



Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA
XVIII Ciclo (A.A. 2002-2005)

**STUDI SUL MECCANISMO DI AZIONE DEL
FARMACO ANTIPARASSITARIO
PRAZIQUANTEL**

ANNA RITA TROIANI

DOCENTI GUIDA

Prof. Maurizio Brunori
Dipartimento di Scienze Biochimiche
"A. Rossi Fanelli"
Università degli Studi di Roma
"La Sapienza"

Dott. Piero Liberti
Istituto di Biologia Cellulare
Consiglio Nazionale delle Ricerche

COORDINATORE

Prof. Paolo Sarti
Dipartimento di Scienze Biochimiche
"A. Rossi Fanelli"
Università degli Studi di Roma
"La Sapienza"

DOCENTI ESAMINATORI

Prof. Giorgio M. Giacometti
Dipartimento di Biologia
Università di Padova

Prof.ssa Luciana Avigliano
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Prof. Massimiliano Coletta
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

1 - INTRODUZIONE	4
1.1 - Premessa	5
1.2 - Gli schistosomi	5
1.3 - Patologia della schistosomiasi.....	8
1.4 - Terapia.....	9
1.5 - Farmaco-Resistenza.....	10
1.6 - Praziquantel.....	10
1.7 - Canali del calcio.....	12
1.8 - Struttura dei canali	13
1.9 - Classificazione dei canali.....	16
1.10 - Subunità beta dei canali del calcio.....	18
1.11 - I canali del calcio e il citoscheletro.....	19
2 - MATERIALI E METODI	21
2.1 - Materiale parassitario di partenza -Schistosomi.....	22
2.2 - Preparazione di RNA e cDNA.....	22
2.3 - Northern Blots.....	23
2.4 - PCR, Clonaggio, Sequenze ed Espressione.....	25
2.5 - Peptidi sintetici.....	27
2.6 - Immunizzazione del coniglio per la produzione di anticorpi.....	28
2.7 - Preparazione di estratti totali di parassiti.....	28
2.8 - Western Blot.....	28
2.9 - Inclusioni in paraffina.....	29
2.10 - Immunofluorescenza.....	29
2.11 - Colture di schistosomi <i>in vitro</i>	29
3 - RISULTATI	30
3.1 - Sequenze di canali del calcio di schistosomi sensibili e resistenti al PZQ.....	31
3.1.1 - Le subunità β dei canali del calcio hanno la stessa sequenza in schistosomi più o meno sensibili al PZQ.....	31
3.1.2 - Le subunità β dei canali del calcio sono ugualmente espresse in schistosomi adulti più o meno sensibili al PZQ.....	33
3.1.3 - Le subunità β dei canali del calcio sono ugualmente espresse in schistosomi maturi e immaturi.....	34
3.2 - Immunolocalizzazione di canali del calcio in schistosomi sensibili e resistenti al PZQ	35

3.2.1 - Produzione e caratterizzazione di anticorpi verso la subunità β di <i>Schistosoma</i>	35
3.2.2 - Utilizzazione degli anticorpi anti-subunità β per l'immuno-localizzazione della proteina.....	38
3.3 - Influenza dei classici calcio-inibitori sull'attività del PZQ.....	39
3.4 - Influenza della struttura del citoscheletro sull'attività del PZQ.....	40
4 - DISCUSSIONE	43
5 - BIBLIOGRAFIA	47
6 - PUBBLICAZIONI	51
7 - RINGRAZIAMENTI	53

1 - INTRODUZIONE

1.1 - Premessa

La schistosomiasi è una malattia parassitaria che affligge oggi nel mondo 200 milioni di persone nelle regioni tropicali e sub-tropicali [1]. Per la sua importanza in termini numerici e di gravità clinica, è considerata la seconda malattia parassitaria umana dopo la malaria. L'infezione viene trasmessa tramite un mollusco acquatico che funge da ospite intermedio e viene contratta in seguito all'esposizione per pochi minuti della cute intatta alle acque infette [2]. Il numero di persone affette da schistosomiasi è tutt'altro che in diminuzione dal momento che le condizioni climatiche e i programmi di irrigazione attuati nei paesi in via di sviluppo per incrementare l'agricoltura, ma anche le condizioni di vita degli abitanti (abitudini, mancanza di servizi igienici), facilitano il contatto di uomini con l'acqua e quindi con le forme infettanti dei parassiti, facendo sì che l'uomo rappresenti la principale fonte di diffusione del parassita.

La schistosomiasi umana è causata da tre specie principali di parassiti: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium*.

1.2 - Gli schistosomi

Schistosoma mansoni (Phylum Platyhelmintha, Classe Trematoda, Sottoclasse Digenea, Ordine Strigeatida, Famiglia Schistosomatidae, Genere *Schistosoma*) è assieme a *S. japonicum*, *S. haematobium* e altre specie di minore importanza numerica (*S. mekongi*, *S. intercalatum*, *S. mathei*) l'agente eziologico della schistosomiasi.

Gli adulti di *S. mansoni* e *S. japonicum* vivono nelle vene mesenteriche, quelli dello *S. haematobium* vivono invece nelle vene del plesso vescicale. Dal punto di vista sistematico gli schistosomi sono (come abbiamo detto) dei trematodi digenei. La caratteristica principale che distingue questi parassiti dagli altri trematodi è la divisione dei sessi messa in evidenza da uno spiccato dimorfismo sessuale (Fig.1).

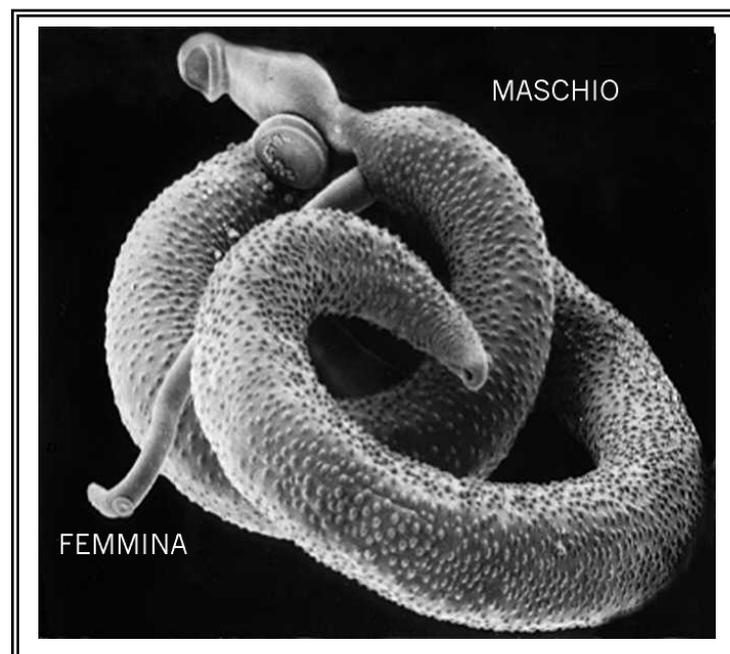


Fig. 1 - Immagine al microscopio elettronico di una coppia di *S. mansoni* adulti.

Il maschio (7-12 mm di lunghezza) infatti, avvolgendosi come una doccia sull'asse longitudinale del corpo, forma il cosiddetto canale ginecoforo nel quale alloggia la femmina (10-17 mm di lunghezza) (Fig.2). Per mezzo delle ventose (orale e ventrale) del maschio, gli adulti accoppiati vivono attaccati alle pareti dei vasi sanguigni e depongono un gran numero di uova.

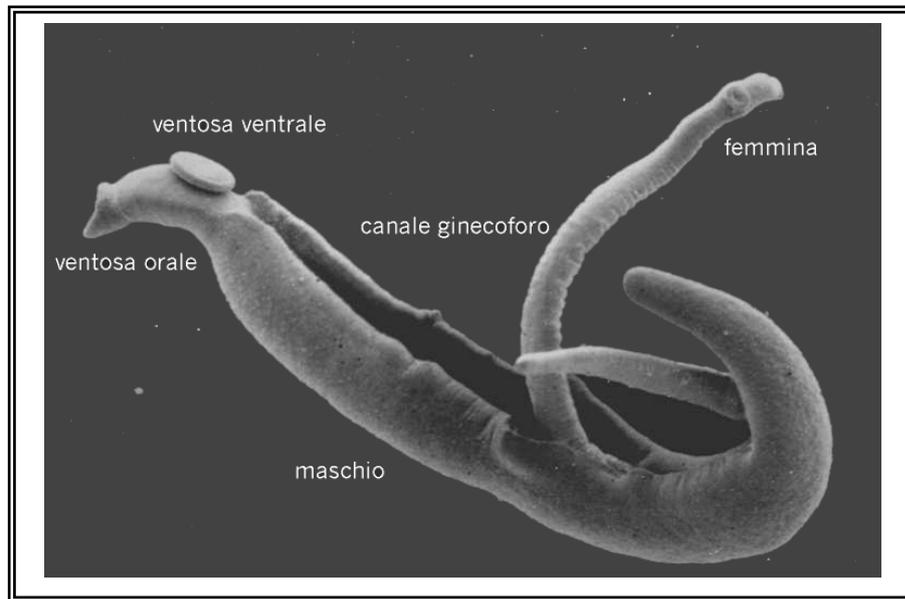


Fig. 2 - Coppia di *S. mansoni* adulti.

Nel caso di *S. mansoni* la produzione media è di un uovo ogni cinque minuti. Le uova degli schistosomi (0,1 mm di lunghezza) posseggono una spina che è caratteristica per ogni specie (Fig.3). La funzione della spina è probabilmente quella di aiutare le uova stesse ad avanzare nelle venule ove sono state deposte, fino a raggiungere, dopo aver digerito i tessuti circostanti con l'aiuto di enzimi litici, il lume delle cavità intestinale o vescicale, al fine di pervenire nel mondo esterno.

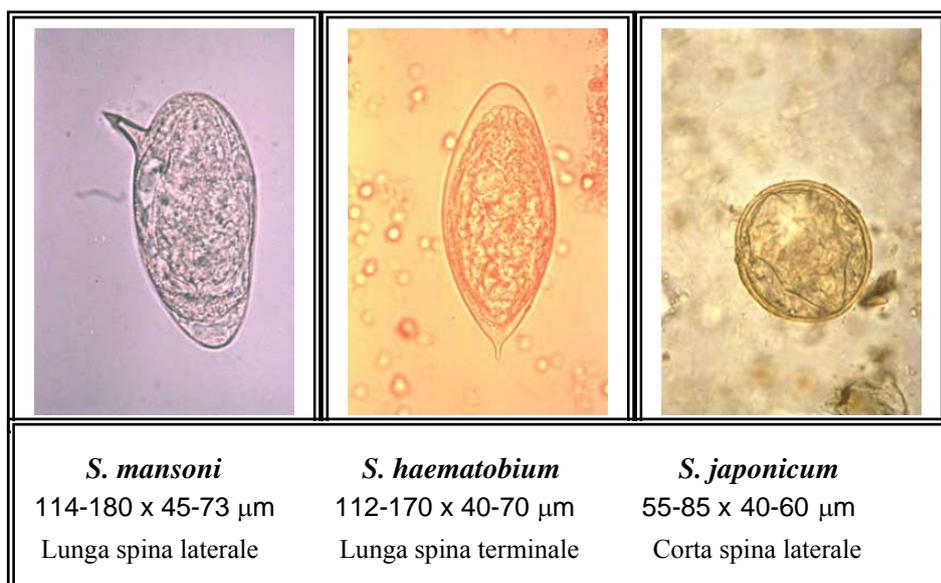
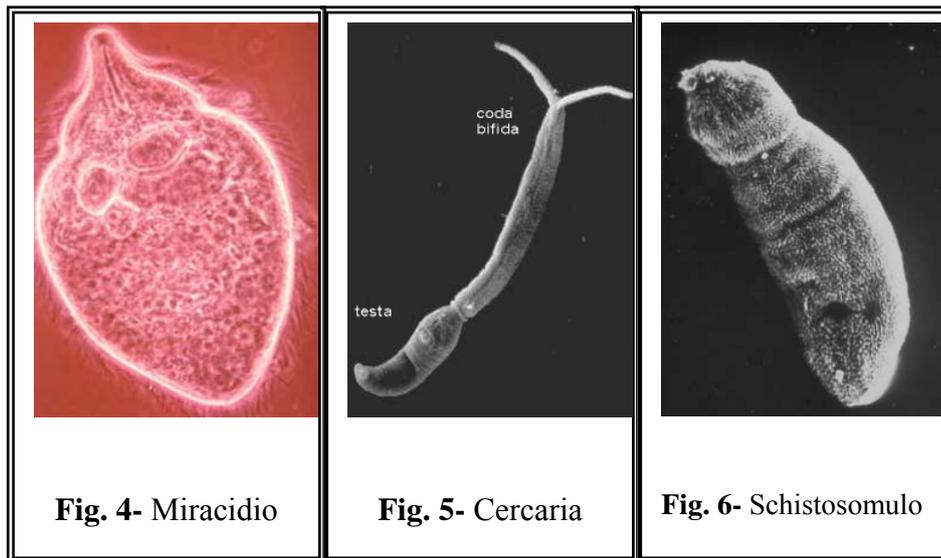


Fig. 3 - Uova di diverse specie di schistosoma.

E' da rilevare peraltro che molte uova (la metà circa) non riescono a raggiungere il lume intestinale o vescicale e vengono trasportate dalla corrente sanguigna al fegato. Se le uova, eliminate con le feci o con le urine, vengono a trovarsi in un ambiente ipotonico, quale ad esempio l'acqua dolce di un fiume, ad una temperatura di almeno 10°C ed in presenza della luce, si schiudono liberando una larva ciliata detta miracidio (Fig.4).

Il miracidio ha una vita di poche ore, durante la quale nuota attivamente e, guidato probabilmente da meccanismi chemiotattici, va alla ricerca dell'ospite intermedio, un mollusco gasteropode di specie diversa a seconda della specie elmintica in questione (*Biomphalaria* spp. nel caso dello *S. mansoni*).



Penetrato con l'ausilio di enzimi litici nel tegumento del mollusco, il miracidio si trasforma in una sporocisti primaria nella quale le cellule germinali si differenziano in sporocisti secondarie o sporocisti figlie. Dopo circa un mese, a seguito di questo processo moltiplicativo, si liberano dal mollusco (sotto lo stimolo della luce e ad una temperatura dell'acqua non inferiore ai 20°C) decine di migliaia di cercarie per ogni miracidio penetrato. Queste larve, costituite da una testa a cui segue una coda bifida, nuotano liberamente nell'acqua e possono vivere fino a 48 ore (Fig.5). Se in questo periodo di tempo trovano l'ospite definitivo (ad esempio l'uomo) scaricano il secreto di alcune ghiandole che producono enzimi istolitici e penetrano attraverso la pelle, perdendo la coda. I parassiti, detti adesso schistosomuli (Fig.6), dopo una permanenza di un giorno o due nei tessuti sottocutanei, raggiungono attraverso il torrente circolatorio i polmoni. Da questa sede, ritornano al cuore e con il sangue sistemico arrivano nelle vene mesenteriche ove raggiungono la maturità sessuale ed iniziano la deposizione delle uova. Il ciclo biologico dello *S. mansoni* (Fig.7) può essere facilmente mantenuto in laboratorio utilizzando come ospite intermedio il mollusco adatto (*Biomphalaria glabrata*) e come ospite definitivo il topo.

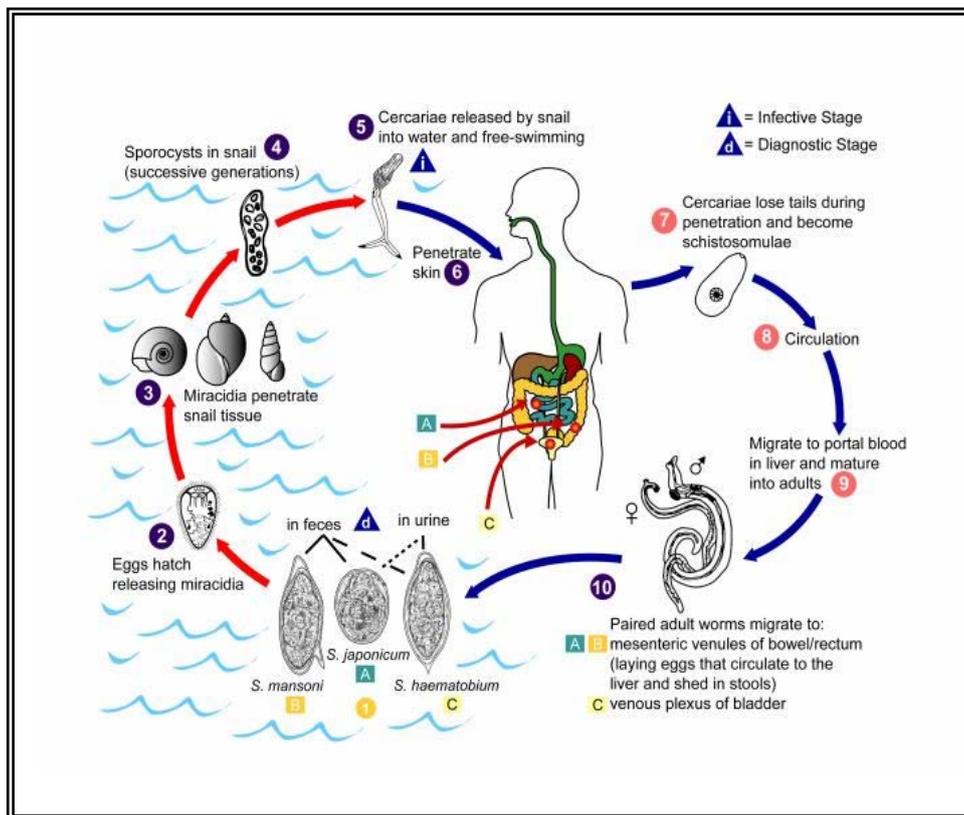


Fig. 7 - Ciclo biologico degli schistosomi.

