

1-2-3-4

2010

La tecnica RT qPCR (Reverse Transcription quantitative PCR) nello studio dell'espressione genica di *Saccharomyces cerevisiae*.

Application of RT qPCR to study gene expression in Saccharomyces cerevisiae.

E. Vaudano, O. Noti, A. Costantini, E. Garcia-Moruno

CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia, Via P. Micca, 35 Asti

Email: biologia.molecolare@isenologia.it

RT qPCR, espressione, *Saccharomyces cerevisiae*.

RT qPCR, expression, Saccharomyces cerevisiae.

Riassunto

Nel flusso dell'informazione genica la trascrizione rappresenta un passaggio fondamentale, la cui regolazione determina un primo controllo nella produzione di proteine strutturali o enzimatiche. Per esempio, ad una maggiore o minore espressione di determinati geni, corrisponde, anche se non in modo lineare, una diversa produzione di enzimi che determinano una variazione nella produzione di metaboliti. Ancora, se i geni codificano per proteine trasportatrici di membrana, una loro diversa trascrizione può tradursi in una differente intensità di assimilazione di nutrienti.

In questo lavoro sono presentati alcuni risultati relativi all'utilizzo della RT qPCR, recentemente affermatasi come una metodologia di riferimento per la quantificazione dell'espressione genica, applicata al lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Nel lievito secco attivo, è stata studiata l'espressione di geni codificanti per i trasportatori di ammonio *MEP1,2,3* e per la famiglia di trasportatori di esosi *HXT*, ottenendo interessanti risultati che giustificano una maggiore attenzione al processo di reidratazione del lievito secco prima dell'inoculo nel mosto. Il lavoro apre interessanti prospettive di studio sui vari aspetti legati alla regolazione della trascrizione e potrebbe contribuire a chiarire i meccanismi molecolari che intervengono in eventi critici quali fermentazioni stentate ed arresti fermentativi.

Abstract

The transcription is a fundamental step in the flow of genetic information; its regulation represents the first control in the synthesis of structural or enzymatic proteins. For instance, a different expression level of the genes, leads to a different production, even though in a non linear relation, of the corresponding enzymes that finally influence the metabolite synthesis. Moreover, if the different expression involve genes encoding for the membrane transport proteins, a different rate of nutrients transport could be observed.

In this work, results of expression studies in Saccharomyces cerevisiae using the RT qPCR, that recently has become one of the leading technique in expression analysis, are shown. In the active dry yeast expression of genes encoding for the ammonium transporters MEP 1,2,3 and hexose carriers HXT were studied. The results prove the need for greater attention to the rehydration process, prior to inoculum in must for fermentation. This work provides interesting research perspectives on regulation of gene expression and could help to clarify the molecular mechanisms of critical events such as stuck and sluggish fermentations.

Introduzione

I geni determinano una funzione soltanto se vengono espressi, cioè se l'informazione in essi contenuta come sequenza di DNA viene convertita in RNA attraverso il processo di trascrizione. Studiare la trascrizione significa quindi osservare i geni in azione, il primo passaggio di un processo che porterà ad un prodotto: RNA o catena polipeptidica. Avere una informazione quantitativa della

trascrizione vuol dire misurare la prima risposta dei geni ad un determinato stimolo ambientale che si tradurrà (anche se non linearmente ma attraverso diverse fasi regolative) in una risposta di diverso tipo, percepibile a livello macroscopico, ad esempio la produzione differenziale di un metabolita o una maggiore o minore assunzione di un nutriente.

Nell'ambito dello studio dell'espressione a livello di trascrizione, la RT qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction) è una delle più potenti tecniche a disposizione. Essa offre la possibilità di valutare l'espressione con accuratezza misurando la quantità di mRNA in un ampio intervallo, permettendo di testare diverse condizioni sperimentali (Bustin et al., 2005). Come in altre tecniche che valutano l'espressione, è fondamentale la normalizzazione dei risultati per evitare errori sperimentali come quelli che derivano dalle diverse quantità di RNA estratto e dalla differenti rese nella trascrizione inversa dei diversi campioni.

Nel sistema di quantificazione relativa l'espressione di un gene bersaglio (target genes) viene relativizzata verso uno o più geni di riferimento (reference genes). I reference genes devono essere preventivamente valutati, dimostrando di esibire la minore variazione possibile nel loro profilo di espressione durante tutte le condizioni sperimentali, prima di essere utilizzati per la normalizzazione del profilo di trascrizione dei target genes. Vari metodi sono stati proposti per la valutazione della stabilità di espressione dei reference genes (Vandesompele et al., 2002; Pfaffl et al., 2004; De Kok et al., 2005)

In questo lavoro riportiamo l'applicazione della tecnica di RT qPCR per lo studio dell'espressione genica durante la fase di reidratazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae* in forma essiccata. Attraverso l'analisi statistica sono stati valutate le stabilità di espressione di otto potenziali reference genes. La tecnica è stata successivamente utilizzata nello studio dell'espressione di alcuni geni verificandone l'espressione in mezzi di reidratazione diversi. Lo studio ha riguardato alcuni geni codificanti per il trasporto di ammonio *MEP1*, *MEP2* e *MEP3* oltre ai geni *HXT1-7* codificanti per i trasportatori di esosi più importanti presenti in *Saccharomyces cerevisiae*.

Materiali e metodi

Ceppo di lievito utilizzato e terreni di reidratazione

Nello studio di reidratazione è stato utilizzato il ceppo commerciale Fermivin prodotto da DSM Food Specialties Beverage Ingredients, (Delft, The Netherlands) appartenente alla specie *Saccharomyces cerevisiae* venduto sottoforma di Lievito Secco Attivo (LSA).

