



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE
INDIRIZZO MICROBIOLOGIA MOLECOLARE E CLINICA

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI UNA PUTATIVA PATHWAY DI RNA INTERFERENCE NEL PROTOZOO A TRASMISSIONE SESSUALE *TRICHOMONAS* *VAGINALIS*

Relatore:

Dott. Daniele Dessì

Tesi di Dottorato di:

Federica Riu

XXII Ciclo

Federica Riu - Identificazione e caratterizzazione di una putativa pathway di RNA interference nel protozoo a trasmissione sessuale *Trichomonas vaginalis*- Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari. 1

SOMMARIO

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1 Trichomonas vaginalis	2
Morfologia	2
Metabolismo	3
Epidemiologia, manifestazioni cliniche e diagnosi	5
1.2 RNA interferenza.....	6
Scoperta dell'RNA interferenza	6
Meccanismo dell'RNA interferenza	8
Componenti dell'RNAi: siRNA, Dicer, RISC.....	11
Micro-interference RNA	16
Rimodellamento cromatinico	17
Applicazioni biotecnologiche e biomediche dell'RNAi	18
RNAi nei protozoi.....	19
1.3 Il sequenziamento del genoma di T. vaginalis	26
Struttura del genoma, processamento dell'RNA, trasferimento genico laterale	26
Repeats, elementi trasponibili ed espansione genomica	27
Metabolismo, stress ossidativo, trasporto	28
Famiglie geniche espanse	29
Meccanismi molecolari di patogenicità.....	31
2. Materiali e metodi	33
Analisi della sequenza del genoma di <i>T. vaginalis</i>	33

Cellule e loro coltivazione.....	33
Estrazione DNA.....	34
Estrazione ed analisi dell'RNA	34
Sintesi dell'RNA double stranded (dsRNA) omologo all' α -actinina.	37
Elettroporazione di dsRNA in <i>T. vaginalis</i>	38
Analisi delle proteine.....	38
Anticorpi anti-enzima malico.....	38
Costruzione dei vettori per l'espressione di dsRNA	39
3. RISULTATI.....	42
Ricostruzione di una putativa via di RNAi in <i>T. vaginalis</i>.	42
Sintesi ed elettroporazione di dsRNA in <i>T. vaginalis</i>	44
Western blotting e RT-PCR	45
Costruzione di vettori per l'espressione di dsRNA.	47
4. DISCUSSIONE	48
BIBLIOGRAFIA.....	53

RIASSUNTO

T. vaginalis è il protozoo responsabile della malattia a trasmissione sessuale non virale più diffusa al mondo, la tricomoniasi. Il recente completamento del genoma di *T. vaginalis* ci ha permesso di ricostruire per via bioinformatica il backbone genetico di una putativa via di RNA interferenza. L'RNAi è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica posttrascrizionale sequenza-specifico presente negli eucarioti ed attivato da dsRNA. I due componenti chiave dell'RNAi sono Dicer, appartenente alla famiglia delle RNaseIII, e la famiglia delle proteine Argonaute, necessarie per la formazione del complesso effettore che guida la degradazione dell'RNA messaggero. L'analisi di sequenza eseguita sul genoma *T. vaginalis* ha portato all'identificazione di geni predetti per una putativa Dicer, due putative Argonaute e 41 DEAD/DEAH box elicasi, tutti trascrizionalmente attivi. Per poter valutare se *T. vaginalis* possieda un'attività di silenziamento genico post-trascrizionale indotto da dsRNA, il protozoo è stato trasfettato con un dsRNA sintetico omologo all' α -actinina. I risultati dei diversi esperimenti si sono mostrati contraddittori, di difficile interpretazione e con problemi di riproducibilità che hanno impedito di trarre conclusioni. Il sistema sperimentale stesso di trasfezione di dsRNA sintetico può non essere e il più adatto, almeno nel caso di *T. vaginalis*, per monitorare una eventuale attività di RNAi. Infatti inizialmente è stato possibile osservare un silencing dell' α -actinina, ma esperimenti successivi non hanno condotto allo stesso risultato. Per aggirare i problemi insiti nell'utilizzazione di dsRNA sintetico è stato messo a punto un sistema plasmidico per l'espressione stabile e inducibile di dsRNA stem-loop in vivo, la cui itrasfezione in *T. vaginalis* potrebbe portare alla verifica dell'esistenza o meno di un'attività RNAi nel protozoo. La dimostrazione di una via di RNAi in *T. vaginalis* potrebbe portare alla messa a punto di un potente strumento di genetica inversa per questo protozoo, nonché gettare nuova luce sulla comparsa di questo meccanismo negli eucarioti.-

1. INTRODUZIONE

1.1 *Trichomonas vaginalis*

Morfologia

T. vaginalis è un protozoo appartenente alla classe dei Flagellati e all'ordine dei Trichomonadida, descritto per la prima volta da Donnè nel 1836¹. *T. vaginalis* non forma cisti, e il suo ciclo cellulare presenta il solo stadio di trofozoite. Le dimensioni del protozoo variano notevolmente, da 7 a 23 µm di lunghezza e da 5 a 15 µm di larghezza². *T. vaginalis* è in genere piriforme, ma può mostrare forme diverse a seconda delle condizioni ambientali. Nei terreni di coltura liquidi il protozoo si presenta generalmente con morfologia piriforme, mentre in presenza di agar o di monostrati cellulari assume spesso forma ameboide (Figura. 1). Morfologie particolari sono osservate talvolta nelle secrezioni vaginali e nelle urine. Anche condizioni fisico-chimiche quali la tensione d'ossigeno, il pH, la temperatura, possono alterarne la morfologia³. Se l'ambiente diventa sfavorevole, ad esempio, *T. vaginalis* può assumere aspetto sferoidale, con internalizzazione dei flagelli, senza però che formi alcuna parete. Sono state inoltre osservate forme giganti multinucleate sferoidali, con dimensioni fino a dieci volte rispetto alla cellula normale⁴. La divisione cellulare è di tipo criptopleuromitotico, con la formazione di un fuso extranucleare durante la mitosi, senza scomparsa della membrana nucleare³. Osservazioni di microscopia elettronica hanno evidenziato di ribosomi e dell'apparato del Golgi, che prende il nome di apparato parabasale⁵.

T. vaginalis ha quattro flagelli anteriori, lunghi circa 12 µm. Un quinto flagello origina dorsalmente in prossimità degli altri quattro e viene incorporato lungo il margine libero di una membrana ondulante che si estende per circa due terzi della lunghezza del protozoo. È presente una struttura chiamata assostile, localizzata lungo l'asse anteroposteriore dell'organismo, e il cui segmento terminale sporge oltre l'estremità posteriore del protozoo di circa un terzo, contribuendo alla definizione della sua caratteristica morfologia. Il trofozoite presenta un unico nucleo, disposto anteriormente, di forma tipicamente allungata.

Nel citoplasma di *T. vaginalis* non sono presenti mitocondri, ma altri organuli detti idrogenosomi⁶, dotati di una doppia membrana e contenenti una matrice granulare. Questi organuli devono il loro nome al fatto che producono idrogeno⁷ e rivestono un ruolo fondamentale nel metabolismo energetico del protozoo⁸.

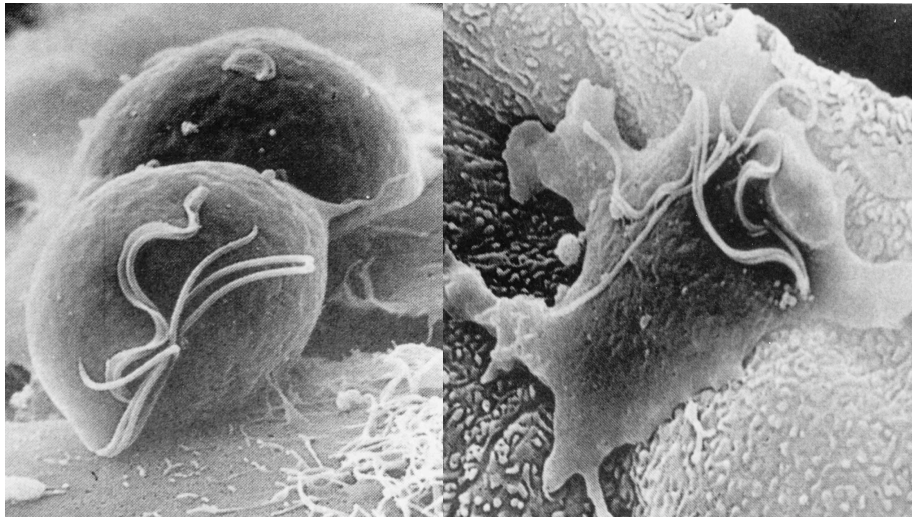


Figura 1 Aspetti morfologici di *Trichomonas vaginalis*. A) Piriforme; B) Ameboide.

Metabolismo

T. vaginalis ha un metabolismo tipicamente eucariotico, nonostante alcune importanti differenze per quanto riguarda le esigenze trofiche ed il metabolismo energetico⁹. Difatti *T. vaginalis* manca di molte vie biosintetiche ed abbisogna di un apporto esterno di amminoacidi, purine e pirimidine, vitamine, acidi grassi saturi ed insaturi, colesterolo. La fonte energetica primaria è rappresentata da carboidrati quali il glucosio, maltosio e galattosio. *T. vaginalis* presenta inoltre scorte intracellulari di glicogeno, il cui utilizzo viene regolato dalla disponibilità dei zuccheri sopra citati¹⁰. *T. vaginalis* è un microorganismo aerotollerante in grado di crescere a diverse pressioni parziali di O₂. Il metabolismo energetico è di tipo fermentativo, e i prodotti finali sono principalmente glicerolo, lattato, acetato, CO₂, ed H₂, oltre che malato ed alanina¹¹. In Figura. 2 è possibile osservare come il metabolismo

energetico di *T.vaginalis* sia ripartito tra citosol ed idrogenosoma, e quali siano le reazioni che portano alla formazione di ATP e dei cataboliti descritti.

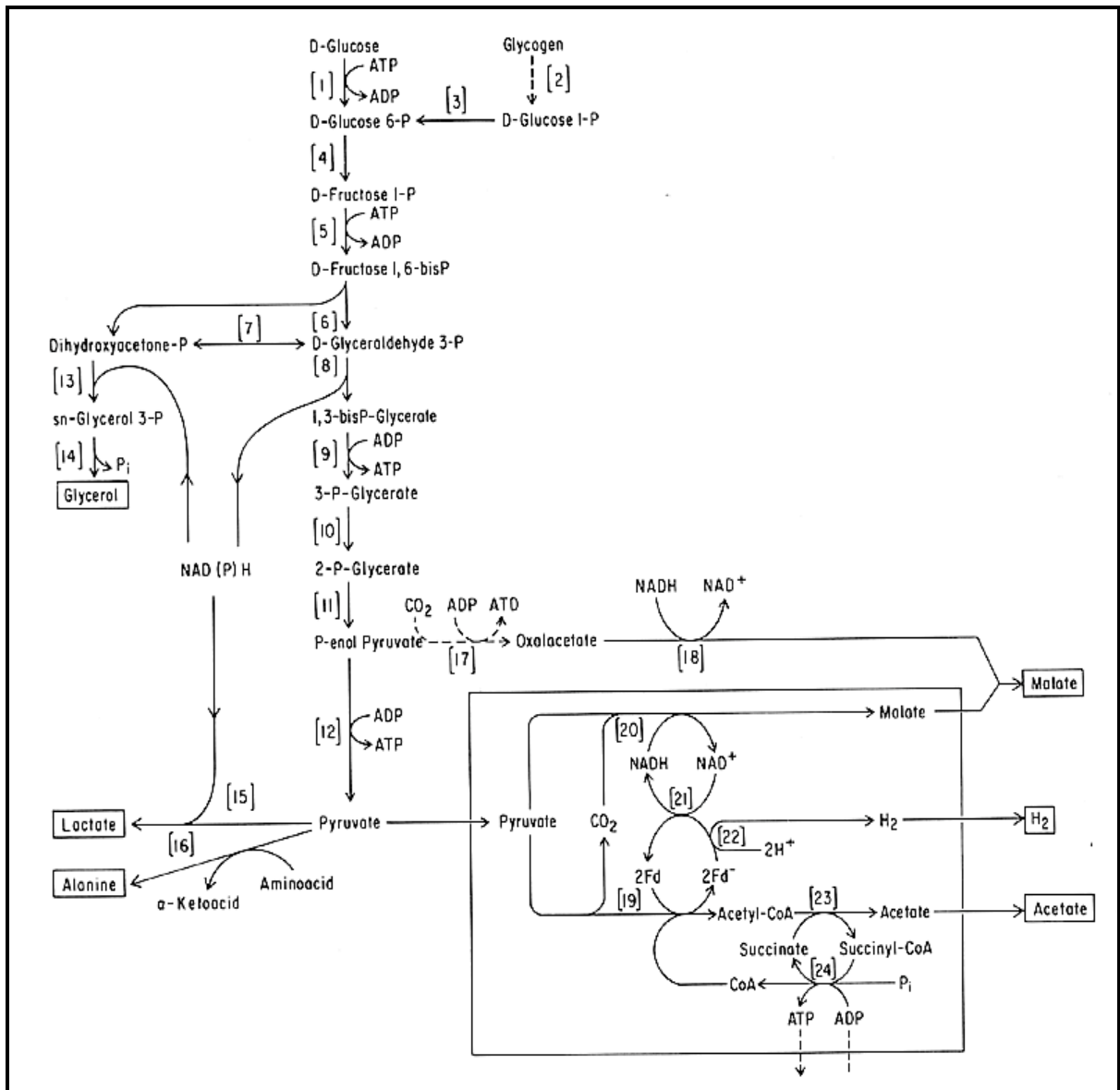


Figura 2 Mappa metabolica di *T. vaginalis*. 1) esochinasi; 2) glicogeno fosforilasi; 3) fosfoglucomutasi; 4) fosfoglucoisomerasi; 5) fosfoglucochinasi; 6) aldolasi; 7) trioso-fosfato isomerasi; 8) gliceraldeide fosfato isomerasi; 9) fosfoglicerato chinasi; 10) fosfogliceromutasi; 11) enolasi; 12) piruvato chinasi; 13) glicerolo-3-fosfato deidrogenasi, 14) glicerolo- 3- fosfatasi; 15) lattato deidrogenasi, 16) alanina amino transferasi; 17) fosfoenolpiruvato chinasi; 18) malato deidrogenasi; 19) piruvato:ferrodossina ossido riduttasi; 20) malato deidrogenasi decarbossilante (enzima malico); 21) NAD-ferrodossina ossido riduttasi; 22) idrogenasi; 23) acetato:succinatoCoA-transferasi; 24) succinato tiochinasi.

Epidemiologia, manifestazioni cliniche e diagnosi

T. vaginalis è responsabile della più diffusa malattia a trasmissione sessuale non virale, la tricomoniasi. *T. vaginalis* infetta 173 milioni di persone ogni anno nel mondo.¹²

La trasmissione avviene esclusivamente per contatto sessuale, benché alcuni abbiano speculato sulla possibilità di una trasmissione non sessuale dell'infezione¹³

Nelle donne, *T. vaginalis* infetta principalmente l'epitelio squamoso del tratto genitale. Il quadro clinico può variare da un'infezione asintomatica fino alla vaginite conclamata. Nell'infezione sintomatica, la presenza di secrezioni vaginali anomale e di irritazioni vulvovaginali sono i sintomi più frequentemente riportati, e sono presenti dal 50 al 75% dei casi. Le pazienti sintomatiche possono inoltre riportare dispareunia (10-50%), disuria (30-50%), e dolori addominali (5-12%). All'esame ginecologico, la vulva presenta un eritema diffuso o escoriazioni in meno del 20% delle pazienti, un'infiammazione della parete vaginale (40-75%), e la cosiddetta cervice a fragola che, pur essendo spesso riportata come segno tipico dell'infezione da *T. vaginalis*, è osservata solo nel 2% dei casi¹⁴. I fattori che determinano la presenza o meno della sintomatologia e delle manifestazioni cliniche non sono noti, ma si ritiene dipendano da differenze di virulenza fra i diversi isolati del protozoo oppure da una diversa suscettibilità individuale dell'ospite infettato¹⁵. È stata inoltre osservata una variabilità nella sintomatologia nelle diverse fasi del ciclo mestruale. Infatti l'infezione diventa spesso latente durante la fase follicolare e ovulatoria del ciclo mestruale, mentre si ha generalmente un'esacerbarsi dei sintomi durante la fase mestruale. Questo si ritiene correlato al cambiamento di pH che si verifica durante questi periodi, oltre al diverso quadro ormonale, al quale il protozoo potrebbe essere suscettibile. Inoltre, l'esacerbarsi dei sintomi potrebbe essere correlato con l'ampia disponibilità di ferro durante la fase mestruale, che causa un aumento del metabolismo del protozoo e induce l'espressione di alcuni fattori di patogenicità¹⁶. Alcuni studi hanno riportato un aumento delle infezioni sintomatiche durante la gravidanza. Questa osservazione potrebbe essere correlata agli stessi motivi riportati per le variazioni durante il ciclo mestruale¹⁷.

