SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE**

**PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE**
**XXVIII CICLO**

**Dott.ssa Giulia Siciliano**

La Dott.ssa Giulia Siciliano, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma), presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, sotto la supervisione del Dott. Pietro Alano e del Dott. Andrea Cara, ed un periodo di formazione all'estero presso la Columbia University a New York, sotto la supervisione del Dottor David Fidock.

Nel corso del Dottorato, la Dott.ssa Siciliano si è occupata della messa a punto di saggi utili per identificare vie metaboliche attive nei gametociti maturi, da utilizzare come target per nuovi farmaci atti a bloccare le forme di trasmissione della malaria.

La forma più pericolosa e mortale di malaria nell'uomo è causata dal parassita *Plasmodium falciparum*. Il parassita è trasmesso all'uomo dalla femmina della zanzara del genere *Anopheles,* che inietta gli sporozoiti nel sangue durante il suo pasto di sangue. Queste forme extracellulari migrano velocemente nel fegato attraverso il circolo ematico. Ogni sporozoita che invade un epatocita si divide mitoticamente e si differenzia in migliaia di merozoiti epatici che, rilasciati, invadono gli eritrociti, originando il ciclo asessuato intraeritrocitario. Questo ciclo, della durata di circa 48 ore, è responsabile dei sintomi clinici causati dall'infezione del parassita malarico.

Nel sangue, alcune forme intra-eritrocitiche si differenziano, con un meccanismo ancora poco conosciuto, in gametociti maschili e femminili, le forme sessuali del parassita. All'interno dell'eritrocita, il parassita che ha intrapreso il differenziamento sessuale si sviluppa attraverso cinque stadi di maturazione che complessivamente durano circa 12 giorni. I gametociti maturi (stadio V), se risucchiati dalla zanzara *Anopheles* durante il suo pasto di sangue, si sviluppano in gameti all'interno del suo stomaco. Dalla fusione di un gamete femminile e uno maschile si forma uno zigote, il quale si differenzia in un oocinete, che attraversa la parete dello stomaco e si trasforma in oocisti nell'emocele dell'insetto. Da questa oocisti sono rilasciati gli sporozoiti che migrano nelle ghiandole salivari e che verranno poi inoculati nell'ospite umano al successivo pasto di sangue.

I gametociti di *P. falciparum* sono i responsabili della trasmissione del parassita dall'ospite umano alla zanzara. Tutti i farmaci ad oggi conosciuti sono utilizzati per curare i sintomi della malattia e quindi sono volti a eliminare le forme asessuate del parassita; l'unico farmaco ad oggi utilizzato contro i gametociti maturi di *P. falciparum* è la primachina. La carenza di farmaci contro i gametociti è in parte dovuta alla mancanza di un saggio cellulare veloce, quantitativo e