1.3 - PATOLOGIA DELLA SCHISTOSOMIASI

La schistosomiasi è diffusa in 74 paesi nel mondo ed è una delle poche malattie parassitarie in fase di espansione. In particolare lo *S. mansoni* è diffuso nella quasi totalità dell'Africa e in Sud America; lo *S. haematobium* in Africa ed in Medio Oriente; lo *S. japonicum* in Cina, Filippine e in alcune isole del sud est asiatico (Fig.8).

Va innanzitutto ricordato che nella schistosomiasi come in quasi tutte le parassitosi, l'entità delle manifestazioni cliniche e dei relativi danni è proporzionale al numero dei parassiti in causa e alle reazioni individuali dell'ospite. Di conseguenza, nella stragrande maggioranza dei casi (90%), la malattia può decorrere per molti anni in forma asintomatica. L'azione patogena degli schistosomi è imputabile quasi esclusivamente alla grande quantità di uova che depongono. Soltanto una parte delle uova riesce a raggiungere le feci (o le urine) e con esse l'esterno; un gran numero resta invece intrappolato nelle pareti intestinali, altre ancora vengono trasportate dal sangue portale al fegato. Le uova bloccate nei tessuti non danno luogo ad alcuna reazione sino a che, al sesto giorno dopo l'ovodeposizione, i miracidi in esse contenuti raggiungono la maturità ed iniziano ad eliminare, attraverso i pori del guscio, delle secrezioni che vengono a contatto con i tessuti circostanti. Le reazioni dell'ospite contro le uova e contro le secrezioni prodotte dai miracidi sono complesse e coinvolgono soprattutto meccanismi di immunità cellulare, portando alla formazione di tipiche reazioni locali (granulomi) caratterizzate dall'accumulo e dalla proliferazione di eosinofili, monociti, fibroblasti, linfociti, neutrofili e plasmacellule. Alla distruzione delle uova segue un processo di riparazione con calcificazione e formazione di un tessuto cicatriziale.

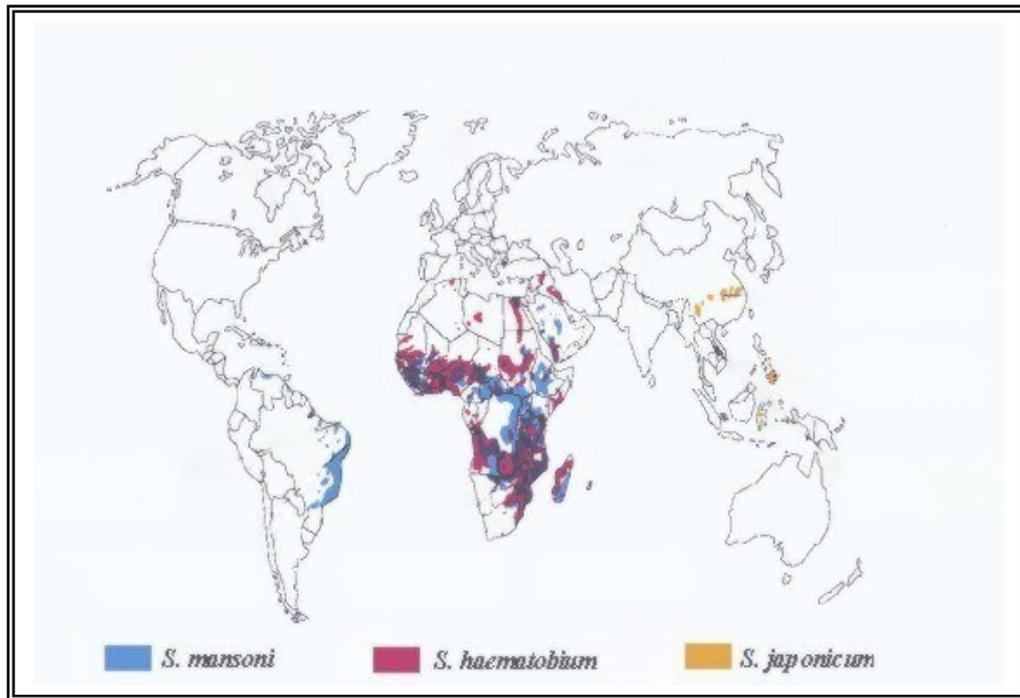


Fig. 8 - Diffusione della schistosomiasi nel mondo.

Ciò porta ad una progressiva fibrosi del tessuto epatico e quindi ad una alterazione della sua funzione; inoltre il flusso sanguigno attraverso il tessuto fibroso risulta ostacolato e si ha un progressivo aumento della pressione nel sistema portale; il sopraggiungere di ipertensione portale produce spesso un accumulo di liquido sieroso nella cavità addominale (ascite). La schistosomiasi è chiaramente una malattia debilitante e come tale ha effetti più gravi nelle popolazioni con carenze nutritive.

1.4 - TERAPIA

La prevenzione della schistosomiasi è assai problematica, in quanto non esiste un vaccino (le cui prospettive di sviluppo sono incerte e comunque molto lontane), mentre i programmi di miglioramento igienico e di educazione sanitaria si scontrano inevitabilmente con le precarie condizioni economiche dei paesi in cui la schistosomiasi è endemica.

L'unico strumento per il controllo della malattia consiste quindi nel trattamento chemioterapico.

Esistono attualmente due farmaci per la schistosomiasi: l'oxamniquina, che è attiva solo contro lo *S. mansoni*, e il praziquantel che è attivo contro tutte le specie del parassita [3]. Anche se i due farmaci sono ugualmente efficaci nelle infezioni da *S. mansoni*, la maggiore versatilità del praziquantel ha promosso quest'ultimo a farmaco di elezione e ne ha aumentato la richiesta e la produzione. Grazie alla competizione commerciale così instaurata, il prezzo del praziquantel è oggi abbastanza contenuto (circa US\$ 0.3 per trattamento), mentre il costo per l'oxamniquina si è mantenuto a livelli molto più elevati, la sua domanda è drasticamente diminuita ed è possibile che la sua produzione venga interrotta [4].

Il risultato è che, per una malattia che affligge 200 milioni di persone, disponiamo praticamente di un unico presidio terapeutico: questa è una situazione molto pericolosa dal

momento che qualunque farmaco anti-infettivo ha una vita limitata dall'inevitabile emergenza di organismi farmaco-resistenti.

1.5 - FARMACO-RESISTENZA

Anche per il praziquantel, quindi, la minaccia di farmaco-resistenza è oggi incombente, visto che esistono ormai numerose segnalazioni di ceppi di schistosoma con diminuita sensibilità al farmaco [5]. Un primo allarme di mancata efficacia del praziquantel è arrivato nel 1994 dal Senegal, dove solo il 20-30% degli individui trattati risultava curato, mentre tale percentuale è di solito dell'80-90% [6]. La particolare intensità dell'infezione nel focolaio senegalese in esame ha poi suggerito che gli insuccessi potevano essere legati, in gran parte, alle eccezionali condizioni epidemiologiche (elevato numero di parassiti, rapida reinfezione, ecc.), ma resta il fatto che schistosomi isolati da questo focolaio e mantenuti in laboratorio hanno in effetti dimostrato una minore sensibilità al farmaco [7]. Un secondo allarme è poi giunto dall'Egitto, dove pazienti refrattari al trattamento venivano trattati altre due volte con il praziquantel e, se ancora positivi, si isolava il corrispondente ceppo di schistosoma e se ne saggiava in laboratorio la sensibilità al farmaco. Con questo procedimento sono stati ripetutamente isolati ceppi di schistosoma che manifestano una parziale insensibilità al praziquantel [8]. Un terzo tipo di evidenza, infine, è stato raccolto in un laboratorio inglese dove un ceppo inizialmente sensibile è stato sottoposto in generazioni successive a pressione selettiva con dosi crescenti di praziquantel e si è osservato che già al settimo passaggio (circa 1,5 anni) gli schistosomi risultanti mostravano una minore suscettibilità all'azione del farmaco [9].

È quindi evidente che sarebbe molto importante poter interpretare le basi biochimico-molecolari della resistenza a un farmaco prezioso come il praziquantel, sia per produrre analoghi del farmaco in grado di superare la resistenza, sia per capire quali possibilità possiede il parassita per proteggere i propri bersagli. Nel caso del praziquantel, lo studio della resistenza presenta una ulteriore attrattiva, in quanto il meccanismo d'azione del farmaco stesso è ancora sconosciuto [10] e ci sono precedenti esperienze in cui l'analisi della resistenza è risultata essenziale per la comprensione dei meccanismi d'azione [11].

1.6 - PRAZICUANTEL

Il praziquantel (Fig.9) è oggi il farmaco più importante nella cura della schistosomiasi, in virtù delle seguenti caratteristiche:

- è altamente efficace contro tutte le specie di schistosoma ed anche contro i cestodi;
- presenta scarsi effetti collaterali sia a breve che a lungo termine;
- ha un costo di produzione competitivo;
- viene somministrato come singola dose orale.

Lo studio dei composti con nucleo pirazino-isoquinolinico fu iniziato alla Merck in un piano di ricerca di farmaci tranquillanti. All'inizio degli anni '70 furono evidenziate proprietà antielmintiche in alcuni di questi composti e più di 400 (tra cui il praziquantel) furono sintetizzati e saggiati dalla Bayer.

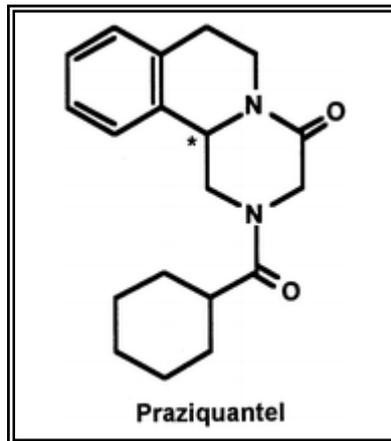


Fig. 9 - Struttura del praziquantel (PZQ).

I primi tentativi d'utilizzo clinico della molecola avvennero nel 1979 in Brasile su pazienti infettati da *S. mansoni*, in Zambia su pazienti infettati da *S. haematobium* e nelle Filippine su pazienti infettati da *S. japonicum* [12].

Questi tests dimostrarono un'elevata efficacia del farmaco e una sua alta tollerabilità.

Il trattamento standard, oggi raccomandato, consiste nella somministrazione di una singola dose orale di 40mg/kg per *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. intercalatum*, mentre per *S. japonicum* la dose raccomandata è di 60 mg/kg.

Anche se ignoriamo il meccanismo d'azione del praziquantel, sono note alcune caratteristiche del suo effetto sugli schistosomi.

Diversi studi sulla molecola hanno rilevato che il gruppo oxo in posizione 4 è essenziale per l'attività del farmaco; inoltre qualunque modificazione dello scheletro ad anelli ne abolisce l'attività.

Poiché il praziquantel possiede un centro chirale nella posizione 11b (*asterisco), la sostanza attualmente usata in terapia è in realtà una miscela racemica di due stereoisomeri di cui, da esperimenti condotti sia *in vivo* che *in vitro*, è stato dimostrato che solo il laevo-enantiomero possiede attività schistosomicida [13]. L'assorbimento del praziquantel dopo la somministrazione orale è un processo rapido e la massima concentrazione nel siero è raggiunta nell'arco di 1-2 ore.

L'eliminazione del farmaco avviene sostanzialmente nelle urine (più dell'80%) ed in minor misura nelle feci ed è praticamente completa nel giro di 48 ore.

Un'altra caratteristica dell'azione schistosomicida del praziquantel consiste nella sua dipendenza dall'età del parassita. Infatti gli schistosomi sono sensibili se l'ospite viene trattato poche ore o pochi giorni dopo l'infezione e divengono progressivamente meno sensibili (fino a raggiungere la quasi completa resistenza) tra la terza e la quarta settimana dall'infezione, per poi tornare ad essere completamente sensibili alla sesta settimana e per tutto il resto della loro vita adulta [14]. Questo andamento bifasico della suscettibilità al praziquantel ha conseguenze rilevanti dal punto di vista clinico [15], ma offre anche un interessante strumento sperimentale nello studio del farmaco. Si può infatti affermare che le forme immature del parassita (3-4 settimane) sono gli organismi che mostrano la più elevata refrattarietà all'azione del praziquantel, maggiore di quella sinora riscontrata in qualunque "mutante resistente" isolato da pazienti o selezionato in laboratorio [16].

Un effetto precoce del praziquantel consiste in alterazioni del tegumento dello schistosoma. Esperimenti *in vitro* [17], in cui i parassiti venivano trattati con concentrazioni di praziquantel paragonabili a quelle trovate nel sangue, hanno dimostrato che è il farmaco stesso, e non un suo metabolita, a causare la morte dei vermi. I vermi trattati *in vitro*

apparivano contratti e con il tegumento ulcerato, proprio come quelli osservati dopo trattamenti *in vivo*.

Alla somministrazione *in vivo* del farmaco segue infatti, nell'arco di un'ora, lo slittamento nel fegato (*S. mansoni* ed *S. japonicum*) dei vermi, che appaiono contratti e con tegumento vacuolizzato ed ulcerato. A seguito di questi processi, nel giro di circa quattro ore, vengono esposti all'esterno del parassita alcuni antigeni che sono normalmente nascosti. E' stato dimostrato che tali antigeni sono il bersaglio di una risposta immunitaria dell'ospite [18].

In effetti, l'attività del praziquantel risulta significativamente ridotta in animali immunodeficienti, ciò che dimostra una parziale immuno-dipendenza dell'azione farmacologica, nonostante che i parassiti muoiano comunque anche *in vitro* [19].

Un altro effetto immediato che si osserva negli schistosomi esposti al praziquantel, consiste in un massiccio afflusso di ioni calcio dal mezzo esterno verso l'interno del parassita. Probabilmente in concomitanza (e probabilmente in conseguenza) dell'afflusso di calcio, si assiste ad un generalizzato aumento della tensione muscolare che produce una intensa paralisi spastica e il distacco delle ventose del parassita dalla parete vascolare dell'ospite [20].

Sembra che l'azione del praziquantel sia strettamente legata ai meccanismi di omeostasi del calcio nel parassita. Un interessante supporto a tale ipotesi è stato fornito da studi che suggeriscono un coinvolgimento della subunità β dei canali del calcio voltaggio-dipendenti di *S. mansoni* e di *S. japonicum* nel meccanismo d'azione del farmaco [21].

1.7 - CANALI DEL CALCIO

I canali del calcio voltaggio-dipendenti risiedono nella membrana cellulare, si aprono in risposta a cambiamenti di voltaggio attraverso le membrane e permettono al calcio di fluire nella cellula. Questa corrente di calcio ha due conseguenze:

- 1) contribuisce alla propagazione del segnale elettrico nelle cellule eccitabili come quelle del sistema nervoso, del cuore e dei muscoli.
- 2) cambia il livello di calcio nella cellula.

La maggior parte delle cellule presenta una bassissima concentrazione di calcio nel citoplasma (tra 10 e 100nM). Mantenere una concentrazione così bassa è necessario in quanto nel citoplasma è presente una elevata concentrazione di fosfati, che fungono da depositi di energia: infatti, i fosfati di calcio sono altamente insolubili in soluzione acquosa e quindi precipiterebbero sotto forma di cristalli, danneggiando la cellula. Nel mezzo extracellulare, invece, la concentrazione di calcio è molto più elevata (circa 1mM) (Fig.10).

Per regolare la concentrazione di calcio citoplasmatico la cellula è dotata, appunto, di canali. Il calcio, quando si trova nella cellula in forma ionica libera (Ca^{2+}), è capace di stimolare potentemente svariati processi che vanno dall'attivazione di numerosi enzimi fosforilati che entrano nel metabolismo a particolari processi quali la contrazione muscolare, esocitosi ed endocitosi.

Quando questi processi non sono in atto spetta alla pompa il compito di mantenere costante la concentrazione del Ca^{2+} .

I canali presenti sulla membrana cellulare vengono regolati da stimoli di diversa natura (meccanici, chimici, elettrici). Questa regolazione di apertura e chiusura è cruciale per la formazione del potenziale d'azione nei nervi e del meccanismo di contrazione nei muscoli.

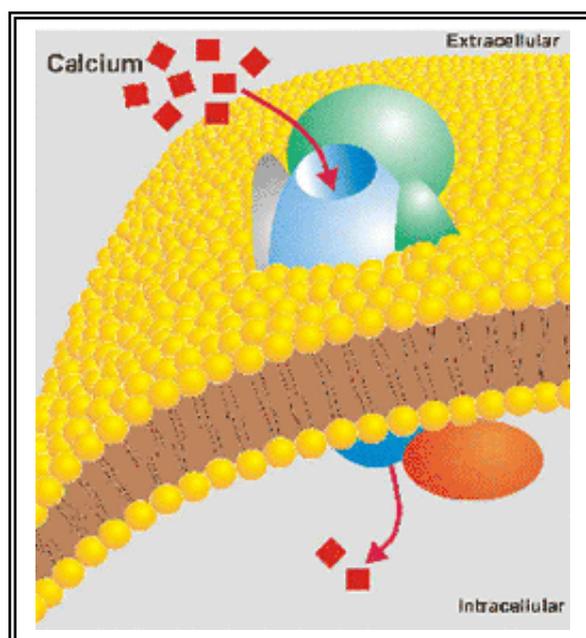


Fig. 10 – Rappresentazione schematica della regolazione della concentrazione citoplasmatica di ioni Ca^{2+} .

