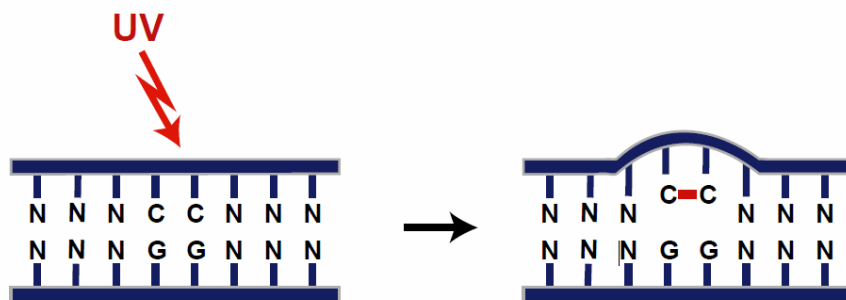


## Esperienza 7: mutagenesi dovuta agli UV

L'irradiazione con i raggi ultravioletti (UV) provoca la formazione di numerose modificazioni del DNA ed è responsabile della maggior parte dei tumori della pelle. Secondo la loro lunghezza d'onda, i raggi UV sono classificati in 3 categorie:

- Gli **UVA** (320-400 nm) sono i meno energetici. Essi inducono tuttavia delle modificazioni del DNA in maniera indiretta.
- Gli **UVB** (280-320 nm) penetrano profondamente nei tessuti e sono direttamente assorbiti dal DNA. Essi inducono la formazione di dimeri di pirimidina. La gran parte del potere cancerogeno della luce solare è dovuto agli UVB.
- Gli **UVC** (200-280) sono i più energetici. Essi sono tuttavia assorbiti dallo strato d'ozono e non raggiungono la superficie della terra. Essi formano delle modificazioni simili agli UVB sul DNA.

I dimeri di pirimidina si formano tra residui adiacenti (dimeri di timina, dimeri di citosina o dimeri di timina-citosina). Essi sono all'origine delle mutazioni nel DNA.



I raggi UV (UVB e UVC) inducono la formazione di dimeri di pirimidina (qui un dimeri di citosina) rappresentato in rosso sullo schema. Questi dimeri provocano una deformazione del DNA che condurrà alle mutazioni durante la replicazione del DNA. Gli UV possono anche provocare altri tipi di mutazioni sul DNA.

La fotoliasi è un enzima attivato dalla luce del giorno che permette di riparare i dimeri di pirimidina. Questo processo di riparazione è chiamato fotoreversione. La fotoliasi esiste in quasi tutti gli organismi viventi tranne i mammiferi con la placenta, come gli umani. Gli UV inducono anche molti altri tipi di mutazioni puntuali come gli arrangiamenti dei cromosomi.

**Soggetti:** mutazioni, UV, curva di sopravvivenza, biosintesi dell'adenina, gene *ade2*, fotoreversione.

## L'esperienza

Durante l'esperienza si determinerà l'effetto della sopravvivenza del lievito dopo diversi tempi d'esposizione agli UV. Si utilizzeranno dei ceppi di lievito che portano una mutazione nel gene *ADE2* implicato nella biosintesi dell'adenina. Queste cellule sono pigmentate di rosso grazie ad un processo descritto nell'esperienza 6. Dopo l'esposizione agli UV, sarà possibile osservare l'apparizione dei mutanti caratterizzati dalla colorazione bianca delle colonie. Questi mutanti possono essere:

- Dei **revertanti veri**: la sequenza wild-type nel sito di mutazione primaria è restituita.
- Degli **pseudo-revertanti**: una mutazione secondaria nel gene permette di sintetizzare l'adenina.
- Delle mutazioni nel gene del **RNAt** (che permette l'inserimento di un amminoacido corretto nel sito della mutazione).
- Delle mutazioni **extragenetiche**: in generale, delle mutazioni nei geni che precedono *ADE2* nella sintesi dell'adenina. Dunque non c'è più sintesi di prodotti che si ossidano in un pigmento rosso.
- Delle mutazioni che toccano la respirazione (i mitocondri). Gli lieviti affetti nella respirazione sono sempre capaci di crescere con la fermentazione, tuttavia la pigmentazione rossa non appare in assenza di respirazione.

Nei primi tre casi, il ceppo diventerà Ade<sup>+</sup> e sarà dunque capace di crescere in un ambiente senza adenina. Nei due ultimi casi, il ceppo resterà Ade<sup>-</sup>.