1.2 RNA interferenza

Scoperta dell'RNA interferenza

Fu Thomas Hunt Morgan, nel 1908, a dare inizio alla selezione basata sulla mutagenesi, isolando decine di mutazioni in *D.melanogaster*¹⁸. Questo sistema di identificazione genica permise, oltre a costruire una mappa genetica, di arrivare ad un metodo di "forward screen" genetico, dando un grosso contributo alla comprensione sullo sviluppo e della regolazione cellulare.

Questo tipo di screening genetico permetteva di ottenere informazioni solo utilizzando organismi che presentavano determinate caratteristiche: capacità di ibridizzazione in laboratorio, breve ciclo vitale, abbondante prole, e con un lavoro di mesi o anni per identificare il gene mutato responsabile del relativo fenotipo. Con l'avvento della biologia molecolare i ricercatori hanno iniziato a cercare la funzione biologica di un gene a partire dalle omologie di sequenza o dalle sue funzioni biochimiche, iniziando così un approccio di genetica inversa: dal gene al fenotipo.

Nel 1984 uno passo significativo in questa direzione fu riportato da Izant e Weintraub¹⁹, che trasformarono cellule in coltura con un costrutto che esprimesse RNA antisenso complementare all'mRNA della timidina chinasi. L'accumulo della proteina timidina chinasi risultava così drammaticamente e specificamente inibito. A questi studi iniziali sono seguiti molti altri^{20,21,22,23} nei quali la strategia dell'antisenso è stata utilizzata per inibire l'attività di geni specifici.

Negli esperimenti basati su RNA antisenso veniva utilizzato, come controllo negativo per la specificità, RNA senso. Durante questi esperimenti Guo e Kemphues²⁴ osservarono che iniettando i filamenti di RNA senso ed antisenso in *C.elegans* ottenevano fenocopie simili.

Fire, Mello e colleghi²⁵ in seguito chiamarono questo fenomeno RNA interference o RNAi per distinguerlo dall'inibizione indotta dal solo RNA antisenso.

Mello e collaboratori però notarono un'altra cosa: il silenziamento avveniva in siti differenti da quello di iniezione suggerendo che l'RNA venisse trasportato dal sito iniziale attraverso le cellule e i tessuti del nematode, attivando una risposta sistemica^{26,27}. Un'altra interessante osservazione fatta da Fire fu che transfettando *C. elegans* con una miscela di RNA senso ed antisenso ottenevano una degradazione sequenza-specifica dell'mRNA omologo. Fire infatti ipotizzò che le soluzioni di RNA senso ed antisenso generate mediante trascrizione in vitro fossero contaminate da piccole quantità di RNA di opposta polarità, causata dalla poca fedeltà di RNA polimerasi virale usate durante la trascrizione in vitro. Fu allora che per testare questa ipotesi iniziò ad utilizzare dei dsRNA scoprendo così che inducevano una risposta veloce e specifica di degradazione dell'mRNA omologo.

Una delle caratteristiche più interessanti dell'RNAi è che non solo induce una risposta molto più intensamente rispetto ai ssRNA, ma che una sola molecola di dsRNA può indurre il silenziamento di decine di messaggeri²⁸. Esperimenti di ibridizzazione in situ mostrarono che gli mRNA di sequenza corrispondente al dsRNA non venivano accumulati. Infatti la prima idea fu che il dsRNA inibisse il gene stesso, interferendo con l'inizio o l'allungamento della trascrizione. Questa ipotesi però non trovò riscontro sperimentalmente, infatti il gene target continuava ad essere trascrizionalmente attivo anche in presenza di dsRNA: era il messaggero ad essere degradato.²⁸

Una forma di silenziamento posttrascrizionale era stato precedentemente documentato in piante e funghi²⁹, fu per primo Napoli et al.²⁸ cercando di introdurre in petunie un transgene che iperesprimesse la chalcone sintasi, per ottenere un incremento della pigmentazione del fiore. Inaspettatamente in più del 40% delle piante transgeniche i fiori apparivano bianchi o con variegature di colore rosso. Questo fenotipo risultava sia dal silenziamento, non solo del transgene, ma anche dalle copie endogene della chalcone sintasi quindi fu chiamato cosoppressione. Nel 1992 Romano e Mancino³⁰ riportarono fenomeni simili in un fungo, la *Neurospora crassa*, chiamando tale effetto "quelling".

In seguito Cogoni et al.³¹ ottennero forti evidenze che il quelling nei funghi derivava da alterazioni a livello posttrascrizionale, stabilendo che le molecole effettrici risiedevano nel citoplasma e molto probabilmente erano RNA. Tuttavia in alcuni casi la cosoppressione nelle piante risultava correlata con la metilazione del gene stesso, conducendo ad una downregolazione dell'espressione³². Waterhouse et al. dimostrarono l'RNAi anche nelle piante di tabacco e riso, concludendo quindi che anche due organismi evolutivamente così divergenti come piante e nematodi rispondono alla presenza di dsRNA allo stesso modo.

Meccanismo dell'RNA interferenza

La scoperta dell'RNAi è la maggiore conquista della moderna biologia. L'RNAi infatti influenza la proliferazione cellulare, lo sviluppo, l'immunità e la cancerogenesi. Le due maggiori classi di RNAi sono gli small interfering RNA o siRNA ed i micro interfering RNA o miRNA. Entrambe richiedono il taglio di lunghi RNA a doppio filamento (dsRNA) in frammenti di 20-30 paia di basi, e sono caratterizzate da 2 nucleotidi (nt) protrusi al terminale 3'.

I siRNA sono generati dal taglio di dsRNA precursori ad opera di Dicer, una RNase di tipo III, presente nel citoplasma; mentre la via che conduce ai miRNA inizia nel nucleo, dove i pri-miRNA sono processati da un complesso costituito da Drosha, un'altra RNase III, e DGCR8 per produrre i pre-miRNA di circa 70 nucleotidi. Questi ultimi sono trasportati nel citoplasma dove sono tagliati da Dicer in miRNA maturi. Un filamento dei corti dsRNA così prodotti, chiamato filamento guida, viene incorporato in un complesso multiproteico chiamato "RNA induced silencing complex" (RISC) nel quale le proteine Argonaute inducono l'appaiamento del filamento guida con l'mRNA omologo in modo sequenza-specifico. L'appaiamento tra il filamento dell'siRNA e l'mRNA induce la degradazione di quest'ultimo (Figura. 3 a-b). Nei miRNA invece tale appaiamento porta ad una inibizione della trascrizione. In entrambe i casi si ha l'inibizione della sintesi proteica (Figura. 3 c)

Gli RNA attivi nell'RNAi possono essere classificati in famiglie:

Small interfering RNA o siRNA : sono corti filamenti di dsRNA di circa 19-23 nt omologhi ad un RNA messaggero. Hanno una distinta polarità, essenziale per lo svolgimento della loro funzione.

siRNA efficienti devono possedere un gruppo ossidrilico e 2 nucleotidi protrusi al 3', ed un gruppo fosfato al 5'. I siRNA possono derivare da virus a RNA, elementi trasponibili o essere prodotti sinteticamente.

Micro interfering RNA o miRNA: sono oligomeri di 21 nt che si legano al 3' UTR dell'RNA messaggero specifico inibendone la traduzione. I miRNA derivano da precursori primari endogeni chiamati pri-miRNA che vengono tagliati da un'enzima della famiglia delle RNaseIII chiamata Drosha originando i pre-miRNA di circa 70 nt che vengono trasportati nel citosol dove le Dicer provvedono a tagliarli in miRNA maturi analoghi ai siRNA e processati in modo analogo³³.

Tiny non-coding RNA o tncRNA: sono simili ai miRNA in quanto anch'essi nel genoma sono localizzati al di fuori delle sequenze codificanti proteine, sono composti da circa 20-22 nt e mostrano un pattern di espressione temporale ben definito durante lo sviluppo, ma si distinguono dai miRNA poiché i precursori non presentano strutture secondarie stem loop come i miRNA. La funzione dei tncRNA non è ancora chiara³⁴.

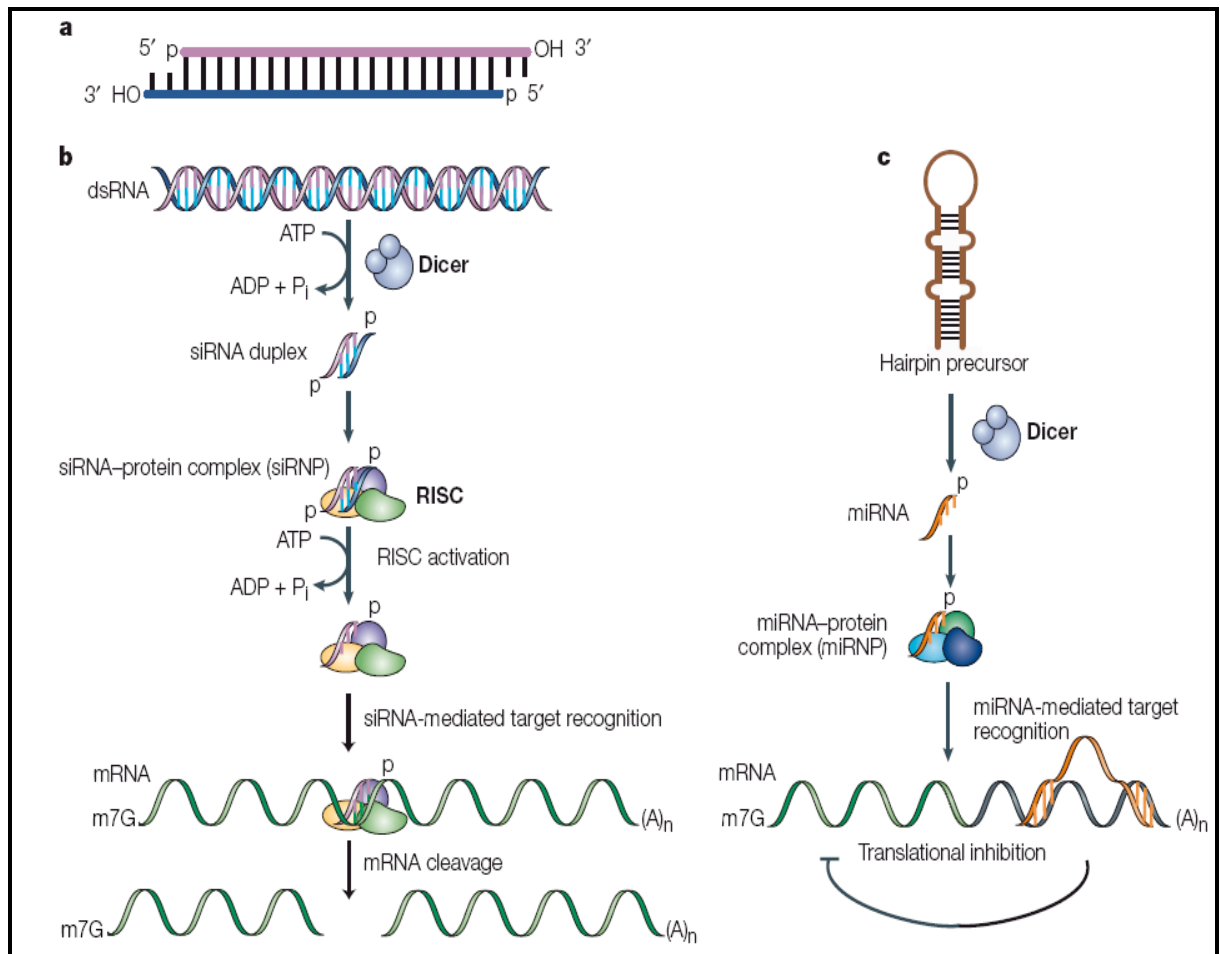


Figura 3

a- Small interfering (si)RNA. Le caratteristiche molecolari dei siRNA comprendono: il terminale 5' fosforilato, una regione duplex di 19 nucleotidi (nt), e 2 nt protrusi e non fosforilati al terminale 3' che sono caratteristici dei prodotti di taglio delle RNaselli

b- Meccanismo di silenziamento mediato da siRNA. I lunghi double strand (ds)RNA sono tagliati ad opera di un membro della famiglia delle RNaselli, Dicer, in siRNA in modo ATP dipendente. Questi siRNA sono incorporati nell'RNA-inducing silencing complex (RISC). Sebbene la formazione del complesso RISC-siRNA sia ATP indipendente, l'apertura del siRNA duplex richiede ATP. Una volta svolto, il filamento antisense guida RISC sull'RNA messaggero con sequenza complementare, portando al taglio endonucleolitico dell'mRNA target.

c- Meccanismo di silenziamento mediato da micro (mi)RNA. Sebbene originariamente sia stato identificato sulla base della sua capacità di processare lunghi dsRNA, Dicer può tagliare anche RNA hairpin di circa 70 nt, precursori dei miRNA³⁵.

Componenti dell'RNAi: siRNA, Dicer, RISC

Iniziali studi su estratti embrionali di *D. melanogaster* rivelarono la presenza di un'attività capace di degradare lunghi dsRNA in frammenti di 21-25 nt chiamati small interfering RNA (siRNA)³⁶. L'analisi di questi RNA mostrò che erano RNA a doppio filamento contenenti un gruppo fosfato al 5'³⁷. L'enzima che inizia la via dell'RNAi appartiene alla famiglia delle RNaseIII, enzimi che mostrano specificità per i dsRNA. Gli enzimi delle RNaseIII si dividono in tre classi:

- RNaseIII batterici contenenti un singolo dominio catalitico e un dominio di dsRNA binding (dsRBD).

- la famiglia delle Drosha contenente 2 domini catalitici³⁸

- la terza famiglia contiene, oltre ai due domini catalitici, anche un dominio elicasi ed un motivo PAZ. Membri della terza classe sono stati correlati con il processamento del dsRNA in siRNA all'inizio dell'RNAi³⁹. Questa famiglia di proteine, chiamata Dicer, possiede dei componenti evolutivamente conservati. Proteine Dicer ottenute da *D. melanogaster*,

C. elegans, eucarioti superiori e *neurospora* hanno mostrato la capacità di riconoscere e processare i dsRNA in siRNA di dimensioni caratteristiche della specie.

Dicer è tipicamente composto da un dominio DExH/DEAH RNA elicasi N-terminale, un dominio PAZ, due domini RNaseIII ed un dominio dsRNA-binding (dsRBD).

I domini DExH/DEAH sono RNA elicasi responsabili dell'assemblamento dei siRNA nel complesso RISC.

Il dominio PAZ (piwi argonaute zwiller), presente in Dicer, è costituito da circa 130 residui amminoacidici e può legare sia il 3' dei ssRNA oppure i 2 nt protrusi al 3' dei dsRNA.

Il dominio dsRBD è presente in molte proteine coinvolte nella trascrizione, nel processamento dell'RNA, localizzazione e traduzione degli mRNA. Questo dominio riconosce e lega i dsRNA aspecificamente, agevolando probabilmente il legame del dsRNA con il dominio PAZ⁴⁰.

Funzionalmente i due domini RNaseIII di Dicer si associano a formare un pseudo-dimero intramolecolare, creando così un sito attivo in cui ogni dominio idrolizza un singolo filamento dell'RNA duplex, generando un nuovo terminale.

Il prodotto di Dicer è un RNA 21 nucleotidi. Il numero di nucleotidi del siRNA deriva dalla distanza tra il terminale neoformato sull'RNA duplex che legherà PAZ, ed il sito attivo dell'RNaseIII (Figura 4).

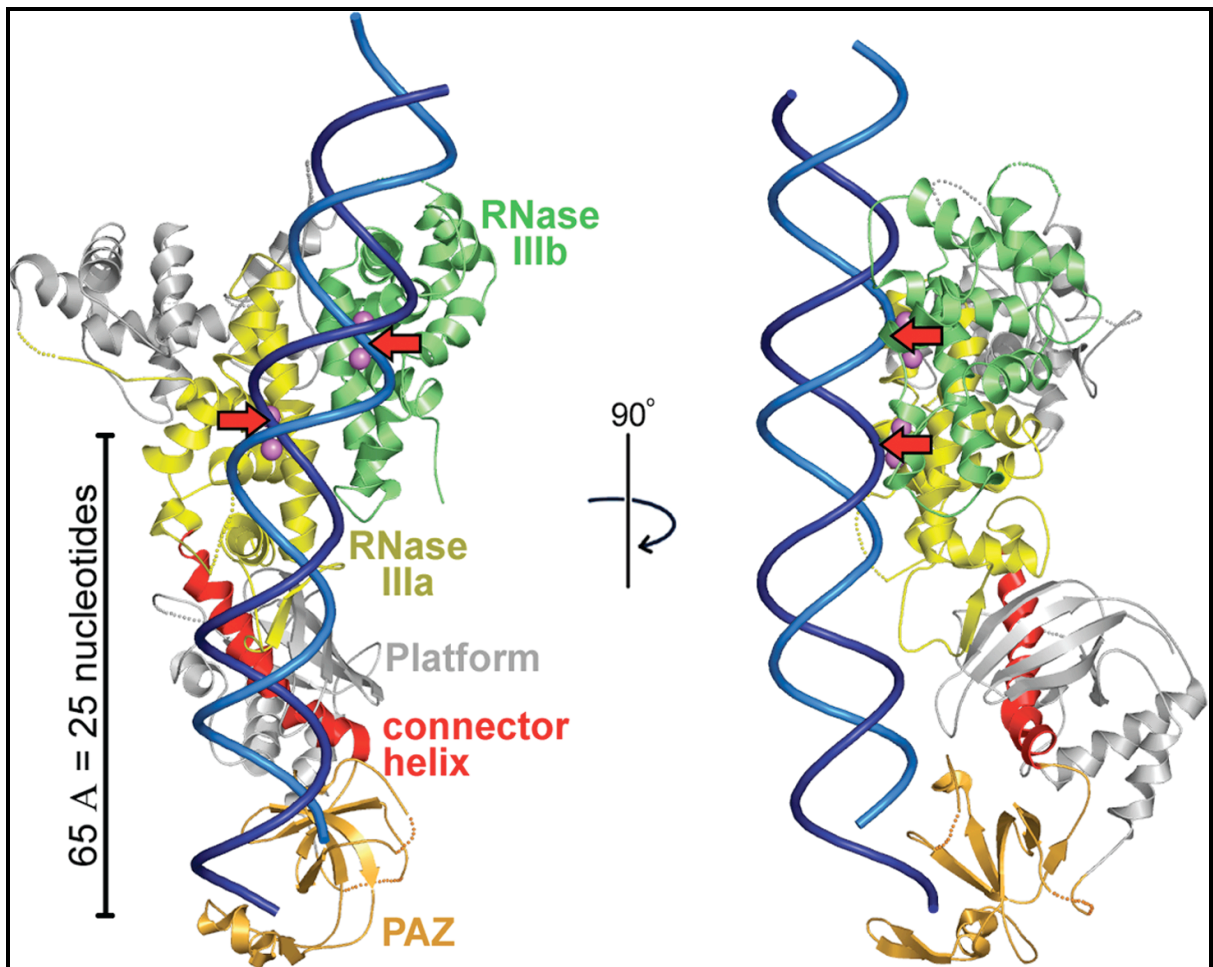


Figura 4 Modello di processamento di dsRNA da parte di Dicer di *Giardia intestinalis*. Dicer riconosce il terminale del dsRNA attraverso il dominio PAZ (in giallo), e lo taglia con i domini RNaseIII. La distanza tra PAZ e i domini RNaseIII determina la lunghezza dei siRNA prodotti. Nel caso di *Giardia* tale distanza è di 65 Å, che corrispondono a 25 nt.⁴¹

Il processo di RNAi viene portato a termine da RISC che riconosce e degrada l'mRNA target. Le proteine chiave del RISC sono le proteine Argonaute, inizialmente

Federica Riu - Identificazione e caratterizzazione di una putativa pathway di RNA interference nel protozoo a trasmissione sessuale *Trichomonas vaginalis*- Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari. 12

identificate in mutanti di *A. thaliana* le cui foglie portavano un'alterata morfologia . Le Argonaute costituiscono una famiglia evolutivamente conservata presente in molti eucarioti.

Le Ago sono proteine ubiquitarie in animali e piante, funghi, protisti e archea. Il numero di geni Ago trovati nelle diverse specie vanno da uno come in *S. pombe*, a 27 in *C. elegans*. In alcuni casi copie multiple di geni Ago sono funzionalmente ridondanti. Per esempio alg-1 e alg-2 sono sufficienti per compensare un'altra Argonaute, anche se solitamente i geni Ago in un organismo sono specifici e non si sovrappongono funzionalmente tra di loro. La famiglia di Ago eucariotiche sono classificate in 3 classi principali: il gruppo più grande è chiamato Argonaute (ci si riferisce a questa classe come Ago), e di questo gruppo fanno parte le Ago-1 di *Arabidopsis*.

A livello cellulare le Ago si localizzano principalmente nel citoplasma e nel nucleo.

Il secondo gruppo è Piwi (P-element Induced Wimpy Testis), molto abbondanti in cellule della linea germinale dove agiscono per silenziare i trasposoni. Nel genoma umano ci sono 4 copie sia di Ago che di Piwi.

La terza classe comprende geni Argonaute specifici dei nematodi, chiamati WAGO.

Nel gruppo Ago i siRNA sono prodotti da Dicer nel citoplasma, mentre nel gruppo Piwi il filamento guida si forma attraverso un meccanismo nel quale l'RNA target è tagliato da una proteina Piwi diventando il filamento guida di un'altra Piwi. Questa cascata è generalmente iniziata da piRNA (piwi interacting RNA) ereditati per via materna. Le Argonaute della terza classe ottengono il filamento guida mediante il clivaggio di lunghi dsRNA esogeni o endogeni ad opera di Dicer.

Strutturalmente le proteine Argonaute sono composte da 4 domini: un dominio N-terminale, un dominio PAZ, un dominio centrale Mid, ed il dominio PIWI.

I domini N-terminale, Mid e PAZ si dispongono a formare un incavo in cui si trova il dominio PIWI. Il dominio PIWI si ripiega in modo simile alle RNaseH, un endonucleasi che taglia l'RNA ibridi RNA/DNA.

Il lobo N-terminale contiene un dominio Paz, il quale lega il 3' finale del DNA guida, mentre il lobo C-terminale contiene il dominio centrale Mid che lega il 5' fosfato del

DNA guida e il dominio PIWI, il cui gruppo carbossiterminale interagisce con il gruppo fosfato al 5' del filamento guida.

Il 5' fosfato del DNA guida è tenuto in una tasca tra il dominio Mid e Piwi, i quali agiscono come punto di ancoraggio per il DNA nella proteina. Il primo nucleotide al 5' del filamento guida si infila in una piccola tasca permettendo alla proteina un contatto base-specifico che spiega perché alcune Argonaute eucariotiche hanno preferenze per alcune basi al 5' e perché solitamente il nucleotide al 5' non contribuisca significativamente al riconoscimento del target. Le 2 basi protruse al 3' sono invece legate al dominio PAZ mentre il resto della molecola è relativamente libera, in modo da accomodarsi nell'incavo dell'Argonaute, permettendo così la sistemazione anche di filamenti di differenti lunghezze.

Dopo il legame con l'RNA target, i domini di legame dell'Argonaute si aprono in modo da far appoggiare il filamento target ed il filamento guida.

I due filamenti sono uniti nei nucleotidi da 2 a 8 mediante appaiamento di Watson-Crick.

Le basi da 2 a 6 del filamento guida si trovano esposte nella parte esterna del complesso e questo è molto importante in quanto sono le responsabili del riconoscimento della sequenza target. Questa porzione del filamento guida viene chiamata "seed region". Tale modello spiegherebbe anche l'elevata efficienza con cui RISC localizza i messaggeri target.

Il riconoscimento dell'mRNA target da parte del complesso RISC-filamento guida è l'idrolisi del mRNA, o "slicing". Le due caratteristiche necessarie per lo slicing sono la presenza di proteine Ago cataliticamente attive, ed un appaiamento quasi perfetto tra filamento guida e RNA target, per assicurare che solo il messaggero specifico sia degradato.

L'attività RNasica del dominio Piwi di Argonaute catalizza la reazione di taglio dell'RNA target mediante idrolisi, e il conseguente silenziamento dell'espressione della proteina.³⁹

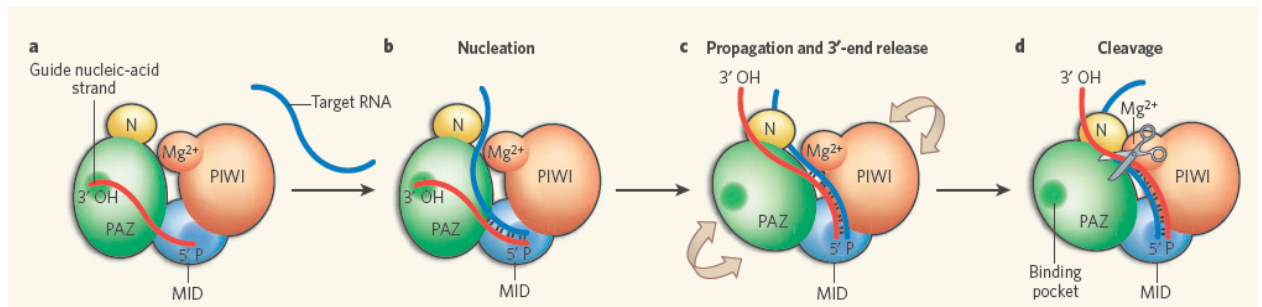


Figura 5

a. - Le proteine Argonaute possiedono quattro domini: il dominio amminotermine (N), PAZ, MID e PIWI. Ogni proteina Argonaute lega una corta molecola di RNA (in rosso), la quale funziona da template per il legame con l'RNA target (in blu). Il terminale 5' fosfato (5'P) dell'RNA è ancorato al dominio MID, mentre il terminale 3' ossidrilico (3'OH) si trova ancorato al dominio PAZ.

b. - Studi strutturali di Wang e colleghi mostrano che il complesso Argonaute lega l'RNA target, iniziando con la formazione di una doppia elica derivante dall'appaiamento del filamento guida con l'RNA target.

c. - Il movimento necessario di Argonaute permette l'estensione delle doppia elica mentre il l'RNA guida è ancorato in entrambe le estremità. Il 3'OH del filamento guida è rilasciato dal dominio PAZ permettendo la rotazione.

d. - Tale cambio conformazionale favorisce l'esatto posizionamento del sito di taglio dell'RNA target in prossimità del dominio PIWI. Gli ioni magnesio facilitano la precisione di taglio nell'RNA target⁴².

Micro-interference RNA

Negli eucarioti il meccanismo prevalente di silenziamento mediato da RISC è la repressione della traduzione guidata dai miRNA. Questi rappresentano una classe di corti RNA regolatori presenti in piante e animali. I miRNA derivano da trascritti endogeni a doppio filamento con struttura a forcina (stem-loop), e che sono processati dalle proteine Ago.

A differenza delle reazioni di slicing, la repressione della traduzione non richiede una estesa complementarità di sequenza tra filamento guida e target. In generale solo le basi da 2 a 7 del filamento guida sono necessarie per appaiarsi con il target e iniziare la repressione della trascrizione. Esistono diversi meccanismi di repressione della traduzione da parte di RISC. La repressione della traduzione è stata studiata approfonditamente in *D. melanogaster*, che possiede almeno due distinti RISC e ognuno media la repressione attraverso meccanismi differenti. Più precisamente RISC formato da Ago-2 blocca l'interazione proteina-proteina tra eIF4E e eIF4G, necessari per la formazione di un complesso pre-iniziale sul mRNA target.

Ago-1 di *D. melanogaster*, invece, promuove la repressione della traduzione tramite deadenilazione e degradazione dell'mRNA. Infatti nel complesso Ago1 -RISC è presente anche la proteina GW182, che ha la funzione di reclutare il complesso di poli-deadenilazione costituito da Ccr4-Not, e il complesso di mRNA decapping costituito da DCP1 e DCP2³⁹

Rimodellamento cromatinico

Generalmente nei sistemi eucariotici le modifiche negli istoni inducono il passaggio da eterocromatina, non trascrivibile, ad una forma altamente trascritta come l'eucromatina.

Una volta formata l'eterocromatina l'effetto di blocco della trascrizione, viene propagato a notevole distanza, grazie alle interazioni proteina-proteina tra i fattori di rimodellamento cromatinico. Queste proteine sono generalmente poste in prossimità di sequenze di DNA ripetute, come per esempio centromeri, telomeri e locus mating⁴³. Questo tipo di sequenze sono responsabili della produzione di dsRNA, che di conseguenza vengono processate mediante la via di RNAi.

In *S.pombe* è stata osservata un'elevata quantità di siRNA derivanti da sequenze centromeriche ripetute⁴⁴; inoltre, mutanti di *S.pombe* per *dcr1*, *ago1*, *rdrp1*, presentano degli accumuli di lunghi RNA non codificanti (ncRNA) omologhi alle sequenze centromeriche⁴⁵.

In organismi wild-type un filamento della regione centromerica è costitutivamente espresso, mentre il filamento complementare, soggetto a repressione eterocromatinica, viene trascritto solo occasionalmente⁴⁶, e proprio tale trascritto guiderà a formazione di dsRNA poi processato mediante RNAi. Questo processo potrebbe avvenire nel nucleo, infatti un componente di tale complesso, RdRP, è fisicamente legato alle sequenze ripetute centromeriche più esterne⁴². Questo complesso potrebbe essere guidato da determinate regioni di DNA, in seguito ad appaiamento DNA-RNA.

La conseguenza è che l'istone H3-K9 viene metilato e acetilato, condizione necessaria per la formazione dell'eterocromatina. Inoltre in *N.crassa* e *A.thaliana* è stato osservato che la metilazione di H3-K9 dirige la metilazione del DNA, e di conseguenza, consente il legame di proteine che legano i gruppi metilici al DNA metilato⁴⁷.

A seguito di questi eventi la cromatina rimane estremamente compattata e quindi trascrizionalmente inattiva⁴⁸.

Applicazioni biotecnologiche e biomediche dell'RNAi

L'RNAi è un potente mezzo per l'inibizione della funzione genica in modo sequenza-specifico. Le applicazioni di silenziamento indotte da RNAi si stanno facendo strada in campo biotecnologico e biomedico.

Per esempio in campo agricolo i siRNA sono stati utilizzati per creare maschi sterili di parassiti nocivi, utilizzando come target geni legati alla fertilità. Sono state create piante ad alto potenziale commerciale in cui l'RNAi induce resistenza a virus o batteri. Anche in campo terapeutico l'RNAi possiede un elevato potenziale. Attualmente le applicazioni dell'RNAi includono terapie antivirali, come nel caso del papilloma virus⁴⁹, virus dell'epatite B⁵⁰ e C⁵¹, gammaherpesvirus murino e HIV di tipo 1⁵². Anche se, nonostante il primo successo un ostacolo importante è rappresentato dalle strategie che alcuni virus hanno evoluto per evadere l'RNAi.

Molti gruppi di ricerca e aziende farmaceutiche hanno utilizzato l'RNAi per scoprire e validare nuovi target per lo sviluppo di farmaci.

Uno degli studi più interessanti è rappresentato dal silenziamento di un oncogene che trascrive per la proteina survivina, iper-espressa in cellule tumorali del colon, in cui c'è stata diminuzione della crescita tumorale in seguito a terapia di RNAi⁵³.

RNAi nei protozoi

Nei protozoi il fenomeno dell'RNAi è stato per la prima volta descritto in *Trypanosoma brucei* da Ullu et al. nel 1998⁵⁴. Il meccanismo di RNAi in *T.brucei* ha molte caratteristiche in comune con le altre vie di RNAi conosciute, inclusa la formazione di siRNA⁵⁵ e la presenza dei geni Argonaute e Dicer^{56,57,58}.

Il lavoro iniziato in *T.brucei* potrebbe proseguire investigando su quali altri protozoi parassiti abbiano una via attiva di RNAi, ottenendo un potente tool per la manipolazione genica di queste specie. Sono state impiegate molte strategie per accertare quali protozoi possedessero una RNAi attiva. La prima è stata la genomica comparativa mediante ricerca di omologie di sequenza per identificare geni ortologi codificanti per Argonaute e Dicer.

Lo svantaggio dell'approccio bioinformatico è che ortologi molto distanti non sono facilmente identificabili, specialmente se i dati dei sequenziamenti non sono completi. Ortologi di Argonaute e Dicer sono stati identificati in *Trypanosoma congolense*⁵⁹, *Leishmania braziliensis*⁶⁰, *Giardia intestinalis*^{61,62,63}, *Entamoeba histolytica*^{56,57,64}, *Toxoplasma gondii*⁶⁵.

Mentre non sono stati identificati nel genoma di *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi*, e *Plasmodium spp*^{56,57}.

Sono stati analizzati anche i genomi di *Cryptosporidium spp*, *Theileria spp.*, *Babesia bovis* e *Eimeria tenella* alla ricerca di omologi di Dicer e Argonaute, mediante TBLASTN e confrontando le sequenze Argonaute e Dicer umani, e non sono stati trovati omologi. Alcuni, ma non tutti, i protozoi sono dotati dei tradizionali componenti dell'RNAi. La suddivisione tra le specie RNA+ e RNA- non sembra seguire la filogenesi, un'ipotesi è che l'RNAi possa essere stata persa ripetutamente presumibilmente per l'assenza di una pressione selettiva. È interessante notare che *L. major* e *L. infantum* posseggono una sequenza Argonaute degenerata nella regione sintenica all'ortologa putativa in *L. braziliensis*.⁶⁶

Nei parassiti in cui sono presenti i componenti dell'RNAi, la genomica comparativa dovrebbe essere complementata con analisi funzionali, determinando così quali degli

ortologhi identificati, spesso altamente divergenti, sono funzionali in una via tradizionale di RNAi.

La strategia adeguata per determinare se i protozoi parassiti possiedono una via di RNAi attiva è l'approccio funzionale. Lunghi dsRNA e siRNA sono stati utilizzati per silenziare l'espressione di trascritti endogeni, e l'efficienza è stata mostrata misurando la degradazione del trascritto omologo. Il punto debole di questa strategia è la non facilità di correlazione di risultati positivi con la presenza di una via di RNAi dipendente da dsRNA, siRNA, e degradazione del target. Quindi si sono cercati, ed in seguito caratterizzati, sia siRNA derivanti da dsRNA, che siRNA omologhi a geni potenzialmente regolati con l'RNAi.

Quest'ultima strategia supporta, ma non sostituisce, la strategia funzionale prima descritta. Infatti i siRNA possono essere presenti a bassi livelli, e potrebbe essere difficile differenziare i siRNA endogeni derivanti da corti trascritti, dai corti RNA risultanti dalla normale degradazione degli mRNA.

Esistono forti evidenze funzionali per la presenza di un'RNAi attiva nel parassita correlato *T.congolense*⁶⁷. D'altra parte studi sistematici di RNAi dimostrano che né i dsRNA e né i siRNA hanno la capacità di silenziare l'espressione genica in *L. major* e *T.cruzi*. Non ci sono finora dati relativi alla funzionalità dell'RNAi in *L.braziliensis*^{68, 69}.

Perciò i kinetoplastidi sono apparentemente divisi in base ad un efficace utilizzo dei dsRNA nell'RNAi. Quindi basandosi su analisi bioinformatiche e funzionali dell'RNAi, i kinetoplastidi possono essere divisi in tre gruppi:

1. organismi in cui la presenza di RNAi è supportata sia da analisi bioinformatiche che funzionali, e nel quale ormai l'RNAi è utilizzata di routine;
2. organismi in cui non c'è stato riscontro né a livello bioinformatico né funzionale;
3. organismi che presentano delle evidenze bioinformatiche o strutturali dell'RNAi, ma nei quali l'RNAi non è utilizzato di routine.

Poiché *T.brucei* reca numerose componenti della tradizionale via di RNAi, inclusi omologhi funzionali come Argonaute e Dicer, siRNA endogeni, e dati di funzionalità, non può che essere inserito nel primo gruppo. Insieme a *T. congolese*, in cui l'RNAi è

supportata da dati bioinformatici ed un singolo, forte studio funzionale. Finora *T. cruzi*, *L. major* e *L. infantum* non è stata supportata da dati né funzionali né bioinformatici e di conseguenza sono stati inseriti nel secondo gruppo. Per *L. braziliensis* invece ci sono evidenze bioinformatiche ma non funzionali quindi attualmente è nel terzo gruppo.

I dati derivanti da *G. intestinalis* e *E. histolytica* sembrano essere coerenti quando vengono confrontati gli studi funzionali e bioinformatici. Inoltre la presenza di ortologhi di Dicer e Argonaute è stata osservata in *G. intestinalis*; Ullu et al. hanno identificato RNA duplex di 25 nt derivanti dal retrotrasposone endogeno GIL/Genie 1, suggerendo, ma non provando la presenza di una RNAi attiva in questo organismo. In *E. histolytica*, nel quale sono codificati ortologhi di componenti noti dell'RNAi, ci sono evidenze che indicano silenziamento genico in seguito a trattamento con siRNA o di shRNA espressi da un plasmide. L'attività di silencing è limitata a due soli geni target γ -tubulina e EhDia e non c'è ad oggi un uso sistematico dell'RNAi in *E. histolytica* per effettuare gene silencing.

La possibile presenza di RNAi negli apicomplexa ha generato enorme interesse, anche se continua a rimanere controversa. Oltre alle evidenze bioinformatiche già citate, dsRNA e siRNA sono stati utilizzati nel laboratorio di Ananvoranich per ridurre i livelli di trascritto in *T. gondii*, stabilendo un'evidenza funzionale per l'RNAi^{70,71,72}. Molti dei lavori si sono basati sul silenziamento della ipoxantina-xantina-guanina fosforibosiltrasferasi (HXGPRT) e della uracil fosforibosiltrasferasi (UPRT), i livelli dei quali vengono poi misurati valutandone l'attività metabolica. I parassiti con ridotti livelli di TgAgo (Argonaute- PIWI ortholog) da RNAi, possiedono una ridotta capacità di silenziamento mediata da RNAi per i trascritti HXGPRT e UPRT, suggerendo un ruolo funzionale per questi ortologhi. Tuttavia la produzione di siRNA non è stata dimostrata e non è diffuso l'uso dell'RNAi in *T. gondii*.

La presenza di un'attiva via di RNAi in *Plasmodium spp.*, è ugualmente dibattuta. Sebbene non siano stati trovati ortologhi della via di RNAi durante gli studi di genomica comparativa, ci sono cinque studi funzionali che suggeriscono la presenza di una via di RNAi in *Plasmodium spp.* In ogni caso successivamente non sono stati

fatti altri studi e sono stati inoltre riportati casi di fallimento di esperimenti simili^{73,74},. In più è fallito anche uno studio per identificare siRNA endogeni in *P. falciparum*⁷⁵, che in conseguenza di tutti questi esperimenti è stato posizionato nel III gruppo. Non sono stati osservati ortologi di componenti dell'RNAi né sono stati effettuati studi funzionali su *Cryptosporidium spp.*, *Theileria spp.*, *E. tenella*, e *B. bovis*, che sono stati tutti inseriti nel III gruppo.

L'RNAi, quando presente e funzionale, gioca un ruolo importante nella biologia dei protozoi parassiti.

Gli esperimenti su *T. brucei* suggeriscono che l'RNAi può avere molti ruoli endogeni.

T. brucei difettivi nel meccanismo di RNAi presentano elevati livelli di trascritti dei trasposoni SLACS e Ingi, e bassi livelli di siRNA derivanti da SLACS e Ingi^{54,76,77,78}

La funzione sembra essere almeno parzialmente il controllo dei retrotrasposoni come è stato osservato in organismi non protozoari. I retrotrasposoni sono stati identificati in molti protozoi parassiti che possiedono una putativa via di RNAi oltre a *T. brucei*, inclusi *L. braziliensis*, *E. histolytica*, e *Giardia lamblia*, e siRNA derivanti da retrotrasposoni sono stati identificati in *G. intestinalis*. Tuttavia la presenza di retrotrasposoni non è stata strettamente correlata con la presenza di una via di RNAi, come *T. cruzi* per esempio che presenta dei trasposoni ma non fa RNAi⁷⁹. Mentre in *P. falciparum* e *T. gondii* nei quali è ancora controversa la presenza di un'attiva RNAi, non sono presenti retrotrasposoni⁸⁰. Rimane da chiarire se l'RNAi venga usata come difesa contro virus a dsRNA, sebbene siano stati identificati virus in alcuni protozoi come *G. lamblia*⁸¹ e *T. vaginalis*⁸².

Le prove di come l'RNAi nei protozoi controlli l'espressione endogena di siRNA sono attualmente poche, eccetto che per *T. brucei* e *G. intestinalis*, nei quali sono stati trovati corti RNA omologhi a messengeri^{56,83}.

Resta il dubbio se questi RNA siano effettivamente siRNA oppure derivino dalla normale degradazione di RNA.

L'analisi di sequenza di questi corti RNA, sia in wild-type che in mutanti Dicer ha chiarito questo dilemma, anche grazie al legame di siRNA alle Argonaute che permette l'isolamento e la caratterizzazione dei relativi RNA. Portando alla

conclusione che i corti RNA non sono correlati con la degradazione dell'RNA, ma con i siRNA.

Poiché i mutanti nella via dell'RNAi presentano alti livelli di trascrizione dei retrotrasposoni, è anche possibile che la via dell'RNAi possieda un ruolo, diretto o indiretto, nel silenziamento trascrizionale nel nucleo come osservato nell'uomo, piante e *S. pombe*^{84,85,86}. Un'ipotesi è che l'RNAi sia necessaria per il silenziamento e spegnimento di antigeni, poiché questo processo è regolato dalla trascrizione e potenzialmente da rimodellamento cromatinico.

Nonostante studi funzionali suggeriscano la presenza dell'RNAi in molti protozoi patogeni, ancora l'RNAi non è stato adottato come metodo diffuso di genetica inversa, tranne che per *T. brucei*.

È chiaro il motivo di ciò per i protozoi nei quali non c'è stato riscontro bioinformatico o funzionale.

Per quanto invece riguarda il terzo gruppo è possibile che questi protozoi non posseggano una via classica di RNAi, e i risultati ottenuti finora rappresentino degli artefatti.

Per esempio è stato osservato che alti livelli di oligonucleotidi possono causare inibizione della crescita in *P.falciparum*^{87,88,89}. In tal modo, quando elevate quantità di dsRNA vengono utilizzate in esperimenti di silenziamento, bloccando la crescita in modo non specifico bloccando la trascrizione, il tasso di turnover determina il livello di RNA e proteine prodotte per il target preso in esame. RNA con emivita breve appaiono silenziati, mentre RNA con lunga emivita, sembrano non essere influenzati.

Molti studi specialmente quelli in *Plasmodium spp.*, e *T.gondii*, non hanno mostrato in modo diretto una specifica riduzione di RNA e proteine, ma piuttosto sono stati valutati altri fenotipi, come variazioni nella crescita o nel metabolismo.

Con l'ormai routinario utilizzo dell'RNAi in *T. brucei*, usare la manipolazione genetica per ricostruire un'attiva via di RNAi in organismi che non la possiedono sembra una possibilità allettante anche se potenzialmente irraggiungibile.

È stato dimostrato come in *T.brucei*, che la proteina Ago2 di origine umana complementi TbAgo1, dando la prima dimostrazione che le proteine Argonaute

possano essere intercambiabili e funzionali anche in organismi evolutivamente distanti⁹⁰.

Inoltre Rivas et al. hanno dimostrato che Ago2 umana ricombinante può combinarsi con siRNA per tagliare specificamente RNA in un sistema in vitro, definendo così un RISC minimale.

Considerati insieme, questi risultati sembrano suggerire la possibilità di restaurare la funzionalità dell'RNAi mediante knocking-in del RISC minimale seguito dall'introduzione di siRNA. Per ottenere un sistema funzionale in vivo il RISC ha bisogno di altre proteine; per esempio è stato dimostrato che in vitro l'ATP non è necessario in quanto il complesso RISC non rilascia l'RNA dopo averlo degradato, step cruciale in vivo per il riciclo del RISC.⁹¹

Inoltre la ricostituzione di una funzionale via di RNAi richiederebbe precisa coordinazione della localizzazione così come dell'espressione dei componenti necessari, incluso il trascritto target, cosa che potrebbe rivelarsi difficoltosa, specialmente se la ricostituzione richiede più della sola reintroduzione di una Argonaute.

L'RNAi rappresenta un mezzo ottimale per avere informazioni sulla funzione genica in modo veloce e facile. In molti parassiti metodi efficienti per il silenziamento genico non sono disponibili, e il lavoro si complica se si parla di geni correlati, duplicati o intere famiglie di geni.

Risulta difficile l'applicazione dei classici metodi utilizzati in altri organismi, ad esempio se il ciclo sessuale non è stato completamente identificato, oppure lo sviluppo è complesso o sperimentalmente impraticabile.

L'RNAi potrebbe avere molte applicazioni nella caratterizzazione funzionale di singoli geni.

La regolazione dell'induzione dell'RNAi e le inerenti variazioni nell'efficienza dell'interferenza permetterebbe ai ricercatori di analizzare fenotipi derivanti da livelli differenti di espressione genica. Molti geni non correlati possono essere studiati con poco sforzo, permettendo analisi di epistasi e di processi multipli. L'RNAi può produrre cellule con ridotta espressione di geni essenziali, portando a fenotipi che

non potrebbero essere studiati con la completa eliminazione del gene. Inoltre gli effetti dell'RNAi sono reversibili permettendo uno studio approfondito della funzione genica. In organismi dove la delezione genica è laboriosa o difficoltosa, e i sistemi di regolazione dell'espressione sono limitati, questo approccio risulta estremamente promettente.

Poiché l'RNAi è un sistema di silenziamento basato sulla specificità di sequenza può essere utilizzato a livello di intere famiglie geniche. Nei tripanosomi, infatti, è stata fatta interferenza simultanea di membri omologhi di una famiglia utilizzando un solo dsRNA. Al contrario, in *Drosophila*, sono stati utilizzati una combinazione di dsRNA per silenziare una famiglia di geni. Nonostante l'interpretazione dei dati sia da trattare con attenzione, l'RNAi resta un metodo migliore rispetto alla costruzione di knock-out multipli⁹².

1.3 Il sequenziamento del genoma di *T. vaginalis*

Negli ultimi anni, la comunità dei ricercatori che hanno come oggetto dei loro studi *T. vaginalis* ha creato un consorzio con lo scopo di esercitare pressioni sui National Institutes of Health americani al fine di finanziare il sequenziamento del genoma di questo microorganismo. Gli sforzi sono stati premiati e il *T. vaginalis* Genome Project ha iniziato le proprie attività presso il TIGR (The Institute of Genomic Research, Rockville, MD, USA), sotto la direzione di Jane Carlton.⁹³

Struttura del genoma, processamento dell'RNA, trasferimento genico laterale

La sequenza del genoma di *T. vaginalis* è stata generata con la metodologia whole-genome shotgun, e contiene 1,4 milioni di reads shotgun assemblate in 17.920 scaffolds per una copertura stimata di 7.2X. Almeno il 65% del genoma di *T. vaginalis* è costituito da sequenze ripetute. Nonostante siano state sviluppate diverse procedure per implementare l'assemblaggio, la sovrabbondanza di repeats ha prodotto una sequenza frammentata, impedendo lo studio dell'architettura del genoma di *T. vaginalis*. Questa caratteristica ha anche reso difficoltosa la determinazione delle dimensioni del genoma stesso, che sono state comunque stimate in circa 160 MB. E' stato identificato un set di base di 60.000 geni codificanti proteine, una delle cifre più alte tra gli eucarioti. Sono stati identificati introni in 65 geni, compresi i 20 in cui erano stati precedentemente dimostrati. Sono stati trovati tRNA per tutti e 20 gli aminoacidi, e sono state inoltre identificate circa 250 unità di DNA ribosomale (rDNA), tutte localizzate su uno dei sei cromosomi di *T. vaginalis*. Da sottolineare come l'apparato di trascrizione di *T. vaginalis*, nel suo assortimento di fattori di trascrizione e di subunità delle RNA polimerasi, appaia più simile a quello dei metazoi che non tipicamente protista. Durante l'annotazione del genoma sono state trovate 152 possibili casi di trasferimento laterale genico (LGT) da procarioti. Le funzioni putative di questi geni sono diverse, e influenzano diverse vie metaboliche e

quindi influenzando l'evoluzione del metaboloma di *T. vaginalis*. La maggior parte (65%) dei geni putativamente derivati da LGT codificano per enzimi metabolici, più di un terzo dei quali sono coinvolti nel metabolismo dei carboidrati e degli aminoacidi. Diversi dei geni acquisiti per LGT potrebbero essere derivati da batteri del genere

Bacteroides, che sono abbondanti nella flora intestinale dei vertebrati (Tab 1).

Feature	Value
<i>Genome</i>	
Size of assembly (bp)	176,441,227
G+C content (%)	32.7
No. of scaffolds	17,290
N_{50} scaffold size (bp)	68,338
<i>Protein-coding genes</i>	
No. of predicted genes	59,681
No. of evidence-supported genes	25,949
No. of genes with introns	65
Mean gene length (bp)	928.6
Gene G+C content (%)	35.5
Gene density (bp)	2956
Mean length of intergenic regions (bp)	1165.4
Intergenic G+C content (%)	28.8
<i>Non-protein-coding genes</i>	
Predicted tRNA genes	479
Predicted 5.8S, 18S, and 28S rDNA units	~250

Tabella 1. Tabella riassuntiva delle caratteristiche del genoma di *T. vaginalis* il numero di geni predetti potrebbe includere repeats a bassa complessità o nuovi elementi trasponibili piuttosto che veri geni di *T. vaginalis*, ma in assenza di decisive prove resta l'attuale set di geni.

Repeats, elementi trasponibili ed espansione genomica

Le 59 famiglie più comuni di repeats identificate nella sequenza assemblata costituiscono circa 39 Mb del genoma e possono essere così classificate: (i) virus-like; (ii) transposon-like, comprese le circa 1000 copie del primo elemento trasponibile mariner identificato al di fuori degli animali; (iii) retrotransposon-like; (iv) non classificati. La maggior parte dei 59 repeats sono presenti in centinaia di copie (numero medio di copie: 660), e ogni famiglia di repeats appare straordinariamente omogenea, con un polimorfismo medio del 2.5%. La mancanza di una forte correlazione tra numero delle copie e differenze medie di appaiamento tra copie,

suggerisce che vi sia stata una improvvisa espansione dei repeats. Per dare una stima del periodo di espansione, sono stati comparati i gradi di polimorfismo tra i repeats di *T. vaginalis* con la divergenza tra diversi loci codificanti proteine in *T. vaginalis* e la specie correlata *T. tenax*, ottenendo l'indicazione che l'espansione dei repeats sia avvenuta dopo la separazione tra le due specie. Sono state inoltre ottenute indicazioni di come diverse famiglie di repeats siano andate incontro a successive espansioni. Le famiglie di repeats di *T. vaginalis* sono assenti in *T. tenax*, ma sono presenti in isolati di *T. vaginalis* con diversa provenienza geografica, in accordo con l'ipotesi che l'espansione sia avvenuta dopo la speciazione ma prima della diversificazione di *T. vaginalis*. Le grandi dimensioni del genoma, l'alto numero di copie di repeats, il basso polimorfismo dei repeats e le evidenze di una espansione dei repeats dopo la separazione tra *T. vaginalis* e *T. tenax*, suggeriscono che recentemente *T. vaginalis* è andato incontro a un sostanziale aumento delle dimensioni del genoma.

Metabolismo, stress ossidativo, trasporto

T. vaginalis utilizza i carboidrati come principale fonte di energia, attraverso un metabolismo fermentativo in condizioni sia aerobiche che anaerobiche. Il protozoo utilizza inoltre diversi aminoacidi come substrati energetici, con la via dell'arginina diidrolasi come una delle principali vie di produzione di ATP. L'analisi della sequenza del genoma ha confermato un ruolo centrale per le aminotransferasi e la glutammato deidrogenasi: queste vie sono presumibilmente cataboliche, ma potrebbero essere reversibili e consentire al parassita di sintetizzare glutammato, aspartato, glutammina, alanina e glicina. Sono stati identificati i geni necessari alla sintesi di prolina, arginina e treonina. È stata anche identificata una via per la sintesi de novo di cisteina, attraverso la cisteina sintasi, un candidato LGT, nonché i geni per il metabolismo della metionina, inclusi quelli coinvolti nella sua possibile rigenerazione. Studi precedenti indicano che la sintesi de novo di lipidi sia limitata alla fosfatidiletanolamina, mentre altri lipidi, incluso il colesterolo, sono probabilmente

acquisti da fonti esterne. L'analisi del genoma ha confermato l'assenza di geni codificanti per gli enzimi coinvolti nelle vie di sintesi e degradazione di quasi tutti i lipidi.

Sono stati identificati geni codificanti per superossido dismutasi, tioredoxina, reduttasi, perossiredoxina e ruberitina, in accordo con lo stile di vita microaerofilo di *T. vaginalis*, che richiede sistemi redox e antiossidanti per contrastare gli effetti tossici dell'ossigeno.

T. vaginalis dimostra notevoli capacità di trasporto, come evidenziato dall'espansione di famiglie di trasportatori, come ad esempio quelli per gli zuccheri e gli aminoacidi. Possiede inoltre il maggior numero di componenti della famiglia di cotrasportatori catione cloruro di tutti gli eucarioti di cui è stato sequenziato il genoma, che riflette la capacità del protozoo di adattarsi ai cambiamenti osmotici presenti nell'ambiente mucosale.

Famiglie geniche espanse

Molte famiglie geniche nel genoma di *T. vaginalis* sono andate incontro a espansione a un livello mai osservato prima negli eucarioti unicellulari (Tab. 2). Questa sorta di espansione "conservativa" di famiglie geniche potrebbero aumentare le capacità adattative di un microorganismo al proprio ambiente. Da sottolineare come l'espansione selettiva di componenti del macchinario di membrane trafficking, fondamentale per la secrezione di effettori di patogenicità, per l'endocitosi di proteine dell'ospite, e per la fagocitosi di batteri e cellule dell'ospite, correla con l'intensa attività endocitica e fagocitica di *T. vaginalis*.

Alcune delle famiglie geniche espanse fanno parte del kinoma di *T. vaginalis*, che comprende circa 880 geni che codificano per tipiche chinasi eucariotiche, e circa 40 chinasi atipiche, cosa che lo rende uno dei kinomi eucariotici più grandi e complessi. L'espansione genica ha riguardato anche proteine del citoscheletro. *T. vaginalis* possiede diverse strutture citoscheletriche insolite (la pelta, l'assostile, la costa). Sono presenti molti elementi citoscheletrici correlati con l'actina e la tubulina, con

l'eccezione della miosina. In contrasto, gli omologhi del motore microtubulare dineina e kinesina sono abbondanti in modo inusuale. Perciò, il traffico intracellulare in *T. vaginalis* potrebbe essere mediato essenzialmente dalla dineina e kinesina citoplasmatiche, come già osservato per *Dictyostelium* e per i funghi filamentosi. Si potrebbe ipotizzare che la perdita di un trafficking intracellulare mediato da miosina possa essere un evento comune tra gli eucarioti unicellulari. Rimane da chiarire se la trasformazione morfologica in senso ameboide osservata durante la colonizzazione dell'ospite sia mediata dall'actina o se sia determinata da riarrangiamenti citoscheletrici alternativi. Sono stati identificati omologhi di proteine coinvolte nella risposta al danneggiamento e riparo del DNA, rimodellamento cromatinico e nella meiosi, nonostante *T. vaginalis* abbia una riproduzione asessuata. Dei 29 geni che fanno parte del corredo base meiotico, diversi sono proteine con funzione di riparo generale necessarie per la meiosi in altri organismi, mentre 8 sono meiosi-specifici. Si può concludere che *T. vaginalis* possiede dei recenti relitti evolutivisti di un macchinario meiotico, oppure dei geni funzionali in un processo meiotico di ricombinazione in un ciclo sessuale non ancora descritto.

Gene family (functional unit)	Members
Protein kinases	927
BspA-like gene family	658
Membrane trafficking: small GTPases	328
rDNA gene cluster	~250
Cysteine peptidase (clan CA, family C19)	117
Membrane trafficking: vesicle formation	113
ABC transporter superfamily	88
GP63-like (leishmanolysin)	77
MFS transporter family	57
MOP flippase transporter family	47
Cysteine peptidase (clan CA, family C1)	48
AAAP transporter family	40
Dynein heavy chain	35
P-ATPase transporter family	33
Serine peptidase (clan SB, family S8)	33
Membrane trafficking: vesicle fusion	31

Tabella 2- In tabella sono riportate le famiglie o i gruppi di famiglie geniche di *T. vaginalis* che mediano processi, nei quali sono coinvolte più di 30 proteine alle quali sono state assegnate delle putative funzioni. GTPases sono la somma solo delle GTPase Rab e ARF; ABC: ATP-binding cassette; MSF: major facilitator superfamily; MOP multi-drug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide; AAAP, amino acid/auxin permease.

Meccanismi molecolari di patogenicità

Uno step cruciale nell'inizio e nel mantenimento dell'infezione è l'adesione alle cellule dell'ospite da parte di *T. vaginalis*. Sono state identificate otto famiglie contenenti circa 800 candidate proteine di superficie, che includono anche 650 putative BspA-like proteins caratterizzate da leucine-rich-repeats (LRR). Le BspA-like proteins sono espresse sulla superficie di molti batteri patogeni e mediano l'adesione cellulare. L'unico altro eucariote che esprime BspA-like proteins è *Entamoeba histolytica*.

T. vaginalis possiede 75 geni che codificano per GP63-like proteins, omologhi delle proteine di superficie più abbondanti di *Leishmania major*, le leishmanolisine. La maggior parte delle GP63-like proteins predette possiede i domini necessari per un'attività metallopeptidasica. Sono stati inoltre identificati dei geni codificanti per putativi effettori citolitici, che potrebbero essere rilasciati dopo il contatto con le cellule ospiti. Si tratta di 12 geni (TvSaplip1-12) contenenti dei domini saposin-like, che sono ritenuti mediare un'attività formante poro. Questi domini mostrano un tipico pattern di sei residui di cisteina, abbondanti residui idrofobici in posizioni conservate. Queste candidate proteine formanti poro sono simili alle amoebapores, proteine ad attività citolitica secrete da *E. histolytica*, e possono essere ritenute le candidate trichopores.

L'analisi della sequenza del genoma di *T. vaginalis* ha consentito inoltre di avere nuove e importanti informazioni sul degradoma, evidenziando anche in questo caso una massiccia espansione che ha portato il protozoo a possedere più di 400 peptidasi. Ciò sottolinea l'importanza di questa classe di molecole nella biologia del parassita.

Grazie al progetto genoma è stato possibile identificare nuove vie metaboliche e gettare luce sul processo patogenetico, fornendo così potenziali nuovi approcci per lo sviluppo di innovativi strumenti diagnostici e nuove terapie. Le analisi condotte sono state sicuramente ostacolate dal gran numero di repeats molto simili e di elementi trasponibili. Le ragioni di questo drammatico aumento nelle dimensioni del

genoma potrebbero essere le più varie. E' stato ipotizzato che un antenato comune di *T. vaginalis* sia andato incontro a un effetto collo di bottiglia durante un ipotetico passaggio dall'ambiente intestinale (l'habitat tipico di molte specie di *Trichomonas*) a quello urogenitale. In questo passaggio una diminuita selezione potrebbe essere risultata nell'accumulo di repeats e nell'espansione selettiva di determinate famiglie geniche. Poiché le dimensioni del genoma e quelle cellulari sono correlate, l'aumento del genoma potrebbe avere avuto come effetto anche l'aumento delle dimensioni della cellula. L'aumento delle dimensioni potrebbe avvantaggiato *T. vaginalis* da un lato aumentandone le capacità fagocitiche nei confronti dei batteri della flora vaginale, da un altro lato rendendo più difficoltosa l'ingestione da parte dei fagociti dell'ospite e fornendo una maggiore area di contatto per la colonizzazione della mucosa vaginale.

2. Materiali e metodi

Analisi della sequenza del genoma di *T. vaginalis*

Sono state effettuate ricerche di omologia nel database della sequenza del genoma di *T. vaginalis* (<http://trichdb.org/trichdb/>) per l'identificazione di putativi componenti della via di RNAi. Le queries utilizzate per l'analisi BLAST erano le sequenze aminoacidiche: *Drosophila melanogaster* Dicer (acc no Q9VCU9); *T. brucei* TbAGO-1 (acc no EAN78475), *D. melanogaster* Armitage (acc no AAT12000). L'analisi è stata effettuata mediante TBLASTN usando l'assembly 7.2X del genoma come subject. L'attività trascrizionale delle putative ORF trovate mediante analisi di omologia è stata valutata mediante analisi BLAST di 75.858 EST (expressed sequence tags) nel database Chang Gung *Trichomonas vaginalis* Expressed Sequence Tag (TvXpress DB; <http://163.25.93.159/est/>). I geni predetti che non sono stati confermati come trascritti in questo modo sono stati analizzati sperimentalmente mediante RT-PCR. Le sequenze aminoacidiche ottenute per traduzione concettuale dei geni predetti sono state analizzate per la ricerca di domini funzionali conservati mediante il software SMART (Simple Modular Architecture Research Tool - <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Cellule e loro coltivazione

L'isolato di *T. vaginalis* SS30, naturalmente privo di *Mycoplasma hominis*^{94, 95} e TVV⁹⁶, è stato ottenuto da tampone vaginale di donna affetta da tricomoniiasi. I protozoi sono stati coltivati mediante diluizioni giornaliere 1:16 in terreno Diamond's TYM supplementato con siero bovino fetale (FBS) al 10%. Le colture sono state incubate a 37°C. La vitalità dei protozoi è stata monitorata valutandone la motilità.

Estrazione DNA

10^7 cellule sono state centrifugate a 1500 g per allontanare il terreno di coltura; sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Le cellule sono state risospese in 318 μ l di tampone TE pH 8, 80 μ l di SDS al 10%, 2 μ l di proteinasi K e sono state incubate a 65°C per 30 minuti. Sono stati aggiunti 200 μ l di fenolo saturato in Tris-HCl, 200 μ l di cloroformio-alcol isoamilico 24:1. È stata fatta un'ulteriore centrifugazione a 12000xg per 10'. È stata raccolta la fase acquosa che ha subito altre due estrazioni in Fenolo-CIA 25:24:1. È stato fatto precipitare il DNA aggiungendo 0.8 ml di etanolo al 100% e 40 μ l di acetato di sodio 3M a pH 5.2 e incubando per 1 ora e 45' a -80°C. È stata fatta una centrifugazione a 12000xg per 15' a 4°C, il soprannatante è stato scartato e il pellet lavato con 1 ml di etanolo al 70%. Una volta asciugato all'aria il DNA è stato risospeso in 30 μ l di TE pH 8.

Il ciclo di amplificazione utilizzato variava a seconda della coppia di primers utilizzata.

- 1) DENATURAZIONE a 94°C per 5 minuti.
- 2) AMPLIFICAZIONE, ripetuta per 35 cicli
 - 94°C per 45"
 - temperatura di annealing 45"
 - 72°C per 30"
- 3) POLIMERIZZAZIONE a 72°C per 5 minuti.

Estrazione ed analisi dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto con Trizol (Invitrogen) in accordo con le istruzioni del produttore. Brevemente, alle cellule risospese in Trizol sono stati aggiunti 200 μ l di cloroformio, seguiti da agitazione per 15", 3' a T ambiente, e centrifuga per 10'. L'RNA nella fase acquosa è stato precipitato con 500 μ l di isopropanolo, incubato 10' a T ambiente e centrifugato. Il pellet di RNA è stato lavato con etanolo al 70%, ed una volta asciugato è stato risospeso in opportuno volume di acqua trattata con DEPC (dietilpirocarbonato) allo 0,01%.

Tutte le centrifugate sono state effettuate a 4°C e 12000 x g.

La concentrazione dell'RNA è stata determinata in spettrofotometria UV a 260 nm e la qualità valutata con l'elettroforesi su gel d'agarosio all'1%. Per la RT-PCR semiquantitativa un eventuale DNA genomico contaminante è stato eliminato mediante trattamento con DNaseI (Invitrogen), e l'assenza di DNA è stata confermata da PCR convenzionale.

I cDNA sono stati retrotrascritti a partire da 500 ng di RNA totale, 0,5 µg di Oligo(dT), 1 µl di dNTPs 10 mM, 4 µl di first strand 5X, 2 µl di DTT 0,1 M, ed 200 unità di SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore.

Per ogni reazione di qRT-PCR con i diversi cDNA sono state effettuate curve standard con diluizioni seriali di cDNA.

Tabella 3 Elenco dei primers utilizzati:

Gene	sequenza primers	T annealing (C°)
<i>TvDEAD/DEAH helicase1</i>	CCTCGATGAAGCCGATAGAC	58
	CCTGCTCTGCCTGTTCTACC	
<i>TvDEAD/DEAH helicase2</i>	ATGTGGGAAAACCCTCACAG	57
	AGCAACAAGTGTGGCTTCCT	
<i>TvDEAD/DEAH helicase3</i>	AAAGAAAGGCTACGCGTTCA	54
	GCATTTGCCATTTCTTCGAT	
<i>TvDEAD/DEAH helicase4</i>	GAAACCTTTAACGCGATCCA	56
	GGAACAGTGGCAGAAAAGAGC	
<i>TvDEAD/DEAH helicase5</i>	TGAAGGAGCAAAGGGTGTTT	53
	CCGCCACAAAATAGACCAAC	
<i>TvDEAD/DEAH helicase6</i>	TTGGACAAATCCAACACCAA	51
	GGCCAAGTTGCAGAAAACAT	
<i>TvDEAD/DEAH helicase7</i>	GGAAACAGAGGATGGAACGA	53
	CCATTGCCATTCCAATTACC	
<i>TvDEAD/DEAH helicase8</i>	GTTTGCCACGGAGACATTTT	51
	GAGGGGGAGTCACTACTACA	
<i>TvDEAD/DEAH helicase9</i>	CGGCATCCATACCATTATCC	56
	TTTCGCCAACAGAAACAGTG	
<i>TvDEAD/DEAH helicase10</i>	CATTGTGTTCCAAATCGTG	54
	AAATCGCAGGTTTGTGTTGG	
<i>TvDEAD/DEAH helicase11</i>	CCAAGGCCAAAAGTGAAGCTC	57
	GCCTGAGCGAAGTCAAATC	
<i>TvDEAD/DEAH helicase12</i>	TCGGAGATGAAAGCAGAGGT	53
	CTAAAAGGATACCGCCGTGA	
<i>TvDEAD/DEAH helicase13</i>	ATGCGCTAATACCGGAACAG	53
	GGAGGGTTCTGCAACAATA	
<i>TvDEAD/DEAH helicase14</i>	CAAAATCTTGGTGGCGATTT	54
	AGCGATCCTGTTGCTTTCAT	
<i>TvDEAD/DEAH helicase15</i>	TGAACCTCAATGCAAAGCTG	56
	GCGACTCCTGTTCTGTCCAT	
<i>TvDEAD/DEAH helicase16</i>	CCGGAATGACTGACGAATTT	56
	GGCGATAACGTGTTTGAGGT	
<i>TvDEAD/DEAH helicase17</i>	AGCAGAAAACAGGCTCAGGAA	57
	GCCTGTGGAACCTTGCTTTTC	
<i>TvDEAD/DEAH helicase18</i>	TGAACCTCAATGCAAAGCTG	56
	GCGACTCCTGTTCTGTCCAT	
<i>TvAgo-like1</i>	TTGGCCGCATGAGAAAATC	55
	CCGCAGAAATGAAGGGAACC	
<i>TvAgo-like2</i>	GTTTTCGGACGGACCATCATT	55
	CCCGAAAAAGGCAGGAACAT	
<i>TvdsRNaseIII</i>	TGGCACATTGTTTGGCAGTT	53
	CTTTGTCCGTCATGAGTTATCC	

<i>TvAA</i>	ATGAACGAGGCTCATGC	63
	TCTCCTTCTTGGCGTTGA	
<i>TvME</i>	CCAGACACTCCCAGTCC	58

	AT	
	TGTCTCGCCAAAGACTT	

Sintesi dell'RNA double stranded (dsRNA) omologo all' α -actinina.

Gli RNA senso ed antisenso sono trascritti a partire da 2 DNA identici omologhi alla regione centrale di 700 paia di basi (bp) dell' α -actinina (gene ID XM001580086 TVAG 190450), ma recanti il promotore T7 in direzioni opposte, inserito mediante PCR.

α -actsenso:

For TAATACGACTCACTATAGGGACTCCGTCAACCGCCACCACTCC

Rev CGGGCCTTGCGCTCTTCTTCCT

α -actantisenso:

For ACTCCGTCAACCGCCACCACTCC

Rev TAATACGACTCACTATAGGGCGGGCCTTGCGCTCTTCTTCCT).

Ogni DNA templatato viene trascritto in una singola reazione di trascrizione in vitro, originando così i due filamenti ssRNA complementari. Le reazioni sono state eseguite come da protocollo l'unica variazione è stata l'aggiunta alla miscela di reazione di fluorescein-12-uridine-5'-trifosfato (UTP-FITC) (Roche, Mannheim, Germany), in quantità tale che il rapporto UTP-FITC/UTP fosse 3,5 mM/6,5 mM. I ssRNA-FITC sono stati purificati, quantificati e quantità equimolari di RNA-senso e RNA-antisenso sono stati incubati per 5' a 75°C e lasciati a temperatura ambiente fino a completo raffreddamento (circa 4 ore.). la qualità del dsRNA-FITC è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Elettroporazione di dsRNA in *T. vaginalis*.

$2,5 \times 10^8$ cellule di *T. vaginalis* SS-30 sono state centrifugate a 1500xg per 10', e il pellet è stato risospeso in 300 μ l di Diamond freddo. Alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 35 μ g di dsRNA-FITC o una quantità equivalente di poly(IC) come controllo. L'elettroporazione è stata effettuata a 350 volts e 960 μ Fd in microcuvette da 0,4 cm utilizzando lo strumento Bio-Rad gene pulser. Le cellule elettroporate sono state immediatamente risospese in 50 ml di Diamond a 37°C.

A partire dall'elettroporazione (tempo 0) sono stati effettuati prelievi consecutivi per l'estrazione di proteine e RNA, rispettivamente da 5×10^5 e 1×10^7 cellule.

Analisi delle proteine.

5×10^5 cellule (trattate e controllo) sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate 2 volte con PBS. Il pellet è stato risospeso in Laemmli e bollito per 3'. Per il Western blotting proteine estratte da 5×10^4 cellule sono state separate mediante SDS-PAGE in un gel all'8%, e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state saturate in PBS contenente il 0,05% di Tween20 e il 3% di albumina serica bovina (Sigma-Aldrich). Le membrane sono state incubate con anticorpi policlonali \bar{A} - α -actinina e \bar{A} -enzima malico.

Anticorpi anti-enzima malico.

Per valutare la possibile variazione dell'espressione dell' α -actinina in seguito alla transfezione con dsRNA-FITC, i livelli di espressione dell'enzima malico sono stati utilizzati come loading control. Per fare ciò stato necessario produrre anticorpi contro tale proteina. La porzione del gene dell'enzima malico compresa tra il residuo 230 e 1810 (gene ID XM5464269 TVAG_267870) è stata amplificata mediante PCR (**TvMEclon for:** CGGGATCCGCTAAGGTCCCAACC. **TvMEclon rev:** AACTGCAGATAGAGTTGCTCGTA) e clonata nel vettore di espressione pQE30 (Qiagen), che permette di sintetizzare la

proteina di interesse fusa con una coda N-terminale di 6 residui di istidina, consentendo perciò la purificazione della proteina mediante cromatografia per affinità con ioni di nichel.

La proteina ricombinante è stata purificata e quantificata mediante Bradford's reagent (Sigma-Aldrich)

40 µg di antigene addizionati con 500 µl di PBS e 500 µl di adiuvante di Freund completo (Sigma-Aldrich) sono stati inoculati in topo (BALB-C).

Dopo 15 giorni è stata inocolata la stessa quantità di antigene miscelata con 500 µl di PBS e 500 µl di adiuvante di Freund incompleta.

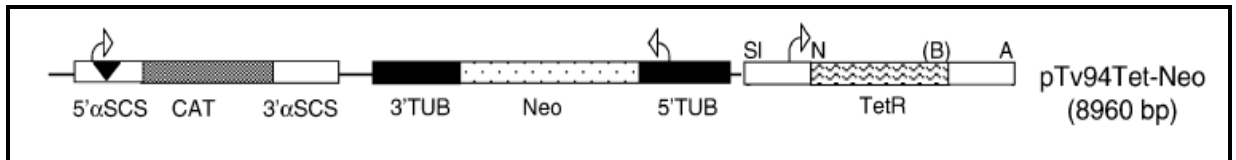
Il terzo inoculo è stato effettuato dopo circa 22 giorni e la miscela comprendeva 30 µg di antigene risospesi in 1 ml di PBS.

Il bleeding del topo è stato effettuato dopo una settimana dall'ultimo inoculo.

Il titolo dell'anticorpo è stato valutato mediante ELISA.

Costruzione dei vettori per l'espressione di dsRNA

Per ottenere un vettore che esprima in modo inducibile dsRNA in *T. vaginalis*, abbiamo utilizzato il vettore pTV94Tet-neo, precedentemente messo a punto per l'espressione di geni esogeni in *T. vaginalis*. (gentilmente fornito da P.J. Johnson, UCLA, Los Angeles, USA⁹⁷). Il vettore pTV94Tet-neo è stato messo a punto sullo scheletro del pBluescript (Stratagene), in cui è stato inserito, tra il 5' UTR ed il 3' dell' α -succinyl CoA sintetase B (5'-3' α -SCS), il gene CAT (cloramfenicolo acetil trasferasi), la sequenza dell'operatore Tet (TetO, freccia nera) è stata inserita a valle del sito di inizio della trascrizione Inr (freccia bianca). La cassetta Neo, che codifica per la neomicina fosfotransferasi, è stata posizionata tra il 3' e 5' della regione UTR del gene della tubulina. TetR, anch'essa inserita tra il 3' e il 5' dell'UTR dell' α -SCS, esprime per il repressore di TetO.

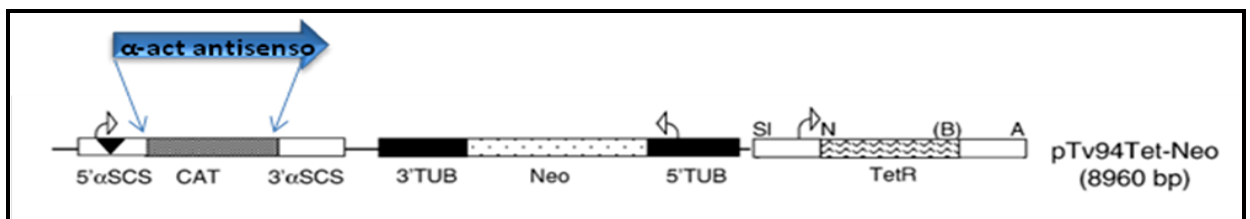


L'obiettivo è l'espressione di dsRNA stem-loop, in cui i due ssRNA siano separati da una sequenza spaziatrice non correlata con *T. vaginalis*. Questa sequenza è necessaria per la propagazione nei batteri del plasmide, che senza risulterebbe instabile a causa delle sequenze ripetute invertite.

Nel plasmide pTV94 Tet-neo è stato sostituito CAT con la porzione dell' α -actinina

α -actBamHI 5' CGGGATCCTGCATGGACATCATCAACAA 3';

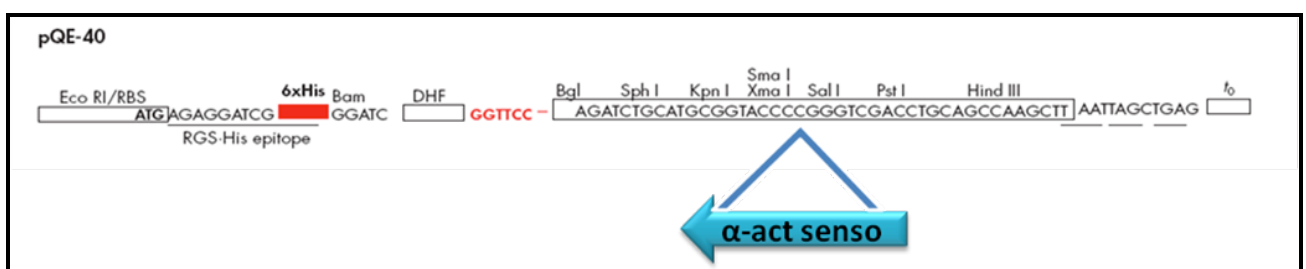
α -actKpnI 5' GGTACCCAACCTGAGCCTTGACTGC 3') di 700 bp orientata in direzione antisenso utilizzando KpnI e BamHI. Il plasmide è stato chiamato pTV α act.



L' α -actinina in direzione senso amplificata mediante PCR

(**α -actSmaI** 5' CCCCCGGGGTGCATGGACATCATCAACAA 3';

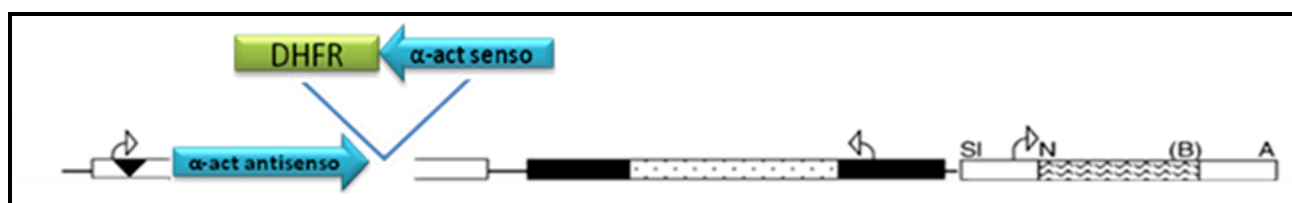
α -actPstI 5' GGTACCCAACCTGAGCCTTGACTGC 3') è stata inserita mediante SmaI e PstI a valle del gene DHFR del plasmide pQE40



Il plasmide così ottenuto è stato utilizzato come template per amplificare in PCR (DHF α BamHI-for 5' CGCGGATCCGCGAAGAATGACCACAACCTCTTCAG 3';

DHF α BamHI-rev 5' CGCGGATCCGCGCTGCAGCAGCATCTCCTG 3') 500 nt del gene DHFR (spaziatore) e l' α -actinina in direzione senso.

L'amplificato ottenuto è stato inserito in pTV α act originando il plasmide definitivo pFR α actTet-neo.



3. RISULTATI

Ricostruzione di una putativa via di RNAi in *T. vaginalis*.

Due famiglie geniche conservate sono i componenti universali dell'RNAi e riflettono i due step principali di questa via: la famiglia Dicer, caratterizzata da un'attività RNasica di tipo III, e la famiglia Argonate (AGO). L'analisi della sequenza del genoma ha permesso l'identificazione di una putativa RNasi III (TvdsRNase) e di due geni AGO (TvAgo-1 e -2). Tutti e tre i geni hanno attività trascrizionale, come dimostrato mediante RT-PCR. In figura 6 è possibile osservare l'organizzazione in domini di TvdsRNase confrontata con quelle di proteine Dicer di *D. melanogaster* e *C. elegans*, e con la dsRNase di *E. histolytica*.

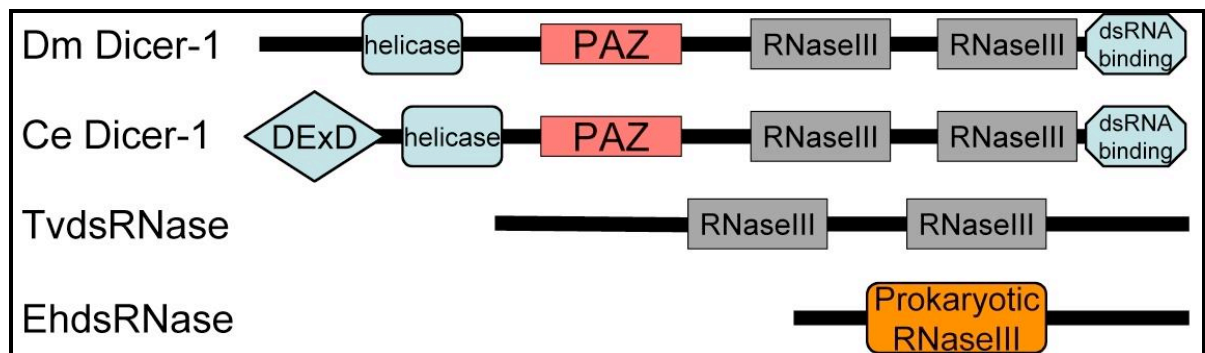


Figura 6 Comparazione dell'organizzazione in domini delle dsRNasi di diversi organismi. Dm: *Drosophila melanogaster*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Tv: *Trichomonas vaginalis*; Eh: *Entamoeba histolytica*.

TvdsRNase differisce dalle proteine Dicer nell'assenza dei domini helicase, PAZ e dsRNA-binding. dsRNase di *E. histolytica* mostra un'attività dicer-like, anche se manca della tipica organizzazione in domini delle proteine Dicer, e il dominio RNaseIII è tipicamente procariotico. Al contrario di EhdsRNase e analogamente alle Dicer, TvdsRNase possiede due domini RNaseIII tipicamente eucariotici ripetuti in tandem.

Le sequenze aminoacidiche di TvAgo-1 e -2 mostrano invece la tipica organizzazione della famiglia AGO, con un dominio PAZ e uno PIWI (Figura. 7). In particolare la sequenza piwi-box, che interagisce con Dicer e lega i siRNA, sembra altamente conservata (Figura. 7).

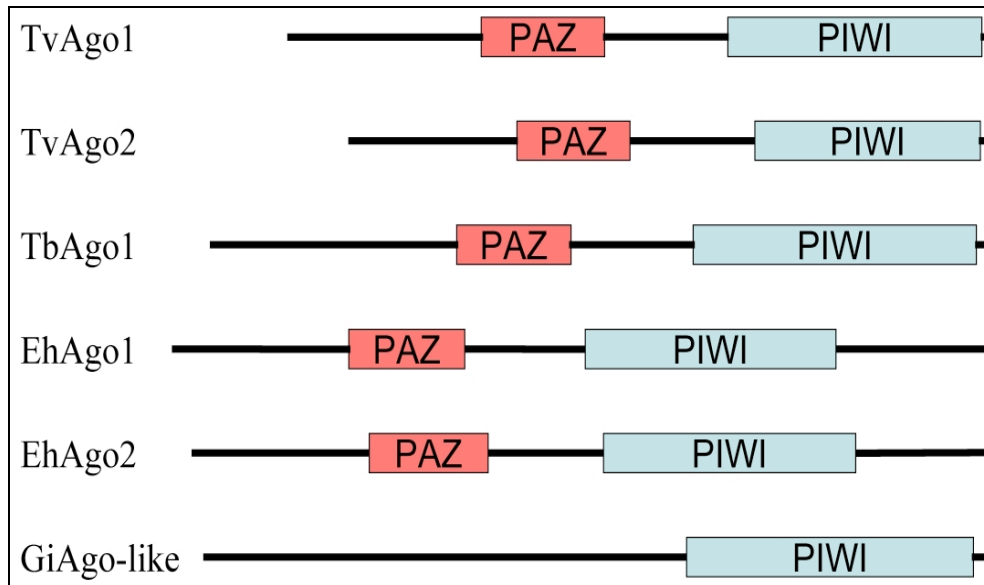


Figura 7 Organizzazione in domini delle proteine TvAGO-1 e -2 confrontate con quella delle proteine AGO di altri protozoi patogeni (*T. brucei*, *E. histolytica*, *Giardia intestinalis*)

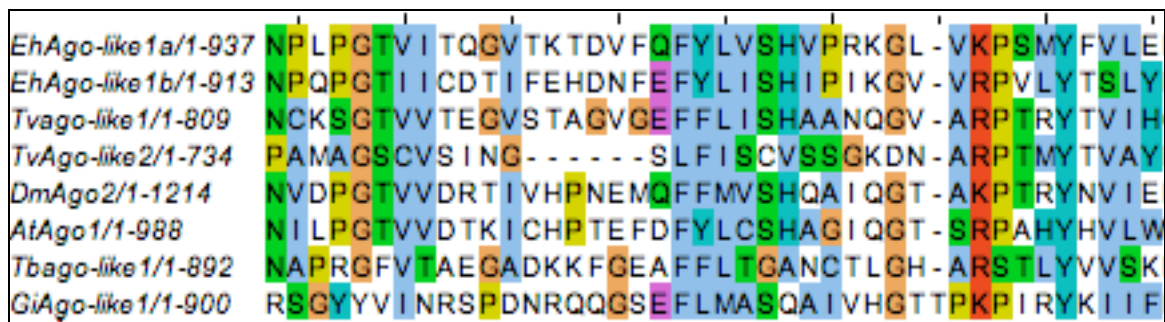


Figura 8 Allineamento delle sequenze dei piwi-box di proteine Argonaute di *T. vaginalis*, *T. brucei*, *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *D. melanogaster*, *A. thaliana*.

Studi in molti organismi hanno dimostrato che diverse RNA elicasi sono coinvolte nei meccanismi di silencing post-trascrizionale. In particolare si ritiene che le DEAD/DEAH-box helicase siano coinvolte nello srotolamento dei siRNA nel RISC. Ad esempio la DEAD-box helicase Armitage è essenziale per l'assemblaggio del RISC in *D. melanogaster*. Dall'analisi della sequenza del genoma di *T. vaginalis* sono stati inoltre

predetti 41 geni DEAD/DEAH-box helicase, la cui attività trascrizionale è stata confermata sia tramite ricerca in una banca EST che tramite RT-PCR.

Sintesi ed elettroporazione di dsRNA in *T. vaginalis*

Per valutare l'eventuale attività di RNAi in *T. vaginalis*, è stato prodotto, mediante trascrizione in vitro, un dsRNA di circa 700 bp omologo alla regione centrale dell' α -actinina.

$2,5 \times 10^8$ cellule sono state elettroporate con 35 μ g di dsRNA-FITC. Il controllo è rappresentato da $2,5 \times 10^8$ cellule trasfettate con dsRNA aspecifico, poly(IC)

Per valutare l'efficienza di elettroporazione un'aliquota di cellule trattate con dsRNA-FITC e di cellule trattate con poly(IC) sono state osservate in microscopia a fluorescenza. (Figura. 9)

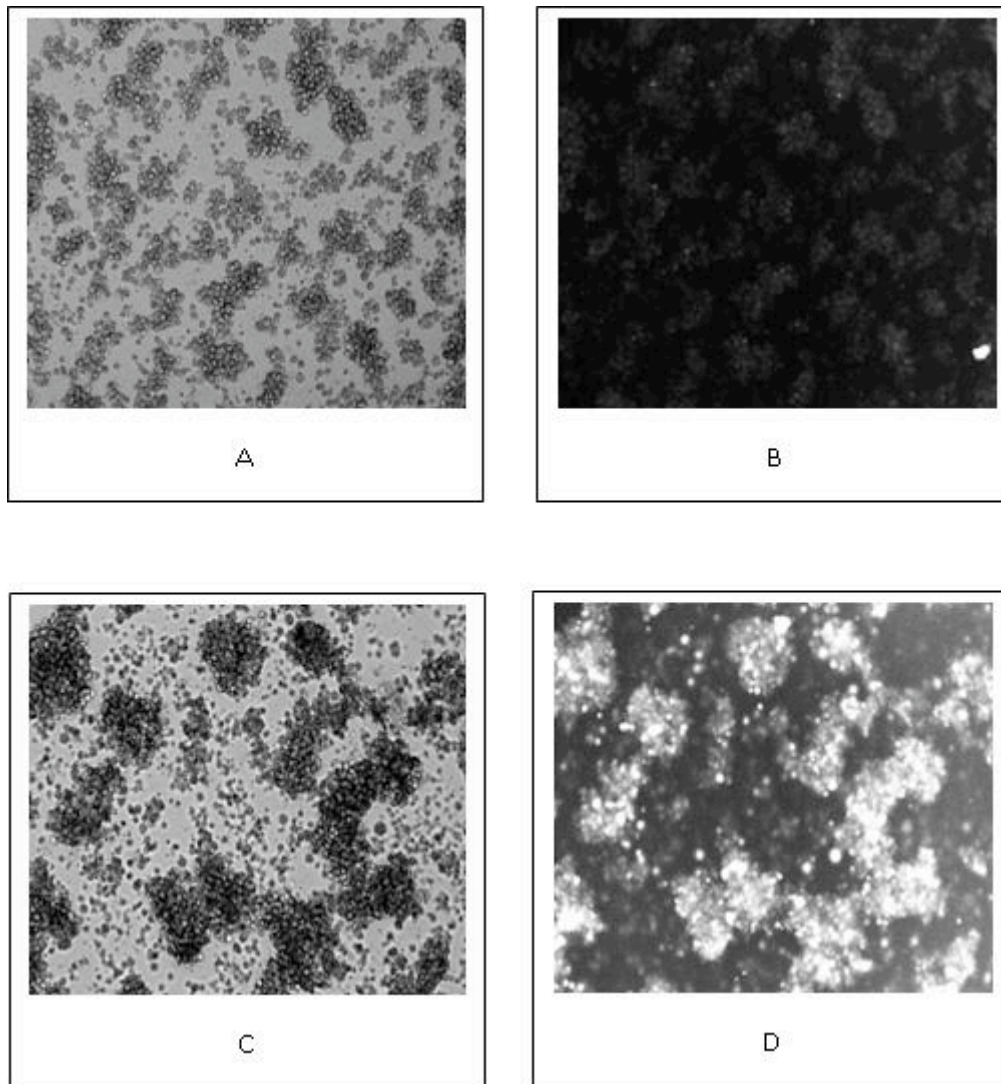


Figura 9 $2,5 \times 10^8$ cellule sono state elettroporate con $35 \mu\text{g}$ di dsRNA-FITC omologo alla regione centrale dell' α -actinina. Il controllo è rappresentato dallo stesso numero di cellule elettroporate con poly(IC). È possibile osservare in **B** che le cellule controllo non emettono alcun tipo di fluorescenza se sottoposte ad luce a 480 nm, mentre in **D** è possibile osservare la fluorescenza emessa da cellule transfettate con dsRNA-FITC .

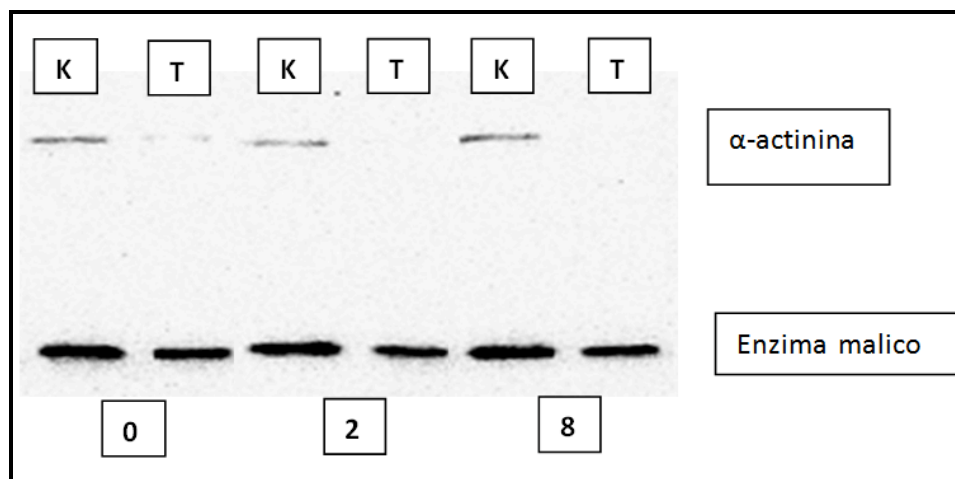
Western blotting e RT-PCR

Le proteine estratte da 5×10^4 cellule transfettate con dsRNA-FITC e con poly(IC) sono state analizzate in Western blot. Sono stati effettuati diversi esperimenti mantenendo le stesse condizioni (numero di cellule, quantità di dsRNA-FITC,

Federica Riu - Identificazione e caratterizzazione di una putativa pathway di RNA interference nel protozoo a trasmissione sessuale *Trichomonas vaginalis*- Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari. 45

condizioni dei prelievi) ma i risultati sono discordanti fra loro, come si può osservare nei due esempi rappresentativi di tutti gli esperimenti. Infatti nell'esperimento A (Figura 9A) è possibile osservare una diminuzione della proteina α -actinina nelle cellule trattate con dsRNA, se confrontata sia con l'enzima malico utilizzato come loading control, sia con l'espressione dell' α -actinina nelle cellule trattate con poly(IC). Mentre nell'esperimento B (Figura. 9B) non si osserva alcuna variazione dell'espressione dell' α -actinina con le cellule elettroporate con poly(IC).

A



B

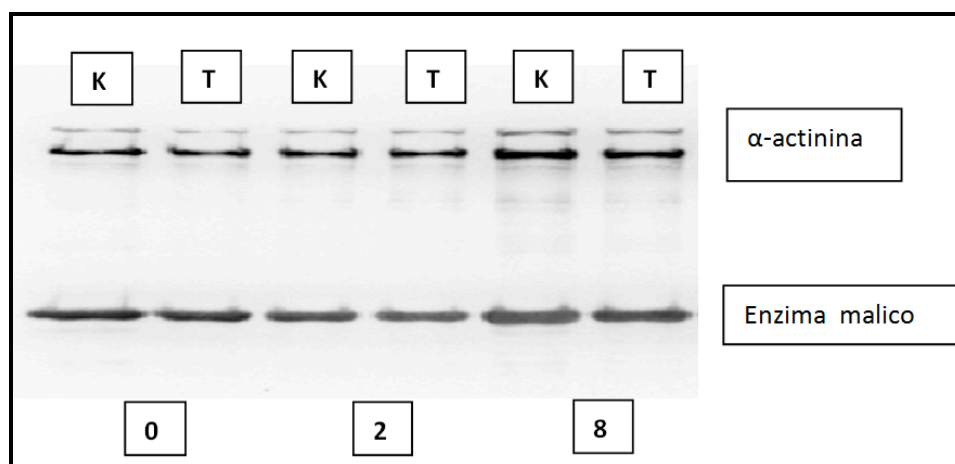


Figura 10 5×10^5 cellule sono state separate su gel di acrilammide 8%, elettrotrasferite su nitrocellulosa e incubate con \bar{A} - α -actinina e \bar{A} -enzima malico. Le corsie contrassegnate con K rappresentano le cellule elettroporate con poly(IC), mentre le corsie T sono le cellule elettroporate con dsRNA-FITC. 0, 2, 8 sono le ore

trascorse dall'elettroporazione. Nella figura **A** è possibile osservare la completa scomparsa dell' α -actinina dopo 2 e 8 ore dalla transfezione. La ripetizione dell'esperimento non ha evidenziato alcuna variazione tra l'espressione dell' α -actinina tra le corsie K e T come mostrato in figura **B**.

Ogni qRT-PCR è stata effettuata con i primers per l' α -actinina e normalizzata sul gene housekeeping dell'enzima malico. Per valutare le variazioni RNA messaggeri dell' α -actinina. I dati ottenuti sono stati normalizzati utilizzando come gene housekeeping l'enzima malico.

I risultati ottenuti non hanno mostrato una significativa variazione tra cellule di controllo e trattate.

Costruzione di vettori per l'espressione di dsRNA.

Il vettore per l'espressione di dsRNA stem loop è stato costruito utilizzando il vettore pTV94Tet-neo. A valle del promotore tetraciclina inducibile sono state inserite due sequenze di DNA uguali ma orientate in senso opposto e separate da una sequenza spaziatrice non correlata con *T. vaginalis*.

La selezione e l'induzione, rispettivamente ad opera di gentamicina e tetraciclina permetteranno l'espressione di un dsRNA hairpin. Attualmente si sta portando a termine l'ultima parte di lavoro per mettere a punto il plasmide definitivo.

4. DISCUSSIONE

Gli ultimi 10 anni hanno visto la ricerca biologica arricchirsi di un nuovo campo di studi, da quando sono stati osservati e descritti in diversi eucarioti fenomeni di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica indotti e guidati da corti duplex di RNA: l'RNA interference.

Questa scoperta ha portato in dote alla comunità scientifica una tecnologia rivoluzionaria per gli studi di funzione genica, che hanno consentito notevoli passi avanti nella comprensione della biologia degli organismi in cui questa tecnologia è stata applicata con successo.

La relativa rapidità e facilità di esecuzione, ovvero l'introduzione di molecole di dsRNA omologhe al gene di cui si vuole silenziare l'espressione, e la specificità ne fanno una tecnica estremamente versatile e altamente informativa.

Per quanto riguarda i protozoi patogeni per l'uomo, si è appena iniziato a scoprire le potenzialità dell'applicazione di questa tecnologia. Difatti, solo per *T. brucei* l'RNAi viene ormai utilizzata routinariamente per studi di funzione genica che prevedono il silenziamento post-trascrizionale dell'espressione genica. Recenti studi, sia funzionali che di database mining in seguito ai progetti di sequenziamento genomico di diverse specie protozarie, stanno suggerendo l'esistenza di una pathway di RNAi funzionale in microorganismi come *T. gondii*, *E. histolytica*, *G. intestinalis*.

Tra i microorganismi di cui è stato recentemente effettuato il sequenziamento del genoma, c'è *T. vaginalis*. Il *T. vaginalis* Genome Project, a cui ha partecipato anche il nostro gruppo di ricerca, ha fornito nuove prospettive per studiare la biologia di un microorganismo, la cui importanza a livello di salute pubblica continua a essere ignorata, nonostante l'elevato numero di casi di tricomoniasi che vengono riscontrati ogni anno in tutto il mondo.

Scopo del lavoro svolto durante il Corso di Dottorato è stato quello di ricercare nella sequenza del genoma di *T. vaginalis* geni omologhi a quelli che costituiscono i passaggi chiave della via di RNAi negli eucarioti, tentare una preliminare

caratterizzazione funzionale di un ipotetico silenziamento genico dsRNA-indotto, e sviluppare un efficiente sistema di espressione di dsRNA in questo protozoo, che potesse consentire di aggirare i problemi tipicamente incontrati nell'introduzione di dsRNA sintetici per ottenere un gene silencing. I due passaggi chiave del pathway di RNAi sono la produzione di siRNA, mediata dalla RNasi di tipo III Dicer, e l'appaiamento degli siRNA con il mRNA omologo, che porta alla degradazione sequenza-specifica di quest'ultimo, mediati dal RISC, il cui core catalitico è rappresentato da proteine della famiglia Argonaute (AGO). L'analisi della sequenza del genoma ha portato alla ricostruzione del backbone genetico di una via di RNAi in *T. vaginalis*. In particolare, è stata identificata una Dicer-like protein (TvDicer), due Ago-like proteins e un corredo di 41 putative DEAD/DEAH RNA helicases. Proteine appartenenti a questa classe sono state viste avere un ruolo chiave nello svolgimento degli siRNA e nell'assemblaggio del RISC, in altri organismi come *D. melanogaster*. Mentre le due putative Argonaute (TvAgo-1 e -2) mostrano la tipica organizzazione delle proteine appartenenti a questa famiglia, con un dominio PAZ e un dominio PIWI, la TvDicer-like protein mostra un'organizzazione meno complessa rispetto alle Dicer dei metazoi. Difatti, manca dei domini dsRNA-binding, PAZ e RNA helicase, mentre presenta due tipici domini RNaseIII ripetuti in tandem. Ciò potrebbe riflettere l'origine evolutivamente antica di *T. vaginalis* e della sua putativa RNAi pathway; si potrebbe difatti ipotizzare che le RNaseIII coinvolte nell'RNAi si siano, nel corso dell'evoluzione, arricchite di altri domini funzionali aggiuntivi, sino ad arrivare all'assetto delle Dicer. E' da sottolineare come anche la Dicer-like di *T. brucei*, di cui è stata dimostrata l'attività di produzione di siRNA a partire da lunghi dsRNA, sia organizzata in due domini RNaseIII in tandem, analogamente a TvDicer. E' interessante notare come *T. vaginalis* possa essere infettato da diversi virus a dsRNA (*T. vaginalis* virus - TVV)⁹⁸. Ciò potrebbe essere un'indicazione di come il meccanismo di RNAi non sia attivo in *T. vaginalis*, e che l'ipotetico macchinario di gene silencing manchi di un qualche componente fondamentale. In alternativa potrebbe essere ipotizzato che TVV ha evoluto delle strategie di evasione per aggirare l'attività antivirale dell'RNAi. Infatti molti virus sia animali che vegetali codificano per proteine

che inibiscono l'RNAi, sequestrando sia i dsRNA che gli siRNA, quindi inibendo l'azione di Dicer e del RISC⁹⁹. L'identificazione di un gene Dicer-like, 2 geni AGO e 41 DEAD/DEAH-box elicasi sono una forte indicazione della presenza di una via di RNAi in *T. vaginalis*, o quantomeno di un sofisticato macchinario di processamento del dsRNA. Gli esempi di knock-out genico in *T. vaginalis* sono rari e limitati a uno scarso numero di geni (16), mostrandosi uno strumento limitato per gli studi di funzione genica in questo microorganismo.

Se tutte queste proteine predette sulla base di analisi bioinformatiche siano effettivamente coinvolte in un ipotetico fenomeno di RNAi in *T. vaginalis*, deve essere confermato sperimentalmente con studi funzionali.

