

Т. Г. Панкова, Т. М. Иголина, Е. Р. Климова, Т. В. Майер

ИЗУЧЕНИЕ ДНК ШТАММОВ МАЛЯРИЙНЫХ ПАРАЗИТОВ, ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО И УСТОЙЧИВЫХ К ХЛОРОХИНУ, МЕТОДОМ ЭНДУНКЛЕАЗНОГО РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА

Проведен сравнительный рестрикционный анализ ДНК малярийных паразитов чувствительного штамма Н, штамма LNK-65 со спонтанно возникшей невысокой устойчивостью к хлорохину и селекционированной линии LNK-65 ХлР, высокоустойчивой к хлорохину. При гидролизе ДНК эндонуклеазами рестрикции *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI* и последующем разделении продуктов гидролиза в 0,8%-м агарозном геле при окраске бромистым этидием обнаружены стабильные отличия в картинах рестрикции ДНК малярийных паразитов. В составе рестриктов ДНК линии LNK-65 ХлР, селекционированной из штамма LNK-65 на высокую устойчивость к хлорохину, имеются добавочные рестрикционные полосы при гидролизе *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, отсутствующие у родительского штамма. Значительные отличия в картинах рестрикции ДНК штаммов Н и LNK-65, очевидно, вызваны принадлежностью их к различным видам *P. berghei* и *P. yoelii* соответственно.

Введение. Широкое использование хлорохина (Хл) в лечении малярии привело в последние десятилетия к распространению штаммов плазмодия, устойчивых к этому лекарству. Природа генетических механизмов, обеспечивающих Хл-устойчивость, остается неясной. Геном малярийного паразита проявляет большую пластичность, примером чего может служить его способность быстро приспосабливаться, развивая наследственный механизм устойчивости фактически к любому противомаларийному средству. Важная роль в этих процессах, по-видимому, принадлежит мутациям в генах, ответственных за инактивацию специфического препарата (точечные мутации, рекомбинация, амплификация).

Возникновение Хл-устойчивости у малярийного паразита под действием селективного пресса Хл напоминает известную выработку устойчивости к метотрексату в животных клетках, обусловленную амплификацией генов дигидрофолатредуктазы, или устойчивость к канцеростатикам, зависящую от амплификации генов множественной лекарственной устойчивости (multidrug resistance — *mdr*) [1, 10, 11]. Можно предположить, что в индукции Хл-резистентности плазмодия важную роль также играет процесс амплификации, затрагивающий гены, обеспечивающие в конечном счете устойчивость клеток малярийного паразита к этому антималярийному препарату. Так, у Хл-резистентного *P. falciparum* с индуцированной устойчивостью к мефлохину было обнаружено несколько копий гена, гомологичного *mdr*-генам млекопитающих [11].

Относительно небольшие размеры генома *P. berghei* ($1,6 \cdot 10^4$ тысяч пар нуклеотидов — тыс. п. н.) [4] дали основание полагать, что с помощью рестрикционного анализа ДНК паразита можно выявить изменения, связанные с приобретением Хл-устойчивости. Для этого нами был проведен сравнительный анализ рестриктов ДНК трех штаммов малярийного паразита, отличающихся по чувствительности к Хл, полученных вследствие гидролиза различными эндонуклеазами рестрикции. Результаты выполненных исследований указывают на отличия в структуре ДНК этих штаммов.

Материалы и методы. Модель. В работе использовали три лабораторных штамма малярийного паразита грызунов (*P. berghei*), полу-

© Т. Г. ПАНКОВА, Т. М. ИГОЛИНА, Е. Р. КЛИМОВА, Т. В. МАЙЕР, 1996

ченных из Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Марциновского (ИМПитМ), Москва: 1) чувствительный к Хл штамм Н; 2) штамм LNK-65 с пониженной в 2—3 раза по сравнению со штаммом Н чувствительностью к Хл, устойчивость у этого штамма носит стабильный характер; 3) линия LNK-65 ХлР, в 7—10 раз более устойчивая к Хл, чем штамм Н, и в 2—3 раза — чем штамм LNK-65. Эта линия сформирована С. А. Рабинович в ИМПитМ последовательным длительным поддержанием родительского штамма LNK-65 на мышях, которым давали постепенно возрастающие дозы Хл [2, 3]. Эта линия характеризуется повышенным тропизмом к ретикулоцитам и пониженной вирулентностью.

Кровь с пораженными эритроцитами хранили в жидком азоте [12], используя в качестве криопротектора диметилсульфоксид. В период эксперимента штаммы поддерживали на беспородных белых мышях (возраст 1,5—2 месяца, масса 18—20 г) внутрибрюшинными перевивками зараженной крови; устойчивость к Хл линии LNK-65 ХлР — введением мышам перорально Хл (350 мг/кг) при развившейся паразитемии. Эта доза Хл не оказывала противомаларийного эффекта, что свидетельствует о сохранившемся уровне устойчивости паразита. Хлорохин в концентрации 50 мг/кг подавлял развитие чувствительного штамма Н. В опыт брали кровь зараженных мышей последующего пассажа, которым Хл не вводили. Для экспериментов использовали мышей с паразитемией, составляющей 60—90 % зараженных эритроцитов.

Очистка крови от лейкоцитов. Кровь зараженных мышей очищали от лейкоцитов [5], дважды пропуская ее через колонку с микрокристаллической целлюлозой ЛК (Чехия). Степень очистки крови от лейкоцитов контролировали микроскопией мазков крови; смесь их после очистки составляла не более 1—3 лейкоцитов на 10^5 паразитов. Очищенные зараженные эритроциты хранили при -20°C .

Выделение и очистка ДНК, рестрикция, электрофорез. Из очищенных от лейкоцитов зараженных эритроцитов мышей выделяли ДНК по [7]. Аналогичную процедуру использовали для получения ДНК лейкоцитов мышей. Размер молекул основной фракции ДНК составлял около 40 тыс. п. н. Спектральные характеристики очищенной ДНК ($A_{260}/A_{280}=1,80-1,82$) свидетельствовали о высокой степени очистки ее от белков и РНК.

5 мкг ДНК паразита или лейкоцитов крови мышей гидролизовали эндонуклеазами *EcoRI*, *BamHI* или *HindIII* (из расчета 10—20 ед. активности фермента на 1 мкг ДНК). Гидролиз вели в течение 5 ч при 37°C . Увеличение длительности гидролиза (до суток) или количества фермента (до 50 ед.) не приводило к изменению картины рестрикции, что подтверждает полноту гидролиза. После гидролиза ДНК осаждали двумя объемами этанола в присутствии 2 М ацетата аммония при -20°C . В качестве маркерных фрагментов использовали продукты рестрикции ДНК фага λ ферментом *PstI*.

Гидролизованые эндонуклеазами рестрикции образцы ДНК наносили на 0,8 % -й агарозный гель, приготовленный на буфере ТАЕ. Электрофорез вели при напряжении 4 В/см² геля в течение 4 ч в буфере ТАЕ. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолете.

Результаты и обсуждение. На рис. 1, 2 представлены картины рестрикции ДНК штаммов *P. berghei* с различной устойчивостью к Хл и ДНК хозяина — лейкоцитов мыши. Отчетливые рестрикционные полосы получены от ДНК всех трех штаммов плазмодия. Видимые полосы образованы повторяющимися последовательностями ДНК, так как фрагменты, представленные единичной копией в геноме, обычно не просматриваются в данных условиях. Размер генома *P. berghei* составляет $1,6 \cdot 10^4$ тыс. п. н. [4]. К примеру, уникальный фрагмент 5 тыс. п. н. должен составлять $3 \cdot 10^{-4}$ всей ДНК генома плазмодия. Для рестрикционного анализа брали 5 мкг ДНК и, следовательно, фрагмент длиной 5 тыс. п. н. в единичной копии составит 1,6 нг, фрагмент

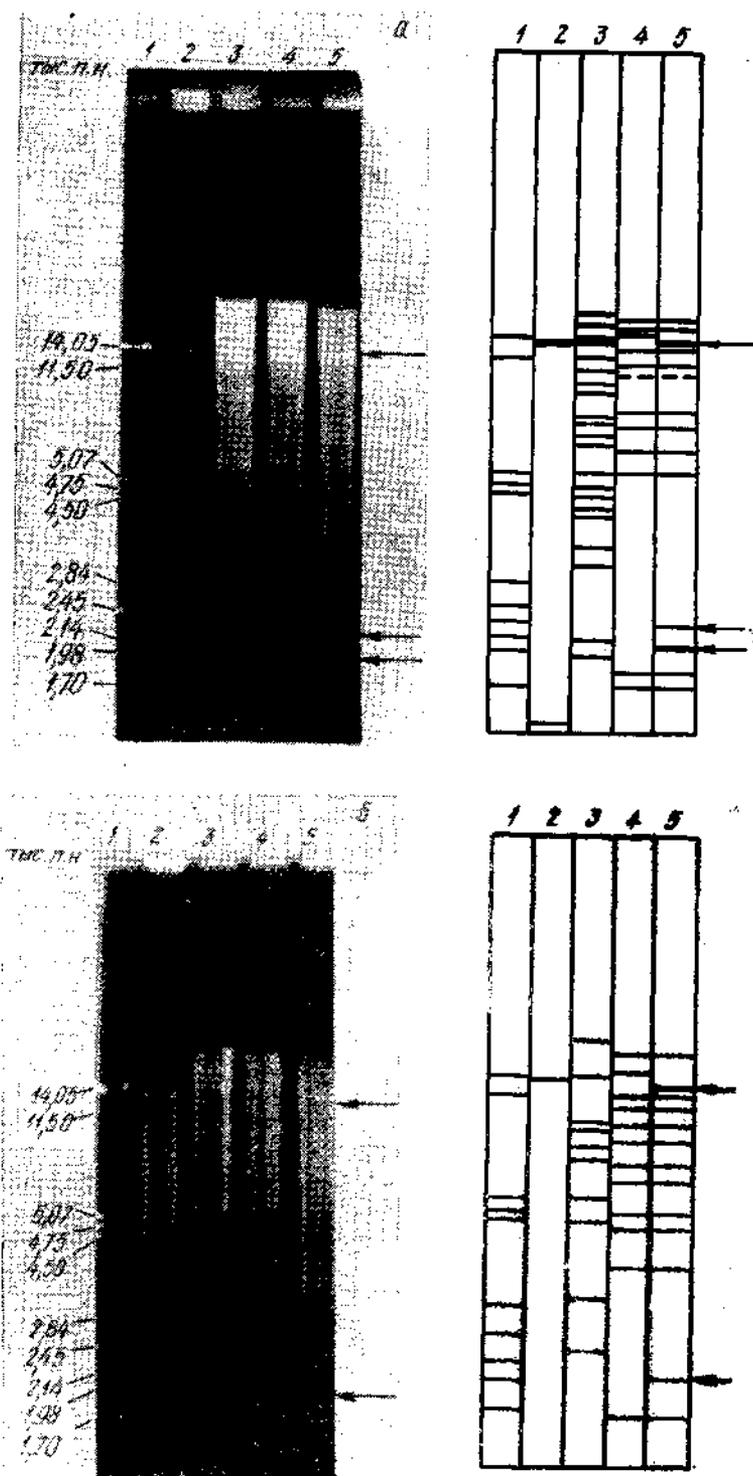


Рис. 1. Электрофореграммы и схематическое распределение рестрикторов ДНК малярийных паразитов штаммов Н (3), LNK-65 (4), LNK-65 ХлР (5) и ДНК лейкоцитов мыши (2) при гидролизе эндонуклеазами *EcoRI* (а) и *HindIII* (б). В качестве маркера использованы продукты гидролиза ДНК фага λ ферментом *PstI* (1). Здесь и на рис. 2 рестрикты ДНК окрашены бромистым этидием

15 тыс. п. н.— 5 нг, фрагмент 1 тыс. п. н.— 0,3 нг. Это на пределе или ниже того количества ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием. Для того чтобы

фрагмент ДНК был отчетливо виден на электрофореграмме, он должен быть представлен в количестве 3—50 копий на геном.

Образцы ДНК штамма LNK-65, выделенные в разное время, после гидролиза *EcoRI* давали совершенно идентичные картины рестрикции. Следовательно, картина рестрикции ДНК малярийного паразита является стабильной характеристикой штамма.

Результаты сравнительного рестрикционного анализа ДНК чувствительного к Хл штамма Н, устойчивых штаммов LNK-65 и LNK-65

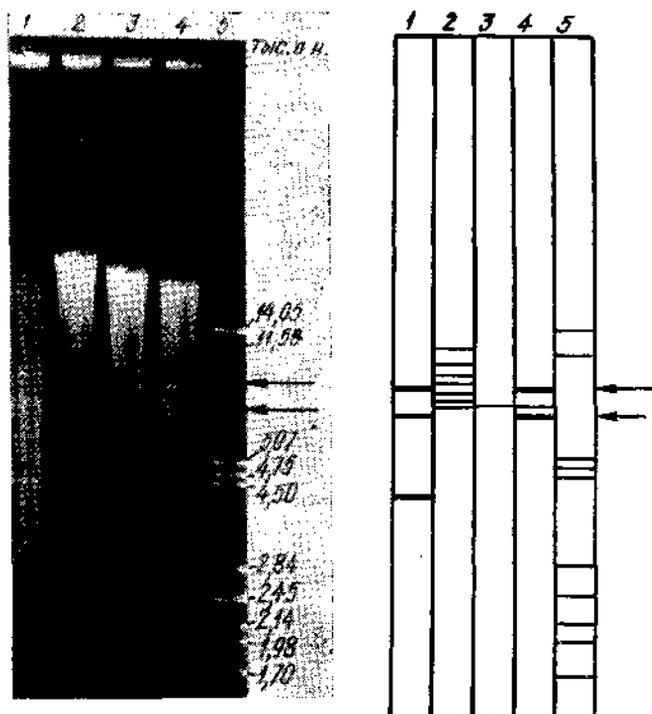


Рис. 2. Электрофореграмма и схематическое распределение рестрикторов ДНК малярийных паразитов штаммов Н (2), LNK-65 (3), LNK-65 ХлР (4) и ДНК лейкоцитов мыши (1) при гидролизе эндонуклеазой *BamHI*. В качестве маркера использованы продукты гидролиза ДНК фага λ ферментом *PstI* (5)

ХлР и лейкоцитов мыши ферментом *EcoRI* приведены на рис. 1, а. Между продуктами гидролиза ДНК чувствительного к Хл штамма и устойчивых штаммов наблюдаются значительные отличия. На электрофореграмме ДНК штамма LNK-65 ХлР с индуцированной устойчивостью к Хл видны три яркие полосы (отмечены стрелками на рис. 1 (а), дорожка 5: ~14; 2,2 и 1,9 тыс. п. н.), которых нет у родительского штамма LNK-65.

На рис. 1, б, представлены электрофореграммы продуктов рестрикции ДНК тех же штаммов плазмодия и лейкоцитов мыши, обработанных эндонуклеазой *HindIII*. При этом также видны значительные отличия между картинами рестрикции ДНК чувствительного к Хл штамма Н и устойчивых штаммов. При общем сходстве картин рестрикции ДНК штаммов LNK-65 и LNK-65 ХлР среди рестрикторов ДНК последнего также отмечаются добавочные полосы (~13 и 1,9 тыс. п. н.) (рис. 1 (б), дорожки 4 и 5).

Особенно наглядны отличия в продуктах гидролиза ДНК исследуемых штаммов при рестрикции эндонуклеазой *BamHI* (рис. 2). На фоне «бедных» картин рестрикции ДНК всех штаммов плазмодия в случае LNK-65 ХлР штамма видны две четкие полосы — ~7 и 6 тыс. п. н., отсутствующие у исходного штамма (рис. 2, дорожки 4, 5). Немного численность продуктов гидролиза ДНК плазмодия эндонуклеазой *BamHI*, возможно, объясняется низким содержанием ГЦ-пар в ДНК

малярийных паразитов грызунов — 20 % [6] (*BamHI*, как известно, распознает последовательность ГГАТЦЦ/ЦЦТАГГ).

Таким образом, во всех случаях при гидролизе эндонуклеазами *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI* наборы рестриктов ДНК штамма LNK-65 отличаются от рестриктов штамма LNK-65 ХлР, полученного в результате ступенчатого отбора на Хл-резистентность. Эти данные позволяют считать, что повышенная устойчивость к Хл линии LNK-65 ХлР является следствием мутационного процесса, изменений в структуре ДНК. Появление дополнительных полос среди рестриктов ДНК Хл-резистентного штамма малярийного паразита, вероятно, связано с амплификацией некоторых последовательностей ДНК, которые могут играть определенную роль в устойчивости плазмодия к Хл. Поскольку с помощью используемой нами методики выделяется вся ДНК плазмодия, то не ясно — входят ли амплифицированные последовательности в состав основного генома или они находятся в составе мини-хромосом.

Отличия между картинками рестрикции ДНК штаммов Н и LNK-65, отчетливо различимые при гидролизе *EcoRI* и *HindIII* (рис. 1, а, б), указывают, видимо, на принадлежность паразитов данных штаммов к разным видам рода *Plasmodium*. Изолят *P. berghei*, от которого ведут свое происхождение все его лабораторные штаммы, был впервые выделен в 1948 г., а на два десятилетия позже был изолирован и идентифицирован другой вид малярийного паразита грызунов — *P. yoelii*, морфологически сходный с *P. berghei*, но характеризующийся спонтанно сниженной чувствительностью к хлорохину и способностью к образованию гаметоцитов. В процессе многих лет культивирования *P. berghei* в различных лабораториях несколько штаммов было выделено в особую группу так называемых «NS»-линий по таким общим признакам, как стабильная пониженная (по сравнению с нормальными штаммами *P. berghei*) чувствительность к Хл и не свойственная для лабораторных штаммов *P. berghei* способность к продукции гаметоцитов. Загадка одной из «NS»-линий была разрешена Питерсом и соавт. в 1978 г. [8], когда в результате сравнительного исследования, включавшего определение изоэлектрических спектров, ДНК-ДНК гибридизацию и перекрестный иммунный анализ, было показано, что малярийные паразиты «NS»-типа являются новым подвигом вида *P. yoelii*. Было продемонстрировано, что исходный природный изолят малярийного паразита грызунов *P. berghei*, от которого ведут свое происхождение все его лабораторные штаммы, в том числе и «NS»-типа, представляет собой природную смесь паразитов *P. berghei* и *P. yoelii*. Обнаруженные нами значительные отличия между картинками рестрикции ДНК малярийных паразитов штамма Н и штамма LNK-65, обладающего характерными чертами «NS»-типа, отражают, по всей видимости, принадлежность этих штаммов к разным видам плазмодия грызунов — *P. berghei* и *P. yoelii* соответственно.

Различия в распределении рестриктов ДНК лейкоцитов мыши и ДНК плазмодия свидетельствуют о том, что плазмодияльные ДНК не «загрязнены» ДНК из клеток хозяина.

Ранее нами показано [9], что у малярийных паразитов устойчивых к Хл штаммов значительно повышена активность микросомных монооксигеназ, метаболизирующих и инактивирующих разнообразные лекарственные вещества, в том числе Хл. В связи с этим логично предположить, что у устойчивых к Хл штаммов происходит амплификация этих или иных генов лекарственной устойчивости, проявлением которой могут быть описанные нами изменения в структуре генов устойчивых штаммов. Проверка этих предположений является предметом наших дальнейших исследований.

Авторы выражают глубокую благодарность С. А. Рабинович за предоставление штаммов малярийного паразита грызунов и консультации в области паразитологии.

ВИВЧЕННЯ ДНК ШТАМІВ МАЛЯРІЙНИХ ПАРАЗИТІВ,
ЧУТЛИВОГО І СТИПКИХ ДО ХЛОРОХІНУ,
МЕТОДОМ ЕНДОНУКЛЕАЗНОГО РЕСТРИКЦІЙНОГО АНАЛІЗУ

Резюме

За допомогою метода рестрикційного аналізу порівняно ДНК малярійних паразитів гризунів *Plasmodium berghei* чутливого штама Н, штама LNK-65 з невисокою стійкістю до хлорохіну, яка виникла спонтанно, та селекційованого штама LNK-65 ХЛР з високою стійкістю до хлорохіну. У складі рестриктів ДНК штама LNK-65 ХЛР спостерігаються додаткові рестрикційні смуги при *EcoRI*-, *HindIII*- і *BamHI*-гідролізі. Значні розбіжності у картині рестрикції ДНК штамів Н і LNK-65, скоріш за все, викликані причаленістю їх до різних видів малярійного паразита гризунів.

