

GENOMUL MITOCONDRIAL

Mitocondria este un organit complex, specializat în respirația celulară și fosforilarea oxidativă, cu rol important în energetica celulară și care prezintă un sistem genetic propriu și, implicit, mecanisme specifice de sinteză proteică. Diametrul mitocondriei este de 1 μm și din punct de vedere al ultrastructurii prezintă învelișul, sistemul de criste și matricea mitocondrială. Învelișul este dublu membranar, extern și intern, sistemul de criste fiind generat de membrana elementară internă. Matricea mitocondrială este substanța fundamentală care ocupă spațiul intern mitocondrial delimitat de membrana internă a învelișului mitocondrial și criste. La nivelul acesteia sunt întâlniți mitoribozomi 70S (cu subunități 30S și 50S).

Biogeneza mitocondriei reprezintă un proces complex, care necesită interacțiunea a două genomuri - nuclear și mitocondrial. Genomul mitocondrial cuprinde informația genetică caracteristică pentru puține componente mitocondriale esențiale. Majoritatea proteinelor mitocondriale (aproximativ 95%), incluzând enzimele responsabile de replicarea și transcrierea ADN mitocondrial, sunt codificate în nucleu, sintetizate în citoplasmă și ulterior transportate în mitocondrie (Tab. 6).

| Componenta structurală mitocondrială | Poliptide |
|--------------------------------------|---|
| MATRIX | carbamil-fosfat-sintetaza superoxid-dismutaza ADN polimeraza ARN polimeraza proteine ribozomale ornitin-trans-carbamilaza enzimele ciclului acidului citric |
| MEMBRANA INTERNĂ | citocromul c subunitatea V a complexului citocromului b subunit β γ δ ale Fi-ATPazei proteolipidul din Fo-ATPaza subunit IV, V, VI, VII ale citocrom-oxidazei |
| SPATIUL INTERMEMBRANAR | citocromul c citocrom-peroxidaza c citocromul b2 |
| MEMBRANA EXTERNĂ | porina |

Tab. 6. Proteine mitocondriale codificate nuclear și sintetizate în citoplasmă

Principala funcție biologică a mitocondriilor este fosforilarea oxidativă, procesele oxidative și de fosforilare fiind catalizate de cinci complexe enzimatice:

- 4 complexe respiratorii, după cum urmează:

I – NADH-CoQ-reductaza: oxidează NADH și reduce CoQ; constituit din FMN (flavin mononucleotid), Fe neheminic, acid sulfuric, CoQ, fosfolipide;

II – succinat CoQ-reductaza: oxidează succinatul reducându-l la fumarat și reduce CoQ; constituit din FAD (flavin adenin dinucleotid), Fe neheminic, citocrom b, fosfolipide;

III – CoQ H₂-citocrom c-reductaza: reoxidează CoQ și reduce citocromul c; format din citocromul b, c₁, Fe neheminic, acid sulfuric, coenzima Q, fosfolipide;

IV – citocrom oxidaza: transferă electronul la oxigen, reducând citocromul c, rezultatul fiind formarea apei; din punct de vedere chimic este format din citocrom a, a₃, Cu și fosfolipide

- și 1 complex ATP-azic (ATP-sintaza)

V – ATP-aza mitocondrială: intervine în etapele finale ale fosforilării oxidative, este oligomicin-sensibilă și în stare cuplată funcționează ca o ATP-sintază sau kinază.

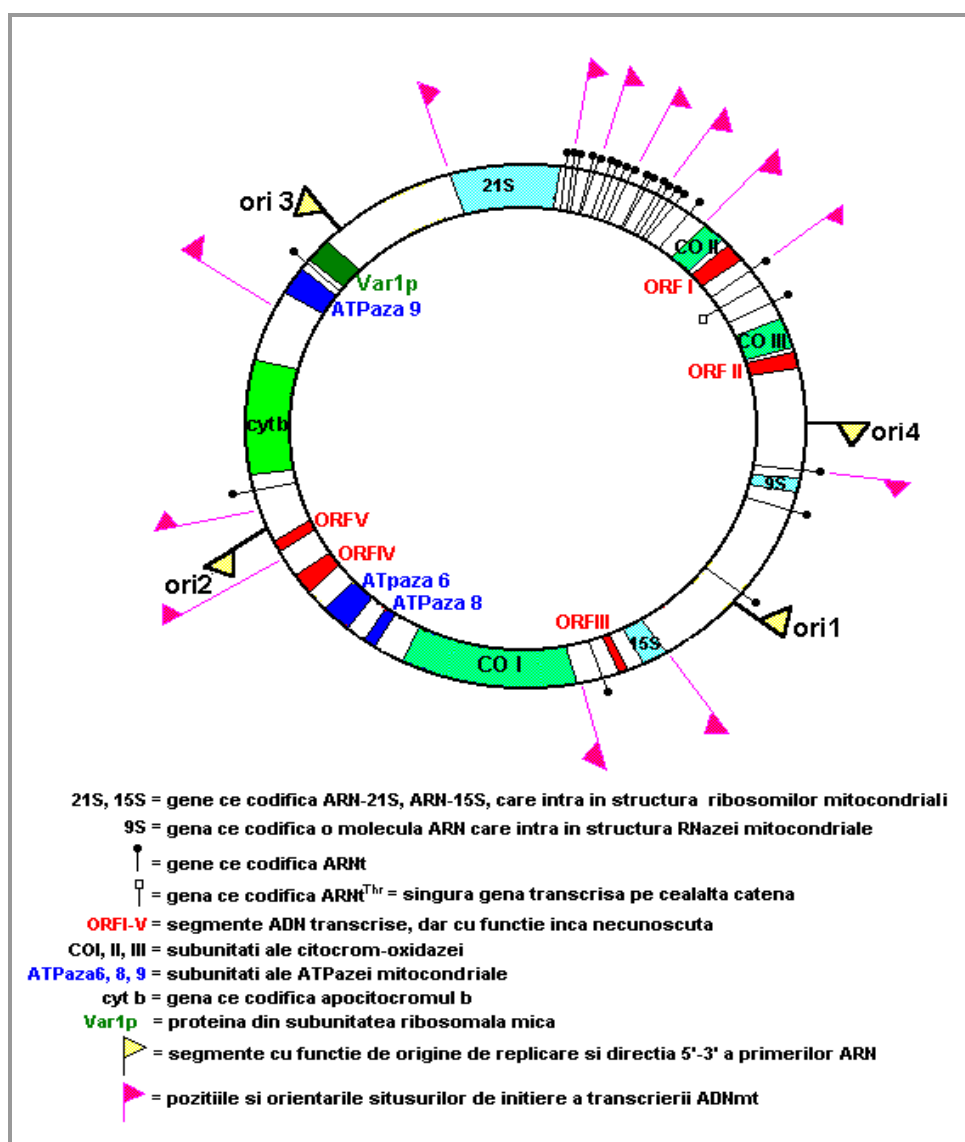
La drojdii ADN-ul mitocondrial (ADNmt) este reprezentat de o moleculă de ADN dublu catenar circular închis, de aproximativ 85 kbp (50 MDa), cu următoarele caracteristici: (1) este necomplexat cu histone, ci cu proteine *histone-like*; (2) are un procent mare de AT (80%); (3) are multe gene mozaicate; (4) există unele diferențe între codul genetic nuclear și cel mitocondrial (Tab. 7).

| CODON | Mesaj în codul universal | Mesaj în codul mitocondrial | | | |
|-------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|---------|--------|
| | | mamifere | <i>Drosophila</i> | drojdii | plante |
| UGA | Stop | Trp | Trp | Trp | Stop |

| | | | | | |
|----------|-----|------|-----|-----|-----|
| AUA | Ile | Met | Met | Met | Ile |
| CUA | Leu | Leu | Leu | Thr | Leu |
| AGA, AGG | Arg | Stop | Ser | Arg | Arg |

Tab. 7. Diferențe între codul genetic universal și cel mitocondrial

ADNmt de la drojdii cuprinde următoarele gene (Fig. 3. 26): circa 24 specii moleculare de ARN (aceste gene sunt grupate într-un *cluster*); 2 specii moleculare de ARNr: 15S în subunitatea de 30S, 21S în subunitatea de 50S (ARNr de 5S este absent); gena pentru ARN 9S (ARN-9S va complexa o proteină, formând o ribozimă denumită RNaza P care participă la maturarea ARNt, având ca situs de acțiune capetele 5'); gene pentru subunități ale citocrom-oxidazei: CO I, II și III; gena pentru apoproteina citocromului *b* (partea complexului b-c1, complexul III); genele pentru 3 subunități ale complexului de sinteză ATP (subunitățile 6, 8 și 9 ale ATPazei mitocondriale); proteine ce interacționează cu acizii nucleici. Aceste gene sunt separate (ADN spacer) prin regiuni bogate în A+T.

Fig. 3. 26. Harta genomului mitocondrial la *Saccharomyces cerevisiae*

În Fig. 3. 27. este prezentat lanțul respirator din membrana mitocondrială internă de la *S. cerevisiae*, la care Complexul I (CI) este reprezentat de NADH-dehidrogenaze, responsabile de oxidarea directă a NADH citosolic, care mai poate fi oxidat și prin intermediul glicerol-3-fosfat

dehidrogenazei. Ca particularitate, *S. cerevisiae* poate crește în aerobioză în prezența D și L-lactatului, datorită existenței D,L-lactat dehidrogenazei.

Complexul II (CII) este reprezentat de succinat dehidrogenaza, Complexul III (CIII) de apoproteina citocromului b, iar Complexul IV (CIV) de citocrom c oxidaza. Mai există de asemenea, 1 complex ATP-azic care intervine în ultimele etape ale fosforilării oxidative.