riproducibile, in grado di testare l'effetto di diverse librerie di composti sui gametociti. Tutto ciò è legato al fatto che i gametociti maturi di *P. falciparum* sono stati fino ad oggi considerati cellule apparentemente quiescenti, con un metabolismo rallentato rispetto a quanto osservato per i parassiti asessuati e per i gametociti immaturi, rendendo difficile la misurazione dell'effetto di composti su questo stadio del parassita. Quest'ultima osservazione deriva dal fatto che i gametociti maturi sono spesso insensibili ai farmaci attivi contro le forme asessuate del parassita e contro i gametociti immaturi. Di conseguenza, è necessario identificare vie metaboliche attive nei gametociti maturi come target per nuovi farmaci. Un'altra importante caratteristica dei gametociti di *P. falciparum* è la difficoltà nel valutare, tramite analisi morfologica, se siano vivi o morti dopo trattamento farmacologico *in vitro*.
Nell'ambito di queste problematiche la Dott.ssa Siciliano ha sviluppato alcuni saggi in grado di valutare la capacità di diversi composti di eliminare i gametociti.
Il primo di questi è un saggio in bioluminescenza a due colori per valutare l'attività di farmaci su stadi immaturi e maturi di gametociti di P*lasmodium falciparum*. Questo saggio si basa sulla costruzione di linee transgeniche di *P. falciparum* in cui due differenti luciferasi, capaci di emettere luce di lunghezza d'onda differente, sono guidate da un promotore attivo durante tutto lo sviluppo sessuale del parassita.
Sono state selezionate le varianti verde wild-type (PpyWT), rossa (PpyRE10) e verde e termostabile (PpyGRTS) di *P. pyralis*, una variante rossa della luciferasi prodotta dalla lucciola *Luciola italica* (LitRE6) e le varianti verde (CBG99) e rossa (CBR) della luciferasi prodotta dallo scarabeo *Pyrophorus plagiophthalamus*, fatte esprimere in parassiti transgenici, sotto la regolazione del promotore del gene *pfs16,* attivo durante tutta la gametocitogenesi di *P. falciparum,* e misurata la loro attività in gametociti immaturi e maturi di parassiti transgenici di *P. falciparum*. Poichè le due luciferasi CBG99 e CBR sono risultate, tra tutte quelle misurate, le più attive, sono state selezionate per un saggio in bioluminescenza a due colori. Il saggio è stato validato utilizzando farmaci conosciuti per essere attivi contro gametociti immaturi (clorochina) e contro gametociti sia immaturi sia maturi (epoxomicina).
Solitamente, i substrati commerciali di luciferasi contengono ATP, stabilizzatori del segnale bioluminescente e soluzioni lisanti che aumentano il segnale emesso dalle luciferasi, la cui persistenza nel tempo e, in teoria, in cellule morte, rende più difficile valutare la vitalità reale delle cellule che esprimono reporter luminescenti. Per questo motivo, la Dott.ssa Siciliano ha introdotto per la prima volta l'utilizzo, in saggi su *P. falciparum,* di una soluzione contenente solo D-Luciferina, il substrato della luciferasi, senza ATP, stabilizzanti e composti lisanti. Con questo reagente la luciferasi utilizza l'ATP prodotto dal parassita e, di conseguenza, emette luce solo se il parassita è vivo.
Tutti i saggi ad oggi esistenti basati su linee transgeniche di *P. falciparum* utilizzano un numero limitato di promotori specifici per stadi sessuati del parassita e prevalentemente quelli attivi durante tutti gli stadi di gametocitogenesi. Gli unici promotori ad oggi descritti per essere specificamente attivi in stadi tardivi di gametocitogenesi sono quelli del gene e del gene *mal8p1.16*, i quali però sono entrambi poco efficienti per questo tipo di saggi. Allo scopo di identificare nuove regioni regolative di *P. falciparum* specificamente ed efficientemente attive in stadi tardivi della gametocitogenesi sono stati selezionati 8 geni sulla base di un'analisi del trascrittoma del parassita nel corso dello sviluppo asessuato e sessuato. Sono stati costruiti dieci plasmidi in cui l'espressione del gene codificante il reporter fluorescente GFP era controllato dalle regioni regolative (promotore e 3' UTRs) degli 8 geni selezionati e da quelle dei geni di controllo *pfs28* e *mal8p1.16*. I dieci plasmidi sono stati trasfettati mediante elettroporazione in colture della linea 3D7 di *P. falciparum* e si sono ottenute altrettante linee stabili da cui sono stati ottenuti gametociti immaturi e maturi su cui sono state effettuate analisi qualitative (microscopia a fluorescenza) e quantitative (FACS) dell'espressione della GFP. Questi esperimenti hanno permesso di individuare una regione regolativa, promotore e 3'UTR, del gene *pfl1675c,* che attivata la trascrizione di RNA in gametociti maturi, più efficientemente di quelle dei geni di riferimento *pfs28* e *mal8p1.16*.

