



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Corso di Dottorato di Ricerca in Life Sciences and Biotechnologies

Coordinatore del Corso: Prof. Leonardo Sechi

XXIX CICLO

**Identificazione di proteine secrete da
Trichomonas vaginalis e loro caratterizzazione
come potenziali marcatori d'infezione**

Tutor:

Prof. Pier Luigi Fiori

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Maria Francesca Sogos

Anno Accademico 2015 – 2016



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Corso di Dottorato di Ricerca in Life Sciences and Biotechnologies

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Life Sciences and Biotechnologies dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2013/2016 - XXIX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

La tesi è stata prodotta, altresì, grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

Sommario

Abstract	2
Introduzione	3
Morfologia	3
Metabolismo	4
Epidemiologia, manifestazioni cliniche e complicanze	6
Meccanismi di patogenicità	10
Considerazioni diagnostiche	12
Scopo del lavoro	17
Materiali e metodi	18
Microorganismi e loro coltivazione	18
Estrazione del DNA genomico	19
Clonaggio in pET-29b(+) e pET-43.1a(+)	19
Induzione dell'espressione delle proteine ricombinanti in <i>E. coli</i>	27
Purificazione delle proteine ricombinanti espresse in <i>E. coli</i>	28
Clonaggio in TagVag-94	30
Transfezione <i>T. vaginalis</i>	34
Studi <i>in silico</i> : strumenti bioinformatici per la predizione dei peptidi	35
Selezione dei campioni: test ELISA con <i>T. vaginalis</i> intero	37
Test ELISA con i peptidi	38
Test ELISA su sieri di donne con differenti combinazioni peptidiche	39
Analisi statistiche	40
Risultati e discussione:	41
Il secretoma di <i>T. vaginalis</i> : analisi delle proteine secrete	41
Produzione delle proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI in <i>E. coli</i>	49
Produzione delle proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI in <i>T. vaginalis</i>	60
Studi <i>in silico</i> : strumenti bioinformatici per la predizione dei peptidi	63
Selezione dei campioni: test ELISA con <i>T. vaginalis</i> intero	71
Test ELISA con i peptidi	73
Test ELISA su sieri di donne con differenti combinazioni peptidiche	79
Conclusioni	83
Materiali supplementari	85
Bibliografia	94

Abstract

Trichomonas vaginalis is the agent of trichomoniasis, one of the most diffused sexually transmitted infections in humans. Routine diagnosis is based on direct microscopic examination and molecular techniques, which are limited by a low sensitivity, being dependent on the number of protozoa in samples. Indirect immunological techniques could represent an efficient alternative. The aim of this study was to identify immunological markers suitable for serodiagnosis of infection.

We have performed proteomic analyses of *T. vaginalis*-secreted proteins and three proteins, heat-shock-protein70 (HSP70), ubiquitin (Ubi) and peroxiredoxin (Prx), were selected for their hypothetical immunogenicity and role in carcinogenesis.

A total of 53 Tv-positive and 40 Tv-negative sera from women and 30 Tv-positive and 10 Tv-negative sera from males, were used to test the immunogenicity of selected proteins. To verify the presence of antibodies against the selected proteins by ELISA, we designed three specific peptides for each protein.

Results demonstrate that selected peptides were able to induce an immune response in females. Interestingly, sera from male were much less reactive to TvHSP70, TvUbi and TvPrx peptides than female sera. Peptide combinations designed to minimize false-positives among tested sera were performed.

These findings confirm that peptide of TvPrx, TvUbi and TvHsp70 are suitable candidate as sex-specific markers of *T. vaginalis* infections, representing a useful alternative to direct diagnostic methods.

Introduzione

Morfologia

Trichomonas vaginalis è un protozoo parassita che appartiene alla classe dei flagellati e all'ordine dei Trichomonadida, descritto per la prima volta da Donnè nel 1836 (Donnè , 1836). *T. vaginalis* è un parassita eucariote ad alta mobilità con corredo genetico aploide, 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, mentre in presenza di agar, di monostrati cellulari o superfici vetrose e plastiche assume spesso morfologia ameboide. Morfologie particolari si osservano talvolta nelle secrezioni vaginali e nelle urine. Inoltre, variazioni di condizioni fisiche e chimiche del mezzo di coltura quali la tensione di ossigeno, il pH, la temperatura, possono alterarne la morfologia. Le dimensioni del protozoo variano sensibilmente, da 7 a 23 μm di lunghezza e da 5 a 15 μm di larghezza (Honigberg , 1990; Honigberg and King, 1964).

T. vaginalis presenta quattro flagelli anteriori, lunghi circa 12 μm . 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 anteroposteriore dell'organismo, il cui segmento terminale sporge oltre l'estremità posteriore del protozoo di circa un terzo, contribuendo a determinarne la caratteristica morfologia. Il trofozoite presenta un unico nucleo, al cui interno sono presenti 6 cromosomi (Zubáková et al., 2008). La divisione cellulare è di tipo criptopleuromitotico, con la formazione cioè di un fuso extranucleare durante la mitosi, senza scomparsa della membrana nucleare (Honigberg , 1990).

Nel 2007 è stato sequenziato il genoma di *T. vaginalis*, il quale consta di circa 160 megabasi ripartite in 6 cromosomi, 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 (Carlton et al., 2007).

L'osservazione in microscopia elettronica ha evidenziato la presenza del complesso del Golgi, detto apparato parabasale, esso è molto sviluppato e si ritiene che svolga un ruolo analogo a quello delle altre cellule eucariote. Sono stati rilevati numerosi ribosomi sia liberi che associati alle membrane del reticolo endoplasmatico. Sono inoltre presenti lisosomi che conferiscono al protozoo attività idrolasica. Il protozoo manca di mitocondri morfologicamente riconoscibili ma questi sono sostituiti nella loro funzione di organuli in cui ha sede la produzione di ATP dagli idrogenosomi, organelli con un diametro circa 0,5 μm che costituiscono circa il 6% del volume cellulare (Müller, 1993; Nielsen and Diemer, 1976).

Gli idrogenosomi per alcuni aspetti sono simili ai mitocondri, sono dotati di due membrane contenenti una matrice granulare ed un core elettrondenso. Inoltre le proteine citoplasmatiche che devono essere veicolate verso tale organulo possiedono un peptide segnale ammino-terminale, che viene eliminato subito dopo l'ingresso nell'organulo, come avviene nei mitocondri.

Per altri aspetti però i gli idrogenosomi si differenziano dai mitocondri, non sono provvisti di DNA e di citocromi. Il nome di questi organuli deriva dalla loro capacità di produrre idrogeno molecolare come prodotto metabolico finale (Lindmark and Müller, 1973). Le reazioni biochimiche che avvengono in questi organuli rappresentano parte integrante del metabolismo energetico di *T. vaginalis* (Lindmark and Müller, 1973).

In uno studio di recente pubblicazione è stato dimostrato che *T. vaginalis* è in grado di stabilire 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 (Dessi et al., 2005, 2006; Vancini and Benchimol, 2008). Tale relazione rappresenta la prima simbiosi descritta tra due patogeni veri, in grado di infettare un ospite immunocompetente, causando patologie indipendenti a carico degli stessi organi.

Metabolismo

T. vaginalis è un eucariote primitivo, per alcuni aspetti simile ad altre cellule superiori, da cui si differenzia però per quanto riguarda il metabolismo energetico e alcune esigenze nutrizionali che lo avvicinano a certi batteri anaerobi primitivi (Müller, 1992). Nel protozoo sono infatti assenti alcune vie biosintetiche fondamentali, rendendo quindi necessari come nutrienti numerosi metaboliti preformati.

T. vaginalis può essere definito aerotollerante, essendo in grado di sopravvivere a diverse pO₂. Il protozoo cresce meglio in condizioni anaerobiche, che in vitro sono generate sia dalla presenza di agenti riducenti nel mezzo di coltura, che dal suo metabolismo respiratorio che tende a consumare rapidamente l'ossigeno presente.

La fonte energetica principale di *T. vaginalis* è rappresentata dai carboidrati fra cui il glucosio, maltosio e galattosio; saccarosio e mannosio non sono invece metabolizzati dal protozoo (Steinbüchel and Müller, 1986). La più importante fonte endogena di energia è rappresentata dal glicogeno. Il metabolismo dei carboidrati è di tipo fermentativo sia in condizioni aerobiche che anaerobiche ed il glucosio viene completamente ossidato. I prodotti finali comprendono acetato, malato, lattato, glicerolo e CO₂. In condizioni anaerobiche viene prodotto anche idrogeno molecolare (Steinbüchel and Müller, 1986) (Lindmark et al., 1989) (Steinbüchel and Müller, 1986a).

T. vaginalis non è in grado di sintetizzare de novo acidi grassi e steroli, in quanto manca degli enzimi essenziali, quindi idrolizza i gruppi acilici da fosfolipidi, colesterolo e trigliceridi per sintetizzare i lipidi ad esso necessari (Beach et al., 1990).

I carboidrati sono la fonte energia primaria per *T. vaginalis*, ma in loro assenza è in grado di sostentarsi metabolizzando anche amminoacidi quali arginina, treonina e leucina.

T. vaginalis può utilizzare l'arginina come fonte di energia, rimuovendo l'azoto dall'amminoacido e generando ATP mediante la via dell'arginina deidrolasi (ADH). Gli enzimi della via ADH sono localizzati nel citosol ad eccezione dell'arginina deaminasi (ADI) che si trova nell'idrogenosoma.

T. vaginalis può servirsi di tale via per acquisire fino al 10% del suo fabbisogno energetico (Knodler et al., 1994; Morada et al., 2011; Narcisi and Secor, 1996; Yarlett et al., 1996) .

T. vaginalis non è provvisto di alcune vie biosintetiche fondamentali quindi non riesce a sintetizzare le molecole necessarie per la sopravvivenza, per questo motivo è un parassita obbligato e può trarre nutrimento dalle secrezioni vaginali, fagocitare cellule dell'ospite o batteri. Il terreno di coltura 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 (DIAMOND, 1957; Diamond et al., 1978).

Epidemiologia, manifestazioni cliniche e complicitanze

T. vaginalis è l'agente eziologico della tricomoniasi, un'infezione sessualmente trasmissibile e curabile tra le più comuni al mondo. È stato stimato che più di 200 milioni di individui siano affetti dalla malattia, di cui 2 milioni solo negli Stati Uniti (Van der Pol, 2007; Schwebke and Burgess, 2004). Nel 2008 l'organizzazione mondiale della sanità ha stimato 276,4 milioni di nuovi casi (WHO, 2012) l'incidenza è aumentata del 11,2% rispetto al 2005.

Un recente studio epidemiologico condotto negli Stati Uniti ha rilevato una prevalenza del 3.1% nelle donne di età compresa tra 14 e 49 anni con un valore che può arrivare nelle donne di colore fino al 13.3% (Bachmann et al., 2011). L'incidenza dell'infezione dipende da numerosi fattori: l'età, i comportamenti sessuali a rischio, la concomitanza di altre infezioni sessualmente trasmissibili, la fase del ciclo mestruale e le tecniche diagnostiche utilizzate (Van Der Pol et al., 2005).

L'organismo ospite di *T. vaginalis* è l'uomo e l'infezione è trasmessa attraverso il contatto sessuale, nonostante alcuni studi abbiano avanzato l'ipotesi di una trasmissione non sessuale (Su, 1982).

Nelle donne il patogeno infetta principalmente l'epitelio squamoso del tratto urogenitale. Le manifestazioni cliniche possono variare da infezioni asintomatiche fino a gravi infiammazioni vaginali (vaginiti) (Hirt and Sherrard, 2015; Kissinger, 2015). I fattori responsabili di tale variabilità non sono completamente conosciuti, ma dipendono sia da differenze di virulenza tra diversi ceppi del protozoo che dalla diversa suscettibilità individuale dell'ospite infettato (Krieger et al., 1990).

Il 75% dei casi di tricomoniasi negli uomini e il 50% nelle donne sono asintomatici quindi danno luogo ad un'infezione subclinica caratterizzata da un'infiammazione cronica locale che può durare per anni (Petrin et al., 1998). La percentuale di infezioni asintomatiche varia dal 9 al 56% dei casi in relazione ai gruppi di popolazione presi in esame (Lehker and Alderete, 1992). Nella donna nel 50-75% dei casi le infezioni sintomatiche sono caratterizzate dalla presenza di secrezioni vaginali anomale che possono essere maleodoranti, abbondanti, schiumose e giallo-verdastre e da irritazioni vulvovaginali. Le pazienti sintomatiche inoltre riportano dispareunia nel 10-50% dei casi, disuria nel 30-50% e dolori addominali 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 indicata come segno tipico della tricomoniasi, è osservata solo in circa il 2% dei casi (Wølnner-Hanssen et al., 1989)

E' stata inoltre osservata una variabilità delle manifestazioni cliniche nelle diverse fasi del ciclo mestruale. L'infezione diventa spesso latente durante le fasi follicolare ed ovulatoria del ciclo, mentre generalmente i sintomi si inaspriscono durante la fase mestruale. Questo è probabilmente dovuto alle variazioni del pH e del quadro ormonale che si verificano durante le diverse fasi del ciclo, alle quali il protozoo potrebbe essere suscettibile.

Nel maschio l'infezione è nella maggior parte dei casi asintomatica, può essere del tutto silente e risolversi spontaneamente nell'arco di tre settimane, a meno che non intervengano fattori di reinoculo o che il protozoo non riesca ad infettare le vie genitali più alte quali prostata o vescicole seminali.

Le manifestazioni cliniche, se presenti, possono variare da uretriti purulente con dolore durante la minzione e l'erezione a uretriti e prostatiti croniche (Jr and Culberson, 1986; Krieger et al., 1996; Petrin et al., 1998; Tiwara et al., 1996).

Per i patogeni in genere e per *T. vaginalis* nello specifico, l'infezione ottimale risulta quella in cui il protozoo riesce ad insediarsi nell'ospite determinando una sintomatologia subclinica. Le infezioni asintomatiche non sono trattate e questo consente al patogeno di sopravvivere indisturbato nell'ospite.

T. vaginalis ha la capacità di aderire alle cellule dell'epitelio urogenitale e di sopravvivere per anni nell'ostile ambiente vaginale tipicamente acido, resistendo alla risposta immune e convivendo con un'imponente microflora commensale. Sono state formulate diverse ipotesi sul meccanismo mediante il quale il protozoo interagisca con il sistema immunitario.

In diversi studi è stato dimostrato che *T. vaginalis* ha la capacità di fagocitare una grande varietà di cellule umane e microrganismi, inclusi eritrociti, leucociti, cellule vaginali epiteliali, batteri, lieviti e particelle virali (Pereira-Neves and Benchimol, 2007). La fagocitosi dei leucociti potrebbe essere una delle vie che il parassita ha sviluppato per sfuggire al sistema immunitario, determinando l'assenza di sintomi osservata nella maggior parte delle infezioni. In uno studio del 2005 (da Costa et al., 2005) è stato ipotizzato che perfino il movimento del patogeno attraverso i desmosomi, per diffondersi al di sotto dello strato epiteliale, sia finalizzato all'evasione della risposta immune. Il protozoo prova a sfuggire al sistema immunitario anche servendosi delle proteasi che degradano citochine e anticorpi (Yadav et

al., 2007) e hanno un'attività antiapoptotica su molti tipi di cellule immunitarie della mucosa (Fichorova, 2009).

Ad oggi il meccanismo mediante il quale *T. vaginalis* riesce ad ottenere nutrienti, stabilire l'infezione, muoversi nel tratto uro-genitale, evitare la risposta immunitaria e propagare l'infezione è ancora poco chiaro.

Nell'ospite gli eventi infiammatori in generale, in particolare quelli cronici, sono stati da diverso tempo individuati come fattori tumorigenici, basti pensare che si stima che circa il 20% di tutte le forme di neoplasie siano il risultato di infezioni croniche (Ames et al., 1995; Coussens and Werb, 2002).

In vari studi è stato dimostrato che la tricomoniasi può essere associata a numerose complicanze, nelle donne l'infezione può essere correlata alla sterilità, alla malattia infiammatoria pelvica e in corso di gravidanza al parto prematuro, alla rottura precoce delle membrane e al basso peso del bambino alla nascita (Fichorova, 2009; Hirt and Sherrard, 2015; Kissinger, 2015).

Nell'uomo le complicanze più comunemente riportate consistono in alterata motilità degli spermatozoi e sterilità (Martinez-Garcia et al., 1996; Škerk et al., 2002).

Inoltre è stato osservato che l'infezione da *T. vaginalis*, così come altre STI (infezioni sessualmente trasmissibili) sembra predisporre verso un'aumentata suscettibilità all'infezione da HIV. Questa è dovuta 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 (Kissinger, 2015; McClelland et al., 2007; Pol et al., 2008).

Numerosi studi hanno dimostrato un'associazione della tricomoniasi, nelle donne con il cancro intraepiteliale cervicale e negli uomini con il carcinoma prostatico. Nel 1992 in uno studio volto ad evidenziare una correlazione tra infezione HPV e cancro intraepiteliale alla cervice, è stata dimostrata un'associazione indipendente con l'infezione da *T. vaginalis* (Gram et al., 1992). Nello stesso anno Chakrabarti et al., hanno riportato invece l'assenza di correlazione (Chakrabarti et al., 1992). Nel 1995, un gruppo di ricerca ha compiuto dei saggi su sieri di donne affette da neoplasia cervicale invasiva e su controlli (donne di pari età sane) trovando anticorpi anti-*T. vaginalis* nel 41% delle pazienti con carcinoma e nel 5% dei controlli

sani; gli autori ipotizzarono che *T. vaginalis* potesse agire come cofattore, a causa della risposta immune suscitata o come veicolo di infezioni virali (Yap et al., 1995).

In una pubblicazione del 2000, è stato ipotizzato che l'infezione da *T. vaginalis* fosse un fattore di rischio del cancro cervicale (Viikki et al., 2000). Infine, in una ricerca del 2012 sono state osservate delle differenze fenotipiche tra ceppi isolati in donne con tricomoniasi e carcinoma cervicale ed altri isolati in donne sintomatiche per *T. vaginalis* ma negative per la neoplasia. Nello studio è stata ipotizzata una associazione tra il cancro e i ceppi con maggiori potenzialità proliferative (Yusof and Kumar, 2012).

Nonostante siano stati pubblicati svariati studi in merito, non è ancora stato chiarito completamente il legame epidemiologico e molecolare tra *T. vaginalis* e carcinoma prostatico. In una ricerca del 1971, *T. vaginalis* è stato proposto per la prima volta come elemento "of interest" per la carcinogenesi prostatica (Wynder et al., 1971). Questa ipotesi è stata confermata da studi che hanno evidenziato la presenza di infiltrazioni infiammatorie e foci di iperplasia epiteliale in tessuti prostatici di uomini infetti da *T. vaginalis* (Jr and Culberson, 1990; Smith, 1987) .

La tricomoniasi può causare uretriti non gonococciche o prostatiti in una bassa percentuale di pazienti (Krieger, 1995) ma nella maggior parte dei casi l'infezione si presenta in forma asintomatica (Soper, 2004).

Le infiammazioni asintomatiche sono silenziose e quindi molto spesso non vengono trattate, questo permette al patogeno di rimanere indisturbato nell'uretra maschile e così aumenta il rischio di ascesa alla ghiandola prostatica che risulta essere più elevato rispetto ad altre malattie sessualmente trasmissibili (Sutcliffe et al., 2006). Una volta raggiunta la prostata, in assenza di sintomi, il protozoo potrebbe dar luogo ad un'infezione a lungo termine e cronicizzare. Queste supposizioni sono supportate da studi su pazienti uomini asintomatici, partners di donne affette da tricomoniasi, molti dei quali sono cronicamente infetti (COUTTS et al., 1959; KOSTIC, 1959; WATT and JENNISON, 1960; WESTON and NICOL, 1963). La lisi del tessuto prostatico causata da *T. vaginalis* mette in atto una serie di meccanismi di rigenerazione cellulare che in condizioni di stress infiammatorio potrebbero essere disregolate e favorire la cancerogenesi (Sutcliffe et al., 2006). In una ricerca del 2012 viene esaminata l'alta incidenza della tricomoniasi in pazienti affetti da iperplasia prostatica benigna e viene sottolineato come sia stato già dimostrato che l'infiammazione cronica è il fattore

inducente verso la progressione della patologia a forme tumorali (Mitteregger et al., 2012) . Kucknoor et al., hanno dimostrato che l'adesione del protozoo alle cellule epiteliali, così come la produzione di proteasi, può causare una modificazione della regolazione di geni coinvolti nell'apoptosi, inibendo fattori che possono bloccare la crescita cellulare incontrollata (Kucknoor et al., 2005).

La manifestazione o la concomitanza di uno di questi eventi (infiammazione cronica, lisi, inibizione dell'apoptosi), potrebbe potenzialmente favorire la tumorigenesi nell'epitelio prostatico.

L'associazione fra tricomoniasi e cancro alla prostata è stata indagata in differenti studi sieropidemiologici (Checkoway et al., 1987; Stark et al., 2009; Sutcliffe et al., 2009). Nel 2010 Sutcliffe et al., hanno ipotizzato un'associazione tra la tricomoniasi e una forma di cancro prostatico estremamente invasiva (Sutcliffe, 2010). Non mancano gli autori che invece sostengono che non ci sia alcuna correlazione tra l'infezione da *T. vaginalis* e lo sviluppo di tumore prostatico (Groom et al., 2012). Anche se bisogna sottolineare che in questo studio del 2012, la diagnosi di tricomoniasi è stata eseguita ricercando il DNA del protozoo in biopsie di tessuto prostatico fissato di pazienti affetti da carcinoma prostatico: questa metodica è discutibile visto che non è probabile che il patogeno durante l'infezione riesca a raggiungere il parenchima prostatico, rimanendo confinato nel lume della ghiandola.

Sebbene sia stata osservata una correlazione tra l'infezione da *T. vaginalis* e il cancro alla prostata, non è stato ancora compreso appieno in che modo il parassita possa contribuire alla carcinogenesi.

Sutcliffe et al., in uno studio del 2012 hanno proposto un modello che spiega in che modo un'infezione cronica e latente come la tricomoniasi, possa up-regolare meccanismi molecolari a cascata che possono contribuire a determinare la carcinogenesi prostatica (Sutcliffe et al., 2012) .

Meccanismi di patogenicità

Nonostante *T. vaginalis* sia l'agente eziologico della malattia a trasmissione sessuale non virale più diffusa al mondo, i meccanismi di patogenicità e le caratteristiche di virulenza non sono stati ancora chiariti completamente.

T. vaginalis è capace di lisare diversi bersagli cellulari, sia cellule aderenti (cellule epiteliali vaginali) che cellule in sospensione (globuli rossi) che sono i due tipi cellulari solitamente usati per i modelli di patogenicità in vitro.

Numerosi studi hanno cercato di chiarire la citopatogenicità nelle varie fasi: l'adesione cellula-cellula (Alderete and Garza, 1985; Alderete et al., 1994, 1995; Arroyo et al., 1992; da Costa et al., 2005) ; l'interazione con i componenti della matrice extracellulare (Lehker and Alderete, 2000) ; la lisi della cellula bersaglio (Adegbaju and Morenikeji, 2008; Dailey et al., 1990; Lehker et al., 1990) e la fagocitosi di questa e di batteri costituenti la flora vaginale (Pereira-Neves and Benchimol, 2007) ; infine la secrezione di fattori solubili.

L'adesione di *T. vaginalis* alle cellule bersaglio è un passaggio critico nella patogenesi del parassita (Adegbaju and Morenikeji, 2008; Arroyo and González-Robles, 1993; Fiori et al., 1999) il protozoo si trova a stretto contatto con la cellula dell'ospite creando un microambiente nel quale si creano le condizioni ottimali per l'attività dei diversi effettori di patogenicità.

Di recente è stata chiarita la struttura del lipoglicano (LG) (Ryan et al., 2011) una molecola che è in grado di legare in maniera specifica le cellule dell'ospite (Bastida-Corcuera et al., 2005; Fichorova et al., 2006; Singh et al., 1999) attraverso il legame con la galectina-1 nelle cellule epiteliali umane (Okumura et al., 2008). Nella completa caratterizzazione strutturale del lipoglicano di *T. vaginalis* realizzata da Ryan et al., è stato evidenziato che questo si differenzia nettamente dal lipoglicano di *Leishmania* e da quello di *Entamoeba* e possiede delle caratteristiche strutturali complesse che gli consentono l'adesione alle cellule dell'ospite (Ryan et al., 2011).

La pubblicazione del sequenziamento del genoma nel 2007 ha fornito interessanti spunti a partire dai quali sono stati condotti differenti studi sulle proteine contenenti domini transmembrana e domini condivisi con proteine implicate nella patogenesi di altri organismi. Sono così state individuate quattro classi di proteasi che possono essere implicate nella degradazione delle proteine dell'ospite o della matrice extracellulare (Hirt et al., 2007). La più ampia famiglia identificata è composta da un gruppo di proteine chiamate BspA-like proteins sulla base della similarità con il gene della BspA protein di *Tannerella forsythensis* (Sharma et al., 1998), BspA è una proteina di superficie capace di legare la fibronectina e il fibrinogeno.

Una delle proteine predette la TvBspA-like-625 è stata localizzata, attraverso tecniche di microscopia confocale, sulla membrana plasmatica del protozoo.

Nonostante sia stato dimostrato che l'adesione è fondamentale per la patogenesi, resta da chiarire in che modo, in seguito al contatto, si esplichino le lisi e che ruolo giochino le molecole secrete, le quali è stato dimostrato che siano capaci di determinare lisi in vitro con un meccanismo patogenetico contatto-indipendente. Diversi studi (Alderete et al., 1991; Fiori et al., 1996; Garber et al., 1989; North, 1982, 1994) mettono in evidenza l'importanza giocata da alcuni fattori secreti nell'interazione ospite-parassita.

In un lavoro in fase di pubblicazione del nostro gruppo di ricerca è stato caratterizzato il secretoma di *T. vaginalis*, questo studio ha reso disponibile il primo database proteico dettagliato sul secretoma del protozoo in differenti condizioni di pH. Grazie al questo lavoro, è stato possibile dare conferma della produzione (e secrezione) di proteine annotate nei database come "putative".

Nel secretoma sono state identificate 184 proteine secrete in condizioni standard, tra queste abbiamo rilevato: peptidasi, proteine del trasporto degli elettroni ed omeostasi redox, proteine formanti il poro, proteine con funzioni eterogenee e "conserved hypothetical protein". Sarebbe importante approfondire l'indagine su queste ultime in quanto rappresentano delle proteine divergenti/specifiche di *T. vaginalis* e quindi, se ancora conservate dall'evoluzione, di potenziale importanza per la biologia del patogeno.

Tra le proteine identificate ha attirato la nostra attenzione la presenza, di una proteina annotata come "macrophage migration inhibitory factor" (MIF), una citochina proinfiammatoria che nell'uomo gioca un ruolo centrale nell'immunità sia innata che adattativa. MIF è implicata in numerosi processi che contribuiscono a creare un ambiente ricco di condizioni predisponenti la tumorigenesi: inibisce p53, sostiene la via ERK, attiva la via COX2/PGE-2 e promuove l'angiogenesi (Conroy et al., 2010).

In uno studio di recente pubblicazione è stata caratterizzata la MIF secreta da *T. vaginalis* (TvMIF), i risultati di questi esperimenti in vitro supportano l'ipotesi che TvMIF giochi un ruolo chiave nell'infiammazione e nella cancerogenesi prostatica (Twu et al., 2014).

Considerazioni diagnostiche

Nessuna delle manifestazioni cliniche della tricomoniasi è abbastanza specifica da consentire una diagnosi precisa (Van der Pol, 2007; Schwebke and Burgess, 2004). Il quadro clinico

dell'infezione da *T. vaginalis* e quello da *Candida spp.* o da *Gardnerella vaginalis*, sono simili per cui è sempre necessaria una diagnosi di laboratorio per la conferma del sospetto clinico. Esistono differenti metodiche per diagnosticare la tricomoniasi, ma nella pratica clinica quella più diffusa e utilizzata è l'osservazione microscopica di un vetrino a fresco allestito da fluidi vaginali (Krieger et al., 1988; Adu-Sarkodie et al., 2004). Questa tecnica di identificazione diretta già descritta da Donnè nel 1836, permette di rilevare il parassita solo nel 60-70% dei casi effettivamente positivi (Fleury, 1979). In questo caso gioca un ruolo centrale l'interpretazione dell'operatore che deve possedere una notevole esperienza nel riconoscere il protozoo anche quando presenta morfologie inconsuete o ha perso la caratteristica motilità. Per questo motivo per la diagnosi di tricomoniasi, all'esame microscopico a fresco si dovrebbe affiancare sempre l'esame colturale considerato più affidabile e sensibile. In differenti lavori sono stati descritti vari terreni di isolamento di *T. vaginalis* (Borchardt and Smith, 1991; DIAMOND, 1957; Draper et al., 1993; Feinberg and Whittington, 1957) per l'esame colturale possono essere necessari sino a 7 giorni perché si osservi una crescita che è comunque dipendente dalla vitalità e dal numero dei protozoi presenti nel campione al momento dell'inoculo. Questi fattori fanno sì che una corretta diagnosi mediante esame colturale sia possibile solo quando il trasporto del campione avviene in modo rapido ed adeguato.

