



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Biologia Molecolare e Applicata

**Identificazione dei geni coinvolti nella
produzione di indoli da parte di *Malassezia furfur***

**Identification of the genes involved in indoles
production by *Malassezia furfur***

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Erica Patriarca

Relatore

Chiar.ma Prof. Anna La Teana

Correlatore:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Ianiri

Sessione Luglio 2024

Anno Accademico 2023-2024

1. MALASSEZIA: STATO DELL'ARTE

1.1 Patologie associate	1
1.2 Tassonomia.....	3
1.3 Ecologia	3

2. CARATTERISTICHE DEL LIEVITO

2.1 Morfologia.....	5
2.2 Condizioni di crescita.....	8
2.3 Genomica e metabolismo.....	9

3. IDENTIFICAZIONE

3.1 Test fenotipici.....	15
3.2 Tecniche molecolari.....	17
3.3 Trasformazione	21
3.3.1 Meccanismo di attacco di <i>A. tumefaciens</i>	23
3.3.2 <i>A. tumefaciens</i> per il gene editing.....	26

4. L'INTERAZIONE CON GLI UOMINI

5. FATTORI DI VIRULENZA

5.1 Fosfolipasi.....	31
5.2 Melanina.....	32
5.3 Indoli	33

6. PIGMENTAZIONE

7. SCOPO DELLA TESI

8. MATERIALI E METODI

8.1 Substrati.....	38
8.2 Microrganismi.....	39
8.3 Analisi della pigmentazione nel wild type.....	40
8.4 Trasformazione mediata da <i>A. tumefaciens</i>	42

8.4.1	Mutagenesi inserzionale	
8.4.2	Mutagenesi target	
8.4.3	Trasformazione	
8.5	Sviluppo di uno screening per isolare mutanti in grado di non produrre pigmenti.....	45
8.6	Isolamento dei mutanti 2B4 e 1G1.....	46
8.7	Analisi fenotipica <i>sul1</i>	47
8.8	Analisi fenotipica <i>cpa1</i>	49
9.	RISULTATI	
9.1	Pigmentazione di <i>M. furfur</i> in vari terreni.....	50
9.2	Trasformazione AMT.....	57
9.3	Screening dei fenotipi	57
9.4	Isolamento dei mutanti inserzionali 1G1 e 2B4.....	58
9.5	Conferma della mutazione in <i>Sul1</i>	60
9.6	Analisi fenotipica dei mutanti per <i>SUL1</i>	61
9.7	Analisi fenotipica dei mutanti per <i>CPA1</i>	65
10.	DISCUSSIONE.....	70

Capitolo primo

STATO DELL'ARTE

Malassezia spp. è un genere di funghi della famiglia Malasseziaceae, ordine Malassezales, recentemente distinti nella classe Malasseziomyceti (Guangxi Wu et al., 2015). Sono riconosciuti nella divisione degli Ustilaginomycota, Basidiomyceti. Essi sono normali componenti del microbiota della pelle di esseri umani ed animali a sangue caldo, generalmente riconosciuti come commensali ma occasionalmente patogeni. Delle venti specie descritte fino ad ora, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. furfur* sono quelle maggiormente presenti sulla pelle degli uomini, mentre *M. pachydermatis* è la più abbondante nel microbiota dei cani (Fiorella Ruchti, 2024).

1.1 Patologie associate

Malassezia è associato a patologie quali dermatite atopica, eczema, Tinea versicolor, dermatite seborreica, follicolite e forfora; tuttavia, fattori ambientali, endogeni ed esogeni potrebbero concorrere. Statisticamente, infatti, la connessione presente tra *Malassezia* e le eziologie citate sono forti, ma variano al variare di fattori altri come igiene, sistema immunitario, stress, secchezza della pelle, calore, sudore ed esposizione solare (Kim, 2001; Meray, 2018). Inoltre, in soggetti sottoposti all'uso di cateteri il cui sistema

immunitario risulta compromesso, le specie di questo genere potrebbero altresì portare a patologie sistemiche (Gaitanis GMagiatis P, 2012).

Ciononostante, *Malassezia* è stato riportato anche come microrganismo mutualista. Nel mutualismo, sia il microrganismo che l'ospite beneficiano dei vantaggi. Chiaramente, l'habitat dell'epidermide è perfetto per *Malassezia* in quanto fornisce una serie di composti lipidici di cui esso si nutre. Al contrario, l'ospite può beneficiare della sua presenza poiché esso protegge l'epidermide, ne metabolizza il sebo rilasciando degli acidi grassi a catena corta dalle proprietà antibatteriche e ne esterifica quelli a media catena conferendo proprietà antimicotiche (Giuseppe Ianiri et al., 2022).

Un esempio di mutualismo è stato osservato con *M. globosa*: è stato visto che in vitro, questa specie è in grado di idrolizzare il biofilm di *S. aureus* (potenziale patogeno, riscontrato anche in caso di dermatite atopica) tramite l'azione della sua aspartil proteasi 1 sulla proteina A. E ancora, ulteriori studi hanno mostrato come la presenza di un microbioma epidermico sano dominato da *Malassezia* risponda prontamente per contrastare una possibile prevalenza di *C. auris*, microrganismo emergente noto in ambito nosocomiale per le infezioni sistemiche che causa (Giuseppe Ianiri et al., 2022).

1.2 Tassonomia

Tassonomicamente, il genere *Malassezia* comprende venti specie divise in quattro gruppi filogenetici, identificati tramite long reads e short reads sequencing ad alta accuratezza (fig. 1). Nel primo gruppo (clade A) si trovano le specie usate come modello poiché più semplici da crescere in coltura e più spesso riscontrabili in infezioni di origine non solo nosocomiale, quali *M. obtusa*, *M. furfur*, *M. brasiliensis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. psitacci*. Nel secondo gruppo (clade B) sono presenti *M. pachydermatis* (clade B3), *M. dermatitis*, *M. equina*, *M. sympodialis*, *M. caprae*, *M. nana* (clade B2); *M. globosa*, *M. restricta*, *M. arunalokei* (clade B1). Il terzo gruppo (clade C)

include *M. cuniculi*, *M. slooffiae* ed il quarto gruppo (clade D) vede una specie di recente identificazione (Marco A. Coelho, 2023).

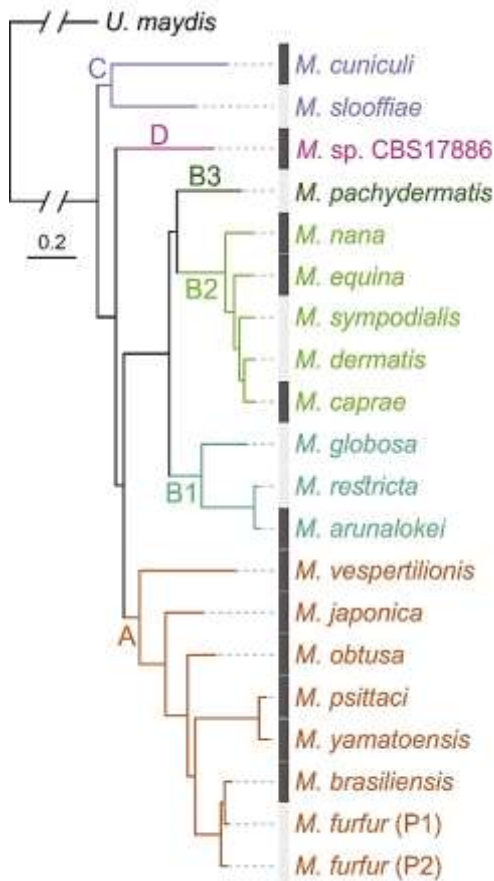


Figura n. 1: l'albero riportato è diviso in cladi A, B1, B2, B3, C e D, nelle quali vengono raggruppate le diverse specie di *Malassezia*.

1.3 Ecologia

Sebbene l'ecologia del genere non sia ancora del tutto chiara, è nota la presenza in habitat marino o in fonti da esso derivanti, di specie dal genoma estremamente affine a quelle del genere *Malassezia*, che potrebbe suggerire una recente divergenza evoluzionistica (Zheng Gao, 2008; Amend, 2014).

Tuttavia, il suo ruolo principale rimane quello di maggior componente (50-80%) del microbiota della pelle dell'uomo, come dimostrano tramite test coltura-dipendente e coltura-indipendente basati su Internal Transcribed Spacer (ITS) (Bart Theelen, 2018). La natura lipide-dipendente di *Malassezia* e l'adattamento alla pelle come habitat, probabilmente da fonti vegetali, è un quesito ancora aperto (Gao et al., 2021). In ogni caso, come suggerito, la presenza sulla pelle è strettamente legata alle caratteristiche del microrganismo (lipofilia) e alle sue richieste metaboliche; a supporto di ciò, si riscontra usualmente una maggiore concentrazione del microrganismo in alcune zone, dalla tipica composizione maggiormente ricca in lipidi rispetto ad altre, quali schiena, braccia, inguine, cute, alcune zone del viso (Keisha Findley, 2013; Bart Theelen, 2018); tuttavia, anche all'interno dello stesso genere sono evidenti differenze tra le varie specie in quanto a preferenze nutrizionali, di cui principalmente fonti lipidiche (Guangxi Wu, 2015). Un riscontro si ha avuto anche da analisi del microbiota intestinale, nel quale è stato ritrovato il fungo *Malassezia* (il microbiota intestinale è normalmente popolato anche da numerosi funghi che concorrono all'omeostasi), talvolta associato all'insorgenza di malattie come il morbo di Crohn o correlato ad oncogenesi (R. Gao, 2017; Jose J. Limon, 2019; Berk Aykut, 2019; Richard, 2020).

Capitolo secondo

CARATTERISTICHE DEL LIEVITO

2.1 *Morfologia*

Nel caso dei funghi e, nello specifico, di *Malassezia*, si può riscontrare la presenza di una parete cellulare, necessaria al mantenimento della pressione osmotica, alla protezione da stress ambientali e all'adesione alle cellule ospiti; ne deriva che la sua stabilità ed integrità sono fondamentali per la vitalità della cellula. La sua peculiare composizione risulta, in linea con molteplici studi, leggermente diversa tra una specie e l'altra, sebbene in genere si osservi una parete sottile e multilamellare, con presenza di creste elicoidali e invaginazioni della membrana plasmatica, costituita per il 70% di zuccheri, circa il 10% di proteine e il 15-20% di lipidi (Thomas Stalhberger, 2014; Celis AM, 2017). La caratteristica più importante della parete dei funghi, infatti, è il *cross-linking* tra polisaccaridi ad alto peso molecolare, necessari al riconoscimento dei recettori dell'ospite, all'adesione e ad evitare la fagocitosi, modulando la risposta infiammatoria dell'ospite. Più nel dettaglio, è stato visto che le specie del genere *Malassezia* sono in grado di sintetizzare chitina/chitosano, β -(1,3)- glucani and β -(1,6)- glucani, galattofurani e mannani (Michael D. Kruppa, 2009; Nobuyuki Shibata, 2009). Una

peculiarità del genere risulta, peraltro, la presenza di un'ulteriore “capsula” lipidica che contorna la parete, la quale sembra essere coinvolta nei meccanismi di patogenicità come citochine pro-infiammatorie e antinfiammatorie (Celis AM, 2017). La membrana cellulare, invece, vede generalmente la presenza di mannani, glucani, proteine, talvolta steroli e chitina a formare una rete selettiva che separi l'ambiente esterno da quello interno.

In questo genere, non è stata riportata riproduzione sessuale: generalmente si manifesta, infatti, una riproduzione asessuata con rilascio dei blastoconidi tramite gemmazione monopolare o simpodiale, sebbene siano presenti i geni mating-type in configurazione pseudobipolare su un unico cromosoma in *M. furfur* (Nobre et al., 2001; Marco A. Coelho, 2023).

In liquido, *Malassezia* cresce in maniera notevole, tanto da essere visibile macroscopicamente spesso come un *ring* al livello massimo che raggiunge il terreno in beuta, se posta in agitazione, o anche con dei grumi sul fondo. In liquido è più facilmente apprezzabile la tipica pigmentazione, successivamente esplicita.

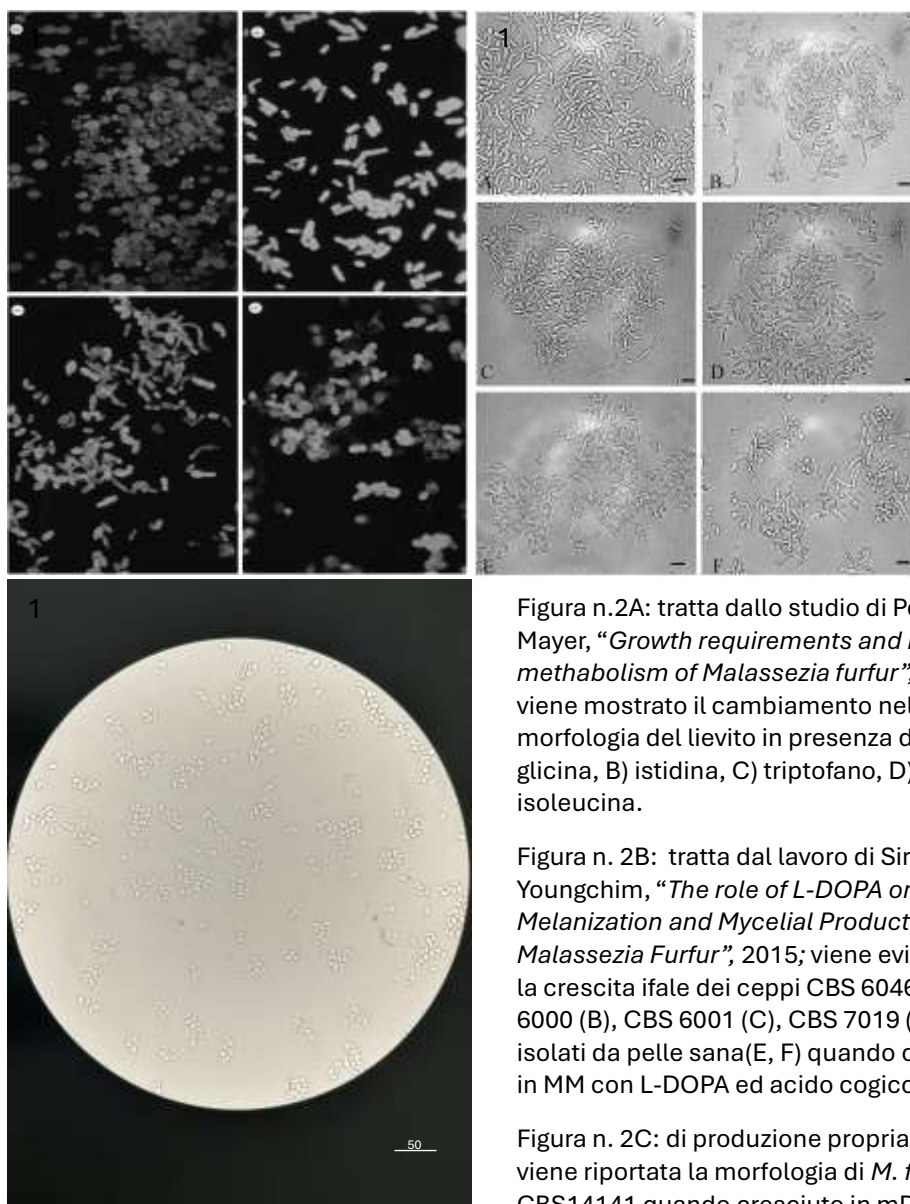


Figura n.2A: tratta dallo studio di Peter Mayer, “*Growth requirements and nitrogen metabolism of Malassezia furfur*”, 1998; viene mostrato il cambiamento nella morfologia del lievito in presenza di A) glicina, B) istidina, C) triptofano, D) isoleucina.

Figura n. 2B: tratta dal lavoro di Sirida Youngchim, “*The role of L-DOPA on Melanization and Mycelial Production in Malassezia Furfur*”, 2015; viene evidenziata la crescita ifale dei ceppi CBS 6046 (A), CBS 6000 (B), CBS 6001 (C), CBS 7019 (D) e due isolati da pelle sana(E, F) quando cresciuti in MM con L-DOPA ed acido cogico.

Figura n. 2C: di produzione propria, in cui viene riportata la morfologia di *M. furfur* CBS14141 quando cresciuto in mDixon.

La morfologia di *Malassezia* vede delle cellule che possono variare in dimensione (da 1.5 a 10 μm) e in forma a seconda della specie e delle condizioni in cui sono poste, spaziando da cellule globose, a ellissoidali o cilindriche, oppure più allungate (Peter Mayer, 1998; Celis AM, 2017), ma anche in forma ifale, più ricorrente in patogenesi (Sirida Youngchim, 2013).

2.2 Condizioni di crescita

Data la sua preponderante presenza sulla pelle, in condizioni di aerobiosi *Malassezia* richiede una temperatura di crescita compresa nel range di circa 30-37°C, variabile a seconda della specie che si sta utilizzando. Non necessita di particolari arricchimenti culturali, se non di un complemento lipidico poiché questo genere ha perso la capacità di sintetizzare acidi grassi *de novo* (*in vivo*, infatti, non sorgono problemi dal momento che le ghiandole sebacee approvvigionano il sebo necessario al microrganismo, il quale è dotato di numerosi enzimi quali lipasi e fosfolipasi per il suo utilizzo) (Guangxi Wu, 2015). Pertanto, per la crescita *in vitro* si usa il terreno mDixon agar la cui composizione vede la presenza di malt extract, peptone, ox-bile, Tween 60, glicerolo e agar; una versione modificata talvolta in auge, comprende l'acido oleico come supplemento lipidico per il fungo (Hao Li). Tuttavia, fa eccezione *Malassezia pachydermatis*, unica specie di questo genere generalmente in grado di crescere in terreno Sabouraud Dextrose Agar (SDA, formato da destrosio e peptone principalmente) senza supplementi lipidici (Laura Puig, 2017). Altri terreni utilizzati per la crescita di *Malassezia*, risultano essere il Leeming-Notman agar medium (peptone, glucosio, estratto di lievito, bile, glicerolo, glicerolo monostearato, Tween 60, latte e agar) e

CHROMagar *Candida* modificato (peptone, mix chromogen, cloramfenicolo, ox-bile, glicerolo monostearato e Tween 60 o 40).

Il Tween risulta essere sempre presente, ma la preferenza e la tolleranza ad esso e alle diverse concentrazioni varia all'interno del genere, come riportato successivamente.

Le colonie sono circolari, con bordo liscio, cremose ma non mucose, dalla superficie liscia, non traslucida e leggermente convessa. In particolare, le colonie di *M. furfur*, la quale sarà oggetto del lavoro di tesi, su Dixon media appaiono di colore rosa pallido-biancastre.