Una delle principali caratteristiche dei canali voltaggio-dipendenti è la natura bifasica della permeazione di ioni. Tali canali si aprono in risposta ad una depolarizzazione della membrana, permettendo di tradurre stimoli elettrici in variazioni di concentrazione del calcio citoplasmatico, il quale, appunto, deve essere bilanciato a causa della tossicità dovuta agli alti livelli intracellulari di tale ione. Poiché il calcio funge da secondo messaggero, questi canali sono essenziali per integrare le informazioni elettriche e chimiche a livello cellulare, regolando cioè una varietà di processi incluso la contrazione muscolare, che è appunto l'effetto riscontrato nei vermi adulti di schistosomi in presenza di PZQ.

1.8 - STRUTTURA DEI CANALI

I canali possono essere costituiti da una singola proteina (o subunità), ma per la maggior parte sono costituiti dall'associazione di una serie di differenti subunità proteiche in un complesso eteromultimerico.

La tipica architettura di tutti i canali è un poro che attraversa il doppio strato lipidico e che facilita il passaggio di milioni di ioni per secondo, determinando uno dei più efficienti mezzi che si sia evoluto per facilitare il movimento passivo di soluti e/o acqua attraverso la membrana cellulare. I canali, comunque, non sono pori statici. I piccoli cambiamenti conformazionali della struttura proteica di un canale determinano un meccanismo di apertura e di chiusura del canale, detto gating (Fig.11).

I canali eteromultimerici sono costituiti da una subunità funzionale principale, detta $\alpha 1$ che forma il poro ed esprime le funzioni di permeazione e gating. Le altre subunità (β , $\alpha 2$, γ e δ) disposte nel complesso del canale voltaggio-dipendente sono necessarie, in genere, per un normale funzionamento elettrofisiologico del canale stesso o per funzioni addizionali di regolazione.

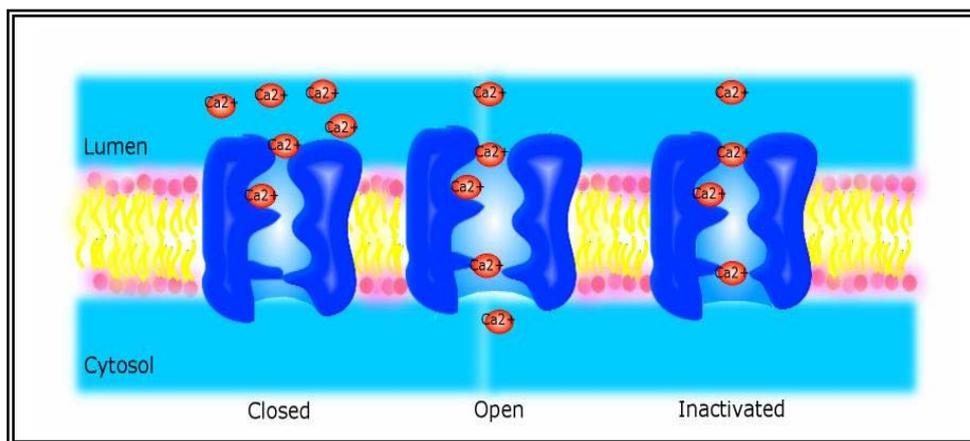


Fig. 11 – Schema degli stadi conformazionali dei canali del Ca^{2+} : chiuso, aperto ed inattivo.

Queste subunità presentano varie strutture. Possono attraversare la membrana lipidica una o più volte come le subunità α_1 o essere interamente citosoliche come nel caso della subunità β dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. Generalmente i ruoli per queste subunità non- α_1 includono:

- 1) la stabilizzazione del complesso del canale nella membrana;
- 2) la variazione del voltaggio nel canale;
- 3) stabilizzano o aumentano l'inattivazione (ad esempio la subunità β dei canali del K^+ voltaggio-dipendenti è richiesta per l'inattivazione del canale).
- 4) permettono il legame di alcune tossine o farmaci che bloccano il canale [22].

In particolare, il canale del Ca^{2+} è un complesso proteico eteromultimerico di membrana formato da 5 subunità. È costituito da un poro formato da una subunità α_1 , sensibile al voltaggio, modulata da subunità ausiliarie α_2 , β , δ e γ (Fig.12).

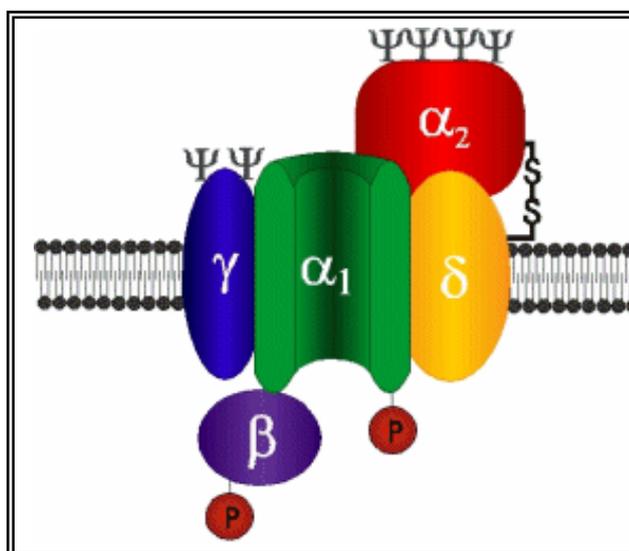


Fig. 12 – Complesso proteico eteromultimerico dei canali del Ca^{2+} formato da 5 subunità: una subunità α_1 , che forma il poro, e subunità ausiliarie α_2 , β , δ e γ .

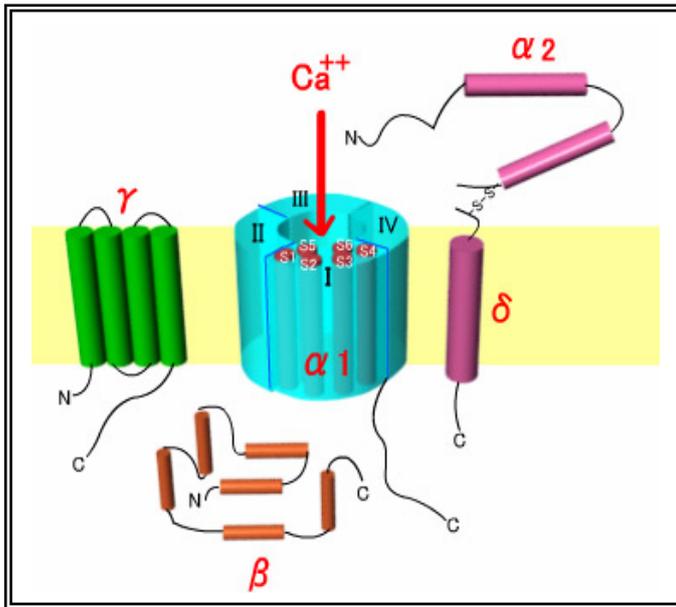


Fig. 13 – Schematizzazione della presunta disposizione dei quattro domini (di cui uno indicato in dettaglio) della subunità α_1 a formare la via di permeazione.

Dal punto di vista molecolare la subunità α_1 contiene 4 domini omologhi, uniti in una sola catena polipeptidica. Tali domini sono a loro volta costituiti da 6 segmenti transmembrana, S1-S6 (formati da α -eliche) (Fig.13).

L' α -elica S4 funge da sensore del voltaggio in quanto contiene residui carichi positivamente ad ogni 3a - 4a posizione, mentre la regione tra S5 e S6 costituisce il poro (Fig.14).

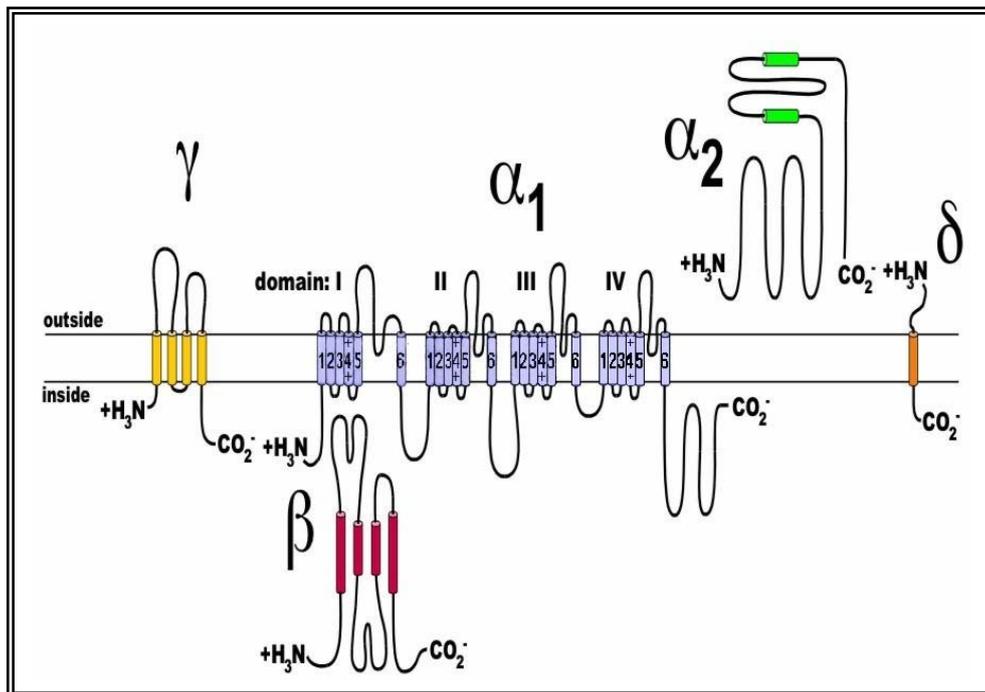


Fig. 14 – Rappresentazione dei canali del Ca^{2+} in cui sono indicati i 4 domini (I-IV) della subunità α_1 , suddivisi nei 6 segmenti transmembrana (S1-6). Le cariche positive indicate su S4 rappresentano i residui basici presenti ogni 3-4 posizioni in tale struttura, che appaiono responsabili della voltaggio-dipendenza del gating.

1.9 - CLASSIFICAZIONE DEI CANALI

I canali del calcio voltaggio-dipendenti sono stati classificati in base a vari criteri:

- il livello di depolarizzazione della membrana necessario per la loro attivazione (LVA o “low voltage activated”; HVA o “high voltage activated”);
- il tipo delle correnti di Ca^{2+} (L o “long lasting”; T o “transient”);
- le loro proprietà farmacologiche, cioè il tipo di sostanze capaci di bloccarne l’attività;
- la struttura della subunità $\alpha 1$ che forma il poro di permeazione ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, ecc.).

Una classificazione alquanto semplificata è presentata nella Tabella 1.

Voltaggio dipendenza	Tipo	Localizzazione	Calcio- antagonisti
HVA	L	Muscolo scheletrico Muscolo cardiaco Cellule endocrine Neuroni Retina	Diidropridine (DHP) Fenilalchilamine (PAA) Benzotiazepine (BZT)
	non L	Neuroni	ω - agatossina ω -conotossina
LVA	non L	Muscolo scheletrico Muscolo cardiaco Neuroni	Kurtossina

Tab. 1 - Classificazione dei canali del calcio nei vertebrati.

L’ultima colonna della Tab.1 riporta i farmaci che sono in grado di bloccare selettivamente l’entrata di Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti nella membrana plasmatica (inibitori dei canali del Ca^{2+}) [23]. Tali farmaci si legano a specifiche sequenze delle subunità $\alpha 1$ dei relativi canali, come schematicamente indicato nella Fig. 15 per i canali di tipo L. Maggiori dettagli sul sito di legame di questi farmaci sono riportati in Fig.16.

In *S. mansoni* sono state caratterizzati 3 tipi di subunità $\alpha 1$ (HVA). Una subunità $\alpha 1$ sembra molto simile ai canali di tipo L (SmCa_v1), mentre le altre due sembrano appartenere alla classe non L-type (SmCa_v2A e SmCa_v2B) [24]. Per quanto riguarda le possibili interazioni farmacologiche, la SmCa_v1 presenta conservati 6 dei 13 aminoacidi necessari nei mammiferi per l’interazione con le diidropiridine [25].

1.10 - SUBUNITÀ BETA DEI CANALI DEL CALCIO

Il meccanismo di azione del praziquantel è ancora sconosciuto, sebbene sia noto che gli effetti iniziali del farmaco includono un rapido afflusso di calcio nel parassita e una contrazione muscolare dipendente dal Ca^{2+} . I canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti possono rappresentare un possibile sito di azione del PZQ, e diversi studi si sono incentrati in particolare sulla caratterizzazione delle subunità β dei canali del calcio di *Schistosoma* e sulle loro interazioni con le altre proteine (Fig.17).

Sono state caratterizzate due subunità β di *S. mansoni*: $\text{SmCa}_v\beta 1$, caratteristica dello schistosoma; e $\text{SmCa}_v\beta 2$, simile alle subunità di mammifero. E' stata inoltre sequenziata una subunità β di *S. japonicum* ($\text{SjCa}_v\beta$). È stato dimostrato che le subunità $\beta 1$ di *S. mansoni* e la subunità β di *S. japonicum* sono molto dissimili da quelle di altre subunità β note, in quanto presentano delle sequenze e dei motivi strutturali che potrebbero essere alla base di importanti differenze tra i canali del calcio del parassita e quelli di mammifero.

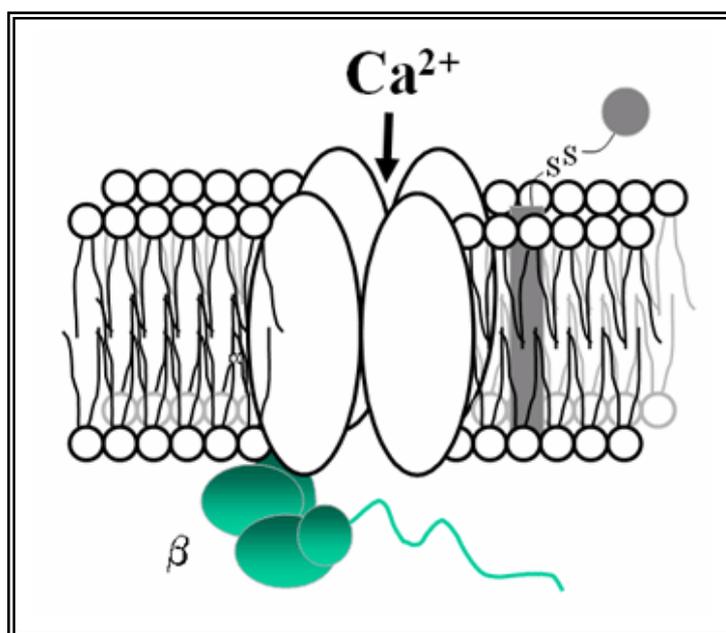


Fig. 17 – Subunità β dei canali del Ca^{2+} .

Se si confronta una subunità β di mammifero con le subunità di *Schistosoma*, si può notare che il gene del parassita ha una sequenza più lunga nella regione C-terminale ed ha importanti differenze nel BID: due residui di serina che rappresentano potenziali siti di fosforilazione, sempre altamente conservati nella proteina dello schistosoma sono sostituiti con altri residui [21]. Le differenze nella regione del BID sono riportate nella figura 18.

Quando le subunità β di *Schistosoma* sono state espresse in oociti di *Xenopus* insieme alle subunità $\alpha 1$ di mammifero, la corrente registrabile di base risultava diminuita, ma l'aggiunta anche di basse concentrazioni di PZQ produceva un aumentato passaggio di corrente. In altri termini, queste subunità β di schistosoma strutturalmente insolite erano capaci di conferire ai canali del calcio di mammifero una sensibilità al PZQ che non esiste normalmente per i canali di mammifero [21].

Inoltre, utilizzando la tecnica della mutagenesi sito-specifica sulla subunità $\beta 1$ di *Schistosoma*, si è visto che, se si ripristinano nelle sequenze di *Schistosoma* le serine di

consenso per la fosforilazione, le subunità di parassita non sono più in grado di conferire alcuna sensibilità al PZQ [24].

SmCav β 1	KKNEFVPPYEIVP	CMRPVVFVGP	ALKGYEVT	DMMQKAIFDA
SjCav β	KKNEFVPPYEIVP	CMRPVVFVGP	ALKGYEVT	DMMQKAIFDS
Rabbit β 1A	KKTEHVPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
Rat β 1B	KSTEHVPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
Human β 1c	KSTEHVPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
Human β 2a	KKTEHTPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
Rabbit β 2b	KKTEHTPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
Rat β 3	KQAEHVPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
Rat β 4	KVTEHIPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
<i>Drosophila</i>	KKQETASPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF
<i>C.elegans</i> -1	VQQENVPPYDVVP	SMRPIILVGP	SLKGYEVT	DMMQKALFDF

Fig. 18 – Sequenze aminoacidiche del Beta Interaction Domain (BID) di *Schistosoma* e di altre specie. I residui di serina che rappresentano potenziali siti di fosforilazione in altre specie, sono sostituiti da altri aminoacidi in *Schistosoma*.

D'altra parte, anche la subunità SmCa ν β 2, che è simile alle subunità di mammifero, è incapace di conferire sensibilità al PZQ.

Questi dati sono stati ulteriormente rafforzati da altri esperimenti in cui oggetto dell'analisi di mutagenesi è stata la subunità β di ratto che invece presenta le due serine conservate nel proprio BID. In questo caso infatti, inserendo in queste due posizioni gli aminoacidi presenti in *Schistosoma*, la subunità mutata di ratto è capace di produrre una sensibilità al PZQ altrimenti inesistente [26]. Questi dati quindi sembrano fortemente supportare l'ipotesi per cui la sensibilità al farmaco sia dovuta ad una diversa funzionalità del BID della SmCav β 1.

1.11 - I CANALI DEL CALCIO E IL CITOSCHELETRO

Il citoscheletro, oltre a fornire il supporto strutturale e avere un ruolo funzionale nella motilità delle cellule, si ritiene abbia anche un importante effetto regolatore sull'afflusso di calcio attraverso i canali del calcio voltaggio-dipendenti, in quanto i canali ionici, oltre ad essere parte integrante della membrana plasmatica, sono fissati alle strutture citoscheletriche, in particolare ai filamenti di actina.