T. vaginalis può essere rilevato negli strisci ginecologici colorati con Papanicolaou (Papanicolaou and Wolinska, 1955). L'accuratezza di questo metodo è stata confrontata da Krieger et al. (Krieger et al., 1988) con le tecniche diagnostiche più comuni per *T. vaginalis* ed è risultata piuttosto bassa, soprattutto a causa dei numerosi falsi positivi osservati. In uno studio del 2016 invece, nel quale sono state confrontate varie tecniche di fissaggio e colorazione per la rilevazione di *T. vaginalis*, la colorazione Papanicolaou è risultata essere il miglior metodo di colorazione permanente (Menezes et al., 2016). Le conclusioni dello studio però suggeriscono che l'osservazione di *T. vaginalis* nei preparati colorati con Papanicolaou debba essere sempre confermata con un'altra metodica.

Pur essendo dei metodi di facile attuazione, le tecniche di identificazione diretta sono limitate da una bassa sensibilità che varia dal 38 all'82%, questo limite dipende non solo dall'esperienza dell'operatore ma soprattutto dal numero dei protozoi presenti nel campione, dalla loro morfologia, dalla loro motilità e dalla loro vitalità (Hobbs and Seña, 2013). L'esame colturale per la diagnosi di tricomoniasi non è diffuso in tutti i laboratori clinici a causa del

tempo richiesto per la crescita parassiti e dei costi associati ai medium di coltura (Garber et al., 1987). La scarsa sensibilità delle tecniche di identificazione diretta si può ulteriormente ridurre del 20% se la valutazione microscopica ha un ritardo di almeno dieci minuti (Kingston et al., 2003) pertanto i campioni andrebbero analizzati subito dopo la raccolta ma questo spesso è difficile in ambito clinico.

Nonostante i suoi limiti l'esame colturale è considerato il metodo gold standard per la diagnosi di tricomoniasi, da tempo si sta tentando di sostituirlo con metodi di diagnosi molecolare NAT (nucleic acid test) che si basano sull'amplificazione degli acidi nucleici (Workowski and Bolan, 2015). Le tecniche molecolari di rilevamento del protozoo sono considerate più sensibili e specifiche e rilevano il protozoo da tre a cinque volte in più rispetto alle metodiche colturali (Hollman et al., 2010; Roth et al., 2011). Nel 1992 Riley et al., hanno proposto una reazione di amplificazione genica PCR (polymerase chain reaction) per la diagnosi di tricomoniasi. Essi hanno incontrato però 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 un'elevata variabilità genotipica, oltre che fenotipica, tra diversi isolati clinici (Riley et al., 1992).

Negli anni successivi sono state messe a punto diverse tecniche molecolari (Chapin and Andrea, 2011; Diaz et al., 2010; Masue et al., 2007; Rappelli et al., 1995) per la diagnosi della tricomoniasi. Una di queste è il test APTIMA *T. vaginalis* (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA) che rileva l'RNA del protozoo con una sensibilità clinica del 95,3% -100% e una specificità del 95,2% -100% (Huppert et al., 2007; Schwebke et al., 2011). Altri test che rilevano *T. vaginalis* sono: l'OSOM Trichomonas Rapid Test (Sekisui Diagnostics, Framingham, MA), che fornisce dei risultati in circa 10 minuti con una sensibilità 82% -95% e una specificità del 97% -100% (Campbell et al., 2008) e l'Affirm VP III (Becton Dickinson, Sparks, MD), un test con una sonda di ibridazione del DNA che identifica *T. vaginalis*, *G. vaginalis* e *Candida albicans* in 45 minuti con sensibilità 63% e specificità del 99,9% (Andrea and Chapin, 2011). Nonostante questi test di diagnostica molecolare consentano di rilevare il protozoo in breve tempo e con elevata sensibilità e specificità, nella maggior parte dei laboratori non sono ancora entrati a far parte delle tecniche diagnostiche routinarie. Uno dei limiti dei test di diagnostica molecolare sono i falsi positivi, soprattutto nelle popolazioni con bassa prevalenza di tricomoniasi, in cui il valore predittivo positivo del test è bassa. Inoltre, né il test OSOM, né il test Affirm VP III possono

essere utilizzati su campioni uretrali maschili, quindi l'esame colturale rimane l'unica alternativa possibile nell'uomo, questo può essere effettuato utilizzando campioni di urina, di tamponi uretrali, o di liquido seminale. Tuttavia, anche in condizioni ottimali, l'esame colturale non è un metodo diagnostico sensibile (Bachmann et al., 2011).

Un'alternativa efficace alle metodiche diagnostiche tradizionali, potrebbero essere le tecniche immunologiche indirette. In passato sono state proposte diverse tecniche immunologiche per una più sensibile e rapida diagnosi di tricomoniasi quali ELISA (Watt et al., 1986), agglutinazione con sfere di lattice adsorbite con anticorpi policlonali anti-*T. vaginalis* (Carney et al., 1988) ed immunofluorescenza (Krieger et al., 1985). L'infezione da *T. vaginalis* determina una risposta immune sia umorale (KOTT and ADLER, 1961; Yano et al., 1983) che cellulo-mediata (Mason and Patterson, 1985) verso l'organismo. Immunoglobuline specifiche sono osservabili sia nel siero che nelle secrezioni (Street et al., 1982; Su, 1982).

Tecniche immunologiche per la ricerca degli anticorpi specifici, potrebbero costituire concretamente una valida alternativa per la diagnosi di *Trichomonas vaginalis*, tuttavia gli sforzi volti per la messa a punto di metodiche sierologiche sinora non hanno dato risultati clinicamente validi.

L'importanza clinica delle tecniche di diagnosi sierologica è ampiamente accettata soprattutto in caso di infezioni croniche, nelle quali la carica del parassita è al di sotto dei limiti di rilevabilità delle comuni tecniche diagnostiche. In casi come questi il patogeno riesce a sopravvivere indisturbato nell'ospite, stabilendo con esso una sorta di 'equilibrio' che alla lunga gli consente di creare un microambiente che predispone la proliferazione cellulare e la cancerogenesi.

In una ricerca di recente pubblicazione (Ton Nu et al., 2015), basata su un follow-up sierologico e clinico per 5-6 mesi dal momento della diagnosi diretta dell'infezione. È stata studiata la cinetica degli anticorpi circolanti (IgG) in differenti pazienti affetti da tricomoniasi. Lo studio ha rivelato che in caso di infezioni acute e sintomatiche l'azione sinergica del trattamento antimicrobico e dei meccanismi di difesa dell'ospite porta in genere alla risoluzione dell'infezione e ad una scomparsa degli anticorpi anti-*T. vaginalis* circolanti nel giro di 2-4 mesi. In caso invece di infezioni silenti e asintomatiche si può andare incontro ad una cronicizzazione della malattia e quindi ad una costante stimolazione dei linfociti B a secernere gli anticorpi anti-*T. vaginalis* (il cui titolo rimane costante nel tempo). Un paziente asintomatico che mantiene il titolo anticorpale alto per più di sei mesi è da considerarsi un

portatore con malattia cronica che, oltre ad essere in grado di trasmettere la malattia, è esposto a rischi di insorgenza di tumori locali.

Considerata l'elevata prevalenza di tricomoniasi soprattutto nei paesi in via di sviluppo, l'impatto delle complicazioni di questa infezione sui sistemi sanitari pubblici, è necessario provare a migliorare i metodi diagnostici utilizzati nei laboratori clinici, mettendo a punto tecniche di diagnosi sierologica e identificando dei markers sierodiagnostici d'infezione affidabili.

In differenti lavori l' α -actina, nella sua forma intera o in epitopi da essa derivati, è stata caratterizzata e descritta come una proteina intracellulare fortemente immunogenica che può essere utilizzata come target per la sierodiagnosi di tricomoniasi sia nelle donne che negli uomini (Addis et al., 1998, 1999; Alderete, 2017; Neace and Alderete, 2013).

Tuttavia al momento, tra i numerosi studi sulla sierodiagnosi della tricomoniasi, non ci sono esempi in letteratura di lavori che identifichino delle proteine secrete dal protozoo, come proteine immunogeniche che possano essere utilizzate come markers sierodiagnostici di tricomoniasi.

Nonostante questo gli antigeni secreti, possono essere considerati in genere dei buoni marcatori perché non solo stimolano una risposta locale, ma essendo solubili quindi facilmente assorbibili in circolo possono stimolare una risposta sistemica, inducendo risposta anticorpale sierica.

In letteratura sono presenti esempi di altri protozoi parassiti come *Giardia lamblia*, (Palm et al., 2003) che secernono delle proteine come per esempio l'arginina deaminasi, che è stata identificata come un antigene immunodominante. Inoltre, sono presenti prove del fatto che *T. vaginalis* secerne proteine come MIF che giocano un ruolo chiave nella patogenicità, nell'immunità e nell'induzioni di neoplasie (Twu et al., 2014).

Scopo del lavoro

Considerata l'elevata prevalenza della tricomoniasi e le severe complicanze associate a questa infezione, il progetto sperimentale seguito nella tesi di dottorato è stato finalizzato a un miglioramento dei metodi diagnostici tradizionali.

Lo scopo del lavoro è stato il seguente:

- Identificazione di nuovi markers sierodiagnostici d'infezione, con particolare attenzione a quelli che possono essere coinvolti con l'induzione ed il mantenimento dello stato tumorale
- Messa a punto di tecniche di diagnosi sierologica
- Interpretazione del ruolo che le proteine secrete giocano nell'attivazione del sistema immunitario

L'identificazione di marcatori immunologici espressi e secreti sempre durante l'infezione e la messa a punto di nuove tecniche di diagnosi sierologica è importante soprattutto per lo screening sierologico di pazienti che sono stati esposti alla tricomoniasi in relazione alla possibilità che questi possano sviluppare un tumore.

Materiali e metodi

Microorganismi e loro coltivazione

Il ceppo G3 di *T. vaginalis* è stato coltivato a 37°C in terreno Diamond's TYM (DIAMOND, 1957; Diamond et al., 1978) supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%.

I differenti ceppi di *Escherichia coli* (*E.coli*) utilizzati in questo studio sono stati coltivati a 37°C in Lurie-Bertani (LB) medium (Bacto® tryptone 10g/L, Bacto® yeast extract 5g/L e NaCl 10g/L) e LB-agar 2%.

Ceppi	Genotipi	Utilizzo	Antibiotico resistenza	Referenze
One Shot™ TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\pm 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1 endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU galK</i> $\Delta\lambda$ - <i>rpsL nupG tonA hsdR</i>	Clonaggio		Invitrogen
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS B</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Espressione proteica		(Studier and Moffatt, 1986)
DH5 α	F- 80 <i>dlacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1</i>	Clonaggio		(Woodcock et al., 1989)
Tuner (DE3)	F – <i>ompT hsdSB</i> (rB– mB–) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)	Espressione proteica		Novagen
Rosetta™(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B – m _B –) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Espressione proteica	Cam34 μ g/ml	(Novy et al., 2001) Novagen
AD494 (DE3)	$\Delta ara-leu7697$ $\Delta lacX74$ $\Delta phoAPvull$ $\Delta malF3F'$ [<i>lac+(lacIq)pro</i>] <i>trxB::kan</i> (DE3)	Espressione proteica	Kan 15 μ g/ml	Novagen

Estrazione del DNA genomico

10^7 cellule di *T. vaginalis* sono state centrifugate a 900xg per 5' a 4°C e lavate due volte in phosphate-buffered saline (PBS). Il pellet è stato risospeso in PBS e gli sono stati aggiunti 20 µl di DEPC (dietilpirocarbonato), successivamente è stato incubato 5' in ghiaccio. Il pellet è stato poi risospeso in 40 ml di buffer Triton X-100-RBS (NaCl 10 mM, TrisHCl 10 mM, MgCl₂ 5mM, Triton X-100 1%), centrifugato a 900xg per 3' a 4°C. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 40 ml di buffer Triton X100 RBS e sottoposto a un'altra centrifugazione nelle stesse condizioni. Il pellet è stato poi risospeso in 5 ml di proteinasi K 1% e SDS 1,5% e incubato per 2 ore a 55°C e per 10' a 65°C.

Successivamente sono state fatte tre estrazioni in fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), e alla fase acquosa sono stati aggiunti 0,1 volumi di Sodio Acetato 3M pH 5.2 e 2 volumi di etanolo assoluto.

La miscela è stata incubata a -20°C per almeno 1 ora e poi centrifugata a 16000xg per 20 minuti. Il pellet di DNA così ottenuto è stato lavato in etanolo 70% e poi risospeso in 200 µl di TE buffer. Il DNA è stato successivamente quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm con Nanodrop 2000 (ThermoScientific, UK).

Clonaggio in pET-29b(+) e pET-43.1a(+)

I primers usati in questo studio sono stati disegnati con l'ausilio di Oligo Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>).

Sono state disegnati primers specifici, per l'amplificazione mediante PCR dei seguenti geni:

- TVAG_484570 (perossiredoxina, TvPRX)
- TVAG_151220 (heat shock protein 70, TvHSP70)
- TVAG_331660 (ubiquitina, TvUBI)

L'amplificazione è stata eseguita usando come stampo il DNA genomico del ceppo di riferimento internazionale di *T. vaginalis* G3.

I primers per il clonaggio sono stati provvisti di siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione (NdeI: CATATG, PshAI: GACNNNGTC, KpnI: GGTACC)

TvPRX_NdeI_for	<u>GCAATTCATATGATGCTTGTCGGAAAACCAGCT</u>
TvPRX_KpnI_rev	<u>CGGGGTACCCGAAACCGACCTGTTTAGATTA</u>
TvHSP70_PshI_for	<u>GCGGACAAGAGTCTATCTGCTATTGGTATTGATCTTGGTACAACATA</u>
TvHSP70_KpnI_rev	<u>GGGGTACCCCTTAGTCGACTTCCTCAACACGTGGGCCAGA</u>
TvUBI_NdeI_for	<u>GGAATTCATATGATGCAGATCTTCGTTAAGAC</u>
TvUBI_KpnI_rev	<u>GGTACCCCTCCTTGCCAGCCTTCTT</u>

La reazione di amplificazione di TvPRX è stata messa a punto e allestita utilizzando DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Thermo Scientific™) secondo il seguente protocollo:

Acqua	29,4 µl
10x optimized DyNAzyme buffer	5 µl
Primer F (10uM)	2,5 µl
Primer R (10uM)	2,5 µl
dNTP's (1,25mM)	8 µl
DyNAzyme Taq polimerasi (2U/µl)	0,6 µl
DNA genomico (50ng/µl)	2 µl
Volume finale	50 µl

La reazione di amplificazione di TvHSP70 è stata messa a punto e allestita utilizzando Taq DNA polymerase (Invitrogen by life technologies) secondo il seguente protocollo:

Acqua	24,4 μ l
10x PCR buffer	5 μ l
Primer F (10uM)	2,5 μ l
Primer R (10uM)	2,5 μ l
dNTP's (1,25mM)	8 μ l
DMSO 5%	2,5 μ l
MgCl ₂ 50mM	2,5 μ l
Taq DNA polymerase (5U/ μ l)	0,6 μ l
DNA genomico (50ng/ μ l)	2 μ l
Volume finale	50 μ l

La reazione di amplificazione di TvUBI è stata messa a punto e allestita utilizzando DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Thermo Scientific™) secondo il seguente protocollo:

Acqua	24,4 μ l
10x optimized DyNAzime buffer	5 μ l
Primer F (10uM)	2,5 μ l
Primer R (10uM)	2,5 μ l
dNTP's (1,25mM)	8 μ l
DMSO 10%	5 μ l
DyNAzime Taq polimerasi (2U/ μ l)	0,6 μ l
DNA genomico (50ng/ μ l)	2 μ l
Volume finale	50 μ l

Sono stati impostati i seguenti cicli di amplificazione:

Tv_PRX	Temperatura	Durata	Numero dei cicli
Denaturazione iniziale	95°C	5 minuti	1
Denaturazione	95°C	1 minuto	
Annealing	55°C	45 secondi	30
Estensione	72°C	45 secondi	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1

Tv_HSP	Temperatura	Durata	Numero dei cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5 minuti	1
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	50°C	1 minuto	10
Estensione	72°C	2 minuti	
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	71°C	1 minuto	30
Estensione	72°C	2 minuti	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1

Tv_UBI	Temperatura	Durata	Numero dei cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5 minuti	1
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	45°C	1 minuto	10
Estensione	72°C	1 minuto	
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	61,3°C	1 minuto	30
Estensione	72°C	1 minuto	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1

Sono state allestite tre differenti reazioni di PCR contenenti le coppie di primers forward e reverse per l'amplificazione di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI. Le dimensioni attese degli ampliconi sono state calcolate online mediante l'ausilio di differenti programmi:

TvPRX 591 bp; TvHSP70 1980 bp e TvUBI 399 bp.

Le dimensioni degli ampliconi sono state visualizzate e confermate mediante elettroforesi su gel di agaroso all'1%.

Gli ampliconi sono stati purificati mediante il QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), seguendo le istruzioni del produttore. Brevemente, alla miscela di amplificazione sono stati aggiunti 4 volumi di Binding Solution e la miscela è stata incubata in una colonnina silicea a temperatura ambiente per 1'. La colonnina è stata poi centrifugata a 17.900xg per 1'. Successivamente la colonna è stata lavata con 700 µl di washing buffer ed il DNA è stato infine eluito in acqua mediante centrifugazione a 17.900xg per 1'.

Il DNA è stato successivamente quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm con Nanodrop 2000 (ThermoScientific, UK).

I plasmidi utilizzati nel corso di questo studio sono elencati in tabella:

<i>Plasmidi</i>	<i>~ Dimensioni (kbp)</i>	<i>Fenotipo/genotipo</i>	<i>Referenze</i>
pET-29b(+)	5.4	Kan r,T7, lac, lacIq	Novagen
pET-43.1a(+)	7.3	Amp r,T7, lac, lacIq	Novagen

Per il clonaggio sono stati scelti due vettori di espressione: pET-43.1a(+) per TvHSP70 e pET-29b(+) per TvPRX e TvUBI; le caratteristiche principali di entrambi sono riportate in Figura 1.

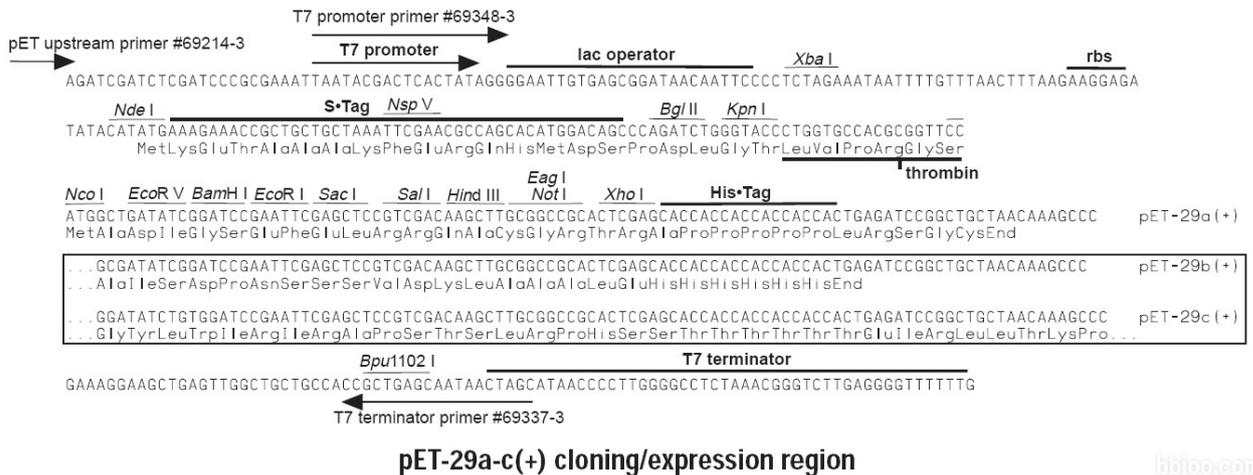
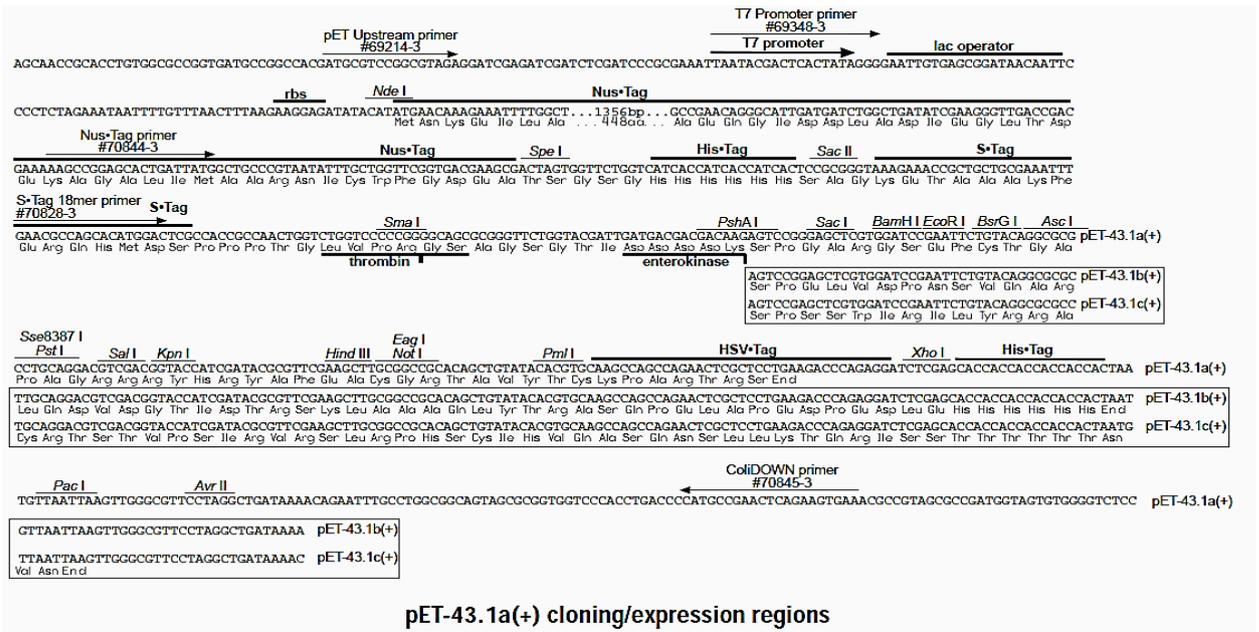


Figura 1. Mappa dei plasmidi usati in questo studio

I sistemi di clonaggio scelti ci consentiranno di produrre le proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI come proteine di fusione con dei Tag specifici, come riportato in Figura 2.

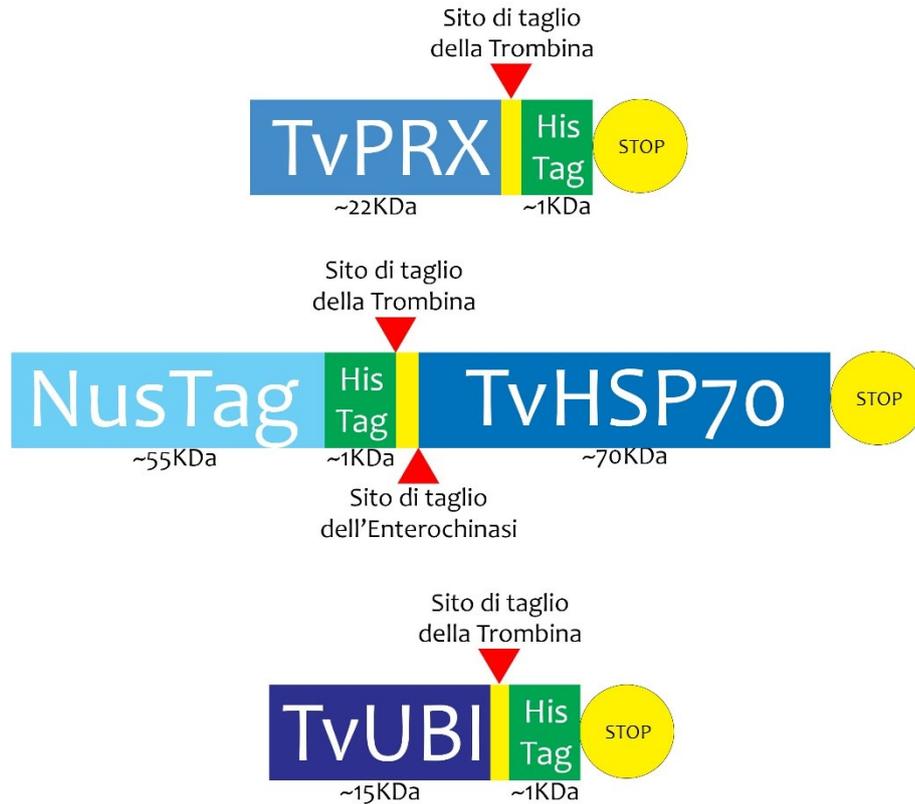


Figura 2. Le proteine di fusione: TvPRX, TvHSP70 e TvUBI

I plasmidi pET-29b+ e pET-43.1a(+) sono stati purificati da una coltura overnight di *E. coli* mediante il kit commerciale Genelute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich).

Il vettore pET-29b+ e i prodotti di PCR (TvPRX e TvUBI) precedentemente purificati sono stati sottoposti a una prima digestione con l'enzima di restrizione NdeI (37°C per tre ore o overnight) dopo la purificazione con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) sono stati sottoposti a una seconda digestione con l'enzima di restrizione Kpn I (37°C per due ore). Il vettore pET-43.1a(+), e il prodotto di PCR (TvHSP70) precedentemente purificati sono stati sottoposti a una prima digestione con l'enzima di restrizione PshI (37°C per 1 ora) e dopo la purificazione sono stati sottoposti a una seconda digestione con l'enzima di restrizione Kpn I (37°C per due ore).

Le reazioni di digestione sono state allestite come segue in tabella, in accordo con le istruzioni del produttore.

	TvPRX	TvUBI	TvHSP70	pET-29b/pET-43.1a
Vettore/inserito (100ng/ μ l)	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
10x buffer	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
NdeI/KpnI/PshI (4U/ μ l)	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
H ₂ O	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Volume totale	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

I prodotti di PCR e il plasmide digerito sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), e il DNA quantificato spettrofotometricamente (Nanodrop 2000).

Le reazioni di ligazione tra i prodotti di PCR e i vettori digeriti, sono state allestite utilizzando il kit Novagen RAPID ligation kit (Novagen) seguendo le istruzioni del produttore, in modo che ci fosse un rapporto molare di 3:1 tra l'inserito e il plasmide.

	Campione	Controllo negativo
Vettore (10ng/ μ l)	2 μ l	2 μ l
Inserito DNA (10ng/ μ l)	6 μ l	0 μ l
5x Ligase buffer	4 μ l	4 μ l
T4 DNA Ligase (4U/ μ l)	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	7 μ l	13 μ l
Volume totale	20 μ l	20 μ l

Le miscele di reazione sono state incubate a 37°C per 1 ora. 5 μ l delle miscele di ligazione sono stati usati per trasformare *E. coli* ceppo Top10 competenti. Brevemente, una volta aggiunti i 5 μ l delle mix di ligazione i batteri sono stati mantenuti in ghiaccio per 1 ora, incubati a 42°C per 2', e poi rimessi in ghiaccio. I batteri sono stati risospesi in 250 μ l di SOC medium (Super optimal broth, Invitrogen) e incubati in agitazione a 37°C per 1 ora, per poi essere seminati su piastre di terreno selettivo.

Rispettivamente, i plasmidi ricombinanti pET29TvPRX e pET29TvUBI su piastre LB-agar Kan (Kanamicina) 25 µg/ml e il plasmide pET43TvHSP70 su piastre LB-agar Amp (Ampicillina) 50 µg/ml.

Le piastre sono state incubate a 37°C overnight. Il giorno successivo è stato effettuato lo screening delle colonie di batteri ricombinanti cresciute sulle piastre.

Le colonie scelte, sono state reisolate almeno tre volte su piastra e poste in coltura liquida selettiva.

In seguito è stata allestita una PCR con primers specifici per i geni d'interesse, per valutare quali tra le colonie cresciute avessero realmente il plasmide con l'inserto.

I risultati della PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agaroso all'1%.

Successivamente i plasmidi ricombinanti sono stati purificati, quantificati e sequenziati mediante il metodo Sanger, presso il centro BMR Genomics dell'Università di Padova.

I risultati del sequenziamento del DNA ricombinante, sono stati allineati con le sequenze genomica attese (scaricate dalla banca dati NCBI) mediante l'ausilio di software per il multi-allineamento di sequenze genomiche come Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Induzione dell'espressione delle proteine ricombinanti in *E. coli*

Una volta purificati, quantificati e sequenziati i plasmidi ricombinanti pET29TvPRX, pET43TvHSP70 e pET29TvUBI sono stati trasformati in diversi ceppi di espressione, seguendo le istruzioni del produttore:

- pET29TvPRX in *E. coli* BL21(DE)
- pET43TvHSP70 in *E. coli* BL21(DE), AD494 (DE), Tuner(DE3) e Rosetta(DE3)
- pET29TvUBI *E. coli* BL21(DE)

E. coli Rosetta (DE3) sono derivati dal ceppo BL21 e progettati per aumentare l'espressione in *E. coli* di proteine eucariotiche che contengono codoni rari. Tali batteri producono i tRNAs per 7 codoni rari (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC E CGG) che sono sotto il controllo dei loro stessi promotori e le cui sequenze sono contenute all'interno del plasmide pRARE, che ha come marcatore di selezione la resistenza al Cloramfenicolo (Cam).

