



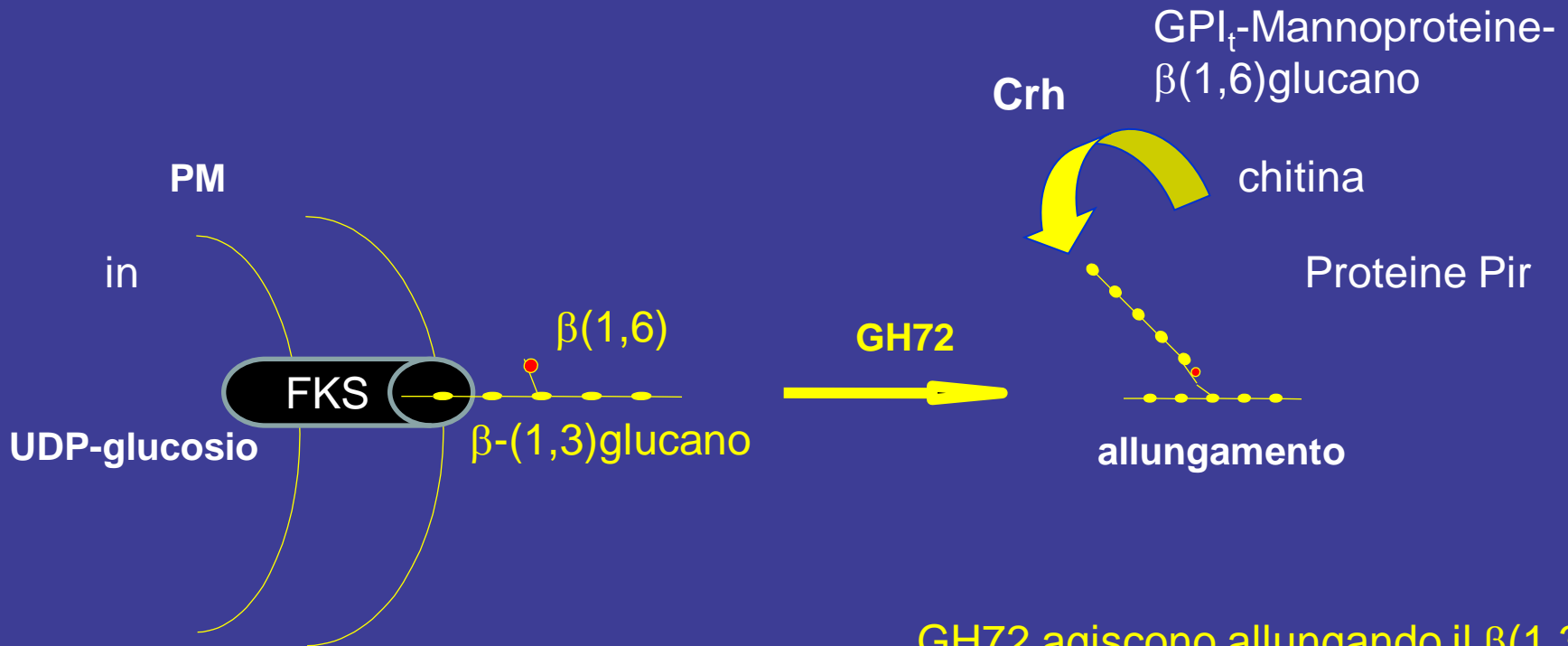
Enzimi di rimodellamento della parete cellulare



Le $\beta(1,3)$ -glucanosil-transferasi
(GH72 in database CAZy)