Le prove di reidratazione sono state eseguite utilizzando quattro diversi mezzi di reidratazione sterilizzati per filtrazione: acqua distillata (W), soluzione al 5% di saccarosio (S), soluzione 6.0 mM di ammonio (N), soluzione al 5% di saccarosio addizionato di 6.0 mM di ammonio (SN). 1 g di lievito secco è stato risospeso in un tubo falcon da 50 mL con 10 ml di mezzo di reidratazione

preventivamente portato a 40°C. La sospensione è stata agitata per 10 s con vortex e posta in termostato a 40°C.

I tempi di campionamento del lievito sono stati 0, 5, 15, 30 min prelevando 1 mL direttamente dal tubo il reidratato preventivamente vortexato per 10 s, ponendolo in tubo Eppendorf da 2 mL e congelandolo istantaneamente con N liquido. Ogni prova di reidratazione è stata eseguita in doppio.

Estrazione dell' RNA e retrotrascrizione

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita utilizzando un kit commerciale (Omega Biotek Inc., Doraville, USA). 50 µL di reidratato, corrispondenti a circa 2×10^8 cellule sono stati addizionati al tampone di estrazione aggiunto di 0.5 mL di palline di vetro sterili da 0.5 mm e agitando in vortex 6 volte per 30' seguiti da 30'' di raffreddamento in ghiaccio. In seguito sono state seguite le indicazioni del produttore del kit. L'analisi della qualità dell'RNA estratto e la relativa quantificazione sono state eseguite per via spettrofotometrica ed attraverso lo strumento Experion (Biorad). La qualità dell'RNA è stata verificata ulteriormente con una corsa su gel di agarosio all'1% e con il sistema di analisi capillare Experion (Biorad). L'RNA estratto è stato conservato a -80°C. Il cDNA è stato sintetizzato partendo da 200 ng di RNA totale utilizzando un kit di trascrittasi inversa two step (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguita dal trattamento con RNasi H. Il cDNA ottenuto è stato successivamente diluito e conservato a -80°.

Primer e calcolo dell'efficienza di amplificazione

I primer utilizzati in questo studio sono stati disegnati utilizzando il software Primer3 e sono stati sintetizzati dalla MWG Biotech (Ebersberg, Germany). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati attraverso elettroforesi su agarosio al 2.5% per verificare la specificità di amplificazione. I primer amplificano un solo frammento delle dimensioni aspettate con l'eccezione del primer *HXT6* che amplifica anche *HXT7* avendo i geni la stessa sequenza. I Reference Genes sono stati scelti dalla letteratura fra quelli comunemente utilizzati per *Saccharomyces cerevisiae* oltre ad alcuni utilizzati per altri generi strettamente correlate, quali *Candida sp.* (Nailis et al., 2006).

L'efficienza della amplificazione per ogni gene stata eseguita con il metodo delle diluizioni partendo da un pool di cDNA rappresentativo di tutte le estrazioni (Rasmussen, 2001) e le determinazioni del valore di espressione sono state corrette sulla reale efficienza di amplificazione. L'efficienza è stata calcolata con la formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$. La lista dei primer utilizzati, le caratteristiche degli ampliconi e l'efficienza calcolata sono riportate in Tab. 1.

Real Time PCR

L'analisi Real Time PCR è stata eseguita in piastre da 96 pozzetti utilizzando lo strumento Biorad ICycler (Biorad Laboratories, Inc., Hercules, USA) usando il fluorocromo SYBR Green secondo il protocollo riportato in Vaudano et al. (2008).

Genes	Forward and reverse primer	Product size	Efficiency
<i>18S</i>	TCA CTA CCT CCC TGA ATT AGG ATT G/AGA AAC GGC TAC CAC ATC CAA	72	2.00
<i>ACT1</i>	GCC TTC TAC GTT TCC ATC CA/GGC CAA ATC GAT TCT CAA AA	153	1.75
<i>TUB2</i>	TTA CCG TTG CAG CCT TCT TT/AAA CCT TGA GGA GCG ACA GA	151	1.92
<i>QCR9</i>	ATC TTT GCA GGT GCC TTT GT/GCA GCT ATT CGA GCC TTG AC	113	1.80
<i>PMA1</i>	GGC TGG TGT CGA AAT CTT GT/CTT TCT GGA AGC AGC CAA AC	139	1.82
<i>PGK1</i>	AAT CGG TGA CTC CAT CTT CG/GTG TTG GCA TCA GCA GAG AA	138	1.81
<i>LSC2</i>	GCG TCC AGT CAA GGT GGT AT/ACT CTT GGC AAC ATC CTT GG	126	1.91
<i>GAPDH</i>	AGA CTG TTG ACG GTC CAT CC/CCT TAG CAG CAC CGG TAG AG	90	2.00
<i>MEP1</i>	TGC CAT GGA CAT TCT AGC TG/TCG TGC TCT GTA GTG CCA TC	111	1.81
<i>MEP2</i>	ACG TTT TAG GAG CCC CAT CT/AGG AAA CAA CCT TGC CCT CT	131	1.87
<i>MEP3</i>	TGG TTG ACG CAT AAC TGG AA/GGA CAC CCG GAA TTT TAC CT	121	1.93
<i>HXT1</i>	GTT GCT TTC GGT GGT TTC AT /TCG TGG TGC TTC ATA CCA AA	101	1.87
<i>HXT2</i>	TTG CCG AAT CCT ATC CTT TG/CAG CAA TAG CCA TAG CAC GA	51	1.89
<i>HXT3</i>	GGC CGA CCA AGT ACT TAC CA/ACC GAA GGC AAC CAT AAC AC	85	1.91
<i>HXT4</i>	TAC CGT TTT CAC TGC TGT CG/GGA AGC AGC ACC CCA TAA TA	145	2.00
<i>HXT5</i>	TCT GAA GTG TCG CCT AAG CA/ATG GTA CCC TCC ATT GGA CA	139	2.00
<i>HXT6/7</i>	GGG CTG TTT GGT CTT CAT GT/TTC TTC CCA CAT GGT GTT GA	94	2.00

Tabella 1 Geni studiati e primers utilizzati in Real Time

Table 1 Genes and primers used in Real Time PCR.