Il citoscheletro si compone di microfilamenti (composti da subunità di actina), microtubuli (formati da tubulina) e filamenti intermedi. I cambiamenti nella rete citoscheletrica alterano le proprietà meccaniche della cellula e sono essenziali per funzioni quali locomozione e citocinesi. I recettori transmembrana ed i segnali intracellulari che producono i cambiamenti citoscheletrici in risposta a stimoli extracellulari sono stati ampiamente studiati e sono argomento di numerosi lavori [27].

Nei neuroni, ad esempio, i microfilamenti e i microtubuli del citoscheletro sono implicati rispettivamente nella regolazione dell'attività dei canali del calcio e del sodio.

Inoltre, studi fatti sempre sui neuroni, hanno dimostrato che un afflusso di calcio attraverso i canali voltaggio-dipendenti induce una serie di risposte sia funzionali che strutturali nelle cellule nervose, e che un eccesso di tali ioni può danneggiarle ed ucciderle. Alcuni dati indicano che la depolimerizzazione dei filamenti di actina può stabilizzare i livelli liberi intracellulari del calcio e proteggere i neuroni [28]. È stato visto infatti che alterazioni citoscheletriche indotte da agenti che aumentano la concentrazione intracellulare del calcio sono dannosi per la sopravvivenza della cellula. Anche nel tessuto cardiaco la regolazione dei canali dipende in modo preciso dai vari componenti del citoscheletro delle cellule. Infatti i microfilamenti regolano le correnti di calcio nei canali L-type dei miociti cardiaci di mammifero [29].

Farmaci come la citocalasina D (Fig.19), che provocano la rottura dei filamenti di actina, riducono il flusso di ioni Ca^{2+} , mentre farmaci quali la falloidina e la jasplakinolide, che stabilizzano i microfilamenti, ne inducono un aumento.

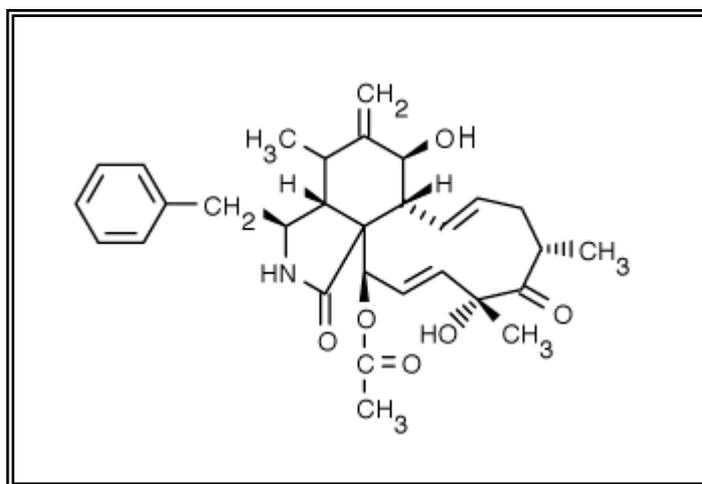


Fig. 19 – Struttura della Citocalasina D (CD).

Alla luce dei dati accumulati negli ultimi anni in vari sistemi cellulari, si può affermare che la depolimerizzazione dei filamenti di actina, in risposta all'afflusso di calcio, serve come meccanismo di feedback per limitare gli effetti tossici di livelli troppo elevati di ioni Ca^{2+} intracellulare. La depolimerizzazione dei microtubuli, per effetto del nocodazolo, o la loro stabilizzazione per effetto del taxolo, invece, si è visto che non ha alcun effetto su tale afflusso.

Anche nel caso dello schistosoma è possibile che si abbia una risposta del citoscheletro in reazione all'entrata di ioni calcio provocata dal PZQ. E' inoltre possibile che alterazioni del citoscheletro possano influenzare l'attività schistosomicida del PZQ. Questi aspetti, sinora inesplorati, saranno oggetto di indagine in questa tesi.

2 - MATERIALI e METODI

2.1 - MATERIALE PARASSITARIO DI PARTENZA - SCHISTOSOMI

Il ciclo biologico dello *S. mansoni* viene mantenuto presso l'Istituto di Biologia Cellulare del CNR di Monterotondo (Roma) mediante passaggi alternati nel topo albino (Swiss) usato come ospite definitivo e nel mollusco acquatico *Biomphalaria glabrata* usato come ospite intermedio [30].

Dei ceppi utilizzati in questi studi, due sono sensibili al PZQ (PR e GP), mentre due sono parzialmente resistenti (BANL e S47). Il ceppo PR (Puerto Rican) è stato isolato prima dell'introduzione del PZQ ed è stato successivamente mantenuto in laboratorio. Il ceppo GP (Gene Pool) è un ibrido originato deliberatamente nei laboratori della Università di Bangor (UK) dall'unione di cercarie di quattro ceppi diversi [9]. Il ceppo BANL è stato ottenuto dal ceppo GP trattato ripetutamente con PZQ per una serie di generazioni. Il ceppo S47 è stato isolato da un paziente senegalese che continuava ad espellere uova dopo due cicli di trattamento con PZQ.

Tutti questi ceppi sono stati recentemente saggiati nuovamente e la loro ED₅₀ per il PZQ è stata determinata nel topo in tre differenti laboratori (Tab.2 e Fig.20) [16].

2.2 - PREPARAZIONE DI RNA e cDNA

Gli schistosomi vengono ottenuti dalla perfusione di topi infettati da almeno 7 settimane usando il terreno RPMI-1640 contenente HEPES e 100U/ml di Eparina.

Ceppo	Laboratorio	ED ₅₀	Media ED ₅₀ ±SD
GP	1	46	68±18
	2	81	
	2	60	
	3	84	
PR	1	81	65±23
	3	49	
BANL	1	207	192±44
	2	155	
	2	159	
	3	247	
S47	1	153	175±65
	1	130	
	1	210	
	2	270	
	3	112	

Tab. 2 – Valori di ED₅₀ ottenuti in tre diversi laboratori.

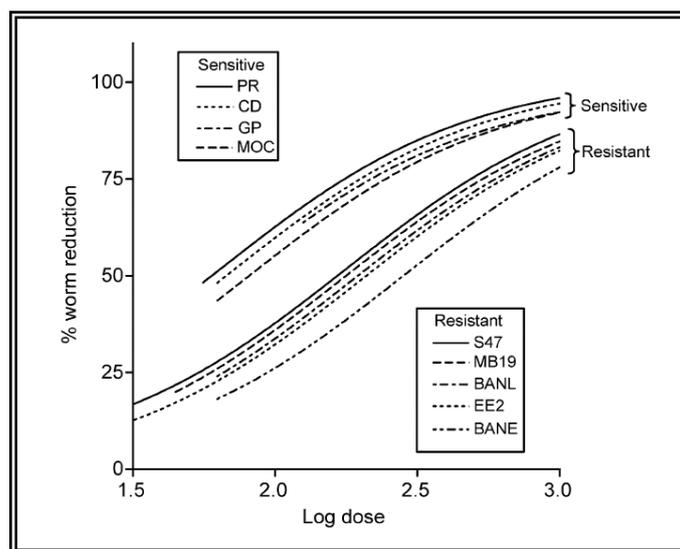


Fig. 20 - Nel grafico sono riportate le curve ottenute dalla percentuale di riduzione dei vermi in funzione della dose di PZQ somministrata per i diversi ceppi sensibili e resistenti.

I parassiti vengono risospesi in un volume di Trizol (Invitrogen) di circa 1ml/50-100 vermi e in questo mezzo vengono omogenizzati in N₂ liquido.

Cinque µg (in un volume totale 10µl) di RNA totale estratto vengono trattati con 5U di DNAsi I, Amp Grade (Invitrogen) per 15 minuti a temperatura ambiente e infine la reazione viene bloccata aggiungendo 1 µl di 25mM EDTA.

Si procede quindi alla preparazione del cDNA utilizzando il “SuperScriptTMIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen).

Il cDNA preparato viene quindi analizzato, con appositi oligonucleotidi, mediante PCR.

2.3 - NORTHERN BLOTS

Cinquanta µg di RNA totale sono stati corsi su un gel denaturante di agarosio 1% e trasferiti su una membrana di nylon Hybond. Sono stati incubati per tutta la notte con una sonda marcata con ³²P e successivamente lavati due volte per 10 minuti a temperatura ambiente in 2x SSC/0.1% SDS e altre due volte per 20 minuti a 55°C in 2x SSC/0.5-1% SDS. Come controllo è stato utilizzato il livello di mRNA di una proteina ribosomale nota di schistosoma, L37 (recentemente clonata: AF035770).

La sonda utilizzata corrisponde al segmento nucleotidico 1749-2400 di SmCavβ1. la sonda è stata ottenuta utilizzando i primers seguenti (Fig.21):

CAVB1 FOR:	GATTACATATGGGTGCTGCAAGTG
B1 REV:	ATGGAATGGACCACCTGTTCGATC

La radioattività delle membrane esposte alla sonda marcata è stata determinata utilizzando una pellicola Biomax MS-1 (Kodak) esposta per tempi diversi a -80°C . La densitometria della autoradiografia è stata eseguita usando il software “NIH Image”.



Fig. 21 - Sonda utilizzata per il Northern blot. La porzione C-terminale delle SmCa_vβ1 è stata utilizzata negli esperimenti di Northern blot.

2.4 - PCR, CLONAGGIO, SEQUENZE ED ESPRESSIONE

Gli oligonucleotidi seguenti sono stati progettati sulla base delle sequenze pubblicate da *Kohn et al.* (Fig. 22B) per la subunità $\beta 1$ dei canali del calcio di *S. mansoni* [21].

5'B1 for	CATGGGTTCAAGACGTTCCAG
B1 HpaI for	AAGAAGTTGACTCAGATCGTCCAC
B1 HpaI rev	GTGTTGTGTTAAGACCATCAGGAC
Cav B1 rev	GTCAATCATCAGGTGGACATGCTC

Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando 1 μ l di cDNA, 50pmoli di ciascun primer e 2,5U di Pfu DNA polymerase (Stratagene).

I frammenti ottenuti in PCR sono stati subclonati in pPCRscript Amp SK(+) (Stratagene) e i plasmidi sono stati sequenziati con un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer usando il kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (ABI). Tutte le sequenze sono state analizzate in entrambe le direzioni e ripetute su differenti cloni.

Un altro frammento di PCR, ottenuto utilizzando i primers:

Gat B1 for	<u>gatewayCTGGACTTACACCTAAAGTTCACTCGTTA</u>
Gat B1 rev	<u>gatewayTCACATAGATCGAACAGGTGGTCCATTCCAT</u>

è stato clonato, secondo il protocollo raccomandato dal produttore, nel vettore di espressione Gateway, pDEST17 (Invitrogen), che genera in *E.coli* un prodotto di fusione [(His)₆-B1Cterm], caratterizzato da una sequenza N-terminale di 6 istidine consecutive che costituisce i primi 30 aminoacidi della proteina, e che permette di avere in seguito un prodotto purificabile (Fig.22B).

La proteina ricombinante è stata espressa in cellule BL21(DE3)pLysS di *E. coli* e purificata con cromatografia di affinità su una resina Ni-NTA (QIAGEN).

Contro la proteina ricombinante è stato prodotto un anticorpo specifico in coniglio.

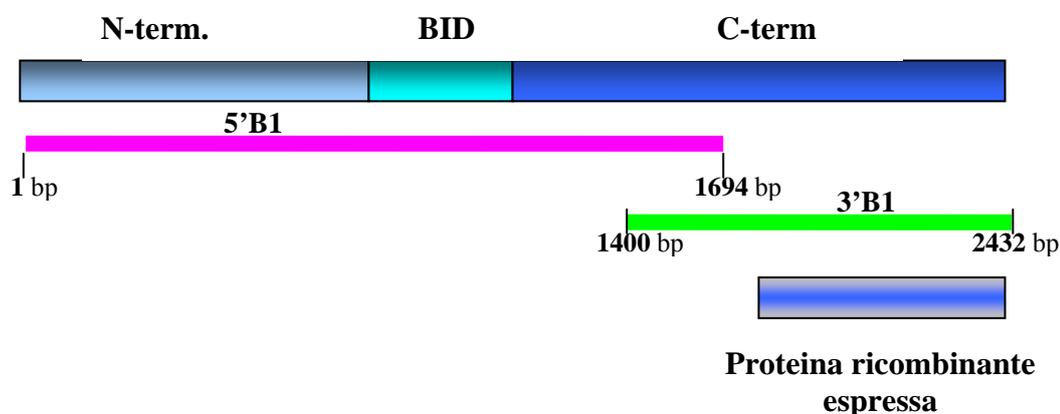


Fig. 22A – Rappresentazione schematica delle sequenze SmCa_v β 1, con i frammenti di PCR (5'B1 e 3'B1) subclonati in pPCRscript Amp SK(+) e successivamente sequenziati. In basso è riportato anche il tratto di proteina espresso e purificato.

1 GAATTACGGC CGCGAATTCC CCTGGC **CAT GGGTCAAGA CGTCCAG** TG AAGTACTAG
 61 TTCAGTTGAT AGTGAAGTAA TTTTAGAAGC TGAACGTTTA GAATTAGAAC GTTAGTTTT
 121 AAAAGAACTT GAATTAGCAG TTTCTAAACC TG TAGCTTTT TCAGTTAGAA CTAATATAAG
 181 TTTTGATGGA GCCTTATATG GTTTGGATGC ACCATCACCG ACTAGAGTTG TTAGTTTTGG
 241 TATAAAAGAT TTCCTACATA TTA AAAAACG TTCAATCAA GATTGGTGGA TTGGTCGTGT
 301 AGTTCGAATA GG TAGTCAA TTGGTTTTAT ACCTAGTCCA TCTAAACTTG AAGTAATCAA
 361 TAATATTATT TTATCGGCCA TTACCACTGC TGCTAATACT AATGTGGTAC ACTTTGCCAA
 421 TGAAATTCAA AATCCGACAA CTA AACCCAGC TCCTGTTGGT GGATTCCGGAT CTGCAGACAC
 481 AACGTTAGAA CGCGGAGGAA ATCGTGGATT GTTGTGTCT AGCGATGTAG ATCATCGTGG
 541 ACCAACTTTG AGTGCTAATC GTCAAAGGCA ATCGGAATCA CCTCCAGTTC ATAAAAATTG
 601 GAAAGATGTC GATGCATATG ATGAAGATGA TTTACGTGAT ACACCACAAA CTGTAGAGGT
 661 ACCAGGACAA CCAACTACCA AGAAACCCCA ACCTGTTGGA CTGGAGTTA AGAAGAGACC
 721 ATTCTCTAAA AAGAATGAAT TTGTACCTCC ATATGAAATT GTACCATGTA TGCGCCCTGT
 781 TGTATTGTT GGTCCAGCTT TGAAAGGTTA TGAAGTGACA GATATGATGC AGAAAGCAAT
 841 ATTTGATGCA ATGAAGAAAC ATTTTGATGG AAGAATTATT GTTAGTCGTG TCAGTACAAA
 901 TATATCATTG GCTAAACGTG TTGGAGAATT ATTACATTTG GATAAAAAAGA ATATTTTAGA
 961 AAAAGGACGT AGTCGACAGC TTGTTTCCTT AATTGAAGTC CAACAAGATT TGGAAAAGAT
 1021 ATTTCAATTTG GGTAGTAAAA TGCAATTACT TTTATTAGAT TGTGATACAA TTAATCATCC
 1081 AAATCAAATT ACTAAACAT GCTTAGCACC TATTGTAATT TATATCAAAA TTAGTAGTAT
 1141 ACGTGTATTA AATCGTTTAA TTA AAAATCG TGGTAAATTA CAAAAAAGA ATGCTGGTGT
 1201 ACAA ACTGCC GCCCTGAAA AACTATTACA ATGTTACCA GAATCATTCTG ATTACGTAAT
 1261 AGATCAAAAAT AATTTATCCA CTGCAACAGA AGCACTAAGT CATTCTTAG AAGGTTATTG
 1321 GGCAGCAACA CATCTCCTT TAATAGTTAG TAAAGCTGAA CGTCTCTTG GCTCTTTTC
 1381 GCTCCAGTG CCTGAAACAA **AAGAAGTTGA CTCAGATCGT CCAG** TTGTAC CTATGACACC
 1441 TGGTCATCCA GGGTTGAGTG TAGTTACCAA ATCTGCATTA AGTGCAGGAT TTAGTAGTCA
 1501 AGAAATTAGTGAATTAACCGGAGCAAGAGC AACTGGTTGG TTAACAGAAA ATGGTGGACA
 1561 AGTAGAAAAT GA ACTTGAC TTACTGGTGT ACATCATGCT GGTAGCGTTG GTAGTGAATT
 1621 TCATAATACA CTTTTGGCGGAAGAAA ACT TAAA ACTGATCATAATAA **GTCCTGATGG**
 1681 **TCTTAACACA ACAC** ATTATT CAGATGATGA AAATGAAGGT TCACGTCAA ATTATCCTCG
 1741 TAATGGTCGA TTACATATGG GTGCTGCAAG TGCAGCGGCA ATTGCTGCTG TTGCCGCT **GG**
 1801 **ACTTACACT AAAGTCACT CGTTA** CATCCATCATTATT CAAGGTGAAA ATAAACGAAA
 1861 TGGTTCAGTA ATTCGTGATA TAAATGGCAA TACTACACAT GAATCACCTG GTTAACTAT
 1921 GGGTTTAGGA TTGGGTATAG CAAATGGGT TGCAGCCACT ATCAGTGCTG CTCTGTTCC
 1981 CAGCCATAAT AGTACTAATC ATCATCAGCA TCATTCAGCA GAGAACTATC ATCAACCAAC
 2041 ATCAAGAATA CCACCTCAA CAATTGCTGC CGCAGCTGTA GCGTCTGTAG TTTCACCACC
 2101 GTTAAAAGAC TTGGGTATTC ATCAAGTGAAGGAAGTGAT GGAACACAAG TCTATCAAAG
 2161 TAGATCAGCT CGTCAAGCAA AGCAACGTGA GAACAATTA GCACGAGTAA AACAAGAAGT
 2221 TGAAGCTAAA GCTTTAGCAT TACAAGCTAC TGCAGGTGGTAGACGAAGAC GTCGAGATAA
 2281 AGAAAGAAGA CAAAGAAATC CTGACGGTTA TTGGGATTCA CATGATGAAC GTTATCATGC
 2341 TCATGGAACAAATGATTTATCAACATTC TCATCA **ATGG AATGGACCAC CTGTTGATC**
 2401 **TAT**GGCAA **GA GCATGTCCAC CTGATGATTG AC**

Fig. 22B – Nella figura sono evidenziati a colore i primers utilizzati per l'amplificazione dei diversi tratti della subunità SmCa_vβ1.