Formazione della parete cellulare nei funghi



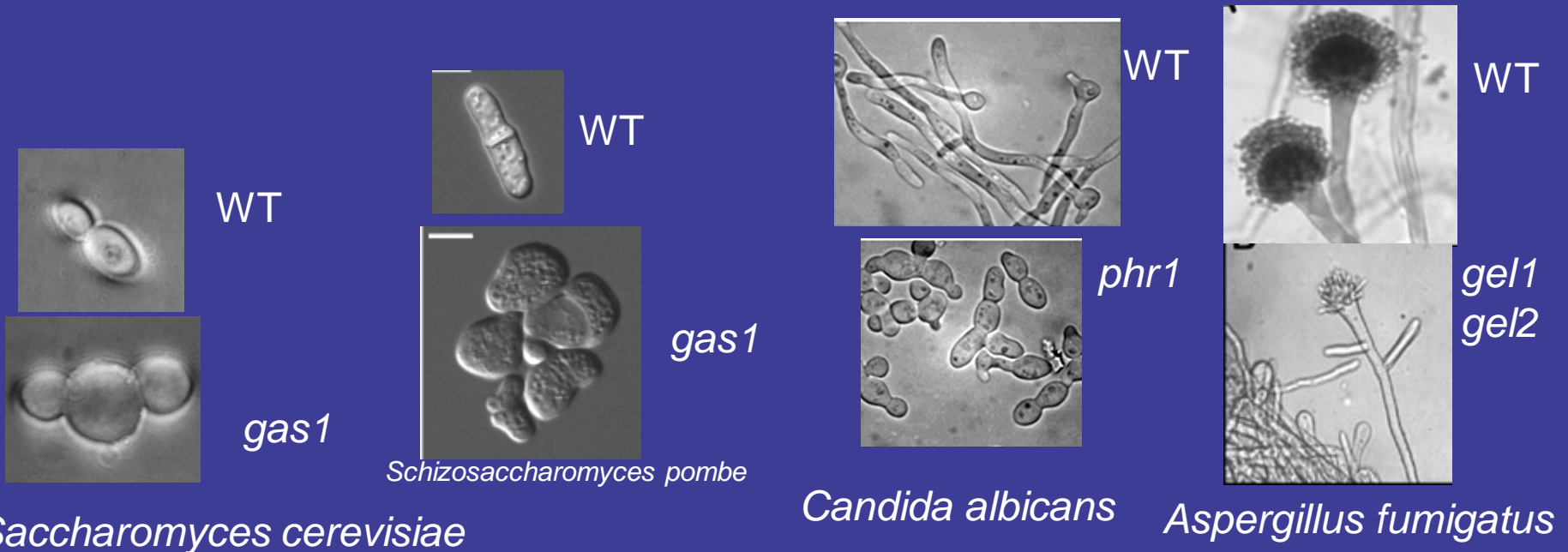
GH72 agiscono allungando il $\beta(1,3)$ -glucano nei punti di ramificazione

Mouyna I. et al. (2000) *J. Biol.Chem.* 275: 14882-14889
Medina de Medina-Redondo et al. (2010) *PLosOne* 5, e14046



Le $\beta(1,3)$ -glucanosil-transferasi

- Glicoproteine contenenti GPI e localizzate nei siti di crescita della parete (Poster)
- Cruciali per la morfogenesi e la vitalità cellulare
- Assenti nell'uomo





Le $\beta(1,3)$ -glucanosil-transferasi sono codificate da famiglie multigeniche

5 geni in *S.cerevisiae* (**GAS**)

5 geni in *C. albicans* (**PHR**)

