

Studi sull'organizzazione del genoma di « P. berghei » mediante clonaggio molecolare (**)

Ben poco è noto a livello molecolare sulla biologia di base del plasmodio e solo recentemente sono state applicate tecniche di clonaggio molecolare, in particolare allo scopo di ottenere l'espressione di antigeni specifici. Nella convinzione che l'elucidazione dei meccanismi fondamentali implicati nel differenziamento nelle varie forme del ciclo vitale del plasmodio possa portare ad altre vie di approccio al problema del controllo della malattia, il lavoro del nostro gruppo si è indirizzato verso due obiettivi principali:

- 1) Comprensione dell'evento molecolare che è alla base della gametogenesi.
- 2) Caratterizzazione di RNA messaggeri e di prodotti genici stadio-specifici.

Senza entrare nei dettagli sperimentali, che comportano l'uso di tecniche di DNA ricombinante, sarà qui data notizia del lavoro condotto su *Plasmodium berghei* considerato come un utile modello di laboratorio.

Per quanto riguarda il primo punto, il problema centrale è quello di interpretare in termini molecolari in che cosa consiste il « commitment » di alcune cellule a differenziare in gametociti, ovvero a divenire capaci di svolgere le varie funzioni specializzate che permettono la trasmissione attraverso il vettore, quali ecaflagellazione, fusione e formazione dello zigote, meiosi.

E' necessario premettere alcune conoscenze di base, emerse da studi più o meno recenti:

a) La produzione di gametociti — sia « in vivo » che « in vitro » — può essere modulata da fattori ambientali. E' stato osservato che la percentuale di gametociti attivi nella popolazione intraeritrocitaria viene indotta ad aumentare

(*) Istituto Superiore di Sanità.

(**) Relazione presentata alla «Giornata di studio sulla Malaria» (Roma, 23 settembre 1983).

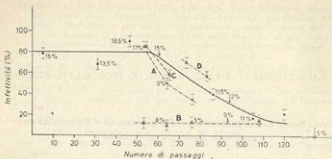


Fig. 1 — Diminuzione dell'infettività verso le zanzare (misurata dalla percentuale di zanzare che sviluppano oocisti a 13 giorni dal pasto di sangue su topini infettati meccanicamente) in funzione del numero d'ordine dei passaggi meccanici per il ceppo di *P. berghei* da noi utilizzato (●) e per diversi cloni puri da esso derivati (A(+); B(Δ); C(□); D(x)). I valori percentuali riportati accanto ai punti sperimentali indicano l'abbondanza relativa in DNA ripetitivo misurata mediante cinetiche di rinaturazione eseguite allo spettrofotometro in corrispondenza al numero di passaggi rilevabile dall'ascissa. Quando il saggio di infettività non è contemporaneo alla misura del contenuto in DNA ripetitivo, quest'ultimo è riportato con una freccia che indica il numero del passaggio corrispondente.

da fattori quali l'essaurimento del terreno di coltura [1], la presenza in esso di AMP ciclico [2], la presenza di anticorpi specifici [3]. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che il meccanismo differenziativo possa essere innescato da una funzione inducibile.

b) La capacità di infettare la zanzara viene perduta spontaneamente ed irreversibilmente a seguito di prolungata trasmissione meccanica (per inoculazione di sangue infetto da ospite vertebrato a ospite vertebrato). Appare cioè che in assenza della pressione selettiva esercitata dal passaggio per zanzara, la funzione che innesca il differenziamento in gametociti venga perduta irreversibilmente.

c) Studi eseguiti con cloni puri di plasmodi derivati da popolazioni in attivo differenziamento (e quindi infettive per la zanzara) rivelano che una singola forma asessuata può ridare origine all'intera serie di forme del ciclo vitale, compresi i gametociti dei due sessi [4]. Le forme asessuate devono quindi contenere l'informazione genetica completa per le funzioni specifiche dei gametociti.

I nostri studi [5, 6] hanno preso il via dall'osservazione di un diverso contenuto in DNA ripetitivo nel genoma di *P. berghei* tra popolazioni intraseroitarie contenenti gametociti attivi e popolazioni non più infettive per la zanzara dopo prolungata trasmissione meccanica (più di 120 passaggi).

