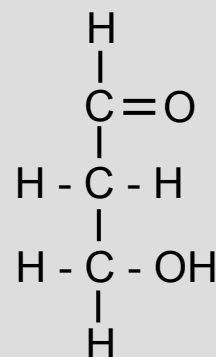


REUTERINA

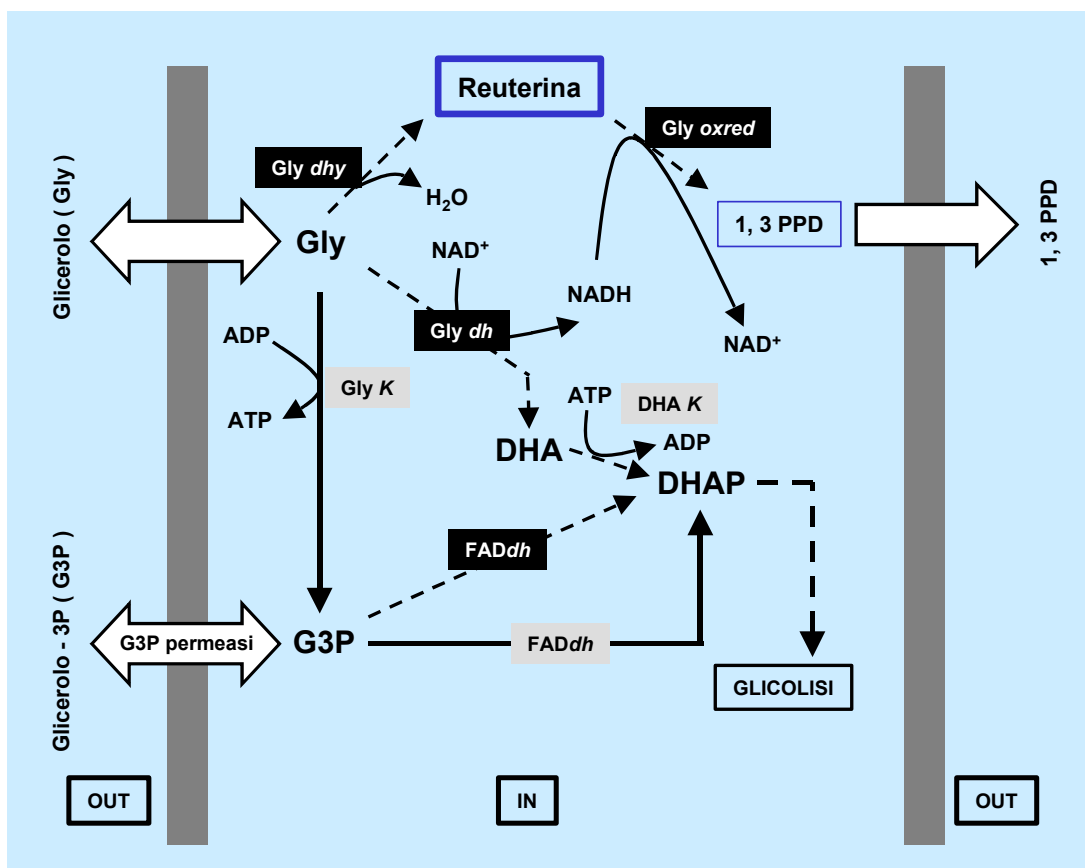
La **reuterina** (β - idrossipropionaldeide) mostra un ampio spettro di attività sia nei confronti di procarioti che di eucarioti.

Questa molecola rappresenta un intermedio del metabolismo anaerobio del glicerolo di **Lactobacillus reuteri** e di altre specie batteriche.

L. reuteri è una specie di batterio lattico eterofermentante, che colonizza il tratto gastrointestinale, inoltre si ritrova comunemente in diversi prodotti lattiero-caseari, carni e in impasti acidi. Vista l'ampia diffusione di *L. reuteri* negli alimenti e nel tratto gastrointestinale dell'uomo e preso atto dell'ampio spettro d'azione della reuterina, questa molecola rappresenta un utile mezzo per il controllo della salubrità degli alimenti (biopreservazione) e di prodotti non alimentari.



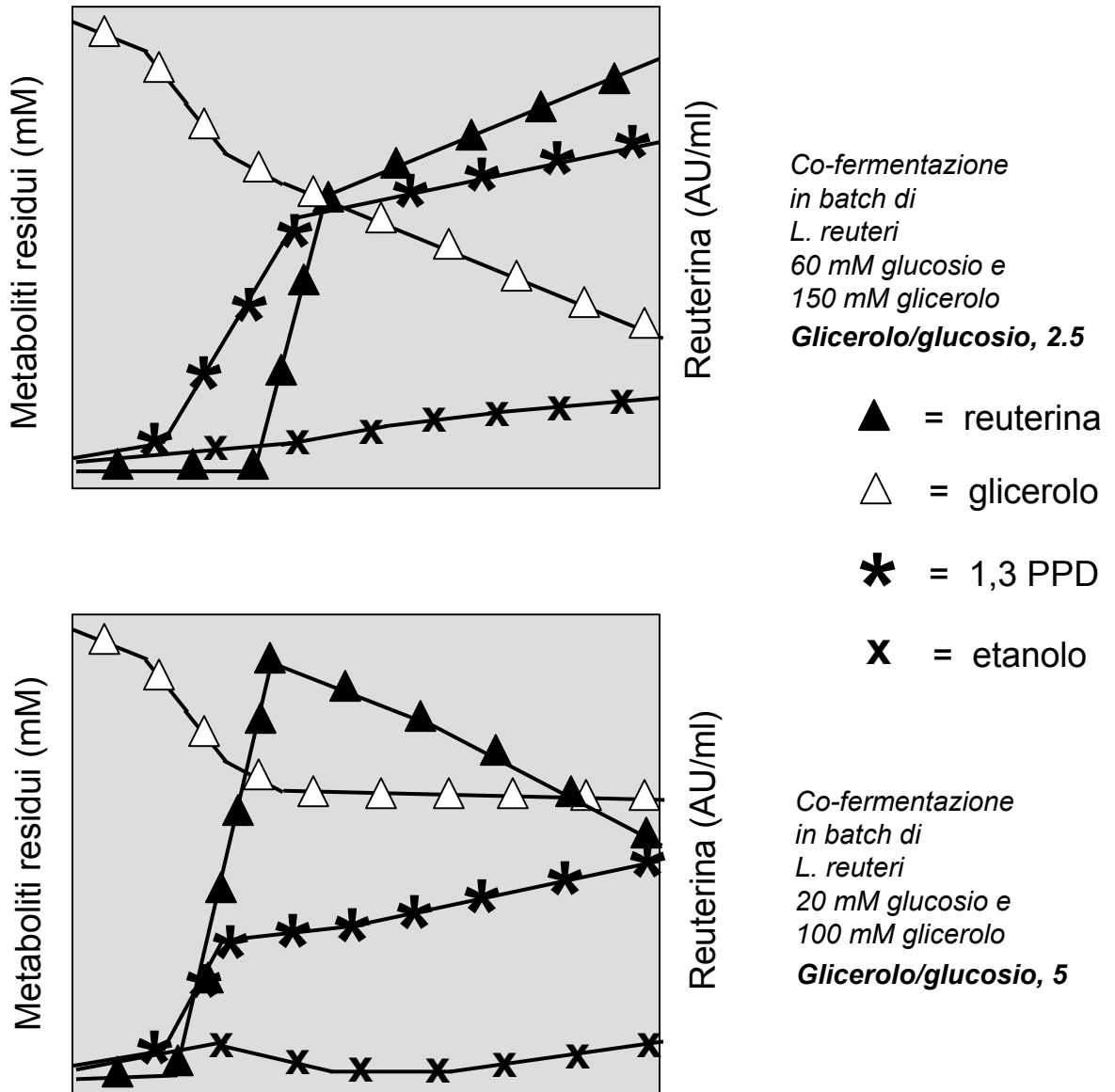
La **reuterina** è prodotta anche da *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e da alcuni Clostridi. Mentre la sintesi di reuterina avviene **solo** in condizioni **anaerobiche** l'attività antibatterica di questa molecola si esplica sia in presenza che in assenza di ossigeno.