Durante il periodo trascorso presso la Columbia University a New York, sotto la supervisione del Dottor David Fidock, la Dott.ssa Siciliano ha preparato e trasfettato un plasmide in cui la regione regolativa del gene *pfl1675c* controllava l'espressione del gene codificante la luciferasi CBG99. In tale plasmide è stata clonata anche una sequenza, attP, che, in presenza della integrasi del micobatteriofago Bxb1, co-trasfettata in un secondo plasmide, ha permesso l'integrazione di tutto il plasmide contenente la cassetta *pfl1675c*-CBG99, in una sequenza attB del gene *cg6* non essenziale per lo sviluppo del parassita all'interno dell'ospite umano. Il risultato di questo lavoro è stata la generazione della linea NF54-cg6-pfl1675c-CBG99, che è stata analizzata mediante PCR per valutare l'avvenuta integrazione del plasmide. L'espressione della luciferasi è stata poi analizzata in un time course della gametocitogenesi. Tali analisi hanno dimostrato non solo che l'integrazione è avvenuta con successo, ma anche che le regioni regolative del gene *pfl1676c* attivano l'espressione di tale cassetta di espressione con maggiore efficienza nei gametociti maturi rispetto a quelli immaturi, anche in seguito ad integrazione stabile nel cromosoma del parassita.
I gametociti maturi di *P. falciparum*, se sottoposti ad un calo di temperatura in presenza di 40 μM di acido xanturenico (XA), una molecola presente nell'insetto *Anopheles*, sono attivati a trasformarsi in gameti. Questo processo avviene solitamente nell'intestino della zanzara ed è inizialmente caratterizzato dalla transizione del parassita dalla sua forma allungata, caratteristica dei gametociti maturi maschi e femmine, ad una forma sferica ed è conosciuto come rounding up. Partendo dal presupposto che questo processo richiede che il gametocita sia vivo per poter sentire e rispondere ai cambiamenti ambientali che determinano il suo sviluppo a gamete, si è ipotizzato che l'effetto di composti sulla vitalità di gametociti maturi di *P. falciparum* possa essere misurato mediante un saggio fenotipico di imaging capace di valutare la capacità dei gametociti maturi di fare *rounding up in vitro*.
Per la messa a punto del saggio è stata utilizzata la linea di *P. falciparum* descritta nel paragrafo precedente, in cui le regioni regolative del gene *pfl1675c* guidano l'espressione di una GFP a partire dai gametociti maturi. Dopo avere osservato che sia le forme allungate che quelle sferiche dopo il *rounding up* avevano lo stesso livello di fluorescenza, il saggio di imaging è stato basato sulla possibilità di distinguere la forma allungata del gametocita maturo dalla forma sferica del gamete, mediante microscopia a fluorescenza. Avendo stabilito il protocollo per l'induzione del *rounding up* e la sua visualizzazione ed acquisizione di immagine su una stazione robotizzata per microscopia e analisi di immagine Scan^R Olympus, il saggio è stato validato con farmaci di controllo (epoxomicina e blu di metilene) ad azione anti-gametocita, e con composti in grado di bloccare il processo di *rounding up* in maniera specifica (CMPD-2).
In base a questi risultati il saggio è stato ottimizzato per un suo utilizzo con parassiti non transgenici, in cui gli stadi di interesse erano colorati con il colorante fluorescente arancio di acridina (AO).
Per l'dentificazione di nuovi farmaci e nuove combinazioni di farmaci attivi contro i gametociti maturi di *Plasmodium falciparum,* nel laboratorio del Dott. David Fidock, Columbia University, è stata misurata l'attività di un composto, l'Actelion-451840, la cui struttura contiene piperazina, su stadi asessuati del parassita *P. falciparum*. Questo composto si è dimostrato molto attivo, con un valore di IC50 minore di 1nM. Inoltre, sono stati selezionati parassiti resistenti all'Actelion-451840 mediante due diverse strategie: esposizione prolungata di stadi asessuati del parassita a dosi appropriate, non letali di composto; questo ha portato ad identificare il possibile target del composto nel gene che codifica per la "multidrug resistance protein 1" di *P. falciparum* (*pfmdr1*). Conferma del ruolo di questo target introducendo, mediante il sistema CRISPR/Cas9, specifiche mutazioni nel gene *pfmdr1*, osservando che queste erano sufficienti a conferire al parassita resistenza al composto. Diverse mutazioni della proteina PfMDR1 sono responsabili della resistenza del parassita a diversi farmaci anti-malarici, come ad esempio alla clorochina. La proteina risiede nella membrana del vacuolo digestivo del parassita, compartimento acido in cui avviene la digestione dell'emoglobina con conseguente formazione e accumulo al suo interno di emozoina (o pigmento). La digestione dell'emoglobina avviene durante tutto il ciclo asessuato del parassita e durante la gametocitogenesi,