I batteri trasformati sono stati seminati su piastre di terreno selettivo rispettivamente:

- *E. coli* BL21 trasformati con pET29TvPRX e pET29TvUBI su piastre LB-agar Kan 25 µg/ml

- *E. coli* BL21 ed *E. coli* Tuner trasformati con pET43TvHSP70 su piastre LB-agar Amp 50 µg/ml
- *E. coli* AD494 trasformati con pET43TvHSP70 su piastre LB-agar Amp 25 µg/ml Kan 12,5 µg/ml
- *E. coli* Rosetta trasformati con pET43TvHSP70 su piastre LB-agar Kan 12,5 µg/ml Cam 17 µg/ml

Dopo incubazione a 37°C overnight delle piastre, è stato effettuato uno screening delle colonie di batteri ricombinanti cresciute.

Le singole colonie isolate sono state selezionate e rilanciate overnight; in LB Kan 25 µg/ml gli *E. coli* BL21 con pET29TvPRX e pET29TvUBI, in LB Amp 50 µg/ml gli *E. coli* BL21 e di *E. coli* Tuner con pET43TvHSP70, in LB Amp 25 µg/ml Kan 12,5 µg/ml gli *E. coli* AD494 con pET43TvHSP70 e in LB Kan 12,5 µg/ml Cam17 µg/ml gli *E. coli* Rosetta con pET43TvHSP70.

Sono state testate differenti strategie di induzione (37°C/30°C e 0,5/1 mM IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside)).

Le condizioni di induzione scelte per l'espressione delle tre proteine ricombinanti in esame sono state:

- temperatura di 37°C
- induzione a OD₆₀₀=0,6
- induzione con IPTG 0,5mM
- durata 4 ore

Aliquote di lisati batterici prima e dopo l'induzione sono state analizzate mediante SDS-page (elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio-dodecyl-solfato) a diversi intervalli di tempo e blottate su una membrana di nitrocellulosa a 250 mA per 1h.

La membrana è stata saturata con 5% skim milk powder in PBS e incubata per 2h con un anticorpo anti-istidina (Sigma) coniugato con perossidasi. La reazione antigene-anticorpo è stata rivelata in chemiluminescenza con kit Supersignal west pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) al Versadoc (Biorad).

Purificazione delle proteine ricombinanti espresse in *E. coli*

Per le proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, prodotte con un Tag 6xHis sono stati testati differenti protocolli di purificazione.

- Protocollo di purificazione QIAexpress Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen)

A seguito dell'induzione, le colture di *E. coli* sono state centrifugate a 5000g per 10 minuti a 4°C. In accordo con le istruzioni del produttore, il pellet è stato risospeso in 10 ml di buffer di lisi (supplementato con lisozima 1mg/ml e benzonase nucleasi 3U/ml) e incubato in ghiaccio per 30 minuti, il lisato è stato centrifugato 14000rpm 4 °C 30 minuti e il surnatante è stato caricato sulla colonna cromatografica

Dopo tre lavaggi con wash buffer, la proteina è stata eluita in tre eluizioni differenti aggiungendo 1ml alla volta di elution buffer. Sono stati testati elution buffer con pH 8 e pH 7.

- Protocollo di purificazione Ni-NTA Spin Kit (Qiagen)

Dopo quattro ore di induzione, le colture di *E. coli* sono state centrifugate a 5000g per 10 minuti a 4°C, il pellet è stato risospeso in buffer di lisi. Sono stati testati i buffer di lisi, NP1 (50mM NaH₂PO₄mM, 300mM NaCl e imidazolo 1 mM a pH 8) e NP10 (50mM NaH₂PO₄mM, 300mM NaCl e imidazolo 10 mM a pH 8) supplementati con lisozima 1mg/ml e benzonase nucleasi 3U/ml. Il pellet risospeso è stato incubato in ghiaccio 30 minuti.

Prima della sonicazione sono stati eseguiti tre cicli: 1 minuto in azoto-10 minuti 42°C. Il lisato sonicato è stato chiarificato a 10000xg 4 °C per 30 minuti. Il surnatante è stato fatto passare attraverso una colonna di cromatografica di affinità (Ni-NTA spin column), precedentemente equilibrata, centrifugando per 2 minuti a 700xg. Le colonne sono state lavate 3 volte testando differenti buffers di lavaggio NP20 (50mM NaH₂PO₄mM, 300mM NaCl e imidazolo 20 mM a pH 8) e NP50 (50mM NaH₂PO₄mM, 300mM NaCl e imidazolo 50 mM a pH 8). Sono state sperimentate differenti condizioni di eluizione con i buffer NP250 (50mM NaH₂PO₄mM, 300mM NaCl e imidazolo 250 mM a pH 8) e NP500 (50mM NaH₂PO₄mM, 300mM NaCl e imidazolo 500 mM a pH 8).

- Protocollo di purificazione in condizioni denaturanti (Qiagen):

Dopo quattro ore di induzione le colture di *E. coli* sono state centrifugate a 5000g per 10 minuti a 4°C, il pellet è stato risospeso in buffer di lisi B (100mM NaH₂PO₄, 100mM TrisCl 7M urea pH 8) e incubato in ghiaccio 30 minuti. Al buffer B sono stati aggiunti il lisozima 1mg/ml, la benzonase nucleasi 3U/ml e un mix di inibitori di proteasi (Sigma). Prima della sonicazione sono stati eseguiti tre cicli: 1 minuto in azoto-10 minuti 42°C. Dopo la sonicazione il lisato è stato chiarificato 10000xg 4 °C 30 minuti. Il surnatante è stato caricato sulla colonna Ni-NTA Superflow Columns precedentemente equilibrata. Dopo tre lavaggi con wash buffer C

(100mM NaH₂PO₄, 100mM TrisCl 8M urea pH 6.3) la proteina è stata eluita in tre eluizioni differenti aggiungendo 1ml alla volta di elution buffer E (100mM NaH₂PO₄, 100mM TrisCl 8M urea pH 4.5).

I campioni: Pellet, surnatate o CFE (cell free extracts), FT (flow through), Wash e le eluizioni ottenuti nei differenti step di purificazione sono stati analizzati mediante SDS-page e western blotting.

Dopo l' SDS-page i gel sono stati colorati con Simply Blue (Invitrogen). Le dimensioni delle proteine di fusione sono state predette online con l'ausilio del programma ExPASy: (TvPrx: ~ 25 kDa, TvHSP70: ~ 130 kDa e TvUBI: ~ 20 kDa) e sono state confermate visualizzando il gel con il marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10/170 kDa)(Biorad).

Per il western-blotting i campioni sono stati analizzati mediante SDS-page e blottati su una membrana di nitrocellulosa a 250 mA per 1h. La membrana è stata saturata in PBS contenente Tween20 0,05% e BSA (albumina sierica bovina) (Sigma-Aldrich) al 3% e successivamente incubata per 2h con un anticorpo anti-istidina (Sigma) coniugato con perossidasi. La reazione antigene-anticorpo è stata rivelata in chemiluminescenza con kit Supersignal west pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) al Versadoc (Biorad).

Le preparazioni proteiche sono state purificate da LPS (lipopolisaccaride) con l'ausilio di Triton X-114. Brevemente, all'eluato sono state aggiunti Triton X-114 all'1%, posto in agitazione a 4°C per 30' e a 37°C per 10'. Dopo centrifugazione a 12000xg per 10' a 25°C, la fase superiore è stata recuperata. Questo protocollo è stato ripetuto per 5 volte.

La concentrazione residua di LPS nel preparato proteico è stata stimata utilizzando il saggio cromogenico Limulus Amebocyte Lysate (Lonza).

I campioni purificati, sono stati trasferiti in tubi da centrifuga dotati di filtro (Amicon® Ultra Centrifugal Filters), in grado di trattenere molecole con un peso molecolare pari o superiore ai 10 kDa/30 kDa/50kDa e centrifugati per 20' a 30.000xg, questo passaggio è stato ripetuto 3 volte allontanando l'eluato e aggiungendo di volta in volta acqua priva di LPS.

Le preparazioni proteiche purificate sono state quantificate con il metodo di Bradford.

Clonaggio in TagVag-94

Con l'ausilio di Oligo Calculator, sono state disegnati dei primers specifici, per l'amplificazione mediante PCR dei geni: TvPRX, TvHSP70 e TvUBI analizzati in precedenza.

L'amplificazione è stata eseguita usando come stampo il DNA genomico del ceppo di *T. vaginalis* G3.

I primers per il clonaggio sono stati provvisti siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione (NdeI: CATATG e BamHI: GGATCC)

TagvagTvPRX_forward	GGAATTC CATATG <u>ATGCTTGTCGGAAAACCAGCTCCA</u>
TagvagTvPRX_reverse	GGATCC <u>GTTGTTAGCCTTGCCGAAGTACTCCTT</u>
TagvagTvHSP70_forward	GGAATTC CATATG <u>ATGTCTGCTATTGGTATTGATCTTG</u>
TagvagTvHSP70_reverse	GGATCC <u>GTCGACTTCTCAACACGTGGGCCA</u>
TagvagTvUBI_forward	GGAATTC CATATG <u>ATGCAGATCTTCGTTAAGACCCTTAC</u>
TagvagTvUBI_reverse	GGATCC <u>CCCCTCCTTGCCAGCCTTCTTT</u>

Le reazioni di amplificazione di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI sono state messe a punto ed allestite utilizzando Vent DNA Polymerase (NEB) secondo il seguente protocollo:

	TvPRX	TvHSP70	TvUBI
Acqua	22,4 µl	22,4 µl	26,9 µl
ThermoPol Reaction Buffer (10X)	5 µl	5 µl	5 µl
Primer F (10uM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer R (10uM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTP's (1,25mM)	8 µl	8 µl	8 µl
Vent DNA Polymerase	0,6 µl	0,6 µl	0,6 µl
MgSO4 (4mM)	2µl	2 µl	2,5 µl
DMSO 10%	5 µl	5 µl	-
DNA genomico (50ng/µl)	2µl	2 µl	2 µl
Volume finale	50 µl	50 µl	50 µl

Sono stati impostati i seguenti cicli di amplificazione:

Tv_PRX	Temperatura	Durata	Numero dei cicli
Tv_UBI			
Denaturazione iniziale	94°C	5 minuti	1
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	45°C	1 minuto	10
Estensione	72°C	1 minuto	
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	55°C	1 minuto	30
Estensione	72°C	1 minuto	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1

Tv_HSP70	Temperatura	Durata	Numero dei cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5 minuti	1
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	50°C	1 minuto	10
Estensione	72°C	2 minuto	
Denaturazione	94°C	1 minuto	
Annealing	55°C	1 minuto	30
Estensione	72°C	1 minuto	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1

Sono state allestite tre differenti reazioni di PCR contenenti le coppie di primers forward e reverse per l'amplificazione di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI.

Le dimensioni degli ampliconi sono state visualizzate e confermate mediante elettroforesi su gel di agaroso all'1%. Gli ampliconi sono stati purificati mediante il QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), seguendo le istruzioni del produttore. Il plasmide TagVag-94 (Ortiz and Johnson, 2003) è stato purificato da una coltura overnight di *E. coli* con il kit commerciale Genelute Plasmid Midiprep Kit (Sigma Aldrich).

Il vettore TagVag-94 e i prodotti di PCR precedentemente purificati sono stati sottoposti a una prima digestione con l'enzima di restrizione NdeI (37°C overnight) e dopo la purificazione con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) sono stati sottoposti a una seconda digestione con l'enzima di restrizione BamHI (37°C per due ore). Le reazioni di digestione sono state allestite come segue in tabella, in accordo con le istruzioni del produttore.

	TvHSP70	TvUBI	TagVag-94
Vettore/inserito (100ng/ µl)	20 µl	20 µl	20 µl
10x buffer	3 µl	3 µl	3 µl
NdeI/ BamHI (4U/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	5 µl	5 µl	5 µl
Volume totale	30 µl	30 µl	30 µl

I prodotti di PCR e il plasmide digerito sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), e il DNA quantificato spettrofotometricamente. (Nanodrop)

Le reazioni di ligazione tra i prodotti di PCR e i vettori digeriti, sono state allestite utilizzando il kit Novagen RAPID ligation kit (Novagen) seguendo le istruzioni del produttore, in modo che ci fosse un rapporto molare di 3:1 tra l'inserito e il plasmide

	Campione	Controllo negativo
Vettore (10ng/ µl)	2 µl	2 µl
Inserito DNA (10ng/µl)	6 µl	0 µl
5x Ligase buffer	4 µl	4 µl
T4 DNA Ligase (4U/µl)	1 µl	1 µl
H ₂ O	7 µl	13 µl
Volume totale	20 µl	20 µl

Le miscele di reazione sono state incubate a 37°C per 1 ora.

5 µl delle miscele di ligazione sono stati usati per trasformare *E. coli* ceppo Top10 competenti. Brevemente, una volta aggiunti i 5 µl delle mix di ligazione i batteri sono stati mantenuti in ghiaccio per 1 ora, incubati a 42°C per 2', e poi rimessi in ghiaccio. I batteri sono stati risospesi in 250 µl di SOC medium e incubati in agitazione a 37°C per 1 ora, per poi essere seminati su piastre di terreno selettivo. Le piastre sono state incubate a 37°C overnight.

Il giorno successivo è stato effettuato lo screening delle colonie di batteri ricombinanti cresciute sulle piastre. È stata allestita una PCR con primers specifici per i geni d'interesse, per valutare quali tra le colonie cresciute avessero integrato il plasmide con l'inserito.

I risultati della PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agaroso all'1%.

Successivamente i plasmidi ricombinanti sono stati purificati, quantificati e sequenziati presso BMR Genomics.

I risultati del sequenziamento del DNA ricombinante, sono stati allineati con le sequenze genomiche attese (scaricate dalla banca dati NCBI) mediante l'ausilio di software per il multi-allineamento di sequenze genomiche come Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

I plasmidi ricombinanti TagvagTvHSP70 e TagvagTvUBI sono stati purificati da una coltura di *E. coli* con il kit commerciale Genelute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich).

Transfezione *T. vaginalis*

Il ceppo G3 di *T. vaginalis* è stato coltivato a 37°C in terreno Diamond's TYM supplementato con FBS al 10%.

La coltura di partenza ~ 750 ml (1×10^6 cell/ml) è stata pellettata a 1800 rpm 10' 4°C, il pellet è stato risospeso in 30 ml di Diamond's completo freddo, incubato in ghiaccio e ricentrifugato 1800 rpm 8' 4°C. Una volta allontanato il surnatante il pellet è stato pesato, incubato in ghiaccio e risospeso in Diamond's completo freddo (500 μ l per g di pellet).

Sono stati aliquotati 300 μ l ($2,5 \times 10^8$ cellule/ml) della sospensione cellulare in ciascuna ellettrocuvetta (0,4cm) ai quali sono stati aggiunti 50 μ g di ciascun plasmide ricombinate (TagvagTvHSP70 e TagvagTvUBI).

Le elettrocuvette sono state incubate in ghiaccio per 5' e le cellule sono state elettroporate (350 volts 960 μ Fd) utilizzando lo strumento Bio-Rad gene pulser (Biorad).

Le cellule elettroporate sono state risospese sotto cappa in 50 ml Diamond's completo e incubate a 37°C per 4 ore. In seguito è stata aggiunta geneticina 100 μ g/ μ l e sono state incubate a 37°C overnight.

Il giorno seguente sono stati trasferiti circa 40 ml in una nuova falcon senza toccare il pellet, sono stati centrifugati 1800 rpm 8', è stato allontanato il surnatante e il pellet è stato risospeso gentilmente in 25 ml di Diamond's completo con geneticina 100 μ g/ μ l, la coltura è stata riposta a 37°C.

Studi *in silico*: strumenti bioinformatici per la predizione dei peptidi

In prima istanza, sono state effettuate delle analisi di sequenza e di struttura delle proteine TvPRX, TvHSP70 e TvUBI con l'ausilio di NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov), Uni-Prot (www.uniprot.org) e ExpASy (us.expasy.org/tools).

Le analisi di predizione di sequenze peptidiche potenzialmente immunogene delle proteine TvPRX, TvHSP70 e TvUBI sono state eseguite mediante il programma bioinformatico BepiPred 1.0 Server (Larsen et al., 2006) ed è stato usato IEDB (Immune Epitope Database) Analysis Resource. Per una più accurata caratterizzazione, le sequenze dei peptidi predetti sono state analizzate su www.immuneepitope.org utilizzando sei differenti tools di predizione (Bepipred Linear Epitope Prediction, Chou and Fasman beta turn prediction, Emini surface accessibility scale, Karplus and Schulz flexibility scale, Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale e Parker Hydrophilicity Prediction).

Le proprietà dei peptidi predetti quali solubilità, antigenicità e accessibilità sono state investigate utilizzando il programma disponibile online PepCalc.com.

Con l'ausilio del programma SEAVIEW, sono stati scelti dei peptidi che contraddistinguessero in modo specifico le proteine in esame, allineando le sequenze peptidiche con le proteasi e visualizzando la localizzazione dei peptidi predetti all'interno della sequenza proteica (Gouy et al., 2010). Le sequenze peptidiche sono state analizzate anche su Blast-P (Basic Local Alignment Search Tool-Protein), (Altschul et al., 1990; Zhang et al., 1998) per indagare il loro eventuale livello di omologia con altre sequenze peptiche di altri sistemi biologici.

Infine, l'antigenicità dei peptidi è stata prevista sul sito web www.innovagen.se ed è stata valutata l'idoneità per la produzione di anticorpi della sequenza peptica.

Nove sequenze peptidiche (tre per ciascuna proteina in esame) sono state disegnate con una lunghezza variabile tra i 10 e i 13 aminoacidi e con una cisteina N o C terminale, per consentire il cross-linking con una proteina carrier.

Tutti i peptidi sono stati sintetizzati dalla LifeTein, LLC (Somerset, New Jersey, USA) con una purezza >90%. (Tabella 1)

Proteine	Lunghezza		Peptidi	Inizio-Fine	Posizione
Tvag_484570 (TvPRX)	196 aa	1	GKPAPAFKSC	4-11	N-terminale
		2	AVFPDTEFKC	85-93	Interna
		3	TPRKEGGLGEC	14-22	N-terminale
Tvag_151220 (TvHSP70)	659 aa	1	RSDGDRPKIEC	93-101	N-terminale
		2	CNEKSDKERH	324-332	Interna
		3	KMSKSDVTDC	181-192	Interna
Tvag_331660 (TvUBI)	132 aa	1	VEPTDRIEDC	17-25	N-terminale
		2	LEDGNTLQDC	49-58	Interna
		3	GKEAYEPSLRC	74-82	Interna

Tabella 1. Caratteristiche dei peptidi usati in questo lavoro

Per immobilizzare i peptidi sulla piastra ci siamo serviti di un metodo di cross-linking diretto (DLCM) messo a punto in uno studio di recente pubblicazione (Cuccuru et al., 2012).

Brevemente, seguendo le istruzioni del produttore e il metodo DLCM, 0,5 µg/well di BSA-M (albumina sierica bovina maleimide attivata) (Pierce, Rockford, IL, USA) sono stati distribuiti sulle piastre successivamente incubate a 4°C overnight.

In seguito 5 mg di ciascun peptide sono stati risospesi in MCB (maleimide conjugation buffer: 83mM sodium phosphate buffer, 0.1mM EDTA, 0.9mM NaCl, 0.02% sodium azide, pH 7.2).

Alle piastre con BSA-M dopo i lavaggi, sono stati aggiunti 0,5 µg/well di ciascun peptide risospeso in MCB, dopo l'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente per permettere il cross-linking, le piastre sono state lavate tre volte con PBS-T (Tween 20) 0.05%, saturate con PBS-T 0.05% BSA 3% e conservate a 4°C sino al momento dell'utilizzo.

Selezione dei campioni: test ELISA con *T. vaginalis* intero

Per valutare l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, durante le infezioni da *T. vaginalis*, mediante l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), sono stati selezionati campioni di donne e di uomini.

Sono stati utilizzati i sieri di 93 donne di pari età e con comportamenti sessuali a rischio. Precedentemente, mediante osservazione microscopica di un vetrino a fresco di tampone vaginale, 53 sono stati classificati come *T. vaginalis*-positivi, quindi affette da tricomoniasi e 40 come *T. vaginalis*-negativi quindi non affette.

La classificazione iniziale è stata confermata mediante un test ELISA in cui *T. vaginalis* G3 è stato utilizzato come antigene.

Quindi in primo luogo i sieri sono stati testati per la presenza di IgG contro *T. vaginalis*, il protocollo ELISA utilizzato è quello messo a punto da Addis MF et al., (Addis et al., 1999) in cui *T. vaginalis* G3 verrà utilizzato come antigene. Il ceppo *T. vaginalis* G3 è stato coltivato in Diamond's TYM supplementato con FBS al 10%, le cellule sono state lavate in PBS due volte e sono state risospese ad una concentrazione di 6×10^6 /ml.

3×10^3 cellule in 50 µl di PBS sono state aggiunte a ciascun pozzetto e sono state lasciate asciugare sotto cappa overnight. Il giorno dopo le cellule sono state fissate in metanolo assoluto freddo per 3'. Dopo i lavaggi in acqua, le piastre sono state saturate con soluzione PBS-T 0.05% BSA 3% per 2 ore. Dopo i lavaggi in PBS-T 0.05% sono stati aggiunti i sieri diluiti 1: 200 in PBS-T BSA 2% e sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo i lavaggi in PBS-T 0.05% è stato aggiunto l'anticorpo secondario, 100 µl di anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma, St. Louis) diluito 1:55000 in PBS-T BSA 2% secondo le istruzioni del produttore e lasciato in incubazione per 2 ore. La reazione colorimetrica è stata sviluppata usando le Sigma FAST pNPP tablet secondo le istruzioni del produttore, l'assorbanza è stata

misurata a 405 nm con lo strumento VersaMax (Molecular Devices) e dati elaborati con il software SoftMaxPro.

Tutti i campioni sono stati testati in duplicato, i sieri sono stati classificati stabilendo un cutoff come il valore medio dei controlli, ottenuto con i sieri di 10 volontari sani distinti dai campioni in esame, più tre deviazioni standard. I sieri sono stati classificati come positivi o negativi se i valori di densità ottica (OD) erano superiori o inferiori rispetto al valore del cutoff.

Dei 93 sieri di donne testati, 53 sono stati classificati come *T. vaginalis*-sieropositivi mentre 40 sono stati classificati come *T. vaginalis*-sieronegativi. Quindi la classificazione iniziale effettuata mediante esame microscopico a fresco è stata confermata.

In seguito i sieri di 40 uomini di pari età e con comportamenti sessuali a rischio, sono stati testati per la presenza di anticorpi contro *T. vaginalis*, con un ELISA in cui *T. vaginalis* è stato utilizzato come antigene, eseguita come spiegato in precedenza.

Tutti i campioni sono stati testati in duplicato, i sieri sono stati classificati stabilendo un cutoff come il valore medio dei controlli, ottenuto con i sieri di 10 volontari sani distinti dai campioni in esame, più tre deviazioni standard. I sieri sono stati classificati come positivi o negativi se i valori di OD erano superiori o inferiori rispetto al valore del cutoff.

Dei 40 sieri di uomini testati, 30 sono stati classificati come *T. vaginalis*-sieropositivi mentre 10 sono stati classificati come *T. vaginalis*-sieronegativi.

Test ELISA con i peptidi

L'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, nell'infezione da *T. vaginalis*, è stata testata utilizzando i 93 sieri di donne classificati come *T. vaginalis*-sieropositivi e *T. vaginalis*-sieronegativi nel precedente esperimento.

Le piastre ELISA da 96 pozzetti sono state adsorbite con BSA-M, 0,5 µg/well legata a 0,5 µg di peptide come spiegato in precedenza. Dopo tre lavaggi in PBS-T 0.05%, sono stati aggiunti i 93 sieri diluiti 1: 200 in PBS-T BSA 2% e testati per un la reattività anti-TvPRX, anti-TvHSP70 e anti-TvUBI. Dopo i lavaggi in PBS-T 0.05% è stato aggiunto l'anticorpo secondario, 100 µl di anti-human IgG coniugato con fosfatasi alcalina (Sigma, St. Louis) diluito 1:55000 in PBS-T BSA 2% secondo le istruzioni del produttore e lasciato in incubazione per 2 ore. Dopo i lavaggi, la reazione colorimetrica è stata sviluppata usando le Sigma FAST pNPP tablet secondo le

istruzioni del produttore, l'assorbanza è stata misurata a 405 nm con lo strumento VersaMax (Molecular Devices) e dati elaborati con il software SoftMaxPro.

Tutti i 93 sieri sono stati testati separatamente con ciascuno dei tre peptidi (delle tre proteine in esame), e tutti i campioni sono stati testati in duplicato.

I sieri sono stati classificati stabilendo un cutoff come il valore medio dei controlli, ottenuto con i sieri di 10 volontari sani distinti dai campioni in esame, più tre deviazioni standard. I sieri sono stati classificati come peptide-positivi o peptide-negativi se i valori OD erano superiori o inferiori al valore del cutoff.

In parallelo, l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, nell'infezione da *T. vaginalis*, è stata testata anche utilizzando i 40 sieri di uomini classificati in precedenza, come *T. vaginalis*-sieropositivi e *T. vaginalis*-sieronegativi.

Le piastre ELISA con BSA-M, 0,5 µg/well legata a 0,5 µg di ciascun peptide sono state preparate come spiegato in precedenza, tutti i 40 sieri sono stati testati in ELISA separatamente con ciascuno dei tre peptidi (delle tre proteine in esame) e tutti i campioni sono stati testati in duplicato come spiegato in precedenza.

I sieri sono stati classificati stabilendo un cutoff come il valore medio dei controlli, ottenuto con i sieri di 10 volontari sani distinti dai campioni in esame, più tre deviazioni standard. I sieri sono stati classificati come peptide-positivi o peptide-negativi se i valori OD erano superiori o inferiori al valore del cutoff.

Test ELISA su sieri di donne con differenti combinazioni peptidiche

Per mettere a punto il nostro test diagnostico abbiamo testato differenti combinazioni peptidiche nella stessa piastra ELISA. Le piastre sono state preparate come spiegato in precedenza, con BSA-M, 0,5 µg/well legata a 0,5 µg di differenti peptidi.

I 93 sieri di donna (53 *T. vaginalis*-sieropositivi e 40 *T. vaginalis*-sieronegativi) testati in precedenza contro i singoli peptidi delle tre proteine in esame, sono stati ritestati in ELISA con differenti combinazioni peptidiche, (TvUBI1-TvUBI3-TvHSP701-TVHSP702 e TvPRX1-TvUBI1-TvUBI3-TvHSP701-TVHSP702) tutti i campioni sono stati testati in duplicato.

I sieri sono stati classificati stabilendo un cutoff come il valore medio dei controlli, ottenuto con i sieri di 10 volontari sani distinti dai campioni in esame, più tre deviazioni standard. I sieri

sono stati classificati come peptide-positivi o peptide-negativi se i valori OD erano superiori o inferiori al valore del cutoff.

Analisi statistiche

Sono state effettuate differenti analisi statistiche per valutare se l'associazione tra la reattività dei campioni *T. vaginalis*-sieropositivi e i peptidi testati potesse essere considerata statisticamente significativa, quindi difficilmente dovuta al caso.

I test statistici P-value, l'Odds Ratio e chi-quadro sono stati eseguiti con l'ausilio del software GraphPad Prism 6.0. e di Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Risultati e discussione

Il secretoma di *T. vaginalis*: analisi delle proteine secrete

Il meccanismo mediante il quale *T. vaginalis* è capace di causare patogenicità, nonostante l'importanza sanitaria, sociale ed economica della tricomoniasi, non è stato ancora chiarito completamente. Diversi studi (Garber et al., 1989; Alderete et al., 1991; Fiori et al., 1996; North, 1982, 1994) mettono in evidenza l'importanza giocata da alcuni fattori secreti nell'interazione ospite-parassita.

Per approfondire questo argomento, in uno studio non ancora pubblicato dal nostro gruppo di ricerca, sono state analizzate mediante gel-based LC MS/MS, le proteine secrete dal protozoo. Questo lavoro ci ha messo a disposizione un database proteico dettagliato sul secretoma del protozoo, nel quale ricercare proteine che potessero essere usate per il nostro scopo.

Nel secretoma sono state identificate 184 proteine secrete, tra queste abbiamo rilevato: peptidasi, proteine del trasporto degli elettroni ed omeostasi redox, proteine formanti il poro, proteine con funzioni eterogenee e "conserved hypothetical protein".