Al termine dell'amplificazione è stata eseguita l'analisi di melting per verificare la specificità della reazione di amplificazione. Per ogni primer e per ogni piastra sono stati inclusi i controlli negativi. I valori di C_q (quantification cycle) sono stati ottenuti utilizzando i parametri automatici del software dello strumento (background subtracted curve fit data) e il threshold value è stato settato automaticamente dal software considerando il momento di massima efficienza della PCR. I dati espressi in C_q sono stati successivamente trasportati in Microsoft Excel per l'analisi.

Analisi dei Reference genes

La valutazione dei migliori reference genes è stata eseguita analizzando la variabilità dell'espressione dei geni candidati in tutti i campioni, prelevati dalle reidratazioni in ogni condizione. Per l'analisi è stato utilizzato il software GeNorm versione 3.3 per Microsoft Excel (Vandesompele et al., 2002).

Analisi dei Target genes

L'analisi dell'espressione dei geni target è stata eseguita normalizzando il valore in copie del gene con la media geometrica dei reference genes scelti. La significatività delle variazioni rispetto al tempo è stata determinata statisticamente attraverso l'analisi della varianza (XLStat, Addinsoft SARL, Paris, France). I geni con un p-value inferiore a 0.05 variano in modo significativo durante la reidratazione.

Determinazione di degli zuccheri e dell'ammonio.

La determinazione degli zuccheri è stata effettuata per HPLC provvisto di rivelatore rifrattometrico utilizzando la colonna Rezex RCM-Monosaccharide (Phenomenex, Torrance, USA).

La concentrazione di ammonio è stata determinata per via enzimatica (Boehringer Mannheim R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Risultati e discussione

Scelta dei migliori reference gene

Questo lavoro descrive l'applicazione della tecnica RT qPCR nello studio di alcuni geni coinvolti nell'assimilazione dell'ammonio e degli zuccheri. Un accurata normalizzazione dei dati di espressione è fondamentale per ottenere informazioni affidabili e, a questo scopo, deve essere eseguita una preventiva valutazione dei potenziali reference genes. Nel caso di cellule che passano bruscamente da uno stato fisiologico di quiescenza, quale è quello in cui si trovano le cellule disidratate, ad uno stato metabolicamente attivo derivante dalla reidratazione in mezzo acquoso, questa normalizzazione e la preventiva valutazione dei geni di riferimento assumono un significato ancora più importante.

L'identificazione di un pool di geni di riferimento per lo quantificazione relativa del target nelle condizioni di reidratazione si basa sulla valutazione della loro variabilità di espressione durante tutte le condizioni dell'esperimento. Il metodo utilizzato prevede l'uso del software GeNorm. I geni sono classificati secondo valore M che rappresenta la media delle variazioni coppia-coppia (pairwise variation) V intesa come la deviazione standard del rapporto di espressione di un gene e gli altri geni candidati. Il software ricalcola poi la M escludendo il gene meno stabile fino ad arrivare ai due più stabilmente espressi.

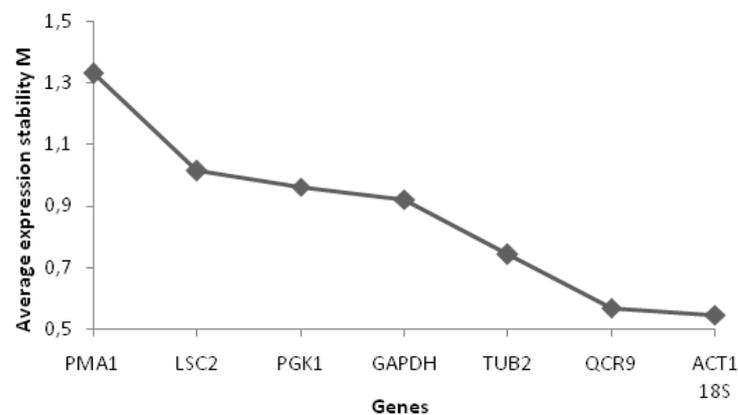


Fig. 1 Analisi dei geni di riferimento candidati con il software GeNorm
Fig. 1 GeNorm analysis of candidate reference genes.

Tutti i geni analizzati hanno un valore di M inferiore al limite di 1.5 suggerito dagli autori tranne *PMA1* che mostra grandi variazioni nelle diverse condizioni di reidratazione. Dopo il processo di esclusione passo a passo, i migliori reference genes sono risultati *ACT1* e *18S* seguiti da *QCR9* (Fig 1). Seguendo il suggerimento degli autori e considerando i valori molto simile di *QCR9* alla coppia dei due migliori geni, questo può essere considerato come terzo reference gene per la normalizzazione. I tre geni stati quindi utilizzati per la normalizzazione dei target genes attraverso la media geometrica dei loro valori di espressione trasformati in numero di copie.

L'assimilazione dell'ammonio

I trasportatori *MEP1-3* mediano l'entrata di ammonio a diverse concentrazioni e sono di grande importanza nelle prime fasi di fermentazione, fino a quando sono presenti fonti di azoto facilmente assimilabili quali ammonio e glutammato ed è quindi in funzione la NCR (nitrogen catabolite repression) che impedisce l'espressione dei trasportatori per altre fonti di azoto (Marini et al., 1997; Beltran et al., 2004).