C. glabrata

C. dubliniensis

C. parapsilosis

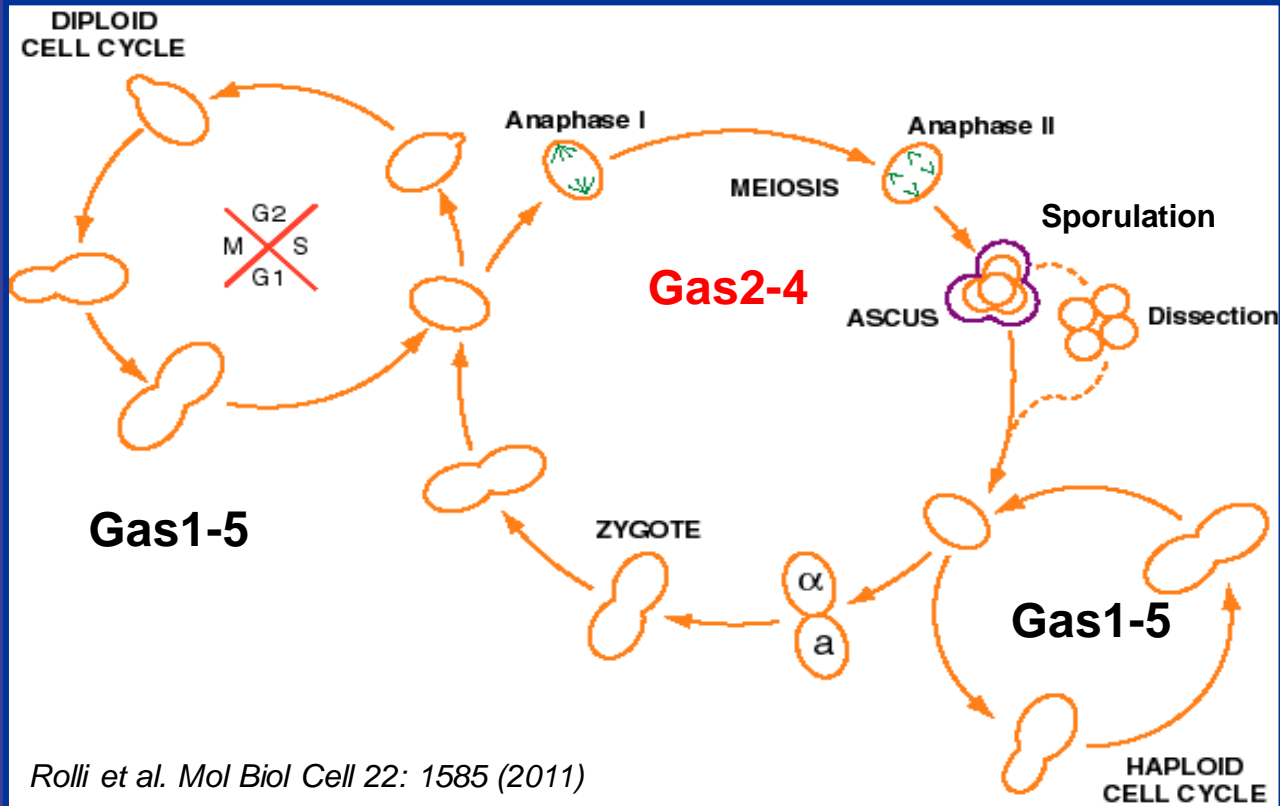
7 geni in *A. fumigatus* (**GEL**)

Analisi filogenetica su 237 sequenze
ha individuato sottogruppi di ortologhi negli Ascomiceti

Significato della Ridondanza?



Diverse isoforme intervengono in vari stadi del ciclo vitale di lievito



L'attività GH72 è essenziale durante l'intero ciclo vitale



Gli enzimi GH72: potenziali target per nuovi agenti antifungini?

- *PHR1* e *PHR2* sono essenziali per la virulenza in *C. albicans*
- *GEL4* è essenziale in *A. fumigatus*
- *GEL1* e *GEL2* sono essenziali per la virulenza in *A. fumigatus*
- *GAS1* è essenziale in *C. glabrata*

Gel/Gas e Phr
sono potenti Ags

Arroyo J. Et al. Yeast 24: 289 (2007)

La somministrazione di Gel1
protegge il topo da
infezione fungina

*Delgado N. et al Infect Immun 71: 3010
(2003)*

Le proteine Gel/Gas
modulano le risposte del sistema
immunitario
(Th1/Th17/Treg)

Bozza S. et al. J.Immun. 183: 2407 (2009)



Gli enzimi GH72 e il trattamento delle infezioni fungine

Patogeno



Ospite

Vaccini

**Nuovi
antifungini**

Immunomodulatori



- Ricerca di inibitori

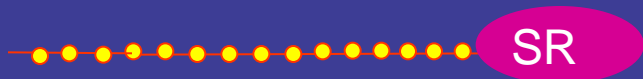
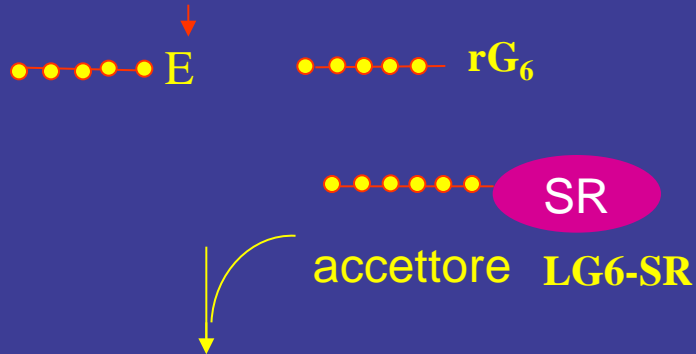
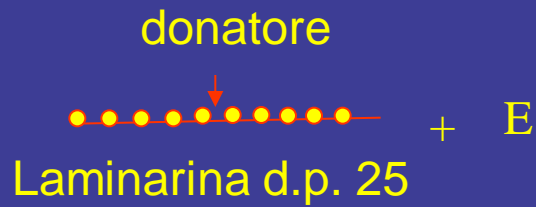
a. Messa a punto di saggi per lo screening di inibitori

