημικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη ή η ακετόνη που αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες στη μόλυνση του περιβάλλοντος (Chang and Keasling, 2006a).

Σε περίπτωση χημικής σύνθεσης ένα πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι η δομή που προσδίδει τη βιολογική δράση των φυσικών προϊόντων δύσκολα αναπαράγεται με χημικό τρόπο λόγο της πολυπλοκότητας της (Bohlmann and Keeling, 2008).

Για όλους τους προαναφερθέντες λόγους υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη συστημάτων παραγωγής που εκτός από την αυξημένη παραγωγή θα στοχεύουν και στην ελαχιστοποίηση της χρήσης επικίνδυνων ουσιών (Chang and Keasling, 2006a). Η χρήση της γενετικής μηχανικής σε μικροοργανισμούς με σκοπό την ετερόλογη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων φυσικών προϊόντων μέσω αυτών θα μπορούσε να αποτελέσει μία καλή εναλλακτική λύση τόσο στην ανάπτυξη ανανεώσιμων συστημάτων όσο και στη βιωσιμότητα τους.

## **1.5 Γενετική μηχανική μικροοργανισμών για την παραγωγή τερπενοειδών**

Η γενετική μηχανική παραγωγής των τερπενίων μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες, σε αυτήν που στοχεύει φυσικούς φορείς παραγωγής, συνήθως τα φυτά, και σε αυτήν που στοχεύει σε ετερόλογους φορείς, συνήθως μικροοργανισμούς. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα φυτού είναι η μέντα (*Mentha x piperita*), στην οποία έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα με στόχο την αύξηση της περιεκτικότητας της μενθόλης (Lange and Croteau, 1999, Lange et al., 2000, Mahmoud and Croteau, 2003). Μία άλλη προσέγγιση είναι η προσπάθεια παραγωγής των επιθυμητών τερπενοειδών μέσω ιστοκαλλιέργειας των φυτών. Ωστόσο, η ετερόλογη παραγωγή τερπενοειδών διαφέρει πολύ από τις παραπάνω

προσεγγίσεις στο γεγονός ότι ο οργανισμός που χρησιμοποιείται ως φορέας σε αυτήν την περίπτωση παράγει ελάχιστο έως καθόλου το τερπενοειδές που μας ενδιαφέρει, διαθέτοντας μόνο το βασικό κεντρικό μεταβολικό μονοπάτι ισοπρενοειδών που παράγει στερόλες ή κινόνες. Παρόλη την αξιοθαύμαστη επιτυχία παραγωγής αλκαλοειδών και αρτεμισινίνης η γενετική μηχανική ετερόλογων φορέων παρουσιάζει δυσκολίες τόσο λόγω έλλειψης γνώσης στο μονοπάτι των δευτερογενών μεταβολιτών όσο και στην κατανόηση της λειτουργίας του.

Εκ πρώτης φαίνεται η γενετική μηχανική των φυτών πιο ελκυστική λόγω της ήδη εγκατεστημένης παραγωγής του τερπενοειδούς στον οργανισμό και την αμεσότητα της προσέγγισης αυτής. Με μία πιο προσεκτική ματιά όμως αντιλαμβανόμαστε ότι η γενετική μηχανική ετερόλογων φορέων παρουσιάζει σαφή πλεονεκτήματα, όπως την απλότητα του μεταβολικού μονοπατιού, ευκολία γενετικών χειρισμών, υψηλής εξέλιξης εργαλεία γενετικής μηχανικής και ταχύτητας των μετασχηματισμών. Επιπλέον, όταν πρόκειται για βιομηχανικής κλίμακας παραγωγή είναι σίγουρα πιο εφικτή σε καλλιέργειες υπό ελεγχόμενες συνθήκες παρά χρησιμοποιώντας φυτά, των οποίων η ανάπτυξη εξαρτάται από την εποχή, τον καιρό και το κλίμα. Ένα επιπλέον όφελος είναι η σταθερή παραγωγή όλο το χρόνο και κατ' επέκταση και η σταθερότητα στην τιμή του παραγόμενου προϊόντος (Vickers et al., 2014).

Για την ετερόλογη παραγωγή τερπενοειδών αρχικά πρέπει να καθοριστεί ο κατάλληλος οργανισμός. Στην απόφαση αυτή σημασία πρέπει να δοθεί στην ικανότητα παραγωγής τερπενίων από τον ίδιο τον οργανισμό, εύκολους γενετικούς χειρισμούς, πιθανή τοξικότητα των τελικών προϊόντων στον οργανισμό, παρουσία ανταγωνισμού ανάμεσα στα διάφορα παραγόμενα τερπένια και η ικανότητα μετασχηματισμού και τροποποιήσεων που διαθέτει ο οργανισμός (Vickers et al., 2014). Με βάση τα παραπάνω οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι οργανισμοί για την παραγωγή τερπενίων είναι το βακτήριο *Escherichia coli* και ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*.

Με τη χρήση μεθόδων μεταβολικής μηχανικής και συνθετικής βιολογίας είναι εφικτό ο οργανισμός να γίνει κατάλληλος για υψηλή παραγωγή βιομηχανικής κλίμακας (Krivoruchko et al., 2011). Μία από τις επιτυχημένες εφαρμογές της συνθετικής βιολογίας στο πεδίο αυτό αποτελεί η γενετική μηχανική του σακχαρομύκητα για εμπορική παραγωγή ενός πρόδρομου μορίου για το ανθελονοσιακό φάρμακο αρτεμισινίνη.

## 1.6 Ετερόλογη βιοσύνθεση τερπενοειδών στο μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* – Πλεονεκτήματα

Ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι πολύ διαδεδομένος στη γενετική και κυτταρική βιολογία κυρίως επειδή αποτελεί έναν απλό ευκαρυωτικό οργανισμό. Η ζύμη αποτελεί έναν εύκολο στη διαχείριση και στην καλλιέργεια οργανισμό ο οποίος επέτρεψε την ανάπτυξη ισχυρών πρότυπων τεχνικών, όπως το σύστημα δύο υβριδίων και την ανάλυση συνθετικής γενετικής συστοιχίας. Ακόμα, η ζύμη διαθέτει ένα απλό και καλά χαρακτηρισμένο γενετικό σύστημα και τη δυνατότητα ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που επιτρέπουν άλλες γενετικές τροποποιήσεις να πραγματοποιηθούν πιο εύκολα (Giaever et al., 2002).

Επιπρόσθετα, η ζύμη είναι οργανισμός που προτιμάται για ετερόλογη έκφραση των ενζύμων που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών επειδή τα πρόδρομα μόρια των τερπενίων GPP, FPP και GGPP παράγονται φυσικά στη ζύμη μιας και συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι της στερόλης (Chambon et al., 1991). Ακόμα η διαθεσιμότητα για ομόλογο ανασυνδιασμό κάνει τη ζύμη ελκυστικό οργανισμό και για συγκεκριμένες χρωμοσωμικές τροποποιήσεις για την βελτίωση της παραγωγής των τερπενοειδών (Schuler and Werck-Reichhart, 2003).

Σημαντικό πλεονέκτημα της ζύμης αποτελεί επίσης το γεγονός ότι διαθέτει ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα και αποτελεσματικούς μηχανισμούς εξαγωγής, οι οποίοι διευκολύνουν την έκκριση των ενώσεων και κάνουν τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στις παρενέργειες των παραγόμενων ενώσεων (Latge, 2007). Τέλος, άλλα θετικά χαρακτηριστικά στον μετασχηματισμό της ζύμης αποτελούν οι χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, το χαμηλό pH και θερμοκρασία ανάπτυξης, η υψηλή ανθεκτικότητα στην οσμωτική πίεση, η αυξημένη προσαρμοστικότητα και η συμβατότητα καλλιέργειας με την τωρινή υποδομή.

## 1.7 Γενετικά τροποποιημένα στελέχη ζύμης για παραγωγή τερπενοειδών

Με τη χρήση της γενετικής μηχανικής σε ένζυμα κλειδιά του μεβαλονικού μονοπατιού έχουμε καταφέρει να κατασκευάσουμε στελέχη ζύμης τα οποία παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα τερπενοειδών. Βασικό ένζυμο που περιορίζει το ρυθμό βιοσύνθεσης των στερολών αποτελεί το HMG2, το οποίο υπόκεινται σε αποικοδόμηση μέσω ενός

ρυθμιστικού μηχανισμού ανάδρασης. Ακόμα το ένζυμο ERG20 το οποίο αποτελεί την πρένυλ-διφωσφορική συνθάση και οδηγεί στην παραγωγή γέρανυλ-διφωσφορικού και φάρνεσυλ- διφωσφορικού. Επίσης το ένζυμο ERG9 το οποίο καταλύει τη βιοσύνθεση του σκουναλενίου απομακρύνοντας από το κύτταρο τα δύο παραπάνω παραγόμενα μόρια. Ακόμα το ένζυμο IDI1 το οποίο συμμετέχει στον ισομερισμό του IPP σε DMAAPP. Τα παραπάνω ένζυμα ρυθμίζονταν ώστε να παράγονται περισσότερο ή λιγότερο με την χρήση απλοειδών και διπλοειδών στελεχών ζύμης.

### **1.8 Σκοπός της Διπλωματικής Μεταπτυχιακής Εργασίας**

Σκοπός της εργασίας είναι να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες και να κατασκευαστούν οι φορείς ώστε να παράγεται υψηλή ποσότητα διτερπενίων από γενετικά τροποποιημένα στελέχη ζύμης.

Αντό στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να επιτευχθεί με τις παρακάτω πειραματικές διαδικασίες:

- Το μετασχηματισμό βελτιστοποιημένων στελεχών ζύμης για παραγωγή τερπενοειδών (διτερπενίων).
- Τη μεταλλαγή των πλασμιδίων pYES/CDS-Y95 και pYES/CLS-Y95 για βελτιστοποίηση παραγωγής διτερπενίων και την εύρεση της αποτελεσματικότερης αποικίας μετά τον μετασχηματισμό για περαιτέρω πειράματα.
- Τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας του φορέα pESC-URA σε σχέση με τους προηγούμενα χρησιμοποιούμενους φορείς pHTDH και pYES στην παραγωγή των διτερπενίων: σκλαρεόλη, μανόλη, οξείδιο της μανόλης και μιλτιραδιένη.

## 2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

«Είμαστε εμείς που ζυμώνουμε και δεν έχουμε ψωμί, εμείς που βγάζουμε το κάρβουνο και κρυώνουμε. Εμείς που δεν έχουμε τίποτα και ερχόμαστε να πάρουμε τον κόσμο.»

Τάσος Λειβαδίτης  
1922-1988

### 2.1 Στελέχη Μικροοργανισμών

#### 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Το στέλεχος Mach1<sup>TM</sup>-T1R - *E. coli* είναι τροποποιημένο από το αγρίου τύπου στέλεχος W (ATCC #9637, S. A. Waksman) και παρέχει πολύ γρηγορότερο χρόνο διπλασιασμού σε σύγκριση με άλλα βακτηριακά στελέχη προς κλωνοποίηση (8 ώρες). Περιέχει αντίσταση στο φάγο T1 και επιλογή μέσω του αντιβιοτικού αμπικιλίνη. Ο γενότυπος του είναι F- φ80 (lacZ) ΔM15 ΔlacX74 hsdR (rK-mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA (Invitrogen).

#### 2.1.2 Στελέχη σακχαρομύκητα

Στον Πίνακας 3 παρουσιάζονται τα στελέχη σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά.

**Πίνακας 3:** Στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν.

AM94	Mat a/a, PGal1-HMG2(K6R):: HOX2, ura3, trp1, his3, PTDH3-HMG2(K6R)::leu2X2, ERG9/erg9	(Ignea et al., 2012)
AM205	Mat a/alpha,PGAL1-(K6R)HMG2::HOX2,ura3,trp1,PTDH3-HMG2(K6R)X2-::leu2 ERG9/erg9, erg20/PTDH3-ERG20(F96C)::erg20, PTDH3-ERG20 (F96C)::FLO5 3UTR. Derived from AM202	(Ignea et al., 2015b)
AM238	MAT $\alpha$ his3, ura3, trp1, rox1, dos2, yer134c, vba5, ynr063w, ygr259c Derived from AM233	(Trikka et al., 2015)
AM240	Mat alpha his3, ura3, trp1, rox1, dos2, yer134c, vba5, ygr259c, ynr063w PTDH3-ERG20 F96C::erg20	Unpublished
AM250	Mat alpha his3, ura3, trp1, rox1, dos2, yer134c, vba5, ygr259c, ynr063w, PTDH3-CLS-ERG2- (F96C)::Ty1A	Unpublished

## 2.2 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

### 2.2.1 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων (*Luria-Bertani medium*)

Αυτό το θρεπτικό μέσο είναι κατάλληλο για καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων. Για τη παρασκευή ενός λίτρου απαιτείται διάλυση: 10 g bacto-trypone (Applichem), 5 g bacto-yeast-extract (Applichem) και 5 g NaCl (Applichem) σε απιονισμένο νερό. Γίνεται ρύθμιση του pH=7 και ακολουθεί αποστείρωση για 20 min στους 121°C. Ακόμα εάν αντί για υγρό θρεπτικό διάλυμα χρειάζεται η παρασκευή στερεού υποστρώματος κατά την ανάμειξη των παραπάνω συστατικών προστίθενται και 20 g Bacto agar (Scharlau) (Bertani, 1951).

### 2.2.2 Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σακχαρομύκητα (YPD)

Αυτό το θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείτε για την καλλιέργεια αγρίου τύπου σακχαρομύκητα. Για τη παρασκευή ενός λίτρου απαιτείται διάλυση: 20 g bacto-peptone (Sigma), 10 g bacto-yeast-extract (Applichem) και 20 g glucose (Applichem) σε απιονισμένο νερό. Γίνεται ρύθμιση του pH=5.8-6.2 και ακολουθεί αποστείρωση για 20 min στους 121°C. Επίσης εάν αντί για υγρό θρεπτικό διάλυμα χρειάζεται η παρασκευή στερεού υποστρώματος κατά την ανάμειξη των παραπάνω συστατικών προστίθενται και 20 g Bacto agar (Scharlau)

(Sherman, 2002).

### 2.2.3 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σακχαρομύκητα για επιλογή (CM)

Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο πρωτόκολλο επιλογής με βάση την αυξοτροφία που παρουσίαζε το κάθε στέλεχος. Αυτό σήμαινε ότι τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που του έλειπε ένα ή περισσότερα αμινοξέα απαραίτητα για την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα (π.χ. ουρακίλη, URA ή ουρακίλη και ιστιδίνη μαζί, URA+HIS). Έτσι μόνο τα κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί με το/α πλασμίδιο/α που έφεραν το/α γονίδιο/α που συμπλήρωνε τις αντίστοιχες μεταλλαγές αυξοτροφίας ήταν σε θέση να αναπτυχθούν στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν 6.7 g/L yeast nitrogen base without aminoacids (US Biological), 20 g/L glucose (Applichem) και 1,3 g/L dropout powder (Sigma). Έγινε ρύθμιση του pH=5.8-6.2 σε όλα τα στερεά θρεπτικά μέσα. Τέλος, ανάλογα με το εάν η πηγή υδατάνθρακα ήταν γλυκόζη ή εναλλακτικά γαλακτόζη 20 g/L (Applichem) και ραφινόζη 10 g/L (US Biological), αντίστοιχα καταστέλλεται ή επάγεται η έκφραση των περιεχομένων στο πλασμίδιο γονιδίων τα οποία έχουν συντηχθεί με τον υποκινητή GAL. Επίσης χρησιμοποιήθηκε Bacto agar της εταιρείας Scharlau για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου (20 g/L). (Sherman, 2002).

## 2.3 Στοκ γλυκερόλης

Για την προετοιμασία τόσο των βακτηριακών στοκ γλυκερόλης όσο και του σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε κορεσμένη καλλιέργεια μικροοργανισμών και 50% αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης (Sigma) σε αναλογία 1:1. Τα δείγματα στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μακροχρόνια διατήρηση τους.

## 2.4 Αντιβιοτικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιβιοτικά.

- Αμπικιλίνη, άλας νατρίου (100 mg/ml) (Sigma). Παρασκευάζεται στοκ διάλυμα συγκέντρωσης 100 mg/ml με απιονισμένο νερό, αποστειρώνεται με μεμβράνη φίλτρου 0.22 μμ και αποθηκεύεται στους -20°C ως δείγματα του 1 ml.
- Καναμυκίνη, θεϊκό άλας (100 mg/ml) (Applichem). Παρασκευάζεται στοκ διάλυμα συγκέντρωσης 100 mg/ml με απιονισμένο νερό, αποστειρώνεται με μεμβράνη

φύλτρου 0.22 μμ και αποθηκεύεται στους – 20° C ως δείγματα του 1 ml.

## 2.5 Πλασμιδιακοί φορείς

Στη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πλασμιδιακοί φορείς όπως παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Παρουσίαση των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν

Πλασμίδια	Βασικά χαρακτηριστικά
pCRII-TOPO	Μέγεθος 3973 kb, Περιέχει : περιοχή κλωνοποίησης, εκκινητές T7 για μεταγραφή RNA και αλληλούχιση, εμπρόσθια και αντίστροφη θέση εκκινητών M13 για αλληλούχιση, origin F1 και αντίσταση στην καναμυκίνη.
pYES2	Παρέχει φυσική έκφραση της πρωτεΐνης στο <i>S. cerevisiae</i> και Περιέχει το γονίδιο URA3 για την επιλογή σε ζυμομύκητες, 2 micron origin για τη συντήρηση υψηλού αριθμού αντιγράφων και τον επαγόμενο υποκινητή GAL 1.
pHTDH3	Περιέχει υποκινητή TDH3 και διαθέτει αυξοτροφία στην ιστιδίνη.
pUTDH3	Περιέχει υποκινητή TDH3 και διαθέτει αυξοτροφία στην ουρακύλη .
pWTDH3	Περιέχει υποκινητή TDH3 και διαθέτει αυξοτροφία στην τρυπτοφάνη.
PYX143	Φορέας χαμηλού αριθμού αντιγράφων (ARS / CEN, LEU2) που εκφράζει τα γονίδια υπό τον έλεγχο του δομικού υποκινητή TPI.
pESC-URA	Μέγεθος 6,6 kb. Αποτελεί επισωμικό πλασμίδιο ζύμης που στηρίζεται στο βασικό κορμό του φορέα pBluescript II SK <sup>+</sup> (Agilent 2012).: Περιέχει: γονίδιο που αφορά την αρχή αντιγραφής του πλασμιδίου pUC και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη που επιτρέπουν την αντιγραφή και την επιλογή σε στελέχη <i>E. coli</i> που περιέχουν το φορέα, γονίδιο που επιτρέπει την αυτόνομη αντιγραφή του σε σακχαρομύκητα σε πολλαπλά αντίγραφα, γονίδιο που συμπληρώνει μεταλλαγές αυξοτροφίας του στελέχους ( <i>URA3</i> ) για την επιλογή σε CM θρεπτικό μέσο που απονιάζει η ουρακύλη, την κασέτα έκφρασης η οποία περιέχει τις αλληλουχίες των υποκινητών GAL1 και GAL10 του <i>S. cerevisiae</i> , Δύο περιοχές κλωνοποίησης, μία αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής καθοδικά του κάθε υποκινητή (2-micron ori, URA3, f1 ori, T ADH1, MCS1/FLAG, p GAL1, MCS2/myc, T CYC1, pUC ori, ampicillin).

## 2.6 Ένζυμα

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν διάφορα ένζυμα που για μεγαλύτερη ευκολία έχουν ομαδοποιηθεί σε περιοριστικά ένζυμα και μη περιοριστικά ένζυμα όπως φαίνεται παρακάτω.

### **2.6.1 Περιοριστικά ένζυμα**

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής περιοριστικά ένζυμα (Εταιρεία NEB) : EcoRI, HindIII, XbaI, SalI, BglIII, BamHI, NotI, MfeI.

### **2.6.2 Άλλα ένζυμα**

Έγινε επίσης χρήση των ενζύμων : RNase A (Applichem) και phusion high-fidelity DNA polymerase (NEB), Taq polymerase (Bioline).

## **2.7 Πρωτόκολλα πλασμιδιακής κλωνοποίησης με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (Υποκλωνοποίηση)**

### **2.7.1 Απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση με SDS από αποικία βακτηρίων (Miniprep)**

Εμβολιάστηκε μοναδιαία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων *E.coli* με το επιθυμητό πλασμίδιο σε 5 ml θρεπτικό υλικό (LB) με το κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλίνη αλλά και καναμυκίνη). Επώαση στους 37°C για μία νύχτα με έντονη μηχανική ανάδευση. Ακολούθησε μεταφορά 4 ml κάθε καλλιέργειας σε σωλήνες τύπου eppendorf και φυγοκέντρηση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου με ταχύτητα 13.000 rpm για την καθίζηση των βακτηριακών κυττάρων. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και επαναιωρήθηκε το βακτηριακό ίζημα σε 250 μl παγωμένου διαλύματος P1 (περιέχει RNase A σε περιεκτικότητα 100 μg/ml για απομάκρυνση του RNA) με έντονη μηχανική ανάδευση (vortex). Προστέθηκαν 250 μl φρέσκου διαλύματος P2 (0,2N NaOH, 1% SDS) στο βακτηριακό εναιώρημα, ανακινήθηκε 5 φορές και τοποθετήθηκε για 5 min για αλκαλική λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη συνέχεια προστέθηκαν 350 μl όξινου διαλύματος N3 (5M potassium acetate, glacial acetic acid (Merck), H<sub>2</sub>O), και πραγματοποιήθηκε διασπορά με ελαφρύ ανακάτεμα έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στη silica μεμβράνη. Κατόπιν φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min και μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε καθαρό eppendorf όπου φυγοκέντρηση και πάλι για 5 min στις 13.000 rpm. Σε αυτό το στάδιο κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες, το γενωμικό DNA και τα υπολείμματα των κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετείται το υπερκείμενο σε στήλες για πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στη silica μεμβράνη. Προστέθηκαν 500 μl PB (70% v/v υδροχλωρική γουανιδίνη (Applichem),

30% v/v ισοπροπανόλη (Fisher Scientific)), και 750 μl διαλύματος PE που αποτελεί απλό διάλυμα με αιθανόλη (80% v/v αιθανόλη (Fisher Scientific), 10% v/v Tris-HCl pH=7.5 (Applichem) και 10% v/v απιονισμένο νερό) για ξέπλυμα μολύνσεων όπως άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά. Απομακρύνθηκαν διεξοδικά τα σφαιρίδια αιθανόλης μέσω φυγοκέντρησης για 1 min στις 13.000 rpm. Τελικά, πραγματοποιήθηκε έκλουση των νουκλεϊκών οξέων σε 50 μl διαλύματος EB (10 mM Tris- H Cl pH 8.5) όπου αφέθηκε για 1 min στη μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκε για 1 min, επίσης, στις 13.000 rpm μέσα σε καινούργιο eppendorf. Ακολουθεί φύλαξη του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA στους -20°C (QIAGEN miniprep kit).

### **2.7.2 Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα**

Τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν απαραίτητα εργαλεία στον ανασυνδιασμό του DNA λόγω της ιδιότητας τους να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες (4-6 ζεύγη βάσεων) και να κόβουν με τον ίδιο τρόπο και τις δύο αλυσίδες DNA δίνοντας κολλώδη ή τυφλά άκρα.

Για να γίνει η αντίδραση πέψης αναμείχθηκαν τα παρακάτω μέχρι τελικού όγκου 30 μl σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου eppendorf:

3 μl 10x restriction enzyme buffer (στις περισσότερες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε cutsmart NEBuffer (NEB), η κατάλληλη ποσότητα του ενζύμου ή των ενζύμων (συνήθως 0.5-1 μl ανάλογα πάντα με την ποσότητα του DNA), η κατάλληλη ποσότητα DNA (συνήθως 5 μl για πέψη με ένα ένζυμο, 10 μl για πέψη με δύο ένζυμα και 15 μl όταν πρόκειται για αφαίρεση insert), 10xBSA (εταιρεία) μόνο εάν απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, και τέλος συμπλήρωση με απιονισμένο H<sub>2</sub>O μέχρι τον απαιτούμενο τελικό όγκο.

Ακολούθησε επώαση για 15 min στα ένζυμα που λειτουργούν με το restriction enzyme buffer cut smart και 2 h στους 37°C στα υπόλοιπα, για πραγματοποίηση της αντίδρασης πέψης. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε για εξαγωγή συγκεκριμένων τμημάτων DNA που προορίζονται για κλωνοποίηση σε άλλους πλασμιδιακούς φορείς ή ακόμα και για ταυτοποίηση του ενθέματος που έχει εντεθεί μετά την κλωνοποίηση.

### **2.7.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%**

Για να διαπιστωθεί η πέψη με περιοριστικά ένζυμα (διαχωρισμός και αναγνώριση

τμημάτων DNA), για τον καθαρισμό τμημάτων DNA καθώς και για την επίτευξη του καθορισμού της ποσότητας DNA για την αντίδραση λιγάσης πραγματοποιήθηκε σε διάφορες φάσεις της πειραματικής διαδικασίας ηλεκτροφόρηση. Διαλύθηκαν 0.8 g αγαρόζης (Invitrogen), ανάλογα με το μέγεθος των δειγμάτων DNA προς ηλεκτροφόρηση, (ζυγισμένα σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας) σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TAE (στοκ διάλυμα 50x, 24.2 % (w/v) Tris base (AppliChem), 3.72 % (w/v) EDTA (Sigma)) σε κωνική φιάλη με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 2.5 min ώστε να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 μl χρωστικής gel red αφού είχε κρυώσει λίγο το διάλυμα της αγαρόζης (περίπου 55°C). Τοποθετήθηκαν τα κατάλληλα κτένια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε το διάλυμα της αγαρόζης να πολυμεριστεί για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά έγινε αφαίρεση των κτενιών εντός του διαλύματος TAE το οποίο προστέθηκε μέχρι την κάλυψη του πηκτώματος μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε loading buffer 6x έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x (STEB for DNA, 100 mM Tris HCl, pH 7.5, 20 % Glycerol (w/v), 1 mM EDTA, και τοποθετήθηκαν στις θέσεις φόρτωσης του πηκτώματος για σύγκριση των εμφανιζόμενων ζωνών με τον μάρτυρα 103SlambdaDNA/ EcoR I/ Hind III Digest της γερμανικής εταιρείας Jena Bioscience.. Ρυθμίστηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 150 V. Μετά από τουλάχιστον 30 min παρουσιάστηκε το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης στην ειδική τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

#### **2.7.4 Απομόνωση επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Η διαδικασία έχει ως εξής: Το πήκτωμα αγαρόζης που φέρει τις επιθυμητές ζώνες DNA τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και με νυστέρι αφαιρέθηκαν τα τμήματα με τις επιθυμητές ζώνες. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου eppendorf και ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Για κάθε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης προστέθηκαν 200 μl Buffer QG (5.5 M guanidine thiocyanate (GuSCN), 20 mM Tris HCl, pH 6.6). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο για 10-15min στους 50°C έως ότου διαλυθεί εντελώς το πήκτωμα.

Μετά το τέλος της επώασης, το διάλυμα πέρασε από στήλες (Nucleospin Plasmid Columns- Macherey-Nagel). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πλύσιμο της μεμβράνης σιλικόνης με προθήκη 500 μl PB (70% v/v υδροχλωρική γουανιδίνη (Applichem), 30% v/v

ισοπροπανόλη (Fisher Scientific)) και 750 μl διαλύματος PE που αποτελεί απλό διάλυμα με αιθανόλη (80% v/v αιθανόλη, 10% v/v Tris-HCl pH=7.5 και 10% v/v απιονισμένο νερό) για ξέπλυμα μολύνσεων. Επετεύχθη ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης με φυγοκέντρηση για άλλα 2 min στις 13.000 rpm ώστε να έχει αφαιρεθεί τελείως το buffer με την αιθανόλη. Τοποθετήθηκε η κάθε στήλη διαχωρισμού σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου eppendorf των 1.5 ml, προστέθηκαν 50 μl διάλυμα EB και μετά από 1 min επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα για 1 min στις 13000 rpm. Η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε στους -20°C.

### 2.7.5 Αντίδραση Λιγάσης (*Ligase reaction*)

Κατά την αντίδραση λιγάσης ενώνονται τμήματα DNA με τη δημιουργία ομοιοπολικού φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των 3' υδροξυλικών άκρων της μίας αλυσίδας και το 5' φωσφορικό άκρο της άλλης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους -4°C overnight και περιείχε την κατάλληλη ποσότητα (1:1 ή 1:2) από γραμμικούς φορείς DNA και τμημάτων DNA που περιέχουν το γονίδιο που θέλουμε να ενθέσουμε, T4 DNA Ligase (0.5 μl) και T4 DNA Ligase 10x buffer, ATP (10 mM) (όλα της εταιρείας NEB) και H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 10 μl. Σημαντική είναι η συγκέντρωση του DNA (0.2 μM) προκειμένου να προωθηθεί η αλληλεπίδραση διαμοριακής παρά ενδομοριακής ένωσης. Με τη χρήση διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου.

### 2.7.6 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μόλυνση 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με το στέλεχος Mach I του βακτηρίου *E. coli* και τοποθετήθηκε για επώαση μία νύχτα στους 37°C με ισχυρή ανάδευση. Την επόμενη μέρα μολύνθηκαν 100 ml με ένα 1 ml από την βακτηριακή καλλιέργεια και τοποθετήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη του ενός λίτρου. Έγινε επώαση με ισχυρή ανάδευση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm να είναι OD=0,6-0,8 το οποίο ελέγχθηκε με φασματοφωτόμετρο. Όταν τα βακτηριακά κύτταρα είχαν την επιθυμητή συγκέντρωση (περίπου 108 κύτταρα/ml), μεταφέρθηκαν σε falcon και φυγοκεντρήθηκαν στις 2.500 rpm για 10 min στους 4°C. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό και επαναδιαλύθηκε το ίζημα σε 30 ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TfbI (30 mM CH<sub>3</sub>COOK, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol). Κατόπιν ακολούθησε επώαση για 30 min στον πάγο. Μετά την επώαση φυγοκεντρήθηκε το δείγμα στις 2000 rpm

για 10 min στους 4°C και πετάχτηκε το υπερκείμενο υγρό. Ακολούθησε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 4 ml παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα TfbII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% Glycerol). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το μοίρασμα του παραπάνω διαλύματος σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου eppendorf ώστε να περιέχονται 50 μl σε κάθε σωλήνα και επιτύχει η άμεση ψύξη τους με υγρό άζωτο και η αποθήκευση τους στους -80°C.

### 2.7.7 Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμική καταπόνηση (Heat shock)

Μέσα σε παγωμένο eppendorf που περιέχει 50 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, και το οποίο τοποθετήθηκε από τους -80oC αμέσως σε πάγο, προστέθηκαν 2 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (Sigma) και 4 μl από το μετασχηματισμένο πλασμίδιο και αναδεύτηκαν ήπια. Έμειναν για επώαση 30 min στον πάγο και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec και επανατοποθετήθηκαν τα δείγματα στον πάγο. Έπειτα προστέθηκαν 250 μl θρεπτικού διαλύματος LB χωρίς αντιβιοτικό και επωάστηκαν στους 37°C για 1 h υπό ανάδευση 200 στροφών/λεπτό. Κατόπιν έγινε στρώσιμο των κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (π.χ. σε 100 ml θρεπτικού διαλύματος LB 100 μl αμπικιλίνης (συγκέντρωσης 100 mg/ml) και αφού στέγνωσε το υγρό θρεπτικό τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C για 12-16 h.

## 2.8 Ενίσχυση τμημάτων DNA με τη χρήση PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει την ενίσχυση τμημάτων DNA *in vitro*, δηλαδή χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών. Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών και DNA πολυμεράσης που είναι θερμοάντοχη πολλαπλασιάζεται ένα μικρό δείγμα DNA έτσι ώστε να επαρκεί για περαιτέρω ανάλυση. Η επιβεβαίωση ενίσχυσης του σωστού τμήματος DNA πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης προστέθηκε 1 μl από κάθε εκκινητή (τελική συγκέντρωση εκκινητών 10 pmol/ml), 5 μl 10x Taq polymerase buffer, 1 μl dNTPs (συγκέντρωσης 10 mM), 2 μl DNA προς ενίσχυση (σε αραίωση 1:10 από δείγμα 0.01-1ng), και 0,5 μl Taq ή phusion πολυμεράσης σε τελικό όγκο μετά την συμπλήρωση αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O: 50 μl, μέσα σε PCR eppendorfs. Το DNA προστέθηκε στο τέλος της διαδικασίας και μετά την συμπλήρωση με την κατάλληλη ποσότητα νερού και το ένζυμο τελευταίο μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στη συσκευή PCR. Κάθε φορά η συσκευή PCR ρυθμιζόταν ανάλογα με τις

ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας.

## 2.9        **Πρωτόκολλα μετασχηματισμού σακχαρομύκητα**

### 2.9.1 **Παρασκευή δεκτικών κυττάρων και μετασχηματισμός σακχαρομύκητα**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μετασχηματισμού σακχαρομύκητα με τη χρήση οξικού λιθίου (LiOAc). Αρχικά, προστέθηκαν 400 μl προκαλλιέργειας (που προέρχεται από 5 ml κατάλληλου θρεπτικού μέσου μετά την προσθήκη 100 μl στοκ γλυκερόλης της επιθυμητής καλλιέργειας και ανάπτυξη στους 30°C για 12-16 ώρες) για κάθε 50 ml θρεπτικού μέσου και επωάστηκαν στους 30°C έως ότου OD600 ~ 0.6-0.7. Στη συνέχεια μεταφέρονται οι καλλιέργειες κάτω από στείρες συνθήκες σε αποστειρωμένους σωλήνες falcon και φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά στις 28.000 rpm. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο πλύθηκε το ίζημα με 5 ml dd H<sub>2</sub>O και φυγοκεντρήθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες έτσι ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια ακολούθησε η ίδια διαδικασία αλλά με τη χρήση solution 1 (1 M Lithium Acetate, 10X TE Buffer, ddH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:1:8) και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε το ίζημα σε solution 1 (400 μl solution 1 για κάθε 50 ml καλλιέργειας). Σε eppendorf των 1,5 ml τοποθετήθηκαν 5 μl sssDNA (Sonicated single –stranded carrier DNA) και 5 μl από το κάθε πλασμίδιο ανάλογα με τον μετασχηματισμό που πρόκειται να πραγματοποιηθεί. Στη συνέχεια προστέθηκαν 80 μl από τα κύτταρα που βρίσκονταν μέσα στο solution 1. Τέλος, σε κάθε eppendorf τοποθετήθηκαν 350 μl solution 2 (1 M Lithium Acetate, 10X TE Buffer, 50 % PEG σε αναλογία 1:1:8) και επωάστηκαν στους 30°C για 45 min. Κατόπιν, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στους 42°C για 15 min και αμέσως μετά φυγοκεντρήθηκαν στις 6.000 rpm για 2 min, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, προστέθηκαν 150 μl διάλυμα TE (αραίωση 1:10 από stock διάλυμα 10X TE buffer (pH 7.5) Tris HCL 0.5 M EDTA) και τοποθετήθηκαν κάθε φορά σε τρυβλίο πετρί με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο, όπου επωάστηκαν για 3-4 ημέρες.

### 2.9.2 **Συνθήκες καλλιέργειας σακχαρομύκητα**

Τα στελέχη χωρίς αυξοτροφίες καλλιεργήθηκαν σε YPD θρεπτικό μέσο ενώ τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε αυξοτροφικό θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη και ραφινόζη ή με γλυκόζη ανάλογα με το εάν ήταν επιθυμητή η επαγωγή της

έκφρασης συγκεκριμένου/ων γονιδίου/ων ή όχι αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση οι καλλιέργειες γίνονται σε εύρος θερμοκρασιών 25-30°C και ανάδευση.

### **2.9.3 Εκκίνηση καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένου σακχαρομόκητα**

Για την εκκίνηση της καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένου σακχαρομόκητα μολύνονται 5 ml του κατάλληλου θρεπτικού μέσου σε δοκιμαστικό σωλήνα με αποικίες από τρυβλίο πετρί. Η καλλιέργεια αυτή αφού αφηνόταν να μεγαλώσει αρκετά (12-16 ώρες), χρησιμοποιούται για την εκκίνηση της κύριας καλλιέργειας (10 ml) η οποία επρόκειτο να επωαστεί για 3-4 ημέρες μαζί με 1 ml δωδεκάνιο. Το δωδεκάνιο χρησιμοποιείται προκειμένου οι πτητικές ενώσεις που παράγονται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας να διαλυθούν εντός του και εν συνεχεία να είναι η απομόνωση τους ευκολότερη.

### **2.10 Πρωτόκολλο ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS)**

Η μέθοδος αυτή είναι πολύ διαδεδομένη όταν επιδιώκεται να επιτευχθεί διαχωρισμός και χαρακτηρισμός μεταξύ των πτητικών ενώσεων ενός άγνωστου δείγματος λόγω του συνδυασμού της αέριας χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας που δίνει υψηλή ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αρχικά πραγματοποιείται έγχυση του δείγματος στη συσκευή GC με τη χρήση τριχοειδούς στήλης κατά μήκος της οποίας τα μόρια συγκρατούνται στη στήλη ανάλογα με τη σχετική συγγένεια τους με τη στατική φάση της στήλης και εκλύονται σε χαρακτηριστικούς διαφορετικούς χρόνους για κάθε μόριο (χρόνος κατακράτησης). Ο διαφορετικός χρόνος έκλυσης του κάθε μορίου επιτρέπει στη συνέχεια στο φασματοφωτόμετρο μάζας να σπάσει κάθε μόριο σε ιονισμένα τεμάχια τα οποία ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας την αναλογία μάζας/φορτίο του κάθε ενός. Τέλος, σχηματίζεται ένα γράφημα με κορυφές όπου η κάθε μία απεικονίζει ιδανικά ένα διαφορετικό μόριο και το μέγεθος κάθε κορυφής είναι ανάλογο της ποσότητας της κάθε ουσίας. Έτσι οι ουσίες ταυτοποιούνται βάση ενώσεων αναφοράς και συγκρίνονται κάθε φορά το χρόνο κατακράτησης και τα φάσματα μάζας της κάθε ουσίας.

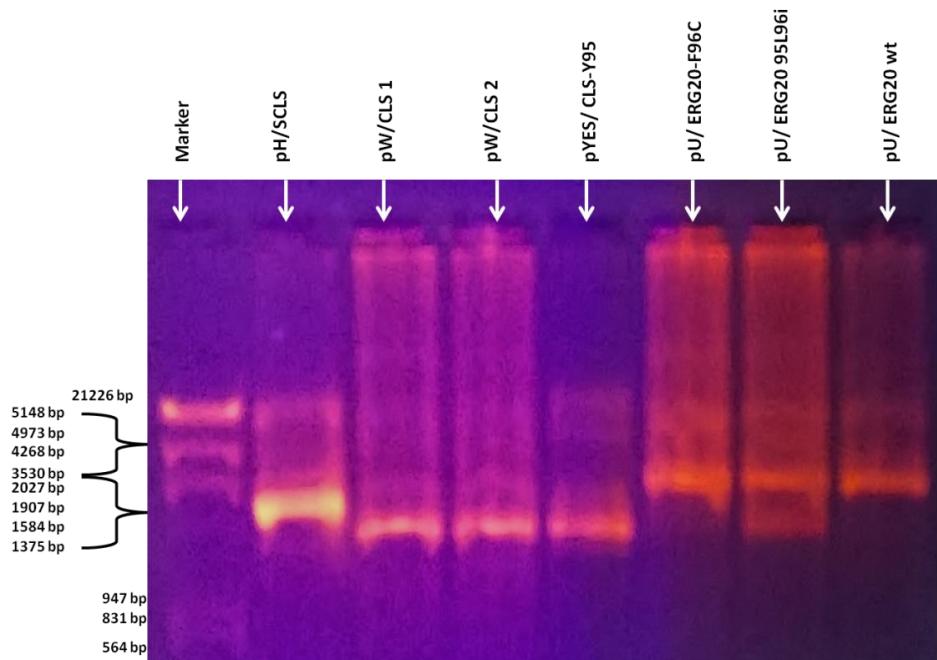
## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

«Για να γίνει κανείς ικανός σ' οποιοδήποτε επάγγελμα τρία πράγματα χρειάζονται: φύση, μελέτη και πρακτική εξάσκηση.»

Αριστοτέλης (384 π.Χ. – 322 π.Χ.)

### 3.1 Δοκιμή μετασχηματισμού διαφορετικών στελεχών ζύμης

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικοί μετασχηματισμοί των στελεχών ζύμης AM94, AM205, AM238, AM240 και AM250 με τους πλασμιδιακούς φορείς της Εικόνας 3, ούτως ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μετασχηματισμού. Έτσι, μετασχηματίστηκαν τα ήδη κλωνοποιημένα γονίδια στα παρακάτω στελέχη ζύμης. (Πίνακας 5).