Durante la reidratazione l'ammonio viene prontamente assimilato dal lieviti. Nel terreno dove esso è stato addizionato si vede infatti una repentina diminuzione fino al 40% della quantità iniziale (Fig. 2). Considerando che la quantità di ammonio fornita nel terreno è al di sotto del limite di 20 mM in cui esso può entrare per sola diffusione oppure con l'ausilio di un trasportatore a bassa affinità non relazionato alla famiglia *MEP*, secondo l'ipotesi formulata da Marini, è lecito concludere che questa assimilazione avvenga attraverso i trasportatori *MEP*. Il lievito secco utilizzato nei nostri esperimenti non apporta ammonio nel mezzo di reidratazione (Dati non riportati).

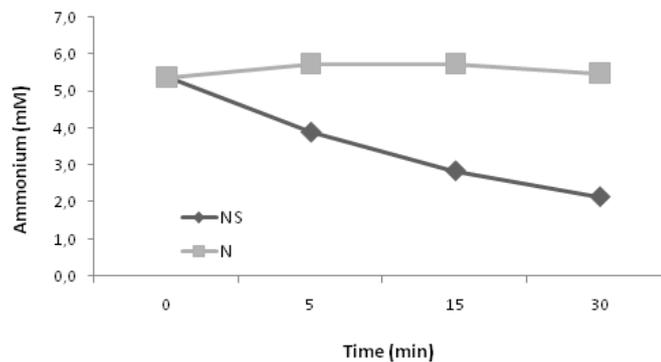


Fig. 2 Assorbimento dell'ammonio nel mezzo SN contenente zuccheri e ammonio e nel mezzo N contenente ammonio.

Fig. 2 Absorption of ammonium during rehydration in medium NS containing sugar and ammonium and in medium N containing ammonium.

I dati relativi all'espressione dei geni *MEP* sono riportati in Fig.3. Il campionamento al tempo 0 offre un'istantanea della situazione del lievito al momento della disidratazione (Rossignol et al 2006). In questo stadio i nostri dati indicano una differenza di un ordine di grandezza di *MEP1* e *MEP2* trasportatori da alta affinità rispetto al trasportatore a bassa affinità *MEP3* evidenziando come in condizioni di carenza di N tipiche delle fasi finali della produzione dell'LSA questo gene abbia un'espressione inferiore.

Il trasportatore a bassa affinità *MEP3* mostra una forte induzione della trascrizione nel terreno S già 5 min dopo l'inizio della reidratazione ($p < 0.01$) e raggiungendo il massimo di circa 8 volte rispetto a 0 dopo 15 min mentre nel terreno con ammonio l'induzione appare ritardata rimanendo al

livello iniziale a 5 min e incrementando drasticamente a 15 min; l'effetto della presenza o meno di ammonio nel terreno di reidratazione appare poco chiara.

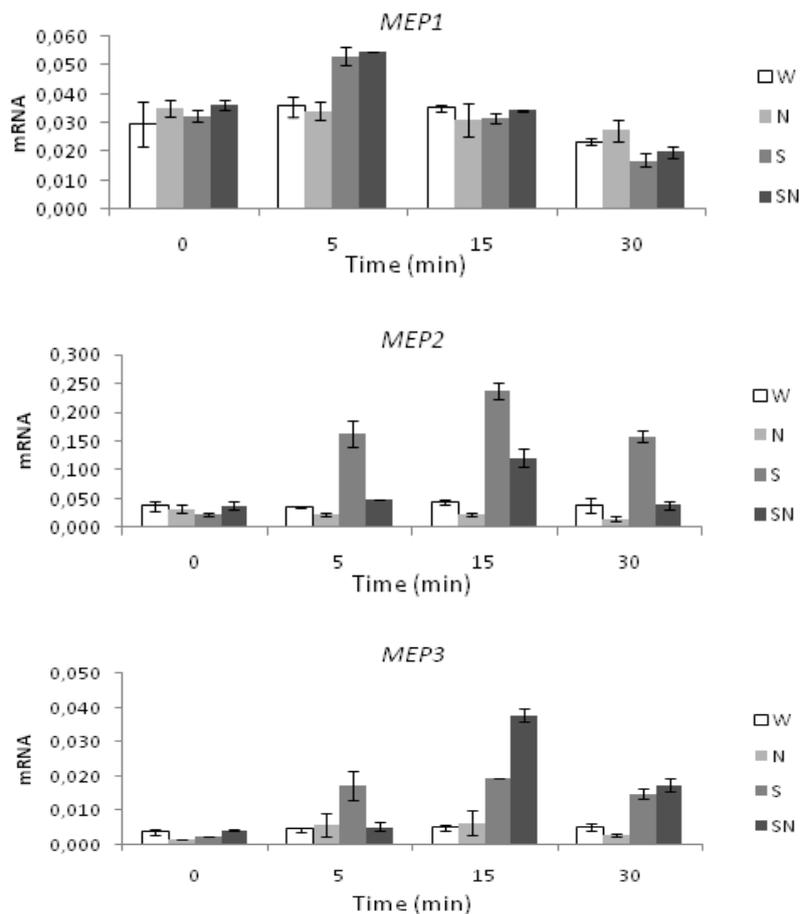


Fig. 3 Espressione dei geni per i trasportatori dell'ammonio in quattro differenti mezzi di reidratazione. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard (n=4)

Fig.3 Ammonium transporters gene expression during the rehydration in four different rehydration media. Error bars represent standard deviations (n = 4)

MEP1 è il gene che viene attivato di meno durante la reidratazione arrivando ad un massimo di circa 1,5 volte rispetto a 0 in ambedue i terreni S e SN ($p < 0.05$). L'effetto dell'ammonio non è visibile su questo trasportatore che non mostra differenze significative in espressione tra i due terreni durante tutto il periodo di reidratazione.

Particolarmente interessante risulta l'espressione di *MEP2*. Questo trasportatore viene fortemente attivato nel terreno in cui è presente solamente saccarosio ($p < 0.01$); esso arriva dopo 15 min a un livello di espressione di circa 10 volte rispetto al punto 0. A differenza degli altri trasportatori, *MEP2* sembra modulare chiaramente la sua espressione in funzione della presenza o meno di ammonio risultando espresso in misura molto minore nel terreno addizionato di zucchero e ammonio durante tutto il periodo della reidratazione, con un massimo di circa 3 volte rispetto a 0. Allo scopo di indagare ulteriormente il lievito è stato sottoposto a reidratazione con zucchero al 5% e concentrazione crescente di ammonio osservandone l'espressione a 15 min. I dati mostrano che

l'espressione di *MEP2* è strettamente correlata alla concentrazione di ammonio (dati non presentati) coerentemente con quanto riportato da Marini et al., (1997), in *S. cerevisiae* e da Biswas e Morschhäuser, (2005) in *Candida albicans*. I nostri dati rivelano quindi che la NCR agisce sull'espressione di questo gene già durante la reidratazione dimostrando che in questa fase il lievito è in grado non solo di attivare ma anche di modulare rapidamente l'espressione come risposta a stimoli ambientali diversificati.

Inoltre questa puntuale risposta potrebbe essere il riflesso di altre funzioni mediate da *MEP2*; oltre che per il trasporto di ammonio, *MEP2* agisce anche da sensore della concentrazione di ammonio influenzando sulla regolazione delle permeasi per fonti alternative di azoto e sulla attivazione di particolari condizioni di crescita come quella pseudo-filamentosa (Marini et al., 1997; Lorenz and Heitman 1998).

Per tutti e tre i geni si nota una diminuzione dell'espressione alla fine della reidratazione. Sembra quindi sussistere un effetto di attivazione della trascrizione una volta che il lievito si idrata seguito da una fase di regolazione. La minore variazione di espressione tra *MEP2* e *MEP1* può essere il riflesso di una diversa efficienza di trasporto dell'ammonio in quanto la produzione di una quantità di trasportatore *MEP2* maggiore può sopperire alla sua bassa efficienza (Marini et al., 1997, Biswas e Morschhäuser, 2005).

L'espressione dei tre trasportatori durante la reidratazione rimane completamente invariata nei reidratati senza saccarosio (W e N). Evidentemente, non è solo il cambiamento osmotico e la presenza di ammonio a determinare variazione dello stato di espressione dei trasportatori ma sono necessari anche la presenza di fonti di carbonio facilmente assimilabili. Durante questa fase la presenza di glucosio ripristina velocemente le capacità metaboliche cellulari attraverso il sistema di segnalazione cellulare *RAS-cAMP* attivando la sintesi delle proteine e quindi anche la trascrizione dei geni *MEP* (Jiang et al., 1998). Queste osservazioni concordano con quelle di Novo et al. (2007) che hanno verificato come la presenza di zuccheri assimilabili abbia il ruolo di interruttore che innesca modificazioni trascrizionali, quando i lieviti sono posti in terreno con diverse fonti di carbonio dopo la reidratazione in acqua. Le sue osservazioni possono essere quindi anticipate alla fase di reidratazione.

Assimilazione degli zuccheri

Durante la fermentazione l'assimilazione degli zuccheri è mediata dai trasportatori appartenenti alla famiglia dei facilitatori dei monosaccaridi (Bisson et al. 1993). Con diverse affinità al substrato essi concorrono a modulare l'ingresso degli zuccheri a diverse concentrazioni e sono finemente regolati nella trascrizione in base alla concentrazione degli stessi, attraverso i sensori di glucosio *Snf3* e *Rgt2* (Özcan and Johnston, 1995).

Durante la reidratazione, l'attivazione e il funzionamento del sistema di idrolisi del saccarosio e del trasporto è evidenziato dai dati riportanti in Fig. 4. Le cellule sono in grado di idrolizzare il saccarosio non appena sono poste nel mezzo con un massimo di attività idrolitica dopo 5 min dall'inizio della reidratazione. L'attività idrolitica è imputabile all'invertasi del lievito e non all'ambiente acido (max pH 5.00) che si crea durante il processo, in quanto la permanenza del saccarosio a 40°C in tampone citrato-fosfato a pH 5.00 non comporta la sua idrolisi (dati non presentati). La diminuzione complessiva degli zuccheri osservabile già dopo 5 min dall'inizio del processo e la differenza di assimilazione tra fruttosio e glucosio suggerisce che, oltre alla scissione del saccarosio nei due monosaccaridi, la cellula è in grado di trasportare gli esosi all'interno della cellula in modo mediato dai trasportatori *HXT*; questi generalmente hanno una maggiore affinità per il glucosio rispetto al fruttosio.

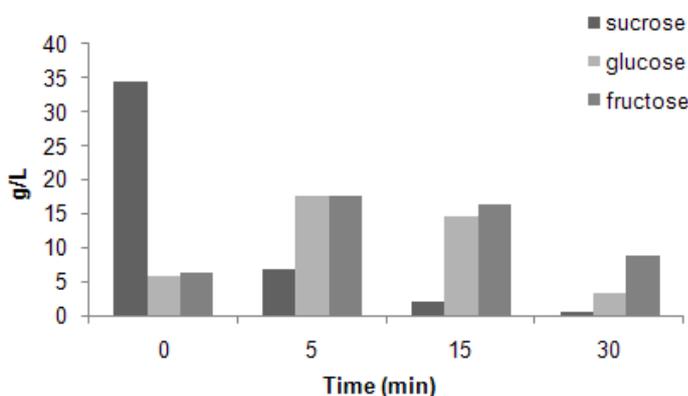


Fig. 4 Evoluzione degli zuccheri nel mezzo di reidratazione S contenente 5% di saccarosio.
 Fig. 4 Sugars evolution during rehydration in medium S containing 5% sucrose.

Per quanto riguarda l'espressione dei trasportatori *HXT*, vengono riportati i dati più significativi, riferiti ai terreni di reidratazione W (acqua) e S (acqua e saccarosio). I dati mostrano una differenza di espressione iniziale (T0) che risulta superiore per i geni *HXT5* e *HXT6/7* di circa 100-250 volte rispetto a *HXT1*, *HXT2*, *HXT3* e *HXT4* (Fig. 5). I valori di espressione iniziali di *HXT1*, *HXT3*, *HXT5* e *HXT6/7* riflettono coerentemente le condizioni presenti al momento dell'essiccazione e il loro sistema di regolazione nei confronti del glucosio; infatti la bassa o nulla concentrazione di zuccheri che caratterizza le fasi finali del processo produttivo del lievito secco, in cui si cerca di indurre la resistenza all'essiccazione sottoponendo i lieviti a condizioni nutrizionali carenti, causa la repressione dei trasportatori a bassa affinità *HXT1* e *HXT3*, che vengono repressi dalla carenza di glucosio, e l'induzione della coppia *HXT6/7* trasportatori ad alta affinità che invece sono indotti nelle medesime condizioni (Liang and Gaber, 1996). Inoltre l'osservazione di alcuni autori secondo i quali l'espressione di *HXT5* e *HXT6* potrebbe essere una risposta a stress nutritivi, potrebbe

spiegare il valore elevato di espressione nel lievito allo stato secco (Diderich et al. 2001; Perez et al. 2005; Rossignol et al. 2006).

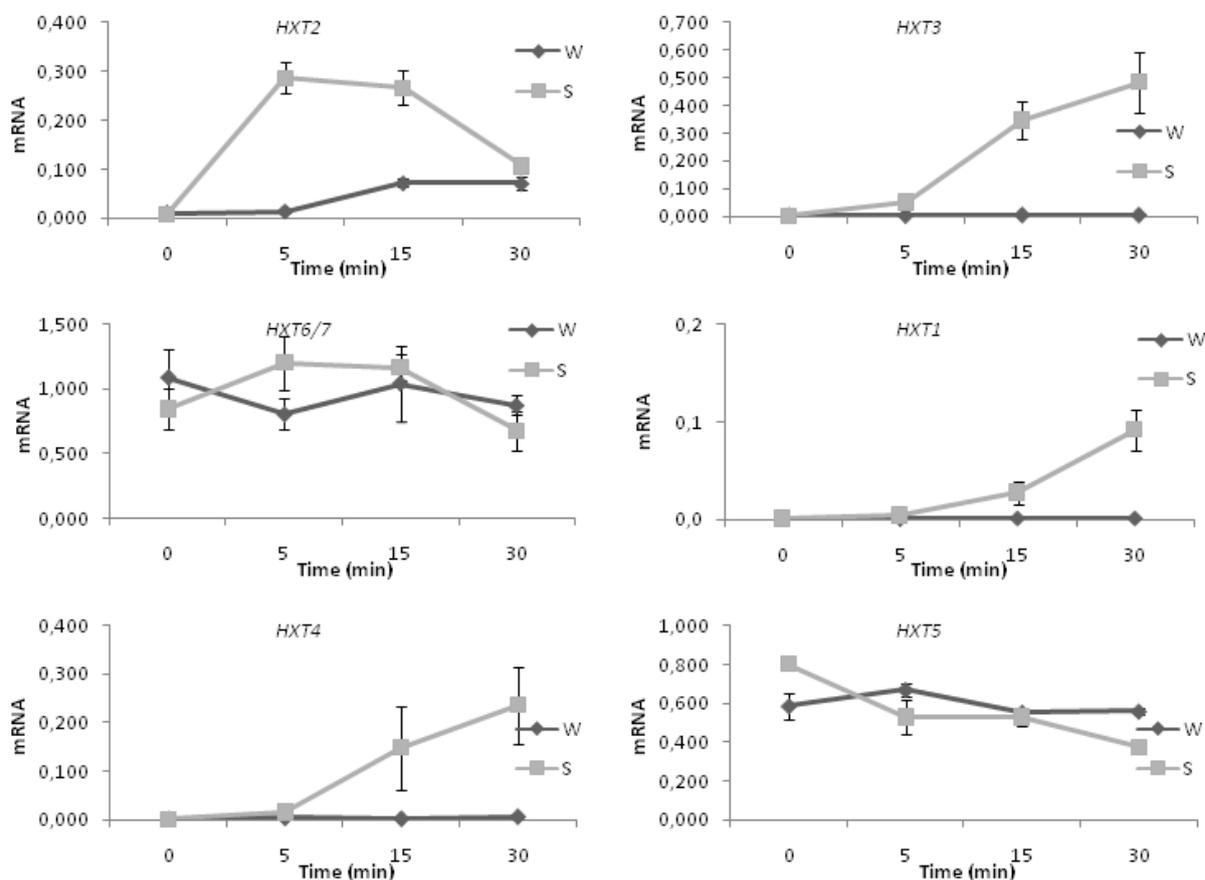


Fig. 5 Espressione dei geni per i trasportatori degli esosi *HXT* durante la reidratazione in acqua (W) e in soluzione 5% saccarosio (S). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard (n=4)