b. Analisi *in silico* di potenziali ligandi

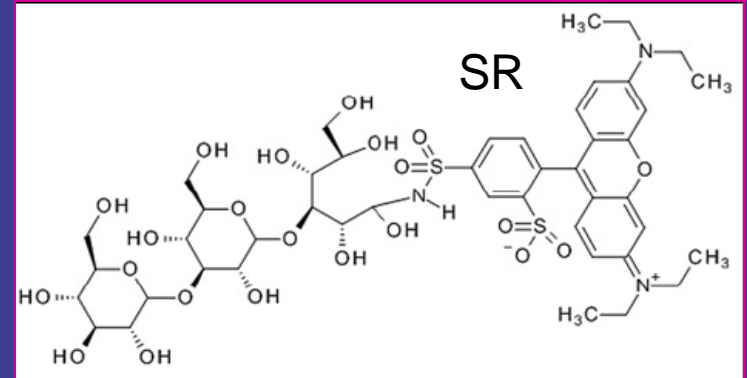
c. Studio di combinazioni con effetto fungicida



Nuovo saggio di attività degli enzimi GH72



**Prodotto di trasferimento
Insolubile in EtOH 66%**

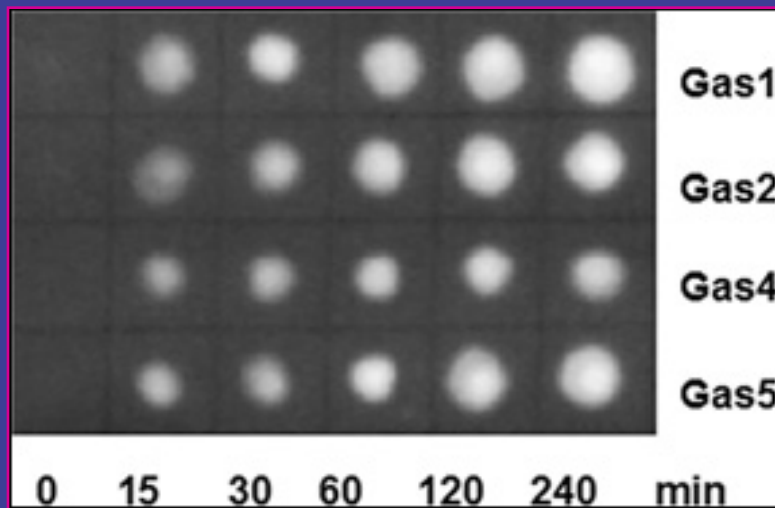