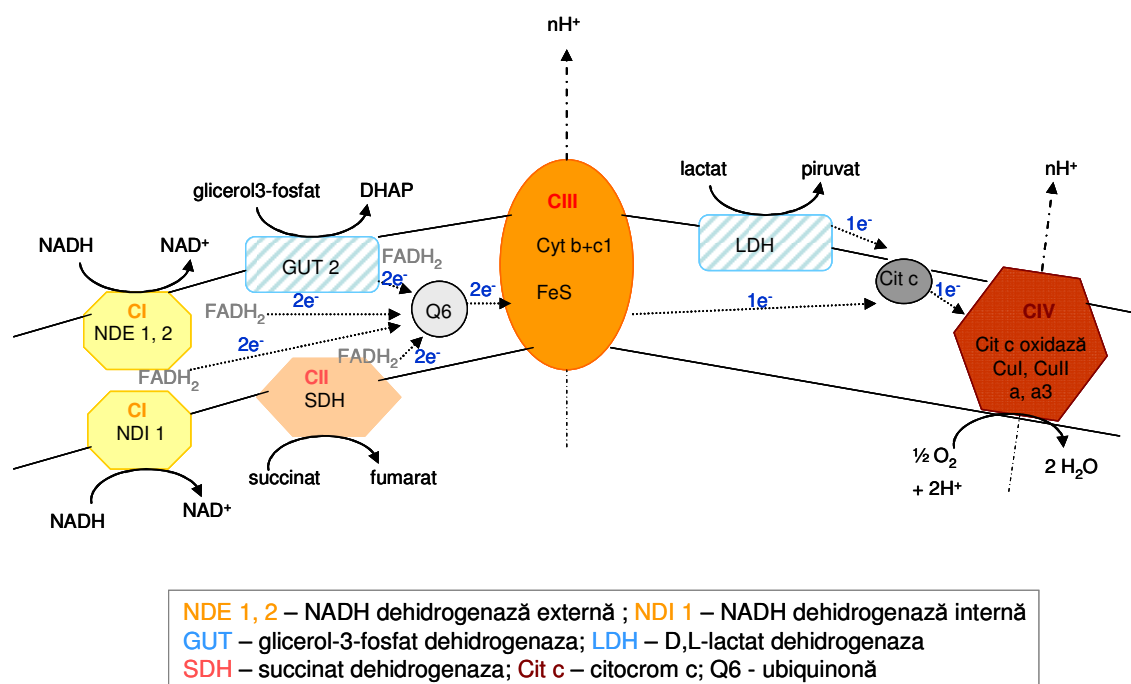


Fig. 3. 27. Lanțul respirator la *Saccharomyces cerevisiae* din membrana mitocondrială internă
[după Rosenfeld, 2003]

Genele mitocondriale

Genele pentru ARN ribozomal (ARNr) 21S și 15S

În cazul drojdiilor, cele două gene ADNr 21S și 15S sunt separate în direcția transcrierii, de un segment de ADN de aproximativ 25 kpb (aproximativ o treime din genom) la nivelul căruia se găsesc numeroase gene ale subunităților citocrom c oxidazei. Astfel, este improbabil ca cele două tipuri de ARNr să fie excizate dintr-un precursor comun.

• Gena ADNr 21S este mozaicată și este asociată locusurilor: *rib1* (desemnează auxotrofia la riboflavină și conferă rezistență la cloramfenicol, *capR*), *rib2* și *rib3* (rezistență la eritromicină – *eryR* și spiromicină - *spiR*); ω (cu alelele ω^+ , ω^n și ω^-) care determină recombinarea polară între markerii flancanți *rib1*, *rib2* și *rib3*; *mim1* (supresor pentru mutațiile mit⁻). În încrucișările $\omega^+ \times \omega^-$, locusul ω^+ și alelele *rib* linkate acestuia, sunt exprimate în detrimentul locusului ω^- și a alelelor linkate. Alela ω^n este deficientă în recombinarea polară.

Gena pentru ARNr 21S prezintă două forme diferite la diverse tulpini de drojdii. Astfel, în cazul în care la nivelul ei este localizat locusul ω^+ , gena prezintă un intron de 1,1 kpb care nu apare la tulpinile ω^- . Intronul separă două gene *rib1A* și *rib1B*, care sunt linkate în tulpinile ω^- . Acest intron este important în recombinarea polară. Din interacțiunile genelor *rib1A* și *rib1B* rezultă rezistența și, respectiv, sensibilitatea la cloramfenicol. La nivelul situsului *rib1B* sunt localizate mutantele ω^n , care nu prezintă polaritate în încrucișările cu ω^+ și ω^- . Datorită mecanismului de polaritate, când o tulpină parentală prezintă intronul de 1,1 kpb și cealaltă nu îl are, majoritatea descendenților moștenesc intronul ω^+ .

Tulpinile ω^+ prezintă și un mini-insert de 66 pb, localizat la 156 pb înaintea intronului major, care este transcris și persistă în ARNr matur fără să-i modifice funcționalitate, fiind opțional și dispensabil, fără un rol fundamental. Intronul major are un URF (*unidentified reading frame*) al cărui polipeptid ar putea avea rol în recombinarea polară, sau care ar putea reprezenta o genă arhaică care nu se mai exprimă în prezent. Secvențele aflate la locul de joncțiune intron-exon, sunt importante în recombinarea polară.

• Gena *ADNr 15S* din subunitatea ribozomală mică este asociată cu *par1* (*parR*), rezistanța la paramicină.

Genele pentru ARN de transfer (ARNt) sunt 24 la număr, nu sunt mozaicate și codifică pentru 31 – 35 de specii de ARNt. Unele molecule ARNt, cum ar fi cele 4 molecule pentru histidină, se formează în urma unor modificări post-transcripționale. Genele pentru ARNt au o distribuție neuniformă, 16 dintre ele fiind plasate între gena pentru ARN21S și locusul COII. La drojdii, genele ARNt sunt grupate, în timp ce la mamifere sunt dispuse între alte tipuri de gene. Direcția transcrierii este de la genele *rib* către *par1*, de pe aceeași catenă, cu o singură excepție: gena pentru ARNt treonină este transcrisă de pe cealaltă catenă, în direcție opusă.

Gene simple ce codifică proteine : genele pentru subunitățile citocrom-oxidazei: COII asociată locusului *oxi1*, COIII - *oxi2* și COI - *oxi3*, gena pentru subunitatea 6 a ATP-azei oligoimicn rezistentă, asociată *oli1*, *oli4*, *oss1* (rezistență la osamicină), *pho1* - *pho*⁻ (deficiență în fosforilare), gena pentru subunitatea 9 a ATP-azei – asociată *oli1*, *oli3*, *oli5*, *oss2*, *pho1* și *ven1* (rezistență la venturicidină).

Genele mozaicate de la nivelul ADNmt

Gena *oxi3* codifică pentru subunitatea I a citocrom oxidazei c (COI), iar mutantele *oxi3*⁻ sunt asociate cu deficiențe respiratorii. Secvențializarea locusului a permis evidențierea unei regiuni de 10 kpb care conține 6 ORF și reprezintă cea mai mare parte din gena *oxi3*. Aceasta prezintă 8 exoni separați de 7 introni.

Gena pentru apoproteina citocromului b (Fig. 3. 28), este asociată locusului *cob-box*, iar mutantele *cob*⁻ sunt deficiente atât în producerea citocromului b, cât și a COI. Există 2 variante ale genei *cob-box*: (i) gena scurtă – preintă 3 exoni (E1s, E2s și E3s) și 2 introni (I1s și I2s); (ii) gena lungă – în cazul acesteia, exonul E1s este fragmentat de doi introni majori de 2 kpb și 1,4 kpb, primul intron, cel lung, conținând un mini-exon de 14 pb. Astfel, E1s se transformă în E1I + E2I (mini-exoni)+ E3I + E4I. Acești patru exoni sunt separați de trei introni opționali I1I, I2I și I3I, care nu au corespondenți în gena scurtă. Doi dintre introni, I2I și I1s (corespunzător lui I4I), prezintă URF, care pentru I2I se pare că ar codifica o maturază, factor difuzabil activ în trans (TAF), iar pentru I4I, o maturază cu rol în splicing-ul genei *oxi3*, secvența semnal pentru splicing fiind: **Intron...TAAAAG/splice/C....Exon**

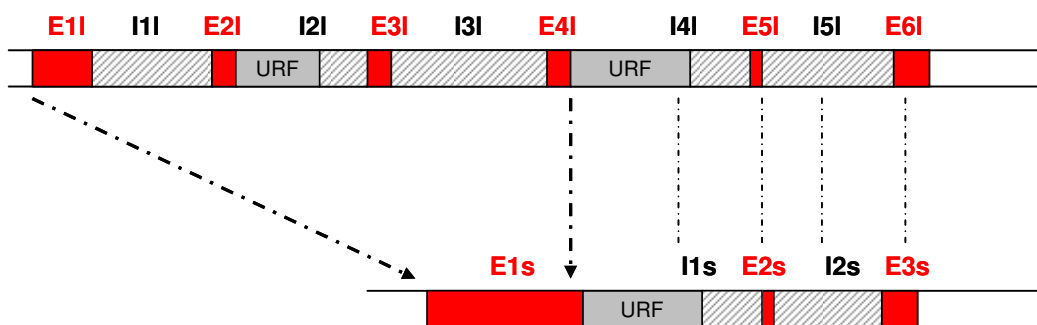


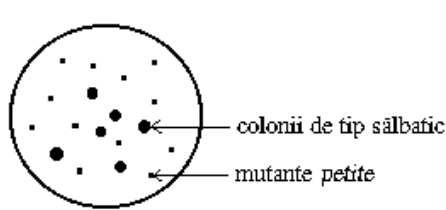
Fig. 3. 28. Structura genei lungi/scurte pentru apoproteina citocromului b

La eucariote și, implicit, la drojdii, există trei grupe de introni. Unii introni din grupul I și II conțin ORF care codifică proteine ce catalizează deplasarea intronilor sub forma unor elemente mobile, cu capacitatea de a se insera în noi loci în genom. Aceste două grupuri de introni au răspândire largă, fiind întâlnite nu numai la eucariote, dar și la procariote. Proteinele din ORF au trei funcții:

► endonuclează – clivează la nivelul țintei ADN pentru a permite inserția intronilor și ajută intronul în a se perpetua în încrucișările în care alelele pentru o genă diferă în ceea ce privește prezența intronului. Polimorfismul în ceea ce privește prezența sau absența intronilor este prezent în ADNmt de la drojdii. De exemplu, gena pentru ARNr 21S, are un intron ce face parte din grupul I, fiind prezent la unele tulpini denumite ω^+ , dar absent la tulpinile ω^- . Încrucișările $\omega^+ \times \omega^-$ sunt polare, descendenții fiind ω^+ prin transpoziție replicativă. Pot să apară mutații atât în tulpina donor cât și în cea receptor; în ω^- mutația apare în zona țintă, de inserție a intronului, iar în ω^+ mutația apare în ORF, eliminând polaritatea. Acțiunea endonucleazică a ORF se manifestă prin recunoașterea genei ω^- și inducerea de rupturi dublucatenare la nivelul țintei, o zonă de 18 kpb, în care intronul se inseră după ce s-a duplicat.

- revertranscriptază – acționează la nivelul ADN complementar al ARN al intronilor;
- maturază – cel mai probabil responsabilă pentru stabilizarea intronului într-o conformație specifică necesară splicing-ului.