Fig 5 *HXT* hexose transporters expression during rehydration in water (W) and water with 5% sucrose (S). Error bars represent standard deviations (n=4)

I valori di espressione iniziale dei trasportatori ad alta affinità *HXT2* e *HXT4* sono coerenti con le condizioni di produzione del LSA se si ipotizza la totale assenza di zuccheri nelle ultime fasi produttive. L'assenza di glucosio reprime la trascrizione in quanto il fattore di trascrizione bifunzionale *Rgt1* legandosi al promotore del gene agisce come repressore reclutando i repressori generali *Ssn6* e *Tup1* (Ozcan and Johnston, 1999). Un'ipotesi alternativa si basa sull'osservazione che l'espressione di questo trasportatore può sfuggire al controllo del glucosio in determinate condizioni quali quelle di iperosmosi presenti durante l'essiccazione (Turkel 1999).

I sette trasportatori, osservati durante la reidratazione in soluzione di saccarosio al 5%, mostrano comportamenti differenti (Fig. 5). *HXT2* viene attivato nelle fasi iniziali della reidratazione ($p < 0.01$) in risposta alla presenza di zuccheri arrivando al livello massimo di espressione a 5 min rispetto al tempo 0. Successivamente la sua espressione tende a scendere. Anche durante la reidratazione la

risposta a livello di espressione sembra incoerente con le caratteristiche del trasportatore che dovrebbe essere represso dalle alte concentrazioni di esosi (1-5%) presenti durante tutta la reidratazione considerando che il saccarosio viene immediatamente idrolizzato. La cinetica di espressione potrebbe indicare una prima repentina risposta alla presenza di esosi che in qualche modo aggira la repressione da glucosio, seguita da una fase regolativa che reprime l'espressione del gene *HXT2* (Ozcan and Johnston, 1995).

I trasportatori a bassa affinità *HXT1* e *HXT3* risultano, nel terreno con zucchero, i geni con la maggiore variazione relativamente al tempo 0 ($p < 0.01$), con valori di mRNA che arrivano a 150-200 volte rispetto a 0 nel campionamento a 30 min. In questo caso il comportamento è coerente con le caratteristiche di affinità dei trasportatori. L'attivazione è ritardata rispetto a *HXT2* e non viene moderata al proseguire della reidratazione. L'induzione osservata senza una successiva regolazione è in accordo con quanto osservato da altri autori, i quali trovano *HXT3* poco influenzabile dalla concentrazione di zuccheri ma solo dalla loro presenza (Ozcan and Johnston, 1995). Per il gene *HXT4* l'attivazione in presenza di un'alta concentrazione di esosi sembra essere in contraddizione con quanto osservato da Ozcan and Johnston, (1995), ma un simile comportamento è stato precedentemente osservato da altri autori durante la fermentazione. (Perez et al. 2005)

L'espressione dei trasportatori ad alta affinità *HXT6/7* e del trasportatore a media affinità *HXT5* durante il periodo di reidratazione nel terreno con saccarosio rimane elevata con una debole tendenza alla diminuzione ($p < 0.05$). La bassa reattività di questi trasportatori insieme all'attivazione dei trasportatori *HXT2* e *HXT4* sembra confermare che, quello operato dagli esosi, non è il solo meccanismo regolatorio ma che la minore o maggiore espressione può essere modulata da stress nutrizionali quali la carenza di fonti azotate oppure da particolari condizioni metaboliche della cellula (Perez et al. 2005).

Durante il processo reidratazione in acqua senza saccarosio, il gene *HXT2* risulta l'unico tra i trasportatori studiati con una variazione significativa ($p < 0.01$) arrivando a circa 8 volte a 30 min rispetto al tempo 0. Non si osservano variazioni significative rispetto a tempo 0 per i trasportatori *HXT1*, *HXT3* e *HXT4* coerentemente con le caratteristiche dei trasportatori che vengono repressi da basse o nulle concentrazioni di zuccheri. In modo simile i trasportatori *HXT5* e *HXT6/7* non subiscono modificazioni rimanendo quindi espressi a livelli elevati. In generale, anche per i trasportatori di esosi *HXT*, con l'eccezione di *HXT2*, sembra che la cellula reidratata senza l'aggiunta di zuccheri rimanga in uno stato quiescente e che una minima quantità di zucchero assimilabile sia necessaria per provocare modificazioni a livello trascrizionale.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che durante la reidratazione, oltre alla repentina attivazione della trascrizione, il lievito è in grado di modulare l'espressione genica, essendo in grado di reagire

alla diversa composizione del mezzo. Una delle osservazioni più interessanti è che il lievito reagisce immediatamente al cambiamento ambientale a condizione che sia presente nel mezzo di reidratazione una fonte di carbonio sotto forma di esosi assimilabili. Questo fenomeno, riguarda tutti i trasportatori *MEP* e quasi tutti i geni *HXT* che, quindi, sembrano sottoposti a regolazione diretta o indiretta da parte degli zuccheri. Questi vengono introdotti nella cellula grazie ad un sistema di assimilazione che è in grado di operare immediatamente permettendo, attraverso l'idrolisi del saccarosio, la formazione dei due esosi glucosio e fruttosio che vengono prontamente trasferiti all'interno della cellula grazie ai trasportatori *HXT*. Fra i trasportatori di ammonio *MEP2* ha mostrato una risposta finemente regolata dalla concentrazione di ammonio. È stato inoltre evidenziato, per alcuni trasportatori *HXT*, che la loro espressione non è semplicemente regolata dalla maggiore o minore affinità per il substrato. Sembrano, infatti, esistere meccanismi che, sia nella produzione ed essiccazione che nella reidratazione permettono alla cellula di aggirare il controllo da parte degli esosi.