2.3 Genomica e metabolismo

Le caratteristiche come la produzione di auxine fanno pensare che esso sia stato originariamente appartenente ad habitat diversi come piante e terreno (o ambiente marino, come riportano le indagini microbiologiche sopracitate) e che si sia adattato successivamente alla pelle di animali a sangue caldo come conseguenza della perdita delle acido-grasso sintasi, Δ^9 -desaturasi e $\Delta^{2,3}$ -enoyl-CoA isomerasi, caratteristica che rende *Malassezia* (talvolta, con eccezione di *M. pachydermatis*) lipidi-dipendente. È noto, grazie alla genomica comparativa, infatti, che questo genere ha subito un turnover molto

importante, il quale ha visto la perdita di circa 800 geni (Giuseppe Ianiri J. H., 2020).

Per ciò che concerne la preferenza verso le fonti lipidiche, la presenza di talune classi di lipidi rispetto ad altre e il pattern enzimatico dal lievito usato sembra non essere correlata alla disposizione filogenetica generalmente accettata, quanto più, probabilmente, alla patogenicità delle specie; tuttavia, si riserva la necessità di susseguenti indagini (Guangxi Wu, 2015; Adriana Marcela Celis Ramírez, 2020).

I lipidi sovente emersi da analisi metabolomiche risultano spaziare tra triacilgliceroli TAG, colesterolo, digliceridi DG, acidi grassi FAs compresi tra 11 e 28C, fosfatidilcolina PC, diacilgliceriltrimetilomoserina DGTS, esteri degli acidi grassi idrossilati FAHFA, fosfatidiletanolamina PE, colesterilestere

CE, ceramide e sfingomieline SM, ma anche acido docosaesanoico DHA e acido arachidonico (Adriana Marcela Celis Ramírez, 2020).

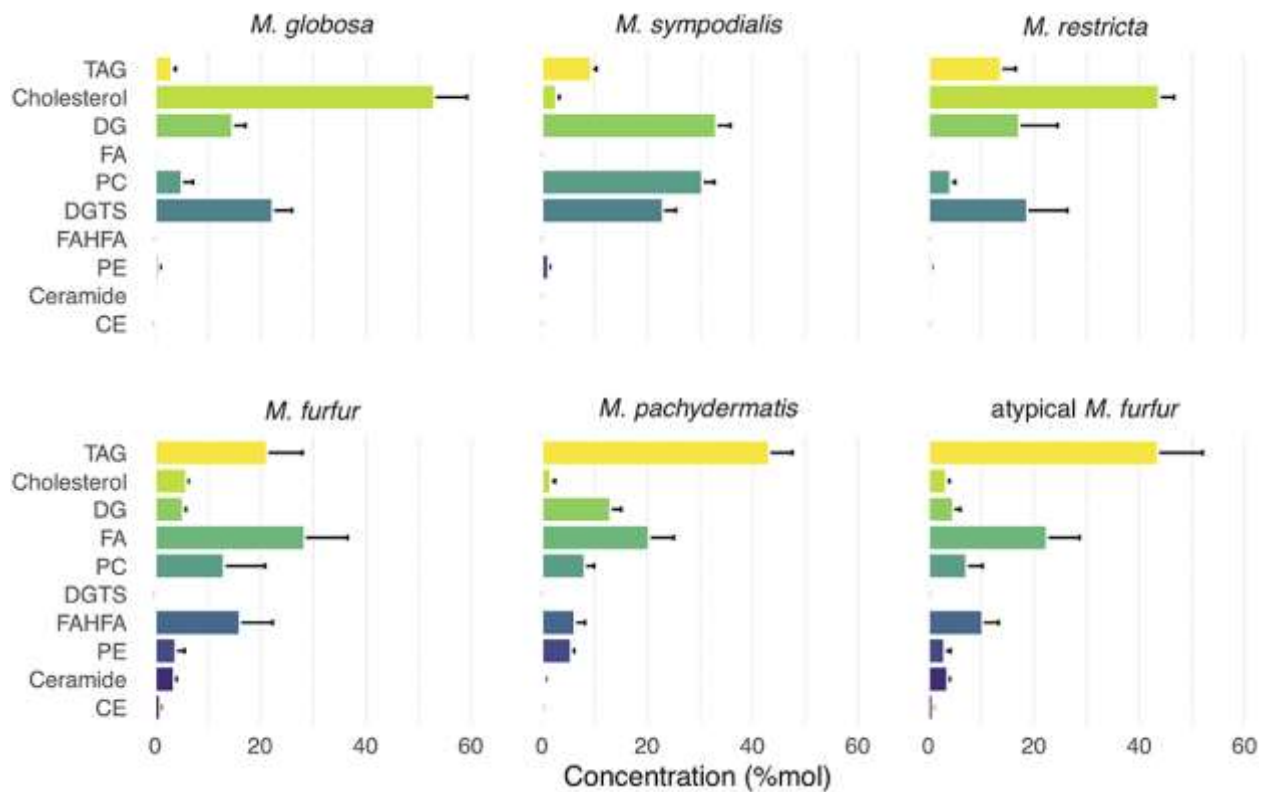


Figura n.3: A. M. C. Ramirez, A. Amézquita, J. E. C. C. Jaramillo *et al.*, “Analysis of *Malassezia* Lipidome Disclosed Differences Among the Species and Reveals Presence of Unusual Yeast Lipids”, 2020. La figura mostra la concentrazione dei prevalenti lipidi relativa alle diverse specie. La concentrazione di ogni lipide è espressa relativamente al totale dei lipidi presenti. Le barre rappresentano una media, le linee la deviazione standard (SD). TAG: triacilgliceridi; DG: digliceridi; FA: acidi grassi; PC: fosfatidilcolina; DGTS, diacilgliceriltrimetilomoserina; FAHFA: acidi grassi idrossilati; PE:

In particolar modo, in *M. furfur* sono state evidenziate differenze metaboliche rispetto alle altre specie del genere: nell’ambito di Analisi di Distribuzione del Flusso (FBA, consistente in un approccio matematico per analizzare il flusso dei metaboliti attraverso un network, da Jeffrey D Orth, 2010) il suo metabolismo ha mostrato alti flussi nelle reazioni relative alla degradazione e

all'allungamento degli acidi grassi, che hanno comportato la conversione dell'idrossialcal-CoA in trans-2-enoil-CoA, e anche in reazioni di degradazione degli amminoacidi valina, leucina ed isoleucina e nel metabolismo di purine e pirimidine. Complessivamente, il metabolismo di *M. furfur* secondo modelli di predizione sembra essere decisamente versatile rispetto ad altre specie, e volto in primis all'uso di amminoacidi, seguito da carboidrati, cofattori e vitamine, lipidi (nel quale, al primo posto si trova la degradazione lipidica, seguita dal metabolismo dei glicerofosfolipidi, elongazione degli acidi grassi e biosintesi degli steroidi). In più specie (*M. furfur* compresa) è stata riscontrata la capacità di ricavare acidi grassi insaturi, come acido oleico, da fonti di lipidi saturi conferendo il vantaggio di adattabilità lì dove le fonti di acidi grassi insaturi scarseggiano (Sergio Triana, 2017).

Inoltre, nel genoma appare importante la presenza di geni codificanti altre idrolasi e, soprattutto, esterasi e peptidasi (lipasi, fosfolipasi, aspartil proteasi e sfingomielinasi) che ottimizzano l'utilizzo delle fonti azotate e lipidiche. In particolar modo, la capacità di crescere anche solo in presenza di Tween e in assenza di altri fonti lipidiche, evidenzia la spiccata capacità di scomporre i lipidi per nutrirsi; nel caso del Tween, si ipotizza la rottura della coda di acidi grassi dello stesso detergente non ionico (Guangxi Wu, 2015).

Anche alcuni geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati sembrano essere mancanti, come la glicosil idrolasi, e i geni codificanti gli enzimi coinvolti nell'RNA interference (iRNA) pathway; in particolare, quest'ultima caratteristica è associata alla presenza di micovirus, ovvero virus che infettano i funghi in maniera a/sintomatica con conseguenze positive e/o negative sull'ospite. Essi sono in grado di influenzare fortemente l'espressione dei funghi, ed il loro pathway dell'iRNA vede la produzione e l'uso di alcune proteine come *Dicer* e *AGO* molto simili a quelle dell'ospite. È stata proposta l'ipotesi per cui gli stessi micovirus hanno evoluto sistemi per silenziare il meccanismo di regolazione iRNA dei miceti (Shelly Applen Clancey, Fiorella Ruchti, 2020).

Dallo studio citato di Wu e colleghi è emersa, inoltre, la presenza di 13 domini funzionali della famiglia PFam *Malassezia*-specifici dalla funzione principalmente sconosciuta, assente negli altri Basidiomiceti (connotazione che potrebbe far pensare ad un trasferimento orizzontale HTG) e la perdita, rispetto agli antenati più vicini, di geni dalle varie funzioni (regolatori di trascrizione, enzimi).

Successivamente, anche altri domini sono stati associati ad eventi di trasferimento orizzontale (HTGs): Un caso evidente in *Malassezia* è quello della favoemoglobina, enzima che dona al microrganismo resistenza allo

stress nitrosativo ed è coinvolto nella degradazione dell'ossido nitrico (NO), il cui gene codificante è stato trasferito da batteri parte del microbiota dei mammiferi, a *Malassezia*, tramite molteplici eventi di HTGs. Altri eventi sono riportati in letteratura per la catalasi e l'ossidoriduttasi (Giuseppe Ianiri, 2020).

Capitolo terzo

IDENTIFICAZIONE

3.1 Test fenotipici

Per l'identificazione fenotipica si può usufruire, a seguito di osservazione delle colonie in piastra, di alcuni test. Il più comune è basato sul Tween, un detergente non ionico, costituito principalmente da polisorbato; esso è un emulsionante e, pertanto, serve a diminuire la tensione superficiale all'interfaccia tra microrganismo e terreno di coltura per facilitare la penetrazione dei nutrienti nella cellula e, dunque, favorire la crescita. Esso si trova in diverse concentrazioni: 20, 40, 60, 80 e viene spesso utilizzato non solo per permettere la crescita, ma anche per test di diffusione al fine della caratterizzazione fenotipica di *Malassezia*: si riscontra che *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. yamatoensis*, *M. equina*, *M. dermatis* e *M. pachydermatis* siano in grado di utilizzare e crescere bene con l'uso di Tween a qualsiasi concentrazione; al contrario, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. cuniculi* non crescono in presenza di Tween, sia esso a qualsiasi concentrazione; i rimanenti, *M. sympodialis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. caprae* hanno preferenze per Tween a concentrazione minore o maggiore (Claudia Cafarchia, 2011; Celis AM, 2017).

Questo può essere affiancato da altri test come quello della catalasi, dell'ureasi, della β -glucosidasi e la crescita con Cremophor[®] EL, un prodotto a base di olio di ricino.

Per ciò che concerne il test della catalasi, tutte le specie di *Malassezia* risultano possedere questo enzima ad eccezione di *M. restricta* e *M. dermatis*; un risultato simile si ha con test dell'attività della β -glucosidasi (che idrolizza i residui di β -D-glucosio e galattosidi dei polisaccaridi generandone il rilascio), per la quale risultano negative anche *M. globosa*, *M. sloofiae*, *M. yamatoensis*, *M. equina*. Tuttavia, è bene precisare che questi risultati potrebbero variare anche intraspecie.

Invece, la crescita in olio di ricino sembra essere una caratteristica distintiva di *M. pachydermatis* e *M. furfur*, anche se quest'ultima non riesce a crescere sempre bene come la prima in tale condizione (Claudia Cafarchia, 2011).

Inoltre, è interessante osservare l'azione antifungina di diversi oli essenziali rispetto ad alcune specie di *Malassezia* piuttosto che altre. A tal proposito, in letteratura sono presenti degli studi che riportano attività antifungina degli oli essenziali a partire da una MIC pari a 30 $\mu\text{g/ml}$; i più efficaci sembrano essere l'olio essenziale di cannella, basilico e malaleuca soprattutto nei confronti di *M. furfur* (Khosravi, Shokri, & Fahimirad, 2015; Rosa, Cristiana, Gabriella, & Rita, 2020).

3.2 Tecniche molecolari

Successivamente ad una prima identificazione fenotipica, per avere la certezza del genere e della specie, ed individuare il ceppo, è necessario utilizzare gli strumenti che la biologia molecolare fornisce; risulta quindi fondamentale avere conoscenza del genoma e della sua organizzazione.

Il genoma delle specie del genere *Malassezia* è compreso tra i 7 Mb ed i 9 Mb; una piccola variabilità potrebbe essere data dalle tecniche di sequenziamento utilizzate. Tuttavia, è noto che la dimensione del genoma è diversa tra le varie specie (Giuseppe Ianiri, 2022).

Wu *et al.* hanno evidenziato come alcuni ceppi della specie *M. furfur* abbiano un genoma di dimensioni doppie rispetto alle altre specie, che potrebbe suggerire un evento di duplicazione dell'intero genoma (Guangxi Wu, 2015) oppure diploidia (*Malassezia* è generalmente aploide) (Bart Theelen V. M., 2022). È bene specificare che nel genere *Malassezia* il numero di cromosomi è variabile tra sei e nove, particolarità dovuta ad una riduzione del numero di cromosomi originariamente identificato in nove: si dimostra, infatti, come il cariotipo abbia subito un'evoluzione che ha coinvolto una probabile rottura cromosomica con conseguente perdita del centromero (es. *M. sympodialis* e simili) ed una inattivazione centromerica seguita da cambiamenti nel DNA e

fusione cromosomica es. *M. furfur* e correlate) (Sundar Ram Sankaranarayanan, 2020).

I metodi che la biologia molecolare offre per l'identificazione microbica e per lo studio di ecosistemi sono vari. Una prima distinzione può essere fatta tra le tecniche coltura-dipendente, che sfruttano il passaggio in terreni di coltura per isolare e selezionare le specie desiderate presenti nel campione, e le tecniche coltura-indipendente, le quali permettono di conoscere tutte le specie presenti in una matrice in precisi momenti e condizioni. Inoltre, si possono distinguere tecniche che non sfruttano la Polymerase Chain Reaction (PCR) piuttosto che *PCR-based*. In generale, le regioni del genoma alle quali vengono applicate le tecniche molecolari, sono i geni del complesso per l'RNA ribosomiale quali *small subunit* (SSU), *Internal Transcriber Spacer* (ITS 1 e 2), il gene 5.8S, la subunità ribosomiale maggiore (LSU 28S), le *Intergenic Spacer* (IGS), i geni 5S e 18 S, a cui possono essere affiancati anche il gene *chs2* ed il motivo dimerizzante *D-domains*, poiché permettono una differenziazione specie-specifica e ceppo-specifica.



Figura n.4: T. Sugita, M. Kodama, M. Saito *et al*, “Sequence Diversity of the Intergenic Spacer Region of the rRNA Gene of *Malassezia globosa* Colonizing the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Healthy Individuals”, 2003. Essa riporta una rappresentazione schematica del gene per rRNA del ceppo CBS7966 di *M. globosa*.

I fingerprinting methods sono metodi che offrono un profilo (un’ “impronta digitale”, appunto), del genoma; sono generalmente rapide poiché non necessitano di informazioni precise riguardanti il genoma o porzioni di esso.

Un esempio potrebbe essere la RAPD-PCR, che viene performata usando dei primers random; il risultato viene analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio, sul quale sarà visibile un profilo tipico della specie, da paragonare ad un controllo positivo. Talvolta potrebbe essere usato per identificare l’agente eziologico di uno *skin disorder* o per effettuare indagini su più campioni di popolazione ed il loro microbiota; tuttavia, la sua riproducibilità non è molto alta, data la natura dei primers (Rinaldo F. Gandra, 2006; George Gaitanis, 2009).

Una ulteriore tecnica potrebbe essere la Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP), con lo scopo di differenziare i varianti in ambito di microbiologia clinica, sebbene non sia molto veloce poiché necessita di digestione e ligazione degli adattatori; nel caso riportato da Gupta e colleghi,

la tecnica, applicata al DNA ribosomiale della LUT e alle ITS precedentemente amplificati tramite PCR, ha permesso di differenziare otto specie da oltre cento campioni di origine diversa e di portare in evidenza anche diversi sottotipi riscontrati (Gupta AK Boekhout T, 2004).

Ancora, la PCR- based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), le tecniche da essa derivate (terminal restriction fragment length polymorphism tRFP, PCR-single strand conformation polymorphism SSCP) e le elettroforesi in ambiente denaturante come la Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) o Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), permettono di apprezzare la presenza di polimorfismi e le differenze cariotipiche, nonostante richiedano tempo ed una buona quantità di cellule, ragioni per cui oggi sono meno utilizzate (George Gaitanis I. D., 2009; Claudia Cafarchia, 2011; Aristeia Velegeaki, 2015).

Attualmente, è prediletto il sequenziamento di seconda e terza generazione: con il loro avvento, infatti, i metodi coltura-indipendente hanno subito un incremento di utilizzo data la rapidità ed il basso costo con il quale si può ottenere la sequenza dell'intero genoma oppure di una parte di esso. Nel primo caso, si ha un Whole Genome Sequencing (WGS) sequenziamento "Shotgun", cosiddetto poiché il genoma viene attaccato da enzimi di restrizione (o altro) che lo frammentano casualmente per poi sequenziare i

frammenti per riassemblarli successivamente sulla base dei dati ricavati con l'aiuto di software. I vantaggi sono rappresentati dalla possibilità di analizzare anche specie sconosciute, non essendo necessari primers o adattatori sequenza-specifici, e un ridotto bias da amplificazione: essendo presenti molti frammenti, quanto più essi sono lunghi, allora più sarà facile per il sistema sovrapporli e allocarli nella struttura del genoma. Al contrario, nel caso in cui si amplifica solamente una porzione di genoma, vengono prodotti una serie di ampliconi dalla lunghezza limitata, che possono portare con sé errori da amplificazione tramite PCR e, chiaramente, l'esclusione di specie sconosciute dal momento che i primers sono progettati in maniera più o meno specifica. D'altro canto, specificità, sensibilità, riproducibilità e basso costo sono caratteristiche centrali di questa alternativa, che potrebbe altresì essere applicata a più porzioni di genoma risultando in una un Multilocus Sequence Typing (MLTS), spesso usata su geni housekeeping. Tutto ciò ha contribuito notevolmente ad ampliare le conoscenze sul metabolismo e l'ecologia di questo fungo.

3.3 Trasformazione

Un valido strumento della biologia molecolare per lo studio genetico microbico è rappresentato, senza dubbio, dalla trasformazione, attraverso la quale del DNA esogeno può essere introdotto nelle cellule con lo scopo di

studiare la funzione dei geni oppure produrre organismi geneticamente modificati. Per la trasformazione nei funghi sono spesso utilizzati Litio Acetato (LiAc) e polietilenglicole (PEG), metodo molto usato per *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida albicans*, oppure elettroporazione sia di cellule intatte che, preferibilmente, di protoplasti, dato lo spessore notevole della parete di *Malassezia*; questa tecnica è molto usata con i funghi filamentosi e con i batteri, vista la sua rapidità ed intuitività, ma non con mutagenesi inserzionale visti i numerosi meccanismi di DNA repair che le cellule possono sfruttare, vanificando lo sforzo. E ancora, la tecnica biolistica, per cui il DNA esogeno viene letteralmente sparato all'interno delle cellule; questo richiede degli strumenti costosi ed è spesso usato con *Cryptococcus*, mentre non ha dato grandi risultati con *Malassezia*.