## Protocollo

### 1) Preparazione della sospensione di lievito

- Prelevare una colonia di lievito *ade2* completamente rossa a partire dalla capsula di Petri che vi abbiamo fornito e metterla in 10 ml di acqua sterile.
- Vortexare la sospensione per sospendere il lievito.
- In teoria, una colonia di lievito in 10 ml di acqua dà una concentrazione di circa 1 milione di cellule per millilitro. Per determinare precisamente la concentrazione del lievito, prelevare 10  $\mu$ l della sospensione e contare le cellule aiutandosi con la cellula di Kovas.
- Diluire (circa 1000 volte) la sospensione per ottenere circa 1000 cellule/ml.

### 2) Semina del lievito su 5 capsule di Petri YPD

Per una capsula:

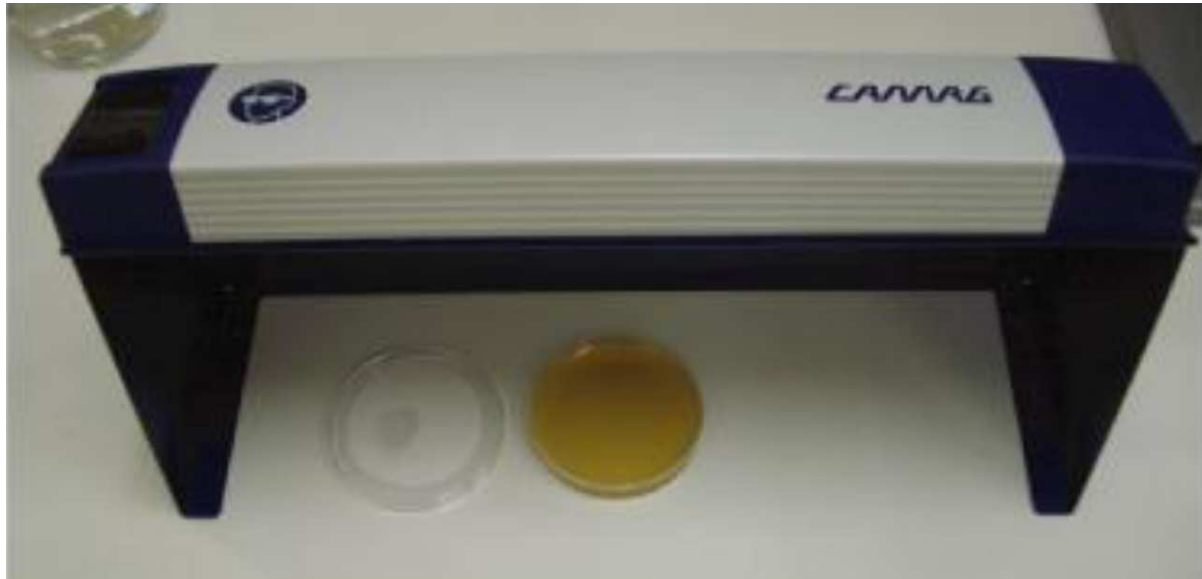
- Vortexare la sospensione di lievito da 1000 cellule/ml. È importante vortexare subito prima di pipettare perché le cellule di lievito sedimentano velocemente.
- Pipettare 100  $\mu$ l della diluzione e depositarli sulla capsula YPD.
- Seminare i 100  $\mu$ l aiutandosi con la spatola sterile (semina per spatolamento).

### 3) Mutagenesi

**Attenzione: gli UV sono mutagenici e cancerogeni. Essi influiscono anche sugli occhi e provocano delle congiuntiviti. Non guardare mai direttamente la lampada UV. Portare i guanti per evitare i colpi di sole sulle mani. Portare delle maniche lunghe per proteggere gli avambracci. Mettere gli occhiali di protezione.**

- Mettere i guanti e gli occhiali di protezione anti-UV. Mettere le maniche lunghe.
- Accendere la lampada UV (posizione 254 nm).
- Mettere una capsula di Petri sotto gli UV. **Togliere il coperchio.** Togliere le mani da sotto gli UV e accendere il cronometro.