In Tabella 2 sono riportate le proteine identificate nel secretoma di *T. vaginalis*:

TVAG_198430	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative
TVAG_454380	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative
TVAG_462940	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative
TVAG_251260	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative
TVAG_414300	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
TVAG_240750	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme, putative
TVAG_495030	5->3 exoribonuclease, putative
TVAG_051160	60S acidic ribosomal protein P0, putative
TVAG_262730	60S ribosomal protein L14, putative
TVAG_140290	60S ribosomal protein L27e, putative
TVAG_021390	AAA ATPase, putative

TVAG_192620	actin depolymerizing factor, putative
TVAG_054030	actin, putative
TVAG_210320	adenosylhomocysteinase, putative
TVAG_407250	adenylyl cyclase-associated protein, putative
TVAG_228780	alcohol dehydrogenase, putative
TVAG_327470	alcohol dehydrogenase, putative
TVAG_344880	alcohol dehydrogenase, putative
TVAG_422780	alcohol dehydrogenase, putative
TVAG_245190	aldo-keto reductase, putative
TVAG_411870	aldo-keto reductase, putative
TVAG_484570	alkyl hydroperoxide reductase, subunit C, putative
TVAG_075420	alkyl hydroperoxide reductase, subunit C, putative
TVAG_129060	alpha-amylase, putative
TVAG_057060	alpha-amylase, putative
TVAG_183300	aminotransferase class V, putative
TVAG_121610	apoptosis inducing factor, putative
TVAG_087140	arp2/3, putative
TVAG_036010	A-type flavoprotein
TVAG_239310	bollus pemphigoid antigen, putative
TVAG_118780	calmodulin, putative
TVAG_261970	carbamate kinase, putative
TVAG_088050	chaperonin, putative
TVAG_467970	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase
TVAG_298080	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase
TVAG_202090	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase
TVAG_057000	Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase
TVAG_090100	Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase
TVAG_426660	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase
TVAG_385340	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase
TVAG_272260	Clan IH, family I25, phytocystatin-like peptidase inhibitor
TVAG_106750	Clan M-, family M49, dipeptidylpeptidase III-like metallopeptidase
TVAG_008880	Clan MA, family M1, aminopeptidase N-like metallopeptidase
TVAG_477180	Clan MA, family M3, oligopeptidase A-like metallopeptidase

TVAG_064330	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase
TVAG_087590	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase
TVAG_386080	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase
TVAG_437930	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase
TVAG_403460	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase
TVAG_056190	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase
TVAG_224980	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase
TVAG_090090	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase
TVAG_369020	clathrin heavy chain, putative
TVAG_369030	clathrin heavy chain, putative
TVAG_402260	coactosin, putative
TVAG_150940	coactosin, putative
TVAG_245580	
TVAG_425470	
TVAG_529190	
TVAG_038420	
TVAG_059980	
TVAG_157940	
TVAG_300840	
TVAG_293660	
TVAG_154680	conserved hypothetical protein
TVAG_321740	
TVAG_349040	
TVAG_487100	
TVAG_371800	
TVAG_261950	
TVAG_196620	
TVAG_420480	
TVAG_088640	
TVAG_494990	
TVAG_208990	
TVAG_383370	
TVAG_140200	

TVAG_248050	
TVAG_265530	
TVAG_410350	
TVAG_224210	
TVAG_351790	
TVAG_150040	
TVAG_260830	
TVAG_328570	
TVAG_180840	
TVAG_441080	
TVAG_224220	
TVAG_100720	
TVAG_150280	
TVAG_415010	
TVAG_377380	
TVAG_181560	
TVAG_477640	
TVAG_444970	
TVAG_021420	coronin, putative
TVAG_062520	cyclophilin, putative
TVAG_147790	cysteine/methionine metabolism pyridoxal-5-phosphate enzymes, putative
TVAG_474980	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative
TVAG_125360	disulfide oxidoreductase, putative
TVAG_263800	disulfide oxidoreductase, putative
TVAG_464170	enolase, putative
TVAG_043500	enolase, putative
TVAG_329460	enolase, putative
TVAG_120370	Extracellular ribonuclease precursor, putative
TVAG_058050	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase
TVAG_103780	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase
TVAG_293540	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase
TVAG_206040	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase
TVAG_267300	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase

TVAG_127250	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase
TVAG_013010	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase
TVAG_403280	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase
TVAG_003900	Ferredoxin 1
TVAG_360700	fructose-bisphosphate aldolase, putative
TVAG_300000	fructose-bisphosphate aldolase, putative
TVAG_038440	fructose-bisphosphate aldolase, putative
TVAG_099490	glucose kinase, putative
TVAG_178210	glucose-1-phosphate thymidyltransferase, putative
TVAG_061930	glucose-6-phosphate isomerase, putative
TVAG_047990	glutaminyl-tRNA synthetase, putative
TVAG_146910	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative
TVAG_348330	glycogen phosphorylase, putative
TVAG_151220	heat shock protein 70 (HSP70)-4, putative
TVAG_158990	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B, putative
TVAG_210380	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, putative
TVAG_014920	histone H4, putative
TVAG_336320	Hydroxylamine reductase, putative
TVAG_035610	Intracellular protein transport protein USO1, putative
TVAG_161300	iron superoxide dismutase A, putative
TVAG_190450	kakapo, putative
TVAG_334040	leucyl-tRNA synthetase, putative
TVAG_219770	macrophage migration inhibitory factor, mif, putative
TVAG_381310	malate and lactate dehydrogenase, putative
TVAG_193000	malate and lactate dehydrogenase, putative
TVAG_239990	malate dehydrogenase, putative
TVAG_253650	malate dehydrogenase, putative
TVAG_204360	malate dehydrogenase, putative
TVAG_171090	malate dehydrogenase, putative
TVAG_238830	malic enzyme, putative
TVAG_491670	malic enzyme, putative
TVAG_228520	malic enzyme, putative
TVAG_266630	methionine-tRNA synthetase, putative

TVAG_358360	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative
TVAG_292690	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative
TVAG_407170	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative
TVAG_381690	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative
TVAG_216360	NADPH cytochrome P450, putative
TVAG_036210	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative
TVAG_417090	neurofilament triplet M protein, putative
TVAG_462280	nicotinate phosphoribosyltransferase, putative
TVAG_293370	nucleoside diphosphate kinase, putative
TVAG_167320	nucleoside diphosphate kinase, putative
TVAG_041310	ornithine carbamoyltransferase, putative
TVAG_419590	ornithine cyclodeaminase, putative
TVAG_026290	oxysterol-binding protein, putative
TVAG_137880	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, ppia, putative
TVAG_476140	peptidylprolyl isomerase, putative
TVAG_165610	peroxiredoxin, putative
TVAG_484570	peroxiredoxins, prx-1, prx-2, prx-3, putative
TVAG_139300	phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative
TVAG_310250	phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative
TVAG_364620	phosphofructokinase, putative
TVAG_430830	phosphofructokinase, putative
TVAG_205910	phosphoglucomutase, putative
TVAG_054830	phosphoglucomutase, putative
TVAG_268050	phosphoglycerate kinase, putative
TVAG_383940	phosphoglycerate kinase, putative
TVAG_113710	phosphoglycerate mutase, putative
TVAG_099570	phosphoserine aminotransferase, putative
TVAG_351310	plastin, putative
TVAG_045340	polyadenylate-binding protein, putative
TVAG_100620	profilin
TVAG_492250	profilin
TVAG_159160	profilin
TVAG_459130	profilin

TVAG_127180	purine nucleoside phosphorylase, putative
TVAG_454490	purine nucleoside phosphorylase, putative
TVAG_081630	purine nucleoside phosphorylase, putative
TVAG_373720	pyruvate kinase, putative
TVAG_015950	pyruvate kinase, putative
TVAG_126970	RAB GDP-dissociation inhibitor, putative
TVAG_490150	Rho GDP-dissociation inhibitor, putative
TVAG_043470	RNA-binding protein, putative
TVAG_318870	spermatogenesis associated factor, putative
TVAG_049140	superoxide dismutase [fe], putative
TVAG_120340	superoxide dismutase [mn], putative
TVAG_039980	superoxide dismutase, putative
TVAG_272910	transaldolase total2, putative
TVAG_212020	transketolase, putative
TVAG_276410	translation elongation factor, putative
TVAG_035410	translation initiation inhibitor, putative
TVAG_096350	triosephosphate isomerase, putative
TVAG_497370	triosephosphate isomerase, putative
TVAG_369470	ubiquitin-activating enzyme E1, putative
TVAG_331660	ubiquitin, putative
TVAG_133060	UDP- glucose pyrophosphorylase, putative
TVAG_156680	vab10 spectraplakkin, putative
TVAG_108510	vacuolar sorting protein vps29, putative
TVAG_124870	WD-repeat protein, putative
TVAG_222320	WD-repeat protein, putative
TVAG_333620	WD-repeatcontaining protein, putative

Tabella 2. Proteine secrete da T. vaginalis

Tra le proteine identificate, l'attenzione del gruppo di ricerca è stata attirata da una proteina annotata come "macrophage migration inhibitory factor" (MIF), una citochina proinfiammatoria che nell'uomo gioca un ruolo centrale nell'immunità sia innata che adattativa. MIF è implicata in numerosi processi che contribuiscono a creare un ambiente ricco di condizioni predisponenti la tumorigenesi: inibisce p53, sostiene la via ERK, attiva la via COX2/PGE-2, promuove l'angiogenesi (Conroy et al., 2010).

In uno studio di recente pubblicazione è stata caratterizzata la MIF secreta da *T. vaginalis* (TvMIF), i risultati di questi esperimenti in vitro supportano l'ipotesi che TvMIF giochi un ruolo chiave nell'immunità innata e adattativa e che sia coinvolta in processi di infiammazione e proliferazione che contribuiscono alla promozione della cancerogenesi prostatica (Twu et al., 2014).

Sulla scia di questi risultati, abbiamo tentato di identificare tra le proteine secrete dal protozoo dei candidati marker sierodiagnostici per *T. vaginalis*, focalizzando l'attenzione su molecole che avessero un ruolo anche ipotetico nell'induzione e/o nel mantenimento dello stato tumorale.

L'identificazione di nuovi marcatori immunologici, espressi e secreti sempre durante l'infezione, e la messa a punto di nuove tecniche di siero-diagnosi indiretta è importante soprattutto per lo screening sierologico di pazienti che sono stati esposti a *T. vaginalis*, in relazione alla possibilità che questi possano sviluppare un tumore.

Per la scelta delle proteine da comprendere in questo studio ci siamo quindi basati su dati bibliografici ottenuti ricercando quali tra queste fossero implicate, in altri sistemi biologici, nel coinvolgimento con l'insorgenza di carcinomi cervicali o prostatici.

Le tre proteine selezionate sono state:

1) Tvag_484570 perossiredossina (TvPRX):

La perossiredossina (PRX) provvede alla difesa antiossidante della cellula, è una sorta di 'spazzino' cellulare e si occupa della rimozione delle ROS, specie reattive dell'ossigeno come per esempio il perossido di idrogeno, altamente tossiche per la cellula (Hofmann et al., 2002; Perkins et al., 2015; Wood et al., 2003).

Numerosi studi dimostrano che la PRX è coinvolta in diversi eventi di cancerogenesi, risulta essere up-regolata in cellule tumorali, interferisce con il processo di morte cellulare inibendo l'apoptosi e fornisce un microambiente favorevole per la proliferazione cellulare (Basu et al., 2011; Li et al., 2013; Ummanni et al., 2012).

2) Tvag_151220 heat shock protein 70 (TvHSP70):

Heat shock protein 70 (HSP70) è una chaperonina ATP-dipendente, la possiamo immaginare come una sorta di sentinella con localizzazione intra ed extra cellulare, che si occupa di riconoscere le proteine mal ripiegate e le ripiega correttamente (Maio, 2011; Maio and Vazquez, 2013; Ritossa, 1996).

HSP70 è una proteina anti-apoptotica, interferisce con il processo di morte cellulare a differenti livelli ed è considerata una proteina citoprotettiva. Per tutti questi motivi è spesso over-espressa nelle cellule tumorali (Ciocca and Calderwood, 2005; Cardile et al., 2003; Jego et al., 2013; Kim et al., 1998).

3) Tvag_331660 ubiquitina (TvUBI):

L'ubiquitina etichetta post-trascrizionalmente le proteine che devono essere degradate. L'ubiquitinazione è un processo enzimatico multi-step che consiste nell'attacco dell'ubiquitina ad un substrato che deve essere degradato (Glickman and Ciechanover, 2002; Pickart and Eddins, 2004; Popovic et al., 2014). L'ubiquitinazione è più di un semplice segnale di degradazione, se deregolata può favorire eventi di tumorigenesi (Li et al., 2016; Ohta and Fukuda, 2004; Popovic et al., 2014; et al., 2015; Zhang et al., 2014).

Il lavoro mira all'identificazione di candidati marker sierodiagnostici per *T. vaginalis*, le tre proteine secrete selezionate TvPRX, TvUBI e TvHSP70, sono state caratterizzate per provare a chiarire il loro ruolo nell'attivazione del sistema immunitario e la loro effettiva secrezione *in vivo*.

Produzione delle proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI in *E. coli*

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato la produzione delle forme ricombinanti delle predette proteine secrete da *T. vaginalis*: TvPRX (TVAG_484570), TvHSP70 (TVAG_151220) e TvUBI (TVAG_331660).

Le sequenze codificanti per TvPRX, TvHSP70 e TvUBI sono state prodotte mediante PCR con primers specifici (Figura 3).

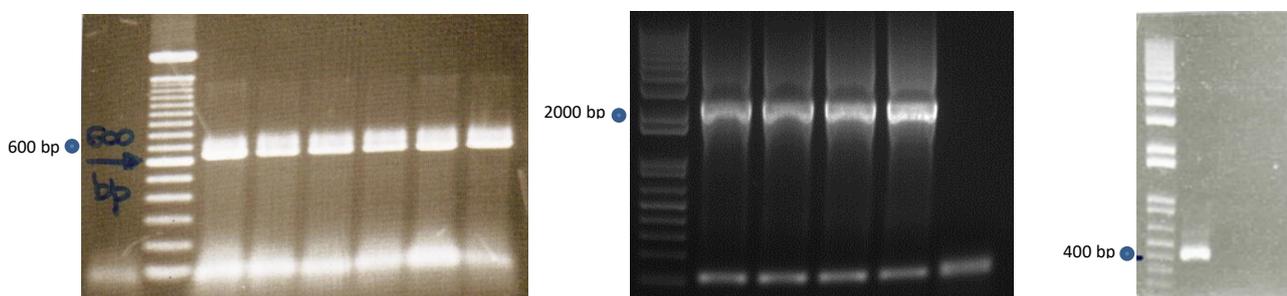


Figura 3. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR TvPRX, TvHSP70 e TvUBI specifica condotta sul DNA totale di *T. vaginalis*

Come mostrato in Figura 3 le dimensioni degli amplificati corrispondono alle dimensioni attese calcolate online: TvPRX 591 bp, TvHSP70 1980 bp e TvUBI 399 bp.

Gli ampliconi TvPRX e TvUBI digeriti con gli enzimi di restrizione NdeI e KpnI sono stati clonati nel vettore pET-29b(+) per ottenere i costrutti pET29TvPRX e pET29TvUBI. Questo vettore ci permetterà di produrre le proteine ricombinanti TvPRX e TvUBI come delle proteine di fusione con un Tag6xHis che ne consentirà la purificazione, inoltre grazie alla presenza di un sito di taglio per la trombina potremo rimuovere la coda di poli-istidine dopo la purificazione.

L'amplicone TvHSP70 digerito con gli enzimi di restrizione PshI e KpnI è stato clonato nel vettore pET-43.1a(+) per ottenere il costrutto pET43TvHSP70. Questo vettore è stato scelto perché ci consentirà di produrre la proteina ricombinate TvHSP70 come una proteina di fusione con un Tag-Nus, che ne accrescerà la solubilità evitando la formazione di corpi di inclusione, e con un secondo Tag-6xHis che ne consentirà la purificazione. Inoltre pET-43.1a(+) codifica per due siti di taglio uno per la trombina e uno per l'enterochinasi, studi di sequenza preliminari ci hanno consentito di identificare un sito di taglio per la trombina nella sequenza di TvHSP70, quindi ci serviremo del sito di taglio per l'enterochinasi per rimuovere i Tag dopo la purificazione.

Le colonie di *E. coli* TOP10 trasformate con i costrutti pET29TvPRX, pET43TvHSP70 e pET29TvUBI sono state sottoposte a una PCR di screening con primers specifici per i geni d'interesse. In particolare sono stati selezionati i cloni positivi alla PCR condotta sui plasmidi estratti dai batteri ricombinati (Figura 4, Figura 5 e Figura 6). La corretta sequenza, orientazione e finestra di lettura degli inserti è stata verificata mediante sequenziamento.

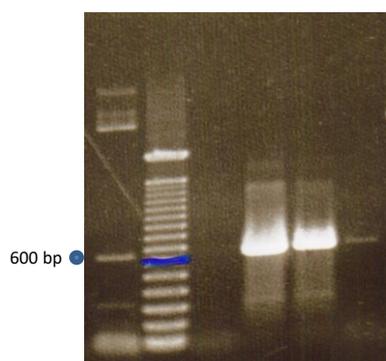


Figura 4. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR di screening TvPRX specifica sul costrutto pET29TvPRX. La dimensione attesa dell'amplificato è di 591 bp.

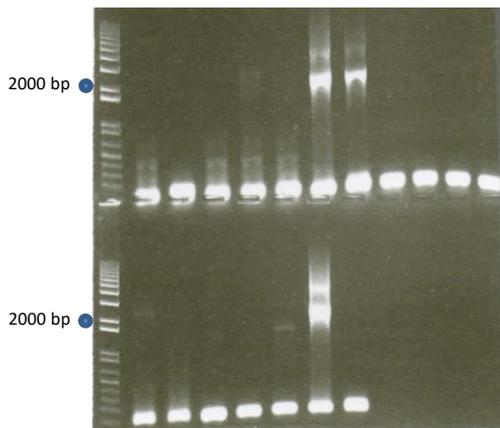


Figura 5. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR di screening TvHSP70 specifica sul costrutto pET43TvHSP70. La dimensione attesa dell'amplificato è di 1980 bp.

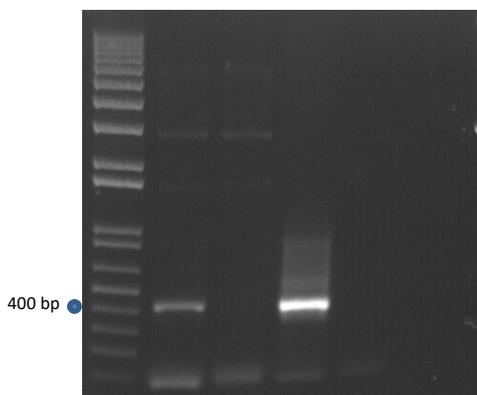


Figura 6. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR di screening TvUBI specifica sul costrutto pET29TvUBI. La dimensione attesa dell'amplificato è di 399 bp.

Una volta purificati e sequenziati i plasmidi ricombinanti pET29TvPRX, pET43TvHSP70 e pET29TvUBI sono stati trasformati in diversi ceppi di espressione.

Le analisi delle sequenze nucleotidiche per la presenza di codoni rari, hanno mostrato la presenza di questi in TvHSP70, questa condizione è nota per essere associata con problemi nell'espressione di proteine ricombinanti in *E. coli*. Quindi si è deciso di testare *E. coli* Rosetta come ceppo ricevente per l'espressione di pET43TvHSP70 ricombinante. Difatti, questo ceppo di *E. coli* è stato opportunamente ingegnerizzato per esprimere i tRNA per codoni rari, consentendo così l'espressione di proteine eterologhe codificate da sequenze geniche contenenti tali codoni. Tuttavia il ceppo *E. coli* Rosetta non ha mai acquisito il plasmide ricombinante nonostante numerosi tentativi di trasformazione.

I ceppi di espressione prescelti sono stati:

- *E. coli* BL21(DE) per pET29TvPRX e pET29TvUBI
- *E. coli* AD494 (DE) per pET43TvHSP70

L'espressione delle diverse proteine ricombinanti è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG alle colture batteriche. Aliquote di lisati batterici prima e dopo l'induzione sono state analizzate mediante SDS-page a diversi intervalli di tempo e blottate su una membrana di nitrocellulosa incubata con un anticorpo anti-istidina per valutare l'effettiva induzione dell'espressione della proteina ricombinante.

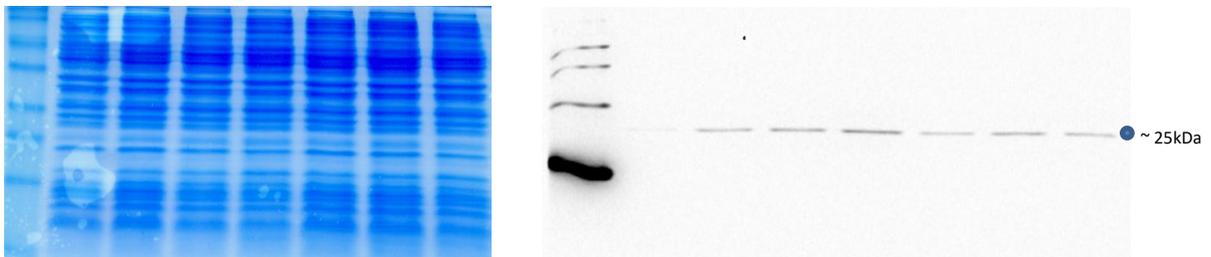


Figura 7. Gel in SDS-page e Western-Blotting di valutazione dell'induzione dell'espressione di TvPRX. In corsia 1 lisato batterico di *E. coli* BL21 non indotto nelle seguenti il lisato batterico 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, O/N dopo l'induzione

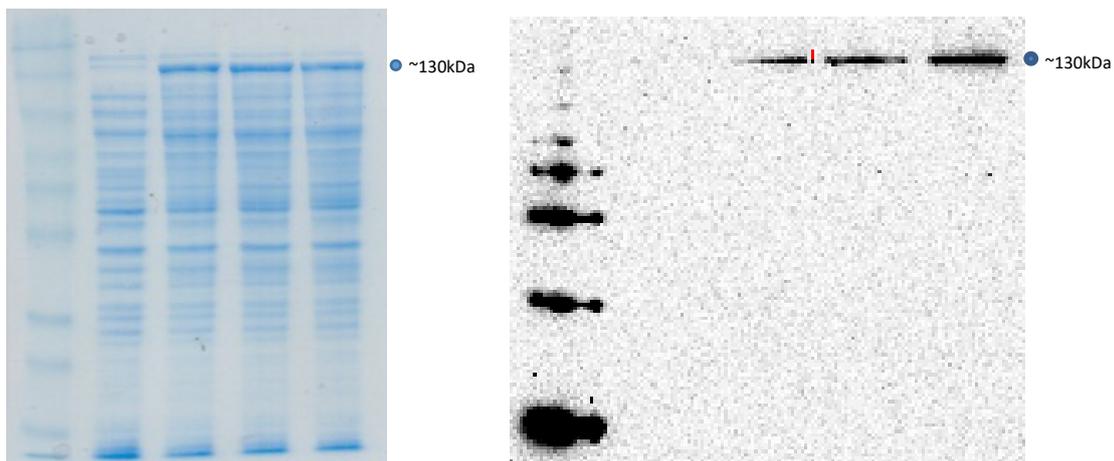


Figura 8. Gel in SDS-page e Western-Blotting di valutazione dell'induzione dell'espressione di TvHSP70. In corsia 1 lisato batterico di *E. coli* AD494 non indotto nelle seguenti il lisato batterico 1h, 4h, O/N dopo l'induzione

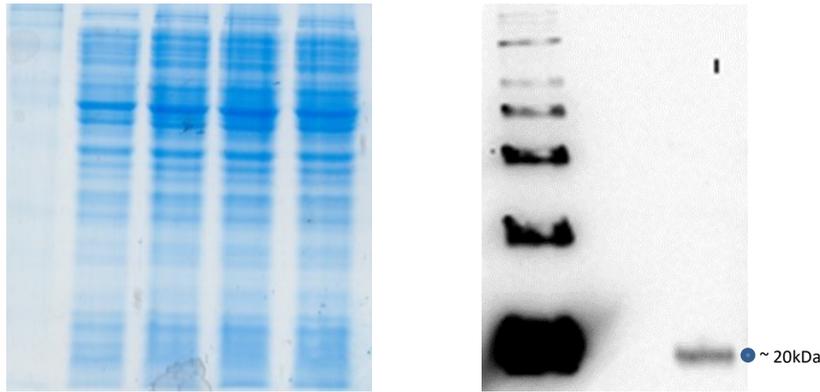


Figura 9. Gel in SDS-page e Western-Blotting di valutazione dell'induzione dell'espressione di TvUBI. SDS-page: in corsia 1 lisato batterico di *E. coli* BL21 non indotto nelle seguenti il lisato batterico 1h, 4h, O/N dopo l'induzione. Western-blotting: lisato batterico di *E. coli* BL21 non indotto in corsia 1, lisato batterico a 4h dall'induzione in corsia 2.

Indicato in Figura 7, Figura 8 e Figura 9 il peso molecolare atteso delle proteine di fusione:

~ 25 kDa per TvPrx, ~ 130 kDa per TvHSP70 e ~ 20 kDa per TvUBI.

Come si può notare nelle immagini precedenti, è molto difficile individuare un'iper-espressione delle proteine in esame nel pattern elettroforetico dei lisati cellulari totale di *E. coli* durante e dopo le 4 ore di induzione con IPTG. Al contrario, in western-blotting è visibile l'effettiva induzione dell'espressione delle proteine ricombinanti seppure i livelli di espressione siano risultati comunque molto bassi per tutte e tre le proteine in esame.

In tutti e tre gli esperimenti di iper-espressione si nota come a 4 ore dall'induzione con IPTG si raggiunge quello che appare il livello massimale di produzione delle proteine eterologhe.

Dopo l'induzione, per le proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, prodotte con un Tag 6xHis sono stati testati differenti strategie di purificazione.

TvPrx è stata purificata grazie alla coda di poli-istidine con il kit commerciale (Ni-NTA Fast Start), che si avvale dell'affinità in colonna cromatografica tra il Tag 6xHis e il nichel. I campioni TvPRX purificati sono stati analizzati mediante SDS-page (Figura 10).

In corsia 1, CFE (cell free extracts o surnatante), a seguire FT (flow through), tre lavaggi e l'eluizione 1 a pH 7, purificata da LPS. A seguire 30k: l'eluizione 1 purificata è stata trasferita in tubi da centrifuga dotati di filtro 30 kDa e centrifugata con l'intento di allontanare le

proteine contaminanti sino a 30 kDa e di rilasciare la nostra proteina d'interesse purificata che è stata caricata nell'ultima corsia (EL30k).

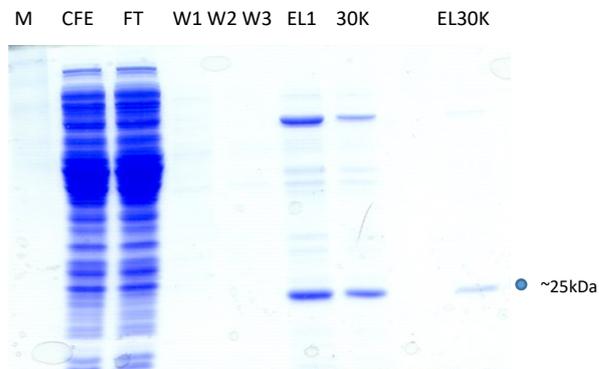


Figura 10. Gel in SDS-page di valutazione della purificazione di TvPRX. In corsia 1 CFE, a seguire FT, tre lavaggi, eluizione 1 della proteina con il buffer di eluizione a pH 7, 30k e infine EL30k.

Come visibile in Figura 10, la proteina d'interesse è stata trattenuta in gran parte dal filtro 30 kDa nonostante le sue dimensioni (~25kDa), quindi abbiamo provato a mettere a punto differenti strategie di purificazione.

I campioni TvPRX provenienti dallo step di purificazione Ni-NTA Fast Start: sono stati analizzati mediante SDS-page (Figura 11).

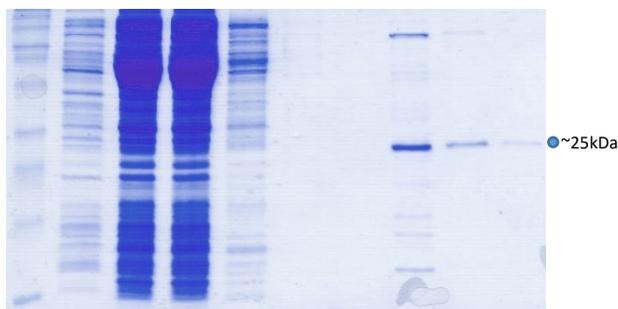


Figura 11. Gel in SDS-page di valutazione della purificazione di TvPRX. In corsia 1 NI (pellet lisato non indotto) a seguire CFE, FT, tre lavaggi e tre eluizioni finali della proteina.

Le tre eluizioni provenienti dallo step di purificazione sono state unite e purificate da LPS. Con l'obiettivo di ottenere una migliore visualizzazione della proteina ricombinante purificata, le eluizioni sono state trasferite in tubi da centrifuga dotati di filtro 50 kDa, questo ci permetterà di trattenere le proteine contaminanti sino a 50 kDa. Successivamente l'eluato contenente la nostra proteina d'interesse è stato caricato in un tubo da centrifuga da 10 kDa e centrifugato, questo ci consentirà di allontanare le proteine inquinanti sotto i 10kDa.

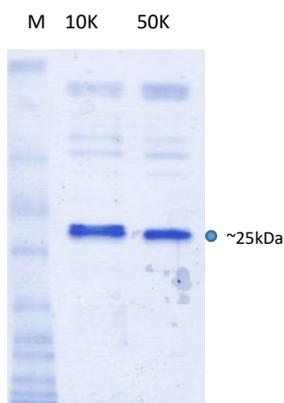


Figura 12. Gel in SDS-page di valutazione della purificazione di TvPRX eseguita mediante filtri 10 kDa e 50 kDa

Come mostrato in Figura 12 l'allontanamento delle proteine inquinanti sotto i 10 kDa è andato a buon fine mentre quello delle proteine sopra i 50kDa non è andato a buon fine.