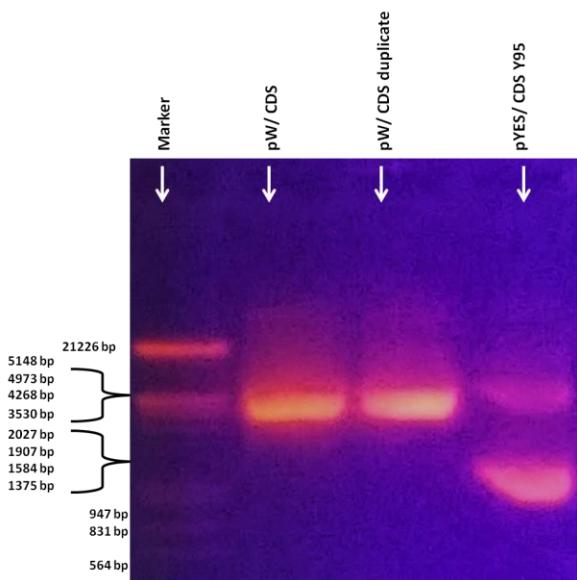


**Εικόνα 3:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :*a)* το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , *β)* το φορέα pH/SCLS, το φορέα pW/CLS (αποικία 1), το φορέα pW/CLS (αποικία 2), το φορέα pYES/CLS-Y95, το φορέα pU/ERG20-F96C, το φορέα pU/ERG20 95L96i και το φορέα pU/ERG20 wt.

**Πίνακας 5:** Παρουσίαση των συνδυασμού των πλασμιδίων με τα οποία μετασχηματίστηκαν τα στελέχη ζύμης *AM94*, *AM205*, *AM238*, *AM240* και *AM250*.

1	pH/ SCLS
2	pH/ SCLS + pW/ CLS
3	pH/ SCLS + pYES/ CLS-Y95
4	pH/ SCLS + pW/ CLS + pU/ ERG20-F96C
5	pH/ SCLS + pW/ CLS + pU/ ERG20 95L96i
6	pH/ SCLS + pW/ CLS + pU/ ERG20 wt

Στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν τα στελέχη ζύμης *AM94* και *AM205* με τα ήδη κλωνοποιημένα πλασμίδια της Εικόνας 4 και με μερικά από τα πλασμίδια της Εικόνας 3 (pH/ SCLS, pU/ ERG20-F96C, pU/ ERG20 95L96i, pU/ ERG20 wt ) σύμφωνα με τον πίνακα 6.



**Εικόνα 4:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά : $\alpha$ ) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ ,  $\beta$ ) το φορέα pW/CDS 1 και 2,  $\gamma$ ) το φορέα pYES/CDS-Y95.

**Πίνακας 6:** Παρουσίαση των συνδυασμού των πλασμιδίων με τα οποία μετασχηματίστηκαν τα στελέχη ζύμης AM94 και AM205.

1	pH/SCLS + pW/CDS
2	pH/SCLS + pYES/ CDS-Y95
3	pH/SCLS + pW/ CDS + pU/ ERG20-F96C
4	pH/SCLS + pW/ CDS + pU/ ERG20 95L96i
5	pH/SCLS + pW/ CDS + pU/ ERG20 wt

Τα μετασχηματισμένα στελέχη ζύμης αφού πέτυχαν αποθηκεύτηκαν τόσο ως αποικίες σε πιάτα στους 4°C όσο και ως στοκ γλυκερόλης υγρής καλλιέργειας για μακροχρόνια αποθήκευση στους -80°C.

### 3.2 Επιλογή μετασχηματισμένων αποικιών ζύμης με τη χρήση γονιδίων από το μονοπάτι των καροτενοειδών

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR μεταλλαξιγένεσης στα πλασμίδια pYES/CDS-Y95 και pYES/CLS-Y95 έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα πλασμίδια pYES/CDS-95L96i, pYES/CDS-95A96TGK και pYES/CLS-95L96i, pYES/CLS-95A96TGK αντίστοιχα. Τα μεταλλαγμένα γονίδια αναμένεται να προωθούν την παραγωγή των καροτενοειδών στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος της ζύμης, κάτι που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των

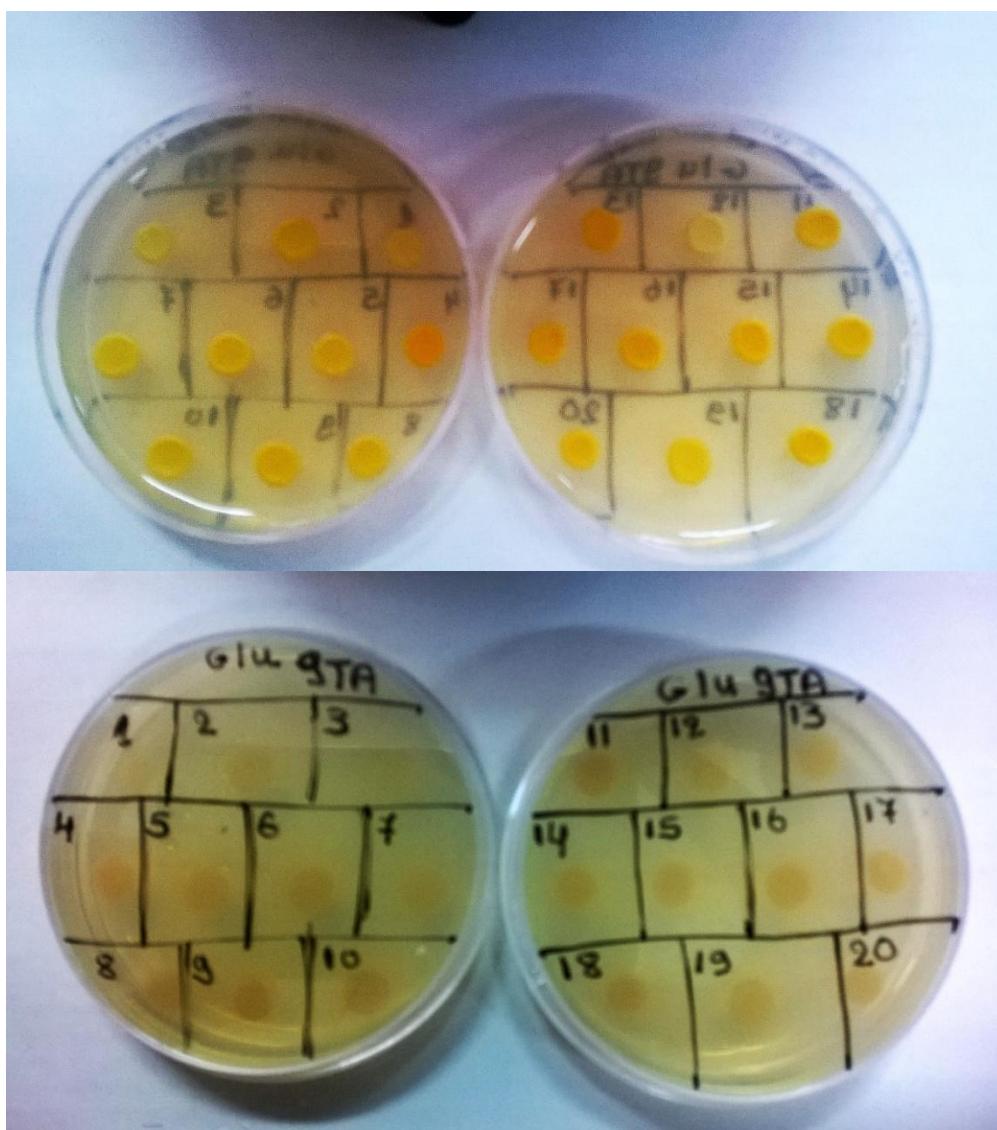
καλύτερων εκ των μεταλλαγμένων αποικιών, για τη περαιτέρω χρήση τους για αύξηση της παραγωγής διτερπενίων. Αυτό κατέστει δυνατό μέσω της ακόλουθης διαδικασίας: Το βασικό στέλεχος ζύμης AM94, το οποίο δεν είναι βελτιστοποιημένο ως προς κάποια συγκεκριμένη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, μετασχηματίστηκε μετά από την κλωνοποίηση των πλασμιδίων crtYB: phytoene synthase/lycopene cyclase και crtI: phytoene desaturase genes από *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν κομμάτι του μονοπατιού βιοσύνθεσης των καροτενοειδών. Με τους μετασχηματισμούς αυτούς στοχεύουμε στην ανίχνευση μεταλλάξεων που προωθούν τη βιοσύνθεση καροτενοειδών και κατ' επέκταση και διτερπενίων. Η χρήση αυτού του είδους screening επιτρέπει την χρωματική αξιολόγηση των αποικιών που παράγουν καροτενοειδή (πορτοκαλί χρώμα) και το διαχωρισμό τους από αυτές που δεν παράγουν (λευκό χρώμα) καθώς επίσης η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της παραγωγής των εκάστοτε αποικιών. Το προϊόν αυτού του μετασχηματισμού (AM94 + pH/crtYB + PYX143/crtI) μετασχηματίστηκε περαιτέρω είτε με κάποιο από τα αρχικά πλασμίδια (pYES/CDS-Y95, pYES/CLS-Y95) είτε με κάποιο από τα μεταλλαγμένα πλασμίδια (pYES/CDS-95L96i, pYES/CDS-95A96TGK και pYES/CLS-95L96i, pYES/CLS-95A96TGK) που προέκυψαν από διαφορετικές αποικίες (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7:** Αναλυτική παρουσίαση των μετασχηματισμών στελεχών σακχαρομύκητα με κωδικό 9TA1-9TA20. Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα δείγματα των αποικιών που παρουσίασαν καλύτερα αποτελέσματα.

Code	Strain	plasmid (s)
9TA1	8TA3(AM94 + pH/crt YB-95 + pYX 143 crtl	pYES/ CDS-Y95
9TA2		pYES/ CDS-95L96i mini1 (FROM PCR 1ST COLONY)
9TA3		pYES/ CDS-95L96i mini2 (FROM PCR 2ND COLONY)
9TA4		pYES/ CDS-95L96i mini3 (FROM PCR 3RD COLONY)
9TA5		pYES/ CDS-95A96TGK mini1 (FROM PCR 1ST COLONY)
9TA6		pYES/ CDS-95A96TGK mini2 (FROM PCR 2ND COLONY)
9TA7		pYES/ CDS-95A96TGK mini3 (FROM PCR 3RD COLONY)
9TA8		pYES/ CDS-95A96TGK mini4 (FROM PCR 4TH COLONY)
9TA9		pYES/ CDS-95A96TGK mini5 (FROM PCR 5TH COLONY)
9TA10		pYES/ CDS-95A96TGK mini6 (FROM PCR 6TH COLONY)
9TA11		pYES/ CDS-95A96TGK mini7 (FROM PCR 7TH COLONY)
9TA12		pYES/ CLS-Y95
9TA13		pYES/ CLS-95L96i mini1 (FROM PCR 1ST COLONY)
9TA14		pYES/ CLS-95L96i mini3 (FROM PCR 3RD COLONY)
9TA15		pYES/ CLS-95A96TGK mini1 (FROM PCR 1ST COLONY)
9TA16		pYES/ CLS-95A96TGK mini2 (FROM PCR 2ND COLONY)
9TA17		pYES/ CLS-95A96TGK mini3 (FROM PCR 3RD COLONY)

9TA18	pYES/ CLS-95A96TGK mini4 (FROM PCR 4TH COLONY)
9TA19	pYES/ CLS-95A96TGK mini5 (FROM PCR 5TH COLONY)
9TA20	pYES/ CLS-95A96TGK mini6 (FROM PCR 6TH COLONY)

Οι αποικίες που προέκυψαν τοποθετήθηκαν σε πιάτα με θρεπτικό μέσο επαγωγής Gal-Raff/U,H,L agar και αφού αναπτύχθηκαν για 3 ημέρες πραγματοποιήθηκε οπτική σύγκριση του χρώματος των τελικών αποικιών. Η παρουσία έντονου πορτοκαλί χρώματος υποδηλώνει τις πιο επιτυχημένες αποικίες ζύμης οι οποίες ήταν οι: 9TA4, 9TA13, 9TA18 και 9TA20 (Εικόνα 5). Από αυτές τις αποικίες επιλέγηκαν οι 9TA4, 9TA13 και 9TA18 για συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας μέσω μετασχηματισμού τους σε άλλα στελέχη σακχαρομύκητα.



**Εικόνα 5:** Πιάτα με σταγόνες 5 μl από τις αποικίες ζύμης με κωδικό 9TA1-9TA20 από τα οποία έγινε η επιλογή των καλύτερων μεταλλαγμένων πλασμιδίων 9TA4, 9TA13, 9TA18 και 9TA20.

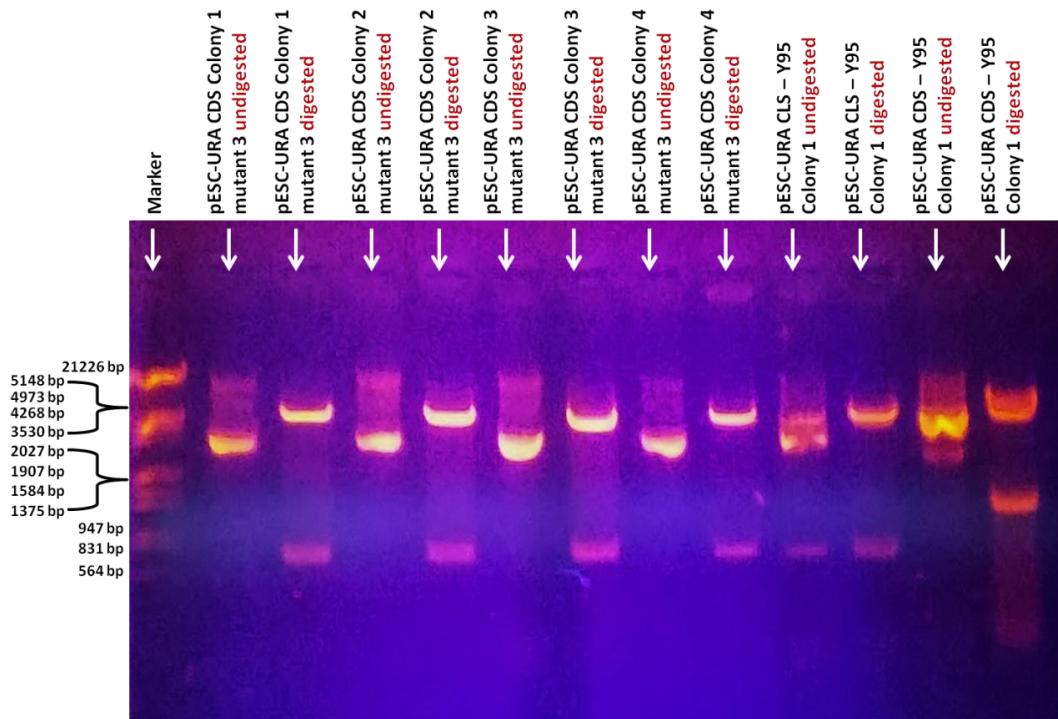
### 3.3 Κατασκευή φορέων έκφρασης

#### 3.3.1 Κατασκευή των κλωνοποιημένων φορέων έκφρασης: pESC-URA/CDS-Y95, pESC-URA/CLS-Y95, pESC-URA/CDS-95L96i, pESC-URA/CLS-95L96i και pESC-URA/CLS-95A96TGK

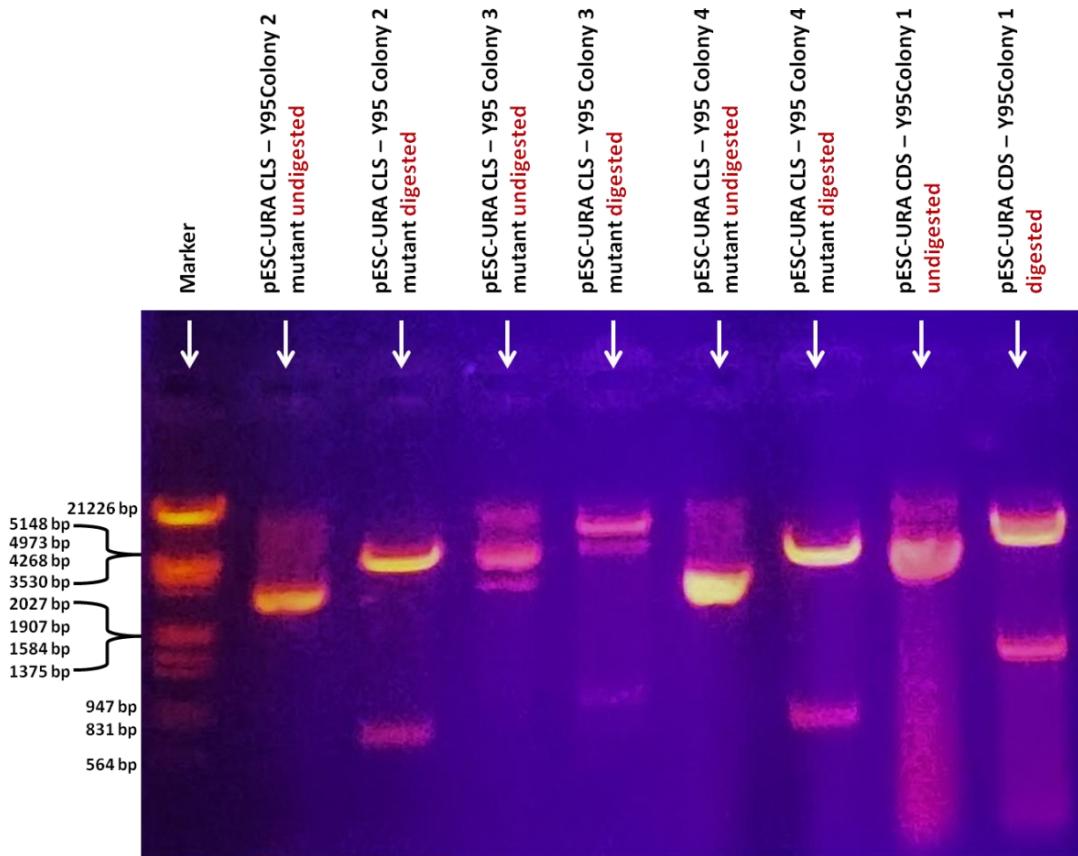
Έγινε κλωνοποίηση των πρώτων γονιδίων (CDS-Y95 και CLS-Y95) καθώς και των καλύτερων μεταλλαγμένων γονίδιων (CDS-95L96i, CLS-95L96i, CLS-95A96TGK) που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.2., τα οποία αποτελούν ένζυμα κατηγορίας: Class II diTPS, *S. fruticosa* copalyldiphosphatesynthase (SfCDS) και *C. creticus* 8-hydroxycopalyl diphosphate synthase (CcCLS) τα οποία παράγουν CPP και 8-OHCPP, αντίστοιχα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να συνδυαστούν με τα ένζυμα κατηγορίας Class I diTPS, p1326 και SCLS, οδηγώντας στην παραγωγή μιλτιραδιένης, οξειδίου της μανόλης, μανόλης και σκλαρεόλης, από το φορέα που μέχρι πρότινος χρησιμοποιούνταν (pYES) στο φορέα pESC-URA. Ο φορέας αυτός διαθέτει τους εκκινητές GAL1 και GAL10 με αντίθετη κατεύθυνση, δίνοντας τη δυνατότητα εισαγωγής δύο γονιδίων ταυτόχρονα, κάτι που θεωρητικά θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή λόγω της εγγύτητας των δύο εμπλεκόμενων γονιδίων.

Αρχικά για την υποκλωνοποίηση των γονιδίων απαιτήθηκε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) από αποικία βακτηρίων *Escherichia coli* που περιείχε το φορέα pESC-URA χωρίς να περιέχει κάποιο κλωνοποιημένο γονίδιο καθώς και το φορέα pYES που περιείχε κάθε φορά ένα από τα παρακάτω γονίδια: CDS-Y95, CLS-Y95, CDS-95L96I Mutant colony 3, CLS-95L96I Mutant colony 1 και CLS-95A96TGK Mutant colony 4. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pESC-URA και των πλασμιδίων pYES/ CDS-Y95, pYES/ CLS-Y95, pYES/ CDS-95L96I Mutant colony 3, pYES/ CLS-95L96I Mutant colony 1 και pYES/ CLS-95A96TGK Mutant colony 4 με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI, για τη δημιουργία των κατάλληλων συμπληρωματικών άκρων. Αφού ολοκληρώθηκε η πέψη των παραπάνω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% έτσι ώστε να απομονωθεί η ζώνη του κάθε γονιδίου και του κομμένου φορέα pESC-URA από το πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA, τόσο του φορέα όσο και των γονιδίων, σύμφωνα με το αναλυτικό πρωτόκολλο καθαρισμού και ακολούθησε αντίδραση λιγάσης του φορέα pESC-URA με το κάθε ένα γονίδιο χωριστά.

Μετά την αντίδραση λιγάσης των παραπάνω καθαρισμένων τμημάτων DNA έγινε ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Eschericia coli* σε θρεπτικό μέσο LB με αμπικιλλίνη για ανάπτυξη αποικιών με επιλογή. Έπειτα πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) από τις μετασχηματισμένες αποικίες *Eschericia coli* και έλεγχος της εισαγωγής του κάθε γονιδίου στο φορέα pESC-URA με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και SalI και αναμενόμενες ζώνες 8306 bp και 1615 bp για το pESC-URA/CDS-Y95 και το μετάλλαγμα του, 8897 bp και 1054 bp για το pESC-URA/CLS-Y95 και τα μεταλλάγματα του, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ενώ ο άδειος φορέας pESC-URA έπειτα από πέψη με τα ίδια ένζυμα παρουσιάζει ζώνες μεγέθους 5855 bp και 776 bp. Ο έλεγχος έγινε σε 8 κλώνους/αποικίες για το φορέα pESC-URA/CDS-Y95 και φαίνεται να είναι σωστός ο κλώνος που προέκυψε από την πρώτη αποικία, σε 4 κλώνους/αποικίες για το φορέα pESC-URA/CLS-Y95 και φαίνεται να είναι σωστός ο κλώνος που προέκυψε από την τρίτη αποικία (Εικόνες 6α και 6β). Επίσης ελέγχητηκαν 10 αποικίες για το φορέα pESC-URA/CDS 95L96i χωρίς να βρεθεί κάποια αποικία με τις σωστές ζώνες (8306 bp και 1615 bp) έπειτα από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI, οπότε δεν προχωρήσαμε στο επόμενο βήμα κλωνοποίησης με αυτό το μετάλλαγμα. Τα πιάτα που προέκυψαν με το φορέα pESC-URA/CLS 95A96TGK και pESC-URA/CLS 95L96i εγκαταλείφθηκαν διότι οι αποικίες που προέκυψαν ήταν σε ποσότητα παρόμοιες με τον άδειο φορέα οπότε αποκλείστηκαν ως μη επιλεγμένες.



**Εικόνα 6α:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CDS 95L961 (αποικίες 1-4, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI με τη σειρά), γ) το φορέα pESC-URA/CLS-Y95 (αποικία 1, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI), δ) τη σωστή εκ των οκτώ αποικιών (αποικία 1) pESC-URA/CDS-Y95 ως θετικό control.



**Εικόνα 6β:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CLS-Y95 (αποικίες 2-4, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI με τη σειρά), γ) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95 (αποικία 1, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI).

### 3.3.2 Κατασκευή των κλωνοποιημένων φορέων έκφρασης: *pESC-URA/CDS-Y95-SCLS*, *pESC-URA/CDS-Y95-p1326*, *pESC-URA/CLS-Y95-SCLS* και *pESC-URA/CLS-Y95-p1326*

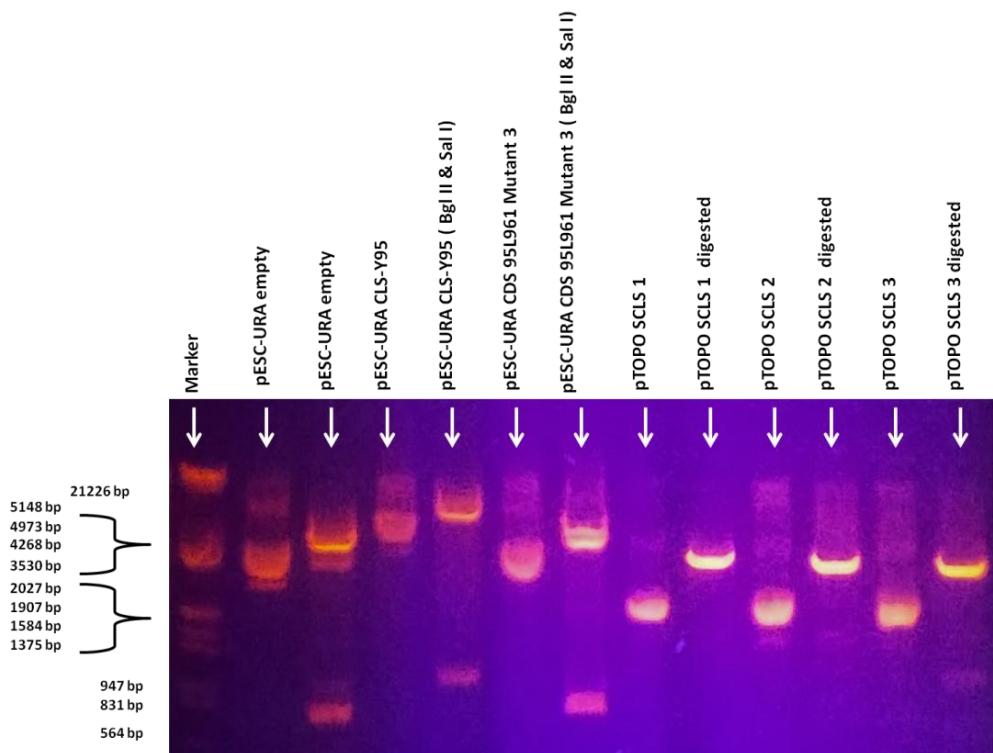
Πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των επόμενων γονιδίων SCLS και p1326 που οδηγούν στην παραγωγή μανόλης, οξειδίου της μανόλης, σκλαρεόλης και μιλτιραδιένης από το φορέα που μέχρι πρότινος χρησιμοποιούνταν (pHTDH) στους ήδη κλωνοποιημένους φορείς pESC-URA/CDS-Y95 και pESC-URA/CLS-Y95 που κατασκευάστηκαν προηγουμένως.

Αρχικά για την κλωνοποίηση των γονιδίων SCLS και p1326 απαιτήθηκε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) από αποικία βακτηρίων *E. coli* που περιείχε το φορέα pH με ένα από τα γονίδια SCLS ή p1326 ήδη κλωνοποιημένο. Έπειτα,

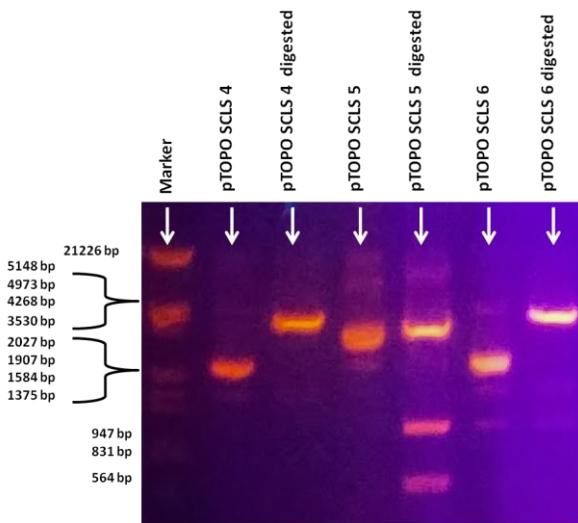
πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που περιέχουν τα γονίδια με τη χρήση του ενζύμου Phusion Polymerase που δημιουργεί τυφλά άκρα οπότε στη συνέχεια απαιτήθηκε η χρήση blunt-end PCR για τη δημιουργία A overhangs έτσι ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση τους στο φορέα pTOPO (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8:** Παρουσίαση της αλληλουχίας και της  $Tm$  των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση PCR.

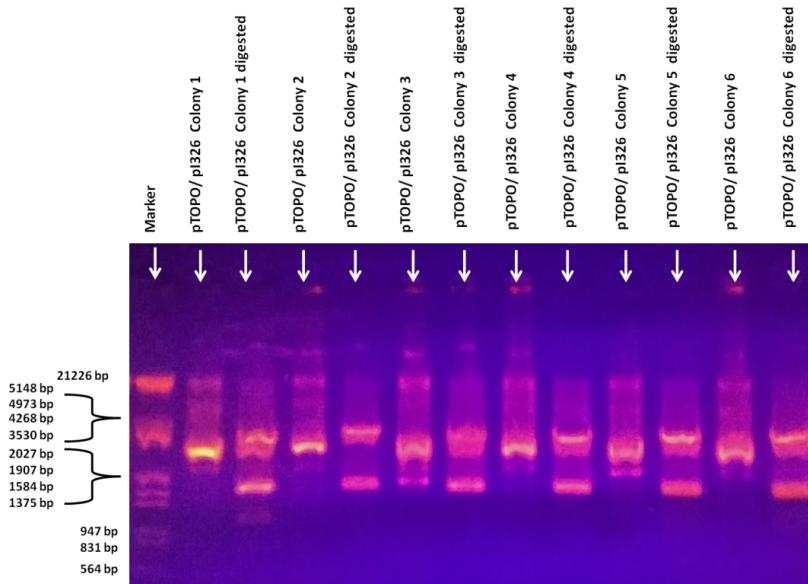
Primers
P1236NOT-5 : gcggccgcatgagaaggagagagaatttcca 32mer Tm=54.7
P1326BGL-3 : agatctctatttccaacgggctataa 28mer Tm=55.3
SCLSmat-NOT-5 : gcggccgcatgagagttggagcaggaaag 30mer Tm=55.0
SCLS-BGL-3 : agatctcaaaagacaaaggattcatatctc 33mer Tm=57.4



**Εικόνα 7α:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA empty (πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI), το φορέα pESC-URA/CLS-Y95 (πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI), γ) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95 95L96i (πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI), δ) το φορέα pTOPO/SCLS (αποικίες 1-3, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI με τη σειρά.



**Εικόνα 7β:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα λ/EcoRI/HindIII, β) το φορέα pTOPO/SCLS (αποικίες 4-6, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI με τη σειρά.

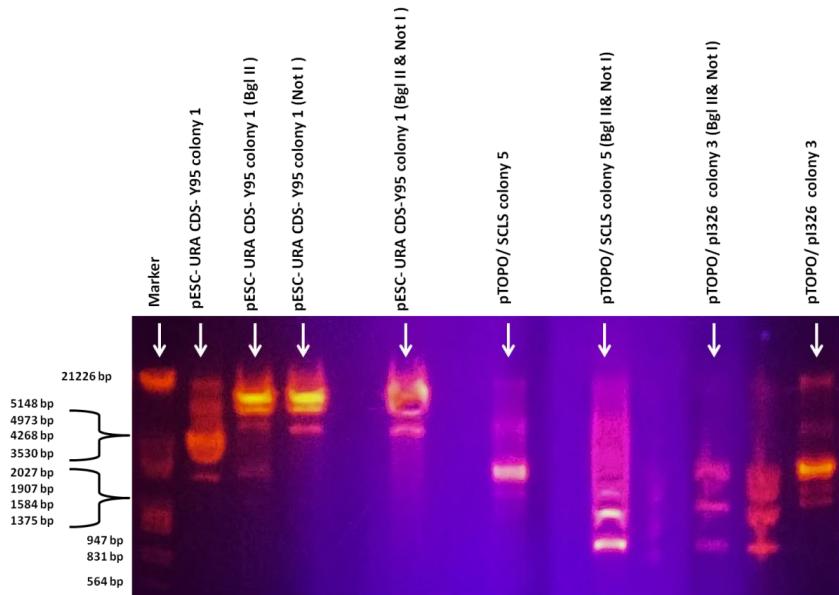


**Εικόνα 7γ:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα λ/EcoRI/HindIII, β) το φορέα pTOPO/p1326 (αποικίες 1-6, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με τα ένζυμα BglII και SalI με τη σειρά.

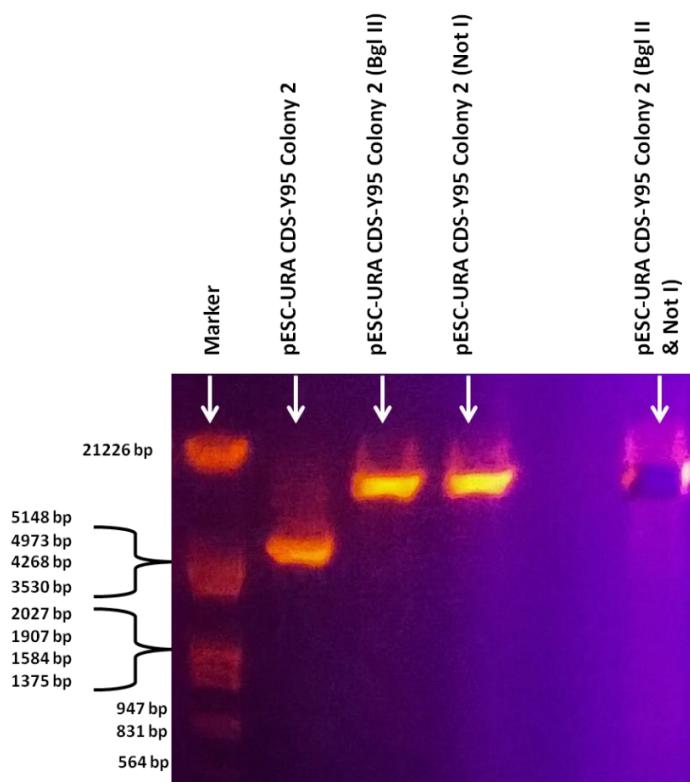
Ακολούθησε η κλωνοποίηση του φορέα pTOPO κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και ο βακτηριακός μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιβιοτικού καναμυκίνη. Για την επιλογή του κατάλληλου κλώνου pTOPO/SCLS πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και SalI και φαίνεται να είναι σωστός ο κλώνος 5

(Εικόνα 7α και 7β). Για την επιλογή του κατάλληλου κλώνου pTOPO/p1326 πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και Sall και φαίνεται να είναι σωστοί οι κλώνοι 1-6 και επιλέγετε με βάση την καλύτερη ποσότητα ο κλώνος 3 (Εικόνα 7γ).

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε πέψη των κλωνοποιημένων φορέων pESC-URA/CDS-Y95, pESC-URA/CLS-Y95 και των πλασμιδίων pTOPO/SCLS και pTOPO/p1326 με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και NotI. Αφού ολοκληρώθηκε η πέψη των παραπάνω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% έτσι ώστε να απομονωθεί η ζώνη του κάθε γονιδίου και του κομμένου φορέα pESC-URA (χρησιμοποιήθηκε η αποικία 2) από το πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 8α και 8β). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA, τόσο του φορέα όσο και των γονιδίων, σύμφωνα με το αναλυτικό πρωτόκολλο καθαρισμού και ακολούθησε αντίδραση λιγάσης των φορέων pESC-URA/CDS-Y95 ή pESC-URA/CLS-Y95 με το κάθε ένα γονίδιο (pTOPO/SCLS ή pTOPO/p1326) χωριστά. Ο συνδυασμός των παραπάνω γονιδίων αναμένεται να παράγει τα ακόλουθα προϊόντα σύμφωνα με τη ποια γονίδια είναι κλωνοποιημένα κάθε φορά στο φορέα pESC-URA (Πίνακας 10).



**Εικόνα 8α:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95 (αποικία 1, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το ένζυμο BglII ή NotI μόνο και στη συνέχεια σε συνδυασμό και των δύο περιοριστικών ενζυμών BglII και NotI, γ) τον επιλεγμένο κλώνο (5) του φορέα pTOPO/SCLS (χωρίς πέψη και έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και NotI), δ) τον επιλεγμένο κλώνο (3) του φορέα pTOPO/p1326 (χωρίς πέψη και έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και NotI).



**Εικόνα 8β:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95 (αποικία 2, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το ένζυμο BglII ή NotI μόνο και τέλος σε συνδυασμό και των δύο περιοριστικών ενζύμων BglII και NotI).

**Πίνακας 10:** Παρουσίαση των αναμενόμενων παραγόμενων προϊόντων σε κάθε περίπτωση.

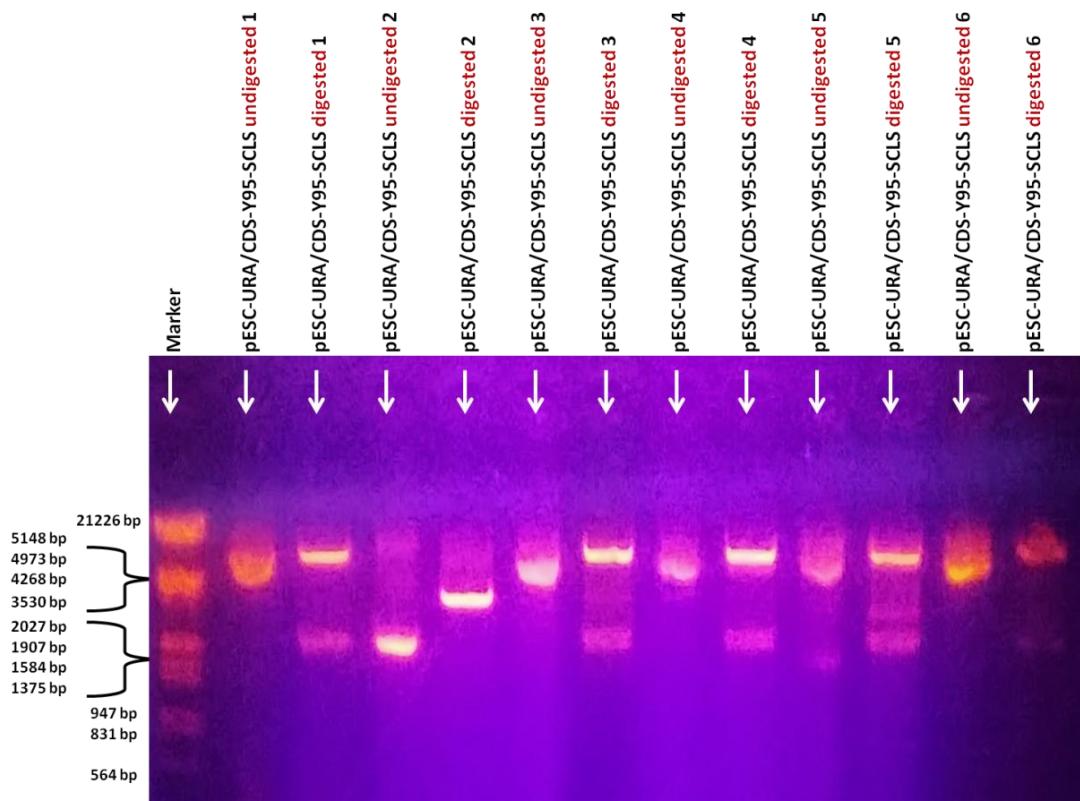
Κλωνοποιημένα Γονίδια	Παραγόμενο προϊόν
CDS-Y95 + SCLS	Manool
CDS-Y95 + p1326	Miltiradiene
CLS-Y95 + SCLS	Sclareol
CLS-Y95 + p1326	Manoyl oxide

### 3.3.2.1 Επιλογή σωστού κλάνου για τον κλωνοποιημένο φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS

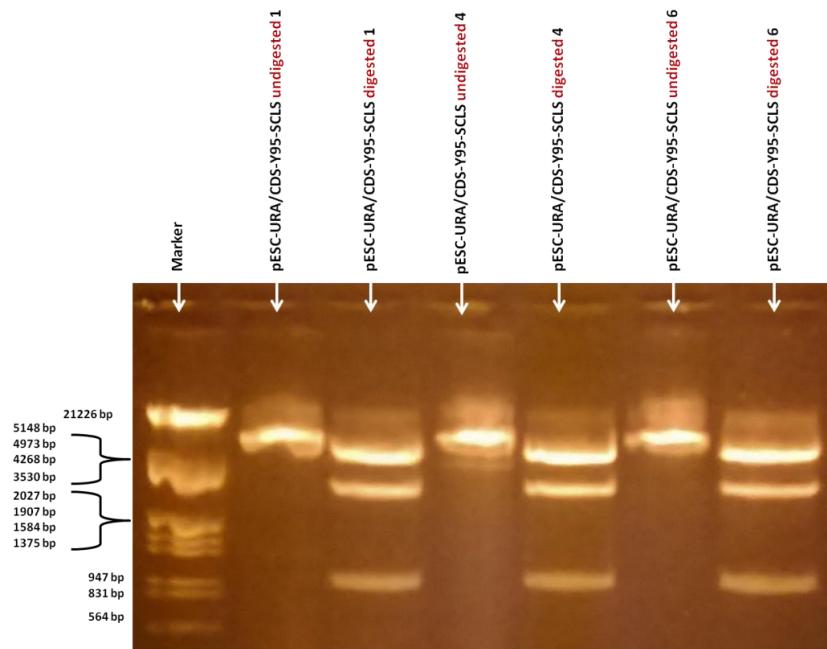
Για την εξακρίβωση της εισαγωγής και των δύο γονιδίων (CDS-Y95 και SCLS) στο φορέα pESC-URA αρχικά πραγματοποίθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και αναμενόμενες ζώνες 8700 bp, 2211 bp και 656 bp σε 6 αποικίες. Οι κλώνοι 1, 3, 4 και 6 του φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS είναι πιθανόν σωστοί (Εικόνα 9α).