T. G. Pankova, T. M. Igonina, E. R. Klimova, T. V. Mayer

ANALYSIS OF DNA FROM STRAINS
OF MALARIA PARASITES SENSITIVE AND RESISTANT
TO CHLOROQUINE BY RESTRICTION ENDONUCLEASE FINGERPRINTING

Summary

DNAs from various *Plasmodium berghei* strains with different chloroquine (Chl) sensitivities were analysed by agarose gel electrophoresis following digestion with restriction endonucleases *EcoRI*, *HindIII* and *BamHI*. The DNA patterns for the two Chl-resistant strains — LNK-65 strain with 2—3 fold increased Chl-resistance and LNK ChIR line with 7—10 fold increased, Chl-resistance (derived from the parent LNK-65 strain by stepwise selection in Chl) show similarity, but some additional bands of DNA digests are observed for LNK ChIR strain compared to the parent LNK strain. DNAs of malarial parasites from the sensitive N strain and from the Chl-resistant strains (LNK-65 and LNK ChIR) yield recognizably distinct patterns, so the resistant strains are suggested to belong to another *Plasmodium* species.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Босток К. Дж., Тайлер-Смит К. Изменение геномной ДНК в клетках, устойчивых к метотрексату // Эволюция генома.— М.: Мир, 1986.— С. 79—100.
2. Рабинович С. А. Морфология штаммов *Plasmodium berghei* с «приобретенной» устойчивостью к противомаларийным препаратам разных химических групп. I. Морфологические особенности штаммов, устойчивых к производным 4-аминохинолина диаминопиридина // Мед. паразитология.— 1969.— № 3.— С. 287—294.
3. Рабинович С. А., Тихомирова Л. А. Избирательное проникновение паразитов штамма *Plasmodium berghei berghei* с «приобретенной» устойчивостью к хлорохину // Там же.— 1973.— № 4.— С. 401—406.
4. Dore E., Birago C., Frontali C., Battaglia P. A. Kinetic complexity and repetitivity of *Plasmodium berghei* DNA // Mol. and Biochem. Parasitology.— 1980.— 1.
5. Fulton J., Grant P. T. The sulfur requirements of the erythrocytic form of *P. knowlesi* // Biochem. J.— 1956.— 63.— P. 274—282.
6. Gutteridge W. E., Trigg P. I., Williamson D. N. Properties of DNA from some malarial parasites // Parasitology.— 1971.— 62.— P. 609.
7. Panyim S., Wilard P., Yuthavong J. Application of genetic engineering to research on tropical disease pathogens with special reference to plasmodia.— Geneva: WHO, 1986.
8. Peters W., Chance M. L., Lissner R. et al. The chemotherapy of rodent malaria. XXX. The enigmas of the NS lines of *Plasmodium berghei* // Ann. Trop. Med. Parasitology.— 1978.— 72.— P. 23—36.
9. Salganik R. I., Pankova T. G., Chechonadskikh T. V., Igonina T. M. Chloroquine resistance of *Plasmodium berghei*: biochemical basis and means for overcoming // Bull. WHO.— 1987.— 65.— P. 381—386.
10. Schümke R. T., Frederick W. A., Rodney E. K., Joseph R. B. Selective multiplication of dihydrofolate genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells // J. Biol. Chem.— 1978.— 253.— P. 1357—1370.
11. Wilson C. M. et al. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum* // Science.— 1989.— 244.— P. 1184—1186.
12. Wilson R. J. M., Farrant J., Walter C. A. Preservation of intraerythrocytic forms of malarial parasites by one-step and two-step cooling procedures // Bull. WHO.— 1977.— 55.— P. 309—315.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд-ния РАН,
Новосибирск

Получено 03.05.94