Tuttavia, la tecnica mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens mediated transformation AMT*) si è dimostrata la migliore nella trasformazione di *Malassezia* in quanto ad efficacia e sostenibilità economica. L'unico svantaggio potrebbe essere una minore rapidità nell'ottenimento dei mutanti e la necessità di adattare questa tecnica a seconda dell'organismo a cui la si applica; al contempo, però, bisogna considerare la possibilità di utilizzo di AMT sia per mutagenesi target che inserzionale (Giuseppe Ianiri A. F., 2016).

In questo lavoro, la tecnica citata verrà usata per produrre dei mutanti inserzionali al fine di indagare il ruolo dei geni coinvolti nella pigmentazione.

3.3.1 Il meccanismo di attacco di *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens è un batterio del suolo filogeneticamente appartenente alla famiglia Rhizobiaceae che, solitamente, infetta le piante dicotiledoni quando queste sono ferite promuovendo la proliferazione cellulare spropositata e, dunque, il tumore (galla) del colletto. Esso aderisce alle proteine della superficie della cellula vegetale da attaccare con meccanismi non del tutto noti ancora.

La virulenza è associata alla presenza del plasmide Tumor inducing (Ti), che varia dai 200 agli 800 kbp a seconda del ceppo. Al suo interno sono principalmente presente una regione VIR, responsabile della virulenza, gli elementi per permettere la replicazione del plasmide e uno o più Transfer DNA (T-DNA) che verranno trasferiti alla cellula target. In genere, il T-DNA contiene geni per la sintesi di auxine e citochinine necessari a stimolare la crescita rapida della galla, e geni per le opine, termine con il quale si indicano una serie di composti generici quali amminoacidi non proteici o zuccheri con la caratteristica distintiva di poter essere metabolizzati solo dal *Agrobacterium*; in questo modo la pianta produce, una volta infetta, le fonti di sostentamento per il suo parassita. Il T-DNA è fiancheggiato da sequenze

ripetute di 23-25 bp, elementi in cis necessari all'escissione dello stesso, denominati Left Border (LB) e Right Border (RB).

Il meccanismo di attacco è decisamente singolare: quando la pianta è ferita, emette delle sostanze chimiche, tra cui l'acetosiringone (stanza fenolica), che attiva la virulenza di *A. tumefaciens*: il batterio, infatti, esprime in maniera costitutiva il gene *VirA*, recettore di membrana dal carattere autofosforilante quando legato a composti fenolici. *VirA* fosforila anche *VirG*, che viene così attivato nella veste di fattore di trascrizione dei geni *vir*. A questo punto, i geni *VirD1* (topoisomerasi) e *VirD2* (endonucleasi) formano un complesso per l'escissione. *VirD2* crea dei nick, rimanendo però legato all'estremità 5' del filamento inferiore del T-DNA in modo da impedire la sua degradazione mentre il danno al DNA del plasmide Ti viene riparato: è proprio durante la riparazione, infatti, che il filamento inferiore protetto da *VirD2* viene staccato, costituendo di fatto il T-DNA che giungerà alla cellula vegetale target. Questo filamento viene rivestito da proteine *VirE2* (comprendono il fattore di localizzazione nucleare, NLS) e trasferito alla cellula vegetale tramite un pilo di infezione costituito da proteine *VirB* e *VirD4*. Inoltre, le proteine *VirD5*, *VirE1* e *VirEe3*, *VirF* vengono trasferite insieme al T-DNA rivestito, poiché necessarie a permettere il corretto svolgimento del meccanismo di infezione (Matthew A Escobar, 2003).

Tuttavia, quello indicato è il processo che avviene naturalmente quando *A. tumefaciens* attacca una pianta; per i funghi, invece, si è visto come alcune delle proteine citate, che agiscono come fattori di virulenza (VirE2, VirE3, VirD5, VirF) non siano necessarie, evidenza che suggerisce che esse possano concorrere ad inibire sistemi di difesa della pianta. La traslocazione del T-DNA è stata recentemente osservata tramite microscopia confocale in *S. cerevisiae*, potendo notare come la proteina VirE2 non è coinvolta nel trasferimento del T-DNA nei lieviti (Paul J. J. Hooykaas, 2018).

Appena dopo l'entrata del T-DNA nel nucleo avviene la ricombinazione non omologa (Non Homologous End Joining, NHEJ) su DNA generalmente corredato da istoni H2A, H3 e H4 (HoChul Yi, 2002; Gelvin, 2021), processo in cui risultano fondamentali le proteine che mediano il double-strand break (DSB) repair quali Ku70, Ku80, Lig4; si potrebbe altresì procedere tramite una Homologous Recombination (HR) in cui, invece, può intervenire in maniera fondamentale il fattore Rad52 per l'integrazione del T-DNA in *S. cerevisiae*. È necessario specificare, quindi, che il T-DNA viene integrato tramite diversi pathway in piante e funghi (Paul J. J. Hooykaas, 2018).

L'integrazione non omologa potrebbe avvenire per micro-omologia, per cui è probabile che una porzione di sequenza (fino al punto in cui è presente l'omologia) venga persa, mentre viene sintetizzato da una polimerasi il

filamento complementare; oppure, potrebbe verificarsi una replicazione a double strand DNA in primis, seguita dal processo di integrazione.

Non è raro il verificarsi di piccole delezioni, sia su T-DNA che sul genoma ospite; potrebbero altresì essere presenti regioni di filler DNA costituito da brevi sequenze che riempiono le imperfezioni lasciate dall'integrazione del DNA esogeno, oppure inserzioni multiple di T-DNA ripetuti diretti in testa-coda o invertiti. Anche in questo caso, però, in *S. cerevisiae* è stato notato che le estremità del T-DNA sono piuttosto preservate durante l'integrazione nel genoma, alcune volte addirittura combacianti con il nick effettuato da VirD2 sul pTi; potrebbero invece verificarsi successivi riarrangiamenti come traslocazioni o inversioni (Paul J. J. Hooykaas, 2018).

3.3.2 A. tumefaciens per il gene editing

Quando si usa AMT per trasferire del DNA esogeno in *Malassezia*, alcune delle caratteristiche citate vengono sfruttate per replicare il processo in maniera simile *in vitro*, al fine di permettere il trasferimento di specifiche sequenze che possono integrarsi per Non Homologous End Joining (NHEJ) oppure Homologous Repair (HR) (Giuseppe Ianiri G. D., 2019).

Per poter utilizzare *Agrobacterium* con lo scopo di gene editing, si ritiene conveniente modificare il plasmide pTi in modo da renderlo più facilmente

manipolabile; per cui, si sostituisce il T-DNA con la sequenza desiderata, mentre i geni codificanti per auxine, citochinine e opine sono eliminati (tuttavia, promotori e terminatori potrebbero essere utili).

Seguendo, si sviluppa un sistema basato su plasmidi cointegrati (più ancestrale e laborioso, si basa sull'integrazione di un vettore navetta clonato in *E. coli* all'interno del pTi tramite un incrocio triparentale con un secondo ceppo di *E. coli* in grado di coniugare), oppure un sistema binario, ad oggi maggiormente utilizzato. In questo caso, nel plasmide pTi vengono mantenuti solamente i geni *vir*, necessari per la trasformazione. Il T-DNA con gene di interesse e/o gene marcatore corredati di promotore e terminatore, left e right border sono clonati in un secondo vettore. Entrambi vengono trasferiti in *A. tumefaciens* (da ciò la denominazione di "sistema binario"), con il quale verrà trasformata la specie desiderata, in questo caso *Malassezia* secondo il protocollo di Ianiri *et al.* (2016) sotto riportato.

Capitolo quarto

L'INTERAZIONE CON GLI UOMINI

Dacché *Malassezia* ha subito un processo di adattamento alla pelle dei mammiferi, si è evinto che questo fungo non agisce solo come patogeno, ma anche come commensale e, talvolta, come organismo simbiotico mutualista. L'avvento delle Next Generation Sequencing ha portato con sé nuove possibilità, facilitando le analisi coltura-indipendente. Di conseguenza, è favorita la comprensione del ruolo di *Malassezia* all'interno del microbioma umano, soprattutto con riguardo a quelle specie difficilmente coltivabili in terreno come *M. restricta*, *M. globosa* e simili.

Come già detto in precedenza, questo microrganismo tende a concentrarsi nelle zone del corpo in cui la presenza di lipidi è maggiore. È sorprendente la sua rapida colonizzazione della pelle, come riportano diversi studi, già da pochi mesi dopo la nascita (probabilmente per via del contatto con la madre) e la tendenza ad aumentare o diminuire la sua presenza ed attività in maniera lineare rispetto a quella delle ghiandole sebacee (Bernier V, 2002; Ro BI, 2005; Ayhan M, 2007; Nagata R, 2012).

La potenzialità immunomodulatoria che questo fungo possiede spazia notevolmente: è stata notato, ad esempio, come talvolta sia in grado di attivare

la cascata del complemento e suscitare sia la risposta umorale che quella innata in individui sani, oppure come esso sia in grado di evadere il sistema immunitario e persino sopprimere la risposta dello stesso verso i suoi antigeni, (H. Ruth Ashbee, 2002; Aristeia Velegeaki, 2015).

La figura 5 di seguito riportata, tratta dallo studio di G. Ianiri, S. LeibundGut-Landmann e T. L. Dawson Jr. mostra come la presenza di *Malassezia* sulla pelle possa scatenare una risposta oppure favorisca una perfetta omeostasi. Quando il microrganismo aderisce alla barriera epiteliale inizia un processo di efficace colonizzazione per cui esso, le sue componenti, gli allergeni o i composti da esso prodotti, vengono recepiti dalle cellule dendritiche e dai macrofagi presenti sulla barriera epiteliale e dalle cellule del Langerhans (anche se le componenti ed i prodotti, al contrario dell'intera cellula del lievito, possono penetrare anche al di sotto dell'epidermide). Su una pelle sana, in cui una diversificazione del microbiota gioca un ruolo fondamentale, l'infiammazione non viene facilmente scaturita; al contrario, in una pelle malsana, in cui sono frequenti perdite di umidità, alterazione della produzione di sebo e condizioni infiammatorie, l'alterazione del microbiota e la perdita

della condizione omeostatica sono favorite, per cui ne potrebbero conseguire *skin disorders* anche ad opera di *Malassezia* (Giuseppe Ianiri S. L.-L., 2022).

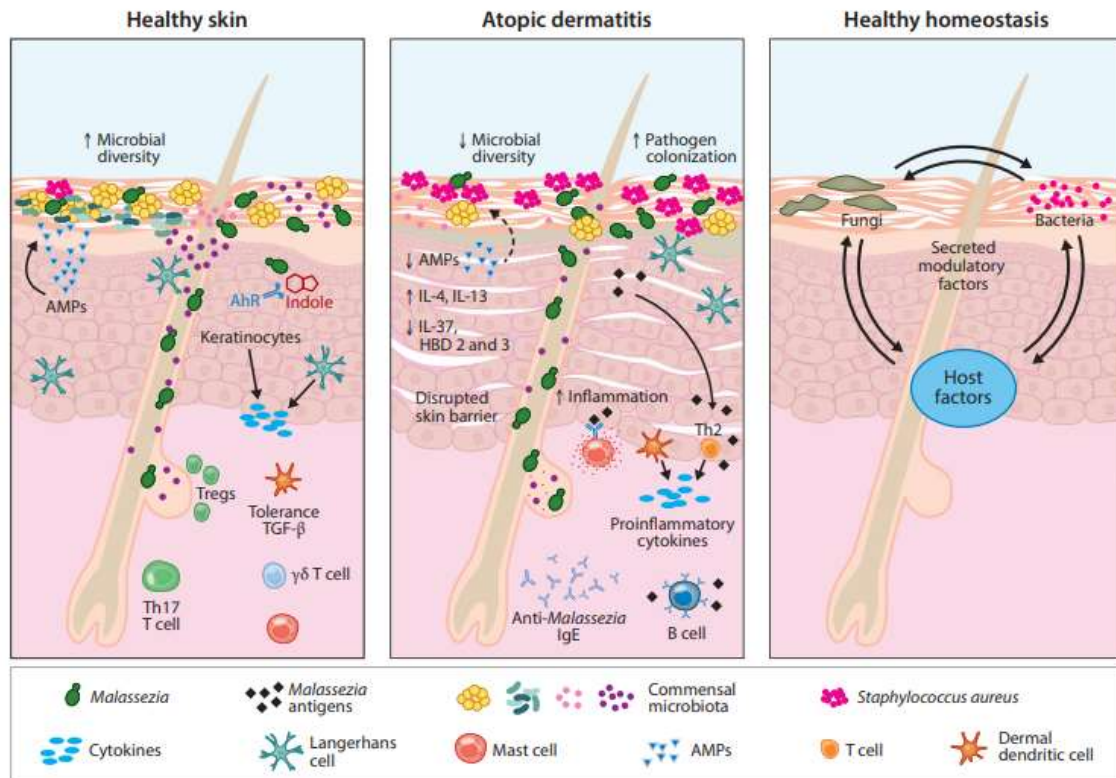


Figura n. 5: G. Ianiri, S. LeibundGut-Landmann, T. L. Dawson Jr., “*Malassezia: A Commensal, Pathogen, and Mutualist of Human and Animal Skin*”, 2022. La figura riporta una rappresentazione della complessità dell’interazione ospite-microbiota e tra i microrganismi presenti. Il delicato equilibrio può portare ad omeostasi oppure disbiosi con conseguente patologie. AhR: recettore aril-idrocarburo; AMP: peptide antimicrobico; HBD: beta-defensina umana; LRR: proteine ricche di ripetizioni di leucina; PRR: pattern di riconoscimento del recettore; Th17: T helper; TLR: recettore Toll-like; Treg: cellule T regolatrici.

Usualmente, viene osservata l’interazione con specifiche cellule T, anticorpi IgG e IgM in pazienti sani, mentre si è visto come specifiche IgE reagiscano con gli allergeni di *Malassezia*. In *M. furfur* sono stati identificati ad oggi tre allergeni, mentre in *M. sympodialis* circa dieci (Gaitanis G Magiatis P, 2012).

Capitolo quinto

FATTORI DI VIRULENZA

Gli agenti di virulenza comunemente riconosciuti nel mondo dei miceti e, nello specifico, nel genere *Malassezia*, sono la produzione di fosfolipasi ed enzimi idrolitici, melanina ed indoli (MA, 2000; Gaitanis GMagiatis P, 2012).

5.1 Fosfolipasi

La fosfolipasi, coinvolta nel complesso processo di interazione tra il fungo e l'ospite, è stata segnalata come protagonista nello sviluppo delle lesioni in caso di patogenicità. In particolar modo, già negli anni '90 si è osservato che la fosfolipasi partecipa nel rilascio di acido arachidonico (molecola ampiamente identificata come infiammatoria) da parte delle cellule epiteliali, poiché ne attacca la parete e ne scinde i glicerofosfolipidi (Lilian I. Plotkin, 1998). Tuttavia, è stato rimarcato come la produzione di fosfolipasi possa essere la stessa, comparata quantitativamente, in campioni sani e campioni malati provenienti dalla stessa persona, suggerendo che lo sviluppo delle lesioni potrebbe essere favorito anche localmente dalle condizioni dell'epidermide e del suo ecosistema (Gabriella Pini, 2011). Non di meno, l'attività fosfolipasica sembra essere maggiore in *M. pachydermatis*, riportata come non lipidi-dipendente, rispetto ad altre specie come *M. furfur* o *M.*

globosa (Weerapong Juntachai, 2009), e correlata con l'attività lipasica, emolitica e di biofilm, rimarcando la complessità del processo infettivo in cui sono intervengono molteplici enzimi idrolitici in maniera più o meno specifica (Chui Bon Tee, 2019; Wissal Chebil, 2022).

5.2 Melanina

La melanina è riportata come fattore di virulenza nei funghi patogeni (Anuradha Chowdhary, 2014), con particolare attenzione verso *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, in cui interviene nel processo di patogenesi. In *Malassezia* è presente l'enzima fenolossidasi per la produzione di melanina dal substrato di partenza L-diidrossifenilalanina (L-DOPA), un noto precursore della dopamina, di cui è presente un sistema di trasporto nelle cellule del Langerhans (Sirida Youngchim, 2013). Inoltre, la melanina in *Malassezia* sembra inibire la sua fagocitosi e controllare la risposta immunitaria dell'ospite (Iniobong C. I. U., 2023).

Cionondimeno, è bene sottolineare che la produzione di melanina può variare notevolmente, anche all'interno della stessa specie. Come riportano G. Ianiri et al. (2016), *M. furfur* CBS14141 non è in grado di produrre melanina da media contenente L-DOPA, in contrapposizione con quanto descritto da Gaitans et al. (2005) nello studio in cui diversi ceppi di undici specie di

Malassezia sono state testate per la produzione di melanina da L-DOPA (George Gaitanis V. C., 2005; Giuseppe Ianiri A. F., 2016).

5.3 Indoli

Alcune specie più di altre all'interno del genere, mostrano una spiccata capacità di produrre delle sostanze xenobiotiche individuate come indoli, spesso riscontrati in presenza di pigmentazione. Sebbene siano ancora da approfondire il processo infiammatorio e quello di evasione immunitaria, nel caso di dermatite seborroica da *M. furfur* si è evidenziata l'attivazione del pathway del recettore aril-idrocarburo (AhR, aryl hydrocarbon receptor) nei cheratinociti.

Il recettore AhR è un fattore di trascrizione ligando-dipendente presente nelle cellule epiteliali e anche in quelle immunitarie intestinali e in precedenza era considerato come un recettore xenobiotico che promuove la detossificazione di contaminanti dannosi come idrocarburi policiclici aromatici (IPA); tuttavia, ad oggi si è compreso che, a seconda del contesto, esso influenza diverse risposte e pathway tra cui il ciclo cellulare, la risposta immunitaria, la risposta ad antiossidanti e, appunto, xenobiotici (Bruno Lamas, 2018). Talvolta, i composti che lega possono avere effetti opposti sulle funzioni cellulari: in questo modo si costituisce un complesso network di regolazione che coordina diverse funzioni, tra cui l'espressione degli enzimi volti al metabolismo degli

xenobiotici, l'omeostasi cutanea ed il danno da UV, la regolazione della produzione di Reactive Oxygen Species (ROS) ed è stato anche associato con processi di carcinogenesi (George Gaitans, 2011; Masutaka Furue, 2014; Aristeia Velegeaki, 2015).