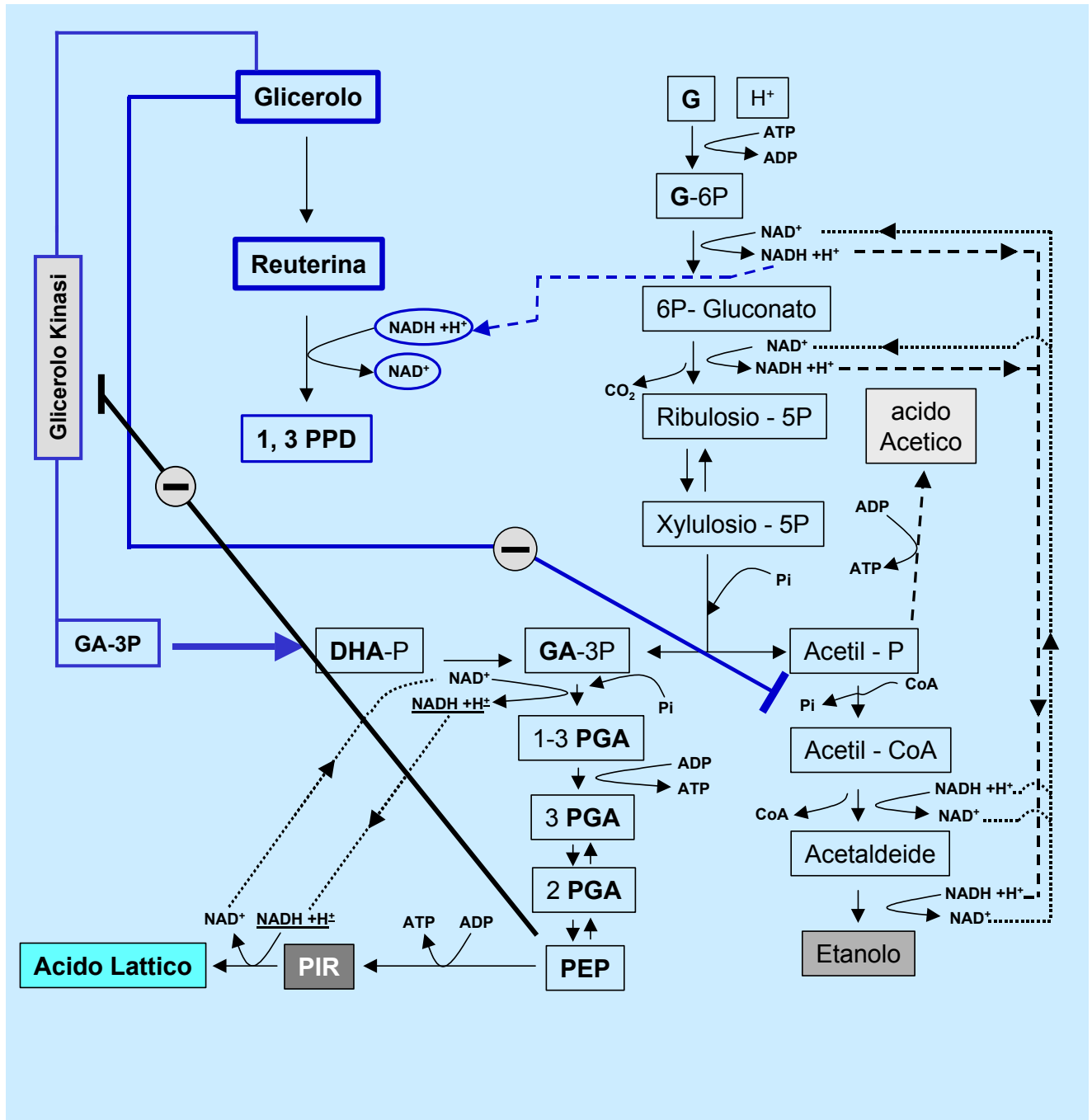
Rappresentazione schematica del pathway di dissimilazione del Glicerolo in **Klebsiella pneumoniae**. La **dissimilazione fermentativa** è controllata dai geni *dha* (linee tratteggiate), mentre la **dissimilazione respiratoria** è controllata dai geni *glp* (linee intere).

