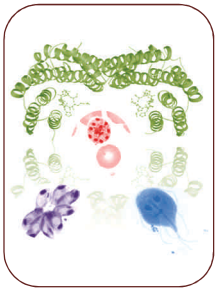
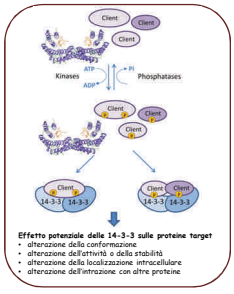
LE PROTEINE 14-3-3 NEI PROTOZOI PARASSITI: RUOLO FUNZIONALE NEI PROCESSI PATOGENETICI E TARGET MOLECOLARI PER LO SVILUPPO DI TERAPIE INNOVATIVE

Marco Lalle[1], Serena Camerini[2], Serena Cecchetti[2], Marialuisa Casella[2], Andrea Ilari[3], Maurizio Botta[4], Marta Ponzi[2], Furio Spano[1], Edoardo Pozio[1].

[1]Dipartimento Malattie Infettive e [2]Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità; [3]Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR, Roma; [4]Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Università di Siena, Siena. Contatto: dr. Marco Lalle,PhD, *marco.lalle@iss.it*

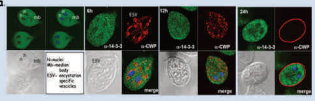


I protozoi parassiti hanno, a livello globale, un impatto rilevante per la salute umana causando gravi patologie, anche fatali, quali malaria, toxoplasmosi e giardiasi. La comprensione dei meccanismi patogenetici è fondamentale per identificare nuovi bersagli terapeutici, contrastare resistenze ed ampliare l'armamentario di farmaci disponibili.
Le 14-3-3 sono proteine dimeriche di 30 kDa, presenti in tutti gli eucarioti. Sono codificate da una famiglia multigenica, ma nei protozoi sono presenti in singolo o duplice copia. Sono in grado di formare dimeri assumendo una caratteristica struttura ad U. Sono in grado di legare agire da adattatori molecolari, legando un ampio ventaglio di proteine, generalmente contenenti fosfo-serine/treonine in sequenze aminoacidiche conservate. Le 14-3-3 sono in grado di regolare la funzione delle proteine bersaglio e sono quindi coinvolte in processi cellulari fondamentali (apoptosi, regolazione del ciclo cellulare, esocitosi, trasduzione del segnale).
Mediante spettrometria di massa, microscopia confocale, cristallografia, dinamica molecolare e l'uso di mutanti abbiamo identificato e caratterizzato sia modificazioni post-traduzionali uniche delle 14-3-3 sia il loro interattoma in *G. duodenalis*, *T. gondii* e *P. berghei*, il modello murino della malaria. Abbiamo dimostrato che alterando le modificazioni post-traduzionali si regola la capacità di legame delle 14-3-3 e che interazioni specifiche svolgono ruoli cruciali in diverse fasi del ciclo biologico di questi organismi.
La possibilità di modulare quindi l'interazione con le 14-3-3 potrebbe rivelarsi una strategia promettente per il trattamento di queste infezioni.

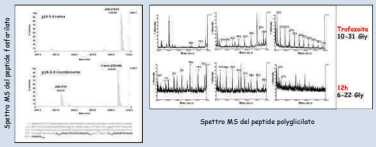


Giardia duodenalis

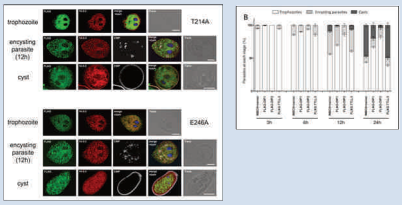
La 14-3-3 del *Giardia* mostra una localizzazione stadio specifica, ed è parzialmente ri-localizzata nel nucleo durante la fase di incistamento del parassita.



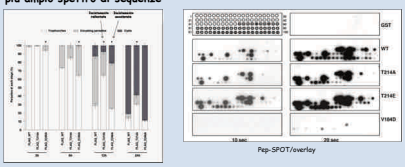
La 14-3-3 è costitutivamente fosforilata (Thr214) e poliglicilata al *C*-terminale in modo stadio specifico (Polimodificazione reversibile generata mediante legame covalente di sequenza di residui di glicina ad un residuo di acido glutammico di una proteina).

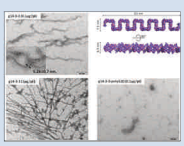


In assenza di poliglicilazione la 14-3-3 si localizza nel nucleo ma la sovraespressione delle deglicilasi riduce la formazione delle cisti

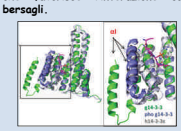


In assenza di fosforilazione della 14-3-3 il parassita ha ridotta capacità di formare cisti e il mutante che mima la fosforilazione interagisce con un più ampio spettro di sequenze

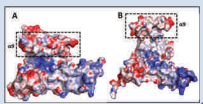




La dinamica molecolare suggerisce che la fosforilazione riduce la mobilità del *C*-terminale, promuove una transizione conformazionale che espone una superficie elettrostatica che favorisce l'interazione con i bersagli.