La sua attivazione tramite gli indoli prodotti da *Malassezia* suggerisce che i ligandi prodotti dal lievito possano regolare lo stato infiammatorio; al contrario, sui controlli sani non si riscontrano considerevoli quantità di indoli tipicamente prodotti da *Malassezia*, come evidenziano le analisi metabolomiche e cromatografiche (George Gaitans, 2008; Prokopios Magiatis, 2013). Tuttavia, recenti studi dimostrano che l'attivazione del recettore AhR è fondamentale per l'omeostasi della pelle e per favorire i processi di barrier repair (Aayushi Uberoi, 2021).

Il recettore AhR è in grado di legare una serie di composti prodotti da *Malassezia* con alta affinità, tra cui indirubina, FICZ e ICZ prodotti anche dal patogeno, i quali implicano una forte risposta. Tra i diversi indoli prodotti dal genere *Malassezia*, inoltre, è stato riscontrato che la malassezina è un potente ligando del recettore AhR implicato nella patogenesi di Pitiriasis versicolor, data la sua capacità apoptotica sui melanociti e inibitiva rispetto alla tirosinasi, enzima chiave nella biosintesi della melanina (Celis AM, 2017).

Capitolo sesto

PIGMENTAZIONE

Gli indoli che *Malassezia* produce sono visibili in coltura sotto forma di pigmenti dal colore variabile dal rosa al marrone: essi sono prodotti dal fungo quando il triptofano è usato come unica fonte di azoto. Anche se questo fenomeno è stato osservato con *M. pachydermatis*, *M. yamatoensis* e *M. slooffiae*, è in *M. furfur* che diventa notevolmente apprezzabile, e sembra essere nel primo caso correlato con la comparsa di dermatite seborroica. Tra i principali pigmenti coinvolti nel processo di attivazione del recettore dei mammiferi AhR si trovano principalmente 6-formilindolo[3,2-b]carbazolo (FICZ), indolo[3,2-b]carbazolo indirubina (ICZ), malassezina, triptantrina, pityriatricina (in ordine di potenza di attivazione dell'AhR) ed altri (Prokopios Magiatis, 2013).

Sebbene il pathway degradativo del triptofano in *Malassezia* sia da chiarire, è ormai noto che questo amminoacido aromatico è coinvolto nel catabolismo di composti ciclici da esso derivato, permettendo la conservazione dell'anello (caratteristica peculiare di diversi ligandi di AhR). Nel complesso, si è visto come fornendo il triptofano fondamentalmente come unica fonte di azoto, il recettore AhR venga stimolato favorendo la trascrizione dell'interleuchina 22 (Il22, iniziatore della risposta immunitaria microbica e fattore di sopravvivenza

per le cellule epiteliali, respiratorie, gastrointestinali ed epatiche; rientra nei linfociti T helper). Tale risposta sembra favorire l'equilibrio del microbiota innescando una serie di reazioni al fine di favorire protezione contro lo stato infiammatorio (Teresa Zelante, 2013; Luigina Romani, 2014). Maggiori studi, come la caratterizzazione dei geni coinvolti nel metabolismo degradativo del triptofano, sono stato condotti sul fungo *Aspergillus fumigatus* ed altri (Tsokyi Choera, 2018).

Capitolo settimo

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è l'identificazione dei geni coinvolti nella produzione di pigmenti indolici in *Malassezia furfur*. Poiché la produzione di pigmenti rossastri/marroni è chiaramente visibile a occhio nudo, l'idea era quella di mettere a punto un approccio di forward genetics che permettesse la rapida identificazione di mutanti di *M. furfur* che avessero perso la capacità di produrre pigmenti. Per questo è stato messo a punto uno screening come segue: generazione di mutanti random mediante trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*, crescita dei trasformanti in presenza di triptofano come unica fonte di azoto per favorire la produzione di pigmenti, e selezione di trasformanti che non mostravano la capacità di produrre pigmenti. Questa metodica ha permesso di isolare due mutanti che sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare e fenotipico.

Capitolo ottavo

MATERIALI E METODI

8.1 *Substrati*

I substrati colturali e reagenti usati sono:

- Modified Dixon medium (mDixon): Malt extract 36 g/L, Peptone 10 g/L, Oxbile 10 g/L, Tween 60 10 ml/L, Glicerolo 99% 4 ml/L, con aggiunta di 20 g/L di agar batteriologico all'occorrenza di substrato solido;
- Luria Bertani (LB): Bacto triptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH per portare a pH 7, con aggiunta di 15 g/L di agar batteriologico all'occorrenza di substrato solido;
- Minimal Medium (MM): Glucosio 15 g/L, Fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4) 1 g/L, Solfato di Magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0,5 g/L, KCl 0.5 g/L;
- MM salt 2.5X: Fosfato di potassio diidrato (KH_2PO_4) 3.625 g/L, Fosfato di potassio dibasico (K_2HPO_4) 5.125 g/L, Cloruro di sodio (NaCl) 0.375 g/L, Solfato di Magnesio eptaidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 1.25 g/L, Cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 0.165 g/L, Solfato di ferro eptaidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0.0062 g/L, Solfato di ammonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 1.250 g/L;

- Induction Media (IM): MMsalt 2.5X 400 ml/L, glucosio 1.8 g/L, glicerolo 5 g/L; 7.7 g/L MES, KOH fino a pH 5.3, 20 mg/L acetosiringone (3', 5'- dimetossi-4-idroacetofenone);

Tutti i substrati sono stati utilizzati dopo averli autoclavati a 121°C per 20 minuti e 1,2 atmosfere oppure, nel caso di mezzi con aggiunta di amminoacidi, filtrosterilizzati dopo l'aggiunta della fonte azotata. Nel caso di substrati solidi sono stati aggiunti generalmente 15-20 g/L di agar, mentre fino a 60 g/L di agar per ottimizzare l'efficienza di trasformazione. Nel caso di terreni di selezione o per mutanti sono stati aggiunti antibiotici a concentrazioni note dopo aver autoclavato il terreno e aver lasciato che raggiungesse i 50°C.

8.2 *Microrganismi*

Il ceppo utilizzato è stato CBS14141 della specie *Malassezia furfur* e/o mutanti da esso derivati.

Le colture sono state ottenute tramite scongelamento del ceppo da -80°C ed un primo passaggio in mDixon agar; dopo due giorni a 30°C, la visibile comparsa di colonie permette il passaggio nello stesso substrato liquido, mantenuto a 30°C e 150 rpm in beute da 50 ml (utilizzate costantemente per i test fenotipici con lo scopo di mantenere le stesse condizioni). Nel caso dei

mutanti, al terreno è stata addizionata la nourseotricina (NAT), ossitettraciclina ed ampicillina.

La trasformazione è stata attuata usando *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, allo stesso modo trasferito da -80°C in substrato solido e, successivamente, in liquido. Il terreno usato è LB addizionato dell'antibiotico kanamicina (kan); in liquido è stato talvolta aggiunto di mInd per favorire l'espressione dei geni *vir* mediata da acetosiringone.

8.3 Analisi della pigmentazione nel wild type

L'abilità di *M. furfur* di produrre pigmenti marroni quando il triptofano è presente come unica fonte di azoto è stata inizialmente riportata da Mayser et al. (1998).

In questo lavoro, l'abilità di *M. furfur* di produrre pigmenti quando il triptofano è presente come unica fonte di azoto è stata testata su tre terreni diversi: Tween 80 (da Mayser et al. 1998), mDixon senza peptone (mDix-mp, da Mayser et al. 2004) e minimal medium (MM); l'amminoacido L-triptofano è stato aggiunto alla concentrazione di 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml e 0.5 mg/ml. I ceppi testati sono stati due: *M. furfur* CBS 1878, aneuploide (Theelen et al., 2022), precedentemente riportato come produttore di pigmenti (Mayser et

al. 1998) ed il ceppo aploide CBS 14141 (Theelen et al., 2022), la cui abilità di produrre pigmenti è sconosciuta. Su terreni agarizzati i microrganismi sono stati strisciati con un'ansa e le piastre incubate a 30°C e fotografate a 4 e 8 giorni.

Sia mDix-mp che MM sono stati utilizzati anche come terreni liquidi per permettere di apprezzare la colorazione e quantificarla tramite la densità ottica (OD_{400}) in relazione alla crescita (OD_{600}).

Per valutare l'effetto dei singoli nutrienti sulla pigmentazione, è stato utilizzato un terreno minimo (MM) al quale è stato aggiunto:

- Triptofano [0.5 mg/ml] come sola fonte azotata e glucosio [15 g/L] come unica fonte di carbonio;
- Triptofano [0.5 mg/ml] come unica fonte di carbonio e nitrato d'ammonio [20 mM] come fonte azotata;
- Triptofano [0.5 mg/ml] come unica fonte di carbonio e azoto;
- Triptofano [0.5 mg/ml] in presenza di glucosio [15 g/L] e nitrato di ammonio [20 mM].

Gli esperimenti sono stati effettuati come segue: dopo crescita ON a 30° C a 150 rpm in mDixon, le cellule sono state lavate due volte con acqua distillata sterile, risospese nello stesso terreno di crescita, e portate ad un $OD_{600} = 0.5$.

Successivamente, 500 μ L di sospensione cellulare sono state aggiunte a 10 mL di terreno in beute da 50 mL, e incubate in agitazione (150 rpm) a 30°C per diversi giorni; giornalmente, è stata prelevata una aliquota di 1 mL che è stata utilizzata per la misurazione della crescita (OD_{600}).

Seguendo, l'aliquota è stata centrifugata a 13000 rpm per 5 minuti, le cellule eliminate ed il supernatante usato per la misurazione dei pigmenti prodotti mediante misurazione della OD_{400} . Tre repliche biologiche sono state effettuate. I dati sono espressi come pigmentazione in relazione alla crescita (OD_{400}/OD_{600}).

Inoltre, delle prove sono state eseguite testando il wild type in MM con glucosio [15 g/L] e $MgSO_4$ [0.5 g/L] aggiungendo, alternativamente, solfato di ammonio $((NH_4)_2SO_4)$ [10 mM] o citrato di ammonio $(C_6H_8O_7 \times 2NH_3)$ [10 mM]. La medesima prova è stata effettuata sul wild type sostituendo i Sali con degli amminoacidi (L-glutammina, L-ornitina+L-aspartato, L-ornitina cloridrata, L-arginina, L-citrullina) a concentrazione finale 10 mM, per poter avere un mezzo di comparazione nell'ambito delle analisi fenotipiche per il gene CPA1.

8.4 Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

8.4.1 Mutagenesi inserzionale

Per la mutagenesi inserzionale random è stato utilizzato il plasmide pAIM2, il quale contiene tra i bordi del T-DNA il gene NAT, che conferisce la resistenza alla nourseotricina, posto sotto il controllo del promotore pACT1 e terminatore tACT1 di *Malassezia sympodialis* (Ianiri et al., 2016).

8.4.2 Mutagenesi target

La mutagenesi target è stata effettuata per il gene *SUL1* secondo la procedura descritta in precedenza (Ianiri et al., 2016). In breve, il costrutto per la mutagenesi è stato assemblato mediante ricombinazione in vivo in *S. cerevisiae* FY834 inserendo il gene NAT tra le regioni di 1500 bp a monte e a valle del gene *SUL1*, ottenute mediante PCR. I trasformanti di *S. cerevisiae* sono stati inizialmente sottoposti a colony PCR per identificare i cloni positivi, i quali successivamente sono stati sottoposti a estrazione del DNA totale. Questo DNA è stato elettroporato in *A. tumefaciens* EHA105, e le colonie di trasformanti selezionate su LB + kanamicina .

8.4.3 Trasformazione mediata da *Agrobacterium*

La trasformazione mediata da *Agrobacterium* è stata realizzata secondo il protocollo sviluppato in precedenza (Ianiri et al. 2016, 2019). In sintesi, *M.*

furfur CBS14141 è stato cresciuto in mDixon per due giorni a 30°C e in agitazione a 150 rpm, e *A. tumefaciens* EHA105 a 28°C e 150 rpm in LB con kanamicina. Da notare che a seconda dall'esperimento effettuato è stato usato *A. tumefaciens* EHA105 contenente il plasmide appropriato.

Per la trasformazione, le sospensioni cellulari di lievito e batterio sono state portate a OD₆₀₀=1, miscelate in diversi rapporti batteri:lieviti (1:1, 1:5, 1:10) in un volume finale di 50 ml, e successivamente centrifugate a 4000 rpm per 15 minuti. A questo punto, il supernatante è stato eliminato, e le cellule spottate su membrane sterili in nylon adagiate su piastre di Induction medium (mInd) agar. Le piastre così ottenute sono state incubate a temperatura ambiente per tre giorni senza parafilm. A questo punto le cellule sono state risospese in acqua e centrifugate a 4000 rpm per circa 7 minuti per separare i lieviti dai batteri: il supernatante è stato scartato, e il pellet risospeso in circa 200 µl di acqua sterile, poi piastrato su terreno selettivo mDixon contenente nurseotricina, ampicillina ed ossitettraciclina. Le piastre sono state chiuse con parafilm e lasciate a 30°C fino alla comparsa delle colonie.

Alcune prove sono state condotte al fine di ottimizzare la trasformazione. In letteratura, è riportato che aumentare il periodo di co-incubazione (coniugazione), usare una temperatura leggermente più bassa quando possibile, testare la ratio tra batterio e fungo e la concentrazione di

acetosiringone costituiscono accorgimenti che potrebbero aumentare l'efficacia della trasformazione (Jianmin Fu, 2021). In particolar modo, in questo lavoro, gli accorgimenti che hanno mostrato un miglioramento nell'efficacia di trasformazione sono stati:

- Utilizzo di diverse membrane per la coniugazione;
- Utilizzo di mInd agar come substrato di coniugazione con una percentuale di agar pari al 5%.

8.6 Sviluppo di uno screening per isolare mutanti in grado di non produrre pigmenti

Circa 700 trasformanti di *M. furfur* CBS 14141 sono stati inoculati in piastre a 96 pozzetti contenenti lo stesso terreno utilizzato per la selezione (mDixon con 100 ppm di nurseotricina e ampicillina, e 300 ppm di tetraciclina). Per ogni pozzetto sono stati utilizzati 150 µl di terreno. Le piastre sono state incubate a 30°C per sette giorni per permettere la crescita dei trasformanti selezionati.

A questo punto i trasformanti sono stati trasferiti in piastre a 96 pozzetti contenenti mDixon-mp con 0.5 mg/mL di triptofano; le piastre sono state incubate a 30°C per 10 giorni. L'identificazione dei trasformanti di *M. furfur*

che avevano perso la capacità di formare pigmenti è stata effettuata visivamente e/o mediante misurazione spettrofotometrica.

I trasformanti selezionati nello screening iniziale sono stati confermati indipendentemente in beute mantenendo inalterati il terreno utilizzato e le condizioni di crescita. La conferma del fenotipo e la misurazione della produzione dei pigmenti in relazione alla crescita (OD_{400}/OD_{600}), è avvenuta secondo le modalità usate per l'analisi della pigmentazione nel wild type, già esplicate nel paragrafo 8.2. In breve, i trasformanti ed il wild type sono stati inoculati alla stessa concentrazione cellulare in modo da poter comparare i risultati ottenuti statisticamente, differenza dello screening iniziale. Sono stati lasciati crescere a 30°C e 150 rpm per diversi giorni; poi, le sospensioni cellulari sono state sottoposte ad analisi spettrofotometrica ad OD_{600} per misurarne la crescita e, dopo centrifugazione, la densità ottica OD_{400} è stata misurata sul surnatante. I due dati sono stati relazionati, e sono stati comparati i risultati dei mutanti con quelli del wild type.

8.7 Isolamento dei mutanti 2B4 e 1G1

I trasformanti 1G1 e 2B4 hanno mostrato un fenotipo significativamente diverso dal WT e quindi sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare. Il DNA genomico dei due trasformanti selezionati è stato ottenuto mediante CTAB e successiva purificazione con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico

(25:24:1). Il DNA purificato è stato utilizzato per una inverse PCR per identificare le inserzioni di T-DNA: il DNA è stato digerito con EcoRI, ApaI e XhoI, successivamente circolarizzato con T4 Ligase, e sottoposto a PCR; per la PCR del DNA digerito con EcoRI sono stati usati i primers M13F e ai76, e M13R e ai77, mentre per i restanti campioni sono stati utilizzati i primers ai76 e ai77. Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati e mappati sul genoma di *M. furfur* CBS 14141 per identificare i siti di inserzione del T-DNA.

Successivamente, i campioni sono stati sottoposti anche a Whole Genome Sequencing utilizzando la piattaforma Illumina (50 bp, single ends). In questo caso le reads sono state trattate come segue: gli adattatori Illumina sono stati eliminati mediante Trimmomatic, e le reads sono state assemblate mediante Spades. I genomi risultanti sono stati sottoposti ad analisi blast utilizzando il gene NAT come query.

8.8 Analisi fenotipica di *sul1*

Per ciò che concerne i mutanti 2B4 e *sul1*Δ, sono state effettuate delle prove sia in solido che in liquido. In un primo momento, per indagare la funzione del gene mutato, si è proceduto ad effettuare delle prove di crescita in piastra con substrato MM con presenza di zolfo sotto diverse forme: solfuro di sodio (Na₂S), metabisolfito di potassio (K₂S₂O₅), solfito di sodio (NaSO₃), solfato di magnesio (MgSO₄), amminoacidica (metionina e cisteina). È bene specificare

che il terreno MM è normalmente costituito da solfato ed altri sali; tuttavia, in questa prova il solfato è stato sostituito per poter analizzare la risposta dei mutanti, comparandola a quella del wild type, quando altre fonti di zolfo sono presenti. Il terreno mDixon è stato usato come controllo per la crescita dei microrganismi.

Le analisi sono state ripetute anche in liquido, mantenendo gli stessi substrati senza solfato o con varie fonti di zolfo. I mutanti ed il wild type sono stati cresciuti a 30°C e 150 rpm overnight; il giorno successivo le sospensioni sono state centrifugate e lavate con acqua sterile distillata ed inoculate a concentrazione ($OD_{600}=0.5$) e quantità (500 μ l) nota nei substrati sopracitati. La crescita è avvenuta a 30°C, 150 rpm, per alcuni giorni, per poi procedere (secondo le modalità precedentemente descritte nel paragrafo 8.2) alla misurazione della crescita tramite OD_{600} e della pigmentazione OD_{400} , al fine di metterle in relazione ed interpretarne il risultato.