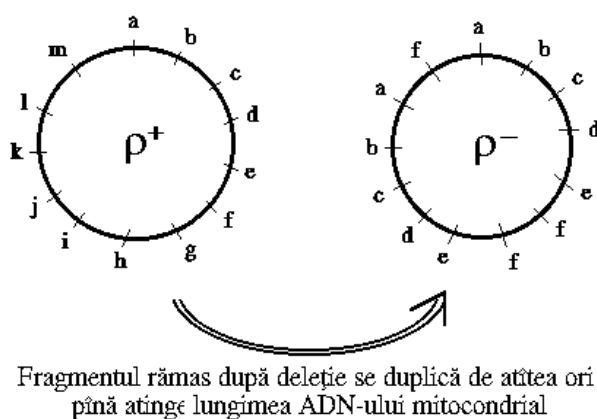
Mutantele *petite*



Mutantele *petite* apar la *Saccharomyces cerevisiae* corelat cu modificări ale ADN-ului mitocondrial, determinând o serie de deficiențe respiratorii; la multiplicare în anaerobioză, mutantele *petite* formează colonii mici ("*petite*") (Fig. 3. 29).

Fig. 3. 29. Aspectul coloniilor *petite*

Mutantele *petite* au fost obținute atât cu mutageni fizici (de exemplu, radiațiile ultraviolete), cât și cu mutageni chimici (nitrosoguanidina). Genomul mitocondrial a fost notat *factor ρ* și, ca urmare, tulpinile de tip sălbatic sunt ρ^+ .



Agenții mutageni specifici pentru ADN procariot (de exemplu, acriflavina, bromura de etidium) au acțiune primară asupra mitocondriilor, determinând 2 tipuri de mutații: ρ^0 - *petite* neutre; ρ^- - *petite* supresive; ρ^0 - apar în urma deleției complete a ADN mitocondrial. Mutantele *petite* supresive apar în urma unor deleții parțiale ce sunt urmate de duplicații (Fig. 3. 30).

Fig. 3. 30. Structura genomului mitocondrial ρ^+ și ρ^-

În procesele de încrucișare sexuată între o tulpină normală ρ^+ și una mutantă ρ^0 , în urma sporulării, în descendență se formează 4 asce cu ascospori ρ^+ și nici un ascospor ρ^0 . În cazul încrucișării unei tulpini normale, de tip sălbatic, cu una ρ^- , aceasta din urmă supresează fenotipul normal, astfel încât toți ascosporii rezultați vor fi ρ^- (Fig. 3. 31).

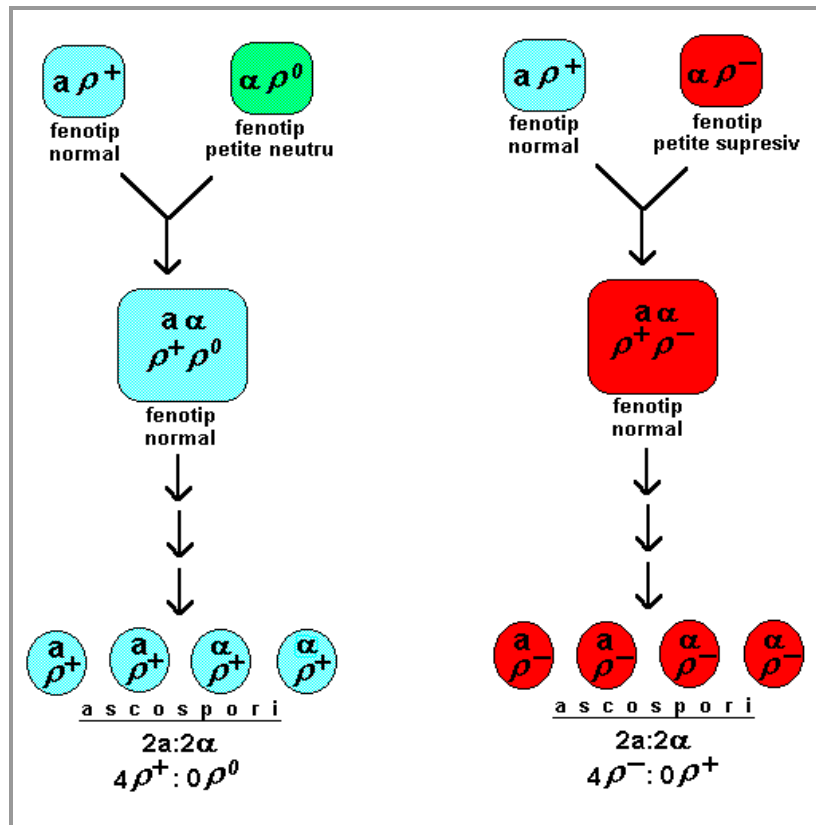


Fig. 3. 31. Schema segregării nemendeliene a genelor mitocondriale în cazul diploizilor $\rho^+ \rho^0$ și $\rho^+ \rho^-$

Structura și funcțiile ADN mitocondrial de la mamifere

Studiul comparativ al ADN mitocondrial de la *S. cerevisiae* și cel uman, a evidențiat numeroase diferențe, în special în ceea ce privește structura genetică și transcrierea genelor mitocondriale:

ADNmt de la *S. cerevisiae*

ADN circular covalent închis, 50 MDa

conține gene mozaicate, care prezintă ORF-uri cu funcții de maturază, în transpoziția replicativă a intronilor, în deleția acestora și inducerea de recombinare genetică între exonii omologi

subunitățile 6, 8, 9 ale ATP-azei

genele ADNt plasate în cluster

transcriere asimetrică

- de la 5 Promotori pe catena H
- de pe catena L - ARNt treonină

lipsește genele pentru subunitățile NADH dehidrogenazei

ADNmt uman

ADN circular covalent închis, 10 MDa

NU conține gene mozaicate

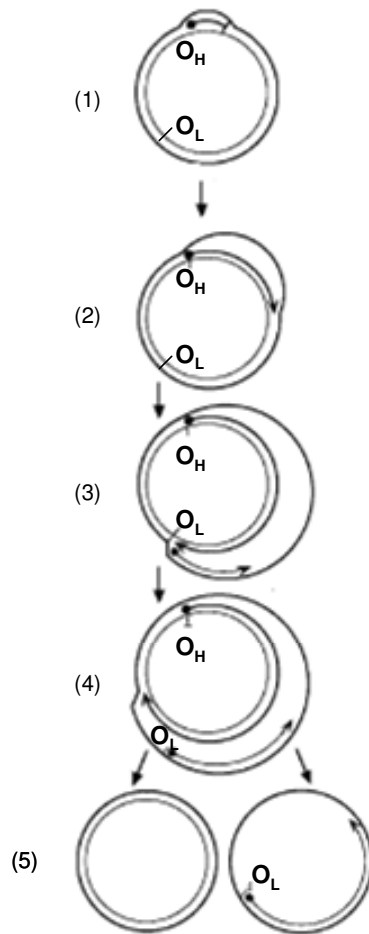
subunitățile 6, 8 ale ATP-azei

genele ADNt plasate între gene

transcriere simetrică - pornește de la 2 promotori plasați lângă *ori*, pe catena H (O_H) și L (O_L), continuând neîntrerupt pe ambele catene pentru a produce perechi de transcripțe primare.

sunt prezente genele pentru subunitățile NADH dehidrogenazei (ND1....5)

Replicarea ADNmt este realizată de ADN polimeraza mitocondrială γ și necesită prezența unor primeri pentru etapa de inițiere (Fig. 3. 33).



Replicarea catenei H este inițiată de la un ARN scurt primer, sintetizat de ARN polimeraza mitocondrială (1).

Primer-ul conferă capătul 3' OH ADN polimerazei γ , care îl elonghează, iar ADN-ul rezultat deplasează catena L, care formează o buclă D (2).

Sinteza catenei H continuă până când este expusă originea pentru replicarea catenei L. În acest moment, este inițiată sinteza catenei L de o primază din citosol (3), ce conține ARN 5,8S.

Elongarea catenei L se continuă de-a lungul catenei H, până ce și ce-a de-a doua catenă este sintetizată complet (4, 5). Replicarea este bidirecțională, asincronă și continuă. ADNmt este mult mai sensibil în prezența unor soluții alcaline slabe care nu au efect asupra ADN nuclear, dar acționează asupra ARN, și nu îndepărtează primerii prin reparare.

Fig. 3. 33. Replicarea ADN mitocondrial la mamifere pe modelul buclei D

CAP. 3.3. GENOMUL EXTRANUCLEAR

PLASMIDA 2 μ m

Denumită astfel după lungimea conturului, determinat prin studii de microscopie electronică, plasmida 2 μ m este formată dintr-o moleculă de ADN dublu catenar circular covalent închis, având o dimensiune de 6.3 Kpb (4.2 MD). Această plasmidă este prezentă la majoritatea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* în 60 - 100 copii / celulă. Plasmida reprezintă un tip de "selfish DNA", prezența sa nefiind asociată cu exprimarea unor caractere fenotipice deosebite. Cu toate acestea, prezența aproape ubiquitară a plasmidei 2 μ m la anumite specii de drojdii, a condus la formularea a trei ipoteze:

(1) prezența plasmidei oferă un oarecare avantaj selectiv celulelor [cir⁺] față de cele [cir⁰]. Ipoteza este puțin probabilă, deoarece, în afara unui timp de generație mai lung (1.5 – 3% pentru celulele cir⁺ față de cele cir⁰), celulele [cir⁺] nu par a prezenta alte modificări fiziologice sau avantaje față de [cir⁰];

(2) mecanismele de replicare a plasmidei și partiție a numărului de copii sunt foarte bine reglate genetic, astfel încât o celulă odată "infectată" cu plasmide 2 μ m, acestea se mențin, având o rată de pierdere nesemnificativă de-a lungul generațiilor. Până în prezent, aceasta pare a fi explicația cea mai valabilă;

(3) este posibil ca plasmida 2 μ m să se poată transmite eficient de la o celulă la alta, fapt care, de altfel a fost observat în cazul împerecherii sexuate, dar într-o proporție foarte mică.

În studiile inițiale, plasmida 2 μ m a fost considerată un element genetic citoplasmatic, dar analizele ulterioare au demonstrat, pe de o parte, localizarea sa nucleară, iar pe de altă parte, structura sa de tip nucleosomal. Plasmida este împachetată în cromatina din nucleu și se replică numai o singură dată în cursul unui ciclu celular, în timpul fazei S, independent de materialul genetic cromosomal. Structura nucleosomală deosebită a plasmidei este datorată asocierii la nivelul secvenței *STB* din structura sa, cu proteina centromerică *histone-like* Cse4 [Ghosh, 2007].

