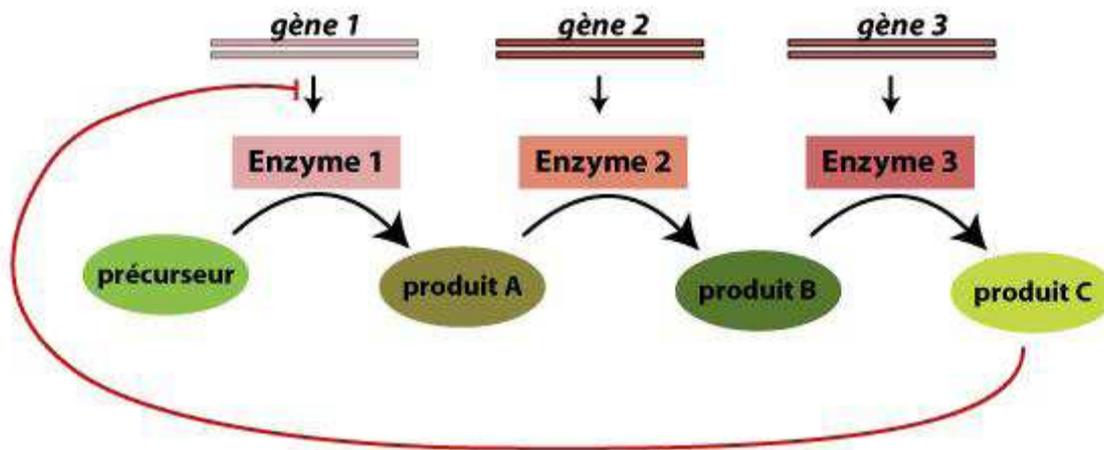


Esperienza 6: la retroinibizione

Le cellule di batteri, lieviti o mammiferi gestiscono con molta attenzione i loro dispendi energetici. Se un prodotto sintetizzato dalla cellula è già presente in abbondanza al suo interno o nell'ambiente esterno, la sua produzione si blocca. Spesso questo fenomeno è dovuto all'interazione del prodotto finale con una molecola che serve come repressore dell'espressione dei geni di biosintesi. Questo fenomeno, chiamato retroinibizione, è presentato nello schema seguente:

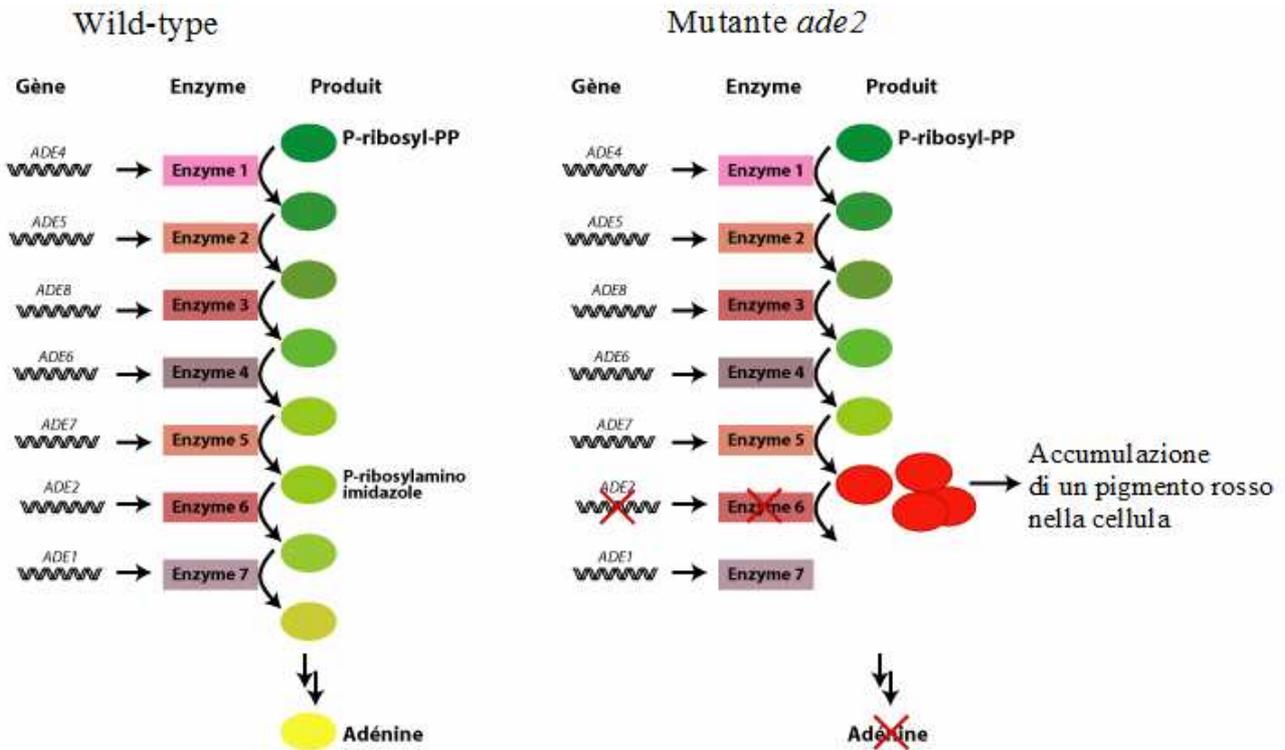


Questa catena di biosintesi è inibita dal suo prodotto C (linea rossa). In presenza del prodotto C nella cellula o nell'ambiente esterno, tutta la catena di biosintesi sarà bloccata. Quando un prodotto regola negativamente la sua produzione, si parla di retroinibizione.

Soggetti: regolazione dell'espressione di un gene, via metabolica, retroinibizione.

Introduzione

Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, la catena di biosintesi dell'adenina contiene una dozzina di enzimi. I geni che codano questi enzimi sono denominati ADE seguito dal numero corrispondente all'ordine del lievito scoperto. Questa catena permette la conversione del precursore, il fosforibosil-pirofosfato (P-ribosyl-PP), in adenina come schematizzato qui sotto.



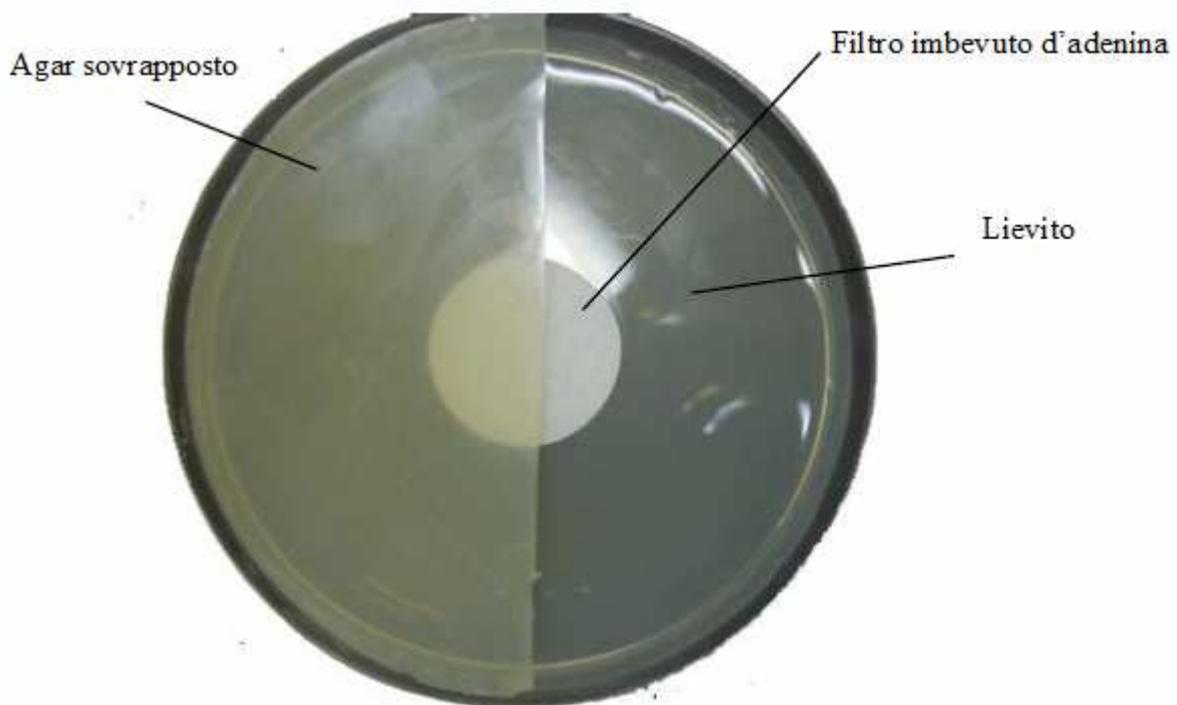
Schema semplificato che rappresenta la catena di biosintesi dell'adenina nel lievito *S. cerevisiae*. A sinistra, il wild-type attiva l'espressione di questa catena in mancanza d'adenina. L'enzima 6 non è funzionale nel mutante *ade2* (a destra), dunque non c'è conversione del prodotto. Esso si accumula nella cellula, dove è ossidato in un pigmento rossastro. Le colonie prendono allora un aspetto rosso quando c'è poca adenina. Un eccesso d'adenina nell'ambiente blocca questa catena di biosintesi (retroinibizione) e il mutante *ade2* resterà bianco. In assenza completa d'adenina nell'ambiente, il mutante *ade2* non potrà crescere (auxotrofia per l'adenina). In assenza di ossigeno, il lievito può crescere grazie alla fermentazione, ma non ci sarà l'apparizione del pigmento rosso.

Un lievito che ha una mutazione in uno di questi geni, non può crescere in assenza d'adenina nell'ambiente. Il lievito diventa allora auxotrofo. Quando una mutazione nel gene *Ade2* rende non-funzionale la sua proteina, il prodotto intermedio (il P-ribosilamino imidazole) non può essere trasformato nel prodotto seguente. Il P-ribosilamino imidazole si accumula allora nelle cellule, dove è ossidato in un pigmento rosso grazie a un processo dipendente dalla respirazione cellulare. L'accumulazione di questo pigmento è visibile nel mutante *ade2* quando l'adenina fornita nel terreno di coltura diventa limitante. In questo caso, la cellula attiva la via di sintesi dell'adenina che termina con l'accumulazione del pigmento rosso, come rappresentato nello schema qui sopra. In assenza d'ossigeno, il lievito è capace di crescere per fermentazione. In questo caso, il prodotto intermedio, l'amino-imidazol-ribotide, non è ossidato e il lievito resta bianco.

L'esperienza

1) Protocollo

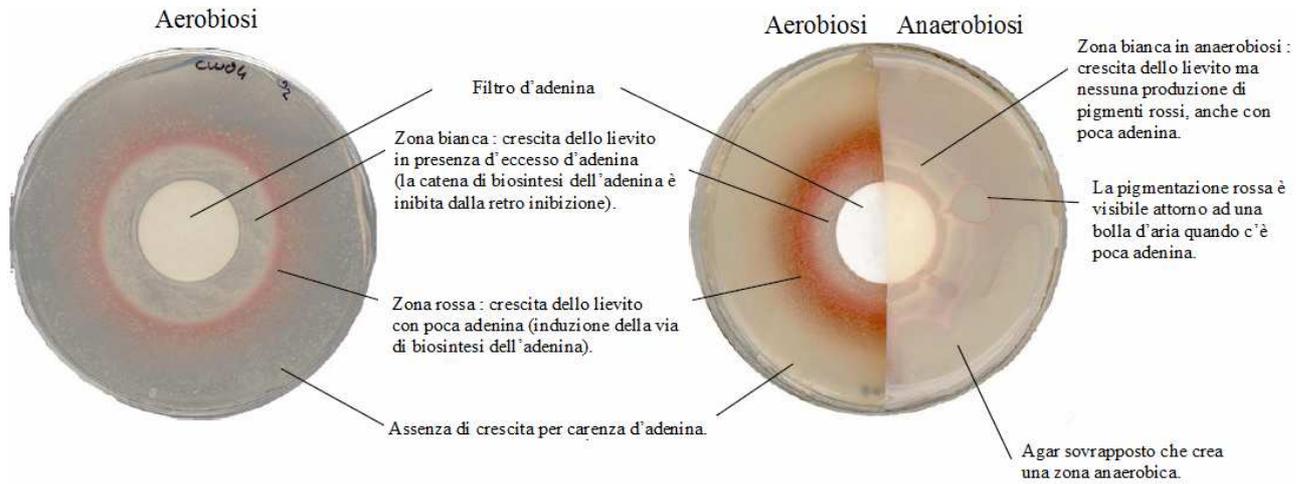
- Prelevare qualche colonia di lievito *ade2* completamente rosse nella capsula di Petri che vi abbiamo fornito e metterle in sospensione in 5 ml di acqua sterile.
- Vortexare la sospensione per risospendere bene il lievito.
- Seminare 100 µl su una capsula di Petri SD senza adenina.
- Mettere un piccolo filtro sulla capsula aiutandosi con una pinzetta sterile.
- Posare dolcemente 200 µl di solfato d'adenina (a 4 g/l) sul filtro.
- Al fine di creare una zona senza ossigeno, è possibile tagliare in due la gelatina di una seconda capsula, poi depositarne la metà delicatamente sulla capsula contenente i lieviti, come rappresentato qui sotto. Provare a evitare le bolle d'aria tra i due strati d'agar.



- Incubare la capsula di Petri all'inghiù a 30°C per 2 giorni.

2) Risultati

Il lievito riesce a crescere normalmente attorno al filtro grazie all'adenina aggiunta su di esso. Attorno a questa zona, c'è un cerchio di lievito rosso. Qui, la concentrazione d'adenina è ancora abbastanza elevata da permettere la crescita delle cellule, ma l'adenina presente è rapidamente esaurita e le cellule iniziano la via di sintesi dell'adenina. Siccome abbiamo utilizzato un ceppo senza il gene *ade2*, le cellule accumulano il pigmento rosso. Fuori da questa zona, le cellule non crescono a causa dell'assenza d'adenina. Nella parte coperta dall'agar sovrapposto, non c'è l'accumulazione del pigmento rosso. Ciò è dovuto all'assenza della respirazione nelle condizioni d'aerobiosi. Si capisce, dunque, che la respirazione è necessaria alla sintesi del pigmento rosso grazie ad un meccanismo non determinato.



3) Materiale

- Ceppo di lievito *ade2* (CW04)
- 2 capsule di Petri SD senza adenina (4 g/l)
- Filtro rotondo
- P200 e punte gialle

Non fornito:

- Spatola o scalpello
- Pinzetta
- Incubatore 30°C
- Pipette Pasteur per seminare
- Etanolo
- Becher per etanolo