Successivamente, sono state indagate altre fonti di solfato, oltre al solfato di magnesio. In questo caso, sono stati sostituiti al solfato di magnesio: solfato di sodio (Na_2SO_4), solfato di zinco ($ZnSO_4$), solfato di ferro (Fe_2SO_4), solfato di manganese ($MnSO_4$), solfato di potassio (K_2SO_4). Essi sono stati aggiunti ognuno in un'aliquota di 50 ml di MM sterile, successivamente filtrosterilizzato, ad una concentrazione di 0.5 g/L. Anche in questo caso, le

prove sono state condotte su substrato solido e substrato liquido, in maniera uguale a quanto già precedentemente riportato per le diverse fonti di zolfo.

8.9 Analisi fenotipica di cpa1

Per il mutante 1G1 è stato previsto lo svolgimento di un'analisi fenotipica in liquido. Nello specifico, è stato usato il substrato MM (come originalmente previsto, glucosio [15 g/L] e MgSO₄ [0.5 g/L]), con l'aggiunta amminoacidi quali: L-glutammina, L-ornitina+L-aspartato, L-ornitina cloridrata, L-arginina, L-citrullina. Pertanto, sono state create delle stock di amminoacidi disciolte in acqua a concentrazione nota, successivamente aggiunte al substrato MM in quantità tale da avere una concentrazione finale pari a 10 mM del composto aggiunto ed un volume finale di 10 ml. Ogni condizione testata, è stata saggiata anche con aggiunta di triptofano e sia per il wild type CBS14141, sia per il mutante 1G1. Dopo aver preparato il substrato come esplicitato, ed aver cresciuto mutante e wild type overnight in mDixon-mp, si è proceduto alla prova secondo quanto riportato nel paragrafo 8.2. Le sospensioni cellulari sono state centrifugate, lavate due volte, inoculate ad OD₆₀₀=0.5, in quantità di 500 µl in 10 ml di substrato. Dopo una crescita di diversi giorni a 30°C e 150 rpm, si è proceduto alla misurazione di OD₄₀₀ e OD₆₀₀ per analizzare i risultati. Tre repliche biologiche sono state effettuate.

Capitolo nono

RISULTATI E DISCUSSIONE

9.1 *Pigmentazione di M. furfur in vari terreni*

Nel terreno Tween 80, solo *M. furfur* 1878 ha mostrato una buona crescita e produzione di pigmenti, confermando i risultati di uno studio precedente (Mayser et al., 1998) (fig. 6). *M. furfur* CBS 14141 ha mostrato crescita ridotta e mancata produzione di pigmenti in questa condizione.

Il razionale nell'utilizzare due ceppi diversi è che il ceppo di *M. furfur* noto per la sua abilità di produrre pigmenti, CBS 1878, è un ibrido aneuploide che contiene due copie della maggior parte dei cromosomi (Theelen et al., 2022), quindi non adatto per uno studio di mutagenesi random. Per questo, il terreno Tween 80 è stato scartato e altri terreni sono stati testati. mDixon-mp ha permesso una buona crescita e pigmentazione di entrambi i ceppi (fig. 6).

Infine, in MM, *M. furfur* CBS 1878 ha mostrato una migliore crescita e produzione di pigmenti in confronto a *M. furfur* CBS 14141 sia a quattro che ad otto giorni di incubazione (fig. 6). Per questo motivo, per lo screening il terreno più adatto è risultato mDixon -mp. In tutti i casi si è notato che l'intensità dei pigmenti aumentava all'aumentare della concentrazione di

triptofano. Inoltre, si è notato che i pigmenti sono sia assorbiti dalle cellule che secreti nel substratoagarizzato.

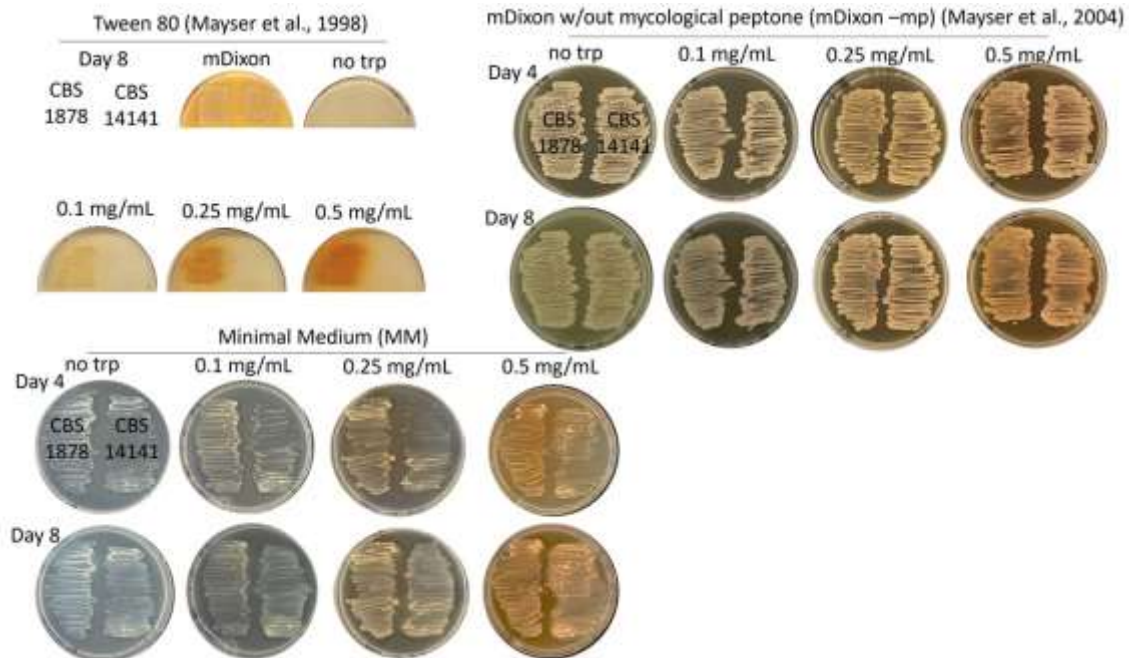


Fig n.6 : la figura riporta le piastre con *M. furfur* CBS 14141 e CBS 1878 sui substrati Tween 80, mDixon-mp e MM; è apprezzabile la pigmentazione delle cellule e del substrato.

In vista del lavoro di mutagenesi inserzionale, questo aspetto non è favorevole in quanto non è agevole distinguere ceppi mutanti che avessero perso la capacità di pigmentare poiché potenzialmente mascherati dal diffondersi nell'agar dei pigmenti prodotti da un altro mutante casualmente posizionato nelle vicinanze. Per questo motivo, i test successivi sono stati effettuati in liquido in quanto l'analisi della pigmentazione dei ceppi deve essere fatta singolarmente, quindi

senza il problema della diffusione dei pigmenti in terreno agarizzato. Inoltre, rispetto al substrato solido, in liquido è possibile quantificare la crescita e la pigmentazione del ceppo tramite la densità ottica (Optical density, OD) ad una lunghezza d'onda di 600 e 400 nm rispettivamente. In mDixon-mp liquido con l'aggiunta di 0.5 mg/ml di triptofano, la produzione di pigmenti di CBS 14141 è visibile già dal secondo giorno di incubazione ed aumenta nel tempo per raggiungere il picco al settimo giorno. Cellule di *M. furfur* CBS 14141 sottoposte a trattamento termico in microonde non sono state in grado di produrre la classica pigmentazione, indicando che la produzione di pigmenti è causata dal metabolismo cellulare (fig. 7).

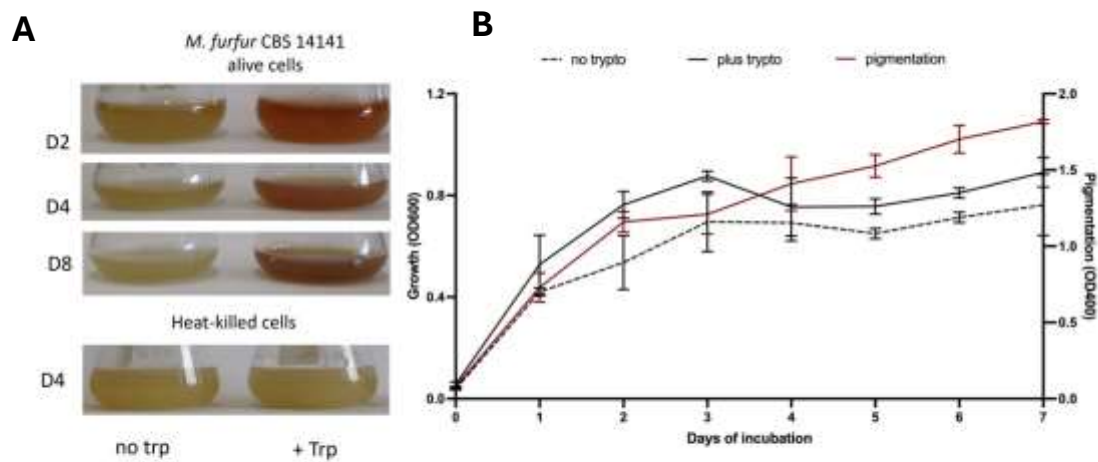


Fig. 7: A) le cellule vive sono in grado di produrre pigmenti marroni visibili dal secondo giorno di incubazione (D2), mentre cellule autoclavate non sono in grado di sviluppare pigmenti (D4, foto al quarto giorno di incubazione); B) la figura mostra come la pigmentazione (OD400) vada di pari passo con la crescita delle cellule (OD₆₀₀).

Successivamente, il substrato MM è stato utilizzato per valutare la pigmentazione a partire dal triptofano in assenza e/o presenza di altre fonti di carbonio e azoto.

Il risultato ottenuto ha rivelato che la maggiore produzione di pigmenti dal triptofano è stata ottenuta quando *M. furfur* CBS 14141 viene cresciuto in presenza di glucosio, seguito dalla crescita in MM con triptofano sia come fonte di carbonio che di azoto e dalla crescita in presenza di fonte carboniosa e azotata con risultati simili tra loro; al contrario, in presenza di nitrato di ammonio non è stata ottenuta la classica produzione di pigmenti, suggerendo che i) il gruppo amminico del triptofano è essenziale per la conversione dello stesso amminoacido in pigmenti indolici, e ii) la presenza di un'altra fonte azotata porta ad una riduzione della produzione di pigmenti probabilmente

perché la cellula, avendo a disposizione dell'azoto, non è forzata a prenderlo dal triptofano (fig. 8).

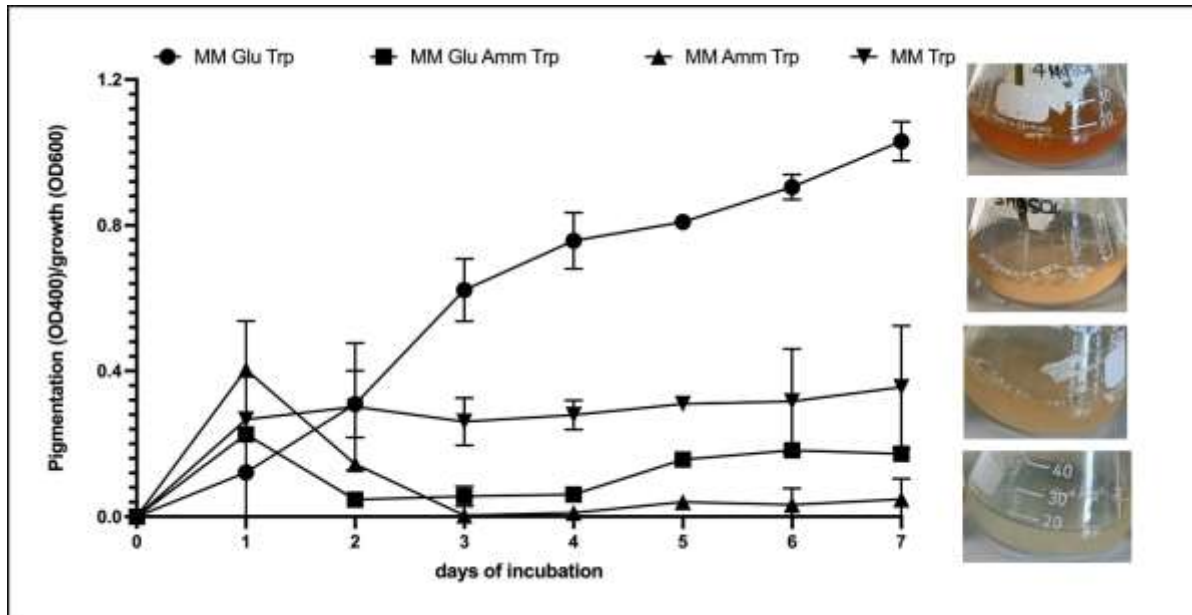


Fig n. 8: comparazione della pigmentazione da *M. furfur* CBS 14141 con usi diversi del triptofano. È evidente come la condizione con glucosio sia quella con maggiore produzione di pigmenti.

Sebbene quanto esposto sia stato osservato molteplici volte, nel corso dello studio, *M. furfur* CBS14141 è stato testato anche in MM liquido con triptofano, glucosio e solfato di ammonio oppure citrato di ammonio. Dai risultati riportati in fig. 8 si evince che il ceppo wild type ha sviluppato pigmentazione nonostante la presenza di fonti di azoto alternative al triptofano. Come si può vedere dal grafico in fig. 9B, la pigmentazione risulta essere quasi al pari con il controllo in MM (completo di triptofano e solfato di magnesio). Inoltre, è stato visivamente riscontrato che il colore dei

pigmenti tende maggiormente al rosa piuttosto che al marrone, a differenza delle altre prove riportate.

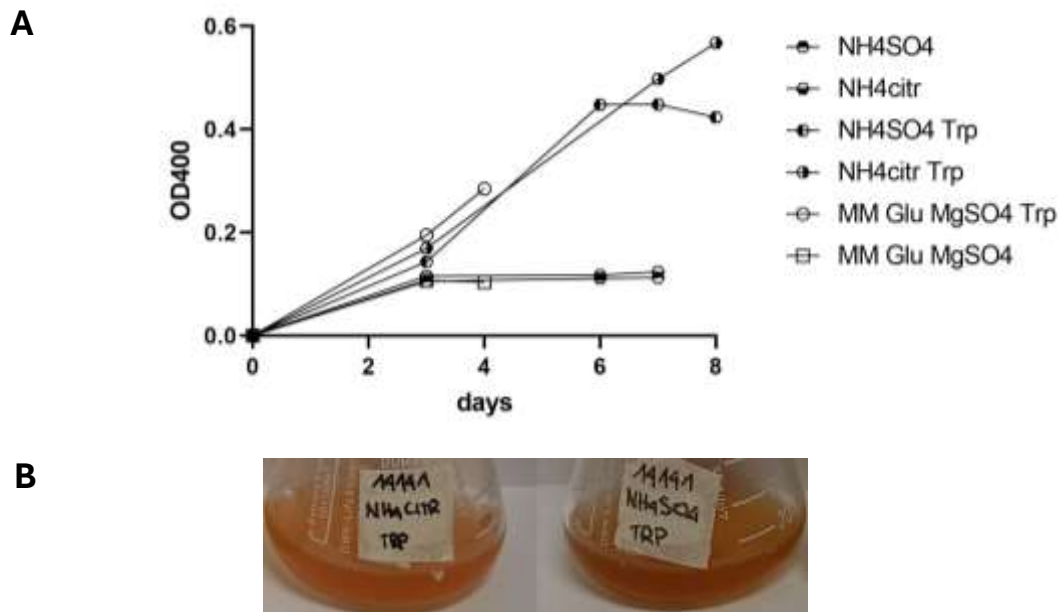


Figura n. 9: A) il grafico mostra come il wild type in MM e triptofano con aggiunta dei Sali sia performante in quanto a pigmentazione; B) la sospensione nelle due beute (*M. furfur* CBS14141) risulta notevolmente pigmentata, con variazione di colore rispetto al substrato con solo MM e triptofano.

Pertanto, è stato visto che il wild type non è in grado di pigmentare in presenza di altre fonti amminoacidiche oltre al triptofano. Questa condizione è stata testata sia con gli amminoacidi solforati metionina e cisteina, che con altri amminoacidi quali L-glutammina, L-ornitina con L-aspartato, L-ornitina cloridrata, L-arginina ed L-citrullina in terreno MM con glucosio e solfato.

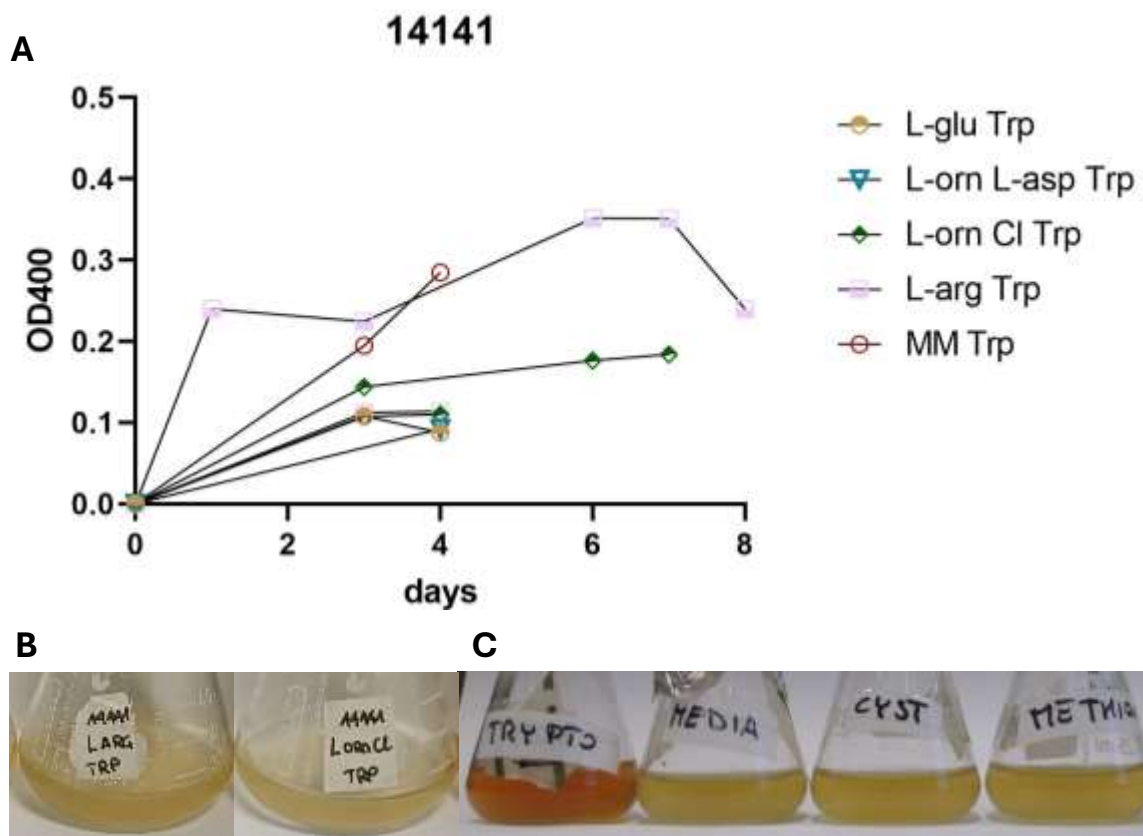


Fig. n. 10: *M. furfur* CBS14141 è stata coltivata in diverse condizioni. A) il grafico riporta la scarsa pigmentazione, quasi assente al giorno sette, in presenza di altri amminoacidi; B) i substrati contenenti i due amminoacidi che sembrano favorire leggermente la produzione di pigmenti nel grafico A vengono riportati; C) viene mostrata l'assenza di pigmentazione quando i due amminoacidi solforati sono presenti come unica fonte di azoto.