Per quanto riguarda il clone pET43TvHSP70 i livelli di espressione sono risultati ugualmente molto bassi (Figura 13).

TvHSP70 è stata purificata grazie alla coda di poli-istidine con il kit commerciale (Ni-NTA Fast Start), i campioni provenienti dallo step di purificazione sono stati analizzati mediante SDS-page.

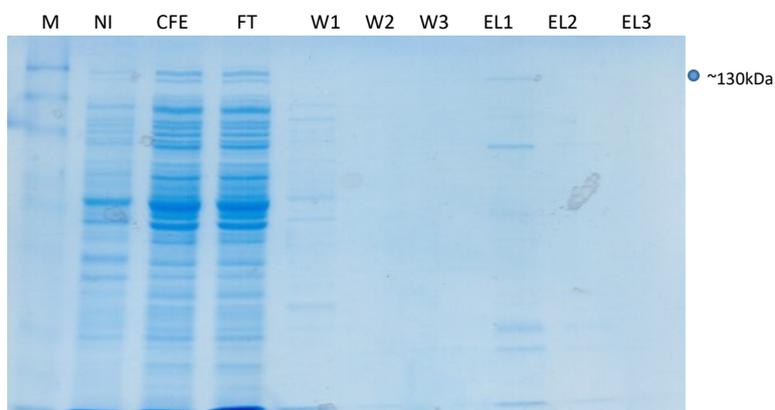


Figura 13. Gel in SDS-page di valutazione della purificazione di TvHSP70. In corsia 1 NI a seguire CFE, FT, tre lavaggi e tre eluizioni finali della proteina.

Poiché uno degli obiettivi del lavoro era quello di valutare l'immunogenicit  delle proteina in esame, sono richieste quantit  consistenti di proteina ricombinante. Con l'obiettivo di ottimizzare la resa sono stati messi a punto altri due differenti protocolli di purificazione:

- purificazione Ni-NTA Spin Kit (Qiagen)
- purificazione in condizioni denaturanti (Qiagen)

I campioni TvHSP70 provenienti dallo step di purificazione Ni-NTA Spin Kit: sono stati analizzati mediante SDS-page e blottati su una membrana di nitrocellulosa incubata con un anticorpo anti-istidina.

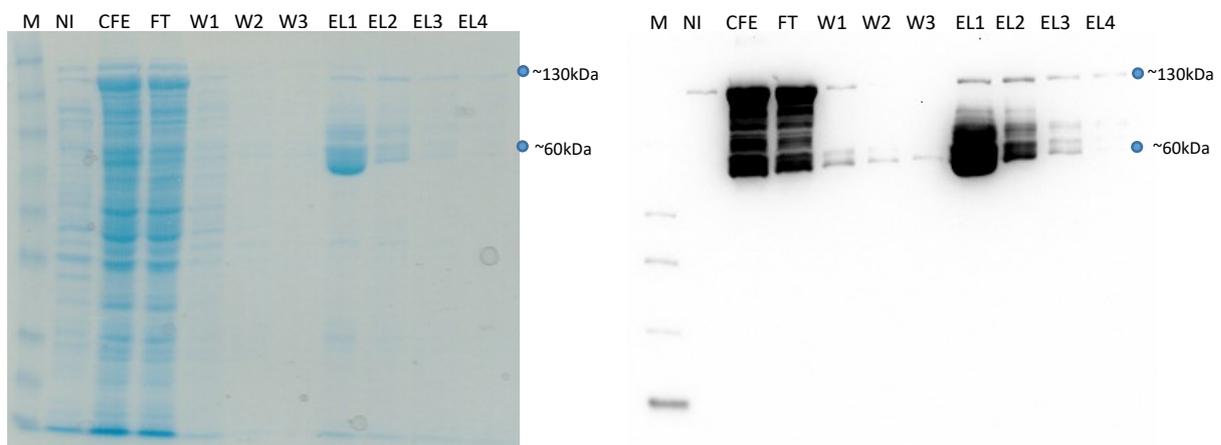
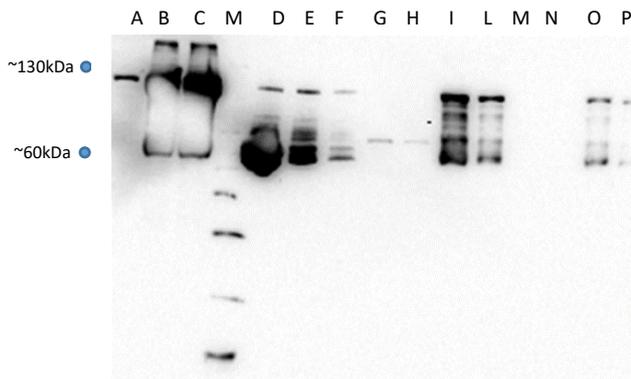


Figura 14. Gel in SDS-page e Western-Blotting di valutazione della purificazione di TvHSP70. In corsia 1 NI a seguire CFE, FT, tre wash (lavaggi) e quattro eluizioni finali della proteina con differenti buffer.

I campioni TvHSP70 provenienti dallo step di purificazione in condizioni denaturanti e i controlli: sono stati analizzati mediante SDS-page e blottati su una membrana di nitrocellulosa incubata con un anticorpo anti-istidina come mostrato in Figura 15, secondo l'ordine seguente:



A: NI
 B: CFE
 C: FT
 M: Marker di pesi molecolari
 D-F: 3 eluizioni della purificazione in condizioni denaturanti
 G-H: 2 eluizioni di una purificazione di controllo eseguita a partire da *E. coli* AD494 trasformati con il vettore pET-43.1a privo di inserto
 I-L: 2 eluizioni della purificazione in condizioni denaturanti svolte su pellet lisati con differenti metodi
 M-N: 2 eluizioni di una purificazione di controllo eseguita a partire da *E. coli* AD494 non trasformati
 O-P: 2 eluizioni di una purificazione eseguita a partire dal FT

Figura 15. Western-Blotting di valutazione della purificazione di TvHSP70

La difficoltà nel visualizzare la proteina ricombinante, ovvero la mancanza di una evidente iperespressione mostrata in Figura 14 e in Figura 15, può essere dovuta a molteplici fattori:

- Scarsa solubilità della proteina
- Tossicità del prodotto
- Instabilità del costrutto o della proteina ricombinante stessa

Il problema sorto nell'interpretazione dei risultati ottenuti è la grande banda presente a circa 60kda, quello che possiamo ipotizzare è che probabilmente questa rappresenti il Tag-Nus, ma il problema è che questa banda è stata visualizzata sia in eluizioni provenienti da diversi metodi di purificazione che in eluizioni di purificazioni di controllo.

Il fatto che la banda sia presente nel controllo è del tutto normale perché anche il plasmide pET-43.1a(+) non ricombinate esprime la Tag-Nus, ma nei batteri ricombinanti per pET43TvHSP70 la proteina di fusione dovrebbe avere una dimensione maggiore (~130 kDa) e non dovremmo visualizzare una banda a ~60 kDa. Abbiamo comunque tentato di dare una spiegazione a questa banda inattesa, per esempio una sintesi del tutto regolare della nostra proteina di fusione è seguita da un taglio proteolitico post-traduzionale mediato da proteasi intracellulari, oppure per qualche motivo la traduzione si blocca dopo la sintesi del Nus-Tag, una volta arrivato alle nostre proteine d'interesse, questo potrebbe accadere per molti motivi diversi, tra cui la formazione di strutture secondarie dell'mRNA.

In caso di ipotetici tagli proteolitici post-traduzionali essendo la dimensione della proteina di interesse (~70 kDa) e le dimensioni del solo Tag-Nus di (~60 kDa) la grande banda visibile nelle immagini potrebbe contenere sia il Tag-Nus che la proteina, oppure nel caso di ipotetici

problemi al meccanismo traduzionale, la grande banda visibile nel gel potrebbe contenere il Tag-Nus iperespresso.

Per quanto riguarda il clone pET29TvUBI i livelli di espressione sono risultati ugualmente bassi (Figura 16).

TvUBI è stata purificata grazie alla coda di poli-istidine con il kit commerciale (Ni-NTA Fast Start), i campioni provenienti dallo step di purificazione sono stati analizzati mediante SDS-page e blottati su una membrana di nitrocellulosa incubata con un anticorpo anti-istidina (Figura 16).

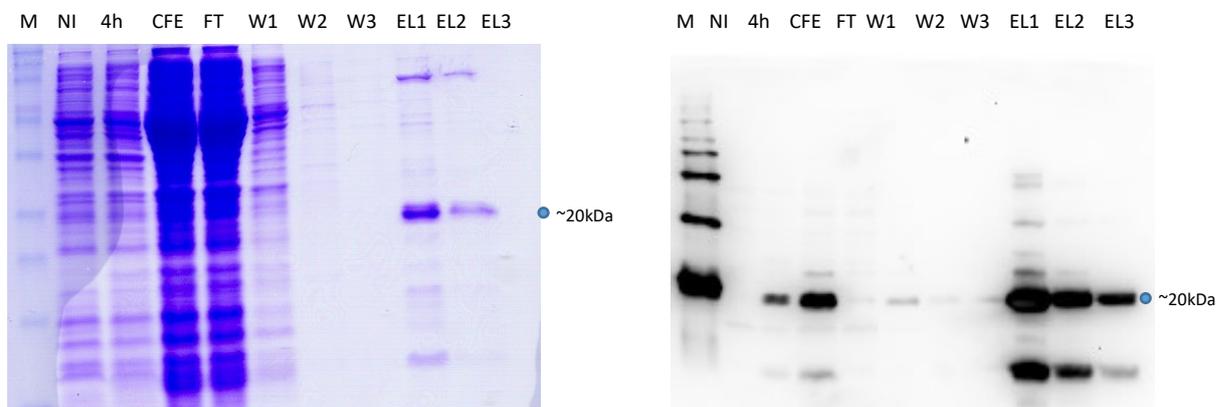


Figura 16. Gel in SDS-page e Western-Blotting di valutazione della purificazione di TvUBI. In corsia 1 NI a seguire lisato batterico a 4h dall'induzione, CFE, FT, tre lavaggi e tre eluizioni finali della proteina.

Le tre eluizioni provenienti dallo step di purificazione sono state purificate da LPS. Con l'obiettivo di ottenere una migliore visualizzazione della proteina ricombinante purificata, i campioni purificati, sono stati trasferiti in tubi da centrifuga dotati di filtro 10 kDa, questo passaggio dovrebbe allontanare le proteine inquinanti sotto i 10 kDa. Successivamente l'eluato con la nostra proteina d'interesse concentrata è stato caricato in un tubo da centrifuga da 30 kDa, questo ci consentirà di allontanare le proteine inquinanti sopra i 30 kDa.

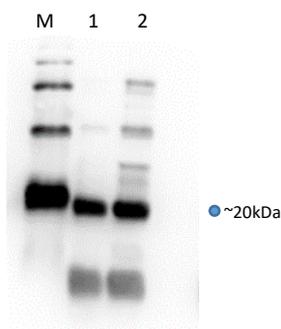


Figura 17. Western-Blotting di valutazione della purificazione di TvUBI mediante filtri 10 kDa e 30 kDa. In corsia 1 le tre eluizioni dello step di purificazione precedente fatte passare su filtri 30 kDa e 10 kDa a seguire le tre eluizioni prima del passaggio nei filtri.

Come mostrato in Figura 17 l'allontanamento delle proteine contaminanti sopra i 30kDa è andato a buon fine mentre quello delle proteine sotto i 10 kDa non è andato a buon fine.

Come è noto la scelta delle condizioni di purificazione delle proteine espresse, dipende principalmente dal tipo di applicazioni post-purificazione che si intendono svolgere e dal risultato che si desidera ottenere.

Poiché uno degli obiettivi principali del lavoro era quello di valutare l'immunogenicità delle proteine in esame, sono richieste non solo quantità consistenti di proteina ricombinante ma anche un'elevata purezza delle preparazioni.

Nella scelta delle condizioni di purificazione si è tentato di mantenere un equilibrio tra resa e purezza, anche se spesso volte la resa è andata a spese della purezza delle preparazioni, impedendo una visualizzazione chiara e priva di ambiguità del prodotto ricombinante.

Si è tentato di ottimizzare la quantità delle proteine espresse aumentando il numero di litri di coltura per *E. coli* trasformati passando dai 200 ml iniziali sino ad un massimo di 4 litri, questo però non ha determinato un'ottimizzazione della quantità proteica ottenuta.

L'iperespressione in *E. coli* e la purificazione delle forme ricombinanti di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI non è stata senza problemi. Difatti, inizialmente è stato molto difficile distinguere mediante tracciato SDS-PAGE una induzione di iperespressione in *E. coli*, ciò può essere dovuto a una molteplicità di fattori da una parziale insolubilità della proteina, a una sua tossicità per *E. coli*, sino ad ipotetici blocchi della traduzione dovuti ad esempio per la presenza di codoni rari nella sequenza genica.

Le analisi di western-blotting ci hanno permesso di identificare le proteine ricombinanti desiderate, che venivano però sintetizzate a un basso livello. Questa problematica si è riflessa

successivamente sul bilancio resa/purezza in fase di purificazione: difatti, per ottenere quantità accettabili di prodotto ricombinante, si è proceduto alla purificazione in condizioni poco stringenti, cosa che ci ha portato ad ottenere preparati con un significativo livello di contaminazione da proteine di *E. coli*.

Considerata queste problematiche, abbiamo provato ad aggirare gli inconvenienti incontrati finora tentando di esprimere le proteine ricombinanti direttamente in *T. vaginalis*.

Produzione delle proteine ricombinanti TvPRX, TvHSP70 e TvUBI in *T. vaginalis*

Scopo di questo lavoro è la produzione delle forme ricombinanti delle predette proteine secrete da *T. vaginalis*: TvPRX, TvHSP70 e TvUBI e la successiva valutazione dell'immunogenicità delle proteina in esame.

Ci serviremo di un sistema plasmidico, TagVag-94 che ci consentirà di indurre l'espressione delle proteine ricombinanti *in vivo*. Essendo un plasmide selezionabile, sarà possibile isolare cloni stabili di *T. vaginalis* che in condizioni di induzione iper-esprimeranno le proteine d'interesse

Le sequenze codificanti per TvPRX, TvHSP70 e TvUBI sono state prodotte mediante PCR con primers specifici (Figura 18).

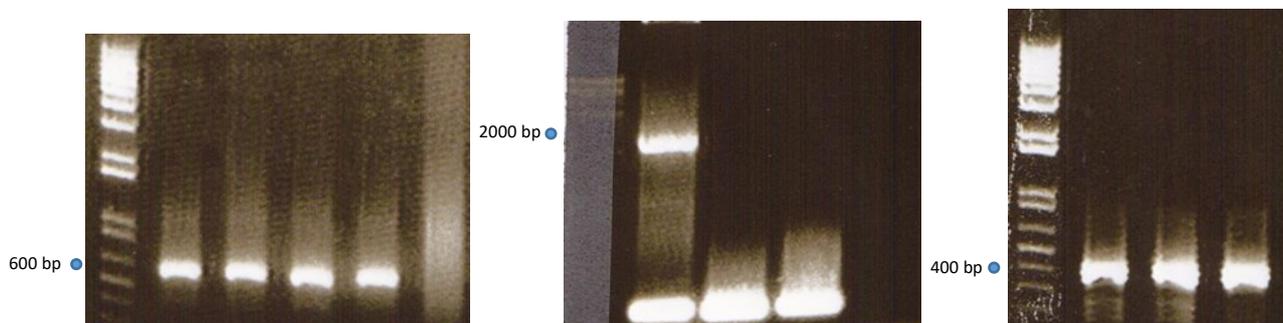


Figura 18. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR TvPRX, TvHSP70 e TvUBI specifica condotta sul DNA totale di *T. vaginalis*

Come mostrato in Figura 18 le dimensioni degli amplificati corrispondono alle dimensioni attese calcolate online: TvPRX 591 bp, TvHSP70 1980 bp e TvUBI 399 bp.

Gli ampliconi TvHSP70 e TvUBI sono stati clonati nel vettore TagVag-94 per ottenere i costrutti TagVagTvHSP70 e TagVagTvUBI.

L'avvenuto clonaggio è stato verificato mediante PCR con primers specifici per i geni d'interesse, condotta sul plasmide estratto dai batteri ricombinanti (Figura 19 e Figura 20). La corretta sequenza, orientazione e finestra di lettura degli inserti è stata verificata mediante sequenziamento.

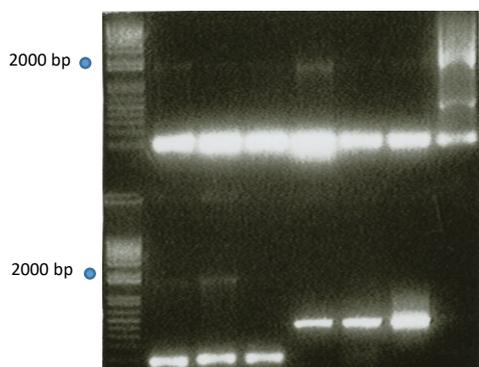


Figura 19. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR TvHSP70 specifica, condotta sul costrutto TagVagTvHSP70. La dimensione attesa dell'amplificato è di 1980 bp.

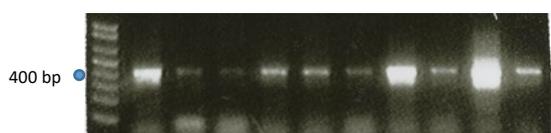


Figura 20. Elettroforesi in gel d'agaroso degli amplificati ottenuti mediante PCR TvUBI specifica, condotta sul costrutto TagVagTvUBI. La dimensione attesa dell'amplificato è di 399 bp.

Le cellule di *T. vaginalis* sono state elettroporate con 50 μ g di TagVagTvHSP70 e 50 μ g di TagVagTvUBI. Il controllo è rappresentato dallo stesso numero di cellule transfettate con TagVag privo di inserto e da cellule di *T. vaginalis* elettroporate senza alcun plasmide.

Per valutare l'efficienza dell'elettroporazione un'aliquota di cellule transfettate con TagVagTvHSP70, TagVagTvUBI e TagVag sono state esaminate al microscopio ed è stata valutata la vitalità e la motilità dei protozoi in seguito all'elettroporazione.

Dopo giorni dal tentativo di transfezione non è stato possibile isolare delle cellule transfettate vive, né nei campioni TagVagTvHSP70 e TagVagTvUBI né nei controlli. Il fatto che non sopravvivessero all'elettroporazione né le cellule transfettate con i plasmidi ricombinanti né quelle transfettate con i plasmidi di controllo ci ha portato ad ipotizzare che le condizioni di

elettroporazione fossero troppo invasive, nonostante siano presenti vari esempi in letteratura di studi in cui *T. vaginalis* e altri protozoi vengono elettroporati in condizioni simili (Hamann et al., 1995; Hrdy et al., 2004; Yee and Nash, 1995).

Con l'obiettivo di riuscire ad ottimizzare l'efficienza della transfezione, abbiamo ripetuto l'esperimento testando differenti condizioni di elettroporazione (da 200 sino a 350 volts), abbiamo risospeso le cellule elettroporate in terreni con differenti composizioni, abbiamo eseguito l'esperimento in condizioni di anaerobiosi e non e le abbiamo selezionate con geneticina.

La scarsa vitalità delle cellule protozoarie in seguito all'elettroporazione, nonostante le differenti condizioni sperimentali usate, non ci ha consentito di isolare dei cloni stabili che esprimessero le proteine d'interesse. Questo ci ha indotto ad avanzare delle ipotesi di natura prettamente speculativa, le cellule transfettate potrebbero subire una selezione negativa rispetto a quelle non transfettate o avere un tasso di replicazione inferiore rispetto a queste ultime.

Sicuramente il modello sperimentale di espressione in vivo delle proteine, mediata dal plasmide inducibile TagVag-94, non rappresenta il modello di studio ottimale per l'iperespressione e la successiva valutazione dell'immunogenicità delle proteine secrete in esame.

Come descritto in precedenza, nessuno degli approcci sperimentali utilizzati per la purificazione delle tre proteine ricombinanti si è rivelato efficace. E' stato impossibile infatti produrre quantità sufficienti di proteine ad elevato livello di purificazione da utilizzare per la caratterizzazione immunologica.

Si è quindi reso necessario ricercare una nuova strategia che consentisse di aggirare tutti gli inconvenienti di tipo tecnico sopra citati.

Per risolvere questa problematica abbiamo deciso effettuare degli studi *in silico* di predizione di peptidi immunogeni nelle sequenze delle proteine d'interesse.

L'utilizzo dei peptidi ci consentirà di poter studiare delle sequenze specifiche per le proteine di *T. vaginalis*, ovviando ai problemi di omologia con proteine di altri patogeni o dell'ospite stesso, omologia della quale avremmo dovuto tener conto nell'analisi dei risultati ottenuti con proteine intere.

Studi *in silico*: strumenti bioinformatici per la predizione dei peptidi

Lo sviluppo di metodi sempre più avanzati per la predizione dei peptidi e la loro sintesi, ha fatto sì che sempre più spesso l'utilizzo dei peptidi sia preferito a quello della proteina intera, soprattutto nei casi come quello di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, in cui la proteina intera non è disponibile e presenta un'elevata omologia di sequenza con proteine dell'ospite o di altri patogeni mucosali.

Tuttavia non tutte le sequenze peptidiche della proteina nativa sono riconosciute dagli anticorpi, per questo motivo è necessario identificare dei peptidi che possiedano un elevato grado di antigenicità e che si trovino in una regione esposta della proteina nativa. Conoscere la sequenza e la struttura della proteina nativa è fondamentale per scegliere degli epitopi facilmente riconoscibili dagli anticorpi e per evitare qualsiasi potenziale cross-reattività con altre proteine correlate.

A tal proposito in prima istanza, sono state effettuate delle analisi di sequenza e di struttura delle proteine TvPRX, TvHSP70 e TvUBI con l'ausilio di NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov), Uni-Prot (www.uniprot.org) e ExpASy (us.expasy.org/tools).

Gli studi di predizione sono stati eseguiti mediante il programma bioinformatico BepiPred 1.0 Server ed è stato usato IEDB (Immune Epitope Database) Analysis Resource.

Al programma BepiPred sono state fornite le sequenze delle proteine Tvag_484570 (TvPRX), Tvag_151220 (TvHSP70) e Tvag_331660 (TvUBI) ed è stata eseguita una predizione delle sequenze peptidiche potenzialmente immunogene. I risultati sono riportati in Figura 21, Figura 22 e Figura 23:

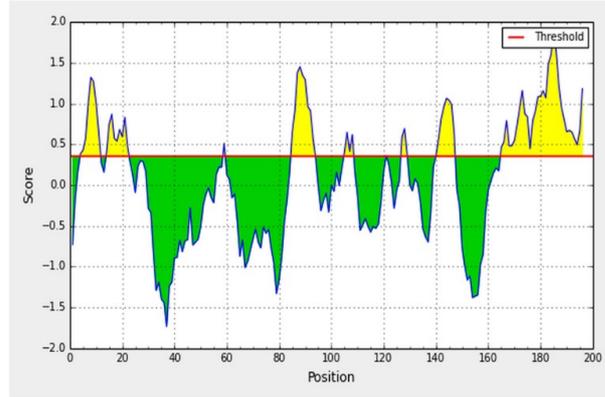
Bepired Linear Epitope Prediction Prediction

Input Sequences

```

1 MLVGGKPAFAF KSTAVFPDTPD FKEVSLQYK GKWLVLFSYP LDFTFVCPTE IIEFSNKYEE
61 FKKIGCEV LGLSVDVSVFT HLAWINTPRK EGGLEIKYP LIGDLGGKIA KDYGFYMCEA
121 GH TLRGTA IIDPEGLIRH VQNNHPDVR NVDEILRLVK AYQFAAKHGE VCPAQNHGEG
181 DLTI KPNP KASKEYFGKA NN
    
```

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



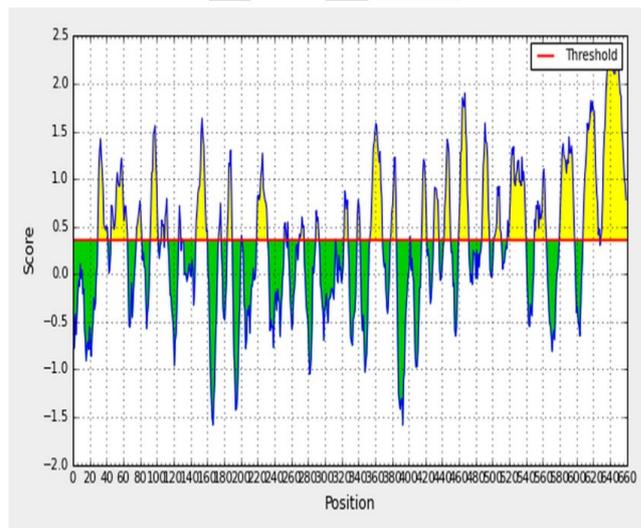
Average: 0.065 Minimum: -1.735 Maximum: 1.887

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	4	11	GKPAPAFK	8
2	14	22	AVFPDTEFK	9
3	59	59	E	1
4	85	93	TPRKEGGLG	9
5	105	108	GKIA	4
6	121	121	T	1
7	127	129	IID	3
8	140	147	NHPDVGRN	8

Figura 21. Predizione delle sequenze peptidiche potenzialmente immunogene di TvPRX

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



Average: 0.318 Minimum: -1.585 Maximum: 2.329

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	30	41	MGNRTTPSYVAF	12
2	46	65	RLVGDAAKNQAAMNPQNTVF	20
3	76	82	SDPVVQK	7
4	93	101	RSDGDRPKI	9
5	106	108	KGE	3
6	110	113	KQFF	4
7	127	128	ET	2
8	130	131	EN	2
9	147	160	YFNDGQRQATKDAG	14
10	174	176	PTA	3
11	184	189	NEKSDK	6
12	201	201	G	1
13	219	232	ATAGDTHLGGEDFD	14
14	252	254	RES	3
15	256	256	R	1
16	270	275	RTISTA	6
17	290	293	DFQD	4
18	313	313	G	1
19	323	328	KMSKSD	6
20	339	342	SRIP	4
21	354	368	GKQPCRGVDPDEAVA	15
22	379	385	KGDNSEA	7
23	402	402	E	1
24	416	421	TTIPAK	6
25	430	436	ADNQPAV	7
26	442	450	EGERTTRD	9
27	460	471	TGIPPAPRGVPQ	12
28	487	496	SAQDKSTGNV	10
29	502	510	KNDRGRLSQ	9
30	518	540	SDAEKYKAQDEEIKKKTEAKNGL	23
31	550	564	SVNGELGSKIDAADK	15
32	580	597	SNQDASVSDYENKQKDVE	18
33	608	627	YQSAAGGAGGMPGGVDPMSMF	20

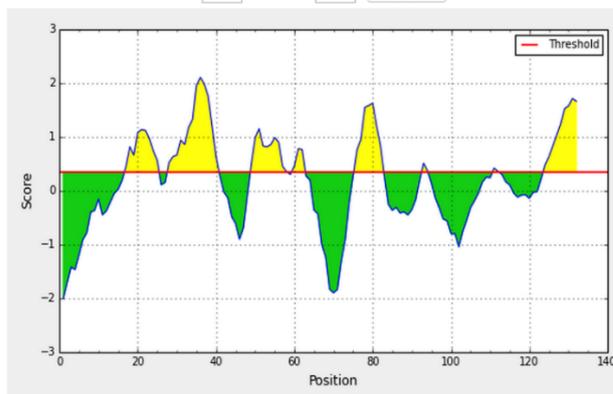
Figura 22. Predizione delle sequenze peptidiche potenzialmente immunogene di TvHSP70

Bepired Linear Epitope Prediction Prediction

Input Sequences

1 MQIFVKITLG KHITLEVEPT DRIEDVKAKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL EDGNTLQDYS
61 IQKDSLHLV LRLRGGGKEA YEPSLRILAE KTNVRSVCR KCYARLSERA QQCRHKQCGH
121 CKSIRPKKA GKE

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0,35 Recalculate



Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	17	25	VEPTDRIED	9
2	28	40	AKIQDKEGIPPDQ	13
3	49	58	QLEDGNTLQD	10
4	60	62	SIQ	3
5	76	82	GGKEAYE	7
6	93	94	NV	2
7	111	112	QQ	2

Figura 23. Predizione delle sequenze peptidiche potenzialmente immunogene di TvUBI

Bepired Linear Epitope Prediction predice la localizzazione degli epitopi lineari delle cellule B tramite il modello hidden Markov e il metodo della scala di propensione. (Larsen et al., 2006) Per ognuna delle tre proteine secrete oggetto di questo studio, sono stati selezionati tre peptidi aventi le caratteristiche di immunogenicità predette sulla base dell'analisi bioinformatica. Per una più accurata caratterizzazione, le sequenze di ognuno dei 9 peptidi sono state successivamente analizzate online su www.immuneepitope.org utilizzando Bepired Linear Epitope Prediction e altri 5 diversi metodi disponibili:

- Chou and Fasman beta turn prediction, uno strumento che predice la presenza di epitopi mediante l'analisi del ripiegamento beta (Chou and Fasman, 1978)
- Emini surface accessibility scale, un calcolo basato sulla scala dell'accessibilità di superficie (Emini et al., 1985)
- Karplus and Schulz flexibility scale, metodo basato sulla scala di flessibilità (Karplus and Schulz, 1985)
- Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale, metodo semi-empirico che sfrutta le proprietà fisico-chimiche degli aminoacidi e le loro frequenze di occorrenza negli epitopi (Kolaskar and Tongaonkar, 1990)
- Parker Hydrophilicity Prediction, scala di idrofilicità dei peptidi basata sui tempi di ritenzione in HPLC su colonna in fase inversa (Parker et al., 1986)

È necessario sottolineare che non esiste un metodo infallibile per prevedere l'antigenicità dei peptidi ma di seguito sono elencate delle caratteristiche, presenti in letteratura, che abbiamo ricercato per definire gli epitopi potenzialmente antigenici in una sequenza proteica:

- Stabilità, solubilità in acqua e orientazione superficiale
- Flessibilità e accessibilità
- Facilità di sintesi e di coniugazione con proteine carrier
- Specificità per le proteine target

Gli epitopi antigenici ideali dovrebbero possedere queste caratteristiche, questo perché in condizioni naturali le porzioni idrofile delle proteine tendono a stare sulla superficie mentre quelle idrofobe si ritraggono verso l'interno, quindi gli anticorpi tendono a riconoscere gli epitopi presenti sulla superficie delle proteine e si legano preferenzialmente agli epitopi flessibili che si dispongono in posizioni più accessibili.