REUTERINA

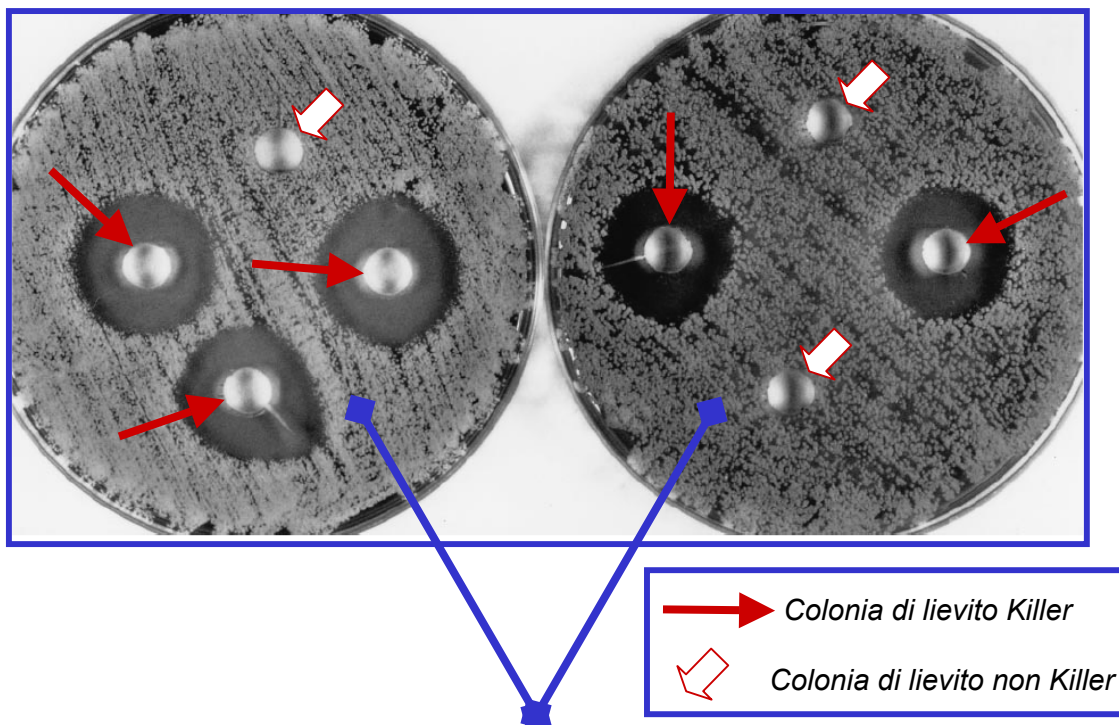
E' stato dimostrato che *L. brevis* e *L. buchneri* non possono crescere solo in presenza di glicerolo come unica fonte di carbonio ma richiedono glicerolo per crescere in presenza di glucosio. Questa co-fermentazione del glicerolo aumenta le rese di fermentazione e modifica il profilo dei prodotti di fermentazione, sopprimendo la formazione di etanolo e incrementando quella di acetato. Studi analoghi condotti su *L. reuteri* confermano i dati precedenti ma evidenziano come la concentrazione di glicerolo nel mezzo di coltura influenzi il livello di reuterina prodotto.



I risultati di questi esperimenti di fermentazione suggeriscono che glicerolo e l'acetilfosfato funzionino entrambe come sistemi di accettori di idrogeno operanti in competizione nell'ossidazione del NADH ...



La presenza di glucosio influenza la produzione di **reuterina**. Per spiegare questo fenomeno è necessario ricordare che il trasporto degli zuccheri a livello della membrana cellulare è regolato dai sistemi **CCR**. In presenza di glucosio o di zuccheri metabolizzati mediante la via **EMP** in diverse specie batteriche si manifesta un fenomeno di repressione della sintesi di glicerolo chinasi che è responsabile della **dissimilazione respiratoria** del glicerolo. In questo modo il glicerolo sarà disponibile per la **dissimilazione fermentativa** a dare 1, 3 PPD limitando l'accumolo di reuterina.



Crescita confluyente di **Candida albicans**

Le tossine **killer** di lievito sono proteine o glicoproteine a basso peso molecolare con azione tossica nei confronti di cellule di lieviti sensibili. L'azione delle tossine killer non è mediata dal contatto tra cellula sensibile e cellula produttrice. La cellula che produce la tossina è immune alla tossina prodotta ma può essere sensibile a tossine diverse prodotte da altri lieviti killer. La capacità di produrre tossine killer è piuttosto diffusa tra lieviti appartenenti a diversi generi e specie.

Questo particolare fenotipo è stato inizialmente osservato in *Saccharomyces cerevisiae* e poi in molti altri generi tra i quali: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* etc.

Le tossine killer di lievito sono rappresentate da diverse specie molecolari non sempre caratterizzate dal punto di vista genetico e biochimico. Nei pochi casi in cui queste tossine sono state studiate in maniera approfondita i determinanti genetici responsabili della loro sintesi sono risultati essere codificati a livello di **dsRNA di virus**, **dsDNA lineari plasmidici** o **geni nucleari**

Genetic basis for killer phenotype expression in yeast

Yeast	Genetic basis	Toxin gene
<i>S. cerevisiae</i>	dsRNA virus	M1-, M2-, M28-dsRNA
<i>H. uvarum</i>	dsRNA virus	M-dsRNA
<i>Z. bailii</i>	dsRNA virus	M-dsRNA
<i>U. maydis</i>	dsRNA virus	M-dsRNA
<i>K. lactis</i>	linear dsDNA plasmid	pGK11
<i>P. acaciae</i>	linear dsDNA plasmid	pPac1
<i>Pichia inositolovora</i>	linear dsDNA plasmid	pPin1
<i>Pichia kluyveri</i>	chromosomal	not identified
<i>Pichia farinosa</i>	chromosomal	SMK1
<i>P. anomala</i>	chromosomal	not identified
<i>Williopsis mrakii</i>	chromosomal	HMK