Si è visto che il campione L-arginina risulta avere un OD400 non del tutto trascurabile, se comparato agli altri amminoacidi. Tuttavia, come si mostra in fig. 10B, è visivamente riscontrabile assenza di colorazione, lasciando pensare che altri sottoprodotti che interferiscono con la lunghezza d'onda a 400 nm vengano prodotti in questo caso.

9.2 Trasformazione AMT

Diverse trasformazioni sono state effettuate e sono stati ottenuti circa 700 mutanti. Alcuni dei fattori che sono stati testati per aumentare l'efficienza di trasformazione sono: le membrane di coniugazione, preferibili in nylon; i rapporti lievito:batterio, per cui si è trovato particolarmente efficace il rapporto 1:7, ma anche 1:5 e 1:10; la percentuale di agar in mInd agar, con il risultato che molte più colonie sono comparse rispetto ad mInd agar 2%. In particolare, si è raggiunta un'efficacia di 400 mutanti in una trasformazione, dei quali sono stati successivamente selezionati i fenotipi utili.

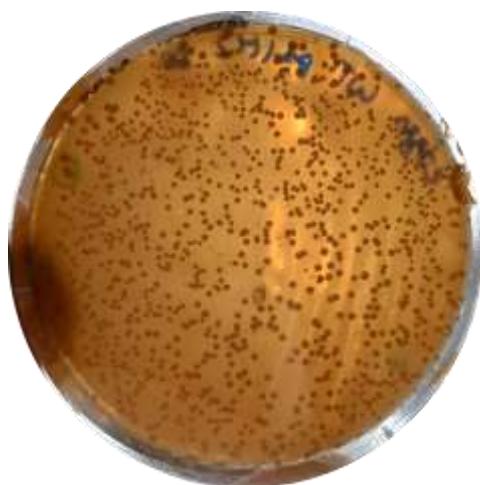


Figura n. 11: la foto riporta una piastra di selezione in cui il WT CBS14141 è stato trasformato tramite *A. tumefaciens* con plasmide pAIM2 seguendo le condizioni ottimizzate.

9.3 Screening dei fenotipi

Le colonie ottenute dalla trasformazione sono state trasferite in diverse piastre a 96 pozzetti con substrato di selezione e, successivamente, in piastre a 96 pozzetti con mDixon-mp con triptofano. A questo punto, i pozzetti non

pigmentanti sono risultati diversi, per cui i mutanti sono stati testati di nuovo in beuta secondo le condizioni di pigmentazione precedentemente citate. Da questo passaggio, due mutanti hanno confermato la riduzione della pigmentazione, denominati 1G1 e 2B4. Questi sono stati successivamente analizzati.

9.4 Isolamento dei mutanti inserzionali 2B4 e 1G1

Due ceppi, i trasformanti 1G1 e 2B4, hanno confermato una significativa riduzione nella produzione di pigmenti marroni. In particolare, mentre per il mutante 1G1 una lunga incubazione è risultata in una pigmentazione rosacea, il mutante 2B4 ha visto la produzione di pigmenti fortemente compromessa; pertanto, quest'ultimo è stato più ampiamente caratterizzato nel presente studio.

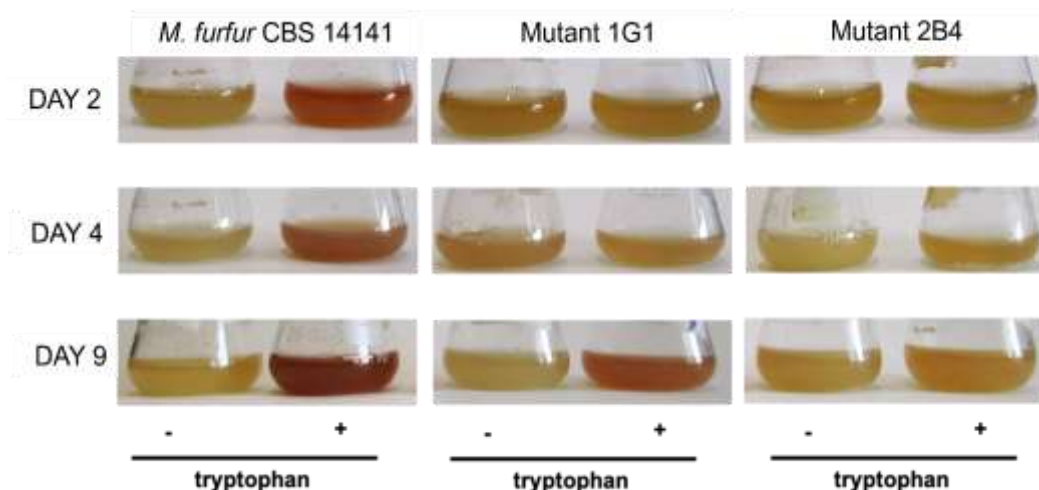


Figura n. 12: vengono mostrati il wild type ed i due mutanti in mDixon senza peptone con aggiunta di triptofano 0.5 mg/ml. La non produzione di pigmenti è maggiormente apprezzabile nel mutante 2B4, successivamente caratterizzato.

La PCR inversa è stata usata per identificare la posizione del T-DNA nel genoma del ceppo 2B4 (fig. 13).

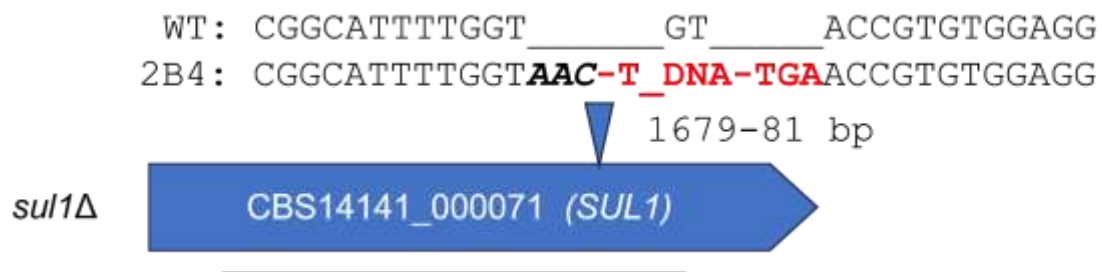


Fig. n. 13: la figura riporta l'inserzione del T-DNA nel mutante 2B4 rispetto al genoma del WT.

L'amplicone ottenuto è stato sottoposto ad analisi tramite BLASTn usando il genoma più recente di *M. furfur* CBS 14141 (JAKMWF010000001.1) come riferimento. Il T-DNA inserito nel cromosoma 2 in posizioni 829042-829044, porta ad una delezione a 2 bp; inoltre, mentre il bordo destro (RB) si è inserito con la classica sequenza TGA, la giunzione dall'altro lato non ha coinvolto la sequenza del bordo sinistro (LB). Questo inserimento del T-DNA è risultato essere all'interno del gene CBS14141_000071 (locus KAI3628368), che codifica l'ortologo del gene *SUL1* di *S. cerevisiae*. Nel lievito modello, *SUL1* codifica per un enzima solfato permeasi ad alta affinità, responsabile dell'assorbimento dei solfati e del controllo della concentrazione di intermedi solfati attivati in maniera endogena.

9.5 Conferma della mutazione in *Sul1*

Per confermare il fenotipo del mutante inserzionale, un mutante target *sul1* Δ è stato generato in maniera indipendente in *M. furfur* CBS14141 utilizzando la trasformazione mediata da *Agrobacterium*. A conferma dei risultati dello screening genetico, sia il mutante inserzionale 2B4 che il mutante target *sul1* Δ hanno mostrato una significativa riduzione nella produzione di pigmenti marroni quando cresciuti in mDixon -mp con triptofano. Essenzialmente, utilizzando il rapporto OD_{400}/OD_{600} che mostra la produzione di pigmenti rispetto alla crescita cellulare, è stato ottenuto un valore significativamente più alto per il WT rispetto ad entrambi i mutanti *sul1* (fig. 14).

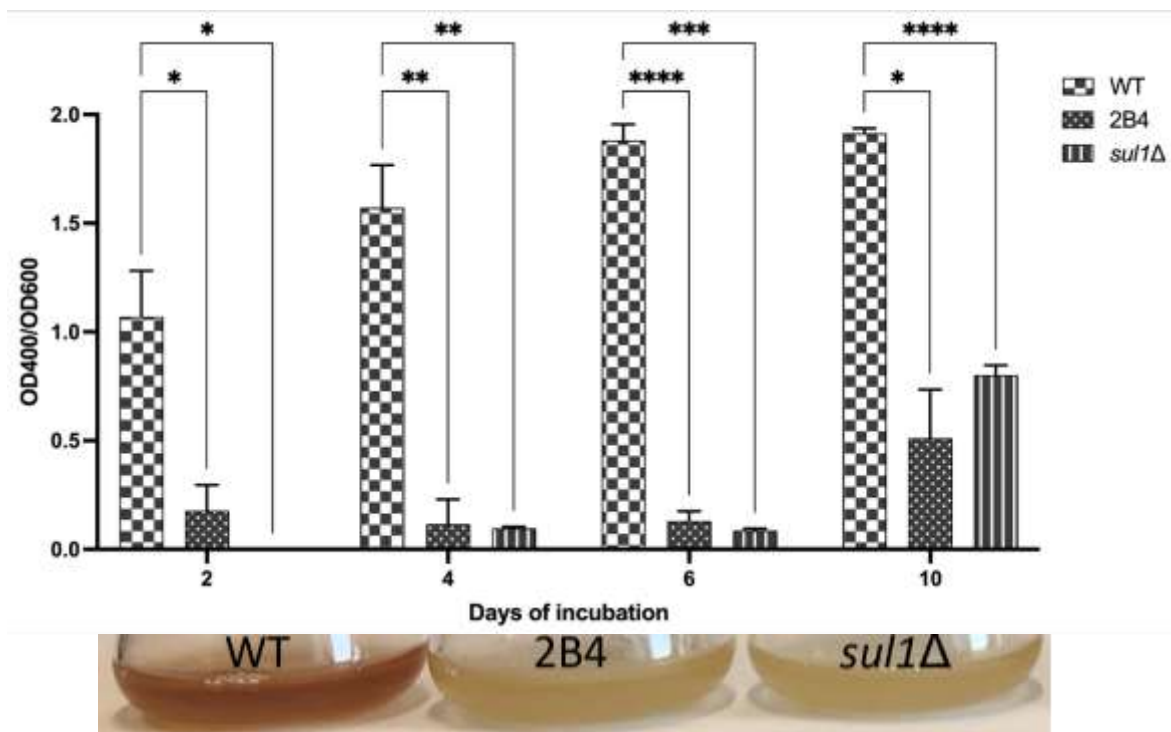


Fig. n. 14: A) il grafico riporta la pigmentazione (OD_{400}) del mutante inserzionale e del target in confronto al WT, relazionati al tasso di crescita degli stessi (OD_{600}); B) viene mostrata la produzione

9.6 Analisi fenotipica dei mutanti per SUL1

Il gene Sul1 è noto essere un gene che codifica per una solfato-permeasi della famiglia dei trasportatori anionici SulP. In *S. cerevisiae*, Sul1 è coinvolto nel trasporto attivo dei solfati e della concentrazione degli intermedi attivi (SGD database).

L'analisi fenotipica ha mostrato come sia in presenza che in assenza della fonte azotata, i mutanti 2B4 e *sul1*Δ abbiano una crescita leggermente ridotta e colonie più piccole su MM e MM con aggiunta di solfuro, solfato e fonti organiche di zolfo come metionina e cisteina. Al contrario, i mutanti mostrano lo stesso fenotipo del mezzo di controllo mDixon quando crescono in presenza di metabisolfito di potassio e solfito. Perciò, i dati confermano che SUL1 è un trasportatore di solfuro, solfato e di amminoacidi solforati, metionina e cisteina, ma non di anidride solforosa e solfito.

Dunque, si è pensato che, se Sul1 fosse coinvolto nella produzione di pigmenti tramite la disponibilità delle fonti di zolfo che trasporta, allora tutte le fonti di zolfo che causano una crescita difettiva dovrebbero avere un'influenza negativa sullo sviluppo di pigmenti in *M. furfur*.

Infatti, la fig. 15B mostra che i pigmenti (espressi come OD₄₀₀) sono visibili solo quando il WT è incubato in presenza di Na₂S, ma non con metabisolfito di potassio (SO₂) e solfito di sodio (SO₃); inoltre, la presenza di Na₂S porta ad un diverso colore del mezzo. Inoltre, come già riportato in fig. 9C, i due amminoacidi solforati non vengono utilizzati da *M. furfur* CBS14141 al fine della produzione di pigmenti, al contrario del solfato (MgSO₄) e del solfuro (Na₂S) che favoriscono lo sviluppo di pigmenti, rilevato tramite OD₄₀₀.

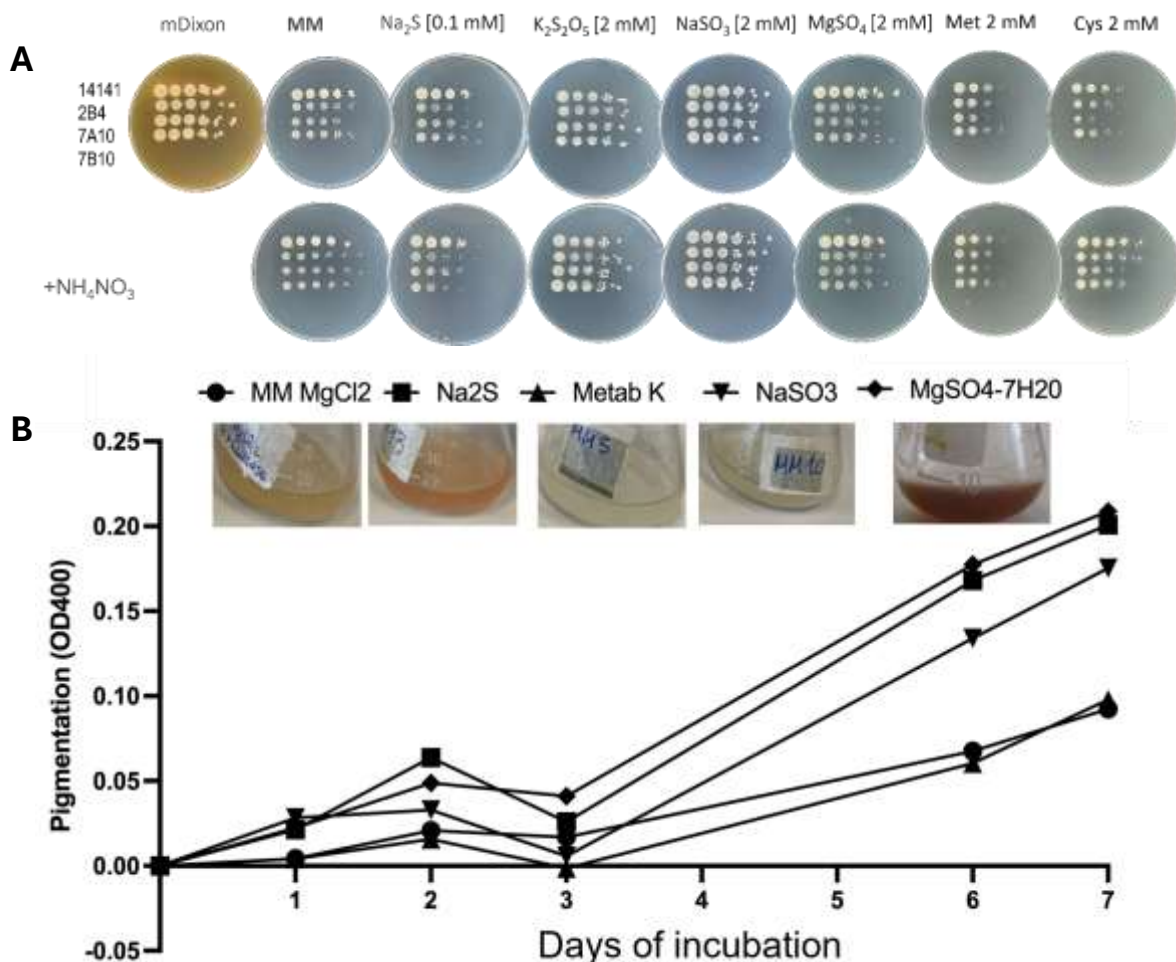


Figura n. 15: A) la figura riporta la crescita in piastra quando diverse fonti di zolfo sono aggiunte; 14141= wild type; 2B4= mutante *sul1* inserzionale; 7A10, 7B10= mutanti target *sul1*Δ; B) il grafico riporta la diversa produzione di pigmenti da *M. furfur* CBS14141 quando diverse fonti di zolfo sono presenti nel mezzo in sostituzione del solfato.

Successivamente, diverse fonti di solfato sono state testate in substrato MM solido, tutte con conseguente riduzione della crescita e della dimensione della colonia sia in presenza che in assenza di una fonte di azoto; in particolare, forti difetti di crescita sono stati osservati su MnSO_4 ad una concentrazione di 5 mM integrato con nitrato di ammonio, e FeSO_4 a concentrazione 2mM in presenza di nitrato di ammonio e, inoltre, sia in presenza che in assenza di nitrato di ammonio a 5mM (fig. 16).