Din punct de vedere structural, plasmida 2 μ m este formată din 2 secvențe invers repetate (*IR*) de 599 pb fiecare, care separă molecula în două regiuni cu secvențe unice (*U1* și *U2*) de 2774 pb, și respectiv, 2346 pb (Fig.3.16). Cele 2 regiunile repetate invers permit recombinări intramoleculare ("flipping") și, ca o consecință, plasmida se poate găsi în două forme echivalente, A și B, care diferă prin orientarea relativă a celor 2 secvențe unice.

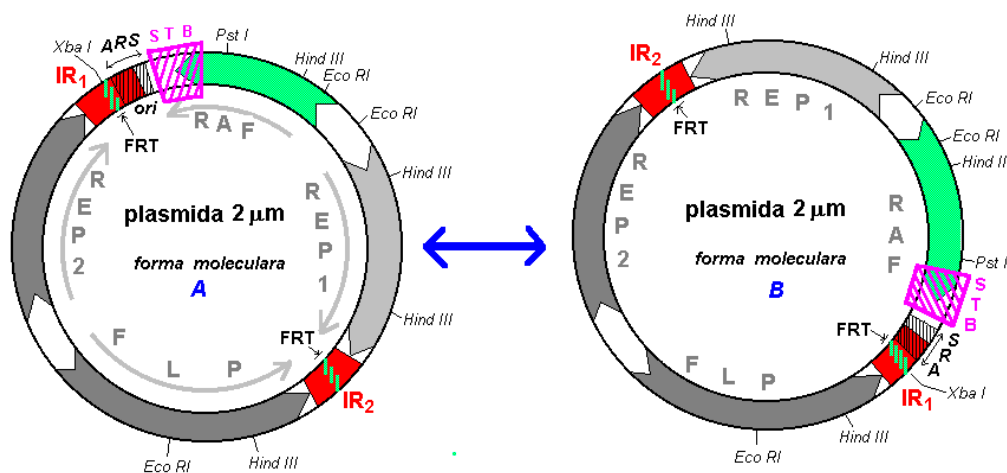


Fig. 3. 16. Structura și formele moleculare ale plasmidei 2 μ m

Cele două secvențe unice cuprind:

→ **gena *FLP* (flipping)** - codifică o recombinază (Flp1) ce catalizează recombinarea situs-specifică la nivelul secvențelor repetate invers. Proteina Flp1 aparține familiei integrazelor ai căror membrii formează legături covalente între un rest de tirozină (Tyr) din poziția 343 din structura sa și gruparea 3'-fosfat de la nivelul secvenței *core* a FRT.

→ **genele *REP1* și *REP2* (replication)** - codifică proteinele Rep1 și Rep2 care se asociază controlând atât stabilitatea și segregarea plasmidei 2 μ m, cât și exprimarea genelor plasmidiale.

Proteina Rep1 co-purifică cu fracția reprezentată de citoscheletul nuclear și se acumulează numai dacă este prezentă Rep2, aflată permanent în nucleu. Localizarea nucleară a proteinelor

Rep1 și Rep2 este determinată de secvențe plasate în regiunile carboxi-terminale ale acestora, astfel încât deleții minore (25 – 50 aminoacizi) din cadrul acestor secvențe, sunt suficiente pentru a delocaliza proteinele și a afecta funcționarea lor în partiția copiilor plasmidei 2 μ m [Velmurugan, 1998]. Studii realizate *in vitro* au demonstrat că primii 129 de aminoacizi din structura proteinei Rep1 asigură interacția acesteia cu Rep2. La rândul său, proteina Rep2 prezintă două domenii funcționale: cel amino-terminal mediază interacția cu Rep1, iar cel carboxi-terminal se leagă de molecula de ADN plasmidial la nivelul secvenței *STB* (*REP3*) [Sengupta, 2001].

→ gena **RAF 1** - codifică o proteină implicată tot în reglarea exprimării genice.

În structura plasmidei 2 μ m au mai fost identificate următoarele secvențe funcționale:

Secvența ARS (*autonomously replicating sequence*) reprezintă originea replicării plasmidei și este plasată la nivelul joncțiunii dintre regiunea unică mare și una din regiunile repetate invers, astfel încât cuprinde o parte din regiunea IR și 100 bp din regiunea unică mare.

Regiunea FRT (*FLP recognition target* - țintă de recunoaștere pentru FLP) la nivelul căreia acționează recombinaza Flp1. Regiunea *FRT* este situată în interiorul uneia din cele 2 IR și este formată din 3 secvențe de câte 13 pb cu orientare inversă și o secvență *core* de 8 pb la capetele căreia se leagă proteina Flp prin intermediul restului de Tyr 343. Complexul format din *FRT* și proteina Flp1, are rol în procesul de recombinare intermoleculară din timpul replicării ADN 2 μ m. S-a observat că modificări ale secvenței de recunoaștere a *FLP*, inhibă puternic procesul de recombinare.

Secvența STB (*stability*) sau **REP3** este necesară segregării stabile a plasmidei în mitoză și este situsul de acțiune pentru producția genelor *REP1* și *REP2*.

Replicarea plasmidei 2 μ m

Replicarea plasmidei 2 μ m este inițiată la nivelul secvenței ARS și se realizează coordonat cu replicarea ADN cromosomal utilizând mașinăria enzimatică a celulei gazdă. Un rol important în procesul de replicare îl are proteina Flp1 care catalizează recombinarea situs-specifică între secvențele repetate invers. *Futcher (1983)* a propus un model conform căruia recombinarea intermoleculară mediată de Flp1 în timpul replicării plasmidei, duce la amplificarea acesteia prin inversarea direcției bifurcației de replicare. Ca urmare, bifurcațiile se urmăresc în jurul plasmidei de un număr mai mare de ori fără a se întâlni. În urma recombinărilor intermoleculare, la nivelul regiunilor repetate invers, în timpul replicării, pot să apară multimeri de 4 μ m și 6 μ m, care sunt rezolvați ulterior cu apariția mai multor molecule plasmidiale (Fig. 3. 17).

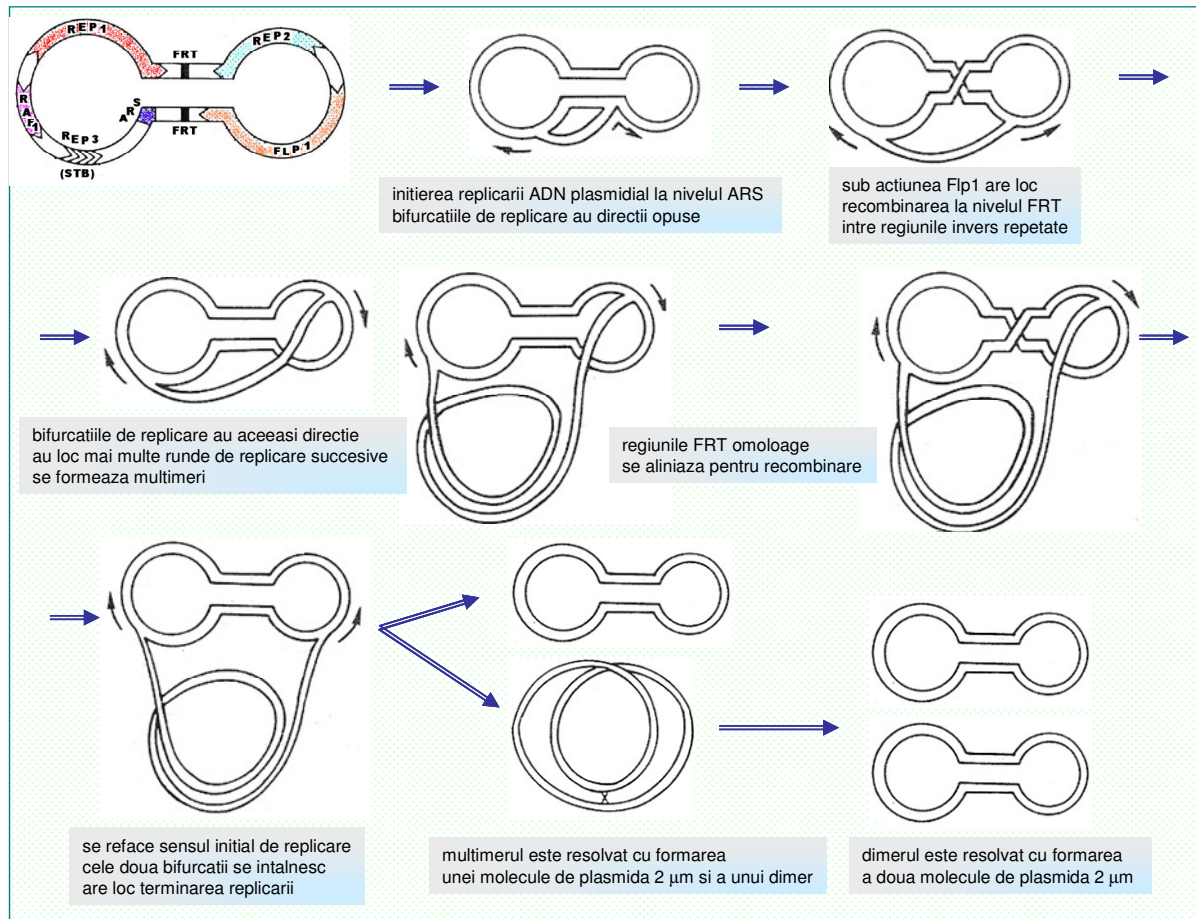


Fig. 3. 17. Replicarea plasmidei 2 μm

Partiția plasmidei 2 μm și reglajul numărului de copii

Analiza genetică a plasmidei 2 μm a evidențiat existența unor sisteme de partiție și amplificare care se pot combina pentru a asigura un mecanism de menținere a unui număr relativ constant de copii a plasmidei. Fiecare plasmidă se replică o singură dată/ ciclu celular, după care, sistemul de menținere stabilă a numărului de copii asigură o repartizare eficientă a plasmidelor la nivelul celulelor fiice.

În procesul de partiție sunt implicate, în principal, proteinele Rep1, Rep2 și locusul *STB* (denumit și *REP3*). Legarea complexului Rep1-Rep2 la nivelul *STB* este mediată de proteina Shf1 (codificată de gena nucleară *SHF1*). Se pare că plasmida 2 μm percepe numărul de copii prin nivelul proteinei Rep1 și că, în cazul unei concentrații mari de proteină, complexul format din Rep1-Rep2 reglează negativ numărul de copii, prin inhibarea exprimării genei *FLP* și stoparea replicării.