La scelta della sequenza è lo step più critico nella predizione dei peptidi, il metodo per disegnare dei peptidi che vengano riconosciuti dagli anticorpi non è preciso ma ci siamo serviti di una serie di linee guida per massimizzare la probabilità di produrre dei peptidi di alta qualità:

- 1) È stata valutata l'omologia di sequenza dei peptidi con altre sequenze peptiche di altri sistemi biologici su BLAST protein search con Protein Lounge (<http://www.proteinlounge.com>)
- 2) Con l'ausilio del programma SEAVIEW i peptidi sono stati disegnati in modo che fossero specifici per le proteine in esame
- 3) Sono stati scelti peptidi che si trovano nella regione N o C terminale
- 4) L'antigenicità dei peptidi è stata prevista sul sito web www.innovagen.se ed è stata valutata l'idoneità per la produzione di anticorpi della sequenza peptica (vedi esempio in Figura 24)

INNOVAGEN
Is your peptide sequence suitable for antibody production

Enter the peptide sequence to be analysed.
(NH₂-) (-COOH)

Specify the sequence location within the protein.
Absolute N-terminus

This peptide is suitable for antibody production!

Based on the information you have provided, the conclusion is that this peptide is suitable for antibody production. However, when placing an order a qualified Innovagen staff member will analyse your sequence once more, to verify its suitability.

This automated analysis takes into account predicted water solubility, peptide length, weight, the need for conjugation and the facilitation thereof, and modifications of the termini. Though believed to be accurate and up to date, all liability for the content, algorithms, accuracy of data, omissions, ambiguities, errors is expressly disclaimed.

Powered by ExpertMaker

Figura 24. Esempio di una valutazione di idoneità per la produzione di anticorpi di uno dei peptidi oggetto di studio eseguita su www.innovagen.se

- 5) Sono state evitate le aree non accessibili della proteina come per esempio i domini trans-membrana
- 6) La lunghezza dei peptidi è stata sempre compresa tra 8 e gli 20 aminoacidi (i peptidi più lunghi perderebbero di specificità quelli più corti potrebbero non essere riconosciuti con affinità sufficiente)
- 7) Le proprietà dei peptidi predetti quali solubilità e accessibilità sono state investigate utilizzando il programma disponibile online PepCalc.com (vedi esempio in Figura 25)

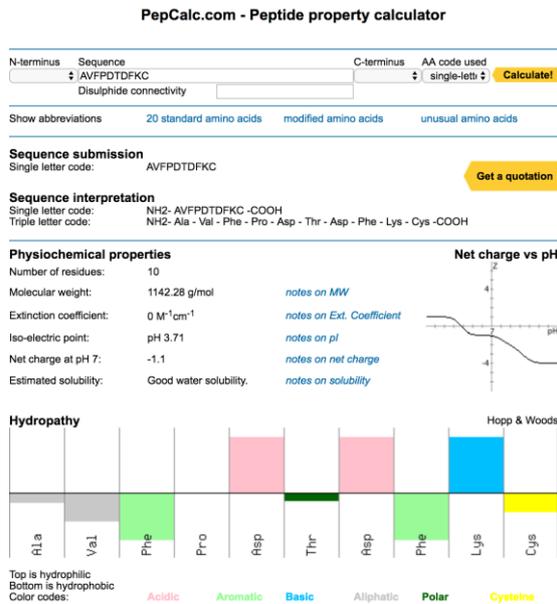


Figura 25. Esempio di una valutazione di solubilità di uno dei peptidi oggetto di studio eseguita su PepCalc.com

Considerando che la solubilità dei peptidi è influenzata dalla composizione aminoacidica, abbiamo tentato di disegnare dei peptidi predetti che rispettassero il più possibile le seguenti osservazioni sulla solubilità:

- È consigliabile evitare peptidi con un elevato tasso di residui idrofobici come leucina (L), valina (V), isoleucina (I), metionina (M), fenilalanina (F) e triptofano (W) perché hanno una limitata solubilità
- È consigliabile mantenere la percentuale di aminoacidi idrofobici sotto il 50%
- È consigliabile evitare sequenze che contengono residui adiacenti multipli di valina (V), isoleucina (I), tirosina (Y), fenilalanina (F), triptofano (W), leucina (L), glutammina (Q) e treonina (T). Se non si possono scegliere sequenze che evitino questa adiacenza rompere le sequenze con delle sostituzioni conservative per esempio inserendo residui di glicina (G) o prolina (P) ogni tre residui o sostituendo la glutammina (Q) con l'asparagina o la treonina (T) con la serina (S)
- Peptidi con residui multipli di cisteina (C), metionina (M) o triptofano (W) sono difficili da sintetizzare con elevata purezza perché suscettibili a reazioni di ossidazione
- È consigliabile evitare le seguenti sequenze:
- Sequenze che iniziano o terminano con una prolina(P)

- Doppietti di alanina (A) valina (V), treonina (T), prolina (P) e sequenze che terminino con valina (V), isoleucina (I), triptofano (W), tirosina (Y) o fenilalanina (F)
- Ripetizioni lunghe dello stesso aminoacido per esempio 6xA, 6xG o 6xN
- È desiderabile una carica complessiva neutra
- Sono preferibili sequenze terminanti con residui idrofili
- È consigliabile limitare il numero di residui idrofobici continui perché potrebbero causare problemi di solubilità

È stato scelto di disegnare tre peptidi potenzialmente immunogeni per ciascuna delle tre proteine in esame. La scelta di testare tre peptidi per valutare la risposta immunitaria durante le infezioni da *T. vaginalis* mira a limitare il numero di falsi positivi tra i campioni testati. Tutte e nove le sequenze peptidiche sono state disegnate con una lunghezza variabile tra i 10 e i 13 aminoacidi e con una cisteina N o C terminale, per consentire il cross-linking con una proteina carrier in test ELISA.

Per una più accurata caratterizzazione, le sequenze di ognuno dei 9 peptidi disegnati prima della sintesi, sono state nuovamente analizzate online su www.immuneepitope.org utilizzando i sei tools di predizione illustrati in precedenza. I risultati sono riportati nei materiali supplementari.

Tutti i peptidi sono stati sintetizzati dalla LifeTein, LLC (Somerset, New Jersey, USA) con una purezza >90%. (Tabella 3)

Proteine	Lunghezza		Peptidi	Inizio-Fine	Posizione
Tvag_484570 (TvPRX)	196 aa	1	GKPAPAFKSC	4-11	N-terminale
		2	AVFPDTDFKC	85-93	Interna
		3	TPRKEGGLGEC	14-22	N-terminale
Tvag_151220 (TvHSP70)	659 aa	1	RSDGDRPKIEC	93-101	N-terminale
		2	CNEKSDKERH	324-332	Interna
		3	KMSKSDVTDC	181-192	Interna
Tvag_331660 (TvUBI)	132 aa	1	VEPTDRIEDC	17-25	N-terminale
		2	LEDGNTLQDC	49-58	Interna
		3	GKEAYEPSLRC	74-82	Interna

Tabella 3. Caratteristiche dei peptidi usati in questo lavoro

Per avere la certezza che i peptidi vengano immobilizzati nella corretta posizione ci si è serviti di un metodo di cross-linking diretto (DLCM) messo a punto in uno studio di recente pubblicazione (Cuccuru et al., 2012).

Con questa tecnica la formazione di un legame tioetere stabile tra il peptide e il carrier permette al peptide di assumere un corretto orientamento spaziale fondamentale per il successivo riconoscimento da parte degli anticorpi.

Selezione dei campioni: test ELISA con *T. vaginalis* intero

Per valutare l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI, durante le infezioni da *T. vaginalis*, mediante ELISA, sono stati selezionati i sieri di 133 pazienti, di cui 93 donne e 40 uomini, di pari età e con comportamenti sessuali a rischio.

I 93 sieri di donne precedentemente classificati mediante osservazione microscopica di un vetrino a fresco di tampone vaginale come *T. vaginalis*-positivi (53), e *T. vaginalis*-negativi (40), sono stati sottoposti ad un test ELISA utilizzando cellule di *T. vaginalis* G3, intere come antigene.

Come controlli negativi sono stati utilizzati i sieri di 10 volontari sani non affetti da tricomoniasi e i valori di assorbanza sommati a tre deviazioni standard sono stati usati per calcolare il

cutoff. I sieri sono stati classificati come positivi o negativi se i valori di OD erano rispettivamente superiori o inferiori rispetto al valore del cutoff. Le differenze osservate erano statisticamente significative.

Il test ELISA ha confermato la classificazione dei sieri mediante vetrino a fresco di tampone vaginale, infatti nei 53 sieri positivi al vetrino è stata rilevata sieropositività per *T. vaginalis* totale, mentre i sieri delle 40 pazienti con vetrino negativo sono risultati *T. vaginalis* sieronegativi. Quindi la classificazione iniziale effettuata mediante esame microscopico a fresco è stata confermata.

A differenza dei campioni di pazienti di sesso femminile, l'osservazione microscopica dei campioni di secreto uretrale o urine non era disponibile. Pertanto i sieri dei 40 pazienti di sesso maschile sono stati classificati solo sulla base della loro reattività immunologica mediante il test descritto.

Considerando che gli esami microscopici a fresco sono dipendenti dalla carica parassitaria e che questa nei pazienti uomini affetti da tricomoniasi è spesso sotto i limiti di rilevabilità è stato possibile classificare i 40 sieri di pazienti di sesso maschile come *T. vaginalis*-sieropositivi o *T. vaginalis*-sieronegativi esclusivamente mediante ELISA contro *T. vaginalis* intero.

Dei 40 sieri di uomini testati, 30 sono risultati reattivi verso l'antigene protozario intero e quindi sono stati classificati come *T. vaginalis*-sieropositivi mentre 10 sono stati classificati come *T. vaginalis*-sieronegativi.

La Tabella 4 riassume la classificazione di 133 pazienti sui quali verrà testata l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI:

Pazienti	<i>T. vaginalis</i> -positivi	<i>T. vaginalis</i> -negativi	Totale
Donne	53	40	93
Uomini	30	10	40
Totale	83	50	133

Tabella 4. Classificazione di pazienti infettati e non infettati da *T. vaginalis*

Test ELISA con i peptidi

I sieri di 93 donne precedentemente testati per la presenza di anticorpi anti- *T. vaginalis* da cui risultavano 53 positivi e 40 negativi sono stati sottoposti ad un saggio ELISA indiretto per valutare l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI durante l'infezione naturale. Alle piastre adsorbite con BSA-M, 0,5 µg/well legata a 0,5 µg di peptide, sono stati aggiunti 93 sieri di donne che sono stati testati per la reattività anti-TvPRX, anti-TvHSP70 e anti-TvUBI successivamente valutata incubando le piastre con un anticorpo secondario anti-human IgG. Dopo l'incubazione la reazione antigene-anticorpo è stata misurata leggendo il viraggio di colore del substrato p-nitrofenil fosfato a 405 nm.

Tutti i 93 sieri sono stati testati separatamente con ciascuno dei tre peptidi (delle tre proteine in esame), e tutti i campioni sono stati testati in duplicato.

I sieri sono stati classificati stabilendo un cutoff come il valore medio dei controlli, ottenuto con i sieri di 10 volontari sani distinti dai campioni in esame, più tre deviazioni standard. I sieri sono stati classificati come peptide-positivi o peptide-negativi se i valori OD erano superiori o inferiori al valore del cutoff. In tutti i casi le differenze osservate erano statisticamente significative come mostrato in Tabella 5:

	P-value	OddsRatio	Chi-squared
TvPRX1	P< 0.0001	106.8	55.1
TvPRX2	P< 0.0001	19.5	31.7
TvPRX3	P< 0.0001	21.6	35.1
TvHSP701	P< 0.0001	43.9	36.7
TvHSP702	P< 0.0001	38.7	43.3
TvHSP703	P< 0.0001	22.8	32.5
TvUBI1	P< 0.0001	42.1	41.8
TvUBI2	P< 0.0001	54.9	29.2
TvUBI3	P< 0.0001	26.1	31.7

Tabella 5. I test statistici P-value, l'Odds Ratio e chi-quadro sono stati eseguiti con l'ausilio del software

GraphPad Prism 6.0. e di Microsoft Excel

L'ELISA indiretto compiuto sui sieri di 93 donne testati per la presenza di anticorpi anti-TvPRX, anti-TvHSP70 e anti-TvUBI al fine di valutare se TvPRX, TvHSP70 e TvUBI vengono espresse da *T. vaginalis in vivo* durante l'infezione umana ha mostrato come possiamo vedere nel Grafico 1, che i pazienti Tv-sieropositivi di sesso femminile hanno anticorpi per almeno uno dei tre peptidi testati nel 96% dei casi in TvPRX, nell'86% dei casi in TvHSP70 e nell'88% dei casi in TvUBI.

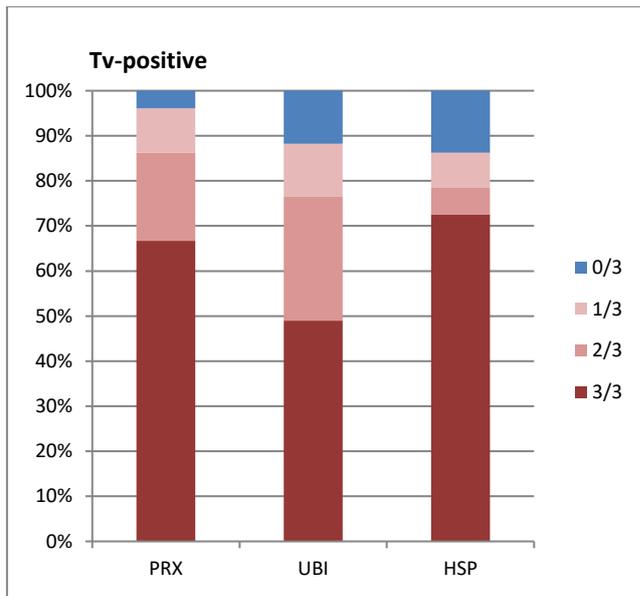


Grafico 1. Presenza di anticorpi anti-TvPRX, anti-TvHSP70 e anti-TvUBI nei sieri di pazienti di sesso femminile affetti da tricomoniasi

Al contrario come mostrato nel Grafico 2 i pazienti Tv-sieronegativi di sesso femminile sono meno frequentemente reattivi, infatti non riconoscono nessuno dei tre peptidi testati nel 76% dei casi in TvPRX, nell'90% dei casi in TvHSP70 e nell'88% dei casi in TvUBI.

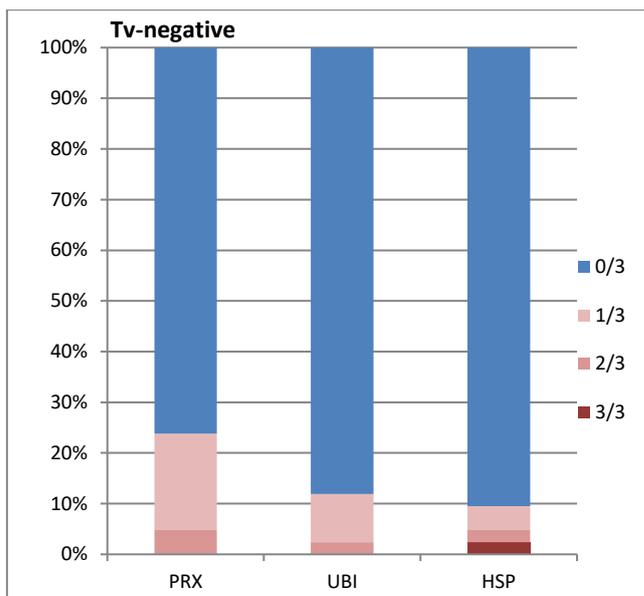


Grafico 2. Presenza di anticorpi anti-TvPRX, anti-TvHSP70 e anti-TvUBI nei sieri di pazienti di sesso femminile non affetti da tricomoniiasi (gruppo di controllo)

È interessante notare la netta contrapposizione della distribuzione dei sieri di pazienti di sesso femminile Tv-sieropositivi rispetto a quella dei Tv-sieronegativi mostrata nel Grafico 3.

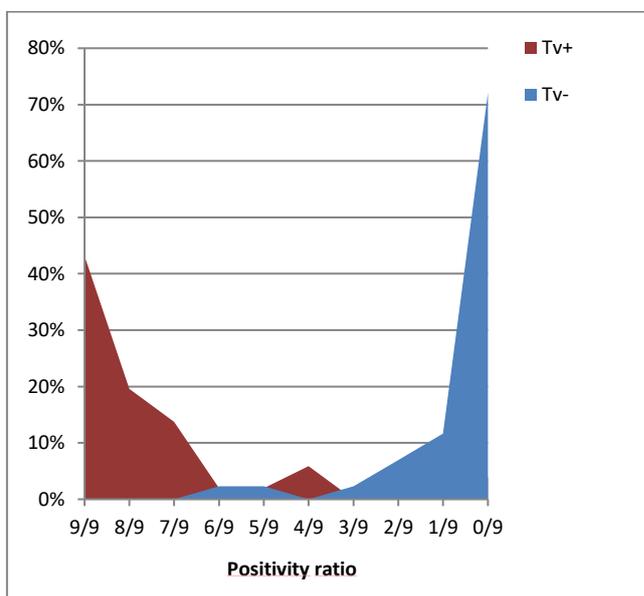


Grafico 3. Rapporto di positività tra i pazienti di sesso femminile Tv-sieropositivi e Tv-sieronegativi e i 9 peptidi testati

L'86% dei pazienti di sesso femminile Tv-sieropositivi riconosce da un minimo di 6 sino ad un massimo di 9 su 9 peptidi testati, mentre i sieri da donne classificate come sieronegative

riconoscono raramente (12%) un massimo di due peptidi, e nel maggiore numero di casi (72%) non riconoscono alcun peptide.

Il test d'immunogenicità dei singoli peptidi ci ha permesso di identificare TvPRX1, TvUBI1, TvUBI3, TvHSP701 e TvHSP702 come i migliori marcatori di infezione tra quelli testati.

Questi risultati indicano fortemente che nelle donne TvPRX, TvHSP70 e TvUBI siano espresse *in vivo* da *T. vaginalis* durante l'infezione.

In parallelo anche i sieri di 40 uomini, precedentemente testati per la presenza di anticorpi anti-*T. vaginalis* da cui risultavano 30 Tv-sieropositivi e 10 Tv-sieronegativi, sono stati sottoposti ad un saggio ELISA indiretto per valutare l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI durante l'infezione naturale.

L'ELISA indiretto compiuto sui sieri di 40 uomini testati per la presenza di anticorpi anti-TvPRX, anti-TvHSP70 e anti-TvUBI al fine di valutare se TvPRX, TvHSP70 e TvUBI vengono espresse da *T. vaginalis in vivo* durante l'infezione umana ha mostrato dei risultati inaspettati, i sieri di uomini Tv-sieropositivi sono nove volte meno reattivi verso TvPRX, TvHSP70 e TvUBI rispetto ai sieri delle donne Tv-sieropositive.

Come mostrato nel Grafico 4 la percentuale di donne Tv-sieropositive che reagiscono ai tre peptidi di TvPRX va da un minimo di 80,4% sino ad un massimo di 86,3% mentre la percentuale di uomini Tv-sieropositivi che reagiscono ai tre peptidi TvPRX non supera mai il 2,5%.

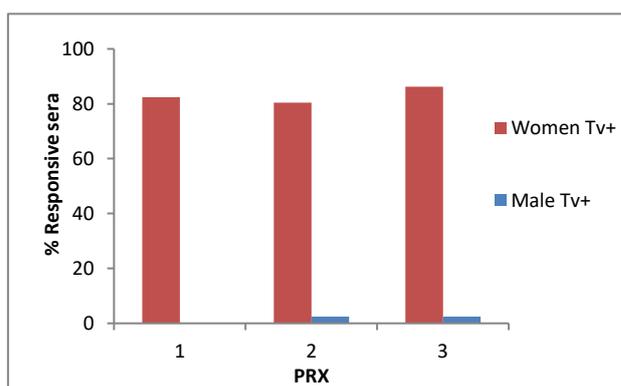


Grafico 4. Responsività dei pazienti di sesso maschile e femminile Tv-sieropositivi ai peptidi di TvPRX

Come mostrato nel Grafico 5 la percentuale di donne Tv-sieropositive che reagiscono ai tre peptidi di TvHSP70 va da un minimo di 74,5% sino ad un massimo di 84,3% mentre la

percentuale degli uomini Tv-sieropositivi che reagiscono ai tre peptidi TvHSP70 non supera mai il 5%.

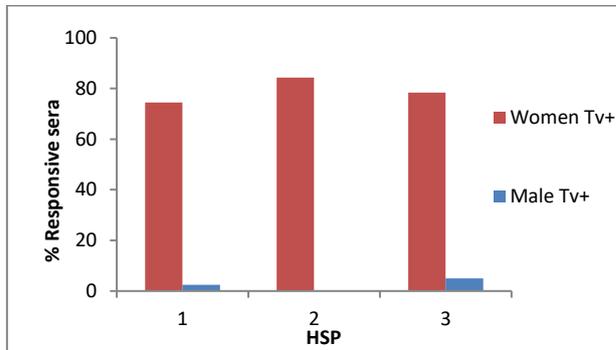


Grafico 5. Responsività dei pazienti di sesso maschile e femminile Tv-sieropositivi ai peptidi di TvHSP70

Come mostrato nel Grafico 6 la percentuale di donne Tv-sieropositive che reagiscono ai tre peptidi di TvUBI va da un minimo di 58,8% sino ad un massimo di 80,3% mentre la percentuale degli uomini Tv-sieropositivi che reagiscono ai tre peptidi TvUBI non supera mai il 5%.

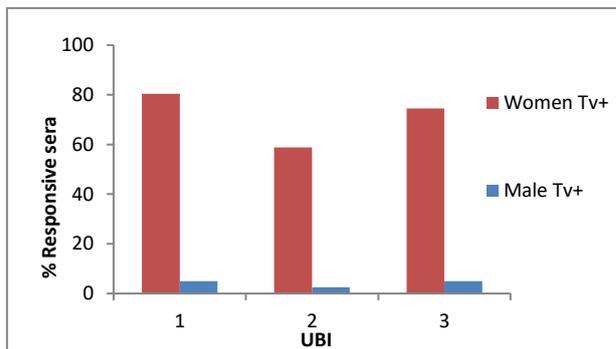


Grafico 6. Responsività dei pazienti di sesso maschile e femminile Tv-sieropositivi ai peptidi di TvUBI

È interessante notare la differenza tra uomini e donne Tv-sieropositivi nella risposta ai peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI; Difatti, mentre nelle donne Tv-sieropositive la percentuale di positività ad almeno uno dei nove peptidi testati è del 96%, questa percentuale scende al 10% negli uomini Tv-sieropositivi, che rispondono d'altra parte con la stessa percentuale di positività dei sieri di controllo di uomini Tv-sieronegativi (Grafico 7).

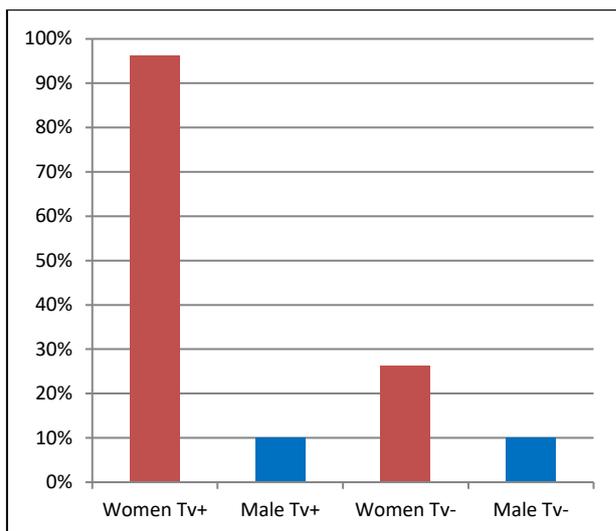


Grafico 7. Percentuale di positività ai nove peptidi testati dei pazienti di sesso femminile e maschile Tv-sieropositivi e Tv-sieronegativi testati

La secrezione *in vivo* di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI è stata dimostrata dalla presenza di anticorpi specifici nei sieri di pazienti donne affette da tricomoniasi. Il dato più clamoroso è però quello della differenza nella reattività anti-TvPRX, TvHSP70 e TvUBI tra i sieri di pazienti di sesso maschile e femminile.

I sieri di pazienti di sesso femminile sono significativamente più reattivi contro TvPRX, TvHSP70 e TvUBI rispetto a quelli di pazienti uomini. Difatti, abbiamo registrato la presenza di anticorpi anti-TvPRX, TvHSP70 e TvUBI nel 96% delle pazienti donne e solo nel 10% dei pazienti uomini. Questi dati indicano l'esistenza di importanti differenze nell'infezione maschile e femminile e potrebbero essere considerati un'indicazione del fatto che TvPRX, TvHSP70 e TvUBI siano espresse preferenzialmente in ospiti di sesso femminile quindi in maniera differenziale nei due sessi.

Questa marcata preferenza potrebbe avere le seguenti motivazioni:

- Il protozoo esprime, in caso di infezione di soggetti di sesso femminile, livelli di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI superiori a quelli espressi in pazienti di sesso maschile, possibilmente per un ipotetico coinvolgimento nei meccanismi di sopravvivenza di *T. vaginalis* a livello della mucosa vaginale

- Le profonde differenze dei sistemi immunitari mucosali dei tratti urogenitali maschili e femminili si riflettono nella risposta umorale a questi determinati antigeni, per cui le stesse proteine risultano diversamente immunogeniche nei due sessi

A supporto della prima ipotesi c'è uno studio del nostro gruppo di ricerca non ancora pubblicato che dimostra come le proteine secrete da *T. vaginalis* cambino al variare delle condizioni in cui si trova il protozoo, per esempio al variare del pH variano i tipi delle proteine secrete, quindi è plausibile ipotizzare che le proteine secrete in vagina siano differenti da quelle secrete nell'uretra.

A supporto della seconda ipotesi ci sono numerosi studi in letteratura che dimostrano le differenze specifiche di genere nella risposta immunitaria a varie infezioni (Butterworth et al., 1967; Fish, 2008; Libert et al., 2010; van Lunzen and Altfeld, 2014; McClelland and Smith, 2011; Roberts et al., 2001).

Nel complesso i risultati ci hanno fatto supporre che i peptidi testati potessero essere identificati come dei nuovi marker d'infezione sesso-specifici, per individuare infezioni da *T. vaginalis*.

Test ELISA su sieri di donne con differenti combinazioni peptidiche

L'ultima fase del lavoro svolto, ha avuto come focus la messa a punto di un test diagnostico con una combinazione dei peptidi testati in singolo che rappresentasse una ipotetica alternativa ai metodi di diagnosi tradizionale. Sono state testate differenti combinazioni peptidiche nella stessa piastra ELISA.

Le piastre sono state preparate come spiegato in precedenza, con BSA-M 0,5 µg/well legata a 0,5 µg di differenti peptidi.

I 93 sieri di donna (53 *T. vaginalis*-sieropositivi e 40 *T. vaginalis*-sieronegativi) testati in precedenza contro i singoli peptidi delle tre proteine in esame, sono stati ritestati in ELISA con differenti combinazioni peptidiche, le combinazioni che hanno tenuto un'elevata percentuale di positività mantenendo costante la percentuale di falsi positivi sono state due:

- 1) TvUBI1-TvUBI3-TvHSP701-TVHSP702
- 2) TvPRX1-TvUBI1-TvUBI3-TvHSP701-TVHSP702

La percentuale di positività alla combinazione peptidica numero 1 nelle donne Tv-sieropositive è dell'80% e nelle donne Tv-sieronegative del 23% (Grafico 8).