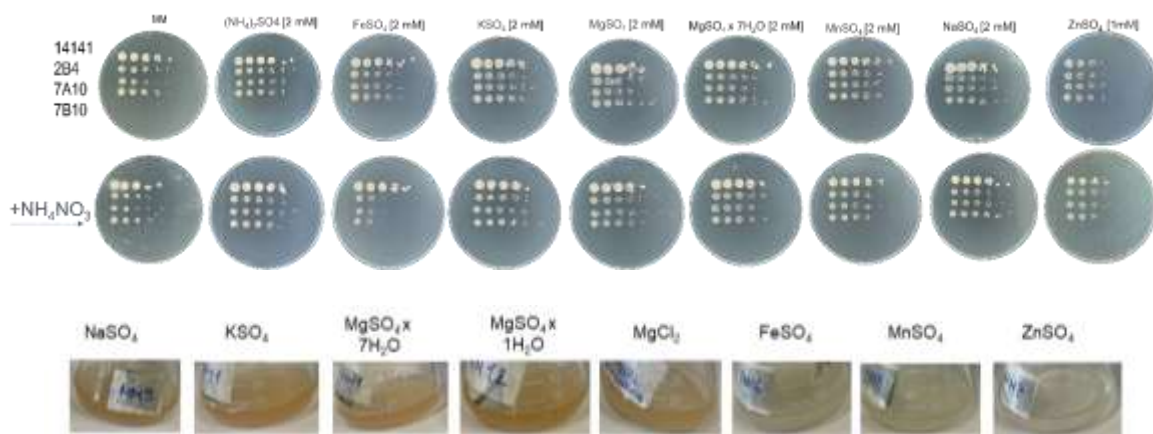


Fig. n. 16: A) vengono riportate le prove effettuate in piastra dove 2B4 ed i mutanti *sul1* Δ (7A10 e 7B10) sono stati spottati su MM con solfati; B) sono mostrate le sospensioni cellulari di *M. furfur* CBS14141 con le diverse fonti di solfato e la loro pigmentazione. Si noti come solfato di ferro, solfato di manganese e solfato di zinco abbiano una scarsa pigmentazione, quasi impercettibile

Il substrato MM è stato usato senza l'aggiunta di solfato nel caso dell'analisi fenotipica per il gene *Sul1*, sostituendo il costituente MgSO_4 con MgCl_2 . Disponendo del wild type *M. furfur* CBS14141 come controllo, è proprio questo il caso in cui è emerso che esso è in grado di pigmentare in maniera più intensa in presenza di solfato, più blanda invece in sua assenza.

L'analisi fenotipica è stata ripetuta in MM, e la condizione con glucosio, triptofano e MgSO_4 ha portato in evidenza un aumento significativo della produzione di pigmenti, chiaramente visibile dal terzo giorno di incubazione.

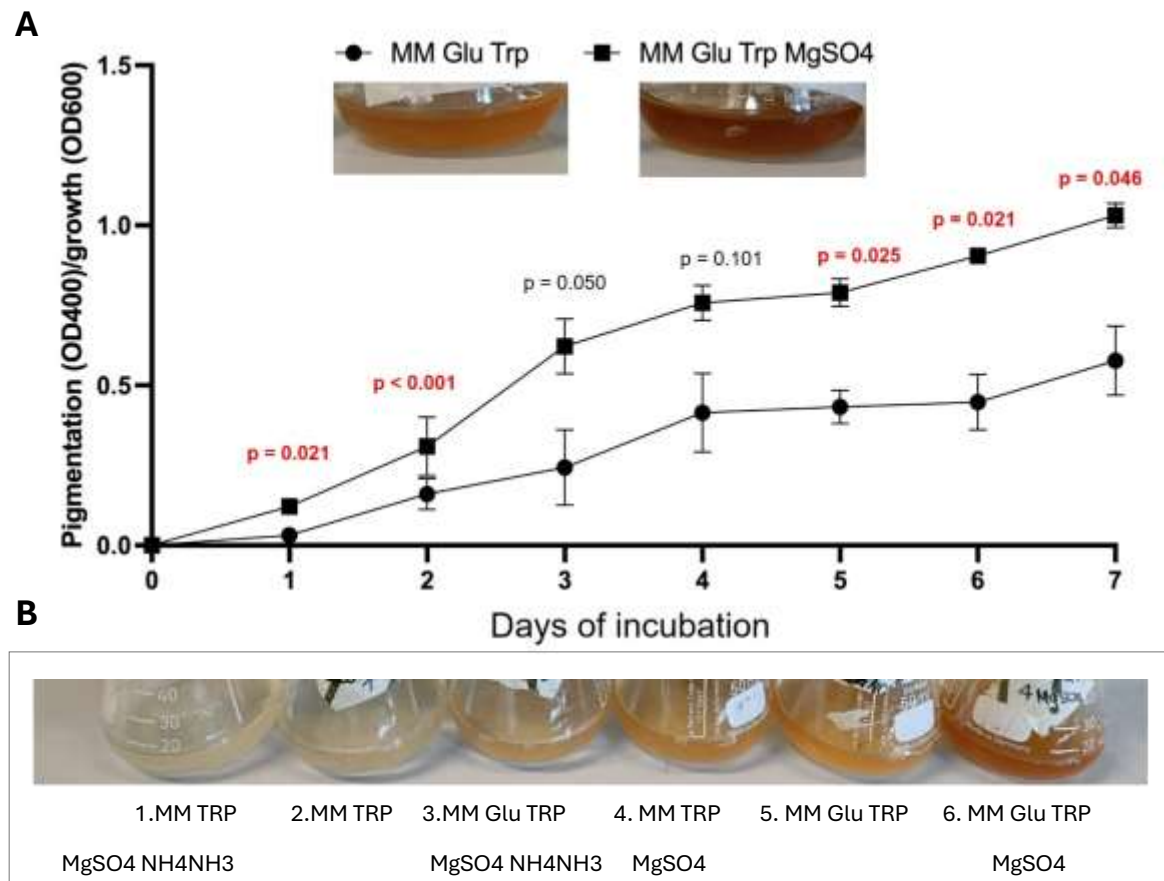


Fig. n. 17: A) il grafico mostra come dal terzo giorno di incubazione di *M. furfur* CBS14141 con e senza solfato sia possibile riscontrare una differenza di pigmentazione tra i substrati; B) si può notare come la presenza dell'ammonio sfavorisca la pigmentazione, e come questa sia invece intensificata in presenza di glucosio, triptofano e solfato in *M. furfur* CBS14141.

In liquido, altre fonti di solfato sono state saggiate per il wild type in MM con triptofano [0.5 mg/ml], con e senza glucosio, sostituendole a MgSO_4 . Con glucosio si può notare che NaSO_4 induce la massima pigmentazione (espressa come OD_{400}), seguita da KSO_4 , MgSO_4 -eptaidrato e MgSO_4 monoidrato; i valori di pigmentazione ottenuti per FeSO_4 sono simili a quelli ottenuti nel

mezzo di controllo senza solfato, mentre MnSO_4 e ZnSO_4 non favoriscono la pigmentazione, come si evince dal grafico sotto riportato (fig. 18).

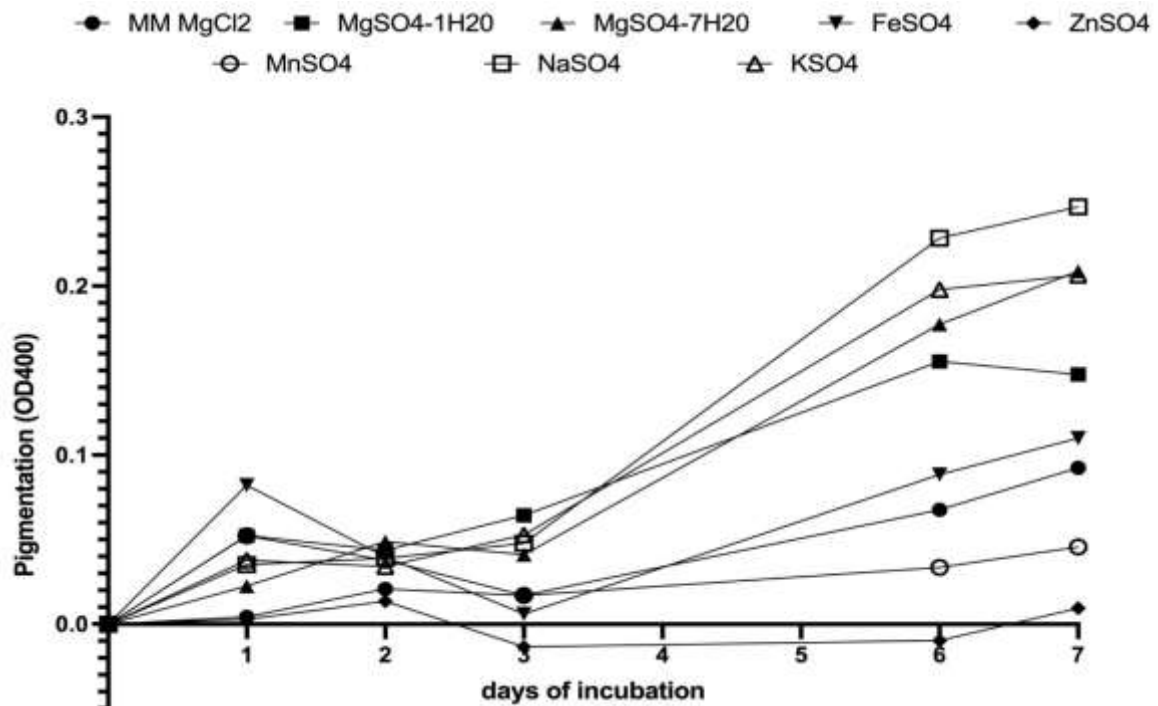


Fig. n. 18: è riportato il grafico relativo alla misurazione della pigmentazione di *M. furfur* CBS14141 in presenza di diversi fonti di solfato. La minore pigmentazione si ha in presenza di solfato di ferro, solfato di manganese e solfato di zinco.

9.7 Analisi fenotipica dei mutanti per *CPA1*

Un altro mutante inserzionale selezionato per la ridotta capacità di formare pigmenti è il ceppo 1G1, sul cui genoma risulta un'inserzione sul gene *CPA1* che codifica per la piccola subunità dell'enzima carbamoil fosfato sintetasi: essa si occupa di legare la glutammina per permettere che la subunità più grande, codificata dal gene *CPA2*, possa ricavarne il gruppo ammidico che catalizza la formazione di carbamoil fosfato.

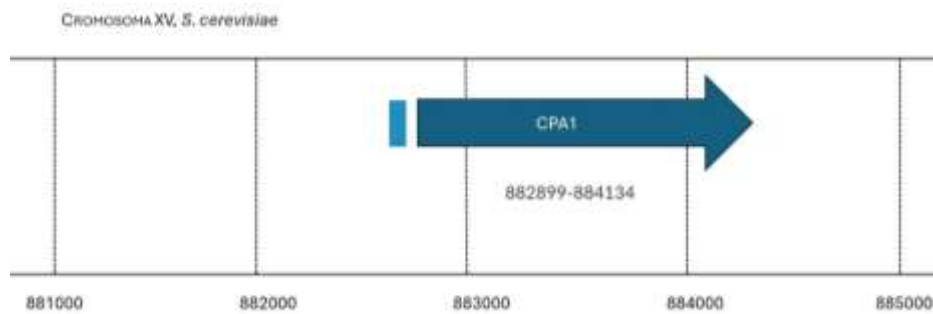


Fig. n. 19: il gene CPA1 si trova sul cromosoma XV di *S. cerevisiae*.

Esso è presente come intermedio nel ciclo dell'arginina (fig. 20), mentre proprio in presenza di arginina vengono repressa trascrizione e traduzione del gene CPA1 tramite sistema feedback (SGD database).

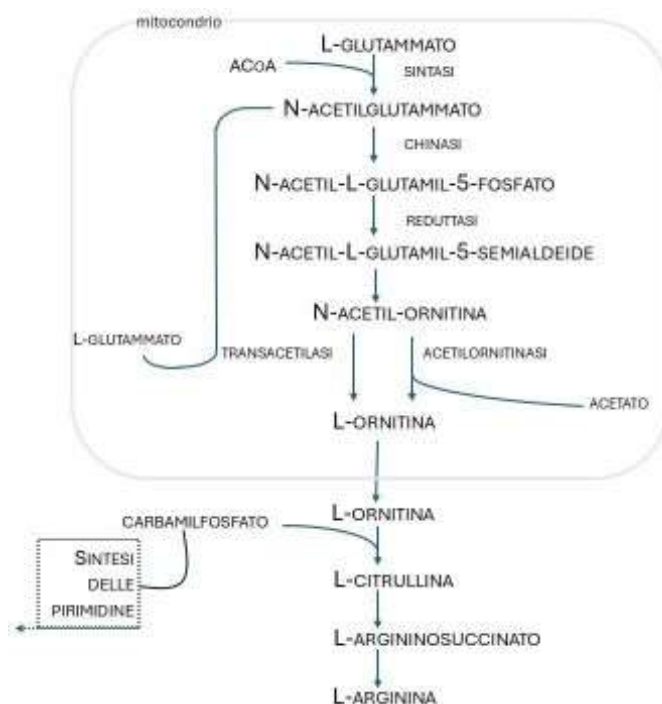


Fig. n. 20: viene illustrato il ciclo dell'arginina, nel quale il carbamilfosfato è utilizzato non solo per la sintesi di arginina ma anche delle pirimidine (Shambaugh, 1979; Agnes Abadijeva, 2001).

Nell'organismo modello *S. cerevisiae* questo gene è riportato come regolatore di circa dieci fattori di trascrizione, tra cui alcuni che influenzano la risposta

all'arginina, la ammino acid starvation, alcuni geni coinvolti nella glicolisi, nella biosintesi della metionina, nella trascrizione e nel silenziamento.

Per comprendere il coinvolgimento del gene CPA1 nella produzione di pigmenti in *M. furfur*, l'approccio seguito è stato quello di porre il ceppo mutante in substrati che presentassero degli intermedi presenti nel ciclo dell'arginina, immediatamente seguenti e precedenti al carbamoil fosfato, con lo scopo di valutarne la crescita ed il ripristino del fenotipo pigmentante.

Dopo diversi giorni di crescita si è potuto notare che la crescita del mutante è più lenta rispetto al wild type in tutte le condizioni testate (fig. 21).

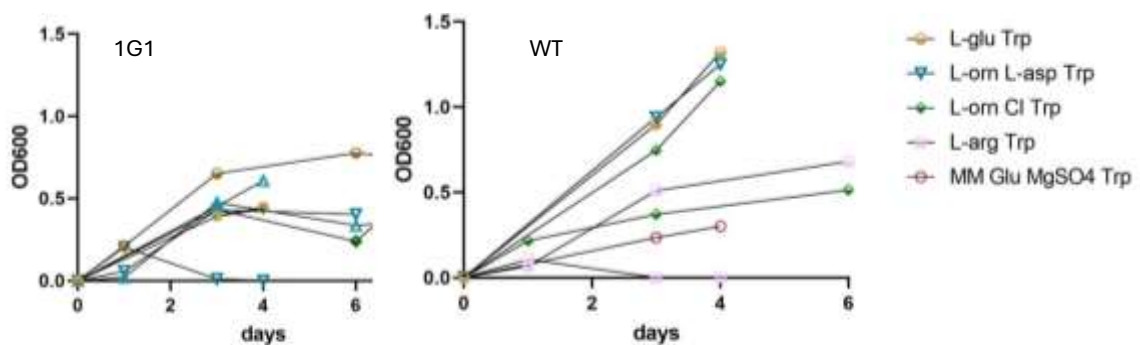


Fig. n. 21: si riporta la crescita misurata tramite densità ottica ad OD=600 del mutante(a sinistra) rispetto al wild type (a destra). Si noti come quella del mutante sia minore.

Si è visto che il mutante è in grado di pigmentare in una sola condizione in cui il wild type è non pigmentante o è poco pigmentante dopo meno di sette giorni, cioè quando posto in L-ornitina cloridrata con triptofano (fig. 22 C); tuttavia, seppure in maniera leggermente più blanda, il mutante è in grado di pigmentare anche se posto in L-citrullina con triptofano ed in L-glutammina con triptofano, anche se la colorazione diventa apprezzabile solamente al giorno nove, mentre non è stata osservata pigmentazione in MM con L-ornitina L-aspartato e triptofano.

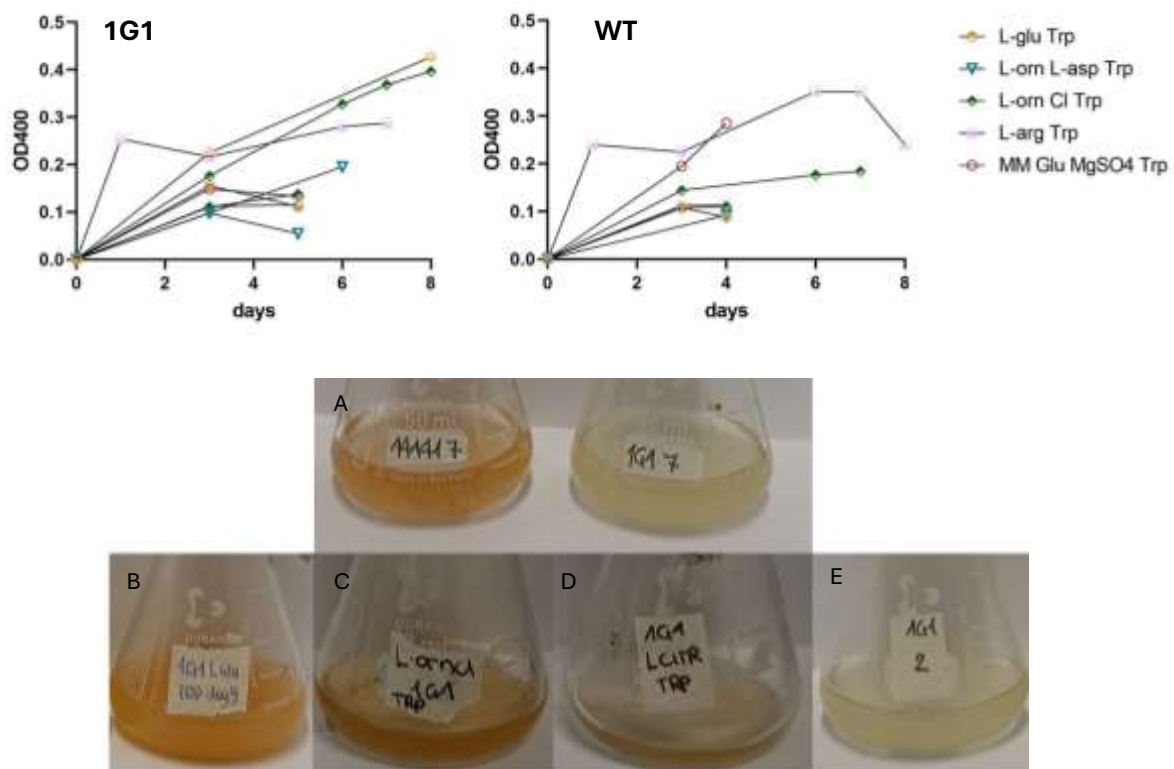


Fig. n. 22: il pannello in alto riporta il grafico relativo alla pigmentazione misurata tramite OD400 in presenza degli amminoacidi citati, a sinistra 1G1, a destra il wild type; il pannello in basso mostra le sospensioni cellulari del mutante in grado di pigmentare: mentre in MM con triptofano il mutante non è in grado di pigmentare, al contrario del wild type (A), esso pigmenta in MM con L-glutammina con triptofano (giorno 9, B), in L-ornitina cloridrata (giorno 7, C) ed in L-citrullina con triptofano (giorno 7, D). Rimane incapace di pigmentare in MM con L-ornitina L-aspartato e triptofano (giorno 7, E).