La figura 1 mostra come la perdita di infettività nei riguardi della zanzara sia accompagnata da una parallela diminuzione nell'abbondanza relativa del DNA ripetitivo. La correlazione tra i due parametri (infettività e contenuto in DNA ripetitivo) è evidenziata meglio in figura 2.

La frazione ripetitiva del DNA estratto dalla popolazione intraeritrocitaria ancora pienamente infettiva è stata da noi isolata e caratterizzata al microscopio

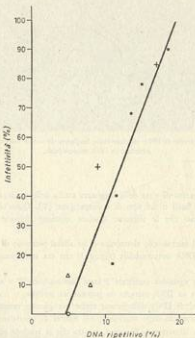


Fig. 2 — Le coppie di valori rilevabili dalla figura 1 per l'infettività nei riguardi della zanzara e per il contenuto in DNA ripetitivo in corrispondenza dello stesso passaggio sono qui riportati come coordinate dei punti che si riferiscono al ceppo non clonato (●) e ai cloni puri A(+) e B(△). Il coefficiente di correlazione valutato con limiti di confidenza del 95% è $0.92 \begin{matrix} +0.04 \\ -0.07 \end{matrix}$.

La retta calcolata con il metodo dei minimi quadrati su questi punti estrapola ad un valore di DNA ripetitivo (~5%) vicino a quello di un ceppo non più infettivo (○).



Fig. 3 — Una molecola di DNA circolare della lunghezza di $\sim 11\mu$; osservata in preparazioni arricchite in DNA mitocondriale.

elettronico dal punto di vista della lunghezza media delle sequenze ripetute (400-1400 coppie di basi) e del tipo di intersperzione [7]. Quest'ultima è risultata elevata, nel senso che le sequenze ripetute appaiono disperse lungo tutto il genoma.

Il lavoro al microscopio elettronico ci ha altresì permesso di evidenziare [7] la presenza di DNA mitocondriale (figura 3) che era stata messa in dubbio da alcuni Autori.

La frazione ripetitiva purificata è stata marcata con ^{32}P e saggata per ibridazione specifica su DNA estratto da popolazioni infettive e non infettive [8]. Tali preparazioni di DNA differiscono anche per piccole variazioni nel profilo elettroforetico ottenuto dopo digestione con enzimi di restrizione.

Il risultato, illustrato in Figura 4, mostra che la frazione ripetitiva presente nel DNA della popolazione infettiva è non solo più abbondante, ma anche diversamente distribuita rispetto a quanto si osserva nel DNA della popolazione non più infettiva. In quest'ultimo caso infatti la sonda ripetitiva marcata riconosce solo pochi, ben determinati, frammenti di restrizione, mentre nel caso della popolazione infettiva si ha una distribuzione assai più ampia e variata della frazione ripetitiva nell'ambito del profilo di restrizione.

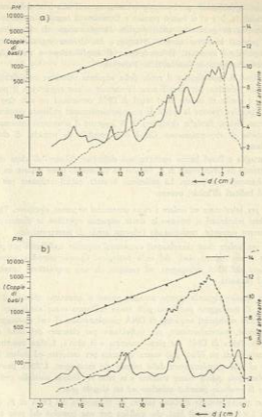


Fig. 4 — Le linee tratteggiate indicano il profilo di restrizione (misurato dall'intensità di fluorescenza lungo il gel elettroforetico colorato con bromuro di etidio) per DNA da popolazione infettiva (a) e DNA da popolazione non infettiva (b) digeriti con l'enzima di restrizione *Hae* III. Le linee continue indicano il profilo di ibridazione della sonda ripetitiva su « Southern blots » degli stessi gel elettroforetici, rivelato per via autoradiografica. La scala a sinistra riporta i pesi molecolari (P.M., espressi in coppie di basi) che corrispondono alla posizione (d) lungo il gel, espressa in cm., per mezzo della curva di taratura ricavata da un DNA di riferimento.

I dati sperimentali qui brevemente riassunti, visti alla luce delle considerazioni iniziali (a, b e c) ci hanno portato a formulare il seguente modello: il differenziamento in gametociti attivi implica l'amplificazione di determinate sequenze presenti in minor numero di copie e con diversa organizzazione anche nella popolazione asessuata. Il meccanismo di amplificazione e riarrangiamento può essere innescato da una funzione inducibile.