Οι πιθανόν σωστοί κλώνοι 1, 4 και 6 του φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS

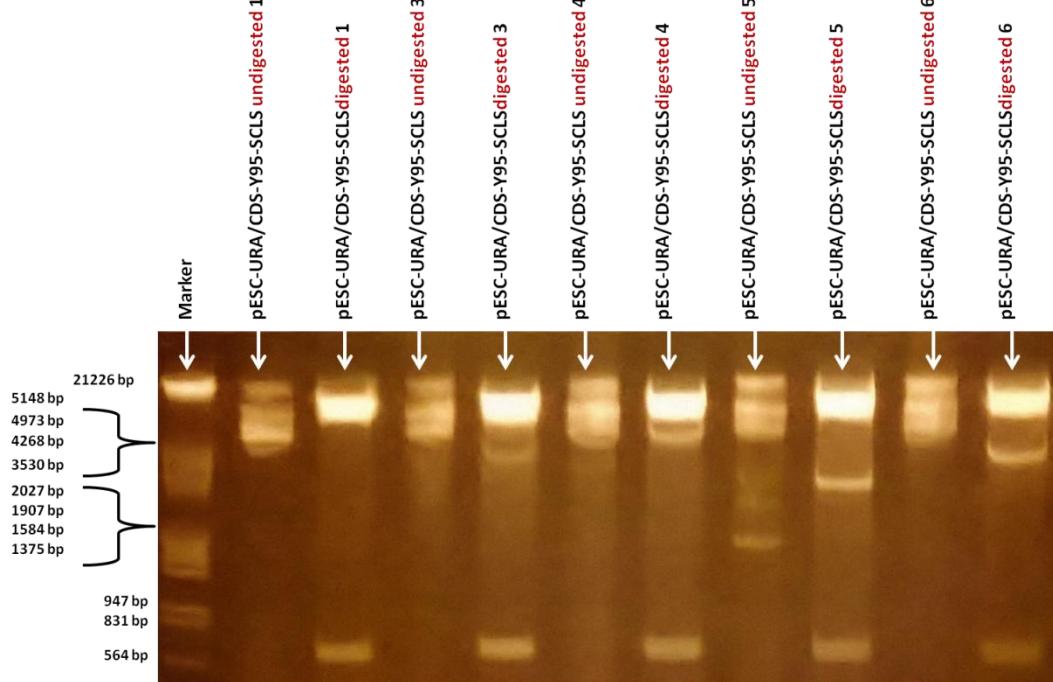
επανελέγχθηκαν με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Xba*I και αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 6816 bp, 3075 bp και 1676 bp (Εικόνα 9β) και στη συνέχεια οι κλώνοι 1, 3, 4 και 6 του φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS μαζί με το λανθασμένο κλώνο 5 ως αρνητικό μάρτυρα, ελέγχθηκαν για τρίτη φορά με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III και αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 6240 bp, 4669 bp και 658 bp. Όπως αποδείχθηκε σωστοί ήταν οι κλώνοι 1 και 3 (Εικόνα 9γ).



**Εικόνα 9α:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα *λ/EcoRI/Hind*III, β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS (αποκίες 1-6, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI στη σειρά).



**Εικόνα 9β:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS (αποκίες 1, 4 και 6 πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Xho στη σειρά).



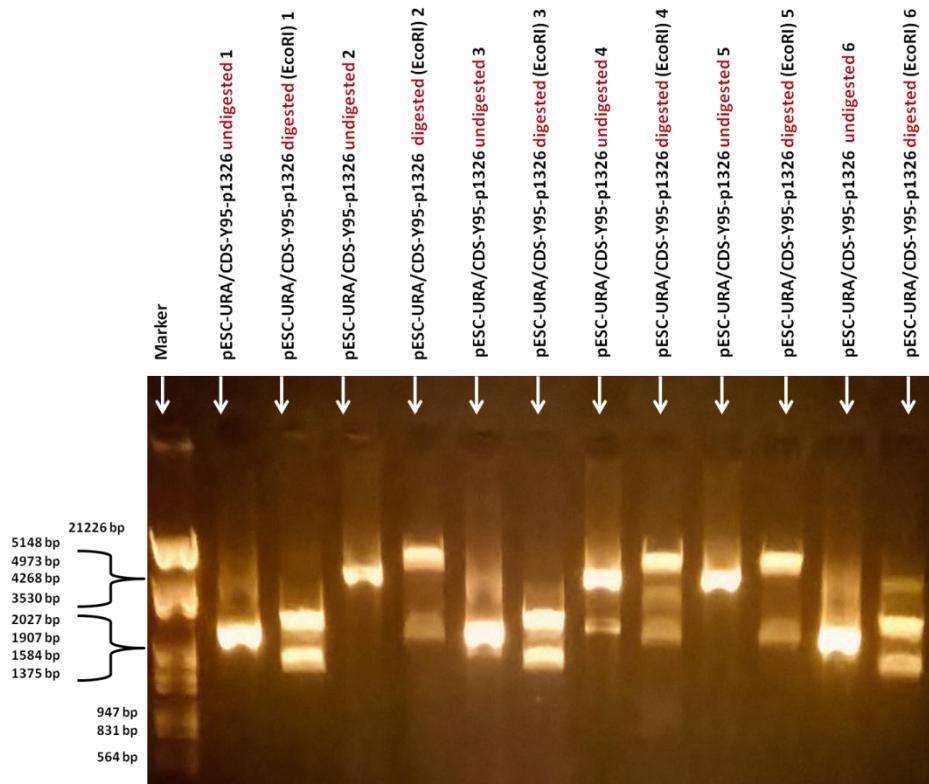
**Εικόνα 9γ:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA CDS-Y95-SCLS (αποκίες 1,3, 4, 5 και 6 πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII, στη σειρά).

### 3.3.2.2 Επιλογή σωστού κλώνου για τον κλωνοποιημένο φορέα pESC-URA/CDS-Y95-p1326

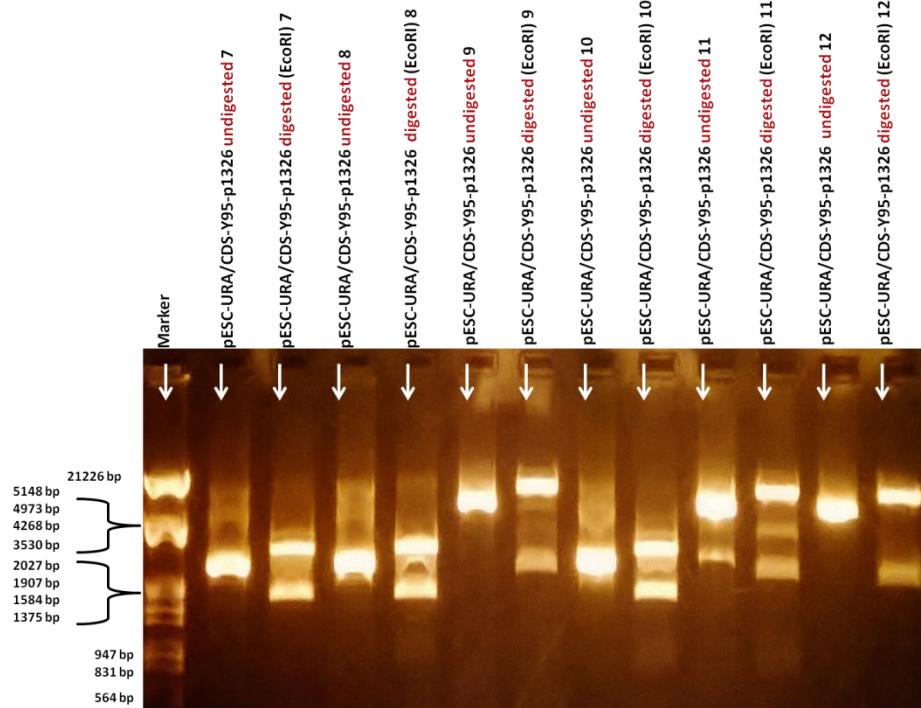
Για την εξακρίβωση της εισαγωγής και των δύο γονιδίων (CDS-Y95 και p1326) στο φορέα pESC-URA πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και αναμενόμενες ζώνες 7715 bp 2211 bp και 1664 bp, με το περιοριστικό ένζυμο SalII και αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 8645 bp, 1820 bp και 1125 bp, όσο και με το περιοριστικό ένζυμο MfeI και αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 4473 bp, 4067 bp, 2765 bp και 285 bp.

Εν συνεχεία, και αφού δεν είχαμε καταφέρει να εντοπίσουμε κάποιο σωστό κλώνο, πραγματοποιήθηκε επανάληψη της αντίδρασης λιγάσης και του βακτηριακού μετασχηματισμού, επιλέχτηκαν εκ νέου αποικίες pESC-URA/CDS-Y95-p1326 και πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα χωρίς όμως θετικό αποτέλεσμα.

Αφού επαναλήφθηκε για άλλη μία φορά η αντίδραση λιγάσης και ο βακτηριακός μετασχηματισμός, επιλέχτηκαν 12 αποικίες pESC-URA/CDS-Y95-p1326 (1-12), στις οποίες πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 7715 bp 2211 bp και 1664 bp .Φαίνονται σωστοί οι κλώνοι 4 και 11 (Εικόνες 10α και 10β).

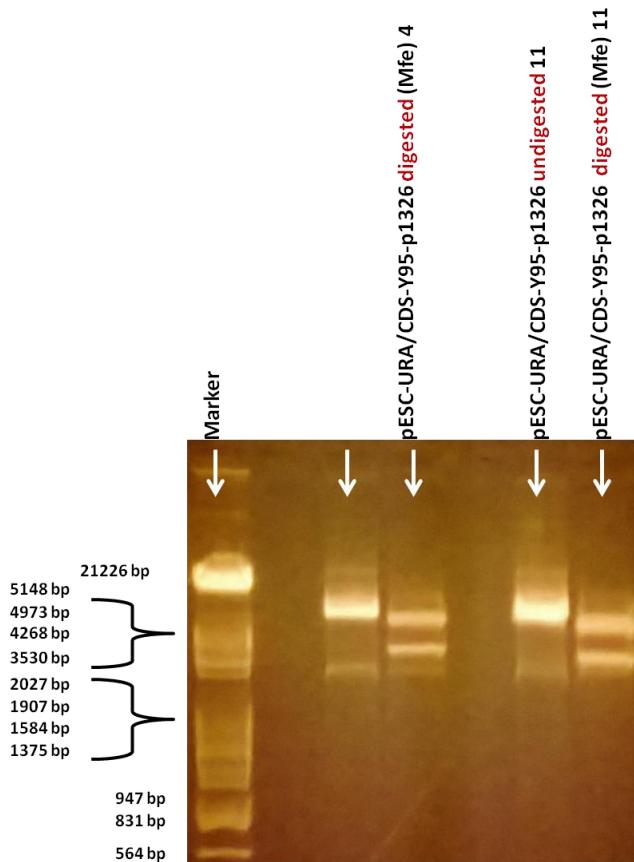


**Εικόνα 10α:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα λ/EcoRI/HindIII, β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95-p1326 (αποικίες 1-6 στη σειρά, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI).



**Εικόνα 10β :** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα λ/EcoRI/HindIII, β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95-p1326 (αποικίες 7-12 στη σειρά, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI).

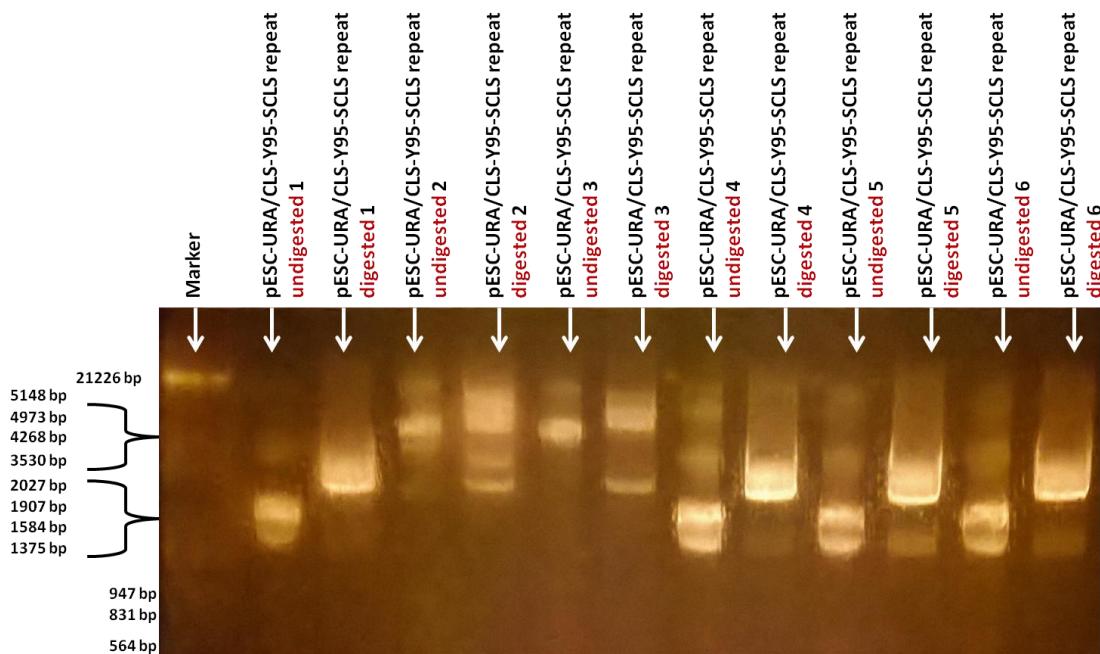
Οι παραπάνω κλώνοι pESC-URA/CDS-Y95-p1326 επιβεβαιώθηκαν έπειτα από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MfeI και αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 4473 bp, 4067 bp, 2765 bp, 285 bp (Εικόνα 11).



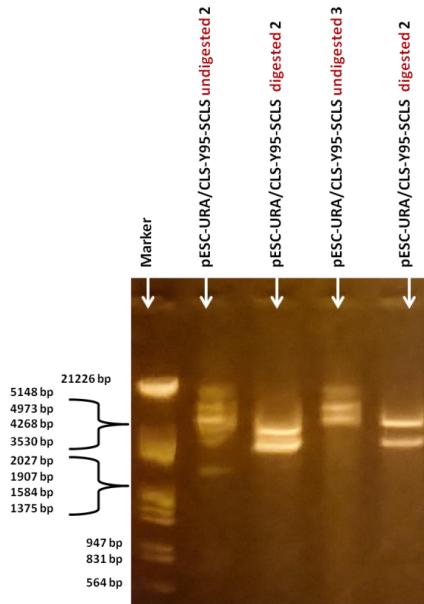
**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :a) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CDS-Y95-p1326 (αποικίες 4 και 11 στη σειρά, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MfeI).

### 3.3.2.3 Επιλογή σωστού κλώνου για τον κλωνοποιημένο φορέα *pESC-URA/CLS-Y95-SCLS*

Για την εξακρίβωση της εισαγωγής και των δύο γονιδίων (CLS-Y95 και SCLS) στο φορέα pESC-URA αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI σε 6 αποικίες και αναμενόμενες ζώνες 7941 bp, 3000 bp και 656 bp. Κανένας κλώνος δεν ήταν σωστός. Στη συνέχεια, λοιπόν, πραγματοποιήθηκε εκ νέου πέψη 6 αποικιών pESC-URA/CLS-Y95-SCLS με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Τη δεύτερη φορά είναι πιθανόν σωστοί οι κλώνοι 2 και 3 έπειτα από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI (Εικόνα 12α).



**Εικόνα 12α:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CLS-Y95-SCLS (αποικίες 1-6 στη σειρά, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI).



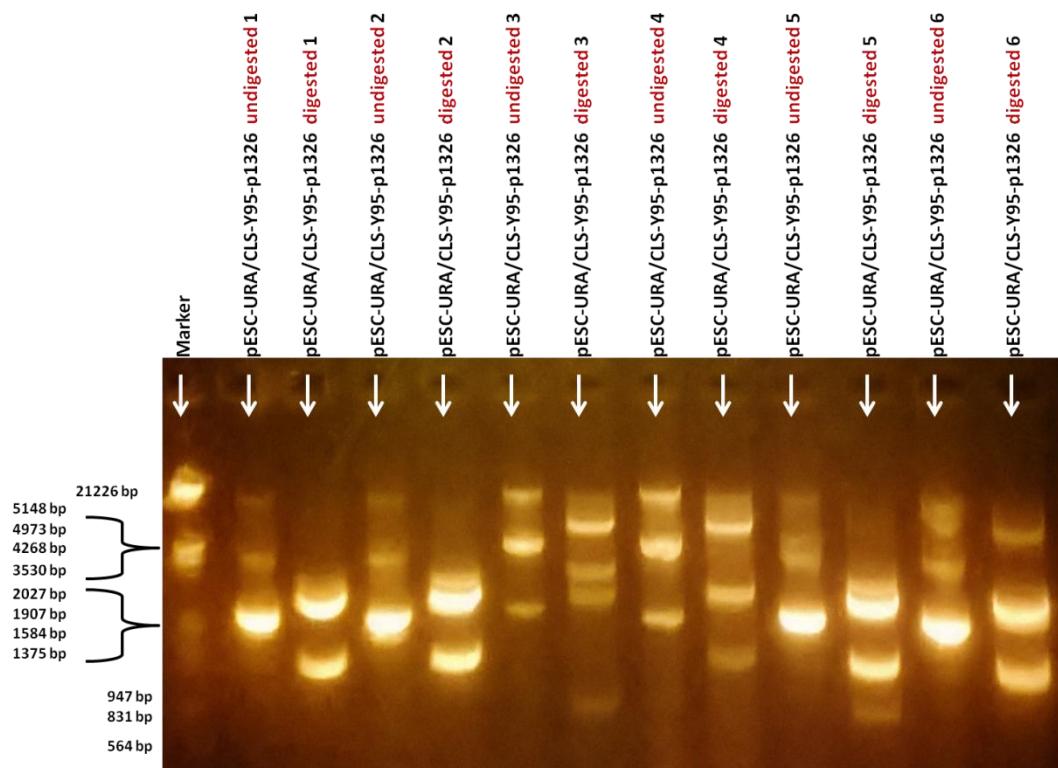
**Εικόνα 12β:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CLS-Y95-SCLS (αποικίες 2 και 3 στη σειρά, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο XhoI).

Οι αποικίες 2 και 3 επανελέγχθηκαν με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο XhoI και

αναμενόμενες ζώνες μετά την πέψη μεγέθους: 6816 bp και 4781 bp, και επιβεβαιώθηκαν ως σωστές (Εικόνα 12β).

### 3.3.2.4 Επιλογή σωστού κλώνου για τον κλωνοποιημένο φορέα *pESC-URA/CLS-Y95-p1326*

Για την εξακρίβωση της εισαγωγής και των δύο γονιδίων (CLS-Y95 και p1326) στο φορέα pESC-URA αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη 6 κλώνων με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και αναμενόμενες ζώνες 6956 bp 3000 bp και 1664 bp. Οι κλώνοι 4 και 6 είναι εμφανώς σωστοί (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :a) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) το φορέα pESC-URA/CLS-Y95-p1326 (αποικίες 1-6 στη σειρά, πρώτα χωρίς πέψη και στη συνέχεια μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI).

### 3.4 Ελεγχος έκφρασης των παραγόμενων προϊόντων από το φορέα *pESC-URA* σε σύγκριση με τους προηγούμενα χρησιμοποιούμενους φορείς *pYES* και *pHTDH*

Για να μπορέσει να καταστεί η σύγκριση της χρήσης των διαφορετικών φορέων ικανή

έπρεπε μετά τη κατασκευή των νέων κλωνοποιημένων φορέων να ακολουθήσει μετασχηματισμός τόσο των παλαιά χρησιμοποιούμενων (pYES/CDS-Y95, pYES/CDS-Y95 + pH/P1326, pYES/CDS-Y95 + pH/ SCLS, pYES/CLS-Y95, pYES/CLS-Y95 + pH/P1326, pYES/CLS-Y95 + pH/ SCLS) όσο και των νέων φορέων έκφρασης σε στελέχη σακχαρομύκητα (φορέας pESC-URA). Ακολουθεί ο Πίνακας 12 με τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τους πλασμιδιακούς φορείς με τους οποίους μετασχηματίστηκε το κάθε στέλεχος.

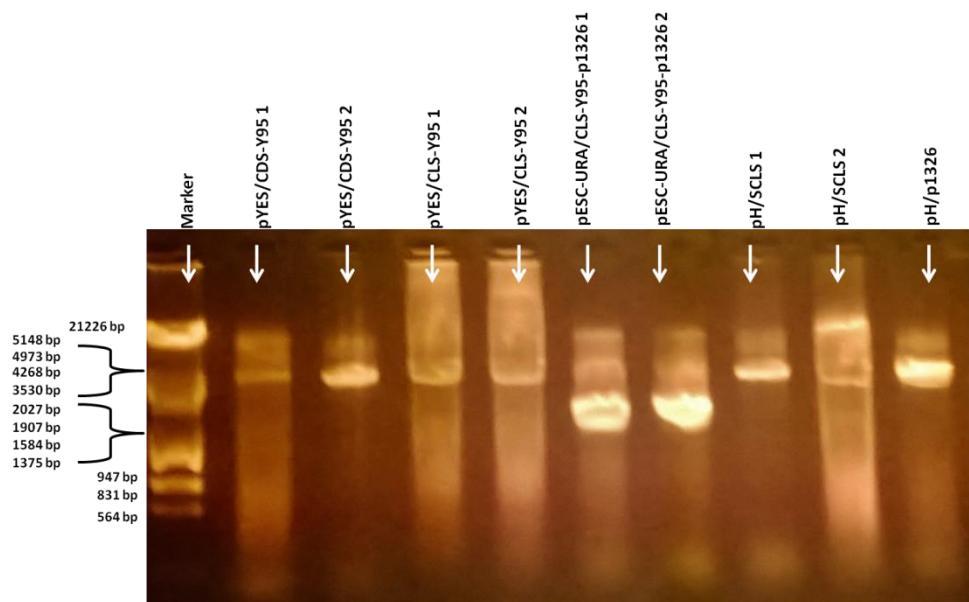
**Πίνακας 12:** Παρουσίαση των στελέχων ζύμης και των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό τους.

Πλασμιδιακοί φορείς	Στέλεχος AM94	Στέλεχος AM240	Στέλεχος AM250
pYES/CDS-Y95	√	√	
pYES/CDS-Y95 + pH/P1326	√	√	
pYES/CDS-Y95 + pH/ SCLS	√	√	
pYES/CLS-Y95	√		√
pYES/CLS-Y95 + pH/P1326	√		√
pYES/CLS-Y95 + pH/ SCLS	√		√
pESC-URA	√	√	√
pESC-URA/CDS-Y95	√	√	
pESC-URA/CDS(Y95)-P1326	√	√	
pESC-URA/CDS(Y95)-SCLS	√	√	
pESC-URA/CLS-Y95	√		√
pESC-URA/CLS(Y95)-P1326	√		√
pESC-URA/CLS(Y95)-SCLS	√		√

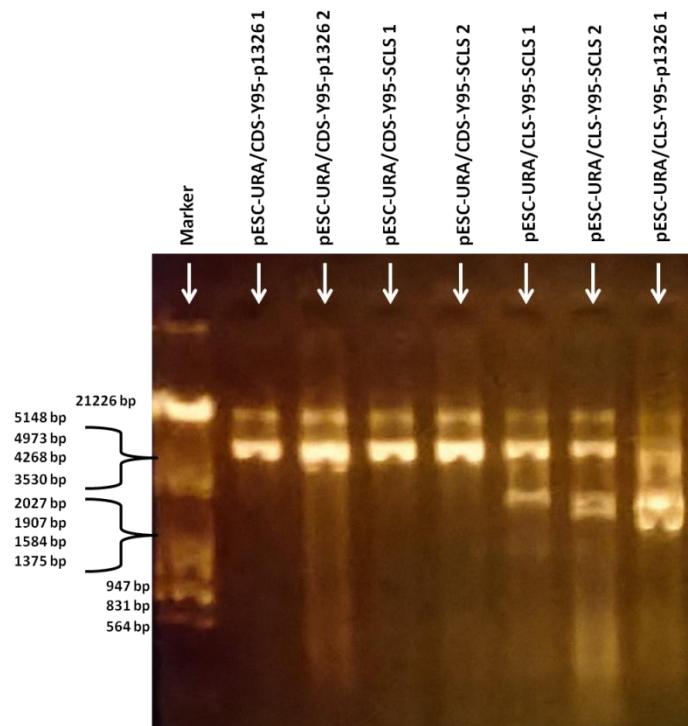
Το στέλεχος AM94 επιλέγει λόγω του ότι αποτελεί ένα βασικό στέλεχος του εργαστηρίου το οποίο ναι μεν είναι βελτιστοποιημένο για παραγωγή διτερπενίων (περιέχει ένα αντίγραφο του γονίδιου Erg9p σε υπολειπόμενη κατάσταση διατηρώντας την παραγωγή στερολών σε χαμηλά επίπεδα, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει στη ζύμη να παράξει αρκετή στερόλη για την επιβίωση της) αλλά παραμένει ανεπηρέαστο ως προς το ποια κατεύθυνση θα ακολουθηθεί στη πορεία παραγωγής των διτερπενίων, δίνοντας μας τη δυνατότητα αποτελεσματικότερης σύγκρισης. Τα στελέχη AM240 και AM250 είναι αντίστοιχα γενετικά τροποποιημένα έτσι ώστε το πρώτο να δίνει καλύτερα αποτελέσματα για χρήση διτερπενίων που προκύπτουν από το γονίδιο CDS-Y95 (περιέχει το γονίδιο ERG20 F96C::erg20), ενώ το δεύτερο δίνει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή διτερπενίων που προκύπτουν από το

γονίδιο CLS-Y95 (περιέχει το γονίδιο CLS-ERG2- (F96C)::Ty1A.

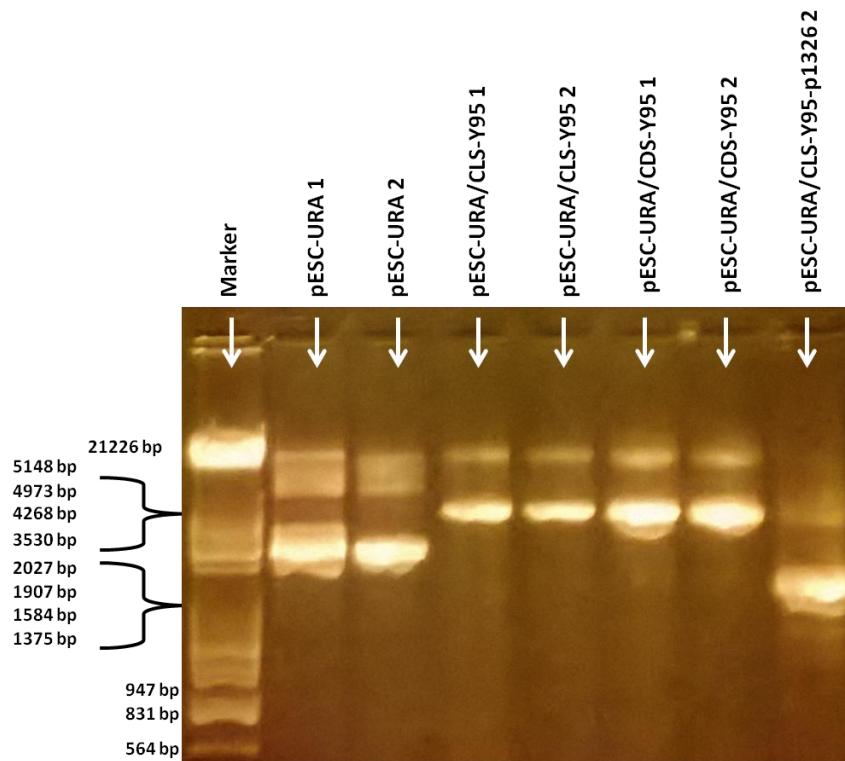
Αφού επετεύχθησαν οι παραπάνω μετασχηματισμοί σε δύο επαναλήψεις σύμφωνα με τα πλασμίδια που φαίνονται στις Εικόνες 14, 15 και 16, επιλέγηκαν οι καλύτερα αναπτυγμένες αποικίες ζύμης που προέκυψαν και τοποθετήθηκαν για παραγωγή των αντίστοιχων ουσιών και εκχύλιση τους με τη βοήθεια δωδεκανίου.



**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :α) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) τα πλασμίδια pYES/CDS-Y95 1, pYES/CDS-Y95 2, pYES/CLS-Y95 1, pYES/CLS-Y95 2, pESC-URA/CLS-Y95-p1326 1, pESC-URA/CLS-Y95-p1326 2, pH/SCLS 1, pH/SCLS 2 και pH/p1326.



**Εικόνα 15:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :a) το μάρτυρα λ/EcoRI/HindIII, β) τα πλασμίδια pESC-URA/CDS-Y95-p1326 1, pESC-URA/CDS-Y95-p1326 2, pESC-URA/CDS-Y95-SCLS 1, pESC-URA/CDS-Y95-SCLS 2, pESC-URA/CLS-Y95-SCLS 1, pESC-URA/CLS-Y95-SCLS 2 και pESC-URA/CLS-Y95-p1326 1.



**Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% των δειγμάτων που αφορούν από αριστερά :a) το μάρτυρα  $\lambda/EcoRI/HindIII$ , β) τα πλασμίδια pESC-URA 1, pESC-URA 2, pESC-URA/CLS-Y95 1, pESC-URA/CLS-Y95 2, pESC-URA/CDS-Y95 1, pESC-URA/CDS-Y95 2 και pESC-URA/CLS-Y95-p1326 2.

### 3.5 Αποτελέσματα GC-MS

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν μετά από 3 ημέρες ανάπτυξης της ζύμης (έως κορεσμού) μετρήθηκαν σε GS-MS, μετά από εκχύλιση των τερπενίων με χρήση δωδεκάνιου. Ο μετασχηματισμός των γονιδίων στον φορέα έκφρασης pESC-URA, συγκεκριμένα στους μετασχηματισμούς pESC-URA/CDS(Y95)-P1326, pESC-URA/CDS(Y95)-SCLS και pESC-URA/CLS(Y95)-P1326, φαίνεται να είναι ενεργός (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13:** Παρουσίαση των παραγόμενων διτερπενίων από τα διαφορετικά στελέχη ζύμης AM94, AM240 και AM250 έπειτα από διαφορετικούς μετασχηματισμούς, όπως προκύπτουν από μέτρηση σε GC-MS.

Πλασμιδιακοί φορείς	Στέλεχος AM94	Στέλεχος AM240	Στέλεχος AM250
pYES/CDS-Y95	-	-	
pYES/CDS-Y95 + pH/P1326	-	15 mg/L miltiradiene	
pYES/CDS-Y95 + pH/ SCLS	23 mg/L manool	-	
pYES/CLS-Y95	-		-
pYES/CLS-Y95 + pH/P1326	-		15 mg/L manoyl oxide
pYES/CLS-Y95 + pH/ SCLS	-		-
pESC-URA	-	-	-
pESC-URA/CDS-Y95	-	-	
pESC-URA/CDS(Y95)-P1326	12 mg/L miltiradiene	-	
pESC-URA/CDS(Y95)-SCLS	-	32 mg/L manool	
pESC-URA/CLS-Y95	-		-
pESC-URA/CLS(Y95)-P1326	10 mg/L manoyl oxide		-
pESC-URA/CLS(Y95)-SCLS	-		-

Ωστόσο παρουσιάστηκε πρόβλημα με τη χρήση των φορέων pYES και pHTDH που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν (πλασμίδια μάρτυρες). Ακόμη και οι μετασχηματισμοί που παρουσίασαν κάποια ενεργότητα δεν ξεπερνάνε τις μέγιστες αναφερόμενες τιμές που έχουν επιτευχθεί στο παρελθόν στο εργαστήριο ( Πίνακας14).

Τερπένιο	Συγκέντρωση (mg/L)	Βιβλιογραφική αναφορά
Σκλαρεόλη	403	(Ignea et al., 2015c)
Μανόλη	96	(Ignea et al., 2015a)

<b>Οξείδιο της μανόλης</b>	36	(Ignea et al., 2015a)
<b>Μιλτιραδιένη</b>	26	(Ignea et al., 2015a)

Δεν ήταν λοιπόν δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων, καθώς κάθε μετασχηματισμός συγκρίνεται με τον αντιστοιχό του στον φορέα pESC-URA ώστε να προκύψει ο βέλτιστος φορέας κλωνοποίησης. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να επαναληφθεί η όλη διαδικασία μελλοντικά προκειμένου να γίνει αποτελεσματικότερη σύγκριση της χρήσης των παραπάνω διαφορετικών συστημάτων φορέων.

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

«Όπου το τηλεσκόπιο σταματάει να  
μας βοηθάει, εκεί αρχίζει το μικροσκόπιο.  
Ποιο απ' τα δύο έχει μεγαλύτερη θέα;»

Βίκτωρ Ουγκώ

Η σημασία της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου πειραματικού πλαισίου με τελικό στόχο την εύρεση μεθόδων αύξησης της παραγωγής τερπενοειδών ενώσεων στο σακχαρομύκητα. Αυτό αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο της εκχύλισης ουσιών από φυτικούς ιστούς και ένα μελλοντικό τρόπο για την παραγωγή τους με οικονομικούς όρους, για εμπορικούς σκοπούς. Η παραγωγή ουσιών από τη ζύμη προσφέρει το πλεονέκτημα της απλούστερης ρύθμισης των γονιδίων σε σχέση με τα φυτά και τη μαζική παραγωγή ουσιών κάτω από απόλυτα καθορισμένες συνθήκες.

Ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, σαν ευκαρυωτικός οργανισμός, έχει εξελίξει ένα μεταγραφικό και μεταφραστικό μηχανισμό ο οποίος μοιράζεται πολλά κοινά σημεία με τους αντίστοιχους μηχανισμούς των φυτών. Το γεγονός αυτό ανάγει τον σακχαρομύκητα σε έναν ιδεώδη οργανισμό για την έκφραση φυτικών γονιδίων που οδηγούν στη βιοσύνθεση φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών. Ο σακχαρομύκητας έχει ορισμένα πλεονεκτήματα

έναντι των σήμερα χρησιμοποιούμενων βακτηριακών συστημάτων για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων που προέρχονται από φυτά, ζώα και μύκητες. Στα κύτταρα ζύμης μπορεί να εκτελεστούν "ευκαρυωτικές" μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μπορεί να είναι απαραίτητες για την δραστικότητα, όπως γλυκοζυλίωση, ακυλίωση λιπαρών και πρωτεολυτική επεξεργασία. Αυτή η υπόθεση βέβαια ποτέ δεν επιβεβαιώθηκε μιας και σε πολλές περιπτώσεις η παραγωγή αυτών των ουσιών σε βακτήρια φαίνεται να είναι περισσότερο αποδοτική (Martin and Scheinbach, 1989, Τραντάς, 2009).

Τα τερπενοειδή των φυτών αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών με πληθώρα εφαρμογών σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς. Η εκχύλιση αυτών των ενώσεων από τις φυσικές πηγές τους έχει μεγάλο κόστος και είναι μη φιλική ως προς το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό, έχουν γίνει προσπάθειες προκειμένου να καταστεί δυνατή η βιοσύνθεση των φυσικών ενώσεων με εναλλακτικούς τρόπους, σε μικροοργανισμούς.

Ο σακχαρομύκητας αποτελεί έναν ιδανικό οργανισμό για ετερόλογη παραγωγή τερπενοειδών ενώσεων. Κάποια πρόδρομα μόρια των τερπενίων όπως GPP και FPP ήδη συντίθενται στα κύτταρα ζύμης, δεδομένου ότι συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της εργοστερόλης. Επιπλέον, η ζύμη είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός με παρόμοια οργάνωση με τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, διευκολύνοντας την ανακατασκευή των φυτικών βιοσυνθετικών μονοπατιών.

Οι εφαρμογές των τερπενίων είναι ποικίλες όπως στη βιομηχανία αρώματος και γεύσης, στην παραγωγή καλλυντικών προϊόντων, στη διατροφή και τη φαρμακολογία. Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες ανακατασκευής των βιοσυνθετικών μονοπατιών που οδηγούν στην παραγωγή του διτερπενίου ταξόλη (Ajikumar et al., 2010), των τριτερπενίων ginsenosides, που ανήκουν σε ομάδα στεροειδών γλικοζιτών και τριτερπενοειδών σαπονινών που απαντώνται στο τζίνσενγκ (Dai et al., 2013) και norditerpenoid tanshinones, που αποτελούν λιπόφιλες ναφθοκινόνες (Guo et al., 2013), όλα για φαρμακευτικές εφαρμογές.

Οι μετασχηματισμοί που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία με ήδη κλωνοποιημένα γονίδια ήταν αποτελεσματικοί και τα δείγματα φυλάχθηκαν για περαιτέρω χρήση στη συνέχεια των πειραμάτων.

Έπειτα στο δεύτερο πειραματικό μέρος, επιλέχτηκαν με εύκολο και αποτελεσματικό τρόπο, οι αποδοτικότερες μεταλλαγμένες αποικίες, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν μία βάση για περαιτέρω γονιδιακές αλλαγές που στο σύνολο τους θα αυξήσουν τη ροή του μονοπατιού προς την παραγωγή διτερπενίων.

Τέλος, τα αποτελέσματα του τρίτου πειραματικού μέρους αν και πολλά υποσχόμενα δεν έδωσαν σαφή εικόνα για το ποιο σύστημα φορέων λειτουργεί αποτελεσματικότερα μιας και δεν παρατηρήθηκε από τις μετρήσεις με το GC-MS παραγωγή των αντίστοιχων διτερπενίων σε όλες τις περιπτώσεις.

#### **4.1 Συμπεράσματα – μελλοντικές εργασίες**

Μία πιθανή μελλοντική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση βακτηριακών συστημάτων παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών μιας και στο παρελθόν έχει λειτουργήσει αποτελεσματικά σε άλλες περιπτώσεις (Nakagawa, 2011).

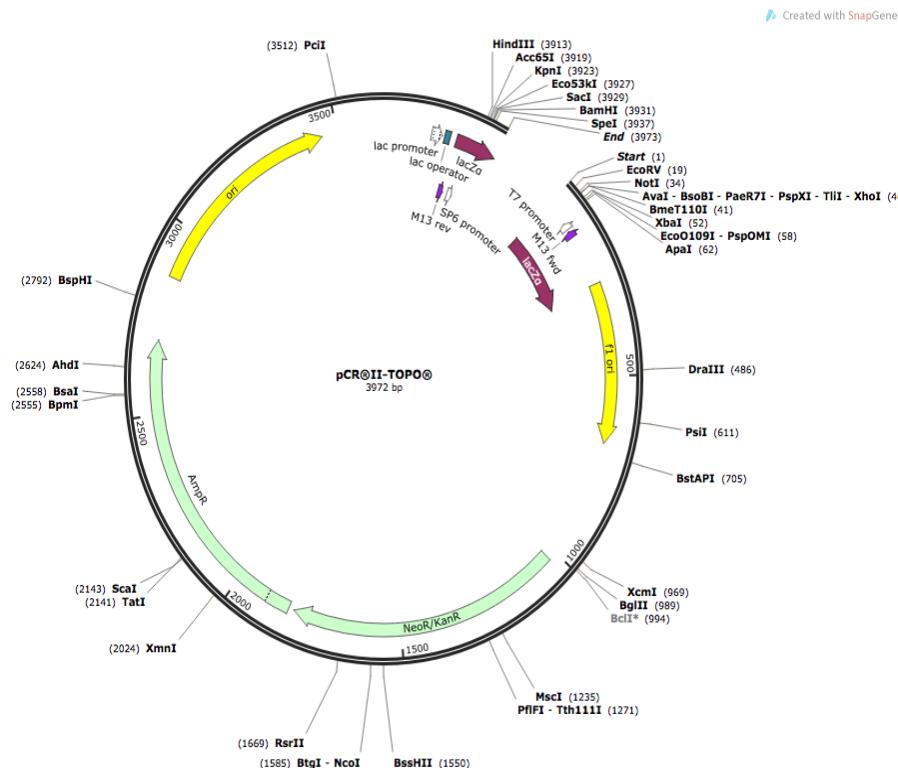
Οι δοκιμαστικοί μετασχηματισμοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά σε πειράματα σύγκρισης τόσο σε σχέση με διαφορετικούς μετασχηματισμούς έπειτα από γονιδιακή μετάλλαξη κάποιων εκ των περιεχόμενων γονιδίων, όσο και για τη δοκιμή διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης της ζύμης μέχρι να βρεθεί ο καταλληλότερος για αύξηση της παραγωγής.