Genă *RAF1* este de asemenea implicată în reglajul numărului de copii, codificând o proteină Raf1, care activează exprimarea genei *FLP* fiind un antagonist al Rep1-Rep2. În procesul de reglaj al numărului de copii, complexul Rep1-Rep2 reprezintă exprimarea lui *RAF1*, inhibând astfel exprimarea lui *FLP* [Ahn, 1997] (Fig. 3. 18)

Supraexprimarea genei *FLP* în celulele în care există deja un număr mare de copii ale plasmidei 2 μm, este asociată cu creșterea în dimensiune a celulei și este letală. Efectul profund nociv al supraexprimării *FLP*, sugerează existența unui mecanism de control al activității acesteia corelat cu numărul de copii al plasmidei. Astfel:

► când numărul de copii ale plasmidei este mare, nivelul proteinelor Rep1 și Rep2 crește, determinând formarea unui complex activ, Rep1-Rep2, cu dublă acțiune: (1) se leagă la situsul *REP3*, asigurând repartizarea egală a numărului de copii între celula mamă și cea fiică; (2) același complex se leagă la capătul 5' al genei *FLP* represând transcrierea acesteia și, deci, procesul de replicare.

► în cazul unei segregări randomice, numărul de copii de plasmidă 2 μm scade, astfel încât concentrația complexului Rep1-Rep2 este insuficientă pentru a repressa transcrierea *FLP*. Ca

urmare, este sintetizată recombinaza Flp1 care acționează determinând creșterea numărului de copii ale plasmidei.

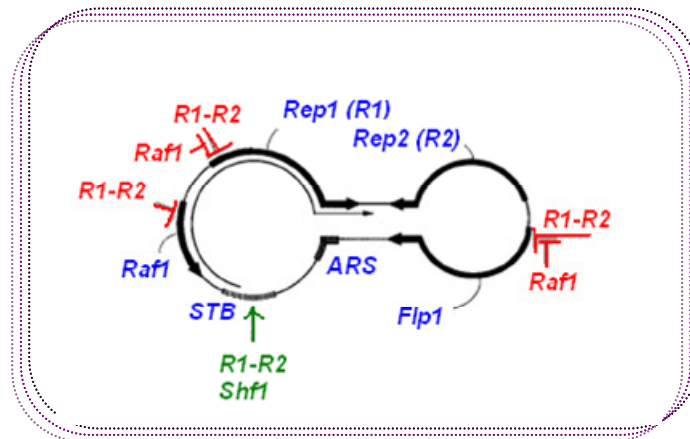


Fig. 3. 18. Mecanismele de reglaj de la nivelul plasmidei 2μm

În ceea ce privește mecanismul prin care sistemul Rep determină partiția plasmidei 2 μm în celulele fiică, studiile efectuate au fost avansate trei posibile modele [Scott-Drew, 1998]:

- (I) primul model propune un mecanism prin care proteinele Rep formează o structură intranucleară care leagă moleculele plasmidiale. Această structură constituie o forță care distribuie plasmidele nou sintetizate în nucleul în diviziune, asigurând partiția acestora în nucleul celulelor fiică.
- (II) în al doilea model, proteinele Rep eliberează plasmidele de la nivelul locusurilor unde sunt localizate în timpul replicării, permițând migrarea acestora în nucleii fiică;
- (III) conform celui de-al treilea model, proteinele Rep formează un complex legat de o componentă nucleară, care se dublează în cursul replicării și se repartizează apoi egal între celula mamă și fiică, angrenând astfel și moleculele plasmidiale atașate.

Experimente mai recente indică cel de-al treilea mecanism de partiție ca fiind cel mai probabil. A fost evidențiat faptul că o parte dintre fibrele fusului de diviziune și anume microtubulii nucleari, sunt implicate în localizarea nucleară a plasmidei 2μm și mediază recrutarea coezinelor la locusul *STB* al plasmidei (Fig. 3. 19)

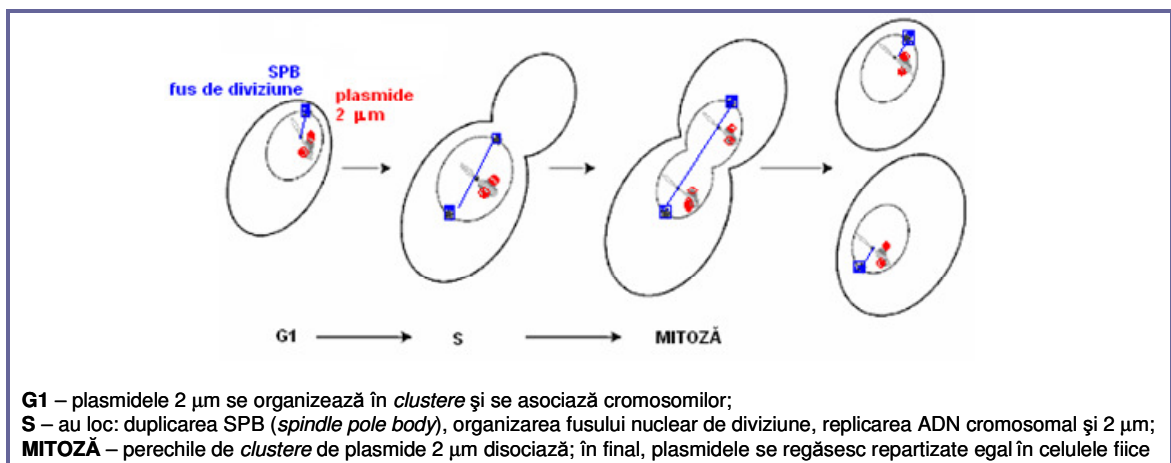


Fig. 3. 19. Modelul de partiție a plasmidelor 2μm la *S. cerevisiae*

Secvențele *ARS* și *STB* din structura plasmidei 2μm sunt implicate și în **proces de silențiere** a informației genetice nucleare. Silențierea mediată de *ARS* acționând în special la nivelul promotorilor genelor supuse mecanismului de represie prin glucoză (*GAL1*, *GAL4* și *SUC2*).

Implicarea secvenței *STB* (*REP3*) în procesul de silențiere, sugerează existența unei legături între acest proces și cel de ancorare nucleară a plasmidei 2μm prin intermediul *STB* sub

acțiunea complexului Rep1-Rep2. Au fost propuse două modele funcționale pentru acest mecanism: (i) ancorarea nucleară a plasmidei 2 μ m la nivelul *STB* ar putea avea efect represiv datorită posibilei sechestrări a unor secvențe aflate în vecinătatea fibrei de cromatină unde are loc ancorarea, fapt care împiedică transcrierea informației genetice de la nivelul lor; (ii) este posibil ca această ancorare să determine asocierea unor represori transcripționali, de tipul proteinelor Sir [Papacs, 2004].

Plasmidele 2 μ m - like

În afară de plasmida 2 μ m de la *S. cerevisiae*, până în prezent au fost identificate 6 structuri plasmidiale similare (*plasmide 2 μ m - like*), prezente numai la un număr redus de specii de drojdii. Toate aceste plasmide au dimensiuni mici (4647 – 6615 pb) și conțin 2 regiuni cu secvențe invers repetate care împart genomul în 2 părți aproximativ egale, cu secvențe unice (Tab. 3) (Fig. 3. 20) [Araki, 1989 ; Broach, 1991 ; Irie, 1991].

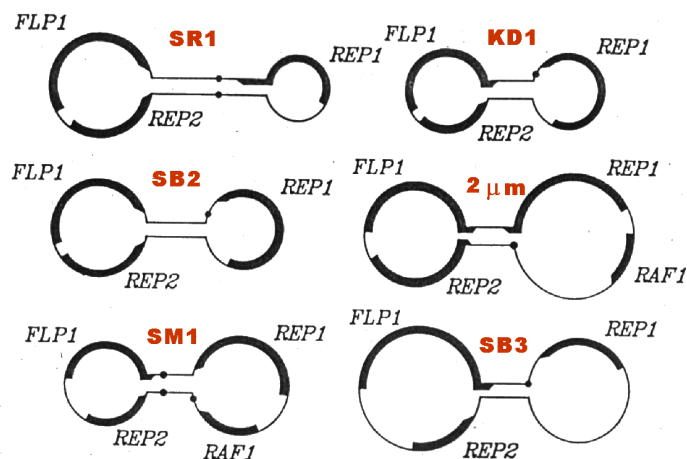
Toate aceste plasmide conțin 3 sau 4 regiuni codificatoare dintre care una pentru o proteină cu mare omologie de secvență cu Flp1 și care este implicată în procesul de recombinare dintre regiunile invers repetate. Toate plasmidele conțin cel puțin o secvență *ARS*, fie la nivelul uneia dintre regiunile unice, fie în imediata lor vecinătate S-a observat de asemenea, că gradul de similitudine între secvența de aminoacizi al Rep1 și Rep2 de la *S. cerevisiae* și cel ale proteinelor corespunzătoare din plasmidele 2 μ m-like de la *Zygosaccharomyces rouxii* și *Kluyveromyces lactis*, este redus. Cu toate acestea, asemănarea evidentă a plasmidelor 2 μ m-like în ceea ce privește structura și funcționarea, sugerează existența unor mecanisme asemănătoare de asigurare a stabilității și de control a numărului de copii.

| Plasmida | Sursa de izolare | Dimensiune (pb) | | | |
|-----------|-------------------------------------|-----------------|------|-----|------|
| | | U1 | U2 | IR | T |
| pSR | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 2654 | 1679 | 959 | 6251 |
| pSB1 | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 2300 | 2900 | 675 | 6550 |
| pSB2 | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 2457 | 2004 | 477 | 5415 |
| pSB3 | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 3168 | 2665 | 391 | 6615 |
| pSM1 | <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> | 2552 | 2160 | 352 | 5416 |
| pKD1 | <i>Kluyveromyces drosophilum</i> | 2137 | 1928 | 346 | 4757 |
| 2 μ m | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 2774 | 2346 | 599 | 6318 |

U1 – regiunea unică mare; U2 – regiunea unică mică; IR – regiunea invers repetată; T – întreaga plasmidă.

Tab. 3. Tipuri de plasmide 2 μ m – like întâlnite la drojdii.

Deși principala aplicabilitate a plasmidei 2 μ m o constituie utilizarea secvenței *ARS* uneori, alături de secvențele *REP1*, *REP2* și *STB* (*REP3*) în construirea vectorilor de tip *shuttle* pentru drojdii, determinarea prezenței sale sau a plasmidelor 2 μ m – like, poate fi folosită ca un indiciu privind posibila apartenență a unei tulpini necunoscute la una dintre speciile la care au fost identificate aceste forme de ADN extracromosomal. Folosirea plasmidelor 2 μ m / 2 μ m - like în scopul stabilirii relațiilor filogenetice dintre diferitele specii de drojdii gazdă, s-a observat că nu există o corelare între acestea și relațiile filogenetice determinate de similitudinea secvenței de baze a plasmidelor. Astfel, plasmidele pSB3 și pSR1 sunt cel mai îndepărtate plasmide dacă se ia în considerație gradul de omologie între secvențele *REP1*; cu toate acestea, ambele plasmide au fost izolate, se mențin și se propagă la fel de bine în tulpini de *Z. rouxii*.