Viral dsRNA genomes involved in killer phenotype expression in different yeasts

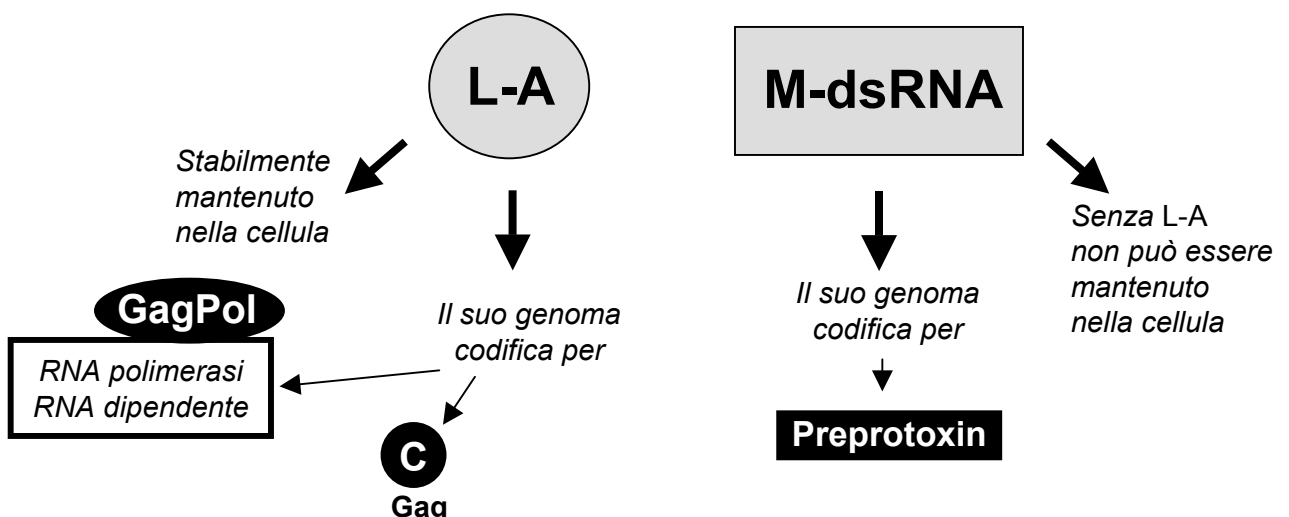
Virus	Function of virus	dsRNA genome (kb)	Encoded protein(s)
ScV-L-A	Helper virus	4.6	Gag, major capsid protein; Pol, RNA-dependent RNA polymerase (Pol is in vivo expressed as Gag-Pol fusion protein)
ScV-M1	Satellite virus ('killer' virus)	1.6	K1 preprotoxin (unprocessed K1 toxin precursor and immunity determinant)
ScV-M2	Satellite virus ('killer' virus)	1.5	K2 preprotoxin (unprocessed K2 toxin precursor and immunity determinant)
ScV-M28	Satellite virus ('killer' virus)	1.8	K28 preprotoxin (unprocessed K28 toxin precursor and immunity determinant)
UmV-P1	'Killer' virus	1.4	KP1 preprotoxin (precursor of an α/β heterodimeric protein toxin)
UmV-P4	'Killer' virus	1.0	KP4 monomeric protein toxin
UmV-P6	'Killer' virus	1.2	KP6 preprotoxin (precursor of an α/β heterodimeric protein toxin)
HuV-L	Helper virus	4.6	Gag, major capsid protein; Gag-Pol, RNA-dependent RNA polymerase ^a
HuV-M	Satellite virus 'killer' virus	1.0	Precursor of a monomeric protein toxin
ZbV-L	Helper virus	4.6	Gag, major capsid protein; Gag-Pol, RNA-dependent RNA polymerase ^a
ZbV-M	Satellite virus 'killer' virus	2.1	Precursor of a monomeric protein toxin

^aThe dsRNA sequence has not yet been identified and, therefore, the postulated viral gene products Gag and Gag-Pol are hypothetical as dictated by analogy to Gag and Gag-Pol of ScV-L-A.

Le tossine killer di *Saccharomyces cerevisiae*

In alcuni ceppi di *S. cerevisiae* il fenotipo killer è dovuto alla presenza di **dsRNA virale** citoplasmatico. Questo materiale nucleico **virale** non determina problemi per la singola cellula che lo ospita in quanto non è stato mai osservata una trasmissione di tipo extracellulare (ciclo litico assente). Questi virus definiti criptici o **VLPs (Virus Like Particles)** possono essere trasmessi solo **verticalmente**, cioè da cellula madre a cellula figlia durante la divisione cellulare.

I ceppi di *S. cerevisiae* produttori di tossine killer sono stati classificati in tre gruppi principali, **K1**, **K2** e **K28**, ciascuno dei quali caratterizzato dalla secrezione di una specifica tossina killer e da non ben identificati sistemi di immunità. Per tutte le tipologie di ceppi killer (**K1**, **K2** e **K28**) la biosintesi della tossina dipende dalla presenza di un **virus satellite M-dsRNA** (ScV-M1, scV-M2 e ScV-M28) la cui presenza nella cellula è strettamente dipendente dalla presenza di un **virus helper L-A** stabilmente mantenuto e replicato nel citoplasma.



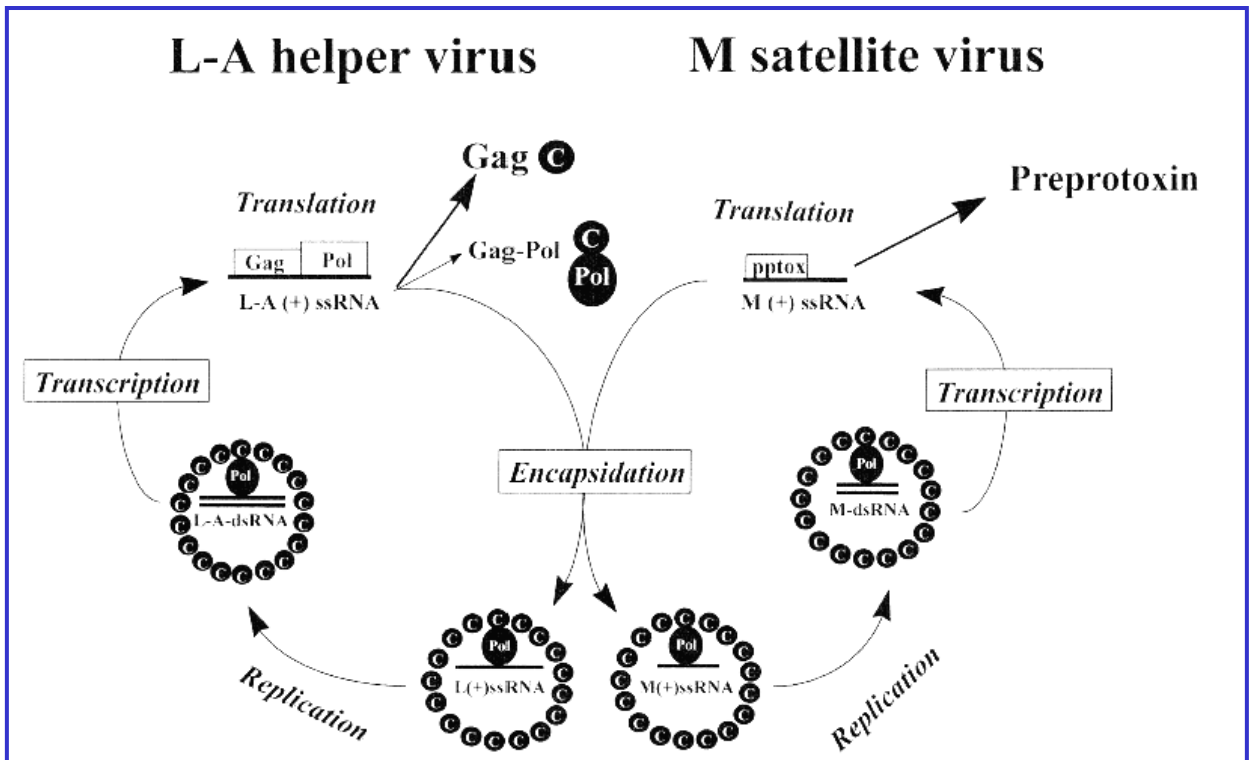


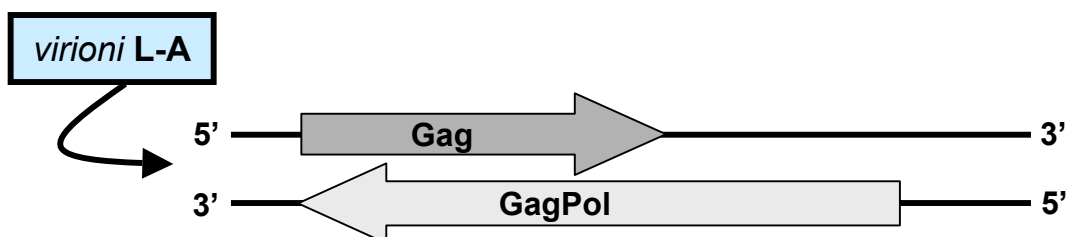
Fig. 2. Replication cycle of L-A and its toxin-coding M satellite virus. Both dsRNA viruses compete for the L-A encoded viral proteins Gag and Gag-Pol which are essential for viral particle structure, viral (+)ssRNA packaging, in vivo RNA replication (i.e. minus-strand RNA synthesis), and (+)ssRNA synthesis on the double-stranded RNA template.

Si presume che il dominio N-terminale del complesso **Gag-Pol/ssRNA** determini la polimerizzazione del capside.

Le particelle dei virioni **L-A** sono di tipo icosaedrico di circa 39 nm di diametro. Il suo sistema di replicazione è conservativo. Dopo trascrizione a partire dall'RNA genomico il filamento + di RNA neotrascritto è espulso all'esterno della particella virale nel citoplasma dove svolgerà due funzioni essenziali:

- sintesi di **Gag** e **GagPol**
- il nuovo (+)ssRNA è impacchettata nelle nuove particelle virali.

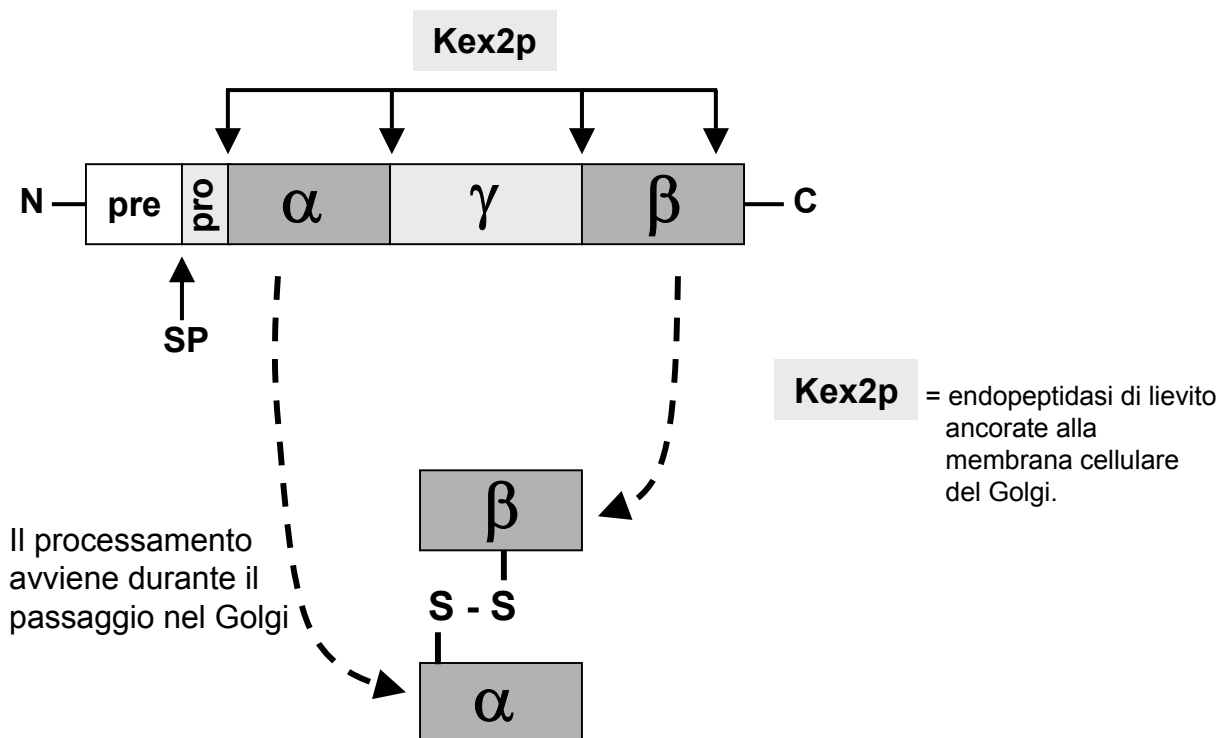
Quando le nuove particelle sono assemblate, **GagPol** sintetizza il filamento (-)ssRNA generando il nuovo genoma virale completo (dsRNA)



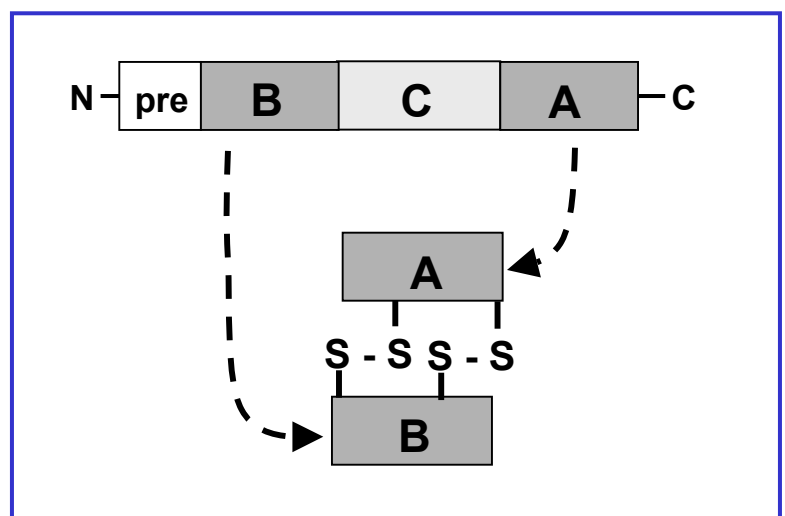
virioni satelliti M-dsRNA

Questi virioni satelliti di L-A parassitizzano **Gag** e **Gag-Pol** per potersi replicare. Il sistema di replicazione dei virioni **M** è molto simile a quello di L-A e differisce solo per il fatto che i virioni **M** incorporano fino a due copie di dsRNA mentre L-A può contenere una sola copia del suo genoma. Sia i genomi di L-A che di M contengono delle sequenze specifiche di "impacchettamento" e replicazione chiamate **VBS** (Viral Binding Sites).

Struttura e processamento della tossina Killer



La modalità del processamento post-traduzionale della proteina killer di lievito è del tutto analoga a quella della **preproINSULINA** →



Biosintesi delle tossina Killer

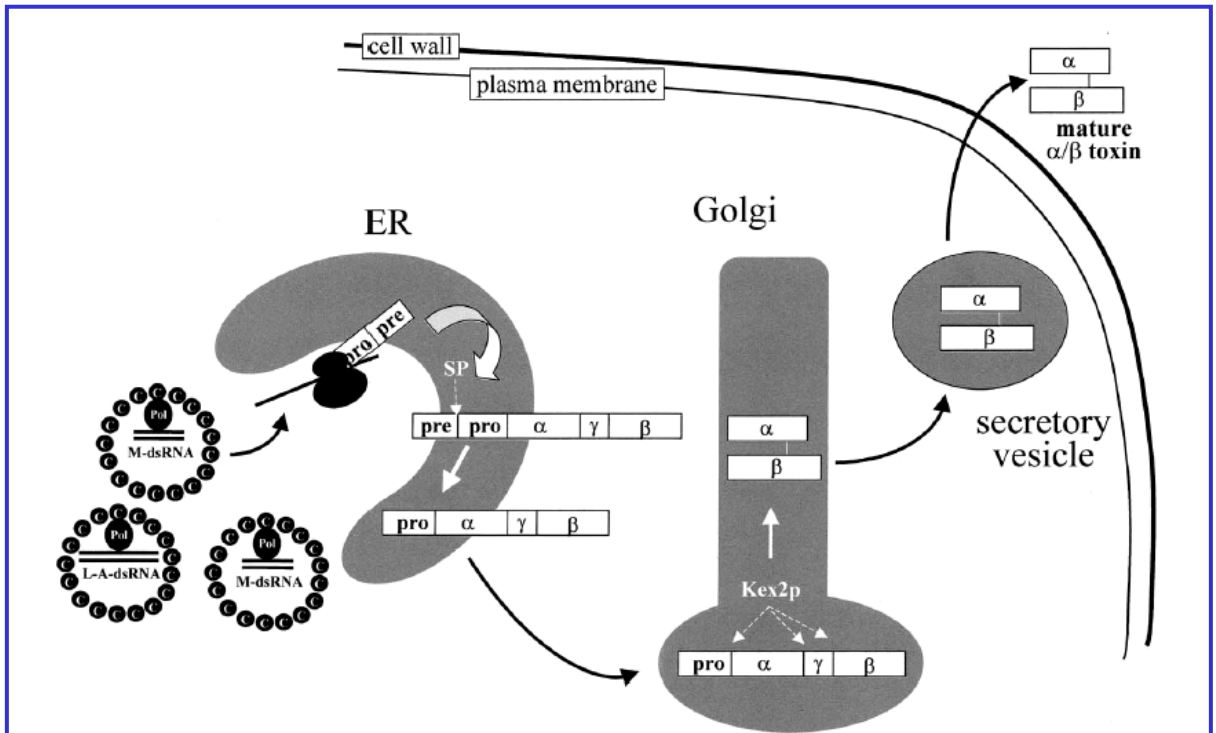
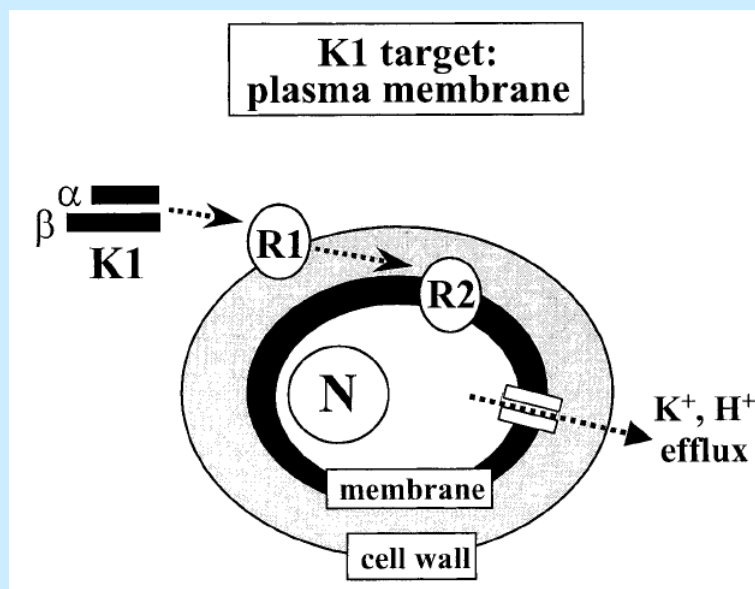