2.5 - PEPTIDI SINTETICI

Considerando la sequenza aminoacidica pubblicata da Kohn et al. (AY033598)[21], sono stati sintetizzati 2 peptidi: uno corrispondente alle regioni N- e C-terminale entrambe unite ad un residuo di cisteina legato, a sua volta, all'ovalbumina (**1-NC**); l'altro più interno, a monte della BID, anch'esso coniugato all'ovalbumina (**1-IN**). (Genemed Synthesis, Inc., South San Francisco) (Fig.23).

Entrambi i peptidi coniugati sono stati iniettati nel coniglio insieme ad adiuvante di Freund per la produzione di anticorpi specifici anti-peptidi. Gli anticorpi ottenuti sono stati successivamente purificati per cromatografia utilizzando la Thiopropyl Sepharose 6B (Amersham Pharmacia).

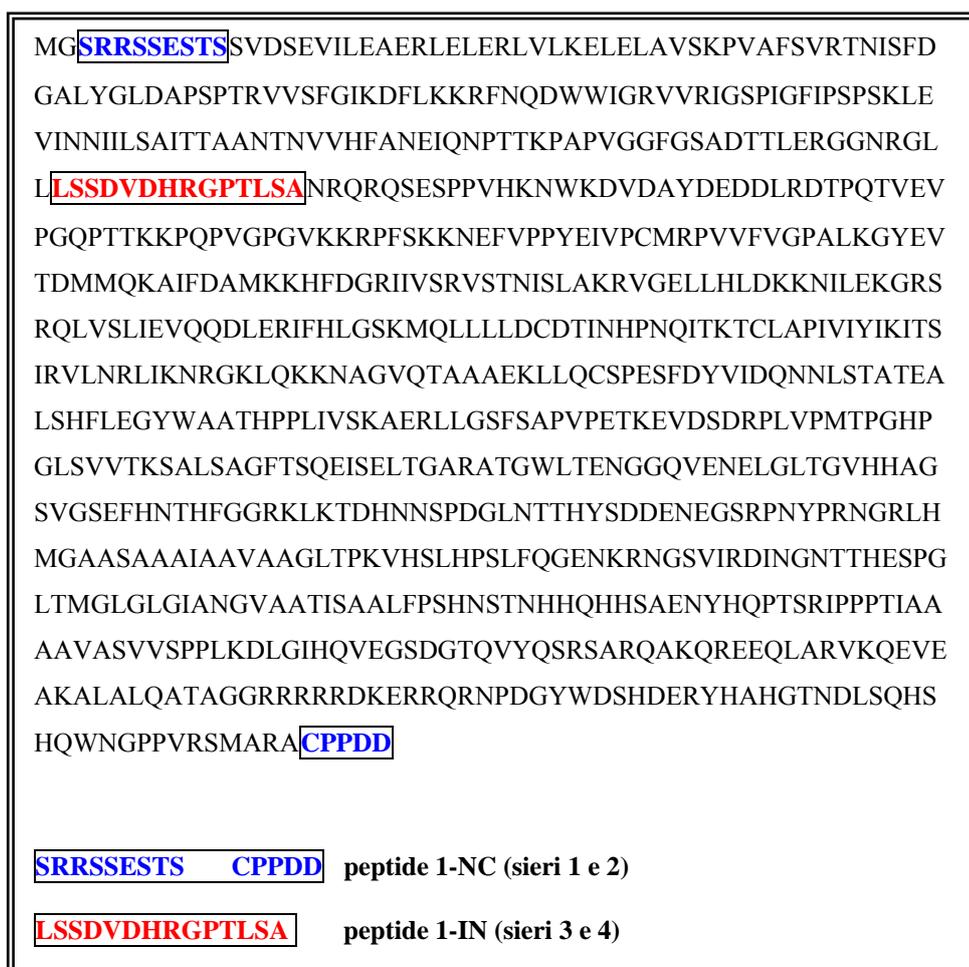
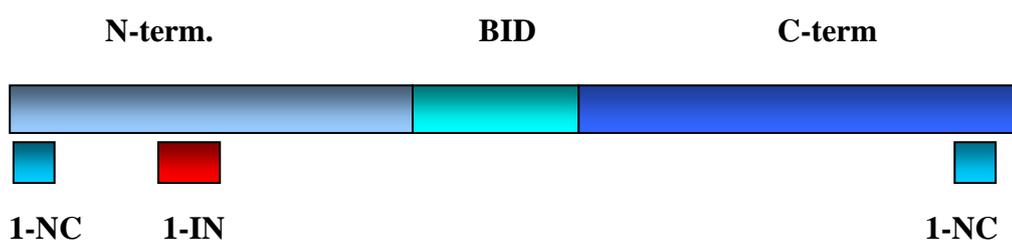


Fig. 23 – Peptidi sintetici della subunità SmCa_vβ1.

2.6 - IMMUNIZZAZIONE DEL CONIGLIO PER LA PRODUZIONE DI ANTICORPI

Un ml di soluzione contenente 100 µg di proteina ricombinante o di peptide viene mescolato energicamente con 1 ml di adiuvante completo di Freund (Difco) fino ad ottenere una densa emulsione. L'emulsione viene poi iniettata per via intradermica in circa 30 aliquote diverse sul dorso di un coniglio. Dopo 30, 37, e 44 giorni dalla prima iniezione, l'immunizzazione viene ripetuta emulsionando la stessa quantità di antigene con adiuvante incompleto di Freund ed iniettando l'emulsione sia per via sottocutanea che per via intramuscolare. A distanza di una settimana da ognuna delle iniezioni (eccetto la prima), il coniglio viene salassato dall'arteria centrale dell'orecchio; il sangue (circa 60ml) viene lasciato coagulare e il siero separato per centrifugazione. I sieri così ottenuti vengono conservati a -20°C.

2.7 - PREPARAZIONE DI ESTRATTI TOTALI DI PARASSITI

Maschi adulti di *S. mansoni* ottenuti tramite perfusione di topi albini, infettati da almeno 7 settimane, vengono omogeneizzati in un apparato di Dounce in ghiaccio, in un tampone di Hepes 0,1M pH 7.4, contenente 10% glicole etilenico ed inibitori di proteasi (0,1mM E64; 0,015M pepstatina; e 0,1U/ml aprotinina). Dopo centrifugazione a 40000g per 30' a 4°C, si separa il supernatante, denominato S40 (frazione solubile), contenente proteine ad una concentrazione di 5-10mg/ml (determinata con il BIO-RAD PROTEIN ASSAY e BSA come standard) dal pellet P40 (frazione non solubile).

2.8 - WESTERN BLOT

L'estratto totale di vermi e le proteine ricombinanti vengono, inizialmente, corsi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE). Le proteine migrate nel gel sono trasferite su filtri di nitrocellulosa, usando come tampone di trasferimento Tris-HCl 50mM pH 8.7, glicina 0.2M, metanolo 20%. Al fine di controllare l'avvenuto trasferimento, il filtro viene colorato con Ponceau (0,2% in 3% TCA), quindi lavato con TBS (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM) e incubato per 30' in una soluzione di TBS con latte in polvere al 5% per bloccare eventuali siti aspecifici.

Il filtro viene incubato a temperatura ambiente per 90 minuti con l'anticorpo specifico di coniglio opportunamente diluito in TBS (1:500) e viene successivamente lavato. Il filtro viene quindi incubato per 1 ora a temperatura ambiente con goat anti rabbit-AP diluito in TBS (1:30000).

Dopo ulteriori lavaggi, il filtro viene sottoposto alla reazione colorimetrica: come agente cromogenico si usa la miscela di due substrati della fosfatasi alcalina che, per azione dell'enzima, formano, *in situ*, un precipitato di colore bluastro di facile rilevazione sul filtro bianco di nitrocellulosa. La soluzione contiene : 32 µl di NBT, nitro blu di tetrazolo, (50mg/ml) e 32µl di BCIP, 5-bromo-4cloro-3-indolo fosfato, (50mg/ml) disciolti in 10ml di tampone alcalino: Tris-HCl 100mM Ph 9.5, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM. La reazione viene bloccata lavando più volte con acqua.

2.9 - INCLUSIONI IN PARAFFINA

I vermi vengono fissati con metanolo per 12 ore a 4°C e quindi lavati due volte in PBS per 10 minuti. La deidratazione viene fatta a 4°C incubando 2 volte per 30 minuti in 50% EtOH/H₂O, 2 volte per 30 minuti in 75% EtOH/H₂O e 30 minuti in 95% EtOH/H₂O. Infine i vermi vengono lasciati per 12 ore a 4°C in 95% EtOH/H₂O. I campioni vengono messi per 10 minuti a temperatura ambiente, e quindi lasciati 2 volte per 2 ore in 100% EtOH, con leggera agitazione. Successivamente vengono lavati 3 volte per 5 minuti con 100% xilene.

I campioni vengono quindi inclusi in paraffina a 58°C inizialmente per 45 minuti con paraffina/xilene (50/50), poi 3 volte per 1 ora con paraffina 100% ed infine per 12 ore con paraffina 100%.

Dopo un'ulteriore incubazione per 1 ora in paraffina 100%, i campioni vengono inclusi negli stampi, portati a temperatura ambiente e lasciati raffreddare per alcune ore.

Queste inclusioni vengono quindi tagliate al microtomo con uno spessore di 6µm. I vetrini ottenuti vengono incubati una notte a 42°C e prima di usarli per immunofluorescenza i campioni vengono deparaffinati e reidratati con una serie di lavaggi: 2x10' Xilene 100%, 2x5' EtOH 100%, 3' EtOH 95%, 3' EtOH 70%, 3' EtOH 50%, 2x5' PBS.

2.10 – IMMUNOFLUORESCENZA

I campioni istologici, dopo i lavaggi in PBS 1x, vengono incubati per 1h a 37°C con anticorpo policlonale di coniglio anti-peptide, anti-B1-Cterm, o anti-actina (Sigma) diluiti 1:300 in PBS 1x con BSA 1% e siero normale di capra 10% fino ad un volume totale di 1 ml.

Dopo ripetuti lavaggi con PBS 1x viene aggiunto un anticorpo secondario (goat anti-rabbit) coniugato FITC (Fluorescein isothiocyanate). I campioni vengono incubati per 1h a 37°C e dopo lavaggi in PBS 1x, vengono osservati con un microscopio a fluorescenza.

2.11 - COLTURE DI SCHISTOSOMI *IN VITRO*

Vermi maschi adulti (7 settimane) o immaturi (4 settimane) ottenuti dalla perfusione di topi infetti sono mantenuti in coltura nel mezzo Eagle MEM modificato secondo Dulbecco con 20% di siero di vitello neonato (in piastre Petri contenenti al massimo 10-12 vermi in 3 ml) a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% CO₂. Il mezzo è cambiato 2 volte alla settimana, e la vitalità dei vermi è giudicata sulla base di osservazioni ad uno stereo microscopio (40x) della loro motilità e dell'aspetto morfologico generale.

Nei trattamenti *in vitro* i parassiti sono esposti al farmaco alle concentrazioni desiderate a tempi diversi, lavati tre volte con soluzione fisiologica e posti nuovamente in coltura in mezzo privo del farmaco.

3 - RISULTATI

3.1 - SEQUENZE DI CANALI DEL CALCIO DI SCHISTOSOMI SENSIBILI E RESISTENTI AL PZQ.

Come illustrato nell'Introduzione, alcuni interessanti studi tendono a suggerire la possibilità che le subunità beta dei canali del calcio voltaggio-dipendenti dello Schistosoma possano essere direttamente coinvolte nel meccanismo d'azione del praziquantel. Infatti, uno degli effetti precoci del farmaco sugli schistosomi consiste in un massiccio afflusso di ioni calcio all'interno del parassita. Da ciò l'ipotesi che le subunità β dei canali del calcio voltaggio-dipendenti siano le possibili molecole target del praziquantel e che eventuali differenze tra le varie subunità possano spiegare la diversa sensibilità al farmaco di ceppi diversi del parassita.

3.1.1 - Le subunità β dei canali del calcio hanno la stessa sequenza in schistosomi più o meno sensibili al PZQ.

Al fine di clonare il gene, o frammenti di esso, della subunità $\beta 1$ dei canali del calcio di *S. mansoni* ($SmCa_v\beta 1$) sono stati disegnati vari oligonucleotidi (evidenziati nella Fig.22) che sono stati poi usati in processi di amplificazione tramite PCR.

Come template sono state usate preparazioni di:

- cDNA di ceppi sensibili al PZQ presenti nel nostro laboratorio (GP, PR)
- cDNA di ceppi resistenti al PZQ presenti nel nostro laboratorio (BANL e S47).

Come primo tentativo si è cercato di amplificare il gene intero, utilizzando gli oligonucleotidi 5'B1for/CavB1rev. Essendo il frammento molto lungo, si è ricorso all'uso di altri oligonucleotidi in modo tale da amplificare e sequenziare frammenti di lunghezza inferiore, e precisamente i frammenti 5'B1 e 3'B1, amplificati rispettivamente con i primers: 5'B1for/B1HpaI rev e B1HpaI for/CavB1rev (Fig.22). I geni isolati sono stati subclonati nel vettore pPCRscript Amp SK(+) (Stratagene). Dopo aver trasformato in cellule DH5 α , si sono selezionati i ricombinanti positivi da cui è stato estratto il DNA.

I frammenti clonati per ogni differente ceppo sono stati sequenziati usando i primers del vettore (T7 e M13+) più esterni ai frammenti stessi.

Attraverso il sequenziamento del gene completo della $SmCa_v\beta 1$ dal cDNA dei quattro diversi ceppi di *S. mansoni*, resistenti e sensibili al farmaco, è stato possibile evidenziare alcune identità e alcune differenze rispetto alla sequenza precedentemente riportata da Kohn et al. [21]. In particolare, abbiamo confermato la mancanza nelle subunità di schistosoma di due residui di serina altamente conservati, all'interno del beta interaction domain (BID), ciò che sembra essere la principale peculiarità di queste subunità (Fig.24).

Dal confronto delle sequenze ottenute sono emerse diverse sostituzioni nucleotidiche di cui la maggior parte silenti, ad eccezione di una sostituzione t117c che porta alla mutazione di una Ala con una Val rispetto alla sequenza precedentemente pubblicata.

Questa variazione c117 è stata però riscontrata in tutti i ceppi analizzati, indipendentemente dalla loro sensibilità al PZQ.

Ciò potrebbe essere il risultato di una imprecisione nel precedente sequenziamento o di una variazione allelica. Abbiamo esaminato le intere sequenze (2319bp), con particolare attenzione alla regione C-terminale e BID, in cui ci si potevano aspettare mutazioni funzionali, ma non è stata osservata alcuna sostituzione aminoacidica (Fig.25).

Una uguale sequenza $SmCa_v\beta 1$ è stata ottenuta usando RNA estratto da schistosomi a diversi stadi di sviluppo del ceppo PR, cioè da adulti (7 settimane) e immaturi (28gg). Questo risultato indica che $SmCa_v\beta 1$ è espressa in entrambi gli stadi del parassita.

MGSRRSSESTSSVDSEVILEAERLELERLVLKELELAVSKPVAFSVRTNISFDGALYGLDAPSPTR
VVSFGIKDFLKKRFNQDWWIGRVRVIGSPIGFIPSPSKLEVINNIILSAITTAANTNVVHFANEIQN
PTTKPAPVGGFGSADTTLERGGNRGLLLSSDVDHRGPTLSANRQRQSESPVHKNWKDVEDAYD
EDDLRDTPTQVEVPGQPTTKKQPVGPGVKRPF **SKKNEFVPPYEIVPCMRPVVFGPALKG**
YEVTDMMQKAIFDAMKKHFDGRIIVSRVSTNISLAKRVGELLHLDKKNILEKGRSRQLVSLIEV
QQDLERIFHLGSKMQLLLLDCDTINHPNQITKTCLAPIVIYIKITSIRVLNRLIKNRGKLQKKNAG
VQTAAAEKLLQCSPESFDYVIDQNNLSTATEALSHFLEGYWAATHPPLIVSKAERLLGSFSAPVP
ETKEVSDRPLVPMTPGHPGLSVVTKSALSAGFTSQEISELTGARATGWL TENGQVENELGLT
GVHHAGSVGSEFNTHFGGRKLKTDHNNSPDGLNTHYSDDENEGSRPNYPRNGRLHMGAAAS
AAAIAAVAAGLTPKVHSLHPSLFQGENKRNGSVIRDINGNTTHESPGLTMGLGLGIANGVAATI
SAALFPSHNSTNHHQHSAENYHQPTSRIPPPTIAAAVASVSPPLKDLGIHQVEGSDGTQVY
QSR SARQAKQREEQLARVKQEVEAKALALQATAGRRRRRRDKERRQRNPDGYWDSHDERYH
AHGTNDLSQHSQWNGPPVRSMARACPPDD

Fig. 24 - Sequenza aminoacidica della proteina SmCa_vβ1 in cui è evidenziato il beta interaction domain (BID).