Al fine di approfondire il ruolo delle sequenze ripetitive amplificate nella popolazione infertiva, per identificarne l'eventuale azione regolatrice, il passo da compiere è quello di isolare brevi tratti di DNA contenenti un solo tipo di sequenza ripetitiva (mentre la sonda da noi precedentemente utilizzata contiene probabilmente diverse famiglie ripetitive), e di leggerne il contenuto informativo con tecniche di sequenziamento. Ciò è reso possibile da tecniche di clonaggio molecolare.

Battaglia e Pozzi hanno costruito una collezione (library) di cloni ricombinanti partendo da DNA totale di *P. berghei* ed utilizzando come vettore un fago λ opportunamente manipolato. La collezione è stata quindi utilizzata per i due obiettivi indicati all'inizio, ovvero:

- 1) per selezionare ed isolare i cloni contenenti sequenze ripetitive. Tra i diversi cloni selezionati si trovano le stesse sequenze ripetitive in almeno tre diversi intorni genomici, confermando l'elevato grado di intersperzione.
- 2) per isolare cloni ricombinanti contenenti sequenze codificanti per proteine espresse a determinati stadi del ciclo biologico. Questa metodica presuppone l'estrazione dell'RNA messaggero, ad esempio, da una popolazione intraeritrocitaria del parassita.

Per quanto riguarda questo secondo punto è necessario chiarire il procedimento. Il messaggero purificato può essere utilizzato come sonda per identificare i cloni contenenti sequenze di DNA complementari ai vari messengeri presenti, nonché, successivamente, per individuare per ciascuno dei cloni selezionati qual'è l'elica di DNA che viene trascritta « in vivo ». L'elica trascritta, immobilizzata su di un filtro, può essere utilizzata per catturare ed isolare il messaggero ad essa complementare dalla miscela dei messengeri. L'RNA messaggero così isolato può quindi essere tradotto « in vitro »: diviene possibile così caratterizzare il prodotto proteico associato ad un singolo gene.

Con questo metodo abbiamo isolato un frammento del DNA di *P. berghei* di circa 5×10^3 coppie di basi, che codifica per una proteina dal peso molecolare apparente di 32.500 dalton, espressa durante la fase intraeritrocitaria del plasmodio. La sequenza codificante (lunga ~ 900 coppie di basi) è fiancheggiata da sequenze ripetute del tipo descritto in precedenza.

Il lavoro sperimentale continuerà da un lato utilizzando le tecniche di sequenziamento per decifrare i messaggi ripetitivi; dall'altro attraverso l'analisi dell'organizzazione del genoma di *P. berghei* allo stadio di sporozoita allo scopo di saggiare il modello di amplificazione proposto. L'idea è quella di identificare

il momento del ciclo vitale in cui si ha la riduzione alla configurazione genomica corrispondente alle forme asessuate.

Per spiegare con un meccanismo di riarrangiamento del genoma il differenziamento in forme sessuate di un organismo come il plasmodio in cui riproduzione sessuata e asessuata si alternano senza il mantenimento di una linea germinale stabile, occorre infatti che il meccanismo di riarrangiamento ipotizzato sia reversibile.

BIBLIOGRAFIA

- [1] CARTER R. and MILLER L.H. (1979) - « Bull. WHO », suppl. 1, 37-52.
- [2] KAUSHAL D.C., CARTER R., MILLER L.H. and KRISHNA G. (1980) - « Nature », 286, 490-492.
- [3] SQUALLEY M.E. and BROWN J. (1979) - « Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. », 73, 316-317.
- [4] WALLIKER D. (1976) - In « Genetic aspects of host parasite relationship » Symposia of the British Society for Parasitology, Taylor A.E.R. & Muller R. eds. Vol. 14, pp. 25-44, Oxford.
- [5] DORE E., BRAGO C., FRONTALI C. and BATTAGLIA P.A. (1980) - « Mol. Biochem. Parasitol. », 1, 199-208.
- [6] BRAGO C., BUCCI A., DORE E., FRONTALI C. and ZENONI P. (1982) - « Mol. Biochem. Parasitol. », 6, 1-12.
- [7] DORE E., FRONTALI C., FRATACANGELI S. and FORTE T. (1983) - « Mol. Biochem. Parasitol. », 8, 339-352.
- [8] DORE E., FRONTALI C., BRAGO C. and PICCI L. (1983) - « Mol. Biochem. Parasitol. », in press.