fino a quando il gametocita raggiunge lo stadio IV di maturazione, mentre non è rilevabile in gametociti più maturi di stadio V.
Per investigare un possibile effetto dell'Actelion-451840 sullo sviluppo sessuale del parassita, la Dott. Siciliano si è occupata di misurare l'attività dell'Actelion-451840 su gametociti immaturi e maturi dei diversi ceppi sensibili e resistenti descritti. Per prima cosa, è stata misurata l'attività del composto su gametociti immaturi e maturi di un ceppo resistente alla clorochina e di un ceppo wild-type di *P. falciparum*. Il composto è risultato molto attivo su entrambi i ceppi e, sorprendentemente, non solo su gametociti immaturi, ma anche su quelli maturi, solitamente insensibili all'attività di molti antimalarici. Mediante l'utilizzo di un colorante fluorescente, il LysoTracker, che dà un segnale quando è localizzato in compartimenti acidici di tipo lisosomiale, è stata osservata la presenza di un vacuolo digestivo attivo in tutti gli stadi di gametocitogenesi dimostrando funzionalmente che il sito in cui risiede la PfMDR1 è presente anche nello stadio più maturo dei gametociti.
Per comprendere se il meccanismo di azione dell'Actelion-451840 sui gametociti fosse lo stesso che per gli stadi asessuati, è stata misurata l'attività del composto su gametociti immaturi e maturi di un ceppo selezionato per la resistenza al composto e di un ceppo ingegnerizzato nel gene *pfmdr1*. In gametociti immaturi e maturi è stato osservato un simile aumento dei valori di IC50 tra gametociti delle linee resistenti rispetto a quelli isogenici delle linee sensibili, indicando che il meccanismo d'azione dell'Actelion-451840 rimane invariato tra stadi asessuati e sessuati del parassita, e suggerendo un inaspettato ruolo di PfMDR1 nei gametociti maturi di *P. falciparum*.
Un secondo obiettivo della ricerca è stato lo studio delle sinergie tra farmaci che alterano il metabolismo redox in gametociti maturi
Il blu di metilene è un blando disinfettante delle vie urinarie che ha acquisito importanza per la sua azione chemoterapica per la quale è stato recentemente dimostrato essere attivo contro i gametociti di *P. falciparum*. Il meccanismo di azione di questo farmaco è controverso, ma si ipotizza che agisca inibendo l'attività enzimatica della glutatione reduttasi (GR), la quale agisce riducendo, in maniera NADPH-dipendente, il glutatione che, nella forma ridotta (GSH), partecipa a molti processi di detossificazione del parassita.
La Dott.ssa Siciliano ha utilizzato la linea di *P. falciparum* appena descritta per studiare il meccanismo di azione del blu di metilene su tali gametociti, mediante la misurazione dell'attività di questo farmaco in combinazione con diversi farmaci o inibitori enzimatici noti per alterare il metabolismo redox del parassita negli stadi asessuati. Tra questi, è stata analizzata l'azione di un composto, l'ML304, che agisce bloccando l'attività di un enzima bifunzionale di *P. falciparum*, la Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi-6-fosfogluconolattonasi (PfGluPho), omologo della glucosio-6-fosfato deidrogenasi umana, che catalizza le prime due reazioni della via dei pentosi fosfato, producendo circa l'80% dell'NADPH presente nell'eritrocita infettato dal parassita asessuato. Abbiamo osservato che questo composto, attivo sugli stadi asessuati del parassita, non mostra alcuna attività sui gametociti maturi (IC50 =65$\mu$M). Tuttavia, utilizzato su gametociti maturi di *P. falciparum* ad una concentrazione di 1$\mu$M in esperimenti dose-risposta con il blu di metilene, ne potenzia drasticamente l'azione abbassando di circa 20 volte la sua IC50.
Questo risultato mostra che il metabolismo redox del parassita è ancora attivo negli stadi sessuali ed è un importante punto di partenza per capire come contrastare i gametociti maturi a livello del loro metabolismo ossidativo e per considerare nuove vie metaboliche da attaccare per bloccare le forme di trasmissione della malaria.

**PUBBLICAZIONI 2012-2015**

Cevenini L, Michelini E, Calabretta M, Camarda G, **Siciliano G**, Branchini B, Roda A, Alano P. Bioluminescence helps Malaria Research: Exploiting new Luciferases to improve analytical performance of Antimalarial screening assays. Luminescence 2014 Aug; 29:81.

Cevenini L, Camarda G, Michelini E, **Siciliano G**, Calabretta MM, Bona R, Santha Kumar TR, Cara A, Branchini BR, Fidock DA, Roda A, Alano P. Multicolor Bioluminescence Boosts Malaria Research: Quantitative Dual-Color Assay and Single-Cell Imaging in Plasmodium falciparum Parasites. Anal Chem. 2014 Sep 2;86(17):8814-21.

**Siciliano G**, Alano P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent Plasmodium in fundamental and applied research. Front Microbiol. 2015 May 11;6:391. Review.

Lucantoni L, Silvestrini F, Signore M, **Siciliano G**, Eldering M, Dechering KJ, Avery VM, Alano P. A simple and predictive phenotypic High Content Imaging assay for Plasmodium falciparum mature gametocytes to identify malaria transmission blocking compounds. Sci Rep. 2015 Nov 10;5:16414.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Giulia Siciliano** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

**NOVEL CELL-BASED ASSAYS IDENTIFY NEW METABOLIC TARGETS TO BLOCK *PLASMODIUM FALCIPARUM* TRANSMISSION**

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi