

Aulas práticas de Fisiologia Celular e Molecular

Transportadores de amônio (MEPs) em leveduras

Aulas práticas (7 e 21 de abril)

Trata-se de um conjunto de aulas de demonstração em que os alunos irão executar alguns procedimentos que no seu conjunto mostram a versatilidade das formas inorgânicas de azoto reduzido ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) como nutrientes, elementos tóxicos e sinalizadores num organismo modelo: *Saccharomyces cerevisiae* (levedura).

Este módulo da Fisiologia Celular e Molecular é constituído por duas aulas práticas, sendo a primeira essencialmente preparativa e a segunda interpretativa dos resultados obtidos.

1 – Inoculação de estirpes de *S. cerevisiae* cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de amônio e de potássio (± 60 min).

O dispositivo experimental proposto baseia-se na existência de uma componente dependente de potássio na toxicidade amoniacal. Assim, espera-se que baixas concentrações de potássio (1,3 mM K^+) e elevadas concentrações de amônio (300 mM NH_4^+) no meio de cultura inibam o desenvolvimento das colónias de *S. cerevisiae* estirpe 31019b. Porque é que o amônio a 300 mM é tóxico?

Delineamento experimental: 2 concentrações de K^+ (1,3 e 13 mM) x 3 concentrações de NH_4^+ (1; 76 e 300 mM) x 3 leveduras (WT, ΔMEP e MEP2). Cada grupo de trabalho vai realizar 2 repetições de cada tratamento. As leveduras utilizadas são todas *Saccharomyces cerevisiae* haplóides da estirpe 31019b (Marini et al 1997, Mol Cell Biol 17(8):4282).

Meio de cultura SD (sem N e sem K) meio mínimo de cultura SD: 0,1 g/L NaCl; 0,1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 g/L glucose; 1 mL de solução stock vitaminas [1000x] e 1 mL de solução stock micronutrientes [1000x]. Foram depois adicionadas as quantidades necessárias para conseguir as diferentes combinações entre a concentração final de 1,3 ou 13 mM de potássio e 1; 76 ou 300 mM de amônio. **IMPORTANTE! Para o Δmep adicionar uracilo (URA) ao meio para uma concentração final de 12 ug/ mL, i.e., 250 μL de URA stock 2,4mg/mL a 50mL de meio SD.**

Procedimento: Cada grupo vai inocular 36 caixas de Petri pelo método de espalhamento recorrendo a uma suspensão de células com DO de 1, e utilizando 20 μL da suspensão por caixa (6 com WT, 6 com ΔMEP e 6 com MEP2). Na segunda aula prática serão observados os resultados em termos de número de colónias formadas e outras observações (ex. dimensão das colónias).

Tabela 1. Número de colónias formadas

WT	[K ⁺] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)		
		1	76	300
	1,3			
	13			
Δ MEP		1	76	300
	1,3			
	13			
MEP2		1	76	300
	1,3			
	13			

Tabela 2. Outras observações

WT	[K ⁺] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)		
		1	76	300
	1,3			
	13			
Δ MEP		1	76	300
	1,3			
	13			
MEP2		1	76	300
	1,3			
	13			

2 – Comunicação entre colónias (± 60 min)

Muitas das colónias de microrganismos libertam NH_3 como sinalizador da sua presença, o que resulta na inibição do crescimento da colónia vizinha no sentido em que o espaço já está ocupado e por isso pode aumentar a competição. O objetivo desta atividade é perceber o papel do MEP2 na sinalização amoniacal da proximidade de outra colónia.

Partindo de culturas de WT, MEP2 e Δ MEP inoculam-se placas de Petri com meio GMagar com uma única colónia, e montam-se de acordo com o indicado na figura em abaixo (Palková et al 1997). Este dispositivo assegura que a única comunicação entre as colónias seja feita através de compostos voláteis no qual se inclui a NH_3 . Os controlos serão realizados com uma fonte de NH_3 em substituição de uma das colónias, e de uma armadilha para a NH_3 na parte de cima de outra caixa.