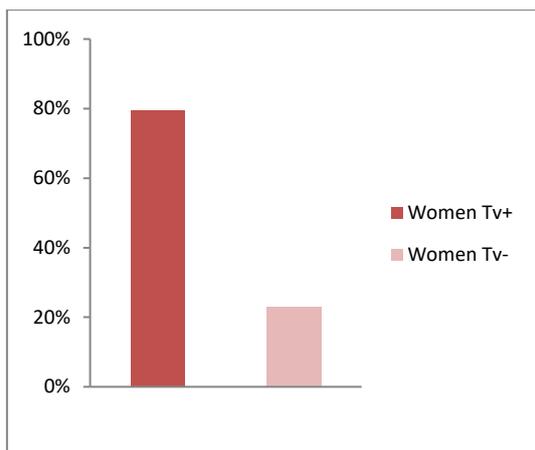


Grafico 8. Presenza di anticorpi anti-TvUBI1-TvUBI3-TvHSP701-TVHSP702 nei sieri di pazienti di sesso femminile affetti da tricomoniasi e nei sieri dei controlli sani

La percentuale di positività alla combinazione peptidica numero 2 nelle donne Tv-sieropositive è dell'90% e nelle donne Tv-sieronegative del 23% (Grafico 9)

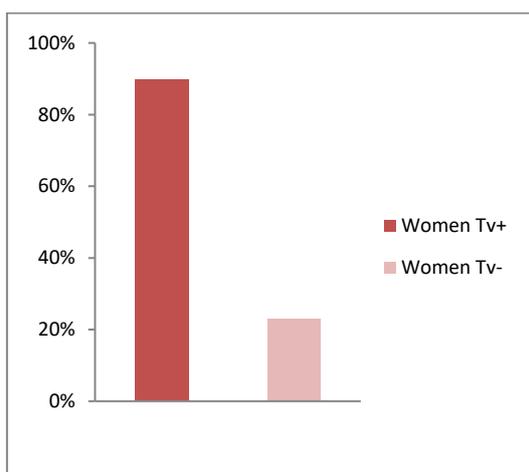


Grafico 9. Presenza di anticorpi anti-TvPRX1-TvUBI1-TvUBI3-TvHSP701-TVHSP702 nei sieri di pazienti di sesso femminile affetti da tricomoniasi e nei sieri dei controlli sani

Ad oggi la combinazione peptidica numero 2 si è rivelata essere la migliore tra quelle testate perché ha consentito di incrementare la percentuale di positività dei campioni Tv-sieropositivi mantenendo inalterata la percentuale di positività dei campioni Tv-sieronegativi (falsi positivi).

Il problema sorto nell'interpretazione dei risultati è anche il limite del test diagnostico che stiamo tentando di mettere a punto e consiste in una cospicua percentuale di falsi positivi

(23%) che potrebbe essere dovuta a molteplici fattori. Quello che possiamo ipotizzare è che ci siano stati degli errori intrinseci nella classificazione dei pazienti in Tv-sieropositivi e Tv-sieronegativi.

Infatti, come citato in introduzione, gli attuali test di screening risentono di numerose lacune. Il vetrino su tampone vaginale ci permette di rilevare protozoi solo nel caso di una infezione acuta con carica infettante alta; nel caso in cui invece il numero di protozoi fosse basso questi potrebbero non essere rilevati al microscopio. Questa condizione potrebbe sussistere anche nel caso di una infezione cronica che è mantenuta solitamente da una limitata quantità di *T. vaginalis*.

D'altro canto il test ELISA che usa come antigene *T. vaginalis* intero è un test grossolano per definizione e può portare ad una errata classificazione dei sieri.

In questo studio, per cercare di limitare questi problemi, è stata fatta una sovrapposizione dei risultati ottenuti con le due tecniche ma questo non restituisce certezze assolute sulla siero negatività delle donne analizzate.

È inoltre possibile che le sequenze peptiche scelte siano comuni a quelle di altri patogeni non ancora presenti in banca dati e quindi che ci sia stato un errore nella predizione.

Considerata l'elevata prevalenza della tricomoniasi soprattutto in paesi in via di sviluppo, l'impatto delle complicazioni di questa infezione sui sistemi sanitari pubblici e le severe complicanze associate a questa infezione, il progetto sperimentale seguito nella tesi di dottorato è stato finalizzato a un miglioramento dei metodi diagnostici tradizionali.

Le tecniche immunologiche per la ricerca di anticorpi specifici costituiscono una valida alternativa ai metodi diagnostici tradizionali soprattutto in caso di infezioni croniche nelle quali la carica del parassita è al disotto dei limiti di rilevabilità delle comuni tecniche diagnostiche. In una ricerca di recente pubblicazione (Ton Nu et al., 2015) è stata studiata la cinetica degli anticorpi circolanti (IgG) in differenti pazienti affetti da tricomoniasi. Lo studio ha rivelato che in caso di infezioni acute e sintomatiche l'azione sinergica del trattamento antimicrobico e dei meccanismi di difesa dell'ospite porta in genere alla risoluzione dell'infezione e ad una scomparsa degli anticorpi anti-*T. vaginalis* circolanti nel giro di 2-4 mesi. In caso invece di infezioni silenti e asintomatiche o a ripetuti reinoculi da parte di partners sessuali che non hanno correttamente fatto terapia anti protozoaria, si può andare incontro ad una cronicizzazione della malattia e quindi ad una costante stimolazione dei

linfociti B a secernere gli anticorpi anti-*T. vaginalis* (il cui titolo rimane costante nel tempo). Un paziente asintomatico che mantiene il titolo anticorpale alto per più di sei mesi è da considerarsi un portatore con malattia cronica che, oltre ad essere in grado di trasmettere la malattia, è esposto a rischi di insorgenza di tumori locali.

I risultati ottenuti ci hanno consentito di dimostrare che i peptidi di TvPRX, TvUBI e TvHSP70 sono in grado di indurre una forte risposta immunitaria umorale in pazienti donne affette da tricomoniasi. I peptidi di TvPRX, TvUBI e TvHSP70 sono stati identificati come dei nuovi markers sesso-specifici per la sierodiagnosi della tricomoniasi. Inoltre durante lo studio ci siamo serviti di differenti combinazioni dei peptidi di TvPRX, TvUBI e TvHSP70 per mettere a punto un test diagnostico attendibile.

L'identificazione di nuovi marcatori immunologici espressi e secreti sempre durante l'infezione e la messa a punto di nuove tecniche di diagnosi sierologica è importante soprattutto per lo screening sierologico di pazienti che sono stati esposti alla tricomoniasi in relazione alla possibilità che questi possano sviluppare un tumore.

Conclusioni

Considerata l'elevata prevalenza della tricomoniasi e l'impatto sui sistemi sanitari pubblici delle severe complicanze ad essa associate, il progetto sperimentale seguito nella tesi di dottorato, è stato finalizzato a un miglioramento dei metodi diagnostici tradizionali, mediante l'utilizzo di tecniche immunologiche indirette per la ricerca degli anticorpi specifici in pazienti affetti da tricomoniasi.

A tale scopo, si è tentato di caratterizzare tre proteine secrete da *T. vaginalis* (TvPRX, TvUBI e TvHSP70) per provare a chiarire il loro ruolo nell'attivazione del sistema immunitario e la loro effettiva secrezione *in vivo*.

Tuttavia lo studio basato sulle proteine intere ci ha posto davanti a delle importanti difficoltà di tipo tecnico: è stato infatti impossibile produrre quantità sufficienti di proteine in forma ricombinante ad un elevato livello di purificazione. Per risolvere questa problematica abbiamo deciso di dirottare il nostro studio verso l'utilizzo dei peptidi che ci ha fornito inoltre il vantaggio di poter studiare delle sequenze specifiche per le proteine di *T. vaginalis*, ovviando ai problemi di omologia con proteine di altri patogeni o dell'ospite stesso, omologia della quale avremmo dovuto tener conto nell'analisi dei risultati ottenuti con proteine intere.

Per ogni proteina sono stati disegnati e sintetizzati tre peptidi, aventi le caratteristiche di immunogenicità predette sulla base di analisi bioinformatiche.

I sieri di 93 donne e di 40 uomini, precedentemente testati per la presenza di anticorpi anti-*T. vaginalis*, da cui risultavano 53 donne positive e 40 negative e 30 uomini positivi e 10 negativi, sono stati sottoposti ad un saggio ELISA indiretto per valutare l'immunogenicità dei peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI durante l'infezione naturale.

L'86% dei pazienti di sesso femminile Tv-sieropositivi riconosce da un minimo di 6 sino ad un massimo di 9 su 9 peptidi testati, mentre i sieri da donne classificate come sieronegative riconoscono raramente (12%) un massimo di due peptidi, e nel maggiore numero di casi (72%) non riconoscono alcun peptide. La tecnica utilizzata per determinare l'immunogenicità dei peptidi, ci ha permesso di determinare che i peptidi TvPRX1, TvUBI1, TvUBI3, TvHSP701 e TVHSP702 sono i migliori marcatori di infezione tra quelli testati.

I risultati ottenuti sono una forte indicazione del fatto che nelle donne TvPRX, TvHSP70 e TvUBI siano espresse *in vivo* da *T. vaginalis* durante l'infezione. È interessante notare la differenza tra uomini e donne Tv-sieropositivi nella risposta ai peptidi di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI; difatti, mentre nelle donne Tv-sieropositive la percentuale di positività ad almeno 1 dei 9 peptidi testati è del 96%, questa percentuale scende al 10% negli uomini Tv-sieropositivi.

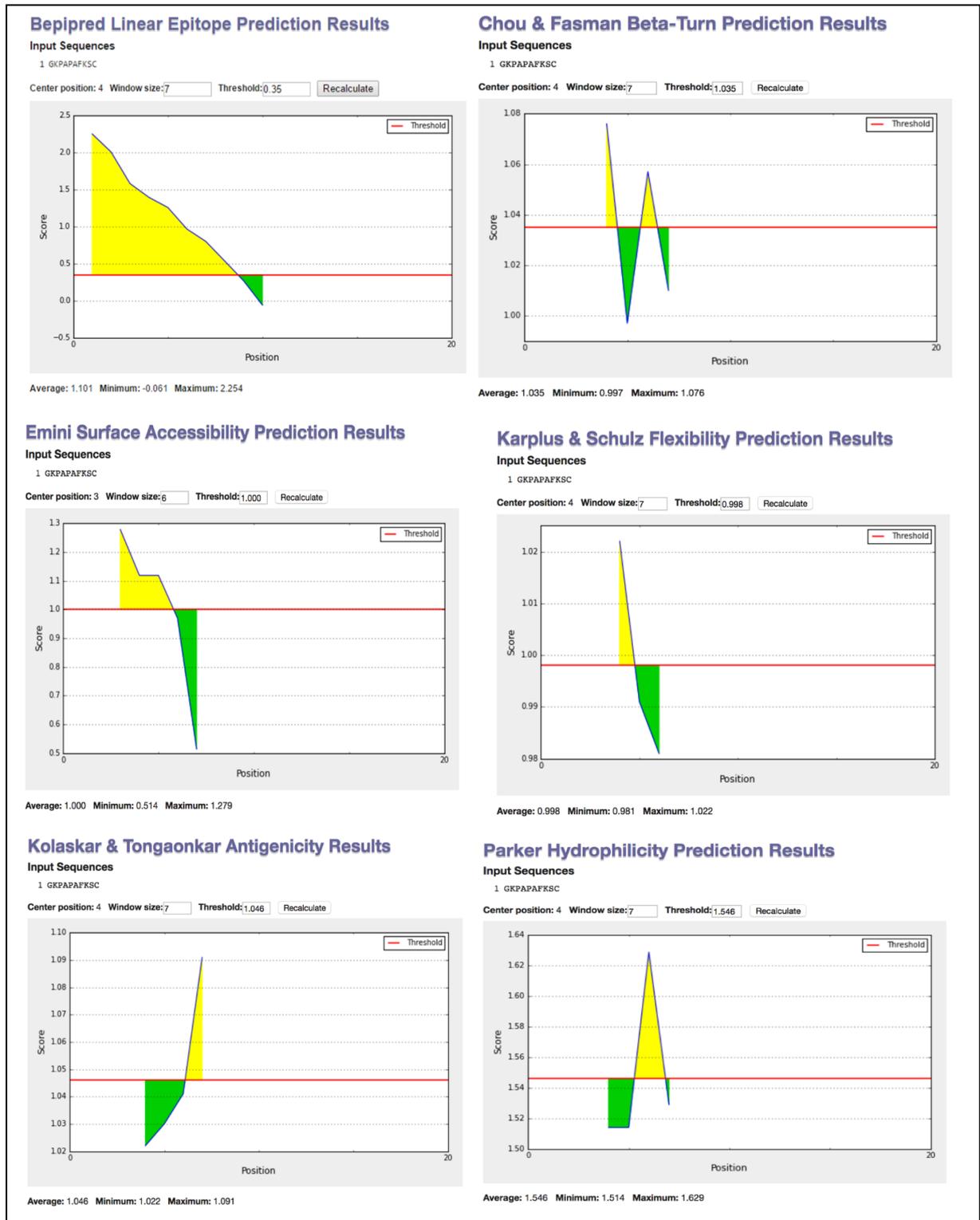
L'ultima fase del lavoro svolto, è stata focalizzata sulla messa a punto di un test diagnostico. A questo fine, sono state testate differenti combinazioni peptidiche nella stessa piastra ELISA. La combinazione peptidica che si è rivelata essere la migliore tra quelle testate, ci ha consentito di incrementare la percentuale di positività dei campioni Tv-sieropositivi mantenendo inalterata la percentuale di positività dei campioni Tv-sieronegativi (falsi positivi). Tale combinazione è composta da i peptidi TvPRX1, TvUBI1, TvUBI3, TvHSP701 e TVHSP702.

In conclusione, i risultati ottenuti ci hanno consentito di dimostrare che i peptidi di TvPRX, TvUBI e TvHSP70 sono in grado di indurre una forte risposta immunitaria umorale in pazienti donne affette da tricomoniasi. I peptidi di TvPRX, TvUBI e TvHSP70 sono stati identificati come dei nuovi markers specifici per la sierodiagnosi della tricomoniasi nel sesso femminile. Inoltre durante lo studio abbiamo individuato la migliore combinazione dei peptidi di TvPRX, TvUBI e TvHSP70 per mettere a punto un test diagnostico attendibile.

Materiali supplementari

Analisi su www.immuneepitope.org delle nove sequenze peptidiche di TvPRX, TvHSP70 e TvUBI.

Peptide TvPRX1: GKPAPAFKSC



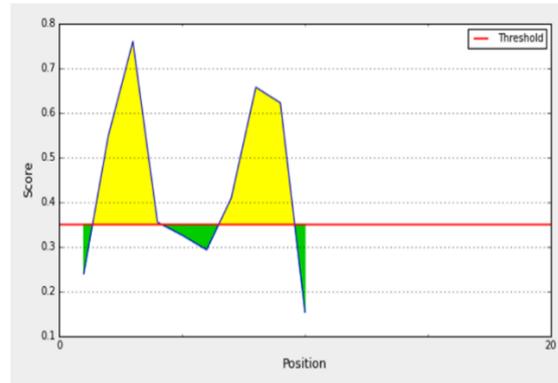
Peptide TvPRX2: AVFPDTEFKC

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 AVFPDTEFKC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



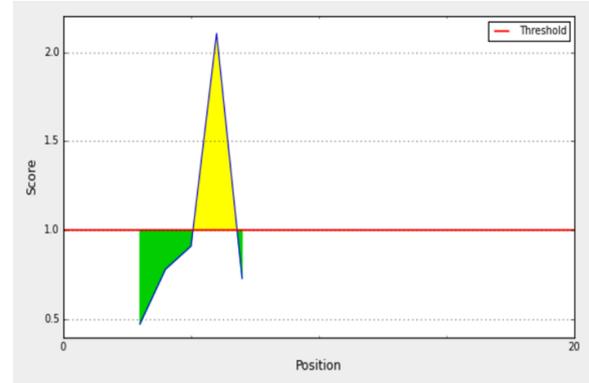
Average: 0.437 Minimum: 0.153 Maximum: 0.761

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 AVFPDTEFKC

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



Average: 1.000 Minimum: 0.473 Maximum: 2.105

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 AVFPDTEFKC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.017 Recalculate



Average: 1.017 Minimum: 0.974 Maximum: 1.039

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

1 AVFPDTEFKC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 2.196 Recalculate



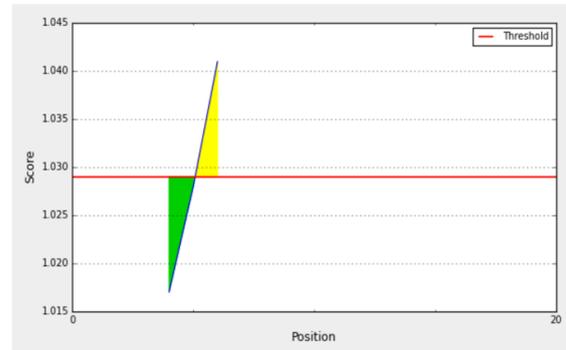
Average: 2.196 Minimum: 0.743 Maximum: 3.600

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 AVFPDTEFKC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.029 Recalculate



Average: 1.029 Minimum: 1.017 Maximum: 1.041

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 AVFPDTEFKC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.074 Recalculate



Average: 1.074 Minimum: 1.014 Maximum: 1.171

Peptide TvPRX3: TPRKEGGLGEC

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 TPRKEGGLGEC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



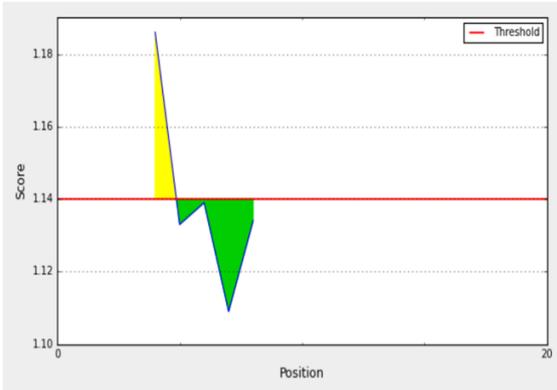
Average: 1.208 Minimum: 0.409 Maximum: 1.886

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 TPRKEGGLGEC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.140 Recalculate



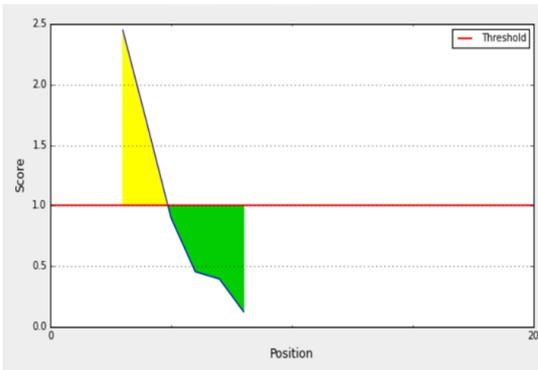
Average: 1.140 Minimum: 1.109 Maximum: 1.186

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 TPRKEGGLGEC

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



Average: 1.000 Minimum: 0.122 Maximum: 2.453

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 TPRKEGGLGEC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.072 Recalculate



Average: 1.072 Minimum: 1.056 Maximum: 1.080

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 TPRKEGGLGEC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.946 Recalculate



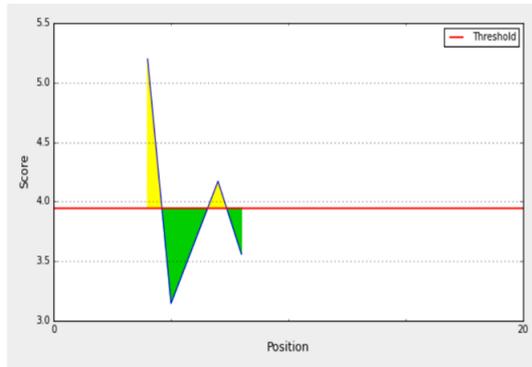
Average: 0.946 Minimum: 0.911 Maximum: 0.998

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

1 TPRKEGGLGEC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 3.946 Recalculate



Average: 3.946 Minimum: 3.143 Maximum: 5.200

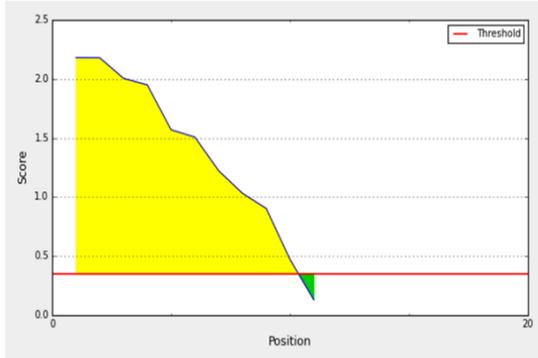
Peptide TvHSP701: RSDGDRPKIEC

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 RSDGDRPKIE C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



Average: 1.377 Minimum: 0.127 Maximum: 2.182

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 RSDGDRPKIE C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.206 Recalculate



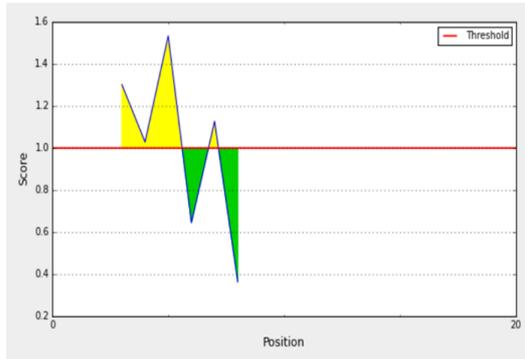
Average: 1.206 Minimum: 1.049 Maximum: 1.341

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 RSDGDRPKIE C

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



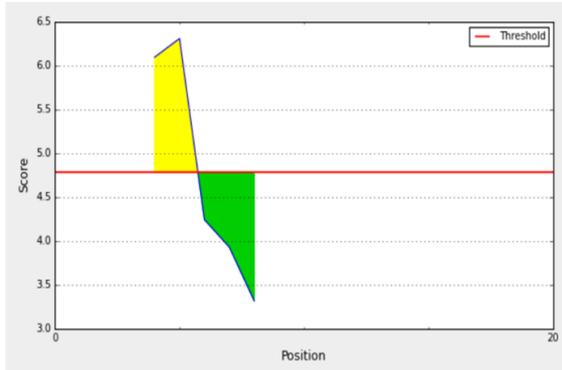
Average: 1.000 Minimum: 0.362 Maximum: 1.535

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

1 RSDGDRPKIE C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 4.780 Recalculate



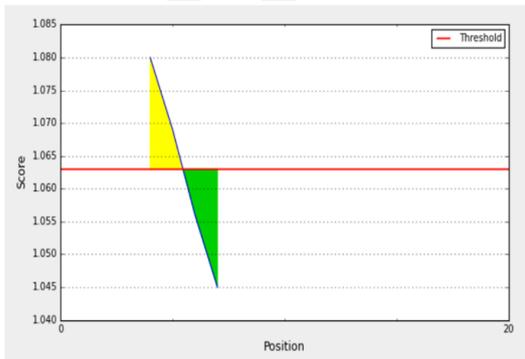
Average: 4.780 Minimum: 3.314 Maximum: 6.314

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 RSDGDRPKIE C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.063 Recalculate



Average: 1.063 Minimum: 1.045 Maximum: 1.080

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 RSDGDRPKIE C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.951 Recalculate



Average: 0.951 Minimum: 0.918 Maximum: 1.021

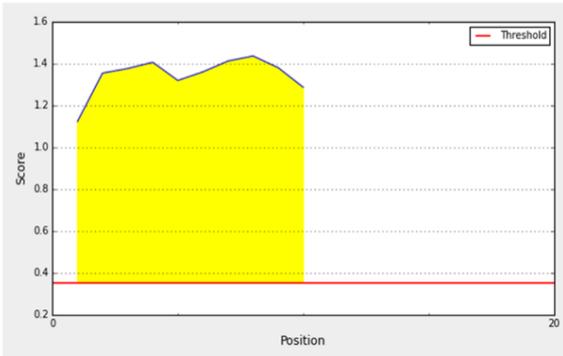
Peptide TvHSP702: CNEKSDKERH

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 CNEKSDKERH

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



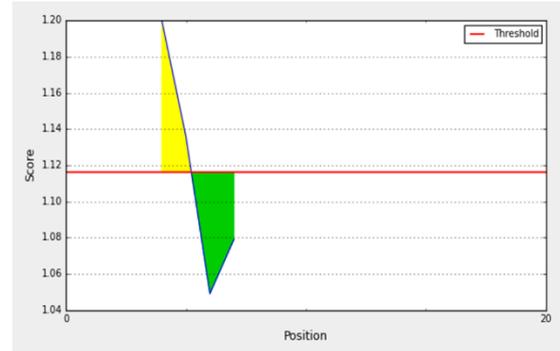
Average: 1.347 Minimum: 1.124 Maximum: 1.438

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 CNEKSDKERH

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.116 Recalculate



Average: 1.116 Minimum: 1.049 Maximum: 1.200

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 CNEKSDKERH

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



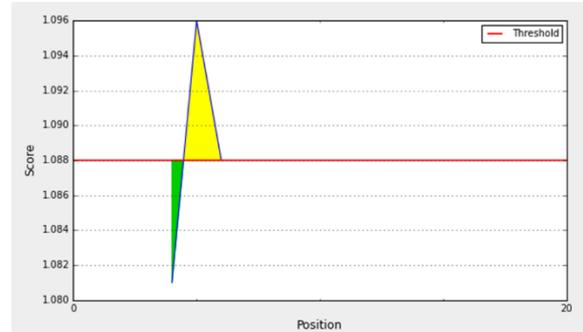
Average: 1.000 Minimum: 0.305 Maximum: 1.387

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 CNEKSDKERH

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.088 Recalculate



Average: 1.088 Minimum: 1.081 Maximum: 1.096

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 CNEKSDKERH

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.924 Recalculate



Average: 0.924 Minimum: 0.888 Maximum: 0.96

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

1 CNEKSDKERH

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 6.582 Recalculate



Average: 6.582 Minimum: 6.000 Maximum: 7.214

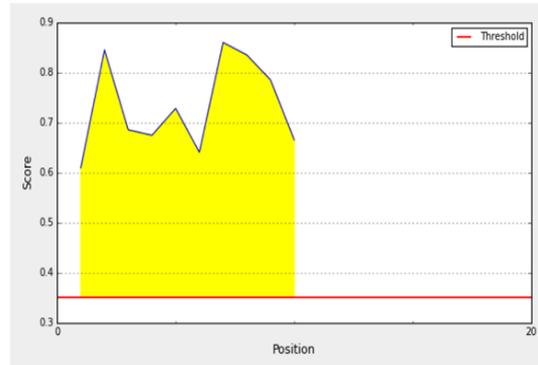
Peptide TvHSP703: KMSKSDVTDC

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 KMSKSDVTDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



Average: 0.734 Minimum: 0.610 Maximum: 0.861

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 KMSKSDVTDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.110 Recalculate



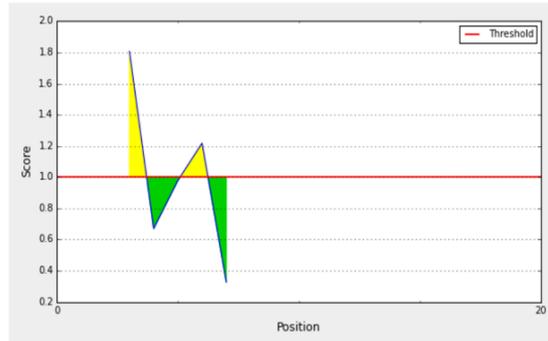
Average: 1.110 Minimum: 1.056 Maximum: 1.179

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 KMSKSDVTDC

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



Average: 1.000 Minimum: 0.327 Maximum: 1.807

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 KMSKSDVTDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.077 Recalculate



Average: 1.077 Minimum: 1.073 Maximum: 1.080

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 KMSKSDVTDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.009 Recalculate



Average: 1.009 Minimum: 0.991 Maximum: 1.054

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

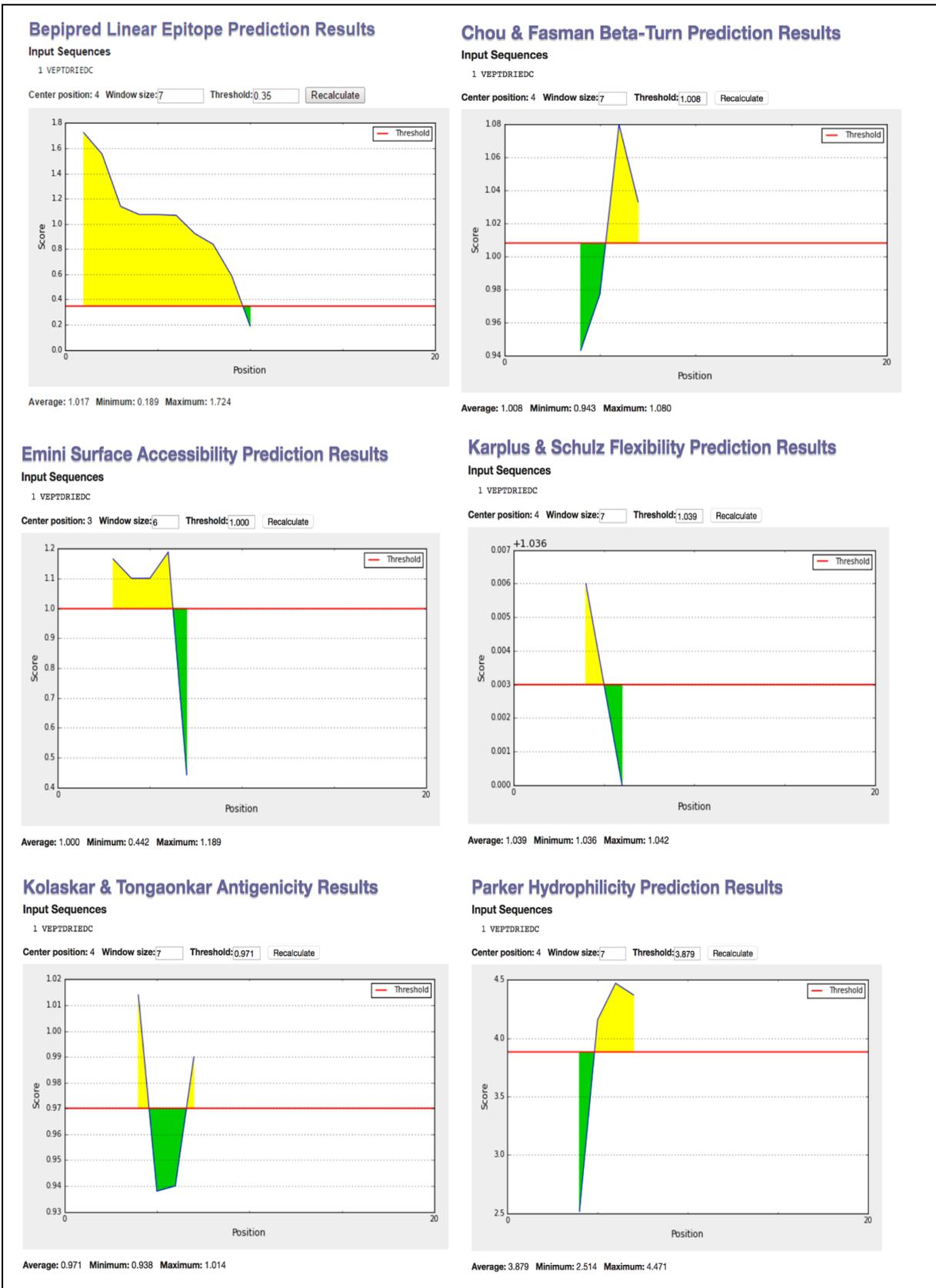
1 KMSKSDVTDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 4.564 Recalculate



Average: 4.564 Minimum: 3.714 Maximum: 5.743

Peptide TvUBI1: VEPTDRIEDC



Peptide TvUBI2: LEDGNTLQDC

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 LEDGNTLQDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



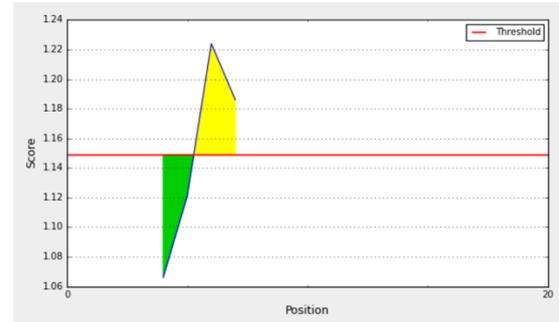
Average: 0.695 Minimum: 0.109 Maximum: 1.095

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 LEDGNTLQDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.149 Recalculate



Average: 1.149 Minimum: 1.066 Maximum: 1.224

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 LEDGNTLQDC

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



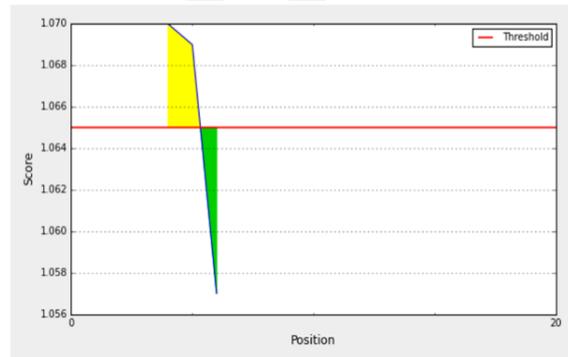
Average: 1.000 Minimum: 0.596 Maximum: 1.101

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 LEDGNTLQDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.065 Recalculate



Average: 1.065 Minimum: 1.057 Maximum: 1.070

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 LEDGNTLQDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.964 Recalculate



Average: 0.964 Minimum: 0.934 Maximum: 1.015

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

1 LEDGNTLQDC

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 3.950 Recalculate



Average: 3.950 Minimum: 2.471 Maximum: 4.957

Peptide TvUBI3: GKEAYEPLRC

Bepipred Linear Epitope Prediction Results

Input Sequences

1 GKEAYEPLR C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 0.35 Recalculate



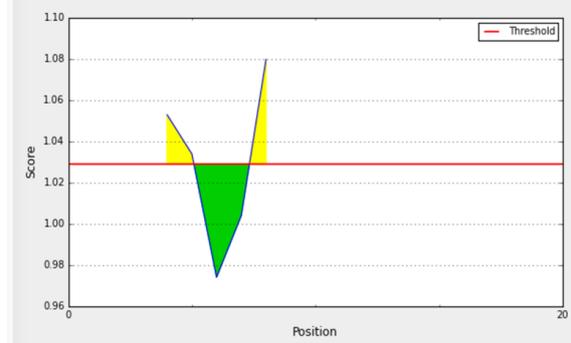
Average: 0.775 Minimum: -0.242 Maximum: 1.480

Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Results

Input Sequences

1 GKEAYEPLR C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.029 Recalculate



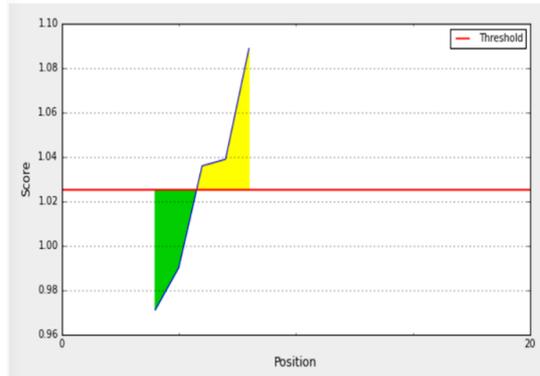
Average: 1.029 Minimum: 0.974 Maximum: 1.080

Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

1 GKEAYEPLR C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.025 Recalculate



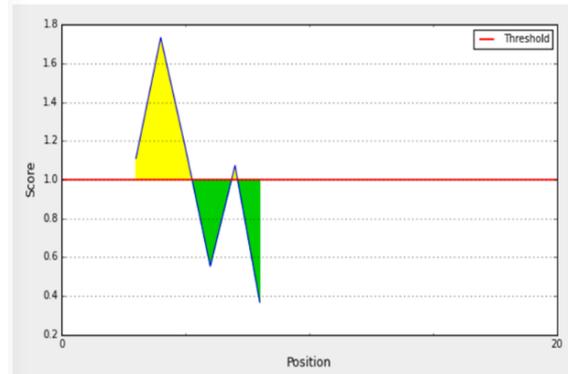
Average: 1.025 Minimum: 0.971 Maximum: 1.089

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

1 GKEAYEPLR C

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate



Average: 1.000 Minimum: 0.367 Maximum: 1.734

Karplus & Schulz Flexibility Prediction Results

Input Sequences

1 GKEAYEPLR C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.005 Recalculate



Average: 1.005 Minimum: 0.999 Maximum: 1.009

Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

1 GKEAYEPLR C

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 2.774 Recalculate



Average: 2.774 Minimum: 1.557 Maximum: 4.300

Bibliografia

- Addis M.F., Rappelli P., Delogu G., Carta F., Cappuccinelli P., and Fiori P.L. (1998). Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin and intracellular localization of the protein. *Infect. Immun.* **66**, 4924–4931.
- Addis M.F., Rappelli P., Pinto De Andrade A.M., Rita F.M., Colombo M.M., Cappuccinelli P., and Fiori P.L. (1999). Identification of *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin as the most common immunogen recognized by sera of women exposed to the parasite. *J. Infect. Dis.* **180**, 1727–1730.
- Adegbaju A, and Morenikeji, OA (2008). Cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Scientific Research and Essay* **3**, 132–138.
- Alderete J.F., and Garza G.E. (1985). Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect. Immun.* **50**, 701–708.
- Alderete JF, Newton E, Dennis C, and Neale KA (1991). The vagina of women infected with *Trichomonas vaginalis* has numerous proteinases and antibody to trichomonad proteinases. *Genitourinary Medicine.* Dec;67(6):469-74.
- Alderete J.F., Arroyo R., and Lehker M.W. (1994). Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence. *Meth. Enzymol.* **236**, 318–333.
- 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.
- Alderete J.F.(2017) Epitopes within recombinant α -actinin protein is serodiagnostic target for *Trichomonas vaginalis* sexually transmitted infections. *Helyion* **3**,1.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, and Myers EW (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Ames BN, Gold LS, and Willett WC (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* Jun 6;92(12):5258-65.
- Andrea SB, and Chapin KC (2011). Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. *Journal of Clinical Microbiology.* Mar;49(3):866-9.
- Arroyo R, and González- Robles A (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular microbiology* Jan;7(2):299-309

- Arroyo R., Engbring J., and Alderete J.F. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 6, 853–862.
- Bachmann L.H., Hobbs M.M., Seña A.C., Sobel J.D., Schwebke J.R., Krieger J.N., McClelland, R.S., and Workowski K.A. (2011). *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin. Infect. Dis.* 53 *Suppl* 3, S160–72.
- Bastida-Corcuera FD, Okumura CY, and Colocoussi A (2005). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryotic Cell* Nov;4(11):1951-8. .
- Basu A, Banerjee H, Rojas H, Martinez SR, and Roy S (2011). Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4. *The ...*
- Beach D.H., Holz 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.
- Borchardt KA, and Smith RF (1991). An evaluation of an InPouch TV culture method for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. *Genitourinary Medicine* Apr;67(2):149-52..
- Butterworth M., McClellan B., and Allansmith M. (1967). Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature* 214, 1224–1225.
- Campbell L., Woods V., Lloyd T., Elsayed S., and Church D.L. (2008). Evaluation of the OSOM *Trichomonas* rapid test versus wet preparation examination for detection of *Trichomonas vaginalis* vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3467–3469.
- Cardile V., Scifo C., Russo A., Falsaperla M., Morgia G., Motta M., Renis M., Imbriani E., and Silvestre G. (2003). Involvement of HSP70 in resveratrol-induced apoptosis of human prostate cancer. *Anticancer Res.* 23, 4921–4926.
- Carlton J.M., Hirt R.P., Silva J.C., Delcher A.L., Schatz M., Zhao Q., Wortman J.R., Bidwell S.L., Alsmark U.C., Besteiro S., et al. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207–212.
- Carney J.A., Unadkat P., Yule A., Rajakumar R., Lacey C.J., and Ackers, J.P. (1988). New rapid latex agglutination test for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Clin. Pathol.* 41, 806–808.
- Chakrabarti R.N., Dutta K., Sarkhel T., and Maity S. (1992). Cytologic evidence of the association of different infective lesions with dysplastic changes in the uterine cervix. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 13, 398–402.
- Chapin K., and Andrea S. (2011). APTIMA® *Trichomonas vaginalis*, a transcription-mediated amplification assay for detection of *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 11, 679–688.

- Checkoway H., DiFerdinando G., Hulka B.S., and Mickey D.D. (1987). Medical, life-style, and occupational risk factors for prostate cancer. *Prostate* 10, 79–88.
- Chou P.Y., and Fasman G.D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47, 45–148.
- Ciocca DR, and Calderwood SK (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*.
- Conroy H., Mawhinney L., and Donnelly S.C. (2010). Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link. *QJM* 103, 831–836.
- Da Costa R.F., de Souza W., Benchimol M., Alderete, J.F., and Morgado-Diaz J.A. (2005). *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Res.* 15, 704–716.
- Coussens LM, and Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* Dec 19-26;420(6917):860-7.
- Coutts W.E., Silva-Inzunza e., and Tallman B. (1959). Genitourinary complications of non-gonococcal urethritis and trichomoniasis in males. *Urol. Int.* 9, 189–208.
- Cuccuru M.A., Dessì D., Rappelli P., and Fiori P.L. (2012). A simple, rapid and inexpensive technique to bind small peptides to polystyrene surfaces for immunoenzymatic assays. *J. Immunol. Methods* 382, 216–219.
- Dailey D.C., Chang T.H., and Alderete J.F. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101 Pt 2, 171–175.
- Van Der Pol B., Williams J.A., Orr D.P., Batteiger B.E., and Fortenberry J.D. (2005). Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. *J. Infect. Dis.* 192, 2039–2044.
- Dessì D., Delogu G., Emonte E., Catania M.R., Fiori P.L., and Rappelli P. (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.
- Dessì D., Rappelli P., Diaz N., Cappuccinelli P., and Fiori P.L. (2006). *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. *Front. Biosci.* 11, 2028–2034.
- Diamond L.S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488–490.
- Diamond L.S., Harlow D.R., 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.
- Diaz N., Dessì D., Dessole S., Fiori P.L., and Rappelli P. (2010). Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* by a new multiplex polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67, 30–36.

Donnè A. (1836). Animacules observés dans le matières purulente set le produit des sécrétions des organes genitaux de l'homme et de la femme. *Sci Paris* 3: 385-386.

Draper D, Parker R, Patterson E, and Jones W (1993). Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with the InPouch TV culture system. *Journal of Clinical Microbiology* Apr;31(4):1016-8.

Emini E.A., Hughes J.V., Perlow D.S., and Boger J. (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55, 836–839.

Feinberg JG, and Whittington MJ (1957). A culture medium for *Trichomonas vaginalis* donné and species of *Candida*. *Journal of Clinical Pathology*. Nov;10(4):327-9.

Fichorova R.N. (2009). Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology* 83, 185–189.

Fichorova RN, Trifonova RT, and Gilbert RO (2006). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infection and immunity* Oct;74(10):5773-9.

Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, and Sechi A (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microbial Pathog.* Feb;20(2):109-18.

Fiori PL, Rappelli P, and Addis MF (1999). The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes and Infection*. Feb;1(2):149-56.

Fish E.N. (2008). The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 737–744.

Fleury F.J. (1979). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *JAMA* 242, 2556–2557.

Garber GE, Sibau, L, Ma, R, and Proctor, EM (1987). Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology* Jul;25(7):1275-9

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.

Glickman M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.

Gouy M, Guindon S., and Gascuel O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.

Gram I.T., Macaluso M., Churchill J., and Stalsberg H. (1992). *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes Control* 3, 231–236.

Groom H., Warren AY, Neal DE, and Bishop KN (2012). No evidence for infection of UK prostate cancer patients with XMRV, BK virus, *Trichomonas vaginalis* or human papilloma viruses. *PloS One*. 7(3):e34221

Hamann L, Nickel R, and Tannich E (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Sep 12;92(19):8975-9

Hirt RP, and Sherrard J (2015). *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2015 Feb;28(1):72-9

Hirt R.P., Noel C.J., Sicheritz-Ponten T., Tachezy, J., and Fiori, P.-L.L. (2007). *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol*. 23, 540–547.

Hobbs M.M., and Seña, A.C. (2013). Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect* 89, 434–438.

Hofmann B., Hecht H.-J.J., and Flohé L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol. Chem*. 383, 347–364.

Hollman D, Coupey SM, Fox AS, and Herold BC (2010). Screening for *Trichomonas vaginalis* in high-risk adolescent females with a new transcription-mediated nucleic acid amplification test (NAAT): associations with . *Journal of Pediatric Adolescent ethnicity, symptoms, and prior and current STIs.gynecologyand* Oct;23(5):312-6.

Honigberg BM, and King VM (1964). Structure of *Trichomonas vaginalis* Donne. *The Journal of Parasitology* 345–364.

Honigberg B.M. (1990). *Trichomonads parasitic in humans. Structure*. Ed Springer-Verlag: 5-35.

Hrdy I., Hirt R.P., Dolezal P., Bardonová L., Foster P.G., Tachezy J., and Embley T.M. (2004). *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432, 618–622.

Huppert JS, Mortensen JE, and Reed JL (2007). Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clinical Infectious Disease* Jul 15;45(2):194-8

Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, and Garrido C (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*. May 28;332(2):275-85

Jr G.W., and Culberson DE (1986). *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine Online* May;110(5):430-2.....

Jr G.W., and Culberson DE (1990). Pathology of urogenital trichomoniasis in men. *Trichomonads Parasitic in Humans* May;110(5):430-2.

Karplus PA, and Schulz GE (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*. Springer

- Kim K.K., Jang T.J., and Kim J.R. (1998). HSP70 and ER expression in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. Korean Med. Sci.* 13, 383–388.
- Kingston M.A., Bansal D., and Carlin E.M. (2003). “Shelf life” of *Trichomonas vaginalis*. *Int J STD AIDS* 14, 28–29.
- Kissinger P (2015). *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*. Aug 5;15:307
- 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.
- Kolaskar AS, and Tongaonkar PC (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4.
- Kostic P.K. (1959). The importance of study of trichomonas infection in the male. *Urol. Int.* 9, 171–177.
- Kott H., and Adler S. (1961). A serological study of *Trichomonas* sp. parasitic in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 55, 333–344.
- Krieger JN (1995). Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sexually Transmitted Diseases*. Mar-Apr;22(2):83-96.
- Krieger JN, Riley DE, and Roberts MC (1996). Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis. *Journal of Clinical Microbiology* Dec;34(12):3120-8.
- Krieger J.N., Holmes K.K., Spence M.R., Rein M.F., McCormack W.M., and 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.
- Krieger J.N., Tam M.R., Stevens C.E., Nielsen I.O., Hale J., Kiviati N.B., and 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.
- 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.
- Kucknoor A.S., Mundodi V., and Alderete J.F. (2005). Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infect. Immun.* 73, 6472–6478.
- Larsen J.E., Lund O., and Nielsen M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2, 2.
- Lehker M.W., and Alderete J.F. (1992). Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol. Microbiol.* 6, 123–132.

- Lehker M.W., and Alderete J.F. (2000). Biology of trichomonosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13, 37–45.
- 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.
- Li L, Zhang YG, and Chen CL (2013). Anti-apoptotic role of peroxiredoxin III in cervical cancer cells. *FEBS Open Bio.*
- Li J., Wang X., Zhang Y., and Zhang Y. (2016). E3 ubiquitin ligase isolated by differential display regulates cervical cancer growth in vitro and in vivo via microRNA-143. *Exp Ther Med* 12, 676–682.
- Libert C, Dejager L, and Pinheiro I (2010). The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature Reviews Immunology.* Aug;10(8):594-604.
- Lindmark D.G., and Müller M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248, 7724–7728.
- 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.
- Van Lunzen J., and Altfeld M. (2014). Sex differences in infectious diseases-common but neglected. *J. Infect. Dis.* 209 Suppl 3, S79–80.
- Maio D.A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! *Cell Stress and Chaperones.* May;16(3):235-49
- Maio D.A., and Vazquez D (2013). Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock (Augusta)* Oct;40(4):239-46.
- Martinez-Garcia F, Regadera J, and Mayer R (1996). Protozoan infections in the male genital tract. *The Journal of Urology* Aug;156(2 Pt 1):340-9.
- Mason P.R., and Patterson B.A. (1985). Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 71, 265–268.
- Masue N., Deguchi T., Yokoi S., Yamada T., Ohkusu K., and Ezaki T. (2007). System for simultaneous detection of 16 pathogens related to urethritis to diagnose mixed infection. *Int. J. Urol.* 14, 39–42.
- McClelland EE, and Smith JM (2011). Gender specific differences in the immune response to infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* Jun;59(3):203-13.

McClelland RS, Sangaré L, and Hassan WM (2007). Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Disease* Mar 1;195(5):698-702

Menezes C., Mello M., and Tasca T. (2016). Comparison Of Permanent Staining Methods For The Laboratory Diagnosis Of Trichomoniasis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2016;58:5

Mitteregger D., Aberle S.W., Makristathis A., Walochnik J., Brozek W., Marberger M., and Kramer G. (2012). High detection rate of *Trichomonas vaginalis* in benign hyperplastic prostatic tissue. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 113–116.

Morada M., Smid O., Hampl V., Sutak R., Lam B., Rappelli P., Dessi D., Fiori P.L., Tachez J., and Yarlett N. (2011). Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 176, 51–54.

Müller M. (1992). Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. *BioSystems* 28, 33–40.

Müller M. (1993). The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2879–2889.

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.

Neace C.J., and Alderete J.F. (2013). Epitopes of the highly immunogenic *Trichomonas vaginalis* α -actinin are serodiagnostic targets for both women and men. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2483–2490.

Nielsen M.H., and Diemer N.H. (1976). The size, density, and relative area of chromatic granules (“hydrogenosomes”) in *Trichomonas vaginalis* Donne from cultures in logarithmic and stationary growth. *Cell Tissue Res.* 167, 461–465.

North MJ (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiological Reviews* Sep;46(3):308-40

North MJ (1994). Cysteine endopeptidases of parasitic protozoa. *Methods in Enzymology.*

Novy R., Don Keith , and Robert (2001). Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression. *Inovations Newsletter Of Novagen, Inc.* 12

Ohta T, and Fukuda M (2004). Ubiquitin and breast cancer. *Oncogene.* Mar 15;23(11):2079-88.

Okumura C., Baum LG, and Johnson PJ (2008). Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cellular Microbiology.* Oct;10(10):2078-90

Ortiz D., and Johnson P.J. (2003). Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 43–49.

Palm J.E., Weiland M.E., Griffiths W.J., Ljungström I., and Svärd, S.G. (2003). Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J. Infect. Dis.* *187*, 1849–1859.

Papanicolaou GN, and Wolinska WH (1955). Vaginal cytology in *Trichomonas* infestation. *International Record of Medicine and General Practice Clinics journal Sep*;168(9):551-6

Parker J.M., Guo D., and Hodges R.S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* *25*, 5425–5432.

Pereira-Neves A., and Benchimol M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol. Cell* *99*, 87–101.

Perkins A., Nelson K.J., Parsonage D., Poole L.B., and Karplus P.A. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 435–445.

Petrin D., Delgaty K., Bhatt R., and Garber G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 300–317.

Pickart C.M., and Eddins M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1695*, 55–72.

Pol V.B., Kwok C, and Pierre-Louis B (2008). *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *Journal of Infectious Feb* 15;197(4):548-54

Van der Pol B. (2007). *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clin. Infect. Dis.* *44*, 23–25.

Popovic D, Vucic D, and Dikic I (2014). Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nature Medicine.* Nov;20(11):1242-53.

Rappelli P., Rocchigiani A.M., Erre G., Colombo M.M., Cappuccinelli P., and Fiori PL. (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.

Riley D.E., Roberts M.C., Takayama T., and Krieger J.N. (1992). Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* *30*, 465–472.

Ritossa F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* *1*, 97–98.

Roberts C.W., Walker W., and Alexander J. (2001). Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 476–488.

Roth AM, Williams JA, Ly R, and Curd K (2011). Changing sexually transmitted infection screening protocol will result in improved case finding for *Trichomonas vaginalis* among high-risk female populations. *Sexually Transmitted Diseases May*;38(5):398-400

- Ryan C.M., Mehlert A., Richardson J.M., Ferguson M.A., and Johnson P.J. (2011). Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: a role for short galactose (β 1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *J. Biol. Chem.* 286, 40494–40508.
- Adu-Sarkodie Y., Opoku B.K., Danso K.A., Weiss H.A., and Mabey D. (2004). Comparison of latex agglutination, wet preparation, and culture for the detection of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect* 80, 201–203.
- Schwebke J.R., and Burgess D. (2004). Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 794–803.
- Schwebke JR, Hobbs MM, and Taylor SN (2011). Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a prospective US clinical trial. *Journal of Clinical.*
- Sharma A., Sojar H.T., Glurich I., Honma K., Kuramitsu H.K., and Genco R.J. (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.
- Singh BN, Lucas JJ, Beach DH, and Shin ST (1999). Adhesion of *Trichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infection and immunity* Aug;67(8):3847-54
- Škerk V, Schönwald S, Krhen I, and Markovinović L (2002). Aetiology of chronic prostatitis. *International Journal of Antimicrobial Agent* Jun;19(6):471-4.
- Smith (1987). *Current Concept and Approches to the Study of Prostate Cancer*. Alan Liss, Inc NY USA 317-325.
- Soper D (2004). Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* Jan;190(1):281-90.
- Stark J.R., Judson G., Alderete J.F., Mundodi V., Kucknoor A.S., Giovannucci E.L., Platz E.A., Sutcliffe S., Fall K., Kurth T., et al. (2009). Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 1406–1411.
- Steinbüchel A., and Müller M. (1986). Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 57–65.
- Steinbüchel A., and Müller M. (1986). Glycerol, a metabolic end product of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 45–55.
- Stree, D.A., Taylor-Robinson D., Ackers J.P., Hanna N.F., and 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.
- Studier F.W., and Moffatt B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Su K.E. (1982). Antibody to *Trichomonas vaginalis* in human cervicovaginal secretions. *Infect. Immun.* 37, 852–857.

- Sutcliffe S (2010). Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future Oncology*. Aug;6(8):1289-311
- Sutcliffe S, Giovannucci E, Alderete JF, and Chang TH (2006). Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Biomarkers & Prevention*. May;15(5):939-45.
- Sutcliffe S., Alderete J.F., Till C., Goodman P.J., Hsing A.W., Zenilman J.M., De Marzo A.M., and Platz E.A. (2009). Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. *Int. J. Cancer* 124, 2082–2087.
- Sutcliffe S., Neace C., Magnuson N., Reeves R., and Alderete J. (2012). Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis A Proposed Molecular Mechanism. *Plos Pathog* 8, e1002801.
- Tiwara S, Passey M, Clegg A, and Mgone C (1996). High prevalence of trichomonal vaginitis and chlamydial cervicitis among a rural population in the highlands of Papua New Guinea. *Papua and New Guinea Medical Journal* Sep;39(3):234-8.
- Ton Nu P.A., Rappelli P., Dessi D., Nguyen V.Q., and Fiori P.L. (2015). Kinetics of circulating antibody response to *Trichomonas vaginalis*: clinical and diagnostic implications. *Sex Transm Infect* 91, 561–563.
- Twu O., Dessí D., Vu A., Mercer F., Stevens G.C., de Miguel N., Rappelli P., Cocco A.R., Clubb R.T., Fiori P.L., et al. (2014). *Trichomonas vaginalis* homolog of macrophage migration inhibitory factor induces prostate cell growth, invasiveness, and inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8179–8184.
- Ummanni R., Barreto F., Venz S., Scharf C., Barrett, C., Mannsperger, H.A., Brase, J.C., Kuner, R., Schlomm, T., Sauter, G., et al. (2012). Peroxiredoxins 3 and 4 are overexpressed in prostate cancer tissue and affect the proliferation of prostate cancer cells in vitro. *J. Proteome Res.* 11, 2452–2466.
- Vancini R.G., and Benchimol M. (2008). Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *Arch. Microbiol.* 189, 7–18.
- Viikki M., Pukkala E., Nieminen P., and Hakama M. (2000). Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol* 39, 71–75.
- Watt L., and Jennison R.F. (1960). Incidence of *Trichomonas vaginalis* in marital partners. *Br J Vener Dis* 36, 163–166.
- Watt R.M., Philip A., Wos S.M., and Sam G.J. (1986). Rapid assay for immunological detection of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 24, 551–555.
- Wen M, Kwon Y, Wang Y, Mao JH, and Wei G (2015). Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer. *Oncotarget* Sep 22;6(28):25226-39

- Weston T.E., and Nicol C.S. (1963). Natural History of Trichomonal Infection in Males. *Br J Vener Dis* 39, 251–257.
- WHO (2012). Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections-2008. Geneva: World Health Organization.
- Wood Z.A., Schröder E., Robin Harris J., and Poole L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, and Graham MW (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* 17, 3469–3478.
- Workowski K.A., and Bolan G.A. (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep* 64, 1–137.
- Wynder E.L., Mabuchi K., and Whitmore W.F. (1971). Epidemiology of cancer of the prostate. *Cancer* 28, 344–360.
- Wølner-Hanssen P., Krieger J.N., Stevens C.E., Kiviat N.B., Koutsky L., Critchlow C., DeRouen T., Hillier S., and Holmes K.K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *JAMA* 261, 571–576.
- Yadav M., Dubey M.L., Gupta I., Bhatti G., and Malla N. (2007). Cysteine proteinase 30 in clinical isolates of *T. vaginalis* from symptomatic and asymptomatic infected women. *Exp. Parasitol.* 116, 399–406.
- Yano A., Yui K., Aosai F., Kojima S., Kawana T., and Ovary, Z. (1983). Immune response to *Trichomonas vaginalis*. IV. Immunochemical and immunobiological analyses of *T. vaginalis* antigen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72, 150–157.
- Yap E.H., Ho T.H., Chan Y.C., Thong T.W., Ng G.C., Ho L.C., and Singh M. (1995). Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. *Genitourin Med* 71, 402–404.
- Yarlett N., Martinez M.P., Moharrami M.A., and Tachezy J. (1996). The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78, 117–125.
- Yee J., and Nash T.E. (1995). Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 5615–5619.
- Yusof A.M., and Kumar S. (2012). Phenotypic “variant” forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from cervical neoplasia patients. *Exp. Parasitol.* 131, 267–273.
- Zhang Y, Huang Z, Zhu Z, and Liu J (2014). Network analysis of ChIP-Seq data reveals key genes in prostate cancer. *Journal of Medical Research* Sep 3;19:47

Zhang Z., Miller W., Schäffer A.A., Madden T.L., Lipman D.J., Koonin E.V., and Altschul, S.F. (1998). Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. *Nucleic Acids Research* 26, 3986–3990.

Zubáčová Z., Cimbůrek Z., and Tachezy J. (2008). Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 161, 49–54.