Fig. 4. Secretory pathway of killer toxin K28 in *S. cerevisiae*. After in vivo translation of the pptox coding viral M28 transcript, pptox is (post-translationally) imported into the lumen of the ER and signal peptidase (SP) cleavage removes the toxin's N-terminal secretion signal (pre-region). In a late Golgi compartment, the Kex2p endopeptidase cleaves the pro-region, removes the intramolecular γ sequence and finally leads to the secretion of the mature α/β heterodimeric protein toxin (modified after [167]).

La regione C-terminale della regione β contiene una sequenza di 4 aa (**HDEL**) che rappresenta un **segnale di ritenzione per il Reticolo Endoplasmatico (RE)**. Questa sequenza è responsabile della “direzionalità inversa” mostrata dalla tossina nel momento in cui agisce su cellule sensibili. Durante la biosintesi questa sequenza è mascherata da una Arg posiziona nella regione C-terminale che, in questo modo evita fenomeni di ritenzione nel RE.

Meccanismo d'azione delle tossine **Killer**



Il meccanismo d'azione delle tossine K1 e K28 è sempre mediato da recettori posti a livello della parete (R1) e della membrana citoplasmatica (R2).

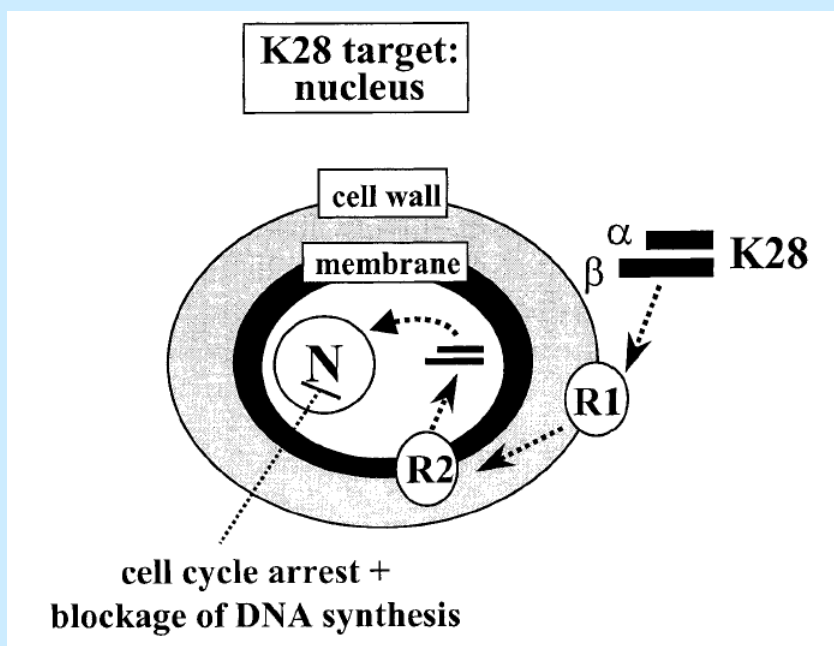
I° STEP

Per le tossine **K1** e **K2**

R1 è un β -1,6-D-glucano mentre per la tossina **K28**

R1 è una α -1,3-mannoproteina ad alto peso molecolare.

Il legame con il recettore consente anche un aumento della concentrazione locale di tossina. Nel caso di mutanti **Killer resistenti** (mutanti **kre**) le mutazioni sono spesso localizzate a livello dei geni della biosintesi di mannani (mutanti **mnn**)



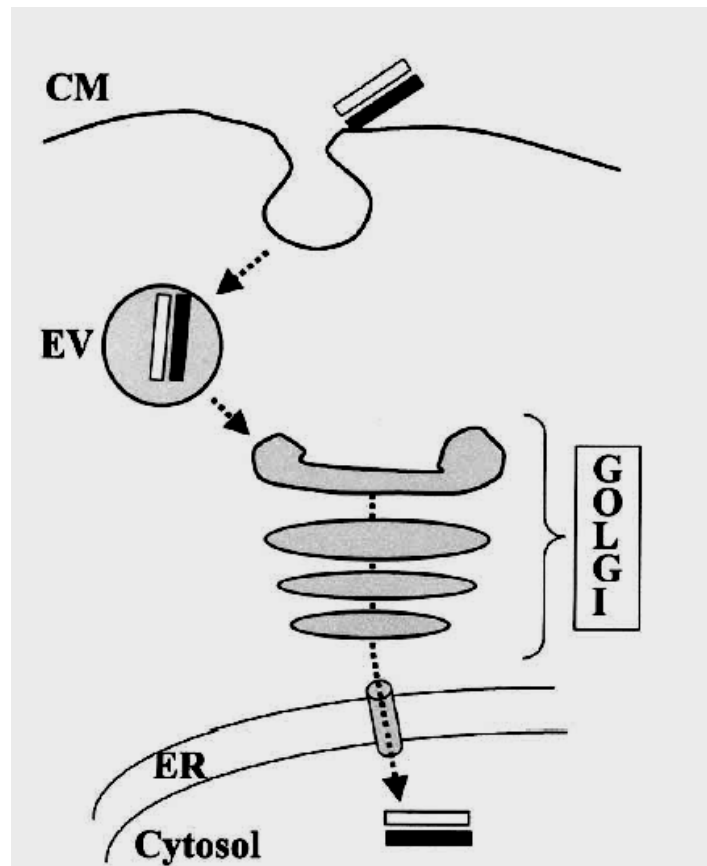
II° STEP

La traslocazione attraverso il citoplasma è mediata dall'interazione della tossina con un secondo recettore che nel caso di **K1** è stato identificato in una proteina glicosilata. Una volta a livello di membrana **K1** esercita la sua azione destrutturante formando canali ionici.