Fig. 3. 20. Structura tipurilor de plasmide 2 μ m – like [după Broach, 1991]

SISTEMUL KILLER

Producerea de către unele specii de drojdii de exotoxine cu acțiune antimicrobiană mediată de receptori membranari, reprezintă un fenomen relativ bine cunoscut, descris pentru prima dată la *S. cerevisiae*, de E. A. Bevan și M. Makower (1963). Capacitatea acestor exotoxine de a determina moartea celulelor aparținând aceleiași specii sau unor specii congenice, le-a conferit denumirea de toxine *killer*. Majoritatea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* au în citoplasmă una sau mai multe specii moleculare de virusuri ARN dublu catenar (ARN d.c.). Aceste molecule prezintă foarte multe similarități cu virusurile ARN d.c. de la organisme eucariote superioare. Ca urmare, virusurile de la *Saccharomyces* reprezintă un model pentru descifrarea mecanismelor centrale de replicare virală, de transcriere ARN-dependentă, de împachetare, de frame-shift ribosomal, precum și relațiile dintre funcțiile virale și cele ale gazdei parazitare. Pentru *S. cerevisiae* au mai fost identificate două toxine killer notate KHR (*killer of heat resistance*, 20 kDa) și KHS (*killer of heat susceptible*, 75 kDa) codificate de gene nucleare plasate pe brațul stâng al cromosomului IX, respectiv, brațul drept al cromosomului V, care nu au omologie cu celelalte gene *killer*. Cele două proteine diferă prin termostabilitate și valoarea pH-ului optim.

Particulele citoplasmice *killer* de la *S. cerevisiae* reprezintă molecule de ARN d.c. încapsulate în particule *virus-like* (cu un diametru de 40 nm) și sunt responsabile de sinteza toxinei *killer*, substanță letală pentru tulpinile de drojdii non-killer.

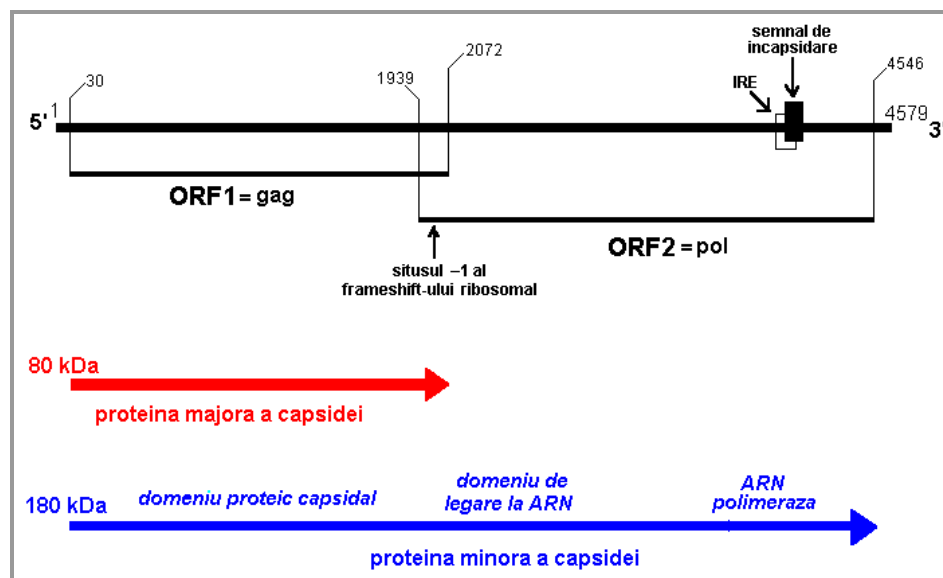
Tulpinile cu potențial *killer* aparținând acestei specii sunt incluse în trei grupe principale: K1 – tulpini de laborator, K2 și K28 – tulpini utilizate în fabricarea berii și a vinului. Deși aceste toxine diferă prin compoziția de aminoacizi, structură și modul de acțiune, prezintă mecanisme de sinteză, procesare și secreție similare. Celulele aparținând aceluiași grup sunt rezistente reciproc la toxina secretată, pe când celulele de drojdie aparținând la grupe diferite (sau chiar specii diferite) sunt, de regulă, sensibile reciproc. Astfel, tulpinile K1 și K2 sunt sensibile la toxina fiecăruia, în timp ce K2 și K28 sunt cross-imune. Celulele producătoare de toxină *killer* sunt notate **K+**, celulele sensibile la toxină – **K-**, iar cele care nu prezintă caracter *killer* – **K0**.

Virusurile ARN d.c. de la drojdii includ 3 familii de genomuri ARN d.c.: L-A, L-BC și M. Atât particulele M, cât și cele L, nu au caracter infecțios și nu prezintă ciclu litic. Ele sunt virusuri latente (cu o serie de caractere de plasmide) și pot fi transmise prin împerechere sexuală sau prin fuziune de protoplaști. Particulele L-BC se întâlnesc mai rar, în numai 10 copii/celulă, au aceeași dimensiune ca și L-A, dar au secvență diferită de nucleotide. Moleculele L-BC sunt localizate în particule virale intracelulare cu proteine capsidale diferite de cele ale capsidelor L-A și nu sunt asociate particulelor de tip M. Din aceste motive se consideră că citoplasma tulpinilor *killer* de la *S. cerevisiae* cuprinde 2 tipuri de particule: L-A și M. Particulele M sunt notate VSc-M și codifică toxina și factorul de imunitate, iar particulele L sunt notate VSc-L, codifică capsidul M și L, precum și polimeraze necesare replicării ambelor genomuri, și au rol de helper în procesul de infecție.

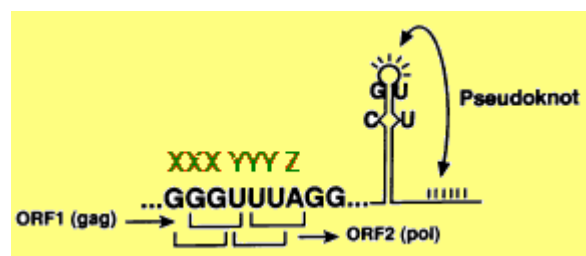
Sinteza toxinelor este asigurată de prezența în citoplasmă a două tipuri de particule **VLP**: **L-A și M**.

➤ particule L-A

- denumite și *particule helper*; se găsesc în aproximativ 100 copii/celulă;
- au diametrul de 39 nm, iar prezența lor nu determină moartea celulei gazdă, comportându-se asemănător virusurilor latente, fără ciclu litic;
- materialul genetic este reprezentat de o moleculă de ARN dublu-catenar de 4.6 kb, care se replică asemănător retrovirusurilor;
- conține informația genetică necesară sintezei proteinelor capsidale și unei ARN polimeraze, necesare pentru încapsidarea și replicarea atât a particulelor L-A, cât și M. Moleculele ARN_{dc} din L-A prezintă 2 ORF: (i) un situs *ORF1* sau *VBS* (*virus binding site*) de 2043 baze care codifică pentru proteina majoră a capsidei denumită Gag (76 kDa) și (ii) un situs *ORF2* care se suprapune cu 130 baze peste *ORF1* (*VBS*), a cărui informație genetică se exprimă numai în combinație cu *ORF1*, formând proteina Gag-Pol sau proteina minoră a capsidei (180 kDa), cu trei domenii active: proteic capsidal, de legare a catenei pozitive a ARN (capătul carboxi-terminal) și cu funcție de ARN polimerază [Magliani, 1997] (Fig. 3. 21).

Fig. 3. 21. Structura genelor *gag-pol* din genomul L-A

Proteina minoră a capsidei, este produsul unui proces de *frameshift ribozomal* în direcția 5', datorat existenței unui heptamer X XXY YYZ (unde X = A, U sau G; Y = A sau U; Z = A, U sau C) urmat de o structură *stem-loop* implicată în formarea unui *pseudoknot* ARN. Modelul lui Jaks (1988) și Dinman (1991), propune alunecarea cu 1 bază pe molecula de ARNmesager, a ARN de transfer (ARN_t) de la situsul P atașat la XXY și a ARN_t de la situsul A atașat la YYZ, pentru a permite atașarea acestora la XXX și, respectiv, YYY. Astfel, se decalează cadrul de citire cu 1 bază, codonul STOP este modificat și se permite citirea lui ORF2 în continuarea lui ORF1 (Fig. 3. 22).

Fig. 3. 22. Procesul de *frameshift ribozomal* la nivelul ORF1/ORF2 din genomul L-A

Replicarea particulelor killer L-A și M (Fig. 3. 23)

Replicarea particulelor *killer* L-A, debutează cu sinteza de noi molecule ARN monocatenar +, o parte dintre acestea reprezentând baza pentru sinteza de proteine capsidale minore și majore, iar cealaltă parte fiind incorporate ulterior în particule virale nou

sintetizate. La asamblarea capsidei virale participă și o proteină / factor sintetizat de celula gazdă, care este ulterior eliminat în citoplasmă. Proteina minoră a capsidei ORF1/ORF2 (Gag/Pol) leagă molecule de ARN monocatenar + și prin activitatea ARN polimerazică determină sinteza catenei ARN- și formarea unei molecule de ARNdublucatenar, care reprezintă genomul unei particule L mature.

Particulele *killer* M, utilizează pentru replicare proteinele capsidale sintetizate de particulele L-A și activitatea ARN polimerazică a ORF1/ORF2 (Gag/Pol). Ciclul de replicare este similar cu cel al L-A, cu diferența că nu toate catenele M "+" sunt excluse din particule, ci servesc ca matrice pentru sinteza de noi catene "-", astfel încât particulele M mature pot conține mai multe molecule ARNdublucatenare. Procesul este denumit *headful replication* [Ribas, 1998].