Laminarina
Laminarioligosaccaride L6-SR
Enzima
buffer
37°C

Collaborazione con Vladimir Farkas

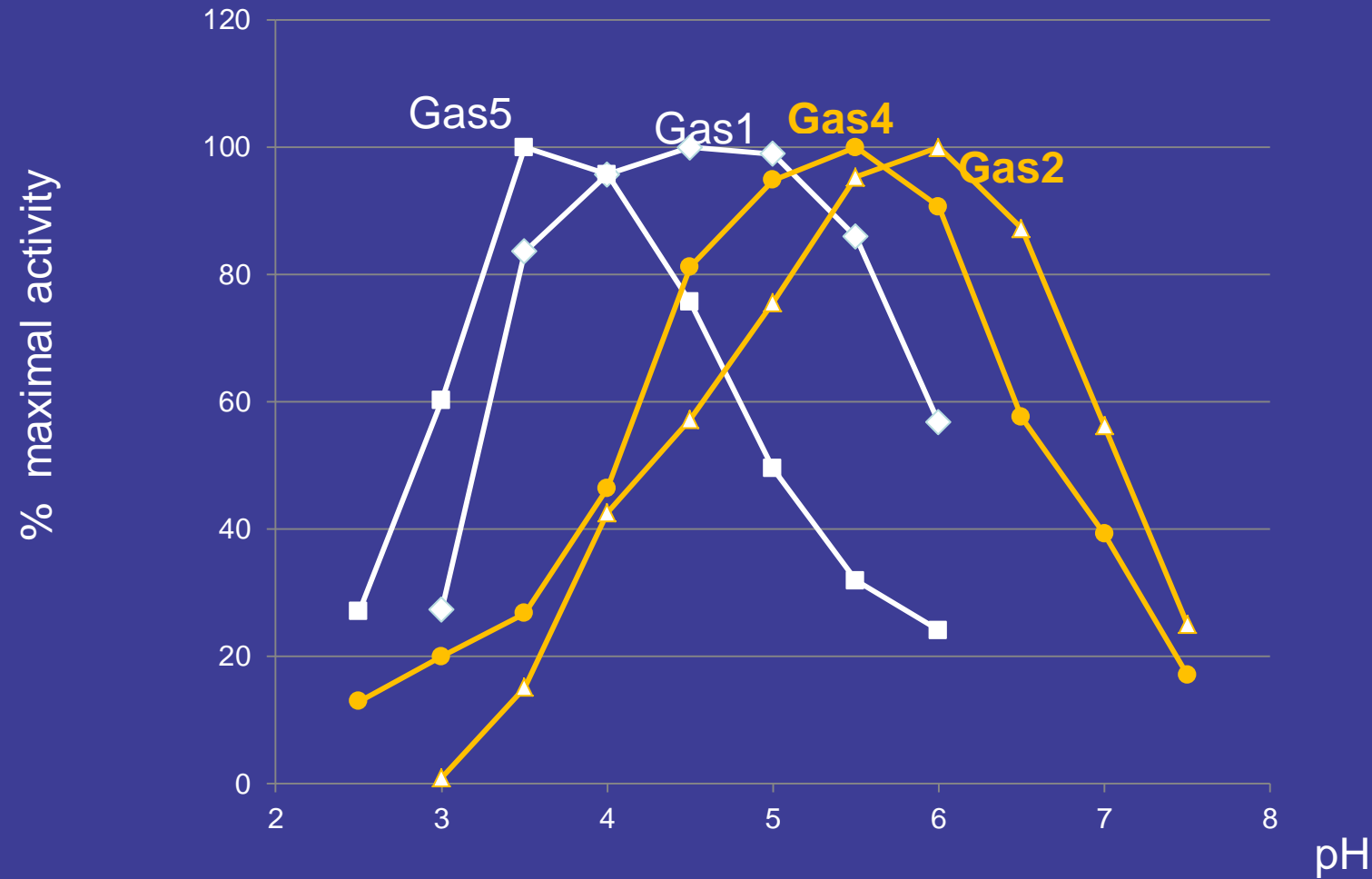


SAGGIO di attività delle proteine Gas di lievito





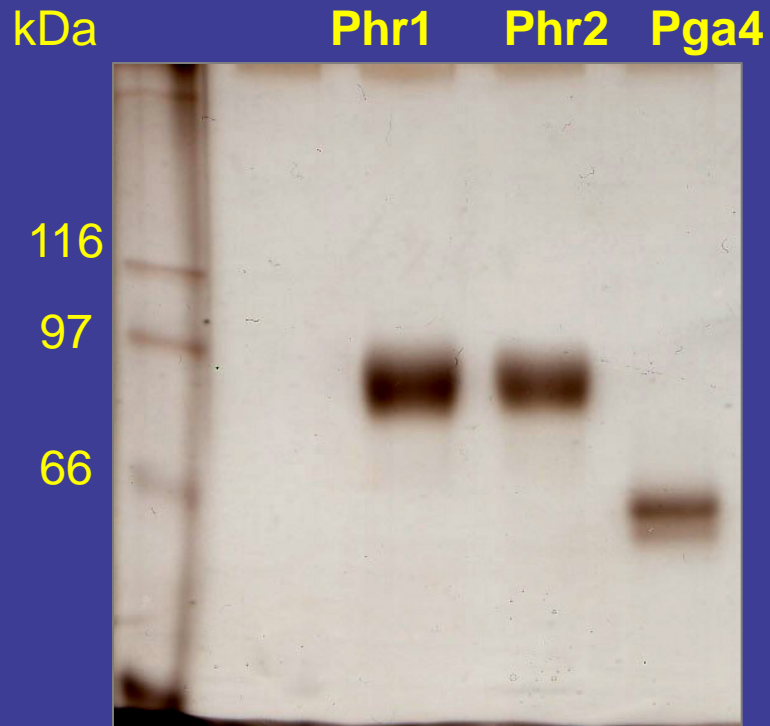
SAGGIO di attività delle proteine Gas di lievito