Ακόμα, από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.2. φαίνεται ότι η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτελεί μία απλή μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες αντίστοιχες περιπτώσεις δίνοντας εύκολα, γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

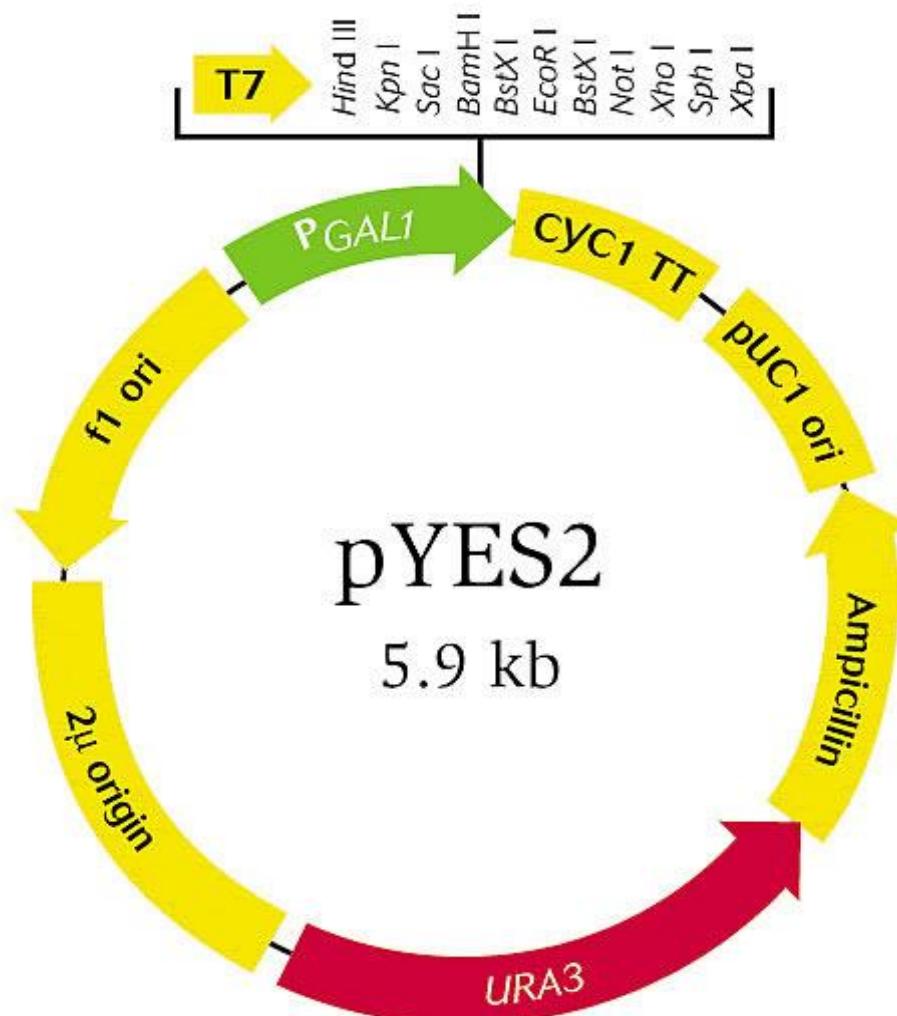
Στη συνέχεια, δεν πρέπει να παραλείψουμε το γεγονός ότι θα έπρεπε να επαναληφθεί τόσο η διαδικασία απομόνωσης των τερπενοειδών ενώσεων και η εκ νέου μέτρηση σε GC-MS, όσο και από την αρχή η επανάληψη του ίδιου του μετασχηματισμού των κλωνοποιημένων γονιδίων στη ζύμη, στο τρίτο πειραματικό μέρος. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε πιο σαφή αποτελέσματα, ξεκαθαρίζοντας ποιό από τα δύο συστήματα είναι καταλληλότερο για τη συνέχιση βελτιστοποίησης του.

Τέλος, δεν θα πρέπει να παραληφθεί ο βασικός στόχος της όλης προσπάθειας που αποτελεί την εύρεση όσο το δυνατόν καλύτερων και αποτελεσματικότερων μεθόδων αύξησης της παραγωγής τερπενοειδών ενώσεων. Αυτό θα οδηγήσει όλη την πειραματική διαδικασία σε άλλο επίπεδο, καθιστώντας ικανή τη βιομηχανική παραγωγή των τερπενίων σε ελεγχόμενα ετερόλογα συστήματα όπως η ζύμη ή τα βακτήρια, με χαμηλό κόστος και αποτελεσματικά. Υπάρχουν πολλοί γονιδιακοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που μένουν να τροποποιηθούν κατάλληλα όπως οι συνθήκες ανάπτυξης, ο αποδοτικότερος οργανισμός, η μετάλλαξη και άλλων γονιδίων που εκφράζουν ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι και η τροποποίηση των ήδη μεταλλαγμένων γονιδίων.

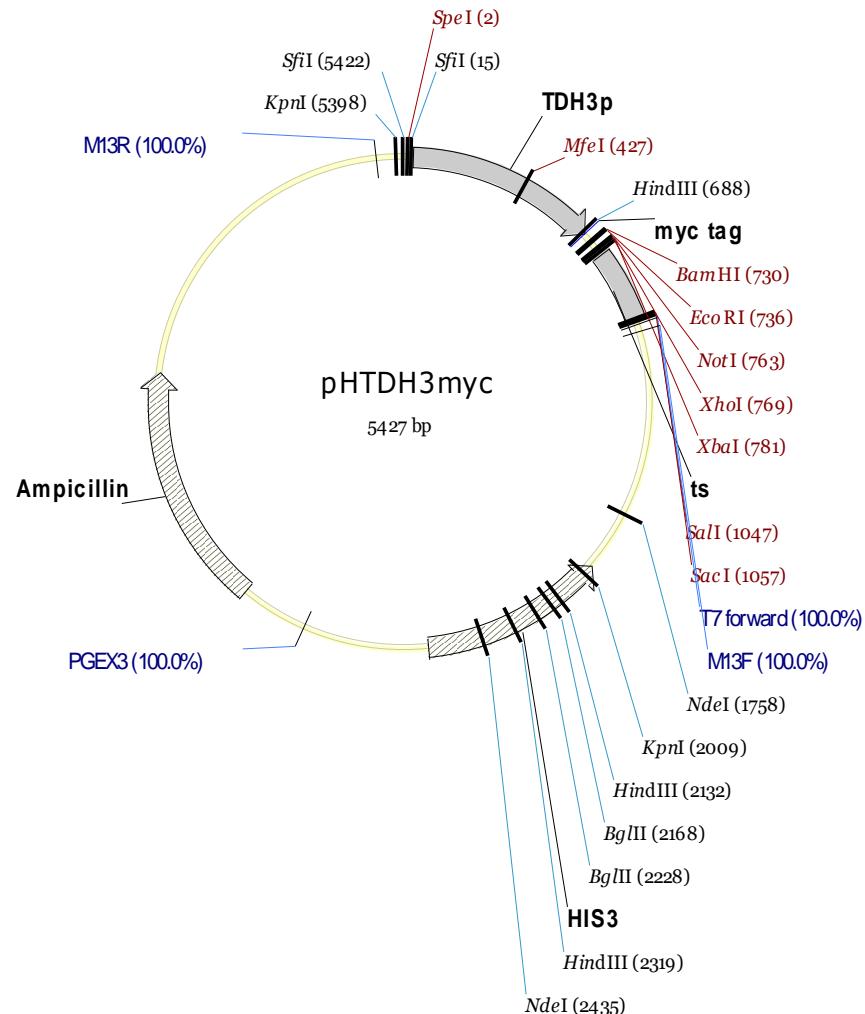
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I – ΧΑΡΤΕΣ ΦΟΡΕΩΝ



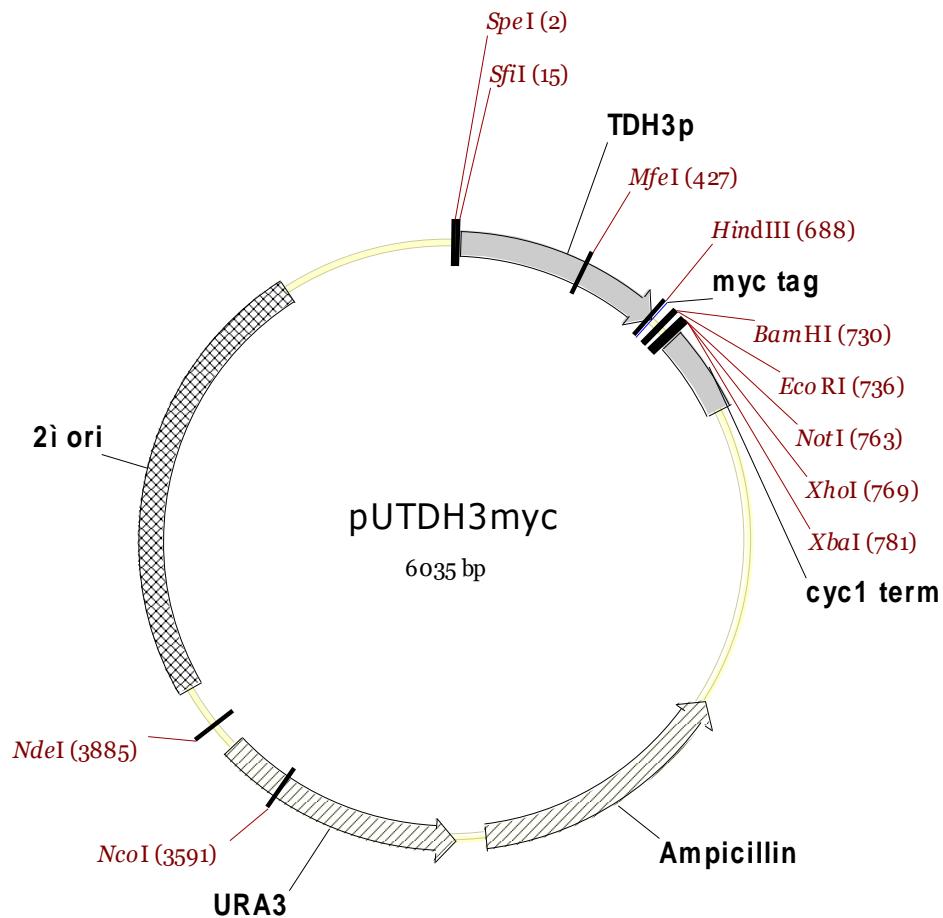
ΣΧΗΜΑ 1 : ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ PCRII-TOPO



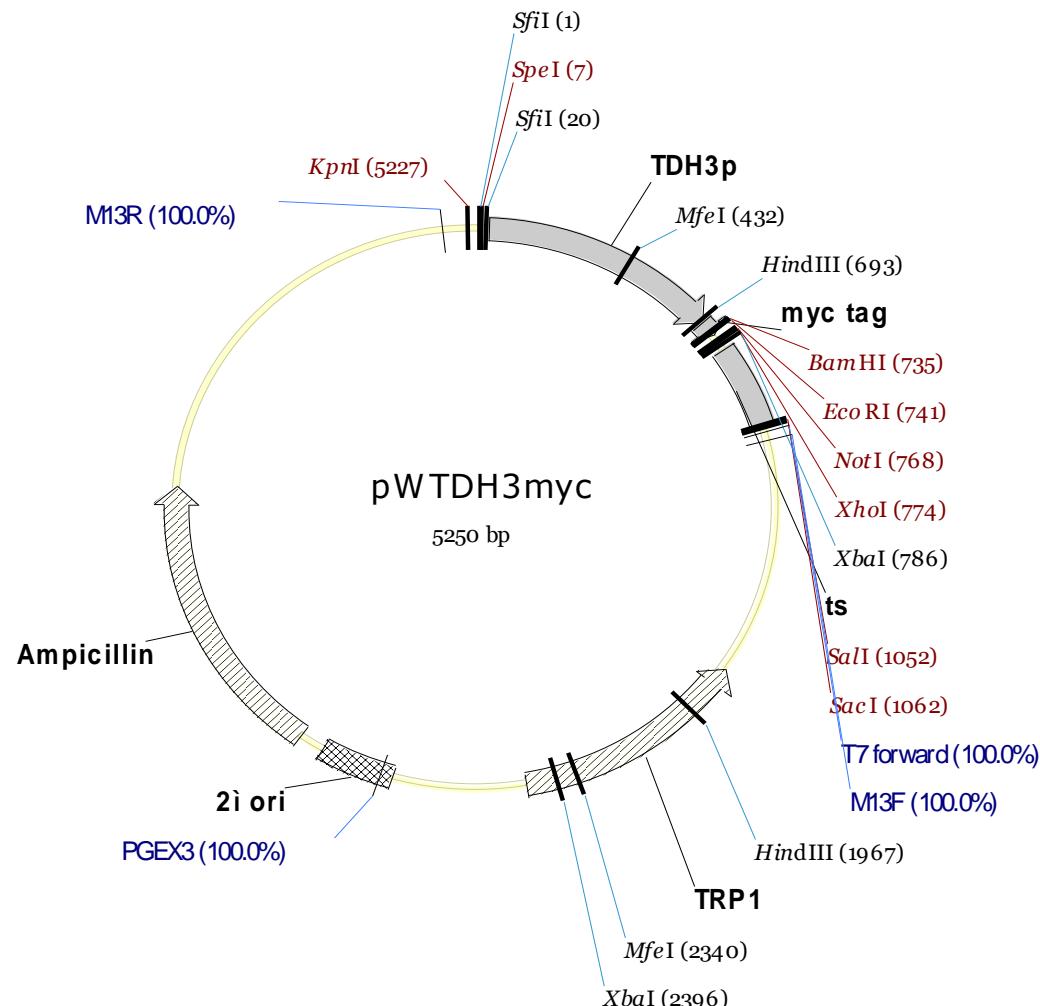
Σχήμα 2 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pYES2



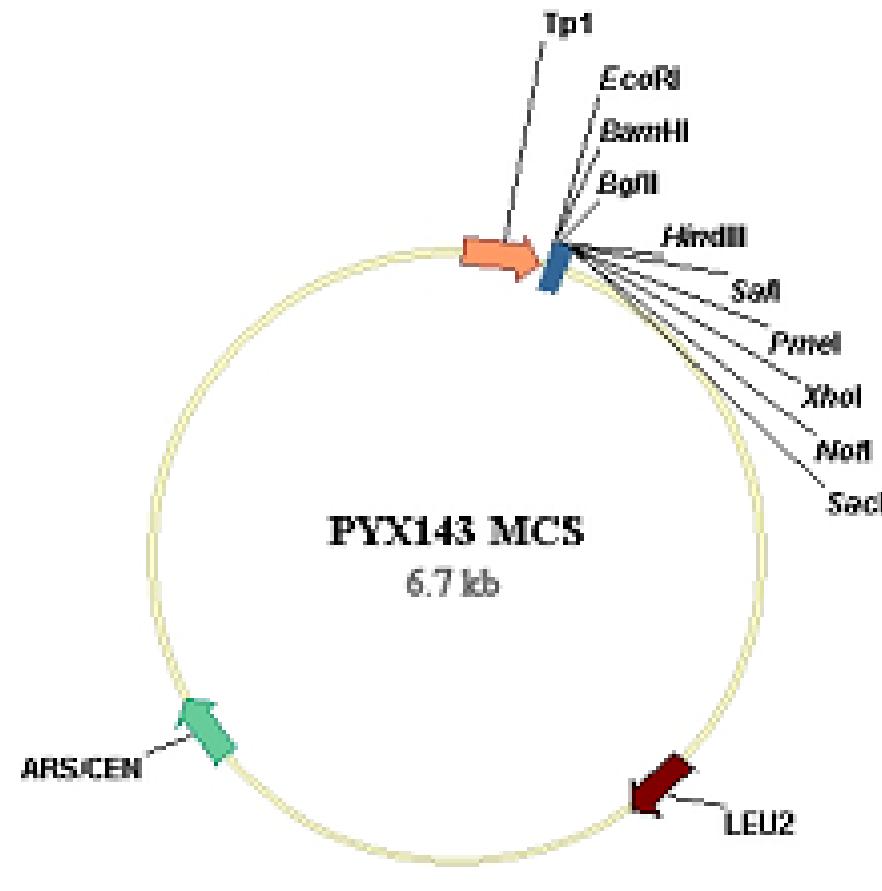
Σχήμα 3 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pHTDH3myc



Συγένια 4 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pUTDH3myc



Σχήμα 5 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pWTDH3myc



Σχήμα 6 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα p

yeast URA3 ORF 417–1217  
 f1 origin 1483–1789  
 ADH1 terminator 1885–2049  
 multiple cloning site 1 2180–2263  
 FLAG tag 2198–2224  
 GAL1/GAL10 divergent promoters 2268–2934  
 multiple cloning site 2 2936–3033  
 c-myc tag 2976–3011  
 CYC1 terminator 3038–3227  
 pUC origin 3414–4081  
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 4232–5089  
 2 $\mu$  origin 5223–6378

**pESC-URA Multiple Cloning Site 1 Region**  
 (sequence shown 2180–2263, bottom strand)

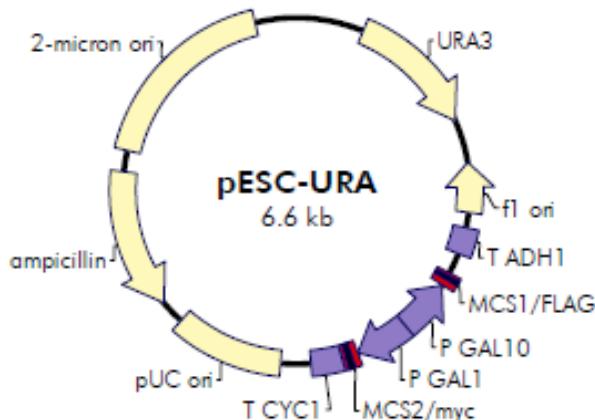
EcoRI		NotI		SphI		ClaI			BglII		SacI		PacI										
GAA	TTC	AAC	CCT	CAC	TAA	AGG	GCG	GCC	GCA	CTA	GTA	TCG	ATG	TAC	AAG	GAT	GAC	GAC	GAT	AAG	ATC	TGA	GCTCTTAATTAA
M	D	Y	K	D	D	D	D	K	I	stop													

FLAG epitope

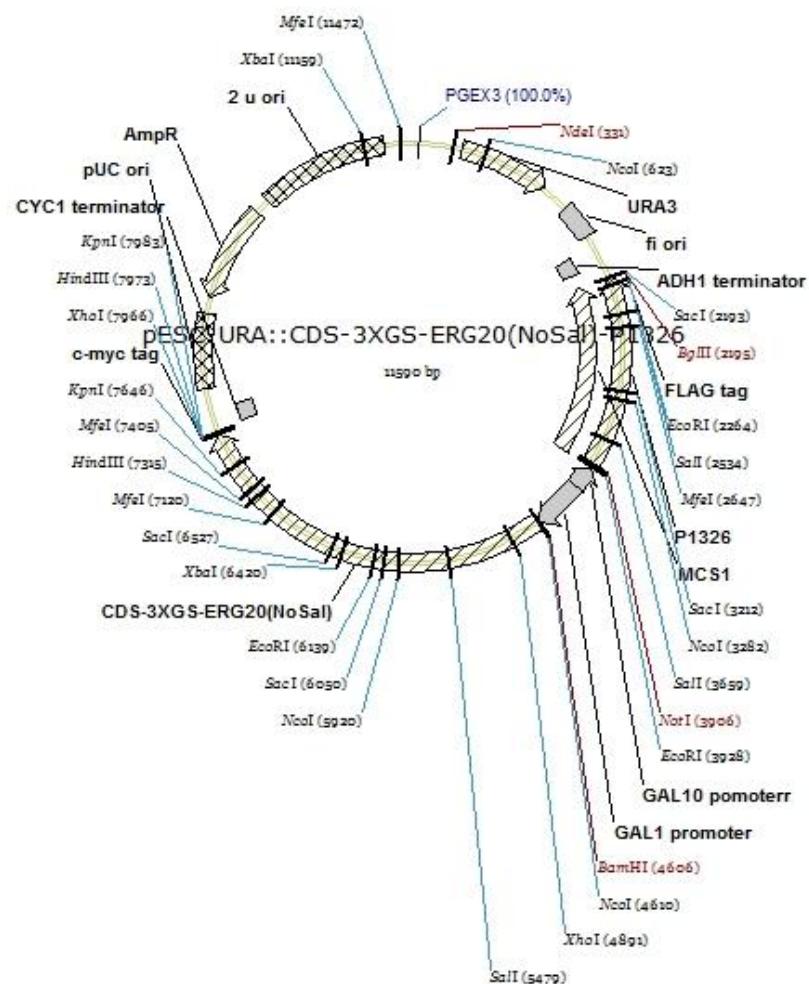
**pESC-URA Multiple Cloning Site 2 Region**  
 (sequence shown 2936–3033, top strand)

BamHI		SrfI		SalI									
G	GAT	CGG	TAA	TAC	GAC	TCA	CTA	TAG	GGC	CCG	GGC	GTC	GAC...
(stop)													
...ATG	GAA	CAG	AAG	TTG	ATT	TCC	GAA	GAA	GAC	CTC	GAG	TAA	GCTTGGTACCGCGGCTAGC
M	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	E	stop	

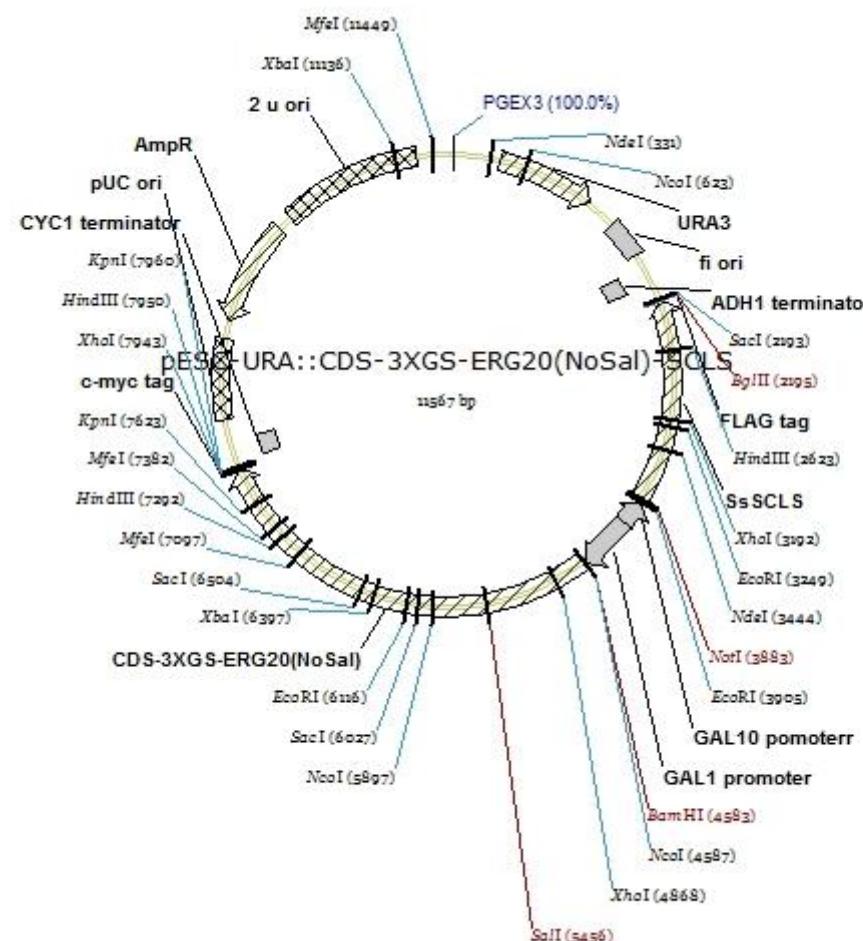
myc epitope



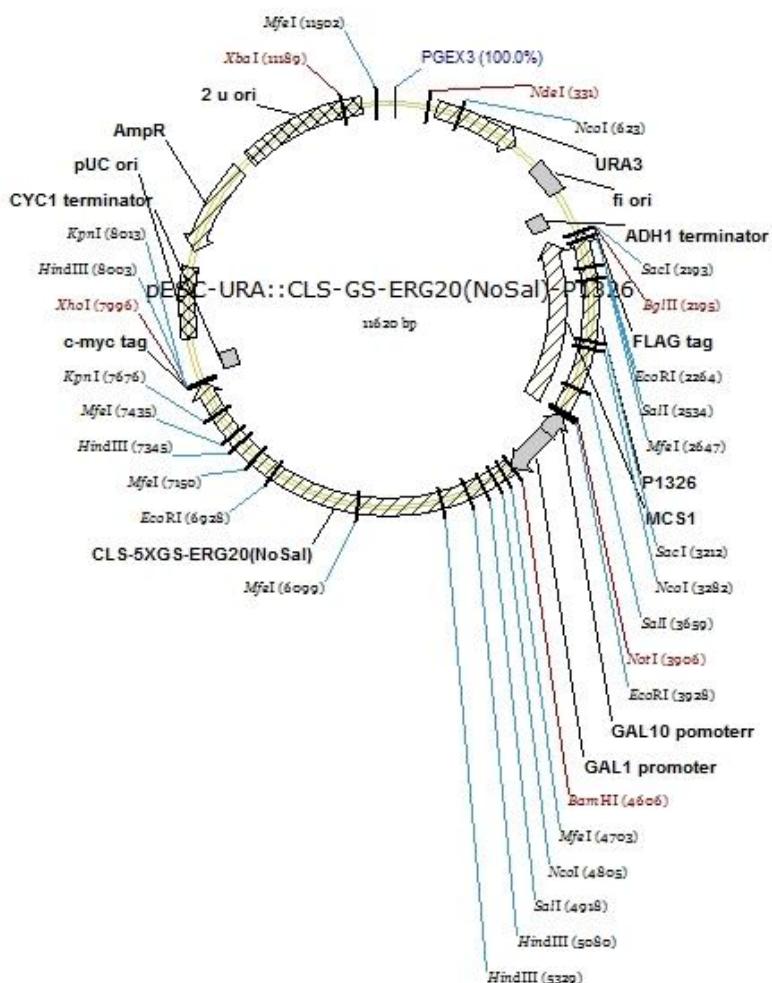
Σχήμα 7 : Γενετικός χάρτης του επαγόμενου φορέα έκφρασης γονιδίων στον σακχαρομύκητα, pESC-URA (Stratagene)



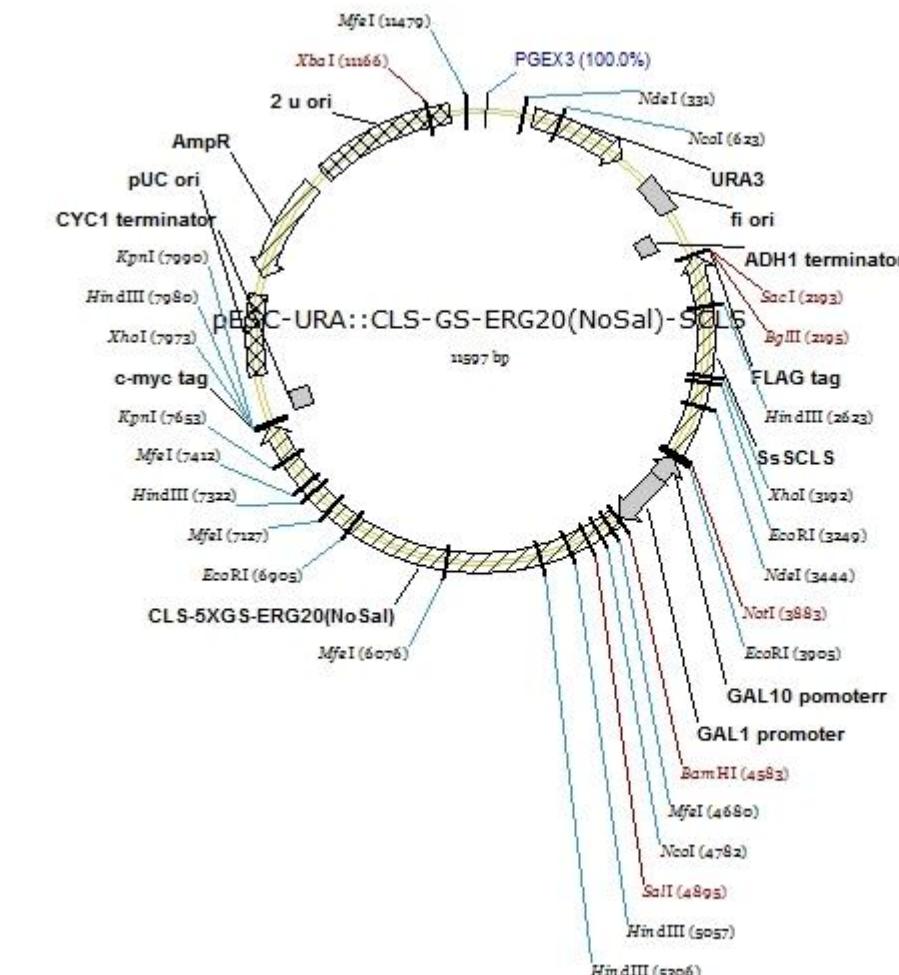
**Σχήμα 8:** Γενετικός χάρτης του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CDS-Y95-p1326



Σχήμα 9 : Γενετικός χάρτης του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS



**Σχήμα 10 :** Γενετικός χάρτης του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CLS-Y95-p1326



**Σχήμα 11:** Γενετικός χάρτης του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CLS-Y95-SCLS

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ –ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΦΟΡΕΩΝ

**Πίνακας 1:** Αλληλουχία του φορέα pCRII-TOPO

1	AGCGCCCAAT	ACGCAAACCG	CCTCTCCCCG	CGCGTTGGCC	GATTCAATTAA
51	TGCAGCTGGC	ACGACAGGTT	TCCCCGACTGG	AAAGCGGGCA	GTGAGCGCAA
101	CGCAATTAAAT	GTGAGTTAGC	TCACTCATTA	GGCACCCAG	GCTTTACACT
151	TTATGCTTCC	GGCTCGTATG	TTGTGTGGAA	TTGTGAGCGG	ATAACAATTT
201	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTAT	TTAGGTGACA
251	CTATAGAATA	CTCAAGCTAT	GCATCAAGCT	TGGTACCGAG	CTCGGATCCA
301	CTAGTAACGG	CCGCCAGTGT	GCTGGAATT	GCCCTTAAGG	GCGAATTCTG
351	CAGATATCCA	TCACACTGGC	GGCCGCTCGA	GCATGCATCT	AGAGGGCCCA
401	ATTCGCCCTA	TAGTGAGTCG	TATTACAATT	CACTGGCCGT	CGTTTACAA
451	CGTCGTGACT	GGGAAAACCC	TGGCGTTACC	CAACTTAATC	GCCTTGCAGC
501	ACATCCCCCT	TTCGCCAGCT	GGCGTAATAG	CGAAGAGGCC	CGCACCGATC
551	GCCCTTCCCCA	ACAGTTGCGC	AGCCTGAATG	GCGAATGGAC	GCGCCCTGTA
601	GCGGCGCATT	AAGCGCGCG	GGTGTGGTGG	TTACGCGCAG	CGTGACCGCT
651	ACACTTGCCA	GCGCCCTAGC	GCCCCGCTCCT	TTCGCTTTCT	TCCCTTCCTT
701	TCTCGCCACG	TTCGCCGGCT	TTCCCCGTCA	AGCTCTAAAT	CGGGGGCTCC
751	CTTTAGGGTT	CCGATTAGT	GCTTTACGGC	ACCTCGACCC	AAAAAAACTT
801	GATTAGGGTG	ATGGTTCACG	TAGTGGCCA	TCGCCCTGAT	AGACGGTTTT
851	TCGCCCTTTG	ACGTTGGAGT	CCACGTTCTT	TAATAGTGGA	CTCTTGTCCC
901	AAACTGGAAC	AACACTCAAC	CCTATCTCGG	TCTATTCTTT	TGATTTATAAA
951	GGGATTTGCG	CGATTCGGC	CTATTGGTTA	AAAAATGAGC	TGATTTAACAA
1001	AAAATTAAAC	GCGAATTAA	ACAAAATTCA	GGGCGCAAGG	GCTGCTAAAG
1051	GAAGCGGAAC	ACGTAGAAAG	CCAGTCCGCA	GAAACGGTGC	TGACCCCGGA
1101	TGAATGTCAG	CTACTGGGCT	ATCTGGACAA	GGGAAAACGC	AAGCGCAAAG
1151	AGAAAGCAGG	TAGCTTGCAG	TGGGCTTACA	TGGCGATAGC	TAGACTGGC
1201	GGTTTATGG	ACAGCAAGCG	AACCGGAATT	GCCAGCTGGG	GCGCCCTCTG
1251	GTAAGGGTGG	GAAGCCCTGC	AAAGTAAACT	GGATGGCTTT	CTTGCCGCCA
1301	AGGATCTGAT	GGCGCAGGGG	ATCAAGATCT	GATCAAGAGA	CAGGATGAGG
1351	ATCGTTTCGC	ATGATTGAAC	AAGATGGATT	GCACGCGAGT	TCTCCGGCCG
1401	CTTGGGTGGA	GAGGCTATT	GGCTATGACT	GGGCACAAACA	GACAATCGGC
1451	TGCTCTGATG	CCGCCGTGTT	CCGGCTGTCA	GCGCAGGGGC	GCCC GGTTCT
1501	TTTGTCAAG	ACCGACCTGT	CCGGTGCCCT	GAATGAAC	CAGGACGAGG
1551	CAGCGCGGCT	ATCGTGGCTG	GCCACGACGG	GCGTCCCTTG	CGCAGCTGTG
1601	CTCGACGTTG	TCACTGAAGC	GGGAAGGGAC	TGGCTGCTAT	TGGGCGAAGT
1651	GCCGGGGCAG	GATCTCCTGT	CATCCACCT	TGCTCCTGCC	GAGAAAGTAT
1701	CCATCATGGC	TGATGCAATG	CGGCGCTGC	ATACGCTTGA	TCCGGCTACC
1751	TGCCCATTCG	ACCACCAAGC	GAAACATCGC	ATCGAGCGAG	CACGTACTCG
1801	GATGGAAGGCC	GGTCTTGTG	ATCAGGATGA	TCTGGACGAA	GAGCATCAGG
1851	GGCTCGCGCC	AGCGAACTG	TTCGCCAGGC	TCAAGGCGCG	CATGCCGAC
1901	GGCGAGGATC	TCGTCGTGAC	CCATGGCGAT	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT
1951	GGTGGAAAAT	GGCCGTTTT	CTGGATTCTAT	CGACTGTGGC	CGGCTGGGTG
2001	TGGCGGACCG	CTATCAGGAC	ATAGCGTTGG	CTACCCGTGA	TATTGCTGAA
2051	GAGCTGGCG	GCGAATGGGC	TGACCGCTTC	CTCGTGTCTT	ACGGTATCGC
2101	CGCTCCCGAT	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCCTTCTT	GACGAGTTCT
2151	TCTGAATTGA	AAAAGGAAGA	GTATGAGTAT	TCAACATTC	CGTGTGCCCC
2201	TTATTCCCTT	TTTGCAGGCA	TTTGCCCTTC	CTGTTTTGC	TCACCCAGAA
2251	ACGCTGGTGA	AAGTAAAAGA	TGCTGAAGAT	CAGTTGGGTG	CACGAGTGGG

2301	TTACATCGAA	CTGGATCTCA	ACAGCGGTAA	GATCCTTGAG	AGTTTCGCC
2351	CCGAAGAACG	TTTCCAATG	ATGAGCACTT	TTAAAGTTCT	GCTATGTGGC
2401	GCGGTATTAT	CCC GTATTGA	CGCCGGGCAA	GAGCAACTCG	GTCGCCGCAT
2451	ACACTATTCT	CAGAATGACT	TGGTTGAGTA	CTCACCACTGC	ACAGAAAAGC
2501	ATCTTACGGA	TGGCATGACA	GTAAGAGAAT	TATGCAGTGC	TGCCATAACC
2551	ATGAGTGATA	ACACTGCGGC	CAACTTACTT	CTGACAACGA	TCGGAGGACC
2601	GAAGGAGCTA	ACCGCTTTT	TGCACAAACAT	GGGGGATCAT	GTAACTCGCC
2651	TTGATCGTTG	GGAACCGGAG	CTGAATGAAG	CCATACAAA	CGACGAGCGT
2701	GACACCACGA	TGCCTGTAGC	AATGGCAACA	ACGTTGCGCA	AACTATTAAC
2751	TGGCGAACTA	CTTACTCTAG	CTTCCCGGCA	ACAATTAAATA	GAATGGATGG
2801	AGGC GGATAA	AGTTGCAGGA	CCACTTCTGC	GCTCGGCCCT	TCCGGCTGGC
2851	TGGTTTATTG	CTGATAAATC	TGGAGCCGGT	GAGCGTGGGT	CTCGCGGTAT
2901	CATTGCAGCA	CTGGGGCCAG	ATGGTAAGCC	CTCCCCGTATC	GTAGTTATCT
2951	ACACGACGGG	GAGTCAGGCA	ACTATGGATG	AACGAAATAG	ACAGATCGCT
3001	GAGATAGGTG	CCTCACTGAT	TAAGCATTGG	TAAC TGT CAG	ACCAAGTTA
3051	CTCATATATA	CTTTAGATTG	ATTAAA ACT	TCATTTTAA	TTTAAAAGGA
3101	TCTAGGTGAA	GATCCTTTT	GATAATCTCA	TGACCAAAAT	CCCTTAACGT
3151	GAGTTTCGT	TCCACTGAGC	GTCAGACCCC	GTAGAAAAGA	TCAAAGGATC
3201	TTCTTGAGAT	CCTTTTTTC	TGCGCGTAAT	CTGCTGTTG	CAAACAAAAA
3251	AACCACCGCT	ACCAGCGGTG	GTTTGTGGC	CGGATCAAGA	GCTACCAACT
3301	CTTTTTCCGA	AGGTAACTGG	CTTCAGCAGA	GCGCAGATAC	CAAATACTGT
3351	TCTTCTAGTG	TAGCCGTAGT	TAGGCCACCA	CTTCAAGAAC	TCTGTAGCAC
3401	CGCCTACATA	CCTCGCTCTG	CTAATCCTGT	TACCA GTGGC	TGCTGCCAGT
3451	GGCGATAAGT	CGTGTCTTAC	CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGGA
3501	TAAGGCGCAG	CGGT CGGGCT	GAACGGGGGG	TTCGTGCACA	CAGCCCAGCT
3551	TGGAGCGAAC	GACCTACACC	GAAC TGAGAT	ACCTACAGCG	TGAGCTATGA
3601	GAAAGCGCCA	CGCTTCCCAGA	AGGGAGAAAG	CGGGACAGGT	ATCCGGTAAG
3651	CGGCAGGGTC	GGAACAGGAG	AGCGCACGAG	GGAGCTTCCA	GGGGGAAACG
3701	CCTGGTATCT	TTATAGTCCT	GTCGGGTTTC	GCCACCTCTG	ACTTGAGCGT
3751	CGATTTTTGT	GATGCTCGTC	AGGGGGGCGG	AGCCTATGGA	AAAACGCCAG
3801	CAACGCGGCC	TTTTTACGGT	TCCTGGCCTT	TTGCTGGCCT	TTTGCTCACA
3851	TGTTCTTCC	TGCGTTATCC	CCTGATTCTG	TGGATAACCG	TATTACCGCC
3901	TTTGAGTGAG	CTGATACCGC	TCGCCGCAGC	CGAACGACCG	AGCGCAGCGA
3951	GTCAGTGAGC	GAGGAAGCGG	AAG		

**Πίνακας 2:** Αλληλουχία του φορέα pYES2

1 GGCGC A AAT TAAAGCCTTC GAGCGTCCC A AACCTTCTC A AGCAAGGTT  
 51 TTCAGTATAA TGTTACATGC GTACACGCGT CTGTACAGAA AAAAAGAAA  
 101 ATTTGAAAT ATAATAAACG TTCTTAATAC TAACATAACT ATAAAAAAAT  
 151 AAATAGGGAC CTAGACTTCA GGTGCTAA CTCCCTCCTT TTGGTTAGA  
 201 GCGGATGTGG GGGGAGGGCG TGAATGTAAG CGTGACATAA CTAATTACAT  
 251 GATGCGGCC C TCTAGATGCA TGCTCGAGCG GCCGCCAGTG TGATGGATAT  
 301 CTGCAGAAAT CCAGCACACT GGCGCCCGTT ACTAGTGGAT CCGAGCTCGG  
 351 TACCAAGCTT AATATCCCT ATAGTGAGTC GTATTACAGC TGCTAGTAGT  
 401 CCGATCCGGG GTTTTTCTC CTTGACGTT AAGTATAGAG GTATATTAAC  
 451 ATTTTTGT TGATAC TTT ATTACATTT AATAAGAAGT AATACAAACC  
 501 GAAAATGTT AAGTATTAG TAAAGTGGT TAATGCAGTT TTGCA TTTA  
 551 TATATCTGTT AATAGATCAA AAATCATCGC TTGCTGATT AATTACCCCA  
 601 GAAATAAGGC TAAAAAACTA ATCGCATTAT CATCCTATGG TTGTTAATTT  
 651 GATTGTTCA TTTGAAAGTT TGTTGGGCC GGTTACTGCC AATTTTCCCT  
 701 CTTCTAC ACC ATAAAGCTA GTATTGAGA ATCTTTATTG TTGGAGCAG  
 751 TGCGCGCGA GGCACATCTG CGTTCAAGGA AC GCGACCGG TGAGGACGAG  
 801 GACGCACGGA GGAGAGTCTT CCTTCGGAGG GCTGTACCC GCTCGGCCGGC  
 851 TTCTAATCCG TACTAGTGGA TCATCCCCAC GCGCCCTGTA GCGCCCCATT

901	AAGCGCGGCG	GGTGTGGTGG	TTACGCCAG	CGTGACCCCT	ACACTTCCC
951	CCGCCCTAGC	CCCCGCTCT	TCGCTTCT	TCCCTTCCTT	TCTCGCCACG
1001	TTCGCCGGCT	TTCCCCGTCA	AGCTCTAAAT	GGGGGCATCC	GTTTACCCCTT
1051	CCGATTTACT	GCTTTACGGC	ACCTCGACCC	AAAAAAACTT	GATTAGGGTG
1101	ATGGTTCACG	TAGTGGGCCA	TCGCCCTGAT	AGACCCTTT	TCGCCCTTG
1151	ACGTTGGAGT	CCACGTTCTT	TAATAGTGA	CTCTTGTGG	AAACTGGAAC
1201	AAACACTAAC	CCTATCTCG	TCTATTCTTT	TGATTTATAA	GGGATTTCG
1251	CGATTCGGG	CTATTGTTA	AAAAATGAGC	TGATTAAACA	AAAATTTAAC
1301	GCGAATTTTA	ACAAAATATT	AACGTTACA	ATTTAAATAT	TTGCTTATAC
1351	AATCTTCCTG	TTTTGGGGC	TTTCTGATT	ATCAACCGGG	GTGGAGCTTC
1401	CCATTGCGAA	TACCGCTCC	ACAAACATTG	CTCAAAGTA	TCTCTTGCT
1451	ATATATCTCT	GTGCTATATC	CCTATATAAC	CTACCCATCC	ACCTTCGCT
1501	CCTTGAACIT	GCATCTAAC	TCGACCTCTA	CATTTTTAT	GTTTATCTCT
1551	AGTATTACTC	TTTAGACAAA	AAAATTGTAG	TAAGAACTAT	TCATAGAGTG
1601	AATCGAAAAC	AATACGAAA	TGTAACATT	TCCTATACGT	AGTATATAGA
1651	GACAAAATAG	AAGAACCGT	TCATAATT	CTGACCAATG	AAGAACATC
1701	AACGCTATCA	CTTTCTGTC	ACAAAGTATG	CGCAATCCAC	ATCGGTATAG
1751	AATATAATCG	GGGATGCGTT	TATCTTGAA	AAATGCACCC	GCAGCTTCGC
1801	TAGTAATCAG	TAACCGGGG	AAGTGGAGTC	AGGCTTTTT	TATGGAAGAG
1851	AAAATAGACA	CCAAAGTAGC	CTTCTCTAA	CCTTAACGGA	CCTACAGTGC
1901	AAAAAGTTAT	CAAGAGACTG	CATTATAGAG	CGCACAAAGG	AGAAAAAAAG
1951	TAATCTAAGA	TGCTTTGTTA	GGAAAATAGC	GCTCTCGGGA	TGCATTTTG
2001	TAGAACAAA	AAGAAGTATA	GATTCTTGT	TGGTAAAATA	GCGCTCTCG
2051	GTTGCATTT	TGTTCTGAA	AAATGCAGCT	CAGATTCTT	GTTGAAAAAA
2101	TTAGCGCTCT	CGTCGCGTT	CATTTTGTT	TTACAAAAT	GAAGCACAGA
2151	TTCTTCGTTG	GTAAAATAGC	GCTTTCGCGT	TGCATTTCTG	TTCTGTAAAA
2201	ATGCAGCTCA	GATTCTTGT	TTGAAAAAATT	AGCGCTCTCG	CGTTGCATT
2251	TTGTTCTACA	AAATGAAGCA	CAGATGCTTC	GTTAACAAAG	ATATGCTATT
2301	GAAGTGCAAG	ATGGAAACGC	AGAAAATGAA	CCGGGGATGC	GACGTGCAAG
2351	ATTACCTATG	CAATAGATGC	AATAGTTCT	CCAGGAACCG	AAATACATAC
2401	ATTGTCTTCC	GTAAAGCGCT	AGACTATATA	TTATTATACA	GGTTCAAATA
2451	TACTATCTGT	TTCAGGGAAA	ACTCCCAGGT	TCGGATGTT	AAAATTCAAT
2501	GATGGGTAAC	AAGTACGATC	GTAAATCTGT	AAAACAGTTT	GTCGGATATT
2551	AGGCTGTATC	TCCTCAAAGC	GTATTGAAAT	ATCATTGAGA	AGCTGCAGCG
2601	TCACATCGGA	TAATAATGAT	GGCAGCCATT	GTAGAAGTGC	CTTTTGCATT
2651	TCTAGTCTCT	TTCTCGGTCT	AGCTAGTTT	ACTACATCGC	GAAGATAGAA
2701	TCTTAGATCA	CACTGCC	GCTGAGCTGG	ATCAATAGAG	TAACAAAAGA
2751	GTGGTAAGGC	CTCGTTAAAG	GACAAGGACC	TGAGCGGAAG	TGTATCGTAC
2801	AGTAGACGGA	GTATCTAGTA	TAGTCTATAG	TCCGTGGAAT	TAATTCTCAT
2851	CTTTGACAGC	TTATCATCGA	TAAGCTAGCT	TTTCAATTCA	ATTCATCATT
2901	TTTTTTTTAT	TCTTTTTT	GATTGCGTT	TCTTTGAAAT	TTTTTGATT
2951	CGGTAATCTC	CGAACAGAAG	GAAGAACGAA	GGAAGGAGCA	CAGACTTAGA
3001	TTGGTATATA	TACGCATATG	TAGTGTGAA	GAAACATGAA	ATTGCCAGT
3051	ATTCTTAACC	CAACTGCACA	GAACAAAAAC	CTGCAGGAAA	CGAAGATAAA
3101	TCATGTCGAA	AGCTACATAT	AAGGAACGTG	CTGCTACTCA	TCCTAGTCCT
3151	GTGCTGCCA	AGCTATTAA	TATCATGCC	AAAAAGCAA	CAAACTTGTG
3201	TGCTTCATTG	GATGTTCGTA	CCACCAAGGA	ATTACTGGAG	TTAGTTGAAG
3251	CATTAGGTCC	CAAATTGTT	TTACTAAAAA	CACATGTGGA	TATCTGACT
3301	GATTTTTCCA	TGGAGGGCAC	AGTTAACCG	CTAAAGGCAT	TATCCGCCAA
3351	GTACAATT	TTACTCTCTG	AAGACAGAAA	ATTGCTGAC	ATTGGTAATA
3401	CAGTCAAATT	GCAGTACTCT	GGGGGTGTAT	ACAGAACATG	AGAACATGGCA
3451	GACATTACGA	ATGCACACGG	TGTGGTGGGC	CCAGGTATTG	TTAGCGGTT
3501	GAAGCAGGCG	GCAGAACAGA	TAACAAAGGA	ACCTAGAGGC	CTTTTGATGT
3551	TAGCAGAAATT	GTCATGCAAG	GGCTCCCTAT	CTACTGGAGA	ATATACTAAG
3601	GGTACTGTTG	ACATTGCGAA	GAGCGACAAA	GATTTTGT	TCGGCTTAT
3651	TGCTCAAAGA	GACATGGGTG	GAAGAGATGA	AGGTTACGAT	TGGTTGATTA
3701	TGACACCCGG	TGTGGGTTA	GATGACAAGG	GAGACGCA	GGGTCAACAG
3751	TATAGAACCG	TGGATGATGT	GGTCTCTACA	GGATCTGACA	TTATTATTGT
3801	TGGAAGAGGA	CTATTGCAA	AGGGAAAGGA	TGCTAAGGTA	GAGGGTGAAC
3851	GTTACAGAAA	AGCAGGCTGG	GAAGCATATT	TGAGAACATG	CGGCCAGCAA
3901	AACTAAAAAA	CTGTATTATA	AGTAAATGCA	TGTATACTAA	ACTCACAAAT
3951	TAGAGCTTCA	ATTTAATTAT	ATCAGTTATT	ACCCATTGAA	AAAGGAAGAG
4001	TATGAGTATT	CAACATTCC	GTGTCGCCCT	TATTCCCTTT	TTTGGGGCA
4051	TTTGCCTTCC	TGTTTTGCT	CACCCAGAAA	CGCTGGTGA	AGTAAAAGAT
4101	GCTGAAGATC	AGTTGGGTGC	ACGAGTGGGT	TACATCGAAC	TGGATCTCAA

4151 CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA  
4201 TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTATA CACTATTATC CCGTATTGAC  
4251 GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT  
4301 GGTTGAGTAC TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG  
4351 TAAGAGAATT ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC  
4401 AACTTACTTC TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTT  
4451 GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC  
4501 TGAATGAAGC CATAACAAAC GACGAGAGTG ACACCAAGAT GCCTGTAGCA  
4551 ATGCCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAACT GGCGAACTAC TTACTCTAGC  
4601 TTCCCGGCAA CAATTAAATAG ACTGAATGGA GGCGGATAAA GTTGCAGGAC  
4651 CACTTCTGCG CTCGCCCTT CGCGCTGGCT GGTTTATTGC TGATAAATCT  
4701 GGAGCCGGTG AGCGTGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA  
4751 TGGTAAGCGC TCCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA  
4801 CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT  
4851 AAGCATTGGT AACTGTCAGA CCAAGTTAC TCATATATAAC TTTAGATTGA  
4901 TTTAAAACCT CATTTTAAAT TAAAGGAGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTG  
4951 ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAACCGT AGTTTCGTT CCAC TGAGGG  
5001 TCAGACCCCG TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTCT  
5051 GCGCGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG  
5101 TTTGTTGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GTTAAC TGCC  
5151 TTCAGCAGAG CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT  
5201 AGGCCACAC TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC  
5251 TAATCCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC  
5301 GGGTTGGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCCAGC GGTGGGCTG  
5351 AACGGGGGGT TCGTGCACAC AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG  
5401 AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGGCCAC GCTTCCCGAA  
5451 GGGAGAAAGG CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA  
5501 GCGCACGAGG GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG  
5551 TCGGGTTTCG CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTGTTG ATGCTCGTCA  
5601 GGGGGCGGA GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACGCCGCCT TTTTACGGTT  
5651 CCTGGGCTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTTCTTCCT GCGTTATCCC  
5701 CTGATTCTGT GGATAACCCTT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATACCGCT  
5751 CGCCGCAGCC GAACGACCGA GGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA  
5801 AGAGCGCCA ATACGCAAAC CGCCTCTCCC CGCGCGTTGG CCGATTCTATT  
5851 AATGCAG

**Πίνακας 3:** Άλληλουχία του φορέα pHTDH3myc

1 ACTAGTGGCC TATGCGGCC AGTCGAGTT TATCATTATC AATACTGCCA  
51 TTTCAAAGAA TACGTAATAA ATTAATAGTA GTGATTTCC TAACTTTATT  
101 TAGTCAAAAAA ATTAGCCTTT TAATTCTGCT GTAACCCGTA CATGCCAAA  
151 ATAGGGGGCG GGTTACACAG AATATATAAC ATCGTAGGTG TCTGGGTGAA  
201 CAGTTTATTCTC CTGGCATCCA CTAATATATAA TGGAGCCGC TTTTAAGCT  
251 GGCATCCAGA AAAAAGA ATCCCAGCAC CAAATATTG TTTTCTTCAC  
301 CAACCATCAG TTCATAGTC CATTCTCTTA GCGCAACTAC AGAGAACAGG  
351 GGCACAAACA GGCAAAAC GGGCACAACC TCAATGGAGT GATGCAACCT  
401 GCCTGGAGTA AATGATGACA CAAGGCAATT GACCCACGCA TGTATCTATC  
451 TCATTTCTT ACACCTCTA TTACCTCTG CTCTCTCTGA TTTGGAAAAAA  
501 GCTGAAAAAA AAGGTTGAAA CCAGTTCCCT GAAATTATTC CCCTACTTGA  
551 CTAATAAGTA TATAAGACG GTAGGTATTG ATTGTAATTC TGAAATCTA  
601 TTTCTTAAAC TTCTTAAATT CTACTTTAT AGTTAGTCTT TTTTTAGTT  
651 TTAAAACACC AAGAACTTAG TTTCGAATAA ACACACAAGC TTATGGAACA  
701 GAAGCTAATA AGTGAGGAGG ATCTGAATGG ATCCGAATTC TGCAGATATC  
751 CATCACACTG GCGGCCGCTC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC GCATCATGTA  
801 ATTAGTTATG TCACGCTTAC ATTCACGCC TCCCCCACA TCCGCTCTAA  
851 CCGAAAAGGA AGGAGTTAGA CAACCTGAAG TCTAGGTCCC TATTTATTTT  
901 TTTATAGTTA TGTTAGTATT AAGAACGTTA TTTATATTC AAAATTTCT  
951 TTTTTCTG TACAGACGCG TGTACGCATG TAACATTATA CTGAAAACCT  
1001 TGCTTGAGAA GGTTGGGA CGCTCGAAGG CTTAAATTG CGGCCGTCGA

1051 CGAGCTCAA TTCGCCATT AGTGAGTCGT ATTACAATTC ACTGGCCGTC  
1101 GTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCT GGCGTTACCC AACTTAATCG  
1151 CCTTGCAGCA CATCCCCCT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCC  
1201 GCACCGATCG CCCTTCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGCG  
1251 GACGCGCCCT GTAGCGGCAC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG  
1301 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTCGCTT  
1351 TCTTCCCTTC CTTTCTGCC ACGTTGCCG GCTTCCCCG TCAAGCTTA  
1401 AATCGGGGGC TCCCTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTAC GGCACCTCGA  
1451 CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATGCCCT  
1501 GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAATAGT  
1551 GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAAACACTC AACCTATCT CGGTCTATT  
1601 TTTTGATTAA TAAGGGATT TGCGGATTT GGCCTATTGG TTAAAAAAATG  
1651 AGCTGATTAA ACAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATAACGTTT  
1701 ACAATTCCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA  
1751 CACCGCATAT GATCCGTCGA GTTCAAGAGA AAAAAAAAGA AAAAGCAAAA  
1801 AGAAAAAAGG AAAGCGGCC TCGTTCAGAA TGACACGTAT AGAATGATGC  
1851 ATTACCTTGT CATCTTCAGT ATCATACTGT TCGTATAACAT ACTTACTGAC  
1901 ATTCACTAGGT ATACATATAT ACACATGTAT ATATATCGTA TGCTGCAGCT  
1951 TTAAATAATC GGTGTCACTA CATAAGAACAC CCTTTGGTGG AGGAAACATC  
2001 GTTGGTACCA TTGGCGAGG TGGCTTCTCT TATGGCAACC GCAAGAGCCT  
2051 TGAACGCACT CTCACTACGG TGATGATCAT TCTTGCCTCG CAGACAATCA  
2101 ACGTGGAGGG TAATTCTGCT AGCCTCTGCA AAGCTTCAA GAAAATGCGG  
2151 GATCATCTCG CAAGAGAGAT CTCCTACTTT CTCCCTTTGC AAACCAAGTT  
2201 CGACAACTGC GTACGGCCTG TTCGAAAGAT CTACCACCGC TCTGGAAAGT  
2251 GCCTCATCCA AAGGCGCAA TCCTGATCCA AACCTTTTA CTCCACGCC  
2301 CAGTAGGGCC TCTTAAAG CTTGACCGAG AGCAATCCCG CAGTCTTCAG  
2351 TGGTGTGATG GTCGTCTATG TGTAAGTCAC CAATGCACTC AACGATTAGC  
2401 GACCAGCCGG AATGCTTGGC CAGAGCATGT ATCATATGGT CCAGAAACCC  
2451 TATACCTGTG TGGACGTTAA TCACCTGCGA TTGTGTGGCC TGTTCTGCTA  
2501 CTGCTTCTGC CTCTTTTCT GGGAAAGATCG AGTGTCTAT CGCTAGGGGA  
2551 CCACCCTTTA AAGAGATCGC AATCTGAATC TTGGTTTCAT TTGTAATACG  
2601 CTTTACTAGG GCTTCTGCT CTGTCATCTT TGCCCTCGTT TATCTGCCT  
2651 GCTCATTTC TAGTATATTC TTCGAAGAAA TCACATTACT TTATATAATG  
2701 TATAATTCTAT TATGTGATAA TGCCAATCGC TAAGAAAAAA AAAGAGTCAT  
2751 CCGCTAGGTG GAAAAAAAT AATGAAAATC ATTACCGAGG CATAAAAAAA  
2801 TATAGAGTGT ACTAGAGGAG GCCAAGAGTA ATAGAAAAG AAAATTGCGG  
2851 GAAAGGACTG TGTTATGACT TCCCTGACTA ATGCCGTGTT CAAACGATAC  
2901 CTGGCAGTGA CTCCTAGCGC TCACCAAGCT CTTAAAACGG AATTATGGTG  
2951 CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAACG CAGCCCCGAC  
3001 ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGA  
3051 TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG  
3101 GTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC  
3151 GCCTATTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAAGACGTCA GGTGGCACTT  
3201 TTGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTT CTAAATACAT  
3251 TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCATAA  
3301 ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA  
3351 TTCCCTTTT TGCGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTGCTCA CCCAGAAACG  
3401 CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA  
3451 CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG  
3501 AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG  
3551 GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA

3601 CTATTCTCA GATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC  
3651 TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG  
3701 AGTGATAACA CTGCCGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA  
3751 GGAGCTAACCC GCTTTTTTC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTGCCCTTG  
3801 ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC  
3851 ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAACCTGG  
3901 CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG  
3951 CGGATAAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG  
4001 TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAN CGTGGGTCTC GCGGTATCAT  
4051 TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA  
4101 CGACGGGCAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG  
4151 ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC  
4201 ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACCTCA TTTTTAATT AAAAGGATCT  
4251 AGGTGAAGAT CCTTTTGAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG  
4301 TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC  
4351 TTGAGATCCT TTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC  
4401 CACCGCTTACCGAGCGGGT TGTTTGCCTG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT  
4451 TTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCC  
4501 TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCCTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC  
4551 CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC  
4601 GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA  
4651 GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG  
4701 AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA  
4751 AGGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG  
4801 CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGG ACGTCCAGGG GGGAACGCCT  
4851 GGTATCTTAA TAGCTCTGTC GGGTTCTGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA  
4901 TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCCGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA  
4951 CGCGGCCCTT TTACGGTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT  
5001 TCTTCCTGC GTTATCCCCCT GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCTTT  
5051 GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC  
5101 AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG  
5151 CGCGTTGGCC GATTCAATTAA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG  
5201 AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAAT GTGAGTTACC TCACTCATTAA  
5251 GGCACCCCCAG GCTTTACACT TTATGCTTCC GGCTCCTATG TTGTGTGGAA  
5301 TTGTGAGCGG ATAACAATT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC  
5351 GCCAAGCTCG GAATTAACCC TCACTAAAGG GAACAAAAGC TGGGTACCGG  
5401 GCCCCCCCCCTC GAAGGCCCTAT GCGGCCA

**Πίνακας 4:** Αλληλουχία του φορέα pUTDH3myc

```
1 ACTAGTGGCC TATGCGGCC AGTCGAGTT TATCATTATC AATACTGC  
51 TTTCAAAGAA TACGTAAATA ATTAATAGTA GTGATTTCC TAACTTTATT  
101 TAGTCAAAAA ATTAGCCTT TAATTCTGCT GTAACCCGTA CATGCCAAA  
151 ATAGGGGGCG GGTTACACAG AATATATAAC ATCGTAGGTG TCTGGGTGAA  
201 CAGTTTATTCT CTGGCATCCA CTAATATATAA TGGAGCCCGC TTTTTAAGCT  
251 GGCATCCAGA AAAAAAAAGA ATCCCAGCAC CAAATATTG TTTTCTTCAC  
301 CAACCATCAG TTCATAGGTC CATTCTCTTA GCGCAACTAC AGAGAACAGG  
351 GGCACAAACA GGCAAAAAAC GGGCACAAACC TCAATGGAGT GATGCAACCT  
401 GCCTGGAGTA AATGATGACA CAAGGCAATT GACCCACGCA TGTATCTATC  
451 TCATTTCTT ACACCTTCTA TTACCTTCTG CTCTCTCTGA TTTGGAAAAAA  
501 GCTGAAAAAA AAGGTTGAAA CCAGTCCCT GAAATTATTC CCCTACTTGA
```

551 CTAATAAGTA TATAAAGACG GTAGGTATTG ATTGTAATTC TGAAATCTA  
601 TTTCTTAAAC TTCTTAAATT CTACTTTAT AGTTAGTCTT TTTTTAGTT  
651 TTAAAACACC AAGAACTTAG TTTCGAATAA ACACACAAGC TTATGGAACA  
701 GAAGCTAATA AGTGAGGAGG ATCTGAATGG ATCCGAATTC TGCAAGATATC  
751 CATCACACTG GCGGCCGCTC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC GCATCATGTA  
801 ATTAGTTATG TCACGCTTAC ATTACGCCC TCCCCCCCACA TCCGCTCTAA  
851 CCGAAAAGGA AGGAGTTAGA CAACCTGAAG TCTAGGTCCC TATTTATTTT  
901 TTTATAGTTA TGTTAGTATT AAGAACGTTA TTTATATTTC AAATTTTCT  
951 TTTTTTCTG TACAGACGCG TGTACGCATG TAACATTATA CTGAAAACCT  
1001 TGCTTGAGAA GGTTTGGGA CGCTCGAAGG CTTTAATTG CGGCCCTGCA  
1051 TTAATGAATC GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCCT ATTGGGCGCT  
1101 CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTGCGT TCGGCTGCGG  
1151 CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTAA ATACGGTTAT CCACAGAAC  
1201 AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGCCCA  
1251 GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCC  
1301 CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCAGAACCC  
1351 GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCCTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC  
1401 GCTCTCCTGT TCCGACCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTCTC  
1451 CCTTCGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG  
1501 TTCGGTGTAG GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG  
1551 TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC  
1601 CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT  
1651 TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTG AAGTGGTGGC  
1701 CTAACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG  
1751 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA  
1801 AACCAACGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC  
1851 GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT  
1901 GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTGG TCATGAGATT  
1951 ATCAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTA  
2001 AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC  
2051 TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT  
2101 AGTTGCCTGA CTCCCCGTG TGTTAGATAAC TACGATAACGG GAGCGCTTAC  
2151 CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT  
2201 CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG  
2251 TGGCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATTCA GTCTATTAAAT TGTTGCCGG  
2301 AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGGC  
2351 ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACTCTCG TCGTTGGTA TGGCTTCATT  
2401 CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT  
2451 GCAGAAAAAGC GGTTAGCTCC TTGCGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG  
2501 TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT  
2551 TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA  
2601 CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGGCC  
2651 GCGTCAATAC GGGATAATAG TGTATCACAT AGCAGAACTT TAAAGTGCT  
2701 CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC  
2751 TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA  
2801 GCATCTTTA CTTTCACCAG CGTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA  
2851 AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATAACTCA  
2901 TACTCTTCCCT TTTTCAATGG GTAATAACTG ATATAATTAA ATTGAAGCTC  
2951 TAATTGTGA GTTTAGTATA CATGCATTAA CTTATAATAC AGTTTTTAG  
3001 TTTTGCTGGC CGCATCTCT CAAATATGCT TCCCAGCCTG CTTTCTGTA  
3051 ACGTTCACCC TCTACCTTAG CATCCCTTCC CTTTGCAAAT AGTCCTCTTC

3101 CAACAATAAT AATGTCAGAT CCTGTAGAGA CCACATCATC CACGGTTCTA  
3151 TACTGTTGAC CCAATGCGTC TCCCTTGTCA TCTAAACCCA CACC GG GT  
3201 CATAATCAAC CAATCGTAAC CTTCATCTCT TCCACCCATG TCTCTTGAG  
3251 CAATAAAGCC GATAACAAAAA TCTTTGTCGC TCTTCGCAAT GTCAACAGTA  
3301 CCCTTAGTAT ATTCTCCAGT AGATAGGGAG CCCTTGCATG ACAATTCTGC  
3351 TAACATCAAAGGGCCTCTAG GTTCCTTTGT TACTTCTTCT GCCGCCTGCT  
3401 TCAAACCGCT AACAAACACCT GGGCCCACCA CACCGTGTGC ATTCGTAATG  
3451 TCTGCCATT CTGCTATTCT GTATACACCC GCAGAGTACT GCAATTGAC  
3501 TGTATTACCA ATGTCAGCAA ATTTCTGTC TTCGAAGAGT AAAAAATTGT  
3551 ACTTGGCGGA TAATGCCTT AGCGGCTTAA CTGTGCCCTC CATGGAAAAA  
3601 TCAGTCAAGA TATCCACATG TGTTTTAGT AAACAAATT TGGAACCTAA  
3651 TGCTTCAACT AACTCCAGTA ATTCCTTGGT GGTACGAACA TCCAATGAAG  
3701 CACACAAGTT TGTTGCTTT TCGTGCATGA TATTAAATAG CTTGGCAGCA  
3751 ACAGGACTAG GATGAGTAGC AGCACGTTCC TTATATGTAG CTTTCGACAT  
3801 GATTTATCTT CGTTCTGTC AGGTTTTGT TCTGTGCAGT TGGGTTAAGA  
3851 ATACTGGGCA ATTTCATGTT TCTTCAACAC TACATATGCG TATATATACC  
3901 AATCTAAGTC TGTGCTCTT CCTTCGTTCT TCCTTCTGTT CGGAGATTAC  
3951 CGAATCAAAGGGAAA AAATTCAAA GAAACCGAAA TCAAAAAAAA GAATAAAAAAA  
4001 AAAATGATGA ATTGAATTGA AAAGCTAGCT TATCGATGAT AAGCTGTCAA  
4051 AGATGAGAAT TAATTCCACG GACTATAGAC TATACTAGAT ACTCCGTCTA  
4101 CTGTACGATA CACTCCGCT CAGGTCTTG TCCTTAAACG AGGCCTTACC  
4151 ACTCTTTGT TACTCTATTG ATCCAGCTCA GCAAAGGCAG TGTGATCTAA  
4201 GATTCTATCT TCGCGATGTA GTAAAACCTAG CTAGACCGAG AAAAGAGACTA  
4251 GAAATGCAAA AGGCACCTCT ACAATGGCTG CCATCATTAT TATCCGATGT  
4301 GACGCTGCAG CTTCTCAATG ATATTCGAAT ACGCTTGAG GAGATACAGC  
4351 CTAATATCCG ACAAACTGTT TTACAGATT ACGATCGTAC TTGTTACCCA  
4401 TCATTGAATT TTGAACATCC GAACCTGGGA GTTTCCCTG AAACAGATAG  
4451 TATATTGAA CCTGTATAAT AATATATAGT CTAGCGCTT ACGGAAGACA  
4501 ATGTATGTAT TTGCGTTCCCT GGAGAAAATA TTGCACTCTAT TGCATAGGTA  
4551 ATCTTGCAAG TCGCATCCCC GGTTCATTTT CTGCGTTCC ATCTTGCACT  
4601 TCAATAGCAT ATCTTGTAA ACGAAGCATIC TGTGCTTCAT TTTGTAGAAC  
4651 AAAAATGCAA CGCGAGAGCG CTAATTTTC AAACAAAGAA TCTGAGCTGC  
4701 ATTTTACAG AACAGAAATG CAACCGGAAA GCGCTATTTT ACCAACGAAG  
4751 AATCTGTGCT TCATTTTGT AAAACAAAAA TGCAACGCGA CGAGAGCGCT  
4801 AATTTTCAA ACAAAAGAATC TGAGCTGCAT TTTTACAGAA CAGAAATGCA  
4851 ACGCGAGAGC GCTATTTAC CAACAAAGAA TCTATACTTC TTTTTGTTC  
4901 TACAAAAATG CATCCCGAGA GCGCTATTTT TCTAACAAAG CATCTTAGAT  
4951 TACTTTTTT CTCCTTGTG CGCTCTATAA TGCACTCT TGATAACTTT  
5001 TTGCACTGTA GGTCCGTTAA GTTGAAGAAGA AGGCTACTTT GGTGTCTATT  
5051 TTCTCTTCCA TAAAAAAAGC CTGACTCCAC TTCCCGCGTT TACTGATTAC  
5101 AGCGAAGCT GC GG GTGCAT TTTTCAAGA TAAAGGCATC CCCGATTATA  
5151 TTCTATACCG ATGTGGATTG CGCATACTTT GTGAACAGAA AGTGATAGCG  
5201 TTGATGATTC TTCATTGGTC AGAAAATTAT GAACGGTTTC TTCTATTTTG  
5251 TCTCTATATA CTACGTATAG GAAATGTTA CATTTCGTA TTGTTTTCGA  
5301 TTCACTCTAT GAATAGTTCT TACTACAATT TTTTGTCTA AAGAGTAATA  
5351 CTAGAGATAA ACATAAAAAA TGTAGAGGTC GAGTTAGAT GCAAGTTCAA  
5401 GGAGCGAAAG GTGGATGGGT AGGTTATATA GGGATATAGC ACAGAGATAT  
5451 ATAGCAAAGA GATACTTTG AGCAATGTT GTGGAAGCGG TATTGCAAT  
5501 GGGAAAGCTCC ACCCCGGTTG ATAATCAGAA AAGCCCCAAA AACAGGAAGA  
5551 TTGTTAAAGC AAATATTAA ATTGTAAACG TTAATATTTT GTAAAATTC  
5601 GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATT TTTAACGAAT AGCCCGAAAT

5651 CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA GGGTTGAGTG  
5701 TTGTTCCAGT TTCCAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGACTCCAAC  
5751 GTCAAAGGGC GAAAAAGGGT CTATCAGGGC GATGGCCCAC TACGTGAACC  
5801 ATCACCTAA TCAAGTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA GCAGTAAATC  
5851 GGAAGGGTAA ACGGATGCC CCATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG  
5901 AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GGGCTAGGGC  
5951 GGTGGGAAGT GTAGGGGTCA CGCTGGCGT AACCACCACA CCCGCCGGC  
6001 TTAATGGGGC GCTACAGGGC GCGTGGGGAT GATCC

**Πίνακας 5:** Αλληλουχία του φορέα pWTDH3μyc

1 CGGCCACTAG TGGCCTATGC GGCCCAGTTC GAGTTTATCA TTATCAATAC  
51 TGCCATTCA AAGAATACGT AAATAATTAA TAGTAGTGAT TTTCTTAAC  
101 TTATTTAGTC AAAAAATTAG CCTTTAATT CTGCTGTAAC CCGTACATGC  
151 CCAAAATAGG GGGCGGGTTA CACAGAATAT ATAACATCGT AGGTGTCTGG  
201 GTGAACAGTT TATTCTGGC ATCCACTAAA TATAATGGAG CCCGTTTT  
251 AAGCTGGCAT CCAGAAAAAA AAAGAATCCC AGCACCAAAA TATTGTTTC  
301 TTCACCAACC ATCAGTTCAT AGGTCCATT CTTAGCGCA ACTACAGAGA  
351 ACAGGGGCAC AAACAGGCAA AAAACGGGCA CAACCTCAAT GGAGTGATGC  
401 AACCTGCCTG GAGTAAATGA TGACACAAAGG CAATTGACCC ACGCATGTT  
451 CTATCTCATT TTCTTACACC TTCTTATTACC TTCTGCTCTC TCTGATTGG  
501 AAAAGCTGA AAAAAAAGGT TGAAACCGT TCCCTGAAAT TATTCCCTA  
551 CTTGACTAAT AAGTATATAA AGACGGTAGG TATTGATTGT AATTCTGTA  
601 ATCTATTCT TAAACTCTT AAATTCTACT TTTATAGTTA GTCTTTTT  
651 TAGTTTAAA ACACCAAGAA CTTAGTTCG AATAAACACA CAAGCTTATG  
701 GAACAGAAGC TAATAAGTGA GGAGGATCTG AATGGATCCG AATTCTGCAG  
751 ATATCCATCA CACTGGCGC CGCTCGAGCA TGCACTAGA GGGCCGCATC  
801 ATGTAATTAG TTATGTCACG CTTACATTCA CGCCCTCCCC CCACATCCGC  
851 TCTAACCGAA AAGGAAGGAG TTAGACAAACC TGAAGTCTAG GTCCCTATT  
901 ATTTTTTAT AGTTATGTTA GTATTAGAA CGTTATTAT ATTCAAAATT  
951 TTTCTTTTT TTCTGTACAG ACGCGTGTAC GCATGTAACA TTATACTGAA  
1001 AACCTTGCTT GAGAAGGTTT TGGGACGCTC GAAGGCTTTA ATTTGCGGCC  
1051 GTCGACGAGC TCCAATTGCG CCTATAGTGA GTCTGATTAC AATTCACTGG  
1101 CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACTT  
1151 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCCTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA  
1201 GGCCCGCACC GATGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT  
1251 GGCACGCG CCCCCTGTAGC GGCGCATTAA GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT  
1301 ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC CCGCTCCTT  
1351 CGCTTCTTC CCTTCCTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTT CCCCCTCAAG  
1401 CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC  
1451 CTCGACCCCA AAAAACTGAA TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC  
1501 GCCCTGATAG ACGGTTTTC GCCCTTGAC GTTGGAGTCC ACGTTCTTA  
1551 ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA CACTCAACCC TATCTCGGTC  
1601 TATTCTTTG ATTTATAAGG GATTTGCGG ATTTCTGGCT ATTGGTTAAA  
1651 AAATGAGCTG ATTTAACAAA ATTTAACGC GAATTAAAC AAAATATTAA  
1701 CGTTTACAAT TTCTGTAGTC GGTATTTCT CCTTACGCT CTGTGGCGTA  
1751 TTTCACACCG CAGGCAAGTG CACAAACAAT ACTTAAATAA ATACTACTCA  
1801 GTAATAACCT ATTTCTTAGC ATTTTGACG AAATTGCTA TTTTGTAGA  
1851 GTCTTTACA CCATTTGTCT CCACACCTCC GCTTACATCA ACACCAATAA  
1901 CGCCATTAA TCTAAGCGCA TCACCAACAT TTTCTGGCGT CAGTCCACCA  
1951 GCTAACATAA AATGTAAGCT TTCGGGGCTC TCTTGCCTTC CAACCCAGTC

2001 AGAAATCGAG TTCCAATCCA AAAGTTCAC C TGTCCCACCT GCTTCTGAAT  
2051 CAAACAAGGG AATAAACGAA TGAGGTTTCT GTGAAGCTGC ACTGAGTAGT  
2101 ATGTTGCAGT CTTTGAAA TACGAGTCTT TTAATAACTG GCAAACCGAG  
2151 GAACTCTTGG TATTCTGCC ACGACTCATC TCCATGCAGT TGGACGATAT  
2201 CAATGCCGTA ATCATTGACC AGAGCCAAA CATCCTCCTT AGGTTGATTA  
2251 CGAAACACGC CAACCAAGTA TTTCGGAGTG CCTGAACATAT TTTTATATGC  
2301 TTTTACAAGA CTTGAAATT TCCTTGAAT AACCGGGTCA ATTGTTCTCT  
2351 TTCTATTGGG CACACATATA ATACCCAGCA AGTCAGCATC GGAATCTAGA  
2401 GCACATTCTG CGGCCCTGT GCTCTGCAAG CCGCAAACCT TCACCAATGG  
2451 ACCAGAACTA CCTTGAAAT TAATAACAGA CATACTCCAA GCTGCCTTTG  
2501 TGTGCTTAAT CACGTATACT CACGTGCTCA ATAGTCACCA ATGCCCTCCC  
2551 TCTTGGCCCT CTCCTTTCT TTTTCGACC GAATTAATTC TTAATCGGCA  
2601 AAAAAGAAA AGCTCCGGAT CAAGATTGTA CGTAAGGTGA CAAGCTATTT  
2651 TTCATAAAAG AATATCTTCC ACTACTGCCA TCTGGCGTCA TAACTGCAAA  
2701 GTACACATAT ATTACGATGC TGTCTATTAA ATGCTTCCTA TATTATATAT  
2751 ATAGTAATGT CGTTGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA  
2801 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACCA CCCGCTGACG CGCCCTGACG  
2851 GGCTTGTCTG CTCCCGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG  
2901 GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGA  
2951 CGAAAGGGCC TCGTGATACG CCTATTTTA TAGGTTAATG TCATGATAAT  
3001 AATGGTTTCT TAGACGTCAG GTGGCACTTT TCAGGGAAAT GTGCGCGGAA  
3051 CCCCTATTG TTTATTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG  
3101 AGACAATAAC CCTGATAAAAT GCTTCATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT  
3151 GAGTATTCAA CATTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTT GCGGCATTTT  
3201 GCCTCCTGT TTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTAAAGT AAAAGATGCT  
3251 GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTAACAG  
3301 CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCGA AGAACGTTT CCAATGATGA  
3351 GCACTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC  
3401 GGGCAAGAGC AACTCGGTG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT  
3451 TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA  
3501 GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCAGTGA GTGATAAACAC TGCAGGCCAAC  
3551 TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTCA  
3601 CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCCTGA TCGTTGGAA CGGGAGCTGA  
3651 ATGAAGCCAT ACCAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGTAGCAATG  
3701 GCAACAACGT TGCGCAAACCT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC  
3751 CGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAAGTT GCAGGACCAC  
3801 TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA  
3851 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GCCCAGATGG  
3901 TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGCAGT CAGGCAACTA  
3951 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG  
4001 CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT  
4051 AAAACTTCAT TTTTAATTAA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA  
4101 ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA  
4151 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTCTGCG  
4201 CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT  
4251 GTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC  
4301 AGCAGAGCGC AGATACAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG  
4351 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA  
4401 TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG  
4451 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC  
4501 GGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC

4551 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CATTGAGAAA GCGCCACGCT TCCCAGAAGGG  
4601 AGAAAGGCAG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG  
4651 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GGAACGCCTG GTATCTTAT AGTCCTGTCG  
4701 GGTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG  
4751 GGGCCGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTT TACGGTTCC  
4801 GCCCTTTGC TGGCCTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG  
4851 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC  
4901 CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCAGTGAGCGAGG AAGCGGAAGA  
4951 GCGCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCAATTAA  
5001 GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGAAC  
5051 GCAATTAATG TGAGTTACCT CACTCATTAG GCACCCCCAGG CTTTACACTT  
5101 TATGCTTCCG GCTCCTATGT TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTC  
5151 ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG CCAAGCTCGG AATTAACCT  
5201 CACTAAAGGG AACAAAAGCT GGGTACCGGG CCCCCCCTCG AAGGCCTATG

**Πίνακας 6:** Αλληλουχία του φορέα PYX143 MCS

1 GGACGTTATG AAGAAGAGAT CTACGTATGG TCATTTCTTC TTCAGATTCC  
51 CTCATGGAGA AAGTGCAGCA GATGTATATG ACAGAGTCGC CAGTTCCAA  
101 GAGACTTTAT TCAGGCACCT CCATGATAGG CAAGAGAGAA GACCCAGAGA  
151 TGTTGTTGTC CTAGTTACAC ATGGTATTTA TTCCAGAGTA TTCTGATGA  
201 AATGGTTTAG ATGGACATAC GAAGAGTTG AATCGTTAC CAATGTTCC  
251 AACGGGAGCG TAATGGTGAT GGAACCTGGAC GAATCCATCA ATAGATAACGT  
301 CCTGAGGACC GTGCTACCCA AATGGACTGA TTGTGAGGGAA GACCTAACTA  
351 CATAGTGTAA AAAGATTACG GATATTTAAC TTACTTAGAA TAATGCCATT  
401 TTTTGAGTT ATAATAATCC TACGTTAGTG TGAGCGGGAT TTAAACTGTG  
451 AGGACCTTAA TACATTCTAGA CACTCTGCG GTATCACCCCT ACTTATTCCC  
501 TTCGAGAGTTA TATCTAGGAA CCCATCAGGT TGGTGGAAAGA TTACCCGTT  
551 TAAGACTTTT CAGCTTCCTC TATTGATGTT ACACCTGGAC ACCCCTTTTC  
601 TGGCATCCAG TTTTTAATCT TCAGTGGCAT GTGAGATTCT CCGAAATTAA  
651 TTAAAGCAAT CACACAATTC TCTCGGATAC CACCTCGGTT GAAACTGACA  
701 GGTGGTTTGT TACGCATGCT AATGCAAAGG AGCCTATATA CCTTGGCTC  
751 GGCTGCTGTA ACAGGAAATA TAAAGGGCAG CATAATTTAG GAGTTTAGTG  
801 AACTTGCAAC ATTTACTATT TTCCCTTCTT ACGTAAATAT TTTCTTTT  
851 AATTCTAAAT CAATCTTTT CAATTTTTG TTTGTATTCT TTTCTTGCTT  
901 AAATCTATAA CTACAAAAAA CACATACATA AACTAAAAGA ATTGGATCC  
951 AGATCTAAGC TTGTCGACGT TTAAACCTCG AGGCGGCCGC GAGCTAAAAA  
1001 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1051 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1101 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1151 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1201 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1251 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1301 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1351 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1401 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1451 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1501 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1551 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1601 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
1651 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

1701 AAAAAAAA  
1751 AAAAAAAA  
1801 AAAAAAAA  
1851 AAAAAAAA  
1901 AAAAAAAA  
1951 AAAAAAAA  
2001 AAAAAAAA  
2051 AAAAAAAA  
2101 AAAAAAAA  
2151 AAAAAAAA  
2201 AAAAAAAA  
2251 AAAAAAAA  
2301 AAAAAAAA  
2351 AAAAAAAA  
2401 AAAAAAAA  
2451 AAAAAAAA  
2501 AAAAAAAA  
2551 AAAAAAAA  
2601 AAAAAAAA  
2651 AAAAAAAA  
2701 AAAAAAAA  
2751 AAAAAAAA  
2801 AAAAAAAA  
2851 AAAAAAAA  
2901 AAAAAAAA  
2951 AAAAAAAA  
3001 AAAAAAAA  
3051 AAAAAAAA  
3101 AAAAAAAA  
3151 AAAAAAAA  
3201 AAAAAAAA  
3251 AAAAAAAA  
3301 AAAAAAAA  
3351 AAAAAAAA  
3401 AAAAAAAA  
3451 AAAAAAAA  
3501 AAAAAAAA  
3551 AAAAAAAA  
3601 AAAAAAAA  
3651 AAAAAAAA  
3701 AAAAAAAA  
3751 AAAAAAAA  
3801 AAAAAAAA  
3851 AAAAAAAA  
3901 AAAAAAAA  
3951 AAAAAAAA  
4001 AAAAAAAA  
4051 AAAAAAAA  
4101 AAAAAAAA  
4151 AAAAAAAA  
4201 AAAAAAAA



6801 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
6851 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
6901 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
6951 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7001 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7051 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7101 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7151 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7201 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7251 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7301 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7351 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7401 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7451 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7501 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7551 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7601 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7651 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7701 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7751 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7801 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7851 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7901 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
7951 AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA  
8001 AAAAAAAAAAAA AAAAAACAATT AAA

**Πίνακας 7:** Αλληλουχία του φορέα pESC-URA

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCG GAGACGGTCA  
61 CAGTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG  
121 TTGGCGGGTG TCAGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC  
181 ACCATACAC AGCTTTCAA TTCAATTCAT CATTTTTTT TTATTCTTT TTTTGATTTC  
241 GTTTCTTG AAATTTTTT GATTGGTAA TCTCCGAACA GAAGGAAGAA CGAAGGAAGG  
301 AGCACAGACT TAGATTGTA TATATACGCA TATGTAGTGT TGAAGAAACA TGAAATTGCC  
361 CAGTATTCTT AACCCAACCTG CACAGAACAA AACCTGCAG GAAACGAAGA TAAATCATGT  
421 CGAAAGCTAC ATATAAGGA CGTGTGCTA CTCATCCTAG TCCTGTTGCT GCCAAGCTAT  
481 TTAATATCAT GCACGAAAG CAAACAAACT TGTGTGCTTC ATTGGATGTT CGTACCA  
541 AGGAATTACT GGAGTTAGTT GAAGCATTAG GTCCCCAAAT TTGTTACTA AAAACACATG  
601 TGGATATCTT GACTGATTTT TCCATGGAGG GCACAGTTAA GCGCTAAAG GCATTATCCG  
661 CCAAGTACAA TTTTTTACTC TTCAAGACA GAAAATTGTC TGACATTGGT AATACAGTCA  
721 ATTGCAGTA CTCTGCGGGT GTATACAGAA TAGCAGAATG GGCAGACATT ACGAATGCAC  
781 ACGGTGTGGT GGGCCCAGGT ATTGTTAGCG GTTGAAGCA GGGCGCAGAA GAAGTAACAA  
841 AGGAACCTAG AGGCCTTTG ATGTTAGCAG AATTGTCATG CAAGGGCTCC CTATCTACTG  
901 GAGAATATAC TAAGGGTACT GTTGACATTG CGAAGAGCGA CAAAGATTT GTTATCGGCT  
961 TTATTGCTCA AAGAGACATG GGTGGAAGAG ATGAAGGTTA CGATTGGTTG ATTATGACAC  
1021 CCGGTGTGGG TTTAGATGAC AAGGGAGACG CATTGGTCA ACAGTATAGA ACCGTGGATG  
1081 ATGTGGTCTC TACAGGATCT GACATTATTA TTGTTGGAAG AGGACTATT GCAAAGGGAA  
1141 GGGATGCTAA GGTAGAGGGT GAACGTTACA GAAAAGCAGG CTGGGAAGCA TATTGAGAA  
1201 GATGCGGCCA GCAAAACTAA AAAACTGTAT TATAAGTAA TGCATGTATA CTAAACTCAC  
1261 AAATTAGAGC TTCAATTAA TTATATCAGT TATTACCTA TGCGGTGTGA AATACCGCAC  
1321 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAG CGTTAATATT TTGTTAAAT  
1381 TCGCGTTAAA TTTTTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTTAACCA ATAGGCCGAA ATCGGAAAA  
1441 TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGGTGTGCTTA GTTGGAAACA  
1501 AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAACC GTCTATCAGG  
1561 GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCT AATCAAGTTT TTTGGGGTCG AGGTGCCGTA  
1621 AAGCACTAAA TCGGAACCCCT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG  
1681 CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGGAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA  
1741 GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG

1801	GCGCGTCCAT	TCGCCATTCA	GGCTGCGCAA	CTGTTGGAA	GGCGATCGG	TGCGGGCCTC
1861	TTCGCTATTA	CGCCAGCTGA	ATTGGAGCGA	CCTCATGCTA	TACCTGAGAA	AGCAACCTGA
1921	CCTACAGGAA	AGAGTTACTC	AAGAATAAGA	ATTTTCGTTT	AAAACCTAA	GAGTCACTTT
1981	AAAATTTGTA	TACACTTATT	TTTTTATAA	CTTATTTAAT	AATAAAAATC	ATAAATCATA
2041	AGAAAATTCGC	TTATTTAGAA	GTGTCAACAA	CGTATCTACC	AACGATTGAA	CCCTTTCCA
2101	TCTTTTCGTA	AATTTCTGGC	AAGGTAGACA	AGCCGACAAAC	CTTGATTGGA	GACTTGACCA
2161	AACCTCTGGC	GAAGAATTGT	TAATTAAGAG	CTCAGATCTT	ATCGTCGTCA	TCCTTGTAAT
2221	CCATCGATAC	TAGTGCGCC	GCCCTTTAGT	GAGGGTTGAA	TTCGAATT	AAAAAATTCT
2281	TACTTTTTT	TTGGATGGAC	GCAAAGAAGT	TTAATAATCA	TATTACATGG	CATTACCACC
2341	ATATACATAT	CCATATACAT	ATCCATATCT	AATCTTACTT	ATATGTTGTG	GAATGTAAA
2401	GAGCCCCATT	ATCTTAGCCT	AAAAAAACCT	TCTCTTGGA	ACTTTCTAGTA	ATACGCTTAA
2461	CTGCTCATTG	CTATATTGAA	GTACGGATT	GAAGCCGCG	AGCGGGTGAC	AGCCCTCCGA
2521	AGGAAGACTC	TCCTCCGTGC	GTCCTCGTCT	TCACCGTCC	CGTTCTGAA	ACCGAGATGT
2581	GCCTCGGCC	GCACTGCTC	GAACAATAAA	GATTCTACAA	TACTAGCTT	TATGGTTATG
2641	AAGAGGAAAA	ATTGGCAGTA	ACCTGGCCCC	ACAAACCTTC	AAATGAACGA	ATCAAATTAA
2701	CAACCATAGG	ATGATAATGC	GATTAGTTT	TTAGCCTTAT	TTCTGGGTA	ATTAATCAGC
2761	GAAGCGATGA	TTTTGATCT	ATTAACAGAT	ATATAAATGC	AAAAACTGCA	TAACCACTT
2821	AACTAATACT	TTCAACAC	TCGGTTGT	TTACTTCTA	TTCAAATGTA	ATAAAAGTAT
2881	CAACAAAAAA	TTGTTAATAT	ACCTCTATAC	TTAACGTCA	AGGAGAAAAA	ACCCCAGGATC
2941	CGTAATACGA	CTCACTATAG	GGCCCGGGCG	TCGACATGGA	ACAGAAGTTG	ATTTCGAG
3001	AAGACCTCGA	GTAAGCTGG	TACCGGGCT	AGCTAAGATC	CGCTCTAAC	AAAAAGGAAG
3061	GAGTTAGACA	ACCTGAAGTC	TAGGTCCTA	TTTATTTTTT	TATAGTTATG	TTAGTATTAA
3121	GAACGTTATT	TATATTCAA	ATTTTCTTT	TTTTTCTGTA	CAGACCGTG	TACGCATGTA
3181	ACATTATACT	AAAAACCTTG	CTTGAGAAGG	TTTTGGGACG	CTCGAAGATC	CAGCTGCATT
3241	AATGAATCGG	CCAACCGCG	GGGAGAGGCG	GTTTGCAT	TGGCGCTCT	TCCGCTTCCT
3301	CGCTCACTGA	CTCGCTGCC	TCGGTCGTT	GGCTGCGCG	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA
3361	AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC	ACAGAACG	GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA
3421	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG	AACCGTAAAAA	AGGCCGCGTT	GCTGGCGTT	TTCCATAGGC
3481	TCCGCC	TGACGAGCAT	CACAAAATC	GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCCGA
3541	CAGGACTATA	AAGATACCG	GCGTTCCCC	CTGGAAGCTC	CCTCGTGC	TCTCCTGTT
3601	CGACCCCTGCC	GCTTACCGGA	TACCTGTCCG	CCTTCTCCC	TCGGGAAGC	GTGGCGCTTT
3661	CTCATAGCTC	ACGCTGTAGG	TATCTCAGTT	CGGTGTAGGT	CGTTGCTCC	AAGCTGGCT
3721	GTGTGCACGA	ACCCCCCGTT	CAGCCGACC	GCTGCGCTT	ATCCGTAAC	TATCGTCTT
3781	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC	GACTTATCGC	CACTGGCAGC	AGCCACTGGT	ACAGGATTA
3841	GCAGAGCGAG	GTATGTAGGC	GGTGCTACAG	AGTTCTGAA	GTGGTGGCCT	AACTACGGCT
3901	ACACTAGAAG	GACAGTATT	GGTATCTGCG	CTCTGCTGAA	GCCAGTTACC	TTCGGAAAAA
3961	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	GGCAAAACAA	CCACCGCTGG	TAGCGGTGGT	TTTTTGTTT
4021	GCAAGCAGCA	GATTACGCGC	AGAAAAAAAG	GATCTCAAGA	AGATCCTTG	ATCTTTCTA
4081	CGGGGTCTGA	CGCTCAGTGG	AACGAAAAC	CACGTTAAGG	GATTTGGTC	ATGAGATTAT
4141	CAAAAAGGAT	CTTCACCTAG	ATCCTTTAA	ATTAAAAATG	AAGTTTAA	TCAATCTAAA
4201	GTATATATGA	GTAAACTTGG	TCTGACAGTT	ACCAATGCTT	AATCAGTGA	GCACCTATCT
4261	CAGCGATCTG	TCTATTCGT	TCATCCATAG	TTGCGTACT	CCCCGTCGTG	TAGATAACTA
4321	CGATACGGGA	GGGCTTACCA	TCTGGCCCCA	GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT
4381	CACCGGCTCC	AGATTTATCA	GCAATAAAC	AGCCAGCCG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAGTG
4441	GTCCTGCAAC	TTTATCCGCC	TCCATCCAGT	CTATAATG	TTGCCGGAA	GCTAGAGTAA
4501	GTAGTTCGTC	AGTTAATAGT	TTGCGCAACG	TTGTTGCCAT	TGCTACAGGC	ATCGTGGTGT
4561	CACGCTCGTC	GTGGTGTATG	GCTTCATTCA	GCTCCGGTTC	CCAACGATCA	AGGCAGGTTA
4621	CATGATCCCC	CATGTTGTC	AAAAAGCAGG	TTAGCTCTT	CGGTCTCCG	ATCGTTGTCA
4681	GAAGTAAGTT	GGCCGCGATG	TTATCACTCA	TGGTTATGGC	AGCAGTCAT	AATTCTCTTA
4741	CTGTCATGCC	ATCCGTAAGA	TGCTTTCTG	TGACTGGTGA	GTACTCAACC	AAGTCATTCT
4801	GAGAATAGTG	TATGCGGCC	CCGAGTTGCT	CTTGGCCGGC	GTCAATACGG	GATAATACCG
4861	CGCCACATAG	CAGAACTTTA	AAAGTGCTCA	TCATTGGAAA	ACGTTCTCG	GGGCAGAAAAC
4921	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG	TTGAGATCCA	GTTCGATGTA	ACCCACTCGT	GCACCCAAC
4981	GATCTTCAGC	ATCTTTACT	TTCACCAAGCG	TTTCTGGGTG	AGCAAAACAA	GGAAGGCAA
5041	ATGCCGCAA	AAAGGGATA	AGGGCAGAC	GGAAATGTTG	AATACTCATA	CTCTTCCTT
5101	TTCAATATTA	TTGAAGCATT	TATCAGGGTT	ATTGTCTCAT	GAGCGGATAC	ATATTTGAAT
5161	GTATTTAGAA	AAATAAACAA	ATAGGGGTT	CGCGCACATT	TCCCCAAAAA	GTGCCACCTG
5221	AACGAAGCAT	CTGTGCTCA	TTTTGTAGAA	AAAAATGCA	ACCGAGAGC	GCTAATTTTT
5281	CAAACAAAGA	ATCTGAGCTG	CATTTCACA	GAACAGAAAT	GCAACGCGA	AGCGCTATT
5341	TACCAACGAA	GAATCTGTG	TTCATTTTTG	TAAAACAAA	ATGCAACGCG	AGAGCGCTAA
5401	TTTTCAAAAC	AAAGAATCTG	AGCTGCATT	TTACAGAAC	GAAATGCAAC	GCGAGAGCGC
5461	TATTTTACCA	ACAAAGAATC	TATACTCTT	TTTTGTTCTA	AAAAATGCA	TCCCGAGAGC
5521	GCTATTTTTC	TAACAAAGCA	TCTTAGATTA	CTTTTTCT	CCTTGTGCG	CTCTATAATG
5581	CAGTCTCTTG	ATAACTTTT	GCAGTGTAGG	TCCGTTAAGG	TTAGAAGAAG	GCTACTTTGG
5641	TGTCTATTTT	CTCTTCCATA	AAAAAAGCCT	GACTCCACTT	CCCGCGTTA	CTGATTACTA

5701 GCGAAGCTGC GGGTGCATTT TTTCAAGATA AAGGCATCCC CGATTATATT CTATACCGAT  
5761 GTGGATTGCG CATACTTTGT GAACAGAAAAG TGATAGCGTT GATGATTCTT CATTGGTCAG  
5821 AAAATTATGA ACGGTTCTT CTATTTGTC TCTATATACT ACCTATAGGA AATGTTTACA  
5881 TTTTCGTATT GTTTCGATT CACTCTATGA ATAGTCTTA CTACAATTAA TTTGTCTAAA  
5941 GAGTAATACT AGAGATAAAC ATAAAAAAATG TAGAGGTCGA GTTAGATGC AAGTTCAAGG  
6001 AGCGAAAGGT GGATGGGTAG GTTATATAGG GATATAGCAC AGAGATATAT AGCAAAGAGA  
6061 TACTTTGAG CAATGTTTG GGAAGCGGT TTCGCAATAAT TTTAGTAGCT CGTTACAGTC  
6121 CGGTGCGTTT TTGGTTTTT GAAAGTGCCT CTTCAGAGCG CTTTGGTTT TCAAAAGCGC  
6181 TCTGAAGTTC CTATACTTTC TAGAGAATAG GAACTTCGGA ATAGGAACCT CAAAGCGTT  
6241 CCGAAAACGA GCGCTTCCGA AAATGCAACG CGAGCTGCCG ACATACAGCT CACTGTTCAC  
6301 GTCGCACCTA TATCTGCGT TGCGCTGTAT ATATATATAC ATGAGAAGAA CGGCATAGTG  
6361 CGTGTATG CTTAAATGCG TACTTATATG CGTCTATTAA TGAGGATGA AAGGTAGTCT  
6421 AGTACCTCT GTGATATTAT CCCATTCCAT GCGGGGTATC GTATGCTTCC TTCAGCACTA  
6481 CCCTTTAGCT GTTCTATATG CTGCCACTCC TCAATTGGAT TAGTCTCATC CTTCAATGCT  
6541 ATCATTTCCT TTGATATTGG ATCATACTAA GAAACCATTAA TTATCATGAC ATTAACCTAT  
6601 AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT C

**Πίνακας 8:** Άλληλουχία του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CDS-Y95-p1326

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA  
61 CACCTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG  
121 TTGGCGGGTG TCAGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC  
181 ACCATACCAC AGCTTTTCAA TTCAATTATG CATTTTTTT TTATTCTTT TTTGATTTC  
241 GTTTCTTTG AAATTTTTT GATTCGGTAA TCTCCGAACA GAAGGAAGAA CGAAGGAAGG  
301 AGCACAGACT TAGATTGGTA TATATACGCA TATGTAGTGT TGAAGAAACA TGAATTGCC  
361 CAGTATTCTT AACCCAACCTG CACAGAACAA AAACCTCGAG GAAACGAAGA TAAATCATGT  
421 CGAAAGCTAC ATATAAGGAA CGTGTGCTA CTCATCCTAG TCCTGTTGCT GCAAGCTAT  
481 TTAATATCAT GCACGAAAAG CAAACAAACT TGTGTGCTTC ATTGGATGTT CGTACCCACCA  
541 AGGAATTACT GGAGTTAGTT GAAGCATTAG GTCCCCAAAT TTGTTACTA AAAACACATG  
601 TGGATATCTT GACTGATTT TCCATGGAGG GCACAGTTAA GCGCTAAAG GCATTATCCG  
661 CCAAGTACAA TTTTTTACTC TTCGAAGACA GAAAATTGC TGACATTGGT AATACAGTCA  
721 AATTGCGATA CTCTGCGGT GTATACAGAA TAGCAGAATG GGCAGACATT AGGAATGCAC  
781 ACGGTGTGGT GGGCCCAGGT ATTGTTAGCG GTTTGAAGCA GGCAGCAGAA GAAGTAACAA  
841 AGGAACCTAG AGGCCTTTG ATGTTAGCAG AATTGTCATG CAAGGGCTCC CTATCTACTG  
901 GAGAATATAC TAAGGGTACT GTTGACATTG CGAAGAGCGA CAAAGATTT GTTATCGGCT  
961 TTATTGCTCA AAGAGACATG GGTGGAAGAG ATGAAGGTTA CGATTGGTTG ATTATGACAC  
1021 CCGGTGTGGG TTAGATGAC AAGGGAGACG CATTGGTCA ACAGTATAGA ACCGTGGATG  
1081 ATGTTGCTC TACAGGATCT GACATTATTA TTGTTGGAAG AGGACTATTT GCAAAGGGAA  
1141 GGGATGCTAA GGTAGAGGGT GAACGTTACA GAAAAGCAGG CTGGGAAGCA TATTGAGAA  
1201 GATGCGGCCA GCAAAACTAA AAAACTGTAT TATAAGTAAA TGCAATGTATA CTAACACTCAC  
1261 AAATTAGAGC TTCAATTAA TTATATCAGT TATTACCCCTA TGCGGTGTGA AATACCGCAC  
1321 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAGA CGTTAATATT TTGTTAAAAT  
1381 TCGCGTTAAA TTTTTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTTAACCA ATAGGGCGAA ATCGGCCAAAA  
1441 TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTTGTTCCA GTTGGAAACA  
1501 AGAGTCCACT ATTAAGAAC GTGGAACCTCA ACCTCAAAGG GCGAAAACC GTCTATCAGG  
1561 GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCCT ATCAAGTTT TTGGGGTGC AGGTGCCGTA  
1621 AAGCACTAA TCGGAACCT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG GGAAGGCCGG  
1681 CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGGAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA  
1741 GTGTAGCGGT CACGCTGCCG GTAACCACCA CACCCGCCG GCTTAATGCG CCGCTACAGG  
1801 GCGCGTCCAT TCGCCATCA GGCTGCCAA CTGTTGGAA GGGCGATCGG TCGGGGCCCTC  
1861 TTCGCTATTA CGCCAGCTGA ATTGGAGCGA CCTCATGCTA TACCTGAGAA AGCAACCTGA  
1921 CCTACAGGAA AGAGTTACTC AAGAATAAGA ATTTCGTT TAAAACCTAA GAGTCACTTT  
1981 AAAATTGTA TACACTTATT TTTTTATAA CTTATTTAAT AATAAAAATC ATAATCATA  
2041 AGAAATTGCG TTATTTAGAA GTGTCACCAA CGTATCTACC AACGATTGAA CCTTTTCCA  
2101 TCTTTGCTA AATTCTGGC AAGGTAGACA AGCCGACAAAC CTTGATTGGA GACTTGACCA  
2161 AACCTCTGGC GAAGAATTGT TAATTAAGAG CTCAGATCTC TATTCTCCAA CGGGCTCAT  
2221 AACCAAGGAT TTCATATCTT CCATCATTG TTGTGGAGAT GTGAATTCTAT CGCCGCTTGC  
2281 ATACAAGTAA CACCCGATCC TGCAACCTT GAGAACATA TCTCTGCATT TTCTTGGGAA  
2341 TTGTTTCCCT TTTATATACA CAATCTCAT CAGCTGCTC CTGTTCCATT CGCCATTTC  
2401 TTGTCCTTT GTAATAGCTT CCTCTTCGGT AAAGGCGCTG TCGTCTTGT TAGCTGCTAG  
2461 CAGAAGGCTC ACGCTATTC CTGTTATTC CTTGCGTTCC TTTTCAAAGG TCTGCACGTC  
2521 GTTGAGCAGG CGGTCGACCA TCGAAACATG CCTACACAAA TCGATGCCT CTTCACTCAG  
2581 AAGCATTTCA TCGGTTAATT TTATACCCAT GAATTGCATC GACATGAGAA TGCAGATTCT  
2641 GCACCCAATT GACACCCACG AATTAGACAA GTATTCTACCC AAGCTCAGCT CGGTCTCATC  
2701 GCTCCATGTA TCTAATTCTA TCTTGAAAAT TGATAGGATT TGAACCCACA GTTTAATTAG

2761 AAAGTCTTG ACAC TGC GGC CTT GTG GAC ATG AGC CCT C TCT ACC AATT CATT CACT GT  
 2821 GTTGTATACC GCT GTG AAAA GGAT TTCAAC TTC CTG CAA CCAT ATT CTG CAG CGT TCTT  
 2881 CTCTTCCAT TCTTTACTA ATT CAAGGAT CTT GTATGAC TCTT GCT TAG TTCCGCCATG  
 2941 ATCGAATAAA TCAT CAATTA GTG TAACGGG AATAATATGT TGGGCAAAAAA CTATACGAAC  
 3001 TTCAGGCAAT TCGGGATCAC CAATAATTGC TGAAGTCAA AAATTAGCAA CGCGCAGTAC  
 3061 ATTTCTTCCA AACCTCAATG TGTCCAACCT ACAATCAGAA TACCACCTCT GCAGTTGCTC  
 3121 AAGTTCTTC CGGTGCTGGG CTTGGCACAT ATTAATATCT TGCCCTGCAA ATGACAGGAA  
 3181 ATCTTCATTA CACAGATTAG GGAACCGAGC TCTCAGAGAT CGATAATGGC TTATGTCATA  
 3241 TAGGTCGAGG TTT CGTCTAA CTCCCATTCT GTCTAATATC CCATGGTAGT TCTTCAAGTA  
 3301 GTATTCACC TGTTTGTGCA ACTTGTGTC AGGAATGGAG TTGGTGAGCA ACTGTTGCTT  
 3361 GAGAAAGGTG GTGGTCCAAC CAAGTAGTTT CTCAGACTG CTTCTTCTT CCCTTATTCT  
 3421 CTCTTGTGCT GCTCTGTAAA GCTCGATCAC CGTCGCCACG TCAATCGTT GCAGATCAAC  
 3481 ACGCTCTTG TCAGCATACG GAGCCAGTGC CTCTAATGAA ACTTCATATC CTTTACTCG  
 3541 CAAAAGTCTG AACGCCATTG CATGAGTAGT AACGTCCGAA TATATTTCGC TATCTTCTC  
 3601 TCTCCATGAT CTG TATGTT CTC TCAAAT TGAGTCGATT TCGGATTGGA AGTATCGGT  
 3661 GACGCCAAC CTCTGGAGGG TGTCGATTAT ACACAGGCTC GATGGTATAT TC GGCGCGGA  
 3721 TTTGATGGCC GCAGGGCAG CCAGAGGATT ATCATCTTCC CGTTAAATT TCTCTTTAT  
 3781 TTTCCCGATC AAATCAGTTG GAGGAGTTGC GAGGCTGCAA AC GCGCTTAA ACGATCGCTT  
 3841 AGTAGCGGCG ATGGCCGGAA AGATTTGGAA TGCATGACGT GGAAATTCT CTCTCCTTCT  
 3901 CATGGGGCCG CTC TTTAGT GAGGTTGAAT TCGAATTTC AAAAATTCTT ACTTTTTTT  
 3961 TGGATGGACG CAAAGAAGTT TAATAATCAT ATTACATGGC ATTACACCCA TATACATATC  
 4021 CATATACATA TCCATATCTA ATCTTACTTA TATGTTGTGG AAATGTAAG AGCCCCATTA  
 4081 TCTTACGCTA AAAAACCTT CTCTTGGAA CTTTCAGTAA TACGCTTAAC TGCTATTGC  
 4141 TATATTGAAG TACGGATTAG AAGCCGCCGA GCGGGTGACA GCCCTCCGAA GGAAGACTCT  
 4201 CCTCCGTGCG TCTCGTCTT CACCGTCGC GTTCCGTAAA CGCAGATGTG CCTCGCGCCG  
 4261 CACTGCTCCG AACAAATAAG ATTCTACAAT ACTAGCTTT ATGGTTATGA AGAGGAAAAA  
 4321 TTGGCAGTAA CCTGGCCCCA CAAACCTTCA AATGAACGAA TCAAATTAAAC AACCATAGGA  
 4381 TGATAATGCG ATTAGTTTT TAGCCTTATT TCTGGGTAA TTAATCAGCG AAGCGATGAT  
 4441 TTTTGATCTA TTAACAGATA TATAATGCA AAAACTGCAT AACCACTTA ACTAATACTT  
 4501 TCAACATTT CGGTTGTAT TACTTCTTAT TCAAATGTAA TAAAAGTATC AACAAAAAAT  
 4561 TGTTAATATA CCTCTATACT TTAACGTCAA GGAGAAAAA CCCCGGATCC ATGGCGCC  
 4621 TGACTTGCCA AAC TCGTGC AAGCAGCTAT CGAAAGTGC GGAATGTCGA GTAGCAAATC  
 4681 TGGATACGTC ACAACTGAGT GAAAAACACA CTTCTCCTAT TCAAACCTCC GATGAGGTGA  
 4741 ATGAAAAGAT GGGGGACTAT ATTGAGTACG TGAAGAATCT TTTGATGACG TCCGGGACG  
 4801 GGCGAATAAG CGTGTGCCCC TACGACACGT CGATAATCGC CCTAATCAAG GACTGAAAG  
 4861 GGCGCGACGC CCCGCA GTT CCGAGTCC CCATCGTGC TCGAGTGGAT CGCGCGGAAC CAAAGGGCGG  
 4921 ATGGCTCGTG GGGCAGTCAA TTCTTCTGCA TTTACGACCG GATTCTAAAT ACATTAGCAT  
 4981 GTGTCGTTGC CTGAAATCG TGGAATCTT AC GCTCACAT GATCCAAAAA GGC GTGACAT  
 5041 ACGTCAATGA AAATGTGAC AAAC TCAAAG ATGGAATAT TGAGCACATG ACATCGGGGT  
 5101 TCGAAATCGT GGT TCCC CGCC CTT GTT CAAA GAGC CAGAGA CTTGGGCATC CAAGGCCTAC  
 5161 CTTATGATCA TCC TCTCATC AAGGAGATTG CTAACACGAA ACAAGGAAGA TTAAAAAAGA  
 5221 TCCCCAAGGA TATGATATAC CAAACACCAA CGACTTTACT ATTCA GTT GAGGATTGG  
 5281 AAGATTTGGA TTGGGAAAAG ATTCTGAAAC TGCAGTCAGG CGATGGCTCT TTCTCACTT  
 5341 CTCCGTGTC CACTGCCAG GTGTTCATGA AGACCAAAAGA TGAAAATGC TTGAAATTCA  
 5401 TCGAGAACGC CGTCAAGAAT TGC GATGGAG GAGCGCCACA TACCTATCCA GTCGATGTCT  
 5461 TCGCAAGGCT TTGGGCA GT CACAGACTAC AACGCCTAGG GATTCCCGT TTCTTCA  
 5521 AGGAAATTAA GTATTTCTTA GACCACATCA ACAGCGTTTG GACAGAAAAC GGC GTTTCA  
 5581 GTGGTAGAGA TTCCGAATT TGCGATACCTC ATGATACCTC TATGGGCATC AGACTACTCA  
 5641 AAATGCATGG ATACAACGTC GATCCAATG CACTTAATCA TTCAAGCAG CCAGATGGGA  
 5701 AATTTCCTTG CTACGGTGGT CAAATGATCG AGTCTGCATC TCCAATATAC AATCTCTAC  
 5761 GGGCAGCTCA ACTGCGATT CCAGGAGAAG AAATTCTGTA AGAAGGCCACT AAATTGCGCT  
 5821 ATAAC TTTT GCAAGAAAAG ATAGCCAACA ACCAATTCA AGAAAATGG GTGATATCCG  
 5881 AGCACTTGAT AGATGAGGTT AAGCTGGGC TGAAGATGCC ATGGTACGCC ACTCTACCC  
 5941 GAGTTGAGGC TGCCTATTAT CTACAATATT ATGCTGCATC TGACGACGTA TGGATTGGCA  
 6001 AGGTTTCTA CAGGATGCC GAAATCAGCA ACGACACATA CAAAGAGCTC GCGGTATTGG  
 6061 ACTTCAACAG ATGCCAGGCC CAACATCAGT TCGAATGGAT TTATATGCAA GAATGGTATC  
 6121 ACAGAAGCAG CGTTAGTGAAT TCGGGATAA GCAAGAAAGA GCTGCTTCGT GCTTACTTT  
 6181 TGGCCGCAGC AACCATATTT GAACTGATA GAACTCAAGA GAGGCTTGTG TGGGCCAAAA  
 6241 CCCAAATTGT TTCTAAGATG ATCACATCAT TTGTTACCA TGGCACTACA CTATCTTGG  
 6301 ACCAAAAGAC TGCAC TTTA TCACAAATTG GACATAATT TGAGCACATC GATGAAATAA  
 6361 TTAGTGCAT GAAAGATCAC GGACTGGCTG GGACCCCTGTT GACAACCTC CAGCAGCTC  
 6421 TAGACGGATT CGACAGATAC ACTGCCATC AGCTGAAAAA TGCGTGGAGC CAATGGTTCA  
 6481 TGAAATTGCA GCAAGGAGAG GCGAAGGGCG GGGAAAGACGC AGAGCTCCAA GCAAACATGT  
 6541 TGAACATCTG CGCCGGTCTC ATTGTTCA ATGAAAGACGT ATTGTCGAC CATGAATACA  
 6601 CGGCTTTTC CACCCACT AACAAATAT GCAAGCGCCT CACCCAAATT CAAGATAGAA

6661 AGATGCTGGA AGTTGTGGAG GGGAGCATAA AGGATAAGGA ACTGGAACAA GATATGCAGG  
 6721 CGTGGTGAA GTTAGTGTCTT GAAGAAAATG GCAGCGGCAT GGACAGAACG ATCAAACAGA  
 6781 CATTTTGTC GGTTTCAAG ACTTTTACT ACAGCGCTA CCACGATGAT GAGACCACCG  
 6841 ATGCTCATAT CTTCAAAGTA CTCTTGGAC CGGTCGTAAG TAGCGGTAGC GGCAAGCCAAT  
 6901 TCATGGCTTC AGAAAAAGAA ATTAGGAGAG AGAGATTCTT GAACGTTTC CCTAAATTAG  
 6961 TAGAGGAATT GAACGCATCG CTTTGGCTT ACGGTATGCC TAAGGAAGCA TGTGACTGGT  
 7021 ATGCCCACTC ATTGAACATAC AACACTCCAG GCGGTAAGCT AAATAGAGGT TTGTCCGTTG  
 7081 TGGACACGTA TGCTATTCTC TCCAACAAGA CCGTTGAACA ATTGGGCAA GAAGAATACG  
 7141 AAAAGGTTGC CATTCTAGGT TGGTGCATTG AGTTGTTGCA GGCTTACTTC TTGGTCGCCG  
 7201 ATGATATGAT GGACAAGTCC ATTACCAGAA GAGGCCAACCC ATGTTGGTAC AAGGTTCCCTG  
 7261 AAGTTGGGA AATTGCCATC AATGACGCAT TCATGTTAGA GGCTGCTATC TACAAGCTTT  
 7321 TGAAATCTCA CTTCAGAAC GAAAAAACT ACATAGATAT CACCGAATTG TTCCATGAGG  
 7381 TCACCTTCCA AACCGAACATTG GGCCAAATTGA TGGACTTAAT CACTGCACCT GAAGACAAAG  
 7441 TGGACTTGTAG TAAGTCTCC CTAAGAACG ACTCCTTCAT AGTTACTTTC AAGACTGCTT  
 7501 ACTATTCTT CTACTTGCCT GTCGCATTGG CCATGTACGT TGCCGGTATC ACGGATGAAA  
 7561 AGGATTGAA ACAAGCCAGA GATGCTTGA TTCCATTGGG TGAATACTTC CAAATTCAAG  
 7621 ATGACTACTT AGACTGCTTC GGTACCCCCAG AACAGATCGG TAAGATCGGT ACAGATATCC  
 7681 AAGATAACAA ATGTTCTGG GTAATCAACA AGGCATTGGA ACTTGTCTTC GCAGAACAAA  
 7741 GAAAGACTTT AGACGAAAT TACGGTAAGA AGGACTCAGT CGCAGAACGCC AAATGCAAAA  
 7801 AGATTTCAA TGACTTGAA ATTGAACACGC TATACCACGA ATATGAAGAG TCTATTGCCA  
 7861 AGGATTGAA GGCCAAAATT TCTCAGGTG ATGAGTCTCG TGGCTCAAA GCTGATGTCT  
 7921 TAACTGCGTT CTTGAACAAA GTTCAACAAGA GAAGCAAATA GTATCTCGAG TAAGCTTGGT  
 7981 ACCGCGGCTA GCTAAGATCC GCTCTAACCG AAAAGGAAGG AGTTAGACAA CCTGAAGTCT  
 8041 AGGTCCCCTAT TTATTTTTT ATAGTTATGT TAGTATTAAG AACGTTATTT ATATTCAAA  
 8101 TTTTCTTTT TTTTCTGTAC AGACCGTGT ACGCATGAA CATTATACTG AAAACCTTGC  
 8161 TTGAGAAGGT TTTGGGACGC TCGAAGATCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG  
 8221 GGAGAGGCAGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTCGCCT  
 8281 CGGTCGTTCG GCTGCGGGCA GCGGTATCAG CTCACTCAA GGCGGTAAATA CGGTTATCCA  
 8341 CAGAACATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACAA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA  
 8401 ACCGTAAGAA GGCGCGTTG CTGGCGTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC  
 8461 ACAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG  
 8521 CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTCTC GACCCGTCCG CTTACCGGAT  
 8581 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT CGGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT  
 8641 ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCCGTTC  
 8701 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG  
 8761 ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG  
 8821 GTGCTACAGA GTTCTTGAAAG TGGTGGCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG  
 8881 GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG  
 8941 GCAAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTG CAAGCAGCAG ATTACCGC  
 9001 GAAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTGA TCTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGG  
 9061 ACGAAAACCTC ACGTTAAGGG ATTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA  
 9121 TCCTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTTGGT  
 9181 CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTCGTT  
 9241 CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT  
 9301 CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG  
 9361 CAATAAACCA GCCAGCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCCTGCAACT TTATCCGCCT  
 9421 CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT  
 9481 TGCACACGT TGGTGCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGT ACGCTCGTCG TTTGGTATGG  
 9541 CTTCAATTCTAG CTCCGGTCTC CAACGATCAA GGCAGGTTAC ATGATCCCCC ATGTTGTGCA  
 9601 AAAAGCGGT TAGCTCTTC GGTCTCCGA TCGTGGTCAAG AAGTAAGTTG GCGCCAGTGT  
 9661 TATCACTCAT GGTTATGGCA GCACCTGCATA ATTCTCTTAC TGTCACTGCCA TCCGTAAGAT  
 9721 GCTTTCTGT GACTGGTGTAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCAGGCGAC  
 9781 CGAGTTGCTC TTGCCCCGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC AGAAACTTAA  
 9841 AAGTCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTCGG GGCAGAAACT CTCAAGGATC TTACCGCTGT  
 9901 TGAGATCCAG TTGATGTAA CCCACTCGT CACCCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT  
 9961 TCACCAAGCGT TTCTGGTGA GCAAAACAG GAAGGCAAAGA TGCCGAAAA AAGGAAATAA  
 10021 GGGCGACACG GAAATGTGA ATACTCATAC TCTTCCTTT TCAATATTAT TGAAGCATT  
 10081 ATCAGGGTTA TTGTCATG AGCGGATACA TATTGATG TATTAGAAA AATAAACAAA  
 10141 TAGGGGTTCC GCGCACATT CCCGAAAAG TGCCACCTGA ACGAAGCATIC TGTCCTCAT  
 10201 TTTGTAGAAC AAAATGCAA CGCGAGAGCG CTAATTTTC AAACAAAGAA TCTGAGCTGC  
 10261 ATTTTACAG AACAGAAATG CAACGCGAAA GCGCTATTT ACCAACGAAG AATCTGTGCT  
 10321 TCATTTTGT AAAACAAAAA TGCAACGCGA GAGCGCTAAT TTTCAAACA AAGAATCTGA  
 10381 GCTGCATTT TACAGAACAG AAATGCAACAG CGAGAGCGCT ATTTTACCAA CAAAGAATCT  
 10441 ATACTCTTT TTTGTTCTAC AAAATGCAT CCCGAGAGCG CTATTTTCT AACAAAGCAT  
 10501 CTTAGATTAC TTTTTTCTC CTTGTGCGC TCTATAATGC AGTCTCTGTA TAACTTTTG

10561 CACTGTAGGT CCGTTAAGGT TAGAAGAAGG CTACTTGGT GTCTATTTTC TCTTCCATAA  
 10621 AAAAACGCTG ACTCCACTTC CCGCGTTAC TGATTACTAG CGAAGCTGCG GGTGCATTT  
 10681 TTCAAGATAA AGGCATCCCC GATTATATT TATACCGATG TGGATTGCGC ATACTTGTG  
 10741 AACAGAAAGT GATAGCGTTG ATGATTCTTC ATTGGTCAGA AAATTATGAA CGGTTCTTC  
 10801 TATTTGTCT CTATATACTA CGTATAGGAA ATGTTACAT TTTCGTATTG TTTCGATTG  
 10861 ACTCTATGAA TAGTTCTTAC TACAATT TTTGCTAAAG AGTAATACTA GAGATAAAC  
 10921 TAAAAAAATGT AGAGGTCGAG TTAGATGCA AGTCAAGGA GCGAAAGGTG GATGGTAGG  
 10981 TTATATAGGG ATATAGCACA GAGATATATA GCAAAGAGAT ACTTTGAGC AATGTTGTG  
 11041 GAAGCGGTAT TCGCAATATT TTGAGTAGCTC GTTACAGTCC GGTGCGTTT TGGTTTTTG  
 11101 AAAGTGCCTG TTCAGAGCGC TTTTGGTTT CAAAAGCGCT CTGAAGTTCC TATACTTTCT  
 11161 AGAGAATAGG AACTTCGGAA TAGGAACCTC AAAGCGTTT CGAAAACGAG CGCTTCCGAA  
 11221 AATGCAACGC GAGCTGCGCA CATACAGCTC ACTGTTCACG TCGCACCTAT ATCTGCGTGT  
 11281 TGCGCTGTATA TATATATACA TGAGAAGAAC GGCATAGTGC GTGTTTATGC TAAATGCGT  
 11341 ACTTATATGC GTCTATTTAT GTAGGATGAA AGGTAGTCTA GTACCTCTG TGATATTATC  
 11401 CCATTCCATG CGGGGTATCG TATGCTTCT TCAGCACTAC CCTTTAGCTG TTCTATATGC  
 11461 TGCCACTCCT CAATTGGATT AGTCTCATCC TTCAATGCTA TCATTCCTT TGATATTGGA  
 11521 TCATACTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG  
 11581 CCCTTCGTC

**Πίνακας 9:** Αλληλουχία του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CDS-Y95-SCLS

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA  
 61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG  
 121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC  
 181 ACCATACAC AGCTTTCAA TTCAATTATC CATTTTTTTT TTATTCTTTT TTTGATTTC  
 241 GGTTCTTTG AAATTTTTT GATTGGTAA TCTCCGAACA GAAGGAAGAA CGAAGGAAGG  
 301 AGCACAGACT TAGATTGGTA TATATACGCA TATGTTAGTGT TGAAGAAACA TGAAATTGCC  
 361 CAGTATTCTT AACCCAACCTG CACAGAACAA AAACCTGCAG GAAACGAAGA TAAATCATGT  
 421 CGAAAGCTAC ATATAAGGAA CGTGCTGCTA CTCATCCTAG TCCTGTTGCT GCCAAGCTAT  
 481 TTAATATCAT GCACGAAAAG CAAACAAACT TGTGTGCTTC ATTGGATGTT CGTACCCACCA  
 541 AGGAATTACT GGAGTTAGTT GAAGCATTAG GTCCCAAAT TTGTTACTA AAAACACATG  
 601 TGGATATCTT GACTGATTTT TCCATGGAGG GCACAGTTAA GCCGCTAAAG GCATTATCCG  
 661 CCAAGTACAA TTTTTACTC TTCGAAGACA GAAAATTGC TGACATTGGT AATACAGTCA  
 721 AATTGCACTA CTCTGCGGGT GTATACAGAA TAGCAGAATG GGCAGACATT ACGAATGCAC  
 781 ACGGTGTGGT GGGCCCAGGT ATTGTTAGCG GTTGAAGCA GGCAGCAGAA GAAGTAACAA  
 841 AGGAACCTAG AGGCCTTTTG ATGTTAGCAG AATTGTCTG CAAGGGCTCC CTATCTACTG  
 901 GAGAATATAC TAAGGGTACT GTTGACATTG CGAAGAGCAG CAAAGATTTT GTTATCGGCT  
 961 TTATTGCTCA AAGAGACATG GGTGGAAGAG ATGAAGGTTA CGATTGGTTG ATTATGACAC  
 1021 CCGGTGTGGG TTTAGATGAC AAGGGAGACG CATTGGTCA ACAGTATAGA ACCGTGGATG  
 1081 ATGTTGGTCTC TACAGGATCT GACATTATTA TTGTTGGAAG AGGACTATTT GCAAAGGGAA  
 1141 GGGATGCTAA GGTAGAGGGT GAACGTTACA GAAAAGCAGG CTGGGAAGCA TATTGAGAA  
 1201 GATCGGGCCA GCAAAACTAA AAAACTGTAT TATAAGTAA TGCATGTATA CTAAACTCAC  
 1261 AAATTAGAGC TTCAATTAA TTATATCAGT TATTACCCCTA TGCAGGTGTGA AATACCGCAC  
 1321 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAA CGTTAATATT TTGTTAAAAT  
 1381 TCGCGTTAAA TTTTGTAA ATCAGCTCAT TTTTAACCA ATAGGCCAA ATCGGCAAA  
 1441 TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG GTTGTCTCA GTTGGAAACA  
 1501 AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAACC GTCTATCAGG  
 1561 GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCC AATCAAGTTT TTTGGGTCG AGGTGCCGTA  
 1621 AAGCACTAAA TCGGAACCCCT AAAGGGAGCC CCCGATTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG  
 1681 CGAACGTTGGC GAGAAAGGAA GGAAAGAAC CGAACAGGAGC GGGCCTAGG GCGCTGGCAA  
 1741 GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG  
 1801 GCGCGTCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG TGCGGGCCTC  
 1861 TTCGCTATTA CGCCAGCTGA ATTGGAGCGA CCTCATGCTA TACCTGAGAA AGCAACCTGA  
 1921 CCTACAGGAA AGAGTTACTC AAGAATAAGA ATTTCGTTT TAAAACCTAA GAGTCACTTT  
 1981 AAAATTGTA TACACTTATT TTTTTATAA CTATTTAAT AATAAAAATC ATAAATCATA  
 2041 AGAAATTGCG TTATTTAGAA GTGTCAACAA CGTATCTACC AACGATTGAA CCCTTTCCA  
 2101 TCTTTGCTA AATTCTGGC AAGGTAGACA AGCCGACAAC CTTGATTGGA GACTTGACCA  
 2161 AACCTCTGGC GAAGAATTGT TAATTAAGAG CTCAGATCTT CAATTCTACG TTGATCCCAT  
 2221 AAGCATAAAA CGTACCCCTA GCCATCTCCA AAAATACATC TTTGCATCTT CTTGGCAAAA  
 2281 TGCTTCTTT TTTATACACA ATCTGCAACA CTTTCTCCA GTGATATTCA ACCATTCAT  
 2341 TGATCTCTGC AATGGCTTC TCTTCACTAA CTTTCTTCC ATCTTCTCA GTGCTAGTA  
 2401 GAATGCTATA ACTTTTCCCT GCAATATTTT CCTCGCGCTC CCTCTCAGAA CTGCACACGT  
 2461 CGTTGAGCAG CGGGCCGACC ATACAGACAT GCCTAGCCAA ATCAGTGCAC TCTTCACTCA  
 2521 TAAGCATTTC ATCGGACAAT TTTACTCCGA CGAATTGCA CGTCAGGAGA CCTGTCAGCC  
 2581 GGGAACCGTT CGACAACCAAC GACGAAGAAA TGTATTGATC GAAGCTTGCG TCGCGTGCAT

2641 TGCTCCATGT ATCTAATTCT ATCTTGAAAG CTGAGAGTAT TTCAACCCAC AATTTGACTA  
2701 GAAACTCTT CACACTACGC CCCTGTCGA CACGAGCCT CTCCGCCAAC TCATTTACTG  
2761 TATTGTACAA CGCCATAAAA AGGATCTCAA GCTCCTCAGA TCCGTAAC TCTCTGACTA GCATCCGGAT  
2821 TCTCCTTCCA TTCTTTACT AATTCAATGA TCTTGTACAA CTCTGACTA GAGCCATGAC  
2881 AGTCGAAAAA ATCATCCATA ATTGTTACAA GCACAGATGT TTTAGCAAAT GCGAGACGAA  
2941 CATAGTCAAA CGCATGATCA CCAATAATT ATAAGGCCA ATAATTAGCA ACAATAACTA  
3001 CATCTCTTCC AAAGTTAAT GTGTCACACC TACAATCTGC ATACCACCTT TGCAAGTTGTT  
3061 GAAGTCCTTT CTGGTTCTGG GCTTCATGTA TATCGAAATC YTGCCTTGCG AAAACTAGAA  
3121 AATCTTCGTT GCATAAATTAA GAGAACCTGT TTGTAGATT CAGAGCTGA TAGTAGGTCA  
3181 TGTCAATAG CTCGAGGTT CGTCTAGCTC CCAATCTTAT GGTTATGCCT TTGTAATTCC  
3241 TCAAGTAGAA TTCCACCAGT TTGTCAGTT TTTTGTCAAGG AATTGAGTTA TCTTGCACCTT  
3301 GCTTATTGAG AAAGATGGTA GTCCAAGCAA GAATTTTTTC AAGACTCCTC TCTTCTTCAT  
3361 ATATTCTCTC ATTTGCTGCT CTATAAAGCT CAATAATCAT CGGCAGGTCA TTTGTTGCT  
3421 GGCTAACAGC CTCTTGGTT CCATATGGAG CCAACTCCTC TGATGAAACT TCGTATCCTT  
3481 TCACTCGCAA AAGCCTAAAT GCCATTGCT GAGTAGTAAC GTTGCATAT ATAACCTTGT  
3541 GTTTTCTTG CCACAACTG AATGTGTTAT CTAAAATAGT GTTGATTCA TATTGGAAGA  
3601 ATTGATCGAC CCCAACCTT TGAAGGGTGT CGATTATACA CAAATTAGAG GGTATATCCT  
3661 CGGATCGAAG AGTCGTGTC GTTGGAAATT TATCGTCTTC CCTCTTGAAA TTCTCTTC  
3721 TTTTGCAT GAAATCTATT GTAGTAAGGC TGCACTTAAC GATGAGACGT GATCTATTGG  
3781 GGGTGGTCAC AGGAAATCCT TGGACTGGAA AATTTCTT CCTGCTCCC ACTCTTGGC  
3841 CGGAGAAAGG CGTAACCTCG ACCTGAAAGG CGAGCGACAT CGGGCCGCC TTTAGTGAGG  
3901 GTTGAATTCG AATTTTCAAA AATTCTTACT TTTTTTTGAG ATGGACGAA AGAAGTTAA  
3961 TAATCATATT ACATGGCATT ACCACCATAT ACATATCCAT ATACATATCC ATATCTAATC  
4021 TTACTTATAT GTTGTGGAAA TGTAAAGAGC CCCATTATCT TAGCTAAAA AACCTTCTC  
4081 TTTGAACTT TCAGTAAATAC GCTTAACCTGC TCATTGCTAT ATTGAAGTAC GGATTAGAAG  
4141 CCGCCGAGCG GGTGACAGCC CTCCGAAGGA AGACTCTCTC CCGTGCCTCC TCGTCTTC  
4201 CGGTCGCGTT CCTGAAACGC AGATGTGCCT CGGCCGCAC TGCTCCGAAC AATAAAGATT  
4261 CTACAATACT AGCTTTATG GTTATGAAGA GGAAAAATTG GCAGTAACCT GGCCCCCACAA  
4321 ACCTTCAAAT GAACGAATCA AATTAACAAAC CATAGGATGA TAATGCGATT AGTTTTTAG  
4381 CCTTATTTC GGGGTAAATTAA ATCAGCGAAG CGATGATTT TGATCTATTAA ACAGATATAT  
4441 AAATGAAAAA ACTGCATAAC CACTTTAACT AATACTTCA ACATTTCGG TTTGTATTAC  
4501 TTCTTATTCA AATGTAAATAA AAGTATCAAC AAAAATTGT TAATATACCT CTATACTTTA  
4561 ACGTCAAGGA GAAAAAACCC CGGATCCATG GCGCCCTGA CTTGCCAAAC TCGTCGAAG  
4621 CAGCTATCGA AAGTGACCGA ATGTCGAGTA GCAAATCTGG ATACGTCACA ACTGAGTGA  
4681 AAACACACTT CTCCTATTCA AACTCCCGAT GAGGTGAATG AAAAGATGGG GGACTATATT  
4741 GAGTACGTGA AGAATCTTT GATGACGTCC GGGGACGGGC GAATAAGCGT GTCGCCCTAC  
4801 GACACGTCGA TAATGCCCT AATCAAGGAC TTGAAAGGGC GCGACGCCCG GCAGTTCCA  
4861 TCGTGTCTCG AGTGGATCGC CGGAAACCAA AGGGCGGATG GCTCGTGGGG CGATCAATT  
4921 TTCTGCATTTC ACGACCGGAT TCTAAATACA TTAGCATGT TGCTGCCTT GAAATCGTGG  
4981 AATCTTCAGC CTCACATGAT CCAAAAGGGC GTGACATAGC TCAATGAAAA TGTGCACAAA  
5041 CTCAAAGATG GGAATATTGA GCACATGACA TCGGGGTTCG AAATCGTGGT TCCCGCCCTT  
5101 GTTCAAAGAG CCAGAGACTT GGGCATCCAA GGCCTACCTT ATGATCATCC TCTCATCAA  
5161 GAGATTGCTA ACACGAAACA AGGAAGAGTA AAAAAGATCC CCAAGGGATAT GATATACAA  
5221 ACACCAACGA CTTTACTATT CAGTTGGAA GGATTGGAAG ATTTGGATTG GGAAAAGATT  
5281 CTGAAACTGC AGTCAGCGA TGGCTCTTC CTCACTTCTC CGTGTCCAC TGCCCAGGTG  
5341 TTCATGAAGA CCAAAGATGA AAAATGCTTG AAATTCTATCG AGAACGCCGT CAAGAATTGC  
5401 GATGGAGGAG CGCCACATAC CTATCCAGTC GATGTCTCG CAAGGCTTTG GGCAGTCGAC  
5461 AGACTACAAAC GCCTAGGGAT TTCCCGTTTC TTTCAGAAGG AAATTAAGTA TTTCTTAGAC  
5521 CACATCAACA CGGTTGGAC AGAAAACGGC GTTTTCACT GTAGAGATTC CGAATTTC  
5581 GATATCGATG ATACCTCTT GGGCATCAGA CTACTAAAAA TGCATGGATA CAAACGTCGAT  
5641 CCAAATGCAC TTAATCATTT CAAGCAGCCA GATGGGAAT TTTCTTGCTA CGGTGGTCAA  
5701 ATGATCGAGT CTGCATCTCC AATATACAAT CTCTACAGGG CAGCTCAACT GCGATTTCCA  
5761 GGAGAAGAAA TTCTTGAAAGA AGCCACTAAA TTTGCCTATA ACTTTTGCA AGAAAAGATA  
5821 GCCAACAACC AATTCAGAA AAAATGGGTG ATATCCGAGC ACTTGATAGA TGAGGTTAAG  
5881 CTCGGGCTGA AGATGCCATG GTACGCCACT CTACCCCGAG TTGAGGCTGC CTATTATCTA  
5941 CAATATTATG CTGCATCTGA CGACGTATGG ATTGGCAAGG TTTCTACAG GATGCCAGAA  
6001 ATCAGCAACG ACACATACAA AGAGCTCGCG GTATTGGACT TCAACAGATG CCAGGCACAA  
6061 CATCAGTTCG AATGGATTAA TATGCAAGAA TGGTATCACA GAAGCAGCGT TAGTGAATT  
6121 GGGATAAGCA AGAAAGAGCT GCTTCGTGCT TACTTTCTGG CCGCAGCAAC CATATTGAA  
6181 CCTGATAGAA CTCAAGAGAG GCTTGTGTGG GCCAAAACCC AAATTGTTTC TAAGATGATC  
6241 ACATCATTTG TTACCAATGG CACTACACTA TCTTTGGACC AAAAGACTGC ACTTTTATCA  
6301 CAAATTGGAC ATAATTTCGA TGGCCTCGAT GAAATAATTA GTGCAATGAA AGATCACCGA  
6361 CTGGCTGGGA CCCTGTTGAC AACCTCCAG CAGCTCTAG ACGGATTGCA CAGATACACT  
6421 CGCCATCAGC TGAAAATGC GTGGAGCCAA TGGTTCATGA AATTGCAAGCA AGGAGAGGGC  
6481 AACGGGGGG AAGACGCAGA GCTCCAAGCA AACATGTTGA ACATCTGC CCGTCTCATT

6541 GCTTCAATG AAGACGTATT GTCGCACCAT GAATACACGG CTCTTTCCAC CCTCACTAAC  
 6601 AAAATATGCA AGCGCCTCAC CCAAATTCAA GATAGAAAGA TGCTGGAAGT TGTGGAGGG  
 6661 AGCATAAAGG ATAAGGAACT GGAACAAGAT ATGCAGCGT TGGTAAGTT AGTGCTTGAA  
 6721 GAAAATGGCG CGGGCATGGA CAGAACATC AAACAGACAT TTTTGTGCGT TTTCAAGACT  
 6781 TTTTACTACA GCGCCTACCA CGATGATGAG ACCACCGATG CTCATATCTT CAAAGTACTC  
 6841 TTTGACCGG TCGTAGGTTAG CGGTAGCGC AGCCAATTCA TGGCTTCAGA AAAAGAAATT  
 6901 AGGAGAGAGA GATTCTTGAA CGTTTCCCT AAATTAGTAG AGGAATTGAA CGCATCGCTT  
 6961 TTGGCTTACG GTATGCCTAA GGAAGCATGT GACTGGTATG CCCACTCATT GAACTACAAC  
 7021 ACTCCAGGCG GTAAGCTAAA TAGAGGTTTG TCCGTTGTGG ACACGTATGC TATTCTCTCC  
 7081 AACAAAGACCG TTGAACAATT GGGGCAAGAA GAATACGAAA AGGTTGCCAT TCTAGGTTGG  
 7141 TGCATTGAGT TGTTGCAGGC TTACTTCTTG GTGCGCCGATG ATATGATGGA CAAGTCCATT  
 7201 ACCAGAAGAG GCCAACCATG TTGGTACAAG GTTCCCTGAAG TTGGGAAAT TGCCATCAAT  
 7261 GACGCATTCA TGTTAGAGGC TGCTATCTAC AAGCTTTGA AATCTCACTT CAGAAACGAA  
 7321 AAATACTACA TAGATATCAC CGAATTGTT CATGAGGTCA CCTTCCAAAC CGAATTGGGC  
 7381 CAATTGATGG ACTTAATCAC TGCACCTGAA GACAAAGTGG ACTTGAGTAA GTTCTCCCTA  
 7441 AAGAACGACT CCTTCATAGT TACTTTCAAG ACTGCTTACT ATTCTTCTA CTTGCCTGTC  
 7501 GCATGGCCA TGTACGTTGC CGGTATCACG GATGAAAAGG ATTTGAAACA AGCCAGAGAT  
 7561 GTCTGATTG CATTGGGTGA ATACTCCAA ATTCAAGATG ACTACTTACA CTGCTTCGGT  
 7621 ACCCCAGAAC AGATCGGTAA GATCGGTACA GATATCCAG ATAACAAATG TTCTGGGTA  
 7681 ATCAACAAAGG CATTGGAACT TGCTTCCGCA GACAAAGAA AGACTTTAGA CGAAAATTAC  
 7741 GGTAAGAAGG ACTCACTCGC AGAACCCAAA TGCAAAAAAGA TTTTCAATGA CTTGAAAATT  
 7801 GAACAGCTAT ACCACGAATA TGAAGAGTCT ATTGCCAAGG ATTTGAAGGC CAAAATTCT  
 7861 CAGGTCGATG AGTCTCGTGG CTTCAAAGCT GATGTCTTAA CTGCTTCTT GAACAAAGTT  
 7921 TACAAGAGAA GCAAATAGTA TCTCGAGTAA GCTTGGTACC GCGGCTAGCT AAGATCCGCT  
 7981 CTAACCGAAA AGGAAGGAGT TAGACAACT GAAAGTCTAGG TCCCCTATTAA TTTTTTATA  
 8041 GTTATGTTAG TATTAAGAAC GTTATTATA TTTCAAATTI TTCTTTTTT TCTGTACAGA  
 8101 CGCGTGTACG CATGTAAACAT TATACTGAAA ACCTTGCTTG AGAAGGTTT GGGACGCTCG  
 8161 AAGATCCAGC TGCATTAATG AATCGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT GCGTATTGGG  
 8221 CGCTCTCCG CTTCCCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCCGCT GCGGCAGCG  
 8281 GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA  
 8341 AAGAACATGT GAGCAAAGG CCAGCAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG  
 8401 GCGTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG  
 8461 AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC  
 8521 GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCCTT TCTCCCTTCG  
 8581 GGAAGCGTGG CGCTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTGCGT  
 8641 CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCACT CCGACCGCTG CGCCTTATCC  
 8701 GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATGCCACT GGCAGCAGCC  
 8761 ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG  
 8821 TGGCTTAACGACGGCTACAC TAGAAGGACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA  
 8881 GTTACCTTCG GAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC  
 8941 GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAGGATC TCAAGAAGAT  
 9001 CCTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT  
 9061 TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC ACTTAGATCC TTTTAAATTAA AAAATGAAGT  
 9121 TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC  
 9181 AGTGGAGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC  
 9241 GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGG TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCATGATA  
 9301 CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAGG  
 9361 GCCGAGCGCA GAGTGGTCC TGCAACTTTA TCCGCCCTCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC  
 9421 CGGGAAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTTGCG GCAACGTTGT TGCCATTGCT  
 9481 ACAGGCATCG TTGTTGTCACG CTCGTCGTTT GGATGGCTT CATTCACTC CGGGTCCCAA  
 9541 CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCCTCGGT  
 9601 CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA  
 9661 CTGCATAATT CTCTTACTGTT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC  
 9721 TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGCTCTT CCGGGCGTCA  
 9781 ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT  
 9841 TCTTCGGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTT CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC  
 9901 ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA  
 9961 AAAACAGGAA GGCACAAATGC CGCAAAAGG GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA  
 10021 CTCATACTCT TCCTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATTC AGGGTTATTG TCTCATGAGC  
 10081 GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTCCGCG CACATTCCC  
 10141 CGAAAAGTGC CACCTGAACG AAGCATCTGT GCTTCATTT GTAGAACAAA AATGCAACGC  
 10201 GAGAGCGCTA ATTTTTCAA CAAAGAATCT GAGCTGCATT TTTACAGAAC AGAAAATGCA  
 10261 CGCGAAAGCG CTATTTTAC AACGAAGAAT CTGTGCTTCA TTTTGTAAGAACAAAATGC  
 10321 AACCGCAGAG CGCTAATTAA TCAAACAAAG AATCTGAGCT GCATTTTAC AGAACAGAAA  
 10381 TGCAACGCGA GAGCGCTATT TTACCAACAA AGAATCTATA CTTCTTTTTT GTTCTACAAA

10441 AATGCATCCC GAGAGCGCTA TTTTTCTAAC AAAGCATCTT AGATTACTTT TTTTCTCCTT  
10501 TGTGCGCTCT ATAATGCGAT CTCTTGATAA CTTTTTGAC TGTAGGTCCG TTAAGGTTAG  
10561 AAGAAGGCTA CTTGGGTGTC TATTTTCTCT TCCATAAAAA AAGCCTGACT CCACCTCCCC  
10621 CGTTTACTGA TTACTAGCGA AGCTGCGGGT GCATTTTTC AAGATAAAAGG CATCCCCGAT  
10681 TATATTCTAT ACCGATGTGG ATTGCGCATA CTTTGTGAAC AGAAAGTGAT AGCGTTGATG  
10741 ATTCTTCATT GGTCAGAAAA TTATGAACGG TTTCTTCTAT TTTGCTCTA TATACTACGT  
10801 ATAGGAAATG TTTACATTT CGTATTGTT TCGATTCACT CTATGAATAG TTCTTACTAC  
10861 AATTTTTTG TCTAAAGAGT AATACTAGAG ATAAACATAA AAAATGTAGA GGTGAGTTT  
10921 AGATGCAAGT TCAAGGAGCG AAAGGTGGAT GGGTAGGTTA TATAGGGATA TAGCACAGAG  
10981 ATATATAGCA AAGAGATACT TTTGAGCAAT GTTTGTGAA GCGGTATTG CAATATTTTA  
11041 GTAGCTCGTT ACAGTCGGT GCGTTTTGG TTTTTGAAA GTGCGTCTTC AGAGCGCTTT  
11101 TGGTTTCAA AAGCGCTCTG AAGTTCCTAT ACTTTCTAGA GAATAGGAAC TTCGGAATAG  
11161 GAACTTCAA GCGTTTCCGA AACGAGCGC TTCCGAAAAT GCAACCGCAG CTGCGCACAT  
11221 ACAGCTCACT GTTCACGTG CACCTATATC TGCCTGTGTC CTGTATATAT ATATACATGA  
11281 GAAGAACGGC ATAGTGCCTG TTTATGCTTA AATGCGTACT TATATGCGTC TATTTATGTA  
11341 GGATGAAAGG TAGTCTAGA CCTCCTGTGA TATTATCCA TTCCATGCGG GGTATCGTAT  
11401 GCTTCCTTC GCACTACCTT TTAGCTGTT TATATGCTGC CACTCCTCAA TTGGATTAGT  
11461 CTCATCCTTC AATGCTATCA TTTCCCTTGA TATTGGATCA TACTAAGAAA CCATTATTAT  
11521 CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCGTC

**Πίνακας 10:** Αλληλουχία του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CLS-Y95-p1326

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA  
61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG  
121 TTGGCGGGTG TCAGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC  
181 ACCATACCAC AGCTTTCAA TTCAATTATC CATTTTTTT TTATTCTTT TTTGATTTC  
241 GGTTTCTTTG AAATTTTTT GATTGGTAA TCTCCGAACA GAAGGAAGAA CGAAGGAAGG  
301 AGCACAGACT TAGATTGGTA TATATACGCA TATGTAGTGT TGAAGAAACA TGAAATTGCC  
361 CAGTATTCTT AACCCAACCTG CACAGAACAA AAACCTGCAG GAAACGAAGA TAAATCATGT  
421 CGAAAGCTAC ATATAAGGAA CGTGTGCTA CTCATCCTAG TCCTGTTGCT GCCAAGCTAT  
481 TTAATATCAT GCACGAAAG CAAACAAACT TGTGTGCTTC ATTGGATGTT CGTACCCACCA  
541 AGGAATTACT GGAGTTAGTT GAAGCATTAG GTCCCAAAT TTGTTACTA AAAACACATG  
601 TGGATATCTT GACTGATTT TCCATGGAGG GCACAGTTAA GCGCTAAAG GCATTATCCG  
661 CCAAGTACAA TTTTTACTC TTCGAAGACA GAAAATTGTC TGACATTGGT AATACAGTCA  
721 AATTGAGTA CTCTGCGGT GTATACAGAA TAGCAGAATG GGCAGACATT AGGAATGCAC  
781 ACGGTGTGGT GGGCCCAGGT ATTGTTAGCG GTTGAAGCA GGCAGCAGAA GAAGTAACAA  
841 AGGAACCTAG AGGCCTTTTG ATGTTAGCAG AATTGTCATG CAAGGGCTCC CTATCTACTG  
901 GAGAATATAC TAAGGGTACT GTTGACATTG CGAAGAGCGA CAAAGATTT GTTATCGGCT  
961 TTATTGCTCA AAGAGACATG GGTGGAAGAG ATGAAGGTTA CGATTGGTTG ATTATGACAC  
1021 CCGGTGTGGG TTTAGATGAC AAGGGAGACG CATTGGGTCA ACAGTATAGA ACCGTGGATG  
1081 ATGTTGCTC TACAGGATCT GACATTATTA TTGTTGAAAG AGGACTATTT GCAAAGGGAA  
1141 GGGATGCTAA GTAGGAGGT GAACGTTACA GAAAAGCAGG CTGGGAAGCA TATTTGAGAA  
1201 GATGCGGCCA GCAAAACTAA AAAACTGTAT TATAAGTAA TGCAATGTATA CTAACACTCAC  
1261 AAATTAGAGC TTCAATTAA TTATATCAGT TATTACCCCTA TGCGGTGTGA AATACCGCAC  
1321 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAGA CGTTAATATT TTGTTAAAAT  
1381 TCGCGTTAAA TTTTGTAA ATCAGCTCAT TTTTAACCA ATAGGGCGAA ATCGGCACAA  
1441 TCCCTTAAAT ACAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTGTTCCA GTTGGAAACA  
1501 AGAGTCCACT ATAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAACC GTCTATCAGG  
1561 GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCCT AATCAAGTT TTTGGGTGAG AGGTGCCGT  
1621 AACCACTAAA TCGGAACCC AAAGGAGCC CCCGATTAG AGCTTGACGG GAAAAGCCGG  
1681 CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGGAGGAGC GAAAAGGAGC GGGCGTAGG GCGCTGGCAA  
1741 GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCCACCA CACCCGCGCG GCTTAATGCG CCGCTACAGG  
1801 GCGCGTCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGAA GGGCGATCGG TGCAGGGCCTC  
1861 TTCGCTTAAAT CGCCAGCTGA ATTGGAGCGA CCTCATGCTA TACCTGAGAA AGCAACCTGA  
1921 CCTACAGGAA AGAGTTACTC AAGAATAAGA ATTTTCGTT TAAAACCTAA GAGTCACTTT  
1981 AAAATTGTA TACACTTATT TTTTTTATAA CTTATTTAAT AATAAAAATC ATAAATCATA  
2041 AGAAATTGCG TTATTTAGAA GTGTCACAA CGTATCTACC AACGATTGAA CCCTTTCCA  
2101 TCTTTCTGTA AATTTCTGGC AAGGTAGACAGA AGCCGACAA CTTGATTGGA GACTTGACCA  
2161 AACCTCTGGC GAAGAATTGT TAATTAAGAG CTCAGATCTC TATTCTCCAA CGGGCTCAT  
2221 AACCAAGGAT TTCAATCTT CCATCATTTG TTGTGGAGAT GTGAATTCTAT CGCCGCTTGC  
2281 ATACAAGTAA CACCCGATCC TGCATACCTT GAGAAACATA TCTCTGCATT TTCTGGGAA  
2341 TTTGTTCCCT TTTATATACA CAATCTCAT CAGCTGTCTC CTGTTCCATT CGGCCATTTC  
2401 TTTGCGCTTT GTAATAGCTT CCTCTCGGT AAAGGCCTG TCGTCTTGT TAGCTGCTAG  
2461 CAGAAGGCTC ACGCTATTC CTGTATTTC CTTGCGTTCC TTTCAAAGG TCTGCACGTC  
2521 GTTGAGCAGG CGGTCGACCA TCGAACATG CCTACACAAA TCGATGCCT CTTCACTCAG

2581 AAGCATTCA TCGGTTAATT TTATACCCAT GAATTGCATC GACATGAGAA TGCAGATTCT  
 2641 GCACCCAATT GACACCCACG AATTAGACAA GTATTCATCC AAGCTCAGCT CCGTCTCATC  
 2701 GCTCCATGTA TCTAATTCTA TCTTGAAAAT TGATAGGATT TGAACCCACA GTTTAATTAG  
 2761 AAAGTCTTG ACACTGCGCC CTTGTGCGAC ATGAGCCCTC TCTACCAATT CATTCACTGT  
 2821 GTTGATACC GCTGTGAAAA GGATTTCAAC TTCCTCGCAA CCATATTCTG CAGCGTTCTT  
 2881 CTCTTCCAT TCTTTACTA ATTCAAGGAT CTTGTATGAC TCTTGCTTAG TTCCGCCATG  
 2941 ATCGAATAAA TCATCAATT GTGTAACGGG AATAATATGT TGGGCAAAAA CTATACGAAC  
 3001 TTCAGGCAAT TCGGGATCAC CAATAATTGC TGAAGTCAAA AAATTAGCAA CGCGCAGTAC  
 3061 ATTTCTTCCA AACCTCAATG TGTCCAACCT ACAATCAGAA TACCACCTCT GCAGTTGCTC  
 3121 AAGTTCTTCC CGGTGCTGGG CTTGGCACAT ATTAAAATCT TGCCCTCGCAA ATGACAGGAA  
 3181 ATCTTCATTA CACAGATTAG GGAACCGAGC TCTCAGAGAT CGATAATGGC TTATGTCATA  
 3241 TAGGTCGAGG TTTCGTCTAA CTCCCATTCT GTCTAATATC CCATGGTAGT TCTTCAAGTA  
 3301 GTATTCCACC TGGTTGTGCA ACTTGTGTC AGGAATGGAG TTGGTGAGCA ACTGTTGCTT  
 3361 GAGAAAGGTG GTGGTCCAAC CAAGTAGTTT CTCAAGACTG CTTTCTTCTT CCCTTATTCT  
 3421 CTCTTGCTG GCTCTGTAAA GCTCGATCAC CGTCGCCACG TCAATCGTTT GCAGATCAAC  
 3481 ACGCTTGTG TCAGCATACG GAGCCAGTGC CTCTAATGAA ACTTCATATC CTTTACTCG  
 3541 CAAAAGTCTG AACGCCATTG CATGAGTAGT AACGTCGCAA TATATTTCGC TATCTTCTC  
 3601 TCTCCATGAT CTGTATGTT CCTCTAAAAT TGAGTCGATT TCGGATTGGA AGTATCGGT  
 3661 GACGCCAAC CTCTGGAGGG TGTCGATTAT ACACAGGCTC GATGGTATAT TCGGCGCGA  
 3721 TTTGATGGCC GCAGCGGCAG CCAGAGGATT ATCATTTTC CGGTTAAATT TCTCTTTAT  
 3781 TTTCCCGATC AAATCAGTTG GAGGAGTTGC GAGGCTGCAA ACGGCGTTAA ACGATCGCTT  
 3841 AGTAGCGGCG ATGGCCGGAA AGATTTGAA TGCAATGACGT GGAAAATTCT CTCTCCTTCT  
 3901 CATGGGGCCG CCCTTTAGTG AGGGTTGAAT TCGAATTTTC AAAAATTCTT ACTTTTTTT  
 3961 TGGATGGACG CAAAGAAGTT TAATAATCAT ATTACATGGC ATTACACCAC TATACATATC  
 4021 CATATACATA TCCATATCTA ATCTTACTTA TATGTTGTGG AAATGTAAG AGCCCCATTA  
 4081 TCTTAGCCTA AAAAACCTT CTCTTGGAA CTTTCAGTAA TACGTTAAC TGCTCATTGC  
 4141 TATATTGAAG TACGGATTAG AAGCCGCCGA GCGGGTGACA GCCCTCCGAA GGAAGACTCT  
 4201 CCTCCGTGCG TCCTCGTCTT CACCGGTGCG GTTCCGTAAA CGCAGATGTG CCTCGCGCCG  
 4261 CACTGCTCCG AACAAATAAG ATTCTACAAT ACTAGCTTT ATGGTTATGA AGAGGAAAAA  
 4321 TTGGCAGTAA CCTGGCCCCA CAAACCTCA AATGAACGAA TCAAATTAAAC AACCATAGGA  
 4381 TGATAATGCG ATTAGTTTT TAGCCTTATT TCTGGGGTAA TTAATCAGCG AAGCGATGAT  
 4441 TTTTGATCTA TTAACAGATA TATAAATGCA AAAACTGCAT AACCACTTTA ACTAATACTT  
 4501 TCAACATTTT CGGTTGTAT TACTTCTTAT TCAAATGTA TAAAAGTATC AACAAAAAAT  
 4561 TGTTAATATA CCTCTATACT TTAACGTCAA GGAGAAAAAA CCCC GGATCC ATGAGATGCA  
 4621 GCGCCAGCG GACGCCCGAA CCACTGGCTC AAGGCTAAA CGGTGGCAGA GATGGCGTGG  
 4681 AGGCGATACA GAGGTTGCAA ACAATTGCGG ATGATAAGAT CGACGGAGGA GCCAATGAGT  
 4741 TGGGAATTGT GGGTTGGGAT CTGATTAGGG ATGGTGTGGA CGCGTGTAAA TCCATGTTG  
 4801 ATTCCATGGG AGATGGAGAT ATAAGCATCT CTGCCTACGA TACCGCATGG GTTGCTCTGG  
 4861 TTAAGGATGT CAATGGCAGC GGCGGCCCTC AGTTTCCCTC CTCCTCCAG TGGATCGTCG  
 4921 ACAATCAGCT CCCGGATGGT TCTTGGGGT ACAGTGAAGT ATTTCCGCA TACGATCGTC  
 4981 TCCTCAAGAC TTTAGCTTGT GTTGTGCCT TGAAATCATG GAATATTCTG CCTGACAAAT  
 5041 GCCAAAAAGG GTTGAAGTTC TTTAGAGATA ACATAAGCAA GCTTGAAAAG GAAAATGTAG  
 5101 AGGCTTCAGC GCAAATGCTG AGCGGGTTTG AAGTTGTGTT TCTTCCCTT ATTGAAGTAG  
 5161 CTCGCGTTT AGACATTCAA ATTCCCTCTAC ATTCTCCTGT TTTCGAAGAC CTAATTGCTA  
 5221 GGAGAAATCT GAAATTGCA AAGATACCGT TGGACTTAAT GCACAATGTA CCGACGTCT  
 5281 TACTCAATAG CTGGAGGGG ATGACAGGAG TGGAAATTGGA CTGGGAAAAG CTTCTGAAAT  
 5341 TGCAGAGCCA AGATGGTTCA TTTATCACT CCCCGTCTC CACTGCTTTC GCTTGTATGC  
 5401 AGACCAATGA CACAAAGTGT TTGGGTTACT TGAAATTGTG GGTCCAAAAG TTCAACGGCG  
 5461 GTGCCCCAGG TCAGTACCCCT GTAGAAATCT TCGAGCGTAT TTGGGTTGTT GATGCCCTAC  
 5521 AACGCTCTAGG GATTCAAGA TATTTCAGC TGGAGATTAA AGAATGTTGT TTGGATTATG  
 5581 CTTTCAAACA TTGGACCCAG TATGGGAGTA GTTGGGCAAG AAATACTCCA GTGTATGACC  
 5641 TTGATGATAC CTGCATGGCT TTTAGGATAC TAAGGTTACA TGGCTACGAT GTTCTGCTG  
 5701 AAGCATTTCG TCACTTTGAA AAAAACGGAG TCTTCTTCTG CTTCGGGTGG GAAACAACTC  
 5761 AGTCGTAAC CGTGAACCTC AATCTGTACA GAGCAACTCA AGTGGCCTT CCTGGAGAAA  
 5821 ATATTCTCAA GGAAGCAAAG CAGTTTCTT TCAACTTTTT GATGAAAAAA CAGGCTGCTC  
 5881 GTGAGTTCCA GGACAAATGG GTCATTTGA AGGACTTTCC TGGTGAGCTG AAGTATGCAT  
 5941 TAGAGTTCC TTGGTATGCT AGCTTGCCTA GAGTGGAGAC CAGATTTAC GTTGAGCAGT  
 6001 ATGGAGGTGA CAATGACGTC TGGATTGGCA AGACTCTTCA CAGGATGCC TATATAATA  
 6061 ATAATGTTTA TCTTGAACTG GCTAAGCTGG ACTTCACAA TTGCCAGGCT TTGCAACAGAA  
 6121 AGGAATGGGA GACTATGCAA AAGTGGTCA TGGAGAGCAA GTTGGATGAA TTTGGGGTGA  
 6181 GTAGTAAAC CCTACTTGAA TCATACTTTC TCGCTGCTGC CAGTATATTC GAACCAGAGA  
 6241 GATCAACGGA GCGGCTTGCC TGGGCAAGA CGGCATTCTC GATGGAGACT ATTGGCTCTT  
 6301 ACTTGATGA TGAAATGAAC TCCAAGGATT TGAGAAAAG CTTCGTCCAA GAGTTAAAAA  
 6361 ACATCTACGA AAGAAGAATG GAAGCAAAG GGACGAAATG GAACCTTATT ATCATCTTGC  
 6421 TAACGACCCCT CAACCACTTG ACGGAGGTCT GTGGTAGAGA CATCAACTCA TATCTTGCC