La seconda fase del lavoro svolto durante il Corso di Dottorato è stato improntato al tentativo di dimostrare funzionalmente l'esistenza di un fenomeno di silenziamento genico post-trascrizionale specificamente indotto da dsRNA. La strategia sperimentale seguita ha ricalcato quella presente in letteratura per *T. brucei*, ovvero l'introduzione di lunghi dsRNA sintetici (700 bp) in *T. vaginalis*. Il gene target prescelto per questo studio è stata l' α -actinina, una actin-binding protein studiata in dettaglio in anni passati nei nostri laboratori. Oltre a possedere tools, quali anticorpi specifici, che consentono il monitoraggio dell'espressione di questo gene, il suo coinvolgimento in fenomeni di transizione morfologica legati alla virulenza lo rendono un bersaglio interessante, il cui fenotipo knockdown potrebbe essere facilmente monitorabile e di sicuro interesse. Un primo gruppo di esperimenti ha dato risultati incoraggianti, ovvero è stata osservata una netta downregolazione dell' α -actinina se riferita all'enzima malico di controllo e a cellule di *T. vaginalis* in cui veniva introdotto un dsRNA aspecifico. Successivamente, è stato impossibile riprodurre i dati ottenuti: l'espressione del gene target non variava in seguito all'introduzione di dsRNA omologo. Da sottolineare, inoltre, l'estrema variabilità nella vitalità delle cellule protozoarie in seguito all'elettroporazione. Nonostante la costanza delle condizioni sperimentali usate, la vitalità osservata variava enormemente da esperimento a esperimento, rendendo difficoltosa e poco affidabile un'interpretazione coerente dei dati.

La mancata riproducibilità dei dati ottenuti in un primo momento, la variabilità della vitalità cellulare post-elettroporazione ci ha indotto ad avanzare diverse ipotesi di natura prettamente speculativa.

1. *T. vaginalis* è RNAi-negativo. La prima conclusione che si può trarre è che il macchinario di RNAi di *T. vaginalis* predetto con l'analisi della sequenza del genoma non sia funzionale, e che i geni identificati abbiano funzioni diverse dal gene silencing. L'apparente knockdown dell' α -actinina ottenuto in un primo tempo potrebbe essere un artefatto e quindi non riproducibile.

2. "Diluizione" del silenziamento: una possibile interpretazione dei dati che indicano l'assenza di un effetto di knockdown, potrebbe essere una mancata rivelazione di un possibile effetto di knock down. Difatti, basti considerare che:

- l'efficienza di transfezione del dsRNA non è mai stata del 100% (intorno all'80%)
- l'efficienza di downregolazione dell'espressione genica mediata da RNAi ha una variabilità notevole, e può essere bassa fino anche al 40%.
- *T. vaginalis* replica in vitro ogni 6 ore, cosa che porta quindi ogni 6 ore a un dimezzamento di un ipotetico gene silencing

Ciò considerato, si potrebbe ipotizzare che un'eventuale diminuzione dell'espressione dell' α -actinina non è stata rivelata perché troppo esigua, a causa dei limiti del sistema sperimentale adottato.

3. Il fenotipo α -actinina knock-down potrebbe essere se non letale quantomeno svantaggiato rispetto al wild-type, e potrebbe subire quindi una selezione negativa rispetto alle cellule non trasfettate, o molto semplicemente avere un tasso di replicazione inferiore rispetto a queste ultime. Anche in questo caso un ipotetico effetto knockdown non sarebbe rilevabile, portando così ad una sottostima dell'effetto di silencing.

In conclusione, il sistema sperimentale rappresentato dall'introduzione in cellule di *T. vaginalis* di dsRNA omologo all' α -actinina non rappresenta il modello di studio ottimale per caratterizzare una possibile attività di gene silencing. Si è quindi reso

necessario ricercare una nuova strategia di approccio che consentisse di aggirare tutti gli inconvenienti sopra citati.

La terza fase del lavoro svolto, ancora in progress, si è focalizzata sulla costruzione di un sistema plasmidico di espressione inducibile di dsRNA. Sulla base di un sistema inducibile di espressione di proteine eterologhe in *T. vaginalis*, è stato costruito un vettore plasmidico che consenta la sintesi in vivo di dsRNA. E' stato clonato e posto sotto il controllo del sistema inducibile Tet un inserto di DNA che codifica per un lungo RNA dalla struttura stem-loop, che verrà presumibilmente riconosciuto dalla putativa machinery dell'RNAi di *T. vaginalis*. Essendo il plasmide selezionabile, ci sarà la possibilità di isolare cloni stabili di *T. vaginalis* che in condizioni di induzione esprimeranno dsRNA sotto il controllo di un promotore forte.

Ciò consentirà di aggirare gli inconvenienti incontrati finora nei tentativi di caratterizzazione funzionale di un'ipotetica RNAi in *T. vaginalis*.

Inoltre, la dimostrazione di una via funzionale di RNAi in un protozoo filogeneticamente antico come *T. vaginalis* potrebbe gettare nuova luce sulla comparsa di questo meccanismo negli eucarioti. Inoltre, la dimostrazione e la caratterizzazione dell'RNAi in *T. vaginalis* potrà essere considerata la base di partenza per lo sviluppo di nuove strategie di intervento contro le malattie di origine protozoaria. L'RNAi viene attualmente largamente sfruttata come innovativo approccio di terapia genica per trattare importanti malattie umane come i tumori o i disordini neurodegenerativi. L'RNAi potrebbe essere considerata una potenziale e importante alternativa alle classiche terapie farmacologiche antiprotozoarie. Infatti il continuo aumento della circolazione di ceppi di *T. vaginalis* metronidazolo-resistenti rende la ricerca di nuovi approcci terapeutici una importante esigenza, considerando anche che limitare la diffusione della tricomoniasi potrebbe significare limitare la diffusione di HIV, soprattutto nei paesi in via di sviluppo.

Bibliografia

- ¹ Donné A. (1836) Animalicules observé dans les matières purulente set le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme. C R Sci Paris 3:385-386
- ² Honigberg B.M., King V.M. (1964) Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. JParassitol 50:345-364
- ³ Honigberg B.M., Brugerolle G. (1990) Structure pp.5-35 In: Trichomonads parasitic in humans. Ed. Springer-Verlag, New York USA.
- ⁴ Mattern C.T.F., Honigberg B.M., Daniel W.A. (1973) Finestructural changes associated with pseudocyst formation in *Trichomitus batrachorum*. J Protozool 20: 222-229
- ⁵ Warton A., Honigberg B.M. (1979) Structure of *Trichomonas* as revealed by scanning electron microscopy. J Protozool 26:56-62
- ⁶ Muller M. (1993) The hydrogenosome. J Gen Microbiol 139:2879-2889
- ⁷ Lindmark D.G., Muller M. (1974) Hydrogenosome, a cytoplasmatic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus* and its role in pyruvate metabolism. J Biol Chem 248: 7724-7728
- ⁸ Lindmark D.G., Muller M., Shio H. (1975) Hydrogenosome in *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol 61:552-554.
- ⁹ Muller M (1990) Biochemistry of *Trichomonas vaginalis* p.53-83 In: *Trichomonas* parasitic in humans. Ed.Springer-Verlag, New York USA.
- ¹⁰ Ter Kuile BH (1995) Adaptation of the carbon metabolism of *Trichomonas vaginalis* to the nature and availability of the carbon source. Microbiology 140:2503-2510.
- ¹¹ Mack S.R., Muller M. (1980) End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. Comp. Biochem. Physiol. 67:213-216.
- ¹² World Health Organization (WHO). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. Geneva: WHO, 1999.
- ¹³ World Health organization (2001) Trichomoniasis p. 26-27. In Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections,. World Health organization, Geneva, Switzerland.
- ¹⁴ Su-Lin KE (1982) Antibody to *Trichomonas vaginalis* in human cervicovaginal secretions . Infect.Immun. 37:852-857.
- ¹⁵ Rein MF (1990) Clinical manifestation of urogenital trichomoniasis in women. In: Trichomonads parasitic in humans. Ed. Springer-Verlag, New York USA
- ¹⁶ Krieger JN (1981) Urologic aspects of trichomoniasis. Invest. Urol. 18:411-417.
- ¹⁷ Lehker MW, Alderete JF (1992) Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins . Mol. Microbiol. 6: 123-132.

Federica Riu - Identificazione e caratterizzazione di una putativa pathway di RNA interference nel protozoo a trasmissione sessuale *Trichomonas vaginalis*- Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari. 53

-
- ¹⁸ Kohler, R. (1994) *Lords of the Fly: Drosophila Genetics and the Experimental Life*. University of Chicago Press, Chicago.
- ¹⁹ Izant, J. G. and Weintraub, H. (1984) Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36, 1007–1015.
- ²⁰ Rosenberg, U. B., Preiss, A., Seifert, E., Jackle, H., and Knipple, D. C. (1985) Production of phenocopies by Kruppel antisense RNA injection into *Drosophila* embryos. *Nature* 313, 703–704.
- ²¹ Harland, R. and Weintraub, H. (1985) Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *J. Cell Biol.* 101, 1094–1099.
- ²² Melton, D. A. (1985) Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 144–148.
- ²³ Fire, A., Albertson, D., Harrison, S.W., and Moerman, D. G. (1991) Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113, 503–514.
- ²⁴ Guo, S. and Kemphues, K. J. (1995) *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611–620.
- ²⁵ Rocheleau, C. E., Downs, W. D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y. H., Ali, M., Priess, J. R., and Mello, C. C. (1997) Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* 90, 707–716.
- ²⁶ Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- ²⁷ Montgomery, M. K., Xu, S., and Fire, A. (1998) RNA as a target of doublestranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15,502–15,507.
- ²⁸ Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279–289.
- ²⁹ Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343–3353.
- ³⁰ Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., and Macino, G. (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15, 3153–3163.
- ³¹ Matzke, M. A. and Matzke, A. (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* 107, 679–685.
- ³² Montgomery, M. K. and Fire, A. (1998) Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.* 14, 255–258.
- ³³ Marcin Nowotny and Wei Yang (2009) Structural and functional modules in RNA interference. *Current Opinion in Structural Biology* 19:286–293

-
- ³⁴ Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T. and Jewell, D. (2003b). microRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current Biology*, 13, 807–818.
- ³⁵ D.M. Dykxhoorn, C.D. Novina and P.A. Sharp. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature reviews* Vol.4:457-467
- ³⁶ Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33 (2000).
- ³⁷ Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877–6888 (2001).
- ³⁸³⁸ Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M. & Gill, S. S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213–221.
- ³⁹ Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366
- ⁴⁰ Hannon J. Gregory. (2002). *Nature* 418, 244-25.
- ⁴¹ J. Macrae, F. Li, K. Zhou, W.Z. Cande, And J.A. Doudn. 2006. Structure of Dicer and Mechanistic Implications for RNAi. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LXXI:73-80.
- ⁴² S. Bouasker, M. J. Simard. (2009) Tracing Argonaute binding. *Nature* Vol.461:743
- ⁴³ Allshire, R. 2002. Molecular biology. RNAi and heterochromatin—a hushed-up affair. *Science* 297:1818–1819.
- ⁴⁴ Reinhart, B. J., and D. P. Bartel. 2002. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297:1831.
- ⁴⁵ Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. L. S. Grewal, and R. A. Martienssen. 2003. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 Lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833–1837.
- ⁴⁶ Dernburg, A. F., and G. H. Karpen. 2002. A chromosome RNAissance. *Cell* 111:159-162
- ⁴⁷ Jackson, J. P., A. M. Lindroth, X. Cao, and S. E. Jacobsen. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416:556–560.
- ⁴⁸ Tamaru, H., and E. U. Selker. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414:277–283.
- ⁴⁹ Jiang, M. and Milner, J. (2002) Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 21, 6041–6048
- ⁵⁰ Shlomai, A. and Shaul, Y. (2003) Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 37, 764–770
- ⁵¹ Kapadia, S. B., Brideau-Andersen, A., and Chisari, F. V. (2003) Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2014–2018

-
- ⁵² Yamamoto, T., Omoto, S., Mizuguchi, M., Mizukami, H., Okuyama, H., Okada, N., Saksena, N. K., Brisibe, E. A., Otake, K., and Fuji, Y. R. (2002) Double-stranded nef RNA interferes with human immunodeficiency virus type 1 replication. *Microbiol. Immunol.* 46, 809–817
- ⁵³ Williams, N. S., Gaynor, R. B., Scoggin, S., Verma, U., Gokaslan, T., Simmang, C., Fleming, J., Tavana, D., Frenkel, E., and Becerra, C. (2003) Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin. Cancer Res.* 9, 931–946
- ⁵⁴ Ngo H, Tschudi C, Gull K, et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14687–92.
- ⁵⁵ Ngo H, Tschudi C, Gull K, et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14687–92.
- ⁵⁶ Shi H, Tschudi C, Ullu E. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 2006;12:2063–72.
- ⁵⁷ Shi H, Ullu E, Tschudi C. Function of the *Trypanosome* Argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the Piwi domain. *J Biol Chem* 2004;279:49889–93.
- ⁵⁸ Shi H, Djikeng A, Tschudi C, et al. Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol* 2004;24:420–7.
- ⁵⁹ Durand-Dubief M, Bastin P. TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol* 2003;1:2
- ⁶⁰ Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania species* that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007;39:839–47.
- ⁶¹ Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 2004;6:509–19.
- ⁶² Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 2006;50:81–99.
- ⁶³ Macrae IJ, Zhou K, Li F, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 2006;311:195–8.
- ⁶⁴ Abed M, Ankri S. Molecular characterization of *Entamoeba histolytica* RNase III and AGO2, two RNA interference hallmark proteins. *Exp Parasitol* 2005;110:265–9.
- ⁶⁵ Al Riyahi A, Al-Anouti F, Al-Rayes M, et al. Single argonaute protein from *Toxoplasma gondii* is involved in the double-stranded RNA induced gene silencing. *Int J Parasitol* 2006;36:1003–14.
- ⁶⁶ Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania species* that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007;39:839–47.
- ⁶⁷ Inoue N, Otsu K, Ferraro DM, et al. Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:309–13

-
- ⁶⁸ Robinson KA, Beverley SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;128:217–28.
- ⁶⁹ DaRochaWD, Otsu K, Teixeira SM, et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2004;133:175–86
- ⁷⁰ Al-Anouti F, Ananvoranich S. Comparative analysis of antisense RNA, double-stranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;12:275–81.
- ⁷¹ Al-Anouti F, Tomavo S, Parmley S, et al. The expression of lactate dehydrogenase is important for the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 2004;279:52300–11
- ⁷² Ananvoranich S, Al Rayes M, Al Riyahi A, et al. RNA silencing of glycolysis pathway in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53(Suppl.1):S162–3.
- ⁷³ McRobert L, McConkey GA. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;119:273–8.
- ⁷⁴ Mohammed A, Dasaradhi PV, Bhatnagar RK, et al. In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*—a mouse malaria model. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:506–11.
- ⁷⁵ Rathjen T, Nicol C, McConkey G, et al. Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host. *FEBS Lett* 2006;580:5185–8
- ⁷⁶ Shi H, Djikeng A, Tschudi C, et al. Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol* 2004;24:420–7.
- ⁷⁷ Janzen CJ, van Deursen F, Shi H, et al. Expression site silencing and lifecycle progression appear normal in Argonaute1-deficient *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2006;149:102–7.
- ⁷⁸ Shi H, Chamond N, Tschudi C, et al. Selection and characterization of RNA interference-deficient trypanosomes impaired in target mRNA degradation. *Eukaryot Cell* 2004;3:1445–53.
- ⁷⁹ El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005;309:409–15.
- ⁸⁰ Wickstead B, Ersfeld K, Gull K. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:360–75.
- ⁸¹ Wang AL, Wang CC. Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 1986;21:269–76.
- ⁸² Wang AL, Wang CC. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7956–60.
- ⁸³ Ullu E, Lujan HD, Tschudi C. Small sense and antisense RNAs derived from a telomeric retroposon family in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* 2005;4:1155–7.

-
- ⁸⁴ Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000;19:5194–201.
- ⁸⁵ Weinberg MS, Villeneuve LM, Ehsani A, et al. The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA* 2006;12:256–62.
- ⁸⁶ Volpe TA, Kidner C, Hall IM, et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002;297:1833–7.
- ⁸⁷ Wanidworanun C, Nagel RL, Shear HL. Antisense oligonucleotides targeting malarial aldolase inhibit the asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;102:91–101.
- ⁸⁸ Barker Jr RH, Metelev V, Rapaport E, et al. Inhibition of *Plasmodium falciparum* malaria using antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:514–8.
- ⁸⁹ Rapaport E, Misiura K, Agrawal S, et al. Antimalarial activities of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8577–80.
- ⁹⁰ Shi H, Tschudi C, Ullu E. Functional replacement of *Trypanosoma brucei* Argonaute by the human slicer Argonaute2. *RNA* 2006;12:943–7.
- ⁹¹ Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:340–9.
- ⁹² Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. Tricia R. Cottrell and Tamara L. Doering. *TRENDS in Microbiology* Vol.11 No.1 January 2003.
- ⁹³ Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S. et al. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315, 207–212.
- ⁹⁴ Dessi D, Delogu G, Emonte E, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P (2005) Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role the protozoon in transmitting bacterial infection. *Infect Immun.* 73:1180–1186
- ⁹⁵ Rappelli P, Addis MF, Carta F, Fiori PL (1998) *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet* 352:1286
- ⁹⁶ Virus in *Trichomonas*—an ultrastructural study Marlene Benchimola, Sandra Pacheco Monteiro, T.-H. Chang, John F. Alderete. *Parasitology International* 51 (2002) 293–298
- ⁹⁷ Diana Ortiz, Patricia J. Johnson. (2003). Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 128 (2003) 43–49
- ⁹⁸ A. Khoshnan, J. F. Alderete, (1993). Multiple double stranded RNA segments are associated with virus particle infecting *Trichomonas vaginalis*. *J Virol* 67, 6950.
- ⁹⁹ O. Voinnet. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206–20