Ottenimento delle glicoproteine Phr1, Phr2 e Pga4 di *Candida albicans* in forma ricombinante e solubile in *Pichia pastoris*

Proteine purificate su resine al Nickel
(800 ng)

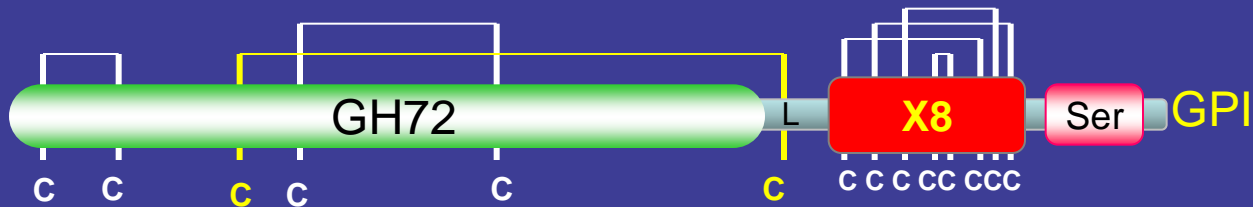


Minigel-Silver staining

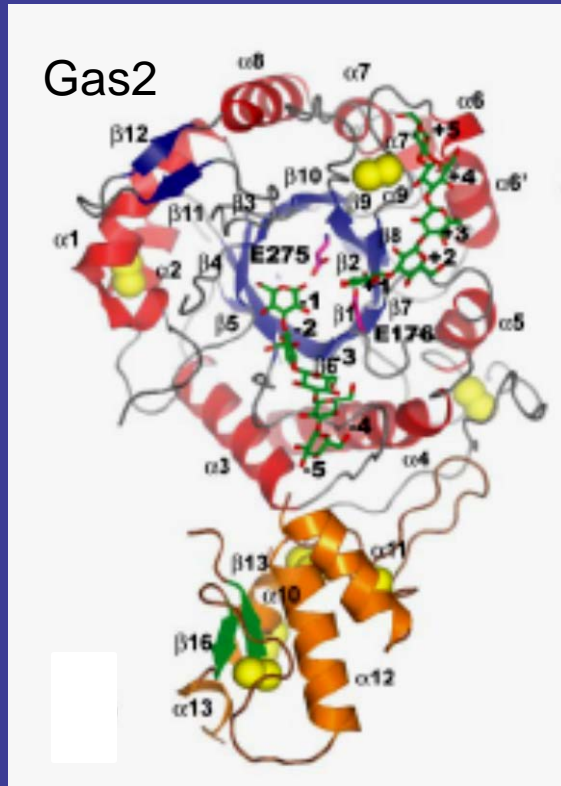
Shaobin Lu
Genny Degani



2° approccio - Analisi *in silico* di potenziali ligandi/inibitori degli enzimi GH72



Popolo et al. *J.Biol. Chem.* 283: 18553-18565 (2008)



→ structure based- drug design

Hurtado-Guerreo et al. *J.Biol.Chem.* (2009) 284: 8461-8469



3° approccio

I funghi hanno straordinarie capacità di resistere allo stress della parete.