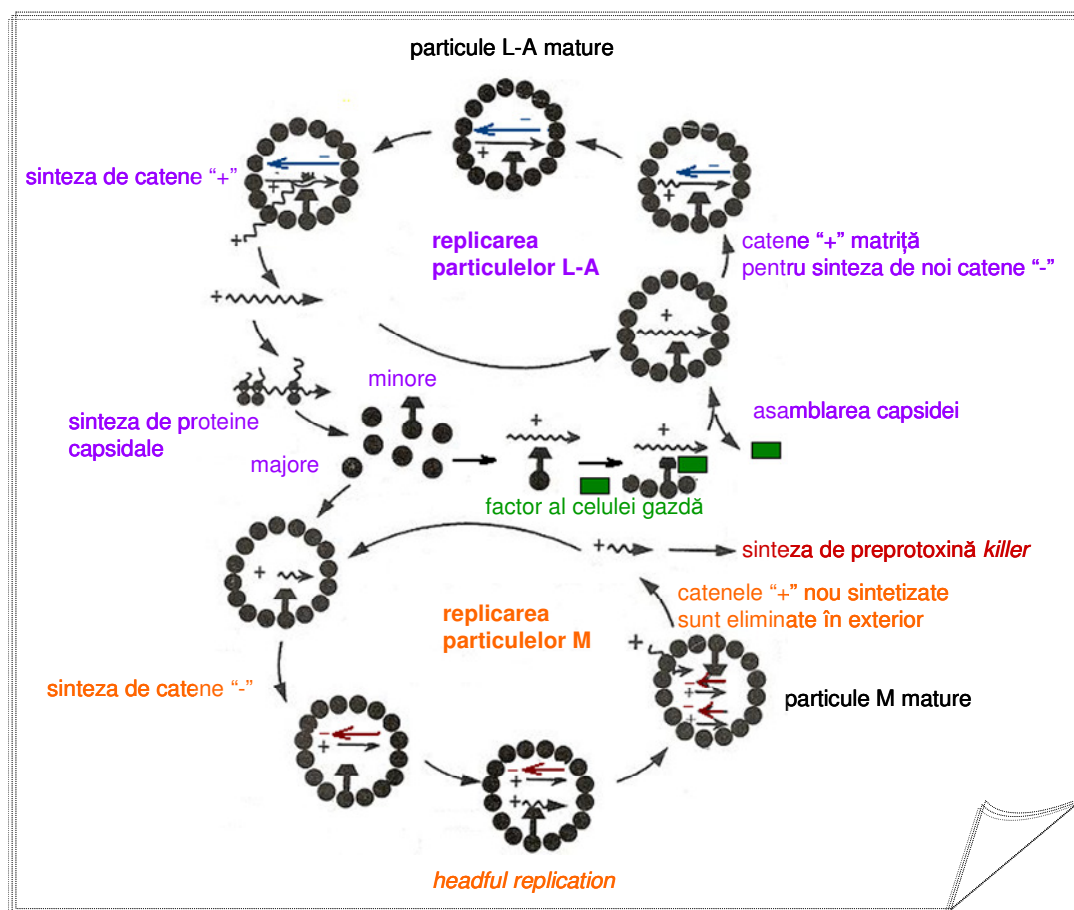


Fig. 3. 23. Replicarea particulelor *killer* L-A și M

► particule M

- trei clase: M1, M2 și M28, responsabile de sinteza toxinelor killer specifice (K1, K2 și, respectiv, K28) și a factorului de imunitate; se găsesc în circa 10-12 copii/celulă;
- particule virale cu aceeași dimensiune ca L-A (39 nm) și al căror material genetic este reprezentat de mai multe molecule de ARN dublu-catenar de dimensiuni mici: M1 – 1.8 kb, M2 – 1.5 kb și M28 – 1.9 kb.

Sinteza toxinelor killer K1, K2 și K28. Mecanism de acțiune

Toxinele K1, K2 și K28 de la *S. cerevisiae*, sunt secrete de tulpinile *killer* purtătoare a particulelor M specifice și sunt sintetizate sub forma de preprotoxine care conțin un capăt amino-terminal hidrofob care este scindat de proteazele Kex1 și Kex2 și numeroase situri de N-glicozilare; preprotoxinele astfel formate au structură generală similară și suferă modificări post-tranșlaționale la trecerea prin aparatul Golgi, citoplasmă și vezicule secretorii, în final fiind eliberate în mediu toxinele mature.

Proteaza Kex2 este o endoprotează de tipul subtilisinei, care clivează proteinele după perechile de aminoacizi bazici Lys-Arg sau Arg-Arg. Proteaza Kex1 este o serin-carboxipeptidază care îndepărtează aceleași perechi de aminoacizi bazici de la capătul C-terminal al peptidei

expuse anterior acțiunii lui Kex2. Ambele enzime sunt ancorate în membrana organitului Golgi, situsurile active fiind plasate în lumenul acestuia [Schmitt, 2002].

Cea mai studiată toxină killer de la *S. cerevisiae* este **toxina K1** (19 kDa). Produsul primar de transcriere a informației genetice din particulele M1, este o polipeptidă de 35 kDa, care prezintă un capăt amino-terminal de 44 aminoacizi (secvență leader, δ) care include o secvență semnal (de 26 aminoacizi) pentru reticulul endoplasmatic (RE); urmează trei domenii: α (103 aminoacizi – poziția 45 la 147), γ (pozițiile 148 la 233) purtător al situsurilor pentru N-glicozilare și β (83 aminoacizi - pozițiile 234 la 316). Pretoxina glicozilată la nivelul RE are 42 kDa, iar prin clivare cu ajutorul proteazelor Kex2 și Kex1 se formează toxina finală care cuprinde două subunități, derivate din domeniile corespunzătoare: α (9,5 kDa) și β (9 kDa) (Fig. 3. 24).

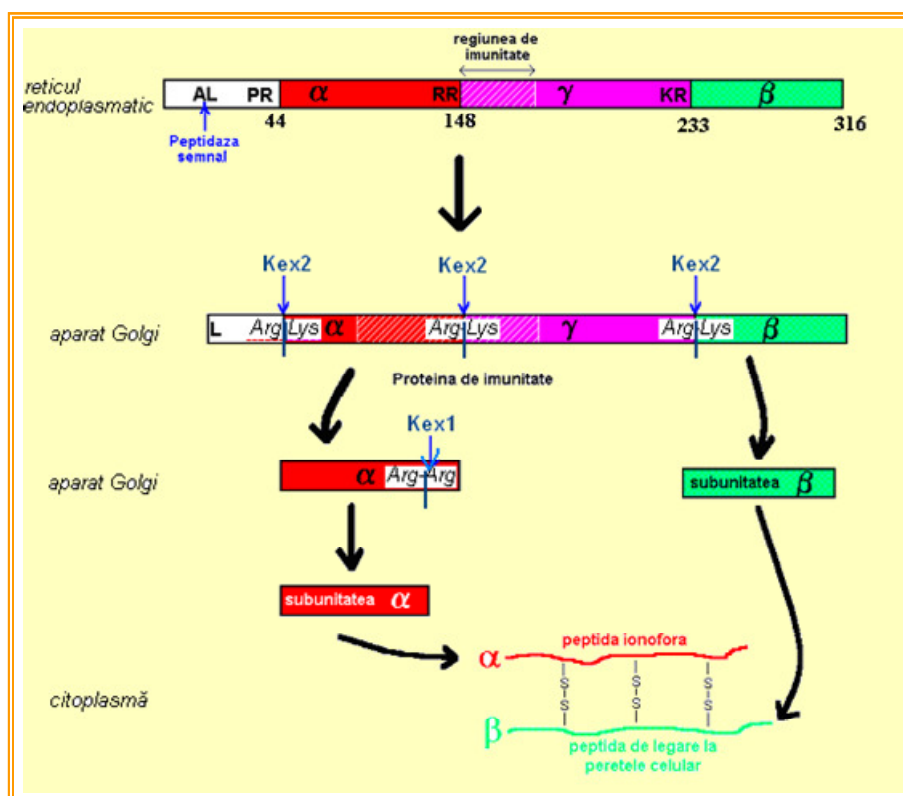


Fig. 3. 24. Maturarea toxinei K1 de la *S. cerevisiae*

Toxina K2 este sintetizată sub forma unui precursor de 362 aminoacizi (38,7 kDa) cu trei situsuri pentru glicozilare (pozițiile 177, 214 și 261), o secvență semnal la capătul amino-terminal și situsuri de clivare recunoscute de Kex2. În urma maturării, rezultă 2 subunități: α (172 aminoacizi) glicozilată în două poziții (177 și 214) și β (140 aminoacizi), care formează toxina matură K2. Spre deosebire de K1, în structura precursorului K2, nu apare domeniul γ .

Într-o primă etapă, toxinele K1 și K2, se leagă prin subunitatea β , de un receptor din peretele celular, 1,6- β -D-glucan (Fig. 3. 25). Ulterior, are loc legarea lor la nivelul membranei plasmactice, proces mediat de glicoproteina peretelui celular Kre1, care este atașată membranei plasmactice prin capătul C-terminal și care are rol esențial în formarea canalelor plasmactice prin care are loc efluxul ionilor de K spre mediul exterior [Breinig, 2002].

Celulele de *S. cerevisiae* **K28** prezintă particule virale M28 care codifică pentru proteina heterodimerică formată din două subunități α și β . Toxina K28 este sintetizată ca un precursor de 345 aminoacizi, iar cele două subunități mature α (10,5 kDa) și β (10,9 kDa), sunt legate prin punți disulfurice între resturile de Cys: α - Cys₅₆ și β - Cys₃₄₀.

Toxina K28 are ca situs primar de legare resturile de α -1-3-manoză de la nivelul manoproteinelor din peretele celular. Acțiunea sa constă în stoparea ciclului celular la începutul fazei S, în stadiul incipient de formare a mugurelui și înaintea replicării ADN (Fig. 3. 25).

