



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

---

CORSO DI DOTTORATO IN MICROBIOLOGIA E GENETICA

CARATTERIZZAZIONE DI UNA FAMIGLIA DI GENI  
CODIFICANTI PROTEINE FORMANTI PORO NEL  
PROTOZOO PATOGENO *TRICHOMONAS VAGINALIS*

*Relatore:*  
Prof.ssa PAOLA RAPPELLI

*Dottorando:*  
NICIA DIAZ

*XXI ciclo*

## INDICE

<b>Riassunto</b> .....	pag.4
<b>Introduzione</b> .....	pag.6
Epidemiologia, manifestazioni cliniche .....	pag.6
Morfologia.....	pag.9
Metabolismo .....	pag.12
Diagnosi .....	pag.14
Patogenicità.....	pag.17
Proteine formanti poro .....	pag.28
<b>Materiali e Metodi</b> .....	pag.35
Identificazione dei geni <i>TvSaplip</i> .....	pag.35
Analisi delle sequenze geniche .....	pag.35
Coltivazione di <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	pag.36
Preparazione delle emazie .....	pag.37
Emolisi da contatto .....	pag.37
Estrazione del DNA.....	pag.38
PCR.....	pag.38
Estrazione RNA.....	pag.40
Retrotrascrizione .....	pag.41
RT-PCR.....	pag.41
Real time PCR multiplex .....	pag.41
Clonaggio di <i>TvSaplip 5</i> e <i>TvSaplip 6</i> .....	pag.45
Produzione delle proteine ricombinanti .....	pag.48
Purificazione delle proteine ricombinanti .....	pag.49
Quantificazione delle proteine purificate .....	pag.50
Produzione di anticorpi policlonali murini .....	pag.50
Immunoblotting .....	pag.51

<b>Risultati</b> .....	pag.52
Identificazione dei geni <i>TvSaplip</i> nel genoma di <i>Trichomonas vaginalis</i>	pag.52
Analisi delle sequenze amminoacidiche TvSaplip	pag.54
Caratterizzazione dei geni <i>TvSaplip</i> .....	pag.56
Produzione delle proteine ricombinanti TvSaplip 5 e TvSaplip 6	pag.63
Localizzazione delle proteina TvSaplip 6 in immunofluorescenza .....	pag.66
<b>Discussione</b> .....	pag.67
<b>Bibliografia</b> .....	pag.76

## RIASSUNTO

*Trichomonas vaginalis* è un protozoo flagellato responsabile della tricomoniasi, una delle malattie a trasmissione sessuale più diffuse al mondo. L'infezione è caratterizzata da un importante effetto citopatico a carico dell'epitelio vaginale (1, 2). Evidenze sperimentali indirette indicano che nel meccanismo di citopatogenicità del protozoo sono coinvolte proteine formanti poro (PFP), suggerendo un'omologia con altri protozoi, quali *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri*, che producono PFP appartenenti alla famiglia delle saposin-like proteins (3, 4). Tuttavia in *T.vaginalis* non è stata finora dimostrata la presenza di geni codificanti per proteine formanti poro.

Scopo del lavoro di dottorato è dimostrare la presenza di geni specifici per PFP anche in *T.vaginalis*, e caratterizzarne gli eventuali prodotti. Il lavoro svolto ha permesso di individuare, mediante analisi del genoma di *T.vaginalis*, la presenza di 12 geni (*TvSaplip1-12*) che mostrano un altissimo grado di similarità con i geni delle saposin-like proteins di *E.histolytica* e di *N.fowleri*.

E' noto che il meccanismo di patogenicità di *T.vaginalis* è fortemente dipendente dall'adesione del protozoo alla cellula bersaglio e da valori di pH intorno a 6.0 (5, 6, 7).

E' stato perciò valutato se tali fattori fossero coinvolti nella modulazione della trascrizione dei geni *TvSaplip 1-12*. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un incremento dei livelli di trascrizione in seguito alla stimolazione per i geni *TvSaplip 5*, *TvSaplip 6*, *TvSaplip 10* e *TvSaplip 12*. In particolare il gene *TvSaplip 12* subisce una modulazione dei livelli di trascrizione in seguito al contatto del protozoo con le

membrane delle cellule bersaglio, mentre i geni *TvSaplip 6* e *TvSaplip 5* mostrano un significativo aumento dei livelli di trascrizione a pH 6.0.

Le proteine TvSaplip5 e TvSaplip6 sono state ottenute in forma ricombinante. Sono risultate essere dei buoni immunogeni, e sono state quindi utilizzate per la produzione di anticorpi specifici monoclonali e policlonali. Gli anticorpi  $\alpha$ -TvSaplip6 hanno permesso di localizzare la proteina in immunofluorescenza su protozoi interi. I dati ottenuti dimostrano che essa è confinata all'interno di granuli intracitoplasmatici. La proteina è stata localizzata anche sulle membrane degli eritrociti dopo contatto con *T.vaginalis*.

L'identificazione e la caratterizzazione dei geni *TvSaplip* nel genoma di *T.vaginalis* e l'osservazione che i geni *TvSaplip 6*, *TvSaplip 5*, *TvSaplip 10* e *TvSaplip 12*, subiscono un incremento dei livelli di trascrizione determinato da fattori che influenzano la patogenicità del protozoo, ha permesso di confermare le evidenze sperimentali indirette sul coinvolgimento di proteine formanti poro nel meccanismo di patogenicità del microrganismo. Si tratta della prima caratterizzazione di geni direttamente coinvolti nella lisi della cellula bersaglio da parte di *T.vaginalis*.

## INTRODUZIONE

*Trichomonas Vaginalis* è un protozoo parassita appartenente alla classe dei flagellati e all'ordine dei Trichomonadida, descritto per la prima volta da Donnè nel 1836 (8).

### **Epidemiologia, manifestazioni cliniche**

*Trichomonas vaginalis* è l'agente eziologico della tricomoniasi, una delle malattie a trasmissione sessuale più diffuse al mondo. Si stima che più di 200 milioni di individui siano affetti dalla malattia, di cui 2 milioni negli Stati Uniti, e annualmente vengono registrati 7-8 milioni di nuovi casi (1, 2). Una elevata incidenza in particolare viene osservata in individui che afferiscono a centri specializzati nel monitoraggio delle malattie a trasmissione sessuale. Negli Stati Uniti la percentuale di infezione è più alta tra le donne di colore che nelle bianche e fattori socio economici e il livello culturale sembrano essere associati all'incidenza della malattia (9).

L'incidenza dell'infezione dipende da numerosi fattori: età, costumi sessuali, numero di partners, altre malattie a trasmissione sessuale concomitanti, fase del ciclo mestruale e tecniche diagnostiche utilizzate (10).

L'uomo è l'unico ospite naturale di *T.vaginalis* e la trasmissione avviene quasi esclusivamente per contatto sessuale, nonostante alcuni studi abbiano avanzato l'ipotesi di una trasmissione non sessuale dell'infezione (11). Essendo spesso associata ad altre malattie a trasmissione sessuale, in particolare la gonorrea, la tricomoniasi può essere utilizzata come marker per comportamenti sessuali ad alto rischio (12, 13).

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. I fattori responsabili di tale variabilità non sono completamente conosciuti, ma comprendono sia differenze di virulenza tra diversi ceppi del protozoo che una diversa suscettibilità individuale dell'ospite infettato (14,15). La percentuale di infezioni asintomatiche varia dal 9 al 56% dei casi in relazione ai gruppi di popolazione presi in esame (16). È noto che circa un terzo delle infezioni asintomatiche diventano sintomatiche entro 6 mesi se non trattate. Sulla base di infezioni sperimentali e di limitate osservazioni cliniche, si ritiene che il periodo di incubazione vari dai 3 ai 28 giorni (17).

L'infezione sintomatica è caratterizzata nel 50-75% dei casi dalla presenza di secrezioni vaginali anomale che possono essere maleodoranti, abbondanti, schiumose e giallo-verdastre e da irritazione vulvovaginale. Tuttavia nessuna di queste manifestazioni cliniche è sufficientemente specifica da consentire una diagnosi precisa (1, 2). Esiste una notevole sovrapposizione tra il quadro clinico dell'infezione da *T.vaginalis* e quello da *Candida spp.* o da *Gardnerella vaginalis*, per cui è sempre necessaria una diagnosi di laboratorio per la conferma del sospetto clinico.

Tra le manifestazioni cliniche sono state riportate dispareunia, disuria e dolori addominali rispettivamente nel 10-50%, nel 30-50% e nel 5-12% dei casi. 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 così detta cervice a fragola che, pur essendo descritta come segno tipico dell'infezione da *T.vaginalis*, è osservata solo in circa il 2% dei casi (18).

E' stata inoltre osservata una variabilità della sintomatologia nelle diverse fasi del ciclo mestruale. Infatti, l'infezione diventa spesso latente durante le fasi follicolare ed ovulatoria del ciclo, mentre si ha generalmente un'esacerbarsi dei sintomi durante la fase mestruale. Ciò probabilmente è legato alle variazioni del pH e del quadro ormonale che si verificano durante le diverse fasi del ciclo, alle quali il protozoo potrebbe essere suscettibile. Infatti durante la fase follicolare ed ovulatoria l'ambiente vaginale diviene ostile per il protozoo che si sposta temporaneamente nel canale endocervicale in cui trova un ambiente a lui più favorevole, determinando così una apparente remissione dell'infezione. Un'altra possibile spiegazione dell'esacerbarsi dei sintomi nella fase mestruale potrebbe essere l'ampia disponibilità di ferro durante questa fase del ciclo, che causa un aumento del metabolismo del protozoo ed induce l'espressione di alcuni importanti fattori di patogenicità (19).

Alcuni studi hanno riportato un aumento delle infezioni sintomatiche durante la gravidanza, che potrebbe essere correlato con gli stessi fattori riportati per le variazioni durante il ciclo mestruale; il diverso quadro ormonale che si ha in questa condizione potrebbe infatti rendere l'ambiente vaginale più favorevole all'infezione (17).

In corso di gravidanza le complicanze più comuni dell'infezione da *T.vaginalis* consistono in parto prematuro, rottura precoce delle membrane e basso peso del bambino alla nascita. E' stato inoltre osservato che un bambino nato da una madre infetta può occasionalmente presentare un'infezione urinaria o vaginale da *T.vaginalis* (20-22). L'infezione è inoltre correlata con una maggiore suscettibilità all'insorgenza di tumori della cervice uterina (23).

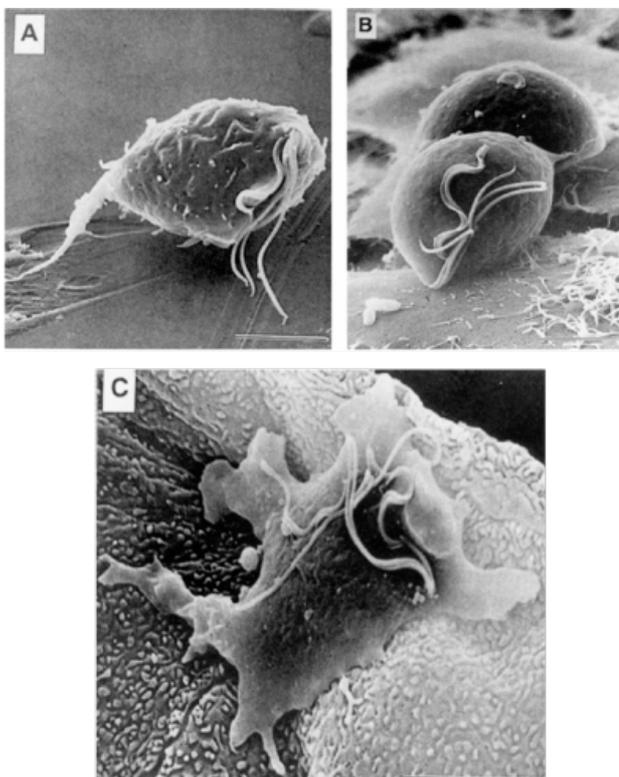
E' stato recentemente dimostrato che la tricomoniasi è associata ad un'aumentata suscettibilità all'infezione da HIV. Questa è legata sia all'aumento del numero di virus

HIV nelle secrezioni genitali quando siano in corso altre infezioni sessualmente trasmesse, sia all'incremento della suscettibilità all'infezione virale associato alle microulcerazioni che si accompagnano all'infezione da parte del protozoo (24, 25).

Nel maschio l'infezione è quasi sempre asintomatica, e si risolve spontaneamente nell'arco di tre settimane, a meno che non intervengano fattori di reinocolo o che il protozoo non infetti anche le vie genitali più alte quali prostata o vescicole seminali. La sintomatologia, se presente, si manifesta con uretriti e prostatiti, e le complicanze più comunemente riportate consistono in un alterata motilità degli spermatozoi e sterilità (26, 27). Recentemente è stata osservata una correlazione tra l'infezione da parte di *T.vaginalis* e l'insorgenza di tumori alla prostata (28).

## Morfologia

*Trichomonas vaginalis* non forma cisti e il suo ciclo cellulare presenta il solo stadio di



trofozoite. In terreni liquidi si presenta generalmente nelle forme più tipiche ovoidali, ellissoidali o sferiche (fig. 1 A, B), mentre in presenza di agar o di monostrati cellulari assume spesso morfologia ameboide (Fig. 1 C).

Morfologie particolari si osservano talvolta nelle secrezioni vaginali e nelle urine. Anche le diverse

Fig.1. Bars = 5  $\mu$ m

condizioni fisico-chimiche, come la tensione di ossigeno, il pH, la temperatura possono determinare alterazioni della morfologia. Se l'ambiente diviene sfavorevole, ad esempio, *Trichomonas vaginalis* può assumere aspetto sferoidale, con internalizzazione dei flagelli, senza però che si formi alcuna parete. Sono state inoltre osservate forme giganti, spesso polinucleate con numerosissimi flagelli sulla superficie (29).

Le dimensioni del protozoo variano sensibilmente, da 7 a 23  $\mu\text{m}$  di lunghezza e da 5 a 15  $\mu\text{m}$  di larghezza (30).

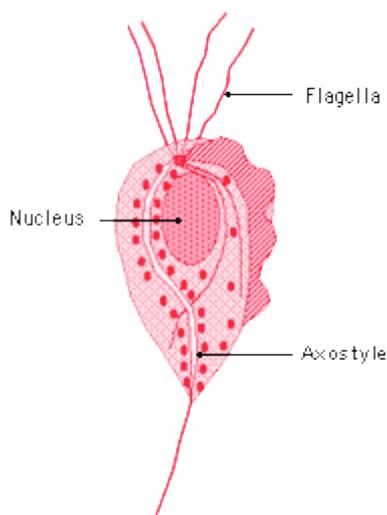
*Trichomonas vaginalis* ha quattro flagelli anteriori, lunghi circa 12  $\mu\text{m}$ . Un quinto flagello origina dorsalmente in prossimità degli altri quattro e viene incorporato sul margine libero di una membrana ondulante che si estende per circa due terzi della lunghezza del protozoo. L'assostile è una struttura che corre lungo l'asse antero-posteriore dell'organismo, il cui segmento terminale sporge oltre l'estremità posteriore del protozoo di circa un terzo, contribuendo a determinarne la peculiare morfologia.

Il trofozoite presenta un unico nucleo, al cui interno sono presenti 6 cromosomi (31), disposto anteriormente, di forma tipicamente allungata con la superficie ventrale a contatto con l'assostile. La divisione cellulare è di tipo criptopleuromitotico, con la formazione cioè di un fuso extranucleare durante la mitosi, senza scomparsa della membrana nucleare (32).

Recentemente è stato sequenziato il genoma di *T.vaginalis*, che ha la sorprendente dimensione di circa 160 milioni di basi. Il 65% di tale genoma è costituito da sequenze ripetute.

Sono stati identificati 60.000 geni putativi ed è stata osservata la presenza di introni soltanto in 65 geni. Sono state identificate regioni codificanti per gli RNA transfer dei 20 aminoacidi prodotti dal protozoo e 250 regioni codificanti per gli RNA ribosomiali (33). L'osservazione in microscopia elettronica (34) ha evidenziato la presenza del complesso del Golgi, detto apparato parabasale, e di numerosi ribosomi sia liberi che associati alle membrane del reticolo endoplasmatico. Sono inoltre presenti lisosomi che conferiscono al protozoo attività idrolasica.

Nel citoplasma di *T.vaginalis* sono assenti i mitocondri ma si evidenziano numerosi altri organelli caratteristici, gli idrogenosomi, che hanno un diametro circa 0,5  $\mu\text{m}$  e costituiscono circa il 6% del volume cellulare (35-38).



Gli idrogenosomi per alcuni aspetti sono simili ai mitocondri: sono rivestiti da due membrane addossate l'una all'altra e contengono una matrice granulare ed un core elettrondenso. Inoltre le proteine citoplasmatiche che devono essere veicolate verso tale organulo possiedono un peptide segnale amminoterminale, che viene eliminato subito dopo l'ingresso nell'organulo, come avviene nei mitocondri.

A differenza dei mitocondri, tuttavia, gli idrogenosomi mancano di DNA e di citocromi. Il nome idrogenosoma deriva dalla loro capacità di produrre idrogeno molecolare come prodotto metabolico finale (39). Le reazioni biochimiche che avvengono in questi organuli rappresentano parte integrante del metabolismo energetico di *Trichomonas vaginalis* (40).

Sull'origine degli idrogenosomi sono state fatte varie ipotesi: che essi derivino da mitocondri modificati o degenerati, o che abbiano avuto origine comune ai mitocondri da un organello ancestrale e che si siano separati successivamente. A supportare la seconda ipotesi è la conoscenza del fatto che, nella filogenesi, *Trichomonas vaginalis* si sia staccato precocemente dal ramo degli eucarioti, ed esattamente prima della comparsa in essi dei mitocondri (41). Una terza ipotesi propone che gli idrogenosomi abbiano avuto origine dalla simbiosi tra un batterio anaerobio e una cellula eucariotica primitiva, e le similitudini tra il metabolismo energetico degli idrogenosomi e dei batteri anaerobi supportano tale ipotesi (35, 42).

Recentemente è stato dimostrato che *T.vaginalis* può instaurare una relazione simbiotica con il batterio *Mycoplasma hominis*. Il batterio può avere sia localizzazione extracellulare che intracellulare: ciò dipende da caratteristiche intrinseche del ceppo isolato (43-45). Tale relazione rappresenta la prima, e fin ora, unica simbiosi finora descritta tra due patogeni veri, in grado di infettare un ospite immunocompetente, causando patologie indipendenti a carico degli stessi organi.

### **Metabolismo**

*Trichomonas vaginalis* è un eucariote primitivo, per molti aspetti simile ad altre cellule superiori, da cui si differenzia però per quanto riguarda il metabolismo energetico e alcune esigenze nutrizionali che lo avvicinano ad alcuni batteri anaerobi primitivi (46, 47). Nel protozoo sono infatti assenti alcune vie metaboliche fondamentali, rendendo quindi necessari come nutrienti numerosi metaboliti preformati.

La tabella evidenzia che circa il 50% del peso secco di *Trichomonas vaginalis* è costituito da proteine. Elettroforesi bidimensionali di estratti proteici hanno permesso di distinguere più di 200 proteine del protozoo, delle quali circa trenta localizzate sulla superficie cellulare (48).

*T.vaginalis* può essere definito ossigeno-tollerante, essendo in grado di sopravvivere a diverse pO<sub>2</sub>. Il protozoo cresce meglio in condizioni anaerobiche, che *in vitro* sono generate sia dalla presenza di agenti riducenti nel mezzo di coltura, che al suo metabolismo respiratorio che tende a consumare rapidamente l'ossigeno presente.

<b>Peso secco</b>	100-130µg
<b>Proteine</b>	60 µg
<b>DNA</b>	300 µg
<b>RNA</b>	20 µg
<b>Glicogeno</b>	17 µg
<b>Lipidi</b>	10 µg

La principale fonte di energia di *T.vaginalis* è rappresentata dai carboidrati fra cui il glucosio, maltosio e galattosio; saccarosio e mannosio non sono invece metabolizzati dal protozoo (49). La più importante fonte endogena di energia è rappresentata dal glicogeno, che costituisce il 20% del peso a secco dell'organismo. Nonostante tali scorte energetiche il metabolismo di *T.vaginalis* è fortemente influenzato dalla disponibilità di carboidrati nel mezzo (50-52).

Il metabolismo dei carboidrati è di tipo fermentativo sia in condizioni aerobiche che anaerobiche ed il glucosio viene completamente ossidato. I cataboliti prodotti comprendono acetato, malato, lattato, glicerolo e CO<sub>2</sub>. In condizioni anaerobiche viene prodotto anche idrogeno molecolare (49, 50, 53, 54).

Il metabolismo dei carboidrati si attua tra due compartimenti: il citosol e l'idrogenosoma. Nel citoplasma il glucosio è convertito in fosfoenolpiruvato attraverso

la classica via Embden-Meyerhoff-Parnas, che viene poi traslocato nell'idrogenosoma dove avviene l'ossidazione fermentativa con produzione di ATP e H<sub>2</sub> (47, 54, 55).

*T.vaginalis* non è in grado di sintetizzare de novo acidi grassi e steroli, in quanto manca degli enzimi necessari. Infatti idrolizza i gruppi acilici da fosfolipidi, colesterolo e trigliceridi per sintetizzare i lipidi ad esso necessari (56).

I carboidrati sono la fonte energetica d'elezione per *T.vaginalis*, ma in assenza di questi è in grado di sostentarsi metabolizzando anche amminoacidi quali arginina, treonina e leucina. Alanina e glicina rappresentano prodotti secondari del metabolismo del glucosio nel protozoo (57-59).

*T.vaginalis* manca della capacità di sintetizzare purine e pirimidine, per cui è indispensabile che esse siano presenti nel mezzo di crescita (60, 61). Sono stati individuati due differenti carriers nucleotidici, uno per il trasporto di pirimidine e adenosina e l'altro per il trasporto di uridina e guanosina (62).

L'incapacità di sintetizzare molecole indispensabili per la sopravvivenza fanno di *T.vaginalis* un parassita obbligato che reperisce i nutrimenti dalle secrezioni vaginali o fagocitando le cellule dell'ospite o batteri. Il terreno utilizzato per le colture di *T.vaginalis* è il Diamond's TYM (trypticase-yeast extract-maltose) ricco di triptone, estratto di lievito, ferro a cui si aggiunge siero fetale bovino e vitamina A (63-65).

## **Diagnosi**

La metodica più diffusa per la diagnosi di tricomoniasi è l'osservazione microscopica di un vetrino a fresco allestito da fluidi vaginali (66, 67). Questa metodica già descritta da Donnè nel 1836, permette di evidenziare l'infezione solo nel 60-70% dei casi effettivamente positivi (68). E' infatti molto importante l'interpretazione data

dall'operatore che deve possedere una notevole esperienza nel riconoscere il protozoo anche quando presenta morfologie inconsuete o ha perso la caratteristica motilità.

All'esame microscopico a fresco si dovrebbe affiancare sempre l'esame colturale, considerato il gold standard per la diagnosi di tricomoniasi, essendo la tecnica più affidabile e sensibile (85% dei positivi). Sono stati descritti diversi terreni per l'isolamento di *T.vaginalis* (69-71), ma tale esame richiede fino a 7 giorni perché sia osservata crescita, che comunque è sempre dipendente dalla vitalità e dal numero dei protozoi presenti nel campione al momento dell'inoculo. Perché possa essere fatta una diagnosi corretta mediante esame colturale è di fondamentale importanza che il trasporto del campione avvenga in modo rapido ed adeguato immediatamente dopo il prelievo. Per questi motivi non tutti i laboratori utilizzano la coltivazione per la diagnosi di *T.vaginalis*.

*T.vaginalis* può essere osservato anche negli strisci ginecologici colorati con Papanicolau (72, 73). L'accuratezza di questo metodo è stata confrontata da Krieger et al. (67) con le tecniche diagnostiche più comuni ed è risultata piuttosto bassa, soprattutto a causa dei numerosi falsi positivi osservati.

Negli anni più recenti sono state proposte diverse tecniche immunologiche per una più sensibile e rapida diagnosi di tricomoniasi quali ELISA (74, 75), agglutinazione con sfere di lattice adsorbite con anticorpi policlonali anti-*T.vaginalis* (76) e immunofluorescenza (77, 78), ma nessuna di esse è finora entrata nella routine di laboratorio. L'infezione da *T.vaginalis* determina una risposta immune sia umorale (79) che cellulo-mediata (80) da parte dell'organismo infettato. Immunoglobuline specifiche sono osservabili sia nel siero che nelle secrezioni (81-83), per cui tecniche immunologiche per la ricerca di anticorpi specifici potrebbero costituire un valido

strumento diagnostico. Tuttavia a causa dell'elevata variabilità antigenica mostrata dal protozoo (84), non solo tra diversi isolati clinici (85) ma anche nell'ambito dello stesso ceppo (86-88), non è stato possibile finora applicare tali metodiche alla diagnosi di laboratorio.

Sono state messe a punto metodiche molecolari per l'evidenziazione del DNA del protozoo nei fluidi vaginali. Riley et al. (89) tra i primi hanno proposto una reazione di amplificazione genica PCR per la diagnosi di tricomoniasi che prevede l'utilizzo dei primers TVA5 e TVA6 specifici per una sequenza genomica di 102 bp chiamata A6p. Essi hanno incontrato tuttavia non poche difficoltà nell'individuare un segmento di DNA che potesse costituire un bersaglio adeguato per questo tipo di diagnosi molecolare: *T.vaginalis* infatti presenta una notevole variabilità genotipica, oltre che fenotipica, tra i diversi isolati clinici. Successivamente è stata proposta un'altra reazione da Rappelli e coll. (90) che utilizza come bersaglio molecolare il gene codificante per una adesina di *T.vaginalis*: la p65.

Sono stati inoltre descritti primers specifici per il gene della  $\beta$ -tubulina di *T.vaginalis* TUB1 e TUB2 che permettono l'amplificazione specifica di un frammento di DNA di 112 bp. La sensibilità di tali primers, testati su campioni clinici quali tamponi vaginali, ha valori compresi tra 85 e 100%. Naruyasu e coll. (91) hanno recentemente descritto un sistema che permette di identificare simultaneamente sedici microrganismi responsabili di infezioni a carico dell'apparato urogenitale. Tale sistema permette anche di evidenziare l'esistenza di correlazioni tra le diverse infezioni. In particolare per l'identificazione di *T.vaginalis* essi hanno utilizzato una reazione di PCR che ha come bersaglio molecolare una porzione di circa 312 paia di basi del gene codificante per l'RNA ribosomiale 18S.

La PCR, tuttavia, non è entrata nella routine della diagnosi di tricomoniasi nelle donne (92, 93). Infatti la diagnosi viene, nella maggior parte dei casi, eseguita mediante esame microscopico e più raramente esame colturale, che sono certamente più alla portata della maggior parte dei laboratori rispetto all'analisi biomolecolare.

La PCR sembra invece essere il sistema diagnostico più efficace e promettente nella diagnosi di tricomoniasi nell'uomo. Infatti i metodi diagnostici tradizionali sono più difficoltosi, ad esempio l'esame colturale prevede la raccolta sia di tamponi uretrali che del sedimento delle urine per ottenere un maggior numero di protozoi nel campione (94). Schwebke e coll. (95) hanno dimostrato che la sensibilità della PCR nei campioni di urine è del 100% mentre sui campioni derivanti da tamponi uretrali è del 80%.

Recentemente Caliendo e coll. (96) hanno descritto una reazione di Real Time PCR che utilizza come bersaglio molecolare una regione di 67 paia di basi di una sequenza ripetuta del genoma di *T.vaginalis* (Gene Bank Acces.num. L23861). Confrontando la sensibilità di tale sistema con i metodi diagnostici tradizionali, essi hanno dimostrato che la Real Time PCR ha una sensibilità notevolmente superiore rispetto all'esame colturale, permettendo di rilevare il 40% in più dei campioni positivi.

### **Patogenicità**

*T.vaginalis*, pur essendo l'agente eziologico di una delle più diffuse malattie a trasmissione sessuale, è uno dei protozoi meno studiati per quanto riguarda i meccanismi di patogenicità e le caratteristiche di virulenza.

L'infezione da *T.vaginalis* comporta un danno dell'epitelio vaginale e un'importante produzione di secreto. In che modo il protozoo determini questi mutamenti patologici è oggetto di dibattito sin dagli anni '40 (97, 98). Houge (99) per prima ha descritto l'effetto

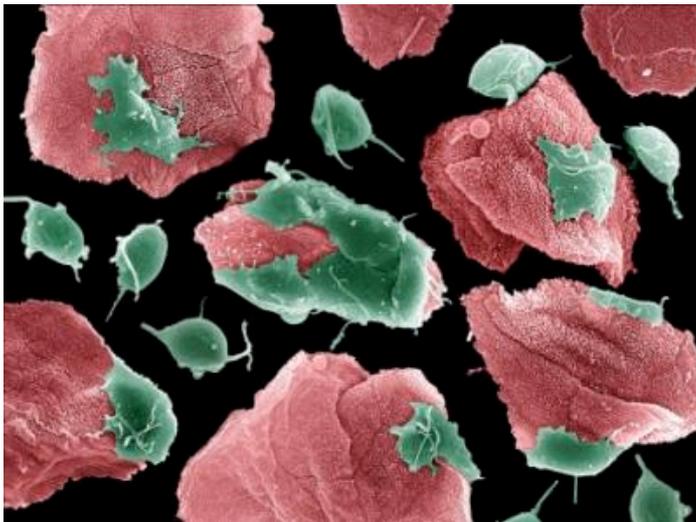
di *T.vaginalis* sulle colture cellulari. L'esposizione di cellule di diversa origine a protozoi vivi comportava una loro "retrazione", osservabile anche quando le cellule erano messe a contatto con supernatanti filtrati del protozoo. Queste prime osservazioni suggerivano che *T.vaginalis* danneggiasse le cellule mediante tossine secrete. Kotcher e Hoogasian (100) hanno studiato l'effetto dei protozoi vivi su espianti primari da embrioni di pollo e cellule di derivazione umana. Essi non sono stati in grado di riprodurre gli stessi effetti usando filtrati del protozoo, ed hanno perciò concluso che il danno alle cellule bersaglio avviene per "via meccanica", cioè dovuto all'azione meccanica dei flagelli del protozoo. Christian et al. (101) e Kulda (102, 103) sono giunti a conclusioni simili usando diverse cellule bersaglio.

Honigberg e Ewalt (104) hanno suggerito che *T.vaginalis* danneggi le cellule dell'ospite sia mediante contatto diretto che attraverso la produzione di fattori secreti. Immagini di microscopia elettronica hanno evidenziato il passaggio di *T.vaginalis* dalla morfologia sferica a quella ameboide nel contatto con le cellule epiteliali, associato alla formazione di pseudopodi (105, 106). Queste osservazioni sono state interpretate come un'attiva fagocitosi delle cellule epiteliali da parte del protozoo (105, 107). Heath ha osservato la distruzione del monostrato cellulare dopo contatto con aggregati di protozoi, suggerendo che "il contatto tra protozoi e cellule bersaglio è un fattore importante nella patogenesi" (108). Questa conclusione è stata supportata dai lavori di Alderete (109, 110) che, studiando l'effetto di *T.vaginalis* su diverse linee cellulari, ha osservato l'assenza di lisi utilizzando protozoi fissati o supernatanti di colture filtrati. Le osservazioni sperimentali tuttavia non andavano generalmente oltre la constatazione di un danno a carico dei vari monostrati cellulari utilizzati.

Sono stati più recentemente descritti i principali meccanismi coinvolti nell'effetto citopatico: l'adesione cellula-cellula (111-115) e l'interazione con i componenti della matrice extracellulare (116); la lisi della cellula bersaglio (117-119) e la fagocitosi di questa e di batteri costituenti la flora vaginale (120); infine la secrezione di fattori solubili. Tra essi sono descritti proteasi extracellulari (121-123) e un prodotto di secrezione cellulare, chiamato cell-detaching factor (CDF), che determina in vitro il distacco di cellule da un monostrato e quindi la possibile disgregazione di un epitelio in vivo (124).

L'adesione di *T.vaginalis* alle cellule bersaglio è un passaggio critico nella patogenesi del parassita, indispensabile perché si verifichi la lisi della cellula bersaglio (125, 126).

La trasformazione del protozoo in senso ameboide determina la formazione di aree in



cui il protozoo si trova a stretto contatto con la cellula bersaglio isolate dall'ambiente esterno, nelle quali è possibile ottenere condizioni ottimali per l'attività dei diversi effettori di patogenicità (127).

L'osservazione dell'interazione tra *T.vaginalis* e cellule dell'epitelio vaginale umano (HVEC), ha permesso di evidenziare che nelle zone di contatto tra le due cellule le membrane sembrano fondersi. Il parassita non penetra attraverso gli epiteli, ma aderisce alle cellule epiteliali formando delle interdigitazioni, ed è perciò considerato non invasivo. E' stato osservato che già dopo cinque minuti di contatto *T.vaginalis* aderisce alle cellule, assumendo una

morfologia ameboide. Dopo due ore di interazione con i protozoi, le HVECs mostrano una mortalità del 90% mentre i protozoi sono tutti vitali (128). La modificazione della morfologia del protozoo, durante l'adesione al target cellulare, è una conseguenza del riarrangiamento del citoscheletro, associato ad una redistribuzione della  $\alpha$ -actinina, normalmente distribuita omogeneamente nel citosol, che viene concentrata nella periferia della cellula (126).

La superficie cellulare di *T.vaginalis* è un mosaico di molecole proteiche che giocano un ruolo fondamentale nell'adesione alle cellule ospiti e alla matrice extracellulare, nell'interazione ospite-parassita, nell'acquisizione di nutrimenti da parte del protozoo (129).

Alderete et al. (130) hanno dimostrato l'esistenza di due classi di molecole direttamente coinvolte nell'adesione del protozoo alle HVECs: le adesine e le cistein proteasi. Alderete descrive quattro proteine coinvolte nell'adesione del protozoo alla cellula ospite: AP65, AP51, AP33, AP120 (113, 131), la cui espressione genica sembra essere regolata a livello trascrizionale dalla disponibilità di ferro (112, 132), e dalla presenza di cistein-proteasi (130, 133). Il contatto iniziale con la cellula ospite determina una modificazione conformazionale del protozoo in senso ameboide, con produzione di pseudopodi seguita da un aumento della sintesi delle adesine (134). Tuttavia i dati presenti in letteratura riguardanti tali proteine sono controversi. Infatti le quattro proteine adesive sono state individuate anche negli idrogenosomi, dove sono coinvolte in attività metaboliche. L'AP65 corrisponde all'enzima malico, l'AP51 costituisce la subunità beta dell'enzima Succinil-CoA Sintetasi, mentre l'AP33 costituisce la subunità alfa di tale enzima, infine l'AP120 corrisponde all'enzima Piruvato-ferridossina ossidoriduttasi (135, 136). Alcuni autori descrivono la presenza di

tali proteine esclusivamente a livello idrogenosomale, mentre altri affermano una doppia localizzazione, sia negli idrogenosomi che nella membrana plasmatica del protozoo (137, 138).

E' invece certa la presenza sulla superficie cellulare di *T.vaginalis* di una glicoproteina altamente immunogenica chiamata P270. Tale proteina, caratterizzata da una organizzazione strutturale tipica delle proteine transmembrana eucariotiche, probabilmente è coinvolta nel legame con molecole esterne (116).

*T.vaginalis* possiede inoltre sulla membrana plasmatica recettori proteici per una proteina della matrice extracellulare, la fibronectina (139). Non è chiaro però se tali recettori siano coinvolti in meccanismi di adesione, di acquisizione di nutrimenti o in entrambi i processi (140). Honigberg et al. (141) hanno caratterizzato dei lectin-binding carbohydrates sulla superficie di *T.vaginalis*, successivamente Cappuccinelli et al. (142) hanno descritto il loro ruolo nell'adesione a superfici di vetro. La presenza di carboidrati sulla membrana plasmatica sembra essere correlata con la virulenza ed in particolare con la lisi degli eritrociti (143), con la fagocitosi delle cellule bersaglio (144) e con la suscettibilità ai farmaci (145).

Nel genoma di *T.vaginalis* è stata recentemente identificata una famiglia di 656 geni che codificano per proteine caratterizzate dalla presenza di un caratteristico *leucine-rich repeat* (129). E' noto che sia i *leucine-rich repeat* che i *proline-rich repeat* mediano interazioni di tipo proteina-proteina e sono presenti in proteine di membrana con funzione di adesine (146, 147).

Tali proteine sono state chiamate BspA-like proteins sulla base della similarità con il gene della BspA protein di *Tannerella forsythensis* (148) batterio patogeno della mucosa orale umana. BspA è una proteina di superficie capace di legare la

fibronectina e il fibrinogeno e gioca un'importante ruolo nella colonizzazione della cavità orale da parte di *T. forsythensis*.

Dei 656 geni individuati nel genoma di *T.vaginalis*, 178 codificano per proteine caratterizzate dalla presenza di un dominio transmembrana. Tra questi è stato studiato in particolare il gene codificante per una proteina di superficie di 625 amminoacidi (TvBspA-like-625), caratterizzata dalla presenza di 12 *leucine rich repeats* ed un *proline rich repeat* (149). TvBspA-like-625 è stata localizzata, attraverso tecniche di microscopia confocale, sulla membrana plasmatica del protozoo.

E' noto che l'interazione di *T.vaginalis* con le proteine dell'ospite quali fibronectina e fibrinogeno determina modificazioni all'interno della cellula che coinvolgono le proteine del citoscheletro actina ed  $\alpha$ -actinina, con conseguenti modificazioni della morfologia del protozoo (150, 151). Sulla base delle caratteristiche di sequenza, è possibile che TvBspA-like-625 sia coinvolta in alcune di queste risposte.

Esperimenti di adesione in vitro hanno permesso di evidenziare che le cellule epiteliali durante l'infezione da *Trichomonas vaginalis* perdono la morfologia tipica diventando tondeggianti, con conseguente disgregazione del monostrato cellulare. Quando il protozoo entra in contatto con una cellula target produce enzimi proteolitici, tra cui le spectrinasi, che degradano la spectrina, un componente del citoscheletro della cellula bersaglio, determinando la perdita della caratteristica morfologia cellulare (152). Non è noto il preciso meccanismo attraverso il quale la spectrinasi penetra nella cellula bersaglio, ma si ipotizza che essa venga rilasciata in vescicole che poi si fondono con la membrana del bersaglio, o che sia direttamente iniettata nella cellula bersaglio. In ogni caso il contatto tra le due cellule è indispensabile per tale processo (126).

La capacità di aderire *in vitro* tuttavia non sembra essere direttamente correlata con la virulenza: ceppi virulenti isolati da pazienti sintomatici mostrano differenze nella loro abilità di aderire alle cellule dell'ospite (153).

E' stato inoltre dimostrato un meccanismo patogenetico contatto-indipendente, e Hogue è stato il primo a riportare che nella patogenesi di *T.vaginalis* sono coinvolti anche meccanismi contatto-indipendenti (154). North (155,156) ha caratterizzato e purificato numerose proteinasi di *T.vaginalis*. Le più rappresentate sono le cistein-proteasi, di cui ne sono state identificate 23 in elettroforesi bidimensionale (157, 158). Esse sono coinvolte in diversi aspetti della patogenicità del protozoo (159), quali l'effetto citotossico, la lisi degli eritrociti (117), nell'adesione alle cellule epiteliali (160) e nell'evasione delle difese immunitarie (161).

Tra i prodotti di secrezione di *T.vaginalis* è stato descritto il *cell detaching factor* (CDF), che determina *in vitro* il distacco di cellule da un monostrato e quindi la possibile disgregazione di un epitelio *in vivo*. CDF è una glicoproteina di 200 kDa (124), immunogena, la cui attività è influenzata dal pH, con un optimum a pH 6,5 che è quello presente in vagina quando l'infezione è in atto. I livelli di CDF sono correlati con la severità della sintomatologia clinica, infatti l'aumento della produzione di CDF determina un esacerbarsi dei sintomi (124). La produzione di CDF sembra inoltre essere influenzata dalla concentrazione di estrogeni in vagina. E' stato infatti osservato che *in vitro* la produzione di CDF decresce in presenza di  $\beta$ -estradiolo.

Il rilascio di CDF e proteasi da parte di *T.vaginalis*, *in vivo*, determina la degradazione di proteine dell'ospite, quali laminina, vitronectina ed altri componenti della matrice extracellulare, causando il distacco delle cellule dai tessuti epiteliali (162-164).

Per meglio comprendere il meccanismo di patogenicità del protozoo, negli anni passati è stato allestito un modello sperimentale, basato sull'interazione *in vitro* tra *T.vaginalis* ed eritrociti umani. E' noto infatti che *T.vaginalis* è in grado di emolizzare i globuli rossi di differenti specie, dai quali acquisisce lipidi e ferro che non riesce a sintetizzare autonomamente e che gli sono indispensabili per sopravvivere (119). La lisi degli eritrociti sembra essere mediata da interazioni specifiche ligando-recettore tra protozoo e globulo rosso. Inoltre i globuli rossi rappresentano un bersaglio fisiologico dell'azione di *T.vaginalis* durante l'infezione.

L'utilizzo di eritrociti come cellule bersaglio per lo studio dell'attività citolitica del protozoo presenta alcuni importanti vantaggi rispetto all'utilizzo di cellule epiteliali. Innanzitutto gli eritrociti sono più semplici, e quindi costituiscono un modello più facilmente studiabile. Inoltre sono sino a 100 volte più sensibili all'azione di alcune citolisine (165) ad esempio alle perforine dei linfociti T. Infine la lisi delle emazie può essere quantificata molto semplicemente, misurando spettrofotometricamente l'emoglobina rilasciata nel supernatante. Lo studio *in vitro* dell'interazione di *T.vaginalis* con i globuli rossi ha permesso di definire alcune importanti caratteristiche del meccanismo citolitico del protozoo.

Esperimenti di emolisi condotti separando i protozoi dai globuli rossi attraverso una membrana semipermeabile, o incubando preventivamente i protozoi con un siero di coniglio anti-*T.vaginalis* hanno permesso innanzitutto di confermare la contatto dipendenza del fenomeno (5, 7). L'agglutinazione dei globuli rossi da parte di *T.vaginalis* avviene dopo 2-3 minuti dal contatto. In altri esperimenti i protozoi o i globuli rossi venivano preventivamente trattati con enzimi proteolitici, quali la tripsina,

tale trattamento inibiva l'emolisi evidenziando il coinvolgimento di recettori proteici presenti su entrambe le membrane nel meccanismo di adesione (7).

La capacità di *T.vaginalis* di lisare i globuli rossi con cui viene a contatto dipende dalla temperatura. Infatti, il fenomeno è fortemente inibito a 20°C e a 4°C, mentre ha un optimum a 37°C. Un'altra importante caratteristica dell'attività citolitica di *T.vaginalis* è la calcio-dipendenza del fenomeno. Infatti in esperimenti condotti in presenza di EDTA, un chelante del calcio, è stato dimostrato che concentrazioni 4 mM di EDTA inibiscono completamente l'emolisi, mentre concentrazioni inferiori riducono l'attività emolitica. La capacità di danneggiare le membrane delle cellule bersaglio non è invece alterata quando al campione viene addizionata insieme all'EDTA una quantità equimolecolare di CaCl<sub>2</sub>, a dimostrazione che l'effetto inibitorio è dovuto alla capacità di chelare ioni Ca<sup>++</sup> dell'EDTA e non ad un effetto tossico diretto della molecola (7).

Un altro importante fattore che influenza l'effetto citopatico di *T.vaginalis* è il pH. In vivo l'infezione da *T.vaginalis* determina un innalzamento del pH vaginale che è stato messo in relazione con un'intensa fagocitosi da parte del protozoo dei lattobacilli presenti, che sono tra i maggiori responsabili dell'ambiente acido della vagina. Infatti il pH vaginale, che in condizioni normali presenta valori intorno a 4.5, aumenta nel 66-91% dei casi portandosi a valori intorno a 5.0-6.0 (15). Negli anni passati Garber e Bowie (166) hanno suggerito che bassi valori di pH possano costituire fattori importanti per la lisi contatto-dipendente delle cellule epiteliali da parte del protozoo. Pindak (167) invece ha suggerito l'esistenza di una citotossicità indipendente dal contatto tra *T.vaginalis* e cellule bersaglio, che l'autore ha imputato direttamente all'acidità dei prodotti secreti dal protozoo.

Fiori et al. (7) hanno dimostrato l'esistenza di un'emolisi contatto-indipendente. Infatti in esperimenti nei quali veniva valutata l'attività emolitica di supernatanti di *Trichomonas vaginalis*, ottenuti incubando i protozoi in tamponi a diversi valori di pH, si osservava lisi delle emazie solo quando il pH aveva valori inferiori a 6.5 . Questi risultati danno una spiegazione del fatto che la lisi delle cellule bersaglio apparisse contatto-dipendente negli esperimenti tradizionali. Infatti questi venivano condotti a valori di pH, intorno alla neutralità, non permissivi per l'emolisi contatto-indipendente. Il pH acido agisce sia inducendo la secrezione di un fattore emolitico, sia condizionandone la funzionalità.

Il pH acido è da considerarsi pertanto un fattore regolatore dell'emolisi e non, come invece suggeriva Pindak (167), il diretto responsabile della lisi delle emazie. Infatti globuli rossi di controllo, incubati in tamponi con valori di pH corrispondenti a quelli dei supernatanti emolitici, non lisavano affatto.

L'insieme delle caratteristiche dell'emolisi hanno portato ad ipotizzare un meccanismo citopatico mediato da proteine del tipo delle perforine, anche dette proteine formanti poro (168). Esse sono proteine caratterizzate dalla capacità di inserirsi nella membrana delle cellule bersaglio e di formare in essa un poro funzionale permeabile a piccoli ioni (169). Il meccanismo di azione di una proteina formante pori può essere così riassunto: quando una proteina formante poro viene inserita nella membrana bersaglio determina la formazione di un canale che rende la membrana semipermeabile, consentendo il libero passaggio di piccoli ioni attraverso essa. Gli ioni si muovono così liberamente secondo il proprio gradiente elettrochimico, a differenza di quanto fanno le molecole più grandi, che non riescono a passare attraverso il canale formato dalla perforina. Il fenomeno determina così un effetto Donnan, con conseguente ingresso all'interno

della cellula bersaglio di molecole di acqua in risposta alle differenze di pressione osmotica che si vengono a creare attraverso la membrana. L'ingresso di acqua porta ad un rigonfiamento della cellula ed infine alla sua lisi. Questa lisi cellulare, per le modalità che la caratterizzano, è anche detta "colloido-osmotica".

L'azione delle proteine formanti poro sulle cellule bersaglio può essere inibita dai "protettori osmotici". Infatti, poichè la lisi è dovuta alla pressione colloido-osmotica intracellulare, conseguenza dell'alterato scambio di piccole molecole, essa può essere inibita mettendo le cellule in presenza di molecole con diametro effettivo superiore a quello dei pori. Tali molecole infatti, non potendo attraversare liberamente il canale del poro, generano una pressione osmotica extracellulare che controbilancia quella interna, e si oppongono così di fatto al rigonfiamento e alla lisi. L'abilità di una certa molecola di bloccare la lisi colloido-osmotica può dare anche una stima del diametro interno del canale transmembrana generato dalla perforina. L'uso di protettanti osmotici ha permesso di determinare il diametro dei pori prodotti da *T.vaginalis* sulle cellule bersaglio che è compreso tra 1.14 e 1.34 nanometri. Questi esperimenti hanno confermato l'ipotesi della formazione da parte di *T.vaginalis* di pori funzionali sulle membrane bersaglio, e danno una misura del diametro interno del canale transmembrana responsabile della lisi cellulare (6).

La lisi contatto-dipendente e quella da prodotti secreti sono in conclusione riconducibili ad un unico meccanismo, mediato dall'inserzione sulla membrana bersaglio di una proteina in grado di formare pori funzionali con diametro di circa un nanometro. La secrezione e l'attività biologica della perforina sono fortemente condizionate dalle condizioni di pH dell'ambiente, che deve essere inferiore a 6.5.

L'intima adesione tra *T.vaginalis* e cellula bersaglio è effettivamente necessaria perchè avvenga la lisi: essa infatti garantisce la creazione di un microambiente tra membrana e membrana nel quale si verificano le condizioni di pH acido e di concentrazione di fattori litici permissive per la lisi (5-7). Il protozoo, una volta adeso alla cellula bersaglio, secerne enzimi coinvolti nel determinare e mantenere le condizioni acide nel microambiente che viene a formarsi. Tutte queste caratteristiche del processo emolitico supportano l'ipotesi del coinvolgimento di proteine formanti poro solubili (7).

Alle basse temperature la lisi è inibita, ma non il contatto tra protozoo e cellula bersaglio, suggerendo che si tratti di fenomeni distinti. E' stato così possibile ipotizzare un meccanismo citopatico di *T.vaginalis* che richiede una prima fase di intimo contatto tra le membrane effettore e bersaglio, seguita dall'inserzione di molecole formanti poro ed infine dal distacco del protozoo e la lisi della cellula bersaglio.

### **Proteine formanti poro**

La formazione di pori sulle membrane di cellule bersaglio è una strategia di attacco/difesa diffusa tra gli organismi filogeneticamente più diversi, dai batteri all'uomo. I linfociti T citotossici e le cellule NK del sistema immunitario ad esempio utilizzano un meccanismo mediato da perforine per lisare le cellule bersaglio (170-173). Sono proteine formanti poro anche molti veleni presenti in natura, come ad esempio la mellitina, il piccolo polipeptide anfipatico che costituisce fino al 50% del peso del veleno dell'ape *Apis mellifera*, o la barbatolisina, presente nel veleno della formica rossa *Pogonomyrmex barbatus*. Anche la sogliola marina *Pardachirus pavonius* produce sostanze con attività perforinica, che sembrano agire come repellenti per gli squali (174). Tra i microorganismi molti hanno sviluppato un meccanismo di

offesa che utilizza proteine formanti poro (175). Tra essi vi sono diversi batteri, come alcuni ceppi uropatogeni di *Escherichia coli*, produttori di una emolisina calcio-dipendente (176-180) che inserendosi nelle membrane bersaglio forma un poro di circa 3 nanometri, e *Staphylococcus aureus* che secreta l' $\alpha$ -tossina, molecola che polimerizza formando dei canali nelle membrane (181-184).

Un'altra classe di proteine formanti poro è quella appartenente alla famiglia delle saposin-like protein, o SAPLIP. Questa è una famiglia estremamente conservata di piccole proteine (circa 75-77 aminoacidi), con un'alta omogeneità strutturale, caratterizzata dalla presenza di un dominio, detto Saplip, molto conservato (185, 4).

Alla famiglia delle Saplip appartengono anche proteine umane, cofattori nel metabolismo lipidico. Infatti nei lisosomi la degradazione di alcuni sfingolipidi richiede la presenza di quattro piccole glicoproteine chiamate saposine che derivano da precursori noti come prosaposine, che dopo clivaggio enzimatico generano le saposine A, B, C e D (186). Le proteine mature sono costituite da circa 80 residui aminoacidici, contenenti ciascuna un dominio Saplip. In particolare SapA stimola l'attività dell'enzima che degrada la glucosilceramide determinando delle modificazioni conformazionali nell'enzima stesso; SapB agisce solubilizzando i sulfatidi e rendendoli accessibili all'enzima coinvolto nella degradazione di questi; SapC agisce formando un complesso con l'enzima che degrada la glucosilceramide, e favorendo l'interazione enzima-substrato; SapD è la più abbondante saposina nei tessuti, agisce legando l'enzima degradativo della glucosilceramide. Deficienze nella produzione delle saposine B e C sono state associate a disordini nello stoccaggio dei lipidi (186, 187).

Un'altra proteina appartenente alla famiglia delle Saplip è la proteina B del surfattante polmonare SpB (188), un complesso di fosfolipidi cui sono associate specifiche

proteine, implicato nel ridurre la tensione superficiale all'interfaccia aria-liquido nelle pareti dei condotti distali delle vie aeree e negli alveoli. SpB viene prodotta dalle cellule di tipo II negli alveoli, sotto forma di precursore che viene clivato enzimaticamente dando origine alla proteina biologicamente attiva (189).

Anche la sfingomielinasi acida appartiene alla famiglia delle proteine Saplip. Si tratta di un enzima lisosomiale che idrolizza la sfingomielina in ceramide e fosfatidilcolina, che può prendere parte alla via di trasduzione del segnale mediata da  $TNF\alpha$  ed ha attività fosfolipasica (190). La sequenza aminoacidica della proteina è caratterizzata dalla presenza di un dominio Saplip di 76 residui aminoacidici e da una regione contenente il sito catalitico. La forma matura dell'enzima è un singolo polipeptide. È stato osservato che la deficienza di tale enzima risulta in un disordine nello stoccaggio lisosomiale della sfingomielina (191).

Le proteine appartenenti alla famiglia delle SAPLIP, nonostante l'evidente eterogeneità funzionale, sono accomunate dalla capacità di interagire con i lipidi. Questo tratto comune è determinato dalle caratteristiche strutturali di tali proteine. Difatti le SAPLIP mostrano un dominio comune, dominio Saplip, caratterizzato da uno scheletro conservato di 6 residui di cisteina in posizione invariante, che vanno a formare tre ponti disolfuro e da un'abbondanza di residui idrofobici.

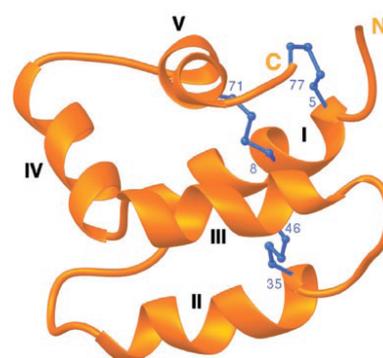


Fig. 2 Struttura terziaria tipica di un dominio Saplip

La sequenza aminoacidica si ripiega a formare 5 alfa-eliche interconnesse da 3 ponti disolfuro, organizzazione tipica di tutte le SAPLIP (4, 185) (Fig. 2).

Tra i protozoi patogeni per l'uomo, *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri* producono delle proteine formanti poro, chiamate rispettivamente Amoebapore e Naegleriapore, che contribuiscono all'azione patogena di questi protozoi, e che appartengono alla famiglia proteica SAPLIP (3).

*Entamoeba histolytica* (Fig. 3) è l'agente eziologico della amebiasi, un'infezione a carico dell'apparato gastrointestinale che può diffondersi extraintestinalmente e arrivare al fegato determinando una massiccia distruzione dei tessuti. I mediatori dell'attività di killing del protozoo sono pore-forming proteins (192). Tali proteine sono state ampiamente caratterizzate e sono state individuate tre isoforme note come Amoebapore A, B e C, che mostrano attività battericida e citolitica verso cellule nucleate. Esse hanno anche caratteristiche strutturali conservate, ciò suggerisce che le tre isoforme abbiano un meccanismo di formazione dei pori simile. Nonostante tutto la sequenza aminoacidica delle isoforme B e C mostra un'identità con Amoebapore A solo del 57 e 47% rispettivamente (193, 194).



Fig. 3 *Entamoeba histolytica*

Le amoebapores sono contenute in granuli citoplasmatici caratterizzati da un pH acido, che vengono liberati nello spazio che si crea tra le due membrane in seguito al contatto del protozoo con la cellula bersaglio. In questo modo si ha l'acidificazione del microambiente tra le due membrane, creando le condizioni ideali perché le Amoebapores possano esplicare la loro funzione. E' noto infatti che l'attività di amoebapore A è fortemente dipendente dal pH acido (193, 194).

Le amoebapores sono analoghe alle granulisine dei linfociti TCD8+ e alle NK-lisine delle cellule Natural Killer dei mammiferi, molecole ad attività batteriolitica prodotte dai linfociti T citotossici e delle cellule NK. E' stato osservato che cellule di *E.histolytica* sottoposte al silencing del gene codificante per amoebapore A perdono la capacità di esercitare un effetto citopatico su cellule bersaglio (195, 196).

Sono state individuate PFP anche in *Naegleria fowleri* (Fig. 4), un protozoo flagellato a vita libera diffuso nelle acque di tutto il mondo. Esso può compiere il suo intero ciclo vitale senza parassitare alcun organismo, tuttavia in alcuni casi passando attraverso la

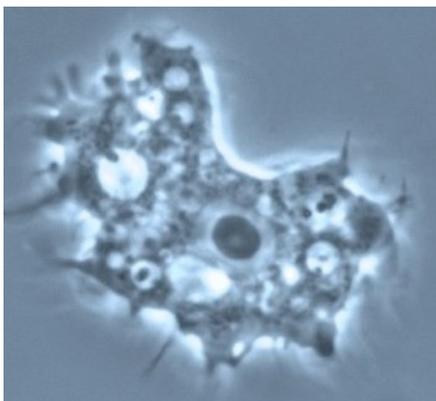


Fig. 4 *Naegleria fowleri*

mucosa nasale e il nervo olfattivo, può invadere il cervello umano e causare meningoencefalite.

Questa malattia è caratterizzata da una massiccia distruzione dei tessuti dell'ospite a causa dell'attività citolitica del protozoo (3, 197).

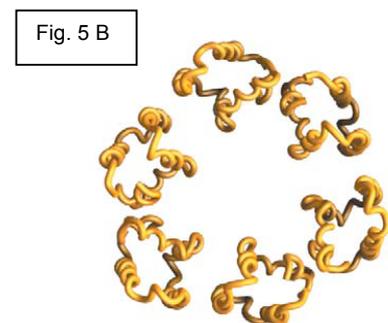
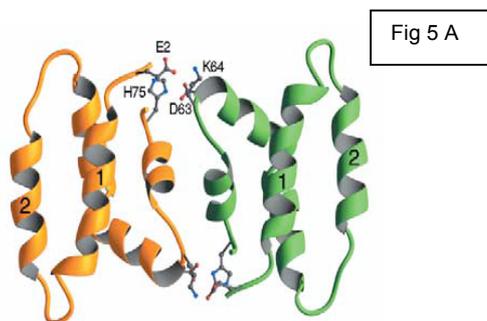
L'attività citolitica è stata attribuita alla secrezione di proteine formanti poro che sono state identificate e

denominate Naegleriapores A e B. Le Naegleriapores hanno un ampio spettro d'azione, potendo agire sia su cellule procariotiche che su cellule eucariotiche. Esse vengono prodotte a partire da un precursore, costituito da più domini Saplip dal quale si ottengono peptidi biologicamente attivi costituiti da un unico dominio Saplip, in seguito ad un clivaggio enzimatico. Il precursore di Naegleriapore A dà origine a 3 isoforme diverse, mentre il precursore di Naegleriapore B dà origine a 5 isoforme (198). E' stato osservato che le unità singole derivanti da uno stesso precursore non sono presenti in quantità

equivalenti, probabilmente perché vi sono differenze di stabilità tra le varie unità che vanno quindi incontro a proteolisi (198).

Il fatto che esista un precursore che viene clivato nelle diverse isoforme proteiche attive, permette al microrganismo di produrre contemporaneamente diverse proteine formanti poro, quindi di possedere una maggiore aggressività ed un più ampio spettro di cellule bersaglio. Tutte le isoforme di Naegleriapore B hanno attività batteriolitica sia su batteri Gram positivi che Gram negativi (197, 198).

Il meccanismo di formazione dei pori da parte di Amoebapore e Naegleriapore è pH dipendente, così come l'attività emolitica di *T.vaginalis*. A pH acido un residuo di Istidina in posizione caratteristica viene protonato, determinando la formazione di un dimerico per interazione elettrostatica con un residuo di acido aspartico carico negativamente presente in un altro monomero (Fig. 5 A). Di seguito vengono aggiunti nuovi dimeri sino ad ottenere una struttura esamerica ad anello, che ha la superficie esterna di natura idrofobica e il canale interno su cui si affacciano residui polari di natura idrofila. Il modello strutturale prevede quindi la formazione di un poro di diametro di circa due nanometri. Questo tipo di struttura si inserisce nelle membrane delle cellule bersaglio formando un canale che determina la lisi osmotica (194) (Fig. 5 B).



Il ruolo delle pore forming proteins in *T.vaginalis* è stato finora dimostrato solo indirettamente, attraverso esperimenti che dimostrano la formazione di pori funzionali del diametro di circa 1,2 nanometri sulle membrane bersaglio. Tuttavia i geni e gli effettori coinvolti nell'effetto citopatico del protozoo non sono stati finora descritti. Partendo dal presupposto che le caratteristiche del meccanismo di patogenicità di *T.vaginalis* sono per molti aspetti simili a quelle di *Entamoeba histolytica* e di *Naegleria fowleri*, è ipotizzabile le proteine formanti poro di *T.vaginalis* presentino un elevato grado di omologia rispetto a Amoebapores e Naegleriapores. In questa tesi di Dottorato verrà descritta l'individuazione e la caratterizzazione dei geni codificanti per le proteine formanti poro in *T.vaginalis*.

## MATERIALI E METODI

### Identificazione dei geni *TvSaplip 1-12*

La ricerca di sequenze codificanti per putative Pore Forming Proteins in *Trichomonas vaginalis* è stata possibile grazie al recente sequenziamento del genoma del protozoo. Utilizzando il Database Tvag\_6x\_assembly del *Trichomonas vaginalis* Genome Project (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/>) ed il programma tblastn, che permette di individuare sequenze nucleotidiche omologhe partendo una sequenza amminoacidica, sono state condotte analisi di similarità. La sequenza amminoacidica utilizzata come query era costituita dai 98 residui amminoacidici della proteina AmoebaporeA di *Entamoeba histolytica* (GenBank nos. P34095):

MKAIVFVLIFAVAFVAVTATHQGEILCNLCTGLINTLENLLTTKGADKVKDYISSLCNKASG  
FIATLCTKVLDFGIDKLIQLIEDKVDANAICAKIHAC

### Analisi delle sequenze geniche

Le sequenze dei 12 Open Reading Frame *TvSaplip 1-12* sono state caratterizzate attraverso i programmi Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://www.ebi.ac.uk>), SCANPROSITE (<http://www.expasy.org/>) e SignalP 3.0 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)). Essi permettono, a partire da una specifica sequenza genica, di effettuare un'analisi di sequenza per domini conservati, quindi di conoscere l'ipotetica struttura della proteina dedotta.

In particolare i software SMART e SCANPROSITE permettono di individuare nella struttura della proteina la presenza di domini conservati, la posizione ipotetica di ponti disolfuro inter ed intracatena e la presenza di siti di glicosilazione. Il software SignalP 3.0 Server permette di predire in una sequenza aminoacidica la presenza e la localizzazione di un peptide segnale, e il sito di clivaggio del peptide segnale stesso. Utilizzando il software ClustalW le sequenze aminoacidiche dei domini Saplip sono state allineate con le sequenze aminoacidiche di Amobapores A, B, C (GenBank nos. P34095, Q24824 e Q24825) e di Naegleriapores A e B (GenBank nos. AAL01157 e AAL01158).

#### **Coltivazione di *Trichomonas vaginalis***

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando i ceppi di riferimento SS-22 e G3 di *T.vaginalis*, caratterizzati dall'assenza del simbionte *Mycoplasma hominis*, da una spiccata patogenicità *in vitro* e da una particolare stabilità fenotipica. I ceppi, isolati da donne affette da tricomoniasi sintomatica, fanno parte della banca di protozoi del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari.

I protozoi erano mantenuti in coltura mediante passaggi giornalieri in terreno liquido Diamond's TYM (trypticase-yeast extract-maltose) (65) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FSB), diluiti con terreno fresco in modo che non superassero mai la concentrazione di circa  $1.5 \times 10^6$  protozoi/ml, a 37°C in atmosfera addizionata con il 5% di anidride carbonica (63).

Quando non utilizzati per gli esperimenti i protozoi venivano congelati in azoto liquido, risospesi alla concentrazione di  $1 \times 10^7$  protozoi/ml in soluzione di congelamento (10% dimetilsolfossido e 90% FBS). Gli esperimenti venivano condotti utilizzando protozoi in

crescita esponenziale, con vitalità superiore al 99%, determinata microscopicamente sulla base della motilità.

### **Preparazione delle emazie**

Sangue umano di gruppo 0, prelevato in presenza di eparina da donatori sani, era diluito 5 volte in tampone fosfato pH 7,4 (PBS) e centrifugato a 2000 rpm. Il plasma ed il "buffy coat" contenente le cellule nucleate venivano allontanati, e gli eritrociti lavati tre volte con lo stesso tampone. Se non utilizzati immediatamente i globuli rossi erano conservati a 4°C in RPMI per non più di cinque giorni.

### **Emolisi da contatto**

*T.vaginalis* in fase esponenziale di crescita sono stati lavati due volte in PBS e risospesi in PBS addizionato con maltosio 15 mM (PBS-M) ad una concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/ml. Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni differenti, utilizzando come medium PBS-M a pH 6.0 e PBS-M a pH 7.0. Ai protozoi sono stati aggiunti gli eritrociti umani ottenuti come descritto in rapporto di 20:1 con i protozoi. Le cellule sono state incubate in atmosfera addizionata con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C e ad intervalli di tempo predefiniti (0', 30', 60', 90') sono stati prelevati 4 ml della sospensione e centrifugati a 1800 rpm per 10'. Il surnatante è stato ulteriormente centrifugato a 14000 rpm per 10', per eliminare le membrane degli eritrociti lisati, ed è stato analizzato spettrofotometricamente mediante lettura dell'assorbanza a 546 nm, al fine di quantificare l'emoglobina rilasciata nel mezzo conseguente all'attività emolitica dei protozoi. I controlli erano rappresentati da campioni trattati secondo lo stesso protocollo ma in assenza di protozoi.

## Estrazione del DNA

Dieci milioni di cellule per ciascun ceppo di *Trichomonas vaginalis* sono stati lavati 2 volte in PBS ed incubati per 20 minuti a 65°C in 400 µl di tampone TE pH 8.0 (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA ) addizionato con SDS 1% e 100 µg/ml di Proteinasi K. Il DNA è stato estratto tre volte con 400 µl di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:24:1), quindi precipitato in 2 volumi di etanolo assoluto e 0.1 volumi di sodio acetato 3 M pH 5.2. Il DNA infine è stato risospeso in tampone TE sterile ad una concentrazione finale di 0.4 µg/ml e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

## PCR

Per ciascun gene *TvSaplip* da 1 a 12 è stato messo a punto un protocollo di PCR per determinare l'effettiva presenza delle sequenze specifiche nel genoma dei ceppi di *Trichomonas vaginalis* oggetto dello studio. Utilizzando il programma Oligo Perfect Designer (Invitrogen) è stata disegnata una coppia di primers specifica per ciascun gene:

TvSaplip 1 fw 5'-GCCAGCTGCCCAACATTAC-3'	
TvSaplip 1 rev 5'-TCAGCAGCGCGAGACTTC-3'	T.a 55°C Amplicon size: 404 bp
TvSaplip 2 fw 5'-ATCTGCGACACATGCGTTACA-3'	
TvSaplip 2 rev 5'-GGGCGAGCTTGAGGGACTTT-3'	T.a. 57°C Amplicon size: 511 bp
TvSaplip 3 fw 5'-GCCACGTGCTACAAAGGTT-3'	
TvSaplip 3 rev 5'-GGCAGCCGGTGGTTCGT-3'	T.a. 53,5°C Amplicon size: 235 bp
TvSaplip 4 fw 5'-CCGCCC GCCATCATT CAG-3'	
TvSaplip 4 rev 5'-GCAGCCGCTCCATTAACAACAGT-3'	T.a. 56,8°C Amplicon size: 565 bp

TvSaplip 5 fw 5'-AAAACGGCCTTACACAATGCTC-3'	
TvSaplip 5 rev 5'-TCACCAGAACGAAGGAAGTAGATG-3'	T.a. 52°C Amplicon size: 200 bp
TvSaplip 6 fw 5'-CTTATTTGCTAGCGCTGTTTCCTT-3'	
TvSaplip 6 rev 5'-CATTGTGGGTTTGTCTCTGTTGA-3'	T.a. 55,8°C Amplicon size: 357 bp
TvSaplip 7 fw 5'-TTAGGTAAATGCCGTCCAAAAG-3'	
TvSaplip 7 rev 5'-TGAGAAATAATAAGGTGAATAAGA-3'	T.a. 48,9°C Amplicon size: 272 bp
TvSaplip 8 fw 5'-GGCGGCCAGTCATCAACAGC-3'	
TvSaplip 8 rev 5'-TTATGGAAAATGGCGTGGACCTT-3'	T.a. 57,4°C Amplicon size: 162 bp
TvSaplip 9 fw 5'-GAATTTGCCAACCGCTGAA-3'	
TvSaplip 9 rev 5'-TGCTGCCATGGGAGTTTGT-3'	T.a. 53°C Amplicon size: 274 bp
TvSaplip 10 fw 5'-CTTGTTATGTGCCCGTCTTGTGG-3'	
TvSaplip 10 rev 5'-TCTCGCCTGCCTTAATGTATCTGA-3'	T.a. 54,5°C Amplicon size: 242 bp
TvSaplip 11 fw 5'-GAGCCCAATGTGCCTTTCTT-3'	
TvSaplip 11 rev 5'-TTTCCTTTTCTATGTACTTGATGA-3'	T.a. 49,5°C Amplicon size: 194 bp
TvSaplip 12 fw 5'-CCAAGCCAGGACCAAAGTG-3'	
TvSaplip 12 rev 5'-GGGGCCCTCCTGTTATTATTATTC-3'	T.a. 50,5°C Amplicon size: 148 bp

La mix di reazione per le PCR è così costituita: 3,2 µl dNTPs 1,25 mM, 2 µl di Buffer 10X (Invitrogen), 0,75 µl di MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen), 0,24 µl di taq Polymerase Recombinant 5U/µl (invitrogen), 1 µl di ciascun primers 10 mM, 1 µl DNA e H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume finale di 20 µl. Le reazioni venivano condotte per 30 cicli (1 minuto di denaturazione, 45 secondi di annealing e 45 secondi di estensione) in un thermal cycler PCRExpress HYBAID.

## **Estrazione RNA**

Dalle cellule di *T.vaginalis* messe a contatto con i globuli rossi per tempi differenti è stato estratto l'RNA totale. Brevemente, il pellet è stato risospeso in 800 µl di Trizol reagent (Invitrogen) e 200 µl di cloroformio, e centrifugato per 15' a 12000 rpm a 4°C. La fase acquosa, contenente gli acidi nucleici, è stata quindi trasferita in una nuova provetta e precipitata con 500 µl isopropanolo e 1 µl di glicogeno 10 mg/ml per 30' a -80°C. I campioni sono stati quindi centrifugati a 12000 rpm per 15' a 4°C. Eliminato il sopranatante, i pellets sono stati lavati in 800 µl di etanolo al 75% e centrifugati a 12000 rpm per 5' a 4°C. Eliminato l'etanolo, i pellets sono stati digeriti con 4 unità di DNAsil (Invitrogen), mediante incubazione a 37°C per un'ora, per l'eliminazione del DNA genomico. Successivamente è stata eseguita una seconda estrazione, mediante aggiunta di 300 µl di acqua RNAsi free, 200 µl fenolo e 200 µl cloroformio, e centrifugazione a 12000 rpm, per 5' a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi precipitati in 800 µl di etanolo assoluto, 60 µl di acetato di sodio e 1 µl di glicogeno 10 mg/ml per 30 minuti a -80°C.

I pellets ottenuti dopo centrifugazione a 12000 rpm per 15' a 4°C, sono stati risospesi in 800 µl di etanolo al 75% e centrifugati a 12000 rpm per 15' a 4°C. Eliminato l'etanolo i pellets sono stati risospesi in 50 µl di acqua RNAsi free e conservati a -80°C.

I campioni di RNA ottenuti venivano saggiati in PCR utilizzando i primers: Actin fw 5'-CCCTTCCACACGCCATCATG-3' e Actin rev 5'-ATCACGAACGATTTCTTTTCGG-3', specifici per il gene codificante per l'actina di *T.vaginalis* per verificare eventuali contaminazioni da DNA genomico. I campioni che risultavano positivi erano sottoposti ad una seconda digestione con DNAsi I.

### **Retrotrascrizione**

A 1 µg di RNA totale, per ciascun campione, venivano aggiunti 200 ng di random primers e 1 µl di dNTPs Mix 10 mM in un volume finale di 10 µl. Dopo un'incubazione di 5 minuti a 65°C, alla mix di reazione venivano aggiunti 4 µl di First-Strand buffer 5X (Invitrogen), 2 µl di DTT 0,1 M (Invitrogen) e 1 µl di enzima SuperScript II (Invitrogen) (200 U/µl) e i campioni posti a 42°C per 50 minuti. Alla reazione di retro trascrizione faceva seguito un'incubazione di 15' a 72°C per l'inattivazione dell'enzima.

### **RT-PCR**

Per verificare che le ORF *TvSaplip1-12*, fossero trascritte, sono state allestite delle RT-PCR. Come campione è stato utilizzato cDNA, ottenuto attraverso una reazione di retrotrascrizione dal RNA totale, estratto da protozoi messi a contatto con eritrociti umani per due ore. I primers utilizzati sono quelli disegnati per le PCR messe a punto per verificare la presenza delle sequenze *TvSaplip* nel genoma di *T.vaginalis*. Anche i protocolli per la preparazione della mix di reazione e i cicli di temperatura utilizzati sono gli stessi delle PCR precedenti.

### **Real Time PCR Multiplex**

I cDNA ottenuti negli esperimenti di contatto tra protozoi ed emazie a tempi differenti sono stati analizzati in Real Time PCR. A tale scopo sono state allestite delle Real Time PCR Multiplex che permettessero di valutare modificazioni dei livelli di trascrizione dei geni *TvSaplip1-12* in relazione ad un gene di riferimento, i cui livelli di trascrizione non fossero influenzati dalle condizioni sperimentali scelte. Si è scelto di utilizzare il sistema TaqMan che prevede l'utilizzo, oltre a primers specifici, di sonde

marcate con molecole fluorescenti. Questo sistema permette la messa a punto di Real Time PCR multiplex particolarmente sensibili.

Per ciascun gene sono stati disegnati primers e sonde utilizzando il programma Beacon Designer (PREMIER Biosoft International):

*TvSaplip1* (TVAG\_388060) 1.665 bp  
fw 5'-CGCCGAAATCTGCCAGAAGC-3'  
rev 5'-TGACGCAGTAGTTGCATAATAGGC-3'  
Probe 5'-CGCTGCCACAAAGGTTGCCCGCC-3' Amplicon size 89 bp

*TvSaplip2* (TVAG\_209200) 1.605 bp  
fw 5'-TCTGCAAGAAGATCGGCCTTTG-3'  
rev 5'-AATGGACAAGTTCAACGCACATG-3'  
Probe 5'-TCCGTCAAGGGTGCCAAGTCCCAG-3' Amplicon size 90 bp

*TvSaplip3* (TVAG\_393030) 312 bp  
fw 5'-TTCTTTGCATTATTGGGCCTCATG-3'  
rev 5'-TTCCGTCTCAAGATAGTCTTCG-3'  
Probe 5'-CTGCTGCTGCCGTTAAGCCACGT-3' Amplicon size 134 bp

*TvSaplip 4* (TVAG\_473630) 1.149 bp  
fw 5'-TTCTGTTCAACACAAGGAGTACTG-3'  
rev 5'-TCAATTGTTCCAACAACCTTTGTGC-3'  
Probe 5'-CATGTCGCAGCCGCCTCCATTAACA-3' Amplicon size 77 bp

*TvSaplip5* (TVAG\_000220) 330 bp  
fw 5'-ATCTACTTCCTTCGTTCTGGTG-3'  
rev 5'-TTCTTGTTTTTCATAATATGCAGTG-3'  
Probe 5'-AGCACCGATAAGTCTGCAAGCAGC-3' Amplicon size 90 bp

*TvSaplip6* (TVAG\_453350) 396 bp  
fw 5'-CCAACCGAGATTTGCGAGAAGG-3'  
rev 5'-CTCTGTTGAGAAAGCTGGTCTTCC-3'  
Probe 5'-TGCCGCAAGGTTTCGTGTTAACGCC-3' Amplicon size 123 bp

*TvSaplip8* (TVAG\_213250) 381 bp  
fw 5'-CTACAGCAAGTCATGACATTCC-3'  
rev 5'-TGTGGGAAGTGTGGAGCAAC-3'  
Probe 5'-CGCGGCGGCCAGTCATCAACAGC-3' Amplicon size 147 bp

*TvSaplip10* (TVAG\_392900) 360 bp  
fw 5'-TTCAAGGGAATTCAACTGTGTTTG-3'  
rev 5'-ACACAGATTTCTGATGGTTTCTCG-3'  
Probe 5'-ACCGCAGAAAGATCACCAGCCGC-3' Amplicon size 144 bp

*TvSaplip11* (TVAG\_306610) 309 bp  
fw 5'-GAAATCACAGAAAAGGTTGAAGC-3'  
rev 5'-CTATGTTACTTGATGATTTCTGGAAC-3'  
Probe 5'-CGCATACTTCAGGGTGATGCTCA-3' Amplicon size 109 bp

*TvSaplip12* (TVAG\_183780) 459 bp  
fw 5'-CCGAAATATGTAACTCTTTGATCC-3'  
rev 5'-ATGGCAAATTCTTGATTTGTTTTTC-3'  
Probe 5'-TCAGCCTGCATGGACTCGTTGAAC-3' Amplicon size 122 bp

Inizialmente come gene housekeeping è stato scelto quello codificante per l'actina, una proteina costituente il citoscheletro del protozoo. Tuttavia tale gene non si è rivelato adatto alle condizioni sperimentali da noi utilizzate, poichè i livelli di trascrizione subivano variazioni in seguito al contatto del protozoo con le membrane bersaglio.

E' stato quindi scelto come gene housekeeping il gene codificante l'RNA ribosomiale 18S (Acc.n.U17510 ) i cui livelli di trascrizione rimangono costanti nelle condizioni sperimentali prese in esame. Sono stati disegnati primers e sonda utilizzando il programma Beacon Designer:

fw 5'-GGGAACTTACCAGGACCAGATG-3'  
rev 5'-AGCTGAATCAACGCTAGACAGG-3'  
Probe 5'-CAACCCACGCACCACCAACGGC-3' Amplicon size 124 bp

Tutte le coppie di primers utilizzate sono state sintetizzate dalla ditta Invitrogen, mentre le sonde sono state sintetizzate dalla ditta Sigma Genosys.

La sonda per il gene housekeeping è stata marcata con le molecole fluorescenti Hex (hexachlorofluoresceina phosphoramidite 556 nm) all'estremità 5' e Tamra (6-carbossitetrametilrodamina, 580 nm) all'estremità 3', mentre le sonde per i geni *TvSaplip* sono state marcate con le molecole fluorescenti Fam (6-carbossifluoresceina, 518 nm) all'estremità 5' e Tamra all'estremità 3', in modo da poter lavorare simultaneamente in reazioni di Real Time PCR Multiplex.

Poiché i geni *TvSaplip1-12* sono caratterizzati da una spiccata omologia di sequenza, primers e sonde sono stati disegnati in regioni peculiari per ciascun gene. Inoltre essi sono stati scelti in modo da poter lavorare in un protocollo di multiplex real time PCR con il gene housekeeping. Ciò è stato possibile per tutti i geni *TvSaplip* analizzati eccetto per il gene *TvSaplip7*. A causa delle dimensioni estremamente ridotte, non è stato possibile individuare nella sequenza regioni peculiari che potessero essere ibridizzate da una sonda specifica. Per il gene *TvSaplip7* è stata pertanto messa a punto una Real Time PCR che utilizza come chimica fluorescente il Sybr green (Biorad), sistema che non necessita della sonda specifica.

La mix di reazione per le Real Time PCR Multiplex, è così costituita: 4 µl dNTPs 200 nM, 2,5 µl di Buffer 10X (Invitrogen), 0,75 µl di MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen), 1 µl di taq Platinum 5U/µl (Invitrogen), 0,75 µl di primers 10 mM per il gene *TvSaplip* e per il gene housekeeping, 0,5 µl di sonda 10 mM per il gene *TvSaplip* e per il gene housekeeping, 3 µl cDNA e H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume finale di 25 µl.

Sono stati utilizzati i seguenti cicli di reazione:

95°C per 90"	2 cicli
95°C per 15"	50 cicli
54°C per 30"	
72°C per 30"	

Per la Real Time PCR per l'analisi del gene *TvSaplip 7* è stato utilizzato il seguente protocollo:

12,5 µl di iQ SYBR green Supermix 2X (Biorad), 0,75 µl di ciascun primer 10 mM, 3 µl di cDNA ed H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume finale di 25 µl. Il termal cycler utilizzato è il BioRad Icyler IQ real time PCR instrument.

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato e ciascun esperimento è stato ripetuto tre volte con entrambi i ceppi di *T.vaginalis* presi in esame.

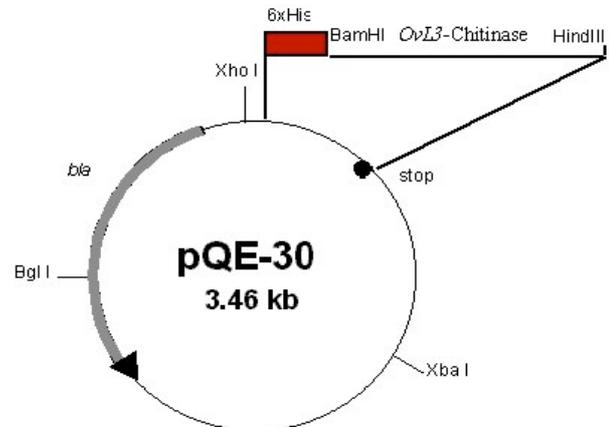
L'espressione relativa dei geni è stata calcolata, in riferimento all'housekeeping gene rRNA 18S, con la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizzando il foglio di calcolo elettronico Gene Expression Relative Quantitation (Biorad) che consente, in seguito all'inserimento dei dati ottenuti in real time PCR, di ottenere i valori di incremento o diminuzione dei livelli di trascrizione rispetto ad un livello basale di trascrizione normalizzati sui valori del housekeeping. La variazione nell'espressione dei geni è quantificata calcolando

$$2^{-\Delta\Delta Ct_{Tv+RBC}} / 2^{-\Delta\Delta Ct_{Tv}}$$

### **Clonaggio di *TvSaplip 5* e *TvSaplip 6***

I geni *TvSaplip 5* e *6* sono stati clonati utilizzando il vettore di espressione pQE30 che permette una semplice purificazione dei prodotti ricombinanti espressi. Infatti la proteina ricombinante ottenuta possiede, all'estremità N-terminale, una coda di sei

istidine che permette la facile purificazione in cromatografia di affinità in colonnine contenenti particelle di nichel (Kit Ni-NTA Spin Handbond, Qiagen). Inoltre tale plasmide possiede il gene per la resistenza all'ampicillina.



Gli inserti di DNA sono stati ottenuti in

PCR utilizzando la Taq polimerasi Vent (New England Biolabs) e i seguenti primers:

*TvSaplip5* (TVAG\_000220) 330 bp

*TvSaplip5-cl fw* 5'-CGGGATCCATGTTTCTTTCTTA-3'

*TvSaplip5-cl rev* 5'-AACTGCAGTTACTCGACGAAATC-3'

T.annealing 59°C

*TvSaplip6* (TVAG\_453350) 396 bp

*TvSaplip6-cl fw* 5'-CGGGATCCATGCTCGCATTCTTA-3'

*TvSaplip6-cl rev* 5'-AACTGCAGGATAGCTTCTTCCCA-3'

T.annealing 63°C

I primers fw di entrambe le coppie presentano all'estremità 5' la sequenza di taglio per l'enzima di restrizione BamHI, evidenziata in rosso. I primers rev sono caratterizzati dalla presenza all'estremità 5' la sequenza di taglio per l'enzima di restrizione PstI, evidenziata in verde.

La mix di reazione era composta da 5 µl di Buffer 10X, 8 µl di dNTPs, 0,75 µl di MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, 2,5 µl di ciascun primer 10 mM, 0,6 µl Taq Vent, 2 µl di DNA e 28,65 µl di H<sub>2</sub>O.

I cicli di temperatura utilizzati per l'amplificazione erano:

94°C per 5'

94°C per 45''	} 10 cicli
45°C per 45''	
72°C per 45''	

94°C per 45''	} 35 cicli
59/63°C per 45''	
72°C per 45''	

72°C per 5'

Il prodotto di PCR ottenuto è stato purificato su colonna (PCR purification Kit Concert , Qiagen). Il plasmide e il prodotto di PCR sono stati digeriti con gli enzimi BamHI e PstI (Amersham). I prodotti di PCR sono stati quindi clonati all'interno del plasmide pQE30 utilizzando il kit Topo TA cloning (Invitrogen), attraverso una reazione di ligation catalizzata dall'enzima T4 ligasi.

I vettori di espressione pQE30/saplip5 e pQE30/saplip6, contenenti rispettivamente gli inserti *TvSaplip5* e *TvSaplip6* sono stati sequenziati dal Servizio Sequenziamento DNA-BMR Genomics per verificare il corretto inserimento dell'inserto.

Per l'espressione della proteina ricombinate è stato scelto il ceppo *Escherichia coli* DH5α preventivamente trasformato con il plasmide pREP4. Il plasmide pREP4 contiene il gene *lacI* che ha il promotore mutato e produce il repressore *lac* in quantità dieci volte superiori al gene nativo. La presenza di numerose copie dei questo plasmide consente di ottenere livelli ancora più alti di repressore *lac*. Inoltre, pREP4 contiene anche il gene che conferisce la resistenza all'antibiotico kanamicina. I batteri sono stati separatamente trasformati con i vettori di espressione pQE30/saplip5 e pQE30/saplip6, utilizzando il kit rapid Transit (Sigma). Brevemente, *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$  sono stati seminati in terreno LB (Luria Bertani) liquido e incubati per una notte a 37°C. Un'aliquota della coltura è stata quindi diluita 1:60 in 30 ml di brodo LB e incubata a 37°C fino al raggiungimento di una densità ottica (O.D.) di 0,4 misurata spettrofotometricamente a 600 nm. Un ml di coltura è stato centrifugato a 3500 rpm per 10', ed i batteri sono stati risospesi in 50  $\mu$ l di tampone Rapid Transit (1 vol Rapid Transit 2x e 1 vol di Recovery medium Sigma). Cinque microlitri del prodotto della reazione di ligation sono stati addizionati alla sospensione batterica. Dopo 10' di incubazione in ghiaccio, sono stati aggiunti 900  $\mu$ l di Recovery medium (Sigma) e i batteri sono stati incubati 60' a 37°C. I batteri trasformati, denominati d'ora in poi rispettivamente DH5 $\alpha$ /saplip5 e DH5 $\alpha$ /saplip6, sono stati seminati su LB agar addizionato con ampicillina 100  $\mu$ g/ml e kanamicina 25  $\mu$ g/ml e le piastre sono state incubate per una notte a 37°C.

I batteri sono stati quindi sottoposti a PCR con i primers specifici per i geni *TvSaplip5* e *TvSaplip6* per confermare l'avvenuta trasformazione.

### **Produzione delle proteine ricombinanti**

Ai batteri trasformati, coltivati in Luria broth con ampicillina 100  $\mu$ g/ml e kanamicina 25  $\mu$ g/ml, in fase esponenziale di crescita, è stato aggiunto IPTG 1mM. I batteri sono stati incubati per 4 ore a 30°C in agitazione. Allo scadere di ciascuna ora di induzione è stata prelevata un aliquota di coltura che è stata processata per l'analisi in SDS-PAGE. Una stessa quantità di cellule per ciascun tempo di induzione è stata centrifugata per 10' a 14000 rpm, risospesa in buffer Laemmli (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,1% Blu di bromo fenolo; 10% glicerolo; 2,5%  $\beta$ -mercaptoetanol) e bollita per 2'.

I campioni sono stati sottoposti a elettroforesi in gel di poliacrilammide al 12.5%, con un voltaggio applicato di 50 V per 15' e 200 V per 35'. I gel sono stati quindi colorati con Blu di Comassie per 30 minuti e successivamente decolorati.

### **Purificazione delle proteine ricombinanti**

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /saplip5 e DH5 $\alpha$ /saplip6 sono stati incubati in LB con ampicillina 100  $\mu$ g/ml e kanamicina 25  $\mu$ g/ml, per una notte a 30°C. La coltura è stata rilanciata in 30 ml di LB con antibiotici fino al raggiungimento di una densità ottica di 0,6 misurata a 600 nm, ed è stato aggiunto IPTG 1mM. I batteri sono stati quindi incubati per 4 ore a 30°C in agitazione. Per mantenere la crescita esponenziale dopo due ore di induzione sono stati aggiunti alla coltura 10 ml di LB liquido con ampicillina 100  $\mu$ g/ml, kanamicina 25  $\mu$ g/ml e IPTG 1 mM.

La proteina ricombinante è stata purificata per cromatografia di affinità (Kit Ni-NTA Spin Handbond Qiagen). Il pellet di batteri è stato risospeso in buffer A pH 8 (6 M Guanidine HCl, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-HCl e 10 mM imidazolo) ed incubato per 90 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Il campione è stato centrifugato per 10 minuti a 14000 rpm, ed il sopranatante è stato caricato nelle colonnine Ni-NTA Spin Handbond (Qiagen), e centrifugato per 1' a 14000 rpm. La colonnina è stata lavata 3 volte mediante centrifugazione per 1' a 14000 rpm con buffer C pH 6,3 (8 M Urea, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,01 M Tris-HCl) contenente imidazolo 10 mM. Le proteine ricombinanti sono state infine eluite dalla colonnina due volte con 100  $\mu$ l di buffer E pH 4,5 (8 M Urea, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,01 M Tris-HCl).

Di ogni frazione ottenuta durante il processo di purificazione sono stati prelevati 10  $\mu$ l per l'analisi in SDS-PAGE in gel di acrilamide al 12,5 %. Ad essi sono stati aggiunti 10  $\mu$ l di Laemmli 2x e bolliti per 2'.

### **Quantificazione delle proteine purificate**

La proteina purificata è stata quantificata mediante Saggio di Bradford. Preparata una soluzione di albumina 10mg/ml, sono state allestite 12 diluizioni in acqua milliQ a partire da questa. Cinque microlitri di ciascuna diluizione sono stati distribuiti in pozzetti di una piastra da 96 pozzetti, ciascuna diluizione è stata caricata in triplicato. Il bianco era costituito da acqua milliQ sterile.

Una volta caricati sulla piastra i campioni, anch'essi in triplicato, sono stati aggiunti per ciascun pozzetto 195  $\mu$ l di reagente di Bradford. Dopo 15' di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati letti allo spettrofotometro a 595 nm.

### **Produzione di anticorpi policlonali murini**

Le proteine purificate sono state utilizzate come antigeni per la produzione di anticorpi monoclonali e policlonali in topi Balb-c.

Al fine di ottenere anticorpi murini specifici per le proteine ricombinanti Tvsaplip 5 e 6, topi di ceppo Balb-c di sesso femminile di età compresa tra le 4 e 6 settimane sono stati separatamente inoculati con le proteine ricombinanti in peritoneo e sotto cute, con dosi di 25  $\mu$ g, in adiuvante completo di Freund. Gli inoculi sono stati ripetuti per 3 volte a distanza di 15 giorni. Dieci giorni dopo l'ultimo inoculo i topi sono stati sacrificati.

## Immunoblotting

La proteina ricombinante TvSaplip 6 è stata analizzata in immunoblotting utilizzando gli anticorpi policlonali prodotti e sieri ottenuti da donne affette da tricomoniasi. I campioni utilizzati sono stati ottenuti da una coltura di *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /saplip6 e indotti a produrre la proteina ricombinante con IPTG 1 mM per quattro ore.

I campioni sono stati preparati per l'elettroforesi su gel di acrilamide al 12.5%: una volta centrifugati, i sedimenti sono stati risospesi in Buffer Laemmli e bolliti per 2'.

Dopo l'elettroforesi le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa, per 50 minuti a 50V.

Le membrane sono state saturate per un'ora in PBS addizionato con Tween20 0.05% e albumina 3%, quindi con i diversi anticorpi primari. In particolare sono stati utilizzati nei diversi esperimenti: 1) anticorpi  $\alpha$ -TvSapilip6 murini ottenuti come descritto (diluizione 1:300)

2) 15 sieri di donne affette da tricomoniasi (diluizione 1:200)

3) un siero policlonale di coniglio immunizzato con proteine totali di *T.vaginalis* (diluizione 1:300)

Dopo estensivi lavaggi le membrane sono state incubate con il relativo anticorpo secondario:  $\alpha$ -mouse IgG (diluizione 1:2000),  $\alpha$ -human IgG (diluizione 1:15000) e monoclonal  $\alpha$ -rabbit IgG (diluizione 1:20000), coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina. La reazione veniva sviluppata in seguito all'aggiunta di 3 ml di substrato BCIP/NBT-blue liquid substrate System for membranes (Sigma) per l'enzima.

## RISULTATI

### **Identificazione dei geni *TvSaplip* nel genoma di *Trichomonas vaginalis***

Il meccanismo di citopatogenicità del protozoo *T.vaginalis* è mediato da proteine formanti poro (PFP). La dimostrazione del coinvolgimento di perforine è stata ottenuta mediante esperimenti di interazione tra *T.vaginalis* e cellule bersaglio condotti *in vitro*. A tutt'oggi, tuttavia, il ruolo delle perforine nell'effetto citopatico di *T.vaginalis* non è stato dimostrato in modo diretto, e non sono stati individuati a livello molecolare né le pore forming proteins né i geni che le codificano.

Proteine formanti poro, appartenenti alla famiglia delle saposin-like proteins, sono state individuate ed ampiamente caratterizzate in altri protozoi, quali *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri*. E' noto che le queste proteine rivestono un ruolo fondamentale nella patogenicità dei due protozoi.

Il recente completamento della sequenza del genoma di *T.vaginalis* ha permesso di verificare la presenza, in esso, di geni codificanti per PFP. In una prima fase del lavoro di tesi sono state condotte ricerche di similarità per individuare, nel genoma di *T.vaginalis*, eventuali sequenze nucleotidiche omologhe ai geni codificanti per proteine formanti poro di *Entamoeba histolytica* e di *Naegleria fowleri*.

In particolare, sono state fatte delle ricerche di similarità utilizzando il database del genoma di *Trichomonas vaginalis* disponibile nel sito <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/>, utilizzando come query la sequenza amminoacidica di Amoebapore A del protozoo *Entamoeba histolytica*.

Tali ricerche hanno portato all'individuazione, nel genoma di *T.vaginalis*, di 12 open reading frames (ORF) con elevatissima omologia nei confronti di Amoebapore A. Le analisi di sequenza hanno permesso di individuare, per ciascuna delle 12 ORF *TvSaplip*, la presenza di uno o più domini conservati Saplip caratteristici delle proteine appartenenti alla famiglia delle Saposin-like proteins.

I risultati ottenuti hanno permesso di affermare per la prima volta che nel genoma di *T.vaginalis* sono presenti geni codificanti per proteine formanti poro.

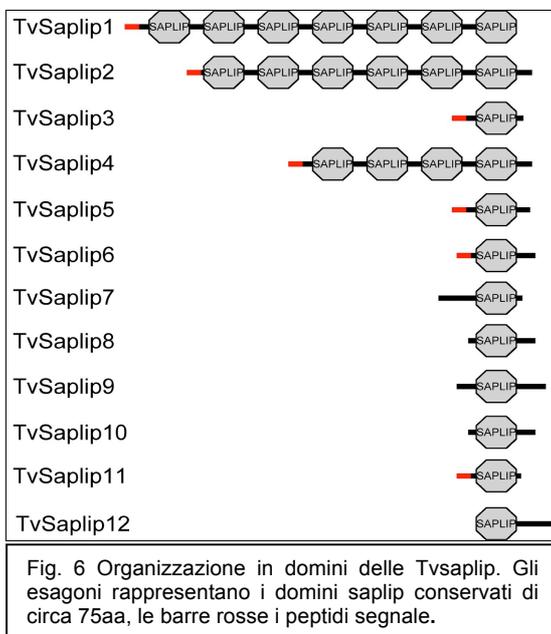
Gli ORFs sono stati denominati *TvSaplip* da 1 a 12 e corrispondono, nel genoma di *T.vaginalis*, ai seguenti loci:

TVAG_388060	TVAG_070250
TVAG_209200	TVAG_213250
TVAG_393030	TVAG_464870
TVAG_473630	TVAG_392900
TVAG_000220	TVAG_306610
TVAG_453350	TVAG_183780

## Analisi delle sequenze amminoacidiche TvSaplip

Utilizzando i software Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://www.ebi.ac.uk>), SCANPROSITE (<http://www.expasy.org/>) e SignalP 3.0 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)), sono state analizzate le sequenze amminoacidiche codificate dalle 12 Open Reading Frame *TvSaplip* da 1 a 12.

Ciascun dominio Saplip individuato è costituito da una sequenza di circa 75 residui amminoacidici con un caratteristico pattern di sei cisteine e una elevato numero di residui idrofobici.

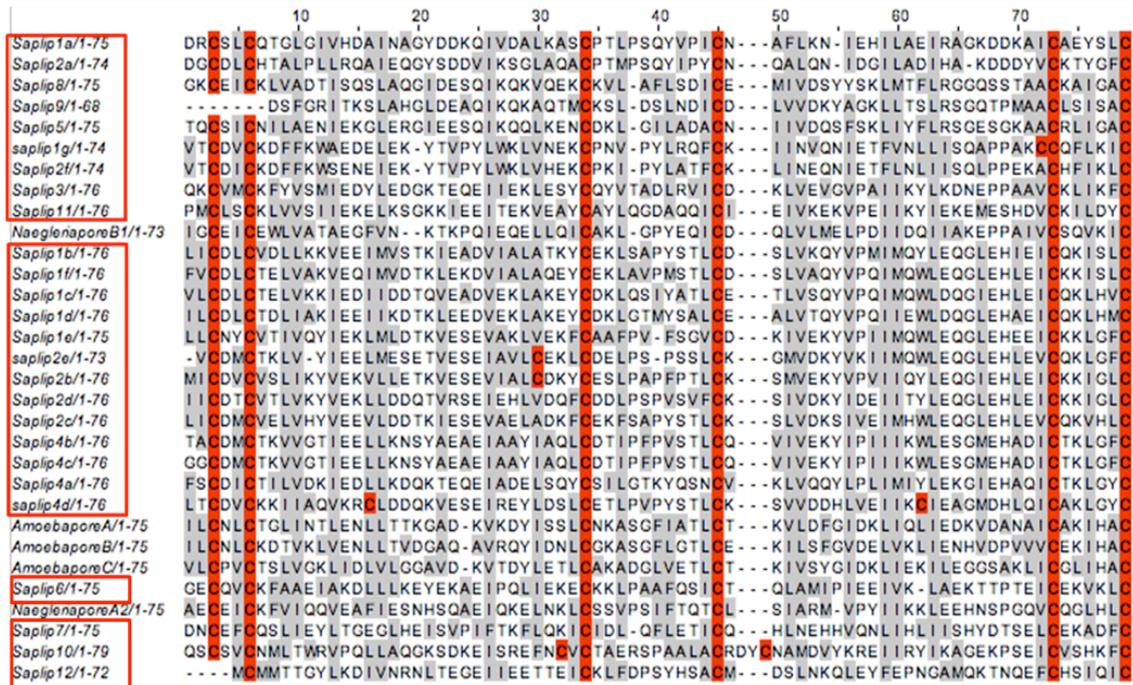


Come mostrato in figura 6, i 12 geni *TvSaplip* hanno un'organizzazione diversa tra loro. Le sequenze amminoacidiche di *TvSaplip* 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 sono infatti costituite da un unico dominio *Saplip*, organizzazione che rispecchia quella caratteristica delle tre *Amoebapores*. *TvSaplip* 1, 2 e 4, in invece, sono costituite rispettivamente da 7, 5 e 4 domini *Saplip*. Tale

organizzazione è analoga a quella delle *Naegleriapores* e delle *Saposine* umane.

Le sequenze amminoacidiche *TvSaplip* 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 11 sono caratterizzate dalla presenza di un peptide segnale in posizione N-terminale, che suggerisce che esse possano essere secrete.

Utilizzando il software ClustalW le sequenze amminoacidiche dei singoli domini Saplip delle *TvSaplip* da 1 a 12 sono state allineate con le sequenze di *Amoebapores* A, B, C e di *Naegleriapores* A and B (Fig. 7).



Carlton JM et al. *Science*. 315: 207-212. (2007).

Fig. 7 Allineamento delle sequenze amminoacidiche *TvSaplips* 1-12 con le sequenze di *Amoebapores* A, B, C e di *Naegleriapores* A e B

L'allineamento delle sequenze amminoacidiche ha messo in evidenza, in tutte le *TvSaplip*, la presenza di cisteine in posizione conservata caratteristiche dei domini Saplip. Esse sono localizzate anche nelle *TvSaplip* nelle posizioni conservate 3, 6, 34, 45, 73 e 79. La presenza di cisteine in tali posizioni è fondamentale per la formazione dei ponti disolfuro indispensabili per la funzionalità delle proteine Saplip. Fanno eccezione *TvSaplip* 9, nella quale sono presenti solo 4 delle caratteristiche cisteine, e *TvSaplip* 12 nella quale manca la cisteina in posizione 3.

Un'altra caratteristica fondamentale dei domini Saplip è l'abbondanza di residui amminoacidici idrofobici, evidenziati in grigio nella figura 7, che sono presenti in tutte le sequenze TvSaplip.

Le Amoebapores sono caratterizzate inoltre da un'istidina (H) in posizione 75. Tale residuo amminoacidico è coinvolto nel meccanismo di formazione dei pori. Un residuo di istidina è presente nella posizione corrispondente anche in TvSaplip 3 e in uno dei domini SAPLIP di TvSaplip 1 e 2. In TvSaplip 10 e 6 nella stessa posizione è invece presente un residuo di lisina (K), caratteristico di Naegleriapores. Poiché la lisina è un amminoacido con caratteristiche chimiche molto simili all'istidina, è ipotizzabile il coinvolgimento di tale amminoacido in un meccanismo di formazione dei pori analogo a quello mediato dall'istidina di Amoebapore A. In TvSaplip 4, 5, 8 e in uno dei domini Saplip di TvSaplip 1 e 2, in posizione 75 è presente una glicina (G). In TvSaplip 7, 11 e in uno dei domini Saplip di TvSaplip 1 è presente un residuo di acido aspartico (D). In TvSaplip 9 e in uno dei domini Saplip di TvSaplip 1 è presente un residuo di serina (S). Infine in TvSaplip12 è presente un residuo di glutammina (Q)

### **Caratterizzazione dei geni *TvSaplip***

Una volta individuate mediante analisi bioinformatica le 12 ORF *TvSaplip1-12*, è stato verificato se esse fossero effettivamente presenti nel DNA dei due isolati di *T.vaginalis* oggetto dello studio. A questo scopo sono state messe a punto delle PCR specifiche per ciascuna ORF, che hanno confermato la presenza di tali sequenze nel genoma di entrambi i ceppi del protozoo. La figura 8 mostra gli amplificati ottenuti con i primers specifici per le TvSaplip da 1 a 12. Gli ampliconi hanno mostrato in tutti i casi dimensioni corrispondenti a quelle attese.

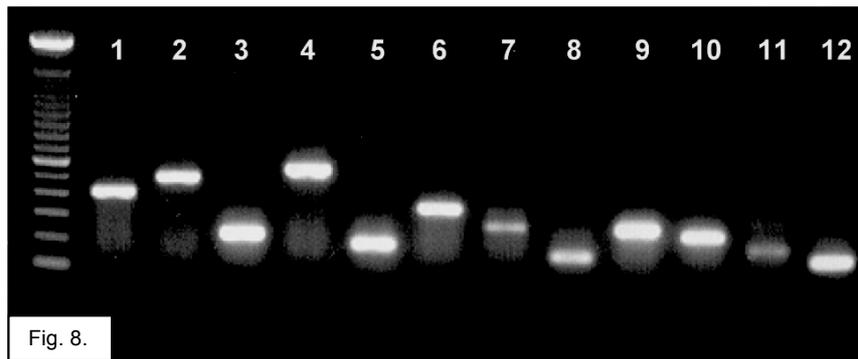


Fig. 8.

E' stato poi verificato che tutte le *TvSaplip* fossero effettivamente trascritte. Sono state quindi allestite delle RT-PCR specifiche per tali sequenze. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che tutti i geni *TvSaplip* vengono trascritti eccetto *TvSaplip 9*, come

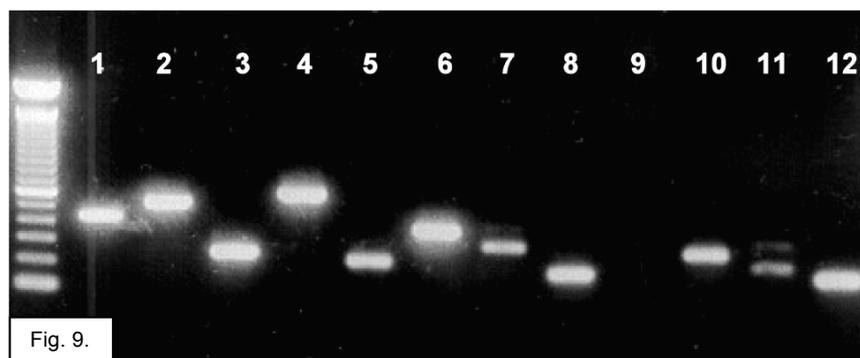


Fig. 9.

mostrato nella figura 9.

L'individuazione dei geni *TvSaplip* nel genoma di *T.vaginalis* e l'evidenza che essi vengono attivamente trascritti, fanno di questi dei forti candidati a rivestire il ruolo di effettori citolitici.

Data l'alta eterogeneità funzionale della famiglia delle saposin-like proteins, è ipotizzabile che non tutti i dodici geni *TvSaplip* siano coinvolti direttamente nell'effetto citopatico di *T.vaginalis*. Difatti tra questi vi saranno probabilmente geni coinvolti nel metabolismo lipidico o in altre funzioni cellulari. Si sono resi quindi necessari studi di

caratterizzazione funzionale dei geni *TvSaplip* per individuare quali siano effettivamente coinvolti nel meccanismo citopatico del protozoo.

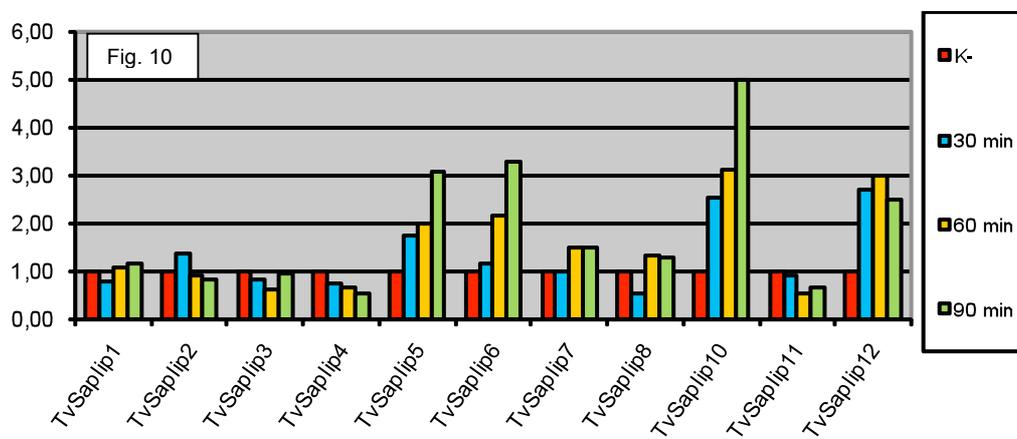
Tra i fattori che caratterizzano il meccanismo di patogenicità di *T.vaginalis*, il contatto con le membrane bersaglio e il pH giocano un ruolo fondamentale. E' stato quindi ipotizzato che tali fattori possano influenzare l'espressione dei geni *TvSaplip* coinvolti dell'attività citolitica del protozoo.

L'approccio scelto si è basato sulla messa a punto di una serie di Real Time PCR per valutare se vi fosse una modulazione dell'espressione genica dei geni *TvSaplip* in seguito al contatto di *T.vaginalis* con eritrociti umani o in seguito a variazioni del pH.

I campioni da analizzare in Real Time PCR, sono stati ottenuti mettendo i protozoi a contatto con eritrociti umani per tempi diversi. Per ciascun gene *TvSaplip* è stata messa a punto una reazione Real Time PCR multiplex, che ha permesso di valutare variazioni dei livelli di trascrizione nelle condizioni sperimentali utilizzate. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto ad un gene di riferimento, i cui livelli di trascrizione non vengono influenzati dal contatto del protozoo con i globuli rossi. Inizialmente come gene housekeeping è stato scelto il gene codificante per l'actina, una delle proteina costituenti il citoscheletro del protozoo, che è uno tra i geni housekeeping più utilizzati. Tuttavia per i nostri scopi tale gene non si è rivelato adatto, in quanto il protozoo in seguito al contatto con le cellule bersaglio subisce delle modificazioni conformazionali che determinano una trasformazione della cellula da piriforme in ameboide. Tale modificazione coinvolge le proteine del citoscheletro, tra le quali l'actina, i cui livelli di trascrizione in tali circostanze subiscono delle fluttuazioni.

Di conseguenza è stato scelto come gene di riferimento il gene per l'RNA ribosomiale 18S, che nelle condizioni sperimentali utilizzate mantiene costanti i livelli di trascrizione.

I risultati ottenuti dalle reazioni di Real Time PCR, mostrati in figura 10, hanno dimostrato che tutti i geni *TvSaplip* analizzati sono costitutivamente trascritti, confermando il risultato della RT-PCR.



I geni *TvSaplip 5, 6, 10 e 12* subiscono un significativo incremento dei livelli di trascrizione dopo contatto con le cellule bersaglio. Al contrario i livelli di trascrizione di tutti gli altri geni *TvSaplip* analizzati non vengono influenzati, in modo apprezzabile, dal contatto del protozoo con le membrane bersaglio.

In particolare il gene *TvSaplip 5* subisce un incremento graduale dei livelli di trascrizione, con un incremento di 2 volte dopo 60 minuti di contatto con le membrane bersaglio che diventa di 3 volte dopo ulteriori 30 minuti. Lo stesso andamento si osserva per il gene *TvSaplip 6*.

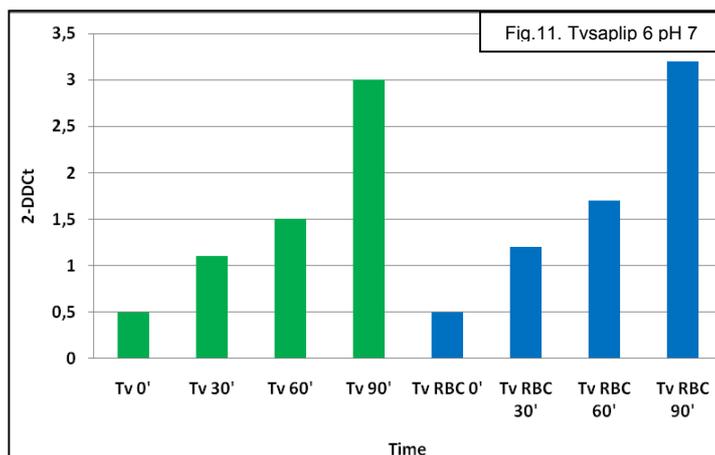
Il gene *TvSaplip 10* è caratterizzato da un aumento ancora più marcato dei livelli di trascrizione, con un incremento di tre volte dopo 60 minuti, che raggiunge valori 5 volte superiori rispetto a quelli iniziali nei 30 minuti successivi.

*TvSaplip 12* subisce un aumento dei livelli di trascrizione più rapido rispetto agli altri geni *TvSaplip*, con un incremento di circa 3 volte ai 60 minuti, che però rimane costante nei 30 minuti successivi.

Il lavoro di tesi si è concentrato sulla caratterizzazione dei geni *TvSaplip 5, 6 e 12* e sulla definizione di un loro ruolo nel meccanismo di patogenicità di *T.vaginalis*.

Tenendo conto della notevole influenza che il pH ha sulla attività emolitica di *T.vaginalis*, è stato verificato se esso fosse un parametro influenzante i livelli di trascrizione dei geni *TvSaplip* sui quali è stato concentrato l'interesse. Sono stati messi a punto esperimenti in cui i protozoi in presenza di membrane bersaglio e non venivano incubati in medium a pH 7. Gli stessi esperimenti sono stati condotti utilizzando un medium a pH 6.

I risultati, valutati in Real Time PCR multiplex, ottenuti a partire da esperimenti nei quali

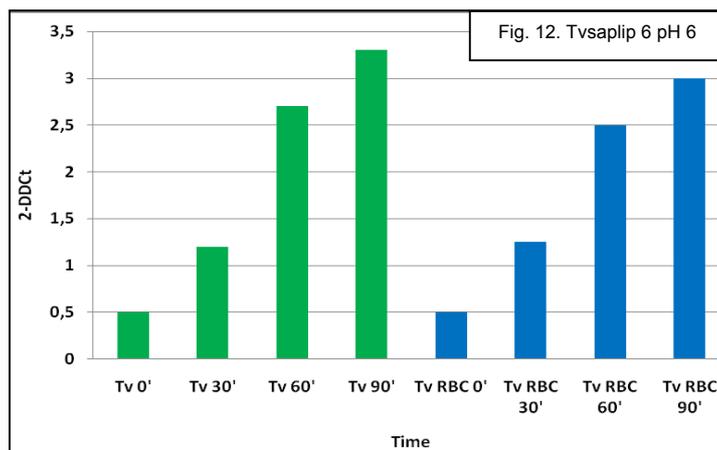


i protozoi venivano messi a contatto con cellule bersaglio in un medium a pH 7 (fig.11), hanno evidenziato che *TvSaplip 5 e 6* sono influenzati dal pH nel determinare l'aumento dei

livelli di trascrizione. Infatti è stato osservato un incremento graduale dei livelli di trascrizione negli esperimenti condotti a pH7 di partenza, sia nei campioni nei quali i

protozoi venivano messi a contatto con gli eritrociti, che nei controlli di *T. vaginalis* non a contatto con gli eritrociti.

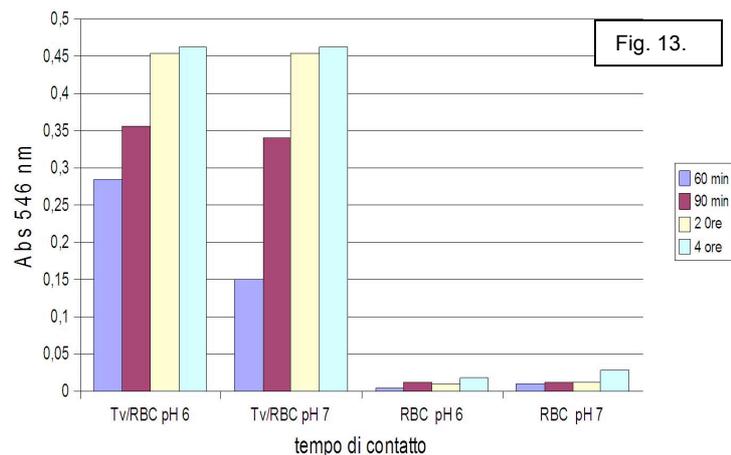
I risultati degli stessi esperimenti condotti a pH 6 (Fig.12) mostrano un incremento dei livelli di trascrizione più immediato. Infatti già dopo 60' si ha un incremento dei livelli di



trascrizione di circa 2 volte rispetto ai valori calcolati all'inizio dell'esperimento. Tale risultato può essere spiegato tenendo conto che il protozoo si trova già in un ambiente con caratteristiche di acidità ottimali perché

possa spiegare la sua azione patogena. Tali risultati trovano riscontro con i dati ottenuti dal monitoraggio dell'attività emolitica del protozoo nel corso dell'esperimento (Fig.13). Infatti nel corso degli esperimenti è stata monitorata l'attività emolitica di

*T. vaginalis* attraverso la quantificazione spettrofotometrica dell'emoglobina rilasciata in seguito alla lisi degli eritrociti. Le evidenze sperimentali hanno dimostrato che negli



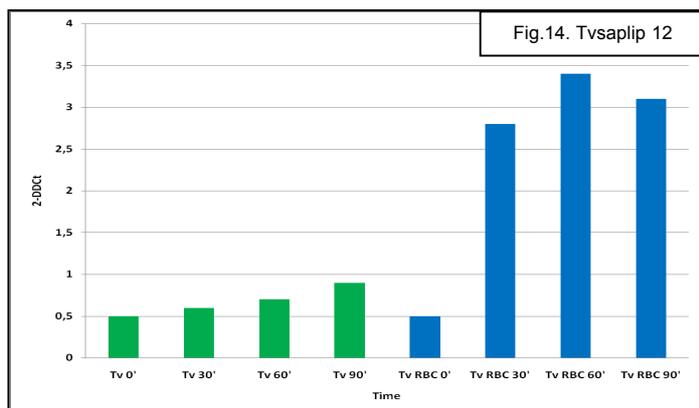
esperimenti in cui il pH di partenza del medium era 7 l'emolisi aveva inizio dopo circa 90' di contatto tra il protozoo e le membrane bersaglio. Al contrario negli esperimenti in

cui il pH di partenza del medium era 6 è stata osservata un'attività emolitica rilevante già dopo 60' di contatto.

Contemporaneamente, durante gli esperimenti, è stato monitorato anche il pH del medium. Ai vari tempi di contatto, è stata osservata una progressiva acidificazione del medium in seguito all'attività metabolica del protozoo. Infatti dopo 90' di contatto con le membrane bersaglio negli esperimenti in cui il pH iniziale era 7, è stato raggiunto il valore di 5,98, mentre negli esperimenti in cui il pH iniziale era 6 è stato raggiunto il valore di 5,03. Tali osservazioni evidenziano che *T.vaginalis* esplica la propria attività emolitica quando il pH ambientale raggiunge il valore circa 6.

Esperimenti analoghi a quelli per i geni *TvSaplip5* e *6* sono stati condotti per il gene *TvSaplip 12* (Fig. 14).

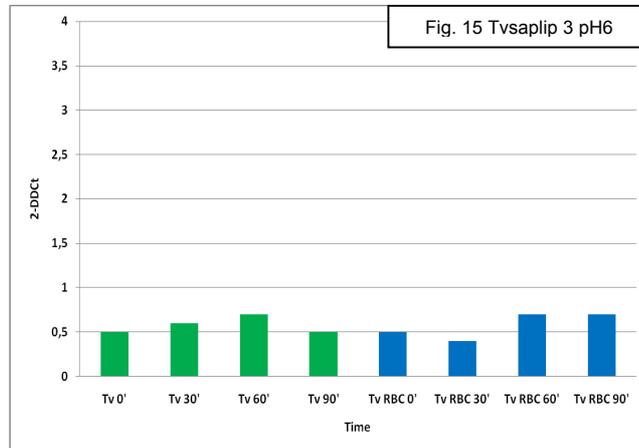
I risultati ottenuti hanno evidenziato che i livelli di trascrizione gene *TvSaplip 12* vengono influenzati dal contatto con le membrane bersaglio, mentre il pH non sembra avere nessun ruolo nel



modulare l'espressione di tale gene. Infatti in assenza delle membrane bersaglio, i protozoi sia negli esperimenti condotti a pH 7 che a pH 6 non subiscono incrementi dei livelli di trascrizione determinati dall'acidificazione del mezzo.

L'influenza del pH sui livelli di trascrizione dei geni *TvSaplip* è stata verificata anche per i geni che non mostravano una modulazione in seguito al contatto del protozoo con

le cellule bersaglio. I risultati ottenuti hanno evidenziato che tali geni non vengono influenzati né dal contatto con cellule bersaglio né dal pH (Fig.15).



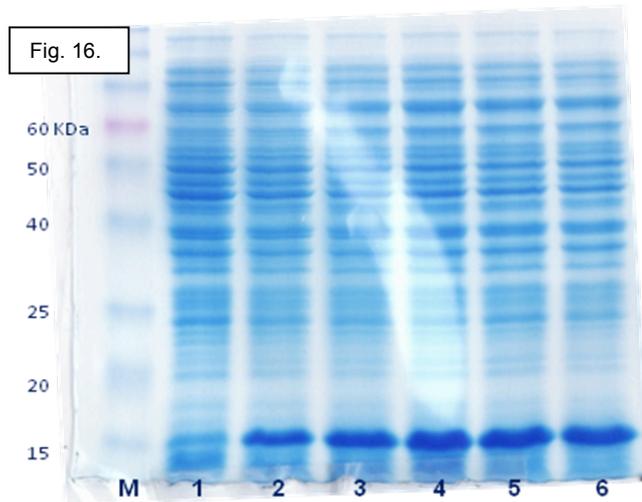
### Produzione delle proteine ricombinanti TvSaplip 5 e TvSaplip 6

I geni *TvSaplip5* e *6* sono stati clonati utilizzando il vettore di espressione pQE30 che permette una facile purificazione dei prodotti ricombinanti espressi.

Per l'espressione della proteina ricombinate è stato utilizzato un sistema procariotico, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . L'induzione dei batteri con IPTG ha determinato la produzione della proteina ricombinante che nel caso di *TvSaplip 6* viene prodotta basalmente anche dai batteri non indotti mentre *TvSaplip 5* viene prodotta solo in seguito all'induzione. In entrambi i sistemi, già dopo un ora di induzione si ha un notevole incremento nella produzione della proteina.

Le proteine ricombinanti *TvSaplip 5* e *6* sono state analizzate in SDS-PAGE nel pattern di proteine totali di *E.coli* DH5 $\alpha$ /*saplip5* e DH5 $\alpha$ /*saplip6* indotti e non indotti. La dimensione delle proteine ricombinanti è stata stabilita, esse hanno un peso molecolare di 12 e 14 kDa rispettivamente.

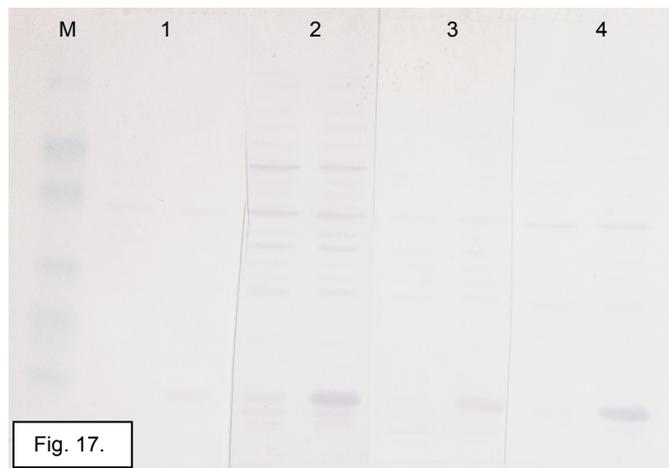
L'immagine (Fig.16) mostra un gel di acrilamide colorato con Blu di Comassie nella



lane 1 sono state corse proteine totali di *E.coli* DH5 $\alpha$ /saplip6 non indotti mentre nelle lane da 2 a 6 sono presenti le stesse quantità di proteine totali di batteri indotti raccolte in 5 ore di induzione allo scadere di ciascuna ora.

Le proteine ricombinanti TvSaplip 5 e 6 sono state poi purificate per cromatografia di affinità, quantificate attraverso un saggio di Bradford, ed utilizzate come antigeni per la produzione di anticorpi policlonali in topi Balb-c.

La proteina ricombinante TvSaplip 6 è stata inoltre utilizzata per saggiare, mediante immunoblotting, la reattività specifica di sieri di donne con tricomoniasi e senza



tricomoniasi. I risultati ottenuti evidenziano che la proteina ricombinante viene riconosciuta in maniera specifica dai sieri di donna con tricomoniasi ma non dai controlli non infetti.

L'immagine (Fig.17) mostra la reattività di 4 sieri di donne con

tricomoniasi nei confronti di proteine totali di *E.coli* DH5 $\alpha$ /TvSaplip6, non indotti e indotti con IPTG.

Gli anticorpi  $\alpha$ -TvSaplip 6 murini sono stati saggiati in immunoblotting utilizzando come antigene proteine totali di *T.vaginalis*. L'immagine (Fig.18) mostra un'immunoblotting

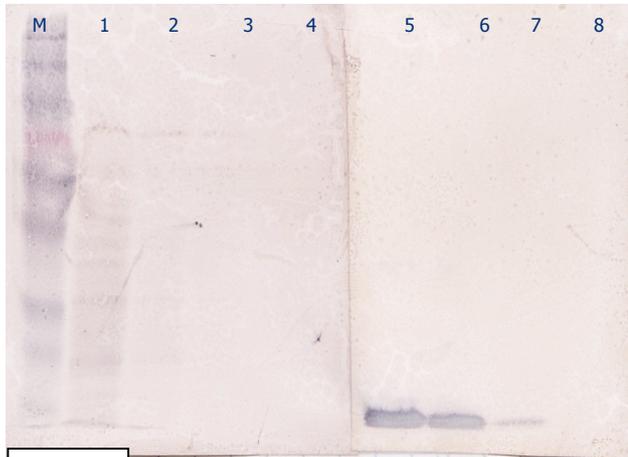


Fig. 18.

nel quale nelle prime 4 lanes dopo il marker sono state caricate concentrazioni decrescenti di proteine totali di *T.vaginalis*, mentre nelle successive lanes sono state caricate concentrazioni decrescenti della proteina ricombinante purificata. La membrana è stata poi

incubata con anticorpi  $\alpha$ -TvSaplip 6 specifici. I risultati ottenuti hanno evidenziato una reattività specifica degli anticorpi verso la proteina ricombinante, ma non verso la proteina nativa. Gli anticorpi  $\alpha$ -TvSaplip 6 sono stati quindi testati in dot-blot per valutare se l'antigenicità della proteina nativa fosse sensibile alla denaturazione effettuata nella preparazione del campione per l'immunoblotting. Sono stati saggiati campioni preparati secondo protocolli denaturanti e non denaturanti, riducenti e non riducenti. I risultati ottenuti mostrano che la proteina nativa non viene riconosciuta dagli anticorpi murini se trattata con agenti denaturanti quali il sodio dodecil solfato e se sottoposta a bollitura.

I risultati ottenuti in condizioni non denaturanti hanno evidenziato la presenza di TvSaplip6 nel campione costituito dai protozoi incubati a pH 6 a contatto con i globuli rossi in quantità maggiori rispetto ai protozoi non attivati.

### **Localizzazione della proteina TvSaplip 6 in immunofluorescenza**

Gli anticorpi  $\alpha$ -TvSaplip 6 sono stati utilizzati per determinare la localizzazione di TvSaplip 6 nella cellula attraverso tecniche di immunofluorescenza. I risultati dimostrano che la proteina si trova, nelle cellule protozoarie, all'interno di granuli citoplasmatici. Dopo il contatto con le membrane bersaglio la proteina si ritrova sulla superficie di membrana delle emazie. Ciò avvalorata l'ipotesi che il contatto del protozoo con le cellule bersaglio determini la secrezione di proteine formanti poro che si inseriscono nella membrana di cellule bersaglio determinandone la lisi.

## DISCUSSIONE

*Trichomonas vaginalis* è l'agente eziologico di una delle malattie a trasmissione sessuale più diffuse al mondo. Benchè sia stato osservato la prima volta da Donné nel 1836, la prima dimostrazione che esso è patogeno si è avuta solo dopo il 1940, ed è da allora che il protozoo è diventato oggetto di studio.

Nel mondo si registrano 200 milioni di casi di infezione, con 7-8 milioni di nuovi casi ogni anno. L'infezione si manifesta generalmente nella donna con una vaginite, mentre nel maschio è nella maggior parte dei casi asintomatica. *T.vaginalis* infetta principalmente l'epitelio del tratto genitale. Nella donna il quadro clinico della tricomoniasi può andare dallo stato di portatore asintomatico alla vaginite conclamata. Nella maggior parte dei casi l'infezione risponde alla terapia e si risolve senza conseguenze, ma talvolta possono subentrare complicazioni. L'infezione nella donna ha infatti tendenza a cronicizzare, e l'infezione cronica è stata messa da diversi ricercatori in relazione con un'aumentata insorgenza di neoplasie della cervice. Inoltre è stata osservata una suscettibilità all'infezione da HIV sei volte maggiore nelle donne affette da tricomoniasi. Il protozoo infatti durante l'infezione esercita un effetto citopatico nei confronti delle cellule dell'epitelio vaginale, con conseguenti interruzioni della continuità dell'epitelio: le microlacerazioni che ne conseguono sembrano costituire una via di accesso per il virus durante rapporti con individui infetti da HIV.

Nonostante la riconosciuta rilevanza dell'infezione da *Trichomonas vaginalis*, i meccanismi cellulari che sono alla base della patogenicità del protozoo non stati completamente definiti. Dal 1943 in avanti sono stati compiuti notevoli sforzi per

chiarire i rapporti tra *T.vaginalis* e cellule epiteliali, che sono il principale bersaglio del suo effetto citopatico. Dal 1957 *T.vaginalis* è coltivabile axenicamente in vitro e questo ha permesso l'allestimento di numerosi modelli sperimentali, con linee cellulari di diversa origine. Il notevole impegno profuso non ha però portato finora a comprendere, a livello molecolare, i meccanismi citolesivi utilizzati dal protozoo. Sino agli anni novanta gli unici dati disponibili portavano a ritenere che *T.vaginalis* non secernesse molecole tossiche e che il meccanismo fosse piuttosto contatto-dipendente. Il lavoro svolto negli ultimi anni dal gruppo di ricerca dell'Università di Sassari ha permesso di descrivere e caratterizzare l'attività citotossica di *T.vaginalis*. Essa è mediata da proteine formanti poro (PFP), molecole in grado di inserirsi nel doppio strato lipidico delle cellule bersaglio, formando canali transmembrana che determinano la lisi osmotica e la morte cellulare. L'effetto citopatico è conseguente ad un intimo contatto tra protozoo e cellula bersaglio, che determina l'instaurarsi di un microambiente tra le membrane, nel quale si vengono a realizzare le condizioni ottimali perché le proteine formanti poro possano svolgere la loro azione. Le perforine di *T.vaginalis* infatti vengono secrete e sono attive solamente in un ambiente nel quale il pH abbia valori intorno a 6.

Questo meccanismo di azione litica nei confronti delle cellule bersaglio è stato già descritto in *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri*, protozoi che utilizzano proteine formanti poro per danneggiare le cellule dell'ospite. Le PFP di *E.histolytica* e di *Naegleria fowleri* appartengono ad una famiglia di molecole note come saposin-like proteins (SAPLIP) e sono state chiamate rispettivamente Amoebapore e Naegleriapore.

Il ruolo delle pore forming proteins in *T.vaginalis* è stato finora dimostrato solo indirettamente, attraverso esperimenti che dimostrano la formazione di pori funzionali del diametro di circa 1,2 nanometri sulle membrane bersaglio. Tuttavia i geni e gli effettori coinvolti nell'effetto citopatico del protozoo non sono stati finora descritti.

Il lavoro di tesi di Dottorato ha avuto come fine quello di individuare e caratterizzare geni codificanti per proteine formanti poro nel genoma di *T.vaginalis*.

Partendo dal presupposto che il meccanismo di patogenicità di *T.vaginalis* mostra numerose similitudini con quello ormai noto di *E.histolytica* e di *N.fowleri*, sono state ricercate sequenze geniche che avessero una elevata omologia con i geni codificanti per Amoebapore e Naegleriapore.

L'analisi bioinformatica del genoma di *T.vaginalis*, recentemente sequenziato, ha portato all'individuazione di dodici open reading frames (ORF) caratterizzati dalla presenza di uno o più domini Saplip. Le sequenze amminoacidiche dedotte presentano un altissimo grado di omologia nei confronti delle pore forming proteins di *E.histolytica* e *N.fowleri*. Le ORF individuate sono state chiamate *TvSaplip* da 1 a 12.

Le sequenze *TvSaplip* sono tutte costituite da uno o più domini estremamente conservati. Tali domini, detti Saplip, sono caratterizzati da uno scheletro conservato che presenta 6 residui di cisteina in posizione invariante, che occupano nelle *TvSaplip* le medesime posizioni che si riscontrano in Amoebapores e Naegleriapores. Le *TvSaplip*, inoltre, presentano un'elevata percentuale di residui amminoacidici idrofobici, anch'essa caratteristica tipica di tutte le proteine appartenenti alla famiglia delle SAPLIP.

I 12 candidati geni *TvSaplip*, pur nella loro omogeneità, mostrano delle importanti differenze strutturali. *TvSaplip* 1, 2 e 4 infatti sono caratterizzati dalla presenza di più

domini Saplip, in particolare da 7, 5 e 4 domini Saplip rispettivamente. Una tale organizzazione multidominio è piuttosto diffusa in Natura. Essa si riscontra, ad esempio, nelle pore forming proteins di *N.fowleri* e nelle saposine umane, che vengono sintetizzate come lunghi precursori contenenti diversi domini Saplip, da cui vengono rilasciati, per proteolisi, peptidi biologicamente attivi costituiti da circa 77 amminoacidi. Il fatto che esista un precursore che viene clivato dando origine a diverse isoforme proteiche attive, permette al microrganismo di produrre contemporaneamente diverse proteine formanti poro. Ciò determina una maggiore aggressività ed un più ampio spettro di cellule bersaglio. Date le omologie strutturali di TvSaplip 1, 2 e 4 con le Naegleriapores e le saposine umane, è ipotizzabile che esse vengano prodotte attraverso un meccanismo analogo.

Tutte le altre TvSaplip sono invece costituite da un unico dominio Saplip, con un'organizzazione simile a quella delle Amoebapores.

In Amoebapore A in posizione 75 è presente un'istidina (H), direttamente coinvolta nel meccanismo di formazione dei pori. A pH acido il residuo di istidina viene protonato, consentendo la formazione di un dimeri per interazione elettrostatica con un residuo di acido aspartico carico negativamente presente in un altro monomero. Di seguito vengono aggiunti nuovi dimeri sino ad ottenere una struttura esamerica ad anello, che ha la superficie esterna di natura idrofobica e il canale interno su cui si affacciano residui polari di natura idrofilica, con formazione di un poro di circa 2 nm. Questo tipo di struttura si inserisce nelle membrane delle cellule bersaglio formando un canale che determina la lisi osmotica. Ciò spiega perché il meccanismo di formazione dei pori da parte di Amoebapore e Naegleriapore sia dipendente dal pH acido dell'ambiente. Anche *T.vaginalis* necessita di un pH acido perché possa esercitare l'effetto citopatico

e, in omologia con *Entamoeba histolytica*, TvSaplip 1, 2 e 3 presentano un residuo di istidina in posizione 75.

In TvSaplip10 e TvSaplip6 in posizione 75 è invece presente un residuo di lisina (K), come in Naegleriapores (170). La lisina è un amminoacido protonabile con caratteristiche chimiche e funzionali simili all'istidina. Ciò permette pertanto di ipotizzare il coinvolgimento di tale amminoacido in un meccanismo di formazione dei pori analogo a quello ormai caratterizzato dell'istidina di Amoebapore A (166, 167).

Le analisi di sequenza hanno permesso inoltre di evidenziare la presenza di peptidi segnale in posizione N-terminale in TvSaplip da 1 a 6 e in TvSaplip 11, suggerendo una loro possibile secrezione da parte del protozoo. Le TvSaplip 7, 8, 9, 10 e 12, che non presentano peptidi segnale, potrebbero essere compartimentalizzate in granuli citoplasmatici e liberate al momento opportuno mediante un meccanismo esocitotico, come accade per Amoebapores.

Le caratteristiche strutturali di alcune TvSaplip rafforzano l'ipotesi che queste possano essere direttamente coinvolte nel meccanismo di patogenicità di *T.vaginalis*, in omologia a quanto avviene in *Entamoeba histolytica* e in *Naegleria fowleri*.

E' noto che alcune delle proteine Saplip esistenti in Natura non sono coinvolte in meccanismi di patogenicità. Alcune di esse, infatti, sono coinvolte nel metabolismo lipidico cellulare, come accade ad esempio per le saposine umane. E' ipotizzabile pertanto che non tutti i dodici geni putativi *TvSaplip* siano direttamente coinvolti nella formazione di pori, ma che una parte di essi svolgano un ruolo diverso nel metabolismo del protozoo.

Per studiare l'effettivo coinvolgimento dei geni *TvSaplip* nella patogenicità di *T.vaginalis* sono stati allestiti esperimenti *in vitro* nei quali i protozoi erano messi a

contatto con eritrociti umani. I globuli rossi infatti rappresentano il modello di cellule bersaglio ottimale, e sono stati già utilizzati in tutti gli esperimenti di caratterizzazione del meccanismo di effetto citopatico da parte di *T.vaginalis* a suo tempo condotti.

I risultati dimostrano che dei dodici geni *TvSaplip* solo *TvSaplip9* non viene espresso neanche dopo contatto con le cellule bersaglio. Degli altri undici solo quattro (*TvSaplip5*, *TvSaplip6*, *TvSaplip10* e *TvSaplip12*) mostrano un incremento nell'espressione nelle condizioni sperimentali utilizzate. L'espressione è stata valutata in multiplex Real Time PCR, normalizzando i risultati rispetto al gene di riferimento codificante per l'RNA ribosomiale 18S. L'incremento è di circa tre volte rispetto al valore basale (cioè prima del contatto con le cellule bersaglio) e si determina entro 90 minuti. Questi dati ci hanno portato a restringere lo studio ai quattro geni *TvSaplip* che hanno mostrato di essere attivati in seguito al contatto con le membrane bersaglio. Tra essi, particolare interesse hanno suscitato *TvSaplip5* e *TvSaplip6*, in quanto entrambi presentano tutte le caratteristiche dei domini Saplip biologicamente attivi. Le sequenze aminoacidi che da essi dedotte, infatti, presentano sia il peptide segnale che tutte e sei le cisteine nelle posizioni conservate. *TvSaplip6*, inoltre, possiede in posizione 75 una lisina, che può svolgere una funzione analoga a quella svolta dall'istidina di Amoebapore A nell'assemblaggio pH dipendente dei monomeri.

E' noto che oltre al diretto contatto con le membrane bersaglio, anche il pH gioca un ruolo chiave nella realizzazione dell'effetto citopatico di *T.vaginalis*. E' stato quindi determinato il ruolo giocato dal pH sull'attivazione dei geni *TvSaplip*. I risultati hanno dimostrato che i geni *TvSaplip5* e *TvSaplip6* sono influenzati dal pH, che deve avere valori intorno a 6 perché si verifichi l'incremento dell'espressione genica. Questi dati sono in perfetto accordo con quanto dimostrato in precedenza dal gruppo di Rappelli

(&), e cioè che l'effetto emolitico di *T.vaginalis* si realizza solo a pH 6, ed è completamente inibito a pH 7. Nel caso di *TvSaplip12* invece l'attivazione si verifica solo dopo contatto con le membrane bersaglio, e non è sufficiente il solo abbassamento dei valori di pH perché si abbia un aumento dell'espressione genica.

Per dimostrare in maniera conclusiva il ruolo svolto da *TvSaplip5* e *TvSaplip6* nella patogenicità di *T.vaginalis* è necessario procedere ad un'inibizione selettiva dei geni o dei loro prodotti.

In questo lavoro si è scelto di produrre anticorpi specifici per le proteine codificate dai geni *TvSaplip5* e *TvSaplip6*. Gli anticorpi specifici infatti rappresentano gli strumenti ideali sia per l'inibizione funzionale delle proteine oggetto dello studio, che per la loro caratterizzazione.

Per ottenere anticorpi specifici è stato necessario produrre *TvSaplip5* e *TvSaplip6* in forma ricombinante, ed inocularle in topi Balb/c. Sono stati finora ottenuti anticorpi policlonali anti-*TvSaplip6*, con i quali è stato possibile per la prima volta iniziare la caratterizzazione delle proteine formanti poro di *T.vaginalis*.

Esperimenti condotti in immunofluorescenza, utilizzando l'anticorpo anti-*TvSaplip6*, hanno dimostrato la presenza della proteina *Tvsaplip6* nel citoplasma di *T.vaginalis*, con una localizzazione apparentemente compartimentalizzata in microvescicole. Il contatto del protozoo con i globuli rossi determina un significativo aumento della fluorescenza, con una cinetica perfettamente sovrapponibile a quella ottenuta misurando la lisi le cellule bersaglio e a quella osservata in Real Time PCR relativa all'attivazione del gene. I globuli rossi a contatto con *T.vaginalis* diventano a loro volta rapidamente fluorescenti in periferia, confermando l'ipotesi di un'inserzione della proteina *TvSaplip* nella membrana delle cellule bersaglio. Gli anticorpi hanno inoltre

mostrato un'ottima reattività nei confronti della proteina ricombinante, ma non hanno riconosciuto in una prima fase la proteina nativa in immunoblotting. Esperimenti condotti facendo avvenire l'elettroforesi in condizioni denaturanti e non denaturanti, riducenti e non riducenti, hanno poi dimostrato che la forma nativa di TvSaplip6 viene riconosciuta dall'anticorpo solo se non denaturata. Ciò ha di fatto limitato le possibilità di caratterizzazione della proteina attraverso l'uso degli anticorpi specifici. E' tuttora in corso la produzione di anticorpi monoclonali anti TvSaplip5 e anti TvSaplip6, che consentiranno di disporre di strumenti epitopo-specifici, che auspicabilmente consentano di superare i problemi riscontrati con il siero policlonale di topo sinora utilizzato.

La proteina ricombinante è stata riconosciuta in modo specifico da sieri di donne affette da tricomoniasi, mentre non è riconosciuta affatto da sieri di donne non infette e di bambini. Questi risultati rafforzano l'ipotesi di un ruolo chiave di TvSaplip6 nel manifestarsi degli effetti dell'infezione da *T.vaginalis*. D'altra parte se è vero che, come suggerito dai risultati ottenuti in immunofluorescenza, la proteina si accumula sulla superficie delle membrane bersaglio, è possibile che essa sia particolarmente esposta al sistema immunitario dell'ospite, e stimoli per questo motivo un'importante risposta anticorpale.

La definizione dell'effettivo ruolo svolto dai geni *TvSaplip* nella patogenesi dell'infezione da *Trichomoans vaginalis* è in questo momento uno dei punti cruciali intorno ai quale ruota l'interesse scientifico nei confronti del protozoo. La definizione dei meccanismi molecolari che sono alla base della patogenicità del protozoo consentirà infatti di dare nuovo impulso agli studi, sia di base che clinici.

I risultati ottenuti nel lavoro di tesi di Dottorato hanno permesso di descrivere e di caratterizzare per la prima volta una perforina ed il suo gene in *T.vaginalis*. I dati ottenuti contribuiscono a definire in maggiore dettaglio i meccanismi molecolari alla base della patogenicità di *Trichomonas vaginalis*. Ciò potrà rappresentare un elemento importante nel quadro più ampio della caratterizzazione della patogenicità dei microorganismi, anche in considerazione del fatto che il protozoo rappresenta un interessante modello per il più generale studio delle complesse relazioni ospite-parassita.

Inoltre è noto che gli effettori di patogenicità sono i migliori candidati per la messa a punto di protocolli vaccinali. La caratterizzazione delle pore forming proteins in *Trichomonas vaginalis* e la migliore definizione del ruolo che esse svolgono nei meccanismi di patogenicità del protozoo renderà disponibili nuovi potenziali bersagli per un'efficace profilassi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) **Van Der Pol B.** (2007) *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent non viral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clin. Infect. Dis.* 44: 23-5.
- 2) **Schwebke J.R., Burgess D.** (2004) Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:794-803.
- 3) **Leipe M., Herbst R.** (2004) Ancient weapons for attack and defence: the pore forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *J. Eukariot. Microbiol.* 51: 516-521.
- 4) **Bruhn H.** (2005) A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem. J.* 389: 249-257.
- 5) **Dailey D.C., Chang T.H., and Alderete J.F.** (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101:171–175.
- 6) **Fiori P.L., Rappelli P., Rocchigiani A.M., and Cappuccinelli P.** (1993). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* 109:13–18.
- 7) **Fiori P.L., Rappelli P., Addis M.F, Secchi A., and Cappuccinelli P.** (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore forming proteins. *Microbiol. Pathog.* 20: 109–118.
- 8) **Donnè A.** (1836) Animacules observés dans le matières purulente set le produit des sécrétions des organes genitiaux de l'homme et de la femme. *C.R. Sci Paris* 3: 385-386.
- 9) **Weistock H., Berman S., Cates W. Jr.** (2004) Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect. Sex. Reprod. Health* 36: 6-10.
- 10) **Van Der Pol B., Williams J.A., Orr D. P., Batteiger B. E., Fortenberry J.D.** (2005) Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of

*Trichomonas vaginalis* infection among adolescent woman. *J. Infect. Dis.* 192: 2039-44.

- 11) **Su-Lin Ke.** (1982). Antibody to *Trichomonas vaginalis* in human cervicovaginal secretions. *Infect. Immun.* 37: 852-857.
- 12) **Plitt S.S., Garfein R.S., Gaydos C.A., Strathdee S.A., Sherman S.G., Taha T.E.** (2005) Prevalence and correlates of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* infections, and bacterial vaginosis among a cohort of young injection drug users in Baltimore Maryland. *Sex Transm. Dis.* 32: 446-453.
- 13) **Minnesota Department of Human Services** (2003) External Quality Review Sexually Transmitted Diseases. *Michigan Peer Review Organization 40600 Ann Arbor Road, Suite 200 • Plymouth, Michigan 48170-4495 • (734) 459-0900.*
- 14) **Krieger J.N., Wolner-Hanssen P., Stevens C., e Holmes K.K.** (1990). Characteristics of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without Colpitis macularis. *J. Infect. Dis.* 161: 307-311.
- 15) **Valandkhani Z** (2004). Role of Ph on adhesion of *Trichomonas vaginalis* isolated from symptomatic and asymptomatic women to vaginal epithelial cells in vitro. *IJMS.* 29: 134-138.
- 16) **Sobel J. D.** (2005) What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis? *Infect. Dis. Clin.* 19: 387-406.
- 17) **Soper D.** (2004) Trichomoniasis: under control or controlled? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190: 281-290.
- 18) **Wolner-Hanssen, P., Krieger J. N., Stevens C. E., Kiviat N. B., Koutsky L., Critchlow C., De Rouen T., Hillier S., and Holmes K. K.** (1989) Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *JAMA* 261:571–576.
- 19) **Lehker M.W., Alderete J.F.** (1992) Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol. Microbiol.* 6: 123-132.

- 20) Cotch M.F., Pastorek J.G., Nugent R.P. et al.** (1997) *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sex. Transm. Dis.* 24: 353-60.
- 21) Klebanoff M.A., Carey J.C., Haunth J.C., et al.** (2001) Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *N. Engl. J. Med.* 345: 487-493.
- 22) Carter, J. E., and K. C. Whithaus.** (2008) Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:17–19.
- 23) Nanda N.** (2006) Trichomoniasis and its treatment. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 4: 125-135.
- 24) Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison C.S.** (2008) *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis.* 197(4):548-54.
- 25) McClelland, R.S., Sangare, L., Hassan, W.M., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., Ndinya-Achola, J., Jaoko, W., Baeten, J.M.** (2007) Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J. Infect. Dis.* 195, 698–702.
- 26) Skerk V., Schonwald S., Krhen I.** (2002) Aetiology of chronic prostatitis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 19: 471-474.
- 27) Martinez-Garcia F., Regardera J., Mayer R.** (1996) Protozoan infections in the male genital tract. *J. Urol.* 156: 340-349.
- 28) Sutcliffe S.** (2006) Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 939-945.
- 29) 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.

- 30) Honigberg B.M., King V.M.** (1964) Structure of *Trichomonas vaginalis* Donnè. *J. Parasitol.* 50: 345-364.
- 31) Zubáčková Z., Cimbuřek Z., Tachezy J.** (2008) Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *J. Mol. Bioc Parasitol.* 161: 49–54.
- 32) Honigberg B.M., Brugeolle G.** (1990) In: Trichomonads parasitic in humans. *Structure.* pp. 5-35 Ed Springer-verlag, New York USA.
- 33) Carlton J.M.** (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315: 207-212.
- 34) Warton A., Honigberg B.M.** (1979) Structure of Trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *J. Protozool.* 26: 56-62.
- 35) Müller M.** (1980) The hydrogenosome. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 30: 365-372.
- 36) Müller M.** (1993) The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2879-2889.
- 37) Nielsen M.N., Diemer N.H.** (1976) The size, density, and relative area of chromatic granules (“hydrogenosomes”) in *Trichomonas vaginalis*. Donnè from cultures in logarithmic and stationary growth. *Cell. Tissue Res.* 167: 461-465.
- 38) Honigberg B.M., Volkman D., Entzeroth R., Scholtyseck E.** (1984) A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis*. Donnè and *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller). *J. Protozool.* 31: 116-131.
- 39) Lindmark D.G., Müller M.** (1974) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus* and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248: 7724-7728.
- 40) Lindmark D.G., Müller M., Shio H.** (1975) Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 61: 552-554.
- 41) Gunderson, J., G. Hinkle, D. Leipe, H. G. Morrison, S. K. Stickel, D. A. Odelson, T. A. Nerad, M. Muller, and M. L. Sogin.** 1995. Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42: 411–415.

- 42) Whatley, F. R.** 1981. The establishment of mitochondria: *Paracoccus* and *Rhodopseudomonas*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361: 330–340.
- 43) Dessì D., Rappelli P., Diaz N., Cappuccinelli P., Fiori P.L.** (2006) *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two sexually transmitted human parasites. *Front. in Biosc.* 11: 2028-2034.
- 44) Dessi D.** (2005) Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. *Infect. immun.* 73: 1180-1186.
- 45) Vancini R.G., Benchimol M.** (2007) Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *Arch. Microbiol.* 189(1):7-18
- 46) Müller M.** (1990) Biochemistry of *Trichomonas vaginalis* in: Trichomonads parasitic in humans. *Pp 52-83. Ed. Springer-Verlag, New York USA.*
- 47) Müller M.** (1988) Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 465-488.
- 48) Alderete J.F., Garza G., Smith J., Spence M.** (1986) *Trichomonas vaginalis*: electrophoretic analysis and heterogeneity among isolates due to high-molecular weight trichomonad proteins. *Exp. Parasitol.* 61: 244-251.
- 49) Steinbüchel A., Müller M.** (1986) Glycerol: a metabolic end product of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 45-55.
- 50) Steinbüchel A., Müller M.** (1986) Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 57-65
- 51) Ter Kuile B.H.** (1995) Adaptation of the carbon metabolism of *Trichomonas vaginalis* to the nature and availability of the carbon source. *Microbiology* 140: 2503-2510.

- 52) Ter Kuile B.H.** (1995) Carbohydrate metabolism and physiology of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis* studied in chemostats. *Microbiology* 140: 2495-2502.
- 53) Mack S.R., and Müller M.** (1980) End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 67:213–216.
- 54) Lindmark D.G., Eckenrode B.L., Halberg L.A., and Dinbergs I.D.** (1989) Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Protozool.* 36:214–216.
- 55) Müller M.** (1992) Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. *Chin. Med. J.* 28:33–40.
- 56) Beach D. H., Holz Jr. G. G., Singh B. N., and Lindmark D. G.** (1990). Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38:175–190.
- 57) Knodler L.A., Edwards M.R., and Schofield P.J.** (1994). The intracellular amino acid pools of *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, and *Crithidia luciliae*. *Exp. Parasitol.* 79:117–125.
- 58) Narcisi E.M., and Secor W.E.** (1996). In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1121–1125.
- 59) Yoon K., Ryu J.S., and Min D.Y.** (1991). Cytotoxicity of lymphokine activated peritoneal macrophages against *Trichomonas vaginalis*. *Kor. J. Parasitol.* 29:381–388.
- 60) Heyworth P.G., Gutteridge W.E., and Ginger C.D.** (1982). Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 141:106–110.
- 61) Heyworth P. G., Gutteridge W. E., and Ginger C. D.** (1984). Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 176:55–60.
- 62) Harris D.I., Beechey R.B., Linstead D., and Barrett J.** (1988). Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29:105–116.

- 63) Lee J.J., Soldo A.T.,** (1992) Protocols in protozoology. (Ed.) *Society of Protozoologists*
- 64) Diamond L. S., Harlow D. H., and Cunnick C. C.** (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431–432.
- 65) Diamond L.S.** (1957) The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43: 488-490.
- 66) Adu- Sarkodie Y., Opocu B.K., Danso K.A., Weiss H.A., Mabey D.** (2004) Comparison of latex agglutination, wet preparation and culture for the detection of *Trichomonas vaginalis*. *Sex. Trans. Infect.* 80: 201-203.
- 67) Krieger J.N., Milton R.T., Stevens C.E., Nielsen I.O., Hale J., Kiviat N.B., Holmes K.K.** (1988) Diagnosis of trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA* 259: 1223-1227.
- 68) Fleury F.J.** (1979) Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *JAMA* 242: 2556-2559.
- 69) Diamond L.S.** (1957) The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43: 488-490.
- 70) Draper D., Parker R., Patterson E., Jones W., Beutz M., French J., Borchardt K., McGregor J.** (1993) Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with the In Pouch TV culture system. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1016-1018.
- 71) Isenberg H.D.** (1994) Parasite culture *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology handbook.* 7.9.3. 1-3.
- 72) Papanicolaou G.N., Wolinska W.H.** (1955) Vaginal cytology in *Trichomonas* infestation. *Int. Rec. Med.* 168: 551-556.
- 73) Wiese, W., S. R. Patel, S. C. Patel, C. A. Ohl, and C. A. Estrada.** (2000) A meta-analysis of the Papanicolaou smear and wet mount for the diagnosis of vaginal trichomoniasis. *Am. J. Med.* 108:301–308.

- 74) Watt R.M., Philip A., Wos S.M., Sam G.J.** (1986) Rapid assay for immunological detection of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 24: 551-555.
- 75) Sharma P., Malla N., Gupta I., Ganguly N.K., Mahajan R.C.** (1991) A comparison of wet mount, culture and enzyme linked immunosorbent assay of the diagnosis of trichomoniasis in women. *Trop. Geogr. Med.* 43: 257-260.
- 76) Carney J.A., Unadkat P., Yule A., Rajakumar R., Lacey C.J.** (1988) New rapid latex agglutination test for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. *I. Clin. Pathol.* 41: 806-808.
- 77) Krieger J.N., Holmes K.K., Spence M.R., McCormack W.M., Tam M.R.** (1985) Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence technique. *J. Infect. Dis.* 152: 979-984.
- 78) Muresu R., Rubino S., Rizzu P., Baldini A., Colombo M., Cappuccinelli P.** (1994) A new method for identification of *Trichomonas vaginalis* by fluorescent DNA in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1018-1022.
- 79) Yano A., Yui K., Aosai F., Kojima S., Kawana T., Ovary Z.** (1983) Immune response to *Trichomonas vaginalis*. VI. Immunochemical and immunobiological analyses of *T. vaginalis* antigen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72: 150-157.
- 80) Mason P.R., Patterson B.A.** (1985) Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 71: 265-268.
- 81) Honigberg, B., and D. E. Burgess.** (1994) Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*, *Parasitic protozoa* 9: 1-109.
- 82) Street D.A., Taylor-Robinson D., Ackers J.P., Hanna N.F., McMillan A.** (1982) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to *Trichomonas vaginalis* in sera and vaginal secretions. *Br. J. Vener. Dis.* 58: 330-333.
- 83) Su K.E.** (1982) Antibody to *Trichomonas vaginalis* in human cervicovaginal secretions. *Infect. Immun.* 37: 852-857.

- 84) Mason, P., and B. A. Patterson.** (1985) Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *Trichomonas vaginalis*. *J.Parasitol.* 71:265–268.
- 85) Su-Lin K.E., Honingberg B.M.** (1976) Antigenic analysis of *Trichomonas vaginalis*. *J. Protozool.* 23: 18A.
- 86) Fiori P.L., Rappelli P., Manca C., Mattana A., Cappuccinelli P.** (1992) Phenotypic variation of surface antigenic determinants in *Trichomonas vaginalis* detected by monoclonal antibodies. *Microbiologica* 15: 227-236.
- 87) Alderete J.F., Suprun-Brown I., Kasmala L., Smith J., Spence M.** (1985) Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolates and subpopulations by sera of patients and experimental infected mice. *Infect. Immun.* 49:463-468.
- 88) Alderete J.F., Kasmala L., Metcalfe E., Garza G.E.** (1986) Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. *Infect. Immun.* 53: 285-293.
- 89) Riley D.E., Roberts M.C., Takayama T., Krieger J.N.** (1992) Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 465-472.
- 90) Rappelli P., Rocchigiani A.M., Erre G., Colombo M., Cappuccinelli P., Fiori P.L.** (1995) Sequence of cDNA coding for a 65 KDa adhesive protein for the specific detection of *Trichomonas vaginalis* by PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 21-26.
- 91) Naruyasu M., Takashi D., Shigeaki Y., Tohru Y., Kiyofumi O., Takayuki E.** (2007) System for simultaneous detection of 16 pathogens related to urethritis to diagnose mixed infection. *I. J. Urol.* 14: 39-42.
- 92) Lawing, L., S. Hedges, and J. Schwebke.** (2000) Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:3585–3588.

- 93) Schee, C., A. Belkum, L. Zwijgers, et al.** (1999) Improved diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swabs and urine specimens compared to diagnosis by wet mount microscopy, culture, and fluorescent staining. *J. Clin. Microbiol.* 37:4127–4130.
- 94) Krieger, J. N., M. Verdon, N. Siegel, and K. K. Holmes.** (1993) Natural history of urogenital trichomoniasis in men. *J. Urol.* 149:1455–1458.
- 95) Schwebke, J., and L. Lawing.** (2002) Improved detection by DNA amplification of *Trichomonas vaginalis* in males. *J. Clin. Microbiol.* 40:3681–3683.
- 96) Caliendo A.M., Jordan J.A., Green A.M. Ingersoll J., Diclemente R.J.** (2005) Real-time PCR improves detection of *Trichomonas vaginalis* infection compared with culture using self-collected vaginal swabs. *J. Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 13: 145-150.
- 97) Honigberg B.M.** (1978) Trichomonads of importance in human medicine. *In: Parasitic protozoa (Kreier J.P., Ed), Vol. 2, p. 275. Academic Press Inc., New York.*
- 98) Krieger J.N.** (1981). Urologic aspects of trichomoniasis. *Invest. Urol.* 18: 411-417.
- 99) Houge M.J.** (1943) the effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue-culture cells. *Am. J. Hyg.* 37: 142-152.
- 100) Kotcher E., Hoogasian A.C.** (1957) Cultivation of *Trichomonas vaginalis* Donnè 1837, in association with tissue cultures. *J. Parasitol.* 43 (suppl.): 39.
- 101) Christian R.T., Miller N.F., Ludovici P.P., Riley G.M.** (1963) A study of *Trichomonas vaginalis* in human cell culture. *Am. J. Ost. Gynecol.* 85: 947-954.
- 102) Kulda J., Honigberg B.M.** (1969) Behavior and pathogenicity of *Tritrichomonas foetus* in chick liver cell cultures. *J. Protozool.* 16: 479-495.
- 103) Kulda J.** (1967) The effect of different species of trichomonads on monkey kidney cell cultures. *Folia Parasitol.* 14: 295-310.

- 104) Honogberg B.M., Ewalt A.** (1961) Preliminary observations on pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* for cell cultures. *Proc. Int. Congr. Protozool.* 1: 568-569.
- 105) Ovcinikov N.M., Delektorskij V.V., Turanova E.N., Yashkova G.N.** (1975) Further studies of *Trichomonas vaginalis* with transmission and scanning electron microscopy. *Br. J. Vener. Dis.* 51: 357-375.
- 106) Nielsen M.H., Nielsen R.** (1976) Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donnè: Interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathol. Microbiol. Sect.B* 83: 305-320.
- 107) Garcia-Tamoyo J., Nunez-Montiel J.T., DeGarcia H.P.** (1978) An electromicroscopic investigation of the pathogenesis of human vaginal trichomoniasis. *Acta Cytol.* 22: 447-454.
- 108) Heath J.P.** (1981) Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cells. *Br. J. Vener. Dis.* 57: 106-117.
- 109) Alderete J.F., Pearlman E.** (1983) Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Brit. J. Ven. Dis.* 60: 99-105.
- 110) Alderete J.F., Garza G.E.** (1985) Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect. Immun.* 50: 701-708.
- 111) Alderete J. F., Arroyo R, and Lehker M. W.** (1994). Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence. *Methods Enzymol.* 236:318–333.
- 112) Alderete J. F., O'Brien J. L., Arroyo R., Engbring J. A., Musatovova O., Lopez O., Lauriano C., and Nguyen J.** (1995). Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 17:69–83.
- 113) Arroyo R.,Engbring J., and Alderete J. F.** (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 6:853–862.
- 114) Da Costa R.F.** (2005) *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell. Res.* 15: 704-716.

- 115) Fiori P.L.** (1997) Contact-dependent disruption of the host cells membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 65: 5142-5148.
- 116) Lehker M.W., Alderete J.F.** (2000) Biology of trichomoniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13: 37- 45.
- 117) Dailey D.C., Chang T.H., and Alderete J.F.** (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101:171–175.
- 118) Adegbaju, A. and Morenikeji, O. A.** (2008) Cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Sci. Res. Essays* 3 (4): 132-138
- 119) Lehker M.W., Chang T.H., Dailey D.C., and Alderete J.F.** (1990). Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 171:2165–2170.
- 120) Pereira-Neves A., Benchimol M.** (2006) Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*- New insights. *Biol.Cell.* 99: 87-101.
- 121) Arroyo R., and Alderete J.F.** (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 57:2991–2997.
- 122) Klemba M., Goldberg D.E.** (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 275-305.
- 123) Garber G.E., and Lemchuk-Favel L.T.** (1994). Analysis of the extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 80:361–365.
- 124) Garber G.E., Lemchuk-Favel L.T., and Bowie W.R.** (1989). Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1548-1553.
- 125) Adegbaju, A. and Morenikeji, O. A.** (2008) Cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis* *Sci. Res. Essay Vol. 3 (4), pp. 132-138*
- 126) Fiori P.L., Rappelli P., Addis M. F.** (1999) The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microb. Infect.* 2: 149-156.

- 127) Arroyo, R., A. Gonzalez-Robles, A. Martinez-Palomo, and J. F. Alderete.** (1993) *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesionsynthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7:299–309.
- 128) M.B. Furtado, M. Benchimol** (1998) Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal apithelial cells. *Parasitol. Res.* 84: 213-220.
- 129) Hirt R.P., Noel C.J., Sicheritz-ponter T., Tachezy J., P.L. Fiori. (2007)** *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol.* 23: 540-547.
- 130) Alderete JF, Lehker MW, Arroyo R** (1995). The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today.* (11):70-74.
- 131) Engbring, J., and J. F. Alderete.** (1998) Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology* 144:3011–3018.
- 132) Garcia A.F., Chang T., Bendimol M., Klumpp D.J., Lehker M.W., Alderete J.F.** (2003). Iron and contact with host cells induce the expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* (80):361-365.
- 133) Arroyo R., Gonzalez-Robles A., Martinez-Palomo A., and Alderete J.F.** (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7:299–309.
- 134) Alderete J.F., Garza G.E.** (1985) Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect. Immun.* 50: 701-708.
- 135) Alderete J.F.** (2001) Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell. Microbiol.* 3:359-370.
- 136) Moreno-Brito V.** (2005) A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell. Microbiol.* 7: 245-258.

- 137) Brugerolle G.** (2000) Immunolocalization of two hydrogenosomal enzymes of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 86:30-35
- 138) Drmota T.** (1996) Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 221-234.
- 139) Peterson K.M., and Alderete J.F.** (1982). Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 37:755–762.
- 140) Gold D., and Ofek I.** (1992). Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces: requirement for energy and serum constituents. *Parasitology* 105: 55–62.
- 141) Choromanski L., Beat D.A., Nordin J.H., Pan A.A., and Honigberg B.M.** (1985). Further studies on the surface saccharides in *Trichomonas vaginalis* strains by fluorescein-conjugated lectins. *Z. Parasitenkd.* 71:443–458.
- 142) Cappuccinelli, P., Cagliani I., and Cavallo G.** (1975). Involvement of a surface concanavalin A-binding glycoprotein in the adhesion of *Trichomonas vaginalis* to substrates. *Experientia* 31:1157–1159.
- 143) de Carli G.A., Brasseur P., Rott M., da Silva A., and Wendorff A.** (1994). Hemolytic activity of various strains and clones of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas suis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 36:207–211.
- 144) Benchimol M., and de Souza W.** (1995). Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* 81:459–464.
- 145) Dias Filho B.P., Andrade A.F., de Souza W., Esteves M.J., and Angluster J.** (1992). Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Microbios* 71:55–64.
- 146) Kobe B, Deisenhofer J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19:415-21.

- 147) Williamson MP.** (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297:249-60.
- 148) Sharma A., Sojar H.T., Glurich I., Honma K., Kuramitsu HK,J.GR.** (1998) Cloning, expression and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect. Immun.* 66: 5703-5710.
- 149) Hirt R.P.** (2002) A novel potential surface protein in *Trichomonas vaginalis* contains a leucine-rich repeat shared by micro-organisms from all three domains of life. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125: 195-199.
- 150) Crouch ML,Alderete JF.** (1999) *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology* 145:2835-43.
- 151) Addis MF, Rappelli P, Delogu G, Carta F, Cappuccinelli P, Fiori PL.** (1998) Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for *Trichomonas vaginalis* alpha actinin and intracellular localization of the protein. *Infect Immun* 66:4924-31.
- 152) Fiori P.L., Rappelli P., Addis M.F., Mannu F., Cappuccinelli P.** (1996) Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 65: 5142-5148.
- 153) Krieger J.N., Wolner-Hanssen P., Stevens C., and Holmes K.K.** (1990). Characteristics of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without colpitis macularis. *J. Infect. Dis.* 161:307–311.
- 154) Petrin D., Delgaty K., Bhatt R. and Garber G.** (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 300-317.
- 155) North M.J.** (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiol. Rev.* 46:308–340.
- 156) North M.J.** (1994). Cysteine endopeptidases of parasitic protozoa. *Methods Enzymol.* 244:523–539.

- 157) Bozner P, Demes P** (1990). Proteinases of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type. *Parasitology*. (102):113-120.
- 158) Neale KA, Alderete JF** (1990). Analysis of the proteinases of representative of *Trichomonas vaginalis* isolate. *Infect. Immun.* (58):157-162.
- 159) Alderete JF, Neale KA, Newton E, Dennis V** (1991). The vagina of women infected with *Trichomonas vaginalis* has numerous proteinase and antibody to trichomonad proteinases. *Genitourin Med.* (67):469-474.
- 160) Arroyo R, Alderete JF** (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* (57):2991-2997.
- 161) Provenzano D, Alderete JF** (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* (63): 3388-3395.
- 162) Draper D., Donohoe W., Mortimer L. and Heine R.P.** (1998). Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Infect. Dis.* 178: 815-819.
- 163) Draper D., Landers D.V., Krohn M.A., Hillier S.L., Wiesenfeld H.C., and Heine R.P.** (2000). Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183: 1243-1248.
- 164) Lubick, K., and D. E. Burgess.** (2004). Purification and analysis of phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 72:1284–1290.
- 165) Shindai Y., Ishikawa H., Hattori M., Okumura K.** (1988) Resistance of mouse cytolytic cells to ore-forming protein-mediated cytolysis. *Eur. J. Immunol.* 18:29-33.
- 166) Garber G.E., Bowie W.R.** (1990) The effect of *Trichomonas vaginalis* and role of pH on cell culture monolayer viability. *Clin. Invest. Med.* 13: 71-76.

- 167) Pindak F.F., Mora de Pindak M., Gardner W.A.Jr** (1993) Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin. Med.* 69: 35-40.
- 168) Tschopp J., Nabholz M.** (1990) Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 279-302.
- 169) Podack E.R., Hengartner H., Lichtenheld M.G.** (1991) A central role of perforin in cytotoxicity? *Ann. Rev. Immunol.* 9: 129-157.
- 170) Nabholz M., MacDonald H.R.** (1983) Cytolytic T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 273-306.
- 171) Podack E.R., Young J.D-E., Cohn Z.A.** (1985) Isolation and biochemical and functional characterization of perforin I from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8629-8633.
- 172) Young J. D-E., Hengartner H., Podack E.R., Cohn Z.A.** (1986) Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 44: 849-859.
- 173) Pena S.V., Krensky A.M.** (1997) Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin. Immunol.* 9: 117-125.
- 174) Young J.D-E, Cohn Z.A.** (1987) Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv. Immunol.* 41: 269-332.
- 175) Bashford C.L., Alder G.M., Menestrina G., Micklem K.J., Murphy J.J., pasternak C.A.** (1986) Membrane damage by hemolytic viruses, toxins, complement, and other cytotoxic agents. A common mechanism blocked by divalent cations. *J. Biol. Chem.* 261: 9300-9308.

- 176) Felmler T., Welch R.A.** (1988) Alterations of amino acid repeats in the *Escherichia coli* hemolysin affect cytolytic activity and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5269: 5273.
- 177) Bhakdi S., Mackman N., Nicaud J.M., Holland I.B.** (1986) *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Inf. Immun.* 52: 63-69.
- 178) Bhakdi S., Greulich S., Muhly M., Eberspacher B., Becker H., Thiele A., Hugo F.** (1989) Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J. Exp. Med.* 169: 737-754.
- 179) Boehm D.F., Welch R.A., Snyder I.S.** (1990) Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocytes membranes. *Inf. Immun.* 58: 1951-1958.
- 180) Moayeri M., Welch R.A.** (1994) Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Inf. Immun.* 62: 4124-4134.
- 181) Fussle R., Bhakdi S., Sziegoleit A., Trantum-Jensen J., Kranz T., Wellwieser H.J.** (1981) On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J. Cell. Biol.* 91:83-94.
- 182) Bhakdi S., Trantum-Jensen J.** (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55:733-751.
- 183) Walker B., Krishnasastri M., Zorn L., Bayley H.** (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 21782-21786.

- 184) Jursch R., Hildebrand A., Hobom G., Trantum-Jensen J., Ward R., Kehoe M., Bhardi S.** (1994) Histidine residues near the N terminus of staphylococcal alpha-toxin as reporters of regions that are critical for oligomerization and pore formation. *Infect. Immun.* 62: 2249-2256.
- 185) Robert S. Munford, Paul O. Sheppard and Patrick J. O'Hara** (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse function on a common backbone structure. *J. Lipid Res.* vol 36, 1653-1663.
- 186) Kishimoto Y., Hiraiwa M., O'Brien J.S.,** (1992) Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid Res.* vol 33: 1255-1267.
- 187) Schuette C.G., Pierstorff B., Huettler S., Sandhoff K.** (2001) Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiol.* 11: 81-90.
- 188) Cochrane C.G., Revak S.D.** (1991) Pulmonary surfactant protein B (SP-B): Structure function relationships. *Scienze* 254: 566-568.
- 189) Chetcuti P.A., Ball R.J.** (1995) Surfactant apoprotein B deficiency. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal ed* 73: 125-127.
- 190) Schuchman E.H., Suchi T., Takahashi K.** (1991) Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNA. *J. Biol. Chem.* 266: 8531-8539.
- 191) Hurwitz R., Ferlinz G., Vielhaber H., Moczall H.** (1994) Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269: 5440-5445.
- 192) Loftus B., Anderson I., Davies R., et al.** (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433: 865-868.
- 193) Leippe M., Ebel S., Schoenberg L., Horstmann R.D.** (1991) Pore forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Med. Scien.* 88: 7659-7663.

- 194) Leippe M., Bruhn H., Hecht O., Grotzinger J.** (2005) Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol.* 21: 5-7.
- 195) Zhai Y., Milton H., Saier J.** (2000) The amoebapore superfamily. *Bioch. Bioph. Act.* 1469: 78-99.
- 196) Rivka Bracha, Yael Nuchamowitz, and David Mirelman**  
(2003) Transcriptional Silencing of an Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular Analysis and Effect on Pathogenicity Eukaryot. Cell. 2: 295–305
- 197) Herbst R., Marciano-Cabral F., Leippe M.** (2004) Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J. Chem.* 279: 25955-8.
- 198) Herbst R., Ott C., Jacobs T., Marti T., Marciano-Cabral F., Leippe M.** (2002) Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* 277:22353-22360.