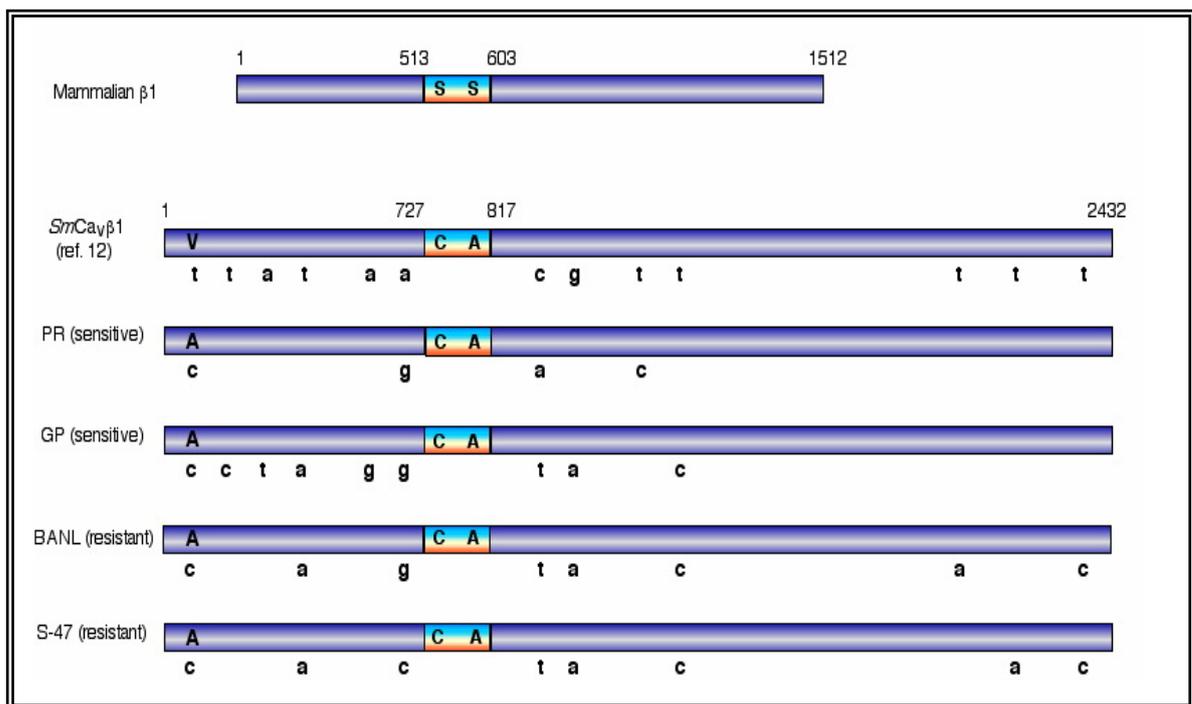


Fig. 25 – Rappresentazione schematica delle sequenze della subunità β1 dei canali del calcio di schistosoma ottenute dai vari ceppi del parassita. In alto è rappresentata la struttura generale di una sequenza Ca_vβ1 di mammifero, con due residui di serina nel BID. Al di sotto è rappresentata la sequenza Ca_vβ1 di schistosoma (SmCa_vβ1)(AY033598), in cui i due residui di serina del BID sono sostituiti da un residuo di alanina ed uno di cisteina. Le altre sequenze corrispondono a SmCa_vβ1 del ceppo Puerto Rican (PR)(AY277533), Gene Pool (GP)(AY277534), Bangor (BanL)(AY277535) e Senegalese (S47)(AY277536).

Tutto ciò sembra quindi escludere la possibilità che la diversa sensibilità al PZQ possa essere legata a differenze strutturali della subunità β nei vari ceppi considerati.

3.1.2 - Le subunità β dei canali del calcio sono ugualmente espresse in schistosomi adulti più o meno sensibili al PZQ.

In seguito a questo risultato negativo si è cercato di verificare una seconda ipotesi possibile, ossia che la differente suscettibilità al farmaco potesse essere dovuta ad un diverso livello di espressione della proteina in esame.

A tal fine sono stati condotti esperimenti di Northern Blot su RNA totali estratti dai 4 differenti ceppi usati precedentemente e da differenti stadi di sviluppo, utilizzando una sonda specifica per la subunità β , cioè un frammento amplificato di 650bp nella regione C-terminale della proteina. Come controllo è stata utilizzata una sonda per la proteina ribosomale, L37 (AF035770).

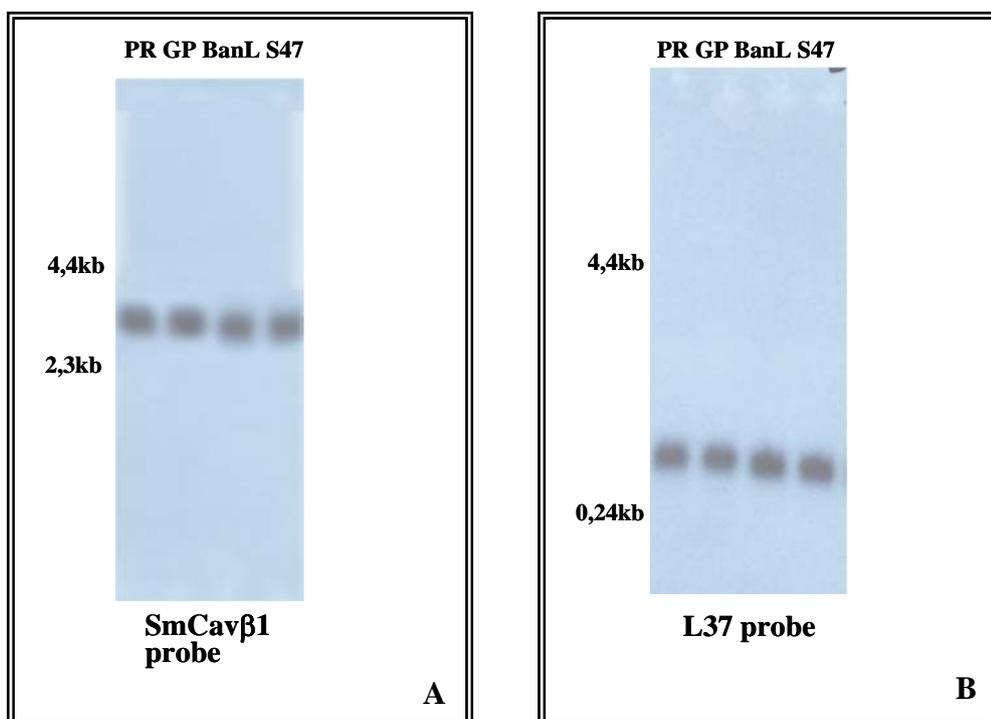


Fig. 26 - Northern Blot di vari ceppi di schistosoma saggiati con il cDNA della sequenza β dei canali del calcio, SmCa $_v$ β 1 (A) e come controllo la sonda per la proteina ribosomale, L37. È stato utilizzato RNA estratto dai seguenti ceppi di schistosoma: PR, GP, BanL and S47.

Come si evince dalla Fig.26, il livello di mRNA della SmCa $_v$ β 1 è approssimativamente lo stesso per i ceppi sensibili, PR e GP, e per quelli resistenti, BANL e S47. Le misurazioni densitometriche normalizzate mostrano che nessuno dei due ceppi sensibili differisce dai due resistenti per più del 17%.

3.1.3 - Le subunità β dei canali del calcio sono ugualmente espresse in schistosomi maturi e immaturi.

È ben noto da esperimenti *in vivo* ed *in vitro* che gli stadi immaturi sono largamente insensibili al farmaco. Infatti il rapporto di ED_{50} tra i vermi immaturi e quelli maturi è almeno di 25 volte, mentre ad esempio i diversi ceppi qui analizzati e saggiati precedentemente differiscono tra di loro di un fattore 2 o 3 (Tab. 2) [16].

Quindi, per evidenziare eventuali differenze nel livello di espressione della proteina tra vermi adulti e immaturi è stato ripetuto l'esperimento di Northern blot. Per normalizzare i dati abbiamo usato una sonda per una proteina ribosomale (L37), che è un gene espresso in modo costante in tutti gli stadi.

Anche nei diversi stadi di sviluppo, però, non è stato possibile evidenziare differenze apprezzabili nei livelli di mRNA (Fig.27). La densitometria delle bande ha indicato che la $SmCa_v\beta 1$ è espressa nei parassiti maturi e immaturi con differenze che non superano il 14%.

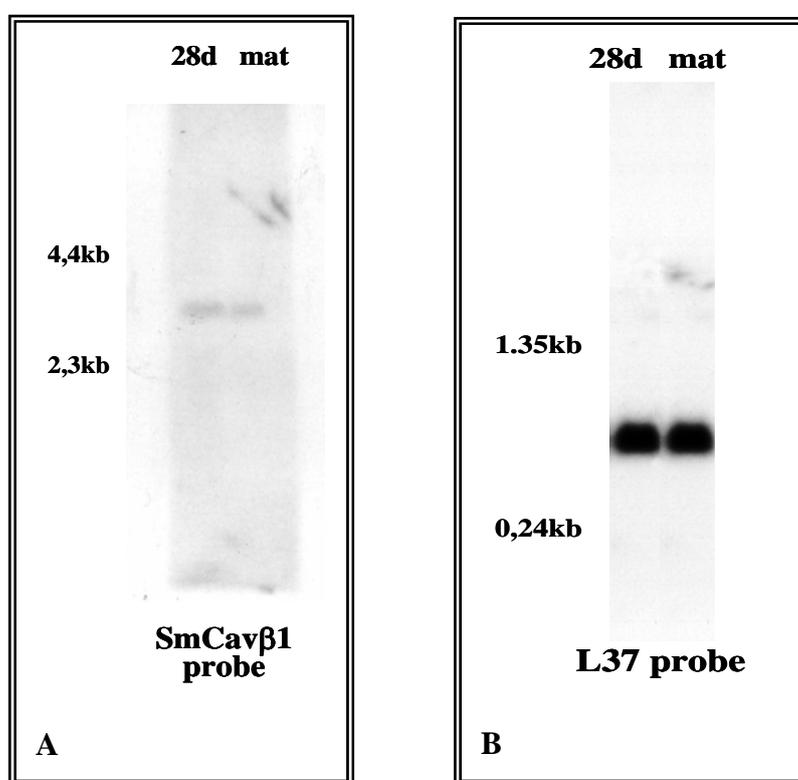


Fig. 27 - Northern Blot su RNA di schistosomi immaturi (28d) e maturi (M) del ceppo PR saggiati con il cDNA della subunità β dei canali del calcio, $SmCa_v\beta 1$ (A) e come controllo con il cDNA della proteina ribosomale L37 (B).

3.2 - IMMUNOLocalizzazione di canali del calcio in schistosomi sensibili e resistenti al PZQ.

Allo scopo di verificare ulteriormente se ad una minore suscettibilità al PZQ fosse associata una differenza qualitativa e/o quantitativa nell'espressione della SmCa_vβ1, sono stati prodotti anticorpi da utilizzare in analisi di western blot, ELISA ed immunofluorescenza indiretta. Gli anticorpi sono stati ottenuti iniettando in conigli due peptidi corrispondenti a varie regioni della proteina oppure una parte della proteina stessa ottenuta con la tecnologia del DNA ricombinante.

3.2.1 - Produzione e caratterizzazione di anticorpi verso la subunità β di *Schistosoma*.

I peptidi 1-NC e 1-IN sono stati disegnati sulla base della sequenza aminoacidica pubblicata [21] (Fig.23): uno corrisponde alle regioni N- e C-terminale fuse in una struttura ad Y; l'altro interno a monte del BID. Gli anticorpi prodotti contro tali peptidi sono stati purificati per cromatografia.

Nell'altro approccio, per ottenere il polipeptide ricombinante si è espresso, in un sistema procariotico, il tratto C-terminale del gene della subunità β1 dei canali del calcio, utilizzando il sistema Gateway Cloning Technology.

Il primo passo è stato l'amplificazione del frammento, utilizzando opportuni oligonucleotidi progettati in modo da creare allo stesso tempo i siti di ricombinazione (attB1for e attB2rev).

La proteina ricombinante è stata ottenuta clonando nel vettore di espressione, pDEST17, il frammento di 605bp amplificato con i primers: Gat B1 for e Gat B1 rev.

L'espressione genera una proteina di fusione dotata, nel tratto N-terminale di 6 istidine, funzionali nelle fasi di purificazione (Fig.28).

Per produrre in grande scala la proteina di fusione è stato preparato un litro di coltura e dopo incubazione a 37°C con IPTG 0.5 mM i campioni sono stati divisi in aliquote di 50 ml, che sono state centrifugate per ottenere i pellets batterici.

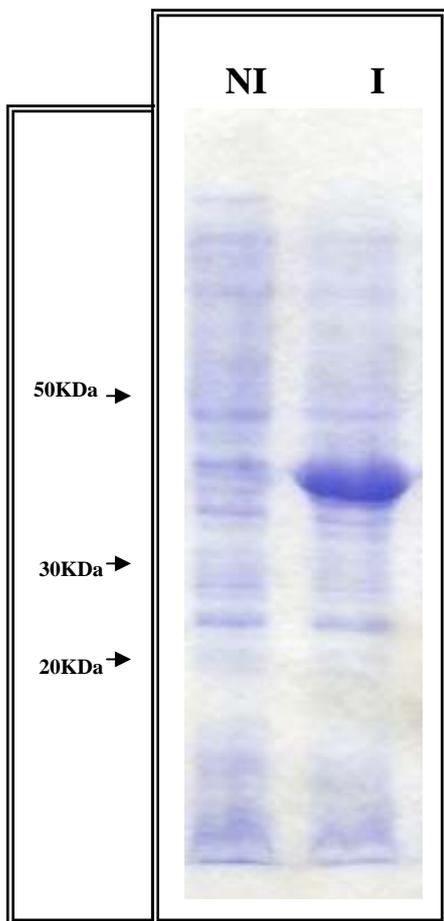
I pellets sono stati risospesi in tampone contenente urea 8M, in modo da rendere solubile la proteina, sonicati e caricati su colonna di affinità Ni-NTA.

L'eluizione è stata eseguita attraverso variazioni di pH che rompono il legame delle istidine con la resina. Aliquote delle frazioni ottenute sono state disciolte in "sample buffer" e le proteine solubilizzate sono state analizzate per elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12,5% in presenza di SDS. La colorazione del gel ha messo in evidenza una banda del peso molecolare atteso di circa 35kDa (Fig.29).

La proteina ricombinante così ottenuta è stata iniettata nel coniglio per la produzione di un anticorpo specifico anti-β1Cterm.

I sieri ottenuti (anti-peptidi e anti-β1Cterm.) sono stati quindi testati mediante Western blots usando come substrato l'estratto totale di vermi diviso nella frazione solubile (S40) e insolubile (P40) e come controllo i diversi antigeni usati per l'immunizzazione.

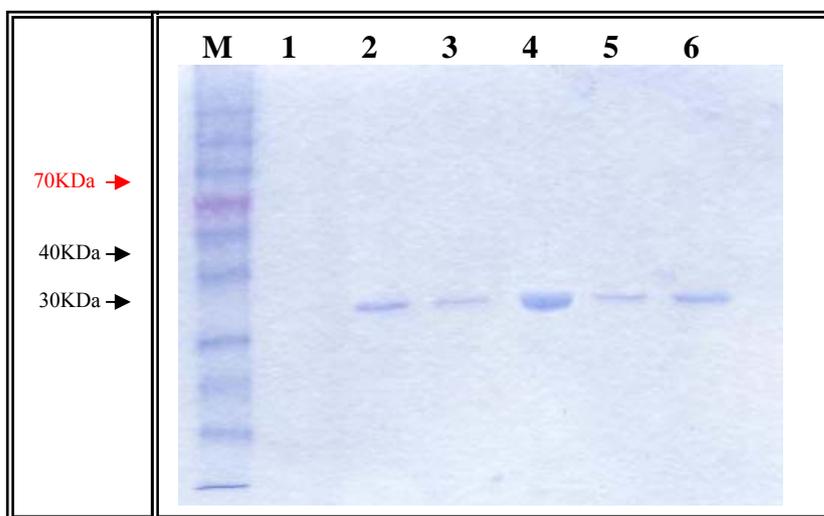
Tutti gli anticorpi ottenuti hanno perfettamente riconosciuto gli antigeni usati per l'immunizzazione (non mostrato). La proteina ricombinante β1Cterm, come atteso, è stata riconosciuta dal rispettivo anticorpo, ma non dai sieri anti-peptidi che sono diretti contro regioni della molecola non comprese nel prodotto ricombinante (Tab.3). Inespugnabilmente, invece, nessuno degli anticorpi prodotti ha evidenziato alcun segnale nella frazione solubile dell'estratto totale di schistosoma (Fig.30). Una delle possibili interpretazioni è che le subunità β vengano rapidamente degradate nell'estratto dei parassiti.



NI - Non indotto

I - Indotto con IPTG 0.5mM

Fig. 28- Elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12.5% di estratti proteici derivanti da 1 ml di batteri (pDEST17-β1Cterm).



M- Marker

1- 1^a eluizione pH 5.9

2- 2^a eluizione pH 5.9

3- 3^a eluizione pH 5.9

4- 4^a eluizione pH 4.5

5- 5^a eluizione pH 4.5

6- 6^a eluizione pH 4.5

Fig. 29- Purificazione della proteina di fusione relativa al frammento GatB1for/GatB1rev.

Eluizioni di una colonna di Nichel con tamponi a diverso pH.

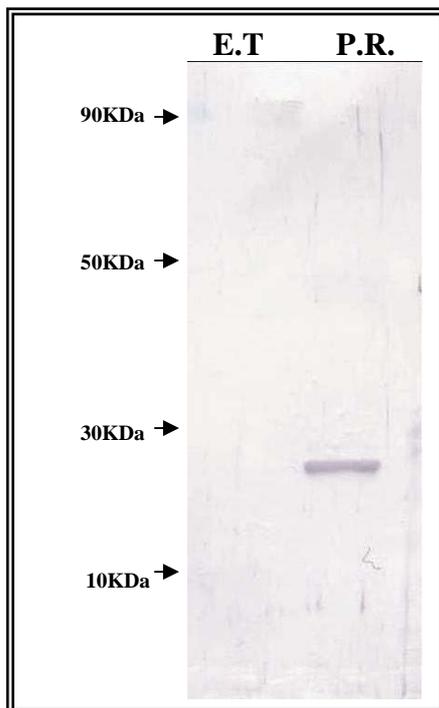
Sieri	S40	P40	B1Cterm.
Anti-1-NC	-	-	-
Anti-1-IN	-	-	-
Anti-β1Cterm	-	-	+

Tab. 3 – Nella tabella sono riportate le varie combinazioni di anticorpi rispetto ai diversi substrati utilizzati nei Western blots. In rosso sono evidenziati i risultati che differiscono dall'atteso.

S40: frazione solubile dell'estratto totale di vermi

P40: frazione insolubile dell'estratto totale di vermi

B1Cterm: proteina ricombinante espressa



E.T.- Estratto Totale di vermi

P.R.- Proteina ricombinante

Fig. 30 – Western blot eseguito sulla proteina ricombinante β1Cterm espressa in pDEST 17 e saggiata con l'anticorpo anti-1-IN.

3.2.2 - Utilizzazione degli anticorpi anti-subunità β per l'immunolocalizzazione della proteina.

Allo scopo di verificare se ad una minore suscettibilità al PZQ fosse associabile una differenza topografica dell'espressione della SmCa ν β 1 nel parassita, gli anticorpi sono stati utilizzati per la localizzazione della proteina in esperimenti di immunofluorescenza indiretta su sezioni di vermi di 4 e 7 settimane inclusi in paraffina.

Anche in questo caso non sono state riscontrate differenze nei diversi stadi di sviluppo del verme (Fig.31). Lo stesso risultato negativo si è ottenuto utilizzando sia gli anticorpi anti-peptidi sintetici che l'anticorpo contro la proteina ricombinante.

Anche in mancanza di dati di supporto da questa prima parte del nostro lavoro, il possibile coinvolgimento dei canali del calcio voltaggio dipendenti nel meccanismo d'azione del praziquantel, rimane sicuramente una delle ipotesi più attraenti tra quelle che sono state fino ad oggi proposte.



Fig. 31-Immunofluorescenza indiretta con anticorpi anti-peptidi su vermi immaturi di 4 settimane (A) e su vermi maturi di 7 settimane (B) inclusi in paraffina

3.3 - INFLUENZA DEI CLASSICI CALCIO-INIBITORI SULL'ATTIVITÀ DEL PZQ.

Abbiamo anche utilizzato inibitori dei canali del calcio come ulteriore dimostrazione della stretta corrispondenza tra l'azione del PZQ e i canali stessi.

Sono stati saggiati rappresentanti di Ca^{2+} antagonisti appartenenti alle tre classi dei composti organici (Fig.32):

- Benzotiazepine (BZP): Diltiazem
- Diidropiridine (DHP): Nifedipine, Nifedipine
- Fenilalchilamine (PAA): Verapamil, Methoxy-verapamil

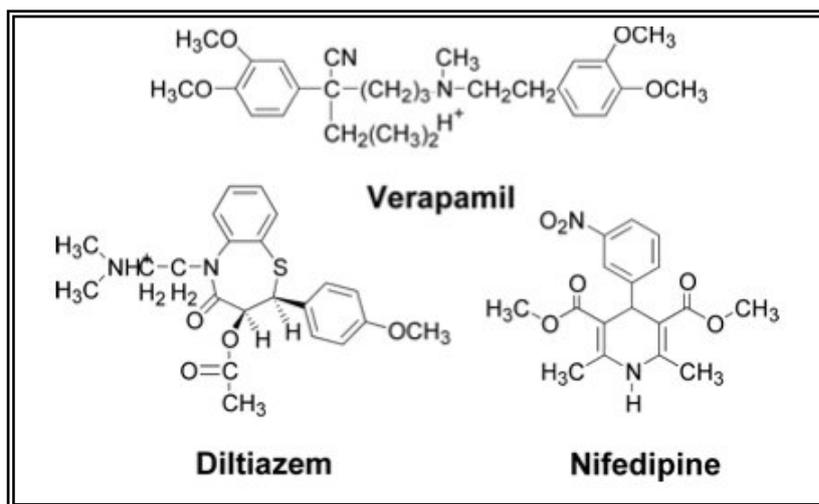


Fig. 32 - Struttura chimica di alcuni Ca^{2+} antagonisti.

Vermi maschi adulti sono stati pre-incubati per 1 ora con i diversi inibitori a due diverse concentrazioni ($5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) e successivamente trattati tutta la notte con il PZQ. La mattina seguente i parassiti venivano lavati e risospesi in mezzo senza farmaci e la sopravvivenza veniva osservata dopo 8 giorni dal trattamento.

Tra i vari calcio-antagonisti saggiati, le diidropiridine sono state quelle che hanno fornito una maggiore competizione con il PZQ, mostrando che un blocco dei canali del calcio permette la sopravvivenza di una larga percentuale di parassiti e dimostrando, inoltre, che i canali su cui il farmaco agisce sono probabilmente canali di tipo L (quelli appunto su cui agiscono le diidropiridine) (Tab.4).

Inhibitor	10µM inhibitor alone	PZQ 3µM alone	5µM inhibitor + 3µM PZQ	10µM inhibitor + 3µM PZQ
Bepidril	100%	15,2%	23,5%	18,5%
Verapamil	100%		25%	28,5%
Methoxy-Verapamil	100%		25%	19%
Diltiazem	100%		17,5%	17,5%
Nicardipine	100%		52,5%	49%
Nifedipine	100%		35,5%	50%

Tab. 4 - Colture *in vitro* di vermi maschi adulti trattati con inibitori dei canali del calcio ± PZQ. E' riportata la percentuale di sopravvivenza dopo 8 giorni.

3.4 - INFLUENZA DELLA STRUTTURA DEL CITOSCHELETRO SULL'ATTIVITÀ DEL PZQ.

Dal momento che la depolimerizzazione dell'actina è ampiamente descritta nei vertebrati come meccanismo di risposta ad un eccessivo afflusso di calcio attraverso i canali voltaggio-dipendenti, è stato verificato se un meccanismo analogo potesse esserci anche nello schistosoma. Lo stato di polimerizzazione dell'actina in seguito all'entrata di ioni calcio provocata dall'azione del PZQ è stato studiato per immunofluorescenza usando anticorpi anti-actina.

Dalle foto di immunofluorescenza (Fig.33) è evidente che negli schistosomi trattati con dosi letali di PZQ, i microfilamenti appaiono alterati già dieci minuti dopo la somministrazione del farmaco, fino ad esserlo totalmente dopo un trattamento overnight.

Si conferma quindi il concetto che la depolimerizzazione dei filamenti di actina, in risposta ad un massiccio afflusso di calcio, possa servire anche nello schistosoma come un meccanismo di feedback per attenuare i livelli potenzialmente tossici di tale afflusso.

L'influenza delle strutture citoscheletriche *in vitro* viene spesso messa in evidenza mediante gli effetti di agenti specifici: citocalasina e nocodazolo, i quali depolimerizzano rispettivamente i filamenti di actina e i microtubuli, mentre altre sostanze come la jaspalakinolide (per l'actina) e il taxolo (per la tubulina) li stabilizzano.

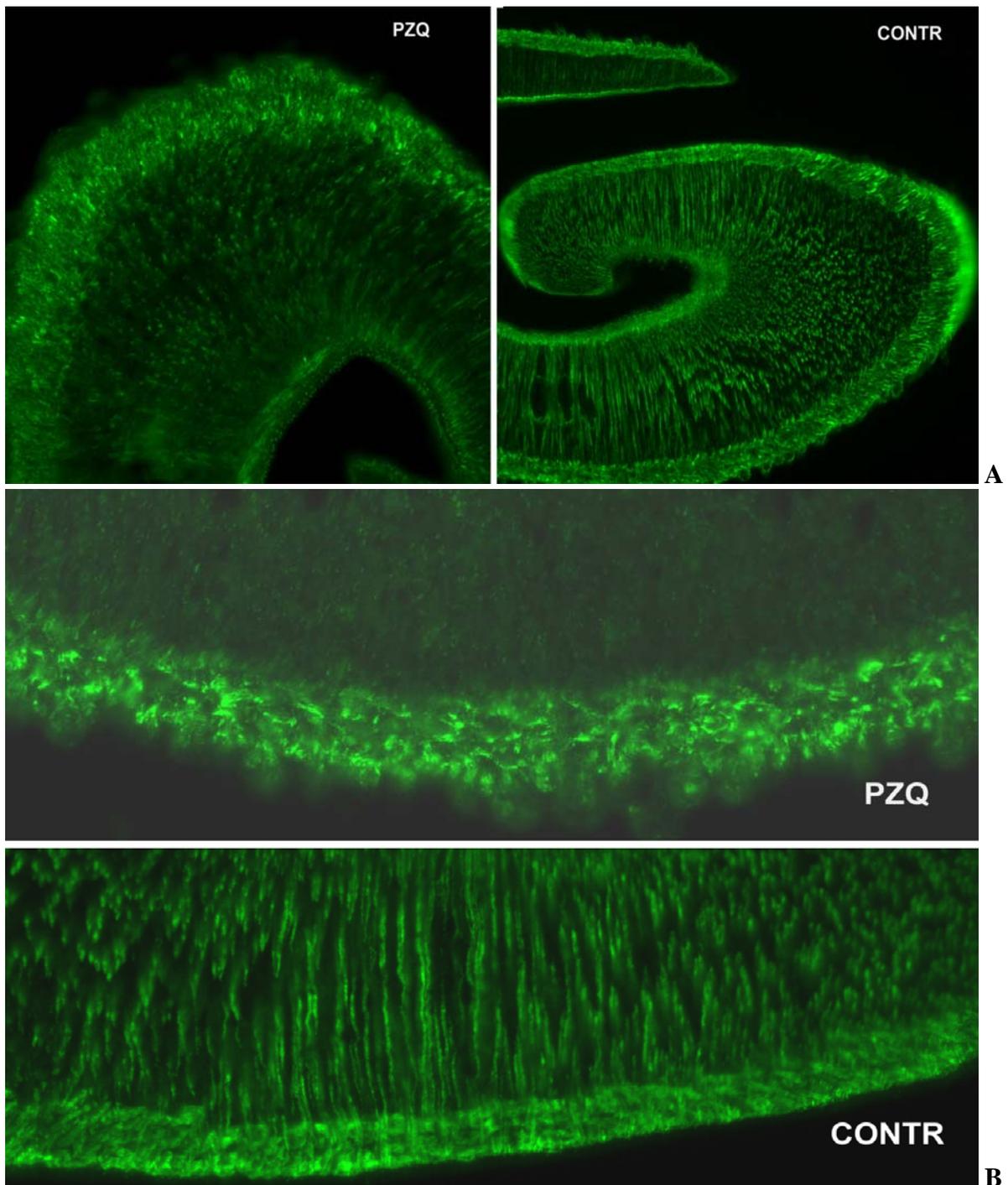


Fig. 33- Immunofluorescenza indiretta con anticorpo anti-actina su vermi maschi adulti trattati 10' con praziquantel (PZQ) e di controllo non trattati (CONTR) (A), e trattati O.N. con praziquantel (PZQ) e di controllo non trattati (CONTR) (B).

Alla luce di questi dati, vermi maschi adulti sono stati trattati *in vitro* con PZQ a diverse concentrazioni per circa 16 ore, dopo averli pre-incubati con citocalasina D (100nM e 1 μ M) per 1 ora. Dopo una nottata, sono stati lavati con soluzione fisiologica e posti nuovamente in coltura in mezzo privo del farmaco. Si è quindi monitorata la loro sopravvivenza dopo 8 giorni in coltura.

È stato visto che la citocalasina D da sola, ad entrambe le concentrazioni saggiate, non risulta essere tossica. Il dato interessante è che la pre-incubazione dei vermi con tale agente abolisce la vulnerabilità al PZQ, risultando così in una sopravvivenza del 100% (Tab.5).

PZQ alone 1µg/ml	Cyto alone 100nM	Cyto alone 1µM	Cyto 100nM + PZQ 1µg/ml	Cyto 1µM + PZQ 1µg/ml
0%	100%	100%	100%	100%

Cyto 1µM + PZQ 1µg/ml	Cyto 1µM + PZQ 3µg/ml	Cyto 1µM + PZQ 10µg/ml	Cyto 1µM + PZQ 20µg/ml
100%	100%	100%	100%

Tab. 5 – Colture *in vitro* di vermi maschi adulti trattati con Citocalasina D ± PZQ. E' riportata la percentuale di **sopravvivenza** dopo 8 giorni.

Tutto ciò non avviene, invece, nei vermi trattati con nocodazolo (Tab.6) e taxolo (Tab.7), dimostrando quindi un non coinvolgimento dei microtubuli nella regolazione dei canali del calcio.

Questi dati, nel loro insieme, fortemente supportano l'ipotesi di un diretto coinvolgimento dei canali del calcio voltaggio dipendenti nel meccanismo d'azione del praziquantel.

PZQ alone 1µg/ml	Noco alone 5µM	Noco alone 10µM	Noco 5µM+ PZQ 1µg/ml	Noco 10µM+ PZQ 1µg/ml
0%	100%	100%	0%	0%

Tab. 6 - Colture *in vitro* di vermi maschi adulti trattati con Nocotazolo ± PZQ. E' riportata la percentuale di sopravvivenza dopo 8 giorni.

PZQ alone 1µg/ml	Tax alone 50µM	Tax alone 100µM	Tax 50µM+ PZQ 1µg/ml	Tax 100µM+ PZQ 1µg/ml
0%	100%	100%	0%	0%

Tab. 7 - Colture *in vitro* di vermi maschi adulti trattati con Taxolo ± PZQ. E' riportata la percentuale di sopravvivenza dopo 8 giorni.

4 - DISCUSSIONE

Il controllo della schistosomiasi, in mancanza di un vaccino, è affidato pressoché totalmente alla chemioterapia e quest'ultima si basa in pratica su un unico farmaco, il praziquantel (PZQ).

Il meccanismo d'azione del PZQ non è stato ancora chiarito, mentre sono già apparsi allarmanti sospetti di farmaco-resistenza. Gli studi fatti in questo lavoro sono finalizzati alla comprensione del meccanismo d'azione del PZQ e si avvalgono anche di parassiti resistenti al farmaco, quali utili strumenti di controllo dei meccanismi proposti.

Il chiarimento del meccanismo d'azione è la premessa per lo sviluppo di farmaci analoghi con migliori caratteristiche oppure di nuovi farmaci diretti contro lo stesso bersaglio o bersagli simili del parassita. Il chiarimento del meccanismo di resistenza, d'altra parte, potrebbe portare alla progettazione di analoghi del PZQ attivi anche contro i parassiti resistenti.

Anche se i meccanismi molecolari dell'attività antiparassitaria del PZQ non sono chiari, sono ben noti alcuni fenomeni che si verificano precocemente e invariabilmente quando lo schistosoma viene in contatto con il farmaco, e cioè:

a)- una immediata contrazione della muscolatura del verme che risulta in una accentuata paralisi spastica, con notevole riduzione del volume apparente del parassita;

b)- un massiccio afflusso di ioni calcio dal mezzo esterno verso l'interno dello schistosoma;

c)- una profonda alterazione del tegumento del verme, dove compaiono, nel giro di 30 secondi, vacuolazioni e vescicolazioni che rapidamente conducono a un completo scompaginamento delle strutture superficiali.

A ben vedere, tutta questa sintomatologia potrebbe essere ricondotta ad un unico fenomeno, e cioè all'afflusso anomalo di Ca^{2+} nel parassita. Infatti la contrazione muscolare è la probabile conseguenza dell'aumentata concentrazione di Ca^{2+} , tanto più che essa si verifica solo parzialmente e temporaneamente in terreni privi di calcio. Anche il danno tegumentale potrebbe essere indotto dall'eccesso di calcio, dal momento che il citoscheletro di actina va incontro ad una massiccia depolimerizzazione in presenza di alte concentrazioni di calcio, come discuteremo meglio più avanti.

Capire il meccanismo in base al quale il PZQ uccide lo schistosoma potrebbe quindi essere equivalente a capire il meccanismo in base al quale il PZQ causa un afflusso di Ca^{2+} nel parassita. Per questo motivo viene qui considerata con grande interesse la recente ipotesi secondo cui il PZQ potrebbe agire sui canali del calcio voltaggio-dipendenti dello schistosoma e più specificamente sulle subunità β di tali canali [31].

Come descritto nell'Introduzione (§ 1.10), il fondamento dell'ipotesi qui analizzata sta nel fatto che la sequenza delle subunità β dei canali del calcio dello schistosoma presenta alcune peculiarità che non si riscontrano negli altri organismi, come ci si potrebbe aspettare appunto per un bersaglio molecolare specie-specifico [21]. Se tale peculiarità strutturale è alla base dell'azione del PZQ, ci è parso ragionevole supporre che una mutazione delle stesse subunità β potesse essere alla base della resistenza al farmaco.

Abbiamo visto (§1.5) che ceppi di schistosoma parzialmente resistenti al PZQ sono stati isolati da pazienti refrattari alla terapia e sono stati anche ottenuti in laboratorio mediante ripetuta pressione selettiva con il farmaco. In questo studio abbiamo appunto utilizzato un ceppo isolato da paziente e un ceppo di laboratorio (ambedue con una diminuita sensibilità al PZQ) ed abbiamo confrontato la sequenza dei geni delle loro subunità β con la sequenza delle stesse subunità in due ceppi normalmente sensibili al farmaco. A parte alcune mutazioni silenziose, la struttura primaria delle subunità β è risultata identica in tutti i ceppi.

E' stata quindi esaminata una ulteriore possibilità, e cioè che – pur avendo la stessa sequenza – le subunità β degli schistosomi insensibili al PZQ venissero espresse in quantità diversa rispetto a quelle degli schistosomi sensibili. Questo è stato saggiato valutando, mediante Northern blots, la quantità di RNA messaggero specifico per le subunità β .

Malgrado la metodica sia solo approssimativamente quantitativa, nessuna differenza significativa di espressione è stata messa in evidenza.

Gli esperimenti appena descritti erano condotti su schistosomi “resistenti” la cui insensibilità al PZQ era in realtà non molto elevata, come mostrato dalla loro ED₅₀ per il PZQ che era circa 3 volte più alta che negli schistosomi normalmente sensibili. Abbiamo allora deciso di confrontare l’espressione delle subunità β tra schistosomi adulti (7 settimane) e schistosomi immaturi (4 settimane), visto che questi ultimi sono decisamente insensibili al PZQ, presentando una ED₅₀ che è almeno 30 volte più alta che negli adulti. Tuttavia, anche tra queste due forme di schistosoma così largamente divergenti nella sensibilità al PZQ, non si è evidenziata alcuna differenza significativa nel livello di espressione delle subunità β dei canali del calcio.

E’ stata allora esaminata una ulteriore possibilità, e cioè che le subunità β , pur avendo la stessa sequenza e lo stesso livello globale di espressione in parassiti con alta o bassa sensibilità al PZQ, fossero in realtà localizzate in strutture differenti del parassita, ciò che avrebbe potuto dar conto di una loro diversa risposta funzionale in presenza del farmaco. Per saggiare questa ipotesi, si è reso necessario produrre anticorpi specifici per le subunità β di schistosoma, ciò che è stato ottenuto in due modi: da una parte si sono usati come antigeni immunizzanti alcuni peptidi sintetici corrispondenti a determinate sequenze della molecola, dall’altra si è espressa una porzione di proteina ricombinante che è stata similmente usata come immunogeno. I sieri ottenuti con i due approcci e utilizzati in analisi di immunofluorescenza hanno dato lo stesso risultato: le subunità β dei canali del calcio di schistosoma presentano la stessa localizzazione anatomica negli schistosomi adulti (sensibili al PZQ) e negli schistosomi immaturi (refrattari al PZQ).

In sostanza, questi esperimenti non hanno confermato l’ipotesi che le subunità fossero qualitativamente, quantitativamente o topograficamente diverse tra schistosomi più o meno sensibili al PZQ. Questo tuttavia non inficia l’ipotesi di base che postula il coinvolgimento delle stesse subunità β nel meccanismo d’azione del farmaco, poiché è possibile che una diminuita sensibilità – negli schistosomi da noi esaminati – sia causata da meccanismi che non comportano necessariamente una alterazione delle molecole bersaglio, ma potrebbe essere legata ad altri meccanismi, come – ad esempio – differenze di entrata, uscita o inattivazione metabolica del farmaco.

Abbiamo quindi deciso di intraprendere altri esperimenti che potessero fornire prove a favore o in contraddizione con l’ipotesi generale di un coinvolgimento dei canali del calcio nel meccanismo d’azione del PZQ.

Sono noti – e largamente impiegati in terapia – un gran numero di farmaci che sono in grado di bloccare il funzionamento di vari tipi di canali del calcio. Tali farmaci “calcio inibitori”, come accennato nell’Introduzione (§1.9), si legano a specifiche sequenze delle subunità $\alpha 1$ dei canali del calcio e impediscono il passaggio di ioni attraverso il poro che è formato appunto dalla subunità $\alpha 1$. Se l’azione del PZQ è veramente mediata da un forte passaggio di Ca^{2+} attraverso i canali voltaggio-dipendenti, un blocco di tali canali dovrebbe contemporaneamente bloccare anche l’azione schistosomicida del farmaco. Non sappiamo però che tipo di canali del calcio (cioè quali subunità $\alpha 1$) siano presenti nello schistosoma e quali tra questi siano veramente coinvolti nel meccanismo del PZQ. Di conseguenza è difficile prevedere il tipo di calcio-inibitori che potrebbero bloccare l’azione schistosomicida. Delle tre subunità $\alpha 1$ che sono state sinora caratterizzate in *Schistosoma*, una è di tipo L mentre le altre due sono “non-L type”. Queste subunità presentano tuttavia differenze nelle sequenze stereospecifiche che legano i farmaci; ad esempio, la catena L-type presenta solo 6 aminoacidi conservati sui 13 che legano le diidropiridine nei vertebrati.

Abbiamo quindi provato l’effetto di differenti calcio-inibitori sulla capacità schistosomicida del PZQ, scegliendo un paio di rappresentanti da ogni classe di inibitori. Il risultato ottenuto è di un certo interesse, poiché gli inibitori della classe delle diidropiridine hanno mostrato un chiaro effetto di interferenza sulle proprietà schistosomicide del PZQ,

mentre le altre classi di inibitori erano del tutto inattivi. Il blocco ottenuto non era totale, ma questo non è sorprendente, vista la conservazione solo parziale del dominio stereospecifico di legame per le diidropiridine, come sopra accennato. L'esperimento suggerisce due conclusioni e cioè, in primo luogo che l'azione del PZQ è veramente mediata da un flusso di Ca^{2+} che passa attraverso i canali voltaggio-dipendenti dello schistosoma, e in secondo luogo che i canali coinvolti sono probabilmente canali "L-type", giacché questo è il tipo su cui agiscono normalmente le diidropiridine nei vertebrati.

Abbiamo infine considerato un'altra importante proprietà dei canali del calcio, e cioè la connessione funzionale (e probabilmente strutturale) che essi hanno con il citoscheletro di actina nei sistemi sinora studiati. E' stato ad esempio dimostrato, nelle cellule nervose, che l'afflusso di Ca^{2+} attraverso i canali voltaggio-dipendenti provoca la depolimerizzazione dei filamenti di actina. Ciò a sua volta blocca l'ulteriore afflusso di Ca^{2+} e previene in tal modo la morte neuronale in conseguenza di un eccesso di concentrazione di ioni Ca^{2+} [28].

Anche nel tessuto cardiaco, Nakamura *et al.* hanno dimostrato che la regolazione dei canali dipende in modo preciso dai vari componenti del citoscheletro delle cellule: i microfilamenti, ad esempio, regolano le correnti di Ca^{2+} nei canali L-type dei miociti cardiaci di mammifero. Le interazioni fra il citoscheletro e l'attività dei canali del Ca^{2+} sono state studiate utilizzando degli agenti capaci di distruggere selettivamente diversi componenti del citoscheletro, vale a dire la citocalasina D per i microfilamenti dell'actina, il nocodazolo per i microtubuli e la colchicina per entrambi. Evidenziando il citoscheletro con tecniche di immunofluorescenza, Nakamura *et al.* hanno dimostrato che la depolimerizzazione dei filamenti di actina ha inibito l'attività dei canali del Ca^{2+} , mentre lo scompaginamento dei microtubuli non ha avuto effetto [27].

Per quanto riguarda lo schistosoma, noi abbiamo innanzitutto verificato se anche nel parassita esistessero simili interazioni tra la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare e la struttura del citoscheletro. In effetti, l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} causato dal PZQ ha prodotto una drammatica distruzione del citoscheletro di schistosoma, come abbiamo potuto documentare usando anticorpi anti-actina in esperimenti di immunofluorescenza. Tali effetti erano già visibili 10 min dopo l'aggiunta di PZQ e sono divenuti imponenti dopo una nottata di trattamento.

Una volta verificata anche nello schistosoma la stretta connessione tra stato del citoscheletro e attività dei canali del calcio, ci siamo infine chiesti se agenti che producono la depolimerizzazione dei filamenti di actina (come la citocalasina D) sarebbero stati in grado di bloccare l'attività dei canali del calcio e di conseguenza l'azione schistosomicida del PZQ, dimostrando così che il meccanismo d'azione del farmaco dipende appunto dalla sua interferenza con il funzionamento dei canali stessi.

Il risultato degli esperimenti è stato chiarissimo: la citocalasina ha infatti causato lo scompaginamento dei filamenti di actina dello schistosoma, ma tale azione – essendo reversibile – non ha provocato la morte del parassita. La presenza della citocalasina durante l'esposizione al PZQ, invece, ha bloccato completamente l'effetto schistosomicida del farmaco. Vale la pena di sottolineare che questo è il primo caso in cui si è ottenuta l'abolizione totale degli effetti schistosomicidi del PZQ. Nocodazolo e taxolo (che non agiscono sui microfilamenti di actina, ma sui microtubuli) non hanno avuto alcun effetto sull'attività del PZQ. Il fatto che un blocco dei canali del calcio –ottenuto indirettamente tramite la depolimerizzazione dei filamenti di actina – sopprima totalmente l'effetto del PZQ, rappresenta una forte evidenza in favore dell'ipotesi di lavoro esaminata in questa tesi, e cioè che il farmaco agisca appunto modificando il funzionamento dei canali del calcio dello schistosoma. Tale azione è probabilmente mediata dagli effetti regolatori della subunità β , che potrebbe essere il bersaglio effettivo del PZQ, ma questi dettagli necessitano di studi ulteriori per essere chiariti.

5 - BIBLIOGRAFIA

- 1- Chitsulo L., Engels D., Montresor A., Savioli L. (2000) - The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*. 77:41-51.
- 2- Sirewalt MA., Hackey JR. (1956) - Penetration of host skin by cercariae of *S. mansoni*. I. Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. *J. Parasitol.* 42:565-579.
- 3- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Archer S. (1995) - Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmacol. Ther.* 68:35-85.
- 4- Doenhoff MJ., Kimani G., Cioli D. (2000) - Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitol. Today* 16:364-366.
- 5- Cioli D. (2000) - Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Curr. Op. Inf. Dis.* 13:659-663.
- 6- Gryseels B., Stelma FF., Talla I., Van Dam GJ., Polman K., Sow S., et al. (1994) - Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Trop. Geogr. Med.* 46:209-219.
- 7- Fallon PG., Sturrock RF., Capron A., Niang M., Doenhoff MJ. (1995) - Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:61-62.
- 8- Ismail M., Metwally A., Farghaly A., Bruce J., Tao LF., Bennett JL. (1996) - Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 55:214-218.
- 9- Fallon PG., Doenhoff MJ. (1994) - Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:83-88.
- 10- Day TA., Bennett JL., Pax RA. (1992) - Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. *Parasitol. Today* 8:342-344.
- 11- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Archer S., (1993) - Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today* 9:162-166.

- 12- Cioli D. and Pica-Mattocchia L. (2003) - Praziquantel. *Parasitology Research* (Suppl.1) 90:S3- S9.
- 13- Pax R., Bennett JL., Fetterer R. (1978) - A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn-Schiedberg's Arch. Pharmacol.* 304:309-315.
- 14- Sabah AA., Fletcher C., Webbe G., Doenhoff MJ. (1985) - *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* 61:294-303.
- 15- Renganathan E., Cioli D. (1998) - An international initiative on praziquantel use. *Parasitol. Today* 14:390-391.
- 16- Cioli D., Botros SS., Wheatcroft-Francklow K., Mbaye A., Southgate V., Tchuente LA., Pica-Mattocchia L., Troiani A.R., El-Din SH., Sabra AN., Albin J., Engels D., Doenhoff MJ (2004)- Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and – susceptible *Schistosoma mansoni* isolates – *Int. Journ. Paras.* 34:979-987.
- 17- Xiao SH., Catto BA., Webster LT. (1985) - Effects of praziquantel on different development stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* 151:1130-1137.
- 18- Harnett W., Kusel JR. (1986) - Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology* 93:401-405.
- 19- Sabah AA., Fletcher C., Webbe G., Doenhoff MJ. (1985) - *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. *Exp. Parasitol.* 60:348-354.
- 20- Andrews P., Thomas H., Pohlke R., Seubert J. (1983) - Praziquantel.- *Med. Res. Reviews* 3:147-200.
- 21- Kohn A, Anderson PAV, Roberts-Misterly JM, Greenberg R (2001) Schistosome calcium channel β subunits. *J. Biol. Chem.* 276:36873-76.
- 22- Steven C. Hebert, MD (1998) – General principles of the structure of ion Channels – *Am. J. Med.* 104:87-98.
- 23- Striessnig J. (1999) – Pharmacology, Structure and Function of Cardiac L-Type Ca^{2+} Channel. *Cell. Physiol. Biochem.* 9:242-269.
- 24- Kohn AB., Roberts-Misterly JM., Anderson PA., Khan N., Greenberg RM. (2003) – Specific sites in the Beta Interaction Domain of a schistosome Ca^{2+} channel beta subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel – *Parasitology*, 127(Pt 4):349-56.
- 25- Kohn AB., Lea JM., Roberts-Misterly JM., Anderson PAV., and Greenberg RM. (2001) – Structure of three high voltage-activated calcium channel $\alpha 1$ subunits from *Schistoma mansoni* – *Parasitology*, 123:489-497.
- 26- Kohn AB., Roberts-Misterly JM., Anderson PA., Greenberg RM. (2003) – Creation by mutagenesis of a mammalian (Ca^{2+}) channel beta subunit that confers praziquantel sensitivity to a mammalian (Ca^{2+}) channel – *Int J Parasitol.* 33(12):1303-8.

- 27- Nakamura M., Sunagawa M., Kosugi T., and Sperelakis N. (2000) – Actin filament distribution inhibits L-type Ca²⁺ channel current in cultured vascular smooth muscle cells – Am. J. Physiol. Cell Physiol. 279:C480-C487.
- 28- Furukawa K., Smith-Swintosky VL. and Mattson MP. (1995) – Evidence that actin depolymerization protects hippocampal neurons against excitotoxicity by stabilizing [Ca²⁺]_i. – Exp. Neurol. 133:153-163.
- 29- Lader AS., Kwiatkowski DJ. and Cantiello HF. (1999) – Role of gelsolin in the actin filament regulation of cardiac L-type calcium channels - Am J Physiol. 277(6 Pt 1):C1277-83.
- 30- Cioli D. (1976) - Transfer of *Schistosoma mansoni* into the mesenteric veins of hamsters.- Int J Parasitol., 6:349-354.
- 31- Greenberg RM. (2005) - Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? - Int J Parasitol., 35(1):1-9.

6 - PUBBLICAZIONI

- 1) C. Valle, **A.R. Troiani**, A. Festucci, L. Pica-Mattoccia, P. Liberti, A. Wolstenholme, K. Francklow, M.J. Doenhoff, D. Cioli.- *Sequence and level of endogenous expression of calcium channel beta-subunits in schistosome isolates and developmental stages displaying different susceptibilities to praziquantel.*- Mol. Biochem. Parasitol. 130 (2003) 111-115.
- 2) C. Valle, **A.R. Troiani**, A. Festucci, L. Pica-Mattoccia, D. Cioli - *Possible implications of Schistosoma mansoni calcium channel beta subunits in the mechanism of action of Praziquantel* - Joint Malaria & BSP Spring Meeting, April 3-6, 2003, Manchester (UK).
- 3) Cioli D., Botros SS., Wheatcroft-Francklow K., Mbaye A., Southgate V., Tchuente LA., Pica-Mattoccia L., **Troiani A.R.**, El-Din SH., Sabra AN., Albin J., Engels D., Doenhoff MJ.- *Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible Schistosoma mansoni isolates* – Int. Journ. Paras. 34 (2004) 979-987.
- 4) F. Angelucci, KA. Johnson, P. Baiocco, A.E. Miele, M. Brunori, C. Valle, F. Vigorosi, **A.R. Troiani**, P. Liberti, D. Cioli, M.Q. Klinkert, and A. Bellelli. - *Schistosoma mansoni Fatty Acid Binding Protein: Specificity and Functional Control as Revealed by Crystallographic Structure.* - Biochemistry 43 (2004) 13000-13011.
- 5) C. Valle, **A.R. Troiani**, P. Lazzaretti, J. Bouvier, D. Cioli and M.Q. Klinkert – *Molecular and biochemical characterizations of a protein cyclophilin from the gastrointestinal nematode Haemonchus contortus* – Parasitol. Res. 96 (4), (2005) 199-205.
- 6) C. Valle, A.L. Basso, **A.R. Troiani**, L. Pica-Mattoccia, D. Cioli – *Studies on the mechanism of action of Praziquantel* – International Symposium “Control of Selected parasitic diseases” Oct.13-16, 2005, Oberflockenbach (Heidelberg).

7 - RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di tesi è stato svolto nell'Istituto di Biologia Cellulare del CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche). Vorrei ringraziare tutti i componenti del laboratorio: Cristiana Valle, Livia Pica, Alfredo Festucci, Anna Lisa Basso, Fabio Vigorosi e Alessandra Guidi, per le straordinarie qualità umane e professionali che ho potuto apprezzare durante tutti gli anni trascorsi nell'Istituto.

In particolare desidero esprimere tutta la mia gratitudine al mio Tutor, Dott. Piero Liberti, per la costante supervisione e per i suoi preziosi consigli, ed al Dott. Donato Cioli per il supporto scientifico nella realizzazione di questo progetto.

Ringrazio il mio docente guida, il Prof. Maurizio Brunori, per la sua disponibilità e il supporto critico ricevuto durante i tre anni di Dottorato, e tutti gli altri membri del gruppo che a lui fanno riferimento.

Infine ringrazio Gianni per la sua pazienza e il costante incoraggiamento: a lui dedico questa tesi.