*Osservazione: la lampada UV si spegne automaticamente dopo 10 minuti d'irradiazione. Se si utilizza la lampada più a lungo, bisogna farla ripartire ogni 10 minuti. Un'opzione più semplice è di avviarla solo durante l'irradiazione. Queste lampade non hanno bisogno di preriscaldamento per aver degli effetti sul lievito.*



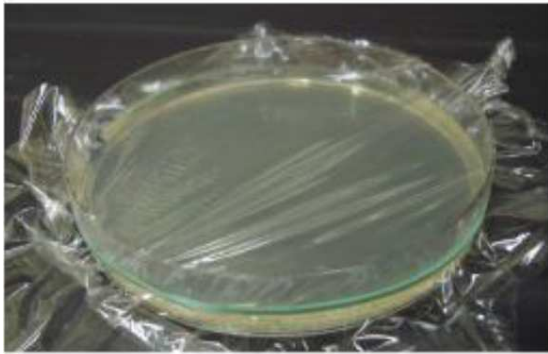
**Lampada UV per la mutagenesi.** Togliere il coperchio della capsula di Petri durante l'irradiazione. Proteggere gli occhi, le mani e gli avambracci durante le manipolazioni sotto la lampada.

- Dopo 10 secondi, rimettere il coperchio e togliere la capsula dagli UV.
- Scrivere 10 secondi sul fondo delle capsule.
- Dopo la mutagenesi, non esporre la capsula a un'intensità luminosa visibile troppo forte, al fine di evitare la fotoreversione.
- Rifare le stesse tappe esponendo le altre capsule per 20, 30 e 40 secondi rispettivamente. Scrivere la durata dell'esposizione agli UV sul fondo delle capsule.
- La quinta capsula non sarà esposta agli UV (scrivere 0 secondi sul fondo della capsula). Questa capsula sarà il controllo dell'esperienza.
- Incubare le capsule all'inghiù per 5-7 giorni a 30°C (o eventualmente a temperatura ambiente).

#### 4) Alternative possibili

##### A) Testare l'efficienza di diverse creme solari

- Procedere come nelle tappe 1 e 2.
- Togliere il coperchio, stenderci sopra un film alimentare e fissarlo con un elastico.
- Stendere 4 creme diverse su 4 capsule (scegliere l'indice UV o delle marche diverse). Lo strato di crema non deve essere troppo spesso. L'importante è che lo strato sia ripartito uniformemente (eventualmente togliere il surplus con un fazzoletto di carta).
- La quinta capsula conterrà il film alimentare senza crema solare. Questa capsula sarà il controllo dell'esperienza.



Togliere il coperchio della capsula e rimpiazzarlo con del film alimentare (immagine a sinistra). Prima di esporre agli UV la capsula, stendere la crema solare da testare sul film alimentare (immagine a destra).

- Esporre tutte le capsule sotto gli UV per 40 secondi.
- Togliere il film alimentare, rimettere il coperchio e scrivere le indicazioni (marca o tipo di crema) sul fondo della capsula.
- Incubare le capsule all'inghiù per 5-7 giorni a 30°C (o eventualmente a temperatura ambiente).

#### B) Determinare il tasso di foto reversione

- Preparare le 3 capsule YPD come descritto nelle tappe 1 e 2.
- Esporre 2 capsule agli UV per 30 secondi come descritto alla tappa 3.
- Esporre una capsula alla luce visibile forte (luce del sole o una lampada forte) subito dopo l'esposizione agli UV.
- Proteggere l'altra capsula dalla luce per 15 minuti dopo la mutagenesi.
- La terza capsula non è esposta agli UV. Questa capsula è il controllo dell'esperienza.
- Incubare le 3 capsule a 30°C per 5-7 giorni.

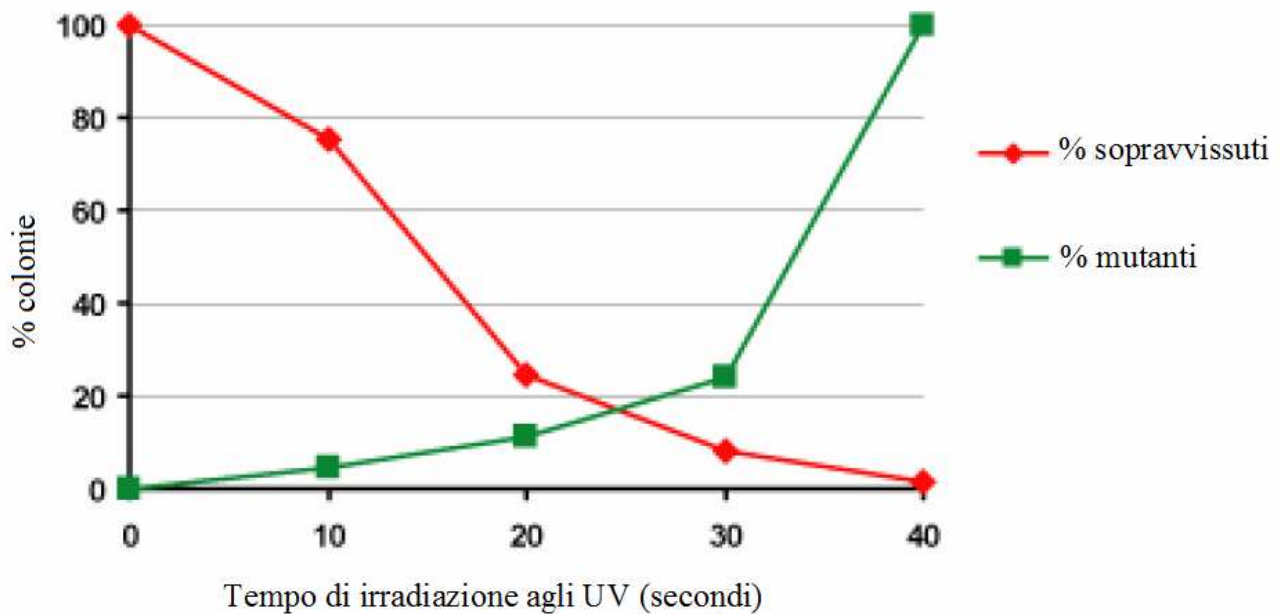
#### 5) Risultati

- Contare il numero totale di colonie su ogni capsula.
- Tracciare il grafico del numero di colonie in funzione del tempo d'irradiazione (curva di sopravvivenza).
- Contare il numero di colonie bianche su ogni capsula.
- Tracciare il grafico del numero di mutanti (colonie bianche) in rapporto al numero totale di colonie sulla capsula (curva di mutazione).



Tempo di esposizione agli UV (in secondi)	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>
Numero totale di colonie	<b>355</b>	<b>268</b>	<b>87</b>	<b>29</b>	<b>5</b>
Numero di colonie bianche	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>5</b>

Grafico dei risultati ottenuti:



In rosso: curva di sopravvivenza in %. Il 100% corrisponde al numero di colonie ottenute senza esposizione agli UV ( $t = 0$ ). In verde: curva del tasso di mutanti in % (colonie bianche in rapporto al numero di sopravvissuti).

Per l'efficienza delle creme solari, comparare e discutere i risultati ottenuti con le diverse creme.

Per il test di fotoreversione, comparare il numero di colonie (e il loro aspetto) ottenuto con e senza esposizione alla luce visibile forte.

6) Per chi desidera continuare...

Come descritto più in alto, alcuni mutanti possono essere capaci di crescere in un ambiente senza adenina. Per determinare la proporzione di questi ultimi, basta replicare le colonie bianche sulla capsula senza adenina. Per fare ciò, si mette la capsula SD senza adenina sulla

griglia della replicazione (foglio di carta contenente una griglia numerata) per contare facilmente le colonie. Procedere come segue:

- Toccare una colonia bianca con uno stuzzicadenti sterile.
- Toccare la casella 1 della capsula SD senza adenina con lo stesso stuzzicadenti.
- Gettare lo stuzzicadenti in un contenitore (gli stuzzicadenti saranno riutilizzati dopo la sterilizzazione).
- Prendere un nuovo stuzzicadenti sterile e toccare una seconda colonia bianca.
- Toccare la casella 2 della capsula SD senza adenina con lo stesso stuzzicadenti.
- Continuare finché tutte le colonie bianche non sono state toccate.
- Fare un controllo negativo (una colonia rossa) per capsula.
- Scrivere sul fondo della capsula e incubare all'inghiù a 30°C per 2-3 giorni.
- Annotare il numero di colonie capaci di crescere in rapporto al numero totale di colonie toccate.
- Discutere i risultati.

Attenzione, il numero di colonie che sono diventate capaci di crescere senza adenina nel terreno di coltura è molto basso. Conviene quindi toccare molte colonie bianche (tutte se possibile). Un'altra possibilità è di replicarle sulle capsule senza adenina con l'aiuto di un blocco di replica. Questo metodo è più rapido ma necessita di più capsule.

## Materiale

- Lampada UV (254 nm)
- Tubi per le diluzioni
- Pipette in vetro da 10 ml
- Propipette
- Pipette automatiche (P200)
- Pipette Pasteur per costruire le spatole per la semina
- Becher e alcool per la semina
- Occhiali di protezione
- Guanti
- Ceppo di lievito *ade2*
- Acqua sterile per le diluzioni
- 5 capsule YPD senza adenina
- Facoltativo:
  - o Capsule SD senza adenina
  - o Stuzzicadenti sterili