6481 ATTCTTGGGA GAAATGGATG ATGATGTGGG AGCCGGAAGG CGACAGGTAC AAAGGGGCAG  
 6541 CGGAACTGCT GTCAAATTCT ATAATCTAA GTTCCGGCCG CCTGTTCTCG AATGATACTG  
 6601 TGTCTCACCC AAATTATGAA AAGCTCGTCA CTCTCTCGAA TAAATTATGC CATCAACTCG  
 6661 GTAATTCCCG TAGAGGAAAC CATAATGAGG ATTCAAGATAT CAAGGACACT AAAATCGAGA  
 6721 TTGCTATGCA AGAACTTGTG CAGTAGTGC ATCAAAAATC CTCGGATGAC ATTAGCATGG  
 6781 ATTAAAGCA AACCTTCTTC GCGGGGTAA GGAGCTTTA CTATGCTGCC CATTGTGATC  
 6841 GGGGAACCAT CAACTCTCAT ATTGTTAAAG TACTTTTGATCAGTTGTT CTCGACGGTA  
 6901 GCGGCAGCGG TAGCGGTAGC GGCAGCGAAT TCATGGCTTC AGAAAAAGAA ATTAGGAGAG  
 6961 AGAGATTCTT GAACGTTTC CCTAAATTAG TAGAGGAATT GAACGCATCG CTTTGGCTT  
 7021 ACGGTATGCC TAAGGAAGCA TGTGACTGGT ATGCCACTC ATTGAACATC AACACTCCAG  
 7081 GCGGTAAGCT AAATAGAGGT TTGTCGTTG TGGACACGTA TGCTATTCTC TCCAACAAGA  
 7141 CCGTTGAACA ATTGGGCAAA GAAGAATACG AAAAGGTTGC CATTCTAGGT TGTCGATTG  
 7201 AGTGTGCA GGCTTACTTC TTGGTCGCCG ATGATATGAT GGACAAGTCC ATTACAGAA  
 7261 GAGGCCAACC ATGTTGGTAC AAGGTTCTG AAGTTGGGAA ATTGCCATC AATGACGCAT  
 7321 TCATGTTAGA GGCTGCTTC TACAAGCTT TGAAATCTCA CTTCAGAAAC GAAAATACT  
 7381 ACATAGATAT CACCGAATTG TTCCATGAGG TCACCTTCCA AACCGAATTG GCCAATTGA  
 7441 TGGACTTAAT CACTGCACCT GAAGACAAAG TGGACTTGAG TAAGTCTCC CAAAGAAC  
 7501 ACTCTTCAT AGTTACTTC AAGACTGCTT ACTATTCTT CTACTGCCT GTCGCATTGG  
 7561 CCATGTACGT TGCCGGTATC ACGGATGAAA AGGATTGAA ACAAGCCAGA GATGTCTTGA  
 7621 TTCCATTGGG TGAATCTTC CAAATTCAAG ATGACTACTT AGACTGCTTC GGTACCCCAG  
 7681 AACAGATCGG TAAGATCGGT ACAGATATCC AGATAACAA ATGTTCTTGG GTAAATCAACA  
 7741 AGGCATTGGA ACTTGCTTC GCAGAACAAA GAAAGACTTT AGACGAAAT TACGGTAAGA  
 7801 AGGACTCAGT CGCAGAACCC AAATGAAAAA AGATTTCAA TGACTTGAAA ATTGAACAGC  
 7861 TATACCACGA ATATGAAGAG TCTATTGCCA AGGATTGAA GGCAAAATT TCTCAGGTG  
 7921 ATGAGTCTCG TGGCTCAAA GCTGATGCT TAATGCGTT CTTGAAACAAA GTTACAAGA  
 7981 GAAGCAAATA GTATCTGGAG TAAGCTTGGT ACCGGCGCTA GCTAAAGATCC GCTCTAACCG  
 8041 AAAAGGAAGG AGTTAGACAA CCTGAAGTCT AGGTCCCTAT TTATTTTTTT ATAGTTATGT  
 8101 TAGTATTAAG AACGTTATTT ATATTCTAAA TTTTCTTTT TTTTCTGTAC AGACGCGTGT  
 8161 ACGCATGTAA CATTATACTG AAAACCTTGC TTGAGAAGGGT TTTGGGACGC TCGAAGATCC  
 8221 AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACCGCGG GGAGAGGCGG TTTGGTATT GGGCGCTCTT  
 8281 CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTGTTG GCTGGCGCGA GCGGTATCAG  
 8341 CTCACTCAA GGCGGTAAATA CGGTATCCA CAGAACGAGG GGATAACGCA GGAAGAAC  
 8401 TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCGCGTTG CTGGCGTTT  
 8461 TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC ACAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC  
 8521 GAAACCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT  
 8581 CTCCTGTTCC GACCCTGGCG CTTACCGGAT ACCTGTCCCG CTTTCTCCCT TCGGGAAAGCG  
 8641 TGGCGTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGAGGTC GTTCGCTCCA  
 8701 AGCTGGCTG TGTGACGAA CCCCCCGTTC AGCCCGACCG CTGCGCTTA TCCGGTAAC  
 8761 ATCGTCTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA  
 8821 ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGAGGCG GTGCTACAGA GTTCTGAAAG TGGTGGCCTA  
 8881 ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG GTATCTGCCG TCTGCTGAAAG CCAGTTACCT  
 8941 TCGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAAACAAAC CACCCTGGT AGCGGTGGT  
 9001 TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACCGCAG GAAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
 9061 TCTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAAATC ACCTAAGGG ATTTGGTCA  
 9121 TGAGATTATC AAAAAGGATC TTACCTAGA TCCTTTAAAT TTAAATGAA AGTTTAAAT  
 9181 CAATCTAAAG TATATATGAG TAAATCTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG  
 9241 CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTCGTT CATCCATAGT TGCGTACTC CCCGCTGTGT  
 9301 AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG  
 9361 ACCCACGCTC ACCGGCTCA GATTATCAG CAATAAACCA GCCAGCGGA AGGGCCGAGC  
 9421 GCAGAACTGG TCCTGCAATTATCCG CCATCCAGTC TATTAATTGT TCGGGGAAG  
 9481 CTAGAGTAAG TAGTCGCCA GTTAATAGTT TGCGAACCGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA  
 9541 TCGGGTGTCA ACGCTCGTCG TTTGGTATGG CTTCATTCAG CTCCGGTTCC CAACGATCAA  
 9601 GGCGAGTTAC ATGATCCCCC ATGATGTGCA AAAAGCGGT TAGCTCTTC GGTCCTCCGA  
 9661 TCGTTGTCAAG AAGTAAGTT GCCCGAGTGT TATCACTCAT GTTATGGCA GCACTGCATA  
 9721 ATTCTCTTAC TGTCACTGCCA TCCGTAAGAT GCTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA  
 9781 AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCCGGC TCAATACGGG  
 9841 ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACCTTAA AAGTGCTCAT CATTGAAAAA CGTTCTCGG  
 9901 GGGAAAACCT CTCAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTGATGTAA CCCACTCGT  
 9961 CACCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTACTT TCACCGCGT TTCTGGGTGA GCAAAACAG  
 10021 GAAGGCAAA TGCCGAAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATAC  
 10081 TCTCCTTT TCAATATTAT TGAAGCATTG ATCAGGGTTA TTGTCATG AGCGGATACA  
 10141 TATTGAAATG TATTTAGAAA AATAAACAA TAGGGGTTCC GCGCACATT CCCGAAAAG  
 10201 TGCCACCTGA ACGAAGCATC TGTGCTTCAT TTTGTAGAAC AAAATGCAA CGCGAGAGCG  
 10261 CTAATTTTC AAACAAAGAA TCTGAGCTGC ATTTTACAG AACAGAAATG CAACGCGAAA  
 10321 GCGCTATTT ACCAACGAAG AATCTGTGCT TCATTTTGT AAAACAAAAA TGCAACGCGA

10381 GAGCGCTAAT TTTCAAACA AAGAACATG A GTCGATTT TACAGAACAG AAATGCAACG  
 10441 CGAGAGCGCT ATTTTACCAA CAAAGAACAT ATACTTCTTT TTTGTTCTAC AAAATGCAT  
 10501 CCCGAGAGCG CTATTTTCT AACAAAGCAT CTTAGATTAC TTTTTTCTC CTTGTGCGC  
 10561 TCTATAATGC AGTCTCTGA TAACTTTG CACTGTAGGT CCGTTAAGGT TAGAAGAAGG  
 10621 CTACTTGGT GTCTATTTCTC TCTTCATAA AAAAGCCTG ACTCCACTTC CCGCGTTAC  
 10681 TGATTACTAG CGAAGCTGCG GGTGCATTT TTCAAGATAA AGGCATCCC GATTATATTC  
 10741 TATACCGATG TGATTGCGC ATACTTGTG AACAGAAAGT GATAGCGTTG ATGATTCTTC  
 10801 ATTGGTCAGA AAATTATGAA CGGTTCTTC TATTTGTCT CTATATACTA CGTATAGGAA  
 10861 ATGTTACAT TTCGTATTG TTTCGATTG ACTCTATGAA TAGTTCTTAC TACAATTTT  
 10921 TTGTCAAAG AGTAATACTA GAGATAAACAA TAAAAAATGT AGAGGTCGAG TTTAGATGCA  
 10981 AGTTCAAGGA GCGAAAGGTG GATGGTAGG TTATATAGGG ATATAGCACA GAGATATATA  
 11041 GCAAAGAGAT ACTTTGAGC AATGTTGTG GAAGCGGTAT TCGCAATATT TTAGTAGCTC  
 11101 GTTACAGTCC GGTGCGTTT TGGTTTTTG AAAGTGCCTC TTCAGAGCGC TTTTGGTTT  
 11161 CAAAGCGCT CTGAAGTCC TATACTTCT AGAGAATAGG AACTTCGGA TAGGAACCTC  
 11221 AAAGCGTTTC CGAAAACGAG CGCTTCCGAA AATGCAACGC GAGCTGCGCA CATACAGCTC  
 11281 ACTGTCACG TCGCACCTAT ATCTGCGTGT TGCGTGTATA TATATATACA TGAGAAGAAC  
 11341 GGCATAGTGC GTGTTATGCG TTAAATGCGT ACTTATATGC GTCTATTTAT GTAGGATGAA  
 11401 AGGTAGTCTA GTACCTCTG TGATATTATC CCATTCCATG CGGGGTATCG TATGCTTCCT  
 11461 TCAGCACTAC CCTTAGCTG TTCTATATGC TGCCACTCCT CAATTGGATT AGTCTCATCC  
 11521 TTCAATGCTA TCATTTCTT TGATATTGGA TCATACTAAG AAACCATTAT TATCATGACA  
 11581 TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACCGAGG CCCTTCGTC

**Πίνακας 11:** Αλληλουχία του κατασκευασμένου φορέα pESC-URA/CLS-Y95-SCLS

1 tcgcgcgttt CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA  
 61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG  
 121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC  
 181 ACCATACCAC AGCTTTCA AACCAATTATG CATTTCATTT TTATTCTTT TTTTGATTT  
 241 GGTTTCTTTG AAATTTTTT GATTGGTAA TCTCCGAACA GAAGGAAGAA CGAAGGAAGG  
 301 AGCACAGACT TAGATTGGTA TATATACGCA TATGTTAGTGT TGAAGAAACA TGAAATTGCC  
 361 CAGTATTCTT AACCCAACCTG CACAGAACAA AAACCTGCAG GAAACGAAGA TAAATCATGT  
 421 CGAAAGCTAC ATATAAGGAA CGTGCCTGCA CTCATCTAG TCCTGTTGCT GCCAAGCTAT  
 481 TTAATATCAT GCACGAAAG CAAACAAACT TGTGTGCTTC ATTGGATGTT CGTACACCA  
 541 AGGAATTACT GGAGTTAGTT GAAGCATTAG GTCCCCAAAT TTGTTACTA AAAACACATG  
 601 TGGATATCTT GACTGATTT TCCATGGAGG GCACAGTTAA GCGCTAAAG GCATTATCCG  
 661 CCAAGTACAA TTTTTACTC TTCGAAGACAA GAAAATTGCG TGACATTGGT AATACAGTCA  
 721 AATTGCAGTA CTCTGCGGT GTATACAGAA TAGCAGAATG GGCAGACATT AGGAATGCAC  
 781 ACGGTGTGGT GGGCCCAGGT ATTGGTAGCG GTTGAAGCA GGCAGCAGAA GAAGTAACAA  
 841 AGGAACCTAG AGGCCTTTTG ATGTTAGCAG AATTGTCATG CAAGGGCTCC CTATCTACTG  
 901 GAGAATATAC TAAGGGTACT GTTGACATTG CGAAGAGCGA CAAAGATTT GTTATCGGCT  
 961 TTATTGCTCA AAGAGACATG GGTGGAAGAG ATGAAGGTTA CGATTGGTTG ATTATGACAC  
 1021 CCGGTGTGGG TTTAGATGAC AAGGGAGACG CATTGGGTCACAGTATAGA ACCGTGGATG  
 1081 ATGTTGCTC TACAGGATCT GACATTATTA TTGTTGGAAG AGGACTATTT GCAAAGGGAA  
 1141 GGGATGCTAA GGTAGAGGGT GAACGTTACA GAAAAGCAGG CTGGGAAGCA TATTGAGAA  
 1201 GATGCGGCCA GCAAACCTAA AAAACTGTAT TATAAGTAA TGCGATGATA CTAAACTCAC  
 1261 AAATTAGAGC TTCAATTAA TTATATCAGT TATTACCTA TGCGGTGTGA AATACCGCAC  
 1321 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAG CGTTAATATT TTGTTAAAAT  
 1381 TCGCGTTAA TTTTTGTAA ATCAGCTCAT TTTTAACCA ATAGGGCGAA ATCGGGCAAAA  
 1441 TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTTGTTCCA GTTGGAAACA  
 1501 AGAGTCCACT ATTAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAAG GCGAAAACC GTCTATCAGG  
 1561 GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCC AATCAAGTTT TTGGGGTCG AGGTGCCGTA  
 1621 AAGCACTAA TCGGAACCTT AAAGGGAGCC CCCGATTAG AGCTTGACGG GGAAGGCCGG  
 1681 CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGGAAAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA  
 1741 GTGTAGCGGT CACGCTGCCG GTAACCACCA CACCCGCCG GCTTAATGCG CCGCTACAGG  
 1801 GCGCGTCCAT TCGCCATTCA GGCTCGCAA CTGTTGGAA GGGCGATCGG TCGGGGCTC  
 1861 TTCGCTATTA CGCCAGCTGA ATTGGAGCGA CCTCATGCTA TACCTGAGAA AGCAACCTGA  
 1921 CCTACAGGAA AGAGTTACTC AAGAATAAGA ATTTCGTTT TAAACCTAA GAGTCACTTT  
 1981 AAAATTGTA TACACTTATT TTTTTATAA CTTATTTAAT AATAAAAATC ATAATCATA  
 2041 AGAAATTGCG TTATTTAGAA GTGTCACAA CGTATCTACC AACGATTGAA CCCTTTCCA  
 2101 TCTTTCGTA AATTCTGGC AAGGTAGACAA AGCCGACAAAC CTTGATTGGA GACTTGACCA  
 2161 AACCTCTGGC GAAGAATTGT TAATTAAGAG CTCAGATCTT CAATTCTACG TTGATCCCAT  
 2221 AAGCATAAAA CGTACCCCTA GCCATCTCCA AAAATACATC TTTGCATCTT CTGGCAAAA  
 2281 TGCTTCTTT TTTATACACA ATCTGCAACA CTTTCTCCA GTGATATTCA ACCATTTCT  
 2341 TGATCTCTGC AATGGCTCA TCTTCACTAA CTTTCTTCC ATCTTCTCA GTGCTAGTA  
 2401 GAATGCTATA ACTTTTCCT GCAATATTGAA CCTCGCGCTC CCTCTCAGAA CTGCACACGT

2461 CGTTGAGCAG CCGGCCGACC ATACAGACAT GCCTAGCCAA ATCAGTGCAC TCTTCACTCA  
 2521 TAAGCATTTC ATCGGACAAT TTTACTCCGA CGAATTGCAT CGTCAGGAGA CCTGTCAGCC  
 2581 GGGAACCGTT CGACAACAC GACGAAGAAA TGTATTCTAC GAAGCTTGC TGCGTGCAT  
 2641 TGCTCCATGT ATCTAATTCT ATCTTGAAAG CTGAGAGTAT TTCAACCCAC AATTGACTA  
 2701 GAAACTCTT CACACTACGC CCCTGTTCGA CACGAGCCCT CTCCGCCAAC TCATTTACTG  
 2761 TATTGTACAA CGCCATAAAA AGGATCTAA GCTCCTCAGA TCCGTAAC GCATCCGGAT  
 2821 TCTCCTCCA TTCTTTACT AATTCAATGA TCTTGTACA CTCTTGACTA GAGCCATGAC  
 2881 AGTCGAAAAA ATCATCCATA ATTGTTACAA GCACAGATGT TTTAGCAAAT GCGAGACGAA  
 2941 CATAGTCAA CGCATGATCA CCAATAATTA ATGAAGCCAA ATAATTAGCA ACAATAACTA  
 3001 CATCTCTTC AAAGTTTAAT GTGTCCAACC TACAATCTGC ATACCAACCTT TGCAGTTGTT  
 3061 GAAGTCCTT CTGGTTCTGG GCTTCATGTA TATCGAAATC YTGCCTTGCG AAAACTAGAA  
 3121 AATCTCGTT GCATAAAATTA GAGAACCTGT TTGAGATT CAGAGCTTGA TAGTAGGTCA  
 3181 TGTCTATAG CTCGAGGTTT CGTCTAGCT CCAATCTTAT GGTATGCCCT TTGTAATTCC  
 3241 TCAAGTAGAA TTCCACCAAGT TTGTCAGTT TTTGTCAGG AATTGAGTTA TCTTGCACCT  
 3301 GCTTATTGAG AAAGATGGTA GTCCAAGCAA GAATTTTTC AAGACTCCTC TCTTCTTCAT  
 3361 ATATTCTCTC ATTTGCTGCT CTATAAAGCT CAATAATCAT CGGCAGGTCA TTTGTTGCT  
 3421 GGCTAACAGC CTCTGGTTA CCATATGGAG CCAACTCCTC TGATGAAACT TCGTATCCTT  
 3481 TCACTCGCAA AAGCCTAAAT GCCATTGCA GAGTAGTAAC GTGCCATAT ATAACTTGTT  
 3541 GTTTTCTG CCACAAACCTG AATGTTTAT CTAAAGTAGT GTTGAATTCA TATTGGAAGA  
 3601 ATTGATCGAC CCCAACCTT TGAAGGGTGT CGATTATACA CAAATTAGAG GGTATATCTT  
 3661 CGGATCGAAG AGTCGGTGTG GTTGGAAATT TATCGTCTTC CCTCTTGAAA TTCTCTTCA  
 3721 TTTTCGCCAT GAAATCTATT GTAGTAAGGC TGCACTAAC GATGAGACGT GATCTATTGG  
 3781 GGGTGGTCAC AGGAAACCTT TGGACTGGAA AATTTCTTT CCTGCTCCCA ACTCTTGGC  
 3841 CGGAGAAAGG CGTAACCTCG ACAGTTGAAGG CGAGCGACAT GCGGCCGCC TTTAGTGAGG  
 3901 GTTGAATTG AATTTCAAA AATTCTTACT TTTTTTTG ATGGACGCAA AGAAGTTAA  
 3961 TAATCATATT ACATGGCATT ACCACCATAT ACATATCCAT ATACATATCC ATATCTAATC  
 4021 TTACTTATAT GTTGGGAAA TGAAAGAGC CCCATTATCT TAGCCTAAAA AAACCTTCTC  
 4081 TTTGGAACCT TCAGTAATAC GCTTAACTGC TCATTGCTAT ATTGAAGTAC GGATTAGAAG  
 4141 CCGCCGAGCG GGTGACAGCC CTCCGAAGGA AGACTCCTC CCGTGCCTCC TCGTCTTCAC  
 4201 CGGTCGCGTT CCTGAAACGC AGATGTGCCT CGCGCCGCAC TGCTCCGAAC AATAAAGATT  
 4261 CTACAATACT AGCTTTATG TTATGAAGA GGAAAATTG GCAGTAACCT GGCCCCACAA  
 4321 ACCTTCAAAT GAACGAATCA ATTAACAAC CATAGGATGA TAATGCGATT AGTTTTTAG  
 4381 CCTTATTCTT GGGGTAATTATCAGCGAAG CGATGATTT TGATCTATTA ACAGATATAT  
 4441 AAATGCAAA ACTGCATAAC CACTTTAACT AATACTTCA ACATTTTCGG TTTGTATTAC  
 4501 TTCTTATTCA AATGTAATAA AAGTATCAAC AAAAATTGT TAATATACCT CTATACTTTA  
 4561 ACGTCAAGGA GAAAAAACCC CGGATCCATG AGATGCAGCG CCAGGCGGAC GCCCGAACCA  
 4621 CTGGCTCAAG GCTAACACGG TGGCAGAGAT GGCCTGGAGG CGATACAGAG GTTGCACAA  
 4681 ATTGCGGATG ATAAGATCGA CGGAGGAGCC AATGAGTTGG GAATTGTTGG TTGGGATCTG  
 4741 ATTAGGGATG GTGTGGACGC CGTGAATCC ATGTTGCTT CCATGGGAGA TGGAGATATA  
 4801 AGCATCTCTG CCTACGATAC CGCATGGTT GCTCTGGTT AGGATGTCAA TGGCAGCGGC  
 4861 GGCCCTCAGT TTCCCTCCCTC CCTCCAGTGG ATCGTGCACA ATCAGCTCCC GGATGGTTCT  
 4921 TGGGGTGACA GTGAAGTATT TTCCGCATAC GATCGTCTCC TCAAGACTTT AGCTTGTGTT  
 4981 GTTGCCTTGA AATCATGGAA TATTGTCCT GACAAATGCC AAAAAGGGTT GAAGTTCTT  
 5041 AGAGATAACA TAAGCAAGCT TGAAAGGAA AATGTAGAGG CTTCAGCGCA AATGCTGAGC  
 5101 GGGTTTGAAG TTGTGTTCT TTCCCTTATTA GAAGTAGCTC GCCGTTTAGA CATTCAAATT  
 5161 CCTCTACATT CTCCTGTTT CGAAGACCTA ATTGCTAGGA GAAATCTGAA ATTTGCAAAG  
 5221 ATACCGTGG ACTTAATGCA CAATGTACCG ACGTCATTAC TCAATAGCTT GGAGGGATG  
 5281 ACAGGAGTGG AATTGGACTG GGAAAAGCTT CTGAAATTGC AGAGCCAAGA TGGTTCTTT  
 5341 ATCACTTCCC CGTCCTCCAC TGCTTCTGC TTGATGCAGA CCAATGACAC AAAGTGTGG  
 5401 GGTTACTTGA AATTGTTGGT CAAAAAGTT AACGGCGGTG CCCCAGGTCA GTACCCCTGTA  
 5461 GAAATCTCG AGCGTATTG GTTGTGTTGAT CGCCTACAAC GTCTAGGGAT TTCAAGATAT  
 5521 TTCCAGCTGG AGATTAAGA ATGTTGTTTG GATTATGCTT TCAACACATTG GACCCAGTAT  
 5581 GGGAGTAGGT GGGCAAGAAA TACTCCAGTG TATGACCTTG ATGATACCTG CATGGCTTT  
 5641 AGGATACTAA GTTACATGG CTACGATGTT TCTGCTGAAG CATTGCTCA CTTTGAAAAA  
 5701 AACGGAGTCT TCTTCTGCTT CGGGTGGGAA ACAACTCAGT CGGTAACCGT GAACTTCAT  
 5761 CTGTACAGAG CAACTCAAGT GGCTTCTTCCT GGAGAAAATA TTCTCAAGGA AGCAAAGCAG  
 5821 TTTTCTTCA ACTTTTGTAT GAAAAAACAG GCTGCTCGTG AGTTCCAGGA CAAATGGTC  
 5881 ATTTTGAAGG ACTTTCTGG TGAGCTGAAG TATGCATTAG AGTTTCCCTTG GTATGCTAGC  
 5941 TTGCTTAGAG TGGAGACCG ATTGTTACGTT GAGCAGTATG GAGGTGACAA TGACGTCCTG  
 6001 ATTGGCAAGA CTCTTACAG GATGCCCTAT ATAATAATA ATGTTTATCT TGAACGGCT  
 6061 AAGCTGGACT TCAACAATTG CCAGGCTTGC CACAGAAAGG AATGGGAGAC TATGCAAAG  
 6121 TGGTCATGG AGAGCAAGTT GGATGAATTG GGGGTGAGTA GTAAAACCCCT ACTTGAATCA  
 6181 TACTTCTCG CTGCTGCCAG TATATTGAA CCAGAGAGAT CAACGGAGCG GCTTGCCTGG  
 6241 GCCAAGACGG CATTCCGTAT GGAGACTATT GGCTCTACT TTGATGATGA AATGAACCTC  
 6301 AAGGATTGAA GAAAAGCCTT CGTCCAAGAG TTTAAAAACA TCTACGAAAG AAGAATGGAA

6361 GCAAAAGGGA CGAAATGGAA CCTTATTATC ATCTTGCTAA CGACCCTCAA CCACCTGACG  
 6421 GAGGTCTGTG GTAGAGACAT CAACTCATAT CTTGCCATT CTTGGGAGAA ATGGATGATG  
 6481 ATGTGGGAGC CGGAAGGCAGA CAGGTACAAA GGGGCAGCGG AACTGCTGTC AAATTCTATA  
 6541 AATCTAAGTT CCGGCCGCCT GTTCTCGAAT GATACTGTTG CTCACCCAAA TTATGAAAAG  
 6601 CTCGTCACTC TCTCGAATAA ATTATGCCAT CAACTCGGTA ATTCCCGTAG AGGAAACCAC  
 6661 AATGAGGATT CAGATATCAA GGACACTAAA ATCGAGATTG CTATGCAAGA ACTTGTGCAG  
 6721 TTAGTGCATC AAAACTCCCT GGATGACATT AGCATGGATT TAAAGCAAAC TTTCTTCGCG  
 6781 GTGGAAGGAA GCTTTTACTA TGCTGCCCAT TGTGATCGGG GAACCATCAA CTCTCATATT  
 6841 GTTAAAGTAC TTTTTGAATC AGTTGTTCTC GACGGTAGCG GCAGCGGTAG CGGTAGCGGC  
 6901 AGCGAATTCA TGGCTTCAGA AAAAGAAATT AGGAGAGAGA GATTCTGAA CGTTTTCCCT  
 6961 AAATTAGTAG AGGAATTGAA CGCATCGCTT TTGGCTTACG GTATGCCAA GGAAGCATGT  
 7021 GACTGGTATG CCCACTCATT GAACTACAAC ACTCCAGGGC GTAAGCTAAA TAGAGGTTG  
 7081 TCCGTTGTGG ACACGTATGC TATTCTCTCC ACAAGACCG TTGAACAATT GGGGCAAGAA  
 7141 GAATACGAAA AGGTGCCCCAT TCTAGGTTGG TGCATTGAGT TGTTGCAGGC TTACTTCTTG  
 7201 GTCGCCGATG ATATGATGGA CAAGTCCATT ACCAGAAGAG GCCAACCATG TTGGTACAAG  
 7261 GTTCTGAAAG TTGGGAAAT TGCCATCAAT GACGCATTCA TGTTAGAGGC TGCTATCTAC  
 7321 AAGCTTTGA AATCTCACTC CAGAACGAA AAATACTACA TAGATATCAC CGAATTGTT  
 7381 CATGAGGTCA CCTTCCAAC CGAATTGGC CAATTGATGG ACTTAATCAC TGCCACCTGAA  
 7441 GACAAAGTGG ACTTGAGTAA GTTCTCCCTA AAGAAGCAGT CCTTCATAGT TACTTCAAG  
 7501 ACTGCTTACT ATTCTTCTA CTTGCCGTGC CGATTGGCCA TGTACGTTGC CGGTATCACG  
 7561 GATGAAAAGG ATTTGAAACA AGCCAGAGAT GTCTGATTC CATTGGGTGA ATACTTCAA  
 7621 ATTCAAGATG ACTACTTAACTA CTGCTTCGGT ACCCCAGAAC AGATCGGTAA GATCGGTACA  
 7681 GATATCCAAG ATAACAAATG TTCTGGGTA ATCAACAAGG CATTGGAAC TGCCTCCGCA  
 7741 GAACAAAGAA AGACTTTAGA CGAAAATTAC GGTAAAGAAGG ACTCAGTCGC AGAAGCCAA  
 7801 TGCAAAAGA TTTTCAATGA CTTGAAAATT GAACAGCTAT ACCACGAATA TGAAGAGTCT  
 7861 ATTGCCAAGG ATTTGAAAGC CAAAATTCT CAGGTGATG AGTCTCGTGG CTCAAAGCT  
 7921 GATGTCTTAA CTGCGTTCTT GAACAAAGTT TACAAGAGAA GCAAATAGTA TCTCGAGTAA  
 7981 GCTTGGTACC GCGGCTAGCT AAGATCCGCT CTAACCGAAA AGGAAGGAGT TAGACAACCT  
 8041 GAAGTCTAGG TCCCCTATTA TTTTTTATA GTTATGTTAG TATTAAGAAC GTTATTTATA  
 8101 TTTCAAATT TTCTTTTTT TCTGTACAGA CGCGTGTACG CATGTAACAT TATACTGAAA  
 8161 ACCTTGCTTG AGAAGGTTTT GGGACGCTCG AAGATCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA  
 8221 CGCGCGGGGA GAGGCGGGTT GCGTATTGGG CGCTCTTCG CTTCCCGC CACTGACTCG  
 8281 CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGGCAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAAATACGG  
 8341 TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG  
 8401 GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC  
 8461 GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAAGA  
 8521 TACCAAGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT  
 8581 ACCGGATACC TGTCCGCCT TCTCCCTCG GGAAGCGTGG CGCTTCTCA TAGCTCACGC  
 8641 TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC  
 8701 CCCGTTCACTC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA  
 8761 AGACACGACT TATCGCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT  
 8821 GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA  
 8881 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT  
 8941 TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTT TTGTTGCAA GCAGCAGATT  
 9001 ACGCGCAGAA AAAAGGATC TCAAGAAGAT CTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT  
 9061 CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC  
 9121 ACCTAGATCC TTTTAAATT AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA  
 9181 ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGCTA  
 9241 TTTCGTTCAT CCATAGTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC  
 9301 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCATGATA CGCGAGAGC CACGCTCACC GGCTCCAGAT  
 9361 TTATCAGCAA TAAACAGCC AGCCGGAAAGG GCGGAGCGA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA  
 9421 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAAGCTA GAGTAAGTAG TTGCGCAGTT  
 9481 AATAGTTGC GCAACGTGTT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACCG CTCGTCGTTT  
 9541 GGTATGGCTT CATTCACTC CGGTCTCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG  
 9601 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC  
 9661 GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC  
 9721 GTAAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG  
 9781 CGGCGACCGA GTTGCTCTT CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA  
 9841 ACTTAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTTA  
 9901 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT  
 9961 TTTACTTCA CCAGCGTTT CGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG  
 10021 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTCA ATATTATTGA  
 10081 AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT  
 10141 AAACAAATAG GGGTCCGCG CACATTCCCC CGAAAAGTGC CACCTGAACG AAGCATCTGT  
 10201 GCTTCATTAA GTAGAACAAA AATGCAACGC GAGAGCGCTA ATTTTCAAA CAAAGAACATCT

10261 GAGCTGCATT TTTACAGAAC AGAAATGCAA CGCGAAAGCG CTATTTTACC AACGAAGAAT  
10321 CTGTGCTTCA TTTTGTAAG AAAACAAATGC AACGCGAGAG CGCTAATTTT TCAAACAAAG  
10381 AATCTGAGCT GCATTTTAC AGAACAGAAA TGCAACGCCA GAGCGCTATT TTACCAACAA  
10441 AGAATCTATA CTTCTTTTT GTTCTACAAA AATGCATCCC GAGAGCGCTA TTTTTCTAAC  
10501 AAAGCATCTT AGATTACTTT TTTCTCCTT TGTGCGCTCT ATAATGCAGT CTCTTGATAA  
10561 CTTTTGCAC TGTAGGTCCG TTAAGGTTAG AAGAAGGCTA CTTGGTGTC TATTTTCTCT  
10621 TCCATAAAAA AAGCCTGACT CCACCTCCCG CGTTTACTGA TTACTAGCGA AGCTGCGGGT  
10681 GCATTTTTC AAGATAAAGG CATCCCCGAT TATATTCTAT ACCGATGTGG ATTGCGCATA  
10741 CTTTGTGAAC AGAAAGTGT AGCGTTGATG ATTCTTCATT GGTAGAAAA TTATGAACGG  
10801 TTTCTTCTAT TTTGTCCTCA TATACTACGT ATAGGAAATG TTTACATTTT CGTATTGTTT  
10861 TCGATTCACT CTATGAATAG TTCTTAAC AATTTTTTG TCTAAAGAGT AATACTAGAG  
10921 ATAAACATAA AAAATGTAGA GGTCGAGTTT AGATGCAAGT TCAAGGAGCG AAAGGTGGAT  
10981 GGGTAGGTTA TATAGGGATA TAGCACAGAG ATATATAGCA AAGAGATACT TTTGAGCAAT  
11041 GTTTGTGAA GCGGTATTG CAATATTTA GTAGCTCGTT ACAGTCCGGT GCGTTTTG  
11101 TTTTTGAAA GTGCGTCTTC AGAGCGCTTT TGGTTTCAA AAGCGCTCTG AAGTTCCAT  
11161 ACTTTCTAGA GAATAGGAAC TTCGGAATAG GAACTTCAA GCGTTCCGA AAACGAGCGC  
11221 TTCCGAAAT GCAACGCGAG CTGCGCACAT ACAGCTCACT GTTCACGTCG CACCTATATC  
11281 TGCGTGTGC CTGTATATAT ATATACATGA GAAGAACGGC ATAGTGCCTG TTTATGCTTA  
11341 AATGCGTACT TATATGCGTC TATTTATGTA GGATGAAAGG TAGTCTAGTA CCTCCTGTGA  
11401 TATTATCCCA TTCCATGCGG GGTATCGTAT GCTTCCTTCA GCACTACCCCT TTAGCTGTT  
11461 TATATGCTGC CACTCCTCAA TTGGATTAGT CTCATCCTTC AATGCTATCA TTTCCATTG  
11521 TATTGGATCA TACTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT  
11581 CACGAGGCC CTTCGTC

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AJIKUMAR, P. K., XIAO, W. H., TYO, K. E., WANG, Y., SIMEON, F., LEONARD, E., MUCHA, O., PHON, T. H., PFEIFER, B. & STEPHANOPOULOS, G. 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 330, 70-4.
- BERTANI, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 293-300.
- BOHLMANN, J. & KEELING, C. I. 2008. Terpenoid biomaterials. *Plant J.*, 54, 656-69.
- BUSCH, T. & KIRSCHNING, A. 2008. Recent advances in the total synthesis of pharmaceutically relevant diterpenes. *Nat Prod Rep.*, 25, 318-41.
- CHAMBON, C., LADEVEZE, V., SERVOUSE, M., BLANCHARD, L., JAVELLOT, C., VLADESCU, B. & KARST, F. 1991. Sterol pathway in yeast. Identification and properties of mutant strains defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase. *Lipids*, 26, 633-6.
- CHANG, M. C. & KEASLING, J. D. 2006a. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol.*, 2, 674-81.
- CHANG, M. C. Y. & KEASLING, J. D. 2006b. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol.*, 2, 674-681.
- CROZIER, A., ASHIHARA, H. & MICHAEL, N. C. 2006. *PLANT SECONDARY METABOLITES Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*.
- DAI, Z., LIU, Y., ZHANG, X., SHI, M., WANG, B., WANG, D., HUANG, L. & ZHANG, X. 2013. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng.*, 20, 146-56.
- GIAEVER, G., CHU, A. M., NI, L., CONNELLY, C., RILES, L., VERONNEAU, S., DOW, S., LUCAU-DANILA, A., ANDERSON, K., ANDRE, B., ARKIN, A. P., ASTROMOFF, A., EL-BAKKOURY, M., BANGHAM, R., BENITO, R., BRACHAT, S., CAMPANARO, S., CURTISS, M., DAVIS, K., DEUTSCHBAUER, A., ENTIAN, K. D., FLAHERTY, P., FOURY, F., GARFINKEL, D. J., GERSTEIN, M., GOTTE, D., GULDENER, U., HEGEMANN, J. H., HEMPEL, S., HERMAN, Z., JARAMILLO, D. F., KELLY, D. E., KELLY, S. L., KOTTER, P., LABONTE, D., LAMB, D. C., LAN, N., LIANG, H., LIAO, H., LIU, L., LUO, C., LUSSIER, M., MAO, R., MENARD, P., OOI, S. L., REVUELTA, J. L., ROBERTS, C. J., ROSE, M., ROSS-MACDONALD, P., SCHERENS, B., SCHIMMACK, G., SHAFER, B., SHOEMAKER, D. D., SOOKHAI-MAHADEO, S., STORMS, R. K., STRATHERN, J. N., VALLE, G., VOET, M., VOLCKAERT, G., WANG, C. Y., WARD, T. R., WILHELMY, J., WINZELER, E. A., YANG, Y., YEN, G., YOUNGMAN, E., YU, K., BUSSEY, H., BOEKE, J. D., SNYDER, M., PHILIPPSEN, P., DAVIS, R. W. & JOHNSTON, M. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418, 387-91.
- GUO, J., ZHOU, Y. J., HILLWIG, M. L., SHEN, Y., YANG, L., WANG, Y., ZHANG, X., LIU, W., PETERS, R. J., CHEN, X., ZHAO, Z. K. & HUANG, L. 2013. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 12108-13.
- IGNEA, C., IOANNOU, E., GEORGANTEA, P., LOUPASSAKI, S., TRIKKA, F. A., KANELLIS, A. K., MAKRIS, A. M., ROUSSIS, V. & KAMPRANIS, S. C. 2015a.

- Reconstructing the chemical diversity of labdane-type diterpene biosynthesis in yeast. *Metab Eng*, 28.
- IGNEA, C., TRIKKA, F. A., KOURTZELIS, I., ARGIRIOU, A., KANELLIS, A. K., KAMPRANIS, S. C. & MAKRIS, A. M. 2012. Positive genetic interactors of HMG2 identify a new set of genetic perturbations for improving sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11, 1-16.
- IGNEA, C., TRIKKA, F. A., NIKOLAIDIS, A., GEORGANTEA, P., IOANNOU, E., LOUPASSAKI, S., KEFALAS, P., KANELLIS, A. K., ROUSSIS, V., MAKRIS, A. M. & KAMPRANIS, S. C. 2015b. Efficient diterpene production in yeast by engineering Erg20p into a geranylgeranyl diphosphate synthase. 27. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717614001384> [Accessed 21/06/2016].
- IGNEA, C., TRIKKA, F. A., NIKOLAIDIS, A. K., GEORGANTEA, P., IOANNOU, E., LOUPASSAKI, S., KEFALAS, P., KANELLIS, A. K., ROUSSIS, V., MAKRIS, A. M. & KAMPRANIS, S. C. 2015c. Efficient diterpene production in yeast by engineering Erg20p into a geranylgeranyl diphosphate synthase. *Metab Eng*, 27.
- KRIVORUCHKO, A., SIEWERS, V. & NIELSEN, J. 2011. Opportunities for yeast metabolic engineering: Lessons from synthetic biology. *Biotechnol J*, 6, 262-76.
- KUZUYAMA, T. 2002. Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for the Biosynthesis of Isoprene Units. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, 1619-1627.
- LANGE, B. M. & CROTEAU, R. 1999. Genetic engineering of essential oil production in mint. *Curr Opin Plant Biol*, 2, 139-44.
- LANGE, B. M., WILDUNG, M. R., STAUBER, E. J., SANCHEZ, C., POUCHNIK, D. & CROTEAU, R. 2000. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2934-9.
- LATGE, J. P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol*, 66, 279-90.
- LEE, P. C., PETRI, R., MIJTS, B. N., WATTS, K. T. & SCHMIDT-DANNERT, C. 2005. Directed evolution of *Escherichia coli* farnesyl diphosphate synthase (IspA) reveals novel structural determinants of chain length specificity. *Metabolic Engineering*, 7, 18-26.
- MAHMOUD, S. S. & CROTEAU, R. B. 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpane reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14481-6.
- MARTIN, C. E. & SCHEINBACH, S. 1989. Expression of proteins encoded by foreign genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, 7, 155-185.
- NAKAGAWA, A. 2011. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nature communications*.
- PERALTA-YAHYA, P. P. & KEASLING, J. D. 2010. Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnology Journal*, 5, 147-162.
- RO, D.-K., PARADISE, E. M., OUELLET, M., FISHER, K. J., NEWMAN, K. L., NDUNGU, J. M., HO, K. A., EACHUS, R. A., HAM, T. S., KIRBY, J., CHANG, M. C. Y., WITHERS, S. T., SHIBA, Y., SARPONG, R. & KEASLING, J. D. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440, 940-943.
- ROHMER, M. 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants[dagger]. *Natural Product Reports*, 16,

- 565-574.
- ROHMER, M., SEEMANN, M., HORBACH, S., BRINGER-MEYER, S. & SAHM, H. 1996. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 2564-2566.
- SCHIFF, P. B. & HORWITZ, S. B. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 1561-1565.
- SCHULER, M. A. & WERCK-REICHHART, D. 2003. Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 629-67.
- SHERMAN, F. 2002. *Getting Started with Yeast* [Online]. Available: [http://bioc162.uni-graz.at/wwwyeast/Lehre/LV\\_713data/startedyeast.pdf](http://bioc162.uni-graz.at/wwwyeast/Lehre/LV_713data/startedyeast.pdf) [Accessed 15/4/12].
- TRIKKA, F. A., NIKOLAIDIS, A., ATHANASAKOGLOU, A., ANDREADELLI, A., IGNEA, C., KOTTA, K., ARGIRIOU, A., KAMPRANIS, S. C. & MAKRIS, A. M. 2015. Iterative carotenogenic screens identify combinations of yeast gene deletions that enhance sclareol production. *Microbial Cell Factories*, 14, 1-19.
- VEEN, M. & LANG, C. 2004. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 635-646.
- VICKERS, C. E., BONGERS, M., LIU, Q., DELATTE, T. & BOUWMEESTER, H. 2014. Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant Cell Environ*, 37, 1753-75.
- WILLIAMS, D. H., STONE, M. J., HAUCK, P. R. & RAHMAN, S. K. 1989. Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *Journal of Natural Products*, 52, 1189-1208.
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- ZERBE, P., HAMBERGER, B., YUEN, M. M., CHIANG, A., SANDHU, H. K., MADILAO, L. L., NGUYEN, A., HAMBERGER, B., BACH, S. S. & BOHLMANN, J. 2013. Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. *Plant Physiol*, 162, 1073-91.
- ΤΠΑΝΤΑΣ, Ε. 2009. *Επερόλογη βιοσύνθεση φυτικών φλαβονοειδών από το Saccharomyces cerevisiae για την αξιοποίησή τους στην φυτοπροστασία της αμπέλου και στην οινοποίηση* [Online]. Ηράκλειο: Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης. Available: <http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/17308#page/14/mode/2up> [Accessed 19/05/12].