Conoscere la risposta compensativa ai danni della parete (cell-wall salvage pathway) è utile per sviluppare strategie combinate e prevenire forme di resistenza



Candida albicans



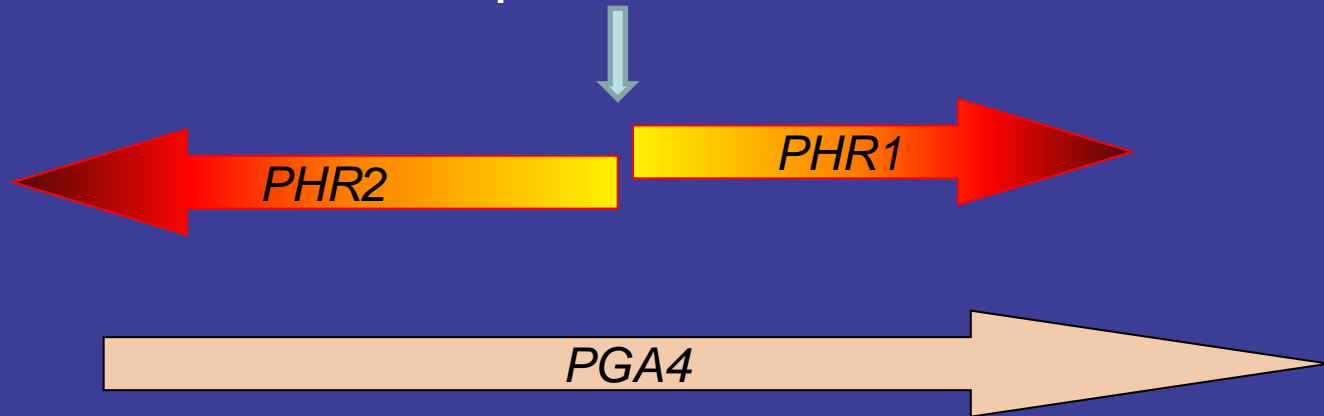
Espressione pH-dipendente di *PHR1*, *PHR2* e costitutiva di *PGA4*

Stomaco

Vagina

Sangue

2.5---4.5---Ambient pH 5.5-----7.3-----8



Saporito-Irwin et al. (1995) Mol.Cell.Biol. 15: 601-613

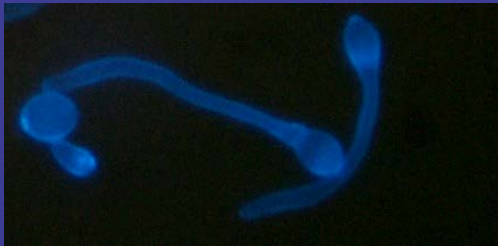
Muhlschlegel f.A. and Fonzi W.A. (1997) Mol. Cell. Biol. 17:
5960-5967



In assenza di Phr1p a pH restrittivo: incapacità di formare ife, difetti di parete e aumento di chitina

M199-150 mM HEPES pH 7.5 37°C

Chitin



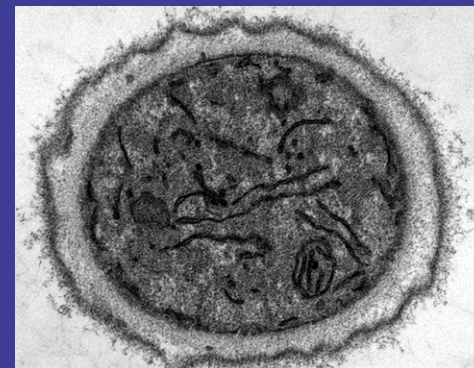
WT



WT



$\Delta phr1$



$\Delta phr1$



Trascrittoma di $\Delta phr1$ dopo induzione della crescita ifale (1-3-5 ore)

- Geni che firmano la risposta allo stress di parete sono UP-REGOLATI nel mutante (*CRH11*, *GFA1*, *GNA1*, *CHS*, *GPI-WPs*) - esteso remodelamento della parete cellulare
- *ECE1* è repressa (*SAP5*, *FTR1*, *CHT2* e *CHT3*)
- Modulazione geni del Cell cycle control e morphogenesis



Ringrazio

**Università degli Studi
di Milano**

**Genny Degani
Shaobin Lu
Julia Calderon Blanco
Enrico Ragni
Eleonora Rolli**

**Georgetown
University**

William Fonzi

Slovak Academy of Sciences

**Vladimir Farkas
Marian Marzan**

**Universidad Complutense
Javier Arroyo**

e il comitato scientifico della FIMUA