Inoltre, nell'organismo modello *S.cerevisiae*, la trascrizione e la traduzione del gene CPA1 sono repressi in presenza di arginina. Nel mutante il gene non è presente, quindi aggiungendo arginina non si attua alcuna repressione; nel wild type, invece, la presenza di arginina non ha mostrato pigmentazione (fig. 23): se questo dovesse essere successo per via della repressione di CPA1, potrebbe confermare l'importanza del gene (e, dunque, del suo sottoprodotto) nella produzione di indoli.



Figura n. 23: la figura mostra le sospensioni cellulari del wild type a sinistra e del mutante 1G1 a destra in MM con L-arginina ed L-triptofano. In entrambi non risulta essere visibile pigmentazione.

Capitolo decimo

DISCUSSIONE

M. furfur è un costituente tipico del micobiota umano e dei mammiferi, riscontrato in condizioni di equilibrio omeostatico e, più spesso, di patogenesi. Nel presente lavoro sono stati posti in analisi alcuni dei geni coinvolti nella produzione di indoli tipica della specie *M. furfur*, questi ultimi ipotizzati essere coinvolti nella interazione ospite-patogeno. Essi derivano dall'utilizzo dell'amminoacido L-triptofano e, quando vengono prodotti, si riscontra una pigmentazione visibile, sia delle cellule che del substrato in cui esse si trovano.

Dapprima, le condizioni di pigmentazione sono state analizzate tramite l'uso di diversi substrati e due ceppi di *M. furfur*, CBS1878 e CBS14141. Tuttavia, quest'ultimo è risultato il più adatto allo studio data la sua aploidia; per i substrati invece, mDixon-mp è risultato ideale, ed è stato affiancato dal substrato minimo MM al fine di indagare il ruolo dei singoli nutrienti. Il triptofano è stato analizzato come fonte di azoto e/o carbonio, concludendo che esso viene maggiormente utilizzato quando costituisce l'unica fonte azotata nel mezzo. A conferma di ciò, il microrganismo è stato posto in Minimal Media e solo in presenza di glucosio come fonte di carbonio e

triptofano come fonte di azoto è stata ottenuta una notevole pigmentazione.

Le condizioni di pigmentazione, tuttavia, sono state più ampiamente analizzate e, sebbene in presenza di MM con nitrato di ammonio ed L-triptofano non si ha una pigmentazione, questo succede invece nel caso in cui nel mezzo sia presente L-triptofano e solfato di ammonio oppure citrato di ammonio, suggerendo che probabilmente potrebbe essere il nitrato ad interferire con il processo. È stata inoltre verificata la pigmentazione nel wild type in presenza di ulteriori fonti amminoacidiche quali metionina, cisteina, glutammina, ornitina e aspartato, ornitina cloridrata, citrullina ed arginina, riscontrando una costante assenza di pigmentazione.

Nel presente studio, inoltre, sono state testate le condizioni di pigmentazione dapprima in MM con solfati, e successivamente senza. In effetti, la migliore produzione di pigmenti nel wild type si è potuta osservare con l'uso di solfato.

Il coinvolgimento genico nel meccanismo di pigmentazione è stato successivamente studiato avvalendosi della tecnica AMT per effettuare mutagenesi inserzionale sul ceppo aploide e pigmentante CBS 14141 della specie *M. furfur*. I numerosi trasformanti ottenuti sono stati sottoposti ad uno screening nel quale sono stati individuati diversi mutanti non pigmentanti;

due di essi, 1G1 e 2B4, sono stati sottoposti e confermati tramite ulteriori test fenotipici.

In particolare, la ridotta capacità pigmentante del trasformatante inserzionale 2B4 per il gene Sul1 è stata confermata tramite la creazione di un mutante target indipendente per lo stesso gene e il ruolo dello stesso gene Sul1 nella pigmentazione è stato più largamente studiato.

Poiché esso è un gene predetto codificante l'enzima solfato-permeasi, si è pensato di testare l'abilità dei mutanti Sul1 di utilizzare fonti di zolfo organiche ed inorganiche in presenza o assenza di una fonte di azoto, quale nitrato di ammonio: i dati fenotipici confermano che Sul1 è un trasportatore di solfuro, solfato e dei due aminoacidi contenenti zolfo, metionina e cisteina, ma non di anidride solforosa e solfito. La domanda a cui rispondere è come Sul1 sia coinvolto nella produzione di pigmenti in *M. furfur*.

Il mutante si è riconfermato incapace di pigmentare anche dopo dieci giorni. La comparazione tra la produzione di pigmenti del mutante target per Sul1, denominato 7A10, e quella del wild type CBS14141 lascia chiaramente intendere che il ruolo del gene Sul1 è fondamentale per la produzione di indoli e, dunque, il trasporto e l'utilizzo di zolfo, specie sottoforma di solfati. Dalle analisi effettuate, si è evinto che Sul1 non è un trasportatore di solfito e metabisolfito, al contrario di quanto è emerso per solfuro, solfato ed

amminoacidi solforati. Ciononostante, si è visto che solamente i primi due (solfato e solfuro) concorrono alla pigmentazione.

Infatti, la presenza di solfato in MM con triptofano favorisce la produzione di pigmenti, anche se le differenze tra il media con e senza solfato raggiungono significatività statistica solo dal terzo giorno di incubazione. Anche l'utilizzo di diverse fonti di solfato può influenzare la pigmentazione, probabilmente a causa di un più o meno agevole utilizzo del solfato quando complessato ad un altro composto (ad esempio, solfato di zinco, che non riporta difetti di crescita ma neanche pigmentazione, piuttosto che solfato di sodio, potassio oppure magnesio, i quali hanno promosso una buona produzione di pigmenti) oppure ad un probabile effetto simil-tossico (come nel caso di solfato di manganese con nitrato di ammonio, che sfavorisce la crescita) o inibitorio.

Successivamente, il mutante 1G1 che riporta una delezione sul gene codificante la subunità piccola della carbamil fosfato sintasi (un gene coinvolto nel ciclo dell'arginina), è stato sottoposto a verifiche fenotipiche.

Dalle prove è emerso che il mutante, a differenza del wild type, è in grado di pigmentare se sono presenti nel substrato i composti amminoacidici che nel ciclo dell'arginina vengono prodotti immediatamente prima o dopo

l'attivazione della carbamil fosfato sintasi. In particolare, l'ornitina cloridrata e la citrullina hanno dato buoni risultati in termini di pigmentazione (in

commercio, infatti, non è disponibile la forma pura dell' L-ornitina, ma complessata con L-aspartato oppure diidrossicloruro; per questo, si può supporre che nella condizione in cui il mutante viene posto in L-ornitina con L-aspartato, potrebbe essere la presenza di due amminoacidi a rallentare il catabolismo del triptofano e la produzione di pigmenti, come più volte mostrato in questo lavoro). Un'ulteriore verifica si rende necessaria sull'espressione di CPA1 del wild type in presenza di L-arginina e della sua pigmentazione in tale condizione, in quanto questo amminoacido sembra inibire la trascrizione genica di CPA1.

La crescita più lenta riscontrata nel mutante 1G1 in tutte le condizioni verificate potrebbe essere giustificata dal fatto che il carbamoil fosfato è anche un intermedio per la biosintesi delle pirimidine; pertanto, senza di esso il microrganismo è costretto a trovare delle vie secondarie di sintesi investendo più energia a discapito della crescita.

Per concludere, si rimarca l'importanza della parte aromatica ricavata dall'utilizzo del triptofano ed utilizzata per il catabolismo degli indoli (viene riportato che la stessa porzione aromatica è sovente ritrovata in composti riscontrati in analisi di metabolomica e in composti di usuale interazione con AhR), così come l'importanza della presenza di solfati che intensificano questo fenomeno. Ulteriori studi sono necessari in termini di biochimica, non

essendo ancora conosciuto il pathway di produzione indolica, ed in termini di espressione genica per capire quanti e quali geni intervengano nel processo, al fine di poter trattare le eventuali patologie in maniera adeguata.

Riferimenti

- Aayushi Uberoi, C. B.-M. (2021). Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Host Microbe*, 1235-1248.
- Adriana Marcela Celis Ramírez, A. A.-C.-M. (2020). Analysis of Malassezia Lipidome Disclosed Differences Among the Species and Reveals Presence of Unusual Yeast Lipids. *Cellular and Infection Microbiology*.
- Agnes Abadijeva, K. P. (2001). A New Yeast Metabolon Involving at Least the Two First Enzymes of Arginine Biosynthesis -ACETYLGLUTAMATE SYNTHASE ACTIVITY REQUIRES COMPLEX FORMATION WITH ACETYLGLUTAMATE KINASE. *Metabolism and Bioenergetics*, 276:46, 45869-42880.
- Agnes Abadijeva, K. P. (2001). A new yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis - Acetylglutamate synthase activity requires complex formation with acetylglutamate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 246 (46): 42869-80.
- Amend, A. (2014). From Dandruff to Deep-Sea Vents: Malassezia-like Fungi Are Ecologically Hyper-diverse.
- Anuradha Chowdhary, J. P. (2014). Black Molds and Melanized Yeasts Pathogenic to Humans. *CSH perspective*.
- Aristea Velegeaki, C. C. (2015). Malassezia Infections in Humans and Animals:Pathophysiology, Detection, and Treatment. *PLOS Pathogens*, 11: 1-6.
- Ayhan M, S. B. (2007). Colonization of neonate skin by Malassezia. *Journal of American Academy of Dermatology*, 57: 1012-1018.
- Bart Theelen, C. C. (2018). Malassezia ecology, pathophysiology,. *Medical Mycology*, s10-s25.
- Bart Theelen, V. M. (2022). Multiple Hybridization Events Punctuate the Evolutionary Trajectory of Malassezia furfur. *mBio*, 13:2 1-19.
- Berk Aykut, S. P. (2019). The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature* , 264-267.
- Bernier V, W. F. (2002). Skin colonization by Malassezia. *Archives of Dermatology*, 138: 215-218.
- Bruno Lamas, J. M. (2018). Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunology*, 11:4 1024-1038.
- Celis AM, W. H. (2017). Malassezia spp. beyond The Mycobiota. *SM Dermatology Journal*.
- Chui Bon Tee, Y. S. (2019). Secreted Hydrolytic and Haemolytic Activities of Malassezia Clinical Strains. *Mycopathologia*, 184: 227-238.

- Claudia Cafarchia, R. B. (2011). Advances in Identification of Malassezia. *Molecular and Cellular Probes*, 1-7.
- Fiorella Ruchti, P. Z.-L. (2024). Epidermal barrier impairment predisposes for excessive growth of the allergy-associated yeast Malassezia on murine skin. © 2024 The Authors. *Allergy published by European Academy of Allergy and Clinical Immunology and John Wiley & Sons Ltd*.
- Gabriella Pini, E. F. (2011). Extracellular phospholipase activity of Malassezia strains isolated from individuals with and without dermatological disease. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(4): 179-182.
- Gaitanis GMagiatis P, H. M. (2012). The Malassezia Genus in Skin and Systemic Diseases. *Clinic Microbiology*.
- Gaitanis, G., Velegraki, A., Magiatis, P., Pappas, P., & Bassukas, I. (2011). Could Malassezia yeasts be implicated in skin carcinogenesis through the production of aryl-hydrocarbon receptor ligands? *Medical Hypothesis*, 77:1 0-51.
- Gelvin, S. B. (2021). Plant DNA Repair and Agrobacterium T-DNA Integration. *International Journal of Molecular Science*.
- George Gaitanis, A. V.-G. (2009). Malassezia furfur fingerprints as possible markers for human phylogeography. *ISME journal*, 3: 498-502.
- George Gaitanis, I. D. (2009). The range of molecular methods for typing Malassezia. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22:119–125.
- George Gaitanis, V. C. (2005). Novel Application of the Masson-Fontana Stain for Demonstrating Malassezia Species Melanin-Like Pigment Production In Vitro and in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*.
- George Gaitanis, P. M.-L. (2008). AhR Ligands, Malassezin, and Indolo[3,2-b]Carbazole are Selectively Produced by Malassezia furfur Strains Isolated from Seborrheic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128:7 1620-1625.
- Giusepp Ianiri, M. A.-L. (2020). HGT in the human and skin commensal Malassezia: A bacterially derived flavohemoglobin is required for NO resistance and host interaction. *PNAS*, 27: 117.
- Giusepp Ianiri, A. F. (2016). Gene Function Analysis in the Ubiquitous Human Commensal and Pathogen Malassezia Genus. *mBio*.
- Giusepp Ianiri, G. D. (2019). Advancing Functional Genetics Through Agrobacterium-Mediated Insertional Mutagenesis and CRISPR/Cas9 in the Commensal and Pathogenic Yeast Malassezia. *Genetics*, 212: 1163-1179.
- Giusepp Ianiri, J. H. (2020). Approaches for Genetic Discoveries in the Skin Commensal and Pathogenic Malassezia Yeasts. *Cellular and Infection Microbiology*.
- Giusepp Ianiri, S. L.-L. (2022). Malassezia: A Commensal, Pathogen, and Mutualist of Human and Animal Skin. *Annual Review of Microbiology*, 757-782.
- Giusepp Ianiri, S. L.-L. (2022). Malassezia: A Commensal, Pathogen, and Mutualist of Human and Animal Skin. *Annual Review of Microbiology*, 76: 757-782.

- Guangxi Wu, H. Z. (2015). Genus-Wide Comparative Genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology and niche adaption on human skin. *Genetics*.
- Gupta AKBoekhout T, T. B. (2004). Identification and Typing of *Malassezia* Species by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of the Internal Transcribed Spacer and Large-Subunit Regions of Ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*.
- H. Ruth Ashbee, E. G. (2002). Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* Species. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Hao Li, G. O. (s.d.). *Malassezia culture on modified Dixon media*. Tratto da <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjrakm2e>
- HoChul Yi, K. S. (2002). Expression of the Arabidopsis histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. *The Plant Journal*.
- Iniobong C. I. U., W. R. (2023). Understanding the role of *Malassezia* spp. in skin disorders: pathogenesis of *Malassezia* associated skin infections. *Medicine, Dentistry, Nursing and Allied Health Journal*, 1245-1257.
- Jeffrey D Orth, I. T. (2010). What Is Flux Balance Analysis? *Nature biotechnology*, 28: 245-248.
- Jianmin Fu, N. E. (2021). Optimizing Transformation Frequency of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Fungi*.
- Jose J. Limon, J. T. (2019). *Malassezia* Is Associated with Crohn's Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. *Cell Host and Microbe*, 377-388.
- Keisha Findley, J. O. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, 367-370.
- Khosravi, A., Shokri, H., & Fahimirad, S. (2015). Efficacy of medicinal essential oils against pathogenic *Malassezia* sp. isolates. *Journal of Medical Mycology*.
- Kim, J. P. (2001, 3). Head and neck dermatitis: the role of *Malassezia furfur*, topical steroid use and environmental factors in its causation. *Clinical and Experimental Dermatology*, p. 226-231.
- Laura Puig, M. R. (2017). Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar. *PLoS ONE*.
- Lilian I. Plotkin, I. M. (1998). Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A2: a potential pathophysiologic mechanism. *Mycologia*, 90: 163-169.
- Luigina Romani, T. Z. (2014). Microbiota control of a tryptophan–AhR pathway in disease tolerance to fungi. *European Journal of Immunology*, 44: 3192-32000.
- MA, G. (2000). Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology*.
- Marco A. Coelho, G. I.-P. (2023). Frequent transitions in mating-type locus chromosomal organization in *Malassezia* and early steps in sexual reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

- Marco A. Coelho, G.-P. (2023). Frequent transitions in mating-type locus chromosomal organization in *Malassezia* and early steps in sexual reproduction. *PNAS Genetics*, 120:32, 1-12.
- Masutaka Furue, M. T. (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Archives of Dermatological Research*, 306: 769-799.
- Matthew A Escobar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Cell press- Trends in Plant Science*, 8: 380-386.
- Meray, Y. G. (2018). Putting It All Together to Understand the Role of *Malassezia* spp. in Dandruff Etiology. *Mycopathologia*.
- Michael D. Kruppa, D. W.-H. (2009). Identification of (1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan as the major carbohydrate component of the *Malassezia sympodialis* cell wall. *Carbohydrate Research*, 2474-2479.
- Nagata R, N. H. (2012). Transmission of the major. *Pediatrics International*, 54: 350-355.
- P. Mayser, A. T.-J. (2004). Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses*, 34-39.
- Peter Mayer, A. I. (1998). Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res*, 290(5): 277-2882.
- Prokopios Magiatis, P. P. (2013). *Malassezia* Yeasts Produce a Collection of Exceptionally Potent Activators of the Ah (Dioxin) Receptor Detected in Diseased Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 113: 2023-2030.
- R. Gao, C. K. (2017). Dysbiosis signature of mycobiota in colon polyp and colorectal cancer. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2457- 2468.
- Richard, M. S. (2020). Overview of the Potential Role of. *Cellular and Infection Microbiology*.
- Rinaldo F. Gandra, R. C. (2006). Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. *Mycopathologia*, 162: 273-280.
- Ro BI, D. T. (2005). The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 10: 194-197.
- Rosa, D., Cristiana, S., Gabriella, P., & Rita, B. A. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Sergio Triana, H. d. (2017). Lipid Metabolic Versability in *Malassezia* spp. Yeasts Studied through Metabolic Modeling. *Frontiers Microbiology*.
- Shambaugh, G. E. (1979). Pyrimidine biosynthesis. *Comments in biochemistry*.
- Shelly Applen Clancey, Fiorella Ruchti, S. L.-L. (2020). A Novel Mycovirus Evokes Transcriptional Rewiring in the Fungus *Malassezia* and Stimulates Beta Interferon Production in Macrophages. *Hoste- Microbe Biology*, 11: 1-18.
- Sirida Youngchim, J. D. (2013). The Role of L-DOPA on Melanization and Mycelial Production in *Malassezia Furfur*. *PLOS*.

- Sundar Ram Sankaranarayanan, G. I.-R. (2020). Loss of centromere function drives karyotype evolution in closely related *Malassezia* species. *Genetics and Genomics*.
- Teresa Zelante, R. G.-B. (2013). Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Cell Press Immunity*, 39: 372-385.
- Teresa Zelante, T. C. (2021). *Aspergillus fumigatus* tryptophan metabolic route differently affects host immunity. *Cell Reports*.
- Tsokyi Choera, T. Z. (2018). A Multifaceted Role of Tryptophan Metabolism and Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in *Aspergillus fumigatus*–Host Interactions. *Frontiers Immunology*.
- Weerapong Juntachai, T. O. (2009). The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Medical Mycology*, 47: 477-484.
- Wissal Chebil, W. R. (2022). Virulence factors of *Malassezia* strains isolated from pityriasis versicolor patients and healthy individuals. *Medical Mycology*.

<https://www.yeastgenome.org/>

<https://www.uniprot.org/>