Meio de cultura GMagar: 1% extrato de levedura, 3% glycerol, 2% Agar, 30 mM de CaCl_2 - inibidor do NSC.

Procedimento: Cada grupo tem 10 caixas de Petri com Meio GMagar para testar a hipótese que tenha criado.

Inocular as caixas de acordo com o esquema da figura. Os alunos dispõem de culturas em meio prolina das três estirpes (WT, MEP2 e Δ MEP), 1 frasco com discos de papel e soluções de amónia e ácido sulfúrico. Inocular as caixas, colocando uma gota de cultura e um disco de papel com amónio ou com ácido sulfúrico. Crie os vários arranjos de que necessita para testar a hipótese.

Depois de efetuar as combinações desejadas, colocar as caixas na incubadora a 28°C e observar na aula prática seguinte.

Etapa 1: Inoculação

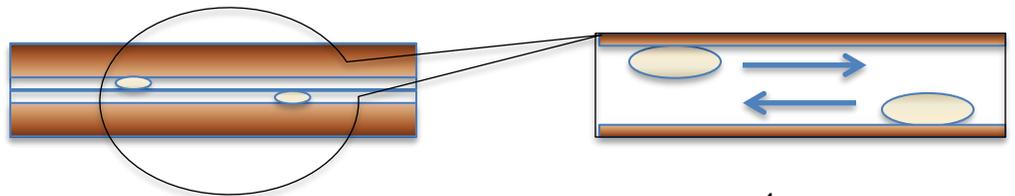
Fundo da caixa: estirpe (a)



Tampa da caixa: estirpe (b)



Etapa 2: Comunicação:



(a) e (b) podem ser as estirpes WT, MEP2 ou Δ MEP, controlos (fonte de NH_3 : disco com NaOH no meio, armadilha para a NH_3 : disco com H_2SO_4 no meio).

3 – Amónio como indutor da resistência a antibióticos (± 60 min)

Muitas das colónias de microrganismos libertam NH_3 como sinalizador da sua presença o que resulta na inibição do crescimento da colónia vizinha (atividade 2). Mas num meio fisicamente separado a NH_3 libertada por uma colónia pode interferir com as características da colónia vizinha, como por exemplo pode induzir resistência a antibióticos. Pensa-se que esta resistência seja proveniente da indução da produção de poliaminas a partir da NH_3 , quando esta é detectada pelos transportadores específicos de amónio. O aumento da resistência a antibióticos foi observado em bactérias com transportadores activos. O objetivo desta atividade é perceber se a NH_3 também induz resistência a antifúngicos em leveduras, e se o triplo mutante (que não possui MEPs ativos - ΔMEP) é afetado pela presença de NH_3 na sua capacidade de ter maior resistência a antifúngicos.

Meio de cultura: Meio MB inoculado com *Bacillus* sp produtor de NH_3 . Meio NB sem cultura. Solução estéril de amónio 5 mM. Meio prolina e meio prolina com pimarcina (antifúngico a 0,01%).

Material Biológico: Utilizar as três estirpes de leveduras (WT, MEP2 e ΔMEP)

Procedimento: As culturas de leveduras e soluções de amónio são incubadas em caixas de Petri tripartidas (onde as culturas estão fisicamente separadas). Cada caixa de Petri terá um compartimento inoculado com cada uma das estirpes de levedura em meio prolina e pimarcina e noutro com meio prolina. No terceiro compartimento teremos a inoculação de *Bacillus* sp produtor de NH_3 , 1 ml de NH_3 ou 1 ml de água.

As inoculações devem ser feitas de acordo com o esquema da figura abaixo. Depois de efetuar as combinações desejadas, colocar as caixas na incubadora a 28°C e observar na aula prática seguinte.