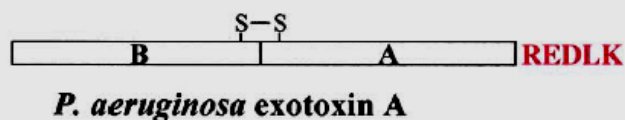
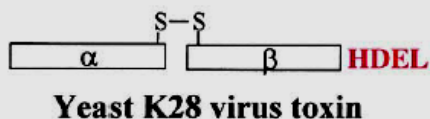
II° STEP per K28

Al contrario di **K1**, **K28** esercita la sua azione tossica per endocitosi percorrendo il sistema secretorio (Golgi, RE) in senso contrario fino a raggiungere il suo bersaglio, l'interno del nucleo.

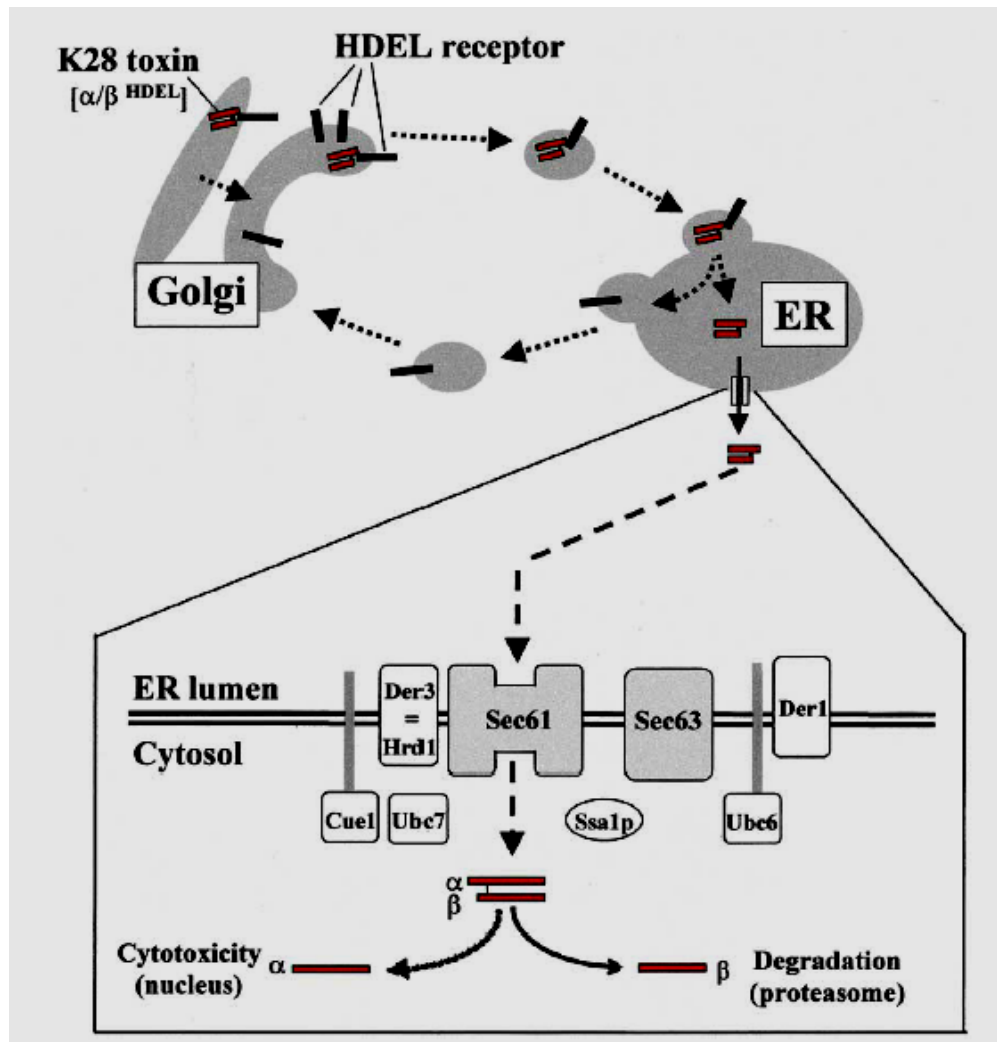
CM = membrana citoplasmatica;
EV = vescicola endosomica;



Microbial/Viral AB-Toxins



Diverse tossine batteriche possiedono sequenze analoghe a **HDEL** per il trasporto a ritroso attraverso i sistemi di secrezione eucarioti, però le tossine killer di lievito sono le uniche a essere prodotte da eucarioti.



Una volta a livello del citosol le due componenti α e β si dissociano a causa delle elevate condizioni riducenti dell'ambiente. Successivamente, mentre la componente β subisce un processo di degradazione, la componente α raggiunge il nucleo dove inattiverà la sintesi del DNA. Si ipotizza, che la componente α sia in grado di entrare nel nucleo attraverso diffusione passiva o attraverso a un sistema di trasporto attivo.

Un elevato numero di geni del cromosoma di lievito (30 geni), quindi non virali, sono importanti nel mantenimento del genoma virale. Questo set di geni viene chiamato **MAK** (**MA**intenance of **K**iller genes).

Sono stati individuati anche mutanti alto-produttori di tossina e i determinanti genici responsabili di questo incremento di tossicità sono stati denominati **SKI** (**S**uper **K**iller). I geni **SKI** mutati migliorano i livelli di traduzione delle tossine. In merito al ruolo fisiologico di questi geni di lievito, è stato ipotizzato che i geni **SKI** wild type codifichino per specie molecolari coinvolte in meccanismi di difesa antivirali e intervengano nei processi di degradazione di 3' mRNA.