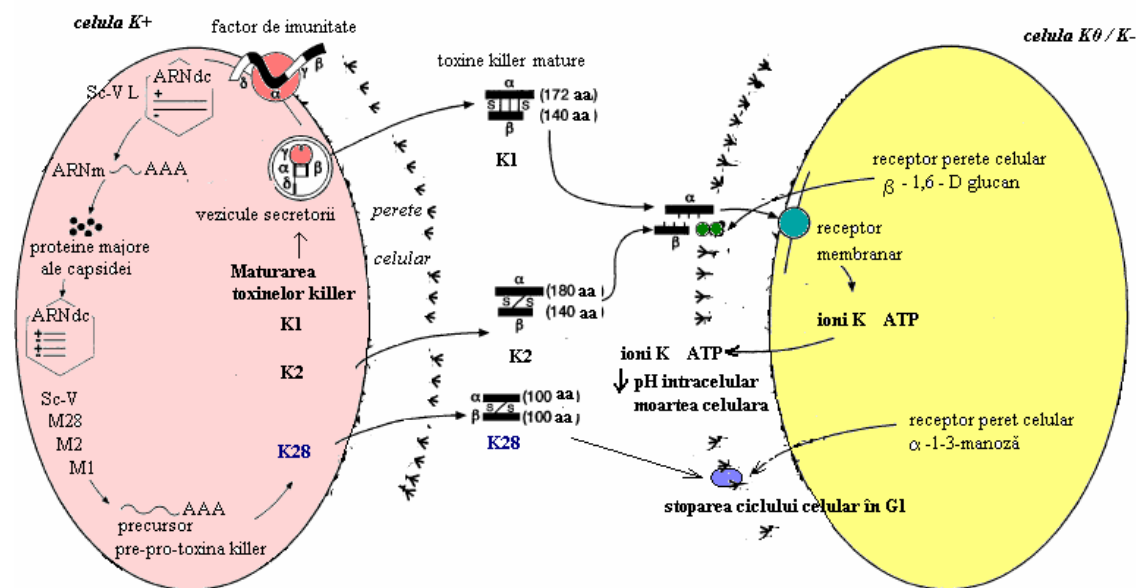


Fig. 3. 25. Mecanismul de acțiune al toxinelor Killer K1, K2 și K28 de la *S. cerevisiae* [după Magliani, 1997]

În concentrații scăzute, toxinele K1, K2 și K28 determină apoptoza celulelor tratate cu aceste toxine, prin rupturi ale ADN și condensarea cromatinei. Acest mecanism se pare că funcționează deseori în condiții naturale, în care toxinele eliberate de tulpina *killer* sunt în concentrație prea mică pentru a determina moartea celulelor sensibile prin procesul declanșat în mod normal de prezența acestora.

Sensibilitatea la toxina *killer* necesită prezența genelor *KRE* implicate în sinteza glucanului (*KRE9*, *10*, *11*) și a mananului, principalii receptori specifici ai toxinei la nivelul peretelui celular. Astfel, genele *KRE1* și *KRE5* codifică pentru proteine implicate în sinteza β -1,6-D-glucanului, *KRE6* codifică o glucan-sintază, iar *KRE2* o manosil-transferază.

Imunitatea la toxine a celulelor este plasată la nivelul membranei plasmatice, fapt susținut de trei observații: (1) celulele *killer* rămân imune chiar sub formă de protoplaști; (2) celulele induse cu rezistență crescută la toxină, *kre*, manifestă acest caracter datorită legării mai slabe a toxinei la peretele celular; (3) unele mutante *kre* manifestă capacitate normală de legare a toxinelor și produc protoplaști imuni [Sesti, 2001].

Gene nucleare implicate în reglajul sistemului killer

În reglajul menținerii și replicării particulelor *killer* L-A și M de la *S. cerevisiae*, sunt implicate numeroase gene nucleare:

► Genele *SKI* – “superkiller” – par a constitui un sistem antiviral al celulei gazdă necesar pentru represia propagarea particulelor virale *killer*. *SKI1* codifică o 5'-exoribonuclează implicată în degradarea ARN și procesare; *SKI2*, *3*, *6*, *7* și *8* - reprezintă numărul de copii ale M1 și acționează specific represând traducerea ARNm al L-A și M

► Genele *MAK* – “maintenance of killer” – 30 la număr, sunt esențiale în propagarea și menținerea fenotipului killer. Trei dintre ele, *MAK3*, *MAK10* și *PET18*, intervin în replicarea genomurilor L-A și menținerea particulelor L-A și M. O serie de gene *MAK* codifică pentru proteine ale subunității ribozomale 60S: L3 (*MAK8*), L4A (*MAK7*), L4B (*KRB1*) și L41B (*MAK18*), pentru ADN topoizomerază I (*MAK1*), pentru o proteină membranară (*MAK11*), *MAK16* este esențială pentru ieșirea din faza G1 și *MAK10* este necesară și pentru creșterea celulară pe surse de carbon nefermentabile.

Aplicații ale drojdiilor killer

Drojdiile cu potențial *killer*, au numeroase aplicații practice și teoretice:

- în industria alimentară și de fermentație, pentru combaterea contaminării tulpinilor de drojdii de tip sălbatic care poate apărea în timpul producerii berii, vinului sau pâinii;
- ca agenți de biocontrol în conservarea produselor alimentare;
- în bio-tiparea drojdiilor și fungilor cu potențial patogen;

- în dezvoltarea de produse antimicotice pentru tratamentul infecțiilor fungice umane și animale;
- în tehnologia ADN recombinant.

Ecologia sistemului killer [Wloch-Salamon, 2008]

Sisteme *killer* în mediu natural Toxinele *killer* pot conferi un avantaj competitiv tulpinilor producătoare, în accesul la resurse necesare primelor faze de creștere celulară, fiind produse la parametrii optimi în celule în curs de creștere la un pH scăzut și în prezența nutrienților. Foarte multe tulpini *killer* au fost izolate de pe fructe, la un pH mic și concentrație crescută de zaharuri. Altele, provin de pe insecte, în special, *Drosophila* spp.

S-a observat că deseori, fenomenul *killer* apare cu preferință între tulpini provenind din ecosisteme cu habitate diferite, ceea ce sugerează o posibilă adaptare în rezistența la anumite toxine *killer* sub acțiunea unor presiuni selective specifice fiecărui habitat.

Sistemele *killer* în mediu industrial Tulpini cu potențial *killer*, majoritatea aparținând speciei *S. cerevisiae*, au fost izolate în 88% dintre procesele de fermentație din producerea vinului, prezența lor fiind influențată de stadiul în care se afla procesul de vinificație și de perioada de cules a strugurilor.

Drojii *killer* oportuniste Drojdiile *killer* oportuniste suscită în ultima vreme un interes deosebit, în special în domeniul medical, în interesul gazdelor cu sistem imunitar compromis. Astfel, s-a observat incidența crescută a fungemiilor asociate cu rate mari ale mortalității, cauzate de specii de drojdii cu potențial patogen și fenotip *killer*, ca *S. cerevisiae* și *Pichia anomala*. O atenție deosebită este acordată posibilei utilizări a toxinelor *killer* ca agent antifungic cu acțiune specifică.

În prezent se cunosc mai multe tipuri de toxine *killer* biochimic diferite, produse de diverse genuri de drojdii. Sinteza lor este asigurată de:

(a) elemente genetice citoplasmice, cu transmitere non-Mendeliană, **virus-like particles (VLPs)**, al căror material genetic este reprezentat de molecule de ARN dublu catenar (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*) (Tab. 4);

| Specia de drojdie | Particule virale | Dimensiunea genomului (kpb) | Funcțiile particulelor virale / proteine codificate |
|--|------------------|-----------------------------|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ScV L-A | 4,6 | Virus helper; ORF1(Gag) – proteina majoră a capsidului; ORF1/ORF2 (Gag/Pol) – proteina minoră a capsidului (domenii: capsidal, de legare ARN monocatenar+, cu funcție de ARN polimerază) |
| | ScV M1 | 1,6 | Toxina K1 (dimer α/β) și factorul de imunitate |
| | ScV M2 | 1,5 | Toxina K2 (dimer α/β) și factorul de imunitate |
| | ScV M28 | 1,8 | Toxina K28 (dimer α/β) și factorul de imunitate |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | ZbV-L | 4,6 | Virus helper; Gag – proteina majoră a capsidului; Gag/Pol– ARN polimeraza |
| | ZbV-M | 2,1 | Toxina killer (monomer) K412 |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | HuV-L | 4,6 | Virus helper; Gag – proteina majoră a capsidului; Gag/Pol– ARN polimeraza |
| | HuV-M | 1,0 | Toxina killer (monomer) |
| <i>Ustilago maydis</i> | UmV-P1 H2 | 1,4 | H2 – proteine capsidale, replicare și menținerea particulelor virale |
| | M1/M2 | | M1/M2 -Toxina killer KP1 (dimer α/β) |
| | UmV-P4 H2 | 1.0 | H2 – proteine capsidale, replicare și menținerea particulelor virale |
| | M2 | | M2 - Toxina killer KP4 (monomer) |
| | UmV-P6 H1 | 2,0 | H1 – proteine capsidale, replicare și menținerea particulelor virale |
| | M2 | | M2 - Toxina killer KP6 (dimer α/β) |

Tab. 4. Specii de drojdii care prezintă sistemul *killer* codificat de particule de tip viral

(b) **plasmide ADN lineare** (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae*, *Pichia pastoris*); (c) **gene nucleare** (număr redus de tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*; tulpini aparținând speciilor: *Pichia farinosa*, *Williopsis mrakii*, *Pichia klyveri*) (Tab. 5) [Starmer, 1987; Banerjee, 2000].

| Specia de drojdie | Material genetic | Toxina produsă | Structura toxinei killer | Mecanism de acțiune |
|--|-------------------------|----------------|----------------------------------|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ARNdc M1 | K1 | dimer α/β | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| | ARNdc M2 | K2 | dimer α/β | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| | ARNdc M28 | K28 | dimer α/β | Inhibarea ciclului celular, stoparea ciclului în G2 |
| | cromosomal | KHR | monomer | necunoscut |
| | cromosomal | KHS | monomer | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | ARNdc M | K412 | monomer | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | ARNdc M | toxina killer | monomer | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| <i>Ustilago maydis</i> | ARNdc M1/M2 | KP1 | dimer α/β | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| | ARNdc M2 | KP4 | monomer | blocarea preluării ionilor Ca^{2+} din mediu extracelular |
| | ARNdc M2 | KP6 | dimer α/β | scăderea concentrației intracelulare a ionilor K^{+} |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | ADNdc linear plasmidial | pGKL1 | trimer $\alpha/\beta/\gamma$ | stoparea ciclului celular în G1 și pierderea viabilității |
| <i>Pichia acaciae</i> | ADNdc linear plasmidial | pPac1-2 | trimer cu activitate chitinazică | stoparea ciclului celular în G1 la pH optim 7,0-7,5 |
| <i>Pichia klyveri</i> | cromosomal | toxina killer | glicoproteină | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| <i>Pichia farinosa</i> | cromosomal | SMK | dimer α/β | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |
| <i>Pichia anomala</i> | cromosomal | 2 toxine | glicoproteine | acțiune killer împotriva speciei <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> la concentrații mari de NaCl |
| | cromosomal | WC 65 UP 25F | glicoproteine | acțiune killer împotriva speciei <i>Candida albicans</i> |
| <i>Williopsis mrakii</i> | cromosomal | HM-1/HMK | monomer | înhibarea sintezei β -1,3-glucanului din structura peretelui celular |
| | cromosomal | K500 | monomer | creșterea permeabilității membranei, formare de canale ionice |

Tab. 5. Principalele caracteristici ale celor mai studiate sisteme **killer**