

Caratterizzazione funzionale della deacetilasi istonica Hst3p di *Candida albicans*

ABSTRACT

L'eucariote unicellulare *Candida albicans* rappresenta uno dei più importanti funghi utilizzato in medicina come modello sperimentale per lo studio delle patologie fungine e della biologia dei funghi dimorfici. Tale fungo è parte del normale microbiota umano; vive, infatti, come commensale a livello della mucosa orale e vaginale e del tratto gastrointestinale dell'uomo. Tuttavia, a livello di tali distretti, esso si comporta come un patogeno opportunisto: alterazioni dell'immunità dell'ospite e della sua microflora endogena possono, infatti, determinare l'incapacità di controllare la proliferazione del fungo, dando origine ad infezioni invasive e persino letali in individui immunocompromessi. Pertanto, negli ultimi decenni, *Candida* si è affermata come principale fungo patogeno dell'uomo responsabile di un'ampia varietà di infezioni mucosali e sistemiche.

La capacità di *C. albicans* di causare e propagare con successo l'infezione è legata all'espressione di numerosi fattori di virulenza, principalmente, alla sua capacità di cambiare reversibilmente e rapidamente morfologia in funzione degli stimoli ambientali, presentandosi in forma di lievito o in forma filamentosa (pseudo-ifa o ifa).

Meccanismi epigenetici di regolazione dell'espressione genica modulano la morfogenesi e la virulenza del fungo polimorfico *C. albicans*. Eventi quali la transizione lievito-ifa, la resistenza ai comuni fungistatici, la formazione di biofilm, lo *switch white-opaque*, sono importanti meccanismi patogenetici, per i quali le modifiche post-traduzionali degli istoni giocano un ruolo chiave. In particolare, l'acetilazione e la deacetilazione istonica regolano lo switch fenotipico di *C. albicans*; di conseguenza, tale modifica istonica è associata alla virulenza fungina.

Nei lieviti, l'acetilazione della Lisina 56 dell'istone H3 (H3K56ac) rappresenta un'importante modifica post-traduzionale che contribuisce alla stabilità del genoma fungino.

In *C. albicans*, i livelli di acetilazione di H3K56 sono regolati da due enzimi con proprietà fungo-specifiche: l'acetiltransferasi Rtt109p e la deacetilasi istonica NAD⁺-dipendente (sirtuina) Hst3p, codificate, rispettivamente, dai geni *RTT109* e *HST3*. *HST3* è un gene essenziale in *C. albicans*. Essendo la delezione del gene *HST3* letale per il fungo e mostrando la sirtuina fungina una bassa percentuale di identità di sequenza con le sirtuine umane, Hst3p rappresenta un buon candidato come target terapeutico.

Scopo di questo studio è stato analizzare i *pathways* molecolari regolati dalla sirtuina Hst3p di *C. albicans*. Essendo una deacetilasi istonica, Hst3p regola l'espressione genica: inducendo condensazione cromatinica, inibisce l'attivazione trascrizionale. Di conseguenza, la delezione del

gene *HST3* o la repressione della proteina da esso codificata determinano una disregolazione dell'espressione genica, che culmina con la morte della cellula fungina. Sulla base di tali considerazioni, tale studio è stato incentrato sulla proteina fungina Hst3p, al fine di caratterizzarne il ruolo nella biologia e virulenza di *C. albicans* e di identificarne i bersagli molecolari, che potrebbero rappresentare nuovi targets per il trattamento delle infezioni fungine.

Il substrato di Hst3p è la Lisina 56 dell'istone H3. Per analizzare gli effetti dell'inibizione di Hst3p sul suo substrato, *C. albicans* è stata cresciuta in presenza di nicotinammide (NAM), quale inibitore aspecifico di sirtuine. Analisi di spettrometria di massa hanno consentito di determinare, per la prima volta, i livelli di acetilazione di H3K56 durante la crescita del fungo e la loro variazione in seguito al trattamento con NAM. L'aumento dei livelli di acetilazione di H3K56 durante la crescita di *C. albicans*, in seguito al trattamento con NAM, ha dimostrato l'effetto inibitorio della nicotinammide sull'attività della sirtuina Hst3p.

Il potenziale coinvolgimento della sirtuina Hst3p nella regolazione dello *switch* morfogenetico di *C. albicans* è stato esaminato conducendo un'analisi morfologica della transizione lievito-ifa in presenza di NAM, al fine di valutare il suo effetto sul processo di duplicazione cellulare e di germinazione. L'inibizione di Hst3p ha rallentato il tempo di duplicazione cellulare e ha indotto una forte alterazione della transizione lievito-ifa: il trattamento con NAM ha indotto una crescita filamentosa anomala, con formazione di ife *V-shaped*, in condizioni di crescita che favoriscono la forma lievito di *Candida*, mentre ha inibito la filamentazione in condizioni inducenti la germinazione fungina. Simili effetti sono stati riscontrati anche in ceppi di *C. albicans* resistenti agli azoli.

La formazione di ife *V-shaped*, in condizioni di crescita non inducenti la filamentazione, richiede una completa riorganizzazione strutturale della parete cellulare, risultato di una rilevante alterazione dell'espressione genica, indotta dal NAM. A tal proposito, conducendo esperimenti di RNA-Sequencing è stato analizzato l'intero profilo trascrizionale del ceppo SC5314 di *C. albicans*, per valutare se l'inibizione della sirtuina Hst3p potesse alterare il pattern di espressione dei geni coinvolti nello switch fenotipico di *Candida*. Geni coinvolti nel processo di adesione, nella crescita ifale, nella transizione *white-opaque* e nella resistenza ai farmaci sono risultati particolarmente disregolati in seguito al trattamento con NAM. Esperimenti futuri di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) consentiranno di verificare se l'espressione di tali geni è direttamente regolata dall'acetilazione di H3K56.

Per poter selezionare degli inibitori di Hst3p, da utilizzare come potenziali agenti antifungini, è stata espressa e purificata la sirtuina ricombinante Hst3p, sia nella sua forma intera che nella sua forma tronca. Le proteine ricombinanti, entrambe risultate complessate allo *chaperon* molecolare

batterico GroEL, non hanno mostrato alcuna attività enzimatica, a causa delle forti condizioni denaturanti adottate nel corso del processo di purificazione, necessarie per dissociare i complessi proteici formati. Per migliorare, dunque, il *folding* proteico nell'ospite batterico, la sirtuina fungina Hst3p è stata espressa e purificata da un sistema batterico over-esprimente numerosi *chaperons* molecolari. Verificata l'attività enzimatica della proteina ricombinante, verrà messo a punto un saggio enzimatico utile a selezionare delle *small molecules*, potenziali inibitori della sirtuina fungina Hst3p, che potranno essere utilizzati come agenti antifungini.