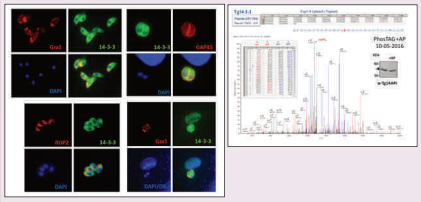


La struttura cristallografica mostra che in assenza di poliglicilazione la 14-3-3 forma filamenti mediante "domain swapping" del *C*-terminale.

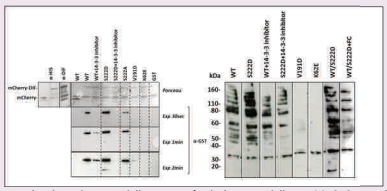


Toxoplasma gondii

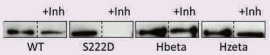
La 14-3-3 di Toxoplasma è espressa in tutti gli stadi del parassita ed è parzialmente fosforilata sulla Ser222



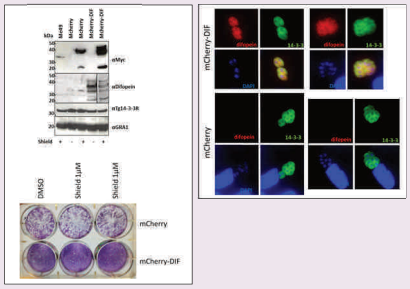
Il mutante fosfomimetico S222D interagisce in modo più "stabile" con proteine target rispetto al WT. Il mutante S222D è più sensibile ed una molecola che inibisce la capacità di legame delle 14-3-3



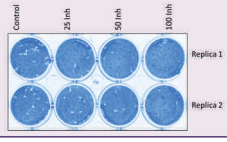
La molecola inibitrice della capacità di legame della Tg14-3-3 non ha effetto sulle 14-3-3 umane



L'espressione inducibile di un peptide (difopeina) che lega in vivo la Tg14-3-3 induce difetti nel ciclo litico del parassita e induce delocalizzazione intracellulare della Tg14-3-3

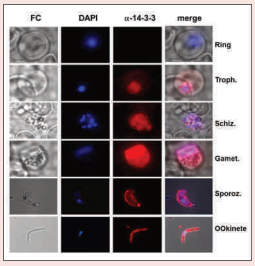


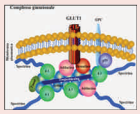
Il trattamento con la molecola inibitrice della capacità di legame della Tg14-3-3 induce difetti nel ciclo litico del parassita



Plasmodium berghei

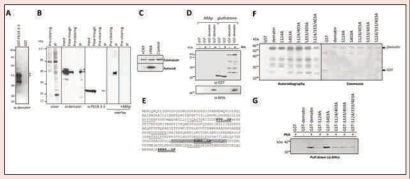
La 14-3-3 del Plasmodio è espressa in tutti gli stadi del parassita ed interagisce con numerose proteine, comprese la dematina dell'eritrocita



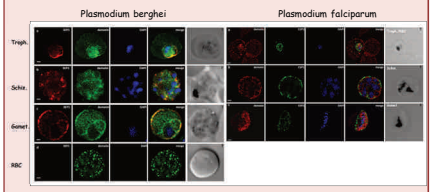


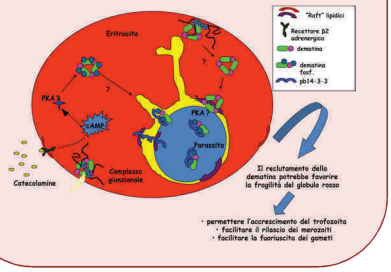
La dematina è parte del complesso che unisce il citoscheletro e la membrana plasmatica. Contribuisce alla stabilità strutturale della membrana eritrocitaria. Interagisce con l'actina e la β-spectrina Lega e favorisce la formazione delle fibre di actina. Delezioni della dematina causano eritrociti osmoticamente fragili.

La dematina dell'eritrocita interagisce con la 14-3-3 di Plasmodio in modo diretto e l'interazione è mediata dalla fosforilazione della Ser124 e Ser333 della dematina da parte della PKA



In eritrociti infettati con *Plasmodio*, la dematina si ri-localizza progressivamente dalla membrana del RBC al parassita





University of Rome "Sapienza"
Department of Biochemical Sciences
Annarita Fiorillo (Crystallography)
Department of Physics
Allegra Via (Molecular Dynamics)
Daniele di Marino (Molecular Dynamics)
Ahmed Sayadi (Biocomputing)

University of Siena, Siena, Italy
Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy
Ylenia Cau (Molecular Dynamics)
Mattia Mori (Molecular Dynamics)

Istituto Superiore di Sanità
Tommasino Pace
Chiara Currà
Leonardo Picci
Federica Fratini
Luca Fantozzi
Simona Cherchi
Lucia Bertuccini
Marco Crescenzi
Carlo Bavassano
Claudia Blasetti Fantauzzi
Fabio Ciccarone
Gabriele Paris Bossi

University of Rome "Tor Vergata"
Gianni Cesareni
Simona Panni (Pep-Spot)

Charite-UniversityBerlin, Germany
Prisca Boisguerin (Pep-Spot)