Le diversità di espressione riscontrate tra i terreni utilizzati si riflettono, presumibilmente, in differenze anche a livello proteomico, influenzando sulla vitalità e sulle performance fermentative dei lieviti, una volta inoculati nel mosto. Oggi la reidratazione dei lieviti è un passaggio relativamente trascurato nella gestione delle fermentazioni. L'acquisizione di informazioni a livello molecolare sul processo potrebbe portare al miglioramento della gestione di questo passaggio in cantina, intervenendo sulla composizione del mezzo, sul tempo di reidratazione, sulla temperatura e su altri fattori. Questo porterebbe un vantaggio competitivo al ceppo inoculato abbreviando il periodo di latenza e permettendo il rapido inizio della fermentazione e potrebbe rappresentare una buona "prevenzione" contro gli arresti fermentativi e le alterazioni organolettiche derivanti da inquinamenti microbici.

Ringraziamenti

Questo studio è stato finanziato dal *Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali* nell'ambito del progetto "Express-Idra" (D.M 19177-7303-08).

Riferimenti bibliografici

1. BELTRAN G., NOVO M., ROZÈS N., MAS A., GUILLAMÓN J.M. (2004). *Nitrogen catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae during wine fermentations*. FEMS Yeast Research, (4): 625-632.
2. BISSON L.F., COONS D.M., KRUCKEBERG A.L., LEWIS D.A. (1993). *Yeast sugar transporters*. Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology, (28): 259-308.
3. BISWAS K., MORSCHHÄUSER J. (2005). *The MEP2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in Candida albicans*. Molecular Microbiology, (56): 649-669.
4. BUSTIN S.A., BENES V., NOLAN T, PFAFFL M.W. (2005). *Quantitative real-time RT-PCR – a perspective*. Journal Of Molecular Endocrinology (34): 597-601.

5. DE KOK J.B., ROELOFS R.W., GIESENDORF B.A., PENNING S. J.L., WAAS E.T., FEUTH T., SWINKELS D.W., SPAN P.N. (2005). *Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes*. *Laboratory Investigation*, (85): 154-159.
6. DIDERICH J.A., SCHUURMANS J.A., VAN GAALEN M.C., KRUCKEBERG A.L., VAN DAM K. (2001). *Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, (18): 1515-1524.
7. JIANG Y., DAVIS C., BROACH J.R. (1998). *Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in Saccharomyces cerevisiae requires signaling through the Ras pathway*. *EMBO Journal*, (17): 6942-6951.
8. LIANG H., GABER R. (1996). *A novel signal transduction pathway in Saccharomyces cerevisiae defined by Snf3-regulated expression of HXT6*. *Molecular Biology of the Cell*. (7): 1953-1966.
9. LORENZ C.M., HEITMAN J. (1998). *The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, (17): 1236-1247.
10. MARINI A.M., SOUSSI-BOUDEKOU S., VISSERS S., ANDRE B. (1997). *A family of ammonium transporters in Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, (17): 4282-4293.
11. NAILIS H., COENYE T., VAN NIEUWERBURGH F., DEFORCE D., NELIS H.J., 2006. *Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in Candida albicans biofilms by real-time PCR*. *BMC Molecular Biology*, (7, 25): doi: 10.1186/1471-2199-7-25. <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/7/25>.
12. NOVO M., BELTRAN G., ROZES N., GUILLAMON J.M., SOKOL S., LEBERRE V., FRANÇOIS J., MAS A. (2007). *Early transcriptional response of wine yeast after rehydration, osmotic shock and metabolic activation*. *FEMS Yeast Research*, (7): 304-316.
13. ÖZCAN S., JOHNSTON M. (1995). *Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter HXT genes to be induced by different levels of glucose*. *Molecular and Cellular Biology*, (15): 1564-1572.
14. ÖZCAN S., JOHNSTON M., (1999). *Function and regulation of yeast hexose transporters*. *Microbiology and Molecular Biology Review*, (63): 554-569.
15. PEREZ M., LUYTEN K., MICHEL R., RIOU C., BLONDIN B. (2005). *Analysis of Saccharomyces cerevisiae hexose carrier expression during wine fermentation, both low- and high-affinity HXT transporters are expressed*. *FEMS Yeast Research* (54): 351-361.
16. PFAFFL M.W., TICHOPAD A., PRGOMET C., NEUVIANS T.P. (2004). *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations*. *Biotechnology Letters*, (26): 509-515.
17. RASMUSSEN R. (2001). *Quantification on the LightCycler*. In: MEUER S., WITTEW C., NAKAGAWARA K., (Eds.), *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg pp 21-34.
18. ROSSIGNOL T., POSTAIRE O., STORAĀ J., BLONDIN B. (2006). *Analysis of the genomic response of a wine yeast to rehydration and inoculation*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (71): 699-712.
19. TÜRKEL S. (1999). *Hyperosmotic stress represses the transcription of HXT2 and HXT4 genes in Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, (44): 372-376.
20. VANDESOMPELE J., DE PRETER K., PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., DE PAEPE A., SPELEMAN F. (2002). *Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biology (Research)* (3): 0034.1-0034.11.

21. VAUDANO E., COSTANTINI A., CERSOSIMO M., DEL PRETE V., GARCIA-MORUNO E. (2009). *Application of real-time RT-PCR to study gene expression in active dry yeast (ADY) during the rehydration phase.* International Journal of Food